

全内反射瞬逝场照明高精度磁镊及其在 DNA 解旋酶研究中的应用*

王爽 郑海子 赵振业 陆越 徐春华†

(中国科学院物理研究所, 软物质物理重点实验室, 北京凝聚态物理国家实验室, 北京 100190)

(2013年4月3日收到; 2013年4月15日收到修改稿)

传统磁镊的测量精度受限于磁球的布朗涨落, 当磁力小于约 10 pN 时, 磁球的布朗涨落明显增大, 对应磁镊的空间分辨率显著下降. 为了提高传统磁镊在小力条件下的测量精度, 本文将全内反射荧光技术引入到磁镊技术中, 并建立相适应的“磁球-手柄-荧光微球-待测生物分子”单分子连接系统, 在小力条件下 (小于 10 pN) 获得纳米量级的测量精度. 应用改进的磁镊对 DNA 发卡的折叠-去折叠态的转变过程进行了研究, 依据 DNA 发卡的折叠-去折叠态转变的性质对全内反射场的穿透深度进行了校正, 并结合实验结果对改进后的磁镊的测量精度进行分析. 观察了 Bloom 解旋酶的解旋动力学过程, 获得初步实验结果, 证实了改进的磁镊在单分子研究中的实用性.

关键词: 磁镊, 全内反射荧光, DNA 发卡, 解旋酶

PACS: 87.80.Nj, 82.37.Rs, 87.15.H, 87.15.kj

DOI: 10.7498/aps.62.168703

1 引言

生物单分子技术在过去的二十年内发展迅速, 不断为生命过程的动力学研究注入新的活力. 生物单分子技术可以分为单分子操纵技术和单分子荧光技术, 常用的单分子操纵技术有磁镊、光镊和原子力显微镜等^[1-6]; 常用的单分子荧光技术有荧光共振能量转移 (FRET)、共聚焦显微、全内反射荧光等^[7,8]. 这些技术被广泛地应用于 DNA 和蛋白质等生物大分子的生命过程的研究中. 相对于其他生物单分子技术而言, 磁镊技术提供了一种简单的拉伸和扭转生物分子的方法, 以及大小恒定的力, 可以用于 DNA 的弹性性质测量和 DNA-蛋白质相互作用的动力学研究中^[9,10]. 磁镊分为纵向磁镊和横向磁镊. 一般地, 在磁镊技术中, 单个 DNA 分子一端连接玻璃表面, 另一端连接磁球, 磁力施加在磁球上, 从而实现对 DNA 分子的拉伸、扭转等单分子力学操纵, 如图 1. 磁镊技术有一显著的优点是可以实现多个 DNA 分子的并行测量, 大大提高实验

效率, 并且施力范围在 0.01—100 pN 之间, 满足大部分生物单分子的实验要求. 但磁镊测力的精度受限于磁球的布朗涨落, 磁力较大时 (10—100 pN), 磁球的布朗涨落较小, 磁镊的精度较高, 这适合于研究 DNA 的 B-S 结构相变的情况^[9]; 磁力较小时 (约 10 pN 以下), 磁球的布朗涨落明显增大, 磁镊的精度显著降低, 限制了磁镊在力较小 (约 10 pN 以下) 情况下的应用. 图 1 给出了传统磁镊的示意图, 采用“磁球-DNA”连接的平板样品池放置在高倍物镜的上方, 磁铁放置在平板样品池的另一侧, 对样品施加磁力, 进行单分子力学操纵.

按文献 [11], 磁镊的空间测量精度有如下表述:

$$\langle(\delta x)^2\rangle = \frac{k_B T}{\alpha}, \quad (1)$$

式中, $\langle(\delta x)^2\rangle$ 是布朗涨落噪音, k_B 是玻尔兹曼常数, T 是绝对温度, α 是 DNA 连接系统的刚度. 根据胡克定律, $\alpha = \frac{\partial F}{\partial L}$, 其中 L 是 DNA 的末端距离.

DNA 的伸长和所受拉力之间的关系由 Worm-

* 国家自然科学基金 (批准号: 61275192, 11004234) 和国家高技术研究发展计划 (批准号: 2012AA02A104) 资助的课题.

† 通讯作者. E-mail: xch@iphy.ac.cn

Like-Chain (WLC) 模型^[12]给出:

$$F = \frac{k_B T}{A} \left(\frac{L}{L_0} + \frac{1}{4(1-L/L_0)^2} - \frac{1}{4} \right), \quad (2)$$

式中, A 是 DNA 的驻留长度, L_0 是 DNA 的轮廓长度. 经过简单的数学推导可知, 如果力 F 一定, $\langle(\delta x)^2\rangle$ 与 DNA 的轮廓长度 L_0 成正比, 缩短 L_0 长度可以减小磁球的空间涨落, 提高装置的精度.

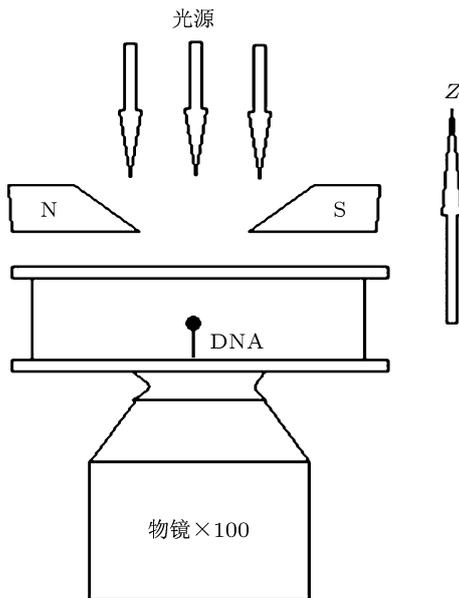


图 1 传统磁镊示意图

已有一些研究组采用“磁球 - 短 DNA ($< 1 \mu\text{m}$)”的连接方式进行磁镊研究^[13], 这样的 DNA 连接方式能够获得较高的空间测量精度, 适用于 DNA 及蛋白构象研究所需的高精度, 但是也存在一些问题. 一方面, 随着 DNA 长度的缩短, 该连接系统的固有频率显著增加, 需要大大提高采样频率才能保证测量的准确度, 这就要求实验装置在采样过程中进行大量计算, 给系统带来负担. 另一方面, 磁铁的位置需要精细调整, 否则会造成磁球扭转和 DNA 斜拉, 使“磁球 - DNA”的最终取向和受力方向不同, 磁球纵向距离变化不能完全反映 DNA 的构象变化^[11,14].

本文把全内反射荧光技术引入到磁镊技术中, 并发展了“磁球 - 手柄 - 荧光微球 - 待测生物分子”的单分子连接技术, 来弥补“磁球 - 短 DNA”连接系统的不足, 提高仪器的精度. 全内反射荧光技术利用光束在两异种介质界面处发生全内反射, 在低折射率介质内产生全内反射场来激发浸没在场内部的荧光物质发光, 该荧光物质的荧光强度与荧光

物质到异种介质界面的距离呈 e 指数衰减. 荧光物质的强度对距离的变化非常敏感, 所以全内反射荧光技术具备很高的空间测量精度. 具体地, 利用全内反射技术探测荧光信号时, 荧光物质的光强与距离关系由如下公式给出:

$$I(z) = I(0) \exp\left(-\frac{z}{d}\right) + C, \quad (3)$$

其中,

$$d = \frac{\lambda}{4\pi \sqrt{n_1^2 \sin^2 \theta - n_2^2}},$$

λ 是入射激光的波长, n_1 是全内反射界面处光密介质折射率, n_2 是光疏介质折射率, θ 是全内反射光束入射角, z 是荧光微球与玻璃表面之间的距离, $I(z)$ 是距离 z 时的荧光光强, C 是系统的背景噪声基线. 一方面, 用全内反射场作激发光源, 应该把磁球替换成荧光微球或荧光分子等荧光物质. 荧光微球直径一般是几十到几百纳米, 远小于磁球直径大小, 有效降低本身的布朗涨落, 并且具备长发光寿命的优势. 荧光分子虽然具有尺寸小的优势, 但它的寿命一般只有几十至上百秒, 且收集到的光子数有限, 不适用于磁镊的长时间观测, 所以我们把荧光物质定为荧光微球. 相应地与荧光微球连接的待测生物分子尺寸可以远小于“磁球 - 短 DNA”中的 DNA 尺寸, 一般是 100 nm 以内. 另一方面, 为了能够在利用全内反射技术观测荧光信号的同时对待测生物分子进行单分子力学操纵, 我们设计了“手柄”, 一端与磁球连接, 另一端与荧光微球连接, “手柄”选用 Lambda DNA , 长度为 $16.4 \mu\text{m}$, 该连接系统的刚度小, 适用于较低的采样频率并保证测力的准确度. 为了验证所做的改进能否有效地提高磁镊装置的精度, 我们利用该改进的磁镊研究了 DNA 发卡的折叠态 - 去折叠态转变现象, 并根据实验数据对改进的磁镊装置的测量精度进行分析讨论. 通常, 全内反射场的穿透深度是通过全内反射入射角进行测量, 再应用 (3) 式计算而实现的, 该方法受角度测量精度和介质折射率的均匀性影响较大. 为了弥补此测量方法的不足, 我们利用 DNA 发卡折叠态 - 去折叠态转变的性质特点对仪器的全内反射场深度进行校正. 最后, 为了验证该改进的磁镊装置在单分子研究领域的可应用性, 我们选用 Bloom (BLM) 解旋酶核心进行了 DNA 发卡解旋实验的初步研究, 得到了 BLM 解旋酶核心解旋动力学的初步结论, 从而验证了该装置的实用性.

2 实验部分

2.1 装置设计原理

传统的纵向磁镊技术是将平板样品池放置在倒置光学显微镜上,物镜位于样品池的一侧,磁铁位于样品池的另一侧,进行单分子力学操纵(见图1).图2(a)给出了改进的高精度磁镊的设计原理:用全内反射物镜作为成像物镜,放置在样品池的一侧,磁铁放置在样品池的另一侧,进行单分子力学操作;一束激光入射到全内反射物镜里,在样品池的玻璃与水的界面发生全内反射,产生的全内反射场激发样品池中的荧光微球,产生的荧光信号由全内反射物镜收集,完成对荧光信号的监测.我们发展了“磁球-手柄-荧光微球-待测生物分子”的单分子连接技术,如图2(b)所示.相比于传统磁镊

技术,这样设计DNA连接方式有以下优点:1)荧光微球的尺寸远小于磁球,在溶液中荧光微球的布朗涨落远小于磁球产生的布朗涨落,可以有效地降低布朗涨落带来的噪声,提高仪器精度;2)荧光微球通过很短的DNA发卡(约20 nm,甚至更小)连到玻璃表面,荧光微球产生的布朗涨落小,这样尺寸的DNA是“磁球-短DNA”连接方式无法应用的;3)磁球通过手柄(Lambda DNA)连到荧光微球上,对荧光微球施加力的束缚,进一步降低荧光微球的布朗涨落;4)Lambda DNA的引入使连接系统的刚度显著减小,适用于较低的采样频率并保证测力的准确度,也克服了“磁球-短DNA”连接造成的磁球扭转等不足.通过该单分子连接技术,我们把磁镊技术和全内反射技术整合一体,有效地提高原磁镊装置的测量精度.

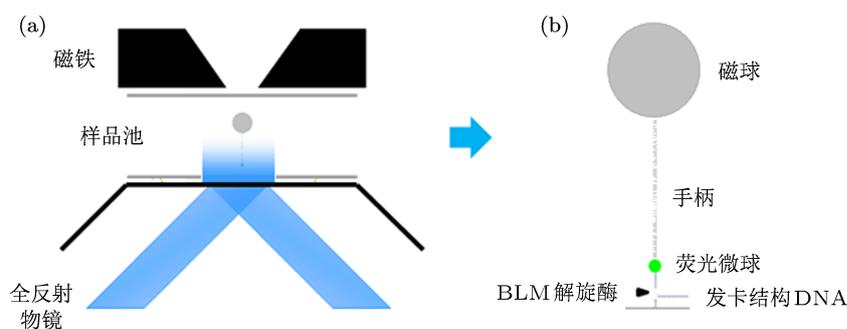


图2 实验装置设计图 (a)高精度磁镊装置设计原理图;(b)目标单分子连接示意图

2.2 装置搭建

图3给出了高精度磁镊装置的搭建示意图.如图所示,该磁镊装置分为五部分:(a)磁镊照明系统及磁镊控制装置;(b)磁镊成像系统;(c)全内反射照明系统;(d)全内反射成像系统;(e)反馈系统.具体地,在(a)部分中,选用红光LED经透镜会聚成平行光对磁镊样品池进行照明,磁镊位于平板样品池的一侧,通过三维平移台(图中未给出)控制磁镊与样品池之间的距离来达到磁镊单分子操纵的目的.平板样品池放置在压电平移台上,全内反射物镜(TIRF objective)位于平板样品池的另一侧,对样品进行光学成像,将磁球的像成在(b)部分的磁镊成像CCD中.在(c)部分全内反射照明系统中,选用488 nm激光经双透镜扩束,从全内反射物镜后焦面的边缘入射,经全内反射物镜照射到平板样品池上,在样品池的玻璃与水溶液的界面发生全内反射,产

生的全内反射场激发样品池中的荧光微球发荧光,该荧光信号经全内反射物镜成像到(d)部分中的高灵敏度CCD(EMCCD)上,实现利用全内反射技术对荧光信号进行观测的目标.在微观实验中,无论是样品池还是仪器本身都存在一定程度的漂移运动.因此,我们设计了反馈系统来实时地对仪器进行空间稳定性的反馈.我们知道,光束发生全内反射时,出射光束与入射光束是关于法线对称的,在上述仪器中,这个法线平行于全内反射物镜的光轴,又因为全内反射入射光束是空间固定的,那么仪器在稳定的情况下,全内反射的出射光束也应该是空间固定的.我们用CCD对全内反射出射光进行空间位置监测,若样品池或仪器发生漂移,则CCD上的全内反射出射光斑会随之运动,利用程序控制压电平移台运动使全内反射出射光斑恢复到初始位置,此时样品池或仪器也被恢复到初始位置,从而实现了仪器的实时反馈调节.

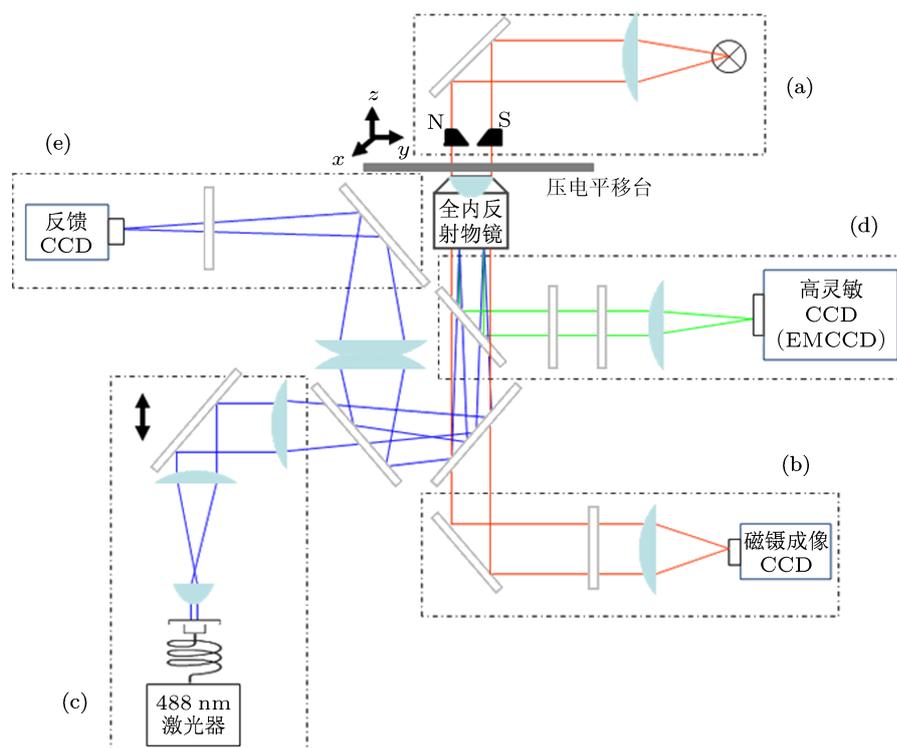


图3 高精度磁镊装置的搭建示意图 (a)为磁镊照明系统及磁镊控制装置; (b)为磁镊成像系统; (c)为全反射照明系统; (d)为全反射成像系统; (e)为反馈系统

2.3 目标单分子连接系统

单分子连接系统的构建在单分子研究中占重要地位. 对于给定的单分子研究装置, 不同的单分子连接系统将实现不同的功能. 例如: 早期的单分子磁镊研究中常选用简单的“磁球 - 长 DNA”连接, 研究长 DNA 的弹性性质^[1,9]; 近期, 少数研究组采用“磁球 - 短 DNA”连接, 研究短 DNA 的力学性质或者短 DNA 与蛋白的相互作用^[12]. 随着人们对仪器测量精度要求的提高, 越来越多的研究组采用将单分子荧光技术(如单分子荧光共振能量转移)与单分子力学操纵技术(如光镊和磁镊)结合^[15,16], 那么就需要重新构建相应的单分子连接系统与改进的仪器相搭配. 单分子连接系统一般采用分子生物学方法得到特定的 DNA 序列, 然后采用生化方法对特定的 DNA 序列进行抗体修饰或荧光标记, 再通过抗原抗体间的特异相互作用得到目标单分子连接系统. 本文为了适应改进后的磁镊装置, 设计了“磁球 - 手柄 - 荧光微球 - 待测生物分子”的单分子连接系统(图 2(b)), 使改进后的磁镊装置能够应用在单分子研究领域, 并有效地提高该仪器的测量精度.

2.3.1 玻璃片表面处理

超声清洗玻璃片(盖玻片和载玻片, 载玻片预先打孔), 加入体积比 7 : 3 的浓硫酸/双氧水浸泡, 80 °C 水浴保温 30 min. 真空状态下, 氧等离子体清洗玻璃片表面, 2% 的 APTES (3- 氨基丙基三乙氧基硅烷) 的丙酮溶液浸泡玻璃片进行表面预修饰, 取出玻璃片, 加 100 mg/mL 的 NHS-PEG 溶液, NHS-PEG 包括 biotin 末端修饰的 NHS-PEG (MW 3400, biotin 末端修饰用于与链霉菌亲和素发生特异性连接, 从而实现单分子连接的构建) 和甲氧基末端修饰的 NHS-PEG (MW 5000, 甲氧基末端修饰用于把玻璃表面修饰成疏水表面, 阻止非特异性吸附作用) 两种, 摩尔比为 1 : 1000, 每一片盖玻片和一片载玻片滴 50 μ L, 重合放置, 50 °C 孵育 90 min, 得到 PEG 修饰的盖玻片和载玻片.

2.3.2 DNA 的制备

实验中应用两种不同的 DNA 实现不同的功能, 一种是 DNA 发卡, 在外力作用下 DNA 发卡双链撕开, 产生可观测的构象变化. 另外, DNA 发卡也可以和蛋白作用, 在这里我们选择 BLM 解旋酶核心与 DNA 发卡作用, 将 DNA 发卡的双链部分解旋成单链, 从而研究 BLM 解旋酶核心的解旋动力学. 另一种是手柄 DNA, 我们选择 Lambda DNA 作

为手柄 DNA, 经过修饰的手柄 DNA 可以把磁球和荧光微球连接起来, 达到磁镊与全内反射技术结合的目的.

DNA 发卡制备 [17]: 购买单链 DNA H1(5'Biotin-TTTTTGGGAG CACTACGTTC GGAC-TAGTGT ACTCTGACTT GAGACTTTTG TCT-CAAGTC), H2(5'P-AGAGTACACT AGTCCGAACG TAGTGCTCCC 44(T) GAACGCAATGTCCAGGT-GTA)(购于 IDT 公司), 两条单链等摩尔比混合, 95 °C 10 min, 缓慢退火至室温, T4 Ligase 做连接, -20 °C 保存.

手柄 DNA 制备: Lambda DNA (购于 NEB 公司) 两端分别与两段单链 DNA (5'P-AGGTCGCCGCCGAACGCAATGTCCAGGTGTA-3' 和 5'P-GGGCGGCGACCT-地高辛-3') 65 °C 退火, T4 Ligase 做连接, -20 °C 保存.

2.3.3 荧光微球表面 DNA 修饰

采用氨基 - 羧基耦合的方法进行荧光微球表面的 DNA 修饰. 单链 DNA (5'NH₂-12C-TTTTTT-TTTTTTTTTTACACCTGGACATTGCGTTC) 与表面修饰羧基的荧光微球 (直径 200 nm, Invitrogen, F8811) 在 EDC/NHS 催化剂的催化作用下, 进行脱水缩合, 最终形成单链 DNA 修饰的荧光微球.

2.3.4 构建目标单分子连接

PEG 修饰的盖玻片和载玻片用双面胶粘成密闭的小室, 连接软管, 用于溶液进出. 0.02 mg/mL 的链霉亲和素溶液处理小室, 约 10 min, 磷酸缓冲液 (含 20 mM 磷酸盐, pH 8.0, 0.9% NaCl) 冲去游离的链霉亲和素, 并用含 10 mg/mL BSA 的磷酸缓冲液封闭玻璃表面. DNA 发卡与荧光微球按摩尔比 1 : 10 混合, 室温放置 30 min, 灌入小室, 孵育 10 min, 磷酸缓冲液冲去游离的荧光微球和 DNA 发卡. 手柄和磁球 (Invitrogen, Dynabeads® M-270 Amine, 预先处理成抗地高辛修饰的表面) 按 1 : 10 的摩尔比混合, 室温缓慢旋转 10 min, 加入含 10 mg/mL BSA 的磷酸缓冲液稀释至适当浓度, 注入小室, 孵育 30 min, 磷酸缓冲液冲去游离的磁球和 Lambda DNA, 即完成如图 2(b) 所示的目标单分子连接的构建.

完成目标 DNA 单分子连接后, 需要判断磁球是否通过单个 Lambda DNA 和单个荧光微球连接到玻璃表面. 由于 Lambda DNA 的一端与磁球连接, 另一端与荧光微球连接, 因此在施加外力的情况下, 观察磁球中心部位是否对应单一荧光微球

就可以来判断磁球是否通过单个 Lambda DNA 和单个荧光微球连接. 另一方面, 荧光微球与玻璃表面之间的连接也需要是单根 DNA 发卡的连接, 才能保证荧光微球与玻璃表面之间的距离变化完全反映 DNA 发卡的长度变化. 理论和实验都有证明, DNA 发卡折叠 - 去折叠平衡态下, 拉力保持在 14—15 pN 之间. 在实验中, 我们把磁力加到 17—20 pN 之间, 观察 DNA 发卡是否被撕开, 来验证该 DNA 发卡连接是否为单根 DNA 发卡连接. 确定单根 Lambda DNA 和单根 DNA 发卡连接后, 我们向样品池中加入含 100 nM BLM 解旋酶核心的反应溶液, 观察并记录荧光微球的光强变化, 分析 BLM 解旋酶核心的工作状态.

2.4 蛋白质及反应溶液

BLM 解旋酶核心蛋白, BLM⁶⁴²⁻¹²⁹⁰, 由法国居里研究所奚绪光博士提供, 具体制备方法如文献 [18] 所述. BLM 解旋酶核心蛋白溶于保存溶液中, 具体成分为: 20 mM Tris-HCl (pH 8.0, 25 °C) (1 M = 1 mol/L), 500 mM NaCl, 1 mM DTT, 10% 甘油, -80 °C 冰箱保存. 做解旋酶反应实验时, 配制蛋白反应溶液, 成分为: 25 mM Tris-HCl (pH 7.5, 25 °C), 50 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 2 mM ATP. 由于该实验中涉及荧光信号的探测, 应加入抗氧化系统和抗淬灭剂, 具体成分为: 0.8% 葡萄糖, 0.1 mg/mL 葡萄糖氧化酶, 0.02 mg/mL 过氧化氢酶, 1% 巯基乙醇. 上述所有溶液都用去离子水 (Millipore, 电阻率 18.2 MΩ) 配制, 蛋白保存溶液和反应溶液都经高温高压灭菌处理, 并用孔径为 0.2 μm 的滤膜过滤, 分装成小管, -20 °C 保存.

3 结果与讨论

3.1 DNA 发卡折叠 - 去折叠实验

在实验中对目标 DNA 连接系统施加恒定的拉力, 磁球被拉离玻璃表面, 磁球投影中心部分与荧光微球的位置基本重合, 即磁球通过手柄的连接垂直于荧光微球的正上方, 可以大致判定磁球是通过该荧光微球连到玻璃表面的. 并且在施加力的过程中, 可以观察到荧光微球的光强随着磁力的增大而降低, 而且 Lambda DNA 的黏性末端无法与玻璃表面直接连接, 所以可以确定该 Lambda DNA 是单根连接.

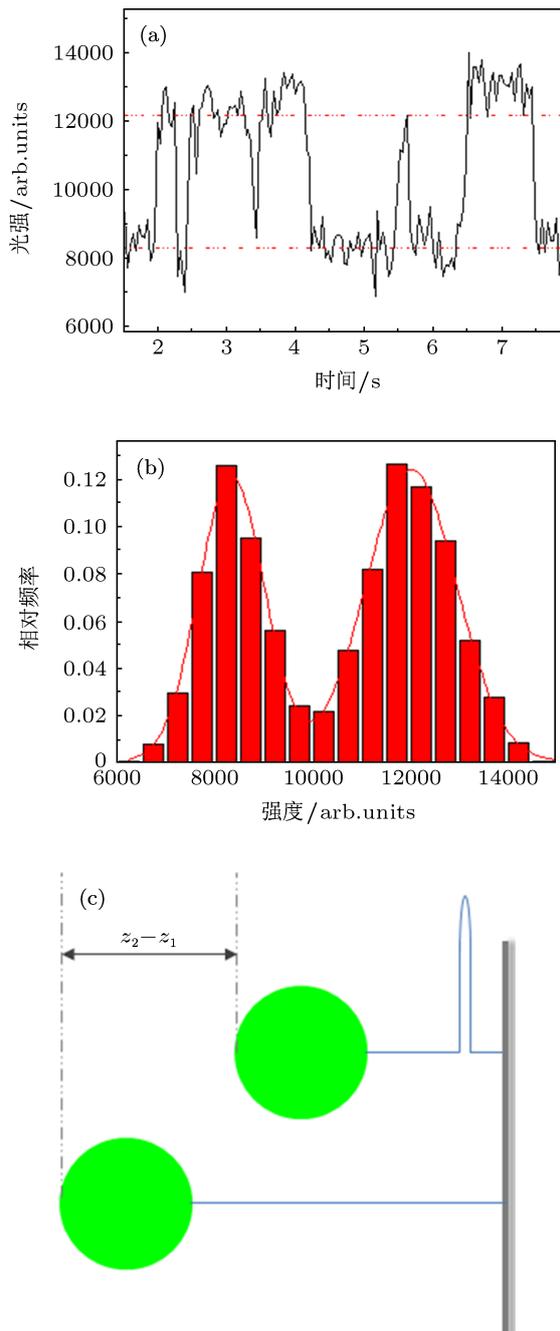


图4 DNA发卡的折叠-去折叠态转变数据 (a) 光强跳变曲线; (b) 光强跳变统计分析, 样本数为 2250; (c) 简单原理示意图

为了判定荧光微球是否是通过单根 DNA 发卡连接到玻璃表面, 逐渐增大磁力, 荧光微球的光强逐渐降低, 当磁力增大到一定程度时, 我们观察到荧光微球亮度发生闪烁, 即光强在两个态之间跳变, 发生 DNA 发卡的折叠态和去折叠态转变, 如图 4(a) 所示, 此时测得磁力为 14.7 pN, 与文献 [12] 提到的单根 DNA 发卡发生折叠态 - 去折叠态转变时所受拉力大小符合, 说明该 DNA 发卡连接是单根连接。

对所得的光强信息统计分析, 得到图 4(b) 的光

强分布. 该光强分布在强度分别为 8300 和 12100 附近各有一峰, 高光强 $I_1 = 12100$ 对应荧光微球靠近玻璃表面的情况, DNA 发卡处于折叠态; 低光强 $I_2 = 8300$ 对应荧光微球远离玻璃表面的情况, DNA 发卡处于去折叠态, 如图 4(c). 根据 (2) 式的 WLC 模型可以计算出 $F = 14.7$ pN 时, 单链 DNA 碱基之间的距离为 0.41 nm/nt. 结合 DNA 发卡发生折叠 - 去折叠状态转变时撕开的碱基数为 42 bp, 计算得到距离变化为 34.4 nm. 又根据 (3) 式, DNA 发卡发生折叠 - 去折叠状态转变时, $I_1/I_2 = \exp((z_2 - z_1)/d) + C$, 其中 $z_2 - z_1 = 34.4$ nm, 平均多次实验结果, 计算得全内反射场深度 $d = (91.2 \pm 2.5)$ nm. 这样, 通过对 DNA 发卡折叠 - 去折叠状态转变的研究, 我们对全内反射场的穿透深度进行了校正, 为磁镊装置的进一步应用奠定基础。

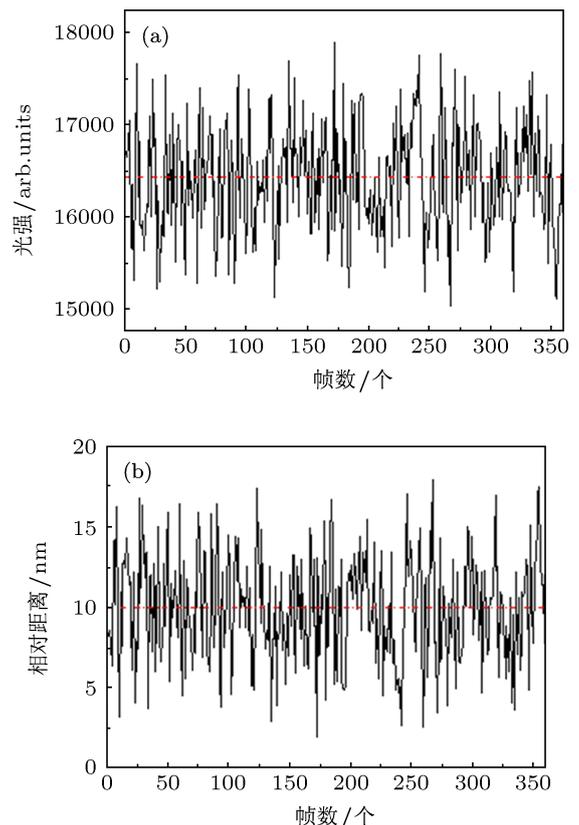


图5 仪器测量精度分析数据 (a) 光强数据; (b) 相对距离数据

为确定仪器的测量精度, 我们测量了一个用 10 nm 短 DNA 双链连接的荧光微球的光强 (图 5(a)), 连同经过实验校正得到的穿透深度参数 d 值代入 (3) 式中, 把光强数据转换成相对距离数据, 如图 5(b), 对该数据统计计算得到仪器的测量精度

为 3.2 nm. 说明本工作中所采用改进磁镊装置的方法可行, 有效地提高了磁镊装置的测量精度.

3.2 BLM 解旋酶核心实验

确定单根 Lambda DNA 和单根 DNA 发卡连接后, 选择一定大小的拉力, 此次实验中施加在 DNA 系统中的拉力约为 10 pN, 向样品池中加入 BLM 解旋酶核心蛋白, 其浓度为 100 nM, 溶液为蛋白反应溶液, 含抗氧化系统和抗淬灭剂. 图 6(a) 给出了 BLM 解旋酶核心蛋白与 DNA 发卡作用的实验曲线, 横坐标是时间 (单位为 s), 纵坐标是荧光微球与玻璃表面之间的相对距离变化 (单位为 nm), 也就是 DNA 发卡的解开长度 (nm). 可以看到, 随着时间的延伸, DNA 发卡的解开长度发生间隔性的增大和减小, 这对应 BLM 解旋酶核心的解旋动力学过程. 具体如图 6(a) (1) 所示, DNA 发卡的解开长度为零时, DNA 发卡上无 BLM 解旋酶核心进行解旋工作, DNA 发卡处于折叠态; 在 260—264 s 之间, BLM 解旋酶核心经扩散运动结合到 DNA 发卡的单链的单链部分, 并捕捉溶液中的 ATP 开始解

旋 DNA 发卡, BLM 解旋酶核心每解开一对碱基, 在磁镊的拉伸作用下, 荧光微球与玻璃表面之间的相对距离就增大两个碱基的长度, 直到 264 s 处, BLM 解旋酶核心解旋功能结束, 从 DNA 发卡上脱落, DNA 发卡被解开的单链 DNA 部分迅速退火成双链 DNA, 从而解开长度陡然减小为零; 或者如图 6(a) (2) 所示, BLM 解旋酶核心沿 DNA 发卡的发卡结构行走互补单链 DNA 上, 再沿着这条单链 DNA 进行单链行走, 在这种情况下, DNA 发卡解开的单链 DNA 部分相对缓慢地退火成双链 DNA, 表现为解开长度缓慢减小为零. 解旋酶完成了一次解旋工作.

解旋酶的解旋速率由曲线中解旋长度增加部分的斜率给出, 对同一拉力条件下的解旋速率统计分析, 如图 6(b) 所示, 对该统计分布进行高斯拟合, 得到 $V_c = (17.9 \pm 6.6)$ bp/s, 这与文献 [19] 中提到的解旋速率相一致. 从而证明了该改进的磁镊装置在单分子研究领域的实用性.

4 结论

本文介绍了一种改进的高精度磁镊装置, 以及配合该磁镊装置使用的“磁球-手柄-荧光微球-待测生物分子”单分子研究系统. 应用该磁镊装置进行了 DNA 发卡的折叠-去折叠态转变的研究, 并利用 DNA 发卡的折叠-去折叠态转变性质对全内反射场的深度进行了校正. 进一步地, 依据实验数据针对改进后的磁镊装置的测量精度进行分析, 得出该磁镊装置的精度提高为 3.2 nm. 最后, 应用该磁镊装置对 BLM 解旋酶核心蛋白的解旋动力学进行了研究, 结果表明, BLM 解旋酶核心蛋白可以与 DNA 发卡发生解旋作用, 其解旋速率为 $V_c = (17.9 \pm 6.6)$ bp/s. 综上所述, 本文讲述的高精度磁镊可以较好地应用在单分子研究领域, 在小力范围 (小于约 10 pN) 内提供较高的测量精度.

该改进的磁镊装置适用于对超短生物大分子的研究, 如纵向轮廓长度不大于 100 nm 的 DNA 分子或多肽分子等. 因为 DNA 连接系统中的荧光微球需要浸没在全内反射场内, 所以该磁镊装置无法应用于长的 DNA 或蛋白分子的研究中. 另一方面, 该磁镊装置在力小于约 10 pN 时, 能够较好地提高磁镊装置的空间测量精度, 但对于约 10 pN 以上的拉力研究时, 其空间测量精度相比于普通磁镊并无明显的优势.

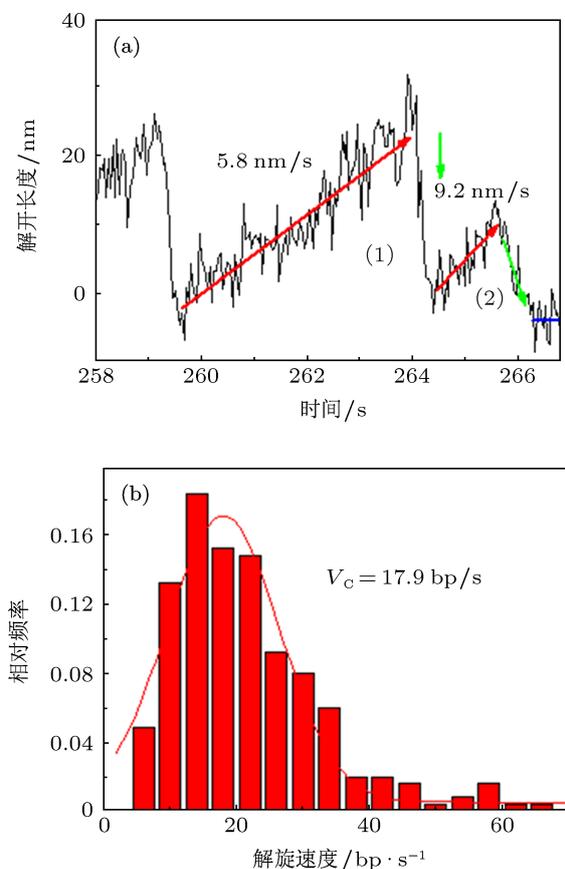


图 6 BLM 解旋酶核心蛋白的解旋数据 (a) BLM 解旋酶核心蛋白的解旋现象; (b) 解旋速度统计分布, 样本数 250

- [1] Smith S B, Finazi L, Bustamante C 1992 *Science* **258** 1122
- [2] Cluzel P, Lebrun A, Heller C, Lavery R, Viovy J, Chatenay C, Caron F 1996 *Science* **271** 792
- [3] Dessinges M N, Lionnet T, Xi X G, Bensimon D, Croquette V 2004 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101** 6439
- [4] Johnson D S, Bai L, Smith B Y, Patel S S, Wang M D 2007 *Cell* **129** 1299
- [5] Perkins T T, Li H W, Dalal R V, Gelles J, Block S M 2004 *Biophys. J.* **86** 1640
- [6] Marsden S, Nardelli M, Linder P, Mccarthy J E 2006 *J. Mol. Biol.* **361** 327
- [7] Myong S, Bruno M M, Pyle A M, Ha T 2007 *Science* **317** 513
- [8] Theissen B, Karow A R, Kohler J, Gubaev A, Klostermeier D 2008 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105** 548
- [9] Smith S B, Cui Y, Bustamante C 1996 *Science* **271** 795
- [10] Sun B, Wei K J, Zhang B, Zhang X H, Dou S X, Li M, Xi X G 2008 *EMBO J.* **27** 3279
- [11] Neuman K C, Nagy A 2008 *Nat. Methods* **5** 491
- [12] Marko J F, Siggia E D 1995 *Macromolecules* **28** 8759
- [13] Lionnet T, Spiering M M, Benkovic S J, Bensimon D, Croquette V 2007 *Natl. Acad. Sci. USA* **104** 19790
- [14] Ran S Y 2012 *Acta Phys. Sin.* **61** 170503 (in Chinese) [冉诗勇 2012 物理学报 **61** 170503]
- [15] Hohng S, Zhou R, Nahas M K, Yu J, Schulten K, Lilley D M, Ha T 2007 *Science* **318** 279
- [16] Lee M, Kim S H, Hong S C 2010 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107** 4985
- [17] Luzzietti N, Brutzer H, Klaue D, Schwarz F W, Staroske W, Clausen S, Seidel R 2010 *Nucl. Acids Res.* **39** e15
- [18] Guo R B, Rigolet P, Zargarian L, Fermandjian S, Xi X G 2005 *Nucl. Acids Res.* **33** 3109
- [19] Yang Y, Dou S X, Xu Y N, Bazeille N, Wang P Y, Rigolet P, Xu H Q, Xi X G 2010 *Biochemistry* **49** 656

A pair of high resolution magnetic tweezers with illumination of total reflection evanescent field and its application in the study of DNA helicases*

Wang Shuang Zheng Hai-Zi Zhao Zhen-Ye Lu Yue Xu Chun-Hua[†]

(Beijing National Laboratory for Condensed Matter Physics, CAS Key Laboratory of Soft Matter Physics, Institute of Physics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China)

(Received 3 April 2013; revised manuscript received 15 April 2013)

Abstract

The resolution of conventional magnetic tweezers is limited by the Brown motion of magnetic beads. When the force is lower than ~ 10 pN, the resolution of magnetic tweezers decreases significantly because of the increased Brown motion. To improve the resolution of magnetic tweezers under low forces, we combine the total internal reflection fluorescence techniques with magnetic tweezers, and design a novel single molecule connection: "magnetic bead-DNA linker-fluorescent bead-single molecule". With the improved magnetic tweezers, we study the folding dynamics of a DNA hairpin. The results reveal that a nanometer-scale resolution is obtained. By analyzing these results, we calibrate the penetration depth of the total internal reflection field. Finally, we investigate the unwinding dynamics of a BLM helicase core protein. Some preliminary results of the helicase unwinding experiments confirm the practicability of the improved magnetic tweezers in the field of single molecular research.

Keywords: magnetic tweezers, total internal reflection fluorescence, DNA hairpin, helicase

PACS: 87.80.Nj, 82.37.Rs, 87.15.H, 87.15.kj

DOI: 10.7498/aps.62.168703

* Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant Nos. 61275192, 11004234) and the National High Technology Research and Development Program of China (Grant No. 2012AA02A104).

[†] Corresponding author. E-mail: xch@iphy.ac.cn