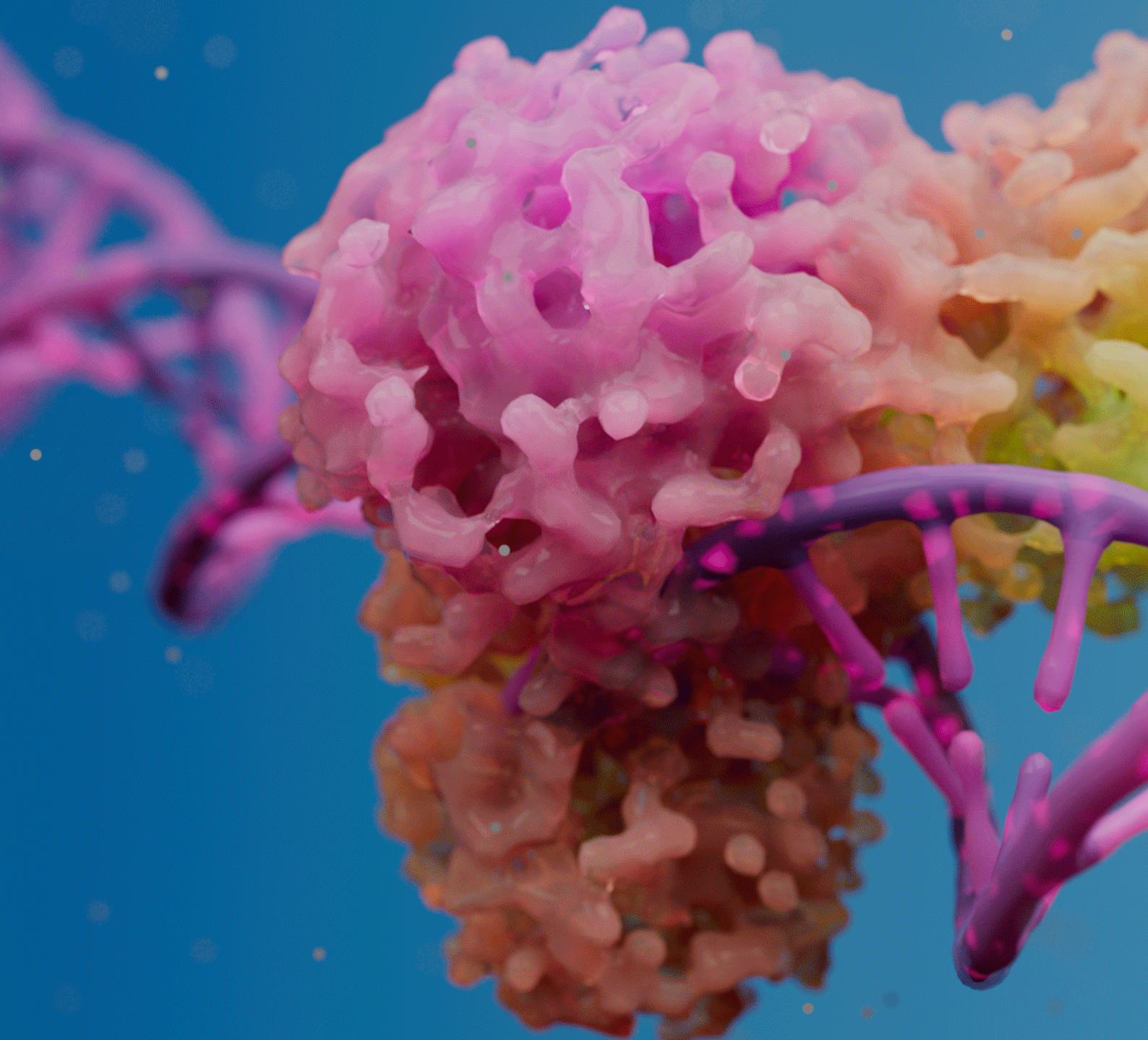


力学操控下DNA构象转变 的实时成像

多色成像应用案例

2017



力学操控下DNA构象转变的实时成像

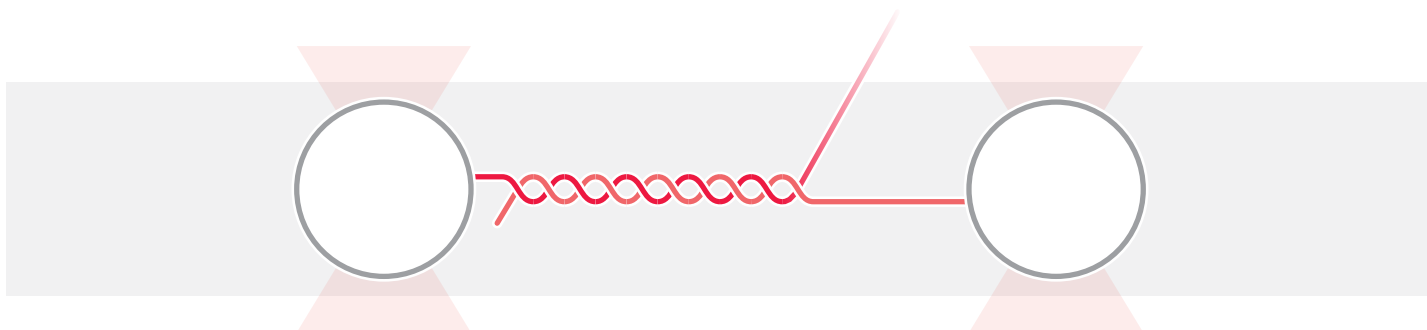


图1 DNA过度拉伸示意图。光镊操控的微球拉伸双链DNA分子，微球的移动带来的力导致DNA分子的剥离

过度拉伸过程中DNA构象转变的研究

单分子力谱 (SMFS) 被广泛用于研究过度拉伸过程中 DNA 的构象转变。然而，之前使用的许多技术仅能提供整体的信息，因此在这些转变过程中发生的确切机制仍不清楚。将 SMFS 与局部的实时成像相结合可以解决这个问题。在本应用报告中，我们将讨论 LUMICKS 的 C-Trap® 集成系统如何通过将高分辨率光镊与共聚焦荧光显微镜相结合，实时监测应力作用下双链 dsDNA 到单链 (ss) DNA 的转变。

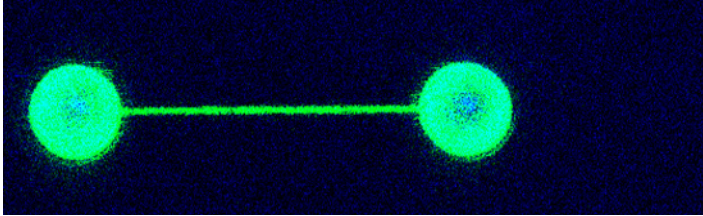
众所周知，dsDNA 在 65 pN 左右经历过度拉伸转变。在这个转变过程中——几乎没有增加力量——DNA 轮廓长度增加了70%。在从 B 型到 S 型 dsDNA 的转换之后，过度拉伸的转变由熔化的 DNA 区域组成，这些区域可能由从末端或缺口剥离或形成熔化气泡引起的。由于DNA的这种转变在 65 pN 左右具有可重复性，因此能够测量在不同结合伴侣或不同缓冲液中出现过度拉伸平台时力的变化，用于揭示这些结合伴侣与 DNA 相互作用的方式是怎样影响 DNA 的结构和稳定性。

这篇报告中，我们使用高分辨率光镊来操纵单个

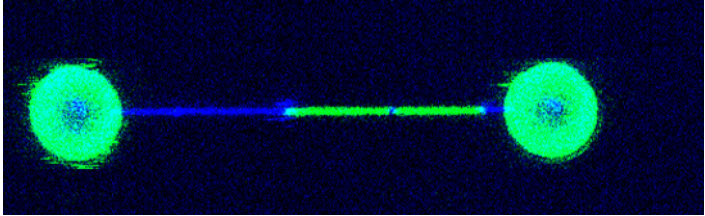
分子，从而在可控方式下诱导DNA的结构转变，而且还能够以亚pN和亚纳米分辨率读取力和距离随时间的变化数值。我们使用特定的荧光标记物进行标记、区分熔化 (ssDNA) 和双链 (dsDNA) 的区域，借助于多色单光子成像系统对这些区域实时成像，成像的定位精度(<15 nm)，因此可以确定它们在 DNA 链的特定位置。使用层流微流控系统和我们的自动化原位组装程序，可以将单个 dsDNA 分子拴系在两个光镊操控的微球之间（图 1）。然后，可以将此拴系结构转运到包含 2 nM Sytox Orange（一种 dsDNA 荧光标记物）和 3 nM 荧光标记的复制蛋白 A (RPA)（一种 ssDNA 结合蛋白）的通道中。

在第一个实验中，我们记录了不同力学操控下的共聚焦荧光图像，以展示我们系统的双色成像能力。首先，我们在 30 pN 的力下对 dsDNA（图 2a）成像。此时，碱基对的间距允许荧光 Sytox 分子（绿色）有效插入，从而完全包覆 dsDNA。在第二个实验中，我们提高操控力，直到达到过度拉伸状态。此时，dsDNA 从两端开始剥离。共

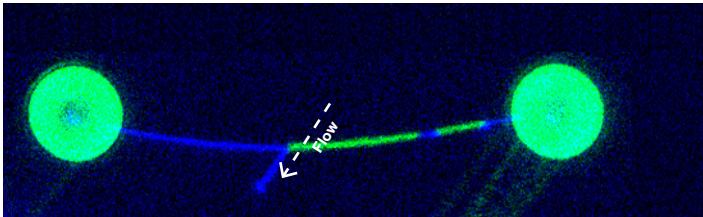
聚焦荧光成像表明不同结构的区域出现，对应于 RPA 与 ssDNA 的结合（图 2b，蓝色）。除了在 DNA 模板两端之外，RPA 染色的 DNA 区域的存在表明发生了从 DNA 缺口处开始的剥离。我们利用 C-Trap® 微流控体系统进一步验证 DNA 熔化区域的存在，我们用垂直于DNA链的温和缓冲液冲击DNA分子以延长被剥离 ssDNA（图 2c）。最后，dsDNA 的完全熔化是由力学诱导的，导致在光学捕获的微球之间是一条完整的结合了RPA的 ssDNA（图 2d）



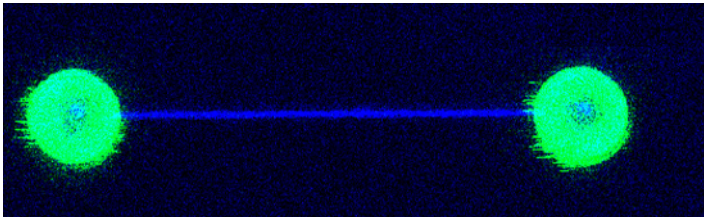
2a 30pN拉伸下的双链DNA



2b 过度拉伸转变态



2c 流动拉伸



2d 30pN拉伸下的单链DNA

图2 dsDNA向ssDNA转变过程中不同阶段的二维双色共聚焦成像（从上到下），绿色荧光表示双链DNA与Sytox结合的区域，蓝色信号反应的是RPA与单链DNA的结合区域

为了建立定量的力谱数据和共聚焦荧光成像的联系，我们做了一项额外的实验，此时我们以140nm/s的恒定速度拉伸dsDNA，同时记录力，距离和荧光图像。（图3）

图中灰色线表示两端距离随时间变化曲线，红色曲线表示DNA上施加的力随时间变化的关系。通过重叠所有数据，我们获得了每条线共聚焦显微图像对应的力和距离值。结果表明，在大约25 pN的力下dsDNA开始结合Sytox Orange，此外，与单纯的dsDNA不同的是，我们直达到90 pN的张力才观察到过度拉伸。这种现象主要由于Sytox与dsDNA结合时稳定了dsDNA结构，使其更难以融化。当达到过度拉伸转变时，出现了蓝色荧光区域，表明从dsDNA到ssDNA的结构转变。再次注意，剥离不仅发生在DNA极端，而且发生在DNA模板中随机分布的缺口处。

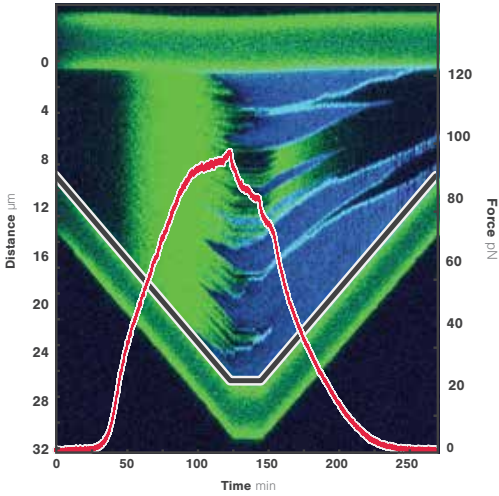


图3 双色共聚焦荧光图像和kymograph数据，其中kymograph数据包含dsDNA以140 nm/s的恒定速度拉伸和返回时光镊间离（灰色）和施加到DNA上力（红色）随时间的变化。

info@lumicks.com

www.lumicks.com

Or find us on:



LUMICKS HQ

Pilotenstraat 41

1059 CH Amsterdam, The Netherlands

+31 (0)20 220 0817



LUMICKS Americas

800 South Street, Suite 100

Waltham, MA 02453, USA

+1 781 366 0380



LUMICKS 亚太

中国北京市朝阳区东三环中路20号 乐成中心A座 577房间

电话: +86 (0)10 58783028

All content and images used in this document are owned or licensed by LUMICKS Technologies B.V and/or its subsidiaries (LUMICKS)!. Unauthorized use is prohibited. Any information provided herein by LUMICKS is made available "as is" and [you] understand and agree that such information is made available without any representation or warranty, express or implied, including any implied warranty of merchantability, satisfactory quality or fitness for any particular purpose or any warranty that the use of such information will not infringe or violate any patent or other proprietary rights of any third party.

For the latest product information please consult us directly. C-Trap®, m-Trap®, AFS®, u-Flux™, Bluelake™, z-Movi®, LUMICKS and the LUMICKS logo are registered trademarks of LUMICKS.

© LUMICKS. Amsterdam, The Netherlands.

LUMICKS