

單分子光鉗系統之建置校正及生醫應用

Setup of Single-Molecule Optical Tweezers and Its Applications in Biomedical Research

張晏展、周冠廷、吳順德、李弘文

Yen-Chan Chang, Kuan-Ting Chou, Shuen-De Wu, Hung-Wen Li

單分子光鉗技術可施加 pN 大小的力於生物系統中，隨著解析度不斷提升，甚至已經能準確地偵測到原子大小等級的距離變化，其技術廣泛的用於生物體系下分子馬達，DNA、RNA 及蛋白質折疊，DNA-蛋白質作用力的研究。本篇描述單分子光鉗之架設與校正方法，同時介紹兩種常用的生物物理實驗方法：(1) 拉伸實驗搭配聚合物模型分析，以及討論用於描述聚合物 (DNA、RNA、蛋白質) 模型的適用範圍；(2) 被動式定力鉗則可用於即時的結構變化量測，不需要額外回饋來維持定力，有效提高了實驗量測上的時間與空間解析度。

Single-molecule optical tweezers platform applies pico-Newton size of forces and has been widely used to study the functional mechanisms in biological systems, such as the motion of molecular motors, folding of DNA or RNA and protein-DNA interactions in the spatial resolution of few Å. Here, we described the detailed guide for instrumental building and calibrations of high-resolution optical tweezers and two types of commonly-used experimental assays. First, the force-extension assay can measure the extension under applied force by stretching and relaxing the molecule, and analyze the contour length and persistence length. Second, the passive force-clamp operates in a nearly zero trap-stiffness region and therefore, removes the needs to actively feedback the system to maintain a constant force throughout the experiments. Hence, the passive force-clamp platform can be used to study fast dynamics with small length change.

一、前言

單分子技術廣泛用於生物體系的研究之中，不同於常見的生化方法僅能得出一大群分子平均的結果，單分子技術則能偵測一個或數個分子的行為、性質，利用機率與統計的方法除了能得到傳統平均實驗的結果，同時還能大大提升實驗靈敏度、以及得知更細微的生化分子的性質分布及運動機制。在眾多單分子實驗之中，光鉗為利用高收聚的雷射在奈米尺度移動物體的技術，施力範圍約在 pN，且具有最高的時間及空間解析度，相應也具有一定的操作難度，時常用來研究分子馬達之運動及 DNA 與蛋白質之交互作用。其原理是一道徑向強度

為高斯分布的高功率雷射經過高數值孔徑 (numerical aperture, NA) 的透鏡時，會被收束為大小約為繞射極限的光點後發散，此光束聚焦的位置稱為光腰中心，由於動量守恆的緣故，光子折射產生的動量變化會驅使任何折射率比水溶液大的介電物質往光腰中心移動 (圖 1)，一旦介電物質偏離光腰中心便會產生向中心的回復力，此力 (F) 正比於偏移量 (x)，故可用虎克力定律描述 $F = kx$ ，只要能夠準確的校正光鉗系統，便可用於精密的生物體系量測。

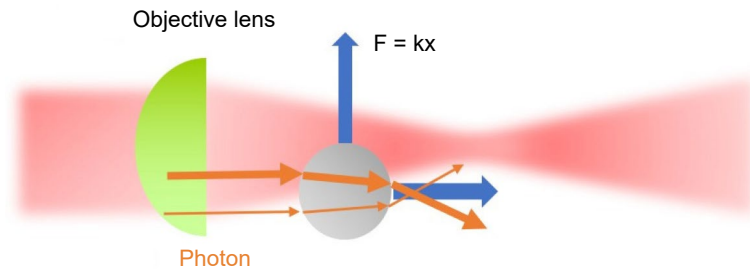


圖 1. 光鉗原理。

光鉗原理可利用光子通過介質折射而維持動量守恆解釋，雷射的強度分布為高斯分布，中心處的光子多，且折射後光子之淨動量方向向外，故此介電物質向光強度最高的地方移動，當球在雷射中心時，會維持不動，此時為平衡位置。

二、光鉗實驗：光路架設

本實驗室之光鉗光路設計如圖 2(a)、(b)，因為雷射光束直徑會大於 AOM (acousto-optical modulator) 孔徑，故第一步為將功率約 5W 的雷射利用一對透鏡 (L1、L2) 縮小，雷射打出 AOM 後，選取第一級繞射光繼續進入後續光路，首先利用分光鏡 (BS1) 將第一級繞射光之 10% 強度導入強度回饋迴路，其餘 90% 進入主要光路，此 10% 強度光束再通過一分光鏡 (BS2) 將 50% 給光電感測器 (photodiode)，其訊號變為電訊接入回饋控制電路板中，另外 50% 給光強度量測器 (power meter)，負責迴圈外的獨立偵測。再將主要 90% 的雷射光通過 L3、L4 放大至顯微鏡透鏡的後焦距光圈大小，導入顯微透鏡後，光束會被聚焦到玻片表面形成光鉗 (圖 2(c))，此光束隨空間分布的位能場可利用簡諧近似為拋物曲面，因此光鉗可視為一虎克彈簧，施力的大小正比於抓住物體的偏移量： $F = kx$ 。光鉗經過樣品小球的散射訊號再經由多個透鏡收束聚焦在 QPD (quadrant photodiode) 中心點。QPD 能將小球偏移光腰中心的距離資訊 x 轉為電訊號輸出，此電訊號需先經過電路式可程式化低通濾波器後，濾除大於取樣頻率一半之電訊號，降低電磁雜訊後，才能接入 NI DAQ 通道取樣而被電腦接收。

1. 雷射功率回饋系統之建立

根據文獻中設計之電路板 (1) 修改，本電路板為 PI 回饋 (proportional-integral feedback) 電路，其控制邏輯為讀取雷射量測電壓輸入，與電腦控制輸入相比較，若輸入的絕對值大於設定之絕對值，則加高 AOM 輸出，反之則減少 AOM 輸出的電壓，以此達到穩定雷射功率在電腦之設定值上，且此電路板之回饋速度在 MHz 以上，故能使雷射功率達到非常高之穩定性，圖 3 為回饋控制的雷射強度偵測數據，相比電腦回饋控制將雜訊全距縮小了約一個數量級。

圖 2(a) 1064 nm 雷射經過 L1、L2 縮小以 AOM 之布拉格角度射入，經過回饋系統後經由 L3、L4 放大至顯微物鏡的孔徑大小，最後經過 HWP (half-wave plate) 用來調整雷射光的極化方向，以打入顯微透鏡，通過樣品後經由 L5、L6、L7 收光打進 QPD 偵測小球的偏移量，DNA 樣品之拉伸可用 PZT (piezo-translation stage) 移動。圖 2(b) 實際之光路圖。圖 2(c) 若雷射光在光路上被均勻的放大、縮小，則通過顯微鏡之雷射光點影像為良好的對稱圖形。

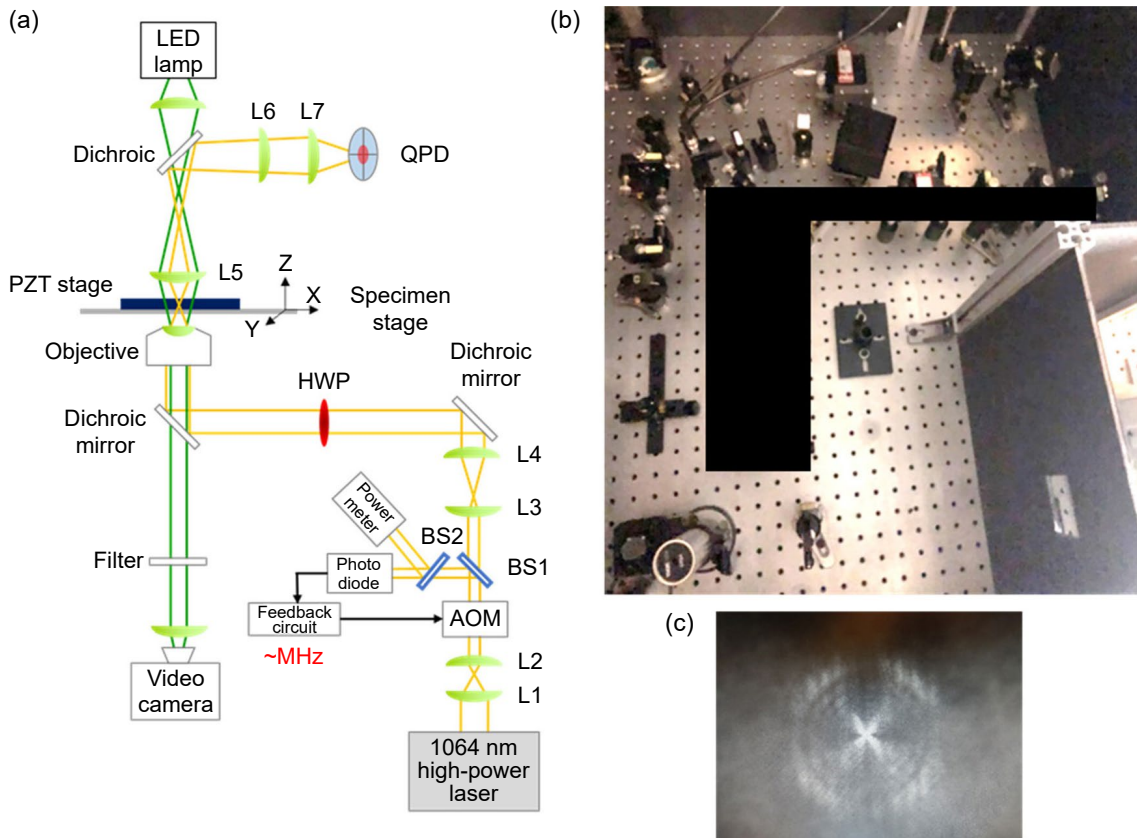


圖 2. 光鉗光路架設。

圖 3 原始雷射讀值約為 20 mW，紅色線為沒有任何回饋控制的雷射輸出強度，雜訊全距為 7.24%，藍色線為加入電腦運算為基底的回饋雷射強度，仍有許多無法消除的尖峰，雜訊全距為 1.87%，而黑色線為電路運算的回饋雷射強度，消除了原本的尖峰，雜訊全距為 0.22%。

2. 位移量測系統之建立

首先將欲偵測靈敏度之小球非專一性地附著在玻片表面上，利用漂浮的自由小球或是栓球對高度找到光腰中心後，利用壓電平台移至固定的小球上之後，驅動壓電平台對固定小球進行掃描，即可得到掃描曲線，利用對稱性找到小球中心後，將此中心左右各 100 nm 的曲線進行擬合 (圖 4)，即可得到系統靈敏度 (volt/ μm)，將實際得到的電壓訊號變為空間上的位移資訊。

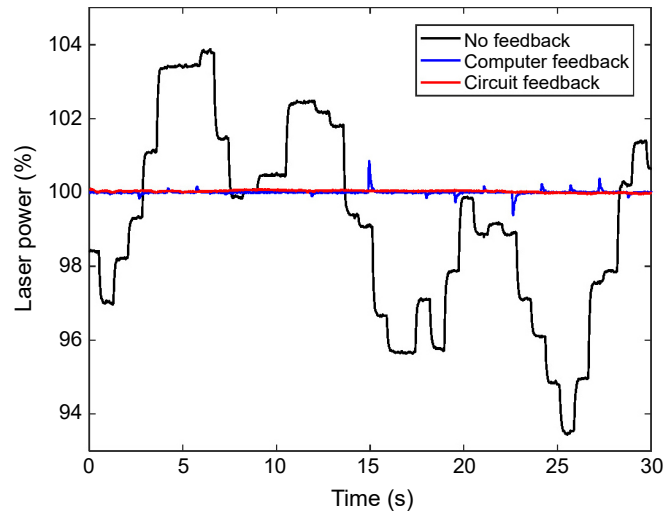


圖 3. 雷射功率回饋系統比較。

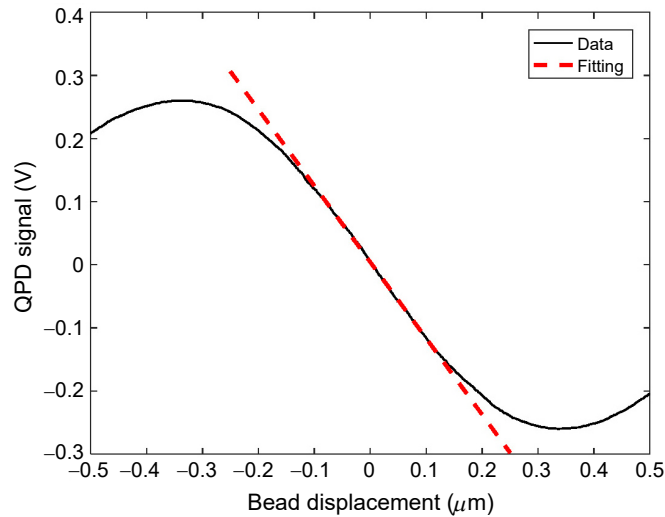


圖 4. 固定小球掃描訊號。

在玻片表面撒上半徑 515 nm 的小球，調整高度並驅動壓電平台使雷射中心掃過小球圓心，同時收取 QPD 訊號，原始數據為黑線，可發現在半徑 100 nm 內，QPD 靈敏度約為一定值，擬合結果為紅色虛線 $y = -1.208x + 0.004$ ， $R^2 = 0.999$ 。

3. DNA 長度之幾何校正

驅動壓電平台拉伸 DNA 時，同時記錄每個壓電平台座標對應之該軸 QPD 訊號，可藉由以下步驟將壓電平台座標及 QPD 電壓，轉為 DNA 長度對應 DNA 所受施力，此曲線稱為 force-extension curve，描述 DNA 受力而伸長的現象。

此種將 DNA 種在玻片表面的單雷射光鉗架設 (圖 5) 可由以下步驟得知力與伸長量⁽²⁾。壓電平台向 X 軸拉伸時，DNA 所受合力與 XZ 軸所施之力關係如下，

$$F = \frac{F_x}{\cos \theta} = \frac{F_z}{\sin \theta} \quad (1)$$

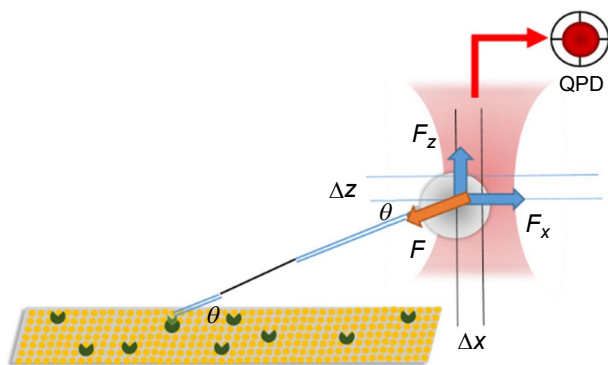


圖 5. 光鉗系統拉伸 DNA 時之幾何位向。

F_x 及 F_z 為小球在 X 及 Z 軸之受力，且角度 θ 之關係式為

$$\tan \theta = \frac{z_{trap} - \Delta z}{X_{st} - \Delta x} \quad (2)$$

z_{trap} ：栓球起始高度 (nm)。

Δz ：拉伸過程小球 Z 軸下降量 (nm)。

Δx ：小球與光腰之偏移量， $\frac{\Delta V}{s(h, 0)}$ 。

ΔV ：小球與光腰之偏移量，原始 QPD 電訊號， $V - V_{center}$ (volt)。

$s(x, y)$ ：在栓球高度 x 且 Z 軸偏移量為 y 時的 QPD 靈敏度 (V/nm)， $s(h, 0)$ 表示小球在光腰中心且栓球高度 h 時之靈敏度。

X_{st} ：壓電平台相對於栓球中心之位移量 (nm)。

單分子栓球之幾何校正步驟如下：

- (1) 先計算拉伸 DNA 過程小球的 Z 軸偏移量 z_{bd} ，此 Z 軸偏移量會使的 DNA 栓球高度在向外的過程不斷下降，故立體校正需要考慮此偏移。

$$z = \frac{\Delta x \times \tan \theta}{\frac{k_z}{k_x}} \quad (3)$$

$$\Delta z = \frac{\Delta x}{\frac{k_z}{k_x}} \frac{z_{trap} - \Delta z}{X_{st} - \Delta x} \quad (4)$$

整理上式左右兩邊可得

$$\Delta z = \frac{z_{trap}}{\frac{k_z X_{st} - \Delta x}{k_x \Delta x} + 1} \quad (5)$$

- (2) 利用 Δz 重新計算小球偏移光腰之量 Δx ，同時 Δz 會影響 QPD 靈敏度

$$\Delta X = \frac{\Delta V}{s(h, \Delta z)} \quad (6)$$

其中 $s(h, \Delta z) = (1 - c_z \cdot \Delta z) \cdot s(h, 0)$ ， c_z 為靈敏度隨著偏移光腰 z 軸的量而下降的比例常數。

(3) 計算栓球 DNA 之伸長量 (extension)

$$x_{DNA} = \frac{z_{trap} - \Delta z}{\sin \theta} - r_{bead} \quad (7)$$

$$x_{DNA} = \frac{z_{trap} - \Delta z}{\sin \left(\tan^{-1} \left(\frac{z_{trap} - \Delta z}{X_{st} - \Delta x} \right) \right)} - r_{bead} \quad (8)$$

(4) 計算栓球 DNA 所受之外力 (force)

$$F = \frac{F_x}{\cos \theta} = \frac{k_x \Delta x}{\cos \left(\tan^{-1} \left(\frac{z_{trap} - \Delta z}{X_{st} - \Delta x} \right) \right)} \quad (9)$$

將 force 和 extension 作圖，即可得 force-extension curve，對此曲線擬合可得接在栓球上之聚合物性質，如：真實長度 (contour length, L_c)、彎折硬度 (persistence length, L_p) 及拉伸硬度 (stretching modulus, K)，用來判斷光鉗系統校正之準確度或是實驗過程之 DNA 栓球是否為可用之單分子 DNA。

三、系統校正及解析度分析

光鉗之施力可在一定的偏移量範圍近似為 $F = k\Delta x$ ，以一顆直徑 $1.03 \mu\text{m}$ 的小球來說，可準確校正之範圍約為半徑 $\pm 100 \text{ nm}$ ， Δx 可由 QPD 訊號搭配靈敏度轉換得知。以下提供三種力常數校正方法，此三種方法可以得到相似之結果 (圖 6)。

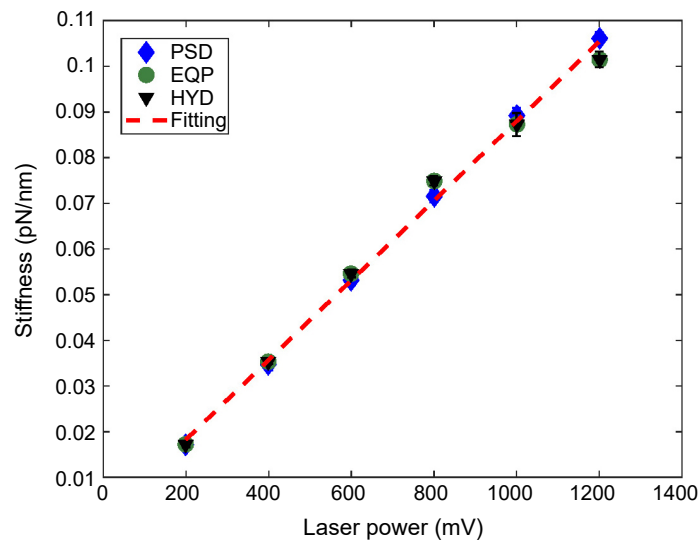


圖 6. 測量不同雷射強度對應的雷射彈力常數。

利用三種方法量測在不同雷射強度下的彈力常數，藍、綠、黑色圓點分別為使用能量頻譜密度法 (PSD)、能量均分法 (EQP)、流體力學法 (HYD) 量測之雷射彈力常數，三組數據 R 平方值為 0.996，呈高度相關。

1. 能量均分定理

當小球被雷射光抓住時，在溶液中之布朗運動會使小球偏離中心平衡位置而後再度被雷射抓回中心，由於雷射之施力行為可視為彈簧，根據能量均分原理，雷射每一個維度所儲存之彈力位能恰等於 $0.5 k_B T$ ，故雷射之彈力常數可由以下關係式得到。

$$\frac{1}{2} k \langle x - \langle x \rangle \rangle^2 = \frac{1}{2} k_B T \quad (10)$$

$$k = \frac{k_B T}{\sigma_x^2} \quad (11)$$

其中 $\sigma_x^2 \equiv \langle x^2 \rangle - \langle x \rangle^2$ 。因為需要知道位置的標準差，要求得彈力常數 k (pN/nm) 需要有準確之 QPD 靈敏度校正，將 QPD 之電訊號轉為空間上的資訊才能準確量測到 k ；藉由量測小球偏移中心的熱擾動，因此校正過程若有發生飄移或是其他震動、雜訊混入系統中，會使校正嚴重失準。

2. 流體拖曳力

可利用對小球施加一已知固定流速 v 之均勻流場，此時小球會被流體拖曳偏離平衡位置，此時流體造成在層流 (laminar flow) 的範圍下可近似為 γv ，故彈力常數 k 滿足以下關係⁽³⁾，

$$\gamma v = k \Delta x \quad (12)$$

$$k = \frac{\gamma v}{\Delta x} \quad (13)$$

其中 Faxen's law 對 Stoke's law 進行校正⁽⁴⁾ $r = \frac{6\pi r \eta}{\left[1 - \frac{9}{16} \left(\frac{r}{z}\right)^2 + \frac{1}{8} \left(\frac{r}{z}\right)^3 - \frac{45}{256} \left(\frac{r}{z}\right)^4 - \frac{1}{16} \left(\frac{r}{z}\right)^5\right]}$ ， r 為小球之半徑 (nm)， η 為流體黏度 (cP)， z 為玻片表面至小球中心點之距離 (nm)，分母項用來修正流體在靠近玻片表面時，流場會受邊界影響而變慢，導致接近表面時摩擦係數 γ 會比 Stoke's law 中所描述的 $6\pi r \eta$ 還要大，當 $z = 1.5 r$ 時 $\gamma = 1.615 (6\pi r \eta)$ ， $z = 3r$ 時 $\gamma = 1.227 (6\pi r \eta)$ ， $z \gg r$ 時 $\gamma \rightarrow 6\pi r \eta$ ，故為了避免高度的不準度造成太大之誤差，一般在 $z > 3r$ 時做校正。此法一樣需要有準確的 QPD 靈敏度校正，此外還需要知道溶液黏度及當前高度。

同時此法利用壓電平台做週期性之等速運動，位置對時間之關係為梯形波 (圖 7(a))，此時 QPD 位置偵測器會出現類似方波之訊號，方波之長度與三角形邊長長度大約相等 (圖 7(b))，因為壓電平台做等速運動時，小球會受到定力流體拖曳力偏離平衡位置，此時，偏離的時間與壓電平台做等速運動的時間相同，此法需要知道溶液黏度及 QPD 靈敏度。

利用壓電平台的運動製造出相對運動的流體對小球施力。圖 7(a) 壓電平台的運動方式， t_1 與 t_2 對應到圖 7(b) 之 t_1 與 t_2 ， t_2 為製造等速的流體的時間，此段時間速度為等速度 $100 \mu\text{m/s}$ 。圖 7(b) 對應的 QPD 訊號， t_1 時小球會維持在平衡位置，而後由於受到流體拖曳力會偏移平衡位置 t_2 時間，為了有統計意義減少誤差，對此響應做直方圖，並以三個高斯函數去擬合，得到平均偏移量為 $dx = 0.01448 \text{ V}$ ，搭配 QPD 靈敏度校正可知 $dx = 11.36 \text{ nm}$ ，由於知道流體速度及流體黏度 (水)，可知產生的拖曳力 $F_{drag} = 0.971 \text{ pN}$ ，可知彈力常數 $k = 0.971/11.36 = 0.0854 \text{ pN/nm}$ 。

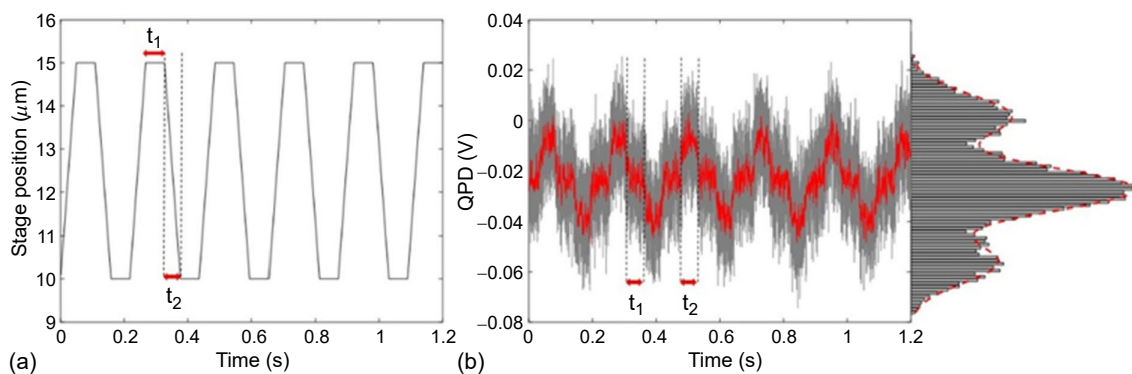


圖 7. 流體力學校正法。

3. 能量密度頻譜

藉由分析小球在雷射中心之熱運動 (圖 8(a))，得到能量密度頻譜 (圖 8(b))，其能量密度頻譜之轉折頻率可以知道雷射提供多大之彈力常數 $k^{(5)}$ ，其中轉折頻率 $f_c = k/2\pi\gamma$ (Hz)， k 為彈力常數 (pN/nm)， γ 為小球受到之摩擦係數 (Pa·s)，小球運動之位置能量密度頻譜可由下面推導而得。此法特色為可將熱運動以外之飄移減少影響 (不要擬合低頻即可)，同時可以看出系統是否有其他雜訊；校正時與其他兩種方法不同，此法不需知道 QPD 靈敏度，但須知道溶液黏度。

推導可由小球之受力方程式出發且忽略高頻之慣性項 $m \frac{d^2 x(t)}{dt^2}$

$$F(t) - kx(t) - \gamma \frac{dx(t)}{dt} = 0 \quad (14)$$

自相關函數 $\phi(\tau)$ 可得

$$\Phi(\tau) = \langle x(t_1)x(t_2) \rangle = \frac{A}{2k\gamma} e^{-\frac{k}{\gamma}|\tau|} \quad (15)$$

其中 $\tau = t_2 - t_1$ 。

單邊能量密度頻譜 S_0 可由自相關函數之傅立葉轉換得到，故

$$\int_{-\infty}^{\infty} dt e^{-2\pi i f t} \phi(t) \equiv S(f) = 0.5 S_0(f) \quad (16)$$

$$S_0(f) = \frac{D/\pi^2}{f_c^2 + f^2}, f \geq 0 \quad (17)$$

其中擴散係數 $D \equiv (k_B T)/\gamma$ 、 $f_c \equiv k/2\pi\gamma$ 。

當 $f \ll f_c$ 時， $S_0(f)$ 約為一常數 D/π^2 ，當 $f \gg f_c$ 時， $S_0(f)$ 約以二次方衰退， f_c 為能量衰退為一半時之頻率，又或是一秒鐘約有 f_c 個相互獨立的位置樣本。 f_c 與雷射提供之彈力常數成正比，與溶液環境之摩擦係數成反比。

圖 8(a) 不同雷射強度下之自由小球在光腰中心的位置座標。圖 8(b) 在不同雷射強度下的單邊能量密度頻譜，由小到大依次為紅綠藍。擷取頻率 $F_s = 131072$ Hz，頻率解析度 $df = 8$ Hz。此圖曲線下積分面積為位置的標準差 $\langle x^2 \rangle = k_B T/k$ ，可看出雷射強度增加，位置的不

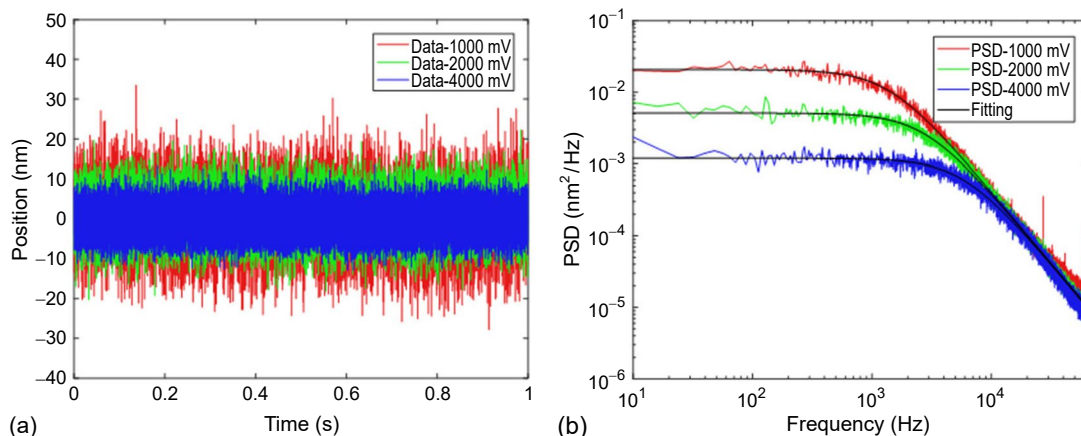


圖 8. 能量密度頻譜法測定雷射彈力常數 k 。

準度會下降，當 $f \ll f_c$ 時 $S_0(f) \approx (D/\pi^2) / f_c^2$ ，約為一常數(直線)且與 f_c 平方反比，故藍色線較紅、綠色線低；當 $f \gg f_c$ 時 $S_0(f) \approx (D/\pi^2) / f_c^2$ ，以 f 平方反比衰減，為一斜直線，僅與小球之擴散係數有關與雷射強度無關，故三條線會幾乎交疊一起衰減。

4. 以 Allan deviation 確立系統之精度

系統主要雜訊來自於小球熱運動之雜訊 (布朗雜訊) 以及平台飄移產生之雜訊，其中布朗雜訊可以藉由平均多個雜亂的數據點來抑制，但是像同一方向或是無法預測之低頻飄移訊號則無法被平均多個數據點來消除，意味著光鉗系統的空間解析度可以藉由平均數據來提高，但平均點數提高的同時時間解析度會下降，同時受限於低頻的飄移雜訊，平均點數提高太多反而可能使空間解析度變差，此關係可以使用 Allan deviation 描述、分析系統中雜訊與平均點數之關係⁽⁶⁾。Allan deviation 定義為

$$\sigma_A(\tau) = \sqrt{\frac{1}{2} \langle (X_{i+1} - X_i)^2 \rangle} > \tau \quad (18)$$

若取樣頻率為 F_s Hz， $\tau = m \times F_s$ 為平均時間、 m 為其中包含的數據點數， x_i 為 m 個點的平均數，其中 x_i 與 x_{i+1} 的時間差距為 τ ， $\langle \dots \rangle_\tau$ 為統計平均， $\sigma_A(\tau)$ 可視為是系統的不準度，一般會隨平均時間 τ 的增加而降低，直至低頻飄移的雜訊顯現時，會再上升；一般而言，當使用的平均時間 τ 變大時，因為 x_i 的數量變少，Allan deviation 的曲線開始變的不平滑 (誤差上升)，所以可以在切割時間窗時可以使用固定窗格 (fixed window) 或是移動窗格 (sliding window)，對應的名稱為 normal Allan deviation 及 overlapping Allan deviation。

以 3281 bp 雙股 DNA 被動式定力鉗之時間軌跡圖，灰色線為 4000 Hz 的數據點，而紅色線為 80 Hz 的數據點，綠色線為 $\tau^{-1/2}$ 之曲線，若在 $\tau < 100$ ms 時、飄移雜訊不明顯，被動式定力鉗下的雜訊與平均時間的關係斜率應與綠色線接近。圖 9(a) 以定力 46 pN 抓住一顆單分子栓球，記錄其 DNA 伸長量。圖 9(b) 將圖 9(a) 的數據做 Allan deviation，可看到要抑制不準度到達 1 nm 約需要 40 ms 去做平均，其中藍色線為 normal Allan deviation，因為時間加大時樣本為不夠，造成訊號較多雜訊，而紅色線為 overlapping Allan deviation，因為使用 sliding window 得到 Allan deviation，統計平均較足夠，可看出相對平滑許多。

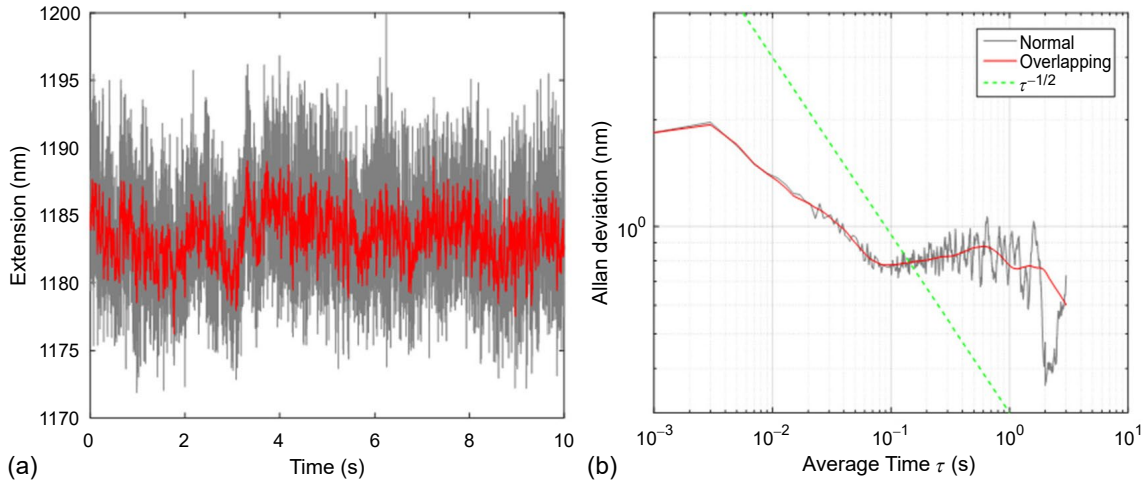


圖 9. 被動式定力鉗模式下 3281 bp DNA 在 46 pN 下之解析度分析。

四、F-x curve 實驗及應用：量測單一DNA 分子之長度與硬度

一般之雙股 DNA 可視為性質均勻之聚合物，其力學性質可主要由 worm-like chain 公式中的三個參數所描述， L_c 為真實長度，描述聚合物沿著其骨架計算的長度； L_p 為彎折硬度，描述聚合物其真實長度切線向量的相關度 $\sim e^{-1/L_p}$ ， L_p 越大表示相關度衰退的越慢，即此聚合物越不易彎折，在小於 5 pN 時對拉伸難易度有顯著影響； K 為拉伸硬度，描述聚合物拉伸過程的伸長量是否容易超過其真實長度， K 越大表示越難拉伸變長，通常於 5–50 pN 主導雙股 DNA 拉伸的難易度。

雙股 DNA 與單股 DNA 根據文獻有已知的力學性質，分析雙股 DNA 之力學性質有助於了解光鉗系統是否能準確量測 DNA 之伸長量，根據文獻資料，雙股 DNA 之真實長度 $L_c = 0.338 \text{ nm/nt}$ 、彎折硬度 $L_p = 45 - 55 \text{ nm}$ 、拉伸硬度 $K = 1000-1500 \text{ pN}^{(2,7)}$ 。

• Marko-Siggia worm-like chain (M-S WLC)

$$F = \frac{k_B T}{L_p} \left[\frac{1}{1(1-x/L_c)^2} - \frac{1}{4} + \frac{x}{L_c} \right] \quad (19)$$

想像聚合物為一條蠕蟲般蜷曲，需要施力才能將它拉長^(7, 8)；理論只考慮聚合物本身之熵（組態數），聚合物受力伸長因而減少本身的聚合物鍊的彎折方向、組合數，意即做功減少熵，在 $F \rightarrow \infty$ 時 $x \rightarrow L_c$ ；不考慮大於 5 pN 後聚合物本身亦會受力而像彈簧一般變長、產生形變，意即不考慮焓(形變)之變化。

適用於 $F \ll \frac{1}{4} \left(\frac{k_B T K^2}{L_p} \right)^{\frac{1}{3}} \approx 12.7 \text{ pN}$ ，一般適用範圍約為擬合曲線小於 5 pN 之區域 (圖 9(b))，若擬合範圍大於 5 pN 會使參數 L_p 顯著下降，造成顯著的誤差。

• Odijk extensible worm-like chain (eWLC)

$$x = L_c \left[1 - \frac{1}{2} \left(\frac{k_B T}{F L_p} \right)^{\frac{1}{2}} + \frac{F}{K} \right] \quad (20)$$

同時考慮施力過程熵和焓的理論方程式 (9)，適用於較高的施力範圍，一般需大於 2 pN (圖 9(a))，且由於雙股 DNA 會產生變為單股或 S-DNA 的相變，擬合時需要將約 50 pN 以上之數據點排除，本篇擬合 5–45 pN 的數據可得到與 Marko-Siggia worm-like chain 相似之真實長度與彎折硬度。

• Smith extensible freely-jointed chain (eFJC)

$$x = L_c \left[\coth \left(\frac{2FL_p}{k_B T} \right) - \frac{k_B T}{2FL_p} \right] \left(1 + \frac{F}{K} \right) \quad (21)$$

同樣為考慮施力過程熵和焓的理論方程式 (10)，本篇適用範圍亦為 5–45 pN，與 WLC 不同的地方為聚合物鍊是一節一節不可彎折之棍棒串接而成，雖然對雙股 DNA 的描述很差，但能夠對單股 DNA 的性質有較好的描述，根據文獻資料，單股 DNA 之真實長度 $L_c = 0.56 \text{ nm/nt}$ 、彎折硬度 $L_p = 0.75 \text{ nm}$ 、拉伸硬度 K 為 800 pN(10,11)。

• Modified worm-like chain (mWLC)

$$F = \frac{k_B T}{L_p} \left[\frac{1}{4 \left(1 - \frac{x}{L_c} + \frac{F}{K} \right)^2} - \frac{1}{4} + \frac{x}{L_c} - \frac{F}{K} \right] \quad (22)$$

同樣為考慮施力過程熵和焓的理論方程式 (2)，不同的是適用範圍為 0–45 pN，由低到高的施力範圍都能很好的描述 DNA 拉伸的實驗數據 (圖 10(a)、10(b))，唯操作較困難之點為，此方程為隱函數方程，施力出現在等號左右兩邊，必須使用隱函數求解方式，本篇使用 Matlab 內建函數 lsqcurvefit 實現，得到之三組參數 (L_p 、 L_c 、 K) 與 Marko-Siggia worm-like chain 及 Odijk extensible worm-like chain 誤差皆在預期數值 1% 內 (圖 10(c))。

使用 DNA 為 3281 bp 雙股 DNA，相同一組數據但不同 WLC 模型的擬合結果，M-S WLC 的擬合範圍為 $\text{force} < 5 \text{ pN}$ ，eWLC 的擬合範圍為 $5 \text{ pN} < \text{force} < 45 \text{ pN}$ ，mWLC 的擬合範圍為 $\text{force} < 45 \text{ pN}$ ，可發現 M-S WLC 在高施力的範圍與實驗數據擬合結果非常差，而 eWLC 則相反，在低施力的範圍誤差很大，僅有 mWLC 在全段區域都貼合數據點。圖 10(a) 全段區域的擬合線，綠色線為 M-S WLC 式 (79)、藍色線為 eWLC 式 (80)、紅色線為 mWLC 式 (81)，可看到在高施力的範圍，僅有 M-S WLC 偏離真實數據點。圖 10(b) 僅畫出 $\text{force} < 5 \text{ pN}$ 的區域，可發現僅有 eWLC 偏離真實數據點。圖 10(c) 此組數據的擬合結果，可以看到三種擬合公式只要在其適用的範圍內操作，都與預期數值相近 (相距 $< 1\%$)。

• mRAD51-DNA 核蛋白絲力學性質

RAD51 參與同源重組反應，RAD51 與 ATP 結合後會增加對 DNA 的親和力並形成核蛋白絲，RAD51 在 ATP 水解之後會變為對 DNA 親和力低的構型，使得核蛋白絲變得不穩定，若在 ATP 加鈣離子的條件下之抑制 ATP 的水解，在此條件下核蛋白絲視為整條長滿 RAD51 之均勻同質的聚合物，藉由拉伸曲線得到 mRAD51 核蛋白絲之力學性質。在鈣離子存在的情況下，可發現通入 mRAD51 後，變成完全被 mRAD51 覆蓋滿的雙股 DNA (圖 11)，可看到在 65 pN 附近的雙股 DNA 過度拉伸態 (overstretching transition) 消失，表示

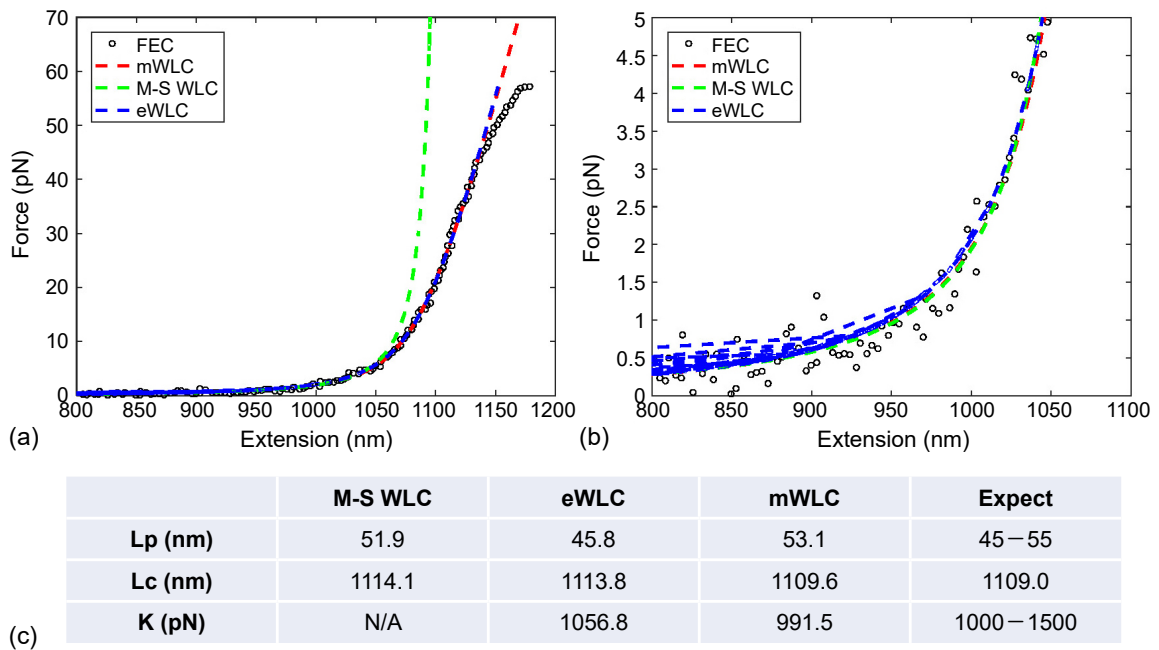


圖 10. 三種 worm-like chain 模型擬合結果。

mRAD51 的確覆蓋滿雙股 DNA，延長了 DNA 的真實長度約 1.5 倍，與文獻報導相同^(12, 13)，同時提升原本 DNA 之硬度，且加入輔助蛋白而後形成的核蛋白絲並沒有產生太大的不同(表 1)。

將原始伸長量除以雙股 DNA 本身之鹼基數，得到 nm/bp 為單位之歸一化的伸長量。黑色數據點為雙股 DNA，紅色五角形數據點為覆蓋滿 mRAD51 之雙股 DNA。以 3281 bp 雙股 DNA。加入蛋白後的拉伸曲線皆無在 65 pN 附近的雙股 DNA 過度拉伸態的存在，且 Lc 變長約 1.5 倍，證明整條 DNA 被蛋白完全覆蓋滿。

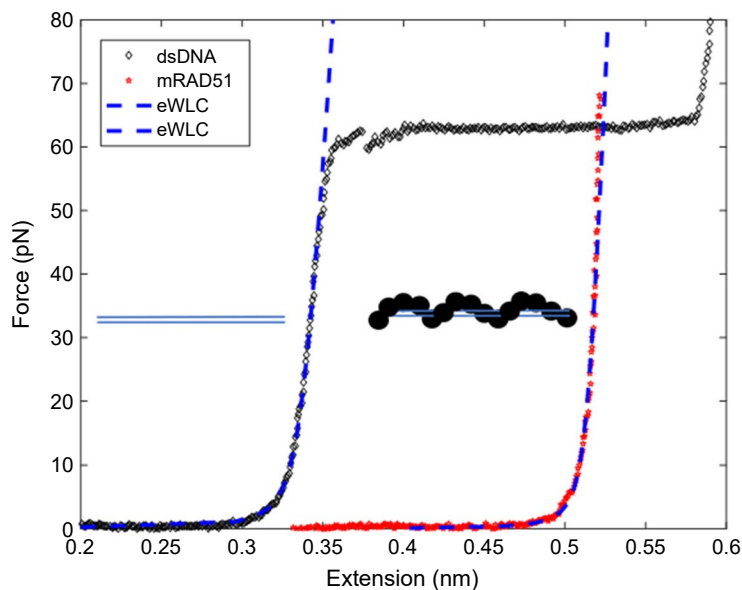


圖 11. mRAD51 在 ATP 加 Ca^{2+} 的情況下形成核蛋白絲的拉伸曲線。

表 1. mRAD51 在不同輔助蛋白下形成核蛋白絲之力學性質統計。

	mRAD51 (N = 4)
Lp (nm)	206.9 ± 6.4
Lc increase (fold)	1.51 ± 0.027
K (pN)	3213 ± 532

五、被動式定力鉗實驗及應用：觀察DNA二級結構之摺疊與解構

若是使用被動式定力鉗⁽¹⁴⁾ 則可以不需要使用壓電平台或是任何外源的回饋系統來達成定力，減少系統的複雜度，且此時時間解析度決定於 DAQ 取樣頻率及 QPD 響應速度，可達最高 150 kHz。其原理是利用光腰外側的非簡諧區域達成定力，此區域約 50 nm 且彈力常數趨近於 0，故 DNA 結構改變使的小球與光腰中心之距離改變時，DNA 上的張力並不會改變，此時能獨立精準地量測二級結構的變化。例如，將一中間接有 20 bp 髮夾型結構 (20R55/T4)⁽¹⁵⁾ 之雙股一單股 DNA，在 13.1 pN 下此二級結構摺疊與解構之分布比例約為 65% : 35% (圖 12)，為單純之雙能階分配。

在 13.1 pN 下，解構態伸長量 $x_u = 1099.9$ nm，摺疊態 $x_f = 1081.7$ ，以此得到此二級結構崩塌產生的伸長量差約 18.2 nm。比例分別約為 35% 及 65%。

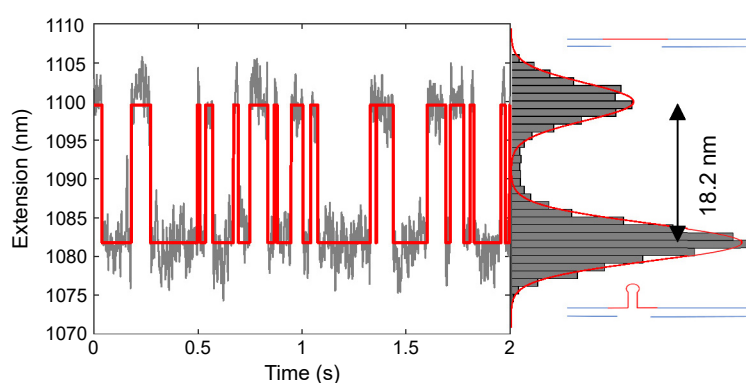


圖 12. 髮夾型結構轉變。

六、結論

單分子光鉗系統可用於研究生物體系中奈米—毫秒尺度的結構變化，相應的一套完整的光鉗系統大致上需要包含，高功率雷射、雷射功率回饋系統、壓電平台、訊號擷取系統以及準確的系統校正才能用於準確的量測，需要自行建立不同儀器單元間的溝通配合程式。

本篇提供完整的光路架設以及系統校正方法用以架設光鉗，以及介紹兩種常使用的實驗方法及其應用，(1) force-extension 的分析可得知聚合物在某狀況下平衡之性質。(2) 利用被動式定力鉗可用於分析動態變化的構型，如 DNA、RNA 或蛋白質之摺疊。

大部分量測解析度都受限於奈米尺度的平台飄移，因此亦有再加入一道雷射取代固定表面的雙光鉗架設，使得表面漂移的雜訊大大降低，用此提高解析度。單分子技術能提供傳統

生化實驗所不能提供的資訊，是機制研究上的一大利器。儘管商用單分子儀器慢慢推出，雖然大量縮短光路架設及程式設計的時間，同時也無法輕易自行升級商用版本的單元物件來提高解析度。若能對儀器本身有充分的了解，亦能更好的解讀實驗數據，發揮設備的最大功效。

參考文獻

1. S. R. Okoniewski, A. R. Carter, and T. T. Perkins, *Methods Mol Biol*, **1486**, 77-107 (2017).
2. M. D. Wang, et al., *Biophys. J.*, **72** (3), 1335-1346 (1997).
3. T. T. Perkins, *Laser Photonics Rev.*, **3** (1-2), 203-220 (2009).
4. K. Svoboda, S. M. Block, *Annu. Rev. Biophys.*, **23** (1), 247-285 (1994).
5. K. Berg-Sorensen, H. Flyvbjerg, *Rev. Sci. Instrum.*, **75** (3), 594-612 (2004).
6. F. Czerwinski, A. C. Richardson, L. B. Oddershede, *Opt. Express*, **17** (15), 13255-13269 (2009).
7. C. Bustamante, et al., *Science*, **265** (5178), 1599 (1994).
8. J. F. Marko, E. D. Siggia, *Macromolecules*, **28** (26), 8759- 8770 (1995).
9. T. Odijk, *Macromolecules*, **28** (20), 7016-7018 (1995).
10. S. B. Smith, Y. Cui, C. Bustamante, *Science*, **271** (5250), 795 (1996).
11. S. R. Okoniewski, L. Uyetake, T. T. Perkins, *Nucleic Acids Res*, **45** (18), 10775-10782 (2017).
12. T. van der Heijden, et al., *Nucleic Acids Res.*, **35** (17), 5646-5657 (2007).
13. J. Hilario, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **106** (2), 361 (2009).
14. W. J. Greenleaf, et al., *Phys. Rev. Lett.*, **95** (20), 208102 (2005).
15. M. T. Woodside, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **103** (16), 6190 (2006).

作者簡介

張晏展先生為台灣大學化學系碩士。

Yen-Chan Chang received his M.S. in Chemistry from National Taiwan University.

周冠廷先生現為台灣師範大學機電工程系碩士生。

Kuan-Ting Chou is currently a M.S. student in Department of Mechatronic Engineering at National Taiwan Normal University.

吳順德先生為交通大學電機控制工程博士，現為台灣師範大學機電工程系副教授。

Shuen-De Wu received his Ph.D. in Electrical and Control Engineering from National Chiao Tung University. He is currently a professor in Department of Mechatronic Engineering at National Taiwan Normal University.

李弘文先生為加州柏克萊大學化學系博士，現為台灣大學化學系教授。

Hung-Wen Li received his Ph.D. in Chemistry from University of California at Berkeley, USA. He is currently a professor in Department of Chemistry at National Taiwan University.