



УДК 557.323..023.088.5

ВЛИЯНИЕ ПОДЛОЖЕК ПРИ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ ДНК И КОМПЛЕКСОВ ДНК С ТРИВАЛИНОМ НА ИХ СТРУКТУРУ

© 2003 г. Д. В. Клинов[#], Л. П. Мартынкина^{**}, В. Ю. Юрченко^{***}, В. В. Демин^{*},
С. А. Стрельцов^{**}, Ю. А. Герасимов^{*}, Ю. Ю. Венгеров^{**}

^{*}Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
РАН, 117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

^{**}Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва;

^{***}Институт медицинских исследований им. Пиковеера, Нью-Йорк

Поступила в редакцию 19.10.2001 г. Принята к печати 08.10.2002 г.

Методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) получены изображения линейной и кольцевой ДНК и комплексов кольцевой ДНК с синтетическим пептидом тривалином с применением традиционно используемой для АСМ подложки – слюды и альтернативной поверхности – высокоориентированного модифицированного пиролитического графита (ВОПГ). Предложен метод модификации ВОПГ, позволяющий адсорбировать ДНК и комплексы ДНК с тривалином на такую поверхность. Показано, что при нанесении на слюду имеют место заметные искажения структуры, как очищенной ДНК, так и ее комплексов с тривалином: для ДНК наблюдается уменьшение высоты молекул, а для ее комплексов с тривалином – существенные изменения формы кольцевых компактных структур. В то же время применение ВОПГ-подложки позволяет сохранить структурную целостность исследуемых комплексов и увеличить наблюдаемую высоту молекул ДНК до 2 нм. Показано, что с помощью АСМ с применением ВОПГ хорошо выявляются особые точки комплексов, где, в соответствии с имеющимися моделями их организации, сходится большое количество претерпевающих излом фибрилл. Полученные результаты дают дополнительную информацию об организации ДНК в составе комплексов с тривалином, а также представляют методический интерес, так как расширяют возможности применения АСМ для исследований ДНК и комплексов ДНК с лигандами.

Ключевые слова: атомно-силовая микроскопия; подложки; высокоориентированный пиролитический графит; тривалин; ДНК; компактизация.

ВВЕДЕНИЕ

Атомно-силовая микроскопия (АСМ) – сравнительно молодой метод, позволяющий анализировать в нанометровом масштабе микрорельеф поверхности. Подходы АСМ, предоставляющие дополнительную информацию к данным, получаемым такими традиционными методами, как электронная микроскопия, активно развивались рядом научных групп для исследований ДНК. Методические исследования велись, в основном, в направлении разработки адекватных методов подготовки препаратов ДНК на различных подложках-носителях [1–4].

К подложкам, используемым для АСМ-исследований биополимеров, выдвигаются следующие общие требования: поверхность должна быть достаточно ровной и хорошо адсорбировать исследуемые объекты. Основной рутинно используемой подложкой для АСМ биообъектов, в частности

ДНК, является слюда [4]. Слюда имеет гидрофильную поверхность с атомарно-ровными участками, размером более 100 мкм. Однако уже первые исследования ДНК на слюдяных подложках выявили их существенные недостатки, такие, как отрицательный заряд поверхности, значительные деформирующие адгезионные силы при адсорбции и высушивании. Для преодоления этих недостатков в ультраструктурных исследованиях ДНК использовалась модификация поверхности слюды двухвалентными катионами [5, 6], силанами [4] или спрединг-агентами [7].

Наряду со слюдой высокоориентированный пиролитический графит (ВОПГ) имеет поверхность с атомарно-ровными участками, легко возобновляемую простым скалыванием. В отличие от поверхности слюды, поверхность ВОПГ инертна и гидрофобна, поэтому посадка биообъектов на его поверхность и получение стабильных АСМ-изображений при сканировании одиночных биомолекул и их комплексов остаются нетривиальной задачей [8].

С использованием различных вариантов подготовки объектов для АСМ и различных типов

Сокращения: АСМ – атомно-силовая микроскопия; ВОПГ – высокоориентированный пиролитический графит; ЭМ – электронная микроскопия.

[#] Автор для переписки (эл. почта: klinov@ibch.ru; тел.: (095) 336-19-88).

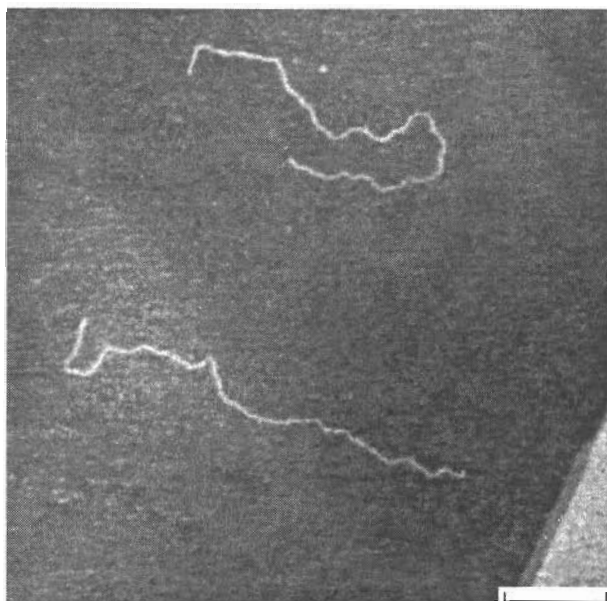


Рис. 1. АСМ-изображение молекул ДНК (плазмида рGem7zf+ (3000 п.о.), линейаризованная по сайту *Sma*I), адсорбированных на поверхности модифицированного ВОПГ. Длина отрезка 200 нм.

носителей-подложек рядом авторов были получены изображения и проведены исследования двунитевых и однонитевых ДНК [1]. Предлагается использовать АСМ как рутинный метод для определения длины фрагментов ДНК [3, 9]. Эффективным оказалось применение АСМ для картирования ДНК при формировании R-петель [3].

Представляется перспективным применение АСМ для изучения также более сложноорганизованных объектов, таких, как комплексы ДНК с белками и другими лигандами. Изучение этих объектов сопряжено с дополнительными трудностями, так как они менее стабильны, чем ДНК, к воздействию многих факторов. АСМ может дать дополнительную информацию об укладке нитей ДНК в составе комплексов, возможность избежать артефактов, связанных с окрашиванием или контрастированием препаратов при применении методов электронной микроскопии.

В нашей работе предполагалось разработать метод модификации ВОПГ, позволяющий исследовать ДНК и ДНК-белковые комплексы на этой подложке при помощи АСМ, сопоставить данные о морфологии препаратов линейной и кольцевой ДНК и комплексов кольцевых ДНК с синтетическим пептидом тривалином ($H-(L-Val)_3-(NH)_2-Dns$) при приготовлении препаратов для АСМ на традиционно используемой для АСМ подложке – слюде и альтернативной поверхности – высокоориентированном модифицированном пиролютическом графите. Комплексы кольцевой суперскрученной ДНК с тривалином были выбраны на-

ми в качестве тестового объекта, так как имеют легко узнаваемую регулярную кольцевую структуру, хорошо изучены морфологически и представляют собой подробно охарактеризованный объект при помощи электронной микроскопии [10–12].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

До сих пор влияние поверхности подложки на наблюдаемую в АСМ структуру биообъекта остается малоизученным. Во многих случаях эти изменения при взаимодействии объекта со слюдой малы в силу его исходной стабильности. Выбор подложек для АСМ достаточно ограничен.

Альтернативная для слюды подложка – высокоориентированный пиролютический графит (ВОПГ). Однако требуется модификация поверхности ВОПГ для посадки биомолекул. Ранее, обработка в газовом тлеющем разряде в парах пентиламина применялась для активации подложек в электронной микроскопии [13]. Предложенный нами недавно метод [14] позволяет однородно модифицировать поверхность ВОПГ в плазме паров воды, оставляя ее достаточно ровной. После процедуры модификации поверхность ВОПГ шероховата (среднеквадратичное отклонение 0.3–0.5 нм), имеет перепады высоты (впадина-пик) 0.4–1 нм, хорошо связывает молекулы ДНК и другие биообъекты и пригодна для АСМ-исследований.

Типичные изображения линейных молекул ДНК, адсорбированных на поверхности модифицированного ВОПГ, наблюдаемых в воздушном окружении, представлены на рис. 1. АСМ-изображения молекул ДНК, адсорбированных на поверхности модифицированного ВОПГ, достаточно стабильны и не нарушаются при многократном сканировании, несмотря на то, что получаются в режиме контактного сканирования (contact mode), при этом воздействие микрозонда на биообъект во время сканирования более деструктивное, чем при использовании резонансного режима (tapping mode).

Высота молекул ДНК, адсорбированных на поверхности модифицированного ВОПГ, составляет 1.5 ± 0.3 нм в условиях воздушного окружения и 2.2 ± 0.3 нм – при обдуве теплым азотом. Наблюдаемая в АСМ высота молекул близка к диаметру ДНК в растворе. В отличие от этого, высота молекул ДНК, измеряемая при помощи АСМ с адсорбцией на слюде, составляет 0.5–0.7 нм, что указывает на существенное изменение конформации ДНК при взаимодействии со слюдой [15]. Возможно также, что в уменьшение наблюдаемой высоты ДНК на слюде вносит вклад давление зонда при сканировании. Однако из имеющихся данных можно сделать вывод, что уже при адсорбции и последующем высушивании молеку-

лы ДНК на слюде сильно деформируются [15], и, вероятно, это главная причина наблюдаемого уменьшения. Тем не менее общий вид молекул (контурная длина, плавность изгиба) на АСМ-изображениях при применении слюды и ВОПГ примерно одинаков.

Как наблюдалось ранее, более крупные биообъекты также могут сжиматься при адсорбции на твердой подложке. Так, при АСМ-исследовании бактериофагов была обнаружена существенно большая деформация головок при адсорбции на слюде (20%), чем на ВОПГ (10%) [16]. Хвосты бактериофагов имеют более плотную упаковку и несжимаемы при адсорбции на слюду и ВОПГ.

В плане сопоставления свойств подложек представляло интерес выяснить, как нанесение на те или иные подложки будет влиять на объект со сложной, но хорошо охарактеризованной организацией. К такому типу объектов можно отнести комплексы суперскрученной ДНК с тривалином [10].

Как мы показали в данной работе, комплексы ДНК с тривалином имеют разный вид при нанесении на разные подложки для АСМ (графит или слюда), причем тип подложки существенно влияет не только на наблюдаемую высоту, но и на саму структуру комплексов. Степень компактизации ДНК в составе комплексов определяется как отношение контурной длины некомпактизованных ДНК к длине комплексов. Форма комплексов, адсорбированных на поверхности модифицированного ВОПГ, степень компактизации ДНК в составе комплексов, их общее расположение на АСМ-изображении (рис. 2а) аналогичны наблюдаемой при электронной микроскопии [17]. На рис. 2в приведено АСМ-изображение препарата кольцевой суперскрученной ДНК, нанесенной на подложку ВОПГ и имеющей типичную для таких молекул морфологию и толщину. Можно предположить, что процедура приготовления образца для АСМ и сам метод визуализации не вносят дополнительных заметных искажений в структуру наблюдаемых биообъектов по сравнению с электронной микроскопией.

В случае адсорбции комплексов ДНК с тривалином на поверхность слюды наблюдается иная картина (рис. 2б): на АСМ-изображении подавляющее большинство кольцевых структур, хотя и сохраняют свою длину и вполне узнаваемы, теряют правильную форму. Они явно напряжены и часто содержат участки с нехарактерными изломами и острыми углами. Все эти искажения структуры, вероятно, объясняются тем, что при частичном разрушении комплексов в ходе их адгезии на слюде высвобождается запасенная внутренняя упругая энергия (аналогично суперскрученным молекулам ДНК), что приводит к искажениям остова комплексов. По-видимому, нанесенные на слюду комплексы ДНК с тривалином уже не яв-

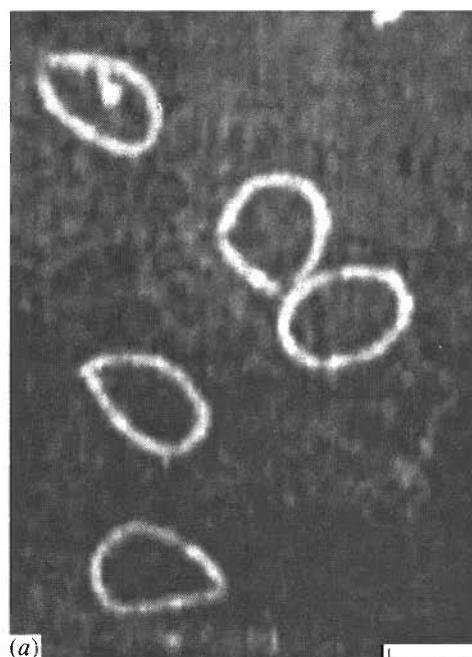


Рис. 2. АСМ-изображение комплексов кольцевых суперскрученных плазмид рВR322 (4360 п.о.) с тривалином, адсорбированных на поверхности модифицированного ВОПГ (а) и на поверхности слюды (б), а также АСМ-изображение препарата кольцевой суперскрученной ДНК плазмиды рВR322 (4360 п.о.), нанесенной на подложку ВОПГ (в). Длина отрезка 100 нм.

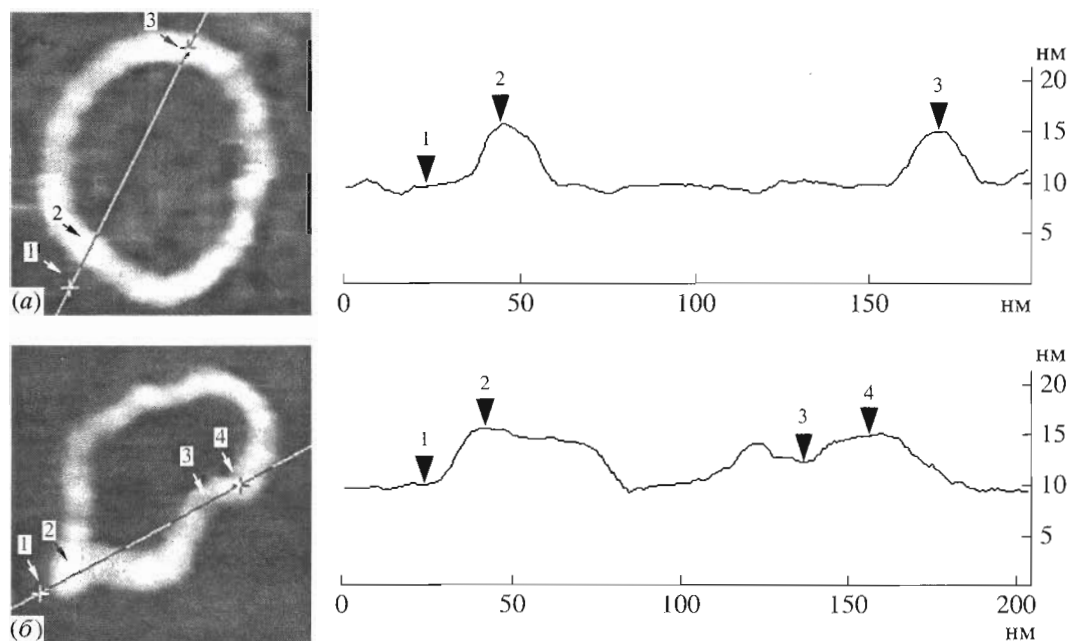


Рис. 3. АСМ-изображение комплекса кольцевой суперскрученной плазмиды рВR322 (4360 п.о.) с тривалином, адсорбированного на поверхности модифицированного ВОПГ (а) и на поверхности слюды (б). Размер изображения 180 нм. Справа приведено сечение вдоль обозначенной линии. Измеренная высота соответствует для (а): между точкой 1 и 2 – 6.1, между 1 и 3 – 5.5 нм; для (б): между точкой 1 и 2 – 5.5, между 1 и 3 – 2.5, между 1 и 4 – 4.8 нм.

ляются плоскими и некоторые участки формирующих фибрилл не прилегают к подложке и приподняты над ней, что и фиксируется на АСМ-изображениях.

На рис. 3а и 3б приведены АСМ-изображения с профилями сечений двух типичных комплексов ДНК–тривалин, нанесенных на ВОПГ и на слюду соответственно. Измерения высоты комплексов показывают, что среднее значение при АСМ-наблюдении на ВОПГ составляет 6.1 ± 0.2 нм (рис. 3а). Это хорошо согласуется с данными о толщине комплексов по измерениям на окрашенных уранилацетатом ЭМ-препаратах [10]. При АСМ-исследованиях на слюде среднее значение высоты колец соответствует 4.9 ± 0.7 нм (рис. 3б), что указывает на сжатие фибрилл на этом типе подложек. Также обращает на себя внимание значительное увеличение разброса измеряемых высот комплексов на слюде, который составляет 0.7 нм по сравнению с 0.2 нм на ВОПГ. Скорее всего, разрушение частично, и некоторые участки кольца остаются в неповрежденном состоянии.

На АСМ-изображении на слюде (рис. 3б), типичном для этой подложки, видны сегменты с высотами, близкими к 5.5–5.8 нм, которые соединены участками с высотами 3.9–4.8 нм. Наиболее высокие точки таких колец чаще всего совпадают с точками изломов фибрилл, что свидетельствует или об утолщении фибрилл в этих точках, или об их приподнятости над поверхностью подложки. АСМ-изображения комплексов ДНК с

тривалином на ВОПГ характеризуются гораздо большей однородностью формирующих их фибрилл по высоте.

Таким образом, показано, что тройные кольца при приготовлении препаратов для АСМ на слюде подвергаются заметным деформациям, в то время как на подложках модифицированного пиролитического графита при использовании разработанных методических приемов их регулярная организация сохраняется.

Значительный интерес могут представлять АСМ-данные о высоте различных фрагментов исследуемых объектов, в особенности в тех случаях, которые имеют более сложную, чем просто кольца, форму. Так, необычные структуры, формируемые мономерными и димерными кольцевыми молекулами плазмиды рТво-1 с тривалином [17, 18] имеют хорошо выявляемые на АСМ-изображениях утолщения (рис. 4а, 4б), локализованные в точках перехода двух фибрилл в одну (отмечены стрелками).

В соответствии с предложенной ранее моделью укладки фибрилл ДНК в составе подобных компактных структур [17], именно в этих точках сходится большое количество претерпевающих излом фибрилл ДНК и соответственно возможны несовершенства укладки фибрилл, визуализируемые как утолщения. В любом случае АСМ-изображения четко указывают на эти точки, как на “особые”, в составе описываемых структур. Предлагаемая методика АСМ-исследований с ис-

пользованием модифицированного ВОПГ перспективна в исследовании ДНК и ДНК-белковых комплексов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Тривалин [$\text{H}-(\text{L-Val})_3-(\text{NH})_2-\text{Dns}$] синтезировали как описано в работе Макарова и соавт. [15].

ДНК плазмиды pGem7zf+ (3000 п.о.) была линеаризована по сайту *Sma*I (Promega). Препараты кольцевых суперскрученных плазмид pBR322 (4360 п.о.) и pTbo-1 (6120 п.о.) очищали с помощью набора "Wizard Minipreps DNA Purification System" (Promega) по стандартной методике.

Комплексы тривалина с ДНК кольцевых суперскрученных плазмид pBR322 и pTbo-1 готовили путем прямого смешивания водно-трифторэтанольного раствора пептида и раствора ДНК в 1 мМ какодилатном буфере, pH 7.0 [11]. Конечный раствор содержал 10 мкг/мл ДНК и 25% трифторэтанола. Концентрация тривалина варьировала от 0 до 0.3 мМ.

Модификация поверхности ВОПГ. ВОПГ был любезно предоставлен Институтом графита (Москва, Россия). Свежесколотый ВОПГ помещался в атмосферу паров воды при давлении около 10^{-2} торр, на электроды подавалось напряжение от 500 до 1000 В, при котором начиналось легкое фиолетовое свечение. Обработку в тлеющем газовом разряде проводили 15–30 с [16, 17]. Модифицированные таким способом подложки использовали для адсорбции ДНК не позже, чем через 30 мин.

Приготовление образцов для АСМ. Раствор ДНК плазмиды pGem7zf+ в 10 мМ MgCl_2 , 20 мМ NH_4Ac , pH 7.0, 5 мкл (концентрация ДНК 1–2 мкг/мл) наносили на поверхность модифицированного ВОПГ, выдерживали 1–5 мин, после чего поверхность промывали водой и высушивали аргоном.

Раствор комплекса ДНК–тривалин наносили на поверхность свежесколотой слюды и модифицированного ВОПГ в объеме 5 мкл, адсорбировали 1 мин, удаляли излишки с помощью фильтровальной бумаги и без промывки высушивали аргоном.

Атомно-силовую микроскопию образцов производили на приборах Solver P47 ВЮ (НТ-МДТ, г. Зеленоград, Россия) и Nanoscope II (Digital Instruments, США) с использованием D и J сканеров. Калибровку прибора осуществляли по коллоидному золоту с размером частиц 10 нм (Sigma, США) и по дифракционным решеткам. Сканирование проводили в контактном режиме с использованием системы обратной связи. Скорость сканирования соответствовала 7–14 Гц. Использовали кантилеверы (Digital Instruments, США) с коэффициентом упругости 0.06, 0.12, 0.38, 0.53 Н/м. Углы сканирования составляли 90 и 180°. Изображения

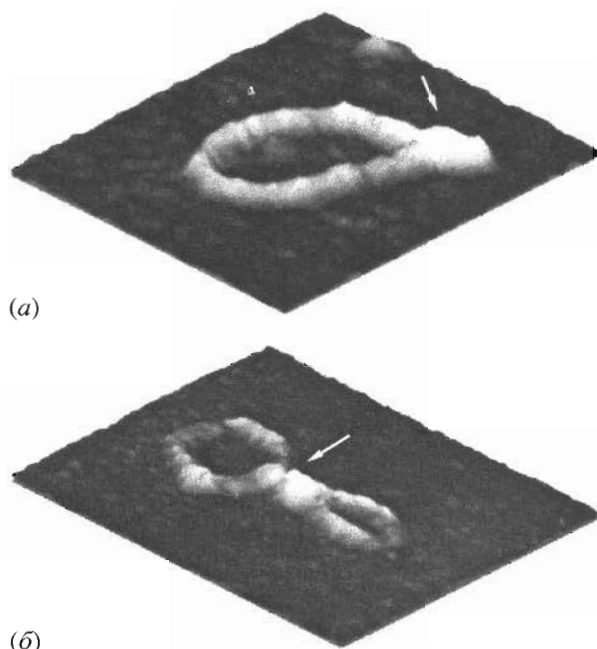


Рис. 4. АСМ-изображение комплекса кольцевой суперскрученной плазмиды pTbo-1 (6120 п.о.) с тривалином, адсорбированного на поверхности модифицированного ВОПГ. Структура, сформированная мономерной кольцевой молекулой (а) и димерной кольцевой молекулой (б). Стрелки указывают на утолщения, локализованные в точках перехода двух фибрилл в одну. Размер изображения 333 × 293 (а), 546 × 606 нм (б).

обрабатывали при помощи фильтров, входящих в матобеспечение прибора Nanoscope II.

Работа поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований (№ 00-04-49070).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hansma H.G., Sinscheimer R.L., Li M.Q., Hansma P.K. // Nucl. Acids Res. 1992. V. 20. С. 3585–3590.
2. Thundat T., Allison D., Warmack R. // J. Vac. Sci. Technol. 1993. V. 11(4). P. 824–828.
3. Klinov D.V., Lagutina I.V., Prokhorov V.V., Neretina T., Khil P.P., Lebedev Yu.B., Cherny D.I., Demin V.V., Sverdlov E.D. // Nucl. Acids Res. 1998. V. 26. P. 4603–4610.
4. Bezanilla M., Manne S., Laney D., Lyubchenko Yu., Hansma H. // Langmuir. 1995. V. 11. P. 655.
5. Thundat T., Allison D., Warmack R., Brown G., Jacobson K., Schrick J., Ferrell T. // Scanning Microscopy. 1992. V. 6. P. 911–918.
6. Vesenska J., Guthold M., Tang C.L., Keller D., Delaine E., Bustamante C. // Ultramicroscopy. 1992. V. 42–44. P. 1243–1249.
7. Schaper A., Starink J.P.P., Jovin T.M. // FEBS Lett. 1994. V. 355. P. 91–95.
8. Тузов И.В., Клинов Д.В., Демин В.В. // Изв. АН. Серия хим. 1994. № 7. С. 1194–1197.

9. Fang Y., Spisz T.S., Wiltshire T., D'Costa N.P., Bankman I.N., Reeves R.H., Hoh J.H. // *Anal. Chem.* 1998. V. 70. P. 2123–2129.
10. Vengerov Yu.Yu., Semenov T.E., Streltsov S.A., Makarov V.L., Khorlin A.A., Zhuze A.L., Gursky G.V. // *J. Mol. Biol.* 1985. V. 184. P. 251–255.
11. Vengerov Yu.Yu., Semenov T.E. // *Electron Microsc. Rev.* 1992. V. 5. P. 193–207.
12. Венгеров Ю.Ю., Мартынкина Л.П., Беспалов М.М., Стрельцов С.А., Юрченко В.Ю., Колесников А.А. // *Молекулярн. биология.* 1997. Т. 31. С. 232–239.
13. Dubochet J., Ducommun M., Zollinger M., Kellenberger E. // *J. Ultrastruct. Res.* 1971. V. 35. P. 147.
14. Klinov D.V., Matsko N.B., Demin V.V. // *Proc. 12-EUREM / Eds L. Frank, F. Ciampor. Brno, 2000. V. 1. P. B539.*
15. Lyubchenko Yu., Shlyakhtenko L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997. V. 94. P. 496–501.
16. Matsko N.B., Klinov D.V., Manykin A.A., Demin V.V. // *Proc. 12-EUREM / Eds L. Frank, F. Ciampor. Brno, 2000. V. 1. P. B531.*
17. Martinkina L.P., Kolesnikov A.A., Streltsov S.A., Yurchenko V.Yu., Vengerov Yu.Yu. // *J. Biomol. Struct. and Dynamics.* 1998. V. 15. P. 949–957.
18. Martinkina L.P., Klinov D.V., Kolesnikov A.A., Yurchenko V.Yu., Streltsov S.A., Neretina T.V., Demin V.V., Vengerov Yu.Yu. // *J. Biomol. Struct. and Dynamics.* 2000. V. 17. P. 687–695.

Effect of Supporting Substrates on the Structure of DNA and DNA–Trivalent Complexes Studied by Atomic Force Microscopy

D. V. Klinov**, **L. P. Martynkina****, **V. Yu. Yurchenko*****, **V. V. Demin***, **S. A. Streltsov****,
Yu. A. Gerasimov*, and **Yu. Yu. Vengerov****

* Phone: +7 (095) 336-1988; e-mail: klinov@ibch.ru

* Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

** Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 32, GSP Moscow, 119991 Russia

*** The Picower Institute for Medical Research, 350 Community Drive, Manhasset, NY, 11030 USA

Linear DNA, circular DNA, and circular DNA complexes with trivalent (TV), a synthetic oligopeptide, were imaged by atomic force microscopy (AFM) using mica as a conventional supporting substrate and modified highly ordered pyrolytic graphite (HOPG) as an alternative substrate. A method of modifying the HOPG surface was developed that enabled the adsorption of DNA and DNA–TV complexes onto this surface. On mica, both purified DNA and DNA–TV complexes were shown to undergo significant structural distortions: DNA molecules decrease in height and DNA–TP displays substantial changes in the shape of its circular compact structures. Use of the HOPG support helps preserve the structural integrity of the complexes and increase the measured height of DNA molecules up to 2 nm. AFM with the HOPG support was shown to efficiently reveal the particular points of the complexes where, according to known models of their organization, a great number of bent DNA fibers meet. These results provide additional information on DNA organization in its complexes with TV and are also of methodological interest, since the use of the modified HOPG may widen the possibilities of AFM in studying DNA and its complexes with various ligands. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2003, vol. 29, no. 4; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: atomic force microscopy, DNA compaction, highly ordered pyrolytic graphite, supporting substrates, trivalent