

用全内反射瞬逝场照明磁镊研究 Bloom 解旋 G-四联体

赵振业 徐春华 李菁华 黄星椽 马建兵 陆颖

Study of Bloom resolving G-quadruplex process by using high resolution magnetic tweezer with illumination of total internal reflection

Zhao Zhen-ye Xu Chun-Hua Li Jing-Hua Huang Xing-Yuan Ma Jian-Bing Lu Ying

引用信息 Citation: *Acta Physica Sinica*, 66, 188701 (2017) DOI: 10.7498/aps.66.188701

在线阅读 View online: <http://dx.doi.org/10.7498/aps.66.188701>

当期内容 View table of contents: <http://wulixb.iphy.ac.cn/CN/Y2017/V66/I18>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

单分子荧光共振能量转移数据处理的优化算法

An optimization algorithm for single-molecule fluorescence resonance (smFRET) data processing

物理学报.2017, 66(11): 118701 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.66.118701>

磁镊结合 DNA 发夹的方法在 RecA 蛋白介导的同源重组机制研究中的潜在应用

Combination of magnetic tweezers with DNA hairpin as a potential approach to the study of RecA-mediated homologous recombination

物理学报.2016, 65(21): 218702 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.65.218702>

软物质实验方法前沿: 单分子操控技术

Frontier of soft matter experimental technique: single molecular manipulation

物理学报.2016, 65(18): 188706 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.65.188706>

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

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

物理学报.2013, 62(16): 168703 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.62.168703>

用荧光显微示踪方法研究 RecA 在 DNA 同源识别过程中的工作机理

A study on the mechanism of RecA in homologous recognition by using single molecule fluorescence tracking

物理学报.2012, 61(21): 218701 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.61.218701>

用全内反射瞬逝场照明磁镊研究 Bloom解旋G-四联体*

赵振业¹⁾²⁾ 徐春华¹⁾²⁾ 李菁华³⁾ 黄星楦¹⁾²⁾ 马建兵¹⁾²⁾ 陆颖^{1)2)†}

1)(中国科学院物理研究所, 软物质物理重点实验室, 北京 100190)

2)(中国科学院大学物理学院, 北京 100190)

3)(广东工业大学材料与能源学院, 广州 510006)

(2017年4月11日收到; 2017年5月18日收到修改稿)

G-四联体(G-quadruplex, G4)是广泛存在于细胞基因组中的一种DNA结构,在DNA的代谢如复制、转录、同源重组等过程中起重要作用. G4解旋酶近年来受到广泛研究,其中Bloom (BLM)解旋酶的研究已经相当丰富,但仍有一些基本问题不清楚.我们应用全内反射瞬逝场照明磁镊对BLM解旋G4的动力学过程进行了深入研究,观察到了BLM解旋G4的分步过程.相对于单分子荧光共振能量转移技术而言,借助磁镊的长时间观测性能,我们在近饱和三磷酸腺苷(ATP)浓度的实验体系中观察到BLM长时间反复解开G4或者长时间维持G4于打开状态的两种作用方式.最后,使用相同的实验条件做了单分子荧光共振能量转移实验,确定了加载2—3 pN的外力对BLM解旋G4没有显著影响.

关键词: Bloom解旋酶, G-四联体, 全内反射, 磁镊

PACS: 87.14.G-, 87.15.H-, 87.15.kj

DOI: 10.7498/aps.66.188701

1 引言

G-四联体(G-quadruplex, G4)是由富含串联重复鸟嘌呤(G)的脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸折叠形成的特殊结构.它是由Hoogsteen键连接,其中还需要一价阳离子(Na^+ 或 K^+)来维持其结构的稳定性,如图1(a)所示.迄今为止认为在DNA中有多种G4结构^[1],这些结构受一价阳离子、尾链的长度及序列和三条G4链的连接环(loop)所影响^[2].端粒末端的G4是目前研究得较为透彻的一种G4结构.在钠溶液(Na^+)环境中G4只有一种反平行结构^[3],而在钾溶液(K^+)环境中则有三种较复杂的结构(hybrid1, hybrid2, two layer parallel)^[4].而进一步的研究认为在端粒末端的G-四联体主要有两种结构^[5].文献^[6, 7]报道了失去一

条链的G4也可以稳定存在,被称为G-triplex(G3).端粒的G4对染色体DNA的复制及稳定性起重要作用^[8],存在于调控序列的G4结构对基因表达、免疫调节等也有着至关重要的作用^[9,10].

RecQ解旋酶是一种广泛存在于原核生物到真核生物的DNA解旋酶,在基因组稳定方面有着重要的作用^[11].人的细胞内含五种RecQ家族的解旋酶,其中Bloom (BLM), Werner和Rothmund-Thomson综合症解旋酶的缺失会分别造成Bloom^[12], Werner^[13]和Rothmund-Thomson综合症^[14]三种遗传疾病. Bloom综合症是一种极为罕见的遗传病,它包括一系列的退行性病变如发育不良、智力低下、免疫能力缺失、不育以及多种罕见的癌症.患者的细胞中会出现染色体不稳定,包括染色体断裂、缺失以及姐妹染色单体互换^[15,16].在细胞中, BLM是一种重要的解旋

* 国家自然科学基金(批准号: 11674382, 11574381)资助的课题.

† 通信作者. E-mail: yinglu@iphy.ac.cn

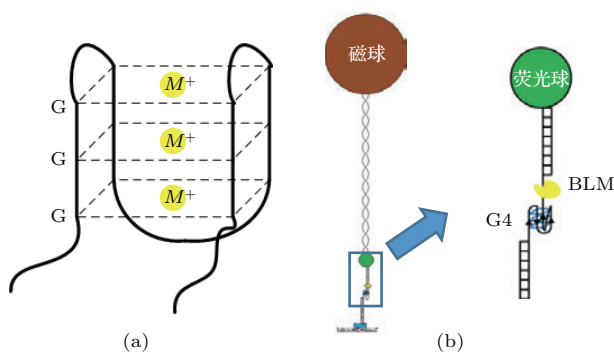


图1 (网刊彩色) (a) G4示意图, M 代表 K 或 Na; (b) 高精度磁镊的单分子系统构成图

Fig. 1. (color online) (a) Schematic illustration of the structure of G4, M represents K or Na; (b) scheme of the single molecule experiment system of high resolution magnetic tweezers.

2.3 smFRET 实验

smFRET 实验所用盖玻片和载玻片都先用浓硫酸和过氧化氢溶液清洗, 然后在盖玻片表面固定 99% 甲基化聚乙二醇 (Laysan Bio, Inc.) 和 1% 的生物素化聚乙二醇 (Laysan Bio, Inc.). 链亲和素 (1 mg/mL) 溶于包含有 50 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5 缓冲液中, 冲入实验用的由 PEG 固定的盖玻片制成的微流样品池中, 并孵育 10 min. 用上述缓冲液冲干净后, 在样品池中加入 20—50 pM 浓度的 DNA 固定 10 min. 未固定于盖玻片表面的 DNA 会被反应缓冲液冲走. 然后在样品池加入含抗淬灭剂 (0.8% 葡萄糖 (D-glucose)、1 mg/mL 葡萄糖氧化酶 (glucose oxidase)、0.4 mg/mL 过氧化氢酶 (catalase) 和 1 mM 水溶性维生素 E (Trolox)) 的反应缓冲液. 实验中所获得的原始数据先进行三点

平滑, FRET 的效率由公式 $I_A/(I_D + I_A)$ 计算得出, 其中 I_D 代表供体的光强, I_A 代表受体的光强.

3 结果与讨论

3.1 G4 实验反应条件的确定

单独的 G4 去折叠实验结果如图 2(a) 所示, 当将磁力缓慢加至 G4 去折叠态的位置时, 可以看到 G4 在折叠和去折叠的状态中来回跳跃. 而在有时可以看见 G4 的中间态, 如图 2(b) 所示. 图 2 纵轴题 l 表示 G4 长度. 这证实了所用的实验设备可以观察到 G4 的反应细节. 在 8 pN 以下, 我们从未看见 G4 的开合. 根据之前的文献 [7, 25] 报道, G4 去折叠最小需要 7 pN 的力, 因此我们的实验与之前的研究相符. 这也确定了后面的实验中所使用的力不超过 7 pN, 实际实验过程中是将磁力加载在 2—3 pN 保持不变.

G4 是一种依靠一价阳离子稳定的分子结构, 一般认为钾离子和钠离子是稳定 G4 的主要稳定剂, 而钾离子稳定效果更佳. 尽管也有实验使用单独的 Na^+ 作为稳定剂, 但在我们的实验中发现, 单独的 Na^+ 稳定效果很差. 如图 3 所示, 在施加了 2—3 pN 的力以后, 发现即使在 150 mM NaCl 溶液中, 仍然可以看到 G4 不稳定的自发开合现象. 而加载力相同的条件下 150 mM KCl 的溶液体系中, G4 可以稳定存在. 因此实验中选择用含 150 mM KCl, 50 mM NaCl, 2 mM MgCl_2 和 1 mM 二硫苏糖醇 (DTT) 溶于 20 mM Tris-HCl, pH 7.5 的缓冲液体系. 在这种反应体系中, G4 以钾离子为稳定剂的构型存在 [26].

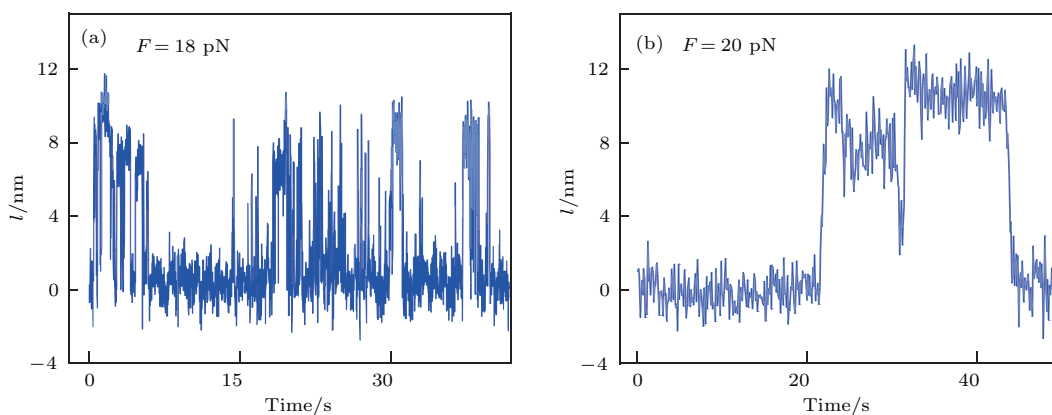


图2 (网刊彩色) (a) G4 在临界力下折叠-去折叠临界转变的反应曲线; (b) 实验中观察到的 G4 折叠-去折叠的分步状态

Fig. 2. (color online) (a) The magnetic tweezer (MT) trace of G4 folding-unfolding; (b) multiple steps in G4 folding-unfolding traces.

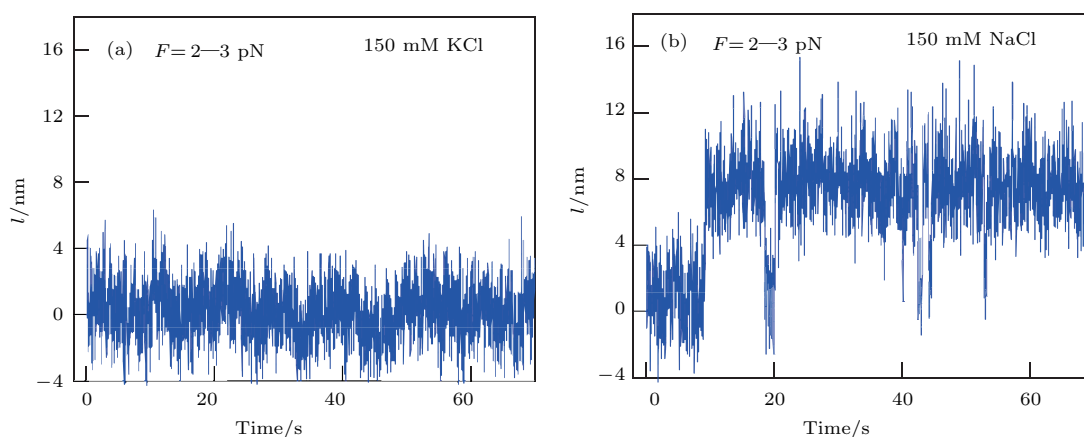


图3 (网刊彩色) (a) 150 mM KCl 缓冲液中的 G4 磁镊反应曲线; (b) 150 mM NaCl 缓冲液中的 G4 磁镊反应曲线

Fig. 3. (color online) (a) The MT trace with 150 mM KCl; (b) the MT traces with 150 mM NaCl.

3.2 低浓度 ATP 下 BLM 分步解旋 G4

在已报道的采用 smFRET 研究 BLM 与 G4 的相互作用实验中, 已确定 BLM 解开 G4 的过程是分步的. 我们将磁镊与全内反射荧光技术结合, 得出了一致的结果. 在 10 nM BLM 和 1 μ M ATP 的实验体系中同样观察到了 G4 的分步解旋, 如图 4(a). 图 4(a) 右侧显示的状态为稳定的 G3 态, 这一状态中 G4 的一条链被打开成自由状态, 可以看到, 底物在 G4 和 G3 两个亚稳态之间来回振荡. 在可以稳定存在的实验条件下, G4 是不会自发打开至 G3 态的. 这说明 BLM 在与 G4 结合后, 会停留在 G4 上很长时间, 从而造成了这种现象. 为了保证这种现象是单个 BLM 造成的, 我们继续降低了 BLM 的浓度, 在 BLM 的浓度为 2 nM 时可以看到反应终止于第 100 s, 如图 4(b) 所示. 在这一 BLM 浓度下, 同样可以看见底物在大部分时间处于 G4 和 G3 这两个态之间. 这意味着 BLM 在与 G4 结合后, 可以停留在 G4 上较长的时间. 这一结果表明 BLM 与 G4 有较长的反应时间, 而且在这段时间内 BLM 并没有离开过 G4, 说明 BLM 和 G4 有较长的结合时间.

当 ATP 浓度达到 20 μ M 时, 实验中已经基本无法看到中间过程, 可以看到 BLM 在 DNA 上快速重复解旋. 从 DNA 长度分布上来看, 这一过程中的 G3 态已经不是很明显. 在本文实验中, 同样可以观察到这一过程可以持续很长的时间, 如图 4(d) 所示.

3.3 高浓度 ATP 下 BLM 解旋 G4 的两种反应现象

上述的 BLM 与 G4 的反应研究中, 为了观察到反应的细节, 大多都采用低浓度的 ATP 进行实验. 本文实验中由于可以在较高的时间分辨率 (50 Hz) 下观察较长的时间 (300 s), 我们进行了高浓度的 ATP 下 BLM 解旋 G4 的实验. 实验中使用的 ATP 浓度为 200—500 μ M, 这一浓度已经接近于 BLM 与 G4 反应的饱和 ATP 浓度^[18]. 为了保证可以观察到单个 BLM 与 G4 的反应, 实验中使用的 BLM 浓度为 2—5 nM. 实验中我们观察到了两种不同的反应现象. 一种是高频率的重复解旋现象, 如图 5(a) 所示. 在实验中, 由于 ATP 的浓度已经接近饱和, 这种高频率的重复解旋发生的时间很长, 同时这种现象还表现为 G4 在大部分时间处于打开的单链状态. 这一反应现象较为符合我们的预期. 而另一种实验现象则出乎我们的意料, 观察到了 BLM 在解开 G4 后, G4 长时间处在单链状态. 这一过程甚至可以持续到 50 s 以上, 如图 5(b) 所示. 这也意味着 BLM 在解旋 G4 后并没有像它在解旋双链 DNA 一样继续移动. 已知的 BLM 解旋模型都认为 ATP 供能后 BLM 会在单链上移动, 而我们却发现了这一反常现象. 上述两种现象以及我们在低浓度 ATP 中的实验结果都可得出一致的结论, 即 BLM 在 ATP 参与下与 G4 的反应过程中都表现出与 G4 很高的亲和力, 这也与文献^[20, 22]的报道一致.

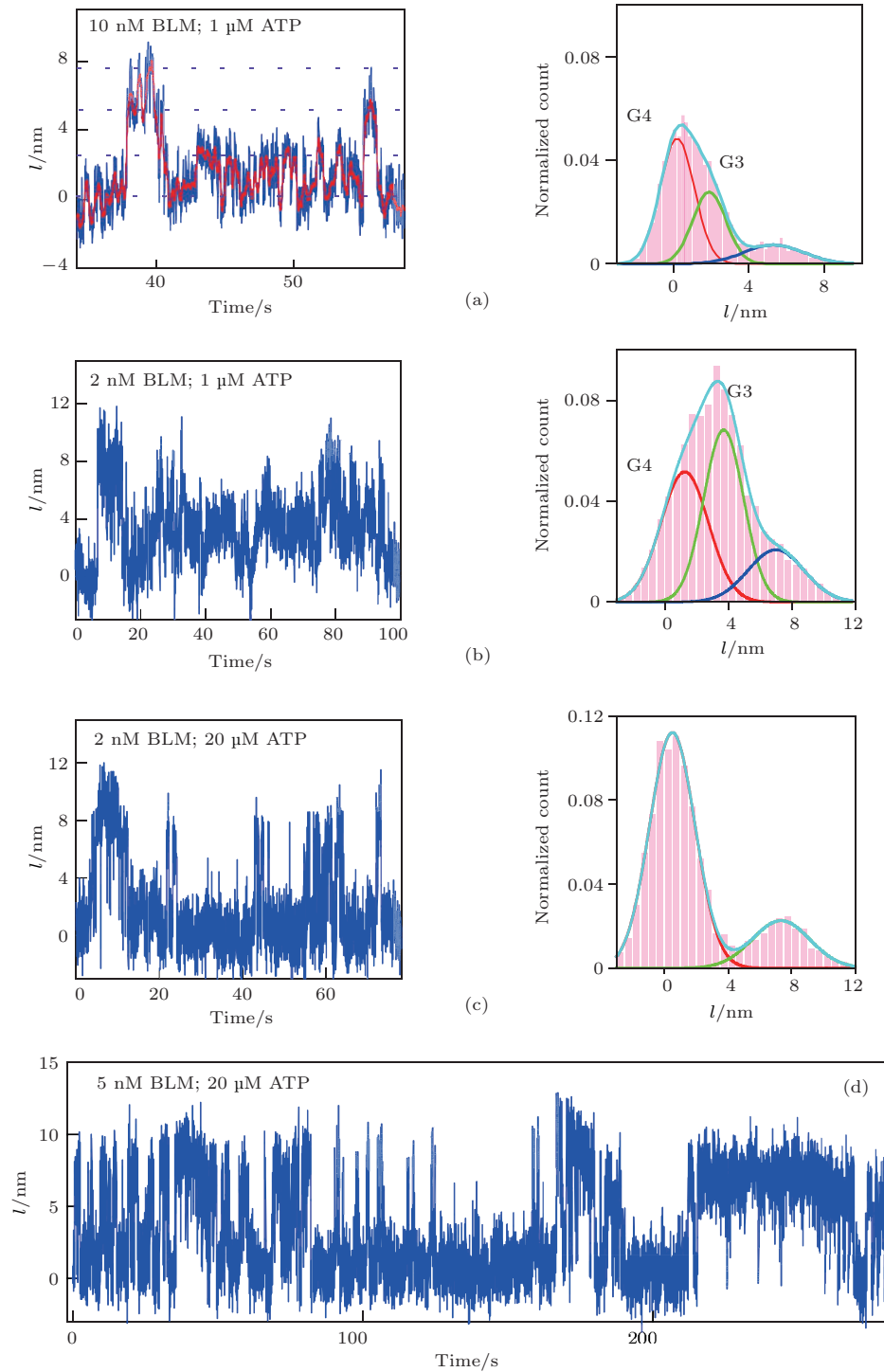


图4 (网刊彩色) 低浓度ATP下磁镊的反应结果 (a) 10 nM BLM, 1 μ M ATP下BLM解旋G4的曲线和伸长分布; (b) 2 nM BLM, 1 μ M ATP下BLM解旋G4的曲线和伸长分布; (c) 2 nM BLM, 20 μ M ATP下BLM解旋G4的曲线和伸长分布; (d) 5 nM BLM, 20 μ M ATP下BLM解旋G4的曲线

Fig. 4. (color online) (a) The MT trace and histograms the length distribution with 10 nM BLM and 1 μ M ATP; (b) the MT trace and histograms of the length distribution with 2 nM BLM, 1 μ M ATP; (c) the MT trace and histograms of the length distribution with 2 nM BLM, 20 μ M ATP; (d) the MT traces with 5 nM BLM, 20 μ M ATP.

与现阶段通用的smFRET实验方法相比, 高精度磁镊可以在较高的空间分辨率的前提下, 同时提高时间分辨率和延长观测时间. 但是, 与sm-

FRET最重要的不同是高精度磁镊可以在实验中对反应底物施加拉力. 对解旋酶而言, DNA是否受力会对解旋的模式产生重大影响^[27]. 尽管在实

验中只施加了2—3 pN的极小的拉力, 但是我们认为有必要确认在高精度磁镊中观察到的结果是否是受到力的影响. 我们以FRET实验来与磁镊实验结果进行对比. 通过这种实验方法, 可以有效地测量3—8 nm的变化^[28]. 为了测量实验中G4的变化, 构建了图6(a)所示的DNA. 已知G4打开会

有21 nt的DNA伸长, 而理论计算得出的长度变化为6—8 nm, 反映在荧光共振能量转移的效率曲线上, 这个变化大约是由0.8到0.2. 在加入G4无法稳定形成的缓冲液后, 可以看到G4自发的开合, 如图6(b)所示.

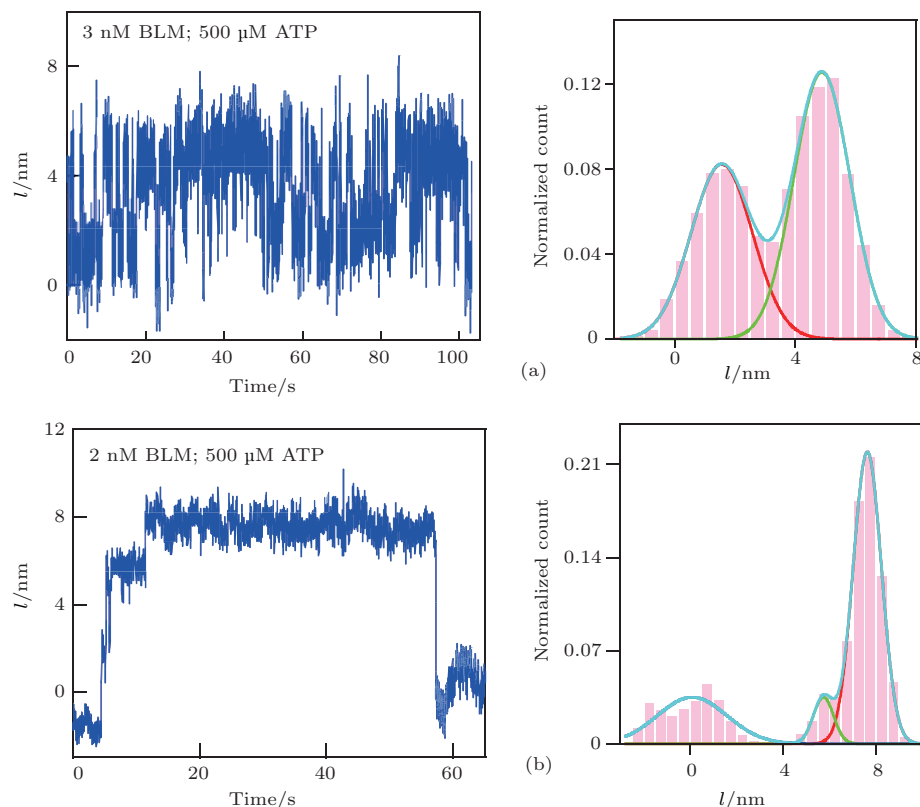


图5 (网刊彩色) 高浓度ATP下磁镊的实验结果 (a) 3 nM BLM, 500 μ M ATP下BLM解旋G4的曲线和伸长分布; (b) 2 nM BLM, 500 μ M ATP下BLM解旋G4的曲线和伸长分布

Fig. 5. (color online) (a) The MT trace and histograms of the length distribution with 3 nM BLM, 500 μ M ATP; (b) the MT trace and histograms of the length distribution with 2 nM BLM, 500 μ M ATP.

3.4 加载外力对BLM解旋G4的影响

smFRET实验中BLM解旋G4的反应条件与磁镊实验一致. 如图6(c)所示, 在1 μ M的ATP下, smFRET的结果与磁镊的结果基本一致. 在smFRET实验中我们也观察到了BLM分步解旋G4的过程, 同时也观察到了长时间的重复解旋. 如图6(d)所示, 在ATP浓度达到20 μ M时, BLM解旋G4的过程明显加快, 重复解旋的次数也明显增多. 本文smFRET结果与前述的smFRET结果是一致的. 以上的结果说明在磁镊实验中加载2—3 pN的拉力对BLM解旋并没有造成显著影响.

为了观察高浓度ATP下的解旋信号, 我们降

低了smFRET实验中的激发光强, 这在一定程度上降低了smFRET的空间分辨率, 但却可以延长观测时间. 如图6(e)和图6(f)所示, 在200 μ M ATP的实验结果中, 同样观察到了两种不同的实验现象. 在长时间停留的实验现象中, 由于使用了低浓度的BLM, 所以在实验中G4处于折叠态时, 我们认为BLM没有工作. 这两种现象与磁镊的结果相对应. 高浓度ATP的smFRET实验结果再次证明了2—3 pN的力对BLM解旋的影响不大. 同时, 在磁镊中得到的反常的BLM长时间停留于单链的现象也显然不是由于磁力造成的. 这种现象的机制值得进一步研究.

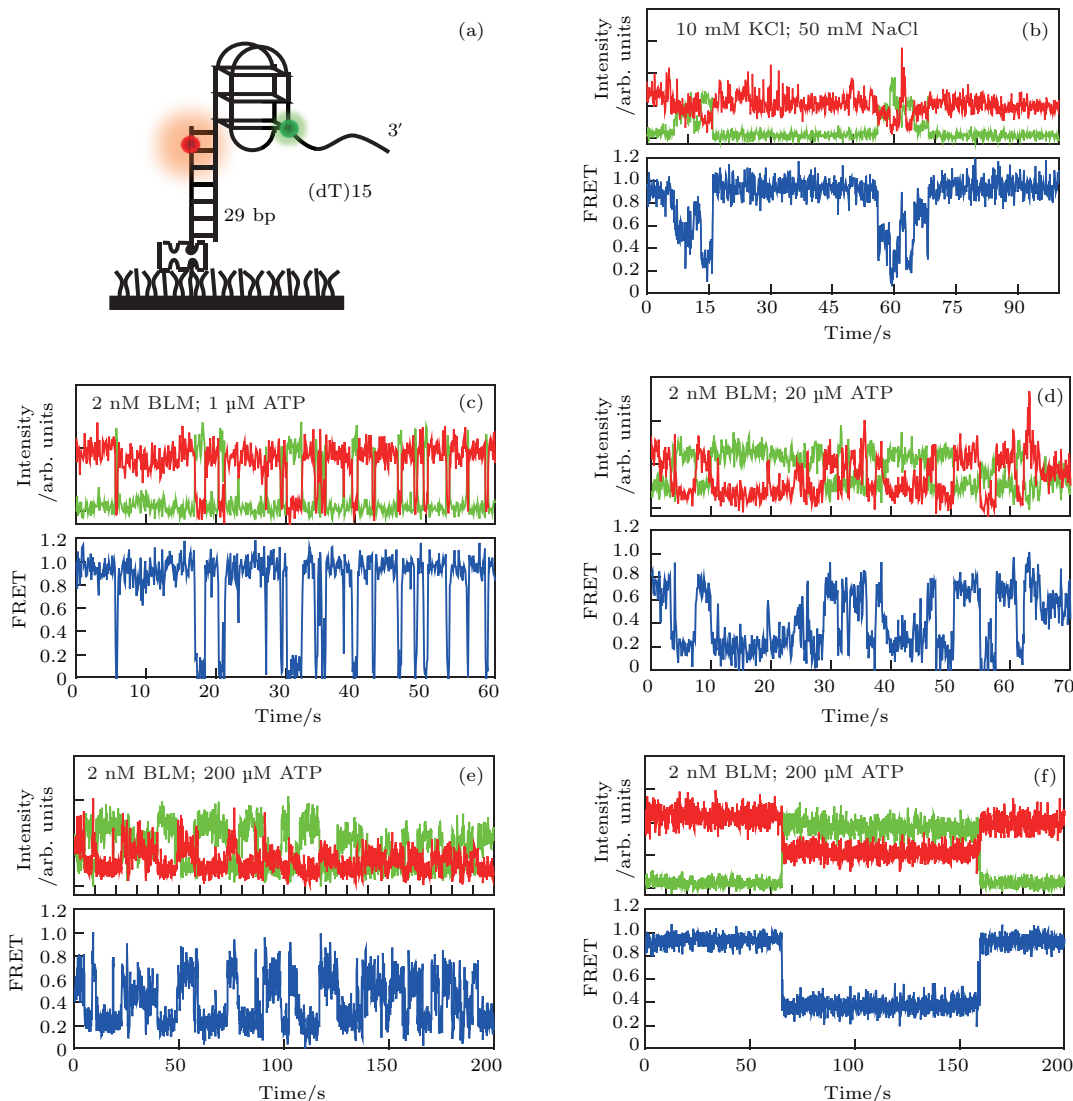


图6 (网刊彩色) (a) FRET 实验中 G4 示意图, G4 与磁镊实验中的 G4 结构相同, cy3 (绿色) 和 cy5 (红色) 分别标在 G4 链上和互补的单链上, G4 的单链和互补链形成双链的支架, 生物素将 DNA 连接于有链亲和素的玻片表面上; (b) 在 10 mM KCl, 50 mM NaCl 溶液环境中 cy3 和 cy5 的荧光光强的曲线 (上层) 和 FRET 曲线; (c) 2 nM BLM, 1 μM ATP 下 cy3 和 cy5 的荧光光强的曲线 (上层) 和 FRET 曲线; (d) 2 nM BLM, 20 μM ATP 下 cy3 和 cy5 的荧光光强的曲线 (上层) 和 FRET 曲线; (e), (f) 2 nM BLM, 200 μM ATP 下 cy3 和 cy5 的荧光光强的曲线 (上层) 和 FRET 曲线

Fig. 6. (color online) (a) Schematic diagram of cy3 (green)- and cy5 (red)-labeled DNA construct (G4) with G4 having three G-quartet planes, the G4 strand and the complementary stem strand are annealed to form a duplex stem, biotin is used to immobilize the DNA to a streptavidin-coated coverslip surface; (b) traces of fluorescence intensities of cy3 and cy5 (upper panel) and FRET trace (lower panel) in 10 mM KCl and 50 mM NaCl buffer; (c) traces of fluorescence intensities of cy3 and cy5 (upper panel) and FRET trace (lower panel) of G4 with 2 nM BLM and 1 μM ATP; (d) traces of fluorescence intensities of cy3 and cy5 (upper panel) and FRET trace (lower panel) of G4 with 2 nM BLM and 20 μM ATP; (e), (f) traces of fluorescence intensities of cy3 and cy5 (upper panel) and FRET trace (lower panel) of G4 with 2 nM BLM and 200 μM ATP.

4 结 论

本文中使用了高精度磁镊方法研究了 BLM 解旋 G4 的过程. 实验中继 smFRET 实验之后同样观察到了 BLM 解旋 G4 的分步过程, 同时在小力的环

境下, 磁镊除了可以提高分辨率以外, 还可以定性地得出反应过程中能量的变化, 其可长时间观测的性能也使我们完成了接近饱和 ATP 浓度体系的实验. 在这种实验条件下观察到了两种反应现象: 一种为重复解旋, 另一种为反常的解旋后解旋酶停留. 可从磁镊实验结果得出如下结论: BLM 与 G4

在解旋过程中有很强的亲和力. 最后我们将使用 smFRET 实验技术的结果与磁镊实验的结果进行对比, 确定了外力在BLM解旋过程中的作用. 本文的结果展示了高精度磁镊的应用前景, 它将来可以在单分子研究领域发挥更多的作用.

参考文献

- [1] Phan A T 2010 *FEBS J.* **277** 1107
- [2] Maizels N, Gray L T 2013 *PLoS Genet.* **9** 1003468
- [3] Noer S L, Preus S, Gudnason D, Aznauryan M, Mergny J L, Birkedal V 2016 *Nucl. Acids Res.* **44** 464
- [4] Lim K W, Amrane S, Bouaziz S, Xu W X, Mu Y G, Patel D J, Luu K N, Phan A T 2009 *J. Am. Chem. Soc.* **131** 4301
- [5] Hansel R, Lohr F, Trantirek L, Dotsch V 2013 *J. Am. Chem. Soc.* **135** 2816
- [6] Li W, Hou X M, Wang P Y, Xi X G, Li M 2013 *J. Am. Chem. Soc.* **135** 6423
- [7] Koirala D, Mashimo T, Sannohe Y, Yu Z, Mao H, Sugiyama H 2012 *Chem. Commun.* **48** 2006
- [8] Balasubramanian S, Neidle S 2009 *Curr. Opin. Chem. Biol.* **13** 345
- [9] Huppert J L, Balasubramanian S 2005 *Nucl. Acids Res.* **33** 2908
- [10] Todd A K, Johnston M, Neidle S 2005 *Nucl. Acids Res.* **33** 2901
- [11] Croteau D L, Popuri V, Opresko P L, Bohr V A 2014 *Annu. Rev. Biochem.* **83** 519
- [12] Cheok C F, Bachrati C Z, Chan K L, Ralf C, Wu L, Hickson I D 2005 *Biochem. Soc. Trans.* **33** 1456
- [13] Goto M 2000 *Clin. Exp. Rheumatol.* **18** 760
- [14] Lindor N M, Furuichi Y, Kitao S, Shimamoto A, Arndt C, Jalal S 2000 *Am. J. Med. Genet.* **90** 223
- [15] German J, Sanz M A, Ciocci S, Ye T Z, Ellis N A 2007 *Hum. Mutat.* **28** 743
- [16] Ellis N A, Groden J, Ye T Z, Straughen J, Lennon D J, Ciocci S, Proytcheva M, German J 1995 *Cell* **83** 655
- [17] Wu L, Hickson I D 2003 *Nature* **426** 870
- [18] Xu Y N, Bazeille N, Ding X Y, Lu X M, Wang P Y, Bugnard E, Grondin V, Dou S X, Xi X G 2012 *Nucl. Acids Res.* **40** 9802
- [19] Sun H, Karow J K, Hickson I D, Maizels N 1998 *J. Biol. Chem.* **273** 27587
- [20] Budhathoki J B, Ray S, Urban V, Janscak P, Yodh J G, Balci H 2014 *Nucl. Acids Res.* **42** 11528
- [21] Chatterjee S, Zigelbaum J, Savitsky P, Sturzenegger A, Huttner D, Janscak P, Hickson I D, Gileadi O, Rothenberg E 2014 *Nat. Commun.* **5** 5556
- [22] Tippiana R, Hwang H, Opresko P L, Bohr V A, Myong S 2016 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **113** 8448
- [23] Wu W Q, Hou X M, Li M, Dou S X, Xi X G 2015 *Nucl. Acids Res.* **43** 4614
- [24] Wang S, Zheng H Z, Zhao Z Y, Lu Y, Xu C H 2013 *Acta Phys. Sin.* **62** 168703 (in Chinese) [王爽, 郑海子, 赵振业, 陆越, 徐春华 2013 物理学报 **62** 168703]
- [25] Boncina M, Lah J, Prislani I, Vesnaver G 2012 *J. Am. Chem. Soc.* **134** 9657
- [26] Ambrus A, Chen D, Dai J X, Bialis T, Jones R A, Yang D Z 2006 *Nucl. Acids Res.* **34** 2723
- [27] Manosas M, Xi X G, Bensimon D, Croquette V 2010 *Nucl. Acids Res.* **38** 5518
- [28] Roy R, Hohng S, Ha T 2008 *Nat. Meth.* **5** 507

Study of Bloom resolving G-quadruplex process by using high resolution magnetic tweezer with illumination of total internal reflection*

Zhao Zhen-Ye¹⁾²⁾ Xu Chun-Hua¹⁾²⁾ Li Jing-Hua³⁾ Huang Xing-Yuan¹⁾²⁾
 Ma Jian-Bing¹⁾²⁾ Lu Ying^{1)2)†}

1) (*Key Laboratory of Soft Matter Physics, Institute of Physics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China*)

2) (*School of Physical Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China*)

3) (*Material and Energy School, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510006, China*)

(Received 11 April 2017; revised manuscript received 18 May 2017)

Abstract

G-quadruplex (G4) is a DNA structure which commonly exists in human genome, and it is considered as an important structure in DNA metabolism such as replication, transcription and homologous recombination. The G-quadruplex helicases have been widely investigated these years. Of them, the Bloom (BLM) helicase is most thoroughly studied. However, there are some basic problems that are still unclear. Most of previous studies of G4 are performed by single molecule fluorescence resonance energy transfer technique. The G4 is in a free state in these experiments, which is different from the physiological environment in cells. The traditional magnetic tweezers have a limitation of spatial resolution in a low force circumstance. Thus here we use high resolution magnetic tweezer under the illumination of total internal reflection fluorescence to study the process of BLM resolving G4. Our modification of magnetic tweezer is to separate the measurements of force and distance of magnetic tweezer in order to improve the spatial resolution, which allows us to observe the unfolding process of G4. With a 2–3 pN force we find that the process of BLM unfolding G4 in low ATP concentration is stepwise, and the G4 is mainly in the state between G-quadruplex and G-triplex. We also find that the BLM could interact with G4 for a long time. Our apparatus is also able to obtain the long time observation results compared with the single molecule fluorescence technique. So we perform experiments with a nearly saturated ATP concentration. We find that the BLM has two ways to maintain G4 dissolution in this condition. The BLM could unfold the G4 repetitively in a long period and it could also keep the G4 in unfolding state for a long time after it has opened the G4. Finally, we also perform single molecule fluorescence resonance energy transfer experiment in the same condition, and we find that the 2–3 pN force in magnetic tweezers has a rare influence on the process of BLM interacting with G4. The results of single molecule fluorescence resonance energy transfer experiments are corresponding to the results of magnetic tweezer in the same conditions. All of our experimental results show that ATP dependent BLM has a high affinity with G4 and BLM has a different way to resolve G4 in high ATP concentration. These results could provide new ideas of the mechanism of BLM resolving G4. Our modified magnetic tweezer shows its capacity in G4 single molecule study, and it could be a useful tool in the future single molecule studies.

Keywords: Bloom helicase, G-quadruplex, total internal reflection, magnetic tweezer

PACS: 87.14.G–, 87.15.H–, 87.15.kj

DOI: 10.7498/aps.66.188701

* Project supported by the National Science Foundation of China (Grant Nos. 11674382, 11574381).

† Corresponding author. E-mail: yinglu@iphy.ac.cn