

单分子水平上研究蛋白质的 折叠与展开动力学

蛋白质折叠应用案例

2017

单分子水平上研究蛋白质的折叠与展开动力学

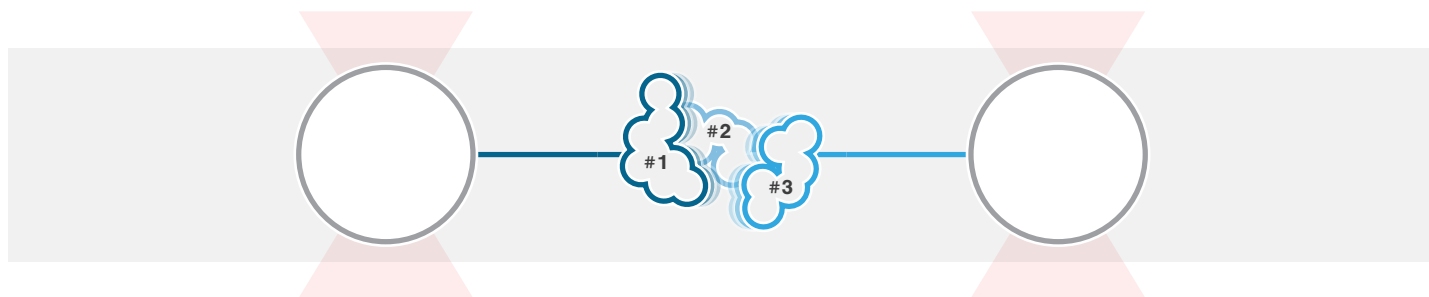


图1 多结构域蛋白质打开实验示意图，含有三个结构域的蛋白通过DNA链接与光镊捕获的微球相连

多结构域蛋白的展开步骤的研究

许多大分子（例如蛋白质和RNA）的生物学功能与其构象及构象动力学过程密切相关，例如，蛋白质的正确折叠成其天然状态对其生物学功能至关重要。而蛋白质的错误折叠或者未折叠要么（部分）无活性，更有甚者会显示对机体的毒性，因为错误折叠蛋白质的聚集与多种神经退行性疾病相关。

研究蛋白质如何正确折叠并确定其如何发生构象变化以完成生物学功能对于了解潜在的生物学机制以及疾病的发病机理至关重要。单分子力谱是研究分子构象变化的力学工具，这主要由其具备分离单个分子并实时观察其构象转变与展开过程的独特能力。

光镊系统具备出色的时空灵敏度和力学操纵能力，可以直接操纵单个蛋白质，并通过测量亚纳米级别的长度变化直接观察分子的构象如何改变。在本应用报告中，我们使用LUMICKS开发的高分辨光镊系统C-Trap®演示如何开展分子构象变化的相关研究，选择的对象为蛋白质钙调蛋白（CaM）（人体内最重要的钙结合蛋白）。

在过去的十多年中，基于单分子方法已经完成了一系列的突破实验，这些实验描述了分子构象变化与力的产生以及来源于相互作用和化学键水解释放的能量产生特定的力学反应之间的有效关联。

具有层流特性的微流控系统我们的自动化实验程序，单个CaM分子可以特异性的固定在光镊捕获的微球之间，CaM和微球之间通过DNA分子直接与他们的N端和C端结构域相连。

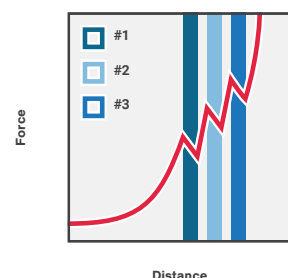


图2 通过增加光阱之间的距离实现对蛋白质分子的力学操控，在力谱曲线上观测到蛋白质分子的构象打开事件

相关文献

1. Stigler, J., Ziegler, F., Giesecke, A., Gebhardt, J. C. M. & Rief, M. The Complex Folding Network of Single Calmodulin Molecules. Science (80-.). 334, 512–516 (2011).
2. Stigler, J. & Rief, M. Calcium-dependent folding of single calmodulin molecules. Proc. Natl. Acad. Sci. 109, 17814–17819 (2012).

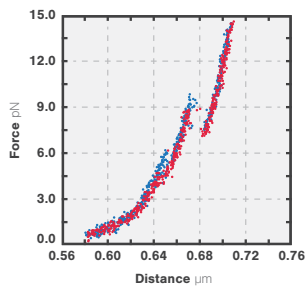


图3 全长CaM蛋白的力-距离延伸（蓝色）和力-距离收缩（红色）曲线，溶液环境为10mM Ca²⁺，拉伸和收缩的速度为100nm/s，微球直径为10μm，其应变系数为0.284pN/nm。

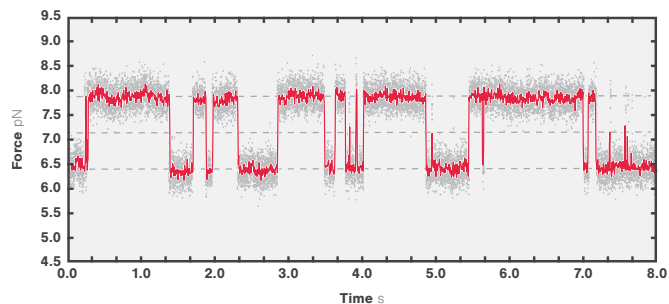
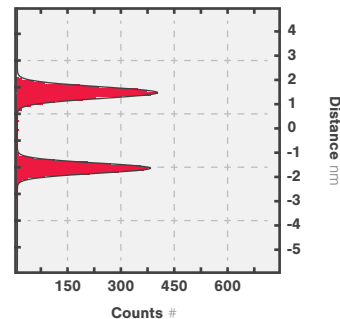


图4 溶液环境为10mM Ca²⁺的全长CaM的多态平衡动力学，作图中的直方图数据清楚地表明CaM分子有两个态，分别对应的力为6.5± 0.1 pN和7.8 ± 0.09 pN（平均值±标准方差）



在第一个实验中，我们记录了钙离子浓度为10mM的环境中全长CaM的拉伸和收缩动力学行为，我们以100nm/s的恒定拉伸和收缩速度记录了单个CaM的力学-距离延伸曲线（如图3）。在拉伸阶段，随着力的增加，可以明显的看到两个力学信号的突然下降，显示了两个展开步骤，对应着两个螺旋环-螺旋域的展开。因此，我们得出结论，C-Trap[®]在力学和距离测量上的高分辨特性（0.2pN < 0.5nm@100Hz）使其提供的力学-延伸距离的力谱曲线成为分辨单个蛋白质展开事件的力学利器，这种类型的测量非常适合野生型蛋白与那些改变或者受损蛋白质折叠特性之间的研究。

我们固定双光镊间的距离（借此固定施加在CaM上的初始拉力）进一步表征了CaM蛋白的折叠/展开平衡动力学，同时测量蛋白质长度的波动和分辨短寿命中间态间的转变（图4）。对单个CaM分子施加7.5pN的力，实时观察到三种不同态之间的平衡波动，这种波动反应了CaM螺旋环-环子域的折叠和展开。和参考1和2中的实验结果相同，这里展示了一个明显的多态折叠/展开模式（图4）。这种在较长一段时间内测量单个蛋白质分子在平衡状态下折叠和展开动力学变化的特征能够展示包含此生理学过程的大量信息，然而这种高质量的实验数据基于仪器的低漂移和长时间内的稳定特性实现的。使用这种分析方法，可以量化蛋白质在不同态的停留时间和态间的转变动力学，相应的，这些信息可以加深对特定蛋白质的折叠/展开途径的理解。

单个蛋白质折叠和展开动力学以及构象变化的研究在生物学和生物物理学领域是产生突破性发现的方法，实验C-Trap[®]光学-共聚焦荧光系统，可以记录单个蛋白质的展开和重折叠以及高度详细的平衡动力学过程。相应的，这使得科学家更容易研究蛋白质展开过程中的中间状态，了解有关蛋白质结构与功能的宝贵信息。蛋白质折叠和构象领域的进一步研究会用到C-Trap[®]系统的高灵敏和多色荧光单分子FRET特性，通过同步监测FRET效率和力的变化来进一步表征蛋白质构象变化，这将建立蛋白质的整体力学特性与局部结构特性间的关系。

info@lumicks.com

www.lumicks.com

Or find us on:



LUMICKS HQ

Pilotenstraat 41

1059 CH Amsterdam, The Netherlands

+31 (0)20 220 0817



LUMICKS Americas

800 South Street, Suite 100

Waltham, MA 02453, USA

+1 781 366 0380



LUMICKS 亚太

中国北京市朝阳区东三环中路20号 乐成
中心A座 577房间

电话: +86 (0)10 58783028

All content and images used in this document are owned or licensed by LUMICKS Technologies B.V and/or its subsidiaries (LUMICKS)!. Unauthorized use is prohibited. Any information provided herein by LUMICKS is made available "as is" and [you] understand and agree that such information is made available without any representation or warranty, express or implied, including any implied warranty of merchantability, satisfactory quality or fitness for any particular purpose or any warranty that the use of such information will not infringe or violate any patent or other proprietary rights of any third party.

For the latest product information please consult us directly. C-Trap®, m-Trap®, AFS®, u-Flux™, Bluelake™, z-Movi®, LUMICKS and the LUMICKS logo are registered trademarks of LUMICKS.

© LUMICKS. Amsterdam, The Netherlands.

LUMICKS