

光镊在生命科学中的应用*

郭红莲[†] 屈 娥 徐春华 李兆霖 程丙英 张道中

(中国科学院物理研究所 北京凝聚态物理国家实验室 北京 100080)

摘 要 由于光镊具有无直接接触、无损伤等诸多优点,且光镊产生的力在皮牛顿量级,正好落在生物大分子相互作用力的范围,所以光镊在生物大分子相互作用测量方面取得了越来越广泛的应用.文章详细介绍了光镊的出现、发展过程以及在生命科学中代表性应用结果.这些结果表明,将光镊应用在生命科学领域,可以揭示或证实许多以前不曾深刻了解的生物大分子的活动规律与机制.

关键词 光镊,生物大分子,相互作用

Application of optical tweezers in life science

GUO Hong-Lian[†] Qu E XU Chun-Hua LI Zhao-Lin CHENG Bing-Ying ZHANG Dao-Zhong

(Beijing National Laboratory for Condensed Matter Physics, Institute of Physics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract Due to their non-contact and non-invasion characteristics and a trapping force just in the range of bio-molecular interactions, optical tweezers are finding more and more applications in the measurement of interactions between biological macro-molecules. We describe in detail the development of optical tweezers and their typical applications in the life sciences. It is shown that the activity and mechanisms of bio-molecules can be revealed and understood in new depth with the use of optical tweezers.

Keywords optical tweezers, biological macro-molecules, interaction

1 引言

早在17世纪初期,德国天文学家开普勒在解释彗尾之所以背向太阳的原因时,就指出这是受到太阳光的辐射作用所致.到1873年,麦克斯韦根据他的电磁学理论从理论上说明了光本身可产生作用力,或者说是光辐压.1909年,德拜给出了线偏振平面电磁波作用于均匀球形粒子所产生的辐射压力的理论.但由于光辐压极其微弱,同时也因缺少足够强的光,毫瓦级功率的光仅可产生皮牛顿级($1\text{pN} = 10^{-12}\text{N}$)的作用力^[1],所以当时无法进行实验研究.直到20世纪60年代,激光的发明给辐射压力的研究提供了高强度、高准直度的光源,从实验上验证光辐射压的存在才成为可能.

贝尔实验室的 Arthur Ashkin 是对此进行研究

的先驱.1970年,Arthur Ashkin 等人首先提出利用光压操纵微小粒子的概念.他们首先用一束1W的连续氦离子激光会聚成窄的光束,成功地观察到在垂直光传播的方向上激光对水中乳胶颗粒的束缚以及沿光的传播方向上由于辐射压引起的小球的加速运动,实现了不同直径的球形颗粒的二维囚禁.为了实现三维囚禁,他们又将两束相向的激光加以聚焦,利用其相反方向的光压构成一个稳定的能量阱,建立了第一套利用光压操纵微小粒子的工具^[2].在此后的几年中,Ashkin 等人逐步拓展其应用领域,如将粒子、液滴等提起以对抗重力等方面的应用研

* 国家重点基础研究发展计划(批准号:2002CB713805, 2006CB910302)、国家自然科学基金(批准号 10604065)资助项目
2007-03-12 收到初稿 2007-04-04 收到修改稿

[†] 通讯联系人. Email: hlguo@aphy.iphys.ac.cn

究^[3-6]. 这套方法后来发展成原子的激光冷却技术, 使得其不仅可以应用在微米级的粒子上, 还可以推广到原子分子的尺度^[7-9], 激光冷却技术也使朱棣文(Steven Chu)获得 1997 年的诺贝尔物理奖. 一直到 1986 年, Ashkin 等人才发现单独一束高度聚焦的激光就足以形成三维稳定的能量阱, 可以吸引电介质粒子并将其束缚在光腰中央, 于是第一个光镊子(optical tweezers)诞生了, 也因此, 光镊的正式名称为单光束梯度力阱(single-beam gradient optical trap), 它可以用来捕获并移动从数十纳米到数十微米的微小粒子^[10].

光镊的发明使人们在许多研究中人们可以从被动的观察转而成为主动的操控, 由于其具有精确定位、选择个体、可实现对生物活体样品非接触无损伤操纵, 以及光镊产生的皮牛顿量级的力正适合于生物细胞、亚细胞层次结构的研究, 再配以高精度的皮牛顿量级的力和纳米量级的位移测量系统后, 光镊的应用便不仅仅停留在微操纵上, 如对细胞、细胞器及染色体进行捕获、分选、操纵、弯曲细胞骨架等, 其应用已拓展到精确测定细胞及分子水平的微小作用力及运动步幅, 如测定马达蛋白作用力及运动步幅, 克服分子马达力引起的细菌的旋转动力以及对膜体系力学特性进行定量研究等. 伴随着研究的深入发展, 光镊和其他技术的组合应用已经引伸出越来越多的新的研究方法和研究领域, 从而有效地促进了生命科学、材料科学、物理学、化学、医学及纳米技术等领域的研究与发展.

2 光镊的基本原理

光镊是利用光与物质间动量传递的力学效应形成的三维梯度光学势阱. 其最基本的组成单元是: 一束经过扩束的平行激光束和一高数值孔径的物镜($NA \geq 1.0$). 当强会聚的 Gauss 光场作用于透明物体时, 如果粒子的折射率 n_1 大于周围介质的折射率 n_m , 无论是在光的传播方向 z 轴, 还是在垂直于 z 轴的 $x-y$ 平面内, 梯度力将把粒子推向光场最强处, 即激光焦点, 如图 1 所示. 通常, 光作用力可以表示为

$$F = Qn_m p / c, \quad (1)$$

其中 Q 为一无量纲系数, n_m 为作用对象周围介质的折射率, p 是激光功率, c 为真空中光波速度.

在 Mie 散射区域, 即当介质颗粒尺寸远大于光波长时, 可用几何光学原理来计算介质颗粒受到的

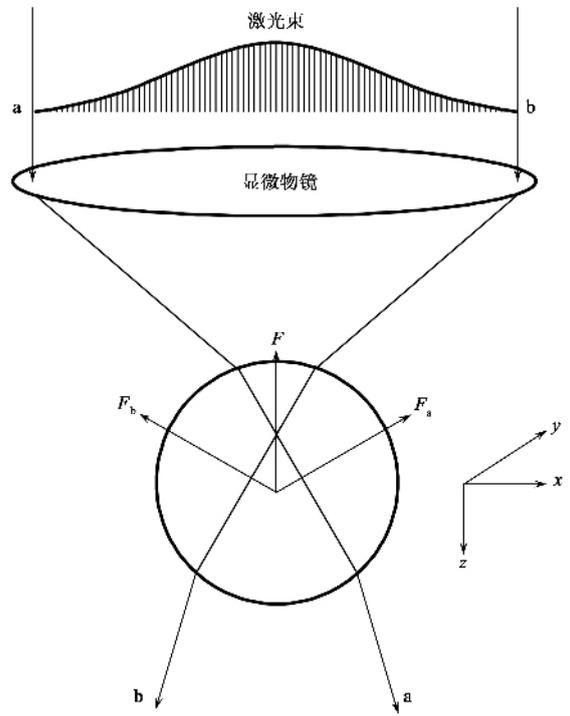


图 1 光镊形成的示意图

光阱力. 设光作用力沿光线行进方向的分量为散射力 f_s , 垂直于光线方向的分量为梯度力 f_g . 由(1)式可知, 对于固定的作用对象及激光功率, 光作用力 F 的大小可由 Q 来表征, 所以 f_s, f_g 可分别由 Q_s, Q_g 来表征. 其表达式分别为

$$Q_s = 1 + R \cos 2\theta - \frac{T^2 [\cos 2(\theta - \theta') + R \cos 2\theta]}{1 + R^2 + 2R \cos \theta'}, \quad (2)$$

$$Q_g = R \sin 2\theta - \frac{T^2 [\sin 2(\theta - \theta') + R \sin 2\theta]}{1 + R^2 + 2R \cos \theta'}, \quad (3)$$

其中 R, T 分别为分界面处光线的反射率和折射率, θ, θ' 分别为入射角和折射角.

在 Rayleigh 散射区域, 即当介质颗粒尺寸远小于光波长时, 可用电磁学模型来计算介质颗粒的受力情况. 对于 Rayleigh 散射球体, 其所受梯度力 F_g 及散射力 F_s 分别为

$$F_g = \frac{\delta}{2} \nabla E^2, \quad (4)$$

式中 δ 为处于样品浸液中散射球体小颗粒的电偶极子极化率, 它同散射颗粒半径 r 的关系为

$$\delta = n_m^2 r^3 \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right), \quad (5)$$

式中 $m = n_1 / n_m, n_1$ 为散射颗粒的折射率.

$$F_s = n_m \frac{S c_s}{c}, \quad (6)$$

式中 S 为时域平均波印亭矢量, 散射截面 C_s 为

$$C_s = \frac{8}{3} \pi k^4 \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right)^2 r^6, \quad (7)$$

式中 k 为波数.

3 光镊在生命科学中的应用

随着物理技术手段的不断进步, 物理学和生物科学的结合使得对生命活动规律的认识逐步深入. 从原来器官、组织的层次逐渐发展到细胞、生物大分子的层次. 分子生物学概念、方法和技术的引入使得生物学取得了突破性进展, 产生了许多新的生长点, 并逐步形成新的概念与新的领域. 其中特别是人们对生命规律的认知, 从过去的对分子整体平均行为的宏观研究, 发展到现在能对分子个体行为进行微观研究, 使人们的认知更深入、更本质, 进而又促进了对生命宏观规律的认识. 生物大分子之间如何相互作用及调控是当前生命科学面临的最基本问题之一, 也是解释生命本质与奥妙的重要组成部分. 而光镊技术由于其独特的优越性, 对于了解生物大分子间相互作用及动力学过程无疑扮演着不可替代的角色. 目前光镊在生物大分子研究中的应用已遍地开花, 硕果累累.

3.1 分子马达力学特性的研究

研究分子马达的力学特性是光镊的典型应用之一. 早在 1993 年, 美国 Rowland 研究院的 Block 和 Svoboda 等使用光镊与双光束干涉仪结合, 在分子水平上首次观测到了驱动蛋白(Kinesin)分子(马达蛋白的一种)在其微管轨道上以 8nm 的步幅阶梯式前进, 间隔时间为 1ms 量级的情形, 证明了驱动蛋白分子将化学能转换为机械能的过程是非连续的^[11], 如图 2 所示. 通过将驱动蛋白结合在被光阱捕获的硅球上, 将微管固定在样品池底上, 当驱动蛋白和微管相互作用时, 小球被拉着沿微管运动, 观测小球的运动轨迹, 便得出了驱动蛋白的运动情况, 结果表明, 驱动蛋白沿微管的运动是离散的, 且每步之间的时间间隔是随机的. 1997 年, Schnitzer 等人通过实验进一步得出驱动蛋白每走一步需要水解一个 ATP 分子的结论^[12].

Finer 等人用负反馈增强的双光镊系统测量了在肌肉收缩中起主要作用的肌球蛋白和微丝之间的

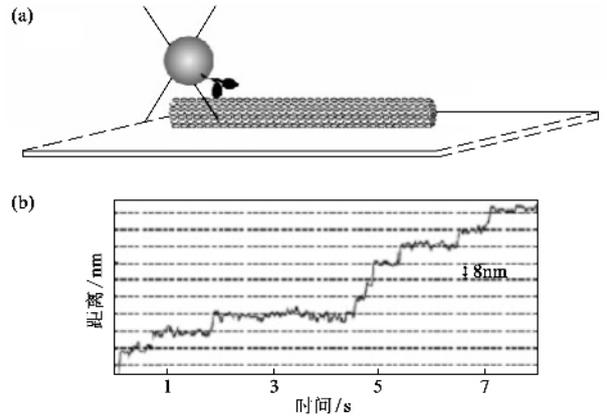


图 2 (a)为驱动蛋白沿微管运动的示意图 (b)为测得的微管以 8nm 为步幅的阶梯式运动过程

作用力和相对运动步幅^[13]. 如图 3 所示, 将微丝的两头分别粘一聚苯乙烯小球, 形成哑铃结构, 用双光镊操控这两个小球, 使得微丝处于绷直状态, 肌球蛋白包被在粘在池底的硅球上, 当肌球蛋白和微丝相互作用时, 被捕获的小球就会偏离光阱的中心位置, 用四象限探测器探测小球的位置, 测出了肌球蛋白 11nm 的运动步幅以及通过负反馈系统探测到 3—4pN 的相互作用力.

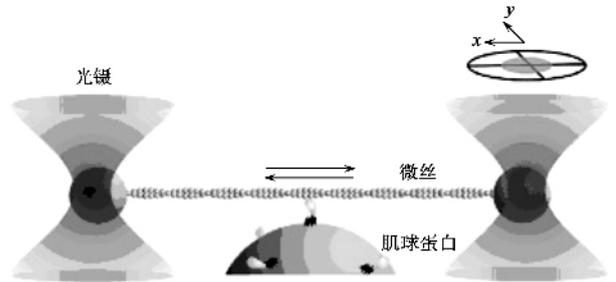


图 3 双光镊测量微丝与肌球蛋白作用力与运动步幅的示意图

Wang 等人利用负反馈控制的单光镊系统测量了在基因表达中起关键作用的 RNA 聚合酶, 以 DNA 为模板, 转录 RNA 的转录速度和作用力^[14], 如图 4 所示, 将 RNA 聚合酶通过小球固定在样品池底部, DNA 的末端粘一聚苯乙烯小球, 用光镊夹住此小球, 当开始转录后, 小球逐渐被拉离光阱, 在开环状态下, 根据小球的运动便可得到 RNA 聚合酶的转录速度, 而在闭环状态下, 根据反馈量便可得到它们之间的作用力.

3.2 蛋白质折叠与去折叠动力学过程

Kellermayer 等人测量了肌肉蛋白分子 Titin 的折叠与去折叠过程^[16], Titin 分子在维持肌小节结构

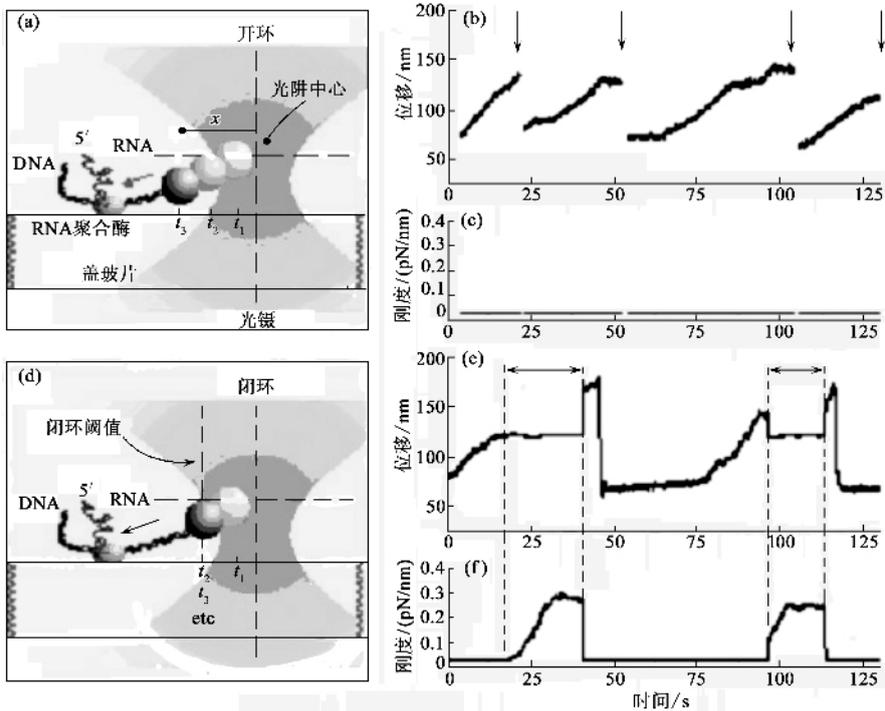


图4 (a,d)分别为光镊在开环与闭环条件下,测量 RNA 聚合酶转录速度与力的示意图 (b,c)为开环条件下测得的小球的位移以及光阱刚度随时间的变化关系曲线 (e,f)对应于闭环条件

的完整性以及缓解外力冲击时起重要作用. 他们将 Titin 分子的两端粘在两个乳胶小球上,一个小球用光镊固定,另一个用微吸管固定,如图 5(a)所示. 通过匀速移动微吸管来观察 Titin 分子的伸缩与受力关系,发现 Titin 分子的弹性表现为高度非线性性,且去折叠与折叠的分子动力学过程的不同导致了力的“磁滞”效应,如图 5(b)所示. 另外,随着拉伸次数的增加,“磁滞”逐渐减弱,见 5(c). 同时, Tskhovrebova 等人用单光镊系统也对 Titin 分子的弹性和折叠与去折叠进行了研究^[17],他们将分子的一端固定在样品池底上,另一端连接在小球上用光镊固定,将 Titin 分子快速拉伸一定长度后观察其上力的变化,发现力以 3—10pN 的幅度台阶式减小,如图 5(d)所示. 相应于 Titin 分子内部以 $19 \pm 11\text{nm}$ 的平均步距伸长,这一长度与一个去折叠区的外形长度符合得非常好,这就说明 Titin 分子通过逐步去折叠来对应外力冲击.

Cecconi 等人利用单光镊与微吸管相配合的技术研究了核糖核酸酶 H 折叠与去折叠的动力学过程^[18]. 他们将核糖核酸酶两端,通过位于其上的半胱氨酸,分别连接两段带有巯基的 500 个碱基序列的 DNA, DNA 的另外一端连接一个直径为 $2\mu\text{m}$ 的小球,用微吸管操纵一个已经连好的小球,用光阱操

纵另一个小球,形成如图 6 所示的结构,通过移动微吸管,给核糖核酸酶施加一外力,观察其去折叠及重新折叠的过程. 他们发现核糖核酸酶 H 去折叠是一个两态过程,但其折叠是一个三态过程,即折叠时必会经历一个中间态. 这一研究对于绘制核糖核酸酶 H 的能谱图具有重要意义.

3.3 细胞骨架力学性质的研究

在细胞中,细胞骨架系统是产生机械力的主要因素,而细胞骨架产生机械力的方式有两大类:一是通过细胞骨架的马达蛋白,如肌球蛋白(myosin)分子沿微丝的运动;另一类是通过细胞骨架蛋白的聚合和解聚,如在细胞分裂过程中,微管的聚合和解聚产生机械力推动染色体的运动. 光镊技术不仅可以对马达分子产生的力的大小及步距进行精确的测定,而且还可以测量微丝和微管本身的力学性质.

Arai 等人用光镊把微丝打结,研究了在弯曲状态下微丝力学性质的变化^[19]. 他们先用双光镊抓住两个表面包被有肌球蛋白的聚苯乙烯小球,然后移动样品池,让样品池内荧光标记的微丝靠近小球. 由于肌球蛋白与微丝间的相互作用,使得两个小球分别粘在微丝的两端,然后操纵一个光阱,将微丝打结,如图 7 所示. 打好结后,用光阱逐渐拉紧微丝,以

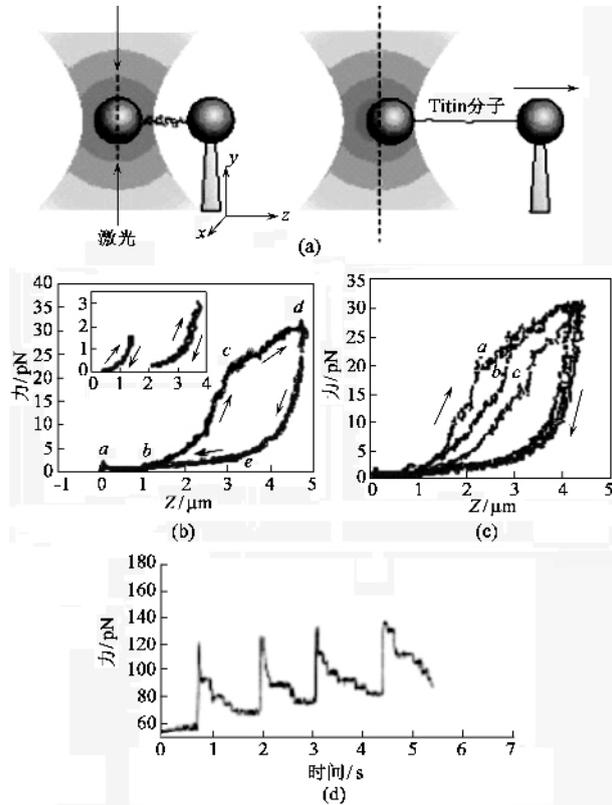


图5 (a)光镊测量 Titin 分子弹性的示意图 (b)测得的 Titin 分子在去折叠与折叠过程中表现出的“磁滞”现象 (c)中的 a b c 分别表示在第二次、三次、五次拉伸时“磁滞”曲线的变化 (d) Titin 分子在受到突然拉伸时,对外力的响应曲线

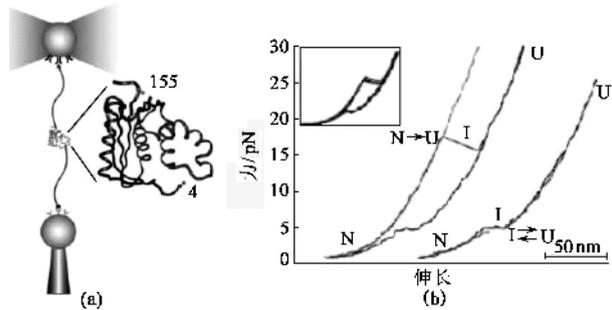


图6 (a)核糖核酸酶去折叠实验示意图(核糖核酸酶在4及155的位置上为半胱氨酸,通过形成二硫键的形式,分别在肽链的两端连接一段DNA作为手柄,DNA再连接到 $2\mu\text{m}$ 的小球上,其中一个小球用微吸管操控,另一个小球用光阱操控)(b)外力与拉伸关系曲线(图中N表示初始态即折叠态,U表示去折叠态,I表示中间态.从图中可以看出,核糖核酸酶在较大外力作用下可以从初始态直接转换到去折叠态,但从去折叠态过渡到折叠态就必须经历中间态,中间态与去折叠态之间的转换为一可逆过程)

减小环的直径,此时微丝所受的力由小球偏移光阱中心的位移获得.当微丝环的直径减小到 $0.36\mu\text{m}$ 时,微丝在打结处断裂.此时对微丝施加的拉力约为

1pN ,以前文献报道直接拉断一根微丝大约需要 400pN 的力,用打结的方法拉断微丝所需要的力比

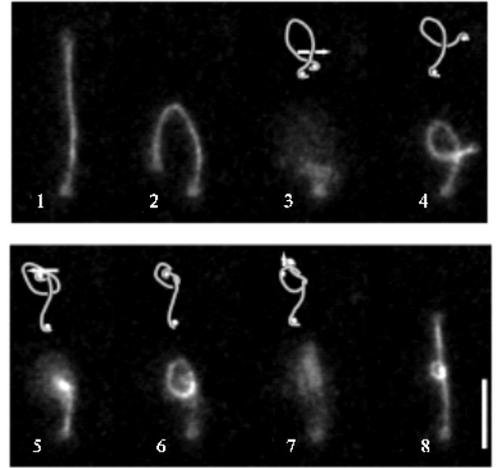


图7 用双光镊进行微丝打结的实验荧光图及示意图

直接拉断小两个数量级之多.这一结果表明,当微丝扭曲时,微丝亚基间相互作用力变弱.

Felgner 等人用光镊研究了微管的抗挠刚度及紫杉醇和微管结合蛋白对微管抗挠刚度的影响^[20].他们用光镊直接捕获以轴丝为核心生长的单根微管的末端,将其弯曲,然后释放,观察微管恢复过程,从而计算出其抗挠刚度为 $(3-4) \times 10^{-24} \text{Nm}^2$.当在微管溶液中加入两种微管结合蛋白(τ 和MAP2)及其结构类似物或紫杉醇,发现野生型的 τ 和MAP2分别使微管刚度增加了3倍和4倍,另外,微管结合蛋白的不同结构类似物都能不同程度地增强微管刚性,而紫杉醇的作用恰恰相反,它使得微管的刚性降低.

Kerssemakers 等人利用多光镊系统对微管聚合产生的机械力进行了测量^[21].他们利用声光偏转器对激光束快速偏转实现了钥匙孔型的光学势阱,如图8(b)所示,通过这种方法测得阻滞单根微管聚合的最大力为 $1.2 \pm 0.2\text{pN}$.

Grishchuk 等人用单光镊测量了微管解聚所能产生的力^[22].他们将四膜虫的表皮铺在盖玻片上,让微管从四膜虫表皮开始聚合生长,这样有利于微管负端(minus end)的固定.当微管生长到 $15-20\mu\text{m}$ 时,将微管蛋白换为标记有若单明染料的微管蛋白,再继续生长 $1-4\mu\text{m}$,形成一个标记有若单明的微管帽,如图9(a)中微管的上端所示.他们利用荧光染料对微管能够造成损伤这一巧妙办法,用激发光照射微管来观察微管解聚的一些细节.具体操作过程如下:将一个 $1\mu\text{m}$ 的玻璃小球通过 biotin-

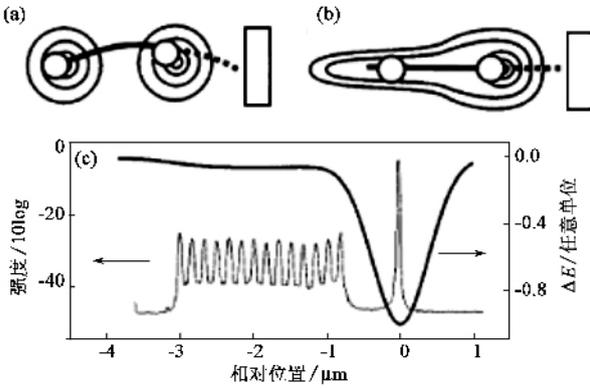


图8 (a)双光阱捕获的两个小球与一根微管粘接,在微管聚合延长过程中,遇到障碍物时微管会发生弯曲;(b)钥匙孔型的光学势阱(在这种非均匀光学势阱中,右面的小球牢牢地被光阱束缚,而左边的小球只在与微管聚合垂直的方向上受到束缚,从而可以有效地防止微管聚合过程中两球之间微管的弯曲);(c)细线表示激光偏转器输入功率谱曲线,粗线为有效光阱势能曲线

streptavidin 之间的特异相互作用结合到微管的侧面,然后用光阱捕获此小球,并对其施加一定的外力,如图9(a)所示,其中十字叉表示光阱的位置.当微管解聚时,如果正好是小球与微管结合的部位先发生解聚,由于解聚的原丝趋向于弯曲状态,于是会将小球推离光阱(如图9(b)所示);如果在远离微管与小球结合的部位先开始解聚,小球就几乎表现不出什么位移(如图9(c)所示),他们用这样的方法测量出微管解聚的力约为0.24pN.

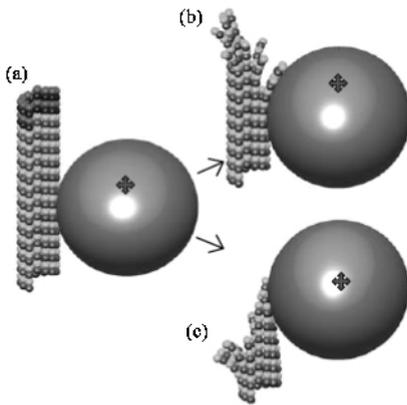


图9 用光镊测定微管解聚力的示意图

中科院物理研究所光物理实验室的郭红莲等人用双光镊系统测量了微管断裂的动态过程^[23].他们用双光阱操纵两个包被有 neutravidin 的1μm 聚苯乙烯小球,然后与一根荧光标记的微管通过 biotin-neutravidin 之间的特异相互作用结合在一起.移动其中一个光阱,使得微管在纵向上受到一定外力的

作用,当用激发光照射微管时,由于荧光对微管的损伤,微管将发生断裂.他们发现微管的断裂表现为阶梯过程,也就是说,构成微管的原丝的断裂不是同时发生的,而是逐步完成的.这一结果从力学角度上证明构成微管的原丝与原丝之间的结合力非常弱,彼此之间相对比较独立.

3.4 DNA 与蛋白质之间相互作用的研究

核小体是构成染色质的基本结构单位,它是由DNA 缠绕在组蛋白上而成的,通常DNA 在组蛋白八聚体复合物上缠绕约1.7圈,形成一个核小体单元,正因为组蛋白的存在,使得DNA 得以大大地压缩在细胞核中,所以DNA 与组蛋白的相互作用对于DNA 的压缩起了至关重要的作用. Mihardja 等人利用光镊系统拉伸单根核小体,研究了DNA 与组蛋白之间的相互作用^[24].图10(b)给出了拉伸核小体的示意图,带有核小体的DNA 链一端,通过抗地高辛包被的小球固定在光阱中,另一端通过抗生物素包被的小球由负压微吸管操纵,通过控制微吸管以一定的速度移动,实现对核小体的拉伸.根据光阱中小球的位移信号可以得到DNA 与组蛋白之间相互作用机制.他们发现,分解一个核小体要经历两个阶段:第一阶段表现为缠绕在组蛋白八聚体的外圈DNA 打开,如图10(e)所示,而这一过程是可逆的,即DNA 还可以重新缠绕在组蛋白上.随着外力的增加,核小体的分解进入第二个阶段,在这个阶段,缠绕在组蛋白八聚体的内圈DNA 开始打开,与第一阶段不同的是,这一过程不再是可逆过程.

DNA 在细胞核中以核小体的形式被高度压缩.这种结构在保证遗传物质稳定性的同时,也阻碍了其他生物大分子接近DNA 双螺旋.然而,许多重要生命过程的发生又都依赖功能大分子与DNA 的相互作用.因此,机体内必然存在使核小体稳定性发生变化的调节机制,以适应不同情况的需要.染色质重组复合物在这一过程中扮演了非常重要的角色.Zhang 等人用光镊系统研究了染色质重组复合物SWI/SNF 以及SRC 与DNA 之间的相互作用^[25].他们发现,染色质重组复合物在ATP 及核小体存在的情况下,可以以约13bp/s 的速度转运DNA,产生约12pN 的力,并可使DNA 形成平均长度为100bp 的DNA 环.这一实验结果表明:第一,染色质重组复合物是依赖于ATP 及核小体的;第二,染色质复合物对于保证DNA 的动态功能起了重要作用,它的存在使得DNA 的转录等一系列重要生命过程得以顺利

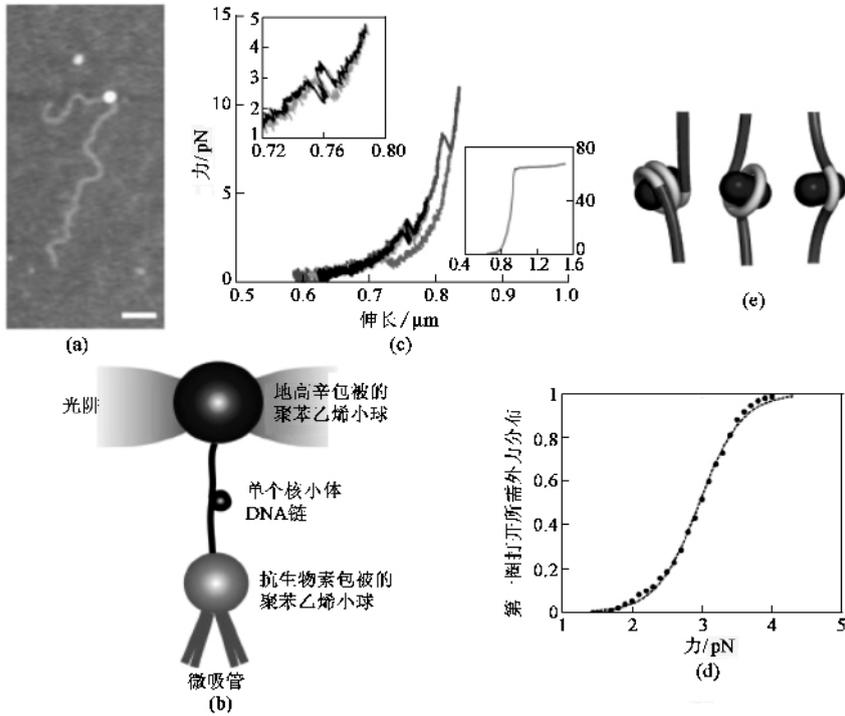


图 10 (a)原子力显微镜照片显示出单个核小体单元 (b)光镊拉伸核小体示意图 (c)代表性的单个核小体外力与伸长的关系曲线 左上插图为小力情况下单个核小体拉伸与放松的放大图,右下插图为拉伸纯 DNA 的曲线图 (d)解开第一圈 DNA 所需外力的概率分布图 (e)DNA 从组蛋白上依次解开的示意图

进行。

4 结束语

综上所述,随着生命科学研究的不断深入,单分子水平上对生命规律的认识已经成为研究者们追求的目标。因此,光镊技术由于其能提供单分子水平上生物大分子的运动学及动力学机制而成为不可或缺的研究工具。光镊技术也在为适应生命科学的需要不断发展和改进,目前,已经有最小分辨率可达 1\AA 的光镊系统问世,这将会极大地满足研究单个生物大分子活动规律的需要。伴随着生物技术及光镊技术的不断进步,相信会涌出越来越多的对生命活动规律前所未有的新发现。

参 考 文 献

[1] Svoboda K, Block S M. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 1994, 23 :247
 [2] Ashkin A. *Phys. Rev. Lett.*, 1970, 24 :156
 [3] Ashkin A, Dziedzic J M. *Appl. Phys. Lett.*, 1971, 19 :283
 [4] Ashkin A, Dziedzic J M. *Appl. Phys. Lett.*, 1974, 24 :586
 [5] Ashkin A, Dziedzic J M. *Science*, 1975, 187 :1073
 [6] Ashkin A, Dziedzic J M. *Appl. Phys. Lett.*, 1976, 28 :333

[7] Ashkin A. *Phys. Rev. Lett.*, 1978, 40 :729
 [8] Ashkin A. *Science*, 1980, 210 :1081
 [9] Chu S. *Science*, 1991, 253 :861
 [10] Ashkin A, Dziedzic J M, Bjorkholm J E *et al.* *Opt. Lett.*, 1986, 11 :288
 [11] Svoboda K, Schmidt C F, Schnapp B J *et al.* *Nature*, 1993, 365 :721
 [12] Schnitzer M J, Block S M. *Nature*, 1997, 388 :386
 [13] Finer J T, Simmons R M, Spudis J A. *Nature*, 1994, 368 :113
 [14] Wang M D, Schnitzer M J, Yin H *et al.*, *Science*, 1998, 282 :902
 [15] Shaevitz J W, Abbondanzieri E A, Landick R *et al.* *Nature*, 2003, 426 :684
 [16] Keller Mayer M S Z, Smith S B, Granzier H L *et al.* *Science*, 1997, 276 :1112
 [17] Tskhovrebova L, Trinich J, Sleep J A *et al.* *Nature*. 1997, 387 :308
 [18] Ceconi C, Shank E A, Bustamante C *et al.* *Science*, 2005, 309 :2057
 [19] Arai Y, Yasuda R, Akashi K *et al.* *Nature*, 1999, 399 :446
 [20] Felgner H, Frank R Schliwa M J *et al.* *Sci.*, 1996, 109 :509
 [21] Kerssemakers J W J, Janson M E, van der Horst A *et al.* *Appl. Phys. Lett.*, 2003, 83 :4441
 [22] Grishchuk E L, Molodtsov M I, Ataullakhanov F I *et al.* *Nature*, 2005, 438 :384
 [23] Guo H L, Xu C H, Liu C X *et al.* *Biophys. J.*, 2006, 90 :2093
 [24] Mihardja S, Spakowitz A J, Zhang Y L *et al.* *PNAS*, 2006, 103 :15871
 [25] Zhang Y L, Smith C L, Saha A *et al.* *Molecular Cell*, 2006, 24 :559