



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102947005 A

(43) 申请公布日 2013. 02. 27

(21) 申请号 201180031020. X

C12Q 1/68 (2006. 01)

(22) 申请日 2011. 06. 21

G01N 33/543 (2006. 01)

(30) 优先权数据

G01N 27/72 (2006. 01)

2004928 2010. 06. 21 NL

G01R 33/12 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 12. 21

(86) PCT申请的申请数据

PCT/NL2011/050446 2011. 06. 21

(87) PCT申请的公布数据

W02011/162603 EN 2011. 12. 29

(71) 申请人 代尔夫特工业大学

地址 荷兰代夫特

(72) 发明人 宁克·德克尔 雅各布·克西马克尔

扬·利普弗特

(74) 专利代理机构 北京品源专利代理有限公司

11332

代理人 杨生平 巩克栋

(51) Int. Cl.

B03C 1/033 (2006. 01)

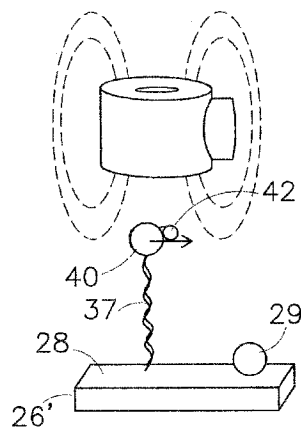
权利要求书 2 页 说明书 12 页 附图 9 页

(54) 发明名称

确定大分子的一个或多个表征特征的方法和实现所述方法的装置

(57) 摘要

本发明涉及使用磁场确定大分子的一个或多个表征特征（特别地核酸如 DNA 的转矩和 / 或缠绕）的方法和装置。



1. 一种确定大分子 (37) 的一个或多个表征特征的方法,所述方法包括下列步骤:
 - a) 为大分子 (37) 的第一端提供顺磁标记 (40),由此形成大分子-顺磁标记-组合体;
 - b) 将所述大分子-顺磁标记-组合体的大分子 (37) 的至少一个其他端与支持大分子 (37) 的所述其他端的支持物 (22) 的一个或多个系链点系链,所述系链点位于 x, y 平面中以便所述大分子-顺磁标记-组合体基本上以与 x, y 平面正交的 z 向,在基本上与 x, y 平面正交排布的主磁体 (12) 和所述支持物 (22) 的表面之间排布,其中所述主磁体 (12) 的极 (14,16) 沿着 z 向排布并且其中所述主磁体在所述大分子-顺磁标记-组合体的位置产生基本上 z 向指向的磁场;
 - c) 确定在由所述主磁体 (12) 产生的磁场中所述大分子-顺磁标记-组合体的所述顺磁标记 (40) 的起始位置;
 - d) 将所述主磁体 (12) 绕其磁轴旋转,由此使得所述顺磁标记 (40) 绕所述主磁体 (12) 的磁轴旋转至测量位置;
 - e) 确定所述大分子-顺磁标记-组合体的所述顺磁标记 (40) 的测量位置;
 - f) 从所述测量位置计算一个或多个表征特征;其中步骤 a) 中所述顺磁标记 (40) 直接与所述大分子 (37) 连接。
2. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述表征特征是转矩并且其中所述顺磁标记 (40) 具有允许确定就步骤 e) 中所述起始位置而言所述测量位置上 x, y 平面中顺磁标记 (40) 的位置上的角偏差的角追踪标记 (42)。
3. 根据权利要求 2 所述的方法,在步骤 c) 之前还包括借助于副磁体 (19) 产生辅助磁场的步骤。
4. 根据权利要求 3 所述的方法,其中所述副磁体 (19) 靠近所述主磁体 (12) 排布,以使得所述副磁体 (19) 的极 (14,16) 与所述主磁体 (12) 的极 (14,16) 相反。
5. 根据权利要求 3 所述的方法,其中所述副磁体 (19) 是包含两个以水平的 x 向延伸的间隔开的 x 线圈 (51) 和两个以水平的 y 向延伸的间隔开的 y 线圈 (52) 的电磁线圈 (51,52) 的组合物,其中,所述电磁线圈 (51,52) 由电流源 (53) 经由电线 (54) 供电,其中所述电磁线圈 (51,52) 以所述支持物 (22) 包埋在所述电磁线圈 (51,52) 所包围的空间中的方式放置。
6. 根据权利要求 3-5 中任一项所述的方法,其中所述主磁体 (12) 的磁力和所述副磁体 (19) 的磁力的强度比在 10000 : 1 至 10 : 1 的范围内。
7. 根据权利要求 1 所述的方法,其中在步骤 b) 中所述系链点与所述主磁体 (12) 的磁轴成一线并且所述表征特征是缠绕。
8. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述主磁体 (12) 和所述支持物 (22) 的系链点可相关地定位以使所述主磁体 (12) 的磁轴和所述系链点重合。
9. 根据权利要求 8 所述的方法,其中所述主磁体 (12) 的磁轴和所述系链点在 $0.1 \mu\text{m}$ 的界限内重合。
10. 根据前述权利要求中的任一项所述的方法,其中所述大分子-顺磁标记-组合体的所述顺磁标记 (40) 和 / 或角追踪标记 (42) 包含一个或多个可见元素并且其中所述一个或多个可见元素被用作将所述大分子-顺磁标记-组合体的旋转可视化的工具。
11. 根据前述权利要求中的任一项所述的方法,其中大分子 (37) 是聚核苷酸部分或与

一个或多个蛋白部分络合的聚核苷酸部分。

12. 用于实行根据前述权利要求中的任一项所述的方法的装置 (10), 所述装置 (10) 包含:

- 用于支持大分子 (37) 的支持物 (22), 所述支持物 (22) 包含与大分子 (37) 的至少一端系链的一个或多个系链点, 所述系链点位于 x, y 平面以使所述大分子 - 顺磁标记 - 组合体基本上以垂直于 x, y 平面的 z 向在基本上垂直于 x, y 平面排布的主磁体 (12) 和所述支持物 (22) 的表面之间排布;

- 用于产生向大分子 (37) 施力的磁场的主磁体 (12), 所述主磁体 (12) 可绕其磁轴旋转并在距所述支持物 (22) 可控制的距离排布; 所述磁轴垂直于支持物的 x, y 平面排布, 其中所述主磁体 (12) 的极 (14, 16) 以 z 向排布并且其中所述主磁体 (12) 在所述大分子 - 顺磁标记 - 组合体的位置产生基本上 z 向定向的磁场;

- 用于旋转所述主磁体 (12) 的工具; 和

- 用于将与所述顺磁标记 (40) 和 / 或所述角追踪标记 (42) 的位置相关的信息成像的成像工具 (32)。

13. 根据权利要求 12 所述的装置 (10), 其还包含副磁体 (19) 以便允许所述大分子 (37) 具有顺磁标记 (40) 以在旋转所述主磁体 (12) 时旋转。

14. 根据权利要求 13 所述的装置 (10), 其中所述副磁体 (19) 是与所述主磁体 (12) 的一侧相连接的永磁体。

15. 根据权利要求 14 所述的装置 (10), 其中所述副磁体 (19) 是包含两个以水平的 x 向延伸的间隔开的 x 线圈 (51) 和两个以水平的 y 向延伸的间隔开的 y 线圈 (52) 的电磁线圈 (51, 52) 的组合体, 其中, 所述电磁线圈 (51, 52) 由电流源 (53) 经由电线 (54) 供能, 其中所述电磁线圈 (51, 52) 以所述支持物 (22) 包埋在所述电磁线圈 (51, 52) 所包围的空间中的方式放置。

16. 根据权利要求 13-15 中任一项所述的装置 (10), 其中所述主磁体 (12) 的磁力和所述副磁体 (19) 的磁力的强度比在 10000 : 1 至 10 : 1 的范围内。

17. 根据权利要求 12 所述的装置 (10), 其中所述主磁体 (12) 的磁轴和所述支持物 (22) 的系链点可相关地定位以使所述主磁体 (12) 的磁轴和所述系链点重合, 优选地在在 0.1 μm 的界限内。

确定大分子的一个或多个表征特征的方法和实现所述方法的装置

技术领域

[0001] 本发明涉及确定大分子的一个或多个表征特征的方法。本发明进一步涉及用于实现所述方法的装置。

背景技术

[0002] 从 Celedon 等人 (Magnetic tweezers measurement of single molecule torque (单分子转矩的磁镊测量), Nano Letters, 9(2009), 1720-1725) 获知这样的方法和装置, 其公开了使用垂直排布的圆柱状磁铁和与大分子连接的探针测量由小珠上的单个大分子产生的转矩的方法。探针由具有与 $1\ \mu\text{m}$ 超顺磁性小珠偶联的强磁性 Ni 段的 Ni-Pt 纳米棒构成。纳米棒起到不对称引入连接部分的作用。Ni 段和超顺磁性小珠之间的偶联是它们之间磁性连接的结果。这意味着 Ni 段和超顺磁性小珠之间的偶联可以由自组装引起。探针使用电化学模板技术单独制备。

[0003] 大分子位置上的磁场主要是垂直指向的, 而不是传统磁镊中水平指向的。由于垂直指向的磁场, 探针经历角阱的低扭转刚度。这允许确定探针方向的角偏差。在传统的磁镊方法中, 水平面中顺磁标记的方向必须由磁场来确定, 因为受到所连接的大分子影响的任何转矩的影响 (在 Celedon 等人, 双螺旋 DNA 的实例中) 太小而难以测量。在 Celedon 测量设备中, 大分子连接的基底是旋转的以便引起大分子中的旋转并且测量所测试的大分子的所获得的转矩和其他特征。据信这一构型允许 $< 1\text{pN}\cdot\text{nm}$ 的转矩分辨率。

[0004] 根据 Celedon 的方法的缺点在于大分子 - 纳米棒 - 小珠 - 组合体是麻烦、费力并费时的。

[0005] 另一个缺点在于制备纳米棒需要具有多个电镀槽的电镀装置形式的特殊器材和方法。

[0006] 还有另一个缺点在于为了将转矩应用于所研究的 DNA 分子, 玻璃基底 (例即流通池) 必须绕磁轴转动。这些转动引起在敏感的单分子实验中非常不期望的机械振动。

[0007] 仍有另一个缺点在于期望构造复杂性表示显微镜可见的适合的结构的低的产量或密度。这与磁镊的广为接受的优点即同时观察并且测量许多大分子组合体的可能性相反。

[0008] 另外的缺点在于组合体非常非球面的性质, 其使得追踪并实施通常以球形或近球形物体的假设为依据的校准程序变得困难。

[0009] Celedon 等人所描述的装置限制于 1.5pN 或更小的张力并且具有约 50nm 的 z - 向分辨率。

发明内容

[0010] 本发明的目的在于提供显示较小程度或完全没有上文缺陷的测量方法。

[0011] 更具体地, 本发明的目的在于提供由于较不复杂的探针制备和这一制备与定义明

确商业上可获得的颗粒的相容性而较易进行的测量方法。

[0012] 本发明的另一个目的在于提高测量结果的准确性。

[0013] 另外的目的在于提供允许测量大分子扭曲的测量方法。

[0014] 另外的目的在于尽可能接近地保留广为接受的拉力校准程序。

[0015] 本发明的还有另一个目的在于提供用于实行根据本发明的方法的装置,尤其是用于测量大分子中的转矩和 / 或扭曲。

[0016] 上文目的中的一个或多个使用根据本发明的测定大分子的一个或多个表征特征的方法来实现,所述方法包括下列步骤:

[0017] a) 为大分子的第一端提供顺磁标记,由此形成大分子 - 顺磁标记 - 组合体;

[0018] b) 将大分子 - 顺磁标记 - 组合体的大分子的至少一个其他端与支持大分子的所述其他端的支持物的一个或多个系链点系链,所述系链点位于 x, y 平面中以便大分子 - 顺磁标记 - 组合体基本上以与 x, y 平面正交的 z 向,在基本上与 x, y 平面正交排布的主磁体和支持物的表面之间排布,其中主磁体的极沿着 z 向排布并且其中主磁体在大分子 - 顺磁标记 - 组合体的位置产生基本上 z 向指向的磁场;

[0019] c) 确定在由主磁体产生的磁场中大分子 - 顺磁标记 - 组合体的顺磁标记的起始位置;

[0020] d) 将主磁体绕其磁轴转动预定数目次数,由此使得顺磁标记绕主磁体的磁轴转动,到测量位置;

[0021] e) 确定大分子 - 顺磁标记 - 组合体的顺磁标记的测量位置;

[0022] f) 从所述测量位置计算一个或多个表征特征;

[0023] 其中步骤 a) 中顺磁标记直接与大分子连接。

[0024] 根据本发明,顺磁标记直接与大分子连接,其一方面允许力和转矩应用于大分子,另一方面允许大分子的检测和转动。

[0025] 所述转矩通过旋转主磁体应用。旋转主磁体而不是如 Celedon 等人中的旋转支持物的好处在于不引入将严重破坏本申请中所描述的单分子测量的精确性的机械振动。

[0026] 申请人发现大分子 - 顺磁标记 - 组合体允许在大的拉力范围 (例如 0.1pN-10

[0027] p) 的弱角阱中确定顺磁标记的起始位置和测量位置。通常以 100-500pN. nm/rad 的角阱 $k_{\text{旋转}}$ 的刚度进行所述方法,产生平衡附近 $> 5^\circ$ 的起伏。这允许直接观察由大分子表现出的转矩所引起的平衡角中的偏移。

[0028] 更具体地,磁场中的顺磁标记经受归因于磁场的梯度的恒定向上的力 F ,其通过大分子系链的恢复力来平衡。此外,标记绕 z 轴的旋转 (沿拉伸的大分子的方向) 是由磁场驱使的。扭转阱 $k_{\text{旋转}}$ 可以通过观察标记的旋转热波动 ($\delta \theta^2$) 并且应用能量均分定理 ($k_{\text{旋转}} = k_B T / (\delta \theta^2)$) 来校准,其中 k_B 是玻尔兹曼常数而 T 是温度。如果大分子系链通过旋转磁体被过旋或欠旋,大分子将对顺磁标记施加回复转矩 T_{DNA} 。校准扭转松弛的大分子的阱刚度和阱的平衡角 θ_0 之后, $T_{\text{大分子}}$ 可从偏离这一平衡的平均角 ($\theta - \theta_0$) 的偏移来确定。 $T_{\text{大分子}} = k_{\text{旋转}} (\theta - \theta_0)$,在磁场的所述旋转之后。

[0029] 大分子可以是聚核苷酸部分,另一种天然高分子或寡聚物以及甚至合成的聚合物或寡聚物。这些聚合物特别是天然聚合物可以是非天然构型的,即分子处于自然界中不存在的构型。非天然构型的天然聚合物的实例是由 Douglas 等人 (Nature, 459 (2009),

414-418) 提出的 DNA 折纸构型。

[0030] 同样用于根据本发明的方法的磁镊的优点中的一个磁镊方案允许多个大分子的平行测量。有利地,使用根据本发明的方法可以测量具有与其连接的顺磁标记的大分子的阵列,例如包含大分子的膜,其上的顺磁标记已经与大分子中的一些连接。

[0031] 通常,根据本发明的方法被用于包含顺磁标记可与其连接的两个或更多个互相缠绕的链的大分子,例如 DNA 或 RNA。在本发明的上下文中,大分子同样可以是两个或更多个大分子的络合物,例如与一个或多个蛋白质分子络合的聚核苷酸部分,诸如染色质。优选地,大分子是聚核苷酸部分或聚核苷酸部分-蛋白质络合物。聚核苷酸-蛋白质络合物在细胞过程中起到重要作用,例如在涉及 DNA 或 RNA 的复制、转录和修复的过程中。在这些类型的过程中,处于其物理上稳定的螺旋状态的 DNA 或 RNA 的相互缠绕被破坏。这一方法,不同类型的蛋白质可与 DNA 或 RNA 链偶联并且获取其信息。这些蛋白质的实例是拓扑异构酶、螺旋酶和聚合酶。

[0032] 在根据本发明的方法的步骤 a) 中,为大分子的第一端提供顺磁标记,通过尝过化学成键。大分子和顺磁标记之间有用的非共价键的实例是蛋白质-配体键,例如生物素-链霉亲和素键。

[0033] 顺磁标记直接与大分子连接。在本发明的背景下,将顺磁标记与大分子直接连接同样包含使用中间分子部分以使得顺磁标记能够与大分子连接和/或增强顺磁标记与大分子的连接。这样的中间分子部分之后作为分子胶粘剂起作用,类似用于与相连接两块砖的灰泥。应注意的是所述中间分子部分仅适用于特定连接的目的。与顺磁标记和大分子的直径相比中间分子部分具有小的直径,即中间分子部分应当具有比顺磁标记的直径小约 10 倍或更小的典型直径。通常,中间分子应当具有 5 和 500nm 之间,优选地 100 和 250nm 之间的直径。例如,当将顺磁标记与 DNA 构建体连接时,DNA 构建体有利地在各个端与功能化的具有例如多个生物素基团的 DNA PCR 片段连接。顺磁标记之后用链霉亲和素或中性亲和素功能化。可使用的其他的蛋白质-配基键是地高辛-抗地高辛键或荧光素-抗荧光素键。

[0034] 应注意到使用中间分子部分将顺磁标记与大分子连接与使用纳米棒组合体将大分子与顺磁标记连接的 Celedon 等人的情况不同。纳米棒组合体,与 0.1 μ m Ni 段连接的 2 μ m Ni-Pt 纳米棒是纳米棒-顺磁标记-大分子-组合体实际上的功能机械部分。需要纳米棒使得大分子可以旋转并且检测大分子的旋转。不用纳米棒,测量不到转矩。这与在确定顺磁标记的位置或方向中不起作用的中间分子部分不同。如果化学上可能,中间大分子部分可以被去掉。

[0035] 除此之外,根据 Celedon 等人的纳米棒本身借助于上文中间大分子部分即借助于中性亲和素-生物素/地高辛键而与大分子连接。

[0036] 最终,根据 Celedon 等人的纳米棒具有约 2 μ m 的长度,其比根据本发明的中间分子部分大得多。

[0037] 因此,本申请的上下文中,纳米棒并不类似于中间分子部分。

[0038] 优选地,用于将大分子系链于支持物的表面的蛋白质-配基键没有干扰用于将大分子固定于顺磁标记的蛋白质-配基键。

[0039] 顺磁标记可以是球状颗粒,但是顺磁标记同样可以具有另一种形状,例如立方体的或不规则的。当实行测量可通过假定颗粒是更加球状或较少球状而简化时,类似小珠的

球状颗粒具有遵循校准程序的优点。

[0040] 顺磁标记的顺磁特征可以是制得顺磁标记的材料的固有特性。有利地,顺磁标记包含聚合物基质,包含例如包埋的铁顺磁微粒例如分子或细粒。也可以使用用顺磁涂层包被的非磁性载体。优选地,聚合物是聚苯乙烯。链霉亲和素包被的 Dynabeads® (Invitrogen) 是实例。

[0041] 有利地,大分子-顺磁标记-组合体的顺磁标记包含可见元素以有利于将大分子-顺磁标记-组合体的旋转可视化。可视化可以通过荧光化合物获得,例如通过用荧光分子和/或细粒包埋顺磁标记。

[0042] 大分子-顺磁标记-组合体可以使用标准的即商业上可得的技术和材料容易地制备。而且,大分子-顺磁标记-组合体的制备可以在短时间内完成,而无需合成纳米棒以允许顺磁标记的角跟踪。根据本发明,顺磁标记与大分子连接而无需插入不对称引入连接。根据本发明的方法的另一个优点是其允许每单位面积上高密度的适合的组合体。使用根据本发明的方法可测量约每 40 平方微米 1 个分子。当用具有 $60 \times 44 \mu\text{m}^2$ 视场的 100x 物镜将组合体成像时,这意味着可同时测量 60 个组合体。应当认识到根据本发明的方法不限于使用将顺磁标记功能化的偶联部分,还可使用形成部分的其他配基-蛋白质键。

[0043] 具有顺磁标记的大分子形成大分子-顺磁标记-组合体。在权利要求 1 的步骤 b) 中,这一组合体系链于支持物例如玻璃板诸如显微镜盖玻片的一个或多个系链点。通常这一系链通过将大分子不具备顺磁标记的一端与所述一个或多个系链点化学连接来完成。优选地,组合体与多于一个系链点系链,因为将组合体与一个系链点系链允许组合体或多或少自由地绕系链旋转。同时,在包含多个地高辛标记的任一个实例中,可以通过对支持物和/或大分子例如地高辛功能化的 DNA PCR 片段或地高辛功能化的 RNA 转录物的各个端的表面适当修饰来使得能够连接和/或增强连接。为了将大分子-顺磁标记-组合体系链于支持物的系链点,优选地包含系链点的支持物的表面同样被功能化,例如用抗地高辛基团。

[0044] 系链点位于 x,y 平面中以使大分子-顺磁标记基本上以垂直于 x,y 平面的 z 向在基本上垂直于 x,y 平面排布的主磁体和支持物的表面之间排布。主磁体产生的磁场基本上在大分子-顺磁标记-组合体的位置指向 z 向。有利地,主磁体置于支持物之上以使 z 向与垂直方向。施加在大分子-顺磁标记-组合体的顺磁标记上的拉力取决于主磁体和顺磁标记之间 z 向的距离,即距离越小,施加在顺磁标记上的拉力越高。因此,越准确地控制主磁体和顺磁标记之间距离,就可以越准确地控制所施加的力。在根据本发明的方法中,可以约 $1 \mu\text{m}$ 的精确度确立主磁体和顺磁标记之间的距离。在根据本发明的方法的步骤 c) 中,大分子-顺磁标记-组合体的顺磁标记的起始位置在主磁体产生的磁场中确定。这一起始位置不是固定的位置而是时间平均位置。磁场中顺磁标记的位置由于热波动而波动。在起始位置,大分子可以处于其扭曲松弛状态。另一个可能性是将大分子预旋至起始位置并且之后实行根据本发明的方法。

[0045] 在根据本发明的方法的步骤 d) 中,主体磁体绕其主要磁轴旋转预定数目次数。这导致顺磁标记同样绕主磁体的磁轴旋转。磁体旋转预定数目次数 N。在这一上下文中,N 可以是实数。优选地,N 是整数。

[0046] N 次旋转之后,大分子-顺磁标记-组合体的顺磁标记处于测量位置。同样,因为热波动,这一测量位置是时间平均位置。在这一测量位置,大分子-顺磁颗粒标记-组合体

施加恢复转矩。作为这一转矩的结果,通常有差异存在于起始位置和测量位置之间,即起始位置的在 x, y 平面上的位置以及 x, y 平面上的角取向和测量位置之间。所述差异归因于由磁场引起的角阱的低扭曲刚度。

[0047] 如果表征特征是转矩,则需要确定顺磁标记的位置上的不同和角偏差。这可以通过使用顺磁标记形状上的小小的不规则来实现,其使得大分子-顺磁标记组合体不对称并且因此在顺磁标记图像中提供不对称。另一个选择是使用角追踪标记,其同样在顺磁标记图像中提供不对称。不规则和角追踪标记允许确定就步骤 e) 中的起始位置而言测量位置中 x, y 平面中顺磁标记的位置上的角偏差。

[0048] 角追踪标记优选地是非磁性的并且具有能够确定就步骤 e) 中的起始位置而言顺磁标记的测量位置的角偏差的功能。不使用角追踪标记,由所用的磁场引起的顺磁标记的旋转将很难追踪。

[0049] 如同顺磁标记一样,角追踪标记有利地是微粒的,优选地是具有小于顺磁标记尺寸的球体颗粒。这一方法,角追踪标记没有明显地破坏顺磁标记的球体形状。由于校准拉伸程序的追踪和校准程序假定大分子-顺磁标记-组合体的整体球体形状,这是有利的。因此,组合体的整体形状越为球体,校准程序越精确。

[0050] 角追踪标记可包含任选地包含荧光颗粒的聚合物基质,例如荧光化合物和 / 或细粒。这样的标记的实例是 Fluorospheres[®] 微球 (Invitrogen)。这些微球可使用标准生物分析技术与顺磁标记连接。为了将角追踪标记与顺磁标记连接,将所述角追踪标记用生物素功能化,其与链霉亲和素功能化的顺磁标记偶联。通常,当将角追踪标记与顺磁标记连接时,一个或多个角追踪标记与顺磁标记连接。实际上,所述方法的准确性未受到角追踪标记的数目的显著影响。优选地,每个顺磁标记具有所连接的一个角追踪标记。

[0051] 任选地,顺磁标记同样由荧光分子和 / 或细粒包埋。有利地,经由顺磁标记的 CCD 图像的互相关分析优选地追踪顺磁标记的旋转角。

[0052] 可从所测定的顺磁标记的角偏差计算大分子的一个或多个表征特征。这些表征特征的实例是转矩、缠绕、扭转刚度、屈曲转矩和临界转矩例如控制大分子或未与大分子结合的蛋白质部分的相变的那些。应当注意的是在本上下文中,测量的是大分子中引起的缠绕上的变化而不是大分子的缠绕的绝对值。然而为了方便的原因,“缠绕上的变化”被称为“缠绕”。

[0053] 在本发明的优选的实施方案中,确定大分子的转矩,即大分子相应于顺磁标记的预定数目的旋转施加的恢复转矩。

[0054] 出人意料的是,发明人能够应用所述力和转矩而无需 Celedon 等人所描述的纳米棒。在所述文献中,作者宣称转矩取决于探针与大分子的连接点和探针的磁性中心之间的距离的水平分量 L_H (第 1721 页“将旋转控制地引入分子”,图 1 的标题)。由此可见为了能够将转矩应用于大分子, L_H 应当是非零的。然而,当将转矩应用于具有根据本发明的构型的大分子时,大分子可以连接于顺磁标记的南极,意味着没有水平分量 L_H , 并且按照 Celedon 等人,意味着应当不可能将转矩应用于大分子。然而,由于所述使用了与主磁体组合的副磁体,发明人能够将转矩应用于大分子。由副磁体施加的辅助磁场导致由主磁体所产生的磁场中的不对称,当具有与其连接的副磁体的主磁体旋转时,不对称使得顺磁标记旋转。本发明人能够应用转矩,甚至使用具有零水平分量 L_H 的大分子-顺磁标记-组合体,强烈表明

本发明具有创造性。

[0055] 为了使得能够确定所述转矩,辅助磁场借助靠近主磁体排布的所述磁体产生。为了实行原因,磁轴优选地平行排布。这一辅助磁场为主磁体的磁场提供水平分量,为主要垂直定向的场提供足够的不对称以允许顺磁标记的旋转。可以排布所述磁体的极以使所述磁体的任一极是平行的或者所述极与主磁体的极相反。有利地,所述磁体的极与主磁体的极相反排布。

[0056] 所述副磁体可以是永磁体,但也可以是电磁体。

[0057] 优选地,与副磁体所施加的力相比主磁体主要拉伸方向即 z 向的磁力的强度比例在 10,000 : 1 至 10 : 1 的范围内。在这一范围内,副磁体的加入不需要整体磁力的再校准。另外,主磁体所施加的主要拉伸方向 (z) 的磁力和副磁体所施加的横断面方向 (x 或 y) 的磁力的强度比例在 10,000 : 1 至 10 : 1 的范围内。

[0058] 有利地,大分子中有待测量的转矩与阱 $k_{\text{旋转}}$ 的扭曲强度的比例使得测量位置的角向和起始位置的角向之间的差别在 0.1 度至 100 度的范围内优选地在 0.1 度和 10 度之间。

[0059] 有利地,副磁体由包含两个间隔开的在水平 x 向延伸的 x 线圈和两个间隔开的在水平 y 向延伸的 y 线圈的电磁线圈的组合体组成,其中电磁线圈经过电线由电源供能。在这一结构中,放置电磁线圈以使支持物包埋在由所述电磁线圈包围的空间中。

[0060] 在本发明的仍有另一个优选的实施方案中,权利要求 1 的步骤 b) 中系链点与主磁体的磁轴成一线。副磁体不存在时,其结果是角阱 $k_{\text{旋转}}$ 的强度减少至典型大分子的水平之下的水平。

[0061] 令人惊讶地,发明人发现当相对定位主磁体和支持物的系链点以使所述主磁体的磁轴和系链点精确重合时,顺磁标记环绕系链点旋转,由此遵循环绕系链点的环形路径。所述重合相对于将大分子系链于表面而定义。这一环绕旋转发生而无需旋转外部磁场,因此其是由导致大分子缠绕上的变化的热波动和所获得的顺磁标记的响应所驱使的。更准确地,在这一接近 x, y 平面的零场的特定的测量位置,顺磁标记的圆周运动与绕其系链点的旋转同时,如通过使用角追踪标记所证明的。这一同时的转旋和圆周运动与太阳绕地球的运动相似,其中月亮以与其绕地球圆周运动相同的速度绕其自轴旋转(结果是作为地球基础的观察者总是看到地球的不同侧面)。

[0062] 由此可见监测运动过程中环形路径上顺磁标记的位置是监测大分子的角波动或冲程的备选方式,而无需角追踪标记。所述环形路径具有微米水平的半径,足以精确测量。圆周运动因此可用于确定大分子缠绕上的变化。x, y- 坐标沿环形路径或弧度转化为角坐标可被用于测量大分子的转矩。应当注意的是如上文描述的在后一个实例中,主磁体的旋转和副磁体施加的辅助磁场被用于应用所述转矩。

[0063] 主磁体的所述磁轴和所述系链点在约 10 优选地 1 更优选地 0.1 μm 的界限内是重合的。

[0064] 结果是在这一实施方案中环形路径的半径具有顺磁标记的半径级别的最大值和为零的最小值,确切的值取决于当大分子与顺磁标记连接的顺磁标记的表面上的点。

[0065] 在根据本发明的方法的优选的实施方案中,步骤 c) 和 e) 包括使用发出辐射的照明工具对大分子-顺磁标记-组合体照明,测量放射,散射或所放出的辐射在顺磁标记和/或角追踪标记上的反射并且将数据相对于与顺磁标记和/或角追踪标记相互作用的放射

做图。

[0066] 在另一个优选实施方案中,大分子-顺磁标记-组合体通过照明工具经由中空的主磁体来照明。在这一上下文中,中空意指从主磁体的一面至另一面的通路沿所述照明的光轴存在。

[0067] 有利地,通过主磁体施加在大分子上的拉力在至少 0.001 至 1000 优选地 0.01 至 100,更优选地 0.1 至 10pN 的范围内。500pN 以上的非常高的拉力被用于测量刚性分子例如肌动蛋白丝或微管。

[0068] 本发明同样涉及施行上文所描述的方法的装置,所述装置包括:

[0069] - 用于支持大分子的支持物,所述支持物包含与大分子的至少一端系链的一个或多个系链点,所述系链点位于 x, y 平面以使大分子-顺磁标记-组合体基本上以垂直于 x, y 平面的 z 向在基本上垂直于 x, y 平面排布的主磁体和支持物的表面之间排布;

[0070] - 用于产生向大分子施力的磁场的主磁体,所述主磁体可绕其磁轴旋转并以距支持物可控制的距离排布;所述磁轴垂直于支持物的 x, y 平面排布,其中主磁体的极以 z 向排布并且其中主磁体在大分子-顺磁标记-组合体的位置产生基本上 z 向定向的磁场;

[0071] - 用于旋转主磁体的工具;和

[0072] - 用于将与顺磁标记和 / 或角追踪标记的位置相关的信息成像的成像工具。

[0073] 根据本发明的主磁体可以是永磁体,但也可以是电磁体。如上文所解释的,顺磁标记经受的力可通过改变主磁体和支持物之间的 z 向距离来改变。电磁体具有力也可以通过改变流经主要集体的电流的量来变化的另外的优点。

[0074] 根据本发明,装置包括用于使得磁体绕其磁轴旋转的旋转装置。有利地,所述旋转装置同样包含将主磁体在 z 向平移的平移工具。

[0075] 如上文所描述的测量转矩的装置进一步包括用于当旋转主磁体时允许具有顺磁标记的大分子旋转的副磁体,其中副磁体与主磁体的一侧相连。

[0076] 所述副磁体可以是可独立地从主磁体平移的永磁体或所述副磁体可以是电磁体。这些有利的方案中,转矩夹紧的强度和拉力可分别变化。

[0077] 在本发明的有利的实施方案中,副磁体由电磁体的组合体组成。即 Helmholtz 线圈,包含两个间隔开的在水平 x 向延伸的 x 线圈和两个间隔开的在水平 y 向延伸的 y 线圈,其中电磁体线圈是由通过电线的电源供能的,其中放置电磁线圈以使支持物包埋在所述电磁线圈之间的空间中。

[0078] 通过使用电磁和永磁体的组合,用于顺磁标记的转矩可与拉力分开,其在控制顺磁标记上引入另外的自由度。

[0079] 在用于测量缠绕的装置中,主磁体的磁轴和支持物的系链点可相关地定位以使所述主磁体的磁轴和系链点重合,在约 10, 优选 1 更优选 0.1 μm 的界限内。

[0080] 就根据本发明的方法而言所描述的优选的实施方案可简单地适用于装置。

[0081] 有利地,装置进一步包含用于照明大分子-顺磁标记-组合体的光源,其中光源以 z 向放置以使主磁体在所述光源和大分子-顺磁标记-组合体之间并且其中主磁体是中空的以允许由光源发射的辐射经过主磁体传导至大分子-顺磁标记-组合体上。

[0082] 在有利的实施方案中,装置同样包含改变主磁体和支持物之间的距离的平移工具,由此改变用于大分子的力以使所述距离的增加产生较低的力;和 / 或在 x, y 平面中平移

支持物的台,所述肽可以纳米级平移。

[0083] 优选地,支持物包含其中可放置液体的内室,其中内室包含对于由照明工具放射的辐射来说可透过的至少两个壁;其中所述壁基本上是平行放置的并且其中所述可透过的壁中的至少一个对应于大分子所系链的支持物的至少一个表面以使大分子在内室内部。

[0084] 通常,成像工具包含将顺磁标记和/或角追踪标记的位置可视化的光学放大工具,检测所述顺磁标记位置的检测器工具和显示所述信息的显示工具。在特定的实施方案中,检测器是 CCD 照相机。将由所述 CCD 照相机提供的图像提交至具有亚像素拟合步骤的图像分析程序。这一方法中 x, y 平面中的顺磁标记的位置可以约 1nm 和约 0.1 度的分辨率确定。通常,装置同样包括用于记录标记的位置和/或所计算的表征特征值的记录工具。

[0085] 在特别优选的实施方案中,支持物包含与大分子所系链的支持物的至少一个表面连接的一个或多个参比元素,作为顺磁标记的位置的参照点。

附图说明

[0086] 本发明的不同方面通过所附附图进一步说明,其中:

[0087] 图 1 显示图表描绘的用于根据本发明测量大分子转矩的设备的实施方案;

[0088] 图 2 显示扭转松弛的大分子的位置;

[0089] 图 3 显示旋转 N 转后大分子的位置;

[0090] 图 4 是与所连接的角追踪标记一起的顺磁标记的位置,这一组合体与大分子连接;以顺磁标记的焦平面上方约 $5\mu\text{m}$ 的聚焦平面来记录图像;

[0091] 图 5 是在从表面固定小珠(上方信号)、传统磁镊中保持的系链 DNA 的小珠(参见例如 US2003/0166262A1)(中部信号)和根据本发明的系链 DNA 的小珠的 CCD 图像的分析获得的旋转波动的踪迹之间的对比;

[0092] 图 6-9 显示 dsDNA 的转矩结果;

[0093] 图 10 显示用电极线圈作为副磁体测量转矩的实施方案;

[0094] 图 11 显示 (x, y) 波动作为电磁线圈施加的逐渐增加的磁场的函数的曲线图;

[0095] 图 12 是图表描绘的用于根据本发明测量大分子缠绕的设备的实施方案;

[0096] 图 13 显示所系链的大分子的位置和系链于大分子的顺磁标记的细节。

[0097] 图 14 显示用图 10 的实施方案测量的 (x, y) 波动的曲线图,其显示顺磁标记的热波动。

[0098] 图 15 显示从角追踪标记的直接追踪和 (x, y) 平面中顺磁标记位置确定的旋转角度的比较(a)以及顺磁标记的转数作为时间的函数的曲线图(b, c);图 15b 是通过将图 14 的 $X-Y$ 曲线图转化为角度获得的。

[0099] 图 16-18 显示监测 DNA 上重组蛋白 A (RecA) 纤维的组合体的结果。

具体实施方式

[0100] 在图 1 中,图表描绘显示测量大分子表征特征的设备 10。设备 10 包括垂直排布的主磁体 12,其被设计以施力同时减少 $k_{\text{旋转}}$,具有底部的南极 14 和顶部的北极 16。如之后会阐明的,主磁体 12 限定用于照明目的的中心孔 18。用于应用转矩具有与主要磁极的极相反的极的较小的副磁体 19 安装在主磁体的圆柱形外壁上,允许有待测试的大分子的小珠旋

转。所获得的磁场由虚线表示,参见图 2。磁体 12 和 19 安装在框 20 中,其可以旋转并且在垂直方向上借助于传动器(未示出)平移。在主磁体 12 下方排布支持物 22,其可在 x, y 平面内以纳米级平移。在所说明的实施方案中,支持物 22 包含从平行排布的透明显微镜盖玻片 26 制得的流通池,例如用玻璃制得的使用防水间隔小距离间隔开的流通池。底部玻片 26' 的内部表面 28(参见图 2 和 3)用粘性剂例如硝基纤维素或聚苯乙烯包被。用于校准机械漂移的一个或多个非磁性参照 29—此处具有例如约 3.0 微米的直径的非磁性乳胶微球—被非特异性地连接于底部玻片 26 的现有的粘性内表面 28。照明工具 30 例如一个或多个 LED 和聚焦透镜被安装在框中并且与中心孔 18 成一线。在流通池 24 下方放置成像工具 32 例如 CCD 照相机和 / 或光电探测器和适合的放大工具 33 例如 100x 油浸物镜并且同样与照明工具 30 和中心孔 18 成一线。在放大装置 33 下方放置压力控制的纳米台 40,其允许物镜的焦平面在 z 向上的精确调节。成像工具 32 与接收来自成像工具 32 的信号,分析信号并计算表征特征的计算机连接。通常,信号和数据将记录在计算机 34 的存储器 36 中。计算机 34 具有展示所接收的信息的和所计算的特征的显示器 38 以及打印机(未示出)。

[0101] 参照小珠 29 可以通过在磷酸盐缓冲的盐水(PBS 缓冲液)中孵育约半小时而随机连接于玻片 26'。

[0102] 大分子 37 具有顺磁标记 40 并且系链于支持物 22。例如 DNA 构建体在两端与功能化的 DNA PCR 片段连接,尤其是与具有多个生物素基团的第一 PCR 片段和具有多个地高辛基团的第二 PCR 片段连接。为了将大分子与支持物 18 连接,通过将结合大分子的地高辛功能化的 PCR 片段的抗地高辛部分与较低盖玻片 26 的内表面非特异性连接来将表面功能化。之后,内表面 26' 通过将所述表面与封闭剂例如 BSA(牛血清白蛋白)、聚 L-谷氨酸或酪蛋白接触而被钝化。

[0103] 生物素 PCR 片段系链于顺磁标记例如具有 2.8 微米直径的链霉亲和素包被的超顺磁珠 M270(可从 Invitrogen 获得)。系链之后,角追踪标记例如一个或多个较小的非磁性小珠 42 诸如生物素标记的 Fluosphere 微球(同样可从 Invitrogen 获得)通过将流动池用预先稀释的这些微球的溶液孵育一段时间来与较大的顺磁标记 40 连接。通常,一个或两个或者甚至更多个微球与磁性小球连接。这些荧光微球为组合体提供足以为追踪旋转提供小珠图像的较小的不对称的可见的不对称,参见图 4。

[0104] 更特别地,较小的角追踪小珠允许使用下列算法经由离焦的 CCD 图像的互相关分析以约 1° 的精确度追踪位置和旋转角。获得了显示不对称性的顺磁小珠和较小的微球的离焦 CCD 图像。顺磁小珠图像的对称中心通过位置追踪算法来确定。围绕这一对称中心,选择包含不对称的径向切面并且进行极转变,径向平均的离焦图像及其自身的镜像提供两个角标志。这些角标志的互相关提供表示对称偏移的最大值。使用预先确定为角拟合的最大值周围的选择拟合确定角位置的亚像素产生亚像素分辨率的角位置。

[0105] 使用上文构型,由此系链的大分子首先以其图 2 中所示的扭曲松弛的状态(= 0 转)成像。从 CCD 图像的分析确定 x、y 和 z 向中的小猪位置(Science 271:1835-1837)。之后旋转排布的磁体 12 和 19 以预定的方向旋转预定数目的次数 N,例如在螺旋构型的双链 DNA 过旋(即以螺旋的方向)或欠旋(以相反的方向)的实例中。参见图 3。之后与扭曲张紧的大分子相连的顺磁标记以稍微离焦的方式成像。参见图 4。

[0106] 图 5 比较从表面连接的小珠(上部信号和柱状图)、保持在传统磁镊中 DNA 系链的

小珠（参见 US2003/0166262A1）（中部信号和柱状图）和根据本发明的 DNA 系链的小珠（中部信号和柱状图）的 CCD 图像的分析获得的转动波动的追踪。所有踪迹的张紧力是 3pN。

[0107] 图 6-9 显示 dsDNA 的转矩测量,尤其是 PBS 缓冲液中 3.5pN 张紧力的 8 千碱基对 (kbp)DNA 分子。图 6 显示扭曲松弛的 DNA (起始位置 = 0 转) 和 $N = 40$ 转的 DNA 系链小珠的角波动的高斯分布。由于 DNA 所施加的恢复转矩,分布中心的偏移是明显的。图 7 显示角分布的宽度以及由此的阱刚度对 DNA 所施加的转矩的范围来说。图 8 显示平均角 (左 Y 轴) 为转数数目的函数,其可以使用公式 $k_{\text{旋转}} = k_B T / (\delta \theta^2)$ 和 $T_{\text{大分子}} = k_{\text{旋转}} (\theta - \theta_0)$ 直接转化为转矩 (右 Y 轴)。屈曲转矩可以从图 8 中转矩对比正转的转数数据中的平台确定。作为力的函数的 DNA 的缠绕持续长度可以从弹性缠绕法中的这些信息的线性拟合确定。图 9 显示所系链的 DBA 的延伸。

[0108] 使用所述装置确定过旋和欠旋单个大分子时大分子系链延伸和转矩响应。以 0 转的扭曲松弛的分子开始, DNA 最初表现如同各向同性弹性棒:当向分子加上正转时,其延伸保持大致不变并且平均角信号上的偏移随转的数目的增加而线性减少。由于在小的角冲程范围内,扭曲阱的刚度独立于所应用的转的数目,这表明在分子中扭曲拉紧线性增加。由于 N 转 $T(N)$ 后转矩可等于 $2 \pi N k_B T C / L_c$, 其中 C 和 L_c 分别是 DNA 的缠绕持续长度和伸直长度, C 直接从转矩响应的线性斜率确定 (L 是从独立的 DNA 拉伸实验确定的)。加上更多正转时,扭曲拉紧上的增加持续直到当分子屈曲形成同向超螺旋时达到临界缠绕密度。超过这一临界,分子中的转矩保持恒定为 T_b (屈曲转矩) 并且另外的转导致伴随着延伸上的迅速减少一起的同向超螺旋的累积。当向扭曲松弛的 DNA 施加负转时, DNA 最初同样表现如同各向同性棒并且施加与正转情况相比带有负号的恢复转矩。在 1pN 或更大的张力下,在欠旋 (分子的延伸保持大约恒定而分子局部变性) 时 DNA 并不弯曲。相应的变性转矩 $T_{\text{变性}} = -10 \pm 1 \text{ pN} \cdot \text{nm}$ 。

[0109] 对单个 DNA 进行有规则的转矩响应测量以将屈曲转矩 T_b 和缠绕持续长度 C 确定为张紧力 F 的函数。 T_b 随增加的 F 有规则地增加。DNA 弹性的简单模型预测 $T_b = (2k_B T L_p F)^{1/2}$, 其中 L_p 是从独立的拉伸实验确定的弯曲持续长度。

[0110] 从作为转的函数的转矩的线性拟合获得的 DNA 的有效扭曲强度表现出显著的 F 依赖性:

[0111] 使用根据本发明的方法和装置的转矩的直接测量具有其同样可以探测复合结构例如 DNA-蛋白质的纤维的优点。检测作为活体细胞中通过 RecA 包被的单链 DNA 的双链 DNA 链侵占的产物的 RecA 异源双链。重组酶 RecA 的纤维在同源重组 DNA 修复通路中起到核心作用。

[0112] RecA 在扭曲强制的 DNA 上存在 ATP- γ S 时装配,使用磁体旋转以将 RecA 纤维以其扭转松弛状态完整装配。松弛的异源双链就松弛的裸链而言变化 -300 转,如假定所观察到的 RecA 结合时每 bp 15° 的欠旋时 7.9kbpDNA 构建体的全 RecA 覆盖所预期的。之后将 RecA 异源双链进行过旋或欠旋,同时测量两者的延伸和转矩。将转矩的初始增加拟合以产生 C_{RecA} , 其被发现比相同力时裸 DNA 的大 1.8 倍。

[0113] 图 10 显示本发明的可选择的实施方案。用于测量的大分子中的转矩的设备装配有作为副磁体 19 的电磁线圈 51、52 的组合物。左边照片显示这样的组合体的侧视图,而右边照片描绘组合体的图顶视图。组合物由两个间隔开的 x 螺旋 51 和两个间隔开的 y 螺旋

52 组成。在特定的实施方案中两个 y 螺旋之间的距离为约 10cm 而 x 螺旋之间的距离为约 5cm。应当注意的是这些距离可随意调节并且不限制本发明的范围。如右边照片中所看到的,电磁线圈 51、52 是通过电线 54 由适合的电源驱动,例如可选择的电流源。

[0114] 放置电磁线圈 51、52 以使流动池 22 包埋在所述电磁线圈 51、52 之间的空间中。

[0115] 通过使用电磁线圈 51、52 作为副磁体 19,可仅在与流动池 22 平行的平面中产生同性质磁场。被用于应用转矩的这一场可以独立于由主磁体 12 所施加的向上的拉力而控制。通过使用电磁线圈 51、52 和永磁体的组合,用于顺磁标记 40 的转矩可与主磁体 12 的拉力解耦合,其在控制顺磁标记 40 上引入另外的自由度。

[0116] 图 11 显示电磁线圈 51、52 逐渐增加的磁场强度下主磁体 12 的持续的拉力下,顺磁标记 40 的某些波动曲线图。当电磁线圈关闭时,角波动位于 (lie on) 几乎环形路径上。当打开电磁线圈 51、52 时,角波动在增加电磁线圈 51、52 施加的磁场时越来越受到限制。使用电磁线圈 51、52 的好处在于通过这些线圈施加的场可通过简单地调节递送至线圈的电流即转动旋钮而调节。当努力获得与永久副磁体 19 相同的曲线图时,必须以可再现的方式调节副磁体和顺磁标记 40 之间的距离。

[0117] 图 12 是显示用于测量大分子中的缠绕的方法和装置的实施方案。与图 1-3 中的那些相似的部分是用相同的标记表示的。用于测量大分子的缠绕的设备 10 包含垂直排布的具有其位于底部的南极 14 和位于顶部的北极 16 的主要环形磁体 12。因此,主磁体限定中心孔 18。与之前所示的转矩测量设备相反,这一实施方案缺少较小的副磁体 19。所获得的磁场在图 13 的左边用虚线表示。磁场 12 安装在框 20 中,其可以旋转并且在垂直方向上借助于传动器(未示出)平移。在主磁体 12 下方排布支持物 22,其可在 x,y 平面内以纳米水平平移。在所说明的实施方案中,支持物 22 包含从平行排布的透明显微镜盖玻片 26 制得的流通池,例如用玻璃制得的使用防水间隔小距离间隔开的流通池。底部玻片 26' 的内部表面 28(参见图 2 和 3)用硝基纤维素包被。用于校准机械漂移的一个或多个非磁性参照 29—此处具有例如约 3.0 微米的直径的非磁性乳胶微球—被连接于底部玻片 26' 的内表面 28。照明工具 30 例如一个或多个 LED 被安装在框中并且与中心孔 18 成一线。在流通池 24 下方放置成像工具 32 例如 CCD 照相机和适合的放大工具 33 例如 100x 油浸物镜并且同样与照明工具 30 和中心孔 18 成一线。在放大装置 33 下方放置压力控制的纳米台 40,其允许物镜的焦平面在 z 向上的精确调节。成像工具 32 与接收来自成像工具 32 的信号,分析信号并计算表征特征的计算机 34 连接。通常,信号和数据将记录在计算机 34 的存储器 36 中。计算机 34 具有展示所接收的信息的和所计算的特征的显示器 38 以及打印机(未示出)。

[0118] 参照小珠 29 可以通过在 PBS 缓冲液中孵育约半小时而随机连接于玻片 26'。

[0119] 大分子 37 具有顺磁标记 40 并且系链于支持物 22。例如 DNA 构建体在两端与功能化的 DNA PCR 片段连接,尤其是与具有多个生物素基团的第一 PCR 片段和具有多个地高辛基团的第二 PCR 片段连接。为了将大分子与支持物 22 连接,通过用结合大分子的地高辛功能化的 PCR 片段的抗地高辛将较低盖玻片 26' 的内表面功能化来准备表面。生物素 PCR 片段系链于顺磁标记例如具有 2.8 微米直径的链霉亲和素包被的超顺磁珠 M270(可从 Invitrogen 获得)。

[0120] 为了确定缠绕,系链的分子以其主轴与磁体 12 的纵轴重合来排布。以这一方法,

顺磁标记环绕系链点旋转,由此遵循环绕系链点的环形路径。这一环绕是由导致大分子缠绕上的变化的热波动和所获得的顺磁标记的响应所驱使的。在这一接近 x, y 平面内零场的特定的测量位置,顺磁标记的圆周运动与绕其系链点的旋转同时,如上文所表明的。参见图 13 的右边部分。环形主磁体 12 的主要 z 向成一线的场由虚线箭头表示。使用磁体与主要 z 向成一线的场。顺磁标记 40 的优选的磁轴 m_0 与垂直磁场成一线并且顺磁标记 40 可绕 z 轴自由旋转。

[0121] 图 14 显示以缠绕构型测量的顺磁标记 40 的 (x, y) 波动的曲线,即所系链的分子以在零点其主轴与磁体 12 的纵轴重合来排布。由于在这种情况下顺磁标记上没有来自自主磁体的旋转强制,所述标记经历位于环上的热波动。这一环示于曲线中。这些热波动可被转化为角,其可与大分子的缠绕上的变化相关。

[0122] 图 15 显示系链的 $1.4 \mu\text{m}$ 半径的顺磁标记 40 在中心成一线的圆柱形磁体 12 下的 x, y -波动。 $0.5 \mu\text{m}$ 半径的角追踪标记 42 连接于所系链的顺磁标记 40 并且作为检测旋转的框标。所有的 (x, y) 位置以灰色显示。显示从小部分轨道选择的框(显示为黑色轨迹)的相应的 CCD 照相机图像。顺磁标记 40 图像离焦 $\sim 4 \mu\text{m}$ 以有助于 x, y 和 z 追踪顺磁标记 40 的位置。从图像来看显而易见的是小珠的旋转(可从小的标记小珠的相对位置追踪的)和 x, y -平面内环形环上顺磁标记 40 的位置之间的固定关系。角追踪标记 42 的位置与环形环上顺磁标记 40 的位置同步旋转,保持与径向向量的逆时针 -5° 的角。同样显示的是从角追踪标记(灰色)的位置和 (x, y) 平面(黑色)中的位置确定的顺磁标记 40 的旋转角的曲线图。所有曲线图符合良好,它们是无差别的。图 15 显示 (b) 中踪迹的急剧上升,几种在头三秒。灰色和黑色踪迹明显不同但是彼此紧密追踪。

[0123] 图 16-18 是缠绕构型通过检测 7.9kbp DNA 101 上重组蛋白 A(RecA) 纤维 102 的组合物监测 DNA 系链的缠绕上的动力学变化的能力的实例。当加入 RecA 和非可水解的 ATP 类似物 ATP- γ S 时,具有 $1.4 \mu\text{m}$ 直径保持在缠绕构型中的顺磁标记 40 示踪螺旋轨迹,表明 DNA 系链延长并同时是展开的(图 16)。灰色值表明进行时间。螺旋轨迹在 $t = 0\text{s}$ 于 $z \sim 0$ 开始并且在 1000s 后于 $z \sim \mu\text{m}$ 结束。图 17 和 18 显示异源双链纤维的组合物如何完成可以通过监测 6.5pN 的拉力下具有 $R = 1.4 \mu\text{m}$ 的顺磁标记 40(B) 和 1.5pN 的拉力下具有 $R = 0.5 \mu\text{m}$ 的顺磁标记 40(R) 的作为时间的函数的旋转角 θ (图 17) 和高 z (图 18) 来追踪。观察到 7.9kbpDNA101 总共展开至 -328 ± 10 转并伸长至 $4.1 \pm 0.1 \mu\text{m}$ 。

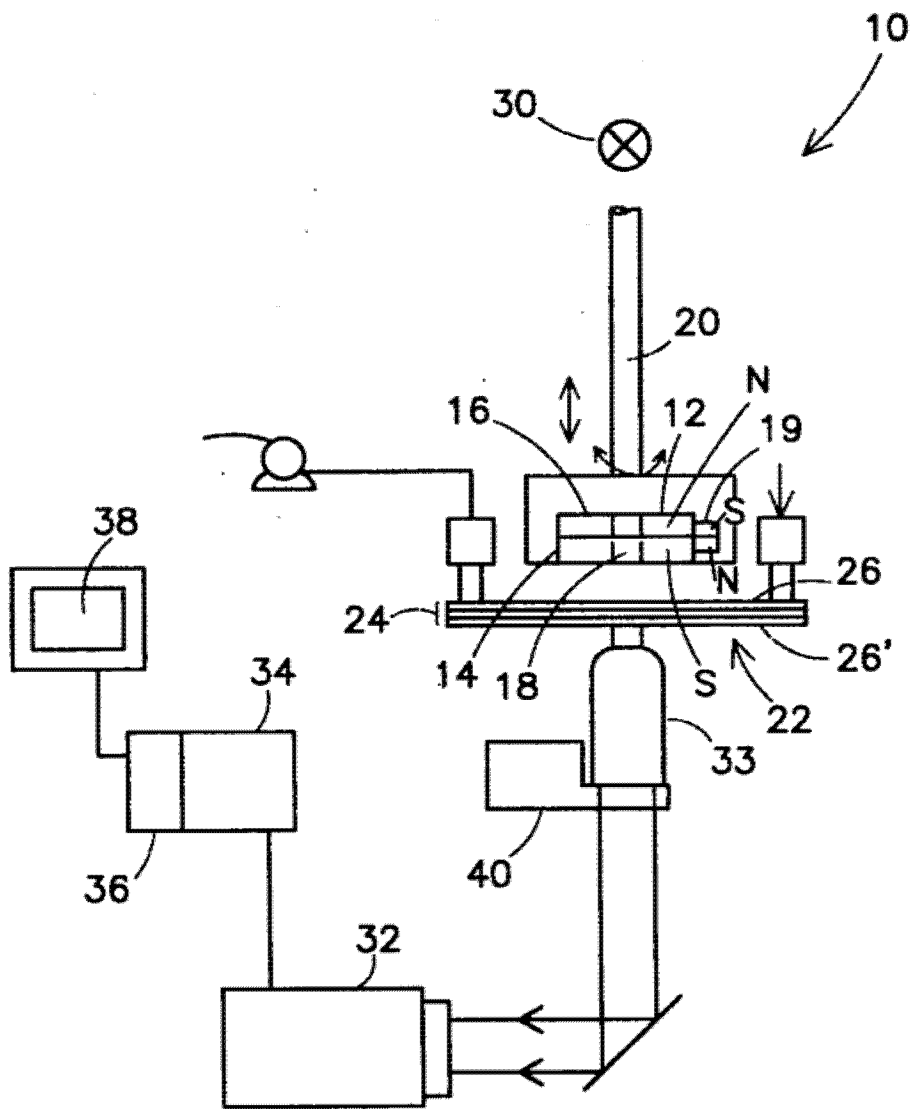


图 1

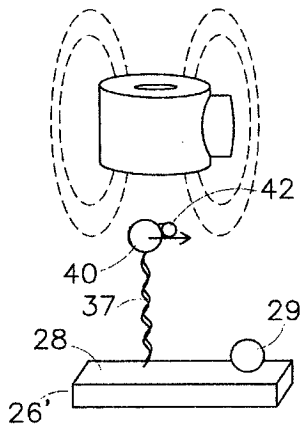


图 2

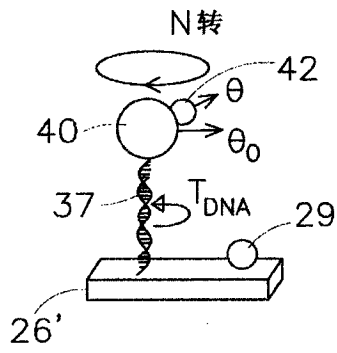


图 3

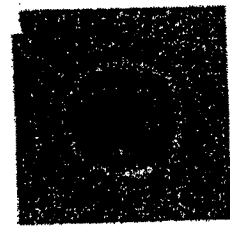


图 4

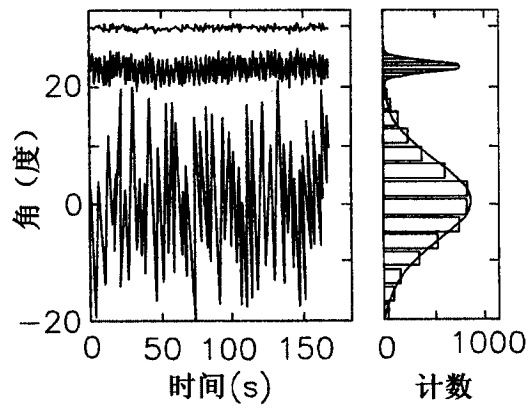


图 5

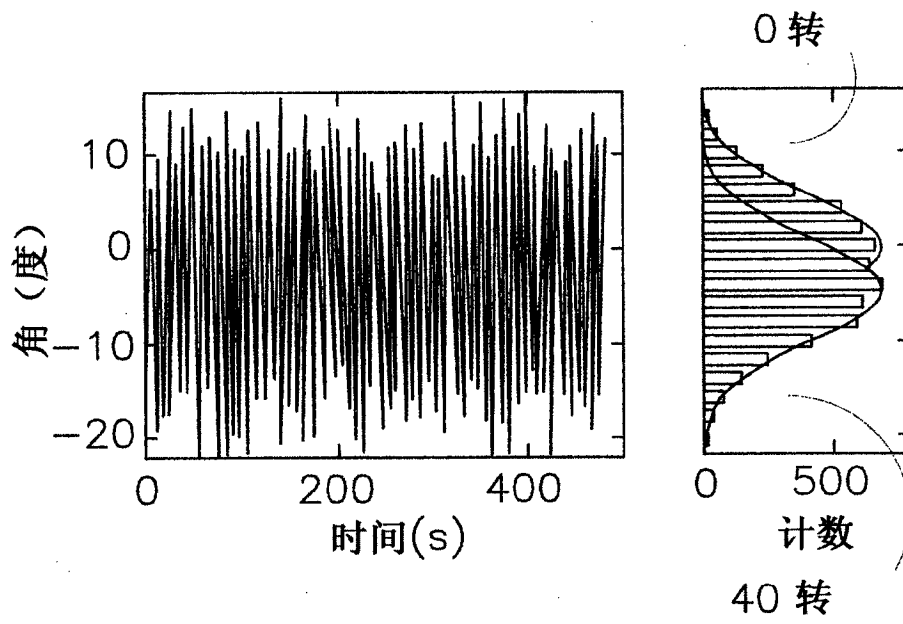


图 6

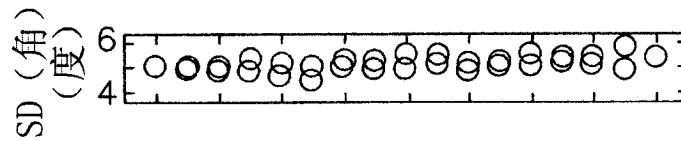


图 7

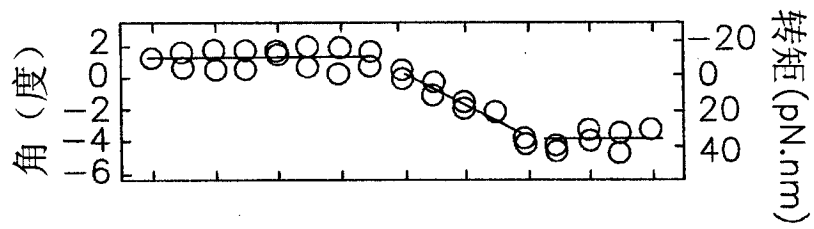


图 8

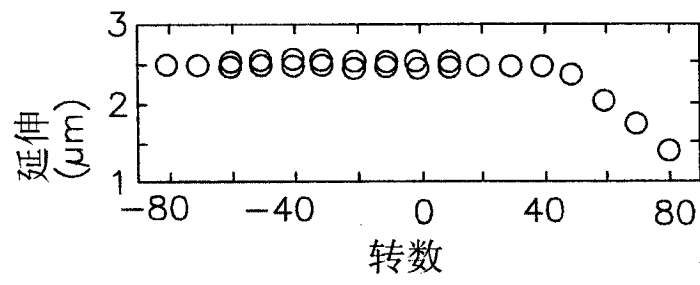


图 9

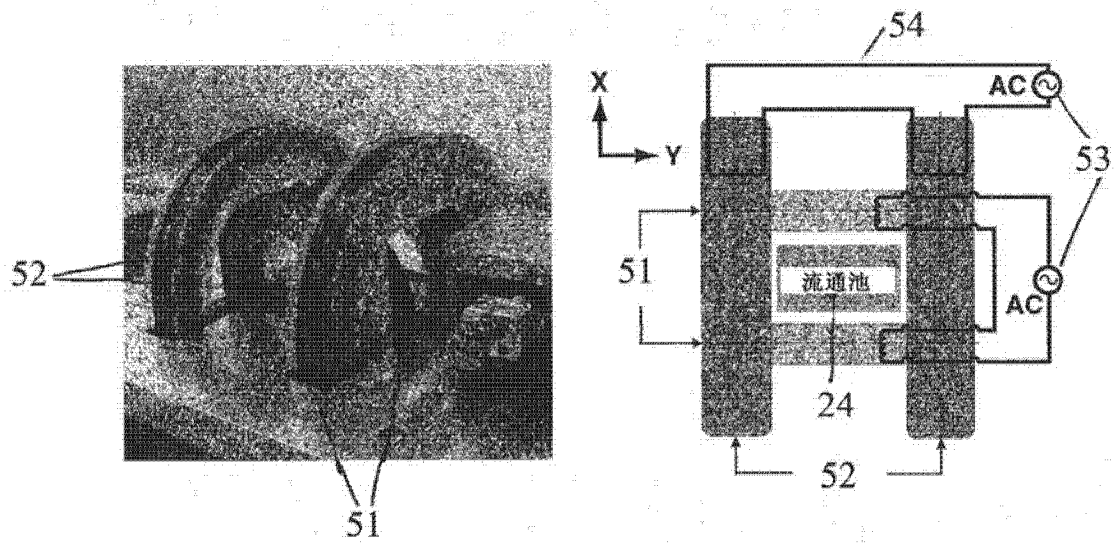


图 10

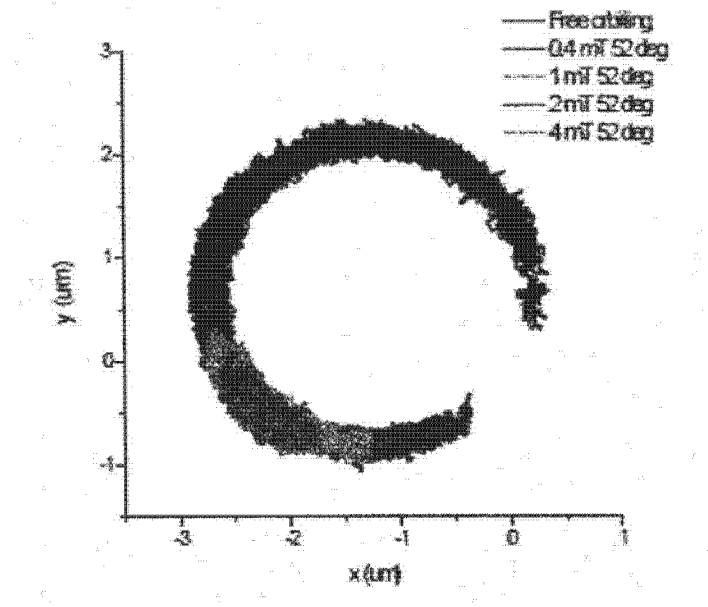


图 11

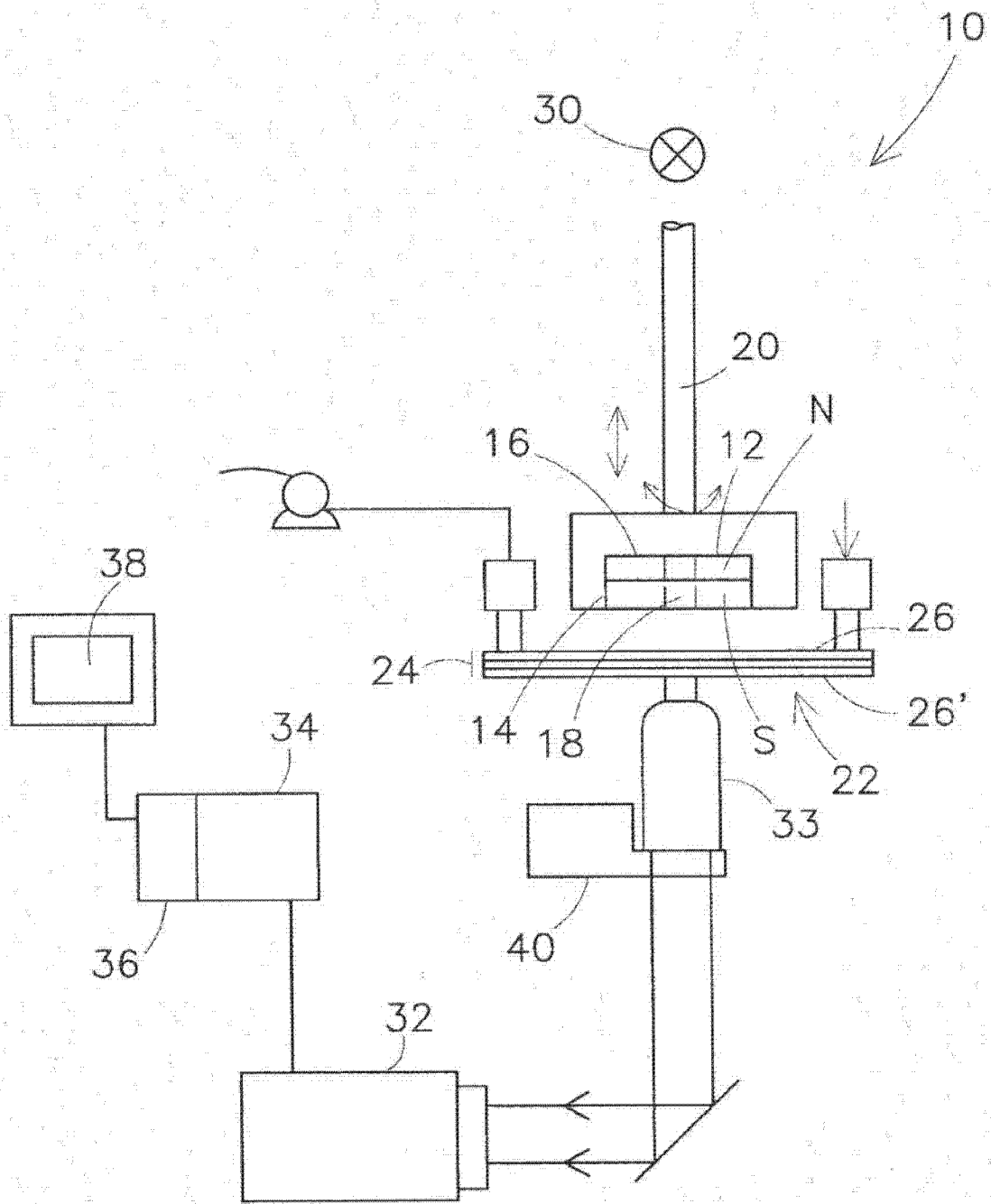


图 12

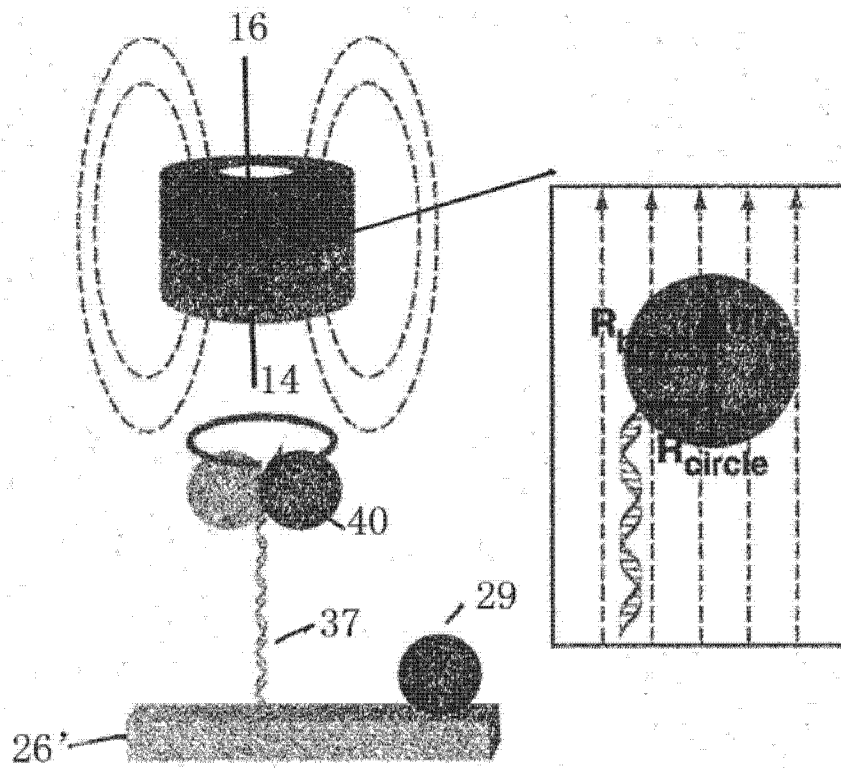


图 13

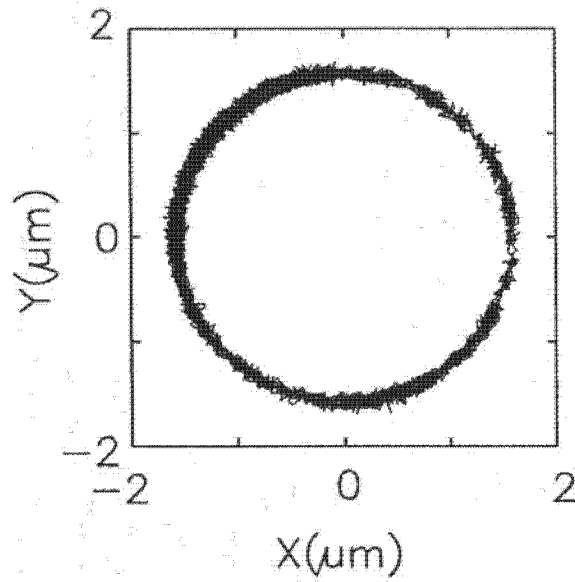


图 14

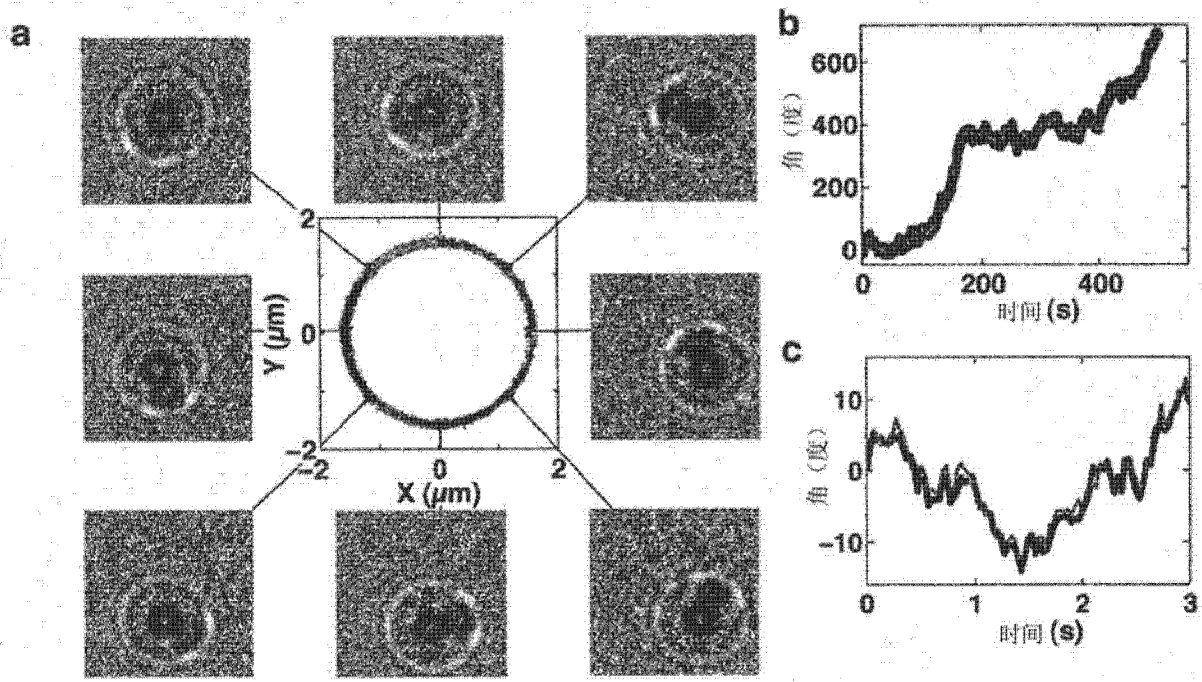


图 15

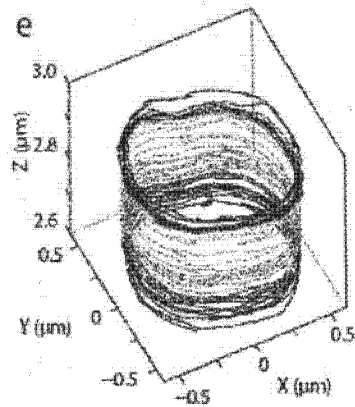


图 16

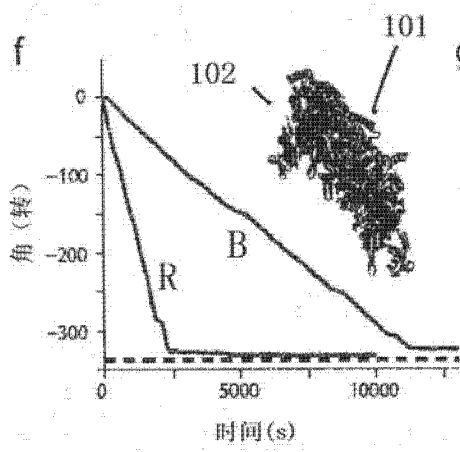


图 17

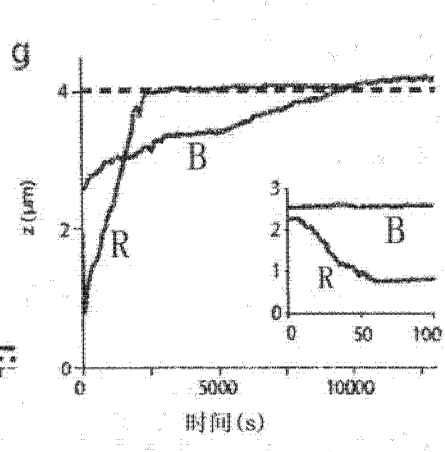


图 18