

单分子动力学研究大肠杆菌单链结合蛋白与单链DNA的结合过程

陆越 马建兵 滕翠娟 陆颖 李明 徐春华

Binding process between *E. coli* SSB and ssDNA by single-molecule dynamics

Lu Yue Ma Jian-Bing Teng Cui-Juan Lu Ying Li Ming Xu Chun-Hua

引用信息 Citation: *Acta Physica Sinica*, 67, 088201 (2018) DOI: 10.7498/aps.67.20180109

在线阅读 View online: <http://dx.doi.org/10.7498/aps.67.20180109>

当期内容 View table of contents: <http://wulixb.iphy.ac.cn/CN/Y2018/V67/I8>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

[单分子荧光共振能量转移数据处理的优化算法](#)

An optimization algorithm for single-molecule fluorescence resonance (smFRET) data processing

物理学报.2017, 66(11): 118701 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.66.118701>

[磁镊结合DNA发夹的方法在RecA蛋白介导的同源重组机制研究中的潜在应用](#)

Combination of magnetic tweezers with DNA hairpin as a potential approach to the study of RecA-mediated homologous recombination

物理学报.2016, 65(21): 218702 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.65.218702>

[软物质实验方法前沿: 单分子操控技术](#)

Frontier of soft matter experimental technique: single molecular manipulation

物理学报.2016, 65(18): 188706 <http://dx.doi.org/10.7498/aps.65.188706>

[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>

单分子动力学研究大肠杆菌单链结合蛋白与单链DNA的结合过程*

陆越¹⁾²⁾ 马建兵¹⁾²⁾ 滕翠娟¹⁾²⁾ 陆颖¹⁾²⁾ 李明¹⁾²⁾ 徐春华^{1)†}

1) (中国科学院物理研究所, 北京凝聚态物理国家研究中心, 北京 100190)

2) (中国科学院大学物理科学学院, 北京 100049)

(2018年1月16日收到; 2018年2月6日收到修改稿)

大肠杆菌单链结合蛋白 (*E. coli* SSB) 具有与单链 DNA (single-stranded DNA, ssDNA) 结合的性质, 起着保护 ssDNA 及引导相关蛋白质反应的重要作用, 然而, 它与 ssDNA 的结合过程及其细节尚未得到确定的研究结果. 本文采用单分子磁镊对 *E. coli* SSB/ssDNA 复合体进行拉力测试, 并采用单分子化学反应动力学方法对测试结果进行分析. 研究发现: *E. coli* SSB 在 ssDNA 上的结合过程分为两个不同的阶段, 一个是在临界力下快速的结合缠绕阶段, 一个是随着力的进一步减小逐步缠绕的阶段. 从中得到了 *E. coli* SSB 与 ssDNA 的化学反应系数, 并得到了相应的自由能参数. 采用自由能校准的方法, 得到了 SSB 与 ssDNA 结合的完整自由能曲线, 从而揭示了 *E. coli* SSB 与 ssDNA 的结合特征. 本文的分析方法也可以应用于相似的化学反应的研究中.

关键词: 单分子动力学, 单链结合蛋白, 结合过程, 自由能

PACS: 82.37.Np, 87.15.Kj, 87.80.Nj, 87.15.H-

DOI: 10.7498/aps.67.20180109

1 引言

生物细胞中的 DNA 分子常以双螺旋结构稳定存在, 然而在 DNA 代谢中, DNA 双链有时需要打开产生单链 DNA, 而单链 DNA 容易遭到攻击和破坏, 从而影响细胞的生存. 因此, 一类名为单链结合蛋白的分子会参与到 DNA 代谢中^[1,2]. 单链结合蛋白往往具有两方面的作用: 它能以很高的亲和力结合单链 DNA 分子, 并且不具备序列特异性, 由此防止其他蛋白降解单链 DNA 分子; 另外, 单链结合蛋白还可以与一系列的蛋白发生相互作用, 例如 RecA, Pol II 等, 引导它们与单链 DNA 结合, 促进反应, 起到介导的作用^[1-9].

单链结合蛋白广泛存在于生物界, 从低等的原核生物到高等的真核生物中, 单链结合蛋白都不可

或缺. 其中, 最具有代表性的单链结合蛋白就是大肠杆菌的单链结合蛋白 *E. coli* SSB, 这种蛋白是一种同源四聚体, 每个亚基的分子量大约 18.9 kD, 四个亚基结合而成的复合物具有极高的稳定性, 在很低的浓度下也不会解离^[5,9-11]. 单链结合蛋白的亚基 N 端会形成类似球状的结构, 它上面的基团可以和单链 DNA 的碱基结合, 从而将单链 DNA 锚定于亚基上. 单链结合蛋白亚基的 C 端则是柔性尾链, 可以和相关的蛋白结合, 从而起到募集和催化的作用^[6,12,13].

大肠杆菌的单链结合蛋白具有一种很特殊的性质: 当溶液中的盐离子浓度 (例如 NaCl) 不同时, *E. coli* SSB 与单链 DNA 具有不同的结合模式^[10,14]. 当盐离子浓度较高时 (200 mM 以上), 单个 SSB 分子可以结合 65 nt 的单链 DNA, 此时 4 个亚基全部参与反应; 当盐离子浓度较低 (20 mM 以

* 国家自然科学基金 (批准号: 11574381, 11574382) 资助的课题.

† 通信作者. E-mail: xch@iphy.ac.cn

下)时,单个SSB分子可以结合35 nt的单链DNA,此时只有两个亚基参与反应;而盐离子浓度位于二者之间(20—200 mM)时,单个SSB分子可以结合56 nt的单链DNA.这个性质可能与SSB在代谢的不同阶段参与不同的反应过程有关.

大肠杆菌SSB的特殊性质引起了许多研究者的兴趣,人们通过不同的手段对SSB结合ssDNA的过程进行了研究.早期的研究者采用停流实验(stop flow)结合标记荧光淬灭的体实验方法来研究SSB的结合过程.然而,SSB结合ssDNA的高亲和力使得反应极为迅速,而且几乎不可逆,这让传统的体实验手段难以得到完整而准确的结合过程信息^[15].单分子力谱实验手段为研究者提供了新的方法^[16].例如,Zhou等^[17]在500 mM NaCl,20 mM Tris-HCl的条件下用光镊进行了拉伸实验,根据实验结果,SSB在不同力下会逐渐从ssDNA上连续剥离,随后掉落;然而,他们并没有观察到SSB结合或脱落过程的细节,因此未能对SSB的结合过程给出更多分析.而Suksombat等^[18]的实验则是在10 mM NaCl,100 mM Tris-HCl的条件下进行,实验结果显示,SSB随着力的逐步升高会分步从ssDNA上剥离,每一步解缠绕后SSB上剩余的结合碱基数都对应着特定的结合模式,分别为56,35,17 nt.然而,这种现象可能是在特定反应条件下的特殊表现,不适用于解释普遍公认的3种结合模式中的反应动力学问题.

在化学反应中,自由能结构决定了反应的特征与细节,并与表征反应速率的化学反应系数密切相关,可以说,能量的变化是化学反应的核心要素.为了完整描述*E. coli* SSB与ssDNA结合的过程,我们设计了单分子磁镊实验,采用单分子动力学方法计算化学反应系数,并从化学反应系数中得到自由能结构并进行修正,得到了整个反应过程的完整信息.

2 实验设计

2.1 玻片的清洗和修饰

盖玻片使用丙酮/甲醇先后超声清洗,再放入浓硫酸:双氧水体积比为7:3的洗液中,95 °C水浴加热,处理约120 min,之后使用Sigmacote(购于Sigma-Aldrich公司)处理盖玻片表面,120 °C孵育约30 min,随后抽真空避光保存.具体方法详见参考文献^[19, 20].

2.2 样品的制备

实验使用的DNA如图1(a)所示.双链手柄部分为2300 bp;70 nt PolyT,用于与SSB进行反应,同时避免形成二级结构;40 bp hairpin,用于判断磁球与玻片表面之间的连接是否为单根DNA^[21].DNA两端分别修饰了biotin分子和地高辛分子.*E. coli* SSB购于Sigma公司,实验使用的磁球购于Invitrogen公司(M280),直径大约为2.8 μm,表面由streptavidin修饰,可以与biotin分子特异性结合.

2.3 实验体系的构建

用Sigmacote处理过的盖玻片和清洗过的载玻片制作样品槽,使用抗地高辛溶液处理表面,抗地高辛分子会被非特异性地吸附于表面,并用钝化缓冲液(主要成分是BSA,NaN₃,表面活性剂等)处理表面,防止磁球的非特异性吸附.实验时将磁球和DNA按一定比例混匀,孵育大约10 min,稀释后加入样品槽中,静置5 min,冲洗多次,即完成实验体系的构建(如图1(a)).

2.4 SSB拉伸实验

首先直接拉伸DNA,通过在14 pN左右出现hairpin的反复开合现象找到单根DNA连接的磁球.将SSB母液用反应buffer(20 mM Tris-HCl,pH = 8.0;120 mM NaCl)稀释至实验所需浓度,灌入样品槽中孵育10 min,随后进行拉力实验.逐步变化拉力,观察DNA的长度变化并记录.

3 实验结果与分析

3.1 反应现象

在实验中,逐步将磁铁远离磁球,由此实现阶梯状变力(图1(b)中蓝色曲线),并观察反应现象.可以发现,随着拉力降低,DNA缩短;当拉力降至大约8 pN时,出现了一个特殊的现象:DNA的长度开始出现往复的跳动,长度大约8 nm,当拉力继续降低时,跳动终止,长度停留在缩短态上.当拉力继续降低时,DNA的长度继续缩短,不再出现类似二态的跳动(图1(b)中黑色曲线).由于在不加SSB的DNA对比拉伸实验中并未在8 pN及附近区域出现这样的二态跳变,因此认为这一现象是由SSB与ssDNA的相互作用引起的.

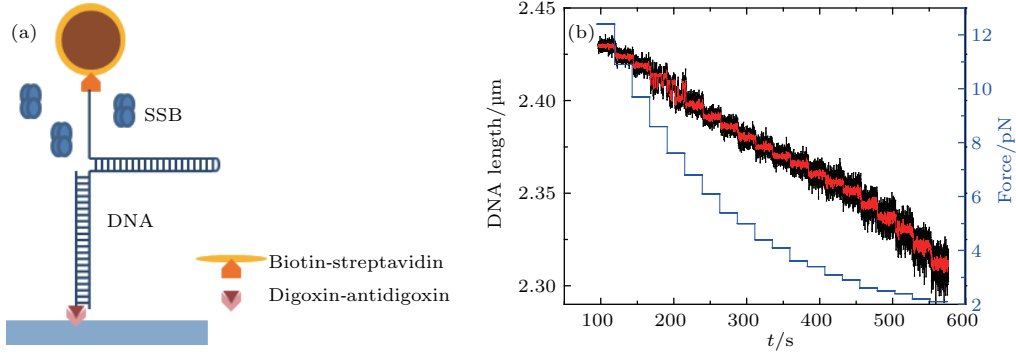


图1 拉伸实验简介 (a) 实验体系构建; (b) 拉力实验结果, 黑色曲线为DNA长度变化原始曲线, 红色曲线为平滑结果, 蓝色曲线为磁力大小

Fig. 1. Stretching experiment introduction: (a) Experiment system; (b) data curve of the experiment, black line is the change of DNA length, red line is the smoothed line, blue line is the change of force.

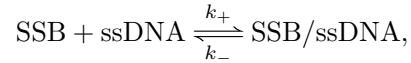
3.2 反应性质的确定

理论上, 由SSB引起的DNA长度缩短一定包含了单链DNA在SSB上的缠绕过程. 但还不能确定在实验中观察到的DNA处于“二态”变化中的伸长态时, SSB是否还结合在ssDNA上? 如果伸长态时SSB仍然保持与ssDNA的结合, 那么“二态”所对应的变化即为ssDNA在同一SSB分子上的“缠绕-去缠绕”过程. 如果伸长态时SSB与ssDNA发生了解离, 那么“二态”所对应的变化即为不同SSB分子与ssDNA的“结合并缠绕-解离”过程.

研究的“二态”反应现象的驻留时间十分重要. 驻留时间是指二态或多态反应体系在某一个状态下停留的时间长度, 它的长短可以表征反应体系在该状态下的稳定程度以及反应的难易程度^[22]. 驻留时间长度的分布规律往往与化学反应的类型存在密切关系. 因此, 通过研究“二态”实验现象中处于两个状态下各自的驻留时间 τ_{binding} 和 $\tau_{\text{unbinding}}$ 的分布来确定这个现象的具体性质(如图2(a)).

若“二态”对应同一SSB分子的“缠绕-去缠绕”过程, 那么, 无论这个体系处于哪一个状态中, 溶液中蛋白的浓度都与它处于该状态下驻留时间的长短无关, 即ssDNA伸长的“去缠绕”态和缩短的“缠绕”态驻留时间分布都与蛋白浓度无关; 反之, 若这个现象对应的是不同SSB分子与ssDNA进行的“结合-解离”过程, ssDNA未结合SSB的解离态驻留时间会明显受到SSB分子浓度的影响. 实验中在不同浓度下观察, 发现在不同蛋白浓度下“二态”现象的驻留时间分布特征有所不同. 所以我们认为观察到的现象是SSB分子的往复结合/解

离. 在这种情况下, SSB的结合和解离导致了长度的变化. 在特定拉力下, SSB会出现反复的结合和解离, 当SSB结合时, ssDNA缠绕在SSB上, 导致了长度的减少; 当SSB解离时, ssDNA完全伸展, 导致长度的增大. 此时, 按照化学反应动力学可以得到以下关系^[22-24]:



$$\begin{aligned} & P_{\text{ssDNA}}(t + dt) \\ &= P_{\text{ssDNA}}(t) - k_+ \cdot P_{\text{ssDNA}}(t) \cdot [\text{SSB}] \cdot dt, \\ & P_{\text{SSB/ssDNA}}(t + dt) \\ &= P_{\text{SSB/ssDNA}}(t) - k_- \cdot P_{\text{SSB/ssDNA}}(t) \cdot dt, \quad (1) \end{aligned}$$

$P(t)$ 是指ssDNA或SSB/ssDNA分子保持其状态的时长达到 t 的概率, 其分布规律即为驻留时间 τ_{binding} 和 $\tau_{\text{unbinding}}$ 的分布^[22-24]. 由以上关系可以得出, 位于伸长态与缩短态的复合物分子保持在当前状态时长(驻留时间)的概率分布存在以下关系:

$$\begin{aligned} P_{\text{ssDNA}}(t) &= C_1 e^{-k_1 t}, \\ k_1 &= k_+ [\text{SSB}], \\ P_{\text{SSB/ssDNA}}(t) &= C_2 e^{-k_2 t}, \\ k_2 &= k_-. \quad (2) \end{aligned}$$

此时的驻留时间分布呈指数特征, 当SSB浓度改变时, 系数 k_1 与SSB的浓度呈正比, 系数 k_2 为常数.

因此调整拉力, 观察到SSB二态现象出现后, 保持拉力不变, 改变SSB的浓度, 在各蛋白浓度下对该现象进行长时间测量, 并以此统计伸长态和缩短态驻留时间分布与蛋白浓度的关系(如图2(a)所示). 结果发现, 对于拉伸曲线中伸长态与缩短态,

驻留时间分布都呈指数形式(如图 2(b)和图 2(c)所示). 然而, 伸长态的系数 k_1 与蛋白浓度存在正比关系, 而对于缩短态, 驻留时间分布的系数 k_2

则保持不变, 这与我们的推断相符合(如图 2(d)所示). 这说明, 观察到的“二态”现象从本质上是 SSB 在 ssDNA 上的往复结合与解离.

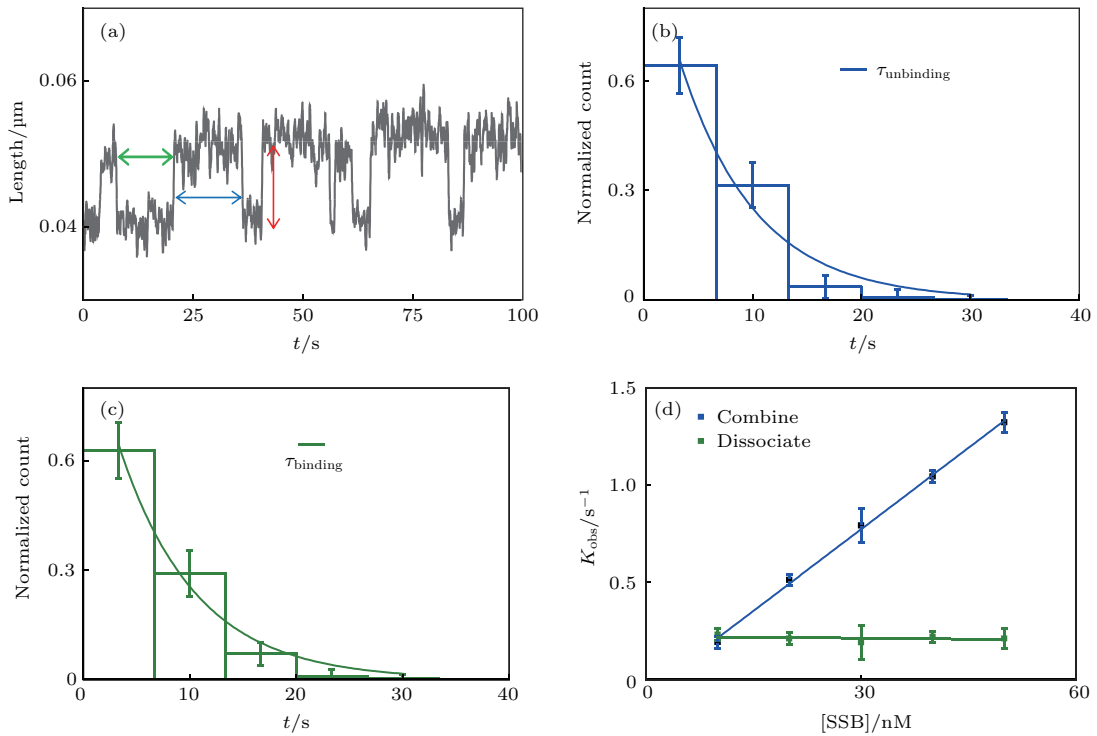


图 2 “二态”现象研究 (a) “二态”现象实验曲线及分析参量示意, 蓝色箭头所示为解离态驻留时间, 绿色箭头所示为结合态驻留时间, 红色箭头所示为长度变化; (b) 解离态驻留时间 $\tau_{\text{unbinding}}$ 分布; (c) 结合态驻留时间 τ_{binding} 分布; (d) 反应速率与蛋白浓度的关系, 蓝色曲线为结合速率, 绿色曲线为解离速率

Fig. 2. Analysis of the “double states” phenomenon: (a) Interaction curve and parameters, blue arrow region means the dwell time of dissociation state, green arrow region means the dwell time of combination state, red arrow region means the change of length; (b) dwell time distribution of dissociation state $\tau_{\text{unbinding}}$; (c) dwell time distribution of combination state τ_{binding} ; (d) relationship between interaction rate and protein concentration, blue symbols and line mean the combination rate, green symbols and line mean the dissociation rate.

3.3 拉力对结合/解离现象的影响

对 SSB 的结合/解离过程进行更为细致的研究. 在前面的实验中发现, 当拉力不同时, SSB 结合/解离的现象有所不同, 因此溶液中 SSB 浓度保持在 10 nM 条件下, 观察不同拉力下 SSB 的结合/解离过程. 发现当拉力较大时, ssDNA 的长度更多处于伸长的状态下, 这意味着当拉力较大时, SSB 趋向于与 ssDNA 解离; 当拉力较小时, 情况刚好相反, SSB 会趋向于结合在 ssDNA 上从而使长度变短. 从前面的理论分析可知, 不同的驻留时间分布对应着不同的化学反应系数. 所以对其驻留时间分布进行分析, 发现随着拉力逐渐升高, SSB/ssDNA 反应的解离系数出现明显的上升, 而结合系数则基本不变(如图 3(a)所示). 这说明, 拉

力会阻碍 SSB 的结合, 促进 SSB 的解离. 这一结果与 Zhou 等^[17]的结论一致. 可以选取结合态与解离态弛豫时间相等的状态作为临界态(如图 3(a)两线交点), 可认为此时 SSB 的结合与解离处于平衡态, 临界反应速率为 $k_{\text{obs}} = 0.19 \text{ s}^{-1}$, 临界力 $F_c = 8.2 \text{ pN}$.

3.4 SSB/ssDNA 结合的“二态”过程是不完全缠绕

在临界力下测量了化学反应导致的 DNA 长度变化, 如图 2(a)所示. 由于 SSB 与 ssDNA 结合时, ssDNA 碱基缠绕至蛋白上, 会造成 DNA 长度的缩短, 同时 ssDNA 结合在 SSB 上时首末端并不重合, 存在一定的首末端距离, 因此, 可以根据两者的差值变化计算结合的碱基数. 通过几何模型分析(如

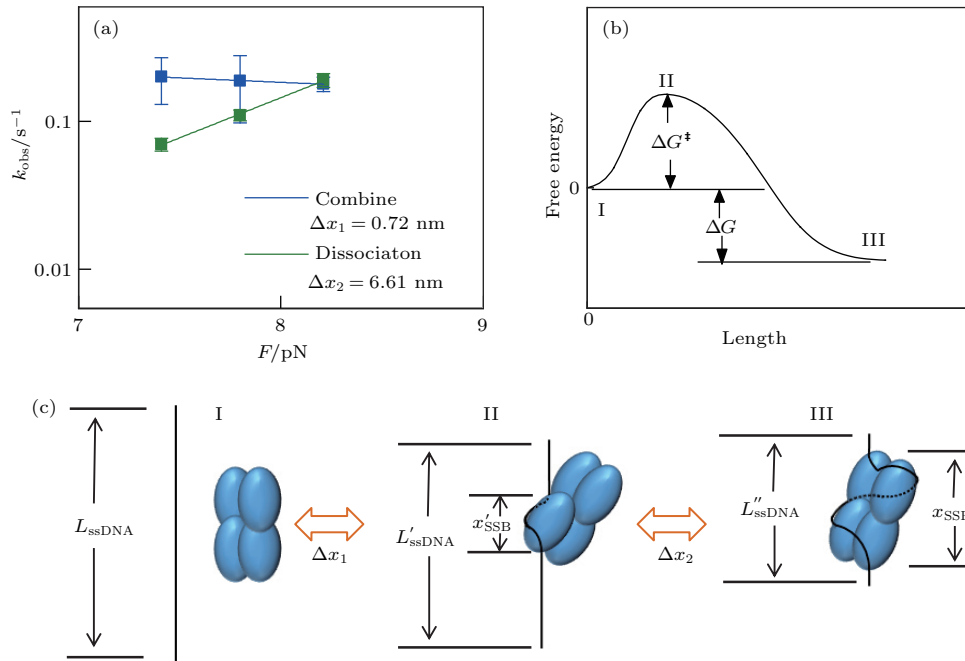


图3 拉力对SSB结合/解离过程的影响 (a) 反应速率随拉力变化关系, 蓝色曲线为结合速率的变化, 绿色曲线为解离速率的变化; (b) 结合/解离现象跨越势垒过程自由能变化示意; (c) 结合/解离现象跨越势垒过程结构变化示意
 Fig. 3. Force influences the combine/dissociate process of SSB/ssDNA: (a) Relationship between interaction rate and force, blue symbols and line mean the combination rate, green symbols and line mean the dissociation rate; (b) schematic illustration of the free energy change during interaction crossing the energy barrier; (c) schematic illustration of the structure change during interaction crossing the energy barrier.

图3(c) 右边 III 结构) 容易得到关系^[17,18]:

$$N_w = \frac{\Delta x(F) + x_{SSB}}{\xi_{ss}(F)}, \quad (3)$$

式中 N_w 为碱基数, $\Delta x(F)$ 为反应长度变化, $\xi_{ss}(F)$ 为 ssDNA 在拉力 F 下的单个碱基长度, x_{SSB} 为 ssDNA 在 SSB 缠绕的首末端距离. 通过实验得到 $\Delta x(F)$ 约为 8 nm, 在本文的实验条件下, 拉力为 8.2 pN 时碱基长度大约为 0.3 nm^[25]. 可以根据 SSB 的结构模型推测结合碱基长度以及首末端距离的关系是否符合这一关系, 从而判断具体的结合模式是否合理. 然而, 符合该公式的碱基数为 35 nt. 这一结论与理论的结果并不符合, 因为在 120 mM NaCl 条件下, SSB 的结合模式应该趋向于 56 nt^[11].

对 SSB/ssDNA 的拉伸曲线进行了对比, 如图 4(a) 所示, 若 SSB 并未结合 ssDNA, 那么理论拉伸曲线应该是绿色曲线; 而如果 SSB 以 35 nt 模式结合了 ssDNA, 随后不再进一步结合, SSB/ssDNA 系统的拉伸曲线应该为蓝色曲线. 但从本文的拉伸结果上看, 随着力的进一步降低, ssDNA 的长度变化比起蓝色和绿色曲线的变化趋势更为明显, 显示出 SSB 可能存在的进一步结合过程. 而这一过

程并未以类似二态跳动的形式存在, 因此我们推测 SSB 随拉力变化存在一个由跳变 + 渐变组成的结合过程.

化学反应过程中, 需要一个活化能使反应体系的自由能跨越势垒, 从而到达另一个稳定态^[26]. 在 SSB 的结合过程中, 存在两个明显区分的步骤, 分别为跳变与渐变, 它们对应着两种不同的自由能结构: 跳变对应着一个较大的单独势垒, 跨越势垒时反应长度也较大, 当吸收足够的活化能时, 体系可以越过这一较大的势垒到达另一个稳定态; 渐变则对应着一系列的小型势垒, 其高度较低, 跨越势垒时对应的反应长度也较小, 因此没有观察到明显的二态跳动. 可以使用不同的方法分别计算两种自由能结构对应的能量变化.

3.5 修正拉力对 SSB 结合自由能的影响

对于跳变过程, 可以通过计算化学反应系数得到自由能的变化. 本文的一系列拉伸实验是在大约 8 pN 下进行的, 但在生物体内, SSB 与 ssDNA 结合时, 有可能并不存在拉力作用. 因此, 我们希望能计算出拉力为零时的化学反应系数以及自由能结构. 当拉力为恒力时, 存在如下关系:

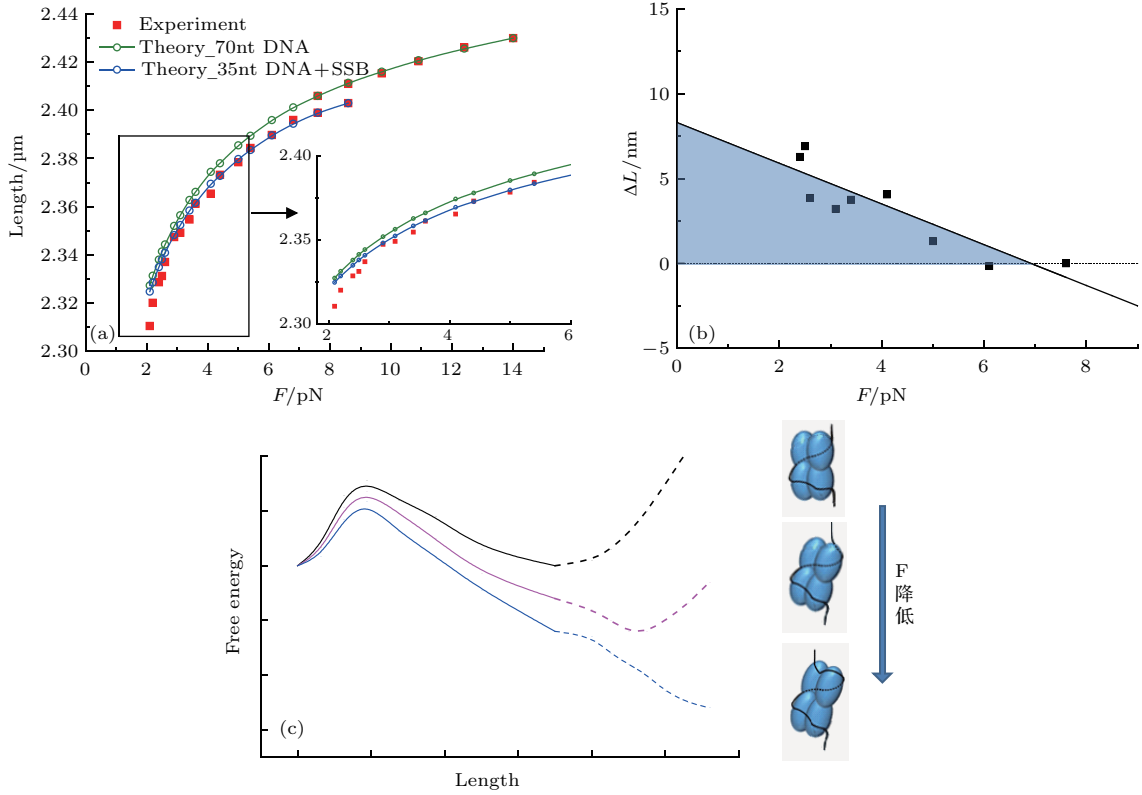


图4 小力下逐步缠绕自由能的修正 (a) 拉伸曲线与理论曲线的对比, 红色点为实验测量点, 绿色曲线为 ssDNA 的拉伸长度理论变化, 蓝色曲线为 SSB 以 35 nt 模式结合的理论长度变化, 嵌入图为黑框部分放大; (b) 拉伸曲线和理论曲线的差值积分, 蓝色区域为积分面积; (c) SSB 结合 ssDNA 自由能变化示意

Fig. 4. Calibration of the step-by-step wrapping's free energy under low force: (a) Comparison between data curve and theoretical curve, red symbols are experiment data, green line means the theoretical force-tension curve of ssDNA only, and the blue line means the theoretical force-tension curve of 35 nt binding mode SSB/ssDNA complex, the inset shows the details in the black frame; (b) integral of deviation between experiment curve and theoretical curve, blue area is the integral area; (c) demonstration of the change of free energy during the SSB binding process.

$$k(F) = k(0) \exp \left[\int_0^F x(F') dF' / (k_B T) \right]. \quad (4)$$

(4) 式被称为 Bell 公式^[27], 它表征了化学反应系数随拉力变化的规律, 其中 $k(F)$ 表示拉力为 F 时的化学反应系数, $k(0)$ 表示拉力为零时的化学反应系数, $x(F')$ 为拉力处于 F' 时 DNA 的长度. 由于得到了不同拉力下的化学反应系数, 因此, 可以利用 (4) 式计算化学反应系数在拉力为零时的值. 为了实现这个目的, 需要求出 Bell 公式中积分项的值, 该积分项对应着拉力从零变为 F 的过程中能量的变化, 其核心是 $x(F')$ 随拉力的变化关系. 可以通过图 3(c) 中的化学反应结合模型进行计算.

SSB 结合 ssDNA 的过程可以分为两个阶段: 结合并跨越势垒的阶段, 如图 3(b) 中 I 和 II 两点之间的变化, 对应图 3(c) 中 I 和 II 两点之间的结构变化; 跨越势垒后的缠绕阶段, 如图 3(b) 中 II 和 III 两点之间的变化, 对应图 3(c) 中 II 和 III 两点之

间的结构变化. 它们的长度变化分别为 Δx_1 和 Δx_2 , 由前面提到的模型, 反应长度的变化同样由碱基的结合以及首末端距离决定, 因此存在以下关系^[17,18]:

$$\begin{aligned} \Delta x_1 &= L_{\text{ssDNA}} - L'_{\text{ssDNA}} \\ &= N_{w1} \xi_{\text{ssDNA}}(F) - x'_{\text{SSB}}, \\ \Delta x_2 &= L'_{\text{ssDNA}} - L''_{\text{ssDNA}} \\ &= N_{w2} \xi_{\text{ssDNA}}(F) + x'_{\text{SSB}} - x_{\text{SSB}}, \end{aligned} \quad (5)$$

(5) 式中各参数的含义如图 3(c) 所示, L_{ssDNA} , L'_{ssDNA} 和 L''_{ssDNA} 分别对应不同结合阶段 DNA 的长度, x_{SSB} 和 x'_{SSB} 分别对应不同结合阶段 DNA 结合在 SSB 上的首末端距离. $\xi_{\text{ssDNA}}(F)$ 对应单链 DNA 在拉力大小为 F 时的碱基长度, N_{w1} 和 N_{w2} 分别对应相应步骤中结合的碱基数, 反应时临界力为 $F_c = 8.2$ pN. 将 (5) 式代入 (4) 式, 可以得到:

$$\begin{aligned}
 k_+(F) &= k_+(0) \exp \left[\int_0^{F_c} (N_{w1} \xi_{ssDNA}(F) - x'_{SSB}) dF' / (k_B T) \right], \\
 k_-(F) &= k_-(0) \exp \left[\int_0^{F_c} (N_{w2} \xi_{ssDNA}(F) + x'_{SSB} - x_{SSB}) dF' / (k_B T) \right],
 \end{aligned} \quad (6)$$

N_{w1} 与 N_{w2} 之和等于 35, $\xi_{ssDNA}(F)$ 与力的大小有关. 由于实验中观察到结合/解离现象的拉力区间很小, 长度变化不大, 因此, 可以近似认为在这个区间内, $\xi_{ssDNA}(F)$ 为常量. 由此, 在临界力附近的区域内可以得到如下关系:

$$\begin{aligned}
 k_+(F_2)/k_+(F_1) &= \exp[(N_{w1} \xi_{ssDNA}(F_c) - x'_{SSB}) \cdot (F_2 - F_1) / (k_B T)], \\
 k_-(F_2)/k_-(F_1) &= \exp[(N_{w2} \xi_{ssDNA}(F_c) + x'_{SSB} - x_{SSB}) \cdot (F_2 - F_1) / (k_B T)].
 \end{aligned} \quad (7)$$

根据图 3(a) 中得到的 $k_+(F)$ 以及 $k_-(F)$ 随拉力变化的关系, 对 (7) 式进行拟合, 可以得到实验条件 $F_c = 8.2$ pN 时, Δx_1 和 Δx_2 分别为 0.72 nm 和 6.61 nm. 由此可见, 之所以结合系数随拉力变化的幅度较小, 是由于这个过程中长度变化 Δx_1 较小, 因此拉力做功对自由能的影响不大, 反应系数变化也不大; 解离系数则正好相反, 较大的 Δx_2 使得拉力会较大程度地作用于自由能, 从而影响解离系数 [28]. Δx_1 和 Δx_2 对应的 N_{w1} 和 N_{w2} 分别为 9 nt 和 26 nt, 这个结果在结构上也具有一定的合理性: SSB 在每个亚基上的结合区域核心长度大约为 9 nt [13], 这说明 SSB 跨越势垒结合 ssDNA 所需的正是一个结合核心的长度. 根据这一结果, 将 N_{w1} 和 N_{w2} 代入 (6) 式, 可以计算得出结合系数在拉力为零时的大小为 $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ($1 \text{ M} = 1 \text{ mol/L}$), 解离系数在拉力为零时的大小为 $1.13 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$.

可以根据化学反应系数计算自由能的各个参数, 由于化学反应系数与自由能之间存在阿伦尼乌斯关系 [26],

$$k_+ = \omega_1 e^{\frac{\Delta G_1}{k_B T}}, \quad k_- = \omega_2 e^{\frac{\Delta G_2}{k_B T}}. \quad (8)$$

(8) 式中, ΔG_1 对应着势垒的高度 ΔG^\ddagger , ΔG_2 对应体系两种状态之间自由能之差与势垒高度之和 $\Delta G^\ddagger + \Delta G_0$, ω_1 和 ω_2 是一个被称为尝试速率的参数, 在生物大分子反应之中, 一般可取 10^7 s^{-1} [26, 29–31]; 然而对于 ω_1 , 由于是双分子反应, 存在蛋白浓度对 k_+ 的量纲影响, 所以在此处取 $10^{16} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, 视为计算 nM 浓度量级的自由能参数. 因此, 可以得到, 此时的 $\Delta G^\ddagger = 19.1 k_B T$, $\Delta G_0 = -6.1 k_B T$.

然而, 这一结果对应的只是跳变阶段, 还需要对渐变阶段的自由能变化进行计算. 由于在渐变区域无法观察到跳变, 所以通过测量化学反应系数的

方法计算自由能是不可行的. 因此, 通过直接进行能量修正来计算渐变区域的自由能.

观察图 4(a) 中的实际拉伸曲线 (红色点) 和 35 nt 结合模式理论拉伸曲线 (蓝色) 并进行对比, 随着拉力逐渐降低, 两者的长度出现区别, 因此, 两者由于拉力做负功导致的自由能变化也是不同的. 对于两者而言, 自由能变化的差别对应着 SSB 与 ssDNA 渐变的结合自由能, 渐变的结合自由能正好等于两者在这个过程中拉力所做负功的差值 [28]. 因此, 只需要求出在拉力降低过程中理论 35 nt 结合曲线与实际拉伸曲线之间拉力做负功的差值, 即可得到渐变区域自由能下降的大小.

使用蓝色的理论 35 nt 结合曲线数值点减去红色的实验曲线数值点, 得到如图 4(b) 的结果, 可见随着拉力的减小, 两者的差值呈现逐渐增大的趋势. 由于差值呈现出与拉力大致线性的关系, 我们对差值采取线性拟合的方法并计算积分, 积分区域如图 4(b) 中蓝色区域所示. 得到在渐变过程中, 自由能的变化大约为 $6.8 k_B T$.

综合以上的结果可以得出当拉力为零时, 自由能曲线的势垒高度为 $19.1 k_B T$, 自由能之差为 $12.9 k_B T$. 同时也得到了 SSB 的结合过程, 如图 4(c) 所示, 其由两段组成: 35 nt 的跳动变化与 21 nt 的渐变. 这两段的变化可能是因为在本文的实验条件下, 跨越势垒需要一定的活化能, 当体系吸收一定的活化能跨越势垒之后, 由于 SSB 对 ssDNA 的高度亲和力, SSB 可以迅速地使 ssDNA 释放电荷 [32], 并结合在 SSB 上.

4 讨 论

本文的研究得到了 SSB 结合 ssDNA 方式为快速跳跃式结合 + 逐步缠绕式结合, 并得到了它的自

由能结构, 该结合自由能结构显示出SSB结合的一些特点. 根据实验结果, ssDNA与SSB结合/解离的过程中, 二者之间的结合力并不是一个恒力. 从零开始逐步增大拉力, 某些区域会先逐步解缠绕, 显示出较小且不均匀的结合强度; 而随着拉力变大至临界力, ssDNA则会直接从SSB上整段解离, 显示出均匀的较强的结合强度. 我们认为这一现象与SSB的电荷特征有关. SSB分子具有与 Cl^- 离子的高度亲和力^[32], 而DNA分子带负电荷, 二者之间同性相斥, 而同时二者之间又能相互结合形成氢键作用力^[13]. SSB某一区域对ssDNA的结合力是该区域这两种作用力相互竞争的结果. 而SSB分子上 Cl^- 离子的分布不均匀, 造成在SSB的不同区域显示出对ssDNA不同的结合力. 一些区域电荷密度较高, 电荷排斥作用明显, ssDNA分子与SSB的结合强度相对较小; 在电荷密度逐步降低的区域, 结合强度也逐步变大, 展现出SSB/ssDNA复合物随着拉力增大逐步解缠绕的特征; 而一些电荷密度最低的区域, 电荷排斥作用不明显, 氢键作用力占主要部分, 体现出较为一致的结合强度, 较大拉力才会破坏整体结合结构, 从而存在较高的反应势垒, 表现出“二态”现象的往复结合/解离. 这个特点显示, SSB的结合并不是一个能量均匀的过程, 整个的结合体系存在较大的能量密度差异. 这可能与SSB的生理功能有关, 可以通过改变结合强度调节SSB的两种功能的协调与转换: 保护ssDNA; 引导相关蛋白参与和ssDNA的反应.

5 结 论

通过磁镊拉伸实验结合单分子动力学分析的方法, 不仅可以研究单链结合蛋白的结合过程, 对于类似的化学反应, 例如DNA与其他蛋白的结合反应, 或蛋白的折叠变构等, 只要可以观察到拉力下存在长度变化的类似反应现象, 这种方法都是可行的. 这种方法不仅可以测量出高亲和力反应的结合过程, 还可以得出小势垒连续反应的自由能变化大小, 并由此得到具体的化学反应细节信息.

参考文献

- [1] Chase J W, Williams K R 1986 *Annu. Rev. Biochem.* **55** 103
- [2] Meyer R R, Laine P S 1990 *Microbiol. Rev.* **54** 342
- [3] Yuzhakov A, Kelman Z, O'Donnell M 1999 *Cell* **96** 153
- [4] Sun W, Godson G N 1998 *J. Mol. Biol.* **276** 689
- [5] Lohman T M, Ferrari M E 1994 *Annu. Rev. Biochem.* **63** 527
- [6] Shereda R D, Kozlov A G, Lohman T M, Cox M M, Keck J L 2008 *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **43** 289
- [7] Fu H X, Le S M, Chen H, Muniyappa K, Yan J 2013 *Nucleic Acids Res.* **41** 924
- [8] Bell J C, Plank J L, Dombrowski C C, Kowalczykowski S C 2012 *Nature* **491** 274
- [9] Waldman V M, Weiland E, Kozlov A G, Lohman T M 2016 *Nucleic Acids Res.* **44** 4317
- [10] Raghunathan S, Ricard C S, Lohman T M, Waksman G 1997 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94** 6652
- [11] Bujalowski W, Lohman T M 1986 *Biochemistry* **25** 7799
- [12] Kozlov A G, Cox M M, Lohman T M 2010 *J. Biol. Chem.* **285** 17246
- [13] Raghunathan S, Kozlov A G, Lohman T M, Waksman G 2000 *Nat. Struct. Biol.* **7** 648
- [14] Lohman T M, Bujalowski W, Overman L B 1988 *Trends Biochem. Sci.* **13** 250
- [15] Kozlov A G, Lohman T M 2002 *Biochemistry* **41** 6032
- [16] Qian H, Chen H, Yan J 2016 *Acta Phys. Sin.* **65** 188706 (in Chinese) [钱辉, 陈虎, 严洁 2016 物理学报 **65** 188706]
- [17] Zhou R B, Kozlov A G, Roy R, Zhang J C, Korolev S, Lohman T M, Ha T 2011 *Cell* **146** 222
- [18] Suksombat S, Khafizov R, Kozlov A G, Lohman T M, Chemla Y R 2015 *Elife* **4** e08193
- [19] Li J H, Lin W X, Zhang B, Nong D G, Ju H P, Ma J B, Xu C H, Ye F F, Xi X G, Li M, Lu Y, Dou S X 2016 *Nucleic Acids Res.* **44** 4330
- [20] Wang S, Qin W, Li J H, Lu Y, Lu K Y, Nong D G, Dou S X, Xu C H, Xi X G, Li M 2015 *Nucleic Acids Res.* **43** 3736
- [21] Wang S, Zheng H Z, Zhao Z Y, Lu Y, Xu C H 2013 *Acta Phys. Sin.* **62** 168703 (in Chinese) [王爽, 郑海子, 赵振业, 陆越, 徐春华 2013 物理学报 **62** 168703]
- [22] Lu H P, Xun L, Xie X S 1998 *Science* **282** 1877
- [23] Xie P, Dou S X, Wang P Y 2004 *Chin. Phys.* **13** 1569
- [24] Zhao Z Y, Xu C H, Shi J, Li J H, Ma J B, Jia Q, Ma D F, Li M, Lu Y 2017 *Chin. Phys. B* **26** 088701
- [25] Saleh O A, McIntosh D B, Pincus P, Ribbeck N 2009 *Phys. Rev. Lett.* **102** 068301
- [26] Kramers H A 1940 *Physica* **7** 284
- [27] Dudko O K, Hummer G, Szabo A 2008 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105** 15755
- [28] Taniguchi Y, Nishiyama M, Ishii Y, Yanagida T 2005 *Nat. Chem. Biol.* **1** 342
- [29] Pope L H, Bennink M L, van Leijenhorst-Groener K A, Nikova D, Greve J, Marko J F 2005 *Biophys. J.* **88** 3572
- [30] Yang W Y, Gruebele M 2003 *Nature* **423** 193
- [31] Woodside M T, Behnke-Parks W M, Larizadeh K, Travers K, Herschlag D, Block S M 2006 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103** 6190
- [32] Bujalowski W, Lohman T M 1989 *J. Mol. Biol.* **207** 269

Binding process between *E. coli* SSB and ssDNA by single-molecule dynamics*

Lu Yue¹⁾²⁾ Ma Jian-Bing¹⁾²⁾ Teng Cui-Juan¹⁾²⁾ Lu Ying¹⁾²⁾ Li Ming¹⁾²⁾ Xu Chun-Hua^{1)†}

1) (National Laboratory for Condensed Matter Physics, Institute of Physics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China)

2) (School of Physical Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

(Received 16 January 2018; revised manuscript received 6 February 2018)

Abstract

Single-stranded DNA binding proteins (SSBs) widely exist in different kinds of creatures. It can bind single-stranded DNA (ssDNA) with high affinity. The binding is sequence independent. SSB can also interact with different kinds of proteins, and thus leading them to work at the special sites. It plays an essential role in cell metabolism. *E. coli* SSB is a representative of SSB among all kinds of SSBs, it is a homotetramer consisting of four 18.9 kD subunits, the homotetramer is stable under low concentration. *E. coli* SSB has different binding modes under different salt concentrations (for example NaCl). When NaCl concentration is higher than 200 mM, *E. coli* SSB can bind 65 nt ssDNA, when NaCl concentration is lower than 20 mM, it can bind 35 nt ssDNA, and when the NaCl concentration is between 20 mM and 200 mM, it can bind 56 nt ssDNA. The characteristics of *E. coli* SSB are so attractive that a large number of researches have been done to distinguish its binding process. Earlier researchers tried to use stop flow technology to study the interaction between SSB and ssDNA in bulk. However, the high affinity between SSB and ssDNA makes this interaction too rapid to be observed at all, and the dissociate interaction even could not be measured. Single molecule technology which combines with low and accurate force offers researchers another way to achieve this goal. Some researchers observed the unwrapping phenomenon in an optical tweezers pulling experiment. However, they did not find the detailed process of binding or dissociation. In our work, we use a magnetic tweezer to pull the SSB/ssDNA complex and find a special phenomenon like double-state jump. Using the single molecule dynamics to analyse the data, we find that this phenomenon is the combination and dissociation between SSB and ssDNA. After comparing the pulling curve of ssDNA only and SSB/ssDNA complex, we find that the SSB binding process consists of two stages, one is rapid combination/dissociation under the action of a critical force; the other is continuous wrapping following the reduced force. According to Bell formula and SSB/ssDNA complex binding model, we obtain the interaction rate and free energy parameters under 0 pN, and we calibrate the free energy to obtain its continuous wrapping part, so we can obtain the whole free energy landscape and understand the binding process. Our analysis way is also applicable to the case of similar interactions to obtain their interaction details and free energy characteristics.

Keywords: single-molecule dynamics, single-stranded DNA binding proteins, binding process, free energy

PACS: 82.37.Np, 87.15.Kj, 87.80.Nj, 87.15.H-

DOI: 10.7498/aps.67.20180109

* Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant Nos. 11574381, 11574382).

† Corresponding author. E-mail: xch@iphy.ac.cn