ПОВЕРХНОСТЬ

Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования **2 • 1998**

УДК 578.086:620.186

© 1998 г. ГАЛЛЯМОВ М.О., ПЫШКИНА О.А., СЕРГЕЕВ В.Г., ЯМИНСКИЙ И.В.

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ СКАНИРУЮЩЕЙ ЗОНДОВОЙ МИКРОСКОПИИ К ИССЛЕДОВАНИЮ КОНФОРМАЦИОННЫХ СВОЙСТВ ДНК

Проведены исследования конформационных свойств ДНК методами зондовой микроскопии и определены преимущества использования этих методов для изучения морфологии биополимеров. Показано, что в водно-спиртовых средах линейная ДНК имеет морфологию тора в отсутствие компактизирующих агентов. При взаимодействии циклической ДНК с ПАВ происходит конформационный переход макромолекулы в состояние развернутого кольца. Определена морфология линейной ДНК, находящейся в комплексе с ПАВ. Выдвинуто предположение об энергетической выгодности тороподобной конформации линейной ДНК при нейтрализации ее заряда.

Для исследования морфологии и конформационного состояния природных биополимеров, находящихся в водных растворах или адсорбированных на поверхность различных подложек, используют большое количество физико-химических методов (круговой дихроизм, дисперсия оптического вращения, двулучепреломление в потоке, рентгеновские исследования и т.д.). Однако, для визуализации и определения морфологии такого сложного природного биополимера как ДНК более перспективным представляется применение методов атомно-силовой (АСМ) [1] и сканирующей туннельной (СТМ) [2] микроскопии.

В представляемой работе проведены комплексные СТМ- и АСМ-исследования морфологии ДНК в различных условиях и показано, что полученные АСМ- и СТМ-изображения исследуемых объектов находятся в хорошем соответствии с имеющимися ранее представлениями о морфологии ДНК.

В качестве подложки для АСМ-исследований использовали слюду (мусковит), для СТМ-исследований применяли высокоориентированный пирографит. Каплю раствора (2 мкл), содержащую исследуемые структуры, наносили на свежесколотую поверхность подложки, затем образцы выдерживали в течение 5 мин, после чего промывали дистиллированной водой, высушивали на воздухе и исследовали методами зондовой микроскопии. СТМ-исследования проводили на сканирующем туннельном микроскопе СКАН-8 (Россия) [3], туннельные параметры варьировали в диапазоне: I_t от 0,2 до 1 нА, U_t от 50 до 1000 мВ. АСМ-исследования проводили в контактном режиме и в режиме прерывистого контакта [4] на приборе Nanoscope-3 (США).

На рис. 1 представлено АСМ-изображение линейной ДНК из эритроцитов цыплят, осажденной из TBE-буфера в присутствии 50%-изопропанола. Показано, что в этих условиях ДНК принимает тороподобную морфологию и в отсутствие компактизирующих агентов. Мы предполагаем, что в присутствии спирта (аналогичные результаты получены для метанола, этанола и изобутанола) происходит сближение противоионов Na^+ с отрицательно заряженными фосфатными группами ДНК до полной экранировки заряда на макромолекуле. В результате происходит высвобождение внутренних напря-

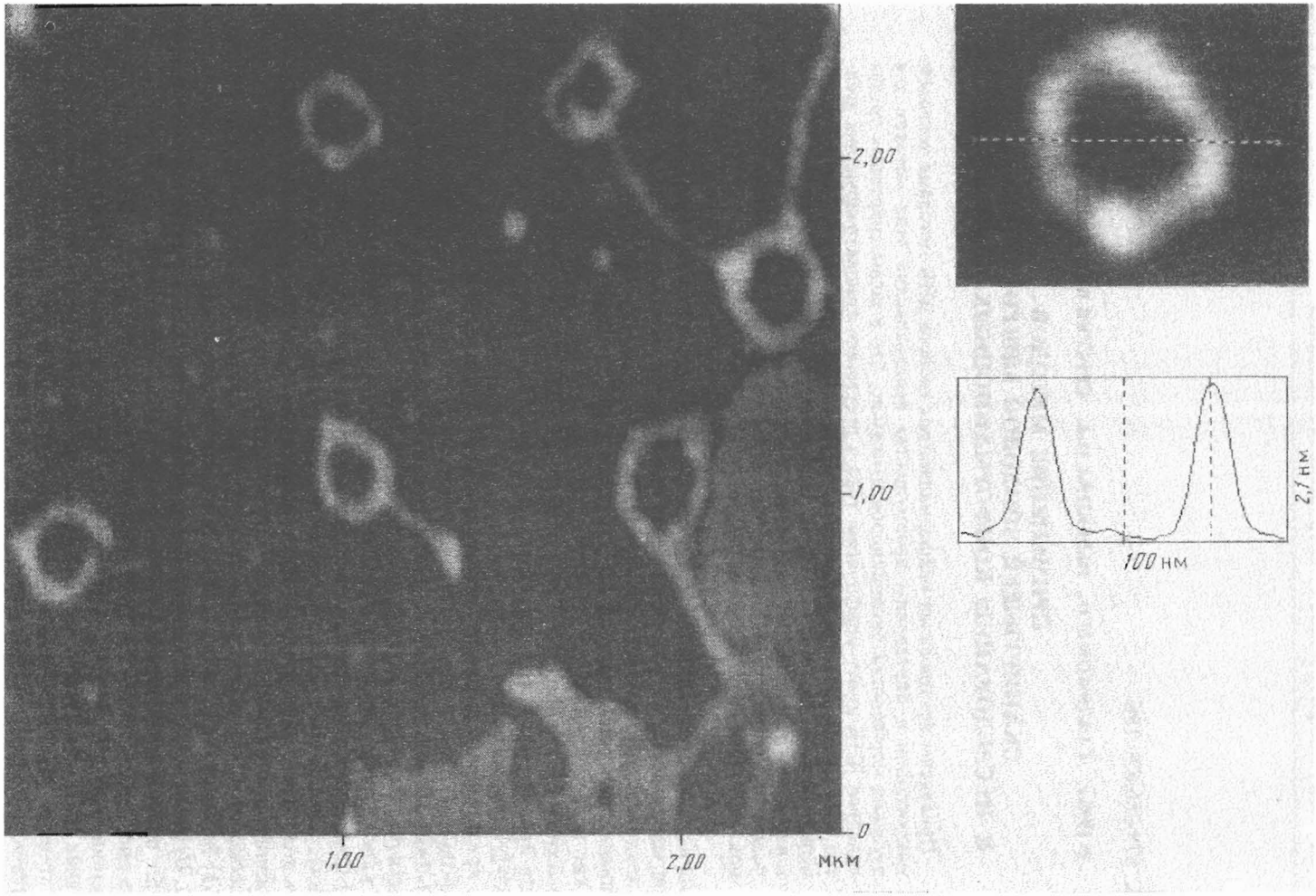


Рис. 1. Исследование молекул линейной ДНК (из эритроцитов цыплят), нанесенных из 50%-ного раствора изопропанола в присутствии 0,05 моль ТВЕ-буфера на поверхность слюды. АСМ, контактный режим. Размер кадра 2,5 × 2,5 мкм, серая шкала 15 нм

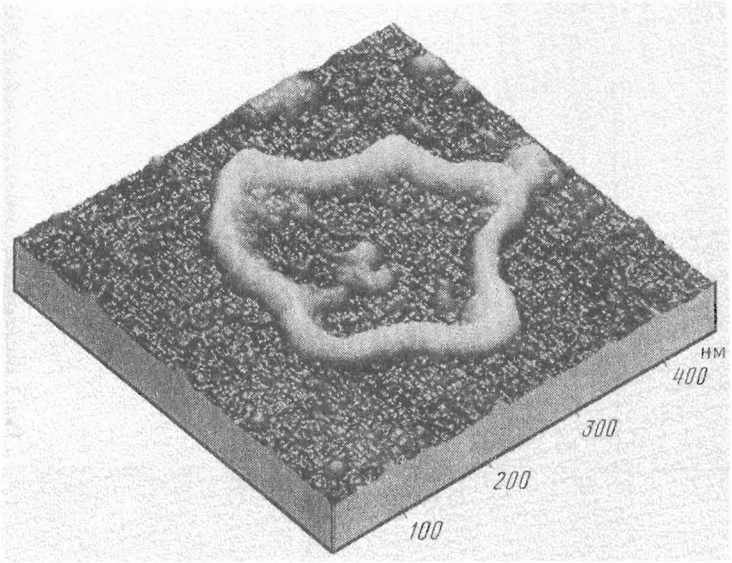


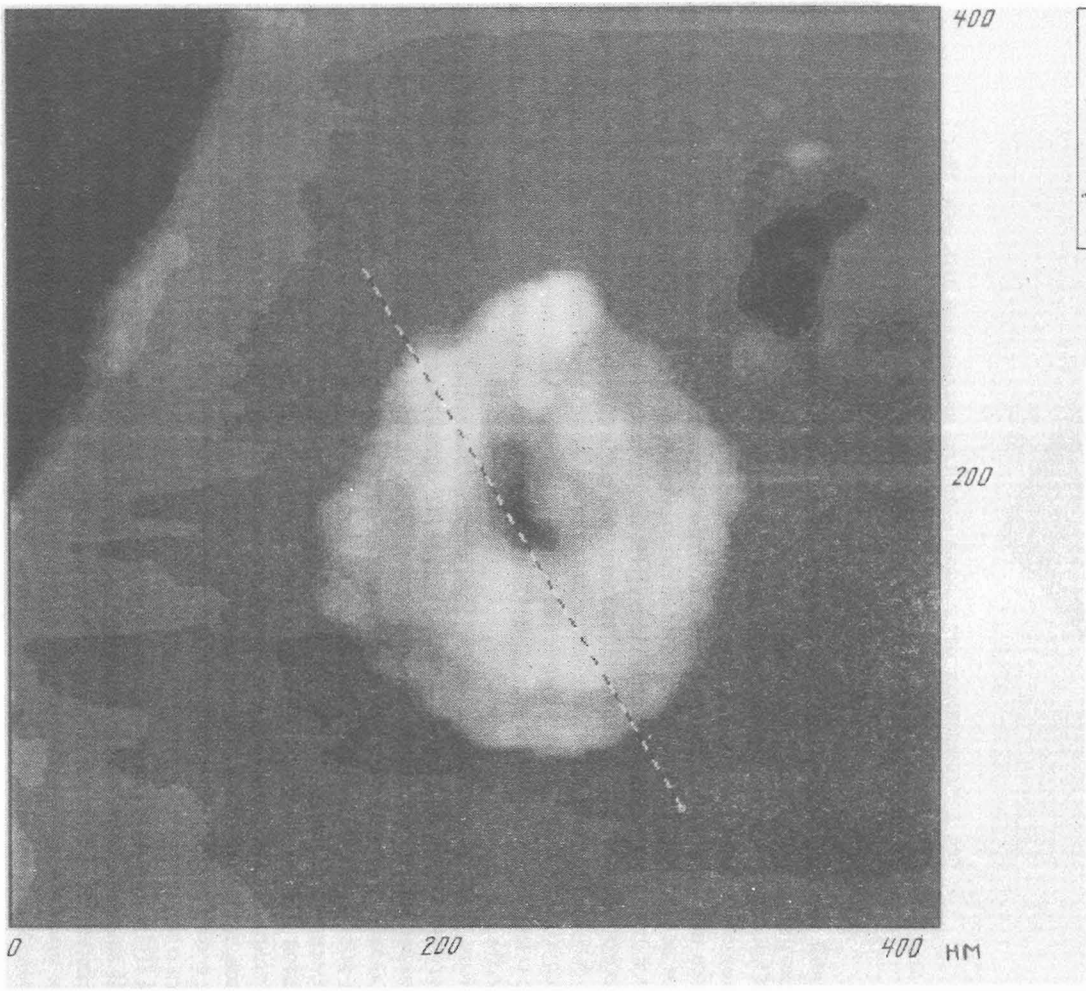
Рис. 2. Исследование морфологии комплекса циклической ДНК (*pUC* 19) с ПАВ (цетилтриметиламмоний бромида), адсорбированного на поверхность слюды. АСМ, контактный режим. Размер кадра 0,45 × 0,45 мкм, серая шкала 15 нм

жений двойной спирали ДНК, которая принимает наиболее энергетически выгодную пространственную конформацию.

Однако оказывается, что тип наиболее выгодной конформации ДНК зависит от исходной конформации макромолекулы. На рис. 2 приведено АСМ-изображение комплекса циклической ДНК (pUC 19) с противоположно заряженным поверхностно-активным веществом ЦТАБ (цетилтриметиламмоний бромид). Принимая во внимание тот факт, что изначально циклическая ДНК находилась в сверхскрученной конформации, можно заключить, что при нейтрализации отрицательного заряда ДНК с помощью ЦТАБ принимает иную наиболее выгодную конформацию – развернутого кольца. Следует отметить, что применение именно метода АСМ позволило ответить на вопрос о морфологии циклической ДНК в присутствии поверхностно-активного вещества (ПАВ).

Как было показано ранее [5], комплексы линейной ДНК с ПАВ сохраняют компактную конформацию и в малополярных органических средах. Однако оказалось невозможным определить морфологию ДНК, включенной в комплекс, обычными физико-химическими методами, такими как вискозиметрия, двулучепреломление, УФ- и КД-спектроскопия и т.д. Как видно из рис. 3 и 4, подобную задачу удалось решить с применением метода СТМ. На рис. 3 представлено СТМ-изображение комплекса линейной ДНК (из эритроцитов цыплят) с противоположно заряженным ПАВ (ДСДАХ – дистеарилдиметиламмоний хлорид), полученного из водного раствора, на рис. 4 – комплекса, полученного из хлороформа. Данные результаты не только подтверждают вывод о сохранении компактной конформации ДНК в хлороформе, но и позволяют говорить о тороподобной конформации как о наиболее энергетически выгодной для линейной ДНК при нейтрализации ее заряда.

В заключение следует отметить, что приведенные результаты свидетельствуют о преимуществах использования методов зондовой микроскопии для исследования сложных комплексов биополимеров и синтетических аналогов липидов, в частности для определения морфологии биообъектов. Упомянутые выше физико-химические методы исследования биополимеров в растворе позволяют получить лишь косвенное представ-



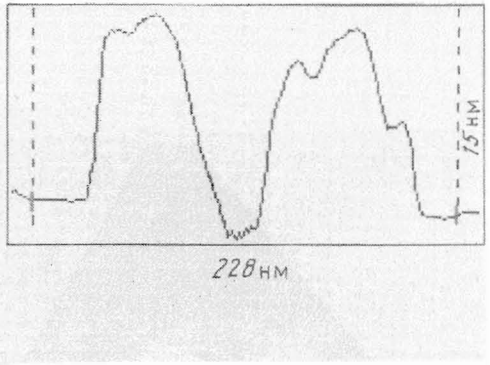


Рис. 3. Исследование комплекса линейной ДНК (из эритроцитов цыплят) и ПАВ (дистеарилдиметиламмоний хлорида), образованного в водной фазе и адсорбированного на поверхность пиографита. СТМ, режим постоянного тока. Размер кадра 0,4 × 0,4 мкм, серая шкала 15 нм

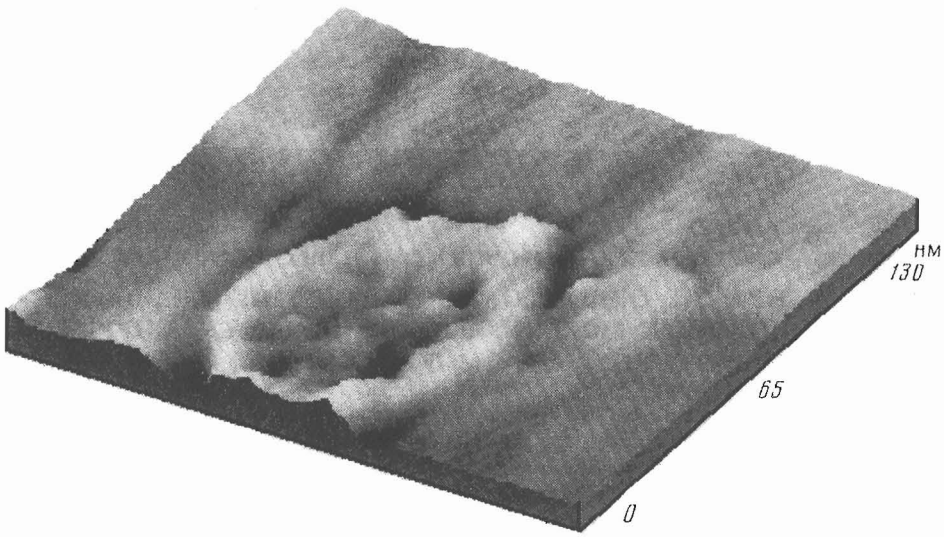


Рис. 4. Исследование комплекса линейной ДНК (из эритроцитов цыплят) и ПАВ (дистеарилдиметиламмоний хлорида), образованного в хлороформе и адсорбированного на поверхность пирографита. СТМ, режим постоянного тока. Размер кадра 0,13 × 0,13 мкм, серая шкала 6 нм

ление об их морфологии, в то время как СТМ и АСМ отображают действительную пространственную структуру объекта.

Данная работа была частично поддержана Российским фондом фундаментальных исследований, гранты 96-03-33522а и 97-03-32778а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Binning G., Quate C.F., Gerber Ch.* // Phys. Rev. Lett. 1986. V. 56. P. 930.
2. *Binning G., Roher H.* // Helv. Phys. Acta. 1982. V. 55. P. 726.
3. *Moiseev Yu.N., Panov V.I., Savinov S.V. et al.* // Ultramicroscopy. 1992. V. 42–44. P. 1596.
4. *Hansma P.K., Cleveland J.P., Radmacher M. et al.* // Appl. Phys. Lett. 1994. V. 64. № 13. P. 1738.
5. *Пышкина О.А., Сергеев В.Г., Лезов А.В. и др.* // Докл. физ. хим. 1996. Т. 349. № 4–6. С. 772.

Московский государственный
университет им. М.В. Ломоносова
Центр перспективных технологий
г. Москва, Россия

Поступила в редакцию
14.06.1997 г.
Принята в печать
24.09.1997 г.

GALLYAMOV M.O., PYSHKINA O.A., SERGEEV V.G., YAMINSKY I.V.

APPLICATION OF SCANNING PROBE MICROSCOPY TO THE STUDY OF DNA CONFORMATION

Conformational properties of DNA were studied with the use of scanning probe microscopy and the advantages of such method were shown. It is shown that linear DNA in water-alcohol solution presents in compact toroid-like conformation without any compacting agents. It is established that a conformational transition of supercoiled DNA into unfolded circle takes place during plasmid DNA – surfactant interaction. Morphology of linear DNA in complexes with surfactant is determined. It is assumed that toroid-like conformation of linear DNA is the energetically favorable when neutralization of DNA charge takes place.