

激光双光镊在单分子生物物理中的研究进展

巩凡¹, 任煜轩^{2*}¹中国科学院上海高等研究院国家蛋白质科学研究(上海)设施, 上海 201210;²复旦大学上海医学院脑科学转化研究院, 上海 200032

摘要 光镊采用聚焦的激光束束缚微米、纳米级的粒子, 具有亚皮牛级的力分辨率和亚毫秒级的时间响应, 在单分子生物物理中具有广泛的应用。通过化学耦链将生物大分子连接到高分子微球上, 光镊可以测量大分子的伸长以及受力, 进而研究 DNA-蛋白质相互作用、蛋白质折叠及分子马达机械化学性质等动态过程。简要介绍光镊的基本原理和常见的单分子光镊几何构型, 并以双光镊为例, 介绍如何设计和搭建光镊设备、所涉及的技术原理、稳定性与降噪处理方法以及分辨率测试方法。以国家蛋白质科学研究(上海)设施的双光镊实验装置为例, 论述双光镊在单分子生物物理中的应用及进展。最后, 对单分子光镊技术的发展前景作出展望。

关键词 生物光学; 双光镊; 单分子; 蛋白质折叠; 分子马达; 光学力

中图分类号 O436 文献标志码 A

DOI: 10.3788/CJL221542

1 引 言

1970年, 阿什金(Ashkin)^[1]提出单个连续可见激光的辐射压可以加速液体或气体中微粒的移动, 而两个相对的激光光束能够束缚悬浮的粒子, 并减缓其运动, 这一技术后来被用于冷却原子并构建玻色-爱因斯坦凝聚态。激光辐射压沿着光的传播方向, 单个光束并不能将粒子束缚在特定位置。1986年, Ashkin等^[2]采用高度会聚的显微物镜聚焦光束, 形成大的光强梯度, 实现单光束光阱, 即众所周知的“光镊”(OT)。激光冷却原子以及激光光镊的主要贡献人分别在1997年与2018年获得诺贝尔物理学奖, 意味着科学界对这两项光学技术的认可。光镊利用一束高度会聚的激光形成稳定的三维陷阱, 能够捕获、移动微米级粒子并测量粒子的位移和受力。经过近40年的发展, 光镊在技术方法和应用上有了长足的进步。除了传统单光镊被广泛用于捕获微米级粒子外, 在单光镊的基础上, 开发出更高精度及操控度的双光镊, 弥补了单光镊容易受机械噪声干扰的缺陷。此外, 全息光镊的开发使得多粒子的捕获成为现实^[3], 等离子体光镊的出现则进一步提高了捕获精度, 实现了纳米尺度的操控^[4]。为了能够灵活控制复杂的设备, 光纤光镊应运而生, 它具有极大的操作灵活性, 并大大增加了样品的适用度^[5]。新型电泳光镊则是将电泳现象应用在光学操纵中, 将传统光镊的激光功率降低至原来的1%甚至0.1%, 实现了对生物细胞的无损捕获^[6], 而基于光子喷流的新型操控手段又拓展了光学力的应用范围^[7-8]。

Ashkin等^[9]在早期工作中操控光镊捕获单个烟草花叶病毒, 这一工作打开了利用光镊研究生物的大门。相较于全息光镊、等离子体光镊, 双光镊因其稳定性和适用性广, 已被广泛用于分子生物学及生物物理学研究中, 并形成成熟的研究体系, 成为科研人员研究单分子生物物理的常选技术之一。传统双光镊具有亚皮牛级力测量精度和亚纳米级位移测量精度^[10-12], 在单个生物大分子的机械力学特性研究中具有独特的优势, 尤其在蛋白质和核酸的动态折叠、分子马达机械特性等研究中发挥着不可替代的作用。这些生物大分子在细胞中参与重要的生命活动。双光镊技术帮助我们了解传统生物化学实验中难以验证的细节, 例如检测到大肠杆菌RNA聚合酶在双链DNA以单碱基对(bp)的步长易位, 在单分子层次理解其在转录过程中的校正机制等^[13-14]。此外, 双光镊还成功用于DNA复制^[15]、转录动力学^[16]、核糖体新生链的共翻译折叠^[17]等过程的研究。双光镊和其他技术的结合也拓宽了其在生物学中的应用, 例如双光镊与超分辨荧光成像技术的结合实现了单分子的可直接可视化, 被认为是详细研究生物分子系统的有效方法。这些技术上的发展使得双光镊成为生物学研究中的有力工具。总的来说, 单分子双光镊能够监测单个分子的动态行为, 帮助我们了解更多的生物反应细节, 进一步理解复杂的生物过程。传统方法一般是通过测量分子平均行为来表征生物过程^[18]。利用双光镊在单分子水平上展开与常规测量互补的研究, 是分子生物学及生物物理学发展的必然趋势。

收稿日期: 2022-12-19; 修回日期: 2023-02-22; 录用日期: 2023-03-06; 网络首发日期: 2023-03-13

通信作者: *yxren@fudan.edu.cn

本文依据微粒大小与光波长之间的关系对光镊原理展开介绍,并概述了单光镊、双光镊及角光镊(AOT)等常用的光镊系统及其涉及的几何结构。相较于其他光镊系统,双光镊的“哑铃”几何结构具有更好的稳定性及更高的分辨率。首先,我们以国家蛋白质科学研究(上海)设施的激光双光镊实验装置为例,介绍如何设计和搭建光镊设备、所涉及的技术原理、稳定性与降噪处理方法以及分辨率测试方法。然后,以中心法则为背景讨论了双光镊在蛋白质动态折叠、DNA-蛋白复合物及分子马达的机械化学性质等研究中的作用。近年来在传统光镊的基础上,涌现出了多种光镊变体。例如双光镊拉曼光谱完成了非直接接触情况下操纵单分子和测量拉曼光谱的同步结合,双光镊与单分子荧光检测及超高分辨率成像技术的结合实现了在三维空间对单分子同时进行成像和操控。这些技术的出现也将双光镊的应用推上了另一个阶段。最后,对光镊技术的发展前景作出展望。

2 光镊的原理及单分子光镊系统

2.1 光镊的基本原理

当光子被吸收性颗粒吸收后,其所携带的动量会传递给粒子,对粒子施加前向散射力。粒子在具有梯度的光场中还会受到光强梯度力的作用而向光阱中心运动。光束作用在球形微粒上会产生光学力。依据微粒的大小分类,通过简化和近似能够对光学力进行定量计算^[19]。在计算过程中通过尺寸参数 $x = k_m r$ 来确定近似值的有效范围,其中 $k_m = 2\pi n_m / \lambda_0$ 是微粒周围介质的光波数, r 是微粒半径, λ_0 是真空条件下捕获激光的波长, n_m 是周围介质的折射率。

当粒径远大于激光波长,即 $x \gg 1$ 时,可以用几何光学近似计算光学力^[21]。大多数光镊中使用的微球可以看作是折射物体,照射在微粒上的光束可以被视为光线的集合^[12]。设微粒折射率大于周围介质折射率,经显微镜高度会聚的激光束作用在透明微粒上时,激光束在微粒表面折射会引起光子动量的改变,此时微粒受到的光场作用力包括梯度力和散射力。在高斯分布的非均匀光场中,微粒会在空间光梯度方向上受到横向梯度回复力和轴向梯度回复力。以横向梯度回复力分析为例[图 1(a)^[20]],假设光线 p_1 和 p_2 具有不同的强度,作用在微粒上时发生折射作用,产生不同大小的动量变化(分别为 Δp_1 和 Δp_2),此时微粒受到等同于动量变化的反作用力 $-dp_1$ 和 $-dp_2$,这两个反作用力在 x 轴的合力 $-dp_x$ 将粒子拉向光束中心[图 1(a)]。同理,轴向梯度力也会产生朝向焦点的回复力[图 1(b)^[20]]。散射力将微粒沿正 z 方向推离焦点,在显微镜的高度聚焦下,沿正 z 方向的散射力与沿负 z 方向的梯度力相互补偿,将微球稳定捕获。

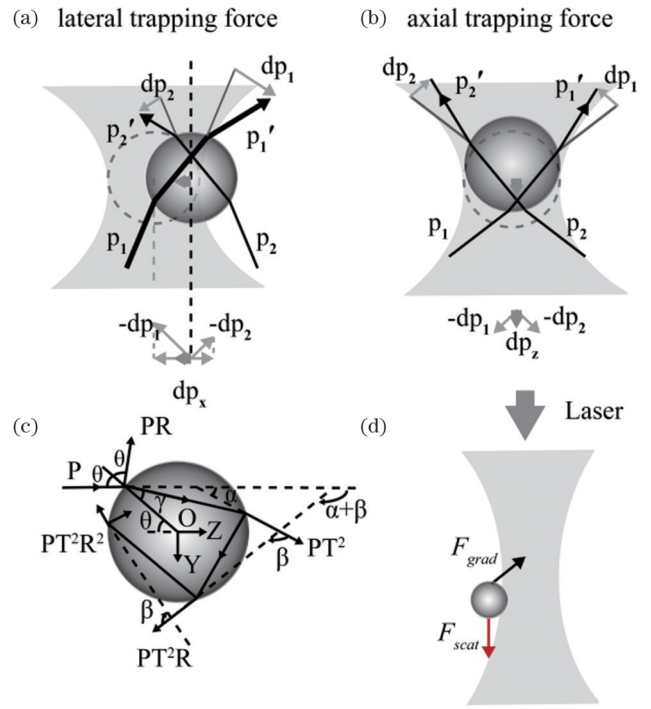


图 1 光镊的基本原理。(a)非均匀场下大于光波长的微粒所受的横向梯度力^[20]。(b)朝向捕获激光焦点的轴向梯度力^[20]。(c)单根光线的射线模型^[21]。(d)小于光波长的偶极子会受到散射力(F_{scat} ,红色箭头)和梯度力(F_{grad} ,黑色箭头)^[12]

Fig. 1 Basic principle of optical tweezers. (a) Lateral gradient force on particles larger than wavelength in non-uniform field^[20]. (b) Axial gradient force towards trapping laser focus^[20]. (c) Ray model for optical force^[21]. (d) Dipoles smaller than wavelength are subject to scattering forces (F_{scat} , red arrows) and gradient forces (F_{grad} , black arrows)^[12]

为分析远大于激光波长的米氏粒子的受力, Ashkin^[21]在 1992 年提出了几何光学(射线)模型。如图 1(c)所示,假设单根功率为 P 的光线以入射角 θ 入射到一个介质球表面上并经过多次反射及折射,其菲涅耳反射和透射系数分别以 R 和 T 来表示,微球所受到的总力由反射光线功率 PR 和无限次递减的出射折射功率 $PT^2, PT^2R, \dots, PT^2R^n, \dots$ 所决定,通过原点 O 的净作用力可分为 F_z 和 F_y 。在 z 轴和 y 轴方向对所有光线产生的力求和,可得到该光线在 z 轴和 y 轴上的作用力:

$$F_z = F_{scat} = \frac{n_1 P}{c} \left\{ 1 + R \cos 2\theta - \frac{T^2 [\cos(2\theta - 2\gamma) + R \cos 2\theta]}{1 + R^2 + 2R \cos 2\gamma} \right\}, \quad (1)$$

$$F_y = F_{grad} = \frac{n_1 P}{c} \left\{ R \sin 2\theta - \frac{T^2 [\sin(2\theta - 2\gamma) + R \sin 2\theta]}{1 + R^2 + 2R \cos 2\gamma} \right\}, \quad (2)$$

式中: θ 和 γ 分别为入射角和折射角; n_1 为微球周围环境的折射率;沿入射光线方向的分量定义为散射力

F_{scat} ; 垂直于入射光线方向的分量定义为梯度力 F_{grad} 。

入射光场可以分解成一份一份的射线, 分别计算 z 方向与 y 方向作用力并求和, 得到总作用力大小。

当粒径 r 远小于激光波长 λ_0 , 即 $x \ll 1$ 时, 可以采用偶极近似来计算光学力, 将瑞利粒子视为偶极子^[22-24], 此时微粒内部被认为是均匀的 ($x|n_p/n_m| \ll 1$)^[23,25]。如果外磁场不太大, 微粒的偶极矩 $\boldsymbol{p}(r, t)$ 可以用极化率 α_p 来表征^[26]:

$$\alpha_p = \alpha_0 \left(1 - i \frac{k_m^3 \alpha_0}{6\pi\epsilon_m} \right)^{-1}, \quad (3)$$

式中: $\alpha_0 = 3V\epsilon_m(\epsilon_p - \epsilon_m)/(\epsilon_p + 2\epsilon_m)$ 为粒子的极化率; ϵ_m 为介质的介电常数; α_0 为静态克劳修斯-莫索蒂极化率; V 为微粒体积; ϵ_p 为微粒的介电常数。

偶极子的极化率与截面有关。光学力可以分为消光 (σ_{ext})、散射 (σ_{scat}) 和吸收 (σ_{abs}) 三部分, $\sigma_{\text{abs}} = \sigma_{\text{ext}} - \sigma_{\text{scat}}$ 。因此对于极化率为 α_p 的微粒, 可以将消光和散射截面写为 $\sigma_{\text{ext,d}} = \frac{k_m}{\epsilon_m} \Re\{\alpha_p\}$, $\sigma_{\text{scat,d}} = \frac{k_m^4}{6\pi\epsilon_m^2} |\alpha_p|^2$ 。

在偶极近似下, 一个微粒在被时变电磁场照射时所经历的时间平均光学力可表示为^[22,24,27]

$$\langle \boldsymbol{F} \rangle_{\text{DA}} = \frac{1}{2} \Re \left\{ \sum_i \alpha_p \boldsymbol{E}_i \nabla E_i^* \right\}, \quad (4)$$

式中: E_i 为电场分量。

由式(4)可以用消光截面和微粒极化率来写出光学力^[22,24,27-29]:

$$\langle \boldsymbol{F} \rangle_{\text{DA}} = \frac{1}{2} \frac{n_m}{c\epsilon_m} \Re\{\alpha_p\} \nabla I(\boldsymbol{r}) + \frac{n_m}{c} \sigma_{\text{ext}} \langle \boldsymbol{S} \rangle - \frac{1}{2} cn_m \sigma_{\text{ext}} \nabla \times \langle \boldsymbol{s} \rangle, \quad (5)$$

式中: $I(\boldsymbol{r}) = \frac{1}{2} n_m c |\boldsymbol{E}(\boldsymbol{r})|^2$ 为电场强度; $\langle \boldsymbol{S} \rangle = \frac{1}{2} \Re\{\boldsymbol{E} \times \boldsymbol{H}^*\}$ 为入射波的时间平均坡印廷矢量; $\langle \boldsymbol{s} \rangle = i \frac{\epsilon_m}{2\omega} \boldsymbol{E} \times \boldsymbol{E}^*$ 为时间平均自旋角动量密度。

式(5)中的第一项为梯度力, 由电场中的偶极子势能产生, 具有正 $\Re\{\alpha_p\}$ 的微粒将被吸引到光场的高强度区域。第二项为辐射压力引起的非保守散射力, 沿

着激光束传播的方向。最后一项是一个与自旋相关的力, 通常不会在光捕获中起主要作用。对于聚焦激光束中存在的偶极子, 梯度力倾向于将其吸引向光束的焦点, 从而抵消散射力的影响, 该散射力将沿入射光传播方向推动微粒^{[图 1(d)]^[12]}。

当粒径 r 与激光波长 λ_0 相近时, 可将光阱与微粒之间的相互作用看作电磁散射, 使用电磁模型计算光阱力。目前常用的电磁散射场计算方法有时域有限差分法 (FDTD)^[30]、有限元法 (FEM)^[31-32]、广义洛伦茨-米氏理论法 (GLMT)^[33] 和 \boldsymbol{T} 矩阵法^[34-35] 等。其中 \boldsymbol{T} 矩阵法能够用于计算任意形状均匀介质粒子, 而且只要计算一次, 就能重复用于该微粒任意位置及方向的捕获力计算。使用 \boldsymbol{T} 矩阵法首先需要计算光阱捕获微粒的 \boldsymbol{T} 矩阵^[36], 并得到入射场展开系数, 随后通过 \boldsymbol{T} 矩阵和入射场展开系数得到出射场展开系数, 进而计算出光阱力。

根据 \boldsymbol{T} 矩阵法基本原理, 入射场和散射场的展开系数之间存在一定的线性关系, 可通过 \boldsymbol{T} 矩阵联系^[37]:

$$\begin{bmatrix} p \\ q \end{bmatrix} = \boldsymbol{T} \begin{bmatrix} a \\ b \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} T^{11} & T^{12} \\ T^{21} & T^{22} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} a \\ b \end{bmatrix}, \quad (6)$$

$$p_{nm} = \sum_{n'm'} (T_{mn'n}^{11} a_{n'm'} + T_{mn'n}^{12} b_{n'm'}), \quad (7)$$

$$q_{nm} = \sum_{n'm'} (T_{mn'n}^{21} a_{n'm'} + T_{mn'n}^{22} b_{n'm'}), \quad (8)$$

式中: a_{nm}, b_{nm} 为入射场的展开系数, 简写为 a 和 b ; p_{nm}, q_{nm} 为散射场的展开系数, 简写为 p 和 q 。

入射激光条件是已知的, 根据入射激光条件可以得到 a_{nm} 和 b_{nm} , 只要得到微粒的 \boldsymbol{T} 矩阵, 就能够求得 p_{nm} 和 q_{nm} 。

扩展边界条件法 (EBCM)^[38] 是计算 \boldsymbol{T} 矩阵最常用的方法之一, 通过该方法得到 \boldsymbol{T} 矩阵的计算公式如下:

$$\boldsymbol{T} = -\boldsymbol{Q}^{(1)} (\boldsymbol{Q}^{(3)})^{(-1)}. \quad (9)$$

根据微粒尺寸等参数, 计算出 \boldsymbol{T} 矩阵, 并随之推算出散射场的展开系数。在确定入射场及散射场之后, 通过麦克斯韦应力张量积分得到作用在微粒上的捕获力^[39], 其辐射捕获力可以通过入射场及散射场的展开系数来表示:

$$F_z = -\frac{\epsilon}{2k^2} \sum_{n=1}^{\infty} \sum_{m=-n}^n \text{Im} \left[\frac{1}{n+1} \sqrt{\frac{n(n+2)(n-m+1)(n+m+1)}{(2n+1)(2n+3)}} \right. \\ \left. (2p_{n+1,m}^* p_{nm} + 2q_{n+1,m}^* q_{nm} + p_{n+1}^* a_{nm} + a_{n+1,m}^* p_{nm} + q_{n+1}^* b_{nm} + b_{n+1,m}^* q_{nm}) + \right. \\ \left. \frac{m}{n(n+1)} i (2q_{nm} p_{nm}^* + p_{nm} b_{nm}^* + a_{nm} q_{nm}^*) \right], \quad (10)$$

式中: k 为波数; ϵ 为微粒周围环境的介电常数。

对于纳米光子学中的场分布受到周围环境影响的情况, 一般可用 FDTD 计算总的散射光场分布, 并通

过麦克斯韦应力张量数值积分来获得光学力。这种方法适合于周边环境复杂和粒子不规则的情况。

分析光镊与微粒之间的作用力具有重大的理论意

义。不同尺寸微粒的理论模型各不相同,根据理论模型得到的作用力除了受光波长和微粒形状影响外,还与激光功率、微粒材质及液体环境等因素紧密相关,而这些因素也会对光镊实验的结果产生一定的影响。理论计算的作用力能够为光镊实验中遇到的实际问题提供理论支撑,指导科研人员优化和改良光镊的性能与结构,提高其操控微粒的能力。因此,推进光学力理论模型的研究对光镊技术的发展有着至关重要的作用。

2.2 常见的单分子生物光镊系统的几何结构

在单分子检测中,需要操纵单个蛋白质、核酸等生

物大分子,而这些纳米级尺寸的单分子不易被直接操纵。一般将单分子通过化学偶连固定在微球上,利用光镊操控微球间接实现对单分子的操控,同时测量单分子的末端距和受力大小。在单分子实验中,常用的光镊系统有单光镊、双光镊以及角光镊。

单光镊中,生物大分子的一端被固定在玻片表面或毛细管吸住的微球上,另一端与单光镊中的微球共价偶连[图 2(a)和图 2(b)^[40]]。单光镊可以测量生物分子的受力大小以及动态折叠等信号,但机械噪声会通过玻片以及电动平台耦合到测量系统,且存在微球容易撞到玻片表面、测量精度差、信噪比低等缺点^[41]。

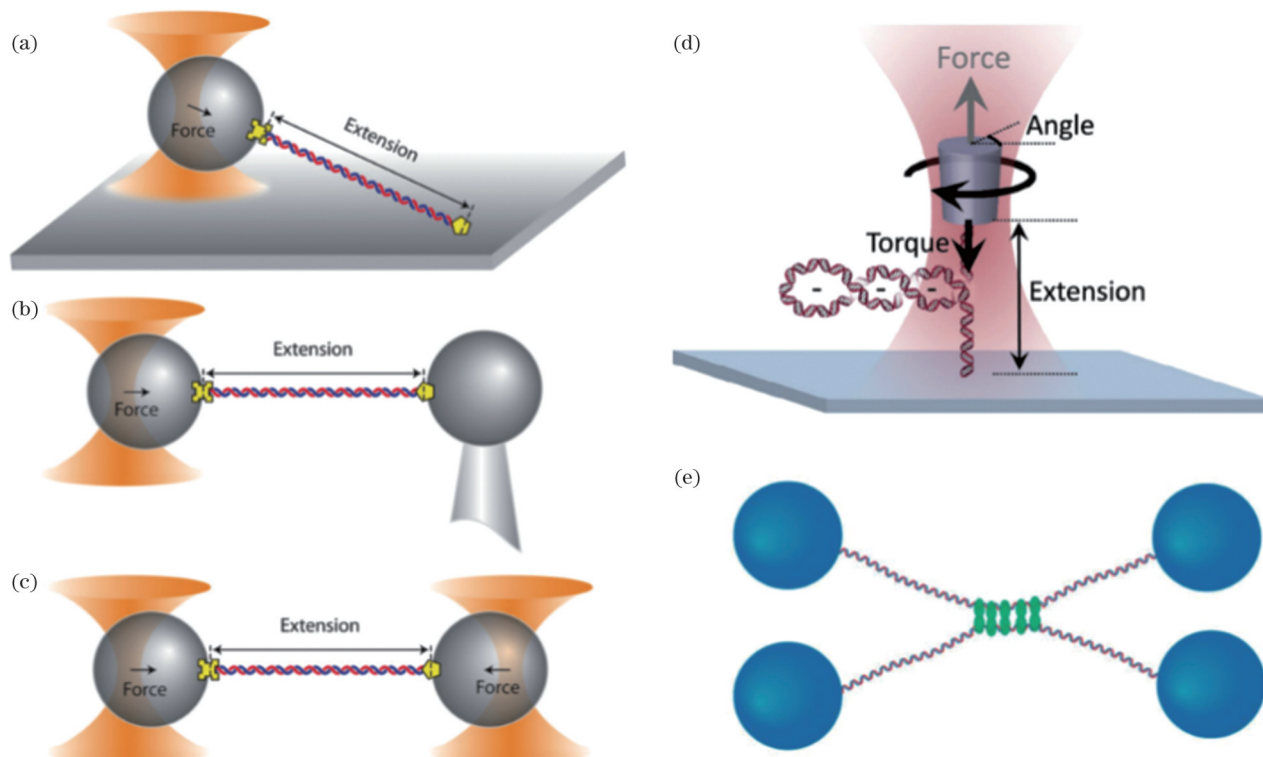


图 2 常见的光阱系统的几何结构。(a)单光阱几何结构,单个DNA分子的一端共价结合在微球上,另一端固定在玻片表面^[40]。(b)光阱-吸管几何结构,与固定在玻片表面的几何结构不同点在于单个DNA分子的另一端固定在毛细管吸住的微球上^[40]。(c)双光阱“哑铃”结构,单个DNA分子被束缚在两个被捕获的微球之间^[40]。(d)角光镊测量超螺旋DNA分子所需扭矩的实验装置^[42]。(e)四光阱光镊操控两条DNA分子^[43]

Fig. 2 Optical trapping strategies for single-molecule studies. (a) Single beam optical trap. A single DNA molecule is tethered between trapped bead and bottom glass slide^[40]. (b) Trap-pipette geometry. A molecule is attached to a second bead held by suction into a micropipette^[40]. (c) Dual-trap “dumbbell” assay. A molecule is tethered between two trapped beads^[40]. (d) Experimental configuration to measure supercoil torque on a DNA molecule with AOT^[42]. (e) Quadruple-trap optical tweezers manipulate dual DNA molecules^[43]

采用差分探测的双光镊有效地避免了由玻片引入的机械噪声^[44]。生物分子被固定在两个光阱各自捕获的微球之间形成“哑铃”结构[图 2(c)^[40]]。这种结构有效地将样品与样品池及其相关的机械振动和漂移分离^[45]。与单光阱几何结构相比,“哑铃”结构具有更好的稳定性和抗噪性,受物镜漂移的影响更小,分辨率更高^[44]。

角光镊的出现使得直接控制和测量单分子生物系统中的扭矩和旋转成为可能^[46]。在角光镊实验中,单

分子的一端固定在显微镜玻片表面,另一端固定在具有双折射特性的微粒底部,通过控制激光偏振来操纵双折射粒子上的单分子扭矩。角光镊已广泛用于测量DNA超螺旋扭矩[图 2(d)^[42]]、染色质纤维扭矩等过程^[42,47]。以测量单个DNA超螺旋扭转为例如^[42],将DNA分子在纳米圆柱和玻片上固定后,使用角光镊将染色质纤维从盖玻片上提起并置于恒定力下,圆柱体以恒定速率旋转以在DNA中引入超螺旋时,可以同时测量到圆柱体上力、位移、扭矩等变化。然而,AOT在

仪器设计和数据采集处理等方面要比差分探测双光镊复杂很多。在 AOT 实验操作过程中需要保持激光的线性偏振并实时校正与线性偏振的偏差,此外还需要纳米尺度的石英圆柱体及精确的扭矩测量,这些较高的条件和操作要求使得 AOT 的使用更加复杂^[12]。

除研究单分子机械力或者力矩外,光镊仪器发展的两个主要趋势是采用结构光实现复杂操控以及多功能光镊的研发^[48]。为研究两个 DNA 链之间的相互作用,人们发展了新的四光阱光镊,同时操纵独立的两条分子链[图 2(e)]^[43]。四光阱不仅能够控制分子链的几何形状,而且可以量化它们之间的相互作用^[43]。除了常用的光镊系统外,为实现不同功能,光镊系统还常与显微镜系统相结合,如微分干涉对比显微镜(DIC)等^[49]。各种成像技术的涌现促进了多功能光镊的发展,在实现大分子操控的同时进行高分辨率的可视化。随着荧光成像技术的快速发展和成像分辨率的不断提高,光镊与荧光相结合的混合仪器越来越受欢迎,目前已经存在光镊与宽场落射荧光^[50]、全内反射荧光(TIRF)^[51]、Förster 共振能量转移(FRET)^[52]等技术相结合的仪器^[12]。这些技术的助力使得光镊数据可以与高分辨率可视化系统提供单分子多维度信息。

2.3 国家蛋白质科学研究(上海)设施的双光镊实验装置介绍

国家蛋白质科学研究(上海)设施作为上海市承建的重大科技基础设施,自 2012 年开始自主研制高精度的激光光镊系统,并于 2015 年通过国家发改委组织的

设施验收。作为大科学装置的核心研制仪器,高精度激光光镊采用差分探测的双光镊^[44,53][图 3(a)],可以操控和追踪微球并测量记录两个颗粒间的作用力与位置状态等信息,主要用于研究蛋白质的折叠、RNA 聚合酶相互作用等生物大分子的机械力学特性和动力学机理。该设备微球定位精度优于 0.5 nm,力的测量范围在 0.1~200 pN,时间测量精度优于 0.1 ms。该系统通过建立恒温恒湿的光学实验室以及差分探测系统,实现对微纳米颗粒位置及力学信号的长时间高精度测量。

激光源采用中心波长为 1064 nm 的连续波激光器(J20I-BL-206C,定制 10 m 光纤束,Spectra-Physics),电光隔离器(ISO,IO-3-1064-VHP,Thorlabs)隔离背反射光,以防止损坏激光腔导致光功率不稳定。第一个半波片(HW1)与偏振分束器(PBS1)相结合以控制总功率,第二个半波片(HW2)用以分配激光功率到两个光阱。第一个望远镜 T1 可将光束直径扩大到 4 mm 左右,扩展的光束通过一对偏振分束器(PBS2 和 PBS3)进行分离和组合,其中一个光束保持固定,另一个光束由压电台(Nano-MTA2X, Mad City Labs, Inc.)驱动的可移动反射镜控制。第二个望远镜 T2 将光束直径扩大两倍并将压电镜平面成像到捕获物镜[OB1,数值孔径(NA)为 1.2,UPLSAPO60XWIR-2,Olympus]的后焦面上。通过用高透射水浸物镜聚焦两个正交偏振的 1064 nm 激光束形成两个激光光阱。为了最大限度地提高检测效率,捕获和探测使用两个相同物镜(OB1 和 OB2),且物镜在捕获波长(1064 nm)处具有高的透射

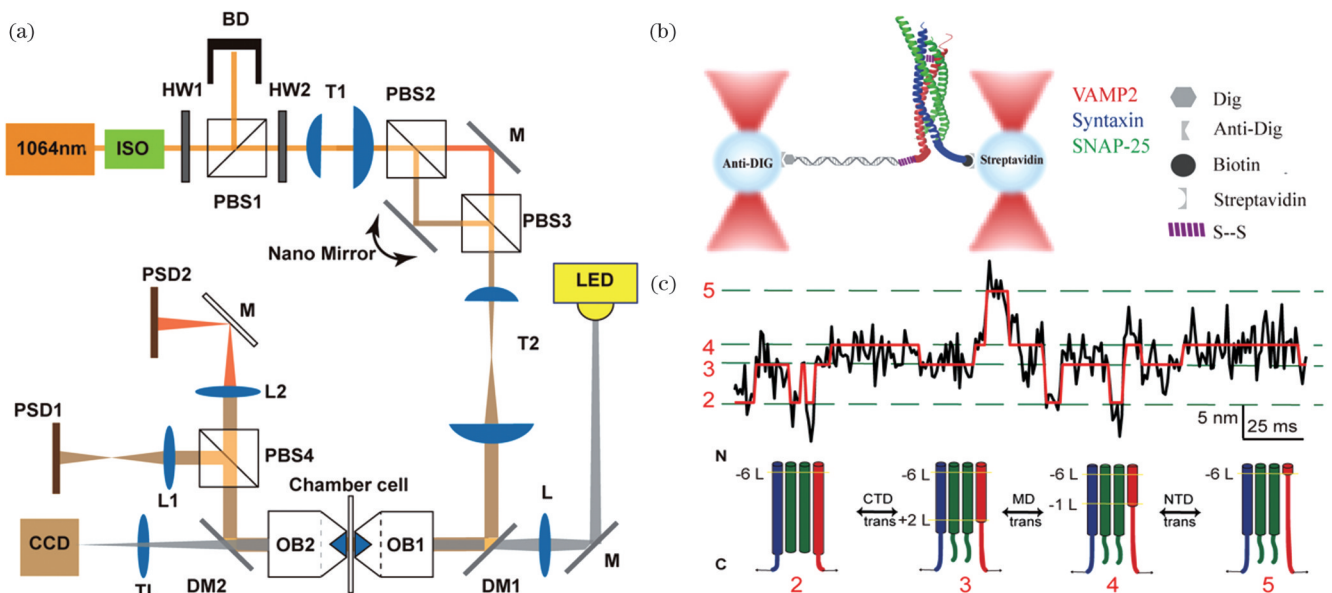


图 3 用于单分子研究的双光镊示意图。(a)双光镊的布局。(b)单分子光镊实验系统示意图,预组装的SNARE蛋白复合物通过二硫键与 2260 bp DNA 手柄交联。(c)恒定光阱距离下单个 SNARE 复合体的伸长-时间轨迹,红线显示为由隐马尔可夫模型(HMM)拟合的状态,下方为 SNARE 复合物不同构象示意图

Fig. 3 Schematics of dual-trap optical tweezers for single-molecule study. (a) Layout of dual-trap optical tweezers. (b) Schematics of single-molecule assay. Preassembled SNARE complex was crosslinked to 2260 bp DNA handle through disulfide bond. (c) Extension-time trajectories of single SNARE complexes under constant trap separation. Ideal state transitions derived from hidden-Markov model (HMM) are expressed in red lines. Configurations for each state are represented at the bottom

率(>80%),其中检测物镜(OB2)的后焦面处共轭的两个位置敏感检测器(PSD,DL100-7 PCBA3)用于位置检测,该检测器背景噪声低、内置前置放大器电路且具有出色的响应速度。明场显微镜由激光发光二极管(LED)照明,并通过电荷耦合器件(CCD,scA640-74fc,Basler)实时监控。双光镊可以对微球间耦连的单个分子施加力,光阱中的两个微球充当力和位移传感器,并通过收集每个微球的前向散射光,结合后焦平面干涉法来确定每个微球相对于光阱中心的位置^[54]。后焦平面干涉法提供了高分辨率应用所需要的灵敏度和带宽,将微球的横向偏转放大数千倍,同时样品平面的视觉图像也被放大60~100倍。因此在光电检测器探测能力范围内,样品平面中微球0.1 nm的位移会引起干涉图案质心几百纳米的移动^[55]。

高分辨率光镊作为高精尖设备,对于安装环境要求极其严格,噪声最小化是搭建光镊平台的关键^[56]。为避免外界环境带来的振动导致仪器显著漂移,该光镊设备安装在混凝土浇筑的防震地基上,所在房间与外界环境噪声隔绝并处于黑暗环境,温度波动控制在1 K以下,空调系统出风口的气流速度小于0.1 m/s。由于空气流动也会激发仪器的机械共振,因此使用黑色厚塑料面板将搭建的光路间及背景气流隔离。为了减少人为操作和仪器运作产生的噪声、消除人体接触引起的热波动,带风扇的激光控制器安装在光镊系统房间外,并用多模光纤束引导泵浦光进入激光腔。实验及软件的操作也在房间外进行,例如添加样品、通过Labview界面对实验系统进行校准和测量等。

由于两个光阱由同一光源分束后经过相同的光路产生,因此两个光路受空气密度波动的影响相同,通过最小化两个光束在空间上分离的路径长度,最大限度地减少每束光独自经过的路径长度。采用差分检测,以最大限度消除空气扰动耦合的噪声^[44]。该仪器以高分辨率无源模式运行,两个光阱的位置在记录期间保持静止,当需要在微球上增加作用力时,可以操控压电镜使可移动光阱远离固定光阱。

在单分子实验中往往更关注单个分子受力大小以及末端距离等参数。光镊通常设置在三种典型的测量模式:拉伸模式、被动模式和恒力模式^[40]。在拉伸模式下,操纵光阱拉伸或放松分子时,分子上的力或伸长会产生相应变化并被记录下来^[57]。通过力-伸长曲线,可研究单链DNA(ssDNA)或双链DNA(dsDNA)的力学性质^[58]。在被动模式下,光阱的位置保持不变,当DNA分子上的蛋白质发生动态折叠或者酶活性改变时,分子上的力和伸长会随时间发生变化^[40]。恒力模式也称为力钳模式,利用反馈机制使得作用在分子上的力保持恒定,通过实时记录分子的长度变化来分析生物大分子的机械性能^[59]。恒力模式还可以通过光学势阱的非线性区来实现,优点是无需反馈模块,不足是稳定性比较差^[59]。我们所搭建的光镊系统包含拉伸和

被动模式,适用的研究范围广泛,在研究DNA-蛋白质相互作用、蛋白质折叠等领域具有极大的优势。

目前,该光镊系统已被成功用于研究蛋白质复合物单分子折叠。在这里以拉伸单个可溶性N-乙基马来酰亚胺敏感因子附着蛋白受体(SNARE)复合物为例,采用“哑铃”结构,即SNARE复合物一端通过DNA手柄与抗地高辛微球连接,另一端通过生物素与链霉亲和素微球连接[图3(b)]。其中SNARE复合物由三种单体蛋白组成:Syntaxin、SNAP-25和VAMP^[60]。利用研制的光镊仪器对单个SNARE复合物的组装/去组装过程进行表征,观测到SNARE复合物在被动模式下4态跃迁的伸长-时间轨迹[图3(c)]。

2.4 光镊的探测和标定

光阱力是光镊实验中需要测定的主要参数之一,需要实时测量并得到精确的数值。根据胡克定律,光阱力与微球偏离光阱中心位置的距离成线性关系,比例系数为光阱刚度。因此,为了得到精确的光阱力,需要测量微球在光镊中的位置,并标定光阱刚度。由于探测器所记录的是电压信号,需要对光镊进行标定以获得光阱刚度以及电压位移转换系数。常用的标定光阱刚度的方法有流体力学法、配分函数法、功率谱密度法、时间飞行法等^[61]。流体力学法通过测定溶液中被光镊捕获微球的黏滞阻力 $F=6\pi\eta rv$ 来得到光阱力,其中 r 为小球半径, η 为液体黏滞系数, v 为小球相对于周围溶液的运动速度。当黏滞阻力平衡光阱力时,由胡克定律 $F=-kx$ 得到光阱的刚度 k ,其中小球偏离光阱中心的距离 x 可以直接测量。功率谱密度法是对小球布朗运动的电压信号进行傅里叶变换得到功率谱密度函数,再从频率域中通过洛伦兹拟合得到拐点角频率,即可求出光阱刚度,简单快速且准确度高(图4)。时间飞行法是通过相机记录微球在向光阱中飞行的动

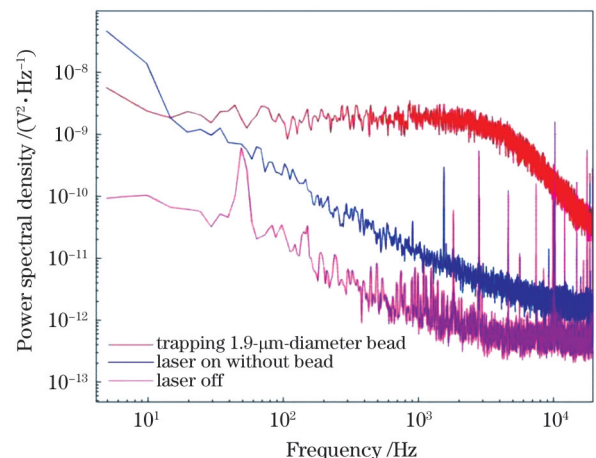


图4 光镊捕获直径为1.9 μm 小球的位移功率谱密度(红色),无微球时(蓝色)以及激光关闭时(玫红)的功率谱
Fig. 4 Power spectral density curves when a 1.9- μm -diameter bead is trapped (red), when laser is on without bead (blue), and when there is no laser beam (rose red)

态过程,测量光阱对特定微球的刚度。该方法基于跟踪微球的运动轨迹获得光阱刚度,可以在低采样率下对直径较大的小球样品进行标定^[61]。

在激光双光镊体系中,通过捕获微球位置信号的功率谱密度来标定光镊^[62]:

$$|\tilde{x}(f)|^2 = \frac{k_B T}{c\pi^2 \beta \left[\left(\frac{\alpha}{2\pi\beta} \right)^2 + f^2 \right]}, \quad (11)$$

式中: k_B 为玻尔兹曼常数; T 为溶液温度; c 为转换常数,取值在 0.1~3 mV/nm 之间; α 为光阱刚度,在单分子实验中其数值通常在 0.01~0.8 pN/nm 之间; $\beta = 6\pi r\eta$ 是已知的阻力系数。

通过实验测量出微粒布朗运动的功率谱 $|\tilde{x}(f)|^2$,拟合出功率谱曲线,就可得到拐角频率 $f_c = \frac{\alpha}{2\pi\beta}$,最终求得光阱刚度为 $\alpha = 2\pi\beta f_c$ 。

在单分子实验中,还需要结合单分子的弹性对位移测量精度进行评估,以消除可能存在的噪声。这里结合常用的激光双光镊来介绍位移精度标定方法。一般地,对两个微球耦连一段双链 DNA 分子,每个微球在各自光阱中的位移分别表示为 x_1 和 x_2 ,对应的光阱施加在微球上的作用力分别为 $f_1 = -k_1 x_1$ 和 $f_2 = -k_2 x_2$;对每个光阱的刚度分别为 k_1 和 k_2 的双光镊,等效光阱刚度 $k_{\text{trap}} = k_1 k_2 / (k_1 + k_2)$,结合图 5(a)可以得到如下几何关系:

$$D = X + \frac{F}{k_{\text{trap}}} + R_1 + R_2, \quad (12)$$

式中: D 为光阱间距离; F 为 DNA 分子所受到的拉伸力; X 为 DNA 手柄伸长量(两微球表面间最近距离); R_1 和 R_2 是两个聚苯乙烯微球的半径。光阱间距离 D 可以通过两个微球的图像来标定。

高空间分辨率是光镊数据测量的核心。在双光阱体系中,捕获两个直径约 900 nm 的聚苯乙烯微球,微球间连有单个约 4000 bp (4 kb) 的 DNA 分子链。测量时首先操控光镊拉伸微球,直至微球受力约为 10 pN 时停止,随后以每 2 s 1 bp 或 2 bp 的步长逐步拉伸两个光阱,记录微球远离各光阱中心的总位移[图 5(b)^[53]]。一般选择较高的采集频率(如 100 kHz)记录数据^[53],当位移轨迹被滤波到 100 Hz 时,能从轨迹中辨别出步长为 2 bp 的步进,而被过滤至 2 Hz 时,可分辨出步长为 1 bp 的步进过程,这表明该仪器能够在 2 Hz 带宽下记录 1 bp 的距离变化。这种精度可由过滤至 2 Hz 的轨迹计算得到成对距离分布图的平均间隔峰值验证。相邻峰值之间的平均间距分别是 0.46 ± 0.05 nm [图 5(c)^[53]]和 0.23 ± 0.05 nm [图 5(d)^[53]],由于 DNA 手柄的机械顺应性,这些测量的步长小于拉伸光阱的步长(0.68 nm 和 0.34 nm)。即使力增大到 20 pN 时,

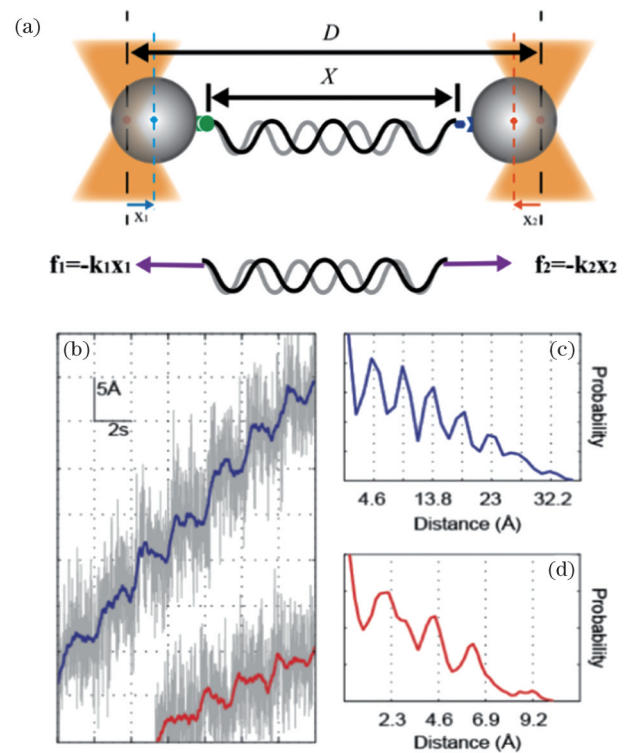


图 5 激光双光镊测量双链 DNA。(a)原理示意图。(b) 100 kHz 采样频率下系链长度分辨率测量结果,其中曲线的成对距离分布图表明光镊可探测的步长:(c)探测步长 4.6 Å (1 Å=0.1 nm);(d)探测步长 2.3 Å^[53]

Fig. 5 Measurement of dsDNA by dual-trap optical tweezers. (a) Schematic diagram. (b) Resolution measurements under the sampling frequency of 100 kHz. Pairwise distance distribution of (b) suggests a step size of 4.6 Å (1 Å=0.1 nm) (c) and 2.3 Å (d)^[53]

也能保持单个碱基对的空间分辨率。这得益于差分探测,既保证了系统噪声受到极大抑制,也实现了系链末端距 1 bp 空间分辨率的精度保证。

激光、微球及样品环境是影响单分子双光镊力谱实验的主要因素。激光光束会影响光阱力的大小,通过控制物镜的数值孔径、激光偏振方向、光束大小等因素可以提高光镊捕获效率。在光镊实验中通常选择对生物分子非特异性及高透光性的二氧化硅球和聚苯乙烯球作为中介介质球。优化样品环境对提高实验效率也是极为重要的,制备稳固干净的样品池、削弱游离态氧对生物分子与微球之间链接的影响、选择合适的微球浓度比例等操作是优化样品环境所必需的。合适的微球浓度是实验成功率高和重复性好的关键,微球浓度需要同时满足捕获微球耗时少和被捕获微球测试不被干扰的要求。

3 双光阱光镊在生物学中的应用

Ashkin^[9,63]早期证明了光镊可以捕获和操纵病毒和细菌。此后,光镊技术逐步被用来研究生物单分子,并促进单分子科学的发展。分子生物学的中心法

则(图6)在近现代分子生物学发展中具有重要的意义,是理解各类疾病的基础,即DNA转录成RNA和RNA翻译成蛋白质[图6(a)]。光镊技术为科研人员提供了强有力的研究手段,并能够在单分子水平上开展对DNA复制、转录、翻译、DNA与蛋白质相互作用

及RNA修饰等过程的研究,其研究范围贯穿了整个中心法则,为在单分子层次理解生命过程提供有力工具。下面介绍一些利用双光镊研究蛋白质、核酸的经典案例,例如核酸-蛋白相互作用、蛋白质折叠及分子马达运动机制。

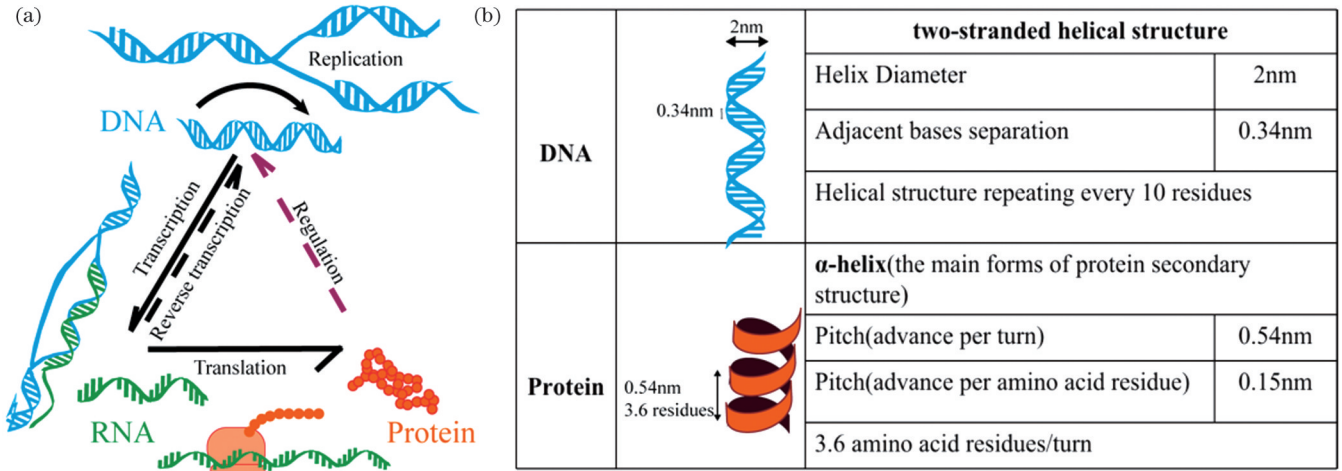


图6 分子生物学中心法则。(a)中心法则的简化概述。DNA能够自我复制并且可以被转录成RNA,RNA被核糖体翻译成多肽,多肽多次折叠成蛋白质。(b)双链DNA和蛋白质二级结构的主要参数

Fig. 6 Central dogma in molecular biology. (a) Overview of central dogma. DNA is self-replicating and information contained in DNA sequence is transcribed into RNA. RNA message sequence is translated into sequence of polypeptide by ribosome. Polypeptides are folded into proteins. (b) Main parameters of double-stranded DNA and protein secondary structure

3.1 DNA弹性特性

DNA是由A、T、G、C四个碱基通过碱基互补配对形成的双螺旋结构的生物分子。作为生物体的遗传物质,它参与了许多生命过程,例如与蛋白质相互作用或者介导分子马达机械化学能量转导等过程,在生命体系中发挥着无可比拟的作用。理解DNA力学特性是探究DNA-蛋白复合物及分子马达机械化学性质的基础,因此,在单分子层面上研究DNA的力学性质尤为重要。从物理角度来讲,DNA是一段弹性物质,相邻碱基之间的垂直距离为0.34 nm。DNA可建模为一维均一柔性聚合物链,可用持久长度来衡量聚合物指向同一方向的趋势。在蠕虫状聚合物中这两个参数通常相关:持续长度越长,拉伸模量越大。操控光镊在DNA分子上施加一定程度的力,将DNA分子拉伸或完全展开,即可测得DNA的弹性参数,如持久长度、拉伸模量等。通过单分子实验对DNA弹性的测量,可以证实一系列描述DNA弹性的理论模型,代表性的模型有蠕虫状链(WLC)和自由连接链(FJC)模型。这里对单分子实验中几个常见模型进行简要介绍。

(1) 1995年,Marko等^[64]提出一个纯熵公式,能够很好地解释在较低力作用下的DNA弹性。此力表达为

$$F = \left(\frac{k_B T}{L_p} \right) \left[\frac{1}{4(1 - x/L_0)^2} - \frac{1}{4} + \frac{x}{L_0} \right], \quad (13)$$

式中: L_p 为持久长度; L_0 为轮廓长度; x 为末端到末端

的距离。

式(13)非常适用于 $F < 5$ pN的数据分析,其中超过 χ^2 的实验值的平均概率 p 约为0.27。然而对于较大的力,数据和拟合之间会出现系统偏差。

(2) 同样在1995年,Odijk^[65]基于组合的熵焓理论,提出了如下模型:

$$x = L_0 \left[1 - \frac{1}{2} \left(\frac{k_B T}{FL_p} \right)^{1/2} + \frac{F}{K} \right], \quad (14)$$

式中: K 为弹性模量。

式(14)适用于 $F > 2$ pN的数据($p \approx 0.19$)。但是该公式无法分析在较低的最大拉伸力($F_{\max} < 15$ pN)下获得的数据集。

(3) 在式(13)的基础上,弹性模型得到进一步改进^[66]:

$$F = \left(\frac{k_B T}{L_p} \right) \left[\frac{1}{4(1 - x/L_0 + F/K_0)^2} - \frac{1}{4} + \frac{x}{L_0} - \frac{F}{K_0} \right], \quad (15)$$

式中: K_0 为弹性模量。

式(15)适用于整个作用力范围内($p \approx 0.13$),拟合只针对部分数据集,排除了高力范围($F < 20$ pN)下产生的一些不稳定性的参数值。

(4) 除了上述提及的用于分析dsDNA的模型外,一般ssDNA弹性的分析可采用FJC模型,即^[67]

$$x = L_0 \left[\coth \left(\frac{2FL_p}{k_B T} \right) - \frac{k_B T}{2FL_p} \right] \left(1 + \frac{F}{K_0} \right). \quad (16)$$

以拉伸 λ DNA 为例^[67] 分析 DNA 的弹性响应。 λ DNA 的轮廓长度为 16.4 μm (假设每碱基对 0.338 nm), 溶液中游离的 dsDNA 由于热波动会采用无规则卷曲的构象, 此时 DNA 分子端到端距离远小于自身轮廓长度, 这一行为就像理想的熵弹簧一样, 可以在其静止长度之外进行低等到中等的延伸^[66]。当拉伸长度在 10~15 μm 时, dsDNA 的熵弹性由小的收缩力 (< 5 pN) 表示, 当接近轮廓长度时, 力会迅速上升。

生理条件下拉伸游离的 dsDNA, 在小于 10 pN 的范围内增加力的大小会使 DNA 变直, 产生的力-伸长曲线与不可伸展的蠕虫链模型即 WLC 模型吻合, 此时 DNA 分子被视为长度为 L_0 的柔性棒, 其刚度用持久长度 L_p 来量化, 约为 50 nm^[45, 64]。拉伸力 $F < 50$ pN 时, DNA 分子为典型的 B 型, 分子表现为弹性拉伸模量。在更高的力下, DNA 分子端到端长度超过完整的轮廓长度, 此时纯熵弹簧就变得不可伸长, DNA 的弹性响应主要由熵拉伸决定^[45]。当力在 10~35 pN 范围时, DNA 分子表现为可伸长杆, 能够被进一步拉伸, 可以使用可伸展蠕虫状链 (eWLC) 模型对力-距离曲线进行拟合, 此时 DNA 的伸展性由拉伸模量决定^[58]。当拉伸力约为 65 pN 时, DNA 分子突然伸长, 最终被过度拉伸至其 B 型轮廓长度的 1.7 倍左右, 这种转变发生在非常窄的力范围内 (约 2 pN)。当作用力超过 65 pN 时, DNA 分子会被过度拉伸, 其轮廓长度在狭窄的力范围内突然拉长了 70%, 由典型的 B 型转变为 S 型^[68]。当作用力进一步加大时, S-DNA 熔为 ssDNA, 并表现为 ssDNA 的力学特性^[69-70]。ssDNA 比 dsDNA 更加灵活并且更具有收缩性, 在高力作用下, 由于不会形成螺旋结构, 它可以被拉伸到比 dsDNA 更长的长度。而在低离子强度下由于静电排斥和排除的体积效应, 会出现与 FJC 模型的偏差^[67]。

3.2 蛋白质折叠的研究

蛋白质的正确折叠是维持细胞活性和健康的重要保证。然而在生理条件下, 蛋白质的折叠过程中容易出现错误折叠或者形成有毒的聚集物, 这会诱导阿尔兹海默症、帕金森病等神经退行性疾病的发生^[71]。了解蛋白质折叠过程的分子机制有助于理解和治疗这些疾病。传统基于系综的检测手段难以检测蛋白质错误折叠等信息, 而光镊能够捕获单个蛋白质并监测在受力作用下的动态折叠过程, 为蛋白质错误折叠相关的动力学提供单分子信息。2005 年, 光镊被用于研究核糖核酸酶 H (RNase H) 的折叠过程, 这是光镊首次被用于详细研究蛋白质折叠的过程。研究发现该蛋白质能够在约 19 pN 及约 5.5 pN 两种不同的状态下展开, 并通过一种中间体重新折叠, 该中间体被认为是一种熔融球结构^[72]。

以阮病毒蛋白 PrP 为例, 说明如何利用光镊在单分

子层次研究蛋白质折叠。阮病毒蛋白 PrP 作为一种膜相关蛋白, 其错误折叠后会形成具有传染性的构象。PrP 具有两种结构: 天然结构 PrP^C 和错误折叠结构 PrP^{Sc}, 其中具有感染性的 PrP^{Sc} 可以招募 PrP^C 并将其转化成 PrP^{Sc}, 但 PrP 的错误折叠结构及转化机制仍然未知, 因此备受关注并被广泛研究。单分子光镊技术能够直接观察单个 PrP 蛋白的折叠路径 [图 7(a)^[73]], 从而揭示 PrP 蛋白错误折叠的机理。单分子力谱结果表明 [图 7(b)^[74]], 天然折叠过程涉及展开和折叠两种状态, 并没有观察到通路中间体。其中, 展开状态以不同的形成速率产生三种不同的错误折叠途径, 形成不同的非天然状态^[74]。错误折叠可用能量景观来描述, 许多情况下错误折叠过程的结果是由动力学主导的^[75], 能量景观的扩散系数能够决定构象转变的微观动力学, 在研究错误折叠过程中发挥着重要的作用^[73]。研究发现从天然结构到错误折叠结构的转化从二聚体开始^[76-77], 基于此, 将两个 PrP 分子端对端共价结合形成串联二聚体, 用于研究 PrP 的错误折叠 [图 7(a)^[73]]。预期中的二聚体之间是相互独立的, 在拉力作用下两个相同的结构域依次展开 [图 7(c) 插图], 而实际上二聚体在约 8 pN 及约 13 pN 处分别出现了大小“断裂”信号并形成了稳定的非天然结构 [图 7(c)^[73]], 从力-伸长曲线得到的信息是重构二聚体错误折叠能量景观所必需的。研究发现错误折叠扩散系数远小于自然折叠扩散系数, 此外, 通过直接测量错误折叠过程中 I_D1 (第一个二聚体中间体) 到 U (展开态) 的过渡路径时间 [t_{tr} , 图 7(d)^[73]] 发现未折叠到错误折叠的 t_{tr} 也远小于未折叠到自然折叠的 t_{tr} ^[78-79], 这一结果与从扩散系数中预测的结果完全一致, 由错误折叠过程中非天然的相互作用引起。

光镊被用于研究更为复杂的蛋白结构或生物系统, 例如蛋白翻译折叠、分子伴侣调控等过程^[17]。在翻译过程中, 新生链在核糖体表面一边合成一边折叠, 与折叠速率相比, 合成速率较慢, 因此翻译过程中为了平衡核糖体的构象, 新生链在结构上会做出相应的转变。为探究核糖体对新生链折叠的影响及新生链折叠转化的过程, Kaiser 等^[80] 选择 T4 溶菌酶蛋白设计了核糖体-新生链复合物实验系统, 在 T4 溶菌酶 C 末端增加了 41 个氨基酸长度的接头域, 可以让整个 T4 溶菌酶蛋白暴露在核糖体出口 [图 7(e)]。研究发现核糖体-新生链复合物的重折叠速率要远低于游离蛋白的重折叠速率, 增加接头长度虽然能够提高新生链的折叠速率, 但仍比游离蛋白的慢, 部分原因是核糖体和新生链之间产生静电相互作用。将 T4 溶菌酶 C 端 15 个氨基酸截断后发现游离的蛋白出现错误折叠, 形成了高度异质结构集合体, 而核糖体-新生链并未出现这种情况, 这表明核糖体似乎能够防止新生链蛋白质的错误折叠^[80]。这一猜测在研究延长因子 G (EF-G) 时也被进一步证实^[82-83]。

EF-G 是一种多域蛋白, 由 G、II、III、IV、V 五个结构域构成, 作为 GTP 酶在翻译延伸过程中具有重要功

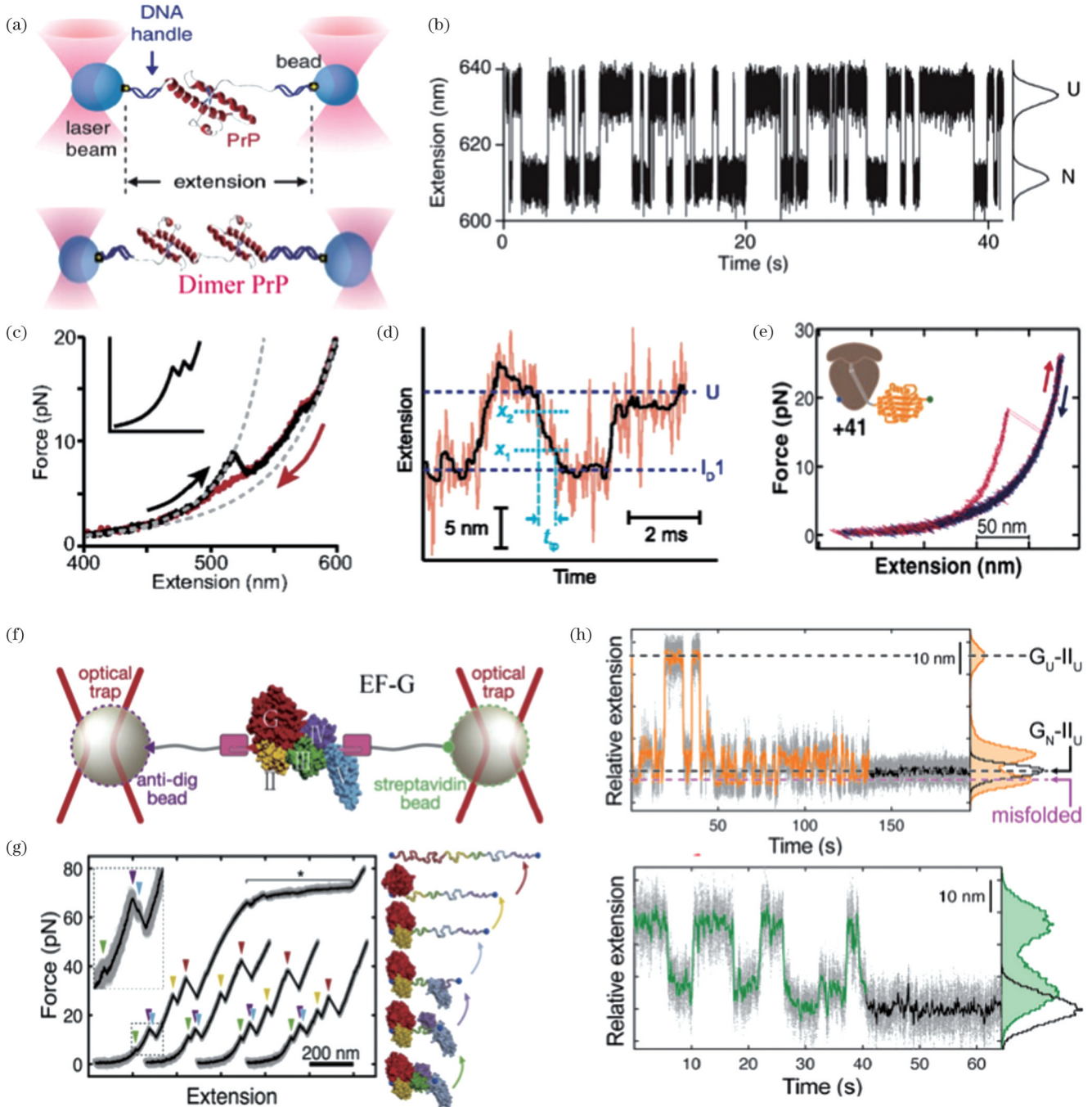


图7 蛋白质折叠的研究。(a)单体及二聚体PrP蛋白质错误折叠的单分子研究示意图^[73]。(b)9.1 pN恒力下,蛋白在展开状态(U)和原生折叠状态(N)之间跃迁^[74]。(c)PrP二聚体的力-伸长曲线,展开(黑色)和重新折叠(红色)曲线表明形成了稳定的非天然结构^[73]。(d)恒力下对中间态 I_{p1} 到展开态U轨迹测量得到的过渡路径时间(t_p)^[73]。(e)T4溶菌酶在核糖体上展开(红色)和重新折叠(蓝色)的力-伸长曲线^[80]。(f)EF-G高级结构单分子研究示意图^[81]。(g)拉伸EF-G的代表性力-伸长曲线^[81]。(h)核糖体和TF减少了域间错误折叠,其中上图为G结构域在3.5 pN的恒力下重新折叠,下图为G结构域在TF和核糖体(452RNC)存在的情况下重新折叠^[82]

Fig. 7 Study of protein folding. (a) Schematic diagram of single-molecule research on monomer and dimer PrP misfolding^[73]. (b) With force held constant at 9.1 pN, protein jumps between unfolded state (U) and natively folded state (N)^[74]. (c) Unfolding (black) and refolding (red) FECs of PrP dimers show formation of stable nonnative structures^[73]. (d) Transition path time (t_p) for misfolding measured from constant-force trajectories for $I_{p1} \leftrightarrow U$ ^[73]. (e) FECs of T4 lysozyme unfolding (red) and refolding (blue) on ribosome^[80]. (f) Schematic diagram of single-molecule study of advanced structure of EF-G^[81]. (g) Representative force extension curves from pulls of EF-G^[81]. (h) Ribosome and TF reduce inter-domain misfolding: top picture is G-domain refolding against constant force of 3.5 pN, and bottom picture is refolding in presence of TF and ribosome (452RNC)^[82]

能。多域蛋白的折叠极为复杂,以共翻译方式开始,核糖体和分子伴侣在其中发挥着至关重要的作用。Liu 等^[83]首次利用光镊技术对 EF-G 的折叠展开初步研究,表征了全长蛋白质下各个结构域的特性^[81,84];Maciuba 等^[81]在此基础上简化了样品连接方法,并成功验证了可行性[图 7(f)和图 7(g)]。Liu 等^[83]发现展开后的结构域之间相互作用影响了 EF-G 的有效折叠,其中 G 结构域作为最先合成的新生链,能够自主折叠,而核糖体的存在降低了 G 结构域稳定性,这与之前观察到的核糖体影响新生多肽结构稳定性的研究结果一致^[85-87]。随后的研究表明 G 结构域的折叠必须在 II 结构域折叠之前完成,这是 II 结构域稳定折叠的先决条件^[82]。后续各个结构域按照合成顺序依次完成分层折叠,从而促进生产性的共翻译折叠,在这一过程中核糖体对 EF-G 折叠的影响依赖于新生链的长度,并表现为加速或减速折叠。此外核糖体和分子伴侣 TF 的存在能够阻止结构域之间的错误折叠,避免生产性折叠减慢[图 7(h)^[82]]。同时,TF 阻止已折叠结构域与未折叠的新合成结构域相互作用,避免了因折叠意外导致的并发症^[82]。

综上所述,基于光镊的单分子研究表明核糖体和分子伴侣的共同引导能够确保新生链走上正确的折叠路径。

3.3 DNA-蛋白质复合物的力学分析

DNA-蛋白质的结合与多种分子及细胞机制息息相关,对于细胞的功能及内部运转具有非常重要的作用,例如 DNA 复制、转录、DNA 修复。光镊在揭示 DNA-蛋白相互作用的动态及机械特性等方面贡献突出。经过前人的不断探索,如今已具备成熟的体系方案来研究 DNA-蛋白相互作用。2003 年,Block 课题组 Shaevitz 等^[13]首次采用微球-DNA-微球的“哑铃”结构解析 DNA-蛋白相互作用。

DNA 的弹性参数是研究 DNA-蛋白质相互作用的重要前提。许多大分子的弹性满足与 DNA 类似的规律,因此光镊可以用来研究蛋白质、核酸等多种大分子体系的机械力学特性^[12]。例如 RNA 聚合酶(RNAP)转录过程中动力学研究^[13,90],将单一活性的 RNAP 固定在一个微球上,DNA 的转录上游或下游共价结合在另一微球上,形成微球-DNA-RNAP-微球[图 8(a)]。在

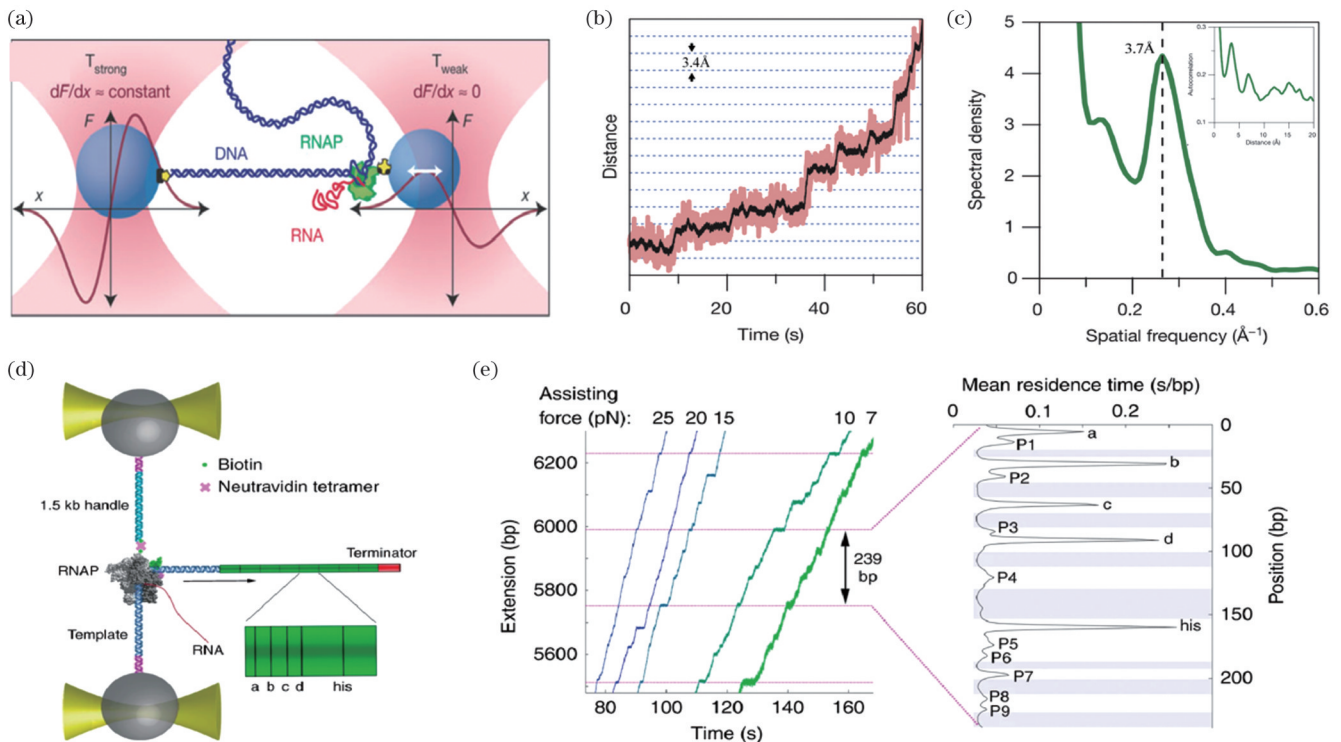


图 8 DNA-蛋白质相互作用研究。(a)RNAP 哑铃结构示意图^[88]。(b) 18 pN 负载力下转录过程中的单个 RNAP 步进运动^[88]。(c)RNAP 转录过程的功率谱在主要空间频率处显示一个峰值,对应数值为 (0.37 ± 0.06) nm。插图表明平均自相关函数在步长的倍数处表现出周期性^[88]。(d)生物素化 RNAP 通过中性亲和素桥接到 1.5 kb DNA 末端^[89]。(e)左图是在辅助力下 RNAP 转录过程停顿迹线;右图是为平均停留时间直方图,通过在所有条件下所有轨迹的每个位点经历的时间进行平均计算得到,停顿位点被标记,无停顿区域用阴影表示^[89]。

Fig. 8 Study on DNA-protein interaction. (a) Schematics of RNAP dumbbell assay^[88]. (b) Step records for single molecular RNAP transcribing under 18 pN^[88]. (c) Average autocorrelation function derived from position histograms of RNAP transcription exhibits periodicity at multiples of step size (inset). Its power spectrum shows a peak at dominant spatial frequency, corresponding to (0.37 ± 0.06) nm^[88]. (d) Biotinylated RNAP is bridged to biotinylated 1.5 kb DNA^[89]. (e) Representative traces obtained under mechanical force (left). Mean residence time histogram (right) is calculated by averaging the time spent at each position in the repeat across all traces at all conditions. Pause sites are marked, and pause-free regions are shaded^[89].

转录过程中,随着 RNAP 在 DNA 上以单碱基对步长不断移位[图 8(b)和图 8(c)],RNAP 和 DNA 末端之间端到端的距离不断变化,通过记录分析力-伸长曲线能够得到移位速度、运行长度等参数^[88]。这些在不同负载力下发生的相应变化为机械化学循环研究中的动力学研究提供数据支持。解压缩通常采用恒力模式,在保证蛋白不从 DNA 脱落的前提下对 DNA 持续解链。在解链过程中 DNA 会出现叉型位置,该位置对应蛋白位置,具有极高的定位精度,可用于检测 DNA 发夹上是否结合蛋白质^[45]。

在单分子水平上研究 RNAP 在转录过程中的动力学能够帮助我们更好地理解转录机制。转录主要分为起始、延伸和终止三步,在转录过程中穿插着停顿。生物素化 RNAP 停靠在与微球连接的模板 DNA 上,并通过中性亲和素桥接到与另一微球相连的 1.5 kb DNA 手柄末端[图 8(d)]^[89]。利用光镊技术能够准确找到 RNAP 在模板 DNA 序列上的位置及暂停位点,该模板 DNA 包含几个序列已知暂停位点:a、b、c、d、his。转录开始后,在负载力协助下可以得到 RNAP 在 DNA 上的运行轨迹及停顿现象,对暂停位点进行统计发现,除了已知序列的强暂停位点外,还出现了弱暂停位点[图 8(e)]^[89]中的 P1~P9。对暂停位点的停顿时长及频率等参数进行量化,发现暂停存在序列特异性。此外,光镊还可以解决真核 RNA 转录过程中的相关问题,被用于研究 RNA 聚合酶 I 和 RNA 聚合酶 II 在转录过程中与核小体相互作用的机理^[16,91-93]。

3.4 分子马达机械化学性质的研究

分子马达是能够将化学能转化为机械功的几类活性酶分子,参与转录、翻译、细胞运动及分裂等过程,在维持细胞功能上发挥着重要的作用^[94]。光镊可通过测量步长、速度、失速力、运行长度等参数来理解不同类别分子马达的机械化学性质。大肠杆菌 Rep 解旋酶是一类通过水解 NTP 解开双链核酸的 DNA 马达,由 1A、1B、2A 和 2B 四个结构域构成,其解链机制一直备受关注^[95]。在没有 DNA 时 Rep 蛋白是一种稳定的单体^[96-97],当 DNA 存在时,Rep 被诱导形成二聚体并具备解旋酶活性^[98-99]。2B 结构域在调节 Rep 解链过程中发挥着重要的作用,2B 和 2A 结构域之间铰链的旋转运动能够引发 2B 结构域构象转变,致使 Rep 解旋酶存在“打开”和“闭合”两种构象^[97,100]。“闭合”状态激活 Rep 从而渐进地展开 DNA 链,而“打开”状态则抑制展开活动^[101]。有两种机制解释渐进的 DNA 展开:控制 2B 构象能够激活单体 Rep 解旋^[101];二聚体 Rep 也可激活解旋活性^[102]。然而目前对这些机制的理解仍然有限。Makurath 等^[103]利用去除 2B 结构域的变体 Rep Δ 2B 和野生型 wtRep 量化 2B 结构域对 Rep 解链进行性和速度的影响[图 9(a)]^[103],研究证实了 Rep 单体 2B 结构域的删除可以激活其解旋活性[图 9(b)]^[103],且比二聚化

的 wtRep 更具有进行性。然而 2B 结构域对于 DNA 解链活动并不是必需的^[102-103],而是在调节解链速度方面起作用。此外,先前研究认为 2B 子域构象之间的转变能够通过“链转换”使得解旋酶在 DNA 双链之间交替易位,从而限制进行性运动^[100,104]。使用光镊对 Rep 进行研究的结果则表明,2B 结构域对于其“链转换”并不是必需的,Rep 的“链转换”并不需要 2B 结构域^[93,103]。

同聚环-ATP 酶是由多个结构同源亚基组成的酶,它通过驱动其底物(如核酸和多肽)的易位或旋转^[106],参与 DNA 复制及易位、ATP 合成、蛋白质降解^[107-108]。然而人们对同聚环-ATP 酶的包装机制知之甚少。噬菌体 ϕ 29 中的 DNA 包装马达蛋白作为同五聚环 ATP 酶,是研究同聚环-ATP 酶中的亚基间协调的理想体系。Moffitt 等^[109]的研究初步证明了 ϕ 29 包装马达蛋白循环转移 DNA 的两个阶段:一个是停留阶段,ATP 与环状 ATP 酶作用位点结合;另一个是爆发阶段,蛋白在 DNA 上四次以 2.5 bp 步长累积易位 10 bp。这两个阶段的循环构成了整个机械化学循环,其中只有四个亚基参与了 DNA 的易位。后续研究完整阐述了整个机械循环过程:在爆发阶段结束时,五个亚基各包含一个 ADP,当新的停留阶段开始时,不参与易位的特殊亚基触发其 ADP 的释放及 ATP 装载,并诱导其他亚基完成 ATP 的装载,随后特殊亚基完成 ATP 的水解并触发后续四个亚基的顺序水解过程^[110]。在噬菌体包装过程中,随着衣壳内病毒 DNA 填充增加,包装速度不断减慢[图 9(e)]^[105],相较于低衣壳填充,高衣壳填充时马达蛋白的机械化学循环特性在多个方面发生改变以保持亚基间运作高度协调:ATP 紧密结合率下降导致停留阶段延长、长时间停顿(LLP)出现、爆发阶段的持续时间延长,马达蛋白的步长减小导致爆发阶段缩短、爆发阶段平均 DNA 易位增量减小和旋转密度增加[图 9(e)和图 9(f)]^[105]。停留阶段的延长和 LLP 的出现是高衣壳填充时包装速度急剧下降的主要原因^[105]。噬菌体 ϕ 29 包装机制,即马达和聚合物底物之间的特定相互作用决定亚单位配位,是同聚环-ATP 酶类的一般特征。

3.5 分子伴侣对蛋白质动态折叠的影响

在复杂的细胞内环境中,分子伴侣能够防止蛋白聚集并促进蛋白有效折叠,在促进和调节蛋白质折叠机制中发挥着重要作用。光镊实验可以揭示分子伴侣如何调控蛋白质折叠及组装过程。Ca²⁺触发的神经递质和激素的胞外分泌是一个被严格控制的过程,这一过程需要核心膜融合蛋白 SNARE 参与。SNARE 是介导膜融合的核心机制,在神经细胞中参与神经递质的释放。SNARE 复合物只有正确组装才能驱动囊泡和质膜的融合,同时许多调节蛋白,例如络合蛋白(Cpx),参与了 SNARE 组装的调节,精确控制膜融合过程。

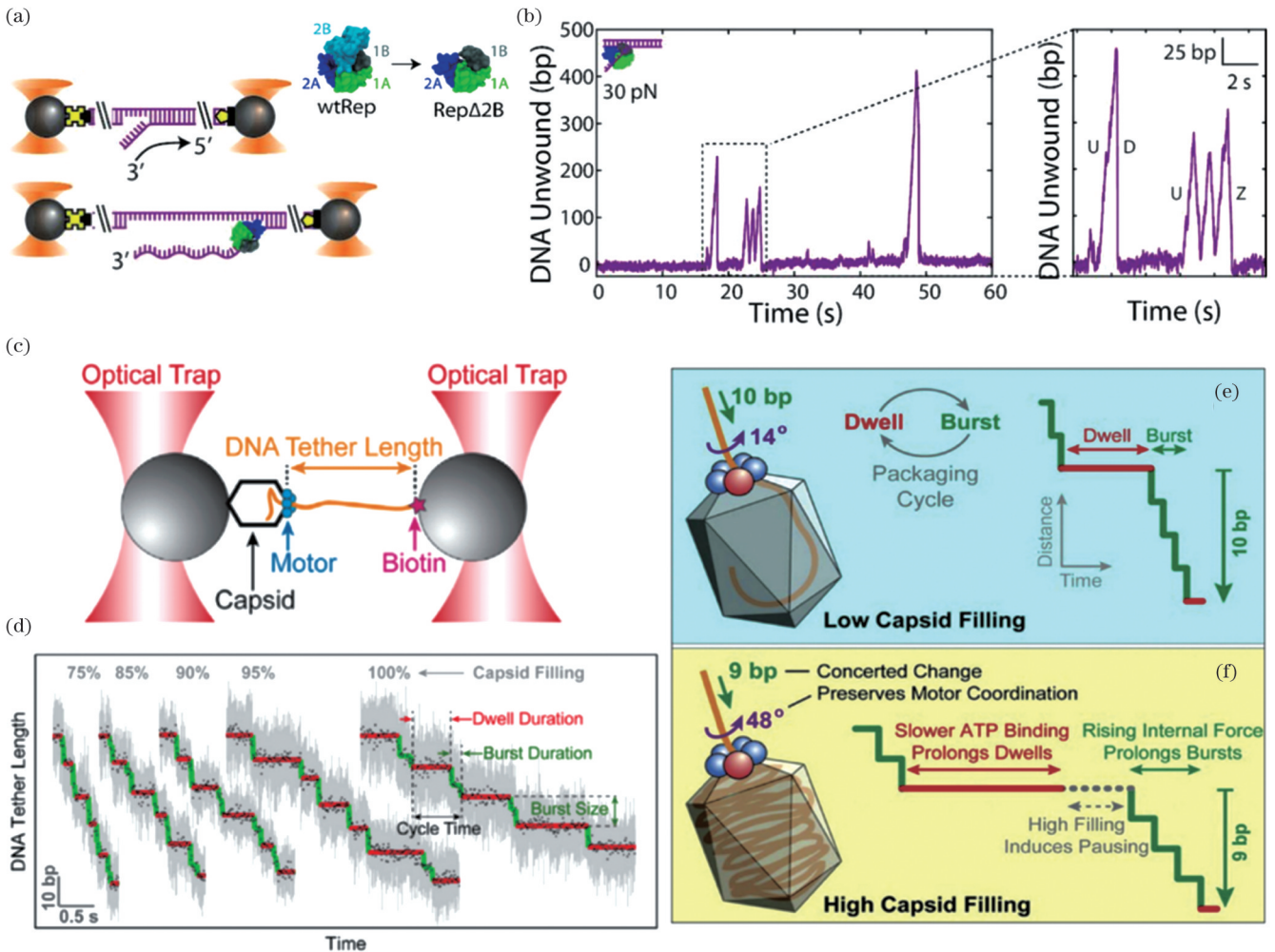


图 9 分子马达机械化学性质的研究。(a)双光镊研究 DNA 叉展开示意图。wtRep“闭合”构象显示有四个亚结构域,Rep Δ2B 的结构模型由三个甘氨酸残基取代^[103]。(b)Rep Δ2B 单体介导 DNA 叉行进展展开的轨迹。局部放大图显示了两轮活动:蛋白质解链(U)通过中间叉离解(D)结束,或经过三轮解链(U)和重新压缩(Z)后 DNA 叉底部解离^[103]。(c)高分辨率马达蛋白包装实验示意图^[105]。(d)不同程度衣壳填充下单个马达蛋白包装循环的轨迹,红色和绿色线段表示停留和爆发阶段^[105]。(e),(f)噬菌体包装过程中低衣壳填充(e)和高衣壳填充(f)的包装特性^[105]

Fig. 9 Mechanochemical properties of molecular motors. (a) Schematic of dual-trap optical tweezers for DNA fork unwinding. wtRep structure in “closed” conformation shows its four subdomains, and structural model of Rep Δ2B with 2B is replaced by three glycine residues^[103]. (b) Trace of processive DNA fork unwinding by Rep Δ2B monomer. Zoom-in plot shows two rounds of activity: protein unwinding (U) ends either by mid-fork dissociation (D) or dissociation at fork base after three rounds of unwinding (U) and re-zipping (Z)^[103]. (c) Experimental geometry of high-resolution packaging assay^[105]. (d) Sample traces displaying individual packaging cycles at various levels of capsid filling. Stepwise fit highlights dwells and bursts in red and green, respectively^[105]. (e), (f) Characteristics of packaging at low capsid filling (e) and high capsid filling (f) in bacteriophage packaging^[105]

为了研究络合蛋白对 SNARE 组装的调节, Hao 等^[111]对 SNARE 复合物依赖络合蛋白的组装/去组装过程进行表征。首先观测到 SNARE 复合物在被动模式下 4 态跃迁的伸长-时间轨迹[图 3(c)],直接呈现了 SNARE 复合物的四种不同构象:连接域打开(状态 2), C 端展开到 +2 层(状态 3), 中间结构域展开到 -1 层(状态 4), N 端在 SNAP-25 脱落之前展开(状态 5)。通过观察加入全长络合蛋白前后 SNARE 复合物动态组装过程的变化,实时研究络合蛋白与 SNARE 复合物中间态的相互作用。

研究发现络合蛋白能够稳定部分折叠的 SNARE 复合物,从而对应生理状态下络合蛋白的“钳制”或“促进”功能(图 10)。此外,络合蛋白的 1-83 氨基酸结构域能够稳定 SNARE 复合物的四螺旋束,其稳定 SNARE 复合物的能力主要取决于 N 端。而且络合蛋白的 C 端结构域(CTD)的关键抑制作用一部分是因为膜结合或囊泡结合,另一部分则是通过与 SNARE 复合物的直接相互作用介导。1-83 氨基酸和 C 端结构域可以有效地重构全长络合蛋白的抑制信号。这些结果表明生理状态下络合蛋白是多个结构域协同运作,

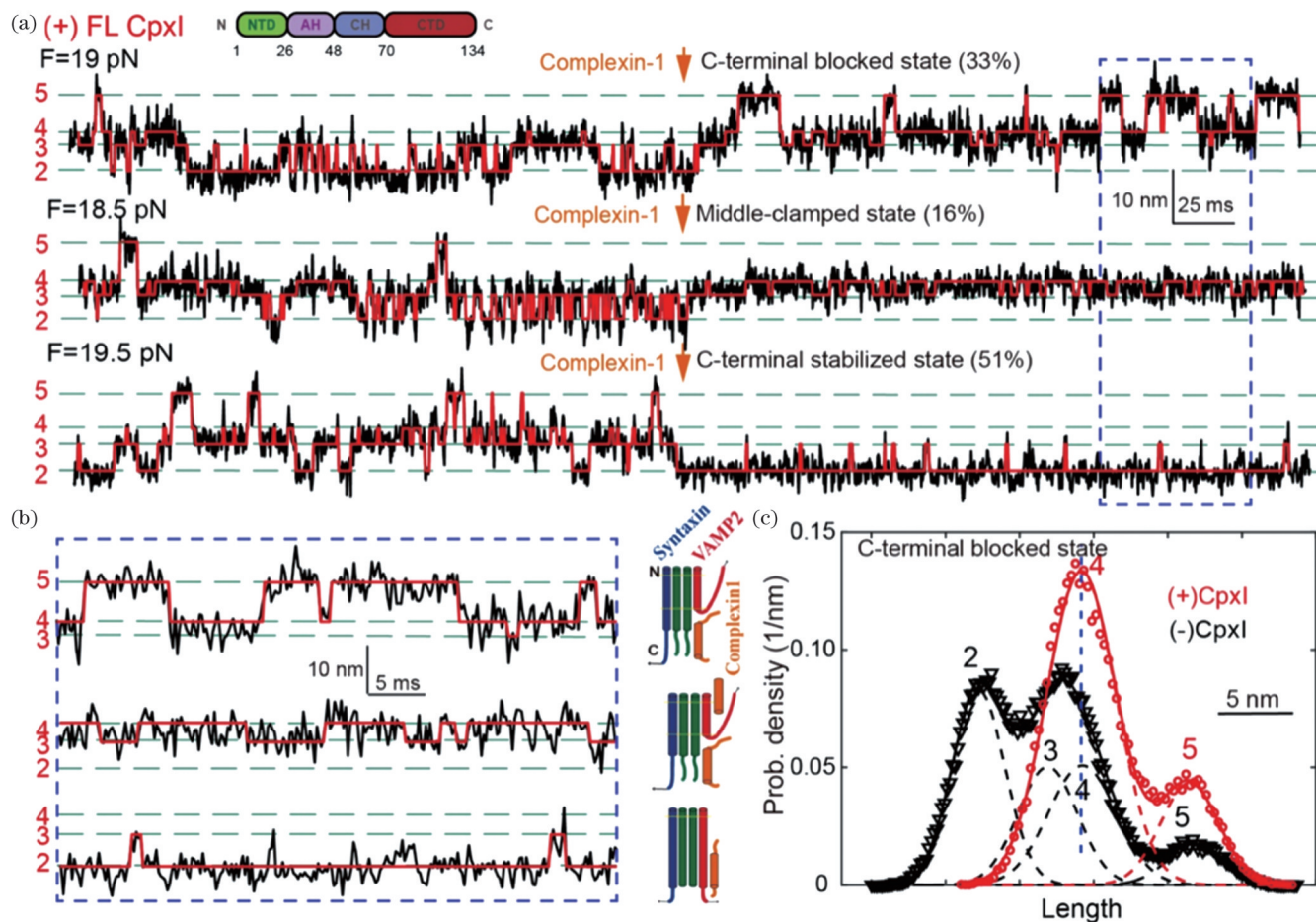


图 10 络合蛋白稳定部分折叠的 SNARE 复合物^[111]。(a) 恒定光阱距离下单个 SNARE 复合体添加络合蛋白前后的伸长-时间轨迹。箭头表示添加全长络合蛋白。(b) 对(a)中蓝色虚线矩形标记的区域放大视图。右侧为对应的 SNARE 构象状态。(c) 络合蛋白存在(红圆)和不存在(黑三角形)时各状态的概率分布及其最佳高斯拟合(红线和黑线)。在全长络合蛋白存在时, SNARE 复合物被锁定到 C 端组装被抑制状态

Fig. 10 CpxI stabilizes partially folded SNARE complex^[111]. (a) Extension-time trajectories of single SNARE complex under constant trap separation in presence of CpxI. Arrows indicate administration of full-length CpxI molecules. (b) Enlarged views of region marked by dashed blue rectangles in (a). SNARE configurations correspond to each state. (c) Probability distributions of extensions correspond to traces in (a) in presence (red circles) and absence (black triangles) of CpxI and their best fits by a sum of four Gaussian functions (red and black lines). This suggests that in presence of full-length CpxI, SNARE complex is locked into C-terminal assembly-inhibited state

在胞内作为一个分子开关存在——无 Ca^{2+} 时稳定 SNARE 复合物的半折叠态,防止囊泡提前释放;当 Ca^{2+} 到达时,帮助 SNARE 复合物正确组装,并维持这一状态直到囊泡内容物释放完成。

4 双光镊技术的发展

随着光镊应用的不断深入,尤其是单分子生物物理的蓬勃发展,光镊技术本身也在为了满足多样化的新需求而不断地完善和更新。特别地,双光镊与其他技术的联合使用推动了单分子科学的发展进程,如纳米生物学和病理诊断。本节围绕双光镊与多种新技术联用的新型杂化光镊展开讨论。

4.1 双光镊与拉曼光谱结合

1928 年,拉曼(Raman)^[112]发现了拉曼散射效应,

即当一束光穿过透明化合物时,该光束中的一小部分光以垂直于原始光束的方式从化合物中发出且伴随着波长的改变。拉曼因这一发现获得了 1930 年的诺贝尔奖,并推动了拉曼光谱学的发展。用激光照射样品后,部分入射光子与样品相互作用会产生能量转移(拉曼位移)并获得振动能量差,通过检测样品的非弹性散射光谱可以确定样品的分子结构、组成和分子间相互作用等信息^[113]。由于某种分子所产生的拉曼信号是唯一的,因此,拉曼光谱可用于定性和定量分析分子种类^[114]。

自发拉曼信号非常弱,限制了其在许多领域的应用。为提高拉曼信号的强度,人们提出表面增强拉曼光谱(SERS)和相干拉曼散射(CRS)光谱等获得高信噪比的拉曼信号。SERS 将分子吸附在粗糙的金属表

面上,通过增加入射电场将拉曼信号增强 $10^3\sim 10^7$ 倍^[115]。但SERS只能用于分析带电分析物,因此在生物应用中的用途有限^[115]。CRS主要有两种形式:相干反斯托克斯拉曼散射(CARS)和受激拉曼散射(SRS)^[116]。这两种CRS作为主要的非线性拉曼技术,可以将拉曼信号显著增强几个数量级,并在生物医学工程应用中潜力巨大。SRS和CARS具有相同的激发条件及分子振动频率匹配的拉曼位移,然而CARS是一个光学参量过程,伴随着来自四波混频过程的非共振部分,而SRS是光子振动能量转移的直接过程^[116]。相较于CARS,SRS测量不受非共振背景的干扰,测量信号与分子浓度成正比。但是检测SRS信号需要一个高度稳定的脉冲源并结合锁相放大器或调谐放大器,这使得宽频SRS测量更具技术挑战性^[117]。

可见激光(图11)也被用于拉曼光谱的激发,以分析单个微粒。近年来,近红外(NIR)激光束因光子能量低、对样品的光分解比可见激光束少等优势,被广泛用于拉曼光谱。2002年,Ajito等^[118]首次报道了捕获单个纳米颗粒的拉曼光镊显微镜(RTM)。在此基础上,Xie等^[119]开发出用于操作和识别溶液中的单个生物细胞的光镊拉曼光谱(LTRS)。该系统将拉曼光谱与光镊相结合,利用单束激光光镊在非直接接触情况下悬浮和操纵单个细胞,在样品最自然的状态下记录其拉曼光谱,并能够将样品保持足够长的时间以进行数据采集,从而得到比自发拉曼光谱更准确的结构和构象信息。单光镊拉曼光谱通常使用单束激光实现捕获和拉曼激发^[119-121],或者使用一束激光进行捕获,另一束不同波长的激光进行拉曼激发^[122]。迄今为止,单光镊拉曼光谱在研究短期高血糖对人体红细胞的影响^[123-124]、癌细胞识别及相关药物评估^[125]、单个线粒体和染色体的鉴定及分类^[126-127]、空气中单个气载颗粒的捕获和分析^[128]等方面有着广泛的应用。现阶段,LTRS与机器学习及深度学习等算法结合,用于在单细胞水平上快速准确地诊断肿瘤或病症^[129-130]及相关药物筛选^[131]。

然而,单光镊拉曼光谱每次只能捕获和分析一个细胞的拉曼光谱,不能同时监测细胞间的相互作用或一个细胞内的两个相关部分。为解决此类问题,结合拉曼光谱的双光镊系统得以开发和优化^[127, 132]。

Li等^[132]搭建了双波长双光阱拉曼光镊系统[图11(a)],并用于监测芽接酵母细胞的动态生长过程[图11(c)]。在该装置中,785 nm近红外激光经分束器BS₁分成两束,主光路光束经M₁反射到达BS₂处,垂直于主光束的分光束经M₂到达BS₂,两光束在Y轴方向成微小角度以确保在空间错开。分色镜DM₂将光束导入扫描系统,并通过透镜L₁、L₂、DM₁和物镜形成双光镊捕获两个微球。来自捕获微球的拉曼散射光由同一物镜收集后经过L₃进入成像光谱仪的入射狭缝,在电荷耦合器件(CCD)上成像。在监测由母子细胞组成的芽接酵母细

胞时,一光阱捕获母细胞,另一光阱捕获子细胞,酵母细胞动态生长时的拉曼光谱被延时记录[图11(c)]。延时拉曼光谱中的细胞核带(1093 cm^{-1} , 812 cm^{-1} 及 783 cm^{-1})、蛋白质带(1654 cm^{-1} , 1306 cm^{-1})、脂质和蛋白CH带(1445 cm^{-1})等各种分子组分动态信息,表明母子细胞的分子组成不同且在生长过程中不断变化,与母细胞相比,子细胞的细胞核带增加显著,这意味着子细胞生长更为迅速。该系统还被用于研究添加发芽剂L-丙氨酸后两个芽孢杆菌孢子的动态萌发和异质性及高温水中孢子湿热失活机制^[132-133]。在这些研究过程中,双光阱拉曼光镊发挥着巨大优势,它能够消除局部培养基环境变化对孢子的影响。

红细胞在经过血管或微小毛细血管时会受到拉伸或压缩,这些形变会引起细胞氧合状态的变化,参与氧气运输的血红蛋白(Hb)在这一过程中至关重要。Rao等^[134]利用双光镊拉伸红细胞模拟体内细胞形变并监测机械应力引起的氧合和脱氧状态转化的光谱信息。与图11(a)不同的是,该研究使用的装置包含两个激光器:激发拉曼光谱的785 nm二极管激光器和捕获细胞的1064 nm二极管激光器[图11(b)]^[135]。实验时操纵光镊固定细胞并使拉曼光束透过红细胞中心,记录红细胞处于平衡(细胞被固定不旋转时的最小约束力)或者拉伸(最大拉伸限度)状态时的拉曼光谱。与平衡状态相比,拉伸状态的拉曼光谱在某些区域存在不同[图11(d)],在 750 cm^{-1} 处其峰值位置与线宽发生变化,这可能是红细胞拉伸对Hb结构施加应变导致的。而在 1625 cm^{-1} 处频带出现降低,表明拉伸后Hb由氧合向脱氧状态转变。结合其他拉曼光谱变化区域分析发现,经过拉伸后红细胞内相邻Hb及Hb与膜之间的相互作用增强,从而促使红细胞从氧合转换至脱氧状态^[135]。此外,Rusciano^[136]在此基础上通过主成分分析法发现这种现象是可逆的。

4.2 双光镊与单分子荧光检测相结合

虽然利用光镊能够在单分子水平上研究生物大分子的动力学,但只能在一维方向上测量单分子的力和延伸长度,这限制了光镊捕获复杂三维构象变化的能力。荧光光谱的出现使得单分子可视化成为现实,基于荧光的单分子技术具有高灵敏度及高分辨率,已被广泛用于探测生物分子的动态变化过程并揭示其分子机制。高分辨率光镊与单分子荧光成像的结合将单分子研究推向了另一个新阶段,它结合了光镊和单分子荧光成像的优势,既具有皮牛级的力分辨率和亚毫秒级的时间响应,又能捕获高灵敏度的荧光信号,是研究复杂三维构象变化的有力工具^[137-138]。

一个经典的例子是DNA结合蛋白与DNA作用的全内反射荧光(TIRF)成像。Lee等^[139]将单光镊与TIRF显微镜相结合,研究长ssDNA上单个UvrD解旋酶动力学,并首次展示了长ssDNA上单蛋白运动的荧

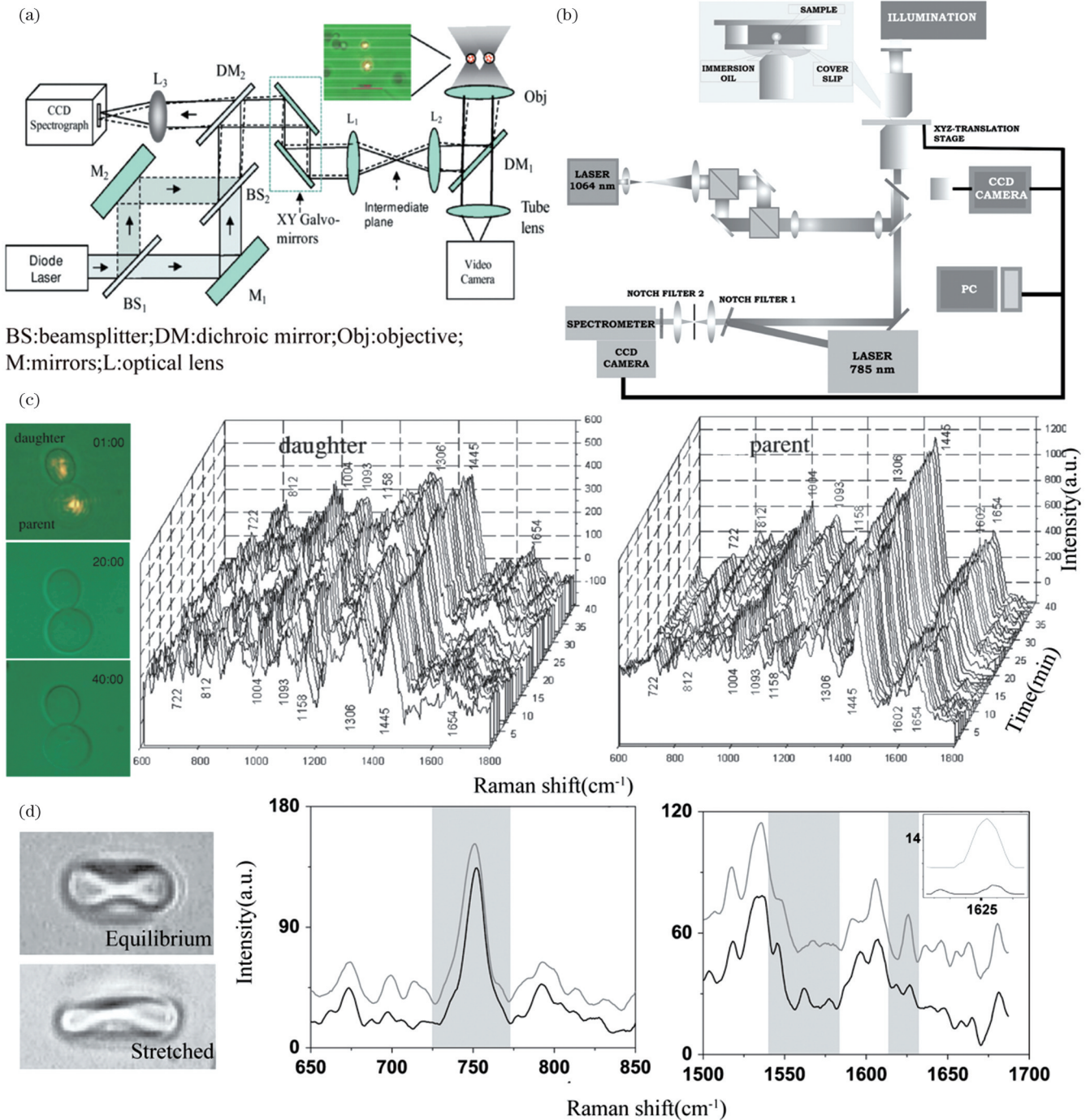


图 11 拉曼光谱与光镊相结合。(a)单波长双光阱拉曼光镊实验装置图^[132]。(b)双波长双光镊-拉曼光谱系统光路图^[134]。(c)双光镊捕获芽接酵母母子细胞的显微图像与延时拉曼光谱^[132]。(d)红细胞平衡(灰色)和拉伸(黑色)状态的拉曼光谱^[134]
 Fig. 11 Laser Raman spectroscopy tweezers. (a) Schematic of dual-trap Raman tweezers^[132]. (b) Schematic of Raman spectroscopy system with dual-spot optical trap^[134]. (c) Time-lapse Raman spectra of daughter cell and parent of budding yeast cell in dual traps^[132]. (d) Raman spectra of equilibrium (gray line) and stretched (dark line) states of RBC^[134]

光图像。TIRF 显微镜能够选择性地照亮玻片表面上方约 100 nm 范围内的分子,具有较好的信噪比。操控单光阱捕获固定在玻片表面的 ssDNA 一端,对单个荧光标记的 UvrD 酶的运动过程进行直接荧光成像 [图 12(a)^[139]],通过监测 DNA 解旋活性,直接可视化 UvrD 酶解旋起始途径来分析其易位和解旋过程中的步进机制。图 12(d)展示了 UvrD 解链过程始末,一个 UvrD 单体(蓝色荧光)沿着 ssDNA 段沿 3'-5' 方向易

位,其解链速度比沿 ssDNA 易位速度慢约 64%,并在 ssDNA/dsDNA 交叉口停滞(50~68 s)。溶液中的另一 UvrD 单体结合(68 s 时荧光强度突然增加两倍),UvrD 解旋酶开始解链 dsDNA,张力的逐渐降低象征着 dsDNA 的展开^[139]。

荧光成像与双光镊的结合进一步拓宽了单分子生物学的研究领域,现已被用于研究同源重组^[140]、翻译调节^[141]、肌球蛋白运动^[142]等过程,特别是在 DNA 机械

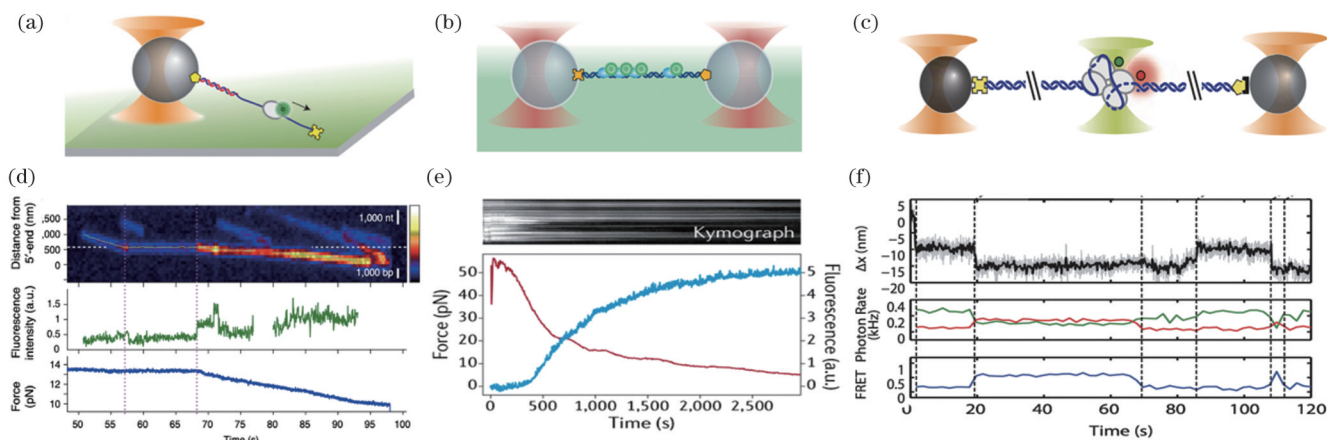


图 12 光镊与单分子荧光检测相结合。(a)单光阱结合 TIRF 显微镜。单个荧光标记的 UvrD 在 ssDNA 上易位^[139]。(b)双光镊结合宽场落射荧光装置。荧光标记 RAD51(绿色圆圈)与 DNA 结合^[143]。(c)荧光标记 SSB、SSB_f、ssDNA 包裹实验示意图^[144]。(d)UvrD 解开 dsDNA 事件。白色虚线表示 ssDNA/dsDNA 交叉口的位置^[139]。(e)保持恒定长度的 RAD51-dsDNA 复合物的波形图及荧光强度轨迹^[140]。(f)SSB 蛋白包裹 ssDNA 过程中测量的荧光和 DNA 代表性伸长轨迹^[144]

Fig. 12 Combination of optical tweezers and single-molecule fluorescence detection. (a) Single trap with total internal reflection fluorescence microscopy with which one UvrD monomer translocates along ssDNA^[139]. (b) Dual-trap and epifluorescence configuration, showing labeled RAD51 bound to DNA and fluorescence collected from dye (green circles)^[143]. (c) Schematic of fluorescently labeled SSB, SSB_f, ssDNA wrapping experiment^[144]. (d) UvrD unwinds dsDNA events. White dashed line indicates projected location of junction^[139]. (e) Kymograph and fluorescence intensity trace of RAD51-dsDNA complex, held at fixed length^[140]. (f) Representative traces of fluorescence and DNA extension measured during SSB wrapping ssDNA^[144]

性能的研究中发挥着独特的优势^[100,143-144]。van Mameren 等^[143]将双光镊与宽场落射荧光装置相结合来研究 Rad51 重组酶与 dsDNA 之间的相互作用[图 12(b)^[143]]。对 Rad51 酶进行荧光标记并利用双光镊拉伸 Rad51-dsDNA 复合物以进行力-伸长测量,同时对这一过程进行荧光成像并创建波形曲线图。波形曲线图是用来分析荧光分子运动轨迹的工具,将目标荧光分子 Rad51 重组酶在 DNA 上的运动过程成像拍摄为视频后,视频中 Rad51 的每一帧按照时间顺序堆叠成单个图像,该图像即显示了 Rad51 的运动轨迹。波形曲线图显示了力(蓝色)的增加,这是由于 Rad51 的去组装引起了 DNA 的收缩[图 12(e)^[140]]。该研究定量分析了 Rad51 核蛋白丝的机械性能并评估了 dsDNA 的弹性,阐明了 Rad51 的去组装机制^[140]。

双光镊也可以与单分子荧光共振能量转移(smFRET)相结合用于检测复合物的构象动力学^[145-146],例如研究 ssDNA 结合 SSB 蛋白包裹拓扑结构及动力学^[144,146]。大肠杆菌 SSB 蛋白能够与 DNA 复制、重组过程中形成的 ssDNA 中间产物结合,保护它们免受损伤及降解。SSB 蛋白与 ssDNA 结合时存在不同中间体包裹状态,Suksombat 等^[144]使用双光镊-共聚焦荧光显微镜同时监测 SSB 蛋白的包裹状态及其在 ssDNA 上的位置,以研究 SSB 蛋白的不同包裹状态是否影响其在 ssDNA 上的扩散能力。SSB 蛋白被标记上单个供体荧光团 Alexa Fluor 555,而 ssDNA 被受体染料 Cy5 标记[图 12(c)^[144]]。利用双光镊以恒定张力拉伸 SSB-ssDNA 复合物,并同时测量供体(绿色)

和受体(红色)的伸长和荧光的变化。力谱及 FRET 效率共同确定了 SSB 蛋白结合 ssDNA(0~20 s)、包裹 ssDNA(20~60 s)及在 ssDNA 上扩散(60~80 s)的模式及机制[图 12(f)^[144]]。这些发现加深了对 SSB 蛋白结合 ssDNA 机制的理解。

4.3 结合超分辨显微成像的双光镊技术

在过去 20 年中,超高分辨率成像的发展突破了光学显微镜衍射极限的限制,促进了荧光成像领域的蓬勃发展。其中受激发射损耗(STED)显微镜是较早被提出并通过实验实现的超分辨率显微镜技术,能够以极高的分辨率等特性观察到传统光学显微镜看不到的细节,现已广泛用于生命科学的许多领域。

光镊可以测量单分子的机械力学特性,但不能直接观察到单分子的影像。Heller 等^[147]将一维(1D)STED 整合到双光镊上,直接观察 DNA 上的蛋白质动力学。1D-STED 的空间分辨率比共聚焦显微镜的分辨率提高了 6 倍,能够以 50 nm 的分辨率可视化 DNA 上蛋白质的运动路径,同时快速 1D 光束扫描确保了高时间分辨率(<50 ms)。这些特性结合光镊技术实现了在高蛋白浓度下,在蛋白密集覆盖的 DNA 上显示单个 DNA 结合蛋白的能力。该装置主要分为三部分:双光镊、光束扫描共聚焦荧光显微镜及 1D-STED 模块。在基于“微球-噬菌体 λDNA-微球”哑铃实验装置上[图 13(c)],双光镊控制 DNA 构象及力的变化,共聚焦荧光显微镜能够在荧光标记蛋白质背景下对 DNA 上蛋白质动态成像,1D-STED 能够在蛋白密集覆盖的 DNA 上区分单个标记蛋白质和蛋白纤维。

双光镊部分中,中心波长为 1064 nm 的激光器发射激光[图 13(a),暗红色],使用倾斜镜(M1和M2)独立控制两个正交偏振光阱,利用两个 PSD 使用后焦平面干涉法测量微球位移。荧光部分中,一个激光系统提供 STED (745 nm, 紫色)和激发光束 [640 nm、543 nm 和 467 nm,使用声光可调谐滤波器(AOTF)从超连续谱(SC)中滤波得到]。光纤耦合的雪崩光电二极管(APD)收集去扫描荧光信号(虚线),通过在公共路径中放置薄膜分束器(BS),使用光电倍增管(PMT)可以选择性检测荧光信号。

该装置具有单荧光团灵敏度,能够检测 ATTO

647N、SYTOX Orange 和 EGFP 的单荧光团,同时多色成像可实现更复杂的多组生物分子研究[图 13(b)]。图 13(b)中黑白图片分别为溶液中没有或存在游离染料(ATTO 647N)的情况下,对 DNA 上的 ATTO 647N 标记蛋白质进行成像。经分析发现在 1 ms 内,可以获得约 100 nmol/L 的单分子灵敏度,比宽场成像的典型极限高 1~2 个数量级。此外,STED 能够实现亚衍射分辨率成像,共焦显微镜和 STED 显微镜获得的波形图中可以观察到单个 SYTOX Red 染料与 DNA 的结合过程,强度分布表明 STED 分辨率比共聚焦显微镜分辨率提高了 3 倍[图 13(d)]。

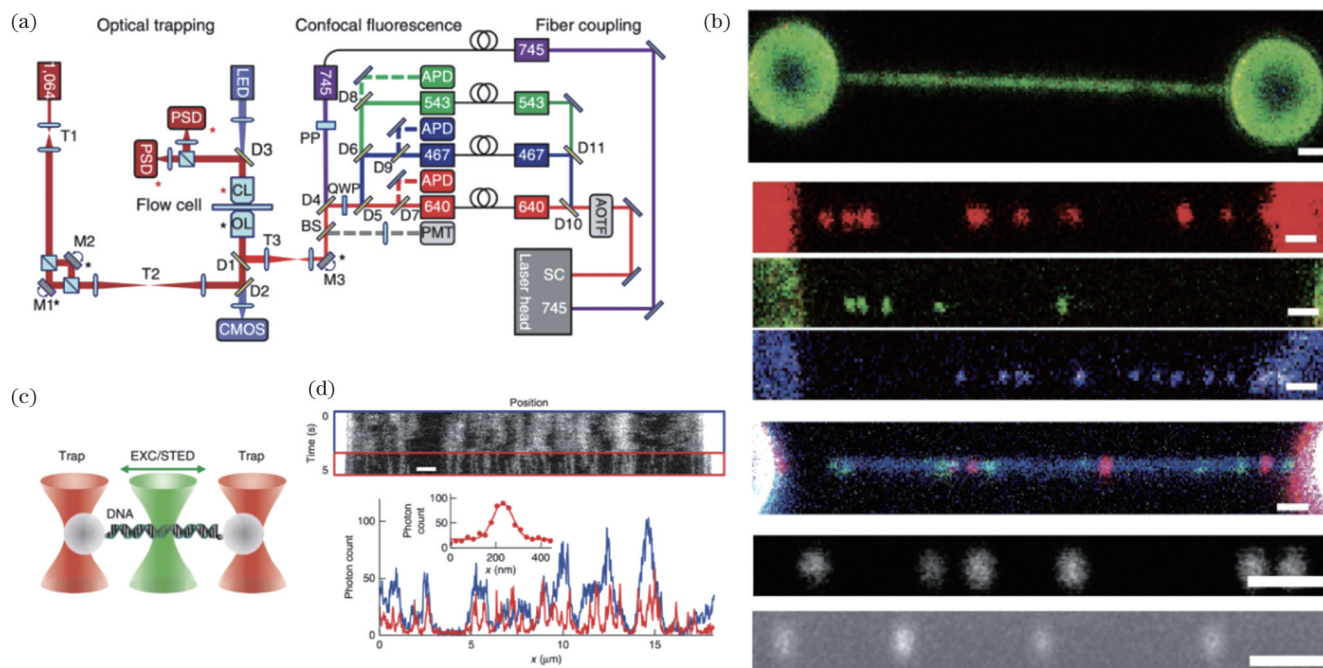


图 13 结合超分辨显微成像的光镊技术^[147]。(a) STED、共聚焦显微镜及双光镊联合实验装置的光路图。(b) 荧光标记的 λ DNA 和蛋白质的共聚焦图像。(c) 两个微球间连接 DNA, 绿色为扫描 DNA 的激发(EXC)光束和叠加的 STED 光束。(d) 光学拉伸 DNA 上 SYTOX Red 染料的 STED 成像

Fig. 13 Combination of ultra-high resolution imaging technology with tweezers^[147]. (a) Beam path in experimental setup of STED combined confocal microscope and dual-trap optical tweezers. (b) Confocal microscopy image of fluorescent labeled λ DNA and protein. (c) Two optically trapped microspheres tethered by DNA molecule, where excitation (EXC) beam (and superimposed STED beam) that is scanned over DNA is shown. (d) STED nanoscopy of SYTOX Red on optically stretched DNA

这一力-超分辨率联合方法还可以研究细胞骨架上的分子马达以及光学操纵细胞或细胞成分的超分辨率成像^[147]。Roy 等^[148]使用光镊捕获的黏性微球作为手柄从单层脂质囊泡拉出膜纳米管,证明 STED 成像-光镊可以用于测量膜张力并同时纳米管进行可视化。实验发现使用 STED 显微镜直接测量纳米管的直径与使用膜曲率弹性模型根据施加的张力计算出的管直径数据吻合。

4.4 纳米光镊的开发与应用

传统双光镊只能用于捕获微米级的微粒,实验操作时不能直接控制纳米级样品,需要依赖于微米级小球。因此纳米尺度实验需求推动了纳米光镊的开发以及纳米级物体的捕获和操控。纳米光镊能够直接捕获

和操纵单个纳米物体并进行超精确定位,在纳米技术和微生物学应用方面有着巨大的潜力^[149]。受制于光的衍射极限,往往难以将光束聚焦到纳米尺度。采用光在金属表面上激发等离子体激元产生局域电场,在激光照射下,金属表面的自由电子密度会发生集体振荡,从而产生等离子体驻波增强电场^[149-150]。通过设计特定的微纳结构使得光局限在空间上很小的区域。常见的纳米光镊有等离子体光镊(POT)。

当粒径近似及远大于激光波长时,由于散射力比梯度力增强得更快,聚焦光束中的散射力会将粒子推开,因此,传统光镊并不适用于捕获金属颗粒(粒径与波长相近)和 Mie 粒子(粒径远大于波长)等大粒径颗粒。Min 等^[151]在金属纳米结构中激发表面等离子体

激元(SPP)的基础上开发出一种用于捕获和操纵金属颗粒的手段——等离子体光镊[图 14(a)],它是基于径向极化光束激发的平坦金属膜上的高聚焦等离子体场(也称为等离子体虚拟探针^[152-154]),稳定捕获瑞利粒子、Mie 粒子甚至是较大的金属物体[如纳米线甚至微米级的复杂金属结构,图 14(c)^[151]。相较于传统光镊的光场,SPP场的中心峰值更强且坡印廷矢量(绿色箭头)几乎消失[图 14(b)^[151]],这些差异说明等离子体光镊施加在粒子上的是拉力而不是推力。与其他基于金属微盘或蝴蝶结结构的等离子体光镊^[155-157]相比,这一装置避免了制造纳米尺寸复杂结构的需求,同时促进了对 SPP 增强倏逝场产生捕获力的全面理解和优化。

对于粒径小于激光波长的情况,采用不同形态的纳米结构设计可以实现纳米级微粒的直接捕获,如金膜中的纳米孔径^[158]、双纳米孔(DNH)等特别适用于单分子捕获^[159]。Righini等^[160]对金属纳米天线进行图案化操作开发出了等离子体光镊,并首次成功地完成了对大肠杆菌的捕获。Pang等^[159]使用金膜中的双纳米孔开发出能够稳定捕获 12 nm 二氧化硅纳米球的等离子体光镊,使得捕获小病毒颗粒成为现实。该实验

还采用双纳米孔捕获半径为 3.4 nm 的单个牛血清白蛋白(BSA)分子^[161]。双纳米孔由聚焦离子束在 100 nm 厚的金膜上刻蚀而成,其两个尖头相隔 15 nm [图 14(e)^[161]]。金膜下的微孔填充有质量分数 1% 的 BSA 溶液,该微孔由聚二甲基硅氧烷(PDMS)垫片和厚玻璃盖玻片组成[图 14(d)^[161]]。等离子体光阱在微孔内产生并可用于捕获 BSA 分子,光作用下 BSA 分子在折叠和未折叠状态之间跃迁,此时光功率会在两个不同的水平之间变化[图 14(f)^[161]]。这一工作证明了双纳米孔光镊可以很容易地检测到单个蛋白质,并可以高分辨率追踪蛋白长时间的变化状态。此外,利用双纳米孔光镊捕获单个 10 bp DNA 发夹并对其去折叠,实时研究了 p53 蛋白与 DNA 发夹相互作用的机理[图 14(g)^[162]]。这一研究表明双纳米孔光镊可以对蛋白质-DNA 相互作用进行超灵敏的检测和量化。双纳米孔光镊同样可以在无标记、无溶液环境中测量单个人血清白蛋白与甲苯磺丁脲和苯妥英的结合动力学^[163]。现阶段纳米光镊被认为在驱动和控制整个芯片实验设备及量子信息处理领域具有潜在的应用价值^[149]。

此外,Chen等^[164]搭建了可用于捕获单个 DNA 分

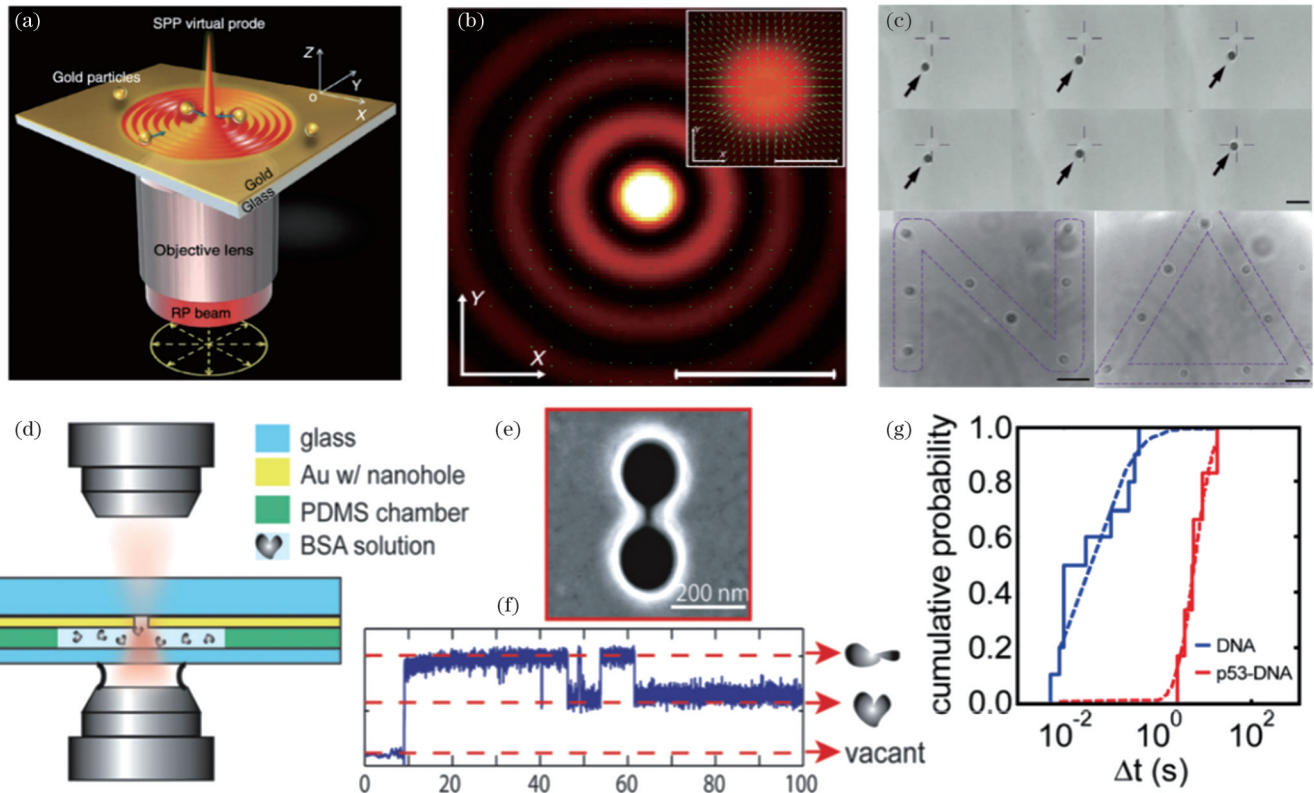


图 14 纳米等离子体光镊。(a) SPP 虚拟探针捕获金属颗粒示意图^[151]。(b) 等离子体光镊在水平面中电场强度和坡印廷矢量的分布^[151]。(c) 等离子体光镊捕获金颗粒^[151]。(d) 双纳米孔光镊实验示意图^[161]。(e) 双纳米孔的扫描电子显微镜图像^[161]。(f) 通过双纳米孔传输的不同状态 BSA 分子光功率的时间变化图^[161]。(g) p53-DNA 复合物和单独 DNA 的解压时间 Δt 累积概率的比较^[162]

Fig. 14 Nano-plasmonic tweezers. (a) Schematic of trapping metallic particles by SPP virtual probe^[151]. (b) Distribution of electric field intensity and Poynting vector in horizontal plane of focused plasmonic tweezers^[151]. (c) Gold particles trapped by focused plasmonic tweezers^[151]. (d) Schematic of double-nanohole optical tweezers^[161]. (e) SEM image of double-nanohole^[161]. (f) Time track of BSA molecular optical power in different states transmitted through double-nanohole^[161]. (g) Comparison of cumulative probability of unzipping time Δt for p53-DNA complex and DNA alone^[162]

子的双光镊体系,同时借助等离子体金纳米颗粒(GNP)团簇对溶液中单个DNA分子进行光学捕获。进而,通过跟踪GNP的动态运动来研究次分辨率的颗粒间作用力,为新兴的纳米生物医学领域提供了技术支持。然而,等离子体光镊只能捕获其附近的纳米粒子,捕获及传输效率相较于传统光镊低。因此在纳米光镊的基础上开发出一种具有传统光镊灵活性的等离子体光镊装置是未来发展的趋势。

5 总结与展望

自1986年诞生以来,传统光镊就被逐步应用于单细胞、单分子生物物理研究。纳米光镊的开发与应用推动了纳米技术及微生物领域的发展,实现了单个纳米级微粒的直接操控与检测。全息光镊、光纤光镊、飞秒光镊等技术不断更新发展,将研究范围从生物单分子扩展到多分子及细胞水平。光镊也被用于捕获和操控活体细胞,在复杂生理条件下研究单细胞的生理特性,如清除小鼠血管中堵塞的红细胞及透明斑马鱼胚胎纳米颗粒和细菌注入的微操作^[165-166]。发展和利用双光镊对生物活体进行非侵入性微操作并探究细胞间及纳米药物与细胞的相互作用是未来发展的方向之一。高精度、高信噪比和高稳定性的双光镊在单分子研究中备受欢迎。双光镊已经逐渐从物理、工程研究阶段转化为生物学家工具箱中研究单分子动力学行为的一个重要而精巧的工具。在单分子科学中双光镊被用来研究DNA弹性特性、蛋白质折叠、DNA-蛋白相互作用及分子马达机械化学性质等。在这些应用中,双光镊提供了高分辨率的数据,揭示了纳米级精度的运动轨迹,有助于更好地理解生物大分子的动力学。双光镊与其他领域技术的结合及其捕获精度的提升拓宽了其在生物学研究中的应用范围。双光镊与荧光技术、拉曼光谱等技术的结合能够在捕获和测量力学信号的同时得到成像或光谱变化信息,促使了光镊在单分子或单细胞水平的应用和发展。

双光镊在开发及生物应用中也面临着许多挑战。相较于TIRF、磁镊等同时获得数百个分子数据量的单分子技术,光镊的吞吐量较低,每次只能收集一个分子的数据。如何提高吞吐量是光镊设备亟需优化的方向,一方面可以通过自动化程序智能捕获和筛选,另一方面可以同时使用多个光阱捕获筛选。然而这些捕获方法需要在维持光镊高精度捕获的前提下实现,是光镊技术发展的一大难点。相比传统系综实验手段,单分子光镊不仅能研究单分子的动态行为,还能对分子施加不同大小的张力,是分子生物学向活体迈进的重要一步。光镊技术虽被用于捕获体内活细胞,但仍面临捕获深度和捕获效率等诸多挑战:(1)对捕获光的影响。捕获激光本身波前发生畸变,降低光束空间聚焦能力,光强严重衰减,并由此带来强的热效应。(2)对单细胞、单分子实验的影响。与在微流道中的标准实验相比,活体内单细胞、单

分子实验往往会受复杂流体流动以及多组分的干扰。然而,随着结构光光镊、光纤光镊以及复杂多物理场技术的不断发展,活体单分子实验仍有无限可能。

国内利用光镊研究单分子起步也比较早,但一直发展缓慢。光镊实验涉及到仪器的搭建与使用、生物样品的制备、数据分析与处理等,需要光学、机械力学、计算机软件和生物化学等多学科交叉和协同合作,对研究人员的专业技术背景要求较高。近年来,有国外公司推出多款光镊设备用于单分子实验,在一定程度上缓解了单分子实验用户的迫切实验需求并推动了单分子科学的发展,应用于基因编辑^[167-169]、生物分子凝聚物微观流变学^[170-171]、DNA损伤修复等研究。国家蛋白质科学研究(上海)设施依托大科学装置,自主研发出高精度激光双光镊系统,并已成功对国内用户开放用于生物单分子研究。该设备采用差分检测减少空气扰动的影响,同时采用光纤传输激光、设置恒温恒湿环境提高设备稳定性。光镊相关的应用仍需要科研及产业界共同努力向纵深推进。国家也越来越重视科研仪器的自主研发,预计国内将在光镊仪器研制及相关的单分子研究中打开新的局面,在自主研发的仪器上做出更多的单分子成果。

参 考 文 献

- [1] Ashkin A. Acceleration and trapping of particles by radiation pressure[J]. *Physical Review Letters*, 1970, 24(4): 156-159.
- [2] Ashkin A, Dziedzic J M, Bjorkholm J E, et al. Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles[J]. *Optics Letters*, 1986, 11(5): 288-290.
- [3] Dufresne E R, Grier D G. Optical tweezer arrays and optical substrates created with diffractive optics[J]. *The Review of Scientific Instruments*, 1998, 69(5): 1974-1977.
- [4] Zhang Y Q, Min C J, Dou X J, et al. Plasmonic tweezers: for nanoscale optical trapping and beyond[J]. *Light: Science & Applications*, 2021, 10(1): 1-41.
- [5] Zhao X T, Zhao N, Shi Y, et al. Optical fiber tweezers: a versatile tool for optical trapping and manipulation[J]. *Micromachines*, 2020, 11(2): 114.
- [6] Lin L H, Peng X L, Wei X L, et al. Thermophoretic tweezers for low-power and versatile manipulation of biological cells[J]. *ACS Nano*, 2017, 11(3): 3147-3154.
- [7] Ren Y X, Zeng X L, Zhou L M, et al. Photonic nanojet mediated backaction of dielectric microparticles[J]. *ACS Photonics*, 2020, 7(6): 1483-1490.
- [8] Ren Y X, Yip G G K, Zhou L M, et al. Hysteresis and balance of backaction force on dielectric particles photothermally mediated by photonic nanojet[J]. *Nanophotonics*, 2022, 11(18): 4231-4244.
- [9] Ashkin A, Dziedzic J M. Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria[J]. *Science*, 1987, 235(4795): 1517-1520.
- [10] Fazal F M, Block S M. Optical tweezers study life under tension[J]. *Nature Photonics*, 2011, 5(6): 318-321.
- [11] Neuman K C, Block S M. Optical trapping[J]. *The Review of Scientific Instruments*, 2004, 75(9): 2787-2809.
- [12] Bustamante C J, Chemla Y R, Liu S, et al. Optical tweezers in single-molecule biophysics[J]. *Nature Reviews Methods Primers*, 2021, 1(1): 29.
- [13] Shaevitz J W, Abbondanzieri E A, Landick R, et al. Backtracking by single RNA polymerase molecules observed at near-base-pair resolution[J]. *Nature*, 2003, 426(6967): 684-687.

- [14] Galbur E A, Grill S W, Wiedmann A, et al. Backtracking determines the force sensitivity of RNAP II in a factor-dependent manner[J]. *Nature*, 2007, 446(7137): 820-823.
- [15] Hoekstra T P, Depken M, Lin S N, et al. Switching between exonucleolysis and replication by T7 DNA polymerase ensures high fidelity[J]. *Biophysical Journal*, 2017, 112(4): 575-583.
- [16] Fitz V, Shin J, Ehrlich C, et al. Nucleosomal arrangement affects single-molecule transcription dynamics[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(45): 12733-12738.
- [17] Bustamante C, Alexander L, Maciuba K, et al. Single-molecule studies of protein folding with optical tweezers[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2020, 89: 443-470.
- [18] Wu W Q, Zhu X H, Song C P. Single-molecule technique: a revolutionary approach to exploring fundamental questions in plant science[J]. *The New Phytologist*, 2019, 223(2): 508-510.
- [19] Polimeno P, Magazzù A, Iati M A, et al. Optical tweezers and their applications[J]. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*, 2018, 218: 131-150.
- [20] van Mameren J, Wuite G J L, Heller I. Introduction to optical tweezers: background, system designs, and commercial solutions [J]. *Methods in Molecular Biology*, 2011, 783: 1-20.
- [21] Ashkin A. Forces of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime[J]. *Biophysical Journal*, 1992, 61(2): 569-582.
- [22] Chaumet P C, Nieto-Vesperinas M. Time-averaged total force on a dipolar sphere in an electromagnetic field[J]. *Optics Letters*, 2000, 25(15): 1065-1067.
- [23] Gordon J P. Radiation forces and momenta in dielectric media[J]. *Physical Review A*, 1973, 8(1): 14-21.
- [24] Arias-González J R, Nieto-Vesperinas M. Optical forces on small particles: attractive and repulsive nature and plasmon-resonance conditions[J]. *Journal of the Optical Society of America A*, 2003, 20(7): 1201-1209.
- [25] Ladavac K, Kasza K, Grier D G. Sorting mesoscopic objects with periodic potential landscapes: optical fractionation[J]. *Physical Review E*, 2004, 70(1): 010901(R).
- [26] Draine B T, Goodman J. Beyond Clausius-Mossotti wave propagation on a polarizable point lattice and the discrete dipole approximation[J]. *The Astrophysical Journal Letters*, 1993, 405: 685-697.
- [27] Gao D L, Ding W Q, Nieto-Vesperinas M, et al. Optical manipulation from the microscale to the nanoscale: fundamentals, advances and prospects[J]. *Light: Science & Applications*, 2017, 6(9): e17039.
- [28] Albaladejo S, Marqués M I, Laroche M, et al. Scattering forces from the curl of the spin angular momentum of a light field[J]. *Physical Review Letters*, 2009, 102(11): 113602.
- [29] Ruffner D B, Grier D G. Comment on "Scattering forces from the curl of the spin angular momentum of a light field" [J]. *Physical Review Letters*, 2013, 111(5): 059301.
- [30] Yee K E. Numerical solution of initial boundary value problems involving Maxwell's equations in isotropic media[J]. *IEEE Transactions on Antennas and Propagation*, 1966, 14(3): 302-307.
- [31] Levy S. Structural analysis and influence coefficients for delta wings [J]. *Journal of the Aeronautical Sciences*, 1953, 20(7): 449-454.
- [32] Courant R. Variational methods for the solution of problems of equilibrium and vibrations[J]. *Bulletin of the American Mathematical Society*, 2012, 49(1): 1-23.
- [33] Grehan G, Maheu B, Gouesbet G. Scattering of laser beams by Mie scatter centers: numerical results using a localized approximation[J]. *Applied Optics*, 1986, 25(19): 3539-3548.
- [34] Li J L W, Ong W L, Zheng K H R. Anisotropic scattering effects of a gyrotropic sphere characterized using the T-matrix method[J]. *Physical Review E*, 2012, 85(3): 036601.
- [35] Bareil P B, Sheng Y L. Modeling highly focused laser beam in optical tweezers with the vector Gaussian beam in the T-matrix method[J]. *Journal of the Optical Society of America A*, 2013, 30(1): 1-6.
- [36] Waterman P C. Matrix formulation of electromagnetic scattering [J]. *Proceedings of the IEEE*, 1965, 53(8): 805-812.
- [37] Gouesbet G. T-matrix formulation and generalized Lorenz-Mie theories in spherical coordinates[J]. *Optics Communications*, 2010, 283(4): 517-521.
- [38] Chew W C. *Waves and fields in inhomogeneous media*[M]. New York: IEEE Press, 1999.
- [39] Jackson J D. *Classical electrodynamics*[M]. New York: Wiley, 1998.
- [40] Chemla Y R. High-resolution, hybrid optical trapping methods, and their application to nucleic acid processing proteins[J]. *Biopolymers*, 2016, 105(10): 704-714.
- [41] Yehoshua S, Pollari R, Milstein J. Axial optical traps: a new direction for optical tweezers[J]. *Biophysical Journal*, 2015, 108(12): 2759-2766.
- [42] Le T T, Gao X, Park S H, et al. Synergistic coordination of chromatin torsional mechanics and topoisomerase activity[J]. *Cell*, 2019, 179(3): 619-631.
- [43] Heller I, Laurens N, Vorselen D, et al. Versatile quadruple-trap optical tweezers for dual DNA experiments[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2017, 1486: 257-272.
- [44] Moffitt J R, Chemla Y R, Izhaky D, et al. Differential detection of dual traps improves the spatial resolution of optical tweezers[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(24): 9006-9011.
- [45] Heller I, Hoekstra T P, King G A, et al. Optical tweezers analysis of DNA-protein complexes[J]. *Chemical Reviews*, 2014, 114(6): 3087-3119.
- [46] La Porta A, Wang M D. Optical torque wrench: angular trapping, rotation, and torque detection of quartz microparticles[J]. *Physical Review Letters*, 2004, 92(19): 190801.
- [47] Deufel C, Forth S, Simmons C R, et al. Nanofabricated quartz cylinders for angular trapping: DNA supercoiling torque detection [J]. *Nature Methods*, 2007, 4(3): 223-225.
- [48] Yang Y J, Ren Y X, Chen M Z, et al. Optical trapping with structured light: a review[J]. *Advanced Photonics*, 2021, 3(3): 034001.
- [49] Svoboda K, Schmidt C F, Schnapp B J, et al. Direct observation of kinesin stepping by optical trapping interferometry[J]. *Nature*, 1993, 365(6448): 721-727.
- [50] Avellaneda M J, Franke K B, Sunderlikova V, et al. Processive extrusion of polypeptide loops by a Hsp100 disaggregase[J]. *Nature*, 2020, 578(7794): 317-320.
- [51] Sparkes I, White R R, Coles B, et al. Using optical tweezers combined with total internal reflection microscopy to study interactions between the ER and Golgi in plant cells[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2018, 1691: 167-178.
- [52] Ngo T M, Zhang Q C, Zhou R B, et al. Asymmetric unwrapping of nucleosomes under tension directed by DNA local flexibility[J]. *Cell*, 2015, 160(6): 1135-1144.
- [53] Sirinakis G, Ren Y X, Gao Y, et al. Combined versatile high-resolution optical tweezers and single-molecule fluorescence microscopy[J]. *The Review of Scientific Instruments*, 2012, 83(9): 093708.
- [54] Gittes F, Schmidt C F. Interference model for back-focal-plane displacement detection in optical tweezers[J]. *Optics Letters*, 1998, 23(1): 7-9.
- [55] Bustamante C, Chemla Y R, Moffitt J R. High-resolution dual-trap optical tweezers with differential detection: managing environmental noise[J]. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2009, 2009(10): 73.
- [56] Bustamante C, Chemla Y R, Moffitt J R. High-resolution dual-trap optical tweezers with differential detection: managing environmental noise[J]. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2009, 2009(10): 72.
- [57] Li P T X, Collin D, Smith S B, et al. Probing the mechanical

- folding kinetics of TAR RNA by hopping, force-jump, and force-ramp methods[J]. *Biophysical Journal*, 2006, 90(1): 250-260.
- [58] Bustamante C, Smith S B, Liphardt J, et al. Single-molecule studies of DNA mechanics[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2000, 10(3): 279-285.
- [59] Greenleaf W J, Woodside M T, Abbondanzieri E A, et al. Passive all-optical force clamp for high-resolution laser trapping[J]. *Physical Review Letters*, 2005, 95(20): 208102.
- [60] Ishizuka T, Saisu H, Odani S, et al. Synaphin: a protein associated with the docking/fusion complex in presynaptic terminals [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1995, 213(3): 1107-1114.
- [61] 周丹丹, 任煜轩, 刘伟伟, 等. 时间飞行法测量光阱刚度的实验研究[J]. *物理学报*, 2012, 61(22): 228702.
- Zhou D D, Ren Y X, Liu W W, et al. Calibration of optical tweezers using time of flight method[J]. *Acta Physica Sinica*, 2012, 61(22): 228702.
- [62] Berg-Sørensen K, Flyvbjerg H. Power spectrum analysis for optical tweezers[J]. *The Review of Scientific Instruments*, 2004, 75(3): 594-612.
- [63] Ashkin A. The study of cells by optical trapping and manipulation of living cells using infrared laser beams[J]. *ASGSA Bulletin*, 1991, 4(2): 133-146.
- [64] Marko J F, Siggia E D. Stretching DNA[J]. *Macromolecules*, 1995, 28(26): 8759-8770.
- [65] Odijk T. Stiff chains and filaments under tension[J]. *Macromolecules*, 1995, 28(20): 7016-7018.
- [66] Wang M D, Yin H, Landick R, et al. Stretching DNA with optical tweezers[J]. *Biophysical Journal*, 1997, 72(3): 1335-1346.
- [67] Smith S B, Cui Y, Bustamante C. Overstretching B-DNA: the elastic response of individual double-stranded and single-stranded DNA molecules[J]. *Science*, 1996, 271(5250): 795-799.
- [68] Ahsan A, Rudnick J, Bruinsma R. Elasticity theory of the B-DNA to S-DNA transition[J]. *Biophysical Journal*, 1998, 74(1): 132-137.
- [69] Rief M, Clausen-Schaumann H, Gaub H E. Sequence-dependent mechanics of single DNA molecules[J]. *Nature Structural Biology*, 1999, 6(4): 346-349.
- [70] Hegner M, Smith S B, Bustamante C. Polymerization and mechanical properties of single RecA-DNA filaments[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(18): 10109-10114.
- [71] Hartl F U. Protein misfolding diseases[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2017, 86: 21-26.
- [72] Cecconi C, Shank E A, Bustamante C, et al. Direct observation of the three-state folding of a single protein molecule[J]. *Science*, 2005, 309(5743): 2057-2060.
- [73] Yu H, Dee D R, Liu X, et al. Protein misfolding occurs by slow diffusion across multiple barriers in a rough energy landscape[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(27): 8308-8313.
- [74] Yu H, Liu X, Neupane K, et al. Direct observation of multiple misfolding pathways in a single prion protein molecule[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(14): 5283-5288.
- [75] Johnson S M, Wiseman R L, Sekijima Y, et al. Native state kinetic stabilization as a strategy to ameliorate protein misfolding diseases: a focus on the transthyretin amyloidoses[J]. *Accounts of Chemical Research*, 2005, 38(12): 911-921.
- [76] Post K, Pitschke M, Schäfer O, et al. Rapid acquisition of beta-sheet structure in the prion protein prior to multimer formation[J]. *Biological Chemistry*, 1998, 379(11): 1307-1317.
- [77] Tompa P, Tusnády G E, Friedrich P, et al. The role of dimerization in prion replication[J]. *Biophysical Journal*, 2002, 82(4): 1711-1718.
- [78] Yu H, Gupta A N, Liu X, et al. Energy landscape analysis of native folding of the prion protein yields the diffusion constant, transition path time, and rates[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(36): 14452-14457.
- [79] Neupane K, Ritchie D B, Yu H, et al. Transition path times for nucleic acid folding determined from energy-landscape analysis of single-molecule trajectories[J]. *Physical Review Letters*, 2012, 109(6): 068102.
- [80] Kaiser C M, Goldman D H, Chodera J D, et al. The ribosome modulates nascent protein folding[J]. *Science*, 2011, 334(6063): 1723-1727.
- [81] Maciuba K, Zhang F, Kaiser C M. Facile tethering of stable and unstable proteins for optical tweezers experiments[J]. *Biophysical Journal*, 2021, 120(13): 2691-2700.
- [82] Liu K X, Maciuba K, Kaiser C M. The ribosome cooperates with a chaperone to guide multi-domain protein folding[J]. *Molecular Cell*, 2019, 74(2): 310-319.
- [83] Liu K X, Rehfus J E, Mattson E, et al. The ribosome destabilizes native and non-native structures in a nascent multidomain protein [J]. *Protein Science: a Publication of the Protein Society*, 2017, 26(7): 1439-1451.
- [84] Liu K X, Chen X Q, Kaiser C M. Energetic dependencies dictate folding mechanism in a complex protein[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116(51): 25641-25648.
- [85] Cabrita L D, Cassaignau A M E, Launay H M M, et al. A structural ensemble of a ribosome-nascent chain complex during cotranslational protein folding[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2016, 23(4): 278-285.
- [86] Knight A M, Culviner P H, Kurt-Yilmaz N, et al. Electrostatic effect of the ribosomal surface on nascent polypeptide dynamics[J]. *ACS Chemical Biology*, 2013, 8(6): 1195-1204.
- [87] Samelson A J, Jensen M K, Soto R A, et al. Quantitative determination of ribosome nascent chain stability[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(47): 13402-13407.
- [88] Abbondanzieri E A, Greenleaf W J, Shaevitz J W, et al. Direct observation of base-pair stepping by RNA polymerase[J]. *Nature*, 2005, 438(7067): 460-465.
- [89] Gabizon R, Lee A, Vahedian-Movahed H, et al. Pause sequences facilitate entry into long-lived paused states by reducing RNA polymerase transcription rates[J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 1-10.
- [90] Adelman K, La Porta A, Santangelo T J, et al. Single molecule analysis of RNA polymerase elongation reveals uniform kinetic behavior[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(21): 13538-13543.
- [91] Bintu L, Ishibashi T, Dangkulwanich M, et al. Nucleosomal elements that control the topography of the barrier to transcription [J]. *Cell*, 2012, 151(4): 738-749.
- [92] Lisica A, Engel C, Jahnel M, et al. Mechanisms of backtrack recovery by RNA polymerases I and II[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(11): 2946-2951.
- [93] Mohapatra S, Lin C T, Feng X A, et al. Single-molecule analysis and engineering of DNA motors[J]. *Chemical Reviews*, 2020, 120(1): 36-78.
- [94] Kolomeisky A B. Motor proteins and molecular motors: how to operate machines at the nanoscale[J]. *Journal of Physics. Condensed Matter*, 2013, 25(46): 463101.
- [95] Dillingham M S. Superfamily I helicases as modular components of DNA-processing machines[J]. *Biochemical Society Transactions*, 2011, 39(2): 413-423.
- [96] Lohman T M, Chao K, Green J M, et al. Large-scale purification and characterization of the *Escherichia coli* Rep gene product[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1989, 264(17): 10139-10147.
- [97] Korolev S, Hsieh J, Gauss G H, et al. Major domain swiveling revealed by the crystal structures of complexes of *E. coli* Rep helicase bound to single-stranded DNA and ADP[J]. *Cell*, 1997, 90(4): 635-647.

- [98] Chao K, Lohman T M. DNA-induced dimerization of the *Escherichia coli* Rep helicase[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1991, 221(4): 1165-1181.
- [99] Bjornson K P, Moore K J, Lohman T M. Kinetic mechanism of DNA binding and DNA-induced dimerization of the *Escherichia coli* Rep helicase[J]. *Biochemistry*, 1996, 35(7): 2268-2282.
- [100] Comstock M J, Whitley K D, Jia H F, et al. Direct observation of structure-function relationship in a nucleic acid-processing enzyme [J]. *Science*, 2015, 348(6232): 352-354.
- [101] Arslan S, Khafizov R, Thomas C D, et al. Engineering of a superhelicase through conformational control[J]. *Science*, 2015, 348(6232): 344-347.
- [102] Brendza K M, Cheng W, Fischer C J, et al. Autoinhibition of *Escherichia coli* Rep monomer helicase activity by its 2B subdomain[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(29): 10076-10081.
- [103] Makurath M A, Whitley K D, Nguyen B, et al. Regulation of Rep helicase unwinding by an auto-inhibitory subdomain[J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(5): 2523-2532.
- [104] Dessinges M N, Lionnet T, Xi X G, et al. Single-molecule assay reveals strand switching and enhanced processivity of UvrD[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(17): 6439-6444.
- [105] Liu S X, Chistol G, Hetherington C, et al. A viral packaging motor varies its DNA rotation and step size to preserve subunit coordination as the capsid fills[J]. *Cell*, 2014, 157(3): 702-713.
- [106] Bustamante C, Chemla Y R, Forde N R, et al. Mechanical processes in biochemistry[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2004, 73: 705-748.
- [107] Iyer L M, Leipe D D, Koonin E V, et al. Evolutionary history and higher order classification of AAA+ ATPases[J]. *Journal of Structural Biology*, 2004, 146(1/2): 11-31.
- [108] Erzberger J P, Berger J M. Evolutionary relationships and structural mechanisms of AAA+ proteins[J]. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 2006, 35: 93-114.
- [109] Moffitt J R, Chemla Y R, Athavan K, et al. Intersubunit coordination in a homomeric ring ATPase[J]. *Nature*, 2009, 457(7228): 446-450.
- [110] Chistol G, Liu S X, Hetherington C, et al. High degree of coordination and division of labor among subunits in a homomeric ring ATPase[J]. *Cell*, 2012, 151(5): 1017-1028.
- [111] Hao T R, Feng N, Gong F, et al. Complexin-1 regulated assembly of single neuronal SNARE complex revealed by single-molecule optical tweezers[J]. *Communications Biology*, 2023, 6(1): 1-12.
- [112] Raman C V, Krishnan K S. A new type of secondary radiation[J]. *Nature*, 1928, 121(3048): 501-502.
- [113] Canetta E. Current and future advancements of Raman spectroscopy techniques in cancer nanomedicine[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(23): 13141.
- [114] Lambert P J, Whitman A G, Dyson O F, et al. Raman spectroscopy: the gateway into tomorrow's virology[J]. *Virology Journal*, 2006, 3(1): 51.
- [115] Kneipp K, Kneipp H, Corio P, et al. Surface-enhanced and normal Stokes and anti-Stokes Raman spectroscopy of single-walled carbon nanotubes[J]. *Physical Review Letters*, 2000, 84(15): 3470-3473.
- [116] Li Y P, Shen B L, Li S W, et al. Review of stimulated Raman scattering microscopy techniques and applications in the biosciences [J]. *Advanced Biology*, 2021, 5(1): e2000184.
- [117] Gala de Pablo J, Lindley M, Hiramatsu K, et al. High-throughput Raman flow cytometry and beyond[J]. *Accounts of Chemical Research*, 2021, 54(9): 2132-2143.
- [118] Ajito K, Torimitsu K. Single nanoparticle trapping using a Raman tweezers microscope[J]. *Applied Spectroscopy*, 2002, 56(4): 541-544.
- [119] Xie C G, Dinno M A, Li Y Q. Near-infrared Raman spectroscopy of single optically trapped biological cells[J]. *Optics Letters*, 2002, 27(4): 249-251.
- [120] Kong L B, Zhang P F, Setlow P, et al. Characterization of bacterial spore germination using integrated phase contrast microscopy, Raman spectroscopy, and optical tweezers[J]. *Analytical Chemistry*, 2010, 82(9): 3840-3847.
- [121] Lankers M, Popp J, Kiefer W. Raman and fluorescence spectra of single optically trapped microdroplets in emulsions[J]. *Applied Spectroscopy*, 1994, 48(9): 1166-1168.
- [122] Creely C, Volpe G, Singh G, et al. Raman imaging of floating cells[J]. *Optics Express*, 2005, 13(16): 6105-6110.
- [123] Singh Y, Chowdhury A, Dasgupta R, et al. The effects of short term hyperglycemia on human red blood cells studied using Raman spectroscopy and optical trap[J]. *European Biophysics Journal*, 2021, 50(6): 867-876.
- [124] Singh Y, Chowdhury A, Mukherjee C, et al. Simultaneous photoreduction and Raman spectroscopy of red blood cells to investigate the effects of organophosphate exposure[J]. *Journal of Biophotonics*, 2019, 12(5): e201800246.
- [125] Moritz T J, Taylor D S, Krol D M, et al. Detection of doxorubicin-induced apoptosis of leukemic T-lymphocytes by laser tweezers Raman spectroscopy[J]. *Biomedical Optics Express*, 2010, 1(4): 1138-1147.
- [126] Ojeda J F, Xie C G, Li Y Q, et al. Chromosomal analysis and identification based on optical tweezers and Raman spectroscopy[J]. *Optics Express*, 2006, 14(12): 5385-5393.
- [127] Tang H Y, Yao H L, Wang G W, et al. NIR Raman spectroscopic investigation of single mitochondria trapped by optical tweezers[J]. *Optics Express*, 2007, 15(20): 12708-12716.
- [128] Ling L, Li Y Q. Measurement of Raman spectra of single airborne absorbing particles trapped by a single laser beam[J]. *Optics Letters*, 2013, 38(4): 416-418.
- [129] Lin M M, Ou H S, Zhang P, et al. Laser tweezers Raman spectroscopy combined with machine learning for diagnosis of Alzheimer's disease[J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2022, 280: 121542.
- [130] Tian X C, Chen C, Chen C, et al. Application of Raman spectroscopy technology based on deep learning algorithm in the rapid diagnosis of glioma[J]. *Journal of Raman Spectroscopy*, 2022, 53(4): 735-745.
- [131] Qiu S F, Li M M, Liu J, et al. Study on the chemodrug-induced effect in nasopharyngeal carcinoma cells using laser tweezer Raman spectroscopy[J]. *Biomedical Optics Express*, 2020, 11(4): 1819-1833.
- [132] Li Y, Wang G W, Yao H L, et al. Dual-trap Raman tweezers for probing dynamics and heterogeneity of interacting microbial cells [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2010, 15(6): 067008.
- [133] Zhang P F, Kong L B, Setlow P, et al. Characterization of wet-heat inactivation of single spores of bacillus species by dual-trap Raman spectroscopy and elastic light scattering[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(6): 1796-1805.
- [134] Rao S, Bálint Š, Cossins B, et al. Raman study of mechanically induced oxygenation state transition of red blood cells using optical tweezers[J]. *Biophysical Journal*, 2009, 96(1): 209-216.
- [135] Creely C M, Singh G P, Petrov D. Dual wavelength optical tweezers for confocal Raman spectroscopy[J]. *Optics Communications*, 2005, 245(1/2/3/4/5/6): 465-470.
- [136] Rusciano G. Experimental analysis of Hb oxy-deoxy transition in single optically stretched red blood cells[J]. *Physica Medica*, 2010, 26(4): 233-239.
- [137] Comstock M J, Ha T, Chemla Y R. Ultrahigh-resolution optical trap with single-fluorophore sensitivity[J]. *Nature Methods*, 2011, 8(4): 335-340.
- [138] Whitley K D, Comstock M J, Chemla Y R. High-resolution "fleezers": dual-trap optical tweezers combined with single-molecule fluorescence detection[M]//*Optical tweezers*. New York: Humana Press, 2017: 183-256.
- [139] Lee K S, Balci H, Jia H F, et al. Direct imaging of single UvrD helicase dynamics on long single-stranded DNA[J]. *Nature*

- Communications, 2013, 4(1): 1-9.
- [140] van Mameren J, Modesti M, Kanaar R, et al. Counting RAD51 proteins disassembling from nucleoprotein filaments under tension [J]. *Nature*, 2009, 457(7230): 745-748.
- [141] Desai V P, Frank F, Lee A, et al. Co-temporal force and fluorescence measurements reveal a ribosomal gear shift mechanism of translation regulation by structured mRNAs[J]. *Molecular Cell*, 2019, 75(5): 1007-1019.
- [142] Ishijima A, Kojima H, Funatsu T, et al. Simultaneous observation of individual ATPase and mechanical events by a single myosin molecule during interaction with actin[J]. *Cell*, 1998, 92(2): 161-171.
- [143] van Mameren J, Modesti M, Kanaar R, et al. Dissecting elastic heterogeneity along DNA molecules coated partly with Rad51 using concurrent fluorescence microscopy and optical tweezers[J]. *Biophysical Journal*, 2006, 91(8): L78-L80.
- [144] Suksombat S, Khafizov R, Kozlov A G, et al. Structural dynamics of *E. coli* single-stranded DNA binding protein reveal DNA wrapping and unwrapping pathways[J]. *eLife*, 2015, 4: e08193.
- [145] Hohng S, Zhou R B, Nahas M K, et al. Fluorescence-force spectroscopy maps two-dimensional reaction landscape of the holliday junction[J]. *Science*, 2007, 318(5848): 279-283.
- [146] Zhou R B, Kozlov A, Roy R, et al. SSB functions as a sliding platform that migrates on DNA via reptation[J]. *Cell*, 2011, 146(2): 222-232.
- [147] Heller I, Sitters G, Broekmans O D, et al. STED nanoscopy combined with optical tweezers reveals protein dynamics on densely covered DNA[J]. *Nature Methods*, 2013, 10(9): 910-916.
- [148] Roy D, Steinkühler J, Zhao Z L, et al. Mechanical tension of biomembranes can be measured by super resolution (STED) microscopy of force-induced nanotubes[J]. *Nano Letters*, 2020, 20(5): 3185-3191.
- [149] Kolbow J D, Lindquist N C, Ertsgaard C T, et al. Nano-optical tweezers: methods and applications for trapping single molecules and nanoparticles[J]. *Chemphyschem*, 2021, 22(14): 1409-1420.
- [150] Choudhary D, Mossa A, Jadhav M, et al. Bio-molecular applications of recent developments in optical tweezers[J]. *Biomolecules*, 2019, 9(1): 23.
- [151] Min C J, Shen Z, Shen J F, et al. Focused plasmonic trapping of metallic particles[J]. *Nature Communications*, 2013, 4(1): 1-7.
- [152] Moh K J, Yuan X C, Bu J, et al. Surface plasmon resonance imaging of cell-substrate contacts with radially polarized beams[J]. *Optics Express*, 2008, 16(25): 20734-20741.
- [153] Moh K J, Yuan X C, Bu J, et al. Radial polarization induced surface plasmon virtual probe for two-photon fluorescence microscopy[J]. *Optics Letters*, 2009, 34(7): 971-973.
- [154] Zhan Q W. Evanescent Bessel beam generation via surface plasmon resonance excitation by a radially polarized beam[J]. *Optics Letters*, 2006, 31(11): 1726-1728.
- [155] Zhang W H, Huang L N, Santschi C, et al. Trapping and sensing 10 nm metal nanoparticles using plasmonic dipole antennas[J]. *Nano Letters*, 2010, 10(3): 1006-1011.
- [156] Juan M L, Righini M, Quidant R. Plasmon nano-optical tweezers [J]. *Nature Photonics*, 2011, 5(6): 349-356.
- [157] Roxworthy B J, Ko K D, Kumar A, et al. Application of plasmonic bowtie nanoantenna arrays for optical trapping, stacking, and sorting[J]. *Nano Letters*, 2012, 12(2): 796-801.
- [158] Juan M L, Gordon R, Pang Y J, et al. Self-induced back-action optical trapping of dielectric nanoparticles[J]. *Nature Physics*, 2009, 5(12): 915-919.
- [159] Pang Y J, Gordon R. Optical trapping of 12 nm dielectric spheres using double-nanoholes in a gold film[J]. *Nano Letters*, 2011, 11(9): 3763-3767.
- [160] Righini M, Ghenuche P, Cherukulappurath S, et al. Nano-optical trapping of Rayleigh particles and *Escherichia coli* bacteria with resonant optical antennas[J]. *Nano Letters*, 2009, 9(10): 3387-3391.
- [161] Pang Y J, Gordon R. Optical trapping of a single protein[J]. *Nano Letters*, 2012, 12(1): 402-406.
- [162] Kotnala A, Gordon R. Double nanohole optical tweezers visualize protein p53 suppressing unzipping of single DNA-hairpins[J]. *Biomedical Optics Express*, 2014, 5(6): 1886-1894.
- [163] Al Balushi A A, Gordon R. A label-free untethered approach to single-molecule protein binding kinetics[J]. *Nano Letters*, 2014, 14(10): 5787-5791.
- [164] Chen L, Liu W, Shen D Y, et al. Label-free plasmonic assisted optical trapping of single DNA molecules[J]. *Optics Letters*, 2021, 46(6): 1482-1485.
- [165] Zhong M C, Wei X B, Zhou J H, et al. Trapping red blood cells in living animals using optical tweezers[J]. *Nature Communications*, 2013, 4(1): 1-7.
- [166] Johansen P L, Fenaroli F, Evensen L, et al. Optical micromanipulation of nanoparticles and cells inside living zebrafish [J]. *Nature Communications*, 2016, 7(1): 1-8.
- [167] Anand R, Buechelmaier E, Belan O, et al. HELQ is a dual-function DSB repair enzyme modulated by RPA and RAD51[J]. *Nature*, 2022, 601(7892): 268-273.
- [168] Newton M D, Taylor B J, Driessen R P C, et al. DNA stretching induces Cas9 off-target activity[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2019, 26(3): 185-192.
- [169] Kono S, van den Berg A, Simonetta M, et al. Resolving the subtle details of human DNA alkyltransferase lesion search and repair mechanism by single-molecule studies[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2022, 119(11): e2116218119.
- [170] Lyon A S, Peeples W B, Rosen M K. A framework for understanding the functions of biomolecular condensates across scales [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2021, 22(3): 215-235.
- [171] Sharp P A, Chakraborty A K, Henninger J E, et al. RNA in formation and regulation of transcriptional condensates[J]. *RNA*, 2022, 28(1): 52-57.

Advances in Laser Dual-Trap Optical Tweezers in Single-Molecule Biophysics

Gong Fan¹, Ren Yuxuan^{2*}

¹National Facility for Protein Science in Shanghai, Shanghai Advanced Research Institute, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201210, China;

²Institute for Translational Brain Research, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China

Abstract

Significance Optical tweezers are a high-resolution force measuring technique invented by A. Ashkin and colleagues in 1986.

Optical tweezers, in brief, use a highly focused laser beam that can form a stable three-dimensional trap to manipulate micron-sized particles. Optical tweezers have sub-piconewton force resolution and sub-millisecond time response, which can be widely used in single-molecule biophysics. In single-molecule optical tweezers experiment, traditional optical tweezers geometries include single-trap and dual-trap geometries. Compared with the single-trap geometries, the dual-trap “dumbbell” assay has better stability and noise resistance, resulting in higher resolution and playing an important role in the study of DNA-protein interactions, protein folding and the mechanochemical properties of molecular motors. In this review, we provide an overview on the basic principles of optical tweezers and the experimental setup of the dual-beam optical tweezers in the National Facility for Protein Science in Shanghai. The application and progress of dual-beam optical tweezers in single-molecule biology are summarized, and we focus on investigating some perspectives for future applications.

Progress When a photon is absorbed by an absorptive particle, the partial momentum of the photons is transferred to the particle, which in turn generates an optical trapping force that stabilizes the particle. Quantitative calculation of the optical trapping force depends on the wavelength of the trapping light and the size of the trapped particle. When the particle radius is close to or greater than the light wavelength, the optical trapping forces can be calculated from “ray-optics” model. When the particle size is smaller than the wavelength, the electromagnetic scattering theory is often chosen as the calculation model (Fig. 1).

Optical tweezers are mainly used in the study of single biomolecules such as proteins and nucleic acids. The systems commonly used in single-molecule optical tweezers experiments include single-trap optical tweezers, dual-trap optical tweezers and angular optical tweezers. These experimental systems involve a variety of geometries, which can be used to directly manipulate single molecules and measure mechanical relevant parameters (Fig. 2). Among them, the “dumbbell” geometry of the tweezers has better stability and noise immunity and higher resolution than other optical tweezers configurations, and these advantages make the tweezers widely applied in single-molecule mechanical properties. The National Facility for Protein Science in Shanghai developed high-precision dual-trap optical tweezers and successfully used them to study the folding dynamics of protein complexes (Fig. 3). In this system, in order to accurately obtain the important parameter of optical trapping force, we chose to use the power spectral density method to calibrate the optical trap stiffness (Fig. 4), and realized base-pair resolution on the measurement of tether extension on the dual-trap optical tweezers (Fig. 5).

Optical tweezers provide powerful single-molecule evidence to study the mechanical behavior of nucleic acid and proteins that constitute the major roles in the interpretation of the central dogma in molecular biology (Fig. 6). Stretching dsDNA with dual-trap optical tweezers helps us understand the elastic model of DNA and lays a foundation for exploring protein folding, DNA-protein complex interactions and mechanochemical properties of molecular motors. Dual-trap optical tweezers can reveal the protein folding process at the single-molecule level, detect subtle protein misfolding information, and measure the translation, folding and molecular regulation processes of multi-domain proteins in real time. All those studies offer single-molecule information for understanding and treating neurodegenerative diseases (Fig. 7). DNA-protein binding is closely related to the molecular mechanisms of DNA replication, repair and transcription. The ability of dual-trap optical tweezers to monitor DNA-protein interactions in real time at the single-molecule level has advanced the development of related molecular mechanisms and molecular dynamics (Fig. 8). In addition, dual-trap optical tweezers can be used to study the motion characteristics of molecular motors. Mechanochemical properties of molecular motors are understood by measuring parameters such as step size, velocity, and run length (Fig. 9). Dual-trap optical tweezers can also be used to reveal how molecular chaperones regulate the folding and assembly process of protein complexes to clarify the folding mechanism, and provide the single-molecule basis for physiological processes (Fig. 10).

In recent years, dual-trap optical tweezers have been developing continuously. Laser Raman spectroscopy tweezers (LRST) have enabled the simultaneous combination of single-molecule manipulation and Raman spectroscopy measurements without direct contact with the sample. Dual-trap Raman tweezers built on this basis can detect the interaction between cells or stretch a single cell to study the changes caused by deformation (Fig. 11). The combination of optical tweezers and single-molecule fluorescence detection breaks the limitation that optical tweezers can only measure in one-dimensional direction, which enables the study of complex conformational changes at three-dimensional level (Fig. 12). Building on this, the combination of ultra-high resolution imaging technology with dual-trap optical tweezers makes it possible to capture the dynamics of a single protein at high protein concentrations (Fig. 13). Besides, nano-optical tweezers are capable of ultra-precise localization of single nano-objects and can track the changing state of biological macromolecules at high resolution over long periods (Fig. 14).

Conclusions and Prospects After more than three decades of development, dual-trap optical tweezers have gradually formed a well-established experimental system in biological research, and the increased temporal and spatial resolution has further extended the application range of dual-trap optical tweezers. At the same time, dual-trap optical tweezers face many challenges in the development and biological application, for example, low throughput or low trap depth and efficiency of living cells. In recent years, although several commercial optical tweezers instruments have been launched for single-molecule studies to promote the single-molecule science, the use of optical tweezers to study single molecules is still developing in China. The National Facility for Protein Science in Shanghai is among the few labs to develop high-precision dual-trap optical tweezers for single-molecule studies. The instrument has high stability and a high signal-to-noise ratio, which has been used in biological single-molecule researches. It is expected that single-molecule experiment using optical tweezers would enter a new phase in China in the coming decade.

Key words bio-optics; dual-trap optical tweezers; single molecule; protein folding; molecular motor; optical force