

利用原子力顯微術於液態環境下觀察 DNA 分子之型態變化

Imaging the Conformation Changes of Plasmid DNA Molecules in Aqueous Environment by Atomic Force Microscopy

蕭一清、林奇宏

I-Ching Hsiao, Chi-Hung Lin

在過去的二十年裡，由於原子力顯微術能於液態環境下及於可控制之溫度下進行掃描，並具有能提供奈米級解析度影像之優異特性，使得有越來越多的研究學者，包含工程學家、化學家，以及生物學家，乃有興趣於其相關之應用及研究。在這篇文章中，我們將透過原子力顯微術於液態環境下觀測 DNA 分子貼附於經氯化鎳及 APTES 處理後之雲母片表面上所呈現之型態。此外，我們亦觀測到，若將 DNA 分子預先與氯化鎳溶液或 APTES 溶液混合，再滴至雲母片表面進行掃描，將導致 DNA 分子產生不同型態之結果。

For the past two decades, more and more researchers, including engineers, chemists, and biologists, were interested in the studies about the applications of atomic force microscopy in their research fields due to its capabilities that can be operated in liquid phase and at a controlled temperature, and provide nano-scale image resolution. In this study, we have observed the conformations of plasmid DNA molecules deposited on Ni- and APTES-treated mica surfaces by AFM in liquid phase. Another interesting study was also carried out in this report that DNA molecules would exhibit different conformations, while they were pre-mixed with NiCl₂ solution and APTES solution before depositing on fresh cleaved mica surfaces.

一、前言

用於觀測生物樣本及進行其相關實驗的方式或技術大致上分為兩類，第一類乃以光學顯微術為主，包括拉曼光譜儀 (Raman spectroscope)、時間解析之單光子計數系統 (time-resolved single photon counting system)、全反射螢光顯微鏡 (total internal

reflection microscope)、共軛焦雷射掃描顯微鏡 (confocal laser scanning microscope) 等整合型光電影像設備，可透過分析生物分子對雷射光之散射性質，或利用螢光染劑與生物分子本身自發之螢光，來觀察及即時監測生物分子之功能或是代謝情況。此方法乃適用於試管內 (*in vitro*) 及細胞體內 (*in vivo*) 之實驗，惟影像之空間解析度有限，約僅 0.2

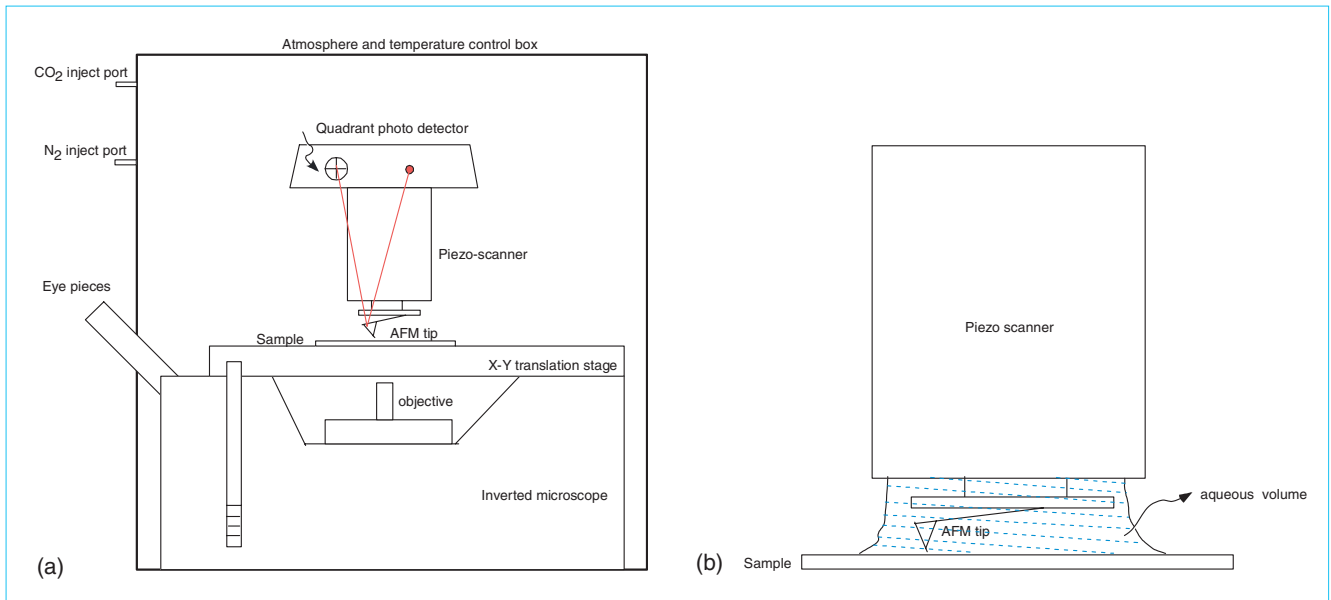


圖 1. (a) 包含倒立式光學顯微鏡以及溫濕度控制箱罩之生物醫學用原子力顯微鏡示意圖；(b) 於液態環境下掃描時，探針與樣品表面被溶液水柱所包覆。

μm 左右。另一類之技術主要是利用電子顯微鏡來提供更高之空間解析度，惟運用此技術時，生物樣本需進行複雜之製備過程，並於真空環境中觀察，更無法作動態之即時偵測，因此，整個過程將無法呈現生物分子之原貌。而自 1986 年，Binnig 等人發明了原子力顯微鏡 (atomic force microscope, AFM)⁽¹⁾，乃解決上述兩類技術上之不足處，並在生物醫學上之研究逐漸嶄露頭角。此法乃利用微小探針來掃描生物樣本，針尖曲率半徑約 15 nm 以下，並可於乾燥環境及接近生物樣本生理狀態之液態環境下進行實驗，故可進行生物分子間反應之即時偵測。此外，透過對探針表面性質之修飾，亦可進行生物分子間反應作用力學及表面化學性質之量測。因此，透過原子力顯微術之優異特性，將於本實驗中，在液態環境下來觀測環狀之 plasmid DNA 分子之型態變化。

二、基本架構及原理

原子力顯微鏡之基本架構主要是由壓電掃描器、回饋控制系統、懸臂及其末端上之探針、光感測器，以及相關電腦影像軟體組成。此外，針對個別實驗設計，可能會有其他相關之設備，包括防震

系統、溫濕度控制箱以及隔音罩等設備。而此技術之缺點乃在於掃描時間相較於光學或電子顯微鏡設備較長，取得一張影像約需數分鐘之時間，較大部分的分子完成反應所需之時間長了許多，因此，在動態即時偵測之實驗上，時間解析度將大大之降低。此外，由於掃描時間較長，且掃描範圍有限，通常尋找到合適之目標區所耗之時間會再拉長。近年來，已有實驗性或商業化產品，除致力於改善掃描速度不足之缺點外，乃嘗試將常見之光學顯微設備或光學技術與原子力顯微鏡結合在一起，因而大大提升原子力顯微鏡在生物醫學上之應用及使用操作之效率。

如圖 1(a) 所示，乃於本實驗室所架設根據市售生物醫學用原子力顯微鏡 (BioScope AFM, Digital Instruments, Santa Barbara, CA) 所描繪之圖形，乃將壓電掃描器安置在一倒立式顯微鏡上，藉由此光學顯微鏡可幫助使用者快速尋找到合適目標區域，隨後再以裝置於壓電掃描器上之探針進行掃描，得到高解析度之微觀資訊。另外，本實驗室亦按顯微鏡之外在形狀，自製溫濕度控制箱，罩蓋整個儀器設備，若為進行活體細胞之實驗時，可大概控制實驗環境溫度接近 37 °C，並通入合適濃度之二氧化碳；若是進行乾燥性樣本實驗，則可通入氮

氣，以維持操作環境及樣本之乾燥度。除此之外，此箱罩還能阻隔噪音之干擾，而增加實驗環境之穩定性。而實驗樣品之載具可為蓋玻片、載玻片、培養皿，以及其他可置放樣品之平坦基材，如雲母片或矽晶片表面。若於液態環境下進行掃描時，溶液將形成一水柱狀體積，如圖 1(b) 所示，乃包覆整個探針與試片表面區域，此設計為開放式工作環境，隨著掃描時間之延長，液體體積將逐漸蒸發流失，故需以外加方式補充液體，維持溶液體積。

原子力顯微術主要之操作模式包括非接觸式 (non-contact mode)、接觸式 (contact mode)，以及輕敲式 (tapping mode) 等三種。在觀察生物性樣本時，所選用操作模式之主要考量乃在於，何種模式能減輕探針對生物樣本之破壞，以維持生物樣本之原貌，並能夠不損失影像解析度。非接觸式主要是將探針盤旋於樣品上方約幾個奈米之距離，並量測探針尖端與樣品間所形成之凡得瓦爾力，此法雖不會造成生物樣本之破壞，但掃描速度過於緩慢，以及解析度差是本模式之缺點。而接觸式有解析度高及掃描速度快之優點，惟若因探針施力過度，容易造成生物樣本之破壞。輕敲式則能有效降低對樣本之破壞，且能保有相當之解析度，唯獨掃描速度不若接觸式快。衡量上述三種操作模式，以輕敲式較為廣泛接受之操作模式，但仍有不少有關生物性樣品之實驗成果，仍嘗試以接觸式為操作模式。在本實驗中，乃以輕敲式為操作模式，並於液態環境下進行掃描。

本實驗架設所採用之 G 型壓電掃描器可進行大範圍之掃描，最大可達 $100\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m}$ 之面

積，而縱深掃描範圍最高為 $6\ \mu\text{m}$ ，因此，可適用於掃描生物樣品種類，最大如細胞，而最小則能掃描單一之生物分子。如圖 2(a) 所示，於液態環境下，利用接觸式掃描所得高度差異 (height image) 顯示之中國倉鼠卵巢細胞 (Chinese hamster ovary cell, CHO cell)，尺標為 $10\ \mu\text{m}$ ，右側之顏色指標顯示為縱深高度相對值，圖 2(b) 為相同掃描位置之探針與樣品摩擦力差異顯示圖 (friction image)，右側顏色指標顯示為探針與樣品摩擦力大小相對值。圖 3(a) 為利用輕敲式所得高度差異顯示乾燥之 type I 膠原蛋白纖維 (collagen fibers)，尺標為 $300\ \text{nm}$ ，圖 3(b) 為相同掃描位置之探針與樣品黏滯性差異顯示圖 (phase image)，右側顏色指標顯示為探針與樣品黏滯性差異大小相對值。進行乾燥性樣品掃描時，所採用探針震動頻率於約為數百 kHz；若於液態環境下操作時，則約為數 kHz，以避免探針之高頻率擺動而引起液體之擾動現象。而實際所使用之震動頻率，將透過系統本身軟體之頻率測試，自動取得每一探針之震動頻率與震幅，而於掃描進行時，可針對頻率及震幅作微調，以達最佳之掃描條件。

三、樣品製備

1. 基材表面性質

利用原子力顯微鏡來觀測生物分子之型態，必須將其固定或貼附在基材 (substrate) 上，而在基材之選用上，會因所欲觀測之樣品大小而選擇不同表面粗糙度之基材。例如，在觀測細胞時，細胞可選

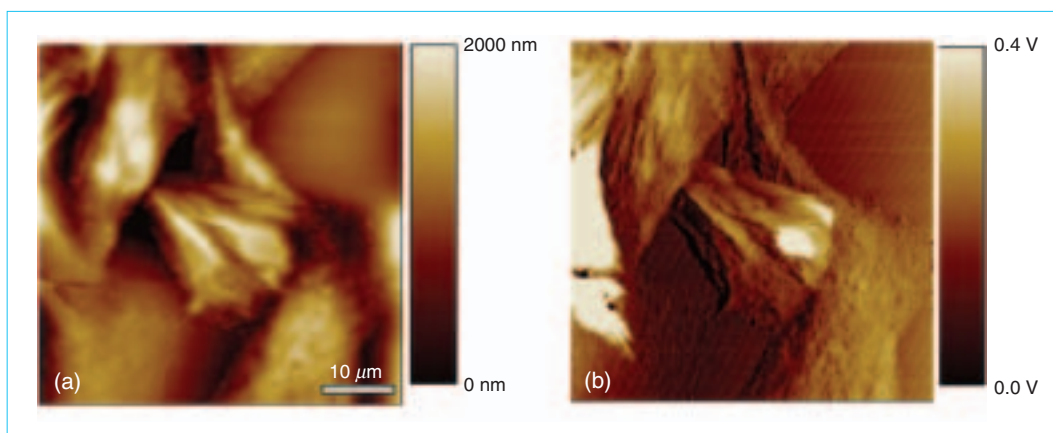


圖 2。
(a) 於液態環下，利用接觸式掃描所得高度差異顯示之中國倉鼠卵巢細胞影像，尺標為 $10\ \mu\text{m}$ ；(b) 為相同掃描位置之探針與樣品摩擦力差異顯示圖。

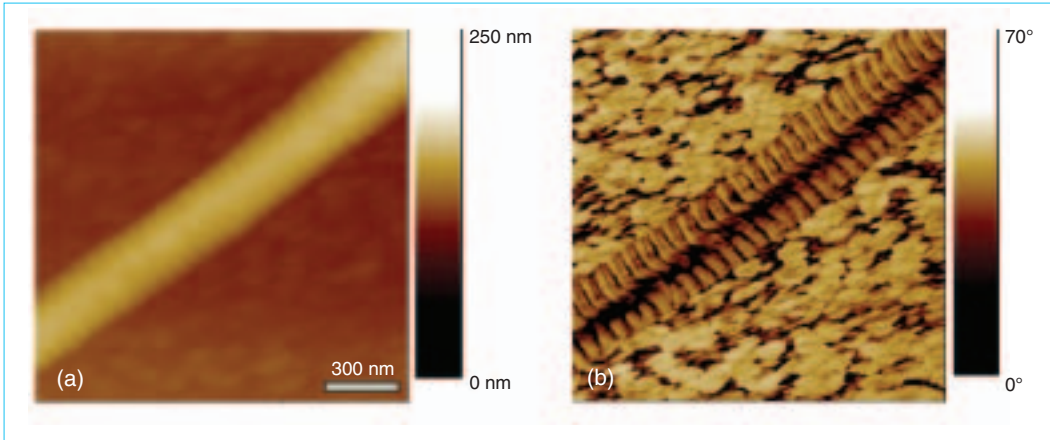


圖 3.
(a) 利用輕敲式所得高度差異顯示乾燥之 type I 膠原蛋白纖維，尺標為 300 nm；(b) 為相同掃描位置之探針與樣品黏滯性差異顯示圖。

擇貼附在蓋玻片、培養皿、矽晶片，以及雲母片上，也就是在觀測較大型樣品時，對基材之粗糙度就比較不要求；而當觀測較小生物分子時，類似膠原蛋白般大小，則將提高所選用基材之粗糙度，如經酸洗之蓋玻片；而當觀測更小生物分子時，如 DNA 分子，則必須選用平整度高之雲母片，或是矽晶片之基材。除了在基材之選擇問題外，觀測乾燥性生物樣品常常遇到生物分子原存在之緩衝溶液或其他處理樣品之溶液乾燥後所殘留之結晶鹽類問題，使得操作者不易掃描到欲觀測之生物樣品原貌。而通常解決之方式，包括將含有欲觀測生物樣品之溶液滴在基材表面上，等待乾燥後，再以乾淨之去離子水或不會殘留鹽類之液體將結晶鹽類清洗掉。但此法亦可能會將生物樣品沖刷掉，除非先將生物分子牢固的貼附在基材表面上，或是先以乾淨之去離子水將鹽類成分稀釋，並透過幾次的離心及稀釋清洗動作，而將鹽類成分去除。惟此法在清洗過程中，生物分子會因所存在之環境不同，而改變原有之型態；而若是直接於液態環境下進行掃描，將可省去乾燥後殘留結晶鹽類之問題。但另一個需要去面對的難題是，如何使生物分子在液態環境下能夠穩定的貼附在基材上，不單如此，若是要進行動態生物分子間反應之即時觀測，如何使生物分子合適的貼附在基材表面，但又能保有生物分子之活動性而能夠在基材表面上活動，將又是在液態環境進行觀測時，所要面對的另一項課題。

2. 基材之表面處理與生物樣本

本實驗欲觀測有關 DNA 分子之型態變化，所

使用之 plasmid DNA 為環狀之 MGC 668/Plp-C1-flag，分子量約為 8000 bp。另一方面，基材之選用上，主要是以雲母片為主，其表面是帶負電。由於 DNA 本身亦是帶有淨負電 (net charge)，故若是要使 DNA 分子能吸附在雲母片表面，勢必要對雲母片表面作修飾。在本實驗用來處理雲母片之表面性質使其具有吸附 DNA 能力之方式主要有兩種。第一種為 3-aminopropyl-triethoxysilane (APTES) (Sigma-Aldrich, Germany)，透過將剛擊開之雲母片浸泡至 0.1 % (v/v) APTES 溶液中約 10 分鐘，使雲母片表面經過 silanes 基修飾後^(2,3)，能夠與 DNA 分子產生共價鍵結⁽⁴⁻⁷⁾，或是將 DNA 預先與 APTES 溶液混合後 (APTES 最終濃度為 0.1% (v/v))，再滴至雲母片表面，並靜置一段時間，使 DNA 分子能穩定被吸附於雲母片表面。另一方式，則是將剛擊開之雲母片浸泡至氯化鎳 (Sigma-Aldrich, Germany) 溶液中⁽⁸⁾ 約 15 分鐘，解離後帶有二價正電之鎳離子，其一端會吸附在雲母片，另一端則能用於吸附 DNA 分子⁽⁹⁻¹²⁾，或是預先將 DNA 與氯化鎳溶液混合後，靜置約 15 分鐘，再滴至雲母片表面，隨後進行原子力顯微鏡之觀察。經表面處理後之雲母片，以乾淨之去離子水清洗，並晾乾等候使用。另外，所有滴至雲母片表面之 plasmid DNA 最終濃度均約為 1 ng/μL。

3. 原子力顯微鏡掃描

本次實驗所使用之設備為市售之生物醫學用原子力顯微鏡 (BioScope AFM, Digital Instruments, Santa Barbara, CA)，操作模式為輕敲式掃描，所使用之

探針為 V 型 (V shape) 探針，掃描震動頻率約為 5–10 kHz，掃描速度約為 0.4–0.6 Hz，而所得影像之畫像數為 512 × 512 pixels，掃描範圍為 1 μm × 1 μm。掃描進行時，溶液體積約維持在 200 μL。

四、結果與討論

1. DNA 影像—於經 APTES 表面修飾之雲母片

將 DNA 滴至經 APTES 處理後之雲母片，並靜置約 5 分鐘後，於液態環境下進行掃描，如圖 4(a) 所示，可得清晰之 plasmid DNA 影像，圖上尺標為 100 nm，右側之顏色指標顯示為縱深高度相對值。而圖 4(b) 為經過約二十分鐘後，掃描同樣之位置所得之圖。由圖 4(b) 上可得知，除了試片本身之熱漂移 (thermal shift) 所造成影像位置移動外 (箭號所指為漂移方向)，此 DNA 影像與先前所得結果並無明顯型態 (conformation) 之改變，由此顯示著，在此時間內，DNA 乃穩定且「分散均勻地」貼附於雲母片表面。從所得到之影像，透過軟體分析 (NanoScope SPMV5) 所量得之 DNA 橫向尺寸約為 8.5 ± 0.5 nm，縱像尺寸約為 1.2 ± 0.2 nm。一般來說，影響 AFM 影像解析度之因素常包含：環境之影響，周遭環境之干擾或無法被防震系統所平衡之震動，通常將造成訊號雜訊比 (single to noise ratio) 過低，導致無法清楚量測到目標物之影像及尺寸；試片之製備過程，即便在液態環境下掃描，溶液中若存在過多無法溶解之雜質，或是樣品本身無法與所使用之基材有穩定之貼附作用，乃影像探針與樣品之接觸作用力，進而影響到影像之解

析度；掃描探針之性質，探針針尖曲率半徑大小，亦會影響所得影像之解析度，掃描時，探針針尖之側邊往往會先碰觸到樣品，此時探針會誤以為已掃描到樣品，便進行上移動作，因此，所得之影像尺寸會比實際尺寸來得大⁽¹³⁾。雙股螺旋之 plasmid DNA 直徑約為 2.5 nm，從掃描所得之尺寸確實會略大於實際尺寸。

2. DNA 影像—DNA 預先與 APTES 混和

DNA 預先與 APTES 混和靜置 5 分鐘後，再滴至剛擊開之雲母片表面，並等候約 5–10 分鐘，使進行掃描。如圖 5(a) 所示，此法同樣可以使 DNA 分子穩定的貼附在雲母片上，惟 plasmid DNA 所存在之型態與圖 4(a) 有很大之不同，此時之 DNA 呈現多種型態，如集結 (condensation) 之型態 (位置 a 處)、高度集結成圓團狀 (位置 b 處)、高度集結成繩捆狀 (位置 c 處)，以及集結成混合之型態 (位置 d 處)。若將 DNA 預先與 APTES 混和靜置 15 分鐘，所得影像除了有高度集結成繩捆狀之 DNA 外，高度集結成圓團狀之 DNA 數量明顯增多，如圖 5(b) 所示。如此顯示，APTES 對 DNA 有很明顯之集結作用，並隨處理時間之不同，產生不同之集結程度。

3. DNA 影像—於經氯化鎳表面修飾之雲母片

將 1 mM 之氯化鎳溶液滴至剛擊開之雲母片處理約 15 分鐘後，清洗晾乾後，再將 plasmid DNA 滴至雲母片表面，並等候約 15 分鐘後，乃進行掃描。如圖 6(a) 所示，此法似乎無法得到理想之 DNA 影像，或是 DNA 無法穩定的貼附於雲母片

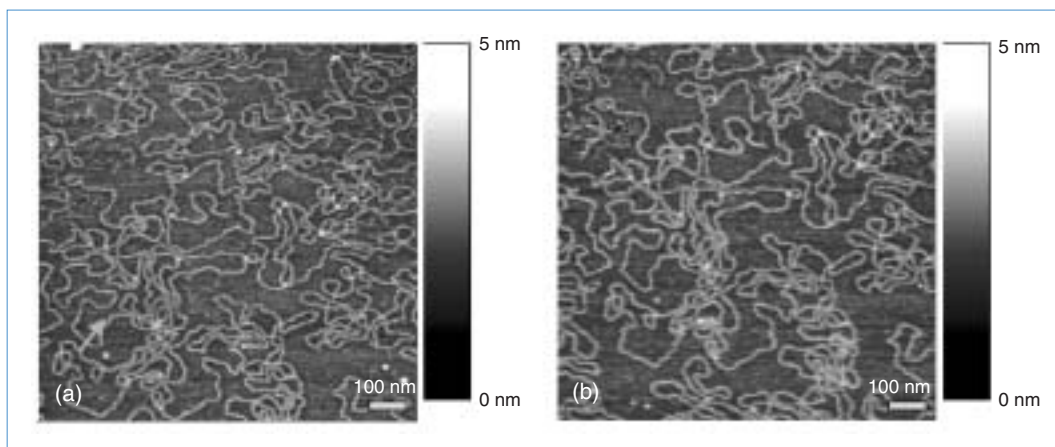
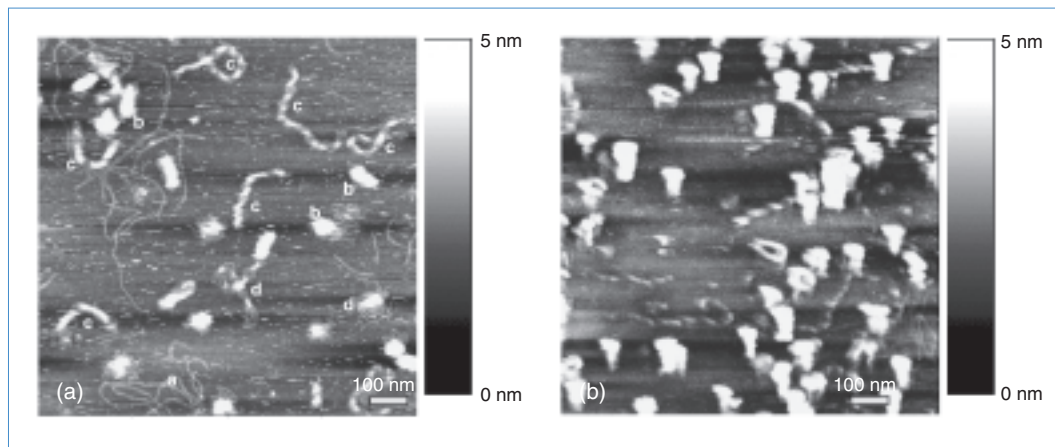


圖 4. (a) DNA 分子貼附於經 APTES 處理之雲母片表面，於液態環境下，利用輕敲式所掃描得高度差異之影像，尺標為 100 nm；(b) 經過 20 分鐘後，相同位置掃描所得之影像。

圖 5.

DNA 分子預先與 APTES 混和 (a) 5 分鐘，(b) 15 分鐘後，再滴至雲母片，於液態環境下，利用輕敲式掃描所得高度差異之影像，尺標為 100 nm。



上。探討其原因，可能是氯化鎳溶液中無法溶解之雜質成分於表面處理過程中，會先堆積於雲母片表面，使雲母片表面之粗糙度提高而不易解析出 DNA 與背景之差異，亦或導致 DNA 分子無法穩定貼附於雲母片；其次，亦有可能是所使用之氯化鎳濃度不足。因此，乃嘗試將氯化鎳濃度提升至 5 mM，並用於處理雲母片表面。如圖 6(b) 所示，所得結果仍無法得到理想之 DNA 影像。

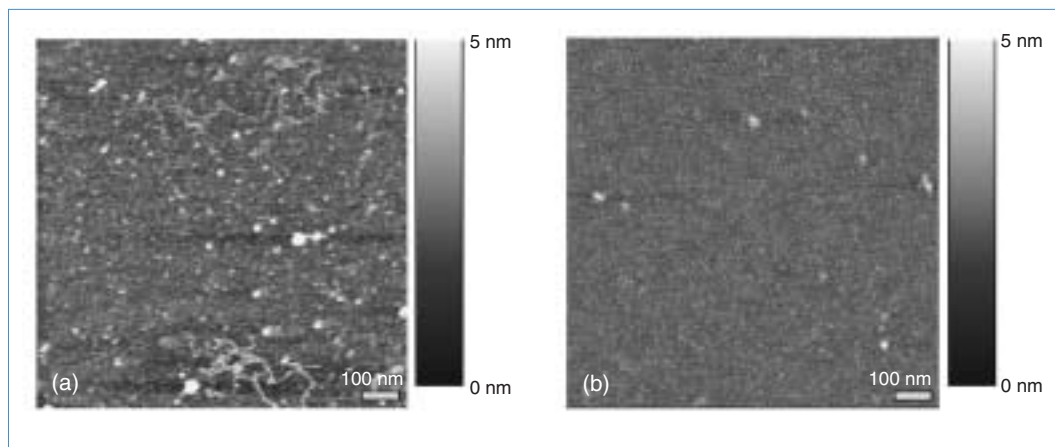
4. DNA 影像—DNA 預先與氯化鎳混和

DNA 預先與 1 mM 氯化鎳溶液混合靜置 15 分鐘後，再滴至剛攪開之雲母片表面，靜置 15 分鐘後，便進行掃描。如圖 7(a) 所示，透過此法，可使 DNA 分子貼附於雲母片表面，而 DNA 分子乃呈現集結之型態，惟集結之程度不若 DNA 以 APTES 預先處理條件下明顯，所量測到之 DNA 寬度約為 8.0 ± 0.5 nm，高度約為 2.4 ± 0.2 nm。另

外，從圖 7(a) 上所顯示多處橫向之雜訊，起因可能歸咎於 DNA 分子與雲母片表面之吸附力不足所致，亦即所使用之氯化鎳溶液濃度不足，故此，改採 5 mM 之氯化鎳溶液預先與 DNA 混合相同時間，再滴至剛攪開之雲母片表面，靜置 15 分鐘後，便進行掃描。如圖 7(b) 所示，可得到更穩定清楚之 DNA 影像，且經由量測所得之 DNA 寬度約為 11.5 ± 0.5 nm，高度則約為 1.5 ± 0.3 nm。經由此法製備樣品，初始掃描時，並無雜質成分堆積現象發生，但隨著掃描時間之延長，堆積現象將逐漸明顯 (圖未展示)，至終將影響掃描之品質。從此實驗結果可知，若利用氯化鎳作為 DNA 吸附於雲母片之媒介，其優點是，所形成較弱之 DNA 分子與雲母片吸附力，可使 DNA 分子貼附於雲母片表面，但仍可維持其活動性，可進行動態之 DNA 分子與相關分子交互作用觀測；惟其缺點將是需調製合適之氯化鎳濃度，以達 AFM 掃描及維持 DNA

圖 6.

將 DNA 分子滴至經 (a) 1 mM，(b) 5 mM 氯化鎳溶液處理後之雲母片表面，於液態環境下，利用輕敲式掃描所得高度差異之影像，尺標為 100 nm。



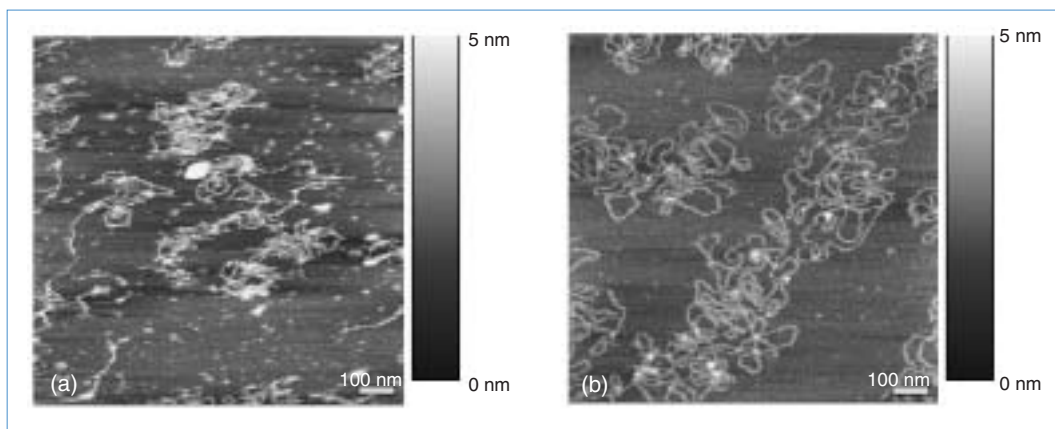


圖 7.
DNA 分子預先與 (a) 1 mM, (b) 5 mM 氯化鎳溶液後，再滴至雲母片，於液態環境下，利用輕敲式掃描所得高度差異之影像，尺標為 100 nm。

活動性所需，並避免溶液中雜質成分之沈澱所造成掃描之干擾。

五、結論

由於原子力顯微鏡結合高解析度，以及能於液態環境下操作之獨特性質，使得此技術不僅在物理或材料科學上被廣泛應用，於生物醫學領域更是逐漸嶄露頭角，並開拓另一片新的視野。且透過技術不斷之改良，乃提供整合其他光學技術之研究平台，因此，其運用之廣泛性，將在奈米科技上佔重要之地位。

在本實驗中，乃利用原子力顯微術觀測 DNA 分子於經過不同表面處理後之雲母片表面上，所呈現不同之型態。經 APTES 處理後之雲母片可穩定吸附 DNA 分子，若預先將 DNA 分子與 APTES 混合，再滴至雲母片表面上，將使 DNA 分子產生集結現象，並隨著混合時間之長短，導致集結程度之不同。而利用氯化鎳溶液處理雲母片表面，可能因雜質成分堆積之緣故，以及氯化鎳濃度不足，無法得到理想之影像，若預先將 DNA 與氯化鎳溶液混合，並提升氯化鎳濃度，則能得到理想之 DNA 影像。利用上述來吸附 DNA 分子之方式，所量得之 DNA 寬度，均約 10 nm 左右，高度則約為 1.5 nm 左右。

參考文獻

1. G. Binnig, C. F. Quate, and C. Gerber, *Phys. Rev. Lett.*, **56**, 930 (1986).
2. Y. L. Lyubchenko, A. A. Gall, L. S. Shlyakhtenko, R. E.

- Harrington, P. I. Oden, B. L. Jacobs, and S. M. Lindsay, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **9**, 589 (1992).
3. M. Sasou, S. Sugiyama, T. Yomoyuki, and T. Ohtani, *Langmuir*, **19**, 9845 (2003).
4. J. Vesenka, M. Guthold, C. L. Tang, D. Keller, E. Delaine, and C. Bustamante, *Ultramicroscopy*, **42-44**, 1243 (1992).
5. W. W. Rees, R. W. Keller, J. P. Vesenka, G. Yang, and C. Bustamante, *Science*, **260**, 1646 (1993).
6. M. Bezanilla, C. J. Bustamante, and H. G. Hansma, *Scan. Microsc.*, **7**, 1145 (1993).
7. Z. Liu, Z. Li, H. Zhou, G. Wei, Y. Song, and L. Wang, *J. Microsc.*, **218**, 233 (2005).
8. H. G. Hansma and D. E. Laney, *Biophys. J.*, **79**, 1933 (1996).
9. J. H. Hoh, G. E. Sosinsky, J. -P. Revel, and P. K. Hansma, *Biophys. J.*, **65**, 149 (1993).
10. M. Radmacher, M. Fritz, H. G. Hansma, and P. K. Hansma, *Science*, **265**, 1577 (1994).
11. J. Yang, J. Mou, and Z. Shao, *FEBS Lett.*, **338**, 89 (1994).
12. H. G. Hansma, D. E. Laney, M. Bezanilla, R. L. Sinsheimer, and P. K. Hansma, *Biophys. J.*, **68**, 1672 (1995).
13. C. J. Bustamante, J. P. Vesenka, C. L. Tang, W. Rees, M. Guthold, and R. Keller, *Biochemistry*, **31**, 22 (1992).

- 蕭一清先生為國立中山大學材料科學工程博士，現任國立陽明大學儀器中心博士後研究員。
- 林奇宏先生為美國耶魯大學細胞生物學博士，現任國立陽明大學微生物及免疫學研究所教授。
- I-Ching Hsiao received his Ph.D. in material science and engineering from National Sun Yat-sen University. He is a postdoctoral at the Instrumental Center of National Yang Ming University.
- Chi-Hung Lin received his Ph.D. in cell biology from Yale University, USA. He is currently a professor in the Institute of Microbiology and Immunology at National Yang Ming University.