

特约综述



我们实验室主要应用单分子光镊技术, 结合相关的分子生物学、生物化学和结构生物学技术, 在单分子水平上通过探索与生物体系紧密相关的机械力、结合能量、结合/运动速率等关键的动力学信息, 从生物物理角度阐述与人类生命活动相关的分子机制, 着重研究: (1) 组蛋白修饰对于核小体结构影响的分子动力学解析; (2) 蛋白质折叠/去折叠的单分子动力学解析。
<http://www.sibcb.ac.cn/PI.asp?id=154>

单分子光镊技术在生命科学中的应用

冯楠 高影*

(上海国家蛋白质科学中心分子生物学国家重点实验室,
中国科学院上海生命科学研究院上海生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031)

摘要 单分子光镊技术是近年来发展起来的一种新型的高分辨率光学技术, 可以在单分子水平上实时观测并研究生物大分子或复合物相互作用的动态行为。光镊次毫秒级的时间分辨率和皮牛顿的力分辨率可使我们精确获得中间态、折叠速率(两态迁移速率)、作用力、能量、距离等重要的动力学信息; 不同于传统的结构生物学方法, 光镊实验是在生理条件下进行的, 这些优势都使得光镊技术成为生物物理学领域一项不可或缺的技术手段。该文将主要针对这项单分子光学技术的原理及其在生物动力学上的应用和发展前景作简要介绍。

关键词 单分子; 光镊技术; 光学; 蛋白质折叠

Applications in Life Science of Single-molecule Optical Tweezers

Feng Nan, Gao Ying*

(National Center for Protein Science Shanghai, State Key Laboratory of Molecular Biology, Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract Optical tweezers are an emerging optical technology with high-resolution for investigating real-time dynamics of macromolecules and complexes at single-molecule levels. With a sub millisecond time response, it is utilized to determine the intermediate states and folding rates. Optical tweezers are very sensitive for a force change in response of end-to-end length change of a molecule. Therefore it can accurately provide the information for mechanical forces, conformational changes and energy, which are the key information for kinetic studies.

国家自然科学基金(批准号: 31571346)资助的课题

*通讯作者。Tel: 021-20778215, E-mail: ying.gao@sibcb.ac.cn

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31571346)

*Corresponding author. Tel: +86-21-20778215, E-mail: ying.gao@sibcb.ac.cn

网络出版时间: 2015-10-23 16:41:48

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20151023.1641.002.html>

Furthermore, unlike the conventional structural biology methods, optical tweezers experiments are performed in a physiological condition. With all these advantages, optical tweezers became an irreplaceable biophysical method for studying dynamic biological processes. In this review, we mainly focus on the basic principles of optical tweezers and their applications especially in protein folding, chromatin remodeling and other molecular motors. We also briefly discuss the future developments of this technology.

Keywords single molecule; optical tweezers; optical technology; protein folding

众所周知, 大多数宏观的生物过程是由最基本的单个蛋白酶与单个DNA分子或RNA分子之间的反应来完成的。伴随着生物技术和分子生物学的进步, 生命研究日益向微观层次深入并进入后基因时代, 人们不再满足于过去只对生物体中大量分子平均行为的研究, 更倾向于从单分子水平解读生物大分子的动力学细节。利用单分子技术研究生物学问题, 尤其是针对蛋白质复合物相互作用的动态过程分析是近年国际上新兴的研究方向。

目前, 单分子技术主要分为两大类。一类基于荧光体系的单分子技术, 主要包括单分子荧光共振能量转移技术(single molecule fluorescence resonance energy transfer, smFRET)^[1]、荧光相关谱技术(fluorescence correlation spectroscopy, FCS)^[2]和随机光学重建显微镜技术(stochastic optical reconstruction mi-

croscopy, STORM)^[3]等。以STORM为例, 它采用光转换荧光探针(photo-switchable fluorescent probes), 可以在时间尺度上分离相互重叠发光的荧光分子, 从而得到10~20 nm高分辨率的三维重构图像^[3-5]。而传统的光学显微镜技术由于受衍射极限的限制, 分辨率都在几百个纳米的水平。STORM技术还可以在纳米层次上揭示细胞内分子间相互作用及组织内细胞间的相互作用。相信随着STORM技术的进一步发展, 这一技术将被广泛应用到DNA、蛋白质分子以及大分子复合体的研究^[6]。

另一类单分子技术则基于力学测量体系建立, 主要以原子力显微镜(atomic force microscope, AFM)、磁镊及光镊技术为代表^[7]。如图1所示, 这三种技术分别利用机械臂、磁学和光学的方法来对研究对象施加作用力^[7]。因此, 它们所能达到的分辨率

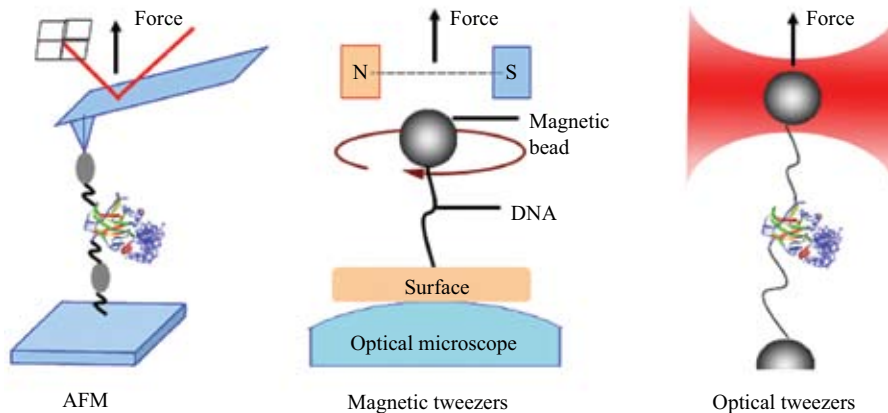


图1 单分子力学技术

Fig.1 Single-molecule force spectroscopy techniques

表1 单分子力学技术分辨率比较(根据参考文献[8]修改)

Table 1 Comparison of single-molecule force spectroscopy techniques (modified from reference [8])

	原子力显微镜 AFM	磁镊 Magnetic tweezers	光镊 Optical tweezers
Spatial resolution (nm)	~0.2	~5	~0.2
Temporal resolutions (ms)	~1	>1	~0.1
Force resolution (pN)	~10	0.001	0.02
Force range (pN)	10~10 ⁴	0.001~100	0.1~100

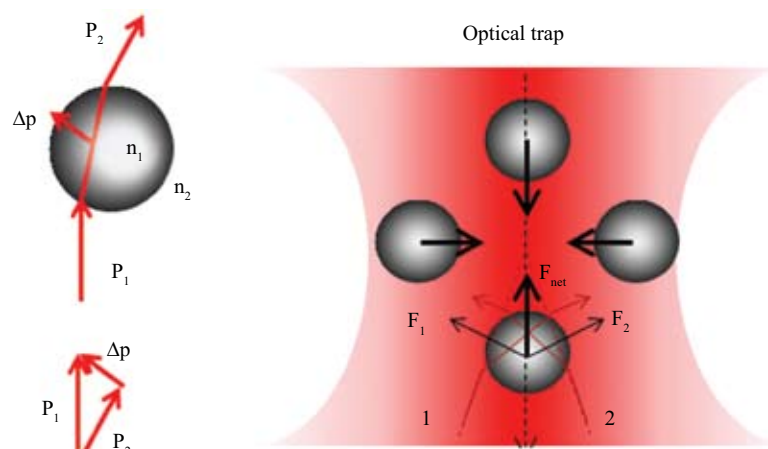


图2 光镊原理示意图

Fig.2 Schematic illustration of optical tweezers

不同(表1^[8]), 其中以光镊技术为最高, 其空间和时间分辨率分别可以达到0.2 nm(小于1个DNA碱基对的长度)和次毫秒级, 同时, 光镊是通过激光实现对研究对象的非接触捕获的, 力均匀地施加在整个研究对象表面, 不会像AFM一样对研究对象造成机械损伤。由于光镊技术超高的分辨率, 应用光镊可以直接连续追踪单个生物大分子折叠和去折叠的完整过程, 实时测量力、距离、时间及中间态等动力学信息^[8], 极大地满足了人们从分子结构角度剖析生物分子工作机制的需求。

近三十年来, 单分子光镊技术逐渐趋于成熟, 物理学家通过改进光学硬件配置, 发展新的实验方法(差分探测法^[9])等, 由单光镊、双光镊^[10]到多光镊, 由线性光镊、旋转光镊、全息光镊^[11]到纳米光镊^[12-13], 大大提高了光镊的测量精度和广度, 这也预示着光镊技术具有不可估量的发展前景和广阔的应用领域。

本文将首先介绍单分子光镊技术的基本原理和装置, 并结合实验室的研究方向, 介绍有关光镊的基本实验设计、光镊在生命科学领域的应用, 最后对光镊的发展前景进行展望。

1 光镊基本原理

光是一种电磁波, 在与物质相互作用时不仅会发生能量的传递, 也会发生动量的传递, 也就是说光会对该物质施加一定的力, 即产生光的力学效应。1970年, Ashkin^[14]首次提出光辐射压力(光压)可以操纵微小微粒。1986年, Ashkin等^[15]发现, 只需要一束高度聚集的激光, 就可形成稳定的三维光学势阱以稳定俘获微粒, 由于只使用了一束激光, 所以称之为

单光束梯度力光阱, 简称光镊。

光镊是基于光的辐射力建立的。如图2所示, 在折射率为 n_2 的介质中存在一个折射率为 n_1 的微粒($n_1 > n_2$), 当一束带有动量 P_1 的激光穿过该微粒时, 经两次折射后, 激光的动量变为 P_2 。根据动量守恒定律, 微粒将产生与激光的动量变化大小相等、方向相反的动量, 即 Δp 。由动量与冲量的关系和牛顿第二定律可知, 微粒会受到一等于动量变化率的作用力, 因此, 当我们采用高数值孔径($NA > 1$)^[15]的物镜将激光聚焦到一个焦点 f (捕获中心)时, 不论微粒上、下、左、右、前、后偏离激光焦点 f , 微粒都会受到一个指向焦点的作用力。这个焦点就如同一个“陷阱”可以捕获该微粒, 因此在光镊实验中, 我们通过调节激光的位置就可以像一把无形的“镊子”达到操控微粒的目的。

同时, 微粒偏离捕获中心的距离和其受到的回复力成正比^[16], 这决定了光镊对微粒的操控不是刚性的, 而是类似于“弹簧”, 并符合胡克定律 $F = -k\Delta x$ 。其中, F 是拉力, k 是光镊的刚度系数(stiffness), Δx 是微粒偏离激光中心的位移。通过微粒产生位移和激光的刚度系数即可计算出拉力 F 。因此, 在操作过程中, 我们可以通过实时测量微粒的位移得到微粒间的相互作用力, 从而得到与微粒相连的生物分子上所受的作用力。

2 光镊实验设计

光镊技术的实验环境一般为接近于生理环境的水溶液, 可减少样品的损伤, 同时实现在生物分子具有生理活性的条件下实时监测分子动态行为的

目的。

此外, 如何对样品进行处理是光镊实验设计中的另一个关键问题。由于生物分子, 例如DNA、蛋白质等, 往往在几纳米到几十纳米之间, 光镊的刚度一般不能稳定地捕获和操控生物分子, 因此, 需要借助一个表面修饰的微米量级的小球(微球)作为“手柄”, 将生物样品通过化学偶联黏附在微球上, 通过直接操控微球达到间接操控生物分子的目的^[17]。生物大分子尤其是蛋白分子, 通常尺寸较小, 因此会在生物分子的一端或两端通过化学方法交联上一段或两段DNA Handle^[18], 使得生物分子两侧的微球间有足够的空间距离, 方便对单个生物分子进行力的测量并且减少微球间不必要的相互作用; 选用的DNA Handle分子长度一般大于500 bp^[8]。图2是双光镊技术研究生物样品的经典单分子实验体系^[19]示意图(以DNA Hairpin为例), 两个聚苯乙烯小球表面分别免疫修饰了Streptavidin和anti-Digoxigenin, DNA Hairpin一端被标记biotin与Streptavidin修饰的微球相连, 另一端则通过巯基与DNA Handle共价交联; DNA Handle则通过Digoxigenin与修饰anti-Digoxigenin的微球相连。因此, 当我们利用两束激光分别捕获两个微球时, 就可以对微球间的conjugates进行操作, 通过移动光阱的位置, 微球间的距离和力都会发生改变, 我们通过测量这些数据就可以得到相关的动力学信息。

3 光镊技术在生命科学中的应用

近年来, 基于光镊技术的应用研究, 证实了该技术独到的应用价值。光镊的应用基本分为四类, 即光镊与细胞生物学、光镊与单分子生物学、光镊与软物质胶体科学和光镊与物理学四个领域。在这些领域中, 科学家们利用光镊技术解决了许多重要的科学问题。结合我们实验室的研究方向, 我们将主要对光镊在单分子生物学的应用加以介绍。光镊亚纳米级的空间分辨率和飞牛顿的力分辨率使其在研究一些生物大分子(如DNA/RNA双链特性^[20-22]、分子马达的分子机制和生物学功能^[17, 23-24]、蛋白质折叠^[25-27]以及染色质重塑^[28]等)的动态运动细节(中间态、能量、折叠速率、作用力、距离等)方面成为一项不可或缺的单分子技术, 并展示出巨大的发展前景。以下我们将对一些代表性的研究成果进行简要介绍。

3.1 研究DNA力学性质

现代生物学中一个最基本的生物学定律就是中心法则: 即遗传信息可由DNA流向DNA, 完成DNA的自我复制过程; 也可由DNA流向RNA再进一步流向蛋白质, 完成转录翻译过程。这是构成现代生物学的理论基石, 因此, DNA、RNA与蛋白质的特性以及它们之间的相互作用无疑是整个生物学研究的核心。Bustamante等^[29]首先利用单分子磁镊技术操纵长约16 μm 的dsDNA分子, 测量了DNA的拉伸特性: 在0.1~10 pN范围内, DNA的拉伸行为符合蠕虫链模型(worm-like chain, WLC), 持久长度为50 nm; 而当力增加到65 pN时, DNA的结构由B型变成S型^[30-31]; 人们用同样的方法研究了ssDNA的力学性质, 发现与dsDNA的拉伸曲线截然不同, ssDNA的持久长度仅有1 nm。基于这些实验结论, 科学家们就可以通过研究蛋白质对DNA拉伸特性的改变来研究DNA相关蛋白(如RNA聚合酶、核糖体、DNA移位酶等)的工作机制。

细胞分裂时, DNA会发生凝缩形成高度聚集结构以维持遗传信息的稳定性。之前人们对DNA如何形成核小体结构已经有了一定的认识, 但是对更高级的染色体结构形成缺乏了解。Case等^[32]利用光镊技术将参与高级染色体结构形成的凝聚蛋白MuK-BEF作为研究对象解析了这一动态凝聚过程。Case等发现, 与naked DNA的力-延伸曲线(force-extension curve, FEC)相比, MuKBEF-DNA复合体表现出更大变化率的力-延伸曲线(FEC), 并且当拉力达到17 pN时, MuKBEF-DNA复合体会经历一个锯齿状振荡的平坦曲线, 说明MuKBEF-DNA复合体经历了个别凝聚事件(MuKBEF结合到DNA上时利用“夹子”这种张合的方式来凝聚DNA)。而当力被撤回时, MuKBEF-DNA复合体重新回到原始的凝聚态, Case等根据这一现象提出了MuKBEF复合物凝缩DNA的“夹子”模型, 这一研究为DNA凝缩机制的研究提供了重要的科学依据。

3.2 研究分子马达的运动机制

生物机体的一切活动, 从DNA的复制和转录、细胞分裂、肌肉收缩到细胞内物质转运, 最终都归结为分子马达做功的结果。分子马达通过运动可以快速高效地将化学能转化为动能, 执行各种生物功能, 因此, 分子马达的动力学机制成为研究者们关注的焦点。科学家利用光镊观察了分子马达运动过程,

发现分子马达是以步进形式运动的, 并测量了蛋白的运动步长, 证明了单个驱动分子的力和运动速度与ATP浓度相关^[17,23,33-34]。这些研究使得光镊成为研究单酶动力学的重要手段, 促使科学家利用光镊技术研究表观遗传调控机制, 尤其是ATP依赖的染色体重塑复合物的运动机制^[35]。

基因组DNA通常以染色质的形式存在于细胞中, 以维持遗传信息的稳定性。然而很多细胞生命活动(比如基因转录、DNA复制、DNA修复、DNA重组等)的正常进行都需要不同的DNA结合蛋白或者反式作用因子结合到特定的DNA区域(如启动子、增强子等顺式作用元件), 进而发挥功能, 因此, 需要染色体重塑蛋白复合物移动、驱逐和重组核小体使得染色质DNA从核小体上暴露出来。目前, 光镊研究染色体重塑复合物的工作已经取得了一定的进展。

Bustamante实验室利用光镊成功操作单个核小体并研究核小体动态行为, 发现在2~3 pN的力作用下, 核小体上外围DNA与组蛋白八聚体的相互作用会被打破, 而内部DNA与组蛋白的相互作用被打破则需要20 pN以上的力^[36]。Zhang等^[37]则利用光镊在核小体水平实时监测了RSC复合物的作用, 测定了RSC转移速率等动力学参数, 证实了RSC是依赖核小体的转移酶。Hall等^[38]发现, 核小体中DNA-组蛋白相互作用并不是均匀的, 在空间上存在约5 bp的周期, 有3个强的作用区域, 其中dyad区域的作用最强, 另两个较强的作用区域在离dyad约±40 bp处, 而核小体的进出端的相互作用较弱, 这些强弱不同的相互作用形成了不同的能垒。这些能垒可能对染色体重塑复合物有着重要的影响, 因为染色体重塑时可能需要克服核小体上的能垒, 这些参数为以后染

色体重塑复合物具体工作机制的研究提供了很好的参考。

3.3 研究蛋白质折叠的动力学机制

光镊在单分子生物学的另一个重要应用就是研究蛋白质折叠的动力学过程。在蛋白质折叠研究中, 人们往往最关心的问题就是一维的氨基酸序列以何种方式折叠而变成稳定的有功能的三维结构的。众所周知, 蛋白质的折叠态、去折叠态及错误折叠态在生物体系中都同时存在。这些态与态之间的相互转换和生物体系的功能直接相关, 同时也和疾病的形成有着密切的关系^[8]。尽管人们已经利用各种传统的生物化学方法对蛋白质去折叠过程进行了几十年的深入研究, 但对蛋白质折叠过程中的具体动力学细节仍知之甚少。光镊技术可以对操控单个蛋白分子并实施观测整个折叠和去折叠的动力学过程, 因此被越来越多地应用到研究生物物理的精细过程中。

最近, Gao等^[26]利用双光镊技术对突触SNARE蛋白的组装机制进行了深入研究。在神经细胞分泌过程中, SNARE蛋白介导突触小泡与突触前膜的融合。SNARE蛋白包括定位在靶细胞膜上的t-SNARE(syntaxin和SNAP-25)和囊泡膜上的v-SNARE, 只有当t-SNARE和v-SNARE通过组装形成“拉链式”复合物时才能驱动膜融合。尽管过去的二十年已经做了大量研究, 但是“拉链式”假说、装配中间体、动力学和能量仍然不明。Gao等^[26]通过实时观测单个SNARE复合体的组装/去组装过程, 发现了SNARE复合体的“拉链式”结构和关键的“半拉链式”装配中间体(t-SNARE和v-SNARE部分折叠到“离子层”), 提出了一种效率高的“拉链式”组装模型, 即:

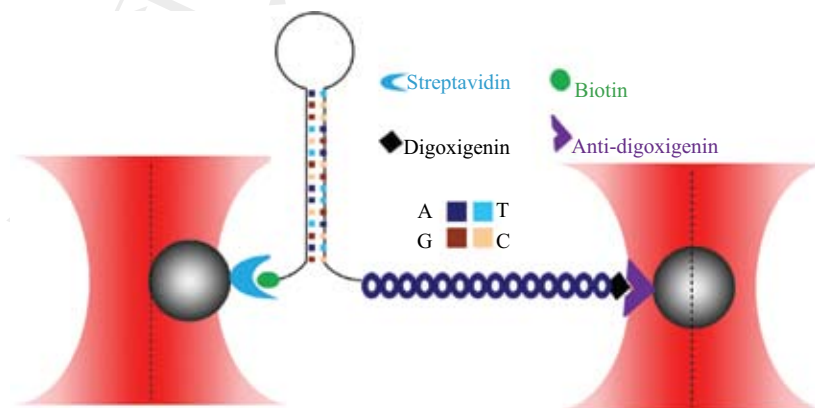


图3 高分辨率双光镊技术研究生物大分子动力学的经典单分子实验体系示意图

Fig.3 Typical experimental setup for macromolecule kinetic studies using high-resolution dual-trap optical tweezers

SNARE复合体N末端的“拉链式”组装是缓慢的,从而SNARE装配中间体可以充当调节蛋白(如Munc18和Complexin)的结合平台,然后在调节模式下,进一步稳定地装配中间体快速及强有力地进行“拉链式”组装直到C末端,最终在跨膜区驱动膜融合。此外,Zhang实验室的研究还表明,这种分步组装的过程是SNARE复合体的普遍特性,具有进化的保守性^[39]。

该研究成果从分子水平上加深了人们对神经分泌过程中SNARE蛋白复合体驱动融合机制的深入了解,同时为我们探索更多疾病相关性蛋白的动力学机制提供了很好的模式基础,相信我们可以通过光镊技术从生物物理层面解释某些蛋白与疾病形成的关联,为开发抗癌药物提供更精确的结构水平的信息。

4 光镊与其他技术相结合

以上关于光镊技术应用在生命科学领域的研究仅仅是冰山一角,但已经向我们展示了光镊在单分子水平研究生物大分子动力学的优越性,它的应用极大地推动了生命科学尤其是生物物理学的发展,加速了人们从单分子水平解析DNA、蛋白质以及各种酶反应的动力学过程。然而,每项实验技术都有其一定的局限性,这就需要相关技术手段结合,克服彼此的劣势,达到最理想的功效。光镊也常常与其他光学技术相结合,成为性能更优越的技术手段。

4.1 光镊与smFRET技术结合

生物大分子尤其是蛋白质往往是三维结构,但目前光镊仅能在一维空间研究它们结构动力学(沿光阱移动方向),存在一定的局限性。例如,马达蛋白沿底物移动时会经历复杂的分子内构象改变,超高分辨率光镊仅能研究马达蛋白沿底物移动的步长等动力学信息,而无法获知蛋白的具体构象变化过程。smFRET技术即单分子荧光共振能量转移检测技术,则可通过给生物分子的不同结构域,或者相互作用的分子,比如受体与配体上分别标记donor和acceptor的染料分子,实时地观测分子构象的变化过程,但其空间分辨率不高。

因此,为实现在亚纳米级的空间尺度上研究生物分子构象变化的目的,科学家们采用交错分时的方法(interlacing and timesharing method)将smFRET与光镊技术相结合,并利用ssDNA与其互补序列的

杂交过程证明了该方法的可行性^[40]。相信随着这种整合仪器设备的进一步完善,科学工作者将会通过荧光信号和成像技术在单分子、亚纳米级空间尺度上多角度监测生物分子的构象改变,尤其是一些蛋白复合物和大分子机器,得到更多的动力学信息。

4.2 光镊与拉曼光谱结合

当一束单色光通过振动的分子时会发生非弹性散射,入射光的能量变化与分子内部分子键(molecular bond)的振动能量相一致,收集分子对入射光的拉曼散射光谱,就可以判断分子的生物化学组成^[41]。传统共聚焦显微拉曼光谱的后向散射横切面很小,散射强度十分微弱,因此所得到的拉曼信号很弱,同时拉曼光谱探测技术通常使用化学修饰将研究对象固定在机制上,这种配置非常不利于生物分子维持其天然的生理状态,也不利于背景噪声的去除。而结合光镊技术的激光光镊拉曼光谱系统(laser tweezers Raman spectroscopy, LTRS)则可以利用激光形成的光阱捕获生物分子,实现在溶液中将其固定并同时得到光谱信号的目的,保证了生物分子天然的微环境,大大提升了光谱的信噪比^[41]。近年来,激光光镊拉曼光谱系统已广泛应用于不同细胞类型的分选^[42]、细菌孢子^[43]、囊泡^[44]等研究。

不同于荧光技术,拉曼光谱的非弹性散射使其避开了光学漂白,可以实现实时、连续监测单细胞的动态过程。Moritz等^[45-46]利用激光光镊拉曼光谱控制单个大肠杆菌细胞,研究其对抗菌药物的敏感性。首先在无药状态下测定大肠杆菌在生长周期的不同阶段与DNA、RNA及蛋白质相关的不同拉曼振动谱带,然后在加药(盘尼西林/链霉素、头孢唑林)状态下测定 729 cm^{-1} 、 $1\ 245\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\ 660\text{ cm}^{-1}$ 的光谱谱带并与无药状态下的拉曼光谱相比较,发现大肠杆菌对头孢唑林更加敏感。

激光光镊拉曼技术无需样品预处理,对样品无损害,是临床研究一个很好的切入点,相信随着该技术的进一步发展,其在细胞分选、癌细胞检测及细胞动力学单细胞水平研究上会越来越有发展空间。

5 发展前景及展望

由于光镊技术集电子、光学、计算机编程、微观操作和生物学为一体,国际上仅少数实验室搭建了不同形式、可操作性强的光镊装置,但随着光镊应用日趋广泛,光镊的潜在发展趋势也越发引人关

注, 更多的科研人员投身于光镊技术的理论研究和应用研发, 相信在不久的将来, 随着光镊技术日趋成熟以及与其他光学技术结合, 如荧光技术、拉曼光谱、全息技术、纳米孔等, 光镊这项富有活力的新兴技术将会在实时连续监测单细胞/单分子的生物动力学, 细胞与细胞、分子与分子间的相互作用等生命科学领域做出更多贡献。

参考文献 (References)

- 1 Juette MF, Terry DS, Wasserman MR, Zhou Z, Altman RB, Zheng Q, *et al.* The bright future of single-molecule fluorescence imaging. *Curr Opin Chem Biol* 2014; 20: 103-11.
- 2 Singh AP, Wohland T. Applications of imaging fluorescence correlation spectroscopy. *Curr Opin Chem Biol* 2014; 20: 29-35.
- 3 Rust MJ, Bates M, Zhuang X. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nat Methods* 2006; 3(10): 793-5.
- 4 Bates M, Huang B, Dempsey GT, Zhuang X. Multicolor super-resolution imaging with photo-switchable fluorescent probes. *Science* 2007; 317(5845): 1749-53.
- 5 Huang B, Wang W, Bates M, Zhuang X. Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy. *Science* 2008; 319(5864): 810-3.
- 6 Xu K, Zhong G, Zhuang X. Actin, spectrin, and associated proteins form a periodic cytoskeletal structure in axons. *Science* 2013; 339(6118): 452-6.
- 7 Neuman KC, Nagy A. Single-molecule force spectroscopy: Optical tweezers, magnetic tweezers and atomic force microscopy. *Nat Methods* 2008; 5(6): 491-505.
- 8 Zhang X, Ma L, Zhang Y. High-resolution optical tweezers for single-molecule manipulation. *Yale J Biol Med* 2013; 86(3): 367-83.
- 9 Nugent-Glandorf L, Perkins TT. Measuring 0.1-nm motion in 1 ms in an optical microscope with differential back-focal-plane detection. *Opt Lett* 2004; 29(22): 2611-3.
- 10 Moffitt JR, Chemla YR, Izhaky D, Bustamante C. Differential detection of dual traps improves the spatial resolution of optical tweezers. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(24): 9006-11.
- 11 Yamamoto J, Iwai T. Highly controllable optical tweezers using dynamic electronic holograms. *Curr Pharm Biotechnol* 2012; 13(14): 2655-62.
- 12 Al Balushi AA, Kotnala A, Wheaton S, Gelfand RM, Rajashekara Y, Gordon R. Label-free free-solution nanoaperture optical tweezers for single molecule protein studies. *Analyst* 2015; 140(14): 4760-78.
- 13 Kotnala A, Gordon R. Double nanohole optical tweezers visualize protein p53 suppressing unzipping of single DNA-hairpins. *Biomed Opt Express* 2014; 5(6): 1886-94.
- 14 Ashkin A. Acceleration and trapping of particles by radiation pressure. *Phys Rev Lett* 1970; 24(4): 156-9.
- 15 Ashkin A, Dziedzic JM, Bjorkholm JE, Chu S. Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles. *Opt Lett* 1986; 11(5): 288.
- 16 Simmons RM, Finer JT, Chu S, Spudich JA. Quantitative measurements of force and displacement using an optical trap. *Biophys J* 1996; 70(4): 1813-22.
- 17 Finer JT, Simmons RM, Spudich JA. Single myosin molecule mechanics: Piconewton forces and nanometre steps. *Nature* 1994; 368(6467): 113-9.
- 18 Cecconi C, Shank EA, Bustamante C, Marqusee S. Direct observation of the three-state folding of a single protein molecule. *Science* 2005; 309(5743): 2057-60.
- 19 Cecconi C, Shank EA, Dahlquist FW, Marqusee S, Bustamante C. Protein-DNA chimeras for single molecule mechanical folding studies with the optical tweezers. *Eur Biophys J* 2008; 37(6): 729-38.
- 20 Liphardt J, Onoa B, Smith SB, Tinoco I Jr, Bustamante C. Reversible unfolding of single RNA molecules by mechanical force. *Science* 2001; 292(5517): 733-7.
- 21 Woodside MT, Behnke-Parks WM, Larizadeh K, Travers K, Herschlag D, Block SM. Nanomechanical measurements of the sequence-dependent folding landscapes of single nucleic acid hairpins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(16): 6190-5.
- 22 Bustamante C, Bryant Z, Smith SB. Ten years of tension: Single-molecule DNA mechanics. *Nature* 2003; 421(6921): 423-7.
- 23 Visscher K, Schnitzer MJ, Block SM. Single kinesin molecules studied with a molecular force clamp. *Nature* 1999; 400(6740): 184-9.
- 24 Wang MD, Schnitzer MJ, Yin H, Landick R, Gelles J, Block SM. Force and velocity measured for single molecules of RNA polymerase. *Science* 1998; 282(5390): 902-7.
- 25 Gao Y, Sirinakis G, Zhang Y. Highly anisotropic stability and folding kinetics of a single coiled coil protein under mechanical tension. *J Am Chem Soc* 2011; 133(32): 12749-57.
- 26 Gao Y, Zorman S, Gundersen G, Xi Z, Ma L, Sirinakis G, *et al.* Single reconstituted neuronal SNARE complexes zipper in three distinct stages. *Science* 2012; 337(6100): 1340-3.
- 27 Stigler J, Ziegler F, Gieseke A, Gebhardt JC, Rief M. The complex folding network of single calmodulin molecules. *Science* 2011; 334(6055): 512-6.
- 28 Sirinakis G, Clapier CR, Gao Y, Viswanathan R, Cairns BR, Zhang Y. The RSC chromatin remodelling ATPase translocates DNA with high force and small step size. *EMBO J* 2011; 30(12): 2364-72.
- 29 Smith SB, Finzi L, Bustamante C. Direct mechanical measurements of the elasticity of single DNA molecules by using magnetic beads. *Science* 1992; 258(5085): 1122-6.
- 30 Smith SB, Cui Y, Bustamante C. Overstretching B-DNA: the elastic response of individual double-stranded and single-stranded DNA molecules. *Science* 1996; 271(5250): 795-9.
- 31 Cluzel P, Lebrun A, Heller C, Lavery R, Viovy JL, Chatenay D, *et al.* DNA: An extensible molecule. *Science* 1996; 271(5250): 792-4.
- 32 Case RB, Chang YP, Smith SB, Gore J, Cozzarelli NR, Bustamante C. The bacterial condensin MukBEF compacts DNA into a repetitive, stable structure. *Science* 2004; 305(5681): 222-7.
- 33 Schnitzer MJ, Block SM. Kinesin hydrolyses one ATP per 8-nm step. *Nature* 1997; 388(6640): 386-90.
- 34 Coy DL, Wagenbach M, Howard J. Kinesin takes one 8-nm step for each ATP that it hydrolyzes. *J Biol Chem* 1999; 274(6): 3667-71.
- 35 Bustamante C, Chemla YR, Forde NR, Izhaky D. Mechanical processes in biochemistry. *Ann Rev Biochem* 2004; 73: 705-48.

- 36 Mihardja S, Spakowitz AJ, Zhang Y, Bustamante C. Effect of force on mononucleosomal dynamics. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(43): 15871-6.
- 37 Zhang Y, Smith CL, Saha A, Grill SW, Mihardja S, Smith SB, *et al.* DNA translocation and loop formation mechanism of chromatin remodeling by SWI/SNF and RSC. *Mol Cell* 2006; 24(4): 559-68.
- 38 Hall MA, Shundrovsky A, Bai L, Fulbright RM, Lis JT, Wang MD. High-resolution dynamic mapping of histone-DNA interactions in a nucleosome. *Nat Struct Mol Biol* 2009; 16(2): 124-9.
- 39 Zorman S, Rebane AA, Ma L, Yang G, Molski MA, Coleman J, *et al.* Common intermediates and kinetics, but different energetics, in the assembly of SNARE proteins. *eLife* 2014; 3: e03348.
- 40 Comstock MJ, Ha T, Chemla YR. Ultrahigh-resolution optical trap with single-fluorophore sensitivity. *Nat Methods* 2011; 8(4): 335-40.
- 41 Chan JW. Recent advances in laser tweezers Raman spectroscopy (LTRS) for label-free analysis of single cells. *J Biophotonics* 2013; 6(1): 36-48.
- 42 de Luca AC, Rusciano G, Ciancia R, Martinelli V, Pesce G, Rotoli B, *et al.* Spectroscopical and mechanical characterization of normal and thalassemic red blood cells by Raman Tweezers. *Opt Express* 2008; 16(11): 7943-57.
- 43 Kong L, Zhang P, Setlow P, Li YQ. Characterization of bacterial spore germination using integrated phase contrast microscopy, Raman spectroscopy, and optical tweezers. *Anal Chem* 2010; 82(9): 3840-7.
- 44 Cherney DP, Conboy JC, Harris JM. Optical-trapping raman microscopy detection of single unilamellar lipid vesicles. *Anal Chem* 2003; 75(23): 6621-8.
- 45 Moritz TJ, Taylor DS, Polage CR, Krol DM, Lane SM, Chan JW. Effect of cefazolin treatment on the nonresonant Raman signatures of the metabolic state of individual *Escherichia coli* cells. *Anal Chem* 2010; 82(7): 2703-10.
- 46 Moritz TJ, Polage CR, Taylor DS, Krol DM, Lane SM, Chan JW. Evaluation of *Escherichia coli* cell response to antibiotic treatment by use of Raman spectroscopy with laser tweezers. *J Clin Microbiol* 2010; 48(11): 4287-90.