

基于片层光照明的新型单分子横向磁镊

马建兵 翟永亮 农大官 李菁华 付航 张兴华 李明 陆颖 徐春华

Single molecule transverse magnetic tweezers based on light sheet illumination

Ma Jian-Bing Zhai Yong-Liang Nong Da-Guan Li Jing-Hua Fu Hang Zhang Xing-Hua Li Ming  
Lu Ying Xu Chun-Hua

引用信息 Citation: [Acta Physica Sinica](#), 67, 148702 (2018) DOI: 10.7498/aps.67.20180441

在线阅读 View online: <http://dx.doi.org/10.7498/aps.67.20180441>

当期内容 View table of contents: <http://wulixb.iphy.ac.cn/CN/Y2018/V67/I14>

---

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

[tBid 蛋白引发磷脂膜透化过程的研究](#)

Fluorescent investigation on process of tBid inducing membrane permeabilization

物理学报.2018, 67(14): 148703 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.67.148703>

[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>

# 基于片层光照明的新型单分子横向磁镊\*

马建兵<sup>1)2)</sup> 翟永亮<sup>1)</sup> 农大官<sup>1)2)</sup> 李菁华<sup>1)</sup> 付航<sup>3)</sup> 张兴华<sup>3)</sup>  
李明<sup>1)2)</sup> 陆颖<sup>1)</sup> 徐春华<sup>1)†</sup>

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

2) (中国科学院大学物理科学学院, 北京 100049)

3) (武汉大学生命科学院高等研究院, 武汉 430072)

(2018年3月14日收到; 2018年4月8日收到修改稿)

磁镊是一种高精度的单分子技术, 它用磁场对连有生物大分子的超顺磁球产生磁力, 通过追踪磁球的位置来测量生物大分子的长度信息. 磁镊包括横向磁镊和纵向磁镊. 纵向磁镊空间精度高, 但昂贵; 横向磁镊简单便宜, 但由于受其成像原理的限制, 一般情况下只能连接较长的DNA等生物大分子, 且其空间精度较差, 进而限制了其应用范围. 为了解决这个问题, 本文改进了横向磁镊, 用片层光照明的方法使光线主要被磁球散射, 从而能够直接观察到吸附在样品槽侧壁上的磁球, 这使得测量短连接的底物成为可能. 对于实际应用的检测, 首先测试了包含270 bp发卡结构的0.5  $\mu\text{m}$  双链DNA, 用其中发卡结构的“折叠-去折叠”跳变过程证明了改进后的横向磁镊的确可以追踪短DNA等生物大分子. 然后, 进一步用16  $\mu\text{m}$ 的 $\lambda$ -DNA检验了实验系统. 最后, 将新型横向磁镊与普通横向磁镊及纵向磁镊在小力和大力条件下拉伸不同长度DNA的噪声进行了比较, 发现改进后的横向磁镊在空间精度上明显优于普通横向磁镊, 与纵向磁镊相比也无明显差异. 以上结果证明了改进后的横向磁镊的精度优势, 并扩展了横向磁镊的应用范围.

**关键词:** 横向磁镊, 片层光照明, 单分子

**PACS:** 87.80.Nj, 82.37.Rs, 82.39.Pj

**DOI:** 10.7498/aps.67.20180441

## 1 引言

单分子技术可以直接测量单个分子的动力学过程等系综实验难以获得的重要信息. 20世纪90年代以来, 单分子技术快速发展<sup>[1-5]</sup>, 这些技术主要被用来研究DNA或蛋白质或它们之间的相互作用, 得到了大量重要结果, 这些技术主要包括光镊<sup>[6-11]</sup>、磁镊<sup>[12-16]</sup>、原子力显微镜<sup>[17]</sup>、荧光共振能量转移<sup>[7,18-19]</sup>和单分子荧光成像<sup>[20-23]</sup>. 其中, 磁镊的一个重要优点是它可以同时对多个单分子进行高通量的测试, 实验效率较高, 从而被广泛使用<sup>[24]</sup>.

一般地, 磁镊样品槽内表面通过化学修饰连接

DNA等大分子, 在DNA分子另一端连接微米量级的超顺磁球, 再通过磁铁操纵超顺磁球, 最后用成像装置来追踪超顺磁球的位置从而获得DNA的长度信息. 实验测得的数据不可避免地有一定的噪声, 对噪声的成因分析有助于提高仪器的性能.

根据能量均分定理, 磁镊在力方向上的噪声 $\sqrt{\langle \delta x^2 \rangle}$ 满足

$$\sqrt{\langle \delta x^2 \rangle} = \sqrt{k_B T / k_{\text{DNA}}}, \quad (1)$$

其中 $\langle \delta x^2 \rangle$ 是磁球在垂直于力的 $X$ 方向上振动方差的平均值;  $k_B$ 是玻尔兹曼常数;  $T$ 是热力学温度;  $k_{\text{DNA}}$ 是DNA的弹性系数.

另一方面, 在0.1—10.0 pN的拉力范围内, 描述双链DNA (dsDNA) 响应拉伸力的最好模型是蠕

\* 国家自然科学基金 (批准号: 11574381, 11574382) 资助的课题.

† 通信作者. E-mail: xch@iphy.ac.cn

虫链 (worm-like-chain, WLC) 模型:

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

其中  $A$  是 DNA 的驻留长度;  $L_0$  是 DNA 的轮廓长度;  $L$  是 DNA 沿拉力方向的伸长;  $F$  是 DNA 两端的力; 根据胡克定律, 对 (2) 式求偏导  $\partial F/\partial L$  就是 DNA 的弹性系数  $k_{\text{DNA}}$ . 进而得到磁镊在力方向上的噪声  $\sqrt{\langle \delta x^2 \rangle}$  满足

$$\sqrt{\langle \delta x^2 \rangle} = \sqrt{2AL_0/(2 + (1 - L/L_0)^{-3})}, \quad (3)$$

也就是说, 在  $F$  固定的条件下, DNA 在力方向伸长的噪声与 DNA 轮廓长度的平方根成正比. 所以 DNA 越短, 系统的空间分辨率越高.

较早的磁镊研究中常选用较长的 DNA 来研究 DNA 的弹性性质<sup>[25,26]</sup>; 随着对仪器测量精度要求越来越高, 人们开始在磁镊中使用短 DNA<sup>[27]</sup>. 磁镊分为纵向磁镊和横向磁镊: 当光路和磁球受力在同一个方向叫作纵向磁镊, 当两者垂直时叫作横向磁镊. 由于纵向磁镊可以连接较短的 DNA 或蛋白质, 所以它的空间分辨率可以更高, 但纵向磁镊需要压电陶瓷和大数值孔径 ( $NA$ ) 目镜等昂贵元件. 虽然横向磁镊仪器更加简单便宜, 但是由于样品槽侧壁在显微镜里形成一段几微米宽的阴影区, 当磁球离侧壁太近时其成像就会受到干扰, 所以一直以来无法用来测量较短的 DNA 或蛋白质; 而长 DNA 的使用则导致噪声较大, 空间分辨率较低, 限制了其应用范围.

为了解决横向磁镊的这个问题, 本文用毛细玻璃管作为样品槽, 激光作为光源, 经过柱面镜聚焦到与样品槽侧壁相连的超顺磁球上, 磁球的散射光被显微镜系统的探测器收集, 在计算机上实时显示. 用这种片层光照明的方法, 实现了对直接固定在毛细管侧壁上的磁球的观察. 然后, 用轮廓长度为  $0.5 \mu\text{m}$  包含 270 bp 发卡结构 (hairpin) 的 dsDNA 和轮廓长度为  $16.4 \mu\text{m}$  的  $\lambda$ -DNA 检验了系统的可靠性. 最后, 对比了新型横向磁镊拉伸不同长度 DNA 的噪声, 发现小力条件下短 DNA 的噪声明显小于长 DNA; 对比了新型横向磁镊和纵向磁镊拉伸短 DNA 的噪声, 发现小力条件下简单的新型横向磁镊的噪声和复杂的纵向磁镊无明显区别. 以上结果证明了新型横向磁镊在不明显增加设备成本的条件下, 的确提高了精度, 且能够追踪

短 DNA, RNA 或蛋白质, 扩展了横向磁镊的应用范围.

## 2 实验方法和材料

### 2.1 光路原理和结构

传统的横向磁镊技术用的是倒置光学显微镜的明场照明<sup>[24]</sup>. 图 1(a) 所示的是改进的高精度横向磁镊的光路原理: 一束普通的平行激光, 经过柱面镜汇聚成一条焦线. 这是因为柱面镜跟球面镜不同: 球面镜在平面的各个方向的焦距相同, 可以把一束光聚焦成为一个点; 而柱面镜只在平面内的其中一个方向上聚焦, 在其他方向上都没有聚焦效果, 从而把一束光聚焦成一条线.

调节焦线位置使其刚好照射到连接在毛细管左侧内壁的磁球上. 被磁球散射的光被普通  $40\times$  的物镜收集, 在录像设备 (CCD, 型号为 GE680) 上成像, 并在计算机上用灰度重心法实时追踪磁球的位置. 钕铁硼磁铁位于磁球的另一侧, 对磁球施以皮牛 (pN) 量级的拉力, 操纵和磁球相连的 DNA, RNA 或蛋白质. 激光、磁球和磁铁沿  $X$  轴方向成一条直线. 图 1(b) 展示了新型横向磁镊的装置设计图, 其中激光器购于北京世峰多光科技有限公司, 型号是  $12 \times 35$  APCMD, 价格约 100 元. 一方面: 片层光的厚度越窄, 磁球散射的光越强, 采集到的信号就更强, 原则上能达到的定位精度更高; 另一方面: 由于磁球分散在侧壁上不同的位置, 为了一次观察到较多磁球, 需要保留足够的照明区域. 激光经过焦距为 80 mm 的柱面镜聚焦后, 聚焦后焦线如图 1(c) 所示, 其半高全宽 (FWHM) 为  $275 \mu\text{m}$  (图 1(d)), 这个宽度可以在一定程度上兼顾精度和照明范围. 片层光照明使光线主要照射到微米级的磁球上, 使得这种横向磁镊装置成为一种暗场照明, 接收不到除磁球散射之外的光. 如图 1(e) 所示, 是 CCD 采集到的直径为  $2.8 \mu\text{m}$  的超顺磁球的图像. 与之对比的是图 1(f) 中传统横向磁镊得到的相同磁球的图像.

文中用到的传统横向磁镊原理参考文献<sup>[28]</sup>, 用到的物镜及软件和新型横向磁镊相同. 文中用到的纵向磁镊仪器物镜的放大倍数是  $100\times$ ,  $NA$  值是 1.49, 追踪软件基于磁球衍射环随焦面的变化规律编写, 具体参考文献<sup>[29]</sup>.

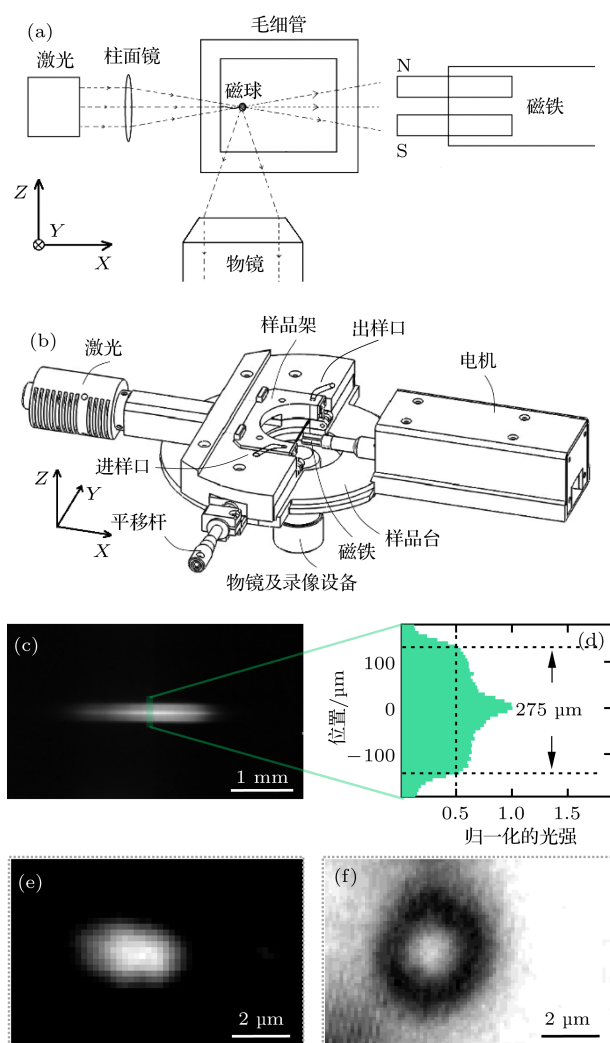


图1 片层光照明的横向磁镊示意图 (a) 光路原理图; (b) 装置设计图; (c) 聚焦后激光的焦线; (d) 焦线宽度方向上的光强分布; (e) 新型横向磁镊磁球的暗场成像图; (f) 传统横向磁镊磁球的明场成像图

Fig. 1. Schematic diagram of light sheet illuminative transverse magnetic tweezers (TMT): (a) Light after focusing; (b) installation plan; (c) light after focusing; (d) intensity profile along the width direction of the light after focusing; (e) micrograph of a  $2.8\ \mu\text{m}$  diameter superparamagnetic bead by the novel TMT; (f) micrograph of a  $2.8\ \mu\text{m}$  diameter superparamagnetic bead by the traditional TMT.

## 2.2 DNA 的结构

实验用到的DNA有两种,一种是轮廓长度为 $16.4\ \mu\text{m}$ 的 $\lambda$ -DNA,另一种是轮廓长度为 $0.5\ \mu\text{m}$ 带有270 bp hairpin的双链DNA.其中, $\lambda$ -DNA(购于NEB公司)两端分别连上修饰了生物素(biotin)或地高辛(digoxigenin)的12个碱基的小片段(3' biotin-cccgcgcgtgga和3' digoxigenin-tccagcggcgagg,生工生物工程(上海)股份有限公司).另外一个

$0.5\ \mu\text{m}$ 带有270 bp hairpin的dsDNA制备方法及序列见参考文献[30].在离hairpin开口端大约90 bp附近有一个GC丰富区,会导致在14 pN附近打开hairpin时先打开前约90 bp.

## 2.3 缓冲液

PBS缓冲液( $20\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH = 8.0,  $150\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{NaCl}$ )经高温高压灭菌处理后用孔径为 $0.2\ \mu\text{m}$ 的滤膜过滤.钝化缓冲液(pas-sivation buffer, PB) ( $10\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{PB}$ , pH = 8.0,  $1\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  乙二胺四乙酸(EDTA),  $10\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{NaN}_3$ (高温撞击爆炸,剧毒),  $10\ \text{mg}/\text{mL}$ 牛血清蛋白(BSA),  $10\ \text{mg}/\text{mL}$  Pluronic F127)直接用孔径为 $0.2\ \mu\text{m}$ 的滤膜过滤.

## 2.4 实验流程

选用的方形毛细管外边长1 mm,内边长 $0.5\ \text{mm}$ ,每段约50 mm.在超声清洗仪里按顺序用甲醇(30 min)和丙酮(30 min)清洗毛细管,再用食人鱼洗液(浓硫酸和双氧水的体积比为7:3,  $95\ ^\circ\text{C}$ 水浴120 min)进一步清洗.然后用Sigma-cote (Sigma公司,有毒,10 min)对毛细管内壁进行表面预修饰,最后在烘箱里烘干,置于真空干燥塔(避光)备用.使用毛细管的优点一方面是方便使用片层光照明,另一方面是毛细管不用花费时间制作样品池,且每次可以清洗上千根毛细管,可以节省大量人力物力.

实验前先把样品架用超声清洗机清洗干净,然后把毛细管固定在样品架上,并连好进样口和出样口.灌入 $0.2\ \text{mg}/\text{mL}$ 抗地高辛(Anti-digoxigenin, 购于Roche Diagnostics, 孵育1 h以上).用钝化缓冲液置换Anti-digoxigenin溶液,孵育至少30 min以防止实验中的非特异吸附.将 $100\ \text{pmol}\cdot\text{L}^{-1}$  DNA与表面修饰了链亲合素蛋白的顺磁性小球(M-280, 购于Invitrogen公司)混合20 min,使DNA与磁球相连;然后灌入竖直的样品槽,使磁球通过重力作用沉降到毛细管的侧壁上,孵育20 min,从而使DNA通过地高辛-抗地高辛的特异性相互作用连在毛细管侧壁.最后用吸水纸或微流泵在出样口引流,用PBS缓冲液把溶液中自由的磁球慢慢地冲掉.所有实验的图像采集速率都是25 帧/s.

### 3 结果与讨论

#### 3.1 直接追踪吸附到毛细管侧壁上的磁球

片层光照明的方式使这种样品槽中几乎只有磁球的散射光线, 样品槽其他位置都不成像, 所以这种横向磁镊可以直接追踪吸附到毛细管侧壁上的磁球. 在未经钝化处理的样品槽里连接了如图2(a)所示的超顺磁球,  $X$ 轴方向为垂直于侧壁的方向也是施加磁力的方向,  $Y$ 方向为平行于侧壁方向. 实验发现片层光照明的横向磁镊可以直接观察到紧贴在样品槽侧壁上的磁球(图1(e)).

追踪这种磁球的位置信息, 由于 $X$ 轴所在的方向是用于测量DNA的长度的方向, 所以 $X$ 方向的追踪噪声是DNA长度的噪声. 图2(b)展示了磁球在 $X$ 方向上一段约100 s的轨迹, 追踪轨迹的噪声符合高斯分布, 噪声大小为4 nm.

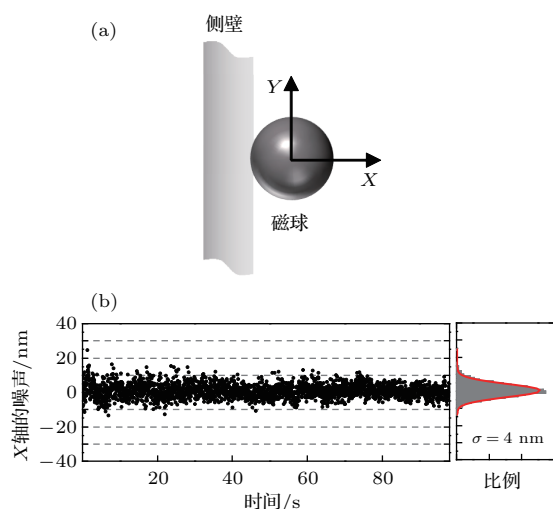


图2 吸附在毛细管表面磁球的噪声 (a) 磁球固定在毛细管侧壁的示意图; (b) 磁球在 $X$ 轴上的噪声

Fig. 2. Noise of the magnetic sphere on the capillary surface: (a) Schematic diagram of the experiment; (b) noise on the  $X$  axis.

#### 3.2 追踪通过短DNA连接的磁球

为了进一步检验片层光照明的横向磁镊, 将轮廓长度为 $0.5\ \mu\text{m}$ 的短双链DNA引入实验体系. 如图3(a)所示, 这个双链DNA带有一段270 bp hairpin. DNA的这种二级结构会在14 pN附近发生“折叠-去折叠”两种状态的跳变<sup>[31]</sup>. 如图3(b)所

示, 把hairpin两端的磁力加到14 pN, 出现了hairpin的“折叠-去折叠”跳变, 其中状态①是折叠态, 状态②是去折叠态. 跳变的距离约为270 nm, 与在PBS缓冲液里 $2 \times 270\ \text{nt}$ 单链DNA (ssDNA) 的长度约270 nm符合<sup>[32]</sup>. 除了“完全折叠”和“完全去折叠”这两种状态之外, 还在离“完全折叠”约1/3 hairpin长度的位置出现一个不太稳定的亚稳态③. 同时, 检查hairpin序列发现在这个位置有一段GC丰富区, 使得hairpin DNA在这个位置比较稳定, 导致在14 pN打开hairpin时在这个位置出现一个亚稳态. 这些细节与用纵向磁镊测得的信息完全一致.

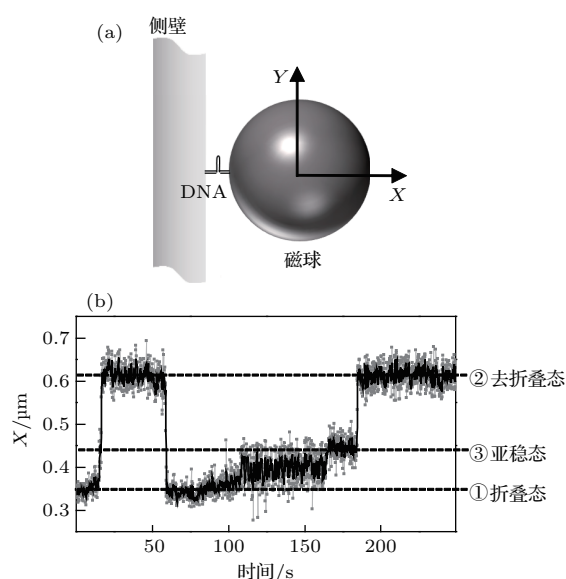


图3 hairpin的折叠去折叠 (a) 磁球通过 $0.5\ \mu\text{m}$ , 包含270 bp hairpin的dsDNA和侧壁连接的示意图; (b) 270 bp hairpin 折叠和去折叠的时间轨迹

Fig. 3. State transition of the folded and unfolded hairpin: (a) Schematic diagram of a  $0.5\ \mu\text{m}$  dsDNA with 270 bp hairpin between the bead and the lateral surface; (b) length vs. time curve of the dsDNA containing 270 bp hairpin.

#### 3.3 追踪通过长DNA连接的磁球

进一步地, 把 $0.5\ \mu\text{m}$ 的短dsDNA换成 $16\ \mu\text{m}$ 长的 $\lambda$ -DNA检验片层光照明的横向磁镊(图4(a)). 按磁力由大到小的顺序对 $\lambda$ -DNA进行了拉伸实验. 如图4(b)所示, 磁铁由近到远, 一共在11个位置停留, 每个位置都停留了200 s左右. 随着磁力的减小, 相应的 $\lambda$ -DNA在 $X$ 方向上越来越短, 且在 $X$ 和 $Y$ 方向上的噪声越来越大.

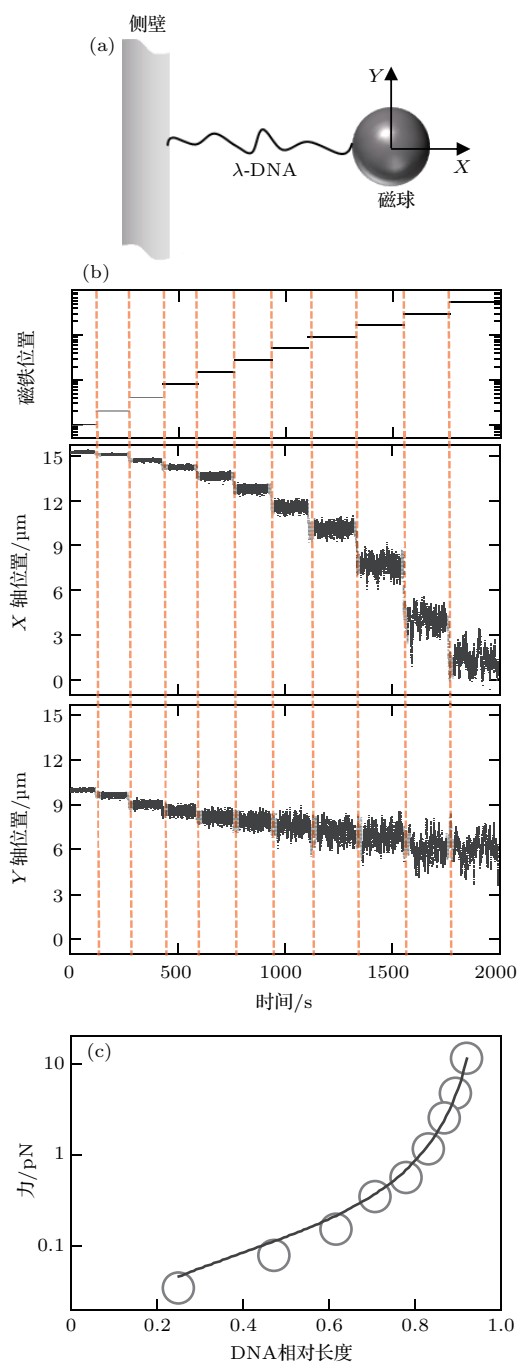


图4 16  $\mu\text{m}$  长度的  $\lambda$ -DNA 的拉伸测量 (a) 磁球通过  $\lambda$ -DNA 和侧壁连接的示意图; (b) DNA 的拉伸曲线; (c) 蠕虫链 (WLC) 模型的拟合

Fig. 4. Stretching test of a 16  $\mu\text{m}$   $\lambda$ -DNA: (a) Schematic diagram of a 16  $\mu\text{m}$   $\lambda$ -DNA between the bead and the lateral surface; (b) stretching curve of DNA; (c) fitting of the worm like chain (WLC) model.

用蠕虫链模型的 (3) 式对 DNA 的受力和首末端距进行拟合. 公式中有一项是磁力  $F$ , DNA 受到的磁力计算公式为 [33]

$$F = k_B T L / \langle \delta y^2 \rangle, \quad (4)$$

其中  $\langle \delta y^2 \rangle$  是磁球在垂直于力的 Y 方向上振动方差

的平均值.

经 (4) 式计算, 磁球在第 1 个位置的磁力是 27 pN, 已经超过了蠕虫链模型的适用范围 10 pN [26]. 而磁球在第 11 个位置已经接触到样品槽侧壁表面, 导致测量的力  $F$  不准确. 用剩下的 9 组数据用蠕虫链模型对 DNA 的受力和首末端距进行拟合. 拟合结果如图 4(c) 所示, 拟合优度是 99.94%, 拟和得出在 PBS 缓冲液的条件下, 双链 DNA 的驻留长度  $A$  是  $(47 \pm 2)$  nm, 与文献上得到的结果一致 [34].

### 3.4 对比不同仪器和条件下的噪声

由于片层光照明的横向磁镊能够直接追踪吸附到毛细管侧壁上的磁球或者用较短的 DNA, RNA 或蛋白质连接的磁球, 所以根据 (3) 式可知, 其追踪噪声应该更小.

图 5(a) 展示了在 1 pN 条件下的追踪噪声. 对于 0.5  $\mu\text{m}$  长的 dsDNA 来讲, 片层光照明的横向磁镊测得的噪声是 19 nm, 是用新型或传统横向磁镊追踪 16  $\mu\text{m}$  的  $\lambda$ -DNA 噪声 (100 nm) 的 1/5. 这说明短 DNA 的连接确实提高了精度. 此外, 我们也用自己搭建的纵向磁镊测量了 0.5  $\mu\text{m}$  长 dsDNA 在 1 pN 条件下的追踪噪声, 为 20 nm, 和片层光照明的横向磁镊没有明显区别. 这说明在小力条件下, 片层光照明的横向磁镊和纵向磁镊对短 DNA 的测量精度相近, 普通磁镊由于不能测量短 DNA, 因此精度大打折扣.

而在 12 pN 的大力条件下的测量结果如图 5(b) 所示. 片层光照明的横向磁镊对 0.5  $\mu\text{m}$  的较短 dsDNA 测得的噪声略微减小, 变为 15 nm; 新型或传统横向磁镊对 16  $\mu\text{m}$  长的  $\lambda$ -DNA 测得的噪声也明显变小, 都变为大约 30 nm. 二者相比, 短 DNA 的连接仍然可以提高横向磁镊的精度. 另一方面, 用纵向磁镊在 12 pN 拉伸 0.5  $\mu\text{m}$  的 dsDNA 测得的噪声也明显减小, 变为 7 nm. 所以在大力条件下, 片层光照明的横向磁镊精度比纵向磁镊稍差. 当然, 纵向磁镊所用物镜的放大倍数是  $100\times$ ,  $NA$  值为 1.49, 而片层光照明的横向磁镊用的物镜放大倍数是  $40\times$ ,  $NA$  值为 0.6, 精度比纵向磁镊稍差是可以理解的. 另一方面, 这也说明片层光照明的横向磁镊还有提升空间, 比如把  $40\times$  的物镜改为更大的放大倍数, 在大力条件下用其他直径的磁球或者改进追踪磁球的算法等.

综上所述: 片层光照明的横向磁镊能够追踪连接短DNA的磁球, 从而明显提高了传统横向磁镊的精度, 在小力和大力条件下都明显优于传统横向磁镊; 和纵向磁镊相比, 片层光照明的横向磁镊在小力下精度与之相近, 而在大力条件下比纵向磁镊稍差.

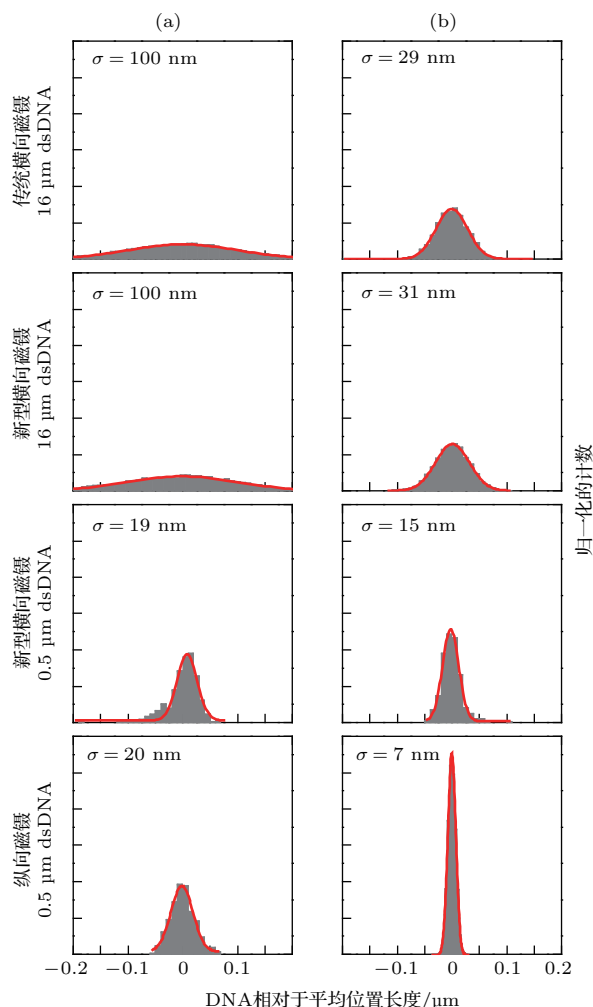


图5 横向或纵向磁镊测量不同长度的dsDNA在小力和大力下的噪声 (a) 在1 pN 条件下的噪声; (b) 在12 pN 条件下的噪声

Fig. 5. Noise of short and long dsDNA at weak or strong force with transverse magnetic tweezers and longitudinal magnetic tweezers: (a) Noise at 1 pN; (b) noise at 12 pN.

## 4 结 论

传统横向磁镊相比纵向磁镊的一个重要优点是更加简单, 成本更低. 但是横向磁镊的缺点是空间精度比较差, 这主要是因为样品池的侧壁在成像时形成的阴影会对离它较近的磁球影像产生干扰,

因而普通横向磁镊只能测量连接长DNA的磁球的位置信息. 本文介绍了一种片层光照明的横向磁镊. 由于这种片层光照明的横向磁镊可以直接观察吸附在样品槽侧壁的磁球, 所以它可以追踪短的DNA, RNA或蛋白质, 拓展了横向磁镊的应用范围. 同时, 改进的简单横向磁镊在小力条件下精度明显提高和到和复杂的纵向磁镊相接近, 大力下精度相差不大. 所以这种简便的横向磁镊可以一定程度上替代昂贵的纵向磁镊. 本文发展的片层光照明的横向磁镊在大力下的精度相对于纵向磁镊还有差距, 这是我们进一步改进的方向.

## 参考文献

- [1] Ha T, Enderle T, Ogletree D F, Chemla D S, Selvin P R, Weiss S 1996 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93** 6264
- [2] Neuman K C, Nagy A 2008 *Nat. Methods* **5** 491
- [3] 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]
- [4] Qian H, Chen H, Yan J 2016 *Acta Phys. Sin.* **65** 188706 (in Chinese) [钱辉, 陈虎, 严洁 2016 物理学报 **65** 188706]
- [5] Madariaga-Marcos J, Hormeno S, Pastrana C L, Fisher G L M, Dillingham M S, Moreno-Herrero F 2018 *Nanoscale* **10** 4579
- [6] Cheng W, Arunajadai S G, Moffitt J R, Tinoco I J, Bustamante C 2011 *Science* **333** 1746
- [7] Comstock M J, Whitley K D, Jia H, Sokolowski J, Lohman T M, Ha T, Chemla Y R 2015 *Science* **348** 352
- [8] Arslan S, Khafizov R, Thomas C D, Chemla Y R, Ha T 2015 *Science* **348** 344
- [9] Neupane K, Foster D A N, Dee D R, Yu H, Wang F, Woodside M T 2016 *Science* **352** 239
- [10] Righini M, Lee A, Canari-Chumpitaz C, Lionberger T, Gabizon R, Coello Y Tinoco I, Bustamante C 2018 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **115** 1286
- [11] Sun B, Johnson D S, Patel G, Smith B Y, Pandey M, Patel S S, Wang M D 2011 *Nature* **478** 132
- [12] Yuan G, Le S, Yao M, Qian H, Zhou X, Yan J, Chen H 2017 *Angew. Chem. Int. Edit.* **56** 5490
- [13] Zhang X, Chen H, Fu H, Doyle P S, Yan J 2012 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109** 8103
- [14] Zhang X H, Chen H, Le S M, Rouzina I, Doyle P S, Yan J 2013 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110** 3865
- [15] Sun B, Wei K J, Zhang B, Zhang X H, Dou S X, Li M, Xi X G 2008 *EMBO J.* **27** 3279
- [16] Li W, Chen P, Yu J, Dong L, Liang D, Feng J, Yan J, Wang P Y, Li Q, Zhang Z, Li M, Li G 2016 *Mol. Cell* **64** 120
- [17] Lee C Y, Lou J Z, Wen K K, McKane M, Eskin S G, Ono S, Chien S, Rubenstein P A, Zhu C, McIntire L V 2013 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110** 5022

- [18] Lin W X, Ma J B, Nong D G, Xu C H, Zhang B, Li J H, Jia Q, Dou S X, Ye F F, Xi X G, Lu Y, Li M 2017 *Phys. Rev. Lett.* **119** 138102
- [19] Blosser T R, Yang J G, Stone M D, Narlikar G J, Zhuang X 2009 *Nature* **462** 1022
- [20] Yasuda R, Noji H, Kinosita K, Yoshida M 1998 *Cell* **93** 1117
- [21] Qi Z, Redding S, Lee J Y, Gibb B, Kwon Y, Niu H, Gaines W A, Sung P, Greene E C 2015 *Cell* **160** 856
- [22] Sun Y, Sato O, Ruhnnow F, Arsenault M E, Ikebe M, Goldman Y E 2010 *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17** 485
- [23] Lu H P, Xun L, Xie X S 1998 *Science* **282** 1877
- [24] Danilowicz C, Coljee V W, Bouzigues C, Lubensky D K, Nelson D R, Prentiss M 2003 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100** 1694
- [25] Smith S B, Finzi L, Bustamante C 1992 *Science* **258** 1122
- [26] Smith S B, Cui Y, Bustamante C 1996 *Science* **271** 795
- [27] Marko J F, Siggia E D 1995 *Macromolecules* **28** 8759
- [28] Wang X L, Zhang X H, Wei K J, Sun B, Li M 2008 *Acta Phys. Sin.* **57** 3905 (in Chinese) [王晓玲, 张兴华, 魏孔吉, 孙博, 李明 2008 物理学报 **57** 3905]
- [29] Sarkar R, Rybenkov V V 2016 *Front. Phys.* **4** 48
- [30] Li J H, Lin W X, Zhang B, Nong D G, Ju H P, Ma J B, Xu C H, Ye F F, Xi X G, Li M, Lu Y, Dou S X 2016 *Nucleic Acids Res.* **44** 4330
- [31] Kim K, Saleh O A 2009 *Nucleic Acids Res.* **37** e136
- [32] Bosco A, Camunas-Soler J, Ritort F 2014 *Nucleic Acids Res.* **42** 2064
- [33] Strick T R, Allemand J F, Bensimon D, Bensimon A, Croquette V 1996 *Science* **271** 1835
- [34] Abels J A, Moreno-Herrero F, van der Heijden T, Veenhuizen P T M, Bruinink M M, Dekker C, Dekker N H 2005 *Biophys. J.* **88** 2737

# Single molecule transverse magnetic tweezers based on light sheet illumination\*

Ma Jian-Bing<sup>1)2)</sup> Zhai Yong-Liang<sup>1)</sup> Nong Da-Guan<sup>1)2)</sup> Li Jing-Hua<sup>1)</sup> Fu Hang<sup>3)</sup>  
Zhang Xing-Hua<sup>3)</sup> Li Ming<sup>1)2)</sup> Lu Ying<sup>1)</sup> Xu Chun-Hua<sup>1)†</sup>

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

2) (School of Physical Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

3) (Institute for Advanced Studies, College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

( Received 14 March 2018; revised manuscript received 8 April 2018 )

## Abstract

Magnetic tweezers are a high precision single-molecule manipulation instrument. A gradient magnetic field is used to generate a force on the order of pN, acting on biomolecule-tethered superparamagnetic beads and to manipulate them. By tracking the bead with an inverted microscope, an imaging system and an image process software, one can obtain the extension length information of the biomolecules, thus can study the mechanism and dynamics of the molecules at a single molecule level. Magnetic tweezers include transverse magnetic tweezers (TMT) which are cheap and simple, and longitudinal magnetic tweezers (LMT) which are expensive and complicated. As the traditional TMT can only track the long biomolecule-tethered beads and their spatial resolution is poorer than that of the LMT according to the error theory of magnetic tweezers and the experimental results, the TMT is not so widely used. To solve this problem, we utilize a light sheet to illuminate the beads only in TMT, and then observe the bead sticking on the lateral surface. The tracking error on the extension axis is 4 nm, which is very small. Then we track and obtain the “folding-unfolding” state transition trace of a hairpin DNA. The hairpin DNA is inserted into a 0.5  $\mu\text{m}$  dsDNA. This experiment proves its ability to study short DNA, RNA or protein. Instead of the fully folded and unfolded state, we observe a semi-stable state at the 1/3 length of the hairpin. The semi-stable state is precisely at the place of the CG rich area of the hairpin, so the CG rich area should be the reason for the semi-stable state. Then we use the 16  $\mu\text{m}$   $\lambda$ -DNA to further test the novel TMT system. Having obtained the stretching curve of the dsDNA, we fit the length-force data with the worm-like-chain model. The fitted persistence length of the dsDNA is  $(47 \pm 2)$  nm, which is consistent with the result in the literature. Finally, we compare the noise of traditional TMT, novel TMT and LMT with that of short and long dsDNA at weak and strong force, and we find that at weak force, the novel TMT distinctly enhances the resolution to the LMT level; while at strong force, the resolution of the novel TMT is about half that of the LMT. The results above prove that (1) the short DNA, RNA or protein can be studied by the novel TMT, which extends the application scope of the instrument; (2) the resolution of TMT is enhanced distinctly under weak and strong force, making the novel TMT competent of more experiments.

**Keywords:** transverse magnetic tweezers, light sheet illumination, single molecule

**PACS:** 87.80.Nj, 82.37.Rs, 82.39.Pj

**DOI:** 10.7498/aps.67.20180441

\* Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant Nos. 11574381, 11574382).

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