

弹性蛋白力学特性的单分子力谱

周浩天 高翔 郑鹏 秦猛 曹毅 王炜

Mechanical properties of elastomeric proteins studied by single molecule force spectroscopy

Zhou Hao-Tian Gao Xiang Zheng Peng Qin Meng Cao Yi Wang Wei

引用信息 Citation: *Acta Physica Sinica*, 65, 188703 (2016) DOI: 10.7498/aps.65.188703

在线阅读 View online: <http://dx.doi.org/10.7498/aps.65.188703>

当期内容 View table of contents: <http://wulixb.iphy.ac.cn/CN/Y2016/V65/I18>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

心率变异性分析在新生儿疼痛检测中的应用

[Application of heart rate variability analysis to pain detection for newborns](#)

物理学报.2014, 63(20): 208704 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.63.208704>

全内反射瞬逝场照明高精度磁镊及其在 DNA 解旋酶研究中的应用

[A pair of high resolution magnetic tweezers with illumination of total reflection evanescent field and its application in the study of DNA helicases](#)

物理学报.2013, 62(16): 168703 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.62.168703>

心磁信号广义 S 变换域奇异值分解滤波方法

[A method for magnetocardiograms filtering based on singular value decomposition and S-transform](#)

物理学报.2013, 62(14): 148702 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.62.148702>

原子力显微镜观测生物大分子图像的一种处理方法

[A new method to deal with biomacromolecular image observed by atomic force microscopy](#)

物理学报.2011, 60(9): 098703 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.60.098703>

专题: 软物质研究进展

弹性蛋白力学特性的单分子力谱*

周浩天¹⁾ 高翔¹⁾ 郑鹏²⁾ 秦猛^{1)†} 曹毅^{1)‡} 王炜¹⁾

1)(南京大学物理学院, 南京 210093)

2)(南京大学化学化工学院, 南京 210023)

(2016年5月30日收到; 2016年8月18日收到修改稿)

弹性蛋白是一类有着特殊力学特性的蛋白. 在生物体内它们是承受和传递力的主要媒介; 在生物体外, 它们更是被广泛地用作高强度的生物材料. 根据其功能不同, 弹性蛋白的力学特性也各异. 有些具有比较高的力学强度, 有些则具有较大的延展性和弹性. 科学家们很早就采用多种手段来人工合成弹性蛋白用于材料和纳米领域, 但对于弹性蛋白的力学特性和序列结构之间的关系还不甚明晰. 本综述介绍通过单分子力谱的实验方法来直接表征单根蛋白质在受力下结构的变化, 研究其力学特性. 基于 Bell 模型, 推导出了蛋白质解折所需力与拉伸速率之间的关系, 揭示了蛋白质力学强度的动力学特性, 当拉伸速率较低时, 解折叠力将正比于拉伸速率, 对于较大的拉伸速率, 解折叠力与拉伸速率成指数关系; 探讨了决定蛋白质力学特性的结构因素和调控蛋白质力学特性的实验方法; 介绍了单分子力谱测量的实验方法, 包括基于光镊、磁镊和原子力显微镜的单分子力谱技术, 着重介绍了原子力显微镜单分子力谱, 并特别介绍了多聚蛋白技术来提供单分子测量的“指纹谱”和提高测量效率; 论述了基于原子力显微镜单分子力谱研究蛋白质力学特性的最新进展, 包括提高原子力显微镜的稳定性和力分辨率的方法, 与荧光标记法相结合来提高实验效率的技术和高速扫描原子力显微镜; 阐述了如何通过单分子力谱实验来理性设计蛋白质材料的力学特性, 并对未来的研究热点做了展望.

关键词: 单分子力谱, 原子力显微镜, 多聚蛋白, 蛋白质材料**PACS:** 87.64.Dz, 87.80.-y, 87.80.Nj, 87.85.jf**DOI:** 10.7498/aps.65.188703

1 蛋白质力学的重要性

作为生命体的重要组成物质, 蛋白质在生命活动中发挥着巨大作用; 作为一种生物纳米机器, 具有特异力学性质的蛋白质广泛地参与到各种细胞过程中^[1-3]. 例如蛋白和DNA的穿膜过程、依靠分子伴侣的蛋白降解过程、分子骨架蛋白的力学抗性、力学信号到电化学信号的转换和细胞间的

黏附等(图1). 在孤立体系中的蛋白或者是在多个蛋白复合物中的一个蛋白为了发挥特定的功能, 往往是通过结构的变化调整其分子内和分子间的相互作用力. 蛋白的稳定结构通常是由区域性的弱相互作用支持的, 包括静电力、范德华作用力、氢键和疏水作用. 而这些力也对稳定蛋白复合物间的分子间作用力具有重要作用. 因而, 对蛋白的力学性质进行研究是当今生物物理学的一个重要分支.

* 江苏省六大人才高峰支持计划和国家自然科学基金(批准号: 21522402, 11374148, 11334004, 81121062)资助的课题.

† 通信作者. E-mail: qinmeng@nju.edu.cn

‡ 通信作者. E-mail: caoyi@nju.edu.cn

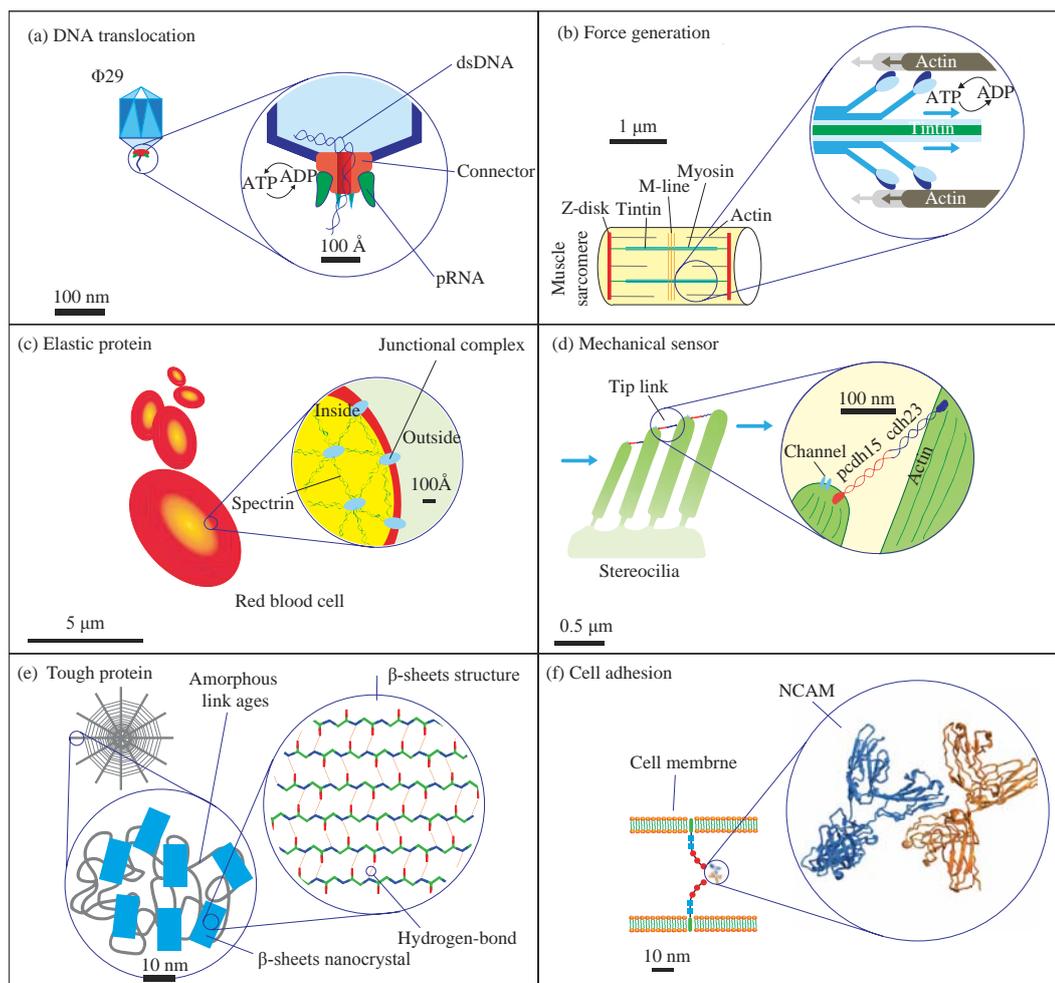


图1 承受机械力的典型蛋白质 (a) DNA在 $\Phi 29$ 噬菌体衣壳中的打包过程,其中存在着自然界中已知的最强健的分子马达之一; (b)肌小节中,通过ATP转化使肌球蛋白纤维与肌动蛋白纤维间发生相对运动,致使肌小节收缩从而使肌肉产生力; (c)蛋白质使细胞对外界的机械力产生抗性,具有功能性作用,比如,红细胞中的 α -螺旋血影蛋白以及其他一些蛋白在维持红细胞特定的流体力学外形及其弹性有重要作用; (d)蛋白质可将外界机械力信号转变为电信号,如在哺乳动物耳内的硬纤毛的顶部有丝状蛋白相连,该丝状蛋白由cadherin 22和protocadherin 15组成,一端连接硬纤毛膜上的离子通道,当硬纤毛受声波震动而歪斜时,离子通道便会打开或关闭,当偏转程度较剧烈时,由于内外静电势的明显变化会使细胞去极化并激发听觉神经; (e)蜘蛛丝的结构示意图,蜘蛛的dragline silk具有极佳的力学特性,其抗张强度可达凯夫拉的一半,其韧性(toughness)超过钢铁和凯夫拉,其韧性源自其结构,蛛丝中,由 β 片层结构组成的晶体连接于非晶的丝状结构中; (f)神经元黏附分子(NCAM)作为一种胶黏蛋白促进神经细胞的黏附并调控轴突的生长,对人类的记忆过程起着重要作用;此外,NCAM以及其他某些胶黏蛋白可作为肿瘤的抑制因子

Fig. 1. Proteins functioning as biological machines: (a) In the bacteriophage $\Phi 29$, DNA translocation is accomplished by one of the strongest biological motors ever known; (b) powered by the hydrolysis of ATP, the actin filaments are pulled inwards by a conformational change, which shortens the muscle sarcomere, with this motion, the muscle contracts and generate force; (c) proteins are of functional importance because they can resist mechanical force, for example, the spectrin, an α -helical protein, gives red cells their characterized flow-optimised shape and their elastic properties; (d) proteins can convert mechanical signals into electrochemical signals, the sensory cells in the inner ear of mammals are equipped with bundles of large membrane-covered cell protrusions, so called stereocilia; they can be pivoted by sound wave; in the tips of the cilia, there are protein tethers made of cadherin 22 and protocadherin 15, which are anchored in the membrane to an ion channel; when stereocilia deflects, it pulls these tethers and leads to the opening and closing of the ion channels; such a process changes the ion flux across the membrane; therefore, a deflection strong enough will eventually depolarize the cell and activate auditory nerve; (e) the dragline silk of spiders has excellent mechanical properties, its tensile strength can reach a half of that of Kevlar; its toughness outperforms both steel and Kevlar; such an exceptional feature roots in its structure; inside a typical fiber, crystalline regions are connected by amorphous linkages; the crystals are β -sheets that have assembled together; (f) neural cell adhesion molecule (NCAM) enhances the adhesion of neural cells and mediates the outgrowth of neurite, it plays an important role in memory consolidation; in addition, NCAM and other cell adhesion molecules function as tumor suppressors.

为了研究蛋白的力学性质,自然就想到对其施加外力并观察其响应,某些情况下,蛋白中的氢键等分子间相互作用会因外力断裂,导致其解折叠.

蛋白的天然构型体现了其最小的自由能. 蛋白质分子具有较弱的稳定性,通常解折叠需要的自由能在5—15 kcal/mol^[4],同时解折叠的结构变化在纳米尺度,因此相对应的生物解折叠力在pN级别. 蛋白会因为热运动而受到外力作用,当其处于无规线团或者变性状态下,构象是最多的,也就是熵值最高. 当蛋白形成二级或三级结构,熵值便减小. 实验上已经有几种单分子操纵技术可以通过施加pN级别的外力来克服蛋白内部的相互作用力^[5],从而破坏蛋白的天然三级结构. 1997年, Gaub等^[6]采用原子力显微镜(AFM)施加外力在单个蛋白分子上的开创性实验成功解折叠了肌肉中的单个肌联蛋白. 该研究发现肌联蛋白可以抵抗150—300 pN的力. 随后,一些课题组对其他有着不同的力学功能的蛋白的力学强度进行了表征^[7-12]. 这些蛋白的力学强度各不相同,与其力学功能有直接相关. 因此蛋白的力学强度定义为其在最高外力作用下仍然保持折叠的状态,这是一个重要的生理参数. 而蛋白的延展性就表明蛋白在形变下却仍然没有断裂或者解折叠.

随着对蛋白力学性质了解的不断深入,近年来采用蛋白人工构建新型材料的研究有了重要的进展^[13-19]. 例如蛛丝蛋白(图1(e))被用于深入研究蛋白序列和结构与形成材料之间的相互关系. 这种方法也为制造下一代力学稳定的生物材料指明了方向^[19]. 弹性蛋白在生物力学机器中是一个重要的功能基本单元,因为它们具有理想的弹性力学强度和抗性,这类蛋白已经被开始作为结构单元应用于构建具有优秀力学功能的生物材料. 受到肌肉肌联蛋白结构的启发,科学家合成了同时具有力学性质和弹性功能的多组分聚合物材料. 这些研究表明了非共价的分子内相互作用对于得到高力学稳定性的蛋白和仿生聚合材料具有重要作用. 最近的研究发现,人工合成的弹性蛋白的力学性质类似甚至超过了天然的蛋白. 另外,人们已经能够利用已知的蛛丝蛋白的结构合成具有非常好的延展性和强度的人工材料^[20]. 利用蛋白作为人工设计的仿生材料和生物功能材料应用到组织工程、润滑和医学领域,受到了极大的关注.

为了利用蛋白构建人工新型材料,或者应用到

纳米力学系统中作为弹簧、转换器或者感应器,我们需要构建一个蛋白“工具箱”,其中的蛋白具有已知或者可以预料到的力学性质^[21-24]. 尽管越来越多的蛋白被实验研究过,但数量仍然有限. 因此发现决定蛋白稳定性和柔韧性的内在原因就非常重要. 为了解决这个问题,我们非常希望能够有能力来推测材料在不同环境下的各种性质,例如力学稳定性、延展性和柔韧性. 在最小尺度下理解它们的结构特性和力学性质,才能让我们更有效和全面地利用它们. 蛋白力学特性的单分子力谱为此提供了有效途径.

2 从物理角度理解蛋白质的力学特性

因为所有的生物系统都存在力,力学响应因蛋白质多种多样的机械性质而不同. 其中被动的力学响应蛋白包括:组成坚硬结构的细胞骨架蛋白,柔软的弹性区域的巨肌蛋白(titin). 力的主动适应是指分子力探测器(sensor),它把力引发的构象变化转变成生物信号. 其他的例子还有细胞吸附蛋白(cell adhesion protein),改变它对其他配体的亲和性来调控吸附.

由于力是矢量,它的方向是很重要的参考量,但是在系综实验中很难控制分子层面的性质. 因此,在单分子层面上研究蛋白质力学相关的功能更加本质. 另外,单分子力谱(SMFS)还可以探测蛋白折叠和解折叠的能量面.

单分子力谱直接测量的物理量是力,力的大小直接反映系统的机械强度. 沿着力的方向的反应坐标上的自由能垒将在力的作用下降低,降低的值正比于施加的力. 而随着自由能垒的降低,反应速率呈指数的增加. 如图2所示,在力等于零时,能量面的形状如图中黑色实线所示,反应速率即体系逃逸这个不可逆的势垒的速率,因此反应速率 $k_0 = A \exp[-\Delta G/(k_B T)]$,这里 ΔG 是这个反应需要跨越的势垒高度, k_B 为玻尔兹曼常数, T 是绝对温度, A 是一个指前因子,这个因子和能量面的形状有关,可以由Kramers方程计算得到. 当在反应坐标的方向上施加力时,自由能面的形状将发生变化,沿着力的方向,自由能逐渐降低,自由能垒的降低等于两处的垂直距离(如图2标注所示) Δx 和拉力 F 的数量积. 即 $F\Delta x$. 在蛋白解折叠研究中, Δx

也被称作解折叠距离. 因此施加力之后反应速率,

$$k = A \exp \left[-\frac{G - F\Delta x}{k_B T} \right]. \quad (1)$$

结合之前的反应速率公式, 并令 $1/(k_B T) = \beta$, 则

$$k = \exp(\beta F \Delta x). \quad (2)$$

这个公式也叫做 Bell 表达式 (Bell's expression) [25], 由 Bell 首先提出, 后来被 Evans 等拓展到研究受体-配体相互作用和蛋白质解折叠 [26,27]. Szabo, Hummer, Dudok 等对如何更好地分析单分子力谱数据也做出了很多贡献.

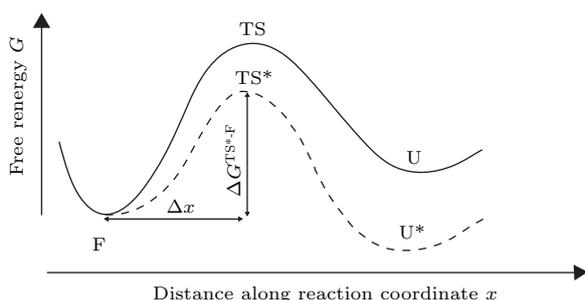


图2 蛋白质折叠能量面 F 代表天然态, TS 代表转变态, U 代表去折叠态; 图中虚线显示在拉力的作用下, 去折叠自由能降低 TS* 代表自由能垒降低后的转变态, U* 代表自由能垒降低后的去折叠态, ΔG 代表在拉力的作用下, 这个反应需要跨越的势垒高度, Δx 代表解折叠距离

Fig. 2. The unfolding pathway of a protein depicted in a free-energy profile. F represents its native, folded state, TS represents a transition state, U represents a denatured, unfolded state. The distance between native and transition state is described by (Δx). The application of an external pulling force causes the free-energy profile to tilt (dotted line). With (TS) turns to (TS*), the energy barrier (ΔG) to reach the unfolded state (U*) is lowered.

除了 Bell 表达式之外, 还存在其他的计算自由能和力的关系的公式.

由于力是随着时间变化的, 所以在通过力的分布计算体系的具体性质时还需要做进一步的处理. 现假设系统的存活率 (survival probability) $S(t)$ 满足一阶反应速率方程, 即

$$\frac{dS}{dt} = -k(t)S(t). \quad (3)$$

因此

$$S(t) = \exp \left[-\int_0^t k(t') dt' \right]. \quad (4)$$

因为我们知道力和时间的关系, 所以时间依赖的 $k(t)$ 可以由 Bell 表达式 (2) 给出. 寿命 t^* 的分布

是 $-\dot{S}(t^*) dt^*$, 所以平均寿命为

$$\bar{t}^* = -\int_0^\infty t \dot{S}(t) dt = \int_0^\infty S(t) dt.$$

解折叠力或者断裂力的分布和寿命的分布有关, $p(F) dF = -\dot{S}(t^*) dt^*$.

假设力和时间是简单的线性关系 (此假设在分布比较窄或者平均值比较大的解折叠力分布下近似成立): $\beta F(t) = \kappa_s vt$, 这里 v 是拉伸速度, κ_s 是被 $k_B T = \beta^{-1}$ 无量纲化的力的加载速率, 使用方程 (2) 和 (4), 得到

$$S(t) = \exp \left[-\frac{k_0}{\kappa_s v \Delta x} (e^{\kappa_s v \Delta x t} - 1) \right]. \quad (5)$$

解折叠力的分布 $p(F) dF = -\dot{S}(t^*) dt^*$ 为

$$p(F) = \frac{\beta k_0}{\kappa_s v} \exp \left[\beta F \Delta x - \frac{k_0}{\kappa_s v \Delta x} (e^{\kappa_s v \Delta x t} - 1) \right]. \quad (6)$$

平均解折叠力为

$$\begin{aligned} \beta \bar{F} &= \kappa_s v \bar{t} = \kappa_s v \int_0^\infty S(t) dt \\ &= \frac{1}{\Delta x} \exp \left(\frac{k_0}{\kappa_s v \Delta x} \right) E_1 \left(\frac{k_0}{\kappa_s v \Delta x} \right), \end{aligned} \quad (7)$$

这里 $E_1(x) = \int_0^\infty e^{-t} t^{-1} dt$ 是指数积分. 在低速下, $\beta \bar{F} \approx \kappa_s v / k_0$; 在高速下,

$$\beta \bar{F} \approx \ln(\kappa_s v \Delta x e^{-\gamma} k_0^{-1}), \quad (8)$$

这里 $\gamma = 0.5772 \dots$ 是欧拉常数.

从 (8) 式中可以看出, 平均解折叠力和加载速率的对数呈正比, 通过测量不同拉伸速度下 (也就是不同的力加载速率下) 解折叠力的平均值, 就可以通过拟合得到反应体系反应能量面的信息, 比如解折叠距离 Δx , 势垒高度 ΔG , 零力下的反应速率 k_0 等.

对于非简单的一级反应的体系, 模型也会随之变化, 实验中需要根据实验得到的结果分析并建立适当的模型进行计算. 因为单分子力谱可以表征系综实验中无法得到的物理量, 所以在生物物理研究中, 尤其是蛋白解折叠/折叠动力学、分子间相互作用的研究中有无法替代的作用. 而且在很多生物过程中, 蛋白受到力学信号的调控, 而 AFM 可以在蛋白上施加精细的拉力, 同时可以测量蛋白在拉力作用下的构象和功能变化, 在力学生物学中也同样有无法替代的作用.

那么从物理上考虑, 什么决定蛋白质的力学强度呢? 从上述能量面分析可以知道, 蛋白质的力学

强度是一个动力学参量,其解折叠力的大小与测量的时间尺度也即力的变化速度 (loading rate) 直接相关.因此,在比较蛋白质力学强度时,必须要保证所得到的解折叠力在同样的拉伸速度下所测得.从能量面上考虑,蛋白质的力学强度只与天然态与转变态之间的能垒和转变态到天然态的距离有关,与蛋白质本身的热力学稳定性无关,与蛋白质化学或者热变性的动力学参数也无关.如果蛋白质的解折叠距离相差较大,两个蛋白的相对力学强度在低的拉伸速度和高的拉伸速度下可能会有显著的差异.最近的研究也发现,蛋白质的力学强度与解折叠距离之间存在一定的相关性^[24].

由于力是一个矢量,在考虑蛋白质的力学强度时一定要标明力的拉伸方向.很多实验表明,对同一个蛋白质进行拉伸,如果拉伸方向不一样,其力学强度会发生很大的差异.这一特性也称作蛋白质的力学各向异性.这方面的具体例子将在后面详细阐述.

3 从结构角度理解蛋白质的力学特性

从蛋白的单分子力学特征来说,蛋白主要分为两类结构:一类是表现为无规线团的无结构蛋白,另一类是具有重复折叠蛋白基元的结构.前者在力学功能上表现为熵弹簧,具有很好的弹性性质,可以像弹簧一样在受力下被拉伸和回复;而后一种表现为震荡吸收的功能,例如肌联蛋白和生腱蛋白,可以在受较大外力下通过受力解折叠的方式吸收大量的外力从而保护组织.下面我们将具体针对有序折叠的球形蛋白来探讨其结构与力学特性之间的关系.

3.1 蛋白质力学强度的决定因素

在自然界中天然存在的弹性蛋白是一类在其生物功能过程中会受到外力作用拉伸的蛋白.所以通常情况下为了实现生物学功能,这类蛋白应该具有较高的力学强度.近年来大量的单分子力谱实验也证明了许多天然弹性蛋白具有较高的力学稳定性.实验发现这类蛋白可以抵抗上百 pN 的拉伸力,其中最著名的例子就是人类的肌肉蛋白中的肌联蛋白 (titin),需要在 100—300 pN 下才会被解折叠^[6].但是具有生物力学功能是否就是蛋白具有高力学强度的决定因素呢?非力学功能蛋白是否具有高力学强度呢?

早期的一些实验发现一部分非力学的功能蛋白稳定性不高,例如 barnase^[28].但是近年来更多的实验证明非力学功能蛋白也具有较高稳定性,例如 GB1^[29,30], protein L^[31], GFP^[32] 等蛋白的解折叠力都在 100—200 pN 甚至更高.因此,蛋白质的力学强度的决定因素是什么?

3.2 蛋白质拓扑结构与蛋白质力学强度之间的关系

实际上,通过分析这类蛋白的结构我们发现,力学功能蛋白具有高力学强度的原因并不是存在某种特异的共价结构,而是那些决定蛋白三维结构的非共价力的蛋白内部的相互作用,例如广泛存在于蛋白内的氢键、静电力相互作用,疏水相互作用等.同时分析那些具有高力学强度的非力学功能蛋白的结构,也具有类似结构和作用.再结合模拟蛋白力学解折叠实验的拉伸分子动力学结果,最终发现由蛋白内的非共价力诱导形成的蛋白三维拓扑是蛋白力学强度的决定因素.

有序折叠的球形蛋白中受力的两个平行 β 折叠股中的受力点通常都在相反的方向形成一个剪切拓扑结构,在 I27 蛋白中的 A 和 G β 折叠股的结构就是一个典型的剪切拓扑结构.在力学解折叠实验中,这两个 β 股间的各种相互作用,例如主链氢键、疏水作用都需要被打破才能使得蛋白分子从两端拉伸.因此这个剪切拓扑结构也就成为蛋白中的一个抵抗力学解折叠的力钳,也是决定蛋白力学强度的分子基础.

单分子力谱实验和分子动力学模拟都验证了上述观点.根据剪切拓扑结构决定蛋白力学强度的准则,我们可以筛选出一些具有高力学强度的非力学功能蛋白.

此外,蛋白质的力学稳定性也是蛋白力学强度的体现,其受多种物理以及化学因素影响.为了研究蛋白质的力学稳定性和结构的联系以及这种联系产生的机理,我们首先需要确定出蛋白的哪个结构单元在承受力.如果知道了这个结构单元,就可以在这个结构上通过突变的方法来改变蛋白的力学稳定性,并将蛋白作为一个观测器 (reporter).比如 Ig27 蛋白,决定它力学稳定性的是它的承受力的 β 片,其上的氢键在加载拉力之后以一种剪切结构 (shear geometry) 共同承担这个拉力.虽然有些蛋白没有任何力学功能,但这种受力单元的存在也会使它们拥有非常强的力学稳定性,比如细菌细胞

壁蛋白 G 的 B1 结构域 (GB1)^[29]. 在受力的 β 片区域做突变破坏氢键结构, 之后将使蛋白质的力学稳定性急剧降低^[33]. 不同于这样的 β 三明治的拓扑结构, 新设计的蛋白 TOP7 包含一个力的传导片层, 这个片层在受力 β 片之间, 它也显示出很强的力学稳定性^[34]. 另外, 在蛋白受力区域之外的突变也可以降低蛋白的力学稳定性^[35,36].

另外较大的蛋白质也经常表现出多个承受力单元, 使得蛋白的解折叠不是“全或无”的过程而是显示出一系列的中间态, 比如绿色荧光蛋白 (GFP)^[32]、强化黄色荧光蛋白 (EYFP)^[37]、T4 溶菌酶 (T4 lysozyme)^[38]、麦芽糖结合蛋白 (maltose-binding protein)^[39] 以及巨肌蛋白激酶 (titin kinase)^[40,41].

3.3 如何人工调控蛋白质强度

在了解蛋白质力学强度的分子基础后, 我们能够尝试人工调控蛋白的力学性质, 这也是为将来设计应用在材料和生物学上的弹性蛋白建立基础.

第一种方法便是通过改变蛋白的自身结构.

既然蛋白的拓扑结构决定蛋白的力学强度, 那么通过改变蛋白的氨基酸从而改变蛋白的结构就是一种最直接的方式. 例如蛋白 I27 中的 AB 和 A'G 区域是其力学稳定性的决定区域, 也就是形成剪切拓扑结构的氨基酸序列. 通过点突变此区域的氨基酸序列就是最自然的调控 I27 蛋白力学稳定性的途径. 实验中通过将 A' 股中的残基变为脯氨酸 (proline) 的方法, 成功阻止了主链氢键的形成, 同时也影响到了该区域的疏水作用, 从而扰乱了 β -sheets 的结构. 实验结果也符合之前的推测: 通过 proline 取代在 11, 13 和 15 号位点后, I27 proline 突变蛋白的解折叠力也大幅度下降. 此后大量的实验也验证了点突变对蛋白力学强度的影响, 通过点突变来调节力学中心的关键氨基酸相互作用也成为一种广泛的人工调控蛋白强度的手段. 需要注意的是尽管有大量实验结果的支持, 其中的分子机理还没有完全被理解. 而且这其中大部分的例子都是减小蛋白质的强度, 而人工尝试提高强度还是非常有限. 大部分成功的实验都是通过试错的方法得到.

蛋白的力学性质还和它的力学解折叠途径直接相关, 因此调节解折叠途径也是一种调节蛋白力学强度的手段. 其中一个经典的例子就是 top7^[34].

Top7 是一种人工设计的非天然蛋白, 具有对中心 β 股对称的结构, 其解折叠拥有两种途径, 各具有不同的反应能垒. 实验中通过形成共价的二硫键阻止住其中一条解折叠途径, 从而提高了 top7 的力学性质. 除了通过突变的方法降低蛋白的力学稳定性, 研究者也发现了增强蛋白力学稳定性的方法. 通过在承受力的 β 片上突变一对面对面的组氨酸以形成一个配位结合位点, 使得 GB1 的力学稳定性上升了两倍. 但是在受力区域之外突变这样一个配位结合位点则没有任何效果^[42]. 这项研究还有一个重要的意义就是在同一个实验中, 可以通过加入金属离子来切换蛋白的普通态和力学稳定态. 在蛋白中加入二硫键使蛋白的稳定性急剧增加, 使得蛋白可以抵抗 nN 量级的拉力而不解折叠^[43]. 而蛋白的解折叠轮廓长度增量将因为二硫键的引入而缩短.

其次还可以通过特异性的蛋白-配体或蛋白-蛋白相互作用调节.

配体与蛋白的结合以及蛋白与蛋白相互间的结合在自然界中广泛存在. 配体结合会改变蛋白折叠与解折叠态间的动态平衡, 是一种很常见的调节蛋白热力学稳定性的手段. 例如自然界会利用蛋白复合物来构建达到热力学稳定的细胞工厂. 但是蛋白的力学稳定性和热力学稳定性之间没有必然的相关性, 需要实验上加以证明蛋白相互结合是否能提高蛋白的力学稳定性. 近年来已经陆续发现了一些例子, 例如配体 MTX 和 NADPH 与蛋白 DHFR 的结合会大幅提高 DHFR 的力学强度, 而抗体 Fc 和 Fab 与蛋白 GB1 的结合也能显著提高 GB1 蛋白的力学强度. 研究发现, 配体结合确实可以影响蛋白的力学性质. NuG2 是一个 GB1 的突变体, 拉伸速度 400 nm/s 时解折叠力为 105 pN. 但是, 当 IgG 抗体的 Fc 片段存在时, 这个蛋白力学稳定性增加了 100 pN 以上^[44]. 因为这样一种增强作用是由配体引起的, 所以改变配体的浓度可以测量配体和蛋白的解离常数. 另一个类似的实验就是 GB1 的另一种突变体 GT18P, 在天然态下它没有结构, 近似于无规卷曲. 但是当抗体加入之后可以测量到 100 pN 的解折叠力^[33].

很明显, 配体的结合会降低蛋白的自由能, 降低的自由能即配体的结合能. 但是, 这个结合能的降低却不一定影响蛋白的力学解折叠路径.

溶剂和温度都是影响蛋白的热力学稳定性的重要环境因素, 因此也能作用为影响蛋白力学强度

的手段. 改变蛋白溶剂的主要方式有加入化学变性剂、调节渗透压、加入拥挤剂等. 例如, 通过在GB1中加入化学变性剂, 发现蛋白的力学强度随之降低, 而且和化学变性剂的浓度成正比^[45]. 和化学变性剂不同, 渗透物的加入能够稳定蛋白的结构, 从而增强蛋白的稳定性.

3.4 蛋白质力学强度与拉伸方向之间的关系

蛋白的稳定性不只是决定于蛋白的拓扑结构, 同时也被拉伸方向影响. 因此蛋白质力学强度一个重要的特性就是在不同的拉伸方向上具有不同的强度, 也就是各向异性. 这主要是因为和蛋白的热力学稳定性不同, 蛋白的力学解折叠是在一个特

定的反应轴上进行的, 被施加外力的方向所决定的. 因此施加在同一个蛋白的不同方向上的外力得到的蛋白力学性质是不同的. 单分子力谱实验和分子动力学模拟结果都给出了直接的证据. 例如, 对于丙酮酸盐脱氢酶的一个小结构域E2lip3, 从不同方向拉伸的实验和分子动力学模拟^[46]显示出这一性质. 同样, 对多聚泛素(ubiquitin polyprotein), 解折叠为200 pN, 此时的拉伸方向为N端和C端. 但若在Lys48和C端的方向拉伸, 蛋白的稳定性则降低了两倍^[47]. 不同的解折叠路径在单分子动力学模拟中也得到证明^[47]. 在Rief研究组的工作中, GFP在不同的位点被交联起来, 显示出了多种解折叠, 在拉伸方向的弹簧劲度系数从1 N/m到17 N/m不等(图3)^[48].

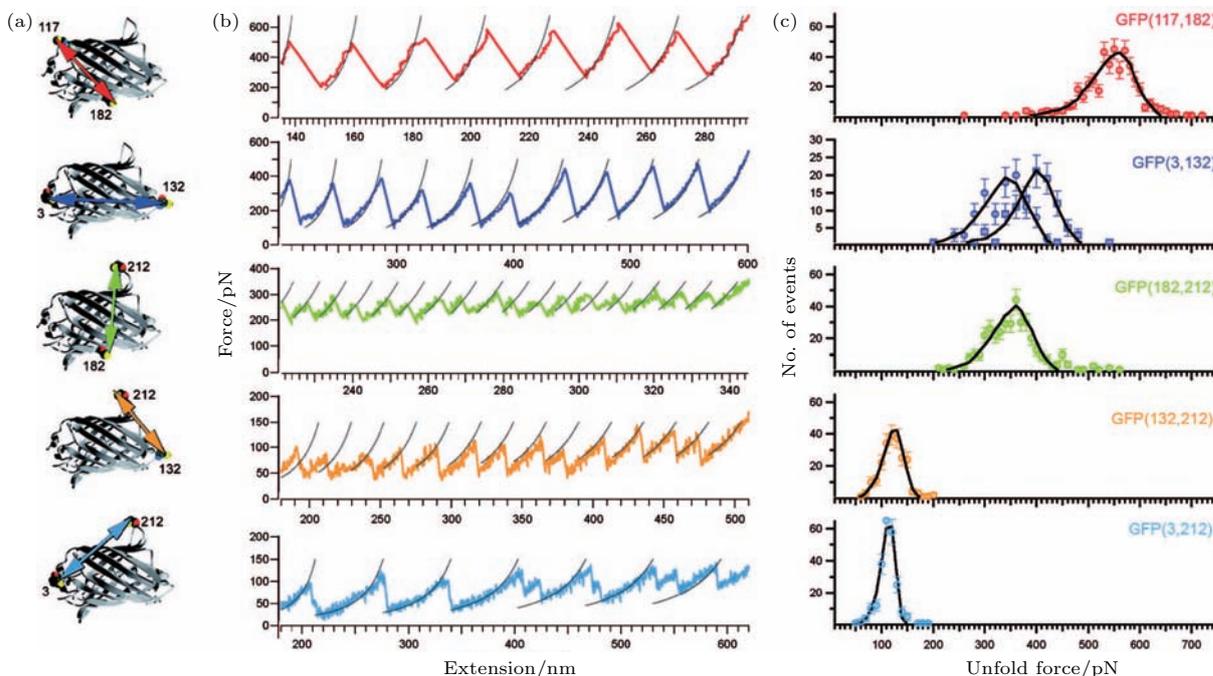


图3 绿色荧光蛋白(GFP)的力学强度与拉伸方向的关联^[48] (a) 通过对不同位点的半胱氨酸进行突变, 便可改变单个GFP结构域在GFP聚合蛋白中的受力位点与方向; (b) 对以不同方式连接的GFP多聚蛋白的力谱; (c) 实验数据(圆圈)与Monte-Carlo模拟的断裂力分布曲线(黑色实线)相对比

Fig. 3. The mechanical stability of GFP at different pulling directions^[48]: (a) By changing the location of cysteine mutations in GFP, the points and direction of force applied to an individual GFP monomer in GFP polyproteins can be manipulated; (b) SMFS profiles obtained by using GFP polyproteins that are linked differently; (c) comparison between experimental rupture force distributions (circles) and that of Monte-Carlo-simulation (black solid lines).

4 研究蛋白质单分子力学特性的实验方法

伴随着技术的发展和人们理念的创新, 新的方法不断出现, 这些困难逐渐被攻破. 新方法主要包括: 原子力显微镜(AFM)、磁镊、光镊、微针操控、

生物膜力探针. 前面三种技术是现在较为广泛使用的(见图4), 它们的分辨率、探测时间等技术特征列在表1中. 相较于以前对于大量分子的总体性质的研究, 这些新的研究方法能够在单分子层面揭示单个分子的性质, 因此更便于发现生物分子的特有的性质. 以下对此三种仪器的工作原理做简要介绍.

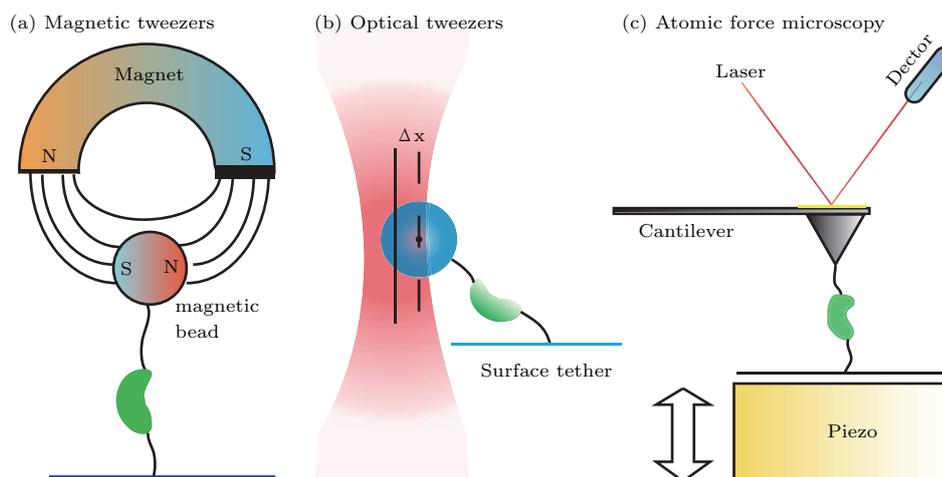


图4 磁镊、光镊以及原子力显微镜的工作原理简图

Fig. 4. Simplified mechanism of magnetic tweezers, optical tweezers and atomic force microscopy.

4.1 磁镊的工作机理

使用磁镊 (magnetic tweezers) 通过磁力对单个蛋白质分子所附着的微小超顺磁 (superparamagnetic) 粒子进行操作, 即可控制使蛋白受力 (图 4(a)). 此类颗粒的受力正比于磁场梯度, 即 $F = \mu \nabla B$, 其中 μ 是顺磁粒子在磁场 B 中的磁矩, 由于分子运动尺度较磁场的变化尺度为一小量, 粒子的磁矩通常可以作为常数处理. 因此磁镊本身具有保持恒力的特性, 避免了例如 AFM 等借助反馈机理保持恒力的方式. 颗粒的横向运动可通过质心跟踪法 (centroid tracking) 测定, 通过观测磁性粒子散射光与未散射光在明场显微镜 (bright-field microscopy) 中的干涉条纹, 可确定轴向运动. 由此类干涉条纹标定出的运动的数量级可精确至 10 nm. 至于力的测量, 可将一个磁珠系于基板表面, 通过观测其布朗运动来实现. 由于该磁珠实际上相当于一个受到横向力并伴随有热运动的振子, 其横向力为 $F\langle X \rangle/L$, 其中 F 为磁珠所受磁力, $\langle X \rangle$ 为磁珠横向运动偏离平衡位置距离的统计平均值, L 为系磁珠的线长. 由能量均分定理, 可推导磁力为 $F = K_B T L / \langle x^2 \rangle$. 通常磁镊施加的力介于 0.05—20 pN^[48].

4.2 光镊的工作机理

光镊 (optical tweezers) 采用紧密聚焦的激光束对介电小球施加辐射压来操控小球的运动 (图 4(b)). 该小球的一端连至待测分子, 待测分子的另一端通常被固定在特定表面. 近焦点附近的

巨大电磁场梯度将引发小球极化, 其所受的力正比于光强梯度, 根据 $F = \alpha \nabla I_0$, 其中, I_0 为小球表面的激光强度, α 为小球的极化率, 改变光强梯度即可改变受力. 为此, 我们可以通过移动光镊或该分子所附着的基板使小球相对激光中心发生位移, 从而改变 ∇I_0 来控制力, 使用反馈机理, 分子所受外力可以被精确控制. 同时, 为了尽量减少强烈的激光对生物分子的影响, 用作光镊的激光波长通常选择为近红外波段, 大多数生物材料对此波段的光几乎不存在吸收, 同时酶催化系统也常被用来去除体系中容易引起荧光淬灭的因子, 如氧气. 小球的位置可由小球散射的激光进行测定. 陷阱的刚性可以通过小球的布朗运动频谱由其对流体黏滞力的响应来测定. 光镊的刚性一般为 0.01—1 pN/nm, 可以施加的力通常为 0.1—100 pN.

4.3 原子力显微镜的工作机理

AFM 的核心部分是一端固定, 另一端带针尖的悬臂 (cantilever), 通过针尖和样品表面的相互作用探测表面的形貌和力学性质 (图 4(c)). 原子力显微镜不同于扫描隧道显微镜, 扫描结果基于针尖和样品间的原子力, 而不是电子的隧道效应, 因此它的针尖可以扫描非导体, 尤其适合化学和生物样本. 针尖扫描样品时, 针尖和样品的相互作用力使悬臂发生了形变, 由于胡克定理, 悬臂形变的大小正比于针尖和样品的作用力. 一束激光聚焦于悬臂的背面, 由于悬臂的形变, 反射的激光也发生偏转, 悬臂形变信号在这个过程中被光杠杆效应放大

了. 而随后反射激光照射入探测器, 探测器由四象限的光二极管构成, 象限之间电压差的变化正比于激光的偏转. 因此, 通过探测器电压即可表征针尖和样品的作用力. 在扫描样品表面的过程中, 通过调节针尖和样品的距离, 我们可以始终保持针尖上的作用力恒定, 即可得到样品的形貌图. AFM除了

用于样品成像之外, 还可以进行单分子力谱测量. 如果保持样品水平位置不动, 在竖直方向上下移动针尖, 使之与样品接触并继续下压, 随后反向运动远离基板并拉伸样品, 在这个过程中可以通过针尖的弯曲程度得到样品的弹性信息. AFM的刚性为 $1-10^5$ pN/nm, 所能施加的力为 $2-10^4$ pN.

表1 三种单分子力学方法的特点

Table 1. Comparison of three high-resolution, single-molecule measurement techniques.

	光镊	磁镊	原子力显微镜
分辨率/nm	0.1—2	5—10	0.5—1
测量时间/s	10^{-4} — 10^3	10^{-3} — 10^5	10^{-3} — 10^2
刚性/pN·nm ⁻¹	0.005—1	10^{-3} — 10^{-6}	$1-10^5$
测量范围/pN	0.1—100	10^{-3} — 10^2	$2-10^4$
位移范围/nm	$0.1-10^5$	$5-10^4$	$0.5-10^4$
典型应用	3D 操控, 交互分析	系留检测, DNA 拓扑结构	较大的拉力, 交互检测
附着类型	共价键或非共价特异性吸附	共价键或非共价特异性吸附	非特异性
特点	底噪、低漂移, 主动或被动力钳	力钳, 珠旋转, 特异性相互作用	高分辨率图像, 非常大的检测力范围, 主动式力钳
局限	光损失, 样品受热, 手柄较重	难于操控分子, 限于大分子, 手柄较重	探针刚性高, 检测力下限较大, 只适用与多聚或嵌合结构, 样品随机吸附

5 原子力显微镜单分子力谱

5.1 原子力显微技术的重要性

1986年, Binnig, Quate 和 Gerber 发明了原子力显微镜. AFM具有很高的空间分辨率和力学灵敏度, 在物理、化学和生物领域有广泛的应用. 在生物学领域, 原子力显微镜可以在液体环境中对生物样品进行观测, 获得高分辨的图像, 可以在接近生理条件下测量生物样品的弹性和力等物理信号, 比如细胞、蛋白自组装体、细胞膜等. 因此AFM是探测生物样品的不可或缺的工具. 另外, 近年来, 人们将AFM应用于单分子生物物理的研究中, 发展发现了许多具有开创性的方法, 比如生物分子间的相互作用、蛋白质的力学解折叠、生物高分子在拉力作用下的构象变化等. 由于AFM可以测量pN级别的作用力, 因此在单分子探测上具有较高的精度. 另外, AFM比之光镊、磁镊等其他的单分子力测量仪器, 具有更广的力学测量范围, 可以测量从十几pN到几nN的信号, 通量也较前两者大, 因此

在单分子领域有不可替代的作用^[49,50].

5.2 原子力显微镜单分子力谱的诠释

在单分子生物物理研究中, 将待研究的生物高分子(比如DNA或者蛋白质), 吸附在基板上. 如果在下压的过程中接触到这个高分子并且此高分子因为非特异性相互作用导致一端吸附于基板上另一端吸附于针尖上时在反向拉伸的过程中, 就可以得到一条高分子的力谱曲线, 即高分子伸长量(extension)和高分子产生的拉力(force)的关系的力学拉伸曲线(force-extension curves). 如图5所示, 这里在基板上吸附了一个含有四个结构域的蛋白质, 当针尖下压时恰好接触到这个蛋白的一端, 因为非特异相互作用, 蛋白吸附在针尖上, 如图5(a)所示, 之后随着针尖上抬远离基板, 蛋白也被拉伸, 由于蛋白两端的拉力随着拉伸而变得越来越大(图5(b)所示), 最终导致蛋白的一个结构域解折叠, 解折叠之后整个高分子的轮廓长度增加了(即原本折叠在结构域中的多肽链变成了无规卷曲

被释放出来), 这将导致拉伸力急剧下降, 因而形成一个解折叠峰, 这个峰值即这个结构域的解折叠力(图5C所示). 随后蛋白分子再次随着针尖远离基板而产生越来越大的拉力, 并最终导致第二个结构域解折叠, 拉力再次急剧下降形成第二个解折叠峰, 峰值为第二个结构域的解折叠力. 随着针尖距离基板越来越远, 四个结构域均发生解折叠, 多肽链则继续被拉伸(图5D). 最终多肽和针尖的相互作用打断, 多肽分子脱离针尖形成最后一个峰(图5E). 应用单分子力谱可以得到蛋白解折叠力, 通过分析解折叠力的分布, 可以得到蛋白质的力学稳定性和自由能面的信息.

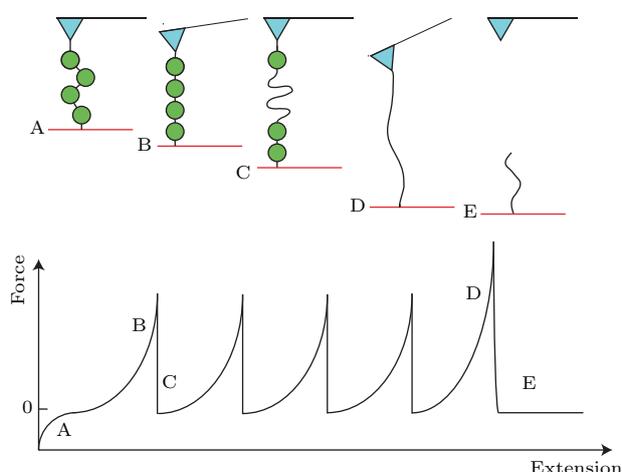


图5 蛋白的单分子力谱实验示意图 图中的蛋白具有4个结构域, A, B, C, D, E表示不同拉伸阶段所对应的力谱谱线

Fig. 5. Schematic of single-molecule force spectroscopy on a polyprotein. The protein here has 4 domains. A, B, C, D, E represent different states of the protein being stretched and the force spectroscopy.

5.3 应用多聚蛋白的优势

实际使用中, AFM的探针针尖与基板上的蛋白接触时, 基板表面的一部分蛋白都会与针尖相互作用. 大部分情况下, 针尖最终可能只接触了完整蛋白的一部分, 而且蛋白可能已经变性. 因此, 针尖与基板间恰能有且仅有一个所要测量的且正确折叠的完整的蛋白的概率是很低的. 此外, 探针在接近基板的过程中, 力谱会出现无规的力涨落, 可能掩盖较短蛋白的真实力谱. 这些因素将导致力谱出现许多无意义图线, 增加对AFM力谱的解释的困难. 如何分辨真实待测蛋白的力谱与那些噪音或错误蛋白的力谱呢?

对此, 我们可以人工合成多聚蛋白(polyprotein), 此类蛋白通常包含数个由连接肽串联而成的全同结构域. 由于结构域全同, 多聚蛋白力谱较天然蛋白更加规则, 每个峰之间存在的微小的变化仅体现了结构域展开过程中的随机性, 而非结构域本身氨基酸序列的变化. 通过产生一系列重复的特征谱线, 多聚蛋白给予我们更多机会彻底分析某个特定的结构域的折叠与解折叠特性. 此外, 多聚蛋白能有效提高实验效率. 即使针尖拾取了蛋白的某个随机片段, 其结果也将与蛋白片段无关, 因为所有结构域都是相同的, 因而无需使单个完整的蛋白质附着到基板和针尖之间. 此外, 多聚蛋白可以通过增加结构域数目从而提高蛋白的拉伸长度, 使最终的力谱免受力涨落的影响.

5.4 多聚蛋白的制备

首先, 将待表达的特定结构域及其连接肽所对应的特定DNA片段通过分子生物学方法制作出来, 即所谓聚合酶链式反应(PCR)引物, 接着通过PCR仪可以将上述特定DNA序列添加到质粒所对应的酶切位点间并大量复制, 通过对其酶切并纯化, 即可获得所谓的“insert”. 同时, 将完整质粒也进行酶切获得“vector”, 之后使用DNA连接酶, 即可获得所需要的质粒. 通过选择特定的酶切位点, 重复类似步骤, 即可控制特定结构域的重复次数或者嵌入其他序列. 最后将质粒转化进入大肠杆菌, 经过培养, 便可将其再复制并通过特定诱导使菌表达所需的多聚蛋白了, 之后一般需要浓缩纯化.

5.5 嵌合多聚蛋白(chimeric polyproteins)

人们已经熟悉一部分蛋白结构域的力学特征及其相应的独特的力谱——“指纹谱”. 由此, 可将已熟知的特定结构域与有待研究的特定结构域组合, 借助指纹谱表征待测结构域的谱线. 例如构建如图6(a)所示的嵌合多聚蛋白, 其中红色方框与绿色圆圈分别代表待测结构域和已知结构域. 假定测量时发现如图6(b)的力谱图, 其中有四个全同的指纹谱, 之后紧随一具有更高的解折叠力(peak unfolding force F_{un})的谱线, 由此可推测此结构域具有较已知结构域更高的力学强度. 同理, 假设其具有相对更弱的力学强度, 其相对应的解折叠力较

其他的低, 因此力谱可如图 6(c) 所示, 首先一个较矮的峰对应待测结构域的力谱, 其后四个相同的谱线对应 4 个已知结构域. 当待测结构域与指纹蛋白具有相似的力学强度时, 单纯分析解折叠力已不能提供有效信息, 因此转而分析峰间距. 如图 7(a) 所示, 其中红色方框与绿色圆圈分别代表待测结构域和已知结构域, 图中所构建的嵌合多聚蛋白具有图 7(b) 所示的力谱, 由于随机的解折叠次序, 实际实验中将获得多种谱线, 图 7(b) 仅表示其中可能的 3 条谱线, 通过测定峰间距, 可得如图 7(c) 中所示的解折叠力与峰间距的关系. 由此, 可明显看到待测结构域具有较已知结构域更小的解折叠长度. 因此, 可以根据相应的解折叠长度将力谱中待测结构域的谱线标记, 进行深入研究. 嵌合多聚蛋白减少了对力谱的繁复分析, 直接指明了待测结构域对应的谱线, 有效提高了实验效率 [51].

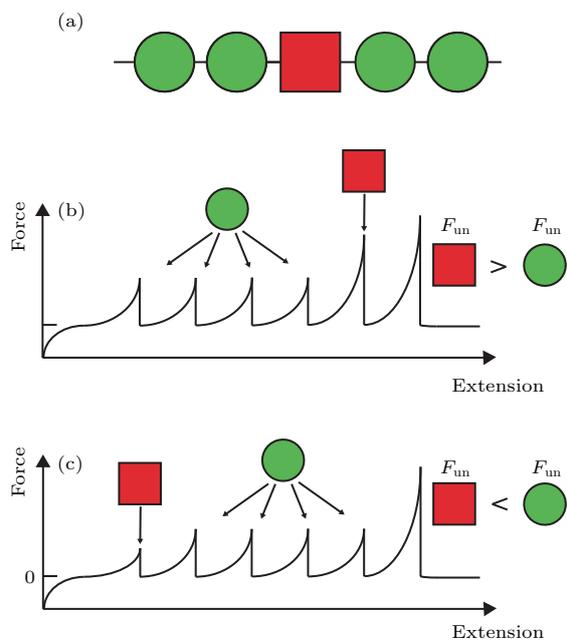


图 6 嵌合多聚蛋白及其简化力谱 (a) 所设计的多聚蛋白的结构, 红色方框与绿色圆圈分别代表待测结构域和已知结构域; (b) 当红色结构域具有更高力学强度时, 其 F_{un} 应当更高; (c) 当红色结构域具有更低力学强度时, 其 F_{un} 应当更低

Fig. 6. Chimeric polyprotein and its theoretical force extension profiles: (a) A simplified Chimeric polyprotein, green circle and red square represent well-known domains and the domain under probe respectively; (b) suppose the red domain is mechanically stronger, the domain is likely to unfold last and its peak unfolding force(F_{un}) should be higher than the red one; (c) if the red domain is mechanically weaker, the domain should unfold first and its F_{un} should be lower than the red one.

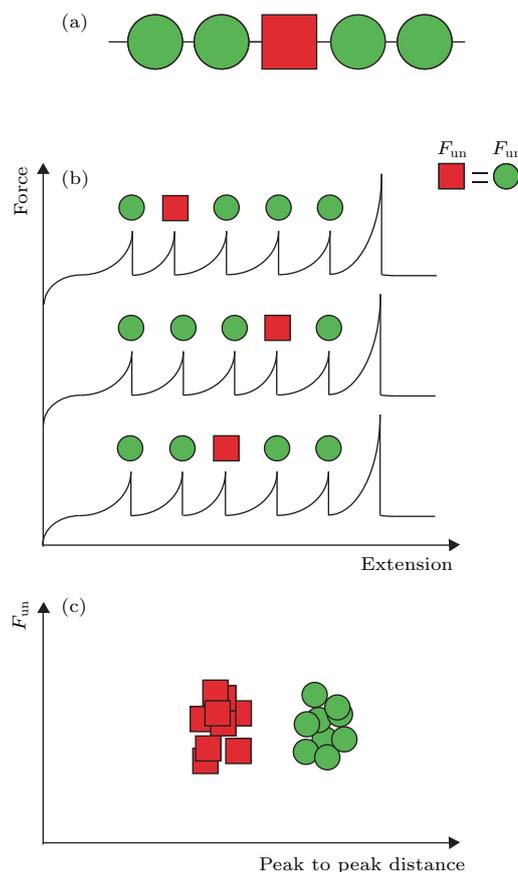


图 7 嵌合多聚蛋白的简化力谱以及峰间距散点图 (a) 所设计的多聚蛋白的结构, 红色方框与绿色圆圈分别代表待测结构域和已知结构域; (b) 部分由随机解折叠次序导致的多种力谱; (c) 峰间距与解折叠力关系的散点图

Fig. 7. Chimeric polyprotein and its theoretical force extension profiles: (a) A simplified chimeric polyprotein, green circle and red square represent well-known domains and the domain under probe respectively; (b) possible force extension profiles result from a random unfolding sequence; (c) scatter plot of the peak-to-peak distances against the peak unfolding forces.

6 原子力显微镜实验的最新进展 (提高稳定性、提高力分辨率、与荧光结合、高速 AFM)

除了生物样品的改进外, 近年来, AFM 本身在技术以及方法上也有了重大的革新. 一方面, 这些新的技术使得 AFM 的稳定性和精确度得到了较大的提高, 另一方面, 由于 AFM 和其他技术的结合, 不但提高了 AFM 力谱测量的通量, 还使得整个测量的时间大大降低. 此外, 由 Toshio Ando 组发明的 AFM 高速成像技术使得 AFM 成像的速度大幅度提高, 以至于可以应用于一些生物大分子的动力学过程的直接测量.

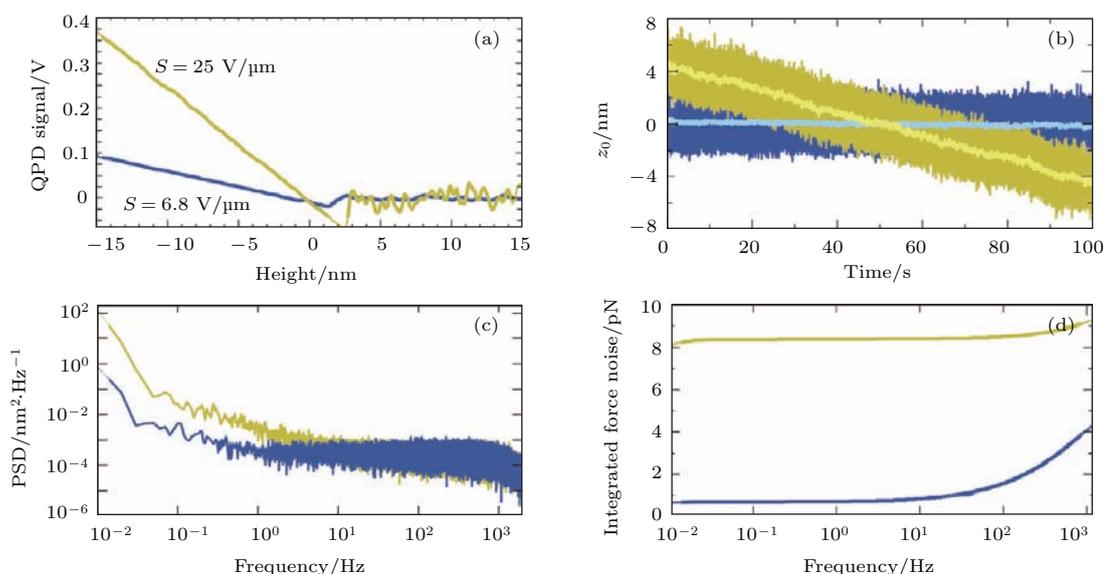


图8 去除金镀层对AFM的灵敏度及精度的影响 (a)两种针尖的力学灵敏度的对比; (b)两种针尖的零力漂移的对比, 2.5 kHz的高频宽数据由深色表示, 10 Hz数据由浅色表示; (c)针尖的平均功率谱(PSD), 基于5个连续的100 s的数据; (d)由图(c)数据所得的针尖的力学分辨率; 黄色曲线属于存在金镀层的针尖, 蓝色曲线代表金镀层被去除的针尖 [52]

Fig. 8. Comparison between gold-coated and uncoated cantilevers in sensitivity and precision: (a) Sensitivity between gold-coated and uncoated cantilevers; (b) time scale of zero-force position (z_0) of gold-coated and uncoated cantilevers. High-bandwidth 2.5 kHz data are represented in dark colors and 10 Hz data are in light colors; (c) an averaged power spectral density (PSD) records of five consecutive 100 s data; (d) integrated force noise based on records in (c); the gold profile represents gold-coated cantilevers while the blue represents the uncoated one. This figure is reprinted from Ref. [52] with permission from the American Chemical Society.

Tom Perkins小组最近研究出一种亚pN精度同时可以在室温水溶液中进行测量的技术. 重要的是这样一种亚pN精度的测量可以在商业化的仪器上使用商业化的针尖进行. 该组的两个重要的研究结果分别是: 1) 力学稳定性和精度受到镀金涂层的限制; 2) 针体较小但是硬度大的针尖无法在时间小于25 ms时提高力学精度. 同时, 研究还发现在金镀层存在时, 零力漂移的速度远大于没有金镀层的情况 [52], 如图8所示.

此外, Matthias Rief的研究小组从仪器上提高AFM较长时间范围的稳定性使得AFM在力学测量的分辨率上获得极大的提高接近了光镊的分辨率从而可以测量蛋白在受力情况下折叠态和去折叠态的相互转变(图9) [53], 这是传统的AFM力谱很难做到的. 另外, 该组发明了锁定力谱(lock-in force spectroscopy)技术该技术可以克服针尖的力漂移, 通过该技术, 实验中直接观察到了蛋白质的折叠过程 [54].

Hermann Gaub研究组最近更是发展了一种基于微流控和体外蛋白表达的高通量蛋白力学测量技术 [55], 通过纳米分辨率的空间定位 [56], 可

以很快地对多种蛋白力学强度进行精准的测量(图10).

AFM的另一个无法取代的功能是生理溶液中生物样品在基板表面的高分辨成像. 最近Toshio Ando等对生物研究方面的AFM成像技术进行了发展, 无论是成像速度还是针尖对样品施加的力方面, 都获得了巨大的进步. 这些发展使得我们可以直接观察单个生物大分子的结构动态变化以及动态的相互作用, 而这个技术是目前其他仪器无法实现的(图11) [57]. 因此, 高速AFM将对生物科学的发展起到极其重大的推动作用. 另外, 最近在溶液中AFM成像达到的分辨率也会扩展AFM在生物研究中的应用.

随着越来越多的基于AFM的单分子力学方法相继被开发出来, 天然态蛋白的力学性质以及通过力学性质得到的结构学和功能学的性质已经得以确定. 尤其是近年来AFM单分子力谱技术取得了巨大的进步, 相信通过日益成熟的研究手段, 未来AFM单分子力谱在生物学研究中将会成为愈发强大的工具.

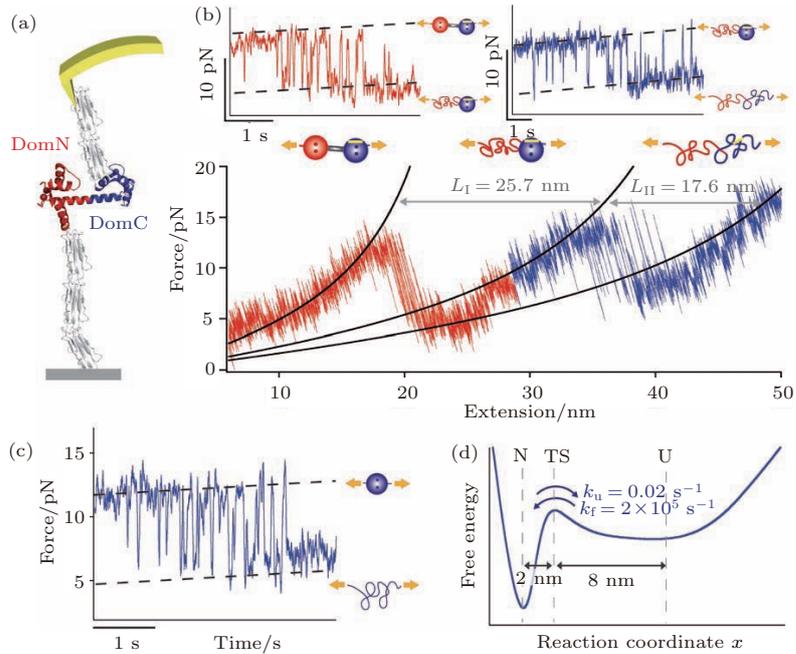


图9 通过高稳定的AFM得到的钙调蛋白(CaM)的实验数据 (a) 实验装置示意图, 通过使用已知力学特性的filamin蛋白作为“把手”将CaM固定在AFM针尖与基板间; (b) 在10 mM钙离子浓度的情况下CaM的N端结构域(DomN)和C端结构域(DomC)的折叠态和去折叠态的相互转变, 其中红线代表DomN, 蓝线代表DomC, 通过蠕虫链拟合(黑线)来分辨DomN和DomC. (c) 在10 mM钙离子浓度下, 分离出的单个DomC的解折叠力和时间的关系; (d) 由数据重构出的蛋白质能量面. N代表天然态, TS表示转变态, U代表去折叠态 [53]

Fig. 9. Experiment data on calmodulin protein by using low-drift AFM: (a) Schematic diagram of the AFM in this experiment, the calmodulin protein (CaM) is connected between cantilever tip and surface by using filamin domains as handles; (b) sample force-time profile of CaM at 10 mM Ca^{2+} , red lines represent the transition between folding and unfolding state of N-terminal domain of CaM (DomN), and those of DomC (C-terminal domain) are shown in blue, worm-like chain fit curves (black lines) are used to determine the contour length increase upon unfolding (ΔL), which enable the identification of individual domains; (c) force-time profiles of the transition region of individual DomC at 10 mM Ca^{2+} ; (d) possible energy landscape for the folding of DomC at 10 mM Ca^{2+} . N represents native state; TS is transition state; U marks unfolded state [53].

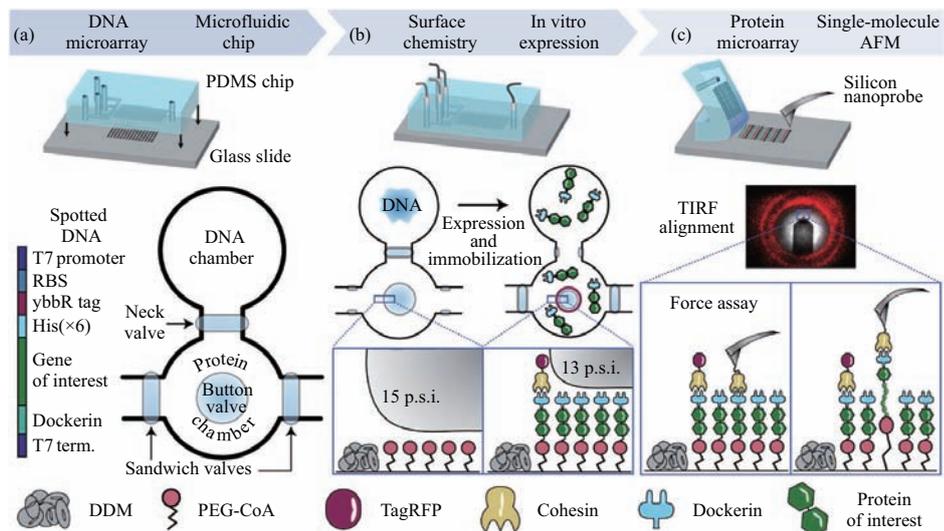


图10 从基因到蛋白质力学测量的实验方法 通过微流控和体外表达相结合, 研究者可以直接将需要研究的蛋白表达并修饰于特定的位置, 再通过荧光方法定位, 最终用AFM对该蛋白进行力学测量 [55]

Fig. 10. A new process from DNA sequence to SMFS. By combing the use of microfluidic chip and DNA expression in vitro, researchers can now perform selective surface modification and express gene of interest in vitro directly. By using total-internal-reflection fluorescence/atomic force microscope (TIRF-AFM), the cantilever can be positioned in the center of the fluorescent rings in the protein array, performing SMFS measurements [55].

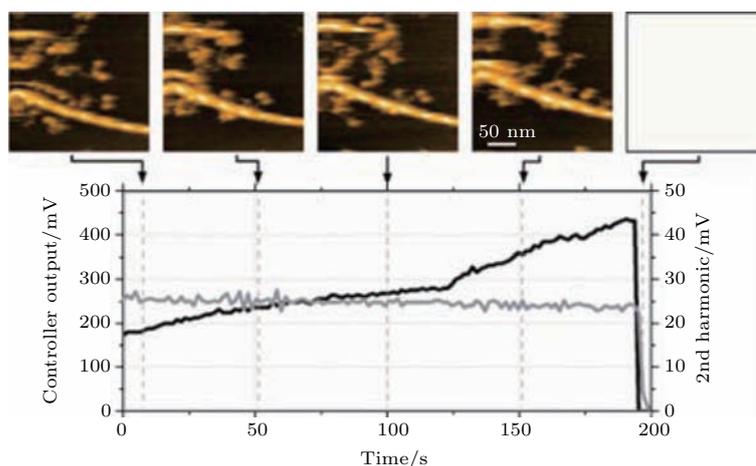


图 11 对附着在肌动蛋白纤维上的肌球蛋白 V 的连续成像 成像速度为 10 帧/s, 可以看到肌球蛋白在纤维上的行走, 上图是选取的五个时间点的成像结果 [57]

Fig. 11. Consecutive imaging of myosin V which is attached to actin filaments. The records were at a frame rate of 10 frames/s. The movement of the myosin can be showed by the photos. The above five images were taken at time points denoted by the arrow [57].

7 界面上的蛋白与固体相互作用

除此之外, 基于原子力显微镜的单分子力谱技术还可以用来研究蛋白与固体的相互作用. 在细胞的贴壁生长、细菌的吸附以及界面的生物膜的形成中, 蛋白和固体的相互作用起到非常重要的作用. 蛋白与固体的相互作用非常复杂, 涉及多种非特异的分子间相互作用, 比如疏水作用、配位作用、静电作用等.

当我们需要测量蛋白与固体的相互作用力时, 首先通过化学修饰的方法在针尖上修饰低密度的蛋白质, 使蛋白质通过共价键牢固地结合在针尖上. 实验时, 针尖靠近基板, 当针尖和基板接触之后, 由于蛋白质和固体基板间存在相互作用, 两者将结合, 随后针尖远离基板, 蛋白上施加的力逐渐增加, 最终两者解离, 针尖将不再受力. 力谱曲线中的峰则代表使蛋白和固体表面解离需要的断裂力. 通过分析断裂力的分布, 可以到的相互作用的动力学信息. 值得注意的是, 在力谱实验过程中, 和固体表面相互作用的蛋白数量可能不同, 如果有多个蛋白都和表面有相互作用的键产生, 则测量到的断裂力将不再能表征单分子的性质. 所以在实验过程中需要用各种手段来增加单分子事件的概率, 并降低多分子事件的概率. 最主要的方法就是调整针尖上蛋白的修饰浓度, 以及通过其他没有活性的基团修饰来稀释待研究蛋白的密度. 但是降低修饰

密度会使得采样率也降低, 因此可能需要一万次以上的反复拉伸, 才可以得到足够多的拉伸曲线从而绘制出断裂力的分布直方图.

近年来, 在蛋白-表面相互作用的研究上也有长足发展. 比如 Messersmith 小组对贻贝足丝蛋白和岩石表面的吸附过程的单分子研究. 研究不但发现足丝蛋白上的多巴对吸附过程的至关重要的作用, 还发现这种相互作用不只是简单的氢键, 而是一种配位作用 [58]. 更新的研究则发现, 足丝蛋白中的儿茶酚基团和固体产生了多样的相互作用, 因此足丝蛋白对不同的表面均有很好的吸附力 [59].

对蛋白和固体相互作用的研究揭示出吸附的机理, 阐明吸附过程中存在的相互作用种类, 并且可以定量测定蛋白-表面相互作用的力学参数, 这些研究得到的数据进而也指导我们设计和开发新型的仿生学材料. 因此具有重要并且无法取代的意义.

8 蛋白质力学从单分子到材料

弹性蛋白在很多生物力学过程和生物材料中作为最基本的结构单元, 提供所需要的弹性、力学强度、韧性和硬度. 理解这些基于蛋白的弹性生物材料的力学性质是一个多尺度的问题, 从原子和分子级别到宏观的级别. 揭示这些基本单元的原理对理解这个问题至关重要.

单分子力谱技术的发展提供了表征这些弹性

蛋白的力学性质的方法. 单分子原子力显微镜尤其适合研究弹性蛋白. 分子动力学模拟, 蛋白质工程和单分子AFM研究已经揭示出单个弹性蛋白分子设计的很多细节, 这些细节可以进一步指导我们对弹性蛋白的分子生物学工程. 研究者们正在从实验观察转为人工设计这些弹性蛋白, 使之具有特

别的力学性质, 进而模仿甚至超越天然的弹性蛋白. Hongbin Li的研究组结合对多种蛋白力学性能的测试结果, 选择了两种合适的蛋, resilin 和GB1, 通过融合, 模仿人类巨肌蛋白. 最终通过这样一种设计方案得到了一种力学性质特别好的仿生材料 (图 12) [23].

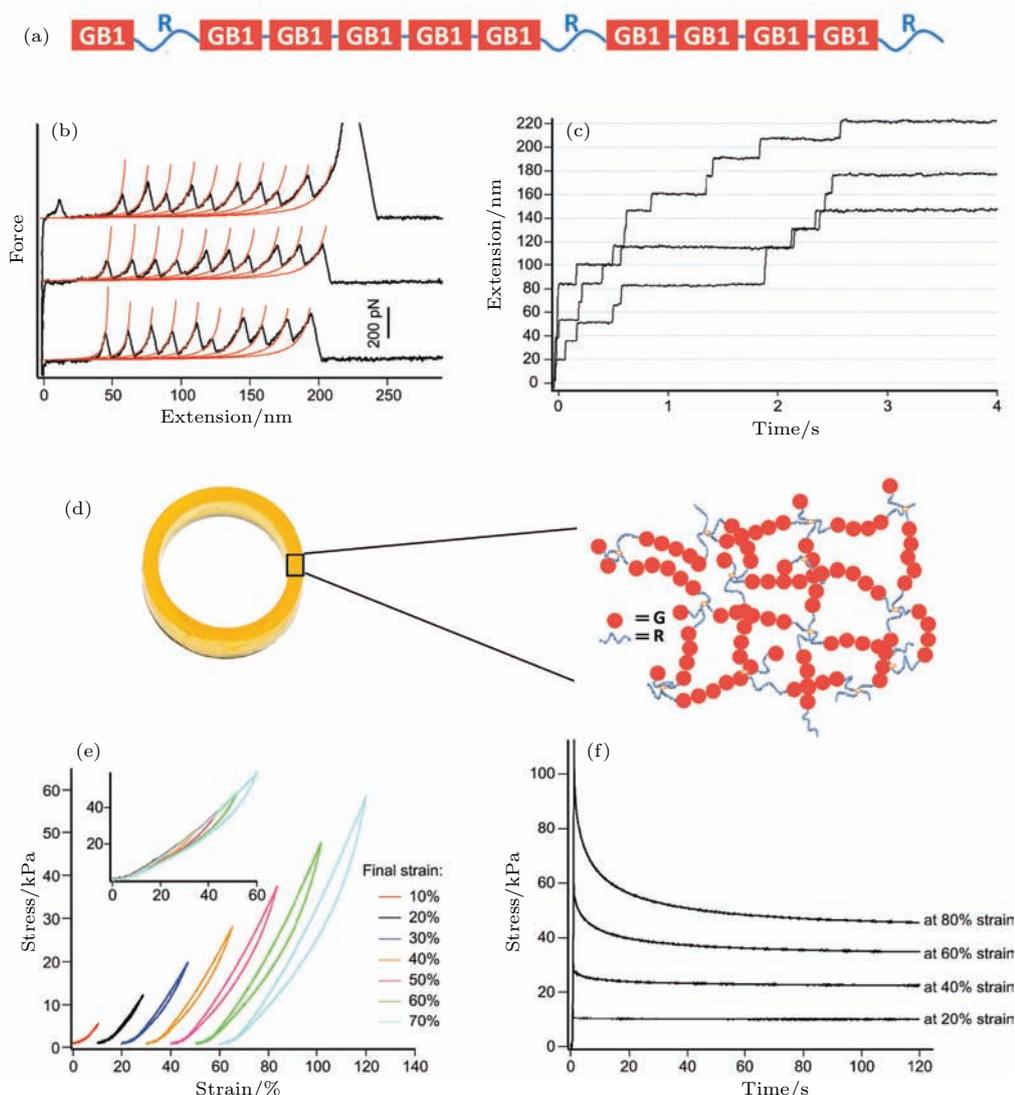


图 12 通过自下而上的方法得到的基于弹性蛋白的生物材料 (a) 模仿巨肌蛋白设计的弹性蛋白 GRG₅RG₄R. G 代表 GB1 结构域, R 代表 resilin 序列; (b) GRG₅RG₄R 的力谱曲线, 开始一段比较平缓的曲线表示无结构的 resilin 序列的拉伸过程, 后面锯齿样图线为 GB1 解折叠过程; (c) GRG₅RG₄R 的恒力拉伸曲线, 阶梯式的拉伸曲线是由 GB1 结构域解折叠所致; (d) 由 GRG₅RG₄R 制作的水凝胶环的照片以及其内部放大的网状结构; (e) GRG₅RG₄R 生物材料的应力-应变以及应力-松弛曲线; (f) GRG₅RG₄R 生物材料在应变不变的情况下, 应力随时间的变化 [23]

Fig. 12. Bottom-up approach can be used to rationally engineer the mechanical properties of elastomeric protein-based biomaterials: (a) Schematic of the sequence of an artificial elastomeric protein GRG₅RG₄R mimicking the sequence of muscle protein titin, G represents a GB1 domain and R represents the resilin repeat; (b) three typical force-extension curves of GRG₅RG₄R, the initial low-force spacer corresponds to the stretching of unstructured resilin sequences, and the sawtooth peaks correspond to the unfolding of GB1 domains; (c) three force-time traces for stepwise unfolding of GRG₅RG₄R under a constant force of 80 pN, each stair corresponds to the unfolding of a GB1 domain; (d) a picture of a ring-shaped hydrogel made of GRG₅RG₄R protein and its proposed network structure; (e) and (f) the stress-strain and stress-relaxation curves for the hydrogels made of GRG₅RG₄R [23].

细胞的吸附一直以来都是生物学中非常重要的课题之一。原子力显微镜的另外一个应用是测量单个细胞和基板的吸附过程,进而研究细胞上的吸附蛋白的相互作用性质。另外,由于AFM可以直接测量蛋白和固体表面的相互作用,而对这些相互作用的本质理解将会直接应用于材料的设计,例如对新型生物涂层材料以及水气界面的生物膜材料的研究起到指导作用。此外,比如真菌疏水蛋白形成的生物膜材料,以及由儿茶酚构成的万能涂层,这些都是理解生物分子单分子层面的性质之后进而模仿设计的。

总之,这些发现将在细节上指导我们自下而上设计蛋白质材料的力学特性,并为我们的设计提供更多有用的信息。

参考文献

- [1] Strong M 2004 *PLoS Biol.* **2** 305
- [2] Berkemeier F, Bertz M, Xiao S, Pinotsis N, Wilmanns M, Gräter F, Rief M 2011 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108** 14139
- [3] Bullard B, Garcia T, Benes V, Leake M C, Linke W A, Oberhauser A F 2006 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103** 4451
- [4] Scharnagl C, Reif M, Friedrich J 2005 *Biochim. Biophys. Acta* **1749** 187
- [5] Neuman K C, Nagy A 2008 *Nat. Methods* **5** 491
- [6] Rief M, Gautel M, Oesterhelt F, Fernandez J M, Gaub H E 1997 *Science* **276** 1109
- [7] Oberhauser A F, Marszalek P E, Erickson H P, Fernandez J M 1998 *Nature* **393** 181
- [8] Rief M, Gautel M, Schemmel A, Gaub H E 1998 *Biophys. J.* **75** 3008
- [9] Rief M, Pascual J, Saraste M, Gaub H E 1999 *J. Mol. Biol.* **286** 553
- [10] Rief M, Gautel M, Gaub H E 2000 *Adv. Exp. Med. Biol.* **481** 129
- [11] Schwaiger I, Sattler C, Hostetter D R, Rief M 2002 *Nat. Mater.* **1** 232
- [12] Urry D W, Parker T M 2002 *J. Muscle Res. Cell Motil.* **23** 543
- [13] Guerette P A, Ginzinger D G, Weber B H, Gosline J M 1996 *Science* **272** 112
- [14] Smith B L, Schaffer T E, Viani M, Thompson J B, Frederick N A, Kindt J, Belcher A, Stucky G D, Morse D E, Hansma P K 1999 *Nature* **399** 761
- [15] Ardell D H, Andersen S O 2001 *Insect Biochem. Mol. Biol.* **31** 965
- [16] Becker N, Oroudjev E, Mutz S, Cleveland J P, Hansma P K, Hayashi C Y, Makarov D E, Hansma H G 2003 *Nat. Mater.* **2** 278
- [17] Elvin C M, Carr A G, Huson M G, Maxwell J M, Pearson R D, Vuocolo T, Liyou N E, Wong D C, Merritt D J, Dixon N E 2005 *Nature* **437** 999
- [18] Lyons R E, Lesieur E, Kim M, Wong D C, Huson M G, Nairn K M, Brownlee A G, Pearson R D, Elvin C M 2007 *Protein Eng. Des. Sel.* **20** 25
- [19] Heim M, Keerl D, Scheibel T 2009 *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **48** 3584
- [20] Wong J Y, McDonald J, Taylor-Pinney M, Spivak D I, Kaplan D L, Buehler M J 2012 *Nano Today* **7** 488
- [21] Li H 2007 *Org. Biomol. Chem.* **5** 3399
- [22] Li H 2008 *Adv. Funct. Mater.* **18** 2643
- [23] Li H, Cao Y 2010 *Acc. Chem. Res.* **43** 1331
- [24] Hoffmann T, Tych K M, Hughes M L, Brockwell D J, Dougan L 2013 *Phys. Chem. Chem. Phys.* **15** 15767
- [25] Bell G I 1978 *Science* **200** 618
- [26] Evans E, Ritchie K 1997 *Biophys. J.* **72** 1541
- [27] Evans E, Ritchie K 1999 *Biophys. J.* **76** 2439
- [28] Best R B, Li B, Steward A, Daggett V, Clarke J 2001 *Biophys. J.* **81** 2344
- [29] Cao Y, Lam C, Wang M, Li H 2006 *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **45** 642
- [30] Cao Y, Li H 2007 *Nat. Mater.* **6** 109
- [31] Brockwell D J, Beddard G S, Paci E, West D K, Olmsted P D, Smith D A, Radford S E 2005 *Biophys. J.* **89** 506
- [32] Dietz H, Rief M 2004 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101** 16192
- [33] Cao Y, Li H 2008 *Nat. Nanotechnol.* **3** 512
- [34] Sharma D, Perisic O, Peng Q, Cao Y, Lam C, Lu H, Li H 2007 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104** 9278
- [35] Balamurali M M, Sharma D, Chang A, Khor D, Chu R, Li H 2008 *Protein Sci.* **17** 1815
- [36] Ng S P, Billings K S, Ohashi T, Allen M D, Best R B, Randles L G, Erickson H P, Clarke J 2007 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104** 9633
- [37] Perez-Jimenez R, Garcia-Manyes S, Ainarapu S R, Fernandez J M 2006 *J. Biol. Chem.* **281** 40010
- [38] Peng Q, Li H 2008 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105** 1885
- [39] Aggarwal V, Kulothungan S R, Balamurali M M, Saranya S R, Varadarajan R, Ainarapu S R 2011 *J. Biol. Chem.* **286** 28056
- [40] Puchner E M, Alexandrovich A, Kho A L, Hensen U, Schafer L V, Brandmeier B, Gräter F, Grubmüller H, Gaub H E, Gautel M 2008 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105** 13385
- [41] Pernigo S, Fukuzawa A, Bertz M, Holt M, Rief M, Steiner R A, Gautel M 2010 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107** 2908
- [42] Cao Y, Yoo T, Li H 2008 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105** 11152
- [43] Grandbois M, Beyrer M, Rief M, Clausen-Schaumann H, Gaub H E 1999 *Science* **283** 1727
- [44] Cao Y, Balamurali M M, Sharma D, Li H 2007 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104** 15677

- [45] Cao Y, Li H 2008 *J. Mol. Biol.* **375** 316
- [46] Brockwell D J, Paci E, Zinober R C, Beddard G S, Olmsted P D, Smith D A, Perham R N, Radford S E 2003 *Nat. Struct. Biol.* **10** 731
- [47] Carrion-Vazquez M, Li H, Lu H, Marszalek P E, Oberhauser A F, Fernandez J M 2003 *Nat. Struct. Biol.* **10** 738
- [48] Dietz H, Berkemeier F, Bertz M, Rief M 2006 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103** 12724
- [49] Hinterdorfer P, Dufrene Y F 2006 *Nat. Methods* **3** 347
- [50] Muller D J, Dufrene Y F 2008 *Nat. Nanotechnol.* **3** 261
- [51] Hoffman T, Dougan L 2012 *Chem. Soc. Rev.* **41** 4773
- [52] Sullan R M A, Churnside A B, Nguyen D M, Bull M S, Perkins T T 2013 *Methods* **60** 131
- [53] Junker J P, Ziegler F, Rief M 2009 *Science* **323** 633
- [54] Schlierf M, Berkemeier F, Rief M 2007 *Biophys. J.* **93** 3989
- [55] Otten M, Ott W, Jobst M A, Milles L F, Verdorfer T, Pippig D A, Nash M A, Gaub H E 2014 *Nat. Methods* **11** 1127
- [56] Baumann F, Heucke S F, Pippig D A, Gaub H E 2015 *Rev. Sci. Instrum.* **86** 035109
- [57] Ando T, Uchihashi T, Fukuma T 2008 *Prog. Surf. Sci.* **83** 337
- [58] Lee H, Scherer N F, Messersmith P B 2006 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103** 12999
- [59] Li Y, Qin M, Li Y, Cao Y, Wang W 2014 *Langmuir* **30** 4358

SPECIAL TOPIC — Progress in Soft Matter Research

Mechanical properties of elastomeric proteins studied by single molecule force spectroscopy*

Zhou Hao-Tian¹⁾ Gao Xiang¹⁾ Zheng Peng²⁾ Qin Meng^{1)†} Cao Yi^{1)‡} Wang Wei¹⁾¹⁾ (School of Physics, Nanjing University, Nanjing 210093, China)²⁾ (School of Chemistry and Chemical Engineering, Nanjing University, Nanjing 210023, China)

(Received 30 May 2016; revised manuscript received 18 August 2016)

Abstract

Elastomeric proteins are a special class of proteins with unique mechanical functions. They bear, transduce mechanical forces inside cell, and serve as biomaterials of high elasticities and strengths outside cell. Depending on their functions, the mechanical properties of elastomeric proteins are very diverse. Some of them are of high mechanical stability and the others are of high extensibility and toughness. Although many elastomeric proteins are engineered for the applications in the fields of biomaterials and nanotechnology, the molecular determinant of the mechanical stability remains elusive. In this review, we summarize recent advances in the field of protein mechanics studied by using single molecule force spectroscopy. Force spectroscopy enables people to probe the unfolding properties of protein domains, thus paving the way for building special proteins with characteristic mechanical functions. To begin with, it is necessary to clarify the factors and their relations with the unfolding force, which is deduced based on Bell's expression. It turns out that the unfolding force is proportional to pulling speed when the speed is relatively small, and has a logarithmic relation in the high-speed approximation. After the external determinant of the force probe is clarified, some intrinsic factors are to be discussed. Hydrogen bond and electrostatic force, rather than covalent bond, contribute to the mechanical performances of proteins. Those interactions rely on the topology structures of protein molecules. By changing the structures of proteins, researchers now manage to change the mechanical characteristics of certain proteins. Since single protein

* Project supported by Six Talent Peaks Project in Jiangsu Province China and the National Natural Science Foundation of China (Grant Nos. 21522402, 11374148, 11334004, 81121062).

† Corresponding author. E-mail: qinmeng@nju.edu.cn

‡ Corresponding author. E-mail: caoyi@nju.edu.cn

is unable to be detected by traditional optic microscope, three devices used to observe and manipulate single protein are introduced in the present paper. These include atomic force microscopy, magnetic tweezers and optical tweezers. Among them, a more detailed explanation of atomic force microscope (AFM) is provided, which briefly describes the basic mechanism and structure of AFM and possible explanation for the formation of force-extension curves. After that, several recent advances for improving the AFM based single molecule force spectroscopy techniques are highlighted. For example, Tom Perkins group [Sullan R M A, Churnside A B, Nguyen D M, Bull M S, Perkins T T 2013 *Methods* **60** 131] has discovered that the gold-stripped tip gives more accurate and reproducible results than a gold-coated one. Matthias Rief group [Schlierf M, Berkemeier F, Rief M 2007 *Biophys. J.* **93** 3989] has managed to increase the resolution of AFM, pushing it in pair with optical tweezers. Hermann Gaub *et al.* [Otten M, Ott W, Jobst M A, Milles L F, Verdorfer T, Pippig D A, Nash M A, Gaub H E 2014 *Nat. Methods* **11** 1127] combined the microfluidic chip and DNA expression in vitro to increase the yields of interpretable single-molecule interaction traces. Toshio Ando *et al.* [Ando T, Uchihashi T, Fukuma T 2008 *Prog. Surf. Sci.* **83** 337] have developed methods to increase the imaging speed of AFM. Finally, the rationally designing the mechanical properties of protein-based materials pioneered by Hongbin Li group is highlighted. They have discovered direct relationship between the mechanical properties of individual proteins and those of the protein materials. To sum up, with AFM, scientists now can explore mechanical properties of a wide range of proteins, which enables them to build biomaterials with exceptional mechanical features.

Keywords: single molecule force spectroscopy, atomic force microscopy, poly protein, biomaterials

PACS: 87.64.Dz, 87.80.-y, 87.80.Nj, 87.85.jf

DOI: [10.7498/aps.65.188703](https://doi.org/10.7498/aps.65.188703)