

# 打开 DNA 双链的物理新方法——激光微流法<sup>\*</sup>

潘秉毅 张凌云<sup>†</sup> 窦硕星 王鹏业

(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)

**摘要** 文章报道了一种打开 DNA 双链的物理方法——激光微流法. DNA 双链分子被固定在石英片的表面, 在一定强度的激光衰减波和微流振荡共同作用下, DNA 双链间的氢键被迅速打开. 利用全内反射单分子荧光共振能量转移技术, 可以观察到激光微流法打开单个 DNA 的动力学过程. 通过对激光进行控制, 可以准确地打开连接在石英表面特定位置的 DNA 双链. DNA 分子打开的比例与激光功率的关系表明微流产生的机械能与激光光能在 DNA 双链打开过程中缺一不可.

**关键词** 单分子生物物理, 激光微流法, 荧光共振能量转移, DNA 变性

## Double-strand DNA melted by laser micro-flow method

PAN Bing-Yi ZHANG Ling-Yun<sup>†</sup> DOU Shuo-Xing WANG Peng-Ye

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

**Abstract** We present a physical method, based on laser micro-flow, to melt double-stands of DNA. When DNA molecules are immobilized on a quartz surface, the hydrogen bonds between complementary strands can be broken rapidly under the control of a laser evanescent wave and micro-flow oscillation. Employing a single-molecule fluorescence resonance energy transfertechnique, the dynamics of DNA melting is studied at the single-molecule level. When the DNA is in a special position, it can be melted by a laser beam focused to a pinpoint. It is shown that the percentage of melted DNA increases proportionally with laser power. Furthermore, we can determine the contribution of the micro-flow mechanics in the melting process.

**Keywords** single-molecule biophysics, laser micro-flow method, fluorescence resonance energy transfer, DNA denaturation

### 1 引言——关于 DNA 双链分子的变性

DNA 变性 (DNA denaturation) 又称 DNA 融化 (DNA melting) 或 DNA 解旋 (DNA unwinding), 指的是通过打开双链 DNA 互补碱基对之间的氢键使其双螺旋结构被打开, 从而形成两条 DNA 单链的过程<sup>[1]</sup>. 生物体内 DNA 的变性是由一类被称为“解旋酶”的马达蛋白在 ATP 水解能的驱动下完成的. 各种解旋酶对 DNA 变性精确有效地调控是 DNA 能够顺利完成遗传信息的储存和传递任务的重要保障<sup>[2]</sup>.

在实验中经常需要对 DNA 双链进行变性, 但大多数解旋酶对溶液环境 (温度、pH 值、盐离子浓度等) 的要求很苛刻以致于很难在体外正常工作. 人们经过不断地探索, 发展了各种可以在体外实验中改变 DNA 双

链的稳定性或者使 DNA 分子变性的物理化学方法, 包括改变盐离子浓度、降低 DNA 浓度、改变溶液环境的拥挤程度、升高温度等, 其中将含有 DNA 双链分子的溶液直接升温至其熔点是目前体外 DNA 变性实验最常用的技术<sup>[3]</sup>. 虽然这些技术以其各自的优点在生物学研究中发挥着重要作用, 但是它们都有一个共同的缺点, 即严重改变了溶液的生理条件, 并由此引发蛋白质变性等一系列不可逆的过程.

最近, 我们研究小组利用全内反射单分子荧光共振能量转移技术, 实现了一种可以用于体外 DNA 变性的新的物理方法. 使用该方法, 我们可以让激光衰减波

<sup>\*</sup> 国家自然科学基金 (批准号: 10834014, 10674173, 30770517)、国家重点基础研究发展计划 (批准号: 2009CB930704) 资助项目  
2010-01-29 收到

<sup>†</sup> 通讯联系人. Email: lyzhang@iphy.ac.cn

和微流振荡共同作用于 DNA 分子使之发生变性,因此不仅不会对溶液环境造成影响,而且可以通过对激光和微流的控制实现二维平面上 DNA 分子的定点打开<sup>[4]</sup>. 接下来,我们将从全内反射单分子荧光共振能量转移技术入手,对这一有趣的工作进行简要介绍.

## 2 全内反射单分子荧光共振能量转移——观察单个 DNA 分子变性过程的利器

荧光共振能量转移 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) 是法国物理学家 J. Perrin 在研究荧光淬灭的实验中首次发现的,距今已有 80 余年<sup>[5]</sup>,其原理如图 1 所示. 当供体 (donor) 荧光分子的发射光谱与受体 (acceptor) 分子的吸收光谱部分重合,且两种分子之间的距离小于一定阈值时,供体的部分能量就会依靠一种诱导偶极子—诱导偶极子 (induced dipole—induced dipole) 相互作用转移给受体分子并由其发射.

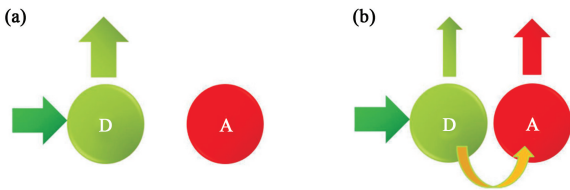


图 1 荧光共振能量转移示意图 (a) 受体与供体间距离较大,无法发生荧光共振能量转移; (b) 受体与供体间距离较小,供体吸收的部分能量转移给受体并由其发射

荧光转移效率 ( $E_{\text{FRET}}$ ) 是指转移给受体分子的能量占供体总吸收能的比例,它与供受体分子间距离的 6 次方成反比,可以通过对供体和受体发光光强的测量获得. 图 2 是不同条件下  $E_{\text{FRET}}$  与分子距离 ( $R$ ) 关系的几个典型图示,其中标度  $R_0$  是当  $E_{\text{FRET}}$  为 0.5 时的两个荧光团间距离. 通常情况下,荧光转移效率在几纳米的范围内对距离的变化非常敏感,这就为我们研究 DNA 变性提供了一把理想的“纳米尺”<sup>[6]</sup>.

我们实验所用的全内反射单分子荧光共振能量转移装置 (total internal reflection fluorescence based single-molecule fluorescence resonance energy transfer, TIRF smFRET) 如图 3 所示.

经过硅烷化、PEG 化、biotin—PEG 掺杂等一系列表面处理工艺,短 DNA 双链分子通过 biotin—streptavidin—biotin 共价连接,像树苗一样被种植在石英反应池的下表面,每个 DNA 末端的两条单链上都分别标记了一对 FRET 荧光素 (供体 Cy3 和受体 Cy5). 激光通过棱镜后在石英片的下表面发生全反射,其产生的消逝波激发了

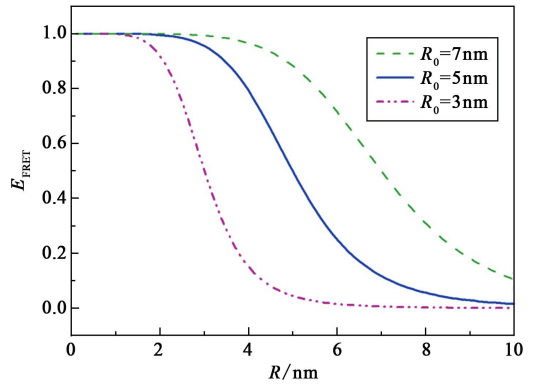


图 2 荧光共振能量转移效率与分子间距离的关系

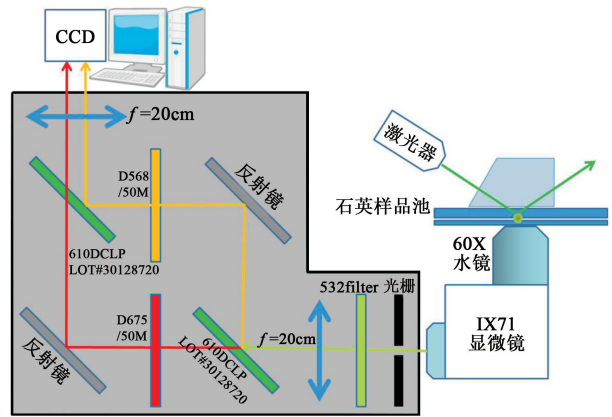


图 3 全内反射单分子荧光共振能量转移装置图

供体分子,同时受体分子也通过 FRET 效应获得能量并发射荧光. 两种荧光素发射的具有不同波长的光子被高倍物镜收集后,由一个分光光路组进行空间分离,最后射入高灵敏度的 ICCD 相机. 通过视频采集卡,我们就可以同时获得衰减波范围内所有 DNA 分子上荧光对的光强信息,并通过计算每对荧光素的能量转移效率来判断其所标记 DNA 分子的变性情况<sup>[7]</sup>.

图 4 简单描绘了 DNA 与石英表面的连接情况,我们可以通过改变表面处理过程中各种反应物的浓度来调节 DNA 的面密度. 理想的 DNA 面密度是每  $1\mu\text{m}^2$  具有 10 个 DNA 分子,因为在这个密度下,我们可以方便地观察到单个 DNA 分子的构象变化<sup>[8]</sup>.

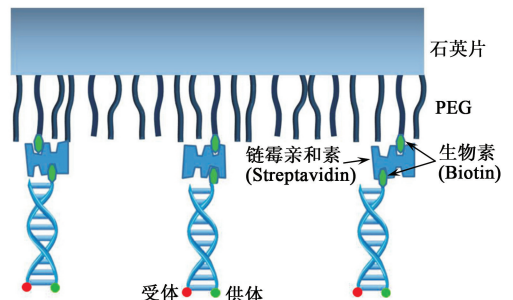


图 4 连接在石英片下表面的 DNA 分子

### 3 激光微流法——光流协作, 定点融化

我们发展了一种叫做“激光微流法”的物理方法, 这种方法可以使以二维阵列方式固定在石英表面的 DNA 分子在激光衰减波和微流振荡的共同作用下实现定点融化. 微流振荡的产生源于与石英样品池相连的微量进样器的推动, 电子步进马达可以对其进行精细控制<sup>[4]</sup>. 虽然微流对反应池石英表面的所有 DNA 分子都有作用, 但只有在激光衰减波照射范围内的 DNA 分子可以同时受到激光和微流的共同作用并发生变性. 在微流条件不变的情况下, 只调节激光的方向就可以准确地打开特定位置的 DNA 双链, 而发生反应的空间范围仅仅取决于全反射光斑的大小(在我们实验中, 通过多次聚焦, 光斑的面积可以控制在  $100\mu\text{m}^2$  以下). 为了使该方法具有普遍的生物学意义和较高的荧光观察效率, 所有实验都在室温下的 DNA 生理缓冲液中进行(100mM NaCl, 25mM Tris-HCl, pH=7.5) 并加入少量不影响体系生物活性的荧光抗漂白剂(1mg/mL glucose oxidase, 0.4% D-glucose, 0.04mg/mL catalase, 1% 2-mercap toethanol). 16bp(base pair) 的双链 DNA 分子由两条标有荧光分子的互补单链在  $90^\circ\text{C}$  退火两小时得到. 该溶液环境和 DNA 序列同样适用于与核酸稳定性相关的其他研究工作<sup>[7]</sup>.

图 5 表示了当激光光强固定在 3mW 时, 实验开始、中间和结束三个时刻表面 DNA 双链的数量. 每个点都代表一个 DNA 分子上荧光对的能量转移效率, FRET 效率越高, 红点就越亮. 如果某个 DNA 分子发生了变性, 荧光受体和供体就会逐渐远离, 并导致其对应的红点迅速变暗并最终熄灭. 从图中可以看出, 大多数激光衰减波照射范围内的 DNA 分子在微流振荡的辅助下都发生了变性反应, 反应持续时间为 5s.

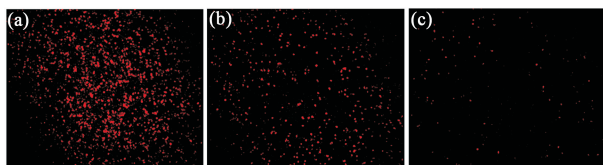


图 5 不同时刻表面的 DNA 双链分子数 (a)0s; (b)2s; (c)5s

为了定量计算激光衰减波对 DNA 变性的影响, 我们对不同的激光功率, 在维持微流环境不变的情况下, 研究了目标区域内发生变性的 DNA 分子占 DNA 总数的比例, 实验结果如图 6 所示. 在我们实验使用的激光功率范围内, DNA 发生变性反应的比例与激光功率成正比. 另外, 我们还注意到图 6 中各数据点连线的延长线并不经过坐标原点, 而是在纵轴形成了约 0.17 的截

距. 这一结果有力地证明了激光衰减波并非 DNA 发生变性的唯一原因, 只有在微流和激光的共同作用下 DNA 双链才能被顺利打开.

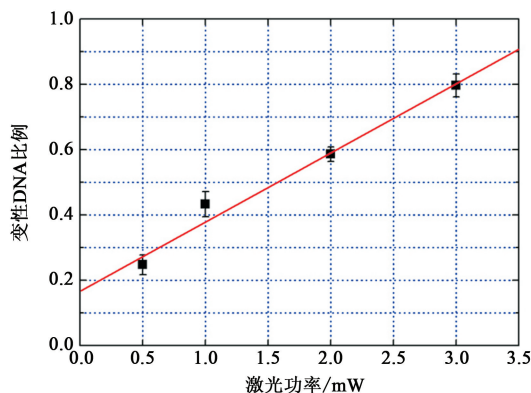


图 6 变性 DNA 比例与激光功率的关系

### 4 总结和展望

激光微流法主要具有如下三方面的优点:

(1) 精准的空间定位. 当激光光斑足够小时, 发生 DNA 变性的空间范围可以下降到极低的尺度, 配合 DNA 面密度的调控, 我们甚至可以控制石英表面单根 DNA 的变性.

(2) 对溶液环境无破坏. 十微米线度、百纳米深度的激光衰减波以及任意生理条件的缓冲液微流对溶液环境几乎没有影响, 保证了反应池中其他生化反应的顺利进行.

(3) 单分子尺度的观测. 与 smFRET 技术的完美结合使人们可以很容易从单分子层面跟踪研究参加反应的 DNA 分子的动力学信息, 这为 DNA 双链稳定性相关的各项工作开辟了新的天地.

我们最近的实验表明, 该方法同样可以被用来定点打开 30bp 的 DNA 双链. 有关激光和微流对 DNA 作用的更深层机制及其应用的理论与实验研究正在积极地进行当中.

**致谢** 感谢哈佛大学谢晓亮教授就该方法的物理机制与我们进行的有益讨论.

### 参考文献

- [1] Thomas R. Gene, 1993, 135:77
- [2] Yang Y, Dou S X. Nucleic Acids Res., 2008, 36: 1976
- [3] Calvo G F, Alvarez-Estrada R F. J. Phys. Condens. Mat., 2008, 20:035101
- [4] Pan B Y, Zhang L Y, Dou S X *et al.* Biochem. Biophys. Res. Commun., 2009, 388:137
- [5] Perrin J. C. R. Acad. Sci. Paris, 1927, 184:1097
- [6] Ha T *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1996, 93:6264
- [7] Roy R, Hohng S, Ha T. Nat. Methods, 2008, 5:507
- [8] Ha T. Methods, 2001, 25:78