

# 拉直的单个 DNA 分子的全内反射荧光实时成像研究

林丹樱<sup>1,2</sup>, 刘晓晨<sup>1</sup>, 王鹏飞<sup>1</sup>, 马万云<sup>1\*</sup>

1. 清华大学物理系原子分子纳米科学教育部重点实验室, 北京 100084
2. 深圳大学光电子器件与系统教育部/广东省重点实验室, 广东 深圳 518060

**摘要** 全内反射荧光(TIRF)成像技术利用穿透深度仅 200 nm 左右的隐失波来激发诱导荧光, 探测灵敏度和图像信噪比大大提高, 成为单分子研究的有力工具。分子梳技术利用 DNA 末端与固体表面的结合力和周围流体流动产生的侧向力将 DNA 分子拉伸并平铺在表面上。结合这两种技术, 对分子梳拉直的单 DNA 分子进行了清晰的实时荧光成像, 发现 TIRF 成像条件下 DNA 分子与荧光探针 YOYO-1 组成的复合体可自然避免发生光敏断裂现象; 实时监测了单个 DNA-YOYO-1 复合体的光漂白过程, 通过对激发光照射时间与探测器曝光时间进行同步控制, 可大幅降低光漂白程度, 为拉直的单 DNA 分子的长时间实时观察和成像研究优化了实验条件, 为实时、可视化地研究其与蛋白质相互作用的动力学过程奠定了基础。

**关键词** 全内反射荧光(TIRF); 实时; 单分子; DNA; 分子梳

**中图分类号:** TH742.9; O439 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2010)05-1266-05

## 引言

DNA 分子是生命体遗传信息的携带者, 是生命的核心物质, 在细胞内与蛋白质、RNA 等通过各种相互作用来实现生命活动。因此, 研究 DNA 分子及其与其他分子的相互作用一直以来都是生命科学研究的热点<sup>[1,2]</sup>。DNA 分子是双螺旋结构的线形分子, 但在溶液中通常呈无规则卷曲状, 为了更方便地进行观察, 利用光镊等技术将 DNA 分子拉直、甚至拉长已成为人们操纵 DNA 分子的重要手段<sup>[3,4]</sup>。但光镊技术对设备的要求很高, 而另一种被称为分子梳(molecular combing)的方法则能更方便、更有效地将 DNA 分子拉直。该方法利用 DNA 末端与固体表面的结合力和周围流体流动产生的侧向力将 DNA 拉伸并平铺在表面上<sup>[5]</sup>, 进而可在单分子水平上进行研究。近年来, 利用新兴的单分子荧光显微成像技术, 如全内反射荧光(TIRF)技术, 还可以对拉直的、荧光染料标记的单个 DNA 分子的动力学行为进行直观的实时观察, 从而探索分子间的相互作用机制<sup>[6-9]</sup>。YOYO-1 等二聚花菁染料与 DNA 结合后其荧光强度可提高几百倍, 因此是常用的高效 DNA 荧光探针; 但在持续光照条件下, YOYO-1 与 DNA 分子可形成具有光敏化作用的配体, 因而容易发生光漂白和光敏断裂现象<sup>[10]</sup>, 这往往限制了 DNA 分

子的长时间实时成像。

TIRF 成像技术是近年来用于生物单分子研究最热门的方法之一<sup>[11-13]</sup>。这种技术利用入射光发生全内反射时产生的隐失波(evanescent wave)来激发诱导荧光, 如图 1(a)所示。而隐失波穿透深度( $d_p$ )有限, 一般仅能激发界面附近厚 200 nm 左右的薄层区域, 荧光信号不受深层荧光分子的干扰, 图像信噪比和灵敏度均得到很大程度提高, 因而可对单个分子进行成像<sup>[14]</sup>。在此前建立的基于像增强型电荷耦合器件(ICCD)的实时荧光显微成像装置<sup>[15,16]</sup>上增加了 TIRF 成像功能, 选用 YOYO-1 对 DNA 进行标记, 采用基于盖玻片覆盖法的分子梳技术将 DNA 分子拉直, 并利用 TIRF 成像技术对拉直的单 DNA 分子进行成像, 对单个 DNA-YOYO-1 复合体在连续光照条件下的光漂白过程进行实时记录, 然后进一步通过同步控制激发与曝光来降低光漂白程度, 以期对单个 DNA 分子的长时间实时成像优化实验条件, 为进一步研究单个 DNA 分子与蛋白质相互作用的动力学过程奠定必要的基础。

## 1 方法

### 1.1 材料与试剂

3-氨基丙基三乙氧基硅烷(3-aminopropyltriethoxysilane,

收稿日期: 2009-04-18, 修订日期: 2009-07-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(10874099, 90919012)和教育部博士点基金项目(20090002110065)资助

作者简介: 林丹樱, 女, 1980 年生, 深圳大学光电子器件与系统教育部/广东省重点实验室讲师 e-mail: dylin@szu.edu.cn

\* 通讯联系人 e-mail: mawy@tsinghua.edu.cn

APS)购自美国 ACROS Organics 公司,  $\lambda$ DNA 购自华美生物工程公司, 荧光探针 YOYO-1 (Ex 491 nm/Em 509 nm) 购自美国 Invitrogen 公司, 24 mm  $\times$  24 mm  $\times$  0.15 mm 盖玻片购自德国 Brand 公司。

### 1.2 荧光标记

将  $\lambda$ DNA 和 YOYO-1 分别用含有 NaCl (10 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>) 和 EDTA (1 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>) 的 10 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0) 稀释, 终浓度分别为 0.67 ng  $\cdot$   $\mu$ L<sup>-1</sup> 和 0.2  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>。取等体积的上述 2 种稀释液混匀后避光反应 60 min,

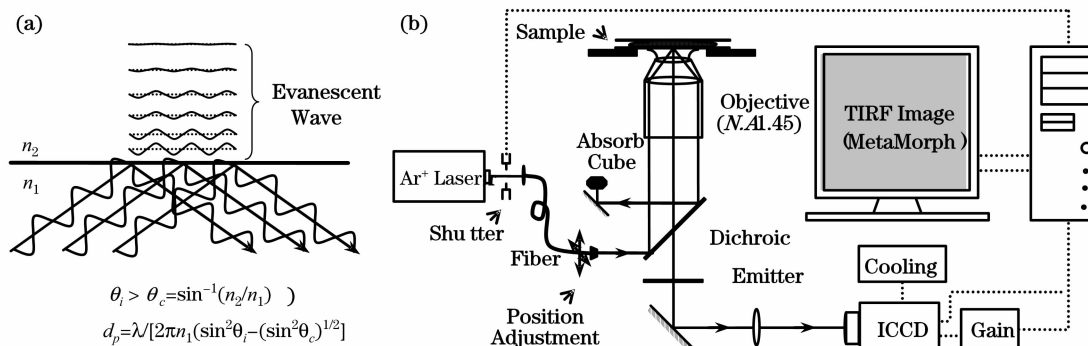


Fig. 1 Schematic illustrations of total internal reflection fluorescence (TIRF) (a) Principle of TIRF,  $\theta_i$  denotes the angle of incidence,  $\theta_c$  denotes the critical angle,  $n_1$  and  $n_2$  denote the refractive indexes of the two mediums respectively ( $n_2 < n_1$ ), and  $d_p$  denotes the penetration depth of evanescent wave; (b) TIRF setup for real-time imaging

### 1.4 分子梳技术

利用分子梳技术对  $\lambda$ DNA 分子进行拉直操纵, 方法简述如下: 取上述标记了 YOYO-1 并稀释至合适浓度的  $\lambda$ DNA 溶液 5  $\mu$ L, 在 APS 处理过的盖玻片表面的一端铺开成线状, 取另一片未经 APS 处理的干净盖玻片从滴有  $\lambda$ DNA 溶液的一端轻轻盖上, 使该盖玻片顺着—个方向将溶液铺开, 利用液体的定向快速流动将  $\lambda$ DNA 分子拉直。该过程在避光条件下进行。

### 1.5 TIRF 实时成像

采用 TE2000 倒置显微镜及其 TIRF2 附件 (Nikon, 日本), 配合 60  $\times$  N. A. 1.45 的 TIRF 专用油浸物镜进行 TIRF 成像, 激发光源采用氩离子激光器 (Melles Griot, 美国; 型号为 35LAL 415), 输出波长 488 nm, 输出功率设定为 50 mW, 二色片 (dichroic) 截止波长 495 nm, 阻挡片 (emitter) 截止波长 515 nm。激光通过光纤引入显微镜, 调节使其沿物镜边缘入射, 可在样品界面发生全内反射产生隐失波并激发诱导样品荧光。荧光信号由 MetaMorph 软件 (Universal Imaging, 美国) 控制 ICCD (Roper Scientific, 美国, 型号为 I-PentaMAX Gen 4) 进行实时采集成像。TIRF 实时成像装置示意图如图 1(b) 所示。

成像参数设置为: ICCD 增益 90.0%, 曝光时间 30 ms, 实时荧光图像序列每两次曝光间隔 1 s, 每个序列持续拍摄 5 min。

为研究  $\lambda$ DNA-YOYO-1 复合体的光漂白过程, 采取 2 种激发方式: (1) 激光连续照射; (2) 激光照射时间与 ICCD 曝光时间同步, 即脉冲式照射, 以降低复合体的光漂白程度。

其中 YOYO-1 分子数与 DNA 碱基对比比例约为 1 : 5, 该配比下 DNA 能被 YOYO-1 有效标记。反应后的溶液用 Tris-HCl 缓冲液稀释 10 倍备用。

### 1.3 衬底修饰

盖玻片经铬酸洗液浸泡过夜、超纯水超声彻底清洗, 70 ~ 90  $^{\circ}$ C 烘干, 保存于无尘称量瓶中; 实验前用 1% 的 APS 溶液 (18.2 M  $\Omega$   $\cdot$  cm 超纯水稀释) 处理 5 min 以增强表面吸附力, 小心取出后立于无尘称量瓶中烘干备用。每片盖玻片均单独处理, 处理后的盖玻片当天用完。

### 1.6 图像及数据处理

由于  $\lambda$ DNA-YOYO-1 复合体被固定在 APS 修饰的盖玻片表面, 实时荧光图像序列中样品位置不变, 因此将前 30 帧图像取平均, 确定复合体所在位置, 然后利用这些位置信息在去除背景后的单帧荧光图像中分别选取拉直和卷曲的  $\lambda$ DNA, 计算其荧光强度  $I$  并绘制其随时间变化的曲线。将该  $I-t$  曲线用方程  $y = y_0 + a \cdot \exp(-t/\tau)$  进行拟合, 其中  $y_0$  和  $a$  为常数, 而  $\tau$  称为光漂白时间常数, 其倒数  $1/\tau$  即为光漂白速率。

## 2 结果与讨论

### 2.1 拉直的单个 $\lambda$ DNA 分子的清晰成像

由于 YOYO-1 标记的高效性、表面修饰对样品的固定、TIRF 成像的高纵向分辨率和高信噪比等因素的综合作用, YOYO-1 标记的单个  $\lambda$ DNA 分子可被 TIRF 实时成像系统清晰记录, 结果如图 2 所示 (30 帧图像取平均, 序号表示不同样品)。结果表明, 同一样品中被分子梳作用拉直成线状的  $\lambda$ DNA 分子方向基本一致, 如样品 9 和 10 所示。同时, 并非所有  $\lambda$ DNA 分子都能被拉直, 图中点状的荧光信号即代表卷曲的  $\lambda$ DNA 分子。此外,  $\lambda$ DNA 约为 48.5 kbp, 理论长度约为 17  $\mu$ m, 将拉直的  $\lambda$ DNA 分子与图中标尺作对比, 可见多数  $\lambda$ DNA 在分子梳作用下并未被过度拉长,  $\lambda$ DNA 分子基本处于正常状态, 这正是进一步研究 DNA 分子与蛋白质分子的相互作用等过程的前提。

### 2.2 单个 $\lambda$ DNA-YOYO-1 的光漂白过程

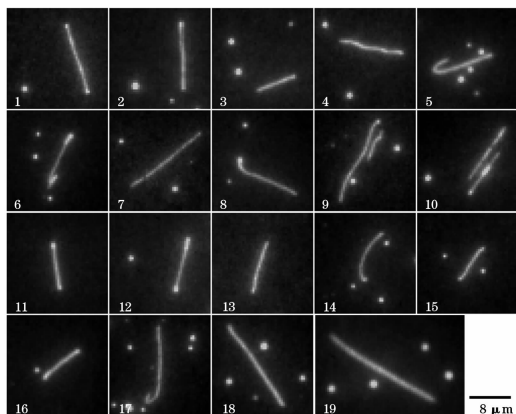


Fig. 2 TIRF images of single stretched  $\lambda$ DNA molecules labeled by YOYO-1. Numbers 1 to 19 denote different samples

以图 2 中样品 10 为例, 实时记录  $\lambda$ DNA-YOYO-1 复合体在连续光照条件下的光漂白过程, 结果如图 3 所示。图中包含两个拉直的  $\lambda$ DNA (分别记为 L1 和 L2) 和一个卷曲的  $\lambda$ DNA (记为 P1)。图 3(a) 的荧光图像序列表明, 由于激光的

连续照射,  $\lambda$ DNA-YOYO-1 复合体的荧光随时间逐渐减弱。图 3(b) 给出 L1, L2 和 P1 的  $I-t$  曲线及其拟合结果。可见, 3 个  $\lambda$ DNA-YOYO-1 复合体的  $I-t$  曲线均符合指数变化规律, 可得到光漂白时间常数  $\tau$  分别为 108.8 s (L1), 128.2 s (L2) 和 237.6 s (P1), 即拉直的 L1 和 L2 其光漂白速率要明显快于卷曲的 P1, 这与文献[17]报道的利用普通荧光显微镜得到的结论是一致的。导致拉直与卷曲的  $\lambda$ DNA 光漂白差异的原因, 有些研究者认为是分子梳作用使  $\lambda$ DNA 被过度拉长后分子内部结构发生改变而影响了光漂白速率[17]。然而此处拉直的 L1 和 L2 其长度均未超过理论长度, 因而并不存在过度拉长改变分子内部结构的问题。可认为拉直的  $\lambda$ DNA-YOYO-1 复合体光漂白速率显著提高, 更直接的原因是拉直后光照面积增加, 因而是所受的总光照量增加导致的。这样, 虽然 DNA 分子拉直后便于单个 DNA 分子与其他分子相互作用过程的研究, 但由此带来的光漂白速率加快问题则成为制约 DNA 分子长时间实时成像的主要因素之一。研究单个 DNA 分子与蛋白质相互作用的动力学过程, 首先需要解决这个问题。

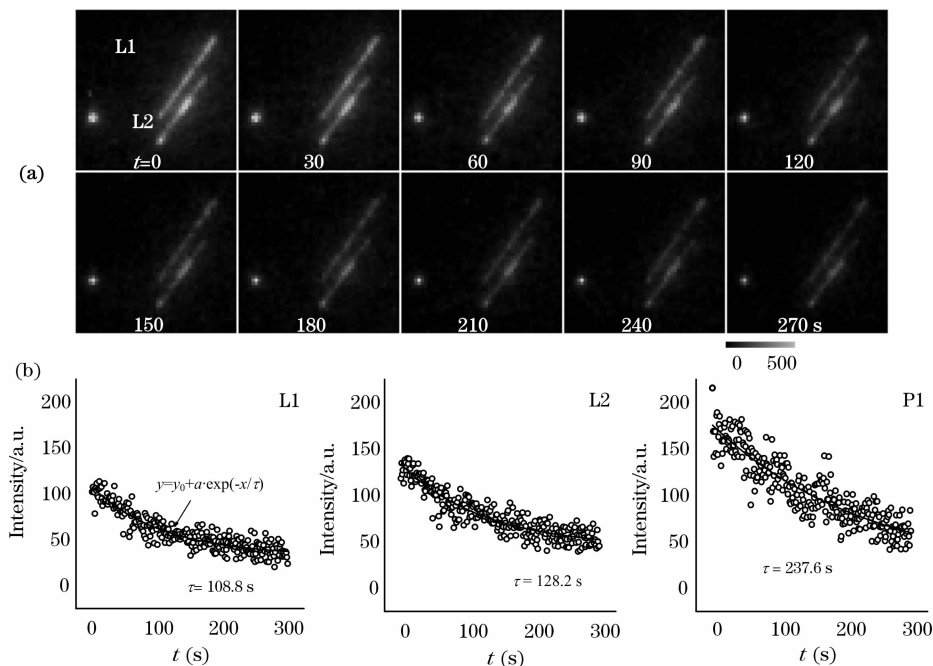


Fig. 3 Photobleaching process of single  $\lambda$ DNA-YOYO-1 complexes under continuous radiation. (a) Time series of TIRF images, the unit of time  $t$  is second; (b) Kinetic plots of fluorescence intensity ( $I-t$ ) and their fitting curves,  $\tau$  denotes the photobleaching time constant

### 2.3 为单个 DNA 的实时成像优化实验条件

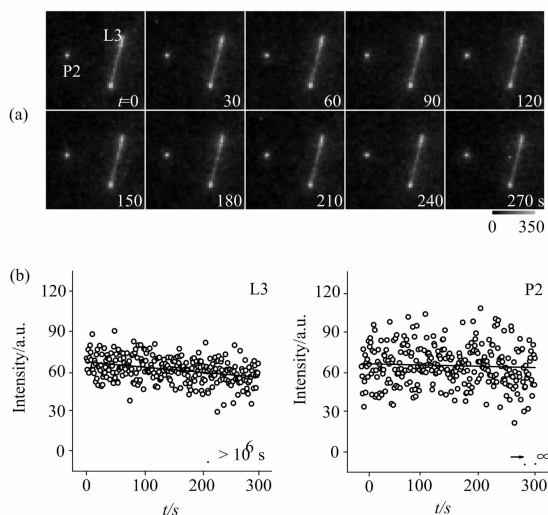
为解决光漂白给长时间实时成像带来的问题, 采用时间同步快门技术, 控制激光照射时间与 ICCD 曝光时间同步, 即脉冲同步照射方式。这种照射与曝光同步控制对成像效果无任何影响, 但  $\lambda$ DNA-YOYO-1 复合体的光漂白程度却可以大幅降低。以图 2 中样品 12 为例, 实时记录  $\lambda$ DNA-YOYO-1 复合体在同步控制条件下的光漂白过程, 如图 4 所示。图中包含一个拉直的  $\lambda$ DNA (L3) 和一个卷曲的  $\lambda$ DNA (P2)。从

图 4(a) 的荧光图像序列可直观地看到, 成像时间相同时, L3 和 P2 的光漂白程度比图 3(a) 中 L1、L2 和 P1 的光漂白程度要低得多; 而图 4(b) 的  $I-t$  曲线可拟合得到非常大的光漂白时间常数  $\tau$ , 对于拉直的  $\lambda$ DNA 可达  $10^6$  s 以上, 而对于卷曲的  $\lambda$ DNA 还要更大。这种变化是很容易理解的, 因为同步控制使得  $\lambda$ DNA-YOYO-1 复合体受光照的时间大幅减少, 每秒钟只有不到 1/30 的时间在接受光照 (30 ms)。这样, 通过同步控制光照与曝光, 制约拉直的单 DNA 分子长时间荧

光成像的光漂白问题方便地得以解决。

此外,如前所述,YOYO-1 除了是一种高效的 DNA 荧光探针以外,还是一种光敏剂,在强光照条件下 YOYO-1 标记的 DNA 分子很容易发生断裂<sup>[10, 18, 19]</sup>,这成为制约 DNA 分子长时间实时成像的另一个因素。在利用汞灯作为激发光

源的普通荧光显微成像实验中也观察到了这种现象。通常的解决方法是在溶液中加入自由基清除剂,如  $\beta$ -巯基乙醇等<sup>[20]</sup>,从而一定程度上降低 DNA 分子的光敏断裂几率。然而在 TIRF 实时成像实验中,即使采用连续光照模式,也并未观察到这种断裂现象,并且无需添加  $\beta$ -巯基乙醇等自由基清除剂。该结果可以这样理解:光照切断 YOYO-1 标记的 DNA 分子是以破坏碱基对之间的化学键为基础的,因此光照能量需要超过一定阈值才能起作用,然而由于 TIRF 成像是利用全内反射隐失波来激发诱导荧光,而隐失波能量只占入射激光能量的很小一部分,因而在设置合适参数可获得拉直的单  $\lambda$ DNA 清晰图像的同时,隐失波的能量还不足以使  $\lambda$ DNA-YOYO-1 发生断裂。这样,光敏断裂的问题就自然得以解决。



**Fig. 4 Photobleaching process of single  $\lambda$ DNA-YOYO-1 complexes under synchronizing control. (a) Time series of TIRF images, the unit of time  $t$  is second; (b) Kinetic plots of fluorescence intensity ( $I-t$ ) and their fitting curves,  $\tau$  denotes the photobleaching time constant**

### 3 结 论

利用 TIRF 成像技术对分子梳拉直的单 DNA 分子进行清晰成像,对单个 DNA 与荧光探针 YOYO-1 的复合体在连续光照条件下的光漂白过程进行实时记录,并通过激发光照时间与 ICCD 曝光时间的同步控制大幅降低了该复合体的光漂白程度,同时实验结果表明 TIRF 成像条件下可自然避免 DNA 分子在 YOYO-1 作用下光敏断裂现象。光漂白和光敏断裂这两个问题的解决,不仅为单个 DNA 分子的长时间实时研究优化了实验条件,同时也为进一步研究单个 DNA 分子与蛋白质相互作用的动力学过程奠定必要的基础。

### 参 考 文 献

- [1] Brewer L R, Bianco P R. Nature Methods, 2008, 5(6): 517.
- [2] WANG Yan-jun, LI Yong-sheng, YANG Quan-yu, et al(王艳君, 李永生, 杨全玉, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2009, 29(1): 165.
- [3] McCauley M J, Williams M C. Biopolymers, 2007, 85(2): 154.
- [4] Keyser U F, van der Does J, Dekker C, et al. Review of Scientific Instruments, 2006, 77(10): 105105.
- [5] Lebofsky R, Bensimon A. Briefings in Functional Genomics and Proteomics, 2003, 1(4): 385.
- [6] Kim J H, Larson R G. Nucleic Acids Research, 2007, 35(11): 3848.
- [7] LIU Yu-ying, WANG Peng-ye, DOU Shuo-xing(刘玉颖, 王鹏业, 窦硕星). Progress in Natural Science(自然科学进展), 2007, 17(4): 421.
- [8] Van Mameren J, Peterman E J G, Wuite G J L. Nucleic Acids Research, 2008, 36(13): 4381.
- [9] Chan T F, Ha C, Phong A, et al. Nucleic Acids Research, 2006, 34(17): e113.
- [10] LI Bing, WANG Ying, HU Jun, et al(李 宾, 汪 颖, 胡 钧, 等). Chinese Science Bulletin(科学通报), 2003, 48(4): 345.
- [11] Reck-Peterson S L, Yildiz A, Carter A P, et al. Cell, 2006, 126(2): 335.
- [12] Mashanov G I, Tacon D, Peckham M, et al. Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(15): 15274.
- [13] Betzig E, Patterson G H, Sougrat R, et al. Science, 2006, 313: 1642.
- [14] Mashanov G I, Tacon D, Knight A E, et al. Methods, 2003, 29(2): 142.
- [15] LIN Dan-ying, LIU Xiao-chen, MA Wan-yun(林丹樱, 刘晓晨, 马万云). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2009, 29(6): 1581.
- [16] Lin D Y, Ma W Y, Duan S J, et al. Apoptosis, 2006, 11(8): 1289.
- [17] Liu Y F, Wang P Y, Dou S X, et al. Chinese Journal of Chemical Physics, 2005, 18(5): 651.
- [18] Akerman B, Tuite E. Nucleic Acids Research, 1996, 24(6): 1080.
- [19] Lyon W A, Fang M M, Haskins W E, et al. Analytical Chemistry, 1998, 70(9): 1743.
- [20] ZHANG Yi, CHEN Sheng-fu, OUYANG Zhen-qian, et al(张 益, 陈圣福, 欧阳振乾, 等). Chinese Science Bulletin (科学通报), 2000, 45(5): 490.

# Study on Real-Time Imaging of Single Stretched DNA Molecules by Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy

LIN Dan-ying<sup>1,2</sup>, LIU Xiao-chen<sup>1</sup>, WANG Peng-fei<sup>1</sup>, MA Wan-yun<sup>1\*</sup>

1. Key Laboratory for Atomic and Molecular Nanosciences of Ministry of Education, Department of Physics, Tsinghua University, Beijing 100084, China
2. Key Laboratory of Optoelectronic Devices and Systems of Ministry of Education/Guang Province, Institute of Optoelectronics, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China

**Abstract** Total internal reflection fluorescence microscopy (TIRF) is a powerful tool for single molecule study, since only a thin layer of about 200 nanometers is excited by the evanescent wave, resulting in high sensitivity of detection and high signal-to-noise ratio of images. Molecular combing is a convenient and efficient way to stretch DNA molecules with the help of the binding force between DNA molecule and solid surface, as well as the lateral force introduced by ambient fluid flow. In the present paper, real-time fluorescence imaging of single DNA molecules was carried out with these two techniques. Clear images of single stretched DNA were obtained, while photocleavage of DNA-YOYO-1 complex was found to be naturally avoided under TIRF imaging conditions. Photobleaching of the complexes was investigated in real-time, and was greatly reduced by synchronizing the excitation of light (laser) and the exposure of detector (ICCD). The method optimized the experimental conditions for long-lasting real-time observation and imaging of single stretched DNA molecules, so as to lay a foundation for visually studying the kinetic processes of interactions between DNA and proteins.

**Keywords** Total internal reflection fluorescence (TIRF); Real-time; Single molecule; DNA; Molecular combing

(Received Apr. 18, 2009; accepted Jul. 22, 2009)

\* Corresponding author