

# 酰基磷酸酶去折叠动力学的单分子磁镊研究

马雪宁<sup>1</sup>, 洪海燕<sup>1</sup>, 孙皓<sup>1,2,3</sup>, 陈虎<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>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, 福建 厦门

<sup>2</sup>国科温州研究院, 生物医学物理中心, 浙江 温州

<sup>3</sup>瓯江实验室, 浙江 温州

收稿日期: 2022年4月7日; 录用日期: 2022年5月11日; 发布日期: 2022年5月18日

## 摘要

酰基磷酸酶(Acylphosphatase, AcP)是最小的基于蛋白质的生物酶之一, 包含98个氨基酸残基, 其天然构象由两个 $\alpha$ 螺旋和一个五链反平行的 $\beta$ 折叠组成。AcP可以催化羧基-磷酸键的水解, 在生物体代谢方面发挥着重要的生理作用。AcP是一种典型的两态折叠蛋白, 它具有体积小、拓扑结构简单、分子内不存在二硫键的特点, 是研究蛋白质折叠/去折叠机制的模型蛋白之一。在单分子力谱研究方面, 人们已经用原子力显微镜研究了AcP的力学性能和去折叠行为。在本文中, 基于稳定的磁镊单分子技术, 我们测量了AcP在不同拉力下的去折叠速率。首先, 我们构建了具有两种指纹信号(I27, SpyCatcher-SpyTag)的重组蛋白用于单分子操纵实验, 然后通过拉力-伸长曲线中的特征确认正确的AcP去折叠信号, 接下来开展了AcP在不同加载速率下的拉伸实验和恒定力下的拉伸实验。我们得到了AcP在20 pN到40 pN拉力区间内的去折叠速率, 并分析了实验结果与原子力显微镜实验结果差异的原因与意义, 结果暗示去折叠过渡态在不同拉力下会发生变化。

## 关键词

磁镊, 去折叠, 过渡态, 酰基磷酸酶

# Single Molecule Magnetic Tweezers Study of Unfolding Kinetics of Acylphosphatase

Xuening Ma<sup>1</sup>, Haiyan Hong<sup>1</sup>, Hao Sun<sup>1,2,3</sup>, Hu Chen<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Fujian Provincial Key Laboratory for Soft Functional Materials Research, Research Institute for Biomimetics and Soft Matter, Department of Physics, Xiamen University, Xiamen Fujian

<sup>2</sup>Center of Biomedical Physics, Wenzhou Institute, University of Chinese Academy of Sciences, Wenzhou Zhejiang

<sup>3</sup>Oujiang Laboratory, Wenzhou Zhejiang

Received: Apr. 7<sup>th</sup>, 2022; accepted: May 11<sup>th</sup>, 2022; published: May 18<sup>th</sup>, 2022

文章引用: 马雪宁, 洪海燕, 孙皓, 陈虎. 酰基磷酸酶去折叠动力学的单分子磁镊研究[J]. 生物物理学, 2022, 10(2): 22-30. DOI: 10.12677/biphy.2022.102003

## Abstract

Acylphosphatase (AcP) containing 98 amino acid residues is one of the smallest globular enzymes. AcP can catalyze the hydrolysis of carboxyl-phosphate bonds and plays an important physiological role in the metabolic system of living organisms. The native state of AcP consists of two  $\alpha$  helices and a five-stranded anti-parallel  $\beta$  sheet. AcP is a typical two-state protein, which has the characteristics of small size, simple topology and no disulfide bond in the molecule, which make it a model protein for studying the mechanism of protein folding/unfolding. The mechanical properties and unfolding behavior of AcP have been studied by atomic force microscopy (AFM). In this paper, based on the stable magnetic tweezers, we measured the unfolding rate of AcP at different constant stretching forces. Firstly, a recombinant protein construct with two kinds of fingerprint signals from I27 and SpyCatcher-SpyTag was produced for single-molecule manipulation experiment. The correct unfolding signal of AcP was identified through the fingerprint singles in the force-extension curve. Then we carried out stretching experiments of AcP at different loading rates and constant forces to obtain the unfolding rates of AcP from 20 pN to 40 pN. The difference between our results and the previous AFM experiment was discussed, and the result indicates that the unfolding transition state will change with force.

## Keywords

Magnetic Tweezers, Unfolding, Transition State, Acylphosphatase

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

在细胞和有机体的生命活动中，蛋白质发挥着关键的结构和功能作用。最初氨基酸残基通过肽键共价连接形成非结构化的多肽链，随后多肽链进行构象搜索，从非结构化的无规线团构象折叠成为具有独特三维构象的天然结构，这是每种蛋白质具有特定功能的关键。蛋白质折叠产生各种高度特异性的结构，使细胞和有机体能够在生命活动中发展出多样性和选择性。蛋白质的氨基酸序列如何决定其三维结构引发了广泛关注，是结构生物学中的核心问题之一[1]。

在蛋白质的折叠过程中，主要通过形成多个非共价键来补偿多肽链构象熵的减少，蛋白质的折叠态通过弱的非共价的分子内相互作用来稳定其三维结构。不同蛋白质需要的折叠时间不同，大多数在几微秒到几分钟内发生[2]。蛋白质折叠的能量景观呈漏斗状，但并非光滑的，由于存在许多蛋白质可以暂时停留的陷阱，所以形成了崎岖不平的能量景观。初始的随机卷曲构象位于漏斗顶部，天然状态位于全局自由能最小值的漏斗底部，具有部分紧凑结构的中间体存在于局部自由能最小的陷阱处[3]。

最初研究蛋白质折叠和去折叠的主要方法是生化体实验，通过控制温度、溶液的 pH 以及引入不同浓度的变性剂诱导蛋白质变性，最常用的变性剂是盐酸胍和尿素，通过改变其浓度，大多数蛋白质发生去折叠 - 折叠转变[4] [5] [6]，然后可以利用光谱、质谱或核磁共振等方法对折叠/去折叠速率进行定量表征。在生化体实验中，每个蛋白质分子处于折叠 - 去折叠转变中的不同状态，然而其测量结果只能表征大量蛋白质所表现出的平均性质，这会掩盖单个蛋白质分子行为的复杂性，难以测量到瞬时中间态，会

导致重要信息的丢失。

后来兴起的单分子操纵技术,包括原子力显微镜、光镊和磁镊,能有效克服生化体实验的局限性[7] [8] [9]。三者都可以通过操纵单个分子获得拉力-伸长曲线,进而阐述有关的分子折叠/去折叠的机制。光镊操作灵活,但高强度的激光会加热介质小球,而溶液中不均匀的温度会对生物分子产生不同程度的影响,因此光镊一般用来施加 30 pN 以下的拉力。原子力显微镜利用微悬臂梁对所研究的分子进行拉伸,由于其较高的硬度,原子力显微镜难以对小于 10 pN 的力进行精确测量,并且测量时间受到机械漂移的影响。磁镊具有优异的稳定性,可以开展力渐变的实验,也可以进行恒定力测量或长时间的平衡态测量。此外,磁镊拉伸实验中,生物分子不会受到光损伤和热损伤,可实现长期、稳定地测量[10] [11]。

酰基磷酸酶(Acylphosphatase, AcP)有 98 个氨基酸残基,是最小的球状蛋白生物酶之一。AcP 广泛性存在于脊椎动物的细胞质中,催化有机酰基磷酸酯的水解,在糖酵解、噬啶的生物合成等过程中发挥至关重要的生理和代谢作用[12]。在许多组织和器官中,AcP 作为两种同工酶被发现,被称为肌肉型 AcP 和器官普通型 AcP,其天然构象由两个  $\alpha$  螺旋和一个五链反平行的  $\beta$  折叠组成,两个  $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$  以排列紧凑的单元相互插入。AcP 是单结构域蛋白,拓扑结构简单,没有二硫键等复杂因素,因此成为研究蛋白质折叠/去折叠机制的模型蛋白[13]。

已经有生化体实验充分研究了 AcP 的折叠动力学,AcP 的折叠遵循两态模型,28°C 时 AcP 在水中的折叠速率为  $0.2 \text{ s}^{-1}$  [14] [15] [16] [17] [18],属于折叠速率比较慢的蛋白质,这对于单分子测量是很不利的,对设备的稳定性有较高的要求。Arad-Haase 等人通过原子力显微镜(Atomic force microscope, AFM)拉伸实验和分子动力学模拟研究了 AcP 的去折叠行为,通过对不同的拉伸速率下的去折叠拉力的分析,他们确定了 AcP 在不受拉力时的去折叠速率和去折叠过渡态的伸长变化[19],但线性外推到无拉力情况的有效性并没有得到验证。在本文中,我们利用稳定的磁镊[20],开展了不同加载速率下的拉伸实验,并通过力跳变实验测量了 AcP 在更小的拉力作用下(20 pN~40 pN)的去折叠速率。

## 2. 材料与方法

### 2.1. AcP 样品的制备

我们设计并合成了 HisTag-AviTag-I27<sub>2</sub>-AcP-I27<sub>2</sub>-SpyTag 蛋白构建体的基因(金斯瑞,中国),然后将其插入质粒 pET151 中。将上述质粒(氨苄青霉素抗性)和另一个具有 BirA 基因(生物素连接酶)的质粒(氯霉素抗性)以等摩尔比混合,然后转化到大肠杆菌菌株 BL21 中,后将菌液 BL21 均匀涂覆在固体培养基上,倒置过夜培养。挑选固体培养基上生长的菌落,将其接种于液体培养基(补充有氯霉素、氨苄青霉素、D-生物素)中,37°C、200 rpm 摇床培养至菌体光密度达到 0.6,然后加入异丙基- $\beta$ -D-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)至终浓度为 0.5 mM,以诱导重组蛋白表达,在 25°C 培养基中表达 AcP 蛋白 12 h。利用低温离心机在 4°C、2500 g 条件下收集菌体 30 min,并在裂解缓冲液(50 mM Tris、500 mM 氯化钠、50%甘油、5 mM 咪唑、5 mM 2-巯基乙醇, pH 8.0)中超声裂解。使用 Ni-NTA Sefinose Resin (生工,中国)纯化重组蛋白,在液氮中速冻并储存在-80°C [21]。

### 2.2. 微流室的制备

22 mm  $\times$  32 mm 和 22 mm  $\times$  22 mm 的盖玻片用于制备微流室。首先用超声波清洗机和等离子体清洗机清洁后,将载玻片浸入 1% 3-氨基丙基三乙氧基硅烷(APTES, 货号 A3648, Sigma)的甲醇溶液中 1 h,然后分别用甲醇和去离子水冲洗,烘干,从而使载玻片硅烷化。将一片 22 mm  $\times$  32 mm 的 APTES 功能化的盖玻片和另一片 22 mm  $\times$  22 mm 的洁净盖玻片居中对齐,沿长边粘贴封口膜,然后在玻片的短边处点胶形成矩形凹槽,以形成微流室。然后将直径为 3.0  $\mu\text{m}$  的聚乙烯微球(货号 17145, Poly-sciences)冲入

腔室并孵育 20 min, 使其粘附在盖玻片表面, 用作参考球以消除实验过程中的空间漂移。用 200  $\mu\text{L}$  PBS 缓冲液冲洗后, 将 1% Sulfo-SMCC (货号 247420, Thermo Science) 冲入微流腔室并孵育 20 min。再将 N-SpyCatcher 蛋白稀释在 PBS 缓冲液中, 冲入腔室并孵育 1 h。然后用含量为 1% BSA 的 1XPBS 溶液冲洗腔室并孵育过夜以钝化表面。

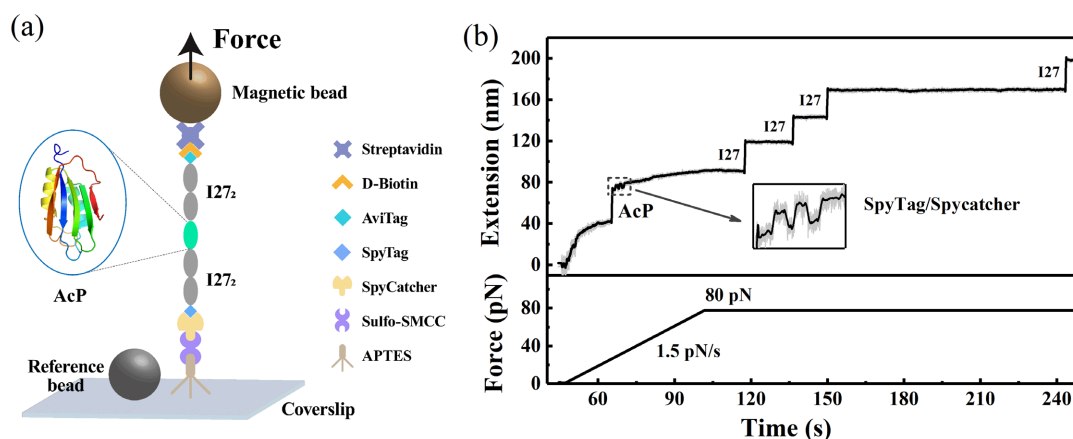
### 2.3. 单分子磁镊实验

将重组蛋白以适宜浓度稀释在含量为 1% BSA 的 1XPBS 溶液中, 冲入微流腔室并孵育 20 min。向腔室冲入适量的链霉亲和素包被的顺磁球 M270, 形成用于磁镊拉伸实验的由单个蛋白质连接到玻璃表面的磁球链接。再将含有 1% BSA 和 10 mM 抗坏血酸钠的 1XPBS 缓冲液冲入腔室, 然后将微流室两端的凹槽封口以形成稳定的内部环境。磁镊搭建在倒置显微镜上, 用 100X 油浸物镜对磁球进行成像。依托于稳定的自组装磁镊, 我们开展了不同类型的磁镊拉伸实验, 用于测量 AcP 的拉力依赖的去折叠动力学[22]。

## 3. 实验结果

### 3.1. 识别 AcP 的正确去折叠信号

用于磁镊拉伸实验的蛋白质 - 磁球链接如图 1(a)所示, 通过链霉亲和素和 N-SpyCatcher 蛋白将结构为 AviTag(biotin)-I27<sub>2</sub>-AcP-I27<sub>2</sub>-SpyTag 的重组蛋白连接在磁球和盖玻片之间。磁铁产生外部磁场, 对磁球施加竖直向上的力, 通过快速移动磁铁调控力的大小, 以此开展磁镊拉伸实验。如图 1(b)所示, 在 1.5 pN/s 的恒定的拉力加载速率下, 力从 0 pN 增加至 80 pN, 拉力 - 伸长曲线记录了三种不同类型的信号。首先在 26 pN 处记录了一个约 26 nm 的去折叠信号, 通过蠕虫状链(worm-like chain, WLC)模型分析, 蛋白质轮廓长度增加了约 36 nm, 这符合我们的目的蛋白 AcP 的理论去折叠步长, 被认为是 AcP 的去折叠



**Figure 1.** Sketch of the structure of the protein tether and typical force-extension curves. (a) The recombinant protein of AviTag(biotin)-I27<sub>2</sub>-AcP-I27<sub>2</sub>-SpyTag was attached to the brown magnetic bead and the silanized coverslip through streptavidin and N-SpyCatcher protein, respectively. The paramagnetic sphere was pulled vertically upward. The gray bead was used as a reference to eliminate mechanical drift during the experiment. The inset shows the crystal structure of AcP (PDB: 1APS); (b) At a force loading rate of 1.5 pN/s, the force-extension curve recorded transition events of the unfolding of AcP, the unfolding/folding transition of the SpyTag/SpyCatcher complex, and the unfolding of four I27 proteins, sequentially

**图 1.** 蛋白质 - 磁球链接的结构示意图和典型的拉力 - 伸长曲线。(a) 重组蛋白 AviTag(biotin)-I27<sub>2</sub>-AcP-I27<sub>2</sub>-SpyTag 分别通过链霉亲和素和 N-SpyCatcher 蛋白连接到棕色磁球和硅烷化的盖玻片上, 磁球受竖直向上的拉力, 灰色小球用作参考以消除实验过程中的空间漂移, 插图显示了 AcP 的晶体结构(PDB: 1APS); (b) 在 1.5 pN/s 的拉力加载速率下, 拉力 - 伸长曲线依次记录了 AcP 的去折叠, SpyTag/SpyCatcher 复合物的去折叠/折叠转变, 四个 I27 蛋白的去折叠的信号

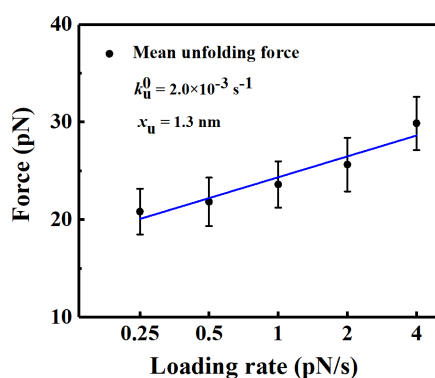
信号(图 4(b))。随后在 28~32 pN 左右出现了几个~3.5 nm 的折叠/去折叠转变, 这是来自于 SpyTag/SpyCatcher 复合物的特征信号[21]。当力增加至 80 pN 并维持在恒定 80 pN 拉力后, 依次出现了四个典型的步长大小约为 25 nm 的信号, 这来自于 I27 的去折叠转变[20]。SpyTag/SpyCatcher 复合物和 I27 提供的特征指纹信号被用于识别正确连接的单个蛋白质链接, 以此确保 AcP 实验数据的准确性。

### 3.2. 不同拉力加载速率下的 AcP 的去折叠测量

为了探究不同拉力加载速率下 AcP 的去折叠动力学, 我们设置了 0.25 pN/s、0.5 pN/s、1 pN/s、2 pN/s、4 pN/s 五种不同的拉力加载速率, 以此开展磁镊拉伸实验, 并统计不同速率下的去折叠力。为了减小实验结果误差, 我们在每个加载速率下进行了多次循环拉伸, 共记录了四根独立测量的蛋白质分子的数据, 每个加载速率下累计统计超过 150 个去折叠事件, 并计算了每个加载速率下的平均去折叠力。如图 2 所示, 我们利用以下公式对数据点进行拟合:

$$F_u^* = \frac{k_B T}{x_u} \ln \frac{r x_u}{k_u^0 k_B T} \quad (1)$$

其中,  $F_u^*$  表示不同加载速率下的最可几去折叠力(实验结果表明最可几去折叠力与平均去折叠力非常接近),  $k_B$  表示玻尔兹曼常数,  $T$  表示绝对温度,  $r$  表示拉力加载速率,  $x_u$  表示去折叠距离(去折叠过渡态与自然状态构象在拉力方向上的伸长的差),  $k_u^0$  表示力为零时的去折叠速率。对 0.25 pN/s 到 4 pN/s 区间内五个不同的加载速率的实验结果进行拟合得到  $k_u^0 = 2.0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  和  $x_u = 1.3 \text{ nm}$ 。在我们的测量中, 测量所用的去折叠拉力比 AFM 的实验要小, 实验结果中去折叠距离比 AFM 实验的 0.6 nm 的结果要大, 同时外推到零拉力的情况得到的去折叠速率比 AFM 的结果要小。这表明 AcP 在更小的拉力作用下时, 其去折叠过渡态可能与大拉力作用时不同。



**Figure 2.** Mean unfolding force at different loading rates. We averaged the unfolding forces under different loading rates. Error bar is the standard deviation of the recorded unfolding forces. The unfolding rate at zero force  $k_u^0 = 2.0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  and unfolding distance  $x_u = 1.3 \text{ nm}$  were obtained by fitting the data points with Equation (1) (solid blue line)

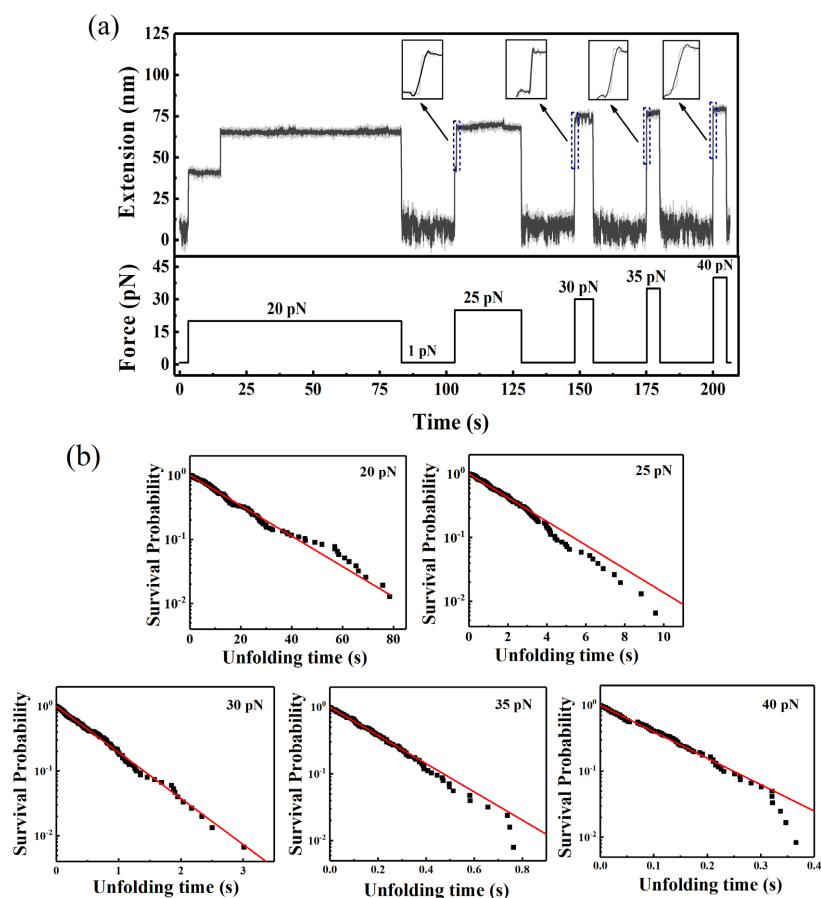
**图 2.** 不同加载速率下的平均去折叠力。我们统计不同加载速率下的去折叠力并对其取平均值, 误差棒代表去折叠力的标准偏差。利用(式 1)拟合数据点(蓝色实线), 得到力为零时的去折叠速率  $k_u^0 = 2.0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  和去折叠距离  $x_u = 1.3 \text{ nm}$

### 3.3. 力跳变实验探究 AcP 在不同拉力下的去折叠速率

典型的力跳变实验可以被用来探究蛋白质的去折叠动力学[23]。我们在 20 pN~40 pN 的力范围内开展



了力跳变实验。如图 3(a)所示, 在同一个蛋白质分子上, 力从 1 pN 分别跃迁至 20 pN、25 pN、30 pN、35 pN、40 pN, 并分别保持 80 s、25 s、7 s、5 s、5 s, 以记录 AcP 的去折叠过程。为了获得足够多的实验数据, 我们进行了多个力跳变的循环实验, 在每次循环之前, 力跳变至小力 1 pN 并保持 20 s, 使 AcP 成功折叠到其自然状态。我们收集了三根独立测量的蛋白质系绳的数据, 每个力下累计记录超过 120 个去折叠事件。如图 3(b)所示, 在不同力下, 根据自然状态寿命的累积分布获得 AcP 自然状态的存活概率, 利用指数拟合确定不同力下的去折叠速率。我们发现, 去折叠速率对力比较敏感, 随着力从 20 pN 增加至 40 pN, 去折叠速率由  $0.05 \text{ s}^{-1}$  增加至  $9.2 \text{ s}^{-1}$ 。



**Figure 3.** The force-jump experiments measured the unfolding rates of AcP under different forces. (a) The unfolding process of AcP was recorded by a typical force-jump experiment. It shows five force-jump cycles on the same protein tether. The AcP unfolding was recorded at different forces for different times. Before each cycle, AcP folded to its native state at a force of 1 pN for 20 s. The inset shows the zoom-in unfolding process of AcP; (b) Survival probability of native state of AcP under different forces. The unfolding rate of AcP under different forces is determined by exponential fitting (red solid line)

**图 3.** 力跳变实验测量不同力下 AcP 的去折叠速率。(a) 典型的力跳变实验记录 AcP 的去折叠过程。它显示了在同一根蛋白质系绳上进行五次力跳变循环, 在不同的力下保持不同的时间来记录 AcP 的去折叠过程。在每次循环之前, 拉力减小到 1 pN 并保持 20 s, 使 AcP 折叠到自然状态。插图显示了放大的 AcP 的去折叠过程; (b) AcP 的自然状态在不同力下的存活概率。AcP 在不同力下的去折叠速率由指数拟合曲线确定(红色实线)

### 3.4. 力依赖的去折叠速率的理论分析

通过力跳变实验确定 AcP 在不同力下的去折叠速率, 将其以对数坐标绘制在图 4(a)中。贝尔模型可

以用来描述蛋白质的去折叠速率与所受拉力之间的关系:

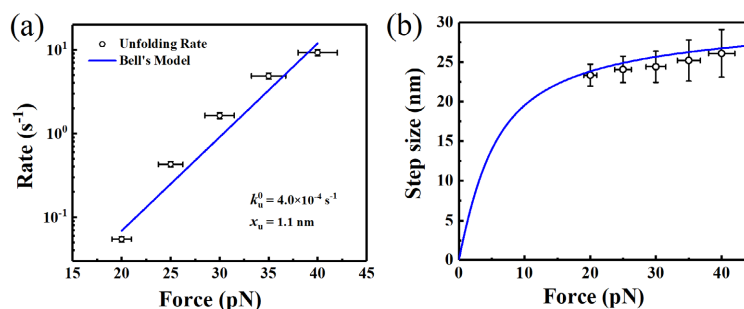
$$k_u(f) = k_u^0 \exp(fx_u/k_B T) \quad (2)$$

其中,  $k_u(f)$  是力依赖的去折叠速率,  $f$  是蛋白质受到的拉力,  $k_u^0$  是蛋白质在力为零时的去折叠速率,  $x_u$  是蛋白质从折叠态到过渡态的去折叠距离。利用贝尔模型拟合 AcP 在 20 pN~40 pN 的去折叠速率, 我们得到 AcP 在力为零时的去折叠速率  $k_u^0 = 4.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  和去折叠距离  $x_u = 1.1 \text{ nm}$ 。

蠕虫状链模型(WLC)可以被用来描述多肽链在拉力方向上伸长对于外力  $f$  的响应:

$$\frac{fA}{k_B T} = \frac{x_{\text{chain}}}{L} + \frac{1}{4} \left( 1 - \frac{x_{\text{chain}}}{L} \right)^{-2} - \frac{1}{4} \quad (3)$$

其中  $A$  是多肽链的驻留长度, 在小力下  $A$  约为 0.8 nm, 轮廓长度  $L$  约为 35.8 nm (每个氨基酸为 0.365 nm 和 AcP 蛋白含有 98 个氨基酸);  $x_{\text{chain}}$  是多肽链沿受力方向的伸长。通过力跳变实验获得的去折叠步长如图 4(b)所示, 统计不同力下的去折叠步长并取平均值。蓝色曲线表示由 WLC 模型确定的 AcP 在不同拉力下的伸长变化  $x_{\text{chain}}$ , AcP 在自然状态的 N-C 距离为 2.5 nm, 我们的实验数据与 WLC 模型确定的理论值相吻合, 进一步证明了我们实验数据的准确性。



**Figure 4.** Force-dependent unfolding rates of AcP and unfolding step size. (a) Unfolding rates of AcP under different forces were obtained from force-jump experiments. We fitted the unfolding rates from 20 pN to 40 pN by Bell's model and obtained the unfolding rate at zero force  $k_u^0 = 4.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  and the unfolding distance  $x_u = 1.1 \text{ nm}$ . The error bar in force comes from 5% uncertainty. Error bars for unfolding rates are standard error of the mean lifetime; (b) The average unfolding step size of AcP under different forces was obtained by force-jump experiments. The error bars for the step size are the standard deviation. The blue curve represents the WLC fitting with contour length of  $\sim 35.8 \text{ nm}$  and persistence length of  $\sim 0.8 \text{ nm}$

**图 4.** 不同拉力下的 AcP 的去折叠速率和转变步长。(a) 通过力跳变实验得到 AcP 在不同拉力下的去折叠速率。我们通过贝尔模型拟合 20 pN 到 40 pN 的去折叠速率, 得到力为零时的去折叠速率  $k_u^0 = 4.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  和去折叠距离  $x_u = 1.1 \text{ nm}$ 。力的误差来自 5% 的拉力校准引入的不确定性, 去折叠速率的误差棒是平均寿命的标准误差; (b) 通过力跳变实验得到不同力下 AcP 的平均去折叠步长。去折叠步长的误差棒是标准偏差。蓝色曲线代表蠕虫状链拟合, 轮廓长度约为 35.8 nm, 持久长度约为 0.8 nm

#### 4. 实验结论

在本文中, 我们基于重组蛋白 AviTag(biotin)-I27<sub>2</sub>-AcP-I27<sub>2</sub>-SpyTag 开展了磁镊拉伸实验。实验中通过 SpyTag-SpyCatcher 在 30 pN 左右的典型 3.5 nm 的信号和 I27 在大力下去折叠的信号作为指纹信号, 可以非常准确的区分正确的单个蛋白质-磁球链接与其它非特异性链接。虽然多个 I27 的去折叠信号可以提供指纹信号, 但它需要施加较大的接近 100 pN 的拉力以使其在数秒内发生去折叠, 在这么大的拉力下

链接容易断掉,很大可能性是由于链霉素和素与生物素之间链接的断裂。与 I27 不同, SpyTag-SpyCatcher 的指纹信号在 30 pN 就可以被观察到,而且由于 SpyTag-SpyCatcher 在 30 pN 的构象转变既包含局部的去折叠,又包含重新恢复构象的可逆过程,所以可以作为拉力校准信号来对不同磁球的拉力进行校准。本实验给出了双指纹信号同时进行拉力校准的单分子力谱实验的应用实例。

磁镊实验可以精确地控制拉力以不同的恒定加载速度增大或减少,也可以在不同的拉力间进行快速跳变并稳定保持恒定拉力。我们测量得到了 AcP 在不同的拉力加载速度下的去折叠力,并在不同的恒定拉力下测量的 AcP 的去折叠速率。相对于 AFM 实验,我们在更小的拉力下完成了测量,实验结果显示 AcP 在小力下的去折叠距离明显变大。图 4(a)中的试验点与标准的贝尔模型比较已经有些偏差。这显示 AcP 去折叠过渡态可能会随着拉力不同而变化。

在小于 20 pN 的拉力下,我们发现 AcP 的去折叠信号会和 I27 的去折叠信号发生混淆,一方面二者的去折叠速率开始变得比较接近,另外他们的去折叠转变的步长也差别不大[24]。所以在更小拉力下的测量,需要去除 I27 或者换用与 AcP 尺寸有较大差别的其它蛋白质代替 I27 作为连接手柄。我们也曾尝试测量 AcP 在小于 3 pN 的折叠速率,但是由于时间-伸长曲线波动较大,AcP 在小力下的折叠步长较小,导致我们未能在实验中直接观察到 AcP 的折叠信号。AcP 在更小拉力下的折叠与去折叠过程需要设计新的实验进行进一步的深入研究,只有同时测量它在不同拉力作用下的折叠速率和去折叠速率,才可以准确得到它的折叠自由能,进一步分析清楚 AcP 的自由能曲面的精细结构。

## 基金项目

本论文获得国家自然科学基金项目(批准号: 11874309, 12174322)以及 111 项目(B16029)的资助。

## 参考文献

- [1] Dill, K.A., Ozkan, S.B., Shell, M.S. and Weikl, T.R. (2008) The Protein Folding Problem. *Annual Review of Biophysics*, **37**, 289-316. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.37.092707.153558>
- [2] Dill, K.A. and MacCallum, J.L. (2012) The Protein-Folding Problem, 50 Years on. *Science*, **338**, 1042-1046. <https://doi.org/10.1126/science.1219021>
- [3] Wolynes, P.G. (2015) Evolution, Energy Landscapes and the Paradoxes of Protein Folding. *Biochimie*, **119**, 218-230. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2014.12.007>
- [4] McCallister, E.L., Alm, E. and Baker, D. (2000) Critical Role of  $\beta$ -Hairpin Formation in Protein G Folding. *Nature Structural Biology*, **7**, 669-673. <https://doi.org/10.1038/77971>
- [5] Religa, T.L., Markson, J.S., Mayor, U., Freund, S.M.V. and Fersht, A.R. (2005) Solution Structure of a Protein Denatured State and Folding Intermediate. *Nature*, **437**, 1053-1056. <https://doi.org/10.1038/nature04054>
- [6] Balbach, J., Forge, V., Lau, W.S., Jones, J.A., Van Nuland, N.A.J. and Dobson, C.M. (1997) Detection of Residue Contacts in a Protein Folding Intermediate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **94**, 7182-7185. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.14.7182>
- [7] Rief, M., Gautel, M., Oesterhelt, F., Fernandez, J.M. and Gaub, H.E. (1997) Reversible Unfolding of Individual Titin Immunoglobulin Domains by AFM. *Science*, **276**, 1109-1112. <https://doi.org/10.1126/science.276.5315.1109>
- [8] Zhao, X.T., Zhao, N., Shi, Y., Xin, H.B. and Li, B.J. (2020) Optical Fiber Tweezers: A Versatile Tool for Optical Trapping and Manipulation. *Micromachines*, **11**, Article No. 114. <https://doi.org/10.3390/mi11020114>
- [9] Le, S.M., Yu, M. and Yan, J. (2019) Phosphorylation Reduces the Mechanical Stability of the Alpha-Catenin/Beta-Catenin Complex. *Angewandte Chemie-International Edition*, **58**, 18663-18669. <https://doi.org/10.1002/anie.201911383>
- [10] Gosse, C. and Croquette, V. (2002) Magnetic Tweezers: Micromanipulation and Force Measurement at the Molecular Level. *Biophysical Journal*, **82**, 3314-3329. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(02\)75672-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(02)75672-5)
- [11] Chen, H., Fu, H.X., Zhu, X.Y., Cong, P.W., Nakamura, F. and Yan, J. (2011) Improved High-Force Magnetic Tweezers for Stretching and Refolding of Proteins and Short DNA. *Biophysical Journal*, **100**, 517-523. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.12.3700>



- [12] Pastore, A., Saudek, V., Ramponi, G. and Williams, R.J.P. (1992) 3-Dimensional Structure of Acylphosphatase Refinement and Structure-Analysis. *Journal of Molecular Biology*, **224**, 427-440. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(92\)91005-A](https://doi.org/10.1016/0022-2836(92)91005-A)
- [13] Stefani, M., Taddei, N. and Ramponi, G. (1997) Insights into Acylphosphatase Structure and Catalytic Mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **53**, 141-151. <https://doi.org/10.1007/PL00000585>
- [14] van Nuland, N.A.J., Chiti, F., Taddei, N., Raugei, G., Ramponi, G. and Dobson, C.M. (1998) Slow Folding of Muscle Acylphosphatase in the Absence of Intermediates. *Journal of Molecular Biology*, **283**, 883-891. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.2009>
- [15] Chiti, F., Taddei, N., Webster, P., Hamada, D., Fiaschi, T., Ramponi, G. and Dobson, C.M. (1999) Acceleration of the Folding of Acylphosphatase by Stabilization of Local Secondary Structure. *Nature Structural Biology*, **6**, 380-387. <https://doi.org/10.1038/7616>  
[https://www.nature.com/articles/nsb0499\\_380](https://www.nature.com/articles/nsb0499_380)
- [16] Chiti, F., Taddei, N., White, P.M., Bucciantini, M., Magherini, F., Stefani, M. and Dobson, C.M. (1999) Mutational Analysis of Acylphosphatase Suggests the Importance of Topology and Contact Order in Protein Folding. *Nature Structural Biology*, **6**, 1005-1009. <https://doi.org/10.1038/14890>  
[https://www.nature.com/articles/nsb1199\\_1005](https://www.nature.com/articles/nsb1199_1005)
- [17] Taddei, N., Chiti, F., Paoli, P., Fiaschi, T., Bucciantini, M., Stefani, M., Dobson, C.M. and Ramponi, G. (1999) Thermodynamics and Kinetics of Folding of Common-Type Acylphosphatase: Comparison to the Highly Homologous Muscle Isoenzyme. *Biochemistry*, **38**, 2135-2142. <https://doi.org/10.1021/bi9822630>
- [18] Taddei, N., Capanni, C., Chiti, F., Stefani, M., Dobson, C.M. and Ramponi, G. (2001) Folding and Aggregation Are Selectively Influenced by the Conformational Preferences of the Alpha-Helices of Muscle Acylphosphatase. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 37149-37154. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105720200>
- [19] Arad-Haase, G., Chuartzman, S.G., Dagan, S., Nevo, R., Kouza, M., Binh Khanh, M., Hung Tien, N., Li, M.S. and Reich, Z. (2010) Mechanical Unfolding of Acylphosphatase Studied by Single-Molecule Force Spectroscopy and MD Simulations. *Biophysical Journal*, **99**, 238-247. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.04.004>
- [20] Chen, H., Yuan, G.H., Winardhi, R.S., Yao, M.X., Popa, I., Fernandez, J.M. and Yan, J. (2015) Dynamics of Equilibrium Folding and Unfolding Transitions of Titin Immunoglobulin Domain under Constant Forces. *Journal of the American Chemical Society*, **137**, 3540-3546. <https://doi.org/10.1021/ja5119368>
- [21] Guo, Z.L., Hong, H.Y., Sun, H., Zhang, X.F., Wu, C.X., Li, B., Cao, Y. and Chen, H. (2021) SpyTag/SpyCatcher Tether as a Fingerprint and Force Marker in Single-Molecule Force Spectroscopy Experiments. *Nanoscale*, **13**, 11262-11269. <https://doi.org/10.1039/D1NR01907D>
- [22] Guo, Z.L., Hong, H.Y., Yuan, G.H., Qian, H., Li, B., Cao, Y., Wang, W., Wu, C.X. and Chen, H. (2020) Hidden Intermediate State and Second Pathway Determining Folding and Unfolding Dynamics of GB1 Protein at Low Forces. *Physical Review Letters*, **125**, Article ID: 198101. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.125.198101>
- [23] Su, H.H., Sun, H., Hong, H.Y., Guo, Z.L., Yu, P. and Chen, H. (2021) Equilibrium Folding and Unfolding Dynamics to Reveal Detailed Free Energy Landscape of Src SH3 Protein by Magnetic Tweezers. *Chinese Physics B*, **30**, Article ID: 078201. <https://doi.org/10.1088/1674-1056/abfb56>
- [24] Yuan, G., Le, S., Yao, M., Qian, H., Zhou, X., Yan, J. and Chen, H. (2017) Elasticity of the Transition State Leading to an Unexpected Mechanical Stabilization of Titin Immunoglobulin Domains. *Angewandte Chemie-International Edition*, **56**, 5490-5493. <https://doi.org/10.1002/anie.201700411>