

酰基辅酶 A 结合蛋白去折叠动力学的单分子磁镊研究*

张宇航¹⁾ 薛振勇¹⁾²⁾ 孙皓¹⁾²⁾ 张珠伟¹⁾²⁾ 陈虎^{1)2)†}

1) (厦门大学物理系, 生物仿生及软物质研究院, 福建省柔性功能材料重点实验室, 厦门 361005)

2) (国科温州研究院, 生物医学物理中心, 温州 325000)

(2023 年 4 月 4 日收到; 2023 年 5 月 9 日收到修改稿)

不同结构类型的蛋白质的力学稳定性和去折叠动力学有显著差异, 其中全部由 α 螺旋构成的蛋白质通常在较小的拉力作用下就会发生快速去折叠, 需要能够精准控制皮牛量级拉力的实验手段来进行定量研究. 酰基辅酶 A 结合蛋白 (ACBP) 是一种研究全 α 螺旋结构蛋白折叠/去折叠动力学性质的模型蛋白, 其由 86 个氨基酸残基形成一种由 4 个 α 螺旋组成的螺旋束结构. 本文利用磁镊对 ACBP 进行了恒定力加载速率的拉伸实验, 得到了不同力加载速率下的去折叠力的分布. 不同数据分析方法都显示 ACBP 具有超长的去折叠距离. 对比分子动力学模拟拉伸的结果, ACBP 的过渡态中整个 N 端 α 螺旋和部分的 C 端 α 螺旋发生了去折叠转变. 本研究显示单分子拉伸实验与分子动力学模拟相结合是揭示蛋白质构象转变的分子机制的可靠研究方法.

关键词: 磁镊, 蛋白质折叠, 过渡态, 分子动力学模拟

PACS: 87.80.Nj, 82.37.Rs, 87.15.A-, 87.14.E-

DOI: 10.7498/aps.72.20230533

1 引言

在生物体内部的各项生命活动中蛋白质均扮演着关键的角色. 蛋白质本身的遗传信息已经通过基因编码在一维的多肽链中, 然而, 蛋白质想要行使生物功能, 必须通过构象搜寻等方式获得其独特的三维结构. X 射线晶体衍射、核磁共振和冷冻电子显微镜等是获得蛋白质的三维结构的主要实验手段. 基于实验获得的大量数据, 最近在蛋白质结构预测领域取得的最重要进展就是 Alpha-fold 等人工智能工具^[1,2], 能够以接近实验测量的精度对蛋白质结构进行预测. 蛋白质作为一种生物活性物质, 其构象并非一成不变的, 蛋白质构象的转变在各项生命过程中也同样十分重要. 最重要的蛋白质

构象转变问题是其折叠与去折叠转变, 其在蛋白质从核糖体上翻译完成^[3], 到被蛋白酶降解^[4]等生命过程都是核心的关键步骤. 另外, 蛋白质的错误折叠可能会诱发很多疾病, 如阿尔兹海默症^[5]和帕金森氏病^[6]等. 因此蛋白质折叠这一研究领域受到越来越多研究人员的关注.

组成蛋白质的氨基酸有 20 种, 一些氨基酸还会形成顺反异构, 这意味着在蛋白质世界中, 存在超大规模的蛋白质可能构象. 蛋白质二级结构的形成是一种快速的动力学过程, 例如, α 螺旋结构能够在 100 ns 的时间尺度内形成, 尽管 β 折叠的形成速度略慢于 α 螺旋, 但通常也形成于 1 μ s 的时间尺度内^[7]. 生化实验、单分子操控实验以及计算机模拟的结果显示快速折叠的蛋白质可以在 μ s 时间尺度内完成折叠^[8], 而包含多个二级结构单元的

* 国家自然科学基金 (批准号: 11874309, 12174322) 和 111 项目 (批准号: B16029) 资助的课题.

† 通信作者. E-mail: chenhu@xmu.edu.cn

较大的蛋白质三维结构域往往需要 ms 或更长的时间才能形成. 从物理学自由能的视角出发, 人们认为蛋白质折叠可以由漏斗形的自由能景观所刻画, 自然状态处于自由能最小的漏斗底部^[9], 蛋白质的稳定性与折叠动力学取决于自由能曲面上最主要的折叠路径、可能的中间态以及不同状态间的能垒高度与位置等信息^[10], 复杂的蛋白质还可能不止一条折叠路径^[11,12].

酰基辅酶 A 结合蛋白 (acyl-CoA binding protein, ACBP) 是一种典型的 α 螺旋束结构的蛋白, 于 1983 年在小鼠的大脑中被首次发现, 在脂质合成、囊泡运输和基因调控等生命活动中均扮演重要的角色^[13]. 由于其具有简单的拓扑结构, ACBP 成为研究全 α 螺旋结构的蛋白质的动力学性质的一个重要模型蛋白. 此前生化实验发现 ACBP 折叠速度较快, 在折叠转变态中位于 N 端和 C 端的 α 螺旋都已经形成并通过疏水相互作用结合在一起^[14]. 单分子光镊实验显示 ACBP 在小于 10 pN 的拉力作用下就会发生去折叠转变, 这主要是由于其结构具有较强的柔性, ACBP 的自然状态结构需要发生较大的形变才跨越过渡态^[15].

单分子操纵技术, 包括光镊、磁镊和原子力显微镜等, 是研究蛋白质力学响应的重要实验手段^[16–18]. 每种技术有其适合的实验条件范围. 由于 ACBP 较弱的力学稳定性, 磁镊技术在小力下稳定长时间测量的技术特点使其非常适合于 ACBP 的研究^[19]. 本文设计了适合单分子测量的重组融合蛋白构建体, 利用磁镊拉伸 ACBP 蛋白, 测量了在不同拉力加载速率下 ACBP 的去折叠力的分布, 通过贝尔模型的理论公式对测量结果进行了拟合, 得到了 ACBP 的去折叠距离. 结合拉力作用下的分子动力学模拟工作^[20], 得到了和实验结果一致的 ACBP 在拉力作用下去折叠转变的过渡态结构.

2 材料和方法

2.1 ACBP 样品制备

本文设计并合成了 HisTag-AviTag-GB1-ACBP-GB1-SpyTag 蛋白构建体的基因序列 (金斯瑞, 中国), 其中 GB1 蛋白已经被单分子实验系统的研究过, 其特征信号可以用来区分目标蛋白与其他杂信号^[21,22]. 将目的片段插入 pET151 载体 (氨苄青霉

素抗性) 中, 然后转化到 BL21 大肠杆菌中, 将菌液均匀涂抹在添加了氨苄青霉素的固体 LB 培养基中, 在 37 °C 恒温培养箱中过夜培养. 挑选合适的单菌落接种至添加氨苄青霉素的 LB 液体培养基, 于 37 °C, 200 r/min 的摇床中培养至光密度达到 0.6, 随后在培养基中加入 50 μ mol/L 的 D-biotin 溶液并继续培养 30 min. 最后再加入一定体积浓度为 1 mol/L 的异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖 (IPTG) 溶液, 使终浓度控制在 0.25–1 mmol/L, 将摇床温度降低至 18 °C 进行重组蛋白表达, 这一过程将持续 12 h. 随后便可收集菌体, 使用冷冻离心机在 4 °C, 5000 r/min 条件下进行离心并移除上清液以获得菌体, 使用 30 mL 的裂解液 (50 mmol/L Tris、500 mmol/L 氯化钠、50% 甘油、5 mmol/L 咪唑、5 mmol/L 2-巯基乙醇, pH=8.0) 使菌体悬浮, 随后利用超声波细胞破碎仪进行菌体破碎. 选用 Ni-NTA Sefinose Resin (生工生物工程 (上海) 股份有限公司, 中国) 对重组蛋白进行纯化^[23]. 凝胶电泳图显示目的蛋白含量远超其他杂带蛋白, 满足单分子实验的要求 (见补充材料图 S1 ([online](#))). 将纯化后的蛋白质放于液氮速冻, 并储存在 -80 °C 冰箱中备用.

2.2 微流室制备

微流室制备所需的盖玻片规格有两种: 22 mm \times 22 mm 和 22 mm \times 32 mm. 首先将 22 mm \times 32 mm 盖玻片放置于超声波清洗机中洗净, 随后利用氧气等离子体清洗机进一步清洗活化表面, 待反应完成后, 浸入 1% 3-氨基丙基三乙氧基硅烷 (APTES, 货号 A3648, Sigma) 的甲醇溶液 1 h, 然后用甲醇溶液清洗 2–3 次后烘干. 使用剪切成流道形状的 Parafilm 将 APTES 功能化的 22 mm \times 32 mm 盖玻片与 22 mm \times 22 mm 的洁净盖玻片黏合, 并在两端使用封口胶制作蓄水凹槽. 待胶干燥后, 冲入直径为 3.0 μ m 的聚乙烯参考球 (货号 17145, Polysciences) 并孵育 15 min, 使其随机黏附至盖玻片表面. 用 400 μ L 的 1 \times PBS 缓冲液 (磷酸缓冲盐水, phosphate buffered saline) 冲洗未连接的参考球, 随后冲入 1% Sulfo-SMCC (货号 247420, Thermo Science) 并孵育 30 min, 加入溶解在 1 \times PBS 缓冲液中的 SpyCatcher 蛋白孵育 1 h. 孵育完成后, 用含量为 1% BSA (牛血清白蛋白) 的 PBS 缓冲液洗除未连接的蛋白, 并于 4 °C 中过夜孵育以

钝化盖玻片表面的非特异性相互作用。

在单分子实验前,使用含量 1% BSA 的 1×PBS 缓冲液将重组蛋白稀释至合适浓度冲入微流室,孵育 25 min. 随后加入链霉亲和素包被的顺磁球 M270 并孵育 5 min, 将含量 1% BSA 的 1×PBS 缓冲液中加入 10 mmol/L 的抗坏血酸钠并冲入微流室以防止蛋白质氧化变性, 最后用密封胶将微流室密封以防止蒸发, 至此构建了完整的蛋白质系绳。

2.3 分子动力学模拟

选用 Gromacs 5.1.4 软件中的 Amber99SB-ILDN 作为分子动力学模拟的力场并选用 SPC/E 水模型进行体系溶剂化, 共计添加 141951 个水分子. 在确保体系内部电荷平衡的前提下, 加入 100 mmol/L 的 NaCl, 系统最终加入 90 个钠离子和 89 个氯离子. 采用最陡峭下降法使系统的能量最小化至收敛. 随后进行 30 ps 的等粒子数等压等温系综平衡, 使模拟稳定在 300 K 温度下 (与实验温度一致). 在模拟开始前, 需确保蛋白质 N-C 端取向与拉伸方向相同, 最后使用弹性系数 $k = 600$ pN/nm 的虚拟弹簧拉伸蛋白质的 N-C 两端, 弹簧的移动速度设置为 $v = 0.01$ nm/ps, 模拟完成后提取蛋白质去折叠过程中的构象 [24].

3 实验结果

3.1 确定目标蛋白

在设计单分子结构中, ACBP 两端各链接一个 GB1 蛋白作为指纹信号, C 端的 SpyTag 能够与玻璃表面的 SpyCatcher 进行特异性连接, N 端的 D-biotin 能够与链霉亲和素包被的顺磁球 M270 相连, 从而形成完整的单分子连接体系, 如图 1(a) 所示。

在磁镊设备中, 磁球上施加的力主要借助于顶部永久磁铁产生的梯度磁场. 在 30 pN 拉力以下, 拉力与磁铁到样品的距离呈指数依赖关系 [19]. 这样一来, 只要将磁铁的移动方式设置为时间的对数函数, 逐渐增加的拉力就可以与时间保持良好的线性关系. 在更大的拉力范围内, 拉力与距离呈现双指数函数加和的依赖关系, 同样可以控制磁铁的移动方式, 实现恒定的力加载速率. 首先采用 1 pN/s 的恒定力加载速率, 将拉力从 0.5 pN 加载至 40 pN, 在这一过程中, 可以依次观察到 3 个比较明显的去折叠信号, 如图 1(b) 所示. 其中 9 pN 位置出现的 14 nm 的去折叠信号, 与蠕虫状链 (worm-like chain, WLC) 模型关于 ACBP 步长的理论描述一致, 余下

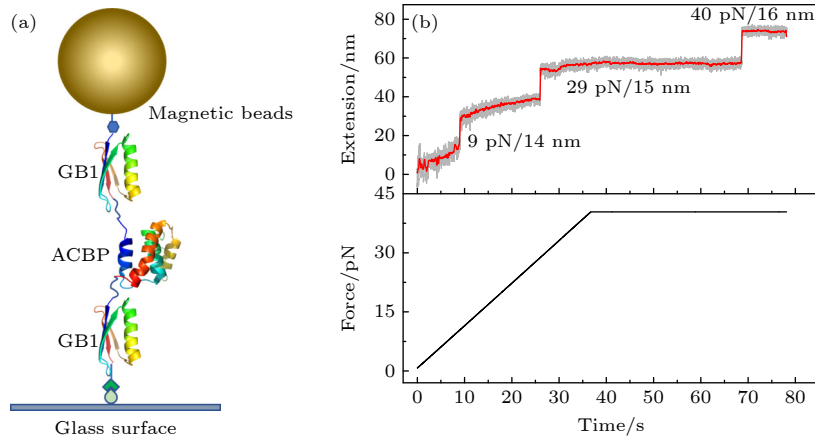


图 1 单分子磁镊实验的结构示意图及典型的拉力-伸长曲线 (a) 磁镊拉伸蛋白的结构示意图, 目的蛋白 ACBP (PDB ID:2ABD) 两端分别连接一个 GB1 蛋白作为特征信号, 通过顶部的磁球施加竖直向上的拉力; (b) ACBP 蛋白构建体的典型的拉力-伸长曲线, 拉力以 1 pN/s 的恒定加载速率从 0.5 pN 增加到 40 pN 并保持在 40 pN, 通过伸长的测量能够依次观察到 ACBP 和 2 个 GB1 的去折叠信号

Fig. 1. Schematic figure of a single molecule magnetic tweezers experiment and typical force-extension curve. (a) Schematic figure of magnetic tweezers setup to stretch the designed ACBP protein construct. ACBP (PDB ID:2ABD) is sandwiched between two GB1 proteins which provide fingerprint signals to identify correct protein tether. Vertical upward force is applied through the top magnetic bead. (b) Typical force-extension curve of ACBP protein construct. Force increased from 0.5 pN to 40 pN with a constant loading rate of 1 pN/s, and kept at 40 pN. The extension time course shows the unfolding signals of ACBP and GB1 protein domains sequentially.

两个去折叠信号分别对应于该力下 GB1 的去折叠事件. 据此特征指纹信号, 可以确认所拉伸的分子就是目的蛋白.

在拉力减小后, ACBP 和 GB1 都可以重新折叠到各自的自然状态构象. 由于良好的折叠性质, 可以在单个蛋白质上进行多个循环的不同条件下的测量, 以积累进行统计分析的实验数据.

3.2 不同力加载速率的实验

为了探究不同加载速率对 ACBP 去折叠力的影响, 分别采用了 0.25, 0.5, 1, 2, 4 pN/s 五种不同的力加载速率进行测量, 并对不同力加载速率下的去折叠力进行统计. 不同蛋白质链之间的动力学性质可能存在细微差别, 为此对 3 条独立的蛋白质系绳进行测量, 在每个加载速率下都获得总共超过 60 次去折叠转变的数据. WLC 常用于描述去折叠多肽链的力 (f)-伸长 (x_{chain}) 依赖关系: $\frac{fA}{k_B T} = \frac{x_{\text{chain}}}{L} + \frac{1}{4} \left(1 - \frac{x_{\text{chain}}}{L}\right)^{-2} - \frac{1}{4}$, 其中, k_B 为玻尔兹曼因子, T 为绝对温度, 驻留长度 $A \approx 0.8$ nm, ACBP 去折叠多肽链的轮廓长度 $L = 31.8$ nm. 折叠状态下的蛋白质被假定为刚体, 在不同拉力下由蛋白质取向涨落给出其沿拉力方向上的伸长 (x_{ACBP}), 具体可以由方程 $x_{\text{ACBP}}(f) = l_0 \coth\left(\frac{fl_0}{k_B T}\right) - \frac{k_B T}{f}$ 所

描述, 其中 ACBP 自然状态下的 N-C 两端距离 $l_0 \approx 2.4$ nm. 图 2 展示了不同力加载速率下的去折叠步长和去折叠力的分布情况, 不同加载速率下的去折叠步长平均值基本符合 ACBP 发生去折叠对应的理论伸长变化量 $x(f) = x_{\text{chain}}(f) - x_{\text{ACBP}}(f)$, 由此表明该信号来自于 ACBP 的去折叠转变. 检查了去折叠力的离散程度与拉伸的先后顺序的关系, 如补充材料图 S2 (online) 所示, 证明蛋白质在多个循环的折叠去折叠过程中性质保持稳定.

假设在测量的拉力区间内, ACBP 的去折叠速率满足贝尔模型给出的拉力依赖关系: $k_u(f) = k_u^0 \exp\left(\frac{fx_u}{k_B T}\right)$, 其中 f 为蛋白质所受外加拉力; k_u 为去折叠速率; k_u^0 为外推到拉力为零时的去折叠速率; x_u 为去折叠距离, 即自然状态与过渡态在拉力方向上伸长的差. 这样所得到的恒定拉力加载速率下的去折叠力的分布 $P(f)$ 满足解析式:

$$P(f) = \frac{k_u^0}{r} \exp\left\{\frac{fx_u}{k_B T} + \frac{k_B T k_u^0}{x_u r} \left[1 - \exp\left(\frac{fx_u}{k_B T}\right)\right]\right\}, \quad (1)$$

其中, r 为拉力加载速率, 单位为 pN/s. 对不同拉力加载速率下得到的去折叠统计直方图进行拟合可以得到贝尔模型中的两个参数 k_u^0 和 x_u . 综合实验中的五种不同的力加载速率下去折叠统计直方图的拟合结果 (图 3), 可以得到 k_u^0 的范围在

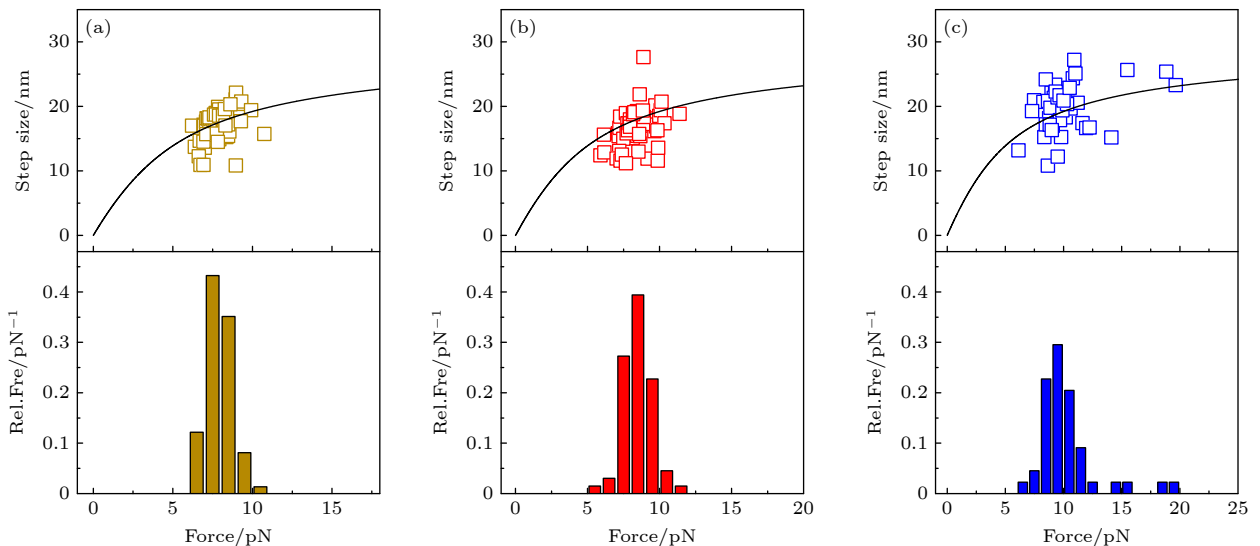


图 2 加载速率分别为 0.25 pN/s (a), 1 pN/s (b) 和 4 pN/s (c) 下, 去折叠步长和去折叠力的统计结果. 上面板为去折叠步长与拉力的散点图, 黑色实线为根据多肽链的虫链模型得到的去折叠步长的理论曲线; 下面板为去折叠力分布的相对频率 (relative frequency, Rel.Fre).

Fig. 2. Results of step size and unfolding force at loading rates of 0.25 pN/s (a), 1 pN/s (b) and 4 pN/s (c). Upper panel shows scattered data points of the step size and corresponding unfolding force. Solid black line shows theoretical curve obtained from worm-like chain model of polypeptide. Lower panel shows relative frequency (Rel.Fre) of unfolding forces.

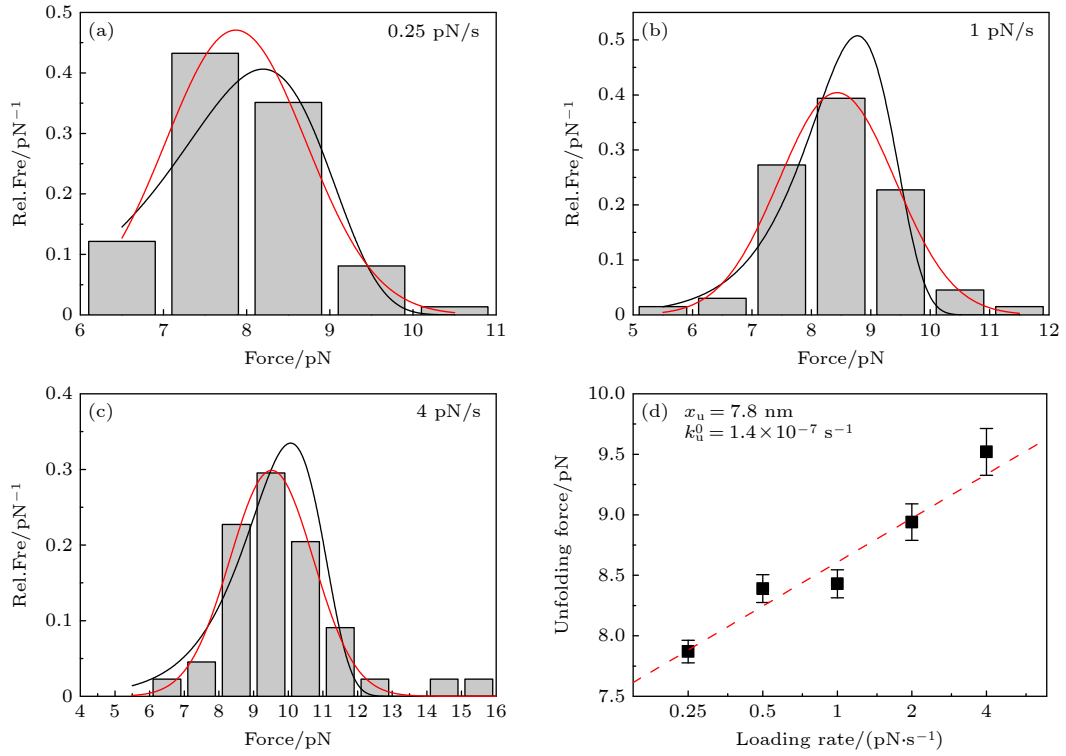


图 3 不同加载速率下的 ACBP 去折叠力的分析 (a)—(c) 0.25, 1, 4 pN/s 的拉力加载速率下, ACBP 去折叠力的分布直方图, 红线和黑线分别对应高斯函数和 (1) 式的拟合曲线; (d) 高斯函数拟合得到的最可几去折叠力与拉力加载速率的依赖关系, 红色虚线给出 (2) 式的拟合结果.

Fig. 3. Analysis of ACBP unfolding force at different loading rates: Distribution histograms of ACBP unfolding force for loading rates of 0.25 pN/s (a), 1 pN/s (b) and 4 pN/s (c), respectively. Red and black curves are fitting curve of Gaussian function and Eq. (1), respectively; (d) most probable unfolding force obtained by fitting of Gaussian function is a function of loading rates. Red dashed line shows fitting curve of Eq. (2).

$3.5 \times 10^{-7} - 3.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, x_u 的范围是 4.5—6.9 nm. 由于每组实验的数据量有限, 而且统计直方图不可避免地引入了拉力取值的离散性, 所以得到的参数的精度有限. 为此引入另外一种分析方法来得到 ACBP 去折叠动力学的相关参数.

(1) 式的峰值拉力对应蛋白质去折叠的最可几去折叠拉力, 其与拉力加载速率的对数成线性关系:

$$F_u^*(r) = \frac{k_B T}{x_u} \ln \frac{r x_u}{k_u^0 k_B T} \quad (2)$$

其中, F_u^* 表示不同加载速率下的最可几去折叠力. 去折叠力的统计直方图的拟合高斯函数的峰值可以近似确定不同加载速率下的最可几去折叠力, 然后通过对拉力加载速率 r 和最可几去折叠力 F_u^* 的依赖关系进行拟合 (图 3(d)), 得到 $k_u^0 = (1.4 \pm 3.1) \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$, $x_u = (7.8 \pm 1.2) \text{ nm}$.

考虑到在 9 pN 拉力左右 ACBP 完全去折叠的伸长变化步长为 15 nm 左右, 所得到的去折叠距离 x_u 对应的过渡态几乎位于伸长变化的一半的位置. 这表明 ACBP 需要发生非常大的构象变化

才到达过渡态. 单分子实验无法给出这个过渡态构象的具体细节, 而分子动力学模拟恰好可以弥补单分子实验的这一缺点.

3.3 分子动力学模拟

为了观察 ACBP 蛋白去折叠过程中的构象变化, 对 ACBP 进行了全原子分子动力学模拟以得到 ACBP 完整的去折叠轨迹. 由于模拟需要在可负担的有限计算时间完成, 所以拉伸的速度较快, 对应的拉力也达到了数百皮牛的量级 (图 4(a)), 远远超过了单分子磁镊实验的拉力.

如图 4(b) 所示, 在拉伸的前期阶段, ACBP 的去折叠主要发生在 N 端的 α 螺旋. 随着模拟的进行, 可逐渐观察到 N 端 α 螺旋完全变为一条柔性的多肽链, 同时 C 端的 α 螺旋末端开始出现类似的去折叠行为. 在伸长约为 9 nm 的过渡态构象中, N 端 α 螺旋发生了完全去折叠, 而 C 端 α 螺旋发生了部分去折叠. 当伸长超过 9 nm, 蛋白质结构遭到剧烈破坏并伴随着余下两个 α 螺旋的去折叠转变.

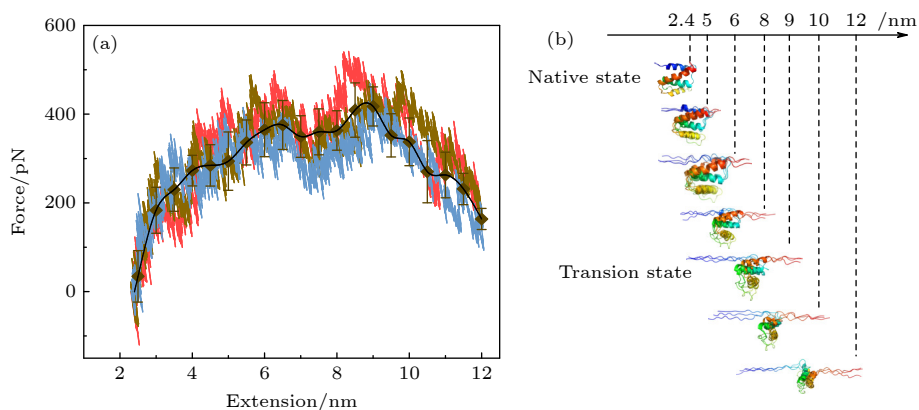


图4 分子动力学模拟中的拉力-伸长曲线以及蛋白质去折叠过程中的构象变化 (a) 3次独立的分子动力学模拟的拉力伸长曲线用三种颜色给出, 黑色图标是三条曲线的平均值. 在开始阶段, 力随着拉伸的进行逐渐增加, 当N-C距离超过9.0 nm后拉力骤降, 以此判断过渡态构象的伸长约为9.0 nm. (b) ACBP的去折叠过程中的快照图, 去折叠开始于N端, 过渡态构象对应结构的N端 α 螺旋发生了完全去折叠, C端 α 螺旋发生了部分去折叠

Fig. 4. Force-extension curves in molecular dynamics simulations and conformational snapshots during unfolding process. (a) Force-extension curves from three independent molecular dynamics simulations are shown in three different colors. Black symbol and black line show the average extension. At the beginning of stretching, force increases gradually. When extension exceeds 9.0 nm, force drops abruptly, which help to identify the transition state with extension of about 9.0 nm. (b) Snapshots during unfolding process of ACBP. Unfolding begins at N-terminal α -helix. Transition state has completely unfolded N-terminal α -helix and partially unfolded C-terminal α -helix.

晶体结构给出 ACBP 自然状态的首末端距为 2.4 nm, 而拉力-伸长曲线的峰值位置对应的构象的伸长约为 8.9 nm, 二者的差值为 6.5 nm, 比实验得到的去折叠距离 7.8 nm 略小, 这个差别可能是由实验条件和分子动力学模拟的条件不同所导致的. 单分子磁镊实验中的拉力范围只有约十几皮牛, 每次拉伸的所需的时间约几秒到几十秒, 而模拟过程的拉力达到了数百皮牛. 虽然具体数值上存在一些差异, 但实验与模拟都给出了比自然状态伸长超过两倍的过渡态. 这与典型的由 β 折叠结构所构成的免疫球蛋白结构域是显著不同的^[25,26].

4 总结与讨论

本文基于重组蛋白 HisTag-AviTag-GB1-ACBP-GB1-SpyTag 开展了磁镊拉伸实验. 通过设置不同的拉力加载速率并统计与之对应的去折叠力分布情况, 发现了 ACBP 具有较长的去折叠距离. 借助分子动力学模拟, 观察到 ACBP 在外力作用下的去折叠过程从 N 端的 α 螺旋开始, 过渡态对应的构象表现为 N 端 α 螺旋全部打开为多肽链, C 端 α 螺旋从末端开始发生了部分去折叠. 与光镊实验比较, 通过控制拉力加载速率, 而不是末端拉伸速度来进行 ACBP 的去折叠动力学研究. 在恒定拉力加载速率的控制方式下, 去折叠力的分

布和最可几值都有解析结果, 可以更方便地进行分析定量. 本文实验结果与光镊实验的主要结论是一致的^[15].

值得一提的是, 与生化实验相比, 单分子实验给出了截然不同的过渡态构象, 并且外推到零力下的去折叠速率比生化实验的结果慢^[14]. 推测这是由二者的实验条件不同所导致的, 单分子拉伸实验与分子动力学模拟通过对分子施加拉力来探究受力条件下蛋白质的去折叠过程, 而传统生化实验通过化学变性剂在零力下使蛋白质发生去折叠转变. 单分子实验与生化实验的不同结果暗示在不同的条件下 ACBP 可能存在不同的去折叠路径.

ACBP 的力学稳定性远远小于以 β 折叠结构的蛋白质. ACBP 的 N 端与 C 端的两个 α 螺旋基本成平行走向, 这两个 α 螺旋之间的疏水残基形成疏水相互作用, 对于 ACBP 的折叠和稳定性起到重要的作用. 从模拟中可以看到, 在 N 端与 C 端的外力对蛋白施加的是剪切作用力. 一般认为剪切力作用的蛋白质能够抵抗相对较大的外力, 但本文实验显示 α 螺旋之间的疏水相互作用可以逐渐被依次破坏, 然后随着 α 螺旋的打开, 蛋白质首末端距逐步伸长. 这表明 α 螺旋之间不同位置的疏水相互作用在抵抗外力方面缺乏协作性. α 螺旋的去折叠变为多肽链, 使得自由能最高的能垒的构象具

有较长的伸长, 这样较小的外力就可以使得能垒显著降低, 进而使蛋白质发生迅速的去折叠.

与 ACBP 形成鲜明对照的是由 N 端与 C 端平行的 β 折叠结构承担剪切外力的蛋白质, 如 I27^[25,26] 和 GB1^[21,27,22]. 这两个承受外力的 β 折叠之间存在一系列的氢键相互作用, 而且 β 折叠的主链成伸展构象, 可以在不断开氢键的情况下将外力传递到整个 β 折叠上的所有氢键. 因此, 两个 β 折叠之间的所有氢键在抵抗外力方面具有非常高的协作性. 此前针对 I27 结构域的单分子实验与分子动力学模拟结果显示, AA'- β 折叠片中氢键全部断裂的构象构成了 I27 的过渡态^[26,28], 其伸长与自然状态极为接近, 仅仅多几个埃的距离. 这样的能垒只有在足够大的外力作用下才能显著降低, 所以这样的蛋白质具有较强的力学稳定性.

具有类似氨基酸数目的以 α 螺旋为主和以 β 折叠为主的蛋白的热力学稳定性基本相似, 而其力学稳定性经常有非常大的差异, 因为力学稳定性主要由其承担外力的关键位置和关键相互作用所决定. 一些蛋白质在细胞中会行使力学传导或力学感受器的功能, 这些功能与其在拉力作用下的构象转变密切相关. 力学传导蛋白往往需要较高的力学稳定性, 例如肌肉蛋白 titin 中的免疫球蛋白结构域^[29]; 而力学感受器蛋白为了对外力具有较高的灵敏度, 需要在较小外力作用下就产生显著的构象转变, 例如细胞黏附蛋白 talin^[30,31], α -catenin^[32] 等. 不同结构类型的蛋白质的力学性质保证了它们适合完成各自的生物功能. 本研究显示单分子操纵实验与分子动力学模拟相结合的研究方案是揭示不同结构组成的蛋白质分子的力学响应的有力手段.

参考文献

- [1] Ayoub R, Lee Y 2021 *Proteins Struct. Funct. Bioinf.* **89** 648
- [2] Lane T J 2023 *Nat. Methods* **20** 170
- [3] Kaiser C M, Goldman D H, Chodera J D, Tinoco I, Bustamante C 2011 *Science* **334** 1723
- [4] Aubin-Tam M E, Olivares A O, Sauer R T, Baker T A, Lang M J 2011 *Cell* **145** 257

- [5] Uddin M S, Al Mamun A, Rahman M A, Behl T, Perveen A, Hafeez A, Bin-Jumah M N, Abdel-Daim M M, Ashraf G M 2020 *Curr. Top. Med. Chem.* **20** 2380
- [6] Tan J M M, Wong E S P, Lim K L 2009 *Antioxid. Redox Signaling*. **11** 2119
- [7] Kumar T K S, Sivaraman T, Samuel D, Srisailam S, Ganesh G, Hsieh H C, Hung K W, Peng H J, Ho M C, Arunkumar A I, Yu C 2000 *J. Chin. Chem. Soc.* **47** 1009
- [8] Fung A, Li P, Godoy-Ruiz R, Sanchez-Ruiz J M, Muñoz V 2008 *J. Am. Chem. Soc.* **130** 7489
- [9] Dill K A, MacCallum J L 2012 *Science* **338** 1042
- [10] Ma X, Sun H, Hong H, Guo Z, Su H, Chen H 2022 *Phys. Rev. E* **106** 024404
- [11] Jagannathan B, Elms P J, Bustamante C, Marqusee S 2012 *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109** 17820
- [12] Pierser C A, Dudko O K 2017 *Phys. Rev. Lett.* **118** 088101
- [13] Piras M, Gerosa C, Fanni D, Cau F, Coni P, Murru R, Denotti G, Orrù G, Scano A, Ledda F, Van Eyken P, Coghe F, Faa G, Castagnola M 2022 *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **26** 3301
- [14] Poulsen F M, Kragelund B B, Osmark P, Neergaard T B, Schiødt J, Kristiansen K, Knudsen J 1999 *Nat. Struct. Biol.* **6** 594
- [15] Heidarsson P O, Valpapuram I, Camilloni C, Imperato A, Tiana G, Poulsen F M, Kragelund B B, Cecconi C 2012 *J. Am. Chem. Soc.* **134** 17068
- [16] Mandal S S 2020 *ACS Omega* **5** 11271
- [17] Neuman K C, Nagy A 2008 *Nat. Methods* **5** 491
- [18] Qian H, Chen H, Yan J 2016 *Acta Phys. Sin.* **65** 188706
- [19] Chen H, Fu H, Zhu X, Cong P, Nakamura F, Yan J 2011 *Biophys. J.* **100** 517
- [20] Miao Y, Feixas F, Eun C, McCammon J A 2016 *J. Comput. Chem.* **37** 1536
- [21] Cao Y, Lam C, Wang M, Li H 2006 *Angew. Chem. Int. Ed.* **45** 642
- [22] Guo Z, Hong H, Yuan G, Qian H, Li B, Cao Y, Wang W, Wu C X, Chen H 2020 *Phys. Rev. Lett.* **125** 198101
- [23] Hong H, Guo Z, Sun H, Yu P, Su H, Ma X, Chen H 2021 *Commun. Chem.* **4** 156
- [24] Zhang X, Guo Z, Yu P, Li Q, Zhou X, Chen H 2020 *Chin. Phys. B* **29** 078701
- [25] Chen H, Yuan G, Winardhi R S, Yao M, Popa I, Fernandez J M, Yan J 2015 *J. Am. Chem. Soc.* **137** 3540
- [26] Yuan G, Le S, Yao M, Qian H, Zhou X, Yan J, Chen H 2017 *Angew. Chem. Int. Ed.* **56** 5490
- [27] Cao Y, Li H 2007 *Nat. Mater.* **6** 109
- [28] Lu H, Schulten K 2000 *Biophys. J.* **79** 51
- [29] Rief M, Gautel M, Oesterhelt F, Fernandez J M, Gaub H E 1997 *Science* **276** 1109
- [30] Yao M, Goult B T, Chen H, Cong P, Sheetz M P, Yan J 2014 *Sci. Rep.* **4** 4610
- [31] Yao M, Goult B T, Sheetz M P, Yan J 2017 *Biophys. J.* **112** 267a
- [32] Yao M, Qiu W, Liu R, Efremov A K, Cong P, Seddiki R, Payre M, Lim C T, Ladoux B, Mège R M, Yan J 2014 *Nat. Commun.* **5** 4525

Single molecule magnetic tweezers for unfolding dynamics of Acyl-CoA binding protein*

Zhang Yu-Hang¹⁾ Xue Zhen-Yong¹⁾²⁾ Sun Hao¹⁾²⁾
Zhang Zhu-Wei¹⁾²⁾ Chen Hu^{1)2)†}

1) (*Fujian Provincial Key Lab for Soft Functional Materials Research, Research Institute for Biomimetics and Soft Matter, Department of Physics, Xiamen University, Xiamen 361005, China*)

2) (*Center of Biomedical Physics, Wenzhou Institute, University of Chinese Academy of Sciences, Wenzhou 325000, China*)

(Received 4 April 2023; revised manuscript received 9 May 2023)

Abstract

There are significant differences in mechanical stability and unfolding dynamics among proteins with different structural compositions. Compared with proteins with β -sheets and subjected to shearing forces, proteins that are composed entirely of α -helices often undergo rapid unfolding under low stretching forces, thus requiring quantitative studies by using experimental tools that can precisely control forces on a pico-Newton scale. Magnetic tweezers with intrinsic force-control capability and great stability for long-time continuous measurement are suitable to measure force-induced conformation transitions of protein subjected to low forces of several pico-Newton. Acyl-CoA binding protein (ACBP) is a model protein used to study the folding/unfolding kinetics of complete α -helices protein. It is composed of 86 amino acid residues, forming a helical bundle of four α -helices. When its N- and C-terminal are stretched, the first and last α -helix are subjected to shear force in parallel. Previous biochemical studies showed that ACBP folding and unfolding in a two-state manner. In this paper, we use magnetic tweezers to stretch ACBP from its N- and C-end and obtain the distribution of the unfolding force at different loading rates ranging from 0.25 pN/s to 4 pN/s. The most probable unfolding forces are all less than 10 pN, which confirms that ACBP is not mechanically stable. At a constant loading rate, the unfolding force distribution and the most probable unfolding force as a function of loading rate have well-defined analytical formulas based on Bell's model. Therefore, the experimental results of unfolding force can be fitted directly to obtain the important kinetic parameter of unfolding distance which is defined as the difference in extension between the native state and the transition state. Data analysis shows that ACBP has an extraordinarily long unfolding distance of 7.8 nm. Steered molecular dynamics simulations of ACBP stretching gives the transition state with N-terminal α -helix fully unfolded and C-terminal α -helix partially unfolded, which is consistent with the long unfolding distance obtained in the experiment on magnetic tweezers. According to the simulation results, the unfolding of α -helices is less cooperative than that of β -sheet structures. This characteristic makes α -helix proteins sensitive to mechanical forces, rendering them suitable as force sensors in cells. This study shows that single-molecule stretching experiment combined with molecular dynamics simulations is a reliable method to reveal the molecular mechanism of protein conformation transitions under stretching forces.

Keywords: magnetic tweezers, protein folding, transition state, molecular dynamics simulations

PACS: 87.80.Nj, 82.37.Rs, 87.15.A-, 87.14.E-

DOI: 10.7498/aps.72.20230533

* Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant Nos. 11874309, 12174322) and the 111 Project, China (Grant No. B16029).

† Corresponding author. E-mail: chenhu@xmu.edu.cn



酰基辅酶A结合蛋白去折叠动力学的单分子磁镊研究

张宇航 薛振勇 孙皓 张珠伟 陈虎

Single molecule magnetic tweezers for unfolding dynamics of Acyl-CoA binding protein

Zhang Yu-Hang Xue Zhen-Yong Sun Hao Zhang Zhu-Wei Chen Hu

引用信息 Citation: *Acta Physica Sinica*, 72, 158702 (2023) DOI: 10.7498/aps.72.20230533

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.7498/aps.72.20230533>

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

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

用单分子技术研究Sso7d与DNA的相互作用

Interaction between Sso7d and DNA studied by single-molecule technique

物理学报. 2018, 67(14): 148201 <https://doi.org/10.7498/aps.67.20180630>

单分子技术研究T7解旋酶的解旋与换链

T7 helicase unwinding and strand switching investigated via single-molecular technology

物理学报. 2018, 67(11): 118201 <https://doi.org/10.7498/aps.67.20180501>

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

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

物理学报. 2018, 67(8): 088201 <https://doi.org/10.7498/aps.67.20180109>

纳米液滴撞击柱状固体表面动态行为的分子动力学模拟

Molecular dynamics simulation on dynamic behaviors of nanodroplets impinging on solid surfaces decorated with nanopillars

物理学报. 2021, 70(13): 134704 <https://doi.org/10.7498/aps.70.20210094>

退火温度调控多层折叠石墨烯力学性能的分子动力学模拟

Manipulations on mechanical properties of multilayer folded graphene by annealing temperature: a molecular dynamics simulation study

物理学报. 2020, 69(19): 196102 <https://doi.org/10.7498/aps.69.20200836>

基于片层光照明的新型单分子横向磁镊

Single molecule transverse magnetic tweezers based on light sheet illumination

物理学报. 2018, 67(14): 148702 <https://doi.org/10.7498/aps.67.20180441>