

软物质实验方法前沿: 单分子操控技术

钱辉 陈虎 严洁

Frontier of soft matter experimental technique: single molecular manipulation

Qian Hui Chen Hu Yan Jie

引用信息 Citation: *Acta Physica Sinica*, 65, 188706 (2016) DOI: 10.7498/aps.65.188706

在线阅读 View online: <http://dx.doi.org/10.7498/aps.65.188706>

当期内容 View table of contents: <http://wulixb.iphy.ac.cn/CN/Y2016/V65/I18>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

空间散斑场捕获大量吸光性颗粒及其红外显微观测

[Trapping of multiple particles by space speckle field and infrared microscopy](#)

物理学报.2014, 63(2): 028701 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.63.028701>

红外显微观测被俘获吸光性颗粒

[Infrared microscopic observation of trapped absorbing particles](#)

物理学报.2013, 62(20): 208702 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.62.208702>

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>

时间飞行法测量光阱刚度的实验研究

[Calibration of optical tweezers using time of flight method](#)

物理学报.2012, 61(22): 228702 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.61.228702>

泽尼克多项式校正全息阵列光镊像差的实验研究

[Aberrations in holographic array optical tweezers corrected with Zernike polynomials](#)

物理学报.2012, 61(18): 188701 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.61.188701>

专题: 软物质研究进展

软物质实验方法前沿: 单分子操控技术*

钱辉¹⁾ 陈虎^{1)†} 严洁^{2)3)4)‡}

1)(厦门大学物理科学与技术学院, 生物仿生与软物质研究院, 福建省柔性功能材料重点实验室, 厦门 361005)

2)(新加坡国立大学生物力学研究所, 新加坡 117411)

3)(新加坡国立大学物理系, 新加坡 117542)

4)(新加坡国立大学生物影像科学中心, 新加坡 117546)

(2016年8月2日收到; 2016年8月26日收到修改稿)

传统的分子生物学实验方法基本都是系综的方法, 测量的信号来自大量的生物分子的平均响应, 这不利于得到生物分子的构象转变与功能的动力学细节. 另外, 很多生物大分子如细胞骨架蛋白、分子马达等在行使功能的时候都会受到或者产生力的作用, 传统的实验方法也难于研究生物分子的力学响应. 最近20年左右发展起来的单分子操控技术可以实现对单个分子的操控, 同时测量单个分子在拉力作用下的力学响应. 最为常用的单分子操控技术主要包括光镊、磁镊和原子力显微镜, 不同的技术有不同的特点和适用范围. 本文对几种常用的单分子操纵技术的特点, 包括物理原理、可以施加的力的范围与精度、可以测量的分子长度范围与精度等做一个系统的介绍. 另外, 单分子操控技术在生物大分子如核糖核酸(DNA)、脱氧核糖核酸(RNA)和蛋白质的构象转变, 相互作用, 以及分子马达的功能机理等方面已经取得的丰富成果也给出概括性的介绍. 本文对生物学家系统的了解单分子操控技术和如何应用该技术解决自己的生物问题提供一个有益的参考.

关键词: 单分子操控, 磁镊, 光镊, 原子力显微镜**PACS:** 87.80.Nj, 82.37.Rs**DOI:** 10.7498/aps.65.188706

1 引言

生物大分子在生命活动中处于核心的位置. 不同于无机物和有机小分子, 生物大分子如蛋白质、核糖核酸(RNA)、脱氧核糖核酸(DNA)、以及多糖等是生物体所特有的, 他们共同组成了生命的基本单元——细胞. 蛋白质、DNA和RNA是实现具体生物功能的执行者和生命信息的载体. 随着生命科学的蓬勃发展, 越来越多具体的生物过程需要理解它们的分子作用机理^[1]. 这些生物大分子的构象转变和相互作用决定了它们的生物功能. 因此, 理解它们的作用机理需要精确测量它们在不同的化

学与物理环境下的构象转变以及相互作用^[2]. 生物大分子的结构和功能吸引了生物化学、生物物理领域的研究者的广泛兴趣, 各种不同的实验手段被利用来研究生物大分子的结构和功能的分子机理.

在生物体中, 生物大分子可以感受溶液中不同的离子强度、pH值等而发生相应的构象变化^[3,4]. 传统的生化方法可以用来研究在不同的溶液环境下生物大分子的构象变化与相互作用. 传统的分子生物学实验方法如凝胶电泳、光吸收谱、光散射、晶体衍射等都需要测量样品里面包含宏观数目的分子, 而测量得到的物理量是样品中所有分子的平

* 国家自然科学基金(批准号: 11474237, 11574310)、111计划(批准号: B16029)、中央高校基本科研业务费(批准号: 2013121005)和新加坡生物力学研究所新加坡国家研究基金资助的课题.

† 通信作者. E-mail: chenhu@xmu.edu.cn

‡ 通信作者. E-mail: phyjy@nus.edu.cn

均性质。但是在生物大分子发生构象转变的过程中,不同的分子经常处于不同的构象,而大量分子的平均性质往往隐藏了这种分子之间的个性差别。因此,传统生化方法无法提供生物大分子构象与相互作用的精密信息。对于生物大分子的一些瞬态、中间态,传统的实验方法很难得到,也就无法对分子构象与相互作用动力学过程进行直接测量。另外,传统的实验方法中样品中的分子一般是在溶液中自由扩散的,而在生物体内有许多生物大分子如细胞骨架蛋白、分子马达蛋白等会受到拉力的作用^[2,5,6]。研究生物大分子的力学性质是传统的生化实验方法所不容易实现的。由于缺乏对生物分子在单个分子水平上的定量理解,许多生物模型还停留在定性描述与猜想阶段。

在最近的20多年里,单分子实验技术蓬勃地发展起来。其中一类是单分子荧光技术^[7,8],一类是单分子操控技术^[9-12]。二者都是以单个生物分子作为测量对象,单分子荧光技术依靠各种荧光标记手段和具有单光子探测灵敏度的相机进行研究,单分子操控技术将所研究的单个分子连接在力学探针上面,对分子施加拉力或控制分子的伸长,分子的力学响应和构象转变可以通过测量到的拉力伸长曲线来表征。

单分子荧光技术可以被用于体外和体内的各种情况下。在只有单个荧光分子被测量,或者不同的荧光分子的图像没有重叠时,通过图像分析可以得到远远高于光学衍射分辨率的定位精度,大量的荧光分子在不同的时刻分别被以纳米的精度定位,然后重新组合在一起,就构成了超高分辨的荧光显微图像^[13,14]。2014年诺贝尔化学奖授予了超高分辨成像技术。另外一种单分子荧光技术是单分子福斯特共振能量转移技术(FRET),通过在分子的不同位点标记 donor 和 acceptor 两种荧光分子,测量两种荧光分子的发光强度可以得到他们之间的能量转移效率和相应位点之间距离的信息,这样能够直接测量生物分子构象变化以及相互作用的精密信息以及动力学过程^[15,16]。单分子荧光技术的主要限制是需要对分子进行荧光标记以及由于荧光湮灭现象无法进行长时观测。

荧光技术是被动的观察,而单分子操控可以对所研究的分子进行主动的力学操控,通常这类技术可以将单个纳米尺度的生物大分子连接于微米尺度的小球或者微悬臂梁之间,对其进行拉伸并测量

分子的伸长和产生的拉力。针对该分子在力学拉伸下的形变进行精密测量,能够获得该分子的构象转变的动态信息以及力学稳定性。此外,由于分子相互作用一般会导致分子形变;因此,这种单分子力学响应测量也能够获取分子动态相互作用的精确信息。由单分子力学响应测量不需要对生物分子进行荧光标记,所以可以对单个分子进行长时间测量。目前最为流行的单分子操控的实验技术有原子力显微镜^[17]、光镊^[18]、和磁镊技术^[19],另外还包括早期的光纤微针技术^[20]和最新发展的声压力谱技术^[21]。本文主要介绍几类最常见的单分子操控技术及其应用。

2 几种典型的单分子操控技术

基于生物分子力学响应的单分子操控技术,如原子力显微镜、光镊和磁镊等,由于其实验操控单分子的实验方法不同,各自有其最适合的实验对象和实验条件,包括适合测量的生物大分子的种类、分子伸长的范围、所施加的拉力大小的范围、可以达到的空间精度和时间精度、所需要控制的缓冲液条件和温度等^[12]。目前,几种常用的单分子操控技术的技术指标排序是:设备稳定性——磁镊(实验时间尺度可达数小时),光镊(实验时间尺度范围分钟到小时),原子力显微镜(实验时间尺度范围秒到分钟);空间分辨率——原子力显微镜($< 1 \text{ nm}$),光镊(nm),磁镊(nm)。时间分辨率——原子力显微镜($< 1 \text{ ms}$),光镊($< 1 \text{ ms}$),磁镊($> 1 \text{ ms}$)。下面我们介绍三种最常见的单分子操控技术的原理。

2.1 原子力显微镜

原子力显微镜单分子操控技术利用一个微悬臂梁拉伸连接于微悬臂梁与基底表面的生物分子。分子的伸长可以通过压电陶瓷控制的微悬臂梁或基底的移动来控制,而分子承受的拉力可以通过微悬臂梁的弯折来测量。原子力显微镜最初是用于对样品形貌的扫描成像,其所用的微悬臂梁的尺寸较大,弹性系数也比较大,这会影响到拉力的精度和分子构象转变的动态响应时间。适合力谱测量的微悬臂梁往往具有较小的尺寸和弹性系数。

对于微悬臂梁的弯折角度的测量是利用一束激光打到微悬臂梁的背面并被反射,利用四象限光

电探测器得到反射激光的位置来得到微悬臂梁的弯折情况. 所以, 其测量具有非常高的时间分辨率和空间分辨率^[22,23].

利用原子力显微镜进行力谱测量时, 特别是蛋白质去折叠的测量过程中, 微悬臂梁需要进入到蛋白质分子所适合的溶液环境中, 这往往会使得微悬臂梁的弹性性质发生缓慢的变化. 另外, 基底与微悬臂梁的相对位置也会发生一定的机械漂移. 这些系统的漂移虽然是随时间缓慢变化的, 但时间稍增长一些就会产生很大的影响. 所以原子力显微镜的单分子力谱测量一般要在若干秒钟的时间内完成, 使得它难于测量比较慢的动力学过程. 原子力显微镜进行力谱测量的示意图如图 1 所示.

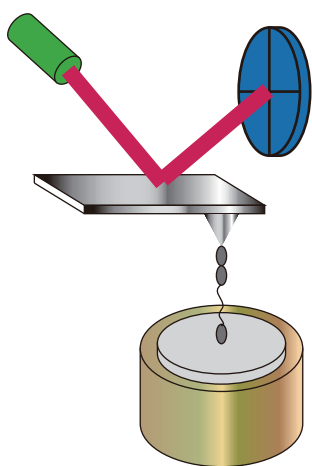


图 1 原子力显微镜进行力谱测量的示意图. 蛋白质被连接于基底与微悬臂梁的针尖之间. 随着压电陶瓷控制基底的收缩, 蛋白质被拉伸, 其感受到的拉力由微悬臂梁的偏折得到. 当蛋白质发生构象转变或去折叠时, 其伸长和拉力都会发生跳变.

Fig. 1. Schematic figure of atomic force microscope measuring force spectroscopy of proteins. The studied protein is linked in between substrate and the tip of micro-cantilever. Piezo-actuator controls the movement of substrate along force direction to stretch protein. Force is measured from the deflection of micro-cantilever with calibrated spring constant. During the experiment, when protein unfolds from stable compact structure to flexible polypeptide, the extension and force will jump suddenly.

原子力显微镜还可以用来研究配体和受体的相互作用. 配体和受体分别被特异性的连接到基底和微悬臂梁探针上, 然后通过接触使他们结合在一起, 稍稍后撤探针并保持一个恒定的拉力. 当配体和受体断开时, 微悬臂梁会回复到偏折为零的状态. 这样测得的拉力依赖的配体-受体解离时间对于研究其功能具有重要的生物意义. 一般情况下解

离时间会随着拉力增大而指数依赖的快速减少, 但也存在一些情况解离时间会随着拉力增大而增长, 这就是著名的 catch bond 现象^[6,24,25].

2.2 光镊

光镊是利用高度汇聚的激光来制作一个可以束缚直径为几百纳米到几个微米的小球的光势阱. 当把小球通过一个生物分子连接到一个固定表面时, 或者将生物分子连接于两个小球之间时, 移动光势阱的位置就可以对该分子进行拉伸^[26,27]. 分子所受拉力的大小可以通过小球在光势阱中离开平衡位置的距离来进行确定. 原子力显微镜和光镊两种技术在物理上等价于将生物分子连接一个已知弹性系数的微弹簧, 并通过控制微弹簧位置实现对生物分子的力学拉伸与测量. 在测量中, 控制量是弹簧末端的位置, 被测量是生物分子长度和拉力.

光镊等效势阱的弹性系数可以通过控制光强方便地进行调节, 一般实验中常用的弹性系数比原子力显微镜的微悬臂梁要小, 可以有更高的测力的精度. 光镊所操纵的小球可以在光学显微镜中观察到, 同时可以高精度地移动没有连接的小球. 所以, 光镊可以全程控制单分子测量的连接、拉伸、测量的过程, 也可以与微流控系统相配合, 实现溶液条

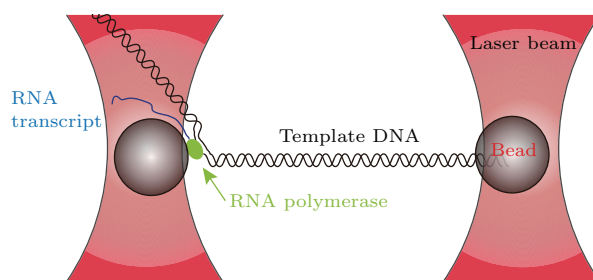


图 2 光镊对 RNA 聚合酶研究的示意图. RNA 聚合酶被连接在一个小球上, DNA 被连接在另外一个小球上, 在基因转录的过程中, 由于 RNA 聚合酶沿着 DNA 模板的运动, 连接于两个小球之间的 DNA 片段会缩短. 通过测量 DNA 的伸长和拉力, 可以得到 RNA 聚合酶进行基因转录的动力学过程.

Fig. 2. Schematic figure of optical tweezers studying the mechanism of RNA polymerase. RNA polymerase is anchored on the surface of a bead, while DNA is linked to another bead. During the process of gene transcription, DNA segment between two beads will be shortened. Through detailed measurement of DNA extension and tension, the dynamic process of gene transcription can be studied.

件的控制. 图2给出了光镊对RNA聚合酶研究的示意图.

2.3 磁镊

不同于原子力显微镜和光镊, 磁镊利用有梯度的磁场对顺磁性小球施加可以控制大小的拉力, 然后通过显微镜的图像分析测量所连接的分子的伸长变化^[28]. 由于其产生作用力的原理不依赖于显微镜(例如光镊)或者微悬臂梁的光反射测量系统(例如原子力显微镜), 可以做到拉力控制和光学测量的相互独立, 这使得磁镊具有及其高度的稳定性^[29-31]. 在测量中, 磁镊的控制量是拉力, 被测量是长度. 相比原子力显微镜和光镊, 磁镊测量结果的解释具有更好的理论简单性. 此外, 磁镊可以轻易通过旋转磁场对分子施加扭转控制, 在DNA超螺旋结构研究领域具有非常重要的作用.

磁镊控制的是拉力的大小, 如果是没有连接的磁球, 会在恒定的拉力作用下飞到样品槽靠近磁铁的侧面上. 所以需要在施加拉力之前先做好分子与磁球和基底表面的连接. 然后施加外力, 对样品进行筛选, 找到单个分子连接的磁球进行测量.

磁镊可以方便地控制磁球的转动, 进而对DNA引入超螺旋^[19]. 改变磁场的设计也可以测量DNA在被扭转时收到的扭矩的大小^[32,33]. 当磁场的磁力线方向与拉力方向相同时, 磁球可以自由

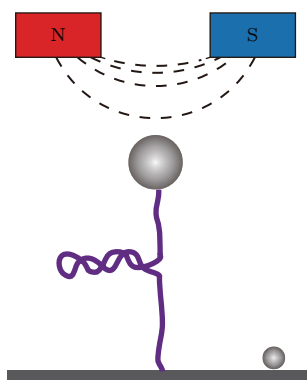


图3 磁镊对DNA进行拉伸的实验示意图. 一条双链DNA被连接于玻璃表面与超顺磁球之间, 通过调节永久磁铁的高度位置可以改变DNA拉力的大小, 通过旋转磁铁在DNA上产生扭矩和超螺旋

Fig. 3. Schematic figure of DNA stretching by magnetic tweezers. Double stranded DNA is linked between coverslip surface and super-paramagnetic tweezers. Force can be controlled by changing the vertical position of permanent magnets, while torque and supercoil can be induced by rotating the magnets.

转动, 这样可以得到DNA扭转变化的信息^[34]. 磁镊对DNA进行拉伸的实验示意图如图3所示.

3 单分子操控技术的理论基础

不同的单分子操控实验技术都是在测量生物大分子的拉力伸长曲线. 生物分子的弹性形变、熵弹性性质、和构象转变都可以通过其拉力伸长曲线得到反应. 对于特别感兴趣的构象转变的细节, 还可以在临界拉力附件的恒定拉力下测量分子构象转变的动态过程^[35].

3.1 高分子的拉力拉伸曲线

几乎所有的生物大分子都是高分子, 即有多个单元构成的长链状分子. 例如DNA或RNA是由核苷酸单元构成的高分子, 蛋白质是由氨基酸残基构成的高分子. 我们首先需要了解高分子的拉力伸长曲线. 具体研究某种生物大分子, 其弹性性质可能在不同的拉力范围由其不同的性质所主要决定, 需要具体问题具体分析. 比较小的折叠好的蛋白可以被看作纳米刚体, 其拉力伸长曲线由热力学决定, 具有简单的解析解^[35]. 因此, 过去十多年的单分子操控研究已经使得大部分生物高分子不同构象的拉力伸长曲线获得的相当完备的理论理解.

很多生物大分子构象的力学响应都可以用特定的高分子模型来描述. 例如对于一个柔性的高分子链状分子, 在外加拉力不是特别大的情况下, 一般柔性连接链(free joint chain, FJC)的模型可以给出其熵弹性性质^[18], 对于一个由 N 段长度为 b 的短棒自由连接在一起的高分子模型, 其全长是 $L = Nb$. 在受到拉力 f 时其伸长满足如下方程:

$$\frac{z}{L} = \coth\left(\frac{fb}{k_B T}\right) - \frac{k_B T}{fb},$$

其中 z 代表分子在拉力方向的平均伸长, k_B 是玻尔兹曼常数, T 是绝对温度.

而对于局部具有一定的弯曲弹性的高分子, 虫链(worm-like chain, WLC)是适合的模型来描述其在很大拉力范围内拉力拉伸响应^[36-38]. 在较大拉力作用下, 虫链的伸长与拉力的关系满足

$$z = L \left(1 - \sqrt{\frac{k_B T}{4A f}}\right),$$

虫链中反应高分子弯曲弹性的参数是驻留长度 A , 在没有外力作用下, A 是虫链在三维空间中局部切向量延高分子链的相关长度. 在小力近似下, 虫链的弹性性质是高斯链的线性弹性. 对大力和小力小的公式进行插值近似处理, 可以得到一个被广泛使用的虫链的拉力伸方程^[36]:

$$\frac{fA}{k_B T} = \frac{z}{L} + \frac{1}{4(1-z/L)^2} - \frac{1}{4}.$$

3.2 生物大分子的稳定性

生物大分子的功能依赖于其特定构象. 通常, 一个生物分子可以具有不同构象, 实现不同功能. 比如双链 DNA、单链 DNA、四链体 DNA、Z-DNA 等, 都是不同的 DNA 构象. 类似 DNA, 蛋白质也可以具有不同构象, 比如不同的折叠结构以及去折叠结构. 单分子操控技术提供了一种不同的研究生物大分子构象稳定性的方法. 当该分子受到特定拉力作用时, 分子的自由能 G 除了其内部相互作用的部分外还有一项来自外力的贡献:

$$G = G_0 - fz,$$

其中 G_0 是分子内部相互作用贡献的自由能, $-fz$ 是由于外力 f 作用引入的能量项.

由于生物大分子的不同构象通常具有不同的力学拉伸曲线, 外力能影响不同构象之间的相对稳定性, 能导致不同构象之间的热力学转变. 如果不同构象的拉力拉伸曲线已知, 那么通过测量该分子的外力导致的构象转化可以直接获取该分子的构象稳定性. 拉力作用下的两种状态的自由能差 ΔG 由方程给出:

$$\Delta G = \Delta G_0 - \int_0^f \Delta z(f) df,$$

其中 ΔG_0 是拉力为零时两种状态的自由能之差, $\Delta z(f) = z_2(f) - z_1(f)$ 是所研究的分子的两种不同状态在拉力 f 下的伸长之差, 其中 $z_1(f)$ 和 $z_2(f)$ 是分子的状态 1 和状态 2 在一定拉力下的伸长.

3.3 生物大分子之间的相互作用

一个生物大分子的功能通常基于它与其他生物分子的结合. 因此, 生物大分子与其他分子相互作用是传统生化的研究重点. 单分子操控技术提供了一种新型的测量方法. 这是因为当一个生物大分子与其他分子结合时, 通常会伴随纳米尺度的形

变, 这种形变可以被单分子操控技术直接探测到. 此外, 一个生物大分子与其他分子结合状态与去结合状态可以被看作两个不同构象, 通常具有不同的拉力伸长曲线. 因此, 拉力大小会影响该生物大分子与其他分子的结合强度. 通过测量结合强度与拉力的依赖关系, 经常可以直接获得生物大分子与特定分子结合的物理特性. 比如, DNA 弯折蛋白, DNA 硬化蛋白, 以及 DNA 嵌入蛋白会导致完全不同的 DNA 力学响应^[39]. 相比传统体生化实验, 这种单分子操控生化测量具有更高的精度和实时性, 提供更丰富的物理信息等优点.

4 单分子操控技术的应用

几种单分子操纵技术虽然都是在测量分子的拉力伸长响应, 但各自有最适合的研究体系. 下面分别介绍原子力显微镜、光镊、和磁镊的典型研究体系.

4.1 原子力显微镜对于蛋白质去折叠的研究

原子力显微镜被广泛应用于蛋白质去折叠、配体受体相互作用方面的研究. 在实验过程中, 蛋白质首先以一定密度连接到基底上, 然后用微悬臂梁的针尖压在表面上, 蛋白质会以一定的概率和针尖连接上, 或者是非特异性连接, 或者和经过修饰的针尖的特异性连接. 然后控制压电陶瓷来对蛋白质进行拉伸, 当蛋白质没有发生去折叠转变时, 拉力随着拉伸的进行而非线性的增加. 拉力会使蛋白质的自然构象变得不稳定而增大去折叠转变的概率. 当蛋白质去折叠突然发生时, 整个蛋白质分子的总长度会增长. 长度的突然增加使得微悬臂梁的偏折减小, 分子感受到的拉力也就突然降低. 继续拉伸可以使拉力重新非线性的增加. 非线性的拉力伸长曲线主要反应的是去折叠后多肽链的熵弹性的响应, 可以用虫链的模型来解释.

针尖有时候会和表面有一定的非特异性相互作用, 即使没有所研究的蛋白质连接于基底与针尖之间, 也会得到类似的测量信号. 为了更容易排除非特异性连接造成的干扰, 蛋白质样品往往被通过基因工程方法构造成多个相同的结构域连接在一起的蛋白质, 这样人们可以同时多个结构域进行拉伸(图 4). 蛋白质去折叠的过程是一个随机过程,

虽然连接在一起的蛋白质结构域受到同样的拉力作用,但是它们不会同时发生去折叠转变.只要有一个结构域去折叠,拉力就会突然减小,继续拉伸拉力会重新增大.这样就会得到一条锯齿状的拉力拉伸曲线.通过分析去折叠拉力的分布与拉伸速度的依赖关系,可以得到蛋白质去折叠过渡态的重要信息.

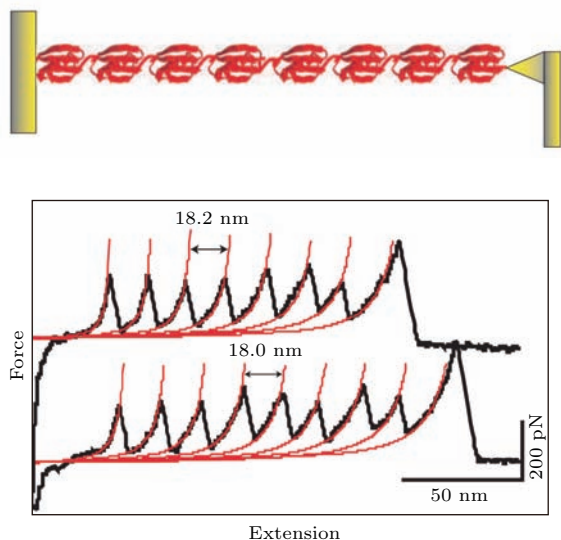


图4 连接在一起的8个蛋白质GB1结构域同时被原子力显微镜拉伸.在拉伸过程中,拉力拉伸曲线可以用一系列的总长逐渐增加的虫链模型来描述.每一个拉力的尖峰对应一个GB1结构域被去折叠成多肽链^[40].图从文献^[40]中取得并经过修改

Fig. 4. Eight concatenated repeats of protein GB1 are stretched by atomic force microscope. During the process of stretching, the force-extension curve can be modeled by a series of worm-like chain with increasing contour length. Each force peak in the saw-tooth pattern of force-extension curve corresponds to the unfolding of one GB1 domain. Figure was adapted from^[40].

原子力显微镜也可以研究蛋白质在恒定拉力作用下的去折叠过程,这需要在系统中加入负反馈机理来实时的调节蛋白质分子的伸长,使得蛋白质受到一个恒定的拉力(即微悬臂梁的偏折保持一个恒定的角度),这种模式叫作force-clamp模式^[41,42].在某个时刻蛋白质发生去折叠,拉力减小,反馈机理会控制压电陶瓷迅速拉伸分子使得拉力恢复到原来的设定值.这样得到的伸长随时间的变化是一组台阶状的曲线,每个台阶对应一个结构域发生去折叠转变.由于反馈机理很难做到十分完美,系统具有有限的响应时间,所以实际蛋白质受到的拉力是一个大小为设定值的拉力与反馈噪音

的叠加.有时候拉力反馈系统会对所研究的分子的构象转变的动力学过程造成一些影响.

4.2 磁镊对于DNA蛋白质相互作用的研究

双链DNA和单链DNA在不同的溶液环境下的弹性性质已经被细致的研究过了,例如,双链B-DNA的拉力拉伸曲线在小于30 pN拉力区内可以用总长可延展的虫链模型来描述^[36],在30—60 pN区间可以用耦合了螺旋的虫链模型来描述^[43],在65 pN左右会发生过度拉伸的构象转变,过度拉伸转变的本质高度敏感于温度、溶液中盐浓度等条件,在高温低盐条件下会变成单链DNA,在低温高盐条件下会变成一种新的DNA构象——S-DNA^[44,45].

在体内,很多种蛋白质会和DNA结合在一起,起到DNA组织和基因调控的重要作用.DNA蛋白质的复合体的拉力拉伸曲线一般会 and 裸露的DNA有所差别,并且这种差别与DNA与蛋白质的相互作用模式密切相关.所以,我们可以通过测量DNA蛋白质复合体的拉力拉伸曲线来研究他们之间相互作用的性质.

DNA与蛋白质的相互作用模式主要有如下几种:缠绕(如核小体)^[46],弯折(如低浓度时的HU, Fis)^[47,48],交联(如有二价阳离子存在时的HNS),协作性覆盖并硬化(如没有二价阳离子存在时的HNS)^[49].不同的相互作用模式具有典型的拉力拉伸曲线,这样通过磁镊单分子的测量,不仅可以得到其相互作用的结合常数,还可以得到相互作用模式、解离和结合的速率及其协作性等信息(图5).

4.3 磁镊对于蛋白质折叠的研究

蛋白质折叠与去折叠的单分子研究主要是用原子力显微镜力谱技术,但是原子力显微镜受到力的精度和稳定性方面的限制.近年来,光镊也被用来研究蛋白质的折叠与去折叠过程,当需要较大外力时,光镊中聚焦激光的热效应不可忽略.另外光镊总需要在所研究的蛋白质上连接一条或两条DNA作为手柄使得两个小球不要距离太近.

最近我们发展了利用磁镊研究蛋白质折叠、去折叠及相互作用的技术.在蛋白质的氨基端和羧基

端标记了可以特异性结合的标记后, 所研究的蛋白质可以直接被连接于玻璃基底与超顺磁小球之间, 不需要DNA手柄就可以进行蛋白质的拉伸实验. 当然, 如果加了DNA手柄, 我们可以利用DNA在65 pN发生过渡拉伸构象转变的性质对拉力进行更高精度的标定. 在没有DNA手柄时, 依赖超顺磁球的热运动也可以对拉力进行标定(小于10%误差). 通过调节永久磁铁的位置, 拉力可以在0—200 pN范围内调节. 200 pN可以使得最稳定的蛋白质在

几秒时间内发生去折叠.

磁镊是严格的恒定拉力系统, 不需要复杂的反馈系统, 而且整个系统非常稳定, 可以连续对单个分子进行若干个小时甚至几天的测量. 虽然在时间分辨率和空间分辨率上与光镊和原子力显微镜有些差距, 但其特点使得它更适合研究在体内承受拉力的而且力学稳定性非常好的蛋白质的折叠、去折叠特性(如肌肉中的蛋白质 titin)(图6) [35].

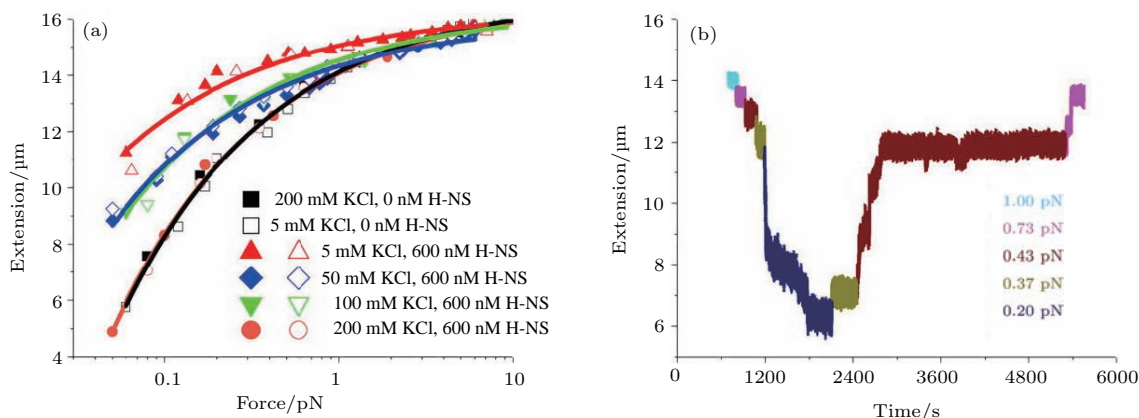


图5 利用磁镊对的DNA与蛋白质HNS相互作用的模式与强度的测量 (a) 在溶液中没有二价阳离子时, HNS协作性的覆盖在DNA上形成复合物, 复合物的总长保持不变, 但是弯折硬度增加(可以从虫链模型拟合得到的驻留长度得到); (b) 在溶液中有Mg离子存在时, 在拉力缩小到0.2 pN时, 由于HNS可以与DNA的不同位点同时结合, 使得DNA发生交联凝聚, 长度持续性的缩短. 图从文献 [49] 中取得并经过修改

Fig. 5. The interaction models of HNS with DNA at different environment condition were studied by magnetic tweezers: (a) Without divalent ions like magnetism and calcium in the solution, HNS will polymerize along DNA to form a rigid rod-like complex with the same contour length as naked DNA and longer persistence length; (b) with divalent ions in the solution, DNA will condense to decrease its length when force is dropped to 0.2 pN, which indicates that HNS with divalent ions can cross-link DNA. Figure is adapted from Ref. [49].

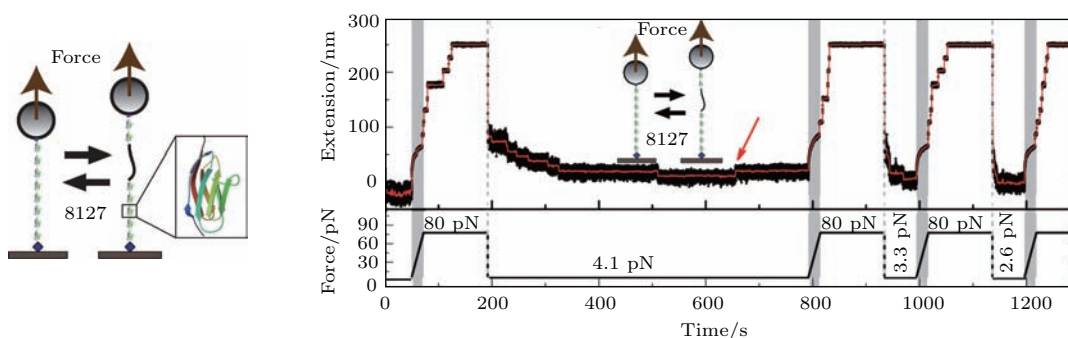


图6 利用磁镊研究蛋白质折叠与去折叠. 肌肉蛋白 titin 中的 I27 结构域被连接于玻璃表面与超顺磁球之间. 当拉力增加到 80 pN 时, 蛋白质的伸长发生阶梯状的增长, 其中每个阶梯是一个蛋白质结构域发生去折叠转变. 当拉力减小到 4 pN 左右或更小时, 蛋白质的伸长阶梯状的缩短, 显示每个蛋白质结构域独自折叠成自然状态的结构. 图从文献 [35] 中取得并经过修改

Fig. 6. Study of protein folding and unfolding by magnetic tweezers. I27 domain in muscle protein titin was linked between coverslip surface and super-paramagnetic bead. When force increased to 80 pN, extension of protein increases stepwisely, which indicates the unfolding of each protein domain. When force was relaxed to 4 pN or less, extension of proteins dropped stepwisely, showing the folding process to its native state independently. Figure was adapted from Ref. [35].

5 讨论、结论与展望

单分子操控技术作为新兴的生物物理实验技术, 经过20余年余年的发展, 已经在研究蛋白质、核酸等生物大分子的功能机理等方面方便得到了广泛的应用. 由于其技术的独特性, 对于研究生物大分子的力学响应、分子马达的作用机理等方面是其他技术所无可取代的. 在单分子操控技术最初的发展阶段, 人们需要在实验室中自主设计和搭建这些设备, 这对于生物背景的研究者是一个巨大的障碍. 随着单分子操控技术的日益成熟, 现在市场上已经有越来越多的商业化的单分子操控设备, 在技术指标和易用性方面在不断地提升, 这必将进一步推动单分子操控技术的广泛应用.

单分子操控技术还在进一步的发展中. 按照所研究的具体问题的需要, 单分子技术在实现更高的稳定性^[50], 更高的时间与空间分辨率^[51,52], 与其他生物物理技术的结合从而提供更多的测量信息方面还在不断地进步^[53,54].

传统的单分子操控技术只能测量所施加外力的两个末端的伸长变化, 生物分子的构象变化需要在其首末端伸长上有所体现才能进行测量. 单分子操控技术的另一个重要的发展方向是与荧光技术相结合, 进而可以测量除了伸长之外更多的信息. 目前在光镊^[53], 磁镊^[54]中, 都已经发展了与荧光技术相结合的实验方案, 使得我们在对单分子进行操控的同时测量分子相互作用与构象变化的更加多维度的信息.

感谢陈虎实验室的袁国华和严洁实验室的乐世敏、姚明曦的有益讨论.

参考文献

- [1] Lewin B 2004 *Genes VIII* (Upper Saddle River: Pearson Prentice Hall)
- [2] Moore S W, Roca-Cusachs P, Sheetz M P 2010 *Dev. Cell* **19** 194
- [3] Fersht A R 1995 *Curr. Opin. Struct. Biol.* **5** 79
- [4] SantaLucia J, Hicks D 2004 *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **33** 415
- [5] Visscher K, Block S M 2000 *Nat. Cell Biol.* **2** 718
- [6] Zhu C 2014 *Ann. Biomed. Eng.* **42** 388
- [7] Bustamante C, Cheng W, Mejia Y X 2011 *Cell* **144** 480
- [8] Xie X S, Choi P J, Li G W, Lee N K, Lia G 2008 *Annu. Rev. Biophys.* **37** 417
- [9] Bockelmann U 2004 *Curr. Opin. Struct. Biol.* **14** 368
- [10] Strick T R, Dessinges M N, Charvin G, Dekker N H, Allemand J F, Bensimon D, Croquette V 2003 *Rep. Prog. Phys.* **66** 1
- [11] Wang M D 1999 *Curr. Opin. Biotechnol.* **10** 81
- [12] Neuman K C, Nagy A 2008 *Nat. Methods* **5** 491
- [13] Huang B, Bates M, Zhuang X 2009 *Annu. Rev. Biochem.* **78** 993
- [14] Huang B, Babcock H, Zhuang X 2010 *Cell* **143** 1047
- [15] Roy R, Hohng S, Ha T 2008 *Nat. Methods* **5** 507
- [16] Weiss S 1999 *Science* **283** 1676
- [17] Rief M, Gautel M, Oesterhelt F, Fernandez J M, Gaub H E 1997 *Science* **276** 1109
- [18] Smith S B, Cui Y, Bustamante C 1996 *Science* **271** 795
- [19] Strick T R, Allemand J F, Bensimon D, Bensimon A, Croquette V 1996 *Science* **271** 1835
- [20] Cluzel P, Lebrun A, Heller C, Lavery R, Viovy J L, Chatenay D, Caron F 1996 *Science* **271** 792
- [21] Sitters G, Kamsma D, Thalhammer G, Ritsch-Martel M, Peterman E J G, Wuite G J L 2015 *Nat. Methods* **12** 47
- [22] Fisher T E, Marszalek P E, Fernandez J M 2000 *Nat. Struct. Biol.* **7** 719
- [23] Javadi Y, Fernandez J M, Perez-Jimenez R 2013 *Physiology* **28** 9
- [24] Liu F, Ouyang Z C 2006 *Phys. Rev. E* **74** 051904
- [25] Thomas W E, Vogel V, Sokurenko E 2008 *Annu. Rev. Biophys.* **37** 399
- [26] Zhang X, Ma L, Zhang Y 2013 *Yale J. Biol. Med.* **86** 367
- [27] Moffitt J R, Chemla Y R, Smith S B, Bustamante C 2008 *Annu. Rev. Biochem.* **77** 205
- [28] Gosse C, Croquette V 2002 *Biophys. J.* **82** 3314
- [29] Chen H, Chandrasekar S, Sheetz M P, Stossel T P, Nakamura F, Yan J 2013 *Sci. Rep.* **3** 1642
- [30] Chen H, Fu H, Zhu X, Cong P, Nakamura F, Yan J 2011 *Biophys. J.* **100** 517
- [31] Chen H, Zhu X, Cong P, Sheetz M P, Nakamura F, Yan J 2011 *Biophys. J.* **101** 1231
- [32] Lipfert J, Skinner G M, Keegstra J M, Hensgens T, Jager T, Dulin D, Köber M, Yu Z, Donkers S P, Chou F C, Das R, Dekker N H 2014 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111** 15408
- [33] Lipfert J, Kerssemakers J W J, Jager T, Dekker N H 2010 *Nat. Methods* **7** 977
- [34] Lipfert J, Wiggins M, Kerssemakers J W J, Pedaci F, Dekker N H 2011 *Nat. Commun.* **2** 439
- [35] Chen H, Yuan G, Winardhi R S, Yao M, Poppa I, Fernandez J M, Yan J 2015 *J. Am. Chem. Soc.* **137** 3540
- [36] Marko J F, Siggia E D 1995 *Macromolecules* **28** 8759
- [37] Bustamante C, Marko J F, Siggia E D, Smith S 1994 *Science* **265** 1599
- [38] Smith S B, Finzi L, Bustamante C 1992 *Science* **258** 1122
- [39] Yan J, Marko J F 2003 *Phys. Rev. E* **68** 011905
- [40] Cao Y, Li H 2007 *Nat. Mater.* **6** 109
- [41] Cao Y, Li H 2011 *Langmuir* **27** 1440

- [42] Fernandez J M, Li H 2004 *Science* **303** 1674
- [43] Broekmans O D, King G A, Stephens G J, Wuite J G L 2016 *Phys. Rev. Lett.* **116** 258102
- [44] Zhang X, Chen H, Le S, Rouzina I, Doyle P S, Yan J 2013 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110** 3865
- [45] Zhang X, Chen H, Fu H, Doyle P S, Yan J 2012 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109** 8103
- [46] Brower-Toland B, Wang M D 2004 *Methods Enzymol.* **376** 62
- [47] Skoko D, Yan J, Johnson R C, Marko J F 2005 *Phys. Rev. Lett.* **95** 208101
- [48] Xiao B, Johnson R C, Marko J F 2010 *Nucleic Acids Res.* **38** 6176
- [49] Liu Y, Chen H, Kenney L J, Yan J 2010 *Genes Dev.* **24** 339
- [50] King G M, Carter A R, Churnside A B, Eberle L S, Perkins T T 2009 *Nano Lett.* **9** 1451
- [51] Edwards D T, Faulk J K, Sanders A W, Bull M S, Walder R, LeBlanc M A, Sousa M C, Perkins T T 2015 *Nano. Lett.* **15** 7091
- [52] Neupane K, Manuel A P, Woodside M T 2016 *Nat. Phys.* **12** 700
- [53] Comstock M J, Ha T, Chemla Y R 2011 *Nat. Methods* **8** 335
- [54] Lee M, Kim S H, Hong S C 2010 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107** 4985

SPECIAL TOPIC — Progress in Soft Matter Research

Frontier of soft matter experimental technique: single molecular manipulation*

Qian Hui¹⁾ Chen Hu^{1)†} Yan Jie^{2)3)4)‡}

1) (*Research Institute for Biomimetics and Soft Matter, Fujian Provincial Key Lab for Soft Functional Materials Research, Department of Physics, Xiamen University, Xiamen 361005, China*)

2) (*Mechanobiology Institute, National University of Singapore, Singapore 117411, Singapore*)

3) (*Department of Physics, National University of Singapore, Singapore 117546, Singapore*)

4) (*Centre for Bioimaging Sciences, National University of Singapore, Singapore 117546, Singapore*)

(Received 2 August 2016; revised manuscript received 26 August 2016)

Abstract

Biomolecules such as proteins and nucleic acids play critical roles in biological processes. Traditional molecular biological experimental techniques usually measure the properties of an ensemble of molecules. The detected signal originates from the average response of large number of molecules, which often conceals the detailed dynamic information about conformational transitions. In addition, many biomolecules, such as cytoskeleton proteins and molecular motors, are subjected to stretching forces or are able to generate force while playing their biological roles in vivo. It is difficult for traditional experimental methods to be used to study the mechanical response of biomolecules. Single molecule manipulation techniques developed in recent twenty years are capable of manipulating and measuring the property of single molecule. Especially, the force response of single molecule can be measured in high precision. The most popular single molecular manipulation techniques are atomic force microscope, optical tweezers, and magnetic tweezers. Here we introduce the principle, capability of force and extension measurement, spatial and temporal resolutions of these three techniques. Applications of single molecular manipulation techniques in the conformation transitions of DNA, protein, and their interactions, and mechanism of molecular motors will be briefly reviewed. This review will provide a useful reference to biologists to learn and use single molecular manipulation techniques to solve biological problems.

Keywords: single molecular manipulation, magnetic tweezers, optical tweezers, atomic force microscope

PACS: 87.80.Nj, 82.37.Rs

DOI: 10.7498/aps.65.188706

* Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant Nos. 11474237, 11574310), the 111 Project, China (Grant No. B16029), the Fundamental Research Funds for the Central Universities, China (Grant No. 2013121005), and the National Research Foundation of Singapore through the NRF Investigatorship and the Mechanobiology Institute (to JY).

† Corresponding author. E-mail: chenhu@xmu.edu.cn

‡ Corresponding author. E-mail: phyyj@nus.edu.cn