

* 专题评述 *

应用分子梳技术对 DNA 单分子的研究*

刘玉颖^{1**} 王鹏业² 窦硕星²

1. 中国农业大学理学院应用物理系, 北京 100083;

2. 中国科学院物理研究所软物质物理实验室, 北京凝聚态物理国家实验室, 北京 100080

摘要 分子梳技术是一种有效的拉伸 DNA 分子的手段, 它利用流体流动过程中施加的力将 DNA 分子拉伸开并且平铺在固体表面上, 在每个玻片上可以同时拉伸很多 DNA 分子并且整齐地排列, 使之便于统计分析数据. 利用分子梳技术可以在单分子水平上研究 DNA 复制、转录过程以及 DNA-蛋白质相互作用. 文中主要介绍分子梳技术原理、实现方法及其重要应用.

关键词 DNA 分子 分子梳 DNA-蛋白质相互作用

生命活动是细胞内蛋白质、DNA 和 RNA 等生物大分子通过酶反应和复杂的信号通路来实现的. 近年来一些高分辨的分析方法例如 X 射线晶体学、核磁共振谱(NMR)等提供了大量生物分子的结构信息. 但是, 为了定量地理解复合体分子以及多种分子参与的生物化学反应过程, 需要建立新的方法. 以往对生物大分子行为的研究所采用的传统生物技术方法, 得到的结果往往是许多分子的一个统计平均值, 并不能反映出每个生物分子的实际状态和功能, 而许多生物分子在生物体内的作用是在单分子水平上进行的. 在单个分子水平上对生物大分子进行探测和操纵是目前生命科学领域研究的热点之一^[1]. 其中 DNA 分子——遗传信息的携带者, 是生命的核心物质. 通常 DNA 分子在溶液中呈无规则卷曲状, 为了更方便地观察 DNA 这种线形分子, 近年来, 拉伸 DNA 分子已成为人们操纵 DNA 单分子的一种重要手段. 许多物理手段被用于拉伸 DNA 分子, 例如磁镊^[2-4]、光镊^[5-8]、光纤与微吸管结合使用^[9]、分子梳技术^[10-12]等. 这些生物操纵工具与单分子荧光检测相结合, 可以在细节上研究分子间作

用的生物化学反应过程, 对单个分子的动力学行为进行观察, 从而探索分子间的相互作用机制.

在本文中, 我们综述拉伸 DNA 分子的一种有利手段——分子梳技术及其在生物学领域中的重要应用.

1 分子梳技术

拉伸和操纵单个生物大分子(如 DNA)时, 通常将此分子的一端固定在固态基质上, 然后通过粘滞力、电泳、光学等方法对高聚物分子进行拉伸. 分子梳技术是通过退却的液面对 DNA 分子进行拉伸并且将拉伸的 DNA 分子平铺在干燥的基底上, 这种物理拉伸过程导致对大量的 DNA 分子进行完全的、可控制的、重复性的拉伸, 从而能够对 DNA 分子的各个片段准确地定位^[10]. 最近, DNA 分子的操纵已成为单分子操纵和探测的研究热点, 其中报道最多的是 DNA 分子的拉直方法及其在生物学中应用的研究. 快速、精确的基因组物理图谱的绘制、基因定位、有序测序等, 是人类基因组、后基因组计划所要解决的重要问题, 利用分子梳技术对 DNA 的拉直和操纵为实现这一目标进行了很

2006-07-31 收稿, 2006-09-25 收修改稿

* 国家自然科学基金资助项目(批准号: 60025516, 10334100)

** E-mail: 51888lyy@sina.com

有成效的方法学探索. DNA 拉直的探测手段有荧光显微术(FM)与原子力显微术(AFM), FM 作为 DNA 单分子成像的工具始于 20 世纪 80 年代, 但高质量的 DNA 单分子荧光图像的获得依赖于新近发展的高效率的 DNA 荧光分子探针和高灵敏度冷却电荷耦合装置(CCD)的应用.

1.1 分子梳技术基本原理

分子梳是人们在试图使 DNA 与固体表面特异性结合时发现的. 简单的原理是: DNA 分子的末端与疏水表面之间存在物理的或化学的结合力, 与表面结合的 DNA 分子整齐地被拉伸排列. DNA 溶液的纯度对成梳过程很重要. 该方法中的关键因素是 DNA 分子的一个末端与表面结合, 在溶液中, DNA 分子呈无规则线团形, 它的尺寸和形状由于 Brown 运动随机波动, 一旦与表面接触, DNA 分子末端有可能与表面结合^[13], 然后通过退却的液面对其拉伸, 使其整齐地排列在固体表面上. 形象地讲, 通过分子梳技术使 DNA 由溶液中无规则线团形变成线形. 在拉伸的过程中, DNA 与固体表面结合的力可能是疏水作用或静电力作用.

1.2 实现分子梳的方法

自从 1994 年 Bensimon 等^[10]首次发明分子梳技术后, 至今分子梳技术得到了快速的发展, 兴起了很多种分子梳技术.

利用分子梳方法拉伸 DNA 分子时, 不需对 DNA 分子末端进行特殊的化学修饰. 在一定的 pH 值范围内, 多种疏水表面上都可以实现分子梳^[14]. 所以近些年来发展了多种可以实现拉伸 DNA 的分子梳方法: 动态分子梳(液面在玻片上移动^[12])、旋涂法^[15,16]、液滴直接蒸发法^[17,18]、玻片覆盖法^[10, 19]、控制液滴移动拉伸^[20]、压缩的氮气驱动拉伸^[21]、准确控制液面流动法^[22]、微型聚苯乙烯线间拉伸^[23]等. 尽管分子梳方法多种多样, 但成梳过程遵循着共同的原理, 即疏水表面的制备、DNA 分子的荧光标记和 DNA 分子拉伸. 多种成梳方法在于拉伸 DNA 分子所采用的具体方法有所不同; 下面对动态分子梳、旋涂法、液滴直接蒸发法作简要介绍.

1.2.1 动态分子梳 动态分子梳技术(dynamic molecular combing, DMC)是一种很重要的、有效

的、独立的方法, 它不同于 PCR 和细胞遗传学手段. 它可以准确地定量测量 DNA 杂交克隆的大小及其它们间的距离, 可以解决从几 kb 到几百 kb 的问题, 不需其他方法作标准. DMC 可以优化顺序已知的粘端 DNA 图谱, 测量 DNA 中毗连群间的距离, 测量 DNA 的异常部位. 该方法不仅在遗传学, 例如基因测序工程(需要基因测序图谱), 而且在诊断学上也适用. DMC 可以检查大 DNA 克隆的完整性及其稳定性.

动态分子梳的实现方法分为以下几个步骤: (i) 制备硅烷或聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)等疏水表面包被的玻片; (ii) 制备一定浓度的 DNA 溶液, 用高灵敏度荧光染料(例如 YOYO-1)标记 DNA 分子; (iii) 将疏水表面包被的玻片浸于溶液中 5 min, 使 DNA 分子的末端结合到玻片上; (iv) 以一定的速度将玻片从溶液中抽出. 在玻片-溶液界面处, 由于液体表面张力的作用, 使得 DNA 分子被拉伸, 硅烷表面的疏水性使表面很快干燥, 被拉长的 DNA 纤维不可逆地被固定在玻片表面上, 这些 DNA 纤维平行地分布于整个疏水表面, 似梳子状. DNA 分子在整个表面上伸展是均匀的, 它不受 DNA 片段大小的影响.

1.2.2 旋涂法 我们利用旋涂法对 DNA 分子进行有效的拉伸, 将标有荧光染料的 DNA 溶液(5—10 μL)滴在疏水表面上, 培育 5 min, 在此培育过程中一些 DNA 分子的末端与疏水表面结合, 然后以一定的角速度旋转玻片, 角速度通常在 2000—7000 r/min, 旋转 1 min, 旋涂完毕后在疏水表面上可以得到拉伸的 DNA 分子, 形成较好的单分子梳(图1(a)). 在液滴旋转过程中 DNA 分子被拉伸开, 如果 DNA 分子所在处的线速度过大, 在溶液中其末端与表面结合的 DNA 分子在旋转过程中将与疏水表面脱离, 所以控制合适的旋转速度和旋转时间对形成单分子梳是十分重要的.

1.2.3 液滴蒸发法 液滴蒸发法是一种简便易行、且对 DNA 分子进行有效拉伸的方法. 将 DNA 溶液(1—2 μL)滴在 PMMA 等疏水表面上, 最初, 液滴的边界线几乎不动, 5—10 min 后, 由于液滴的明显蒸发, 空气与水边界线开始回缩, 其末端与疏水表面结合的 DNA 分子被拉伸, 且被固定在干燥的

疏水表面上,而那些未与表面结合的 DNA 分子随着液体的流动被冲走.结果很多数目的 DNA 分子被拉伸并且呈放射状地整齐地分布在疏水表面上,

类似于太阳光线的形状.在液滴最初边缘处分子梳分布较密集(图 1 (b)).利用分子梳与荧光显微技术相结合,可进行 DNA 单分子的荧光观察.

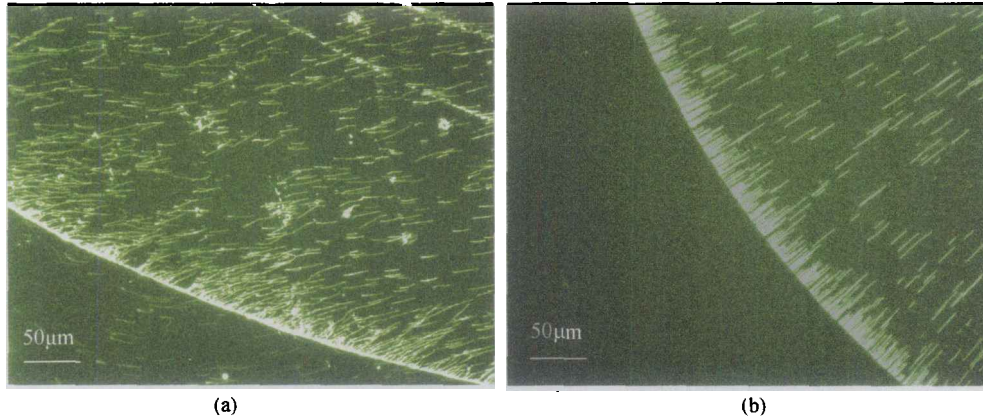


图 1 DNA 单分子梳
(a) 旋涂法; (b) 液滴蒸发法

1.3 分子梳技术的应用

分子梳技术从它被发明到现在短短几年内,已有了较大的发展,兴起了多种分子梳技术,用于研究 DNA 分子的性质等.分子梳技术本身具有以下优点:能够同时拉伸大量的 DNA 分子,重复性好.分子梳技术作为一种工具,与其他技术相结合,可以大大拓展它的应用范围,解决多种问题.在生物技术方面,分子梳技术与荧光原位杂交技术相结合,可以快速地对 DNA 进行分析,从而应用于癌症的检测^[24]、药物治疗功效的检测等.在分子电子学上也有潜在的应用前景,例如在基底上整齐排列的 DNA 分子可以作为二维纳米级装置的模板^[25].

1.3.1 研究染色体上的基因定位 DNA 分子携带着遗传信息,而对于染色体上基因所处的位置,以及哪些是不包括基因的 DNA 序列等问题都有待于解决.因为染色体呈高度卷曲、扭曲状,用许多方法不能看到它的结构.利用分子梳技术对染色体成梳,用荧光标记染色体上的特定序列,可以大大方便对染色体的观察.例如利用分子梳技术和荧光原位杂交检测病人 *TSC 2* 基因部位的突变^[12],其过程包括标记探针、用分子梳技术制备 DNA 纤维、荧光原位杂交及检测分析.分子梳的运用可以得到高分辨率的物理图谱(1—4 kb),对基因组和染色体

结构进行研究,以及致病基因的定位克隆(重复、易位)等^[12](图 2).

1.3.2 研究 DNA 分子复制过程 DNA 分子携带着遗传信息,它的复制在时间空间上必须严格地控制,但是复制的时间空间机制才刚刚初步被揭示.利用分子梳技术与荧光原位杂交技术可以在单分子水平上研究 DNA 的复制.进入合成期以前的染色体用 biotin-dUTP 标记,成梳后通过红色荧光抗体(Texas red)观测,以标记整个染色体;后来复制的序列(进入合成期后不同时刻的染色体)用 digdUTP 标记,成梳后通过绿色荧光抗体(FITC)观测.这样就能得到不同时刻染色体的一系列图谱(图 3),并以此分析复制过程,例如复制起点、复制双向进行、复制子的大小等;并可在单分子水平上研究 DNA 复制、复制叉密度随时间变化等,从而研究复制的进程随时间、空间的变化规律^[26].

除此之外,利用分子梳这一技术平台,与荧光原位杂交和高分辨率观察手段相结合,可以提高对整个基因组 DNA 所有部位的结构和功能分析,例如测量基因位点间的距离、疾病发生时基因的缺失、与致癌基因联系的基因的扩大等.分子梳是目前惟一能鉴别复制起点及其动力学的方法.我们知道,癌细胞复制是无休止的、无法控制的,所以通

过分子梳提供的关于不同复制阶段的 DNA 图谱, 可以区分正常细胞和癌细胞. 此技术已经应用在乳腺癌、子宫癌一些基因的检测中^[24].

1.3.3 研究 DNA 转录过程 利用分子梳技术与荧光显微技术相结合, 通过荧光标记且观察新合成的 RNA, 可以在单个 DNA 分子上研究 DNA 的转录情况. 具体过程为: 用分子梳技术将 DNA 分子拉

伸在疏水的表面上, 然后将 DNA 分子在转录缓冲液中再次水解, 转录缓冲液含 T7DNA, NTPs, T7RNAP, RNase 抑制剂、UTP-Alexa 等. 在转录缓冲液中培育后, 成梳的 DNA 分子上发生转录, 在 NTPs 和 UTP-Alexa 存在时, RNAP 合成出的 RNA 发荧光, UTP-Alexa 用于标记 RNA. 该荧光可以作为一个灵敏的探针检测转录的效率^[27]. 结果发现在过分拉伸的 DNA 中无转录发生, 拉伸不太

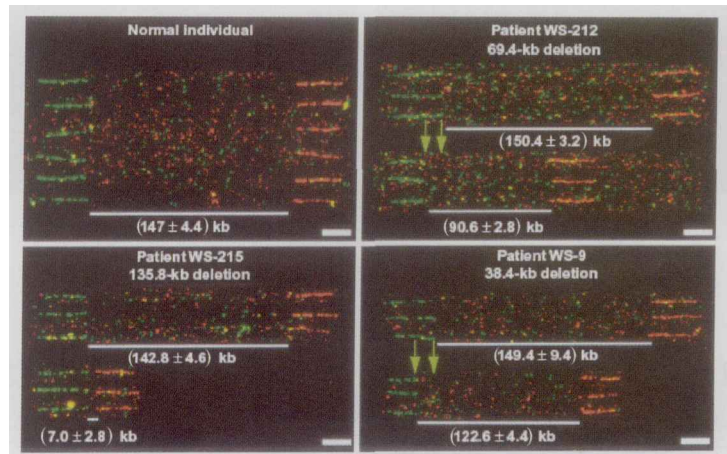


图2 利用分子梳技术和荧光原位杂交检测病人 *TSC2* 基因的突变^[12]

粘粒 CBFS1 在基因 *TSC2* 的末端, 粘粒 GGG4A 在基因 *TSC2* 的近端. 这两个粘粒与整个成梳的 DNA 杂交, 并应用两种不同颜色的荧光检测. 每组实验中显示出 6 种有代表性的信号组合, 来自病人 (WS-212, WS-9, WS-215) 的上方的 3 个信号显示了正常的等位基因, 而下方的 3 个信号显示了突变. 在两个病人 (WS-212 和 WS-9) 中, 其中一个粘粒的信号已经缺失 (标尺: 10 μm)

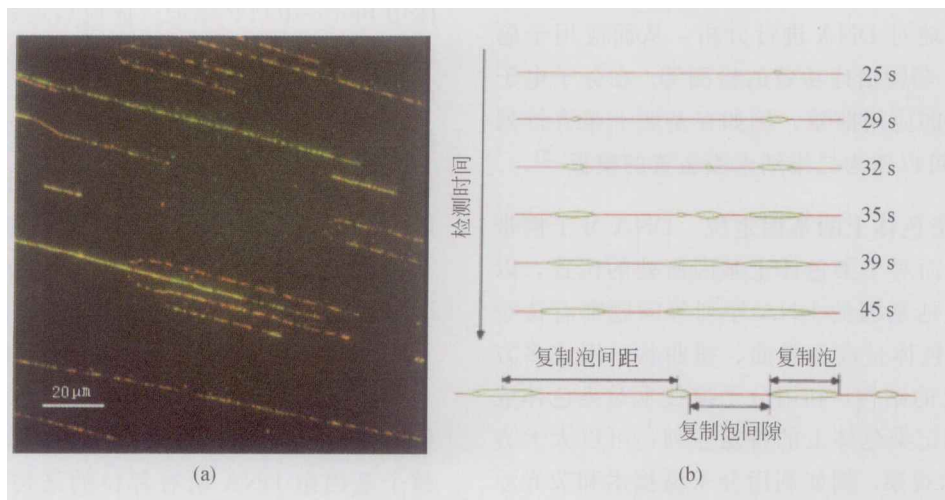


图3 DNA 分子荧光显微照片和不同时刻染色体系列图谱

(a) DNA 分子荧光显微照片. 较早复制的序列用 biotin-dUTP 标记, 通过红色荧光抗体 (Texas red) 观测, 后来复制的序列用 digdUTP 标记, 通过绿色荧光抗体 (FITC) 观测^[26]; (b) 红色部位 (hole) 代表只有一种染料 (红色) 存在时合成的序列. 绿色部位 (eye) 代表加入第二种染料后新合成的序列

大的(接近原长)DNA 上发生了转录^[27].

1.3.4 研究 DNA 与酶、组蛋白间的相互作用 当 DNA 分子用荧光染料标记, 然后再与 *EcoRI* 酶与毫微米的发荧光粒子交联物共同培育, 成梳后, 用荧光显微镜观察. 此方法可以证明酶与 DNA 结合位点是特异性的^[28]. 分子梳技术与扫描探针显微术结合, 可以研究 DNA 的细微结构、寻找酶的结合位点, 为基因准确定位和建立精确的物理图谱提供了信息^[29].

组蛋白是一种很重要的蛋白质, 对 DNA 分子的压缩起着重要的作用, 这种结构不仅具有所占空间较小的特点, 而且与基因表达的自我调控密切相

关, 因而具有重要的生物学意义. 真核生物中, 形成染色质时组蛋白与 DNA 紧密结合. 我们利用分子梳技术^[30], 将 DNA-组蛋白复合体分子拉伸并且平铺在疏水表面上, 然后用倒置荧光显微镜观察单个 DNA 分子及其与组蛋白的复合体(图 4), 通过观察 DNA-组蛋白复合体的拉伸长度及其分子梳的分布, 可以得知 DNA 与组蛋白相互作用的影响因素, 这将有助于在单分子水平上研究 DNA 与组蛋白的相互作用^[31]. 我们还利用分子梳技术研究了几种金属离子(Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+})对 DNA 与组蛋白结合的影响^[32].

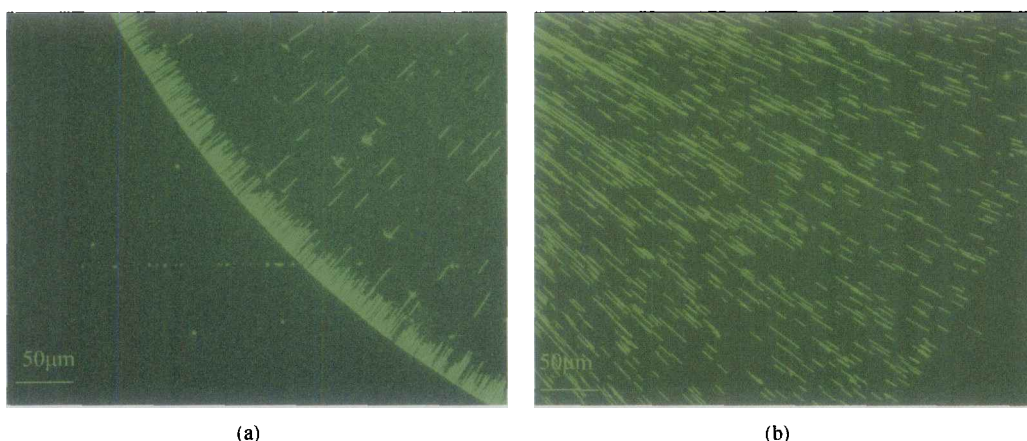


图 4 分子梳拉伸的 DNA 分子及其与组蛋白复合体的分布^[30]
(a) DNA(未加组蛋白); (b) 组蛋白浓度为 DNA 的 50 倍

利用分子梳技术及荧光显微术我们还研究了 DNA 与 *E. coli* RecQ 解旋酶的相互作用. DNA 解旋酶是一种分子马达, 它可以利用 ATP 水解的能量, 沿着 DNA 链移动^[33], 破坏互补碱基对间的氢键, 使互补链分开. 在 DNA 复制、转录、重组、修复等过程中起重要作用^[34, 35]. *E. coli* RecQ 解旋酶是 DNA 解旋酶的一种, 它由 610 个氨基酸组成, 并广泛地分布于多种物种中. 在我们的实验中, 应用分子梳技术在疏水表面上成功地拉伸了 DNA-RecQ 复合体分子, 并且利用荧光显微镜直接观察到了 DNA 与 RecQ 结合以及 DNA 被解旋的分子梳分布; 用原子力显微镜我们直接观察了 RecQ 蛋白及其与 DNA 结合的特性^[36]. 这些方法简单、有效, 更为重要的是它们能直接研究结合及解旋现象.

1.3.5 研究 DNA 分子的导电性 用分子梳技术将 DNA 分子排列在微电极之间, 可观察大量定向排列的 DNA 分子的导电性. 有研究表明, DNA 分子的电导率与 DNA 分子被拉伸的形状、其双螺旋结构、染料分子、疏水表面的性质等有关^[37].

对于 DNA 分子的导电行为人们还知之甚少. 有研究者们测量了干燥的 DNA 分子的导电性, 得出 DNA 分子的构型使其处于电子 π 态, 尽管抗衡离子使骨架上的空穴掺杂成为可能; 湿的 DNA 分子容易导电, 由于溶剂掺杂态使其位于大的 $\pi-\pi^*$ 能带间隙^[38]. DNA 分子的导电性具有很好的应用前景, 它在纳米电子学中可以作为分子导线^[39]. Deng 等用分子梳技术将 DNA 分子拉伸排列成平行或交叉的构型, 然后在 DNA 分子上进行化学钯沉积形

成一维平行或二维交叉的 DNA 金属纳米导线^[25], 这项研究对于纳米装置的构建具有重要的作用。

2 结论及展望

综上所述, 分子梳技术具有以下优点:

(1) 拉伸过程简单. 不管采用哪种拉伸方法, 都遵循以下原理: 首先对基底表面进行处理, 使其成为疏水表面, 然后使溶液中 DNA 分子的末端与疏水表面结合; 再借助流体的流动对 DNA 分子施加拉伸力的作用, 使 DNA 分子沿着流体流动的方向伸展开, 同时整个 DNA 分子固定且平铺在疏水表面上. 分子梳技术易操作, 同时能够拉伸大量 DNA 分子, 重复性好。

(2) 样品溶液制备简单. 不需对 DNA 末端进行特殊的化学修饰, 也不需对一些微米级的小球进行特殊的包被处理, 只需对 DNA 分子进行荧光染料标记, 这样大大简化了实验的准备过程。

(3) 分子梳技术与其他技术相结合, 可以大大拓展它的应用范围. 目前, 分子梳技术已经很成熟, 可以在多种表面上实现 DNA 分子梳, 例如各种疏水表面、云母片、以及 HOPG (highly oriented pyrolytic graphite) 晶体表面等^[40]. 在以后的工作中, 我们将利用分子梳技术将 DNA 分子及 DNA-蛋白质复合体拉伸在云母片、硅片或其他平整的表面上, 然后利用原子力显微镜观察 DNA-蛋白质复合体, 以解答 DNA-蛋白质相互作用的一些问题, 例如: 组蛋白以几聚体与 DNA 结合的, 它们的结合方式随着缓冲液条件的变化如何变化等. 用分子梳技术操纵拉伸 DNA, 然后结合荧光及原子力显微镜这两种有力的观察手段, 必将大大丰富我们关于 DNA-蛋白质相互作用的知识。

此外, 分子梳技术与荧光原位杂交技术相结合, 可以快速地对 DNA 进行分析, 从而应用于癌症的检测、药物治疗功效的检测等. 所以, 该方面的研究具有重要的医学应用价值。

参 考 文 献

- 1 Taekjip H. Single-molecule fluorescence methods for the study of nucleic acids. *Current Opinion in Structural Biology*, 2001, 11: 287—292
- 2 Smith SB, Finzi L, Bustamante C. Direct mechanical measurements of the elasticity of single DNA molecules by using magnetic beads. *Science*, 1992, 258: 1122—1126
- 3 Strick TR, Allemand JF, Bensimon D, et al. The elasticity of a single supercoiled DNA molecules. *Science*, 1996, 271: 1835—1837
- 4 Allemand JF, Bensimon D, Lavery R, et al. Stretched and overwound DNA forms a pauling-like structure with exposed bases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 14152—14157
- 5 Perkins TT, Smith DE, Chu S. Direct observation of tube-like motion of a single polymer chain. *Science*, 1994, 264: 819—822
- 6 Perkins TT, Quake SR, Smith DE, et al. Relaxation of a single DNA molecule observed by optical microscopy. *Science*, 1994, 264: 822—826
- 7 Smith SB, Cui YJ, Bustamante C. Overstretching B-DNA: The elastic response of individual double-stranded and single-stranded DNA molecules. *Science*, 1996, 271: 795—799
- 8 Binnink ML, Schärer OD, Kanaar R, et al. Single-molecule manipulation of double-stranded DNA using optical tweezers: Interaction studies of DNA with RecA and YOYO-1. *Cytometry*, 1999, 36: 200—208
- 9 Cluzel P, Lebrun A, Heller C, et al. DNA: An extensible molecule. *Science*, 1996, 271: 792—794
- 10 Bensimon A, Simon A, Chiffaudel A, et al. Alignment and sensitive detection of DNA by a moving interface. *Science*, 1994, 265: 2096—2098
- 11 Bensimon D, Simon AJ, Croquette V, et al. Stretching DNA with a receding meniscus: Experiments and models. *Physical Review Letters*, 1995, 74: 4754—4757
- 12 Michalet X, Ekong R, Fougereuse F, et al. Dynamic molecular combing: Stretching the whole human genome for high-resolution studies. *Science*, 1997, 277: 1518—1523
- 13 Herrick J, Bensimon A. Single molecule analysis of DNA replication. *Biochimie*, 1999, 81: 859—871
- 14 Allemand JF, Bensimon D, Jullien L, et al. pH-dependent specific binding and combing of DNA. *Biophysical Journal*, 1997, 73: 2064—2070
- 15 Ye JY, Umemura K, Ishikawa M, et al. Atomic force microscopy of DNA molecules stretched by spin-coating technique. *Analytical Biochemistry*, 2000, 281: 21—25
- 16 Yokota H, Sunwoo J, Sarikaya M, et al. Spin-Stretching of DNA and protein molecules for detection by fluorescence and atomic force microscopy. *Analytical Chemistry*, 1999, 71: 4418—4422
- 17 Wang WN, Lin JY, Schwartz DC. Scanning force microscopy of DNA molecules elongated by convective fluid flow in an evaporating droplet. *Biophysical Journal*, 1998, 75: 513—520
- 18 Jing JP, Huang J, Hu XH, et al. Automated high resolution optical mapping using arrayed, fluid-fixed DNA molecules. *Proc*

- Natl Acad Sci USA, 1998, 95: 8046—8051
- 19 Kraus J, Weber RG, Cremer M, et al. High-resolution comparative hybridization to combed DNA fibers. *The American Journal of Human Genetics*, 1997, 99: 374—380
 - 20 Yokota H, Johnson F, Lu HB, et al. A new method for straightening DNA molecules for optical restriction mapping. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25: 1064—1070
 - 21 Li JW, Bai CL, Wang C, et al. A convenient method of aligning large DNA molecules on bare mica surfaces for atomic force microscopy. *Nucleic Acids Research*, 1998, 26: 4785—4786
 - 22 Ohtobe K, Ohtani T. Behavior of DNA fibers stretched by precise meniscus motion control. *Nucleic Acids Research*, 2001, 29: e109
 - 23 Klein DCG, Gurevich L, Janssen JW, et al. Ordered stretching of single molecules of deoxyribose nucleic acid between microfabricated polystyrene lines. *Applied Physics Letters*, 2001, 78: 2396—2398
 - 24 Gad S, Klinger M, Caux-Moncoutier V, et al. Bar code screening on combed DNA for large rearrangements of the BRCA1 and BRCA2 genes in French breast cancer families. *Journal of Medical Genetics*, 2002, 39: 817—821
 - 25 Deng ZX, Mao CD. DNA-templated fabrication of 1D-parallel and 2D-crossed metallic nanowire arrays. *Nano Letters*, 2003, 3: 1545—1548
 - 26 Herrick J, Jun S, Bechhoefer J, et al. Kinetic model of DNA replication in eukaryotic organisms. *Journal of Molecular Biology*, 2002, 320: 741—750
 - 27 Guerou Z, Place C, Freyssingas E, et al. Observation by fluorescence microscopy of transcription on single combed DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 6005—6010
 - 28 Taylor JR, Fang MM, Nie SM. Probing specific sequences on single DNA molecules with bioconjugated fluorescent nanoparticles. *Analytical Chemistry*, 2000, 72: 1979—1986
 - 29 Li MQ. Scanning probe microscopy (STM/AFM) and applications in biology. *Applied Physics A*, 1999, 68: 255—258
 - 30 刘玉颖, 窦硕星, 王鹏业, 等. 应用分子梳技术对 DNA 与组蛋白相互作用的研究. *物理学报*, 2005, 54(2): 622—627
 - 31 Sasaki S, Karube I. Observation and application of a pattern in a DNA-histone mixture. *Analytical Sciences*, 2001, 17: 1213—1215
 - 32 Liu YY, Wang PY, Dou SX, et al. Study the effects of metallic ions on the combination of DNA and histones with molecular combing technique. *Chinese Science Bulletin*, 2005, 50: 731—737
 - 33 Lahue EE, Matson SW. Purified *Escherichia coli* F-factor TraY protein binds oriT. *The Journal of Bacteriology*, 1990, 172: 1385—1391
 - 34 Matson SW, Kaiser-Rogers KA. DNA helicases. *Annual Review of Biochemistry*, 1990, 59: 289—329
 - 35 Lohman TM, Bjornson KP. Mechanisms of helicase-catalyzed DNA unwinding. *Annual Review of Biochemistry*, 1996, 65: 169—214
 - 36 Liu YY, Wang PY, Dou SX, et al. Direct visualization of RecQ helicase-DNA interaction with fluorescence microscopy and atomic force microscopy. *Science and Technology of Advanced Materials*, 2005, 6: 842—847
 - 37 Cai LT, Tabata H, Kawai T. Probing electrical properties of oriented DNA by conducting atomic force microscopy. *Nanotechnology*, 2001, 12: 211—216
 - 38 Endres RG, Cox DL, Singh RRP. Colloquium: The quest for high-conductance DNA. *Reviews of Modern Physics*, 2004, 76: 195—214
 - 39 Dittmer WU, Simmel FC. Chains of semiconductor nanoparticles templated on DNA. *Applied Physics Letters*, 2004, 85: 633—635
 - 40 Rose F, Martin P, Fujita H, et al. Adsorption and combing of DNA on HOPG surfaces of bulk crystals and nanosheets: Application to the bridging of DNA between HOPG/Si heterostructures. *Nanotechnology*, 2006, 17: 3325—3332