Research
Medical Engineering—Review

表征不同 DNA 高阶结构的单分子分析方法

刘泳麟^{a,b}, 边天元^{b,c}, 刘岩^d, 李治民^{a,b}, 裴羽丰^{b,*}, 宋杰^{b,d,*}^a School of Molecular Medicine, Hangzhou Institute for Advanced Study, University of Chinese Academy of Sciences, Hangzhou 310024, China^b The Cancer Hospital of the University of Chinese Academy of Sciences, Institute of Basic Medicine and Cancer (IBMC), Chinese Academy of Sciences, Hangzhou 310022, China^c Academy of Medical Engineering and Translational Medicine (AMT), Tianjin University, Tianjin 300072, China^d Institute of Nano Biomedicine and Engineering, Department of Instrument Science and Engineering, School of Electronic Information and Electrical Engineering, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 July 2022

Revised 18 October 2022

Accepted 28 October 2022

Available online 7 December 2022

关键词

单分子分析方法

DNA 结构

力学性能

构象转变

摘要

DNA 不仅是生命遗传信息的载体,而且是一种高度可编程和自组装的纳米材料。不同的 DNA 结构与其生物学和化学功能有关。因此,了解各种 DNA 结构的物理和化学性质在生物学和纳米化学中具有重要意义。然而,群体分子实验忽略了溶液中 DNA 结构的异质性。单分子分析方法是观察单个分子的行为和探测自由能态的高异质性的有力工具。本文介绍了单分子检测和操纵等单分子分析方法,并讨论了这些方法如何用于测量单/双链 DNA (ss/dsDNA)、DNA 高阶结构和 DNA 纳米结构的分子性质。最后,将 DNA 纳米技术和单分子分析方法进行结合以了解 DNA 和其他生物物质、软物质的生物物理特性。

© 2022 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. 引言

在生物和化学研究中,传统的生化群体分子实验已被广泛用于揭示生物大分子,如 DNA、RNA 和蛋白质的分子特性、功能和机制[1–4]。然而,由于群体分子实验忽略了分子之间的个体差异,因此只提供了一个平均值。为了全面了解分子的性质和机制,已经研发出单分子分析的方法。这些方法是分析和研究高异质性体系中分子的有力工具。单分子分析方法一般包括单分子检测方法和单分子操纵方法。具体来说,单分子检测技术[即单分子荧光[5]、纳米孔[6]、单分子超分辨率 (SM-SR) 显微镜[7]等]可用于实时观察和跟踪生物分子在荧光变化时不同状态之间的

快速转变过程;而单分子操纵技术[即磁镊[8]、光镊[9]和原子力显微镜 (AFM) [10]]可以用来直接操纵分子,以检测分子在拉力作用下的动态过程。对生物分子施加的力可以降低构象转变能垒,加速构象转变速率,缩短检测时间。单分子操纵的另一个好处是可以模拟在体内产生的力,从而确定和量化力对生理和病理过程的影响[11–12]。因此,单分子分析方法通过分析 DNA 等单个生物大分子的动力学和热力学信息,揭示生化或生物物理反应的精确动力学。

DNA 作为一种基本的体内生物大分子,在遗传信息的存储中发挥着至关重要的作用。基于碱基对之间的相互作用, DNA 链形成了 DNA 分子的特殊空间结构,影响了

* Corresponding authors.

E-mail addresses: peiyufeng1992@foxmail.com (Y. Pei), sjie@sjtu.edu.cn (J. Song).

DNA的功能。这些DNA空间结构通常根据DNA结构的复杂性进行分类(图1)。根据Watson-Crick碱基对原理,在体内,由于A-T和C-G之间的相互作用,单链DNA(ssDNA)寡核苷酸(一级结构)形成双链DNA(dsDNA)螺旋[13]。DNA链也可以通过链间或链内相互作用形成更特殊的空间结构[19],如G-四链体(G4)[14]、i-基序(i-motif)[15]、三链或四链连接[16-17]和三螺旋[18]。这些结构被称为DNA二级结构。DNA也可以形成三级结构,如超螺旋DNA[20]和核小体DNA[21]。除了这些与生物功能相关的结构外,DNA还可以形成人工高阶纳米结构,如DNA折纸和DNA“砖块”[22-25]。上述的DNA结构具有不同的化学和物理性质。检测DNA结构的性质对于理解DNA的生物或化学功能是很重要的。

迄今为止,已经发展了许多方法来检测不同的DNA结构。基于DNA的光学活性,利用紫外(UV)-可见光谱[26-28]和圆二色性(CD)光谱[29-31]检测DNA的构象变化及其与配体的相互作用[32]。此外,核磁共振(NMR)、X射线衍射和低温电子显微镜(cryo-EM)技术经常被用于确定DNA的静态或动态结构[29,33-34]。为了检测更大尺寸的静态DNA纳米结构,透射电子显微镜(TEM)和AFM被用于观察形状和形态。在过去的20年里,单分子分析方法为DNA结构的化学和物理性质的测量提供了新的见解。

本文将DNA结构分为一级、二级、三级和高阶结构。

然后,概述了单分子技术的基本原理及其在表征不同DNA结构方面的应用。最后,讨论了单分子技术的优势及其未来的发展。

DNA的主要结构是ssDNA。基于链间和链内的相互作用,DNA也可以形成复杂的空间结构和拓扑结构,称为二级结构和三级结构。术语“高阶DNA结构”在本文指的是人工DNA纳米结构。

2. 单分子技术

2.1. 单分子操纵技术

随着单分子操纵技术的不断发展,其种类不断增加,包括生物膜力探针[35]、流体诱导拉伸[36-37]、微针操作[38]、AFM、光镊和磁镊。后三种方法是最常用的方法,也是本文主要讨论的重点(表1)。

2.1.1. 原子力显微镜-单分子力谱(AFM-SMFS)

AFM-SMFS可用于操控单个分子和测量分子内相互作用力[图2(a)]。在这种技术中,表面用底物分子进行修饰,而可以与底物分子结合的目标分子在AFM-SMFS悬臂梁的尖端被修饰。移动尖端,使其能够与底物分子结合,然后以恒定的速度收缩尖端,将会导致悬臂梁的偏转。悬臂梁的弹性服从胡克定律,因此可以通过悬臂梁的挠度和弹簧常数来计算施加在被束缚的分子上的力。由

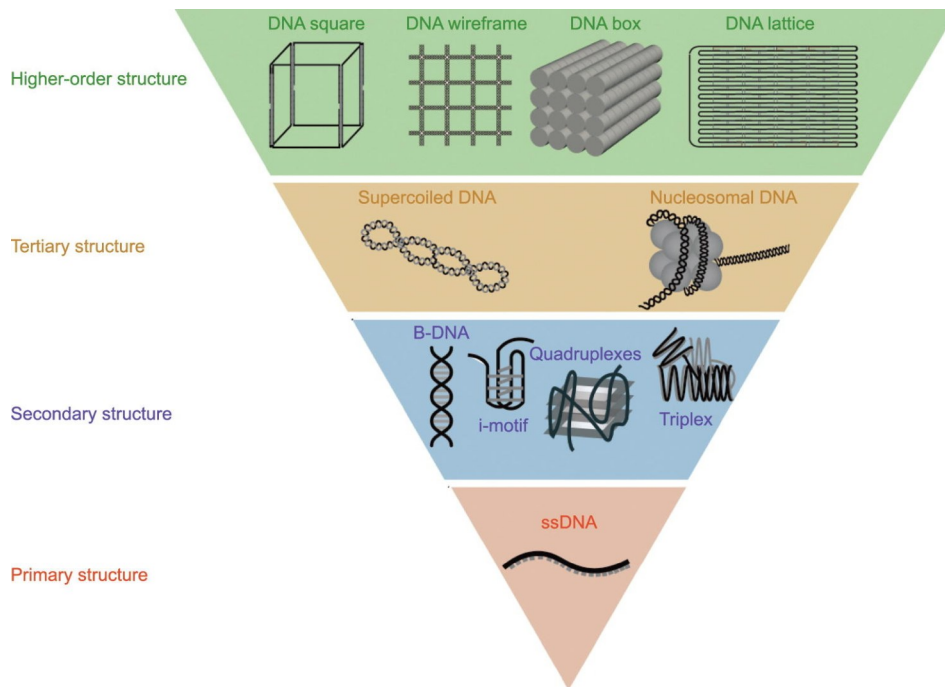


图1. DNA的一级结构和不同的高阶结构。DNA的一级结构是指ssDNA。基于链间和链内的相互作用,DNA还可以形成复杂的空间结构和拓扑结构,即二级结构和三级结构。高阶结构是指DNA人工纳米结构。B-DNA: B型DNA。

表1. 单分子操纵技术的比较

Methods	Force range (pN)	Major applications	Advantages	Disadvantages
AFM	> 10	Monovalent or multivalent ligand-receptor interactions	Monovalent or multivalent ligand-receptor interactions	Probes are expensive and fragile, and should be modified
Magnetic tweezers	0.1–100.0	DNA elasticity; DNA topology	High throughput; prone to applying torque	Low spatial and temporal resolution
Optical tweezers	0.1–100.0	Force strength of molecular interactions	Higher spatial and temporal resolution; DNA molecules can be moved between different solutions	Low throughput

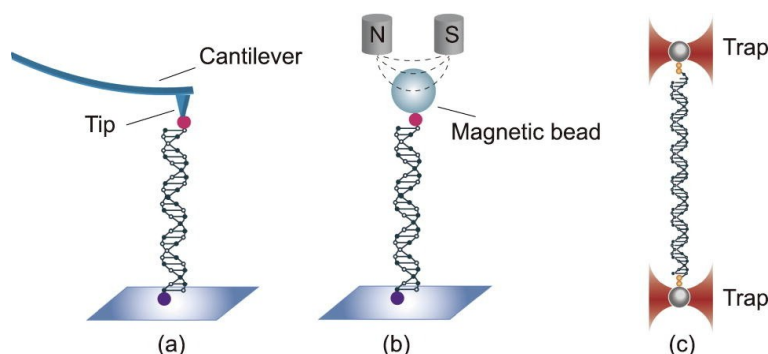


图2. 用于检测DNA结构的单分子操纵示意图。(a) AFM-SMFS; (b) 磁镊; (c) 光镊。

此, 可以得到力-伸长曲线 (FEC)。

2.1.2. 磁镊

磁镊的基本原理是, 放置在磁场梯度中的磁性粒子经历与磁场梯度相同的力。一般来说, 两个磁铁必须一起使用, 从而产生张力和扭矩。这对磁铁悬浮在样品流动通道的上方, 使下面的磁场暴露。在流动通道内, 生物大分子连接在流动通道的底部和小磁珠之间。磁珠由外部磁场操控, 从而控制附着在磁珠上的目标分子。在流动通道下面, 有一个连接电荷耦合装置 (CCD) 相机的显微镜物镜, 将观察到的图像传输到 CCD 相机; 然后, CCD 将图像转换为电信号并将其传输到计算机。当一束平行的光束撞击磁珠时, 就会发生光散射。散射光干扰非散射光, 导致在相机拍摄的图像周围形成同心圆[图2 (b)]。磁镊有一些优点, 如强作用力、操作方便; 此外, 磁镊提供的力可以在 0.1~100 pN 的范围内进行调整[39]。

2.1.3. 光镊

一束聚焦的光束作用在折射率高于周围介质折射率的物体上, 可以产生一种光学梯度力。这一原理是由 Ashkin 在 1970 年发现的[40], 这一发现促进了光镊技术的出现和成熟[41]。光镊使用一束光来捕获粒子[图2 (c)], 并且光必须产生电位的最低点并形成一个光阱。当光阱的势垒大于一个物体的动能时, 该物体将被稳定地束缚在光阱中。当光击中粒子时, 就会发生折射。由于光子动量的变

化, 粒子受到反作用力。多条光线的合力将粒子结合在中心。此时, 可以通过移动光场来移动粒子, 以实现像镊子一样控制磁珠的功能。生物大分子也可以通过将它们与光阱中捕获的粒子连接起来进行操作。定向移动光束的位置可以控制生物大分子两端之间的距离, 因此光镊可以准确地对生物大分子施加与粒子运动方向相同的力。尺寸为 20 nm 到几微米的粒子可以被稳定捕获[42–45]。

2.2. 单分子检测技术

单分子检测技术可以通过检测和对溶液中的单个分子成像, 并实时记录单个分子的行为, 来确定生物分子的动态特性和相互作用[46]。

2.2.1. AFM 成像

AFM 的另一个主要应用是成像。当使用 AFM 作为成像工具时, 最基本的工作原理是尖端接近样品, 直到尖端与样品之间的相互作用力导致悬臂梁变形。通过记录悬臂梁的变形情况, 可以重建样品的表面轮廓。当扫描样品时, 用户可以通过激光 (从悬臂梁反射到位置敏感的光电探测器) 来测量尖端的垂直位置。AFM 成像分辨率可以达到原子水平: 横向分辨率可达 2.00 nm, 纵向分辨率高达 0.01 nm。

2.2.2. 单分子荧光技术

单分子荧光的基本原理是检测附着在所研究分子上的

荧光团所发出的光。基态的荧光基团吸收来自外部光源的光，然后被激发，并发出 $1 \times 10^{-9} \sim 1 \times 10^{-7}$ s 的荧光[47]。在单分子荧光中，荧光分子可以附着在DNA上，在短时间内被检测和监测[48]。利用单分子荧光技术，可以表征高阶DNA结构的不同构象状态[49]。单分子荧光技术被广泛用于探测二级DNA结构的不同构象。

在单分子荧光共振能量转移 (smFRET) 技术中，两种不同颜色的染料定位于宿主分子上的特定位置[图3(a)]。荧光共振能量转移 (FRET) 是基于两种相互接近的荧光染料之间的量子相互作用机制。当供体和受体之间的距离足够近，并且供体被外部光源激发时，受体通过供体和受体之间的非辐射共振能量转移机制发出部分光。能量传递的效率取决于供体和受体之间的距离：

$$E_{\text{FRET}} = \frac{1}{1 + (r/R_0)^6}$$

式中， R_0 是 FRET 效率为 50% 的供体-受体距离； r 为供体-受体距离。smFRET 的研究领域正在扩大，smFRET 可用于酶促反应、分子折叠和构象转变。

2.2.3. 纳米孔技术

纳米孔技术作为一种新的单分子检测平台，可以区分腺嘌呤 (A)、胸腺嘧啶 (T)、胞嘧啶 (C)、鸟嘌呤 (G) 等单核苷碱基的差异。纳米孔技术具有高分辨率、高通量的优点。绝缘膜将电解质室分为顺式室和反式室，一个纳米孔连接两个室[图3(b)]。当电场施加在纳米孔的两端时，目标分子占据纳米级孔隙会导致堵塞，从而干扰通过孔隙的离子电流，产生可测量的信号。这些信号包含了关于目标分子的结构、动力学和其他信息[50-51]。作为材

料，纳米孔可以分为生物纳米孔[52-53]和固态纳米孔[54-55]，它们有助于探索不同的DNA高阶结构。

2.2.4. SM-SR 显微镜

传统的荧光显微镜受到衍射的限制，这定义了可实现的分辨率。SM-SR 技术使荧光显微镜能够实现大约 20 nm 的空间分辨率。在这种技术中，荧光团表现为点源，它们的图像对应于显微镜的点扩散函数 (PSF)。控制发射浓度可以避免同时发射的所有荧光团；然后，每个分子都可以在显微镜图像中进行分析。通过 PSF [图3(c)] 定位每个单个分子的位置，可以重建最终的超分辨率图像[56-57]。SM-SR 显微镜已成为纳米尺度上最有效的成像方法之一，并广泛应用于 DNA 纳米技术领域[58-59]。

受激辐射损耗 (STED) 显微镜是第一个打破光学衍射极限的远场显微成像技术，属于 SM-SR 技术的一个主要类别。STED 的基本原理是同时用两束激光照射样品。一束激光被用来激发荧光分子，使荧光分子在中心达到激发态。在激发后，荧光分子经历从振动弛豫到最低态的过程。同时，另一束光猝灭了中心区域外的被激发的荧光分子，使被激发的荧光分子通过 STED 回到基态，而没有自发发射荧光。这样，最终就能获得超过衍射极限的高分辨率图像[60]。

2.3. 单分子检测和操纵方法的结合

为了研究时间和空间分辨率，将单分子检测与操纵方法相结合，引入互补优势，并为检测DNA构象变化提供了更多的细节。这些方法在动态DNA的动力学或热力学分析方面具有广阔的潜力。早期，Funatsu等[61]首次将光

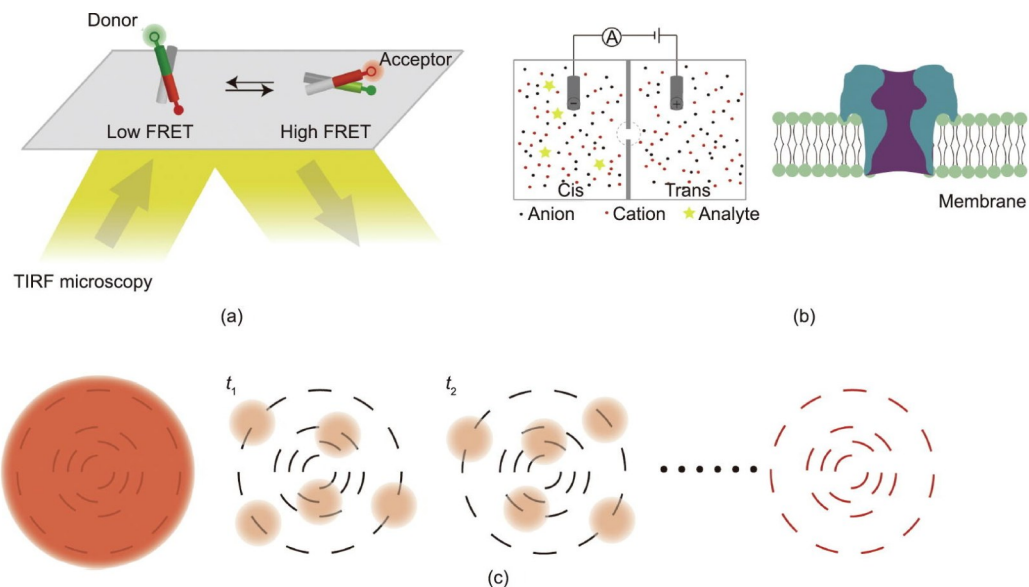


图3. 用于检测DNA结构的单分子检测的示意图概述。(a) smFRET；(b) 纳米孔；(c) SM-SR显微镜。TIRF：全内反射荧光； t_1 、 t_2 ：不同的时间点。

学捕获与单分子荧光相结合，以直接检测驱动蛋白分子和微管之间的相互作用。在此之后，将光/磁镊与单分子荧光或FRET组合，应用于DNA测量变得更加普遍[62–63]，如核小体展开[64]和确定G4的构象多样性[65]。光镊与荧光显微镜和共聚焦微流体技术的结合已经得到了广泛的应用。该技术将单个分子置于不同的反应混合物中，并提供诸如身份、构象动力学和空间动力学等信息[66–67]。此外，Lee等[68]开发了一种将光阱与三色FRET相结合的方法，用于测量更复杂样品[如霍利迪连接体（Holliday Holliday junction）和双发夹]的结构转变或折叠/展开动力学。

3. 表征不同DNA结构的单分子技术

3.1. DNA一级结构

DNA的主要结构是ssDNA，该结构是利用磷酸二酯键排列脱氧核苷酸而形成的，没有氢（H）键的相互作用。ssDNA是DNA复制、转录和修复等生物过程中的重要中间体[69–71]。在体内，ssDNA由于其灵活性而经历了动态的构象变化；因此，对这些力学性能的测量可以为理解DNA的折叠结构提供线索。由于ssDNA的高灵活性，ssDNA的构象只能在群体分子实验中进行统计学上的描述。通过诸如smFRET、荧光相关光谱和力谱等单分子分析方法[72]，ssDNA的力学性能得到了广泛的探索。利用这些方法，发现ssDNA的驻留长度（表征灵活性的一个重要参数[73]）范围在1.5~5.0 nm之间，受DNA序列、轮廓长度和缓冲液中阳离子浓度的影响[74]。然而，这些测量大多是使用较长的ssDNA [大于100核苷酸（nt）]进行的，因为检测较短的ssDNA比较困难。最近，一项研究使用smFRET对小于14 nt的DNA的灵活性进行了调查。结果表明，即使ssDNA短于驻留长度，它也具有灵活性[69]。

影响ssDNA弹性的两个因素：碱基堆叠相互作用和糖褶皱构象转变。先前的一项研究[72]通过AFM测量分析了两个ssDNA聚脱氧核苷酸，即聚dA（dA）和聚dT（dT）的弹性。与具有预期熵弹性行为的聚（dA）相比，聚（dT）在FEC约23 pN和113 pN时表现出两个过度拉伸转变，分别是由碱基堆叠相互作用和糖褶皱构象转变（从C3'-endo缩皱到C2'-endo缩皱）引起的。在具有随机序列的长ssDNA中也发现了糖褶皱构象转变[75]，两种糖褶皱构象的能量差为2~1674 J·mol⁻¹。

温度也可能影响ssDNA的延伸。当ssDNA被相对较低的力（<10 pN）拉伸时，由于二级结构的形成，ssDNA的延伸随着温度的增加而增加。而当拉伸力大于

10 pN时，ssDNA的延伸随温度的升高而减小，说明温度对ssDNA的弹性起着重要作用[76–77]。

如前所述，纳米孔和DNA链之间的相互作用会产生通过纳米孔的离子电流的变化，使纳米孔可以用于DNA测序。纳米孔技术是最有前途的第三代测序技术，具有精度高、成本低、读取长度长等优点。

3.2. DNA二级结构

3.2.1. 双链DNA

3.2.1.1. dsDNA的弹性、解链力和剪切力

Watson、Crick和Franklin在1953年发现了DNA的双螺旋结构[78–79]。此后，双螺旋DNA的化学性质和物理性质引起了人们的广泛关注，特别是dsDNA的弹性。以往的研究表明，自由连接链（FJC）模型和自由旋转链（FRC）模型最适合用于描述ssDNA的弹性[80–82]。FRC模型与FJC模型基本相同，除了前者固定了最近邻单体之间的键角[83]。

$$x = L \cdot \left(1 - \frac{k_B T}{2F \cdot l_b}\right)$$

式中， k_B 为玻尔兹曼常数； x 为聚合物链在给定拉伸力 F 下的平均延伸量； l_b 为聚合物链的旋转单位长度； T 为绝对温度； L 为轮廓长度。

对于dsDNA，力-伸长关系在大的作用力下变成非线性。这种行为可以用FJC模型来解释，而蠕虫链（WLC）模型适用于介量力[84–85]。在经典的FJC模型中，链被表示为自由连接的非弹性段[86]；在没有外力的情况下，这些节段的方向是无关的[37]。在这个模型中，分子的弹性响应为纯熵[87]：

$$\frac{x}{L} = \coth\left(\frac{Fl_k}{k_B T}\right) - \frac{k_B T}{Fl_k}$$

式中， l_k 是Kuhn长度。

作为另一种替代模型，WLC是一种用于描述聚合物分子的模型，该聚合物分子被视为一条长而细的蠕虫；聚合物链的构型是一个空间曲线，可以在整个链的每一点上弯曲。WLC模型于1949年提出[88]，并在1995年用于描述单个dsDNA分子的弹性响应[89]。力 F 与延伸分数（ x/L ）相关，如下[89]：

$$F = \frac{k_B T}{A} \left[\frac{1}{4 \left(1 - \frac{x}{L}\right)^2} - \frac{1}{4} + \frac{x}{L} \right]$$

式中， A 是驻留长度。

为了扩大公式的适用范围，Wang等[90]添加了拉伸模量来修改公式；力 F 现在与延伸分数 (x/L) 有关：

$$F = \frac{k_B T}{A} \left[\frac{1}{4 \left(1 - \frac{x}{L} + \frac{F}{K_0} \right)^2} - \frac{1}{4} + \frac{x}{L} - \frac{F}{K_0} \right]$$

式中， K_0 是弹性模量。

1992年，Smith等[37]测量了单个dsDNA分子的弹性，这是第一次对核酸的单分子研究。他们模拟了附着在磁珠上的DNA分子在水动力和磁力作用下的运动。迄今为止，单分子操纵技术在核酸研究中的应用越来越多，该技术取得了重要进展。在这种技术中，dsDNA分子的一端附着在玻璃表面上，而另一端则连接到磁珠上。DNA分子通过生物素-链霉亲和素或地高辛/抗地高辛抗体等特定反应被连接到不同的表面。在拉伸力小于5 pN时，DNA表现出以熵效应为主的弹性响应；在大于5 pN的力时，焓贡献起着关键作用。先前的研究表明，当施加约65 pN的剪切力时，扭转不受约束的B型DNA（B-DNA）经历了过度拉伸转变[38,91]，导致其原始轮廓长度延长约1.7倍。在150 pN时，DNA分裂成单链，并在放松时完全重组[92]。

Essevaz-Roulet等[93]和Bockelmann等[94]对单个噬菌体 λ DNA分子进行了机械分离，发现DNA机械解链发生在10~15 pN范围内。结果表明，鸟嘌呤/胞嘧啶（GC）含量高度相关，富GC区比富腺嘌呤/胸腺嘧啶（AT）区具有更高的解链力。这一结果与Rief等[92]的研究结果一致。对于聚（dG-dC）和聚（dA-dT）DNA链，解链力为 $F_{G-C} = 20$ pN和 $F_{A-T} = 9$ pN。通过不同拉伸力下的平衡测量，可以得到解链/再结合自由能和动力学[95]。

3.2.1.2. 碱基对之间的相互作用

在DNA双螺旋中，氢键连接两条链上的碱基对，这有助于链间的稳定；而相邻碱基对之间发生碱基堆叠相互作用，提供链间和链内的稳定[图4（a）][96]。如果两个碱基之间的堆叠自由能过高或过低，基因组就会过稳定或不稳定，从而影响DNA在复制或转录过程中的展开，导致遗传不稳定[97]。

早在2004年，Sattin等[98]就探索了堆叠相互作用力，并获得了A-T或G-C碱基对的力贡献。他们发现，虽然A-T和G-C的氢键数量不同，但这些力的数量近似相等。此外，他们还报道了碱基堆叠对dsDNA相互作用的贡献大于氢键。Kilchherr等[99]利用光镊进一步探讨了DNA

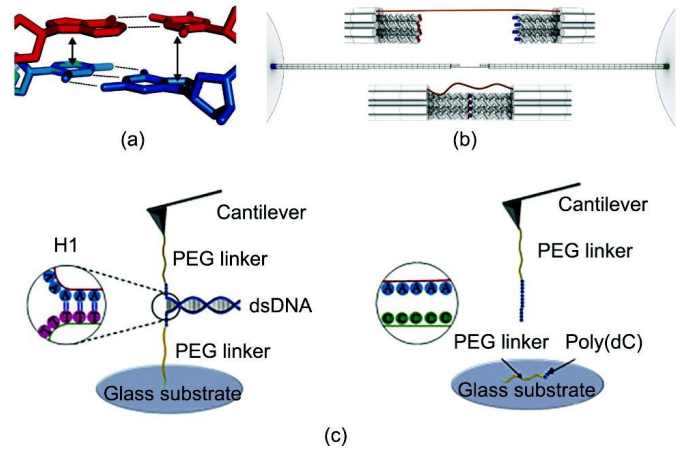


图4. 用于探索碱基对之间相互作用的单分子分析方法的概述。(a) 碱基对之间的堆叠相互作用。经许可转载自参考文献[99]。(b) 使用光镊和DNA折纸结构探测碱基堆叠力的示意图。橙色的系链代表一条单链，红色和蓝色代表末端的碱基对。经许可转载自参考文献[99]。(c) 通过AFM探索核苷酸间相互作用的示意图。PEG：聚乙二醇；H1：dsDNA螺旋结构。经许可转载自参考文献[100]。

碱基对之间的堆叠力[图4（b）]。他们准备了四种由碱基A和T创建的碱基对堆叠配置，并使用光镊来测量力-伸长数据。经过计算，发现每个堆叠的自由能增量在 $-3.4 \sim -14.23$ $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 之间，这一结果现在为基于DNA的设备设计提供指导。

碱基对之间也存在着长程（15~25 nm）相互作用。Luo等[100]利用AFM计算了解离互补碱基对之间的长程相互作用[图4（c）]，发现A-T的长程相互作用为 (2.3 ± 0.2) pN，C-G的为 (3.5 ± 0.2) pN；这些力是由于核苷酸之间有序水结构的多重氢键的相互作用。这一结果可能对理解DNA杂交过程具有重要意义。

3.2.2. 霍利迪连接体

霍利迪连接体是DNA重组中的四链DNA中间体，在特定条件下可以发生构象转变和分支迁移[图5（a）]。在没有金属离子的情况下，霍利迪连接体采用四个指向正方形角的螺旋构象[101]。在 Mg^{2+} 浓度超过约 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时，霍利迪连接体作为两种不同的亚型存在，两者都具有典型的X形结构[102]。随着 Mg^{2+} 浓度增加，两种构象（ISO-I和ISO-II）之间的转变变慢[103–104]，分支迁移速率迅速降低[105–106]。同样，外力也会影响霍利迪连接体的构象转变。Hohng等[107]使用一种结合了smFRET和光镊的技术，发现霍利迪连接体的构象在0.5 pN或更低外力作用下是偏置的[图5（b）]。Nickels等[108]设计了一个自组装DNA力钳[图5（c）]，并表明可以施加外力使霍利迪连接体在ISO-I和ISO-II两种堆叠构象之间连续切换[图5（d）]。这些结果说明了smFRET在探索两个霍

利迪连接体之间构象变化方面的独特优势。由于单分子技术可以用于实时观察霍利迪连接体的中间体和异构化，因此这些技术可以用于探索其内部特性和机械拉伸。这些技术对于未来分析生物系统中的复杂折叠以及设计和验证复杂的DNA纳米组分具有重要意义。

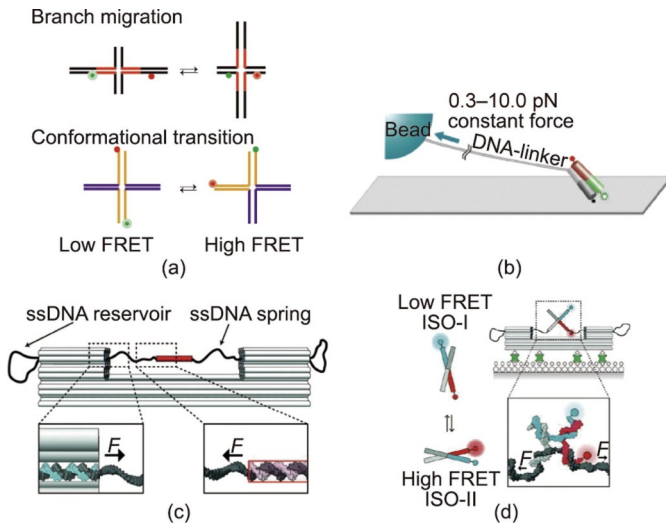


图5. 用smFRET实验探测了霍利迪连接体动力学。(a) 霍利迪连接体的分支迁移和构象转变示意图。Cy5和Cy3荧光团分别在末端附着在两个悬臂梁上。(b) 光镊法探测霍利迪连接体的构象转变。霍利迪连接体通过生物素连接在表面。经许可转载自参考文献[107]。(c) DNA力钳示意图。将感兴趣的分子系统(红色矩形)与DNA力钳的两个锚点连接起来。经许可转载自参考文献[108]。(d) 外力作用下霍利迪连接体的构象转变。经许可转载自参考文献[108]。

3.2.3. DNA G4、i-motif和三重体

G4是由折叠的富含鸟嘌呤的核酸序列组成的四链DNA二级结构[109]。G-四分体是G4的一个结构单元，两层或两层以上的四分体通过 π - π 堆叠形成四链体。1962年，科学家首次在癌细胞中发现了G4，认为它们的稳定性可以有效地抑制肿瘤细胞的增殖[110]。G4折叠拓扑结构可分为三种类型，即混合链结构、反平行链结构和平行链结构[图6(a)] [111]。它们由两个因素决定：糖苷构象和相对链取向[112]。这些结构的力学稳定性可以通过磁镊来探索。Cheng等[113]发现，所有非平行链G4的展开力峰值均低于40 pN，而平行链G4在40~60 pN范围内出现展开力峰值，说明平行链G4具有较高的力学稳定性。当人端粒G4被 K^+ 诱导时，它以混合构象的形式存在[114]。G4的构象变化动力学通常可以通过smFRET来检测[115-117]。Long和Stone [118]发现，原位重折叠导致端粒DNA G4构象的动态分布。环的长度和序列也影响G4的构象和动力学。最近，在 Na^+ 的存在下，也观察到了G4结构的构象动力学。Noer等[119]发现了至少四种FRET状态，表明端粒G4多态性不仅发生在 K^+ 存在的情

况下。作为一种无标记的单分子分析方法，纳米孔也被用于监测G4 [55,120-121]的折叠/展开动态；它们显示出比其他方法具有更高的时空分辨率的潜力。

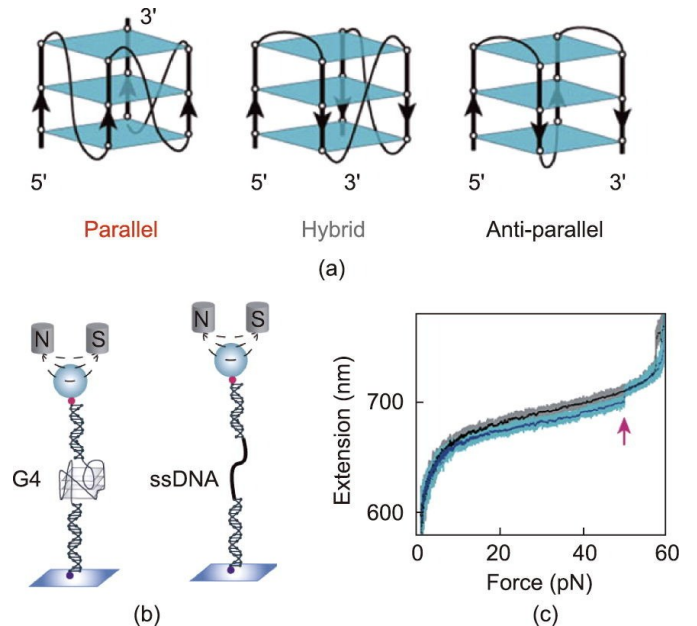


图6. 用磁镊拉伸G4。(a) 三个G4折叠拓扑结构。经许可转载自参考文献[113]。(b) 磁镊测量的实验设置。(c) 运动的力-伸长曲线。红色的箭头指向G4的展开。经许可转载自参考文献[123]。

You等[122]尝试用磁镊探索G4的力学性能[图6(b)和(c)]。他们报道了端粒G4的三种折叠状态，这些状态具有明显不同的机械稳定性和寿命。You等[123]研究了在致癌基因*c-myc*启动子区域形成的DNA G4，发现其主要物种的展开速度较慢，这可能是*c-myc* G4具有基因沉默功能的原因[122,124]。研究人员对另一个富G区，即人类B细胞淋巴瘤2(*Bcl-2*)基因的P1启动子也进行了研究。在该区域内，可以形成多个G4结构。由于*Bcl2-2345*和*Bcl2-1245*具有复杂的折叠/展开动力学，研究人员也对它们进行了研究[125]。通过对折叠/展开动力学的探索，研究者发现*Bcl2-2345* G4的力学稳定性低于*Bcl2-1245* G4。这一信息可指导未来用于调控*Bcl-2*基因表达的G4靶向小分子的设计。与典型G4相比，对非典型G4的研究较少。Zhang等[126]报道，具有凸起的G4形成序列可以形成完全折叠的G4(高机械稳定性)和部分折叠的中间体(低机械稳定性)，这取决于凸起的长度和位置。

该*KIT*基因位于人类染色体4q12至4q13上，属于原致癌基因，可编码干细胞/肥大细胞生长因子受体基因*c-kit*。*c-kit*基因异常可能导致细胞异常增加和肿瘤形成[127]。在*KIT*基因的近端启动子中有三种不同的G4结构：

kit*、kit1 和 kit2 [128]。以往的研究表明，这些位点形成的 G4 会影响基因的表达[129]。了解这些 G4 结构的构象特征和力学性质，深入探索它们在 DNA 结构中的调控作用，对于将它们用作潜在的药物靶点具有重要意义。Buglione 等[130]发现 G4 的形成并不影响 FEC。当施加固定的负扭转应力（负超螺旋=-40）时，野生型 *c-kit* 在低作用力下（ $F = 0.3$ pN，形成卷曲体结构）延伸，但突变的 *c-kit* 没有。在高强度（ $F > 1$ pN，形成变性气泡）下，突变的 *c-kit* 和野生型 *c-kit* 的曲线几乎重合，接近松弛下的 dsDNA 延伸曲线；换句话说，超螺旋的存在对 *c-kit* 区域 DNA 的力学性能有很大影响。

与 G4 类似，i-motif 自 20 世纪 90 年代就开始被模拟了，但近年来逐渐引起了科学家的注意。i-motif 是一个由两个平行的双链通过插入半质子化的胞嘧啶碱基对（C/C⁺）形成的四链结构[131]，广泛存在于基因组 DNA 中[132–133]，并在微酸性 pH 中保持稳定[134]。一些研究结果表明，i-motif 序列在多种生物过程中发挥着重要作用，如调控基因表达和复制[135–137]。Dhakal 等[138]是第一批在单分子水平上探索 i-motif 的力学性质的研究者[图 7 (a)]。这些研究人员确定，i-motif 具有 22~26 pN 的解折叠力。通过结合 smFRET 和自组装 DNA 纳米结构[图 7 (b)]，Megalathan 等[139]证明了人端粒序列在 pH = 9.0 时保持无结构，在 pH = 5.5 时采用了完全折叠的 i-motif 序列结构。然而，在弱酸性 pH（pH = 6.5）下，序列经历了 i-motif、部分折叠态和完全展开态之间的切换动力学过程。拓扑约束也被证明会影响 i-motif 的折叠和构象动力学。在此基础上，Megalathan 等[140]研究了分子拥挤对嵌入在纳米环中的 i-motif 稳定性的影响。为了模拟体内染色质中 i-motif 结构的真实拓扑结构，研究人员构建了扎紧的 DNA 纳米环 i-Cir96L（其中“L”表示扎紧的）[图 7 (b)]。聚乙二醇（PEG）用于模拟分子拥挤。相比，未扎紧的 i-Cir96 纳米环，扎紧结

构中 i-motif 只在 pH = 5.5 时形成，而前者在 pH = 6.5 时显示明显的折叠，在 pH = 7.0 和 7.4 时显示大部分折叠状态[139,141]，表明扎紧的纳米环变得很硬，以至于 DNA 弯曲破坏了 i-motif 的稳定性。在 PEG 存在的情况下，即使在 pH 值为 7.4 时，i-motif 也表现出较高的 FRET 状态，表明 PEG 可以稳定 i-motif。

Ding 等[142]首次将 α -溶血素蛋白纳米孔应用于 i-基序结构的折叠研究。通过将 i-motif 结构封装到纳米腔中，他们报道了一种用于分析 i-motif 寿命的方法。结果表明，i-motif 的折叠寿命随着 pH 值的增加而降低。Xi 等[143]进一步发现，改变环序列和长度并不影响 i-motif 结构的形成，但较长的环不会降低 i-motif 的热稳定性。在没有力的情况下，Jonchhe 等[144]使用微流体通道测量了中性 pH 下 i-motif 的半衰期约为 3 s。这些方法是用于研究单分子动力学的新平台。

当一个嘧啶或嘌呤碱基与沃森-克里克碱基对的嘌呤形成 Hoogsteen 对时，DNA 三链体就形成了，并占据 DNA 双螺旋的大沟，寡核苷酸与 dsDNA 上的目标序列形成分子间三链结构[图 8 (a)] [18]。一个三螺旋结构可能有许多不同的组成和几何形状[145]。Ling 等[146]报道了一个具有 30 个三链结构的 DNA 三链体，并确定了双链和第三条链断裂的力约为 42.6 pN。Lee 等[147]通过 smFRET 研究了 DNA 三链体的形成[图 8 (b)]。当嘧啶基序三链体处于弱碱性条件（pH = 8.5）下时，单链尾部没有被折叠。随着酸度的增加，低 FRET 效率峰消失，在高 FRET 效率下出现了一个新的峰，表明形成了一个平行的三链体。Mg²⁺的存在也可以帮助形成一个三链体，无论是嘌呤基序三链体还是嘧啶基序三链体。Li 等[148]进一步深入了解了形成三链体的动力学，他们使用了单分子拯救绳策略，发现 DNA 三链体的形成也依赖于 DNA 序列。AA 突变体（将 TTAGGG 的基序改变为 AAAGGG）增加了形成 DNA 三链体结构的可能性。

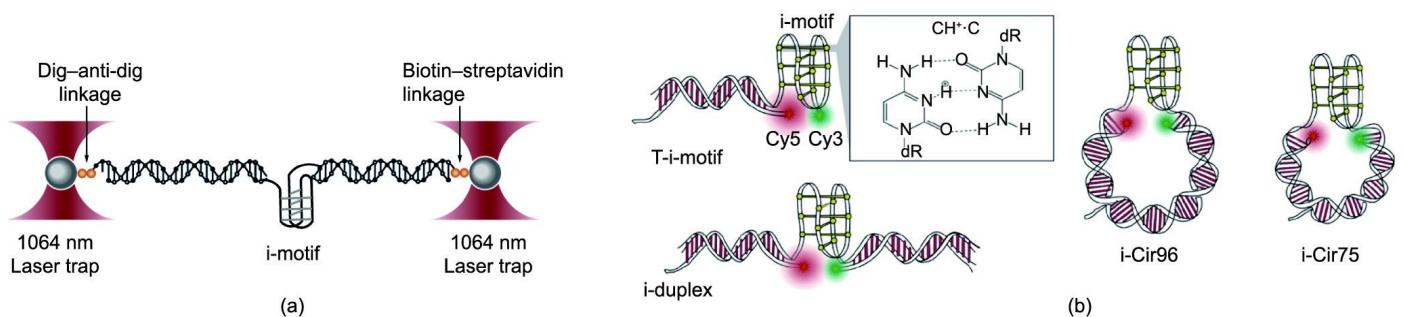


图 7. 利用光镊和 smFRET 研究了 i-motif 的力学性能。(a) 光镊法拉伸 i-motif。(b) 四种不同的 DNA 折纸结构示意图。带有 i-motif 的 DNA 结构连接在 DNA 双链（T-i-motif）的末端位置，或嵌入 DNA 双链体（i-双链）和 DNA 纳米环（i-Cir96 和 i-Cir75）中。绿色和红色分别表示 Cy3 和 Cy5 荧光团。经许可转载自参考文献[139]。

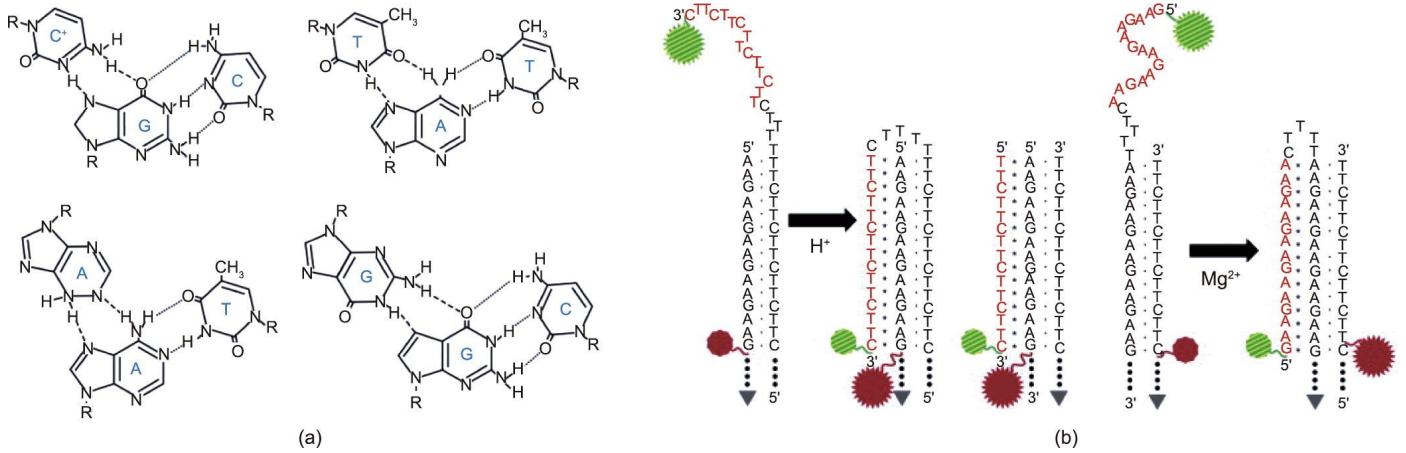


图8. 三链体。(a) DNA三链体中的四个碱基排列。经许可转载自参考文献[147]。(b) 嘧啶基序三链体（左图为两个）和嘌呤基序三链体（右图）的分子结构。一旦被折叠，两个荧光团接近，可以观察到高FRET效率。经许可转载自参考文献[147]。

3.3. DNA三级结构

3.3.1. DNA拓扑结构

DNA双螺旋在复制和转录过程中引起扭转应力，从而产生超螺旋并引起拓扑变化。DNA拓扑结构由连接数(Lk)描述，其中 $Lk = \text{扭曲}(Tw) + \text{弯转}(Wr)$ [149]，Tw指DNA中螺旋旋转的数量，Wr是双螺旋自身交叉的次数（即超螺旋的数量）。这种交织在一起的结构被称为卷曲体[150]。一般来说，负和正超螺旋都是在体内产生的。随着复制体的推进，正超螺旋聚集在复制叉的前面，导致复制体旋转以放松超螺旋，使两个子DNA链纠缠在一起[151]。当DNA转录发生时，在转录泡之前产生正超螺旋DNA，在转录泡之后产生负超螺旋DNA [152]。这种局部纠缠的DNA链对于转录激活是必需的[153]。

单分子磁镊已经成为研究超螺旋DNA的有效工具，因为它们可以通过使用磁体对磁珠进行旋转，很容易地引入超螺旋旋转。当负扭转力作用于DNA时，扭转应力通常储存在卷曲体中，而不是低作用力（低于0.5 pN）时

的扭曲。随着作用力的增加，DNA开始扭曲，这种变化导致DNA变性形成左手结构[154–155]。当作用力增加到2 pN时，负扭转力被变性结构完全吸收，DNA长度不改变[156]。Strick等[154]检测了6条不同GC含量的DNA序列[图9(a)]，得到了超螺旋密度-延伸曲线[图9(b)]。在0.5 pN以下，曲线相似；在0.5 pN以上，由于DNA部分融化，DNA长度增加，不同序列的长度增加也不同。GC含量较高的DNA分子具有较大的延伸性。Kim等[157]探索了胸腺嘧啶鸟嘌呤(TG)重复序列的B型DNA到Z型DNA(B-Z)的转变动力学；他们的smFRET结果表明，TG重复序列对扭转和拉力很敏感，并计算了B-Z转变的速率和速率常数。在之前的工作中，Lee等[63]计算了37 °C下GC重复B-Z转变的正向速率($K_{BZ} = 0.051 \text{ s}^{-1}$)、反向速率($K_{ZB} = 0.070 \text{ s}^{-1}$)和平衡常数($K_{eq} = K_{BZ}/K_{ZB} = 0.73$)。相比之下，TG重复序列的转变速率要高得多，这说明两态之间的自由能垒是较低的[156]。

通过传统的光镊很难将扭转应用于DNA。克服这一

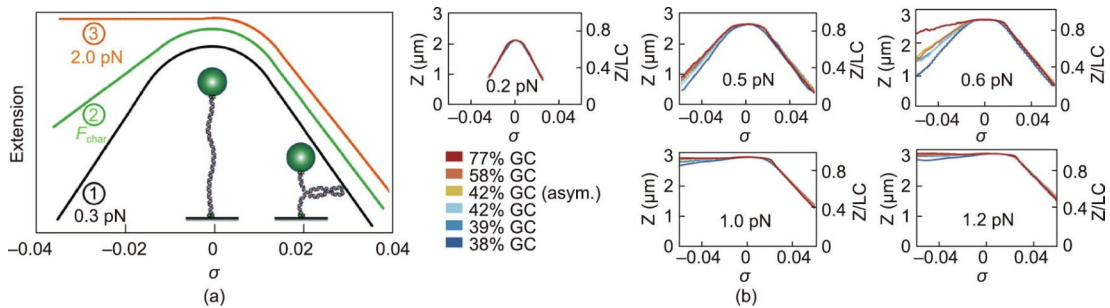


图9. 利用单分子磁镊应用扭转技术探索DNA B-Z转变。(a) 利用磁镊进行DNA超螺旋单分子测量的原理图。超螺旋密度-延伸曲线显示了不同的DNA结构（变性、下缠绕或卷曲）。在一个特征力(F_{char})下，负超螺旋诱导dsDNA局部融化。 σ : 超螺旋密度。经许可转载自参考文献[156]。(b) 曲线显示了不同作用力下DNA延伸与超螺旋密度的关系。当作用力增加到1.2 pN时，所有GC含量不同的序列均呈现不对称曲线，负超螺旋被DNA熔融吸收，正超螺旋被卷曲体吸收。6种不同DNA结构体的最终GC含量分别为77%、58%、42%（GC沿分子的不对称分布）、42%（GC沿分子的对称分布）、39%和38%。Z: DNA延伸长度，LC: 轮廓长度。经许可转载自参考文献[156]。

挑战, Forth等[150]、Sheinin等[158]、Deufel等[159]用光镊捕获纳米石英柱, 将检测的生物分子固定在石英柱和载玻片底部, 对石英柱进行拉伸操作, 扭转生物分子, 并获得DNA的扭转模量[图10(a)]。这种先进的设备被称为角光学陷阱(AOT)。研究人员扭转了一个单底物DNA, 并编织了一个编织的底物DNA(即将DNA的两条链编织在一起)[160]。结果表明, 对于裸DNA, ssDNA的扭转模量比编织DNA的扭转模量高三倍, 而对于染色质, 编织染色质的扭转模量比单个染色质的扭转模量高5倍。换句话说, 当复制发生在裸DNA上时, 复制产生的超螺旋主要分布在复制体后面(此处底物较软)[图10(b)], 而染色体则相反。

3.3.2. 核小体和染色质

在真核生物中, 基因组由染色质组成, 染色质由DNA和组蛋白组成。染色质的基本单位是核小体, 其中DNA的147个碱基对被包裹在组蛋白八聚体(H2A、

H2B、H3和H4)周围, 约1.7转[161–162]。染色质参与了所有的DNA代谢过程, 包括转录、复制、修复和重组。AFM在探索单个染色质链的行为和性质方面的潜力已经被证明[163–165]; 高阶染色质结构的形成也可以通过AFM成像来显示[163]。最近, Kilic等[166]利用smFRET揭示了染色质纤维相互转化动力学, 发现异染色质蛋白1 α 维持染色质处于致密和动态状态。

单分子分析方法允许在应力和扭转条件下观察单个核小体, 这对模拟体内的生理过程很重要。先前的单分子研究表明, 在15–25 pN的作用力下, 核小体将经历从部分展开到完全展开的转变[167–169]。当对DNA模板施加约10 pN的力时, 染色质组装过程显著减慢了[170]。磁镊已被用于监测核小体在拓扑约束的DNA分子上的核小体组装[图11(a)]。Gupta等[171]发现, 在0.025–0.051范围内的正超螺旋会阻止核小体的形成。组蛋白H2A(ubH2A)在赖氨酸119处的单泛素化可以影响核小体的稳定性。Xiao等[172]利用磁镊将DNA与

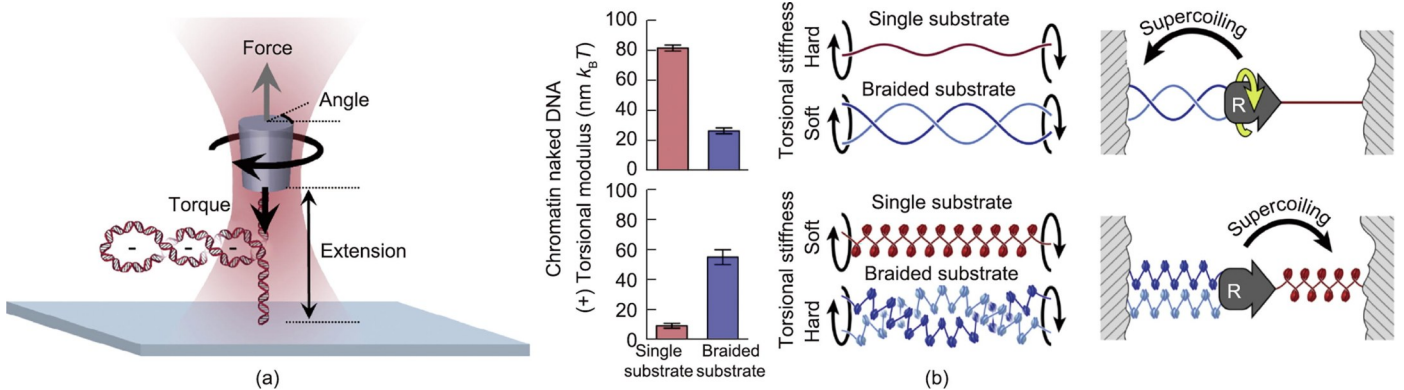


图10. 利用角光学陷阱(AOT)探索DNA拓扑结构。(a) AOT的原理图。经许可转载自参考文献[160]。(b) 单个(红色)和编织底物(蓝色)的扭转模量直方图(左), 显示了DNA和染色质底物在复制过程中的差异(右)。在裸DNA上的复制主要分布在复制体的后面, 而在染色质上的复制主要位于复制体的前面。 $k_B T$ 为 4.14×10^{-21} J, 其中 k_B 是玻尔兹曼常数, T 是温度。经许可转载自参考文献[160]。

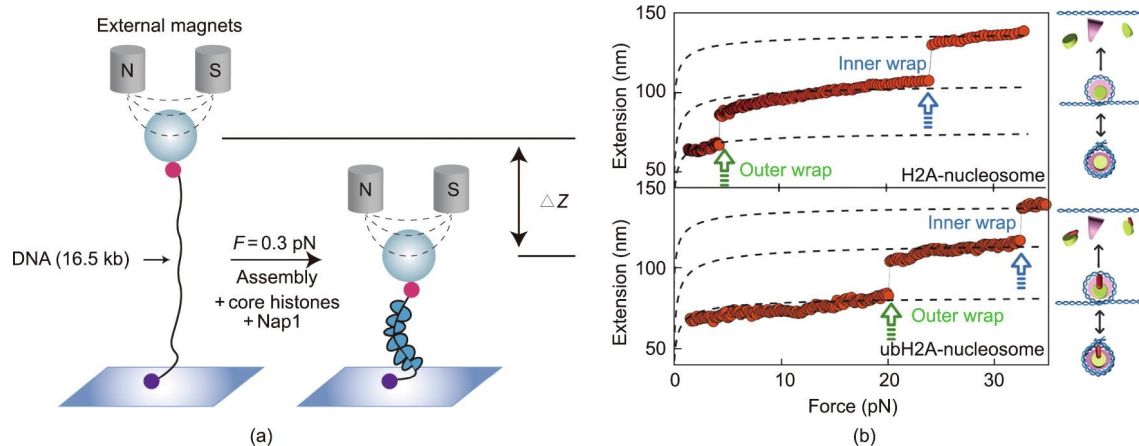


图11. 用磁镊探测的核小体的组装和拆卸。(a) 用磁镊组装核小体。将一个dsDNA分子拴在磁珠和底物表面之间, 然后加入核心组蛋白和组蛋白伴侣Nap1的混合物。核小体的形成是通过监测磁珠的DNA延伸(ΔZ)的缩短来确定的。经许可转载自参考文献[171]。(b) H2A-核小体和ubH2A-核小体的力-伸长曲线。经许可转载自参考文献[172]。

H2A核小体和ubH2A核小体的展开力进行了比较[图11(b)]。他们发现ubH2A核小体在更高的作用力下经历了两步展开。ubH2a可以通过防止组蛋白八聚体的DNA剥离来增加核小体的稳定性。促进染色质转录(FACT)是一种组蛋白H2A-H2B二聚体伴侣[173],可以促进染色质上聚合酶的进展[173],提高转录的保真度[174]。FACT也被证明能在单分子水平上介导核小体的组装和拆卸[175]。最近,Wang等[176]直接研究了ubH2A对FACT功能的影响。通过操控核小体,发现ubH2A以不同的方式调节FACT的双重功能。FACT在核小体组装中的功能不受H2A泛素化的影响;然而,ubH2A极大地限制了FACT与核小体的结合,从而抑制了其核小体的分解活性。

4. 结合单分子分析方法和DNA纳米技术来检测DNA结构

DNA纳米组件可广泛用于纳米材料、生物分子传感、成像和药物递送[177–180]。由于其高分辨率,单分子技

术可以用于表征单个纳米物体的力学性能。因此,单分子分析方法与DNA纳米技术的结合填补了研究空白。有许多关于DNA纳米技术的综述[181–183]。本文主要关注两个主题:①使用DNA纳米结构作为静态平台来操控和观察单个分子;②对DNA纳米结构的结构动力学的研究。

4.1. DNA折纸纳米笼

1991年,Chen等[184]首次报道了利用DNA合成封闭的多面体物体,随后逐渐构建了具有不同功能、形状和大小的DNA纳米笼[185–187]。这些纳米笼表现出极高的稳定性,使它们可以用于单分子研究。由于熵效应,纳米约束可以增加DNA和蛋白质二级结构的稳定性,如G4和i-motif的稳定性。Shrestha等[188]使用光镊探索了DNA折纸纳米笼中G4的力学机制[图12(a)]。他们首先使用了一个中等的纳米笼结构(横截面尺寸为 $9\text{ nm} \times 9\text{ nm}$),发现G4的展开力明显高于没有纳米笼的相同序列。不同的纳米笼尺寸也会影响G4的折叠,较小的尺寸会导致更大的展开力。Jonchhe等[189]发现DNA发夹以相反的方式起作用[图12(b)]。以往的研究表明,纳米约束条件下G4

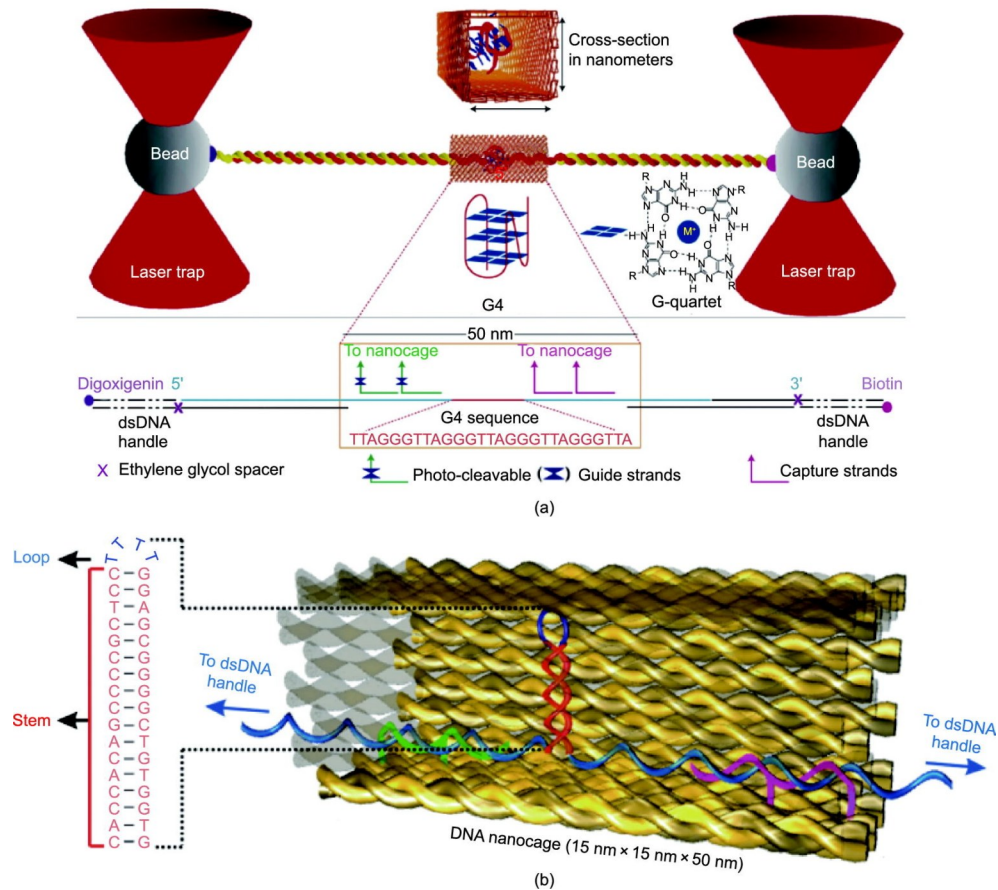


图12. DNA纳米笼的设计。(a)上部:包含G4形成序列的纳米笼示意图。底部:一个G4序列与两个dsDNA手柄连接,两端用地高辛和生物素标记。经许可转载自参考文献[188]。(b)含有发夹的纳米笼示意图。经许可转载自参考文献[189]。

解折叠势垒的增加是由于水分子在G4解折叠转变过程中的水化作用[190]。纳米笼内发夹DNA的异常现象归因于水活性的降低。此外，研究人员认为，阳离子与带负电荷的折纸表面的相互作用也是影响dsDNA稳定性的因素。

4.2. DNA折纸框架

与磁镊和光镊相比，AFM可以直接对生物分子成像。AFM使直接观察酶-dsDNA相互作用的动态运动成为可能，尽管控制DNA链的方向是费力的[191]。为了解决这一挑战，Rajendran等[191]和Sannohe等[192]创建了一个基于DNA折纸的观察平台，称为“DNA框架”，它可以携带底物dsDNA[图13(a)[193]]。研究人员将DNA折纸和高速AFM相结合，以可视化DNA构象的变化[194]。在 K^+ 存在时，DNA框架中的两个dsDNA桥明显显示为X型结构，表明G4的形成[图13(b)]。相比之下，没有 K^+ 存在时，G4结构被破坏。在DNA框架中也观察到中间状态，如G-发夹和G-三链体[图13(b)]。综上所述，DNA折纸框架可以用来观察G4的形成和破坏，这是首次直接可视化G4折叠过程中中间体的溶液态结构。后来，Feng等[195]报道，当核小体接近时被拒绝，而远端的两个核小体可以长时间保持稳定接触。DNA框架也被用于可视化dsDNA的B-Z构象转变[196]和DNA结构变化[197]。因此，一个组装的DNA框架为在体外探索DNA和染色质结构提供了一个有效的平台。

4.3. DNA纳米结构的结构动力学

单分子力谱允许深入探索DNA纳米结构的组装。光镊实验表明，霍利迪连接体的有效密度决定了DNA折纸结构的力学稳定性。在外力的作用下，可以观察到DNA纳米管的两种构象的机械异构化[198]。Bae等[199]报道了一种基于磁镊以控制DNA折纸的机械折叠的策略。支架DNA被机械拉伸以去除二级结构，然后引入短链。随后，该力消失，短链之间的位移导致了DNA纳米结构的折叠。整个折叠过程在10 min内完成。这些研究证明了单分子力谱在探测DNA纳米结构的力学性能方面的优越性。

单分子FRET研究可以监测DNA纳米结构的可逆重构。Sacca等[200]设计了一个可重构的DNA纳米腔，该结构改变了DNA折纸结构的内腔大小。最近的许多研究都使用DNA纳米结构作为药物递送载体。DNA四面体结构是一种稳定的用于药物递送的纳米结构。Goodman等[201]报道了一个封闭的四面体结构（高FE）到一个开放的四面体结构（低FE）的转化——一个可以启动药物释放机制的过程。一个带有空腔的DNA纳米盒是另一个典型的例子。盒子的盖子可以根据特定的寡核苷酸被打开，这一过程可以通过FRET光谱来测量[202]。通过结合布朗动力学模拟和smFRET显微镜，Jepsen等[203]发现 Mg^{2+} 浓度影响DNA纳米盒的结构刚性。这些研究为提高DNA纳米结构的稳定性和优化其功能提供了见解。

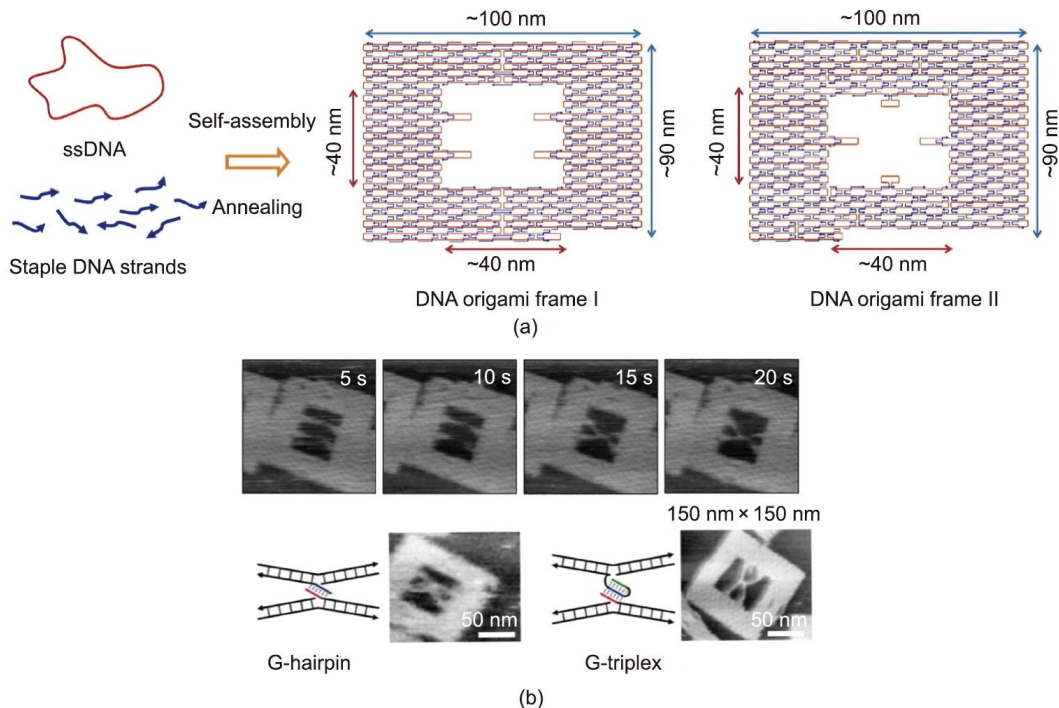


图13. 直接观察DNA折纸框架中DNA构象的变化。(a) 两种不同的DNA折纸框架。经许可转载自参考文献[193]。(b) G4的动态形成（上部）和G-发夹和G-三链体中间体（下部）形成的AFM图像。经许可转载自参考文献[193]。

5. 结论和前景

综上所述，DNA 链间和链内的相互作用导致了 DNA 高阶结构的形成。了解不同 DNA 高阶结构的化学和生物物理性质对于揭示其生物学功能以及 DNA 纳米结构的设计和构建至关重要。为了解释高阶结构的性质，许多静态结构检测方法，如透射电镜、低温电子显微镜和 X 射线衍射，已经被用来确定 DNA 的结构。通过对结构数据的分析，可以计算并得到驻留长度等参数。此外，高速 AFM 成像和核磁共振可以直接测量 DNA 构象转变的动力学。然而，高速 AFM 成像要求样品附着在表面，因此不能完全模拟液体环境。虽然核磁共振可以用于检测动态构象转变，但其时间分辨率为几秒钟[204]；因此，核磁共振不能实时记录快速的动态结构转变。相比之下，单分子检测和操纵方法可以帮助检测 DNA 的构象变化，具有较快的转变动力学，如发夹 DNA 从展开状态到折叠状态的转变动力学[95]。单分子分析方法的高时间和空间分辨率为检测构象变化提供了一个可区分的信号。单分子操纵方法的另一个优点是，这些方法可以直接拉伸和操控单个 DNA 分子，从而能够检测 DNA 的弹性。所施加的力也降低了不同状态下的转变能垒，加速了转变动力学。因此，单分子分析方法为检测高阶 DNA 结构提供了一个强大的检测工具。

随着单分子技术的快速发展，这些方法也被应用于动态 DNA 纳米技术领域。结合单分子检测和链置换反应[205]，DNA 糖基化酶检测[206]、DNA 折纸微阵列表征[207]和 DNA 导航器[208]的应用已经出现。预计将会出现更有效的单分子表征方法。最近，Pei 等[209]介绍了一种基于单分子磁镊和 toehold 介导的 DNA 链置换反应的可重置 DNA 计算方法。此前，Koirala 等[210]和 Mandal 等[211]也提出了几种涉及单分子光镊的 DNA 检测方法。希望未来在这个方向上发展出各种 DNA 存储、DNA 检测和 DNA 计算方法。

虽然已经对 DNA 结构进行了广泛的研究，但内源性和外源性修饰核酸的潜力和功能仍需进一步研究。在体内，DNA 或 DNA 损伤的表现遗传修饰可能诱导基因沉默或突变，并可能随后影响细胞的命运[212–213]。研究表明，修饰 DNA 的物理性质不同于 DNA。Yang 等[214]利用磁镊检测，认为胞嘧啶的甲基化可能会增强 dsDNA 的缩合。McCauley 等[215]通过使用光镊进行发夹解链实验，提供了鸟嘌呤碱基 (oxoG) 诱导的突变效应氧化的生物物理证据。人工核酸[也称为 xeno 核酸 (XNA)]，如 α -L-三核糖基核酸 (TNA)、锁核酸 (LNA) 和 2'-脱氧-2'-

氟- β -D-阿拉伯核酸 (FANA) 也出现在临床前研究[216–218]中。XNA 在体内可以抵抗酶消化，因此，XNA 的高生物稳定性为核酸治疗提供了一个新的视角，包括 RNA 介导的干扰 (RNAi)、反义寡核苷酸 (ASO) 和适配体[219]。DNA 的构象结构可以通过将核苷酸改变为 XNA 来获得改变，而这些结构的稳定性受到 XNA 之间的相互作用的影响。最近的研究表明，2'-脱氧-2'-氟-阿拉伯核苷 (如 2'F-araG) 取代稳定了平行结构的 G4，而 2'F-araC 修饰稳定了 i-motif [220–221]。单分子分析方法可以为探测含有 XNA 的寡核苷酸不同结构的力学性质和构象变化提供更多的信息，这对于理解 XNA 在体内的工作原理具有重要意义。

然而，获得 XNA 链比获得 DNA 更困难。XNA 链的合成有两种有效的方法：固相合成和酶法合成[222]。对于固相合成，XNA 亚胺价格昂贵且不容易获得，而且合成的效率可能要低得多。相比之下，酶法合成可以获得更长的 XNA 链。然而，有必要进化出一种天然酶来特异性识别 XNA (例如，将突变的 Tgo 聚合酶 Tgo-D4K 用于 FANA 延伸) [223]。进化出的 XNA 聚合酶应该具有较高的合成速率和保真度，它们的进化需要大量的工作来筛选合适的聚合酶突变体。因此，进行单分子实验来检测 XNA 的结构取决于 XNA 链的可用性。

在使用单分子分析方法检测 DNA 结构时，仍有几个挑战有待解决。到目前为止，单分子水平的研究已经在体外进行了，特别是那些涉及使用单分子操纵方法测量的研究。可以尽可能多地模拟体内环境。例如，通常使用 PEG 或二甲亚砜 (DMSO) 来模拟体内的拥挤[140,224]。然而，迫切需要填补体外和体内研究之间的差距。最近，Syrchina 等[225]利用光镊操控核浆中的核仁。Keizer 等[226]说明了一种利用磁力在细胞核内的基因组位点进行操控的技术。这些应用显示了在体内操控 DNA 结构的潜力。此外，并不是所有的单分子技术都可以进行高通量的应用，这是单分子技术在解决实际问题方面的一个限制。对于光镊来说，单光束可以通过声光偏转器共享时间，产生多个光阱，是提高吞吐量的有效方法。开发高通量光阱仍然是单分子分析的一个重要挑战。

鉴于过去几十年单分子技术的发展，预计将发现更多的 DNA 高阶结构，同时将出现高精度和高通量的单分子表征方法。

致谢

感谢国家重点研发计划项目(2021YFF1200200)、国家

自然科学基金项目(22161132008)、上海自然科学基金项目(19520714100和19ZR1475800)、浙江大学上海高等研究院繁星科学基金项目(SNZJU-SIAS-006)、浙江省自然科学基金项目(LQ21C050001)资助。

Compliance with ethics guidelines

Yonglin Liu, Tianyuan Bian, Yan Liu, Zhimin Li, Yufeng Pei, and Jie Song declare that they have no conflicts of interest or financial conflicts to disclose.

References

- [1] Aaij C, Borst P. The gel electrophoresis of DNA. *Biochim Biophys Acta Nucleic Acids Protein Synth* 1972;269(2):192–200.
- [2] Xiao W, Oefner PJ. Denaturing high-performance liquid chromatography: a review. *Hum Mutat* 2001;17(6):439–74.
- [3] Kay LE. NMR studies of protein structure and dynamics. 2005. *J Magn Reson* 2011;213(2):477–91.
- [4] Scott LG, Hennig M. RNA structure determination by NMR. *Methods Mol Biol* 2008;452:29–61.
- [5] Joo C, Balci H, Ishitsuka Y, Buranachai C, Ha T. Advances in single-molecule fluorescence methods for molecular biology. *Annu Rev Biochem* 2008;77(1):51–76.
- [6] Deamer DW, Branton D. Characterization of nucleic acids by nanopore analysis. *Acc Chem Res* 2002;35(10):817–25.
- [7] Cattoni DI, Fiche JB, Nöllmann M. Single-molecule super-resolution imaging in bacteria. *Curr Opin Microbiol* 2012;15(6):758–63.
- [8] Gosse C, Croquette V. Magnetic tweezers: micromanipulation and force measurement at the molecular level. *Biophys J* 2002;82(6):3314–29.
- [9] Polimeno P, Magazzù A, Iati MA, Patti F, Saija R, Esposti Boschi CD, et al. Optical tweezers and their applications. *J Quant Spectrosc Radiat Transf* 2018;218:131–50.
- [10] Binnig G, Quate CF, Gerber C. Atomic force microscope. *Phys Rev Lett* 1986;56(9):930–3.
- [11] Heidarsson PO, Naqvi MM, Otazo MR, Mossa A, Kragelund BB, Cecconi C. Direct single-molecule observation of calcium-dependent misfolding in human neuronal calcium sensor-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014;111(36):13069–74.
- [12] Friedrichs J, Taubenberger A, Franz CM, Müller DJ. Cellular remodelling of individual collagen fibrils visualized by time-lapse AFM. *J Mol Biol* 2007;372(3):594–607.
- [13] Watson JD, Crick FH. Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. *Nature* 1953;171(4361):964–7.
- [14] Lipps HJ, Rhodes D. G-quadruplex structures: *in vivo* evidence and function. *Trends Cell Biol* 2009;19(8):414–22.
- [15] Guéron M, Leroy JL. The i-motif in nucleic acids. *Curr Opin Struct Biol* 2000;10(3):326–31.
- [16] Li F, Lin Y, Le XC. Binding-induced formation of DNA three-way junctions and its application to protein detection and DNA strand displacement. *Anal Chem* 2013;85(22):10835–41.
- [17] Duckett DR, Murchie AI, Diekmann S, von Kitzing E, Kemper B, Lilley DM. The structure of the Holliday junction, and its resolution. *Cell* 1988;55(1):79–89.
- [18] Frank-Kamenetskii MD, Mirkin SM. Triplex DNA structures. *Annu Rev Biochem* 1995;64(1):65–95.
- [19] Hansma HG, Revenko I, Kim K, Laney DE. Atomic force microscopy of long and short double-stranded, single-stranded and triple-stranded nucleic acids. *Nucleic Acids Res* 1996;24(4):713–20.
- [20] Ullsperger CJ, Vologodskii AV, Cozzarelli NR. Unlinking of DNA by topoisomerases during DNA replication. In: Eckstein F, Lilley DMJ, editors. *Nucleic acids and molecular biology*. Heidelberg: Springer; 1995. p. 115–42.
- [21] Muthurajan UM, Park YJ, Edayathumangalam RS, Suto RK, Chakravarthy S, Dyer PN, et al. Structure and dynamics of nucleosomal DNA. *Biopolymers* 2003;68(4):547–56.
- [22] Gerling T, Wagenbauer KF, Neuner AM, Dietz H. Dynamic DNA devices and assemblies formed by shape-complementary, non-base pairing 3D components. *Science* 2015;347(6229):1446–52.
- [23] Kuzyk A, Schreiber R, Fan Z, Pardatscher G, Roller EM, Högele A, et al. DNA-based self-assembly of chiral plasmonic nanostructures with tailored optical response. *Nature* 2012;483(7389):311–4.
- [24] Rothemund PW. Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns. *Nature* 2006;440(7082):297–302.
- [25] Liu Y, Cheng J, Fan S, Ge H, Luo T, Tang L, et al. Modular reconfigurable DNA origami: from two-dimensional to three-dimensional structures. *Angew Chem Int Ed Engl* 2020;59(51):23277–82.
- [26] Baldock BL, Hutchison JE. UV-visible spectroscopy-based quantification of unlabeled DNA bound to gold nanoparticles. *Anal Chem* 2016;88(24):12072–80.
- [27] Jangir DK, Dey SK, Kundu S, Mehrotra R. Assessment of amacrine binding with DNA using UV-visible, circular dichroism and Raman spectroscopic techniques. *J Photochem Photobiol B* 2012;114:38–43.
- [28] Charak S, Shandilya M, Tyagi G, Mehrotra R. Spectroscopic and molecular docking studies on chlorambucil interaction with DNA. *Int J Biol Macromol* 2012;51(4):406–11.
- [29] Masiero S, Trotta R, Pieraccini S, De Tito S, Perone R, Randazzo A, et al. A non-empirical chromophoric interpretation of CD spectra of DNA G-quadruplex structures. *Org Biomol Chem* 2010;8(12):2683–92.
- [30] Rahman KM, James CH, Thurston DE. Observation of the reversibility of a covalent pyrrolobenzodiazepine (PBD) DNA adduct by HPLC/MS and CD spectroscopy. *Org Biomol Chem* 2011;9(5):1632–41.
- [31] Tucker BA, Gabriel S, Sheardy RD. A CD spectroscopic investigation of intermolecular and intramolecular DNA quadruplexes. In: *Frontiers in nucleic acids*. American Chemical Society; 2011. p. 51–67.
- [32] Strey HH, Parsegian VA, Podgornik R. Equation of state for DNA liquid crystals: fluctuation enhanced electrostatic double layer repulsion. *Phys Rev Lett* 1997;78(5):895–8.
- [33] Aihara H, Ito Y, Kurumizaka H, Yokoyama S, Shibata T. The N-terminal domain of the human Rad51 protein binds DNA: structure and a DNA binding surface as revealed by NMR. *J Mol Biol* 1999;290(2):495–504.
- [34] Takizawa Y, Tanaka H, Machida S, Koyama M, Maehara K, Ohkawa Y, et al. Cryo-EM structure of the nucleosome containing the *ALB1* enhancer DNA sequence. *Open Biol* 2018;8(3):170255.
- [35] Evans E, Ritchie K, Merkel R. Sensitive force technique to probe molecular adhesion and structural linkages at biological interfaces. *Biophys J* 1995;68(6):2580–7.
- [36] Kim S, Blainey PC, Schroeder CM, Xie XS. Multiplexed single-molecule assay for enzymatic activity on flow-stretched DNA. *Nat Methods* 2007;4(5):397–9.
- [37] 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.
- [38] Cluzel P, Lebrun A, Heller C, Lavery R, Viovy JL, Chatenay D, et al. DNA: an extensible molecule. *Science* 1996;271(5250):792–4.
- [39] Hodeib S, Raj S, Manosas M, Zhang W, Bagchi D, Ducos B, et al. Single molecule studies of helicases with magnetic tweezers. *Methods* 2016;105:3–15.
- [40] Ashkin A. Atomic-beam deflection by resonance-radiation pressure. *Phys Rev Lett* 1970;25(19):1321–4.
- [41] 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.
- [42] Neuman KC, Nagy A. Single-molecule force spectroscopy: optical tweezers, magnetic tweezers and atomic force microscopy. *Nat Methods* 2008;5(6):491–505.
- [43] Neuman KC, Chadd EH, Liou GF, Bergman K, Block SM. Characterization of photodamage to *Escherichia coli* in optical traps. *Biophys J* 1999;77(5):2856–63.
- [44] Sacconi L, Tolić-Nørrelykke IM, Stringari C, Antolini R, Pavone FS. Optical micromanipulations inside yeast cells. *Appl Opt* 2005;44(11):2001–7.
- [45] Cherney DP, Bridges TE, Harris JM. Optical trapping of unilamellar phospholipid vesicles: investigation of the effect of optical forces on the lipid membrane shape by confocal-Raman microscopy. *Anal Chem* 2004;76(17):4920–8.
- [46] Ishii Y, Yanagida T. Single molecule detection in life sciences. *Single Mol* 2000;1(1):5–16.
- [47] Stryer L, Haugland RP. Energy transfer: a spectroscopic ruler. *Proc Natl Acad Sci USA* 1967;58(2):719–26.
- [48] Ritort F. Single-molecule experiments in biological physics: methods and applications. *J Phys Condens Matter* 2006;18(32):R531–83.
- [49] Tsukanov R, Tomov TE, Masoud R, Drory H, Plavner N, Liber M, et al. Detailed study of DNA hairpin dynamics using single-molecule fluorescence

- assisted by DNA origami. *J Phys Chem B* 2013;117(40):11932–42.
- [50] Akeson M, Branton D, Kasianowicz JJ, Brandin E, Deamer DW. Microsecond time-scale discrimination among polycytidylic acid, polyadenylic acid, and polyuridylic acid as homopolymers or as segments within single RNA molecules. *Biophys J* 1999;77(6):3227–33.
- [51] Meller A, Nivon L, Brandin E, Golovchenko J, Branton D. Rapid nanopore discrimination between single polynucleotide molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97(3):1079–84.
- [52] Kawano R, Osaki T, Sasaki H, Takinoue M, Yoshizawa S, Takeuchi S. Rapid detection of a cocaine-binding aptamer using biological nanopores on a chip. *J Am Chem Soc* 2011;133(22):8474–7.
- [53] Butler TZ, Pavlenok M, Derrington IM, Niederweis M, Gundlach JH. Single-molecule DNA detection with an engineered MspA protein nanopore. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105(52):20647–52.
- [54] Storm AJ, Storm C, Chen J, Zandbergen H, Joanny JF, Dekker C. Fast DNA translocation through a solid-state nanopore. *Nano Lett* 2005;5(7):1193–7.
- [55] Bošković F, Zhu J, Chen K, Keyser UF. Monitoring G-quadruplex formation with DNA carriers and solid-state nanopores. *Nano Lett* 2019;19(11):7996–8001.
- [56] Mazidi H, Lu J, Nehorai A, Lew MD. Minimizing structural bias in single-molecule super-resolution microscopy. *Sci Rep* 2018;8(1):13133.
- [57] Izzeddin I, El Beheiry M, Andilla J, Ciepielewski D, Darzacq X, Dahan M. PSF shaping using adaptive optics for three-dimensional single-molecule super-resolution imaging and tracking. *Opt Express* 2012;20(5):4957–67.
- [58] Jungmann R, Steinhauer C, Scheible M, Kuzyk A, Tinnefeld P, Simmel FC. Single-molecule kinetics and super-resolution microscopy by fluorescence imaging of transient binding on DNA origami. *Nano Lett* 2010;10(11):4756–61.
- [59] Steinhauer C, Jungmann R, Sobey TL, Simmel FC, Tinnefeld P. DNA origami as a nanoscopic ruler for super-resolution microscopy. *Angew Chem Int Ed Engl* 2009;48(47):8870–3.
- [60] Blom H, Widengren J. Stimulated emission depletion microscopy. *Chem Rev* 2017;117(11):7377–427.
- [61] Funatsu T, Harada Y, Higuchi H, Tokunaga M, Saito K, Ishii Y, et al. Imaging and nano-manipulation of single biomolecules. *Biophys Chem* 1997;68(1–3):63–72.
- [62] Long X, Parks JW, Bagshaw CR, Stone MD. Mechanical unfolding of human telomere G-quadruplex DNA probed by integrated fluorescence and magnetic tweezers spectroscopy. *Nucleic Acids Res* 2013;41(4):2746–55.
- [63] Lee M, Kim SH, Hong SC. Minute negative superhelicity is sufficient to induce the B-Z transition in the presence of low tension. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107(11):4985–90.
- [64] Ngo TTM, Zhang Q, Zhou R, Yodh JG, Ha T. Asymmetric unwrapping of nucleosomes under tension directed by DNA local flexibility. *Cell* 2015;160(6):1135–44.
- [65] Mitra J, Makurath MA, Ngo TTM, Troitskaia A, Chemla YR, Ha T. Extreme mechanical diversity of human telomeric DNA revealed by fluorescence-force spectroscopy. *Biophys Comput Biol* 2019;116(17):8350–9.
- [66] Wasserman MR, Schauer GD, O’Donnell ME, Liu S. Replication fork activation is enabled by a single-stranded DNA gate in CMG helicase. *Cell* 2019;178(3):600–11.
- [67] Ye S, Chen Z, Zhang X, Li F, Guo L, Hou XM, et al. Proximal single-stranded RNA destabilizes human telomerase RNA G-quadruplex and induces its distinct conformers. *J Phys Chem Lett* 2021;12(13):3361–6.
- [68] Lee S, Hohng S. An optical trap combined with three-color FRET. *J Am Chem Soc* 2013;135(49):18260–3.
- [69] Kang J, Jung J, Kim SK. Flexibility of single-stranded DNA measured by single-molecule FRET. *Biophys Chem* 2014;195:49–52.
- [70] Mortusewicz O, Evers B, Helleday T. PC4 promotes genome stability and DNA repair through binding of ssDNA at DNA damage sites. *Oncogene* 2016;35(6):761–70.
- [71] Yusufzai T, Kong X, Yokomori K, Kadonaga JT. The annealing helicase HARP is recruited to DNA repair sites via an interaction with RPA. *Genes Dev* 2009;23(20):2400–4.
- [72] Ke C, Humeniuk M, S-Gracz H, Marszalek PE. Direct measurements of base stacking interactions in DNA by single-molecule atomic-force spectroscopy. *Phys Rev Lett* 2007;99(1):018302.
- [73] Tinland B, Pluen A, Sturm J, Weill G. Persistence length of single-stranded DNA. *Macromolecules* 1997;30(19):5763–5.
- [74] Chen H, Meisburger SP, Pabitt SA, Sutton JL, Webb WW, Pollack L. Ionic strength-dependent persistence lengths of single-stranded RNA and DNA. *Biophys Comput Biol* 2012;109(3):799–804.
- [75] Viader-Godoy X, Manosas M, Ritort F. Sugar-pucker force-induced transition in single-stranded DNA. *Int J Mol Sci* 2021;22(9):4745.
- [76] De Lorenzo S, Ribezzi-Crivellari M, Arias-Gonzalez JR, Smith SB, Ritort F. A temperature-jump optical trap for single-molecule manipulation. *Biophys J* 2015;108(12):2854–64.
- [77] Danilowicz C, Lee CH, Coljee VW, Prentiss M. Effects of temperature on the mechanical properties of single stranded DNA. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 2007;75(3 Pt 1):030902.
- [78] Watson JD, Crick FH. Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 1953;171(4356):737–8.
- [79] Klug A. Rosalind Franklin and the discovery of the structure of DNA. *Nature* 1968;219(5156):808–10.
- [80] Maier B, Bensimon D, Croquette V. Replication by a single DNA polymerase of a stretched single-stranded DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97(22):12002–7.
- [81] Dessinges MN, Maier B, Zhang Y, Peliti M, Bensimon D, Croquette V. Stretching single stranded DNA, a model polyelectrolyte. *Phys Rev Lett* 2002;89(24):248102.
- [82] Hugel T, Rief M, Seitz M, Gaub HE, Netz RR. Highly stretched single polymers: atomic-force-microscope experiments versus *ab-initio* theory. *Phys Rev Lett* 2005;94(4):048301.
- [83] Zhou Z. Stretching instability of a two-dimensional freely rotating chain. *Chin J Phys* 2018;56(6):2967–76.
- [84] Livadaru L, Netz RR, Kreuzer HJ. Stretching response of discrete semiflexible polymers. *Macromolecules* 2003;36(10):3732–44.
- [85] Dobrynin AV, Carrillo JM, Rubinstein M. Chains are more flexible under tension. *Macromolecules* 2010;43(21):9181–90.
- [86] Radiom M, Borkovec M. Influence of ligand-receptor interactions on force-extension behavior within the freely jointed chain model. *Phys Rev E* 2017;96(6):062501.
- [87] 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.
- [88] Kratky O, Porod G. X-ray investigation of chain molecules in solution. *Recl Trav Chim Pays Bas* 1949;68:1106–22.
- [89] Marko JF, Siggia ED. Stretching DNA. *Macromolecules* 1995;28(26):8759–70.
- [90] Wang MD, Yin H, Landick R, Gelles J, Block SM. Stretching DNA with optical tweezers. *Biophys J* 1997;72(3):1335–46.
- [91] 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.
- [92] Rief M, Clausen-Schaumann H, Gaub HE. Sequence-dependent mechanics of single DNA molecules. *Nat Struct Biol* 1999;6(4):346–9.
- [93] Essevaz-Roulet B, Bockelmann U, Heslot F. Mechanical separation of the complementary strands of DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94(22):11935–40.
- [94] Bockelmann U, Thomen P, Essevaz-Roulet B, Viasnoff V, Heslot F. Unzipping DNA with optical tweezers: high sequence sensitivity and force flips. *Biophys J* 2002;82(3):1537–53.
- [95] 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. *Biophys Comput Biol* 2006;103(16):6190–5.
- [96] Johnson CA, Bloomingdale RJ, Ponnusamy VE, Tillinghast CA, Znosko BM, Lewis M. Computational model for predicting experimental RNA and DNA nearest-neighbor free energy rankings. *J Phys Chem B* 2011;115(29):9244–51.
- [97] Mak CH. Unraveling base stacking driving forces in DNA. *J Phys Chem B* 2016;120(26):6010–20.
- [98] Sattin BD, Pelling AE, Goh MC. DNA base pair resolution by single molecule force spectroscopy. *Nucleic Acids Res* 2004;32(16):4876–83.
- [99] Kilchherr F, Wachauf C, Pelz B, Rief M, Zacharias M, Dietz H. Single-molecule dissection of stacking forces in DNA. *Science* 2016;353(6304):aaf5508.
- [100] Luo Z, Xiao H, Peng X, Li Y, Zhu Z, Tian Y, et al. Long-range ordered water correlations between A-T/C-G nucleotides. *Matter* 2020;3(3):794–804.
- [101] Clegg RM, Murchie AI, Lilley DM. The solution structure of the four-way DNA junction at low-salt conditions: a fluorescence resonance energy transfer analysis. *Biophys J* 1994;66(1):99–109.
- [102] Duckett DR, Murchie AI, Lilley DM. The role of metal ions in the conformation of the four-way DNA junction. *EMBO J* 1990;9(2):583–90.
- [103] Hyeon C, Lee J, Yoon J, Hohng S, Thirumalai D. Hidden complexity in the isomerization dynamics of Holliday junctions. *Nat Chem* 2012;4(11):907–14.
- [104] McKinney SA, Déclais AC, Lilley DM, Ha T. Structural dynamics of individual Holliday junctions. *Nat Struct Biol* 2003;10(2):93–7.

- [105] Lushnikov AY, Bogdanov A, Lyubchenko YL. DNA recombination: Holliday junctions dynamics and branch migration. *J Biol Chem* 2003;278(44):43130–4.
- [106] Karymov M, Lyubchenko YL, Daniel D, Sankey OF. Holliday junction dynamics and branch migration: single-molecule analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102(23):8186–91.
- [107] Hohng S, Zhou R, Nahas MK, Yu J, Schulten K, Lilley DMJ, et al. Fluorescence-force spectroscopy maps two-dimensional reaction landscape of the Holliday junction. *Science* 2007;318(5848):279–83.
- [108] Nickels PC, Wünsch B, Holzmeister P, Bae W, Kneer LM, Grohmann D, et al. Molecular force spectroscopy with a DNA origami-based nanoscopic force clamp. *Science* 2016;354(6310):305–7.
- [109] You H, Zhou Y, Yan J. Using magnetic tweezers to unravel the mechanism of the G-quadruplex binding and unwinding activities of DHX36 helicase. *Methods Mol Biol* 2021;2209:175–91.
- [110] Gellert M, Lipsett MN, Davies DR. Helix formation by guanylic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 1962;48(12):2013–8.
- [111] Parkinson GN, Lee MP, Neidle S. Crystal structure of parallel quadruplexes from human telomeric DNA. *Nature* 2002;417(6891):876–80.
- [112] Phan AT. Human telomeric G-quadruplex: structures of DNA and RNA sequences. *FEBS J* 2010;277(5):1107–17.
- [113] Cheng Y, Zhang Y, Gong Z, Zhang X, Li Y, Shi X, et al. High mechanical stability and slow unfolding rates are prevalent in parallel-stranded DNA G-quadruplexes. *J Phys Chem Lett* 2020;11(19):7966–71.
- [114] Dai J, Carver M, Yang D. Polymorphism of human telomeric quadruplex structures. *Biochimie* 2008;90(8):1172–83.
- [115] Ying L, Ying L, Green JJ, Li H, Klenerman D, Balasubramanian S, et al. Studies on the structure and dynamics of the human telomeric G quadruplex by single-molecule fluorescence resonance energy transfer. *Chemistry* 2003;100(25):14629–34.
- [116] Lee JY, Okumus B, Kim DS, Ha T. Extreme conformational diversity in human telomeric DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102(52):18938–43.
- [117] Shirude PS, Balasubramanian S. Single molecule conformational analysis of DNA G-quadruplexes. *Biochimie* 2008;90(8):1197–206.
- [118] Long X, Stone MD. Kinetic partitioning modulates human telomere DNA G-quadruplex structural polymorphism. *PLoS One* 2013;8(12):e83420.
- [119] Noer SL, Preus S, Gudnason D, Aznauryan M, Mergny JL, Birkedal V. Folding dynamics and conformational heterogeneity of human telomeric G-quadruplex structures in Na⁺ solutions by single molecule FRET microscopy. *Nucleic Acids Res* 2016;44(1):464–71.
- [120] Wang S, Liang L, Tang J, Cai Y, Zhao C, Fang S, et al. Label-free single-molecule identification of telomere G-quadruplexes with a solid-state nanopore sensor. *RSC Adv* 2020;10(45):27215–24.
- [121] Shim J, Gu LQ. Single-molecule investigation of G-quadruplex using a nanopore sensor. *Methods* 2012;57(1):40–6.
- [122] You H, Zeng X, Xu Y, Lim CJ, Efremov AK, Phan AT, et al. Dynamics and stability of polymorphic human telomeric G-quadruplex under tension. *Nucleic Acids Res* 2014;42(13):8789–95.
- [123] You H, Wu J, Shao F, Yan J. Stability and kinetics of c-MYC promoter G-quadruplexes studied by single-molecule manipulation. *J Am Chem Soc* 2015;137(7):2424–7.
- [124] Yu Z, Koirala D, Cui Y, Easterling LF, Zhao Y, Mao H. Click chemistry assisted single-molecule fingerprinting reveals a 3D biomolecular folding funnel. *J Am Chem Soc* 2012;134(30):12338–41.
- [125] Cheng Y, Tang Q, Li Y, Zhang Y, Zhao C, Yan J, et al. Folding/unfolding kinetics of G-quadruplexes upstream of the P1 promoter of the human *BCL-2* oncogene. *J Biol Chem* 2019;294(15):5890–5.
- [126] Zhang Y, Cheng Y, Chen J, Zheng K, You H. Mechanical diversity and folding intermediates of parallel-stranded G-quadruplexes with a bulge. *Nucleic Acids Res* 2021;49(12):7179–88.
- [127] Williams DE, Eisenman J, Baird A, Rauch C, Van Ness K, March CJ, et al. Identification of a ligand for the *c-kit* proto-oncogene. *Cell* 1990;63(1):167–74.
- [128] Ceschi S, Sissi C. *KIT* promoter: structure, function and targeting. In: Neidle S, editor. Annual reports in medicinal chemistry. New York City: Academic Press; 2020. p. 409–39.
- [129] Da Ros S, Nicoletto G, Rigo R, Ceschi S, Zorzan E, Dacasto M, et al. G-quadruplex modulation of SP1 functional binding sites at the *KIT* proximal promoter. *Int J Mol Sci* 2020;22(1):E329.
- [130] Buglione E, Salerno D, Marrano CA, Cassina V, Vesco G, Nardo L, et al. Nanomechanics of G-quadruplexes within the promoter of the *KIT* oncogene. *Nucleic Acids Res* 2021;49(8):4564–73.
- [131] King JJ, Irving KL, Evans CW, Chikhale RV, Becker R, Morris CJ, et al. DNA Quadruplex and i-motif structure formation is interdependent in human cells. *J Am Chem Soc* 2020;142(49):20600–4.
- [132] Mir B, Serrano I, Buitrago D, Orozco M, Escaja N, González C. Prevalent sequences in the human genome can form mini i-motif structures at physiological pH. *J Am Chem Soc* 2017;139(40):13985–8.
- [133] Wright EP, Huppert JL, Waller ZAE. Identification of multiple genomic DNA sequences which form i-motif structures at neutral pH. *Nucleic Acids Res* 2017;45(6):2951–9.
- [134] Wang F, Liu X, Willner I. DNA switches: from principles to applications. *Angew Chem Int Ed Engl* 2015;54(4):1098–129.
- [135] Zeraati M, Langley DB, Schofield P, Moye AL, Rouet R, Hughes WE, et al. I-motif DNA structures are formed in the nuclei of human cells. *Nat Chem* 2018;10(6):631–7.
- [136] Niu K, Zhang X, Deng H, Wu F, Ren Y, Xiang H, et al. BmILF and i-motif structure are involved in transcriptional regulation of BmPOUM2 in *Bombyx mori*. *Nucleic Acids Res* 2018;46(4):1710–23.
- [137] Abou Assi H, Garavis M, González C, Damha MJ. i-motif DNA: structural features and significance to cell biology. *Nucleic Acids Res* 2018;46(16):8038–56.
- [138] Dhakal S, Schonhoft JD, Koirala D, Yu Z, Basu S, Mao H. Coexistence of an ILPR i-motif and a partially folded structure with comparable mechanical stability revealed at the single-molecule level. *J Am Chem Soc* 2010;132(26):8991–7.
- [139] Megalathan A, Cox BD, Wilkerson PD, Kaur A, Sapkota K, Reiner JE, et al. Single-molecule analysis of i-motif within self-assembled DNA duplexes and nanocircles. *Nucleic Acids Res* 2019;47(14):7199–212.
- [140] Megalathan A, Wijesinghe KM, Ranson L, Dhakal S. Single-molecule analysis of nanocircle-embedded i-motifs under crowding. *J Phys Chem B* 2021;125(9):2193–201.
- [141] Paul S, Hossain SS, Samanta A. Insights into the folding pathway of a *c-MYC*-promoter-based i-motif DNA in crowded environments at the single-molecule level. *J Phys Chem B* 2020;124(5):763–70.
- [142] Ding Y, Fleming AM, He L, Burrows CJ. Unfolding kinetics of the human telomere i-motif under a 10 pN force imposed by the α -hemolysin nanopore identify transient folded-state lifetimes at physiological pH. *J Am Chem Soc* 2015;137(28):9053–60.
- [143] Xi D, Cui M, Zhou X, Zhuge X, Ge Y, Wang Y, et al. Nanopore-based single-molecule investigation of DNA sequences with potential to form i-motif structures. *ACS Sens* 2021;6(7):2691–9.
- [144] Jonchhe S, Shrestha P, Ascencio K, Mao H. A new concentration jump strategy reveals the lifetime of i-motif at physiological pH without force. *Anal Chem* 2018;90(5):3205–10.
- [145] Doronina SO, Behr JP. Towards a general triple helix mediated DNA recognition scheme. *Chem Soc Rev* 1997;26(1):63–71.
- [146] Ling L, Butt HJ, Berger R. Rupture force between the third strand and the double strand within a triplex DNA. *J Am Chem Soc* 2004;126(43):13992–7.
- [147] Lee IB, Lee JY, Lee NK, Hong SC. Direct observation of the formation of DNA triplexes by single-molecule FRET measurements. *Curr Appl Phys* 2012;12(4):1027–32.
- [148] Li N, Wang J, Ma K, Liang L, Mi L, Huang W, et al. The dynamics of forming a triplex in an artificial telomere inferred by DNA mechanics. *Nucleic Acids Res* 2019;47(15):e86.
- [149] Fuller FB. Decomposition of the linking number of a closed ribbon: a problem from molecular biology. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978;75(8):3557–61.
- [150] Forth S, Deufel C, Sheinin MY, Daniels B, Sethna JP, Wang MD. Abrupt buckling transition observed during the plectoneme formation of individual DNA molecules. *Phys Rev Lett* 2008;100(14):148301.
- [151] Postow L, Crisona NJ, Peter BJ, Hardy CD, Cozzarelli NR. Topological challenges to DNA replication: conformations at the fork. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(15):8219–26.
- [152] Liu LF, Wang JC. Supercoiling of the DNA template during transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84(20):7024–7.
- [153] Wu HY, Shyy SH, Wang JC, Liu LF. Transcription generates positively and negatively supercoiled domains in the template. *Cell* 1988;53(3):433–40.
- [154] Strick TR, Allemand JF, Bensimon D, Croquette V. Behavior of supercoiled DNA. *Biophys J* 1998;74(4):2016–28.
- [155] Strick TR, Allemand JF, Bensimon D, Bensimon A, Croquette V. The elasticity of a single supercoiled DNA molecule. *Science* 1996;271(5257):1835–7.
- [156] Vlijm R, Torre VD, Dekker JC. Counterintuitive DNA sequence dependence in supercoiling-induced DNA melting. *PLoS One* 2015;10(10):e0141576.
- [157] Kim SH, Jung HJ, Lee IB, Lee NK, Hong SC. Sequence-dependent cost for Z-form shapes the torsion-driven B-Z transition via close interplay of Z-DNA and DNA bubble. *Nucleic Acids Res* 2021;49(7):3651–60.

- [158] Sheinin MY, Forth S, Marko JF, Wang MD. Underwound DNA under tension: structure, elasticity, and sequence-dependent behaviors. *Phys Rev Lett* 2011; 107(10):108102.
- [159] Deufel C, Forth S, Simmons CR, Dejjosha S, Wang MD. Nanofabricated quartz cylinders for angular trapping: DNA supercoiling torque detection. *Nat Methods* 2007;4(3):223–5.
- [160] Le TT, Gao X, Park SH, Lee J, Inman JT, Lee JH, et al. Synergistic coordination of chromatin torsional mechanics and topoisomerase activity. *Cell* 2019;179(3):619–31.
- [161] Kornberg RD. Structure of chromatin. *Annu Rev Biochem* 1977;46(1):931–54.
- [162] Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 1997; 389(6648):251–60.
- [163] Fu H, Freedman BS, Lim CT, Heald R, Yan J. Atomic force microscope imaging of chromatin assembled in *Xenopus laevis* egg extract. *Chromosoma* 2011;120(3):245–54.
- [164] Kotova S, Li M, Dimitriadis EK, Craigie R. Nucleoprotein intermediates in HIV-1 DNA integration visualized by atomic force microscopy. *J Mol Biol* 2010;399(3):491–500.
- [165] Montel F, Castelnovo M, Menoni H, Angelov D, Dimitrov S, Faivre-Moskalenko C. RSC remodeling of oligo-nucleosomes: an atomic force microscopy study. *Nucleic Acids Res* 2011;39(7):2571–9.
- [166] Kilic S, Felekyan S, Doroshenko O, Boichenko I, Dimura M, Vardanyan H, et al. Single-molecule FRET reveals multiscale chromatin dynamics modulated by HP1a. *Nat Commun* 2018;9(1):235.
- [167] Claudet C, Angelov D, Bouvet P, Dimitrov S, Bednar J. Histone octamer instability under single molecule experiment conditions. *J Biol Chem* 2005; 280(20):19958–65.
- [168] Kruithof M, Chien FT, Routh A, Logie C, Rhodes D, van Noort J. Single-molecule force spectroscopy reveals a highly compliant helical folding for the 30-nm chromatin fiber. *Nat Struct Mol Biol* 2009;16(5):534–40.
- [169] Brower-Toland BD, Smith CL, Yeh RC, Lis JT, Peterson CL, Wang MD. Mechanical disruption of individual nucleosomes reveals a reversible multistage release of DNA. *Biophys Comput Biol* 2002;99(4):1960–5.
- [170] Leuba SH, Karymov MA, Tomschik M, Ramjit R, Smith P, Zlatanova J. Assembly of single chromatin fibers depends on the tension in the DNA molecule: magnetic tweezers study. *Biophys Comput Biol* 2003;100(2):495–500.
- [171] Gupta P, Zlatanova J, Tomschik M. Nucleosome assembly depends on the torsion in the DNA molecule: a magnetic tweezers study. *Biophys J* 2009; 97(12):3150–7.
- [172] Xiao X, Liu C, Pei Y, Wang YZ, Kong J, Lu K, et al. Histone H2A ubiquitination reinforces mechanical stability and asymmetry at the single-nucleosome level. *J Am Chem Soc* 2020;142(7):3340–5.
- [173] Belotserkovskaya R, Oh S, Bondarenko VA, Orphanides G, Studitsky VM, Reinberg D. FACT facilitates transcription-dependent nucleosome alteration. *Science* 2003;301(5636):1090–3.
- [174] Mason PB, Struhl K. FACT complex travels with elongating RNA polymerase II and is important for the fidelity of transcriptional initiation *in vivo*. *Science* 2003;23(22):8323–33.
- [175] Chen P, Dong L, Hu M, Wang YZ, Xiao X, Zhao Z, et al. Functions of FACT in breaking the nucleosome and maintaining its integrity at the single-nucleosome level. *Mol Cell* 2018;71(2):284–93.
- [176] Wang YZ, Liu C, Zhao J, Yu J, Luo A, Xiao X, et al. H2A mono-ubiquitination differentiates FACT's functions in nucleosome assembly and disassembly. *Nucleic Acids Res* 2022;50(2):833–46.
- [177] Yu L, Cheng J, Wang D, Pan V, Chang S, Song J, et al. Stress in DNA gridiron facilitates the formation of two-dimensional crystalline structures. *J Am Chem Soc* 2022;144(22):9747–52.
- [178] Fan S, Ji B, Liu Y, Zou K, Tian Z, Dai B, et al. Spatiotemporal control of molecular cascade reactions by a reconfigurable DNA origami domino array. *Angew Chem Int Ed Engl* 2022;61(9):e202116324.
- [179] Fan S, Wang D, Cheng J, Liu Y, Luo T, Cui D, et al. Information coding in a reconfigurable DNA origami domino array. *Angew Chem Int Ed Engl* 2020; 59(31):12991–7.
- [180] Fan S, Cheng J, Liu Y, Wang D, Luo T, Dai B, et al. Proximity-induced pattern operations in reconfigurable DNA origami domino array. *J Am Chem Soc* 2020; 142(34):14566–73.
- [181] Platnich CM, Rizzuto FJ, Cosa G, Sleiman HF. Single-molecule methods in structural DNA nanotechnology. *Chem Soc Rev* 2020;49(13):4220–33.
- [182] Ji J, Karna D, Mao H. DNA origami nano-mechanics. *Chem Soc Rev* 2021; 50(21):11966–78.
- [183] Seeman NC, Sleiman HF. DNA nanotechnology. *Nat Rev Mater* 2017; 3(1): 17068.
- [184] Chen JH, Seeman NC. Synthesis from DNA of a molecule with the connectivity of a cube. *Nature* 1991;350(6319):631–3.
- [185] Oliveira CL, Juul S, Jørgensen HL, Knudsen B, Tordrup D, Oteri F, et al. Structure of nanoscale truncated octahedral DNA cages: variation of single-stranded linker regions and influence on assembly yields. *ACS Nano* 2010;4(3): 1367–76.
- [186] He Y, Su M, Fang PA, Zhang C, Ribbe AE, Jiang W, et al. On the chirality of self-assembled DNA octahedra. *Angew Chem Int Ed Engl* 2010;49(4):748–51.
- [187] Andersen FF, Knudsen B, Oliveira CL, Fröhlich RF, Krüger D, Bungert J, et al. Assembly and structural analysis of a covalently closed nano-scale DNA cage. *Nucleic Acids Res* 2008;36(4):1113–9.
- [188] Shrestha P, Jonchhe S, Emura T, Hidaka K, Endo M, Sugiyama H, et al. Confined space facilitates G-quadruplex formation. *Nat Nanotechnol* 2017; 12(6): 582–8.
- [189] Jonchhe S, Pandey S, Karna D, Pokhrel P, Cui Y, Mishra S, et al. Duplex DNA is weakened in nanoconfinement. *J Am Chem Soc* 2020;142(22):10042–9.
- [190] Jonchhe S, Pandey S, Emura T, Hidaka K, Hossain MA, Shrestha P, et al. Decreased water activity in nanoconfinement contributes to the folding of G-quadruplex and i-motif structures. *Proc Natl Acad Sci USA* 2018;115(38):9539–44.
- [191] Rajendran A, Endo M, Hidaka K, Tran PL, Mergny JL, Sugiyama H. Controlling the stoichiometry and strand polarity of a tetramolecular G-quadruplex structure by using a DNA origami frame. *Nucleic Acids Res* 2013; 41(18):8738–47.
- [192] Sannohe Y, Endo M, Katsuda Y, Hidaka K, Sugiyama H. Visualization of dynamic conformational switching of the G-quadruplex in a DNA nanostructure. *J Am Chem Soc* 2010;132(46):16311–3.
- [193] Endo M. AFM-based single-molecule observation of the conformational changes of DNA structures. *Methods* 2019;169:3–10.
- [194] Rajendran A, Endo M, Hidaka K, Sugiyama H. Direct and single-molecule visualization of the solution-state structures of G-hairpin and G-triplex intermediates. *Angew Chem Int Ed Engl* 2014;53(16):4107–12.
- [195] Feng Y, Hashiya F, Hidaka K, Sugiyama H, Endo M. Direct observation of dynamic interactions between orientation-controlled nucleosomes in a DNA origami frame. *Chemistry* 2020;26(66):15282–9.
- [196] Rajendran A, Endo M, Hidaka K, Sugiyama H. Direct and real-time observation of rotary movement of a DNA nanomechanical device. *J Am Chem Soc* 2013;135(3):1117–23.
- [197] Endo M, Yang Y, Suzuki Y, Hidaka K, Sugiyama H. Single-molecule visualization of the hybridization and dissociation of photoresponsive oligonucleotides and their reversible switching behavior in a DNA nanostructure. *Angew Chem Int Ed Engl* 2012;51(42):10518–22.
- [198] Shrestha P, Emura T, Koirala D, Cui Y, Hidaka K, Maximuck WJ, et al. Mechanical properties of DNA origami nanoassemblies are determined by Holliday junction mechanophores. *Nucleic Acids Res* 2016;44(14):6574–82.
- [199] Bae W, Kim K, Min D, Ryu JK, Hyeon C, Yoon TY. Programmed folding of DNA origami structures through single-molecule force control. *Nat Commun* 2014;5(1):5654.
- [200] Saccà B, Ishitsuka Y, Meyer R, Sprengel A, Schöneweiß EC, Nienhaus GU, et al. Reversible reconfiguration of DNA origami nanochambers monitored by single-molecule FRET. *Angew Chem Int Ed Engl* 2015;54(12):3592–7.
- [201] Goodman RP, Heilemann M, Doose S, Erben CM, Kapanidis AN, Turberfield AJ. Reconfigurable, braced, three-dimensional DNA nanostructures. *Nat Nanotechnol* 2008;3(2):93–6.
- [202] Andersen ES, Dong M, Nielsen MM, Jahn K, Subramani R, Mamdough W, et al. Self-assembly of a nanoscale DNA box with a controllable lid. *Nature* 2009; 459(7243):73–6.
- [203] Jepsen MDE, Sørensen RS, Maffeo C, Aksimentiev A, Kjems J, Birkedal V. Single molecule analysis of structural fluctuations in DNA nanostructures. *Nanoscale* 2019;11(39):18475–82.
- [204] Smith MJ, Marshall CB, Theillet FX, Binolfi A, Selenko P, Ikura M. Real-time NMR monitoring of biological activities in complex physiological environments. *Curr Opin Struct Biol* 2015;32:39–47.
- [205] Luo T, Fan S, Liu Y, Song J. Information processing based on DNA toehold-mediated strand displacement (TMSD) reaction. *Nanoscale* 2021;13(4):2100–12.
- [206] Zhang Y, Hu J, Yang XY, Zhang CY. Combination of bidirectional strand displacement amplification with single-molecule detection for multiplexed DNA glycosylases assay. *Talanta* 2021;235:122805.
- [207] Scheible MB, Pardatscher G, Kuzyk A, Simmel FC. Single molecule characterization of DNA binding and strand displacement reactions on lithographic DNA origami microarrays. *Nano Lett* 2014;14(3):1627–33.
- [208] Chao J, Wang J, Wang F, Ouyang X, Kopperger E, Liu H, et al. Solving mazes

- with single-molecule DNA navigators. *Nat Mater* 2019;18(3):273–9.
- [209] Pei Y, Bian T, Liu Y, Liu Y, Xie Y, Song J. Single-molecule resettable DNA computing via magnetic tweezers. *Nano Lett* 2022;22(7):3003–10.
- [210] Koirala D, Shrestha P, Emura T, Hidaka K, Mandal S, Endo M, et al. Single-molecule mechanochemical sensing using DNA origami nanostructures. *Angew Chem Int Ed Engl* 2014;53(31):8137–41.
- [211] Mandal S, Zhang X, Pandey S, Mao H. Single-molecule topochemical analyses for large-scale multiplexing tasks. *Anal Chem* 2019;91(21):13485–93.
- [212] Baylin SB. DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 2005;2(1 Suppl 1):S4–11.
- [213] Marnett LJ, Plasteras JP. Endogenous DNA damage and mutation. *Trends Genet* 2001;17(4):214–21.
- [214] Yang YJ, Dong HL, Qiang XW, Fu H, Zhou EC, Zhang C, et al. Cytosine methylation enhances DNA condensation revealed by equilibrium measurements using magnetic tweezers. *J Am Chem Soc* 2020;142(20):9203–9.
- [215] McCauley MJ, Furman L, Dietrich CA, Rouzina I, Núñez ME, Williams MC. Quantifying the stability of oxidatively damaged DNA by single-molecule DNA stretching. *Nucleic Acids Res* 2018;46(8):4033–43.
- [216] Ferreira-Bravo IA, DeStefano JJ. Xeno-nucleic acid (XNA) 2'-fluoro-arabino nucleic acid (FANA) aptamers to the receptor binding domain of SARS-CoV-2 S protein block ACE2 binding. *Viruses* 2021;13(10):1983.
- [217] Li X, Li Z, Yu H. Selection of threose nucleic acid aptamers to block PD-1/PDL1 interaction for cancer immunotherapy. *Chem Commun* 2020; 56(93): 14653–6.
- [218] Elayadi AN, Corey DR. Application of PNA and LNA oligomers to chemotherapy. *Curr Opin Investig Drugs* 2001;2(4):558–61.
- [219] Morihiro K, Kasahara Y, Obika S. Biological applications of xeno nucleic acids. *Mol Biosyst* 2017;13(2):235–45.
- [220] Assi HA, Harkness 5th RW, Martin-Pintado N, Wilds CJ, Campos-Olivas R, Mittermaier AK, et al. Stabilization of i-motif structures by 2'- β -fluorination of DNA. *Nucleic Acids Res* 2016;44(11):4998–5009.
- [221] Martin-Pintado N, Yahyae-Anzahae M, Deleavey GF, Portella G, Orozco M, Damha MJ, et al. Dramatic effect of furanose C20 substitution on structure and stability: directing the folding of the human telomeric quadruplex with a single fluorine atom. *J Am Chem Soc* 2013;135(14):5344–7.
- [222] Chaput JC. Redesigning the genetic polymers of life. *Acc Chem Res* 2021; 54(4):1056–65.
- [223] Nikoomezar A, Dunn MR, Chaput JC. Evaluating the rate and substrate specificity of laboratory evolved XNA polymerases. *Anal Chem* 2017;89(23):12622–5.
- [224] Yang Y, Xiang J, Sun H, Chen H, Zhang H, Tang Y. New insights into the effect of molecular crowding environment induced by dimethyl sulfoxide on the conformation and stability of G-quadruplex. *Chin Chem Lett* 2023;34(3):107695.
- [225] Syrchina MS, Shakhov AM, Aybush AV, Nadtochenko VA. Optical trapping of nucleolus reveals viscoelastic properties of nucleoplasm inside mouse germinal vesicle oocytes. 2020. bioRxiv: 2020.03.19.999342.
- [226] Keizer VIP, Grosse-Holz S, Woringer M, Zambon L, Aizel K, Bongaerts M, et al. Live-cell micromanipulation of a genomic locus reveals interphase chromatin mechanics. *Biophysics* 2022;377(6605):489–95.