

生物软物质研究的新进展

王鹏业[†] 李明 翁羽翔

(中国科学院物理研究所 软物质物理实验室 北京 100190)

摘要 文章对近年来中科院物理研究所软物质物理实验室生物软物质研究的部分新进展做一简略介绍,包括 DNA 单分子研究, DNA 与组蛋白的相互作用动力学研究, 生物分子马达的运动机制研究, 解旋酶与 DNA 的结合以及解旋 DNA 的动力学研究, 朊病毒片段聚集的分子动力学研究, 蛋白质折叠动力学的脉冲升温-时间分辨光谱研究, 光合细菌外周捕光天线膜蛋白的拓扑结构研究等.

关键词 生物软物质, DNA, 蛋白质, 动力学, 软物质物理

Recent progress in biological soft matter research

WANG Peng-Ye[†] LI Ming WENG Yu-Xiang

(Laboratory of Soft Matter Physics, Institute of Physics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China)

Abstract On the occasion of the 80th anniversary of the Institute of Physics we present a brief introduction to the recent progress in our research on biological soft matters in the Laboratory of Soft Matter Physics, including single-molecule studies of DNA, the interaction dynamics between DNA and histones, the mechanism of biological molecular motors, the DNA binding and unwinding kinetics of helicases, molecular dynamics investigations on the aggregation of prion fragments, T-jump/time-resolved spectroscopy of protein folding dynamics, and studies on the topological shape of integral membrane protein light-harvesting complexes from photosynthetic bacteria.

Keywords biological soft matter, DNA, protein, dynamics, soft matter physics

1 引言

软物质这一概念由法国物理学家德热纳 (P. G. de Gennes) 首先提出,他在 1991 年诺贝尔奖授奖会上以“软物质(Soft Matter)”为演讲题目^[1],引起广泛关注.软物质的特征就体现在“软”上,比如轻轻施力即可使其产生较大形变,但它又不像普通流体(如水、空气)那样具有良好的流动性.软物质具有短距离的规则性,但缺乏长距离周期性,其形态与熵有很大关系.只有这样它才能够构造出千变万化极其复杂的系统,并可携带大量的信息,生命就是一个例子.因此,软物质是指处于固体和理想流体之间的复杂态物质.一般由大分子或基团组成,在自然界中广泛存在.软物质的基本特性是对外界微小作用的敏感性、非线性响应、自组织行为等.这类物质

与普通固体、液体和气体大不相同.流体热涨落和固态的约束共同导致了软物质的新行为,体现了软物质组成、结构和相互作用的复杂性及其特殊性.软物质在介观尺度(大约从 1nm 到 1 μ m)范围内,通过相互作用,可形成从简单的时空有序到复杂生命体一系列的结构体和动力学系统.软物质的丰富物理内涵和广泛应用背景引起越来越多物理学家的兴趣,是具挑战性和迫切性的重要研究方向,已成为凝聚态物理研究的重要前沿领域.

软物质与生命活动紧密相关,生物体基本上均由软物质构成,如细胞及组成它的主要成分(脂膜、蛋白质、DNA、RNA 等).软物质与一般硬物质的运动变化规律有许多本质区别,人们对这一研究领域的开拓还远未达到较完善的程度,任重而道远.软物

2008-05-24 收到

[†] 通讯联系人. Email: pywang@aphy.iphy.ac.cn

质的概念是从物理学观点上研究生物大分子的主要出发点之一,是连接物理学与生命科学的一条重要纽带.应用现代物理学手段,理论与实验相结合,对一些重要的生物大分子及其相互作用的研究,有助于在分子水平上揭示生物大分子结构、运动与功能的关系.这是物理学与生命科学交叉的前沿领域,有许多问题有待深入研究,是学术界面临的长期研究方向.

从物理学的观点上研究生命系统已经有了很长的历史.著名的物理学家薛定谔于 1943 年写的《生命是什么》^[2]为分子生物学这一极其重要的研究领域的诞生提供了概念上的奠基.该小册子已影响了几代人,包括 DNA 结构的发现者之一克里克(F. H. C. Crick).其中提出的“生命以负熵为生”、“基因是非周期固体”等极具洞察力的观点至今仍具有很强的启迪作用.还有一位有名的物理学家伽莫夫(“大爆炸”宇宙模型提出者之一)在生物学上深刻分析了“遗传密码”(1954 年),成为遗传密码研究的奠基人之一.随着科学的不断发展和研究方法的快速进步,物理学与生命科学越来越密不可分.尽管生命科学的研究近来突飞猛进,但其中仍存在许许多多未解之谜,对科学工作者极具挑战性.因此,从物理学的观点上看生物大分子,运用物理学的概念和方法(例如,通过先进的技术手段获得更精确的实验数据和应用更准确的定量模型来描述生物规律)研究生物物质及生命规律,将大有作为.

物理学研究方法的特点是从复杂的万象中找出普遍的规律,这样的运动规律具有很强的普适性和精确性.这些普适规律对于生命物质也不例外.物理学手段的不断发展大力促进了生命科学甚至医学研究.例如最近几年发展起来的单分子观测手段和单分子微操纵技术,已经成为了研究生物大分子的相互作用及动力学的重要方法.特别是与荧光技术的结合,使得从前一些无法直接观察到的现象得以澄清.

中国科学院物理研究所结合已有的研究基础和凝聚态物理学的发展动向,于 2001 年成立了软物质物理实验室.物理研究所主要从事凝聚态物理、光物理、原子分子物理和等离子体物理等方面的研究,很多基本研究方法和实验条件适用于研究软物质,是开展软物质物理研究的良好场所.经过几年的努力,软物质物理实验室在复杂流体、生物大分子的结构和动力学等方面取得了一些进展.下面就对我们近几年来在生物软物质研究方面的部分新进展进行一

个简略的综述.

2 研究进展

2.1 单分子 DNA

DNA(脱氧核糖核酸)是生命的核心物质,是遗传信息的携带者.生命的蓝图——基因即存在于这一大分子中.从结构上看它是一个较简单的长丝状分子,由两条螺旋状的脱氧核糖核苷酸长链组成,即众所周知的双螺旋.双螺旋外侧是带有负电的戊糖-磷酸骨架,双螺旋内部共有四种碱基(分别用 A, T, G, C 表示)这四种碱基以氢键相互作用组成碱基对(A 和 T 配对, 2 个氢键;G 和 C 配对, 3 个氢键)组成互补链.在生命活动中,DNA 的复制和转录等过程均须将碱基对的氢键打开.在生物体内(in vivo)这一过程是通过酶反应(如解旋酶)实现的.而在体外(in vitro),则可用加热的方法将氢键打开,使双链分离,导致 DNA 分子的熔化(melting),或称为变性(denature).这是一个很有用的方法,例如,目前已被广泛应用的 PCR(聚合酶链式反应)技术的一个重要环节就是通过加热使 DNA 熔化.我们研究了单个 DNA 分子在拉伸力作用下的熔化现象^[3].在 DNA 分子两端施加一定的拉伸力,常温下即可使碱基对的氢键打开,使 DNA 双链分离.我们利用分子梳技术将 λ -噬菌体 DNA 分子展开到疏水表面上,并拉伸到其伸直长度(contour length, 16.2 μm)的大约 1.6 倍.利用荧光分子只有与双链 DNA 结合才发射出较强荧光这一特点,通过荧光显微方法直接观察到了拉伸力导致的 DNA 单分子熔化现象,并发现钠离子、镁离子及 pH 值对 DNA 分子的拉伸有明显影响.

我们建立了一个研究单个 DNA 分子拉伸性质的磁镊装置^[4],可以提供 0.1 到 40 pN 范围的拉伸力,满足大部分单分子 DNA 实验的要求.利用该装置,我们测量了 DNA 分子的凝聚动力学.利用施加于 DNA 上的拉伸力使 DNA 的凝聚速率降低,在有限的时间分辨率下观察到了 DNA 的非连续凝聚过程.实验发现,在凝聚剂作用下,DNA 凝聚成直径约为 100nm 的圆环.有趣的是,DNA 的凝聚是不连续的,每一个凝聚动作只有约 300nm(圆环周长)的 DNA 片段沉积在圆环表面.在 DNA 两端施加拉力,可以使已经凝聚的 DNA 圆环解离.实验发现解离过程也是不连续的,每一个解离动作只有约 300nm 的 DNA 片段从圆环表面脱离^[5].

2.2 DNA 与组蛋白的相互作用

组蛋白是真核生物染色质中的主要蛋白质,结构研究表明,核心组蛋白 H2A、H2B、H3 和 H4 以八聚体的形式存在于核小体中,长度 146bp(碱基对)的 DNA 缠绕在组蛋白八聚体上 1.75 圈形成核小体。核心组蛋白是已知的最为保守的真核蛋白质之一,意味着染色质的基本结构可能由一个真核生物共同祖先进化而来。真核生物的 DNA 分子一般比较长,比如说,人的每个体细胞内 DNA 分子全长约 2m。而真核生物的细胞较小,例如动物细胞核的直径大约有 $10\mu\text{m}$ 。这么长的 DNA 分子被压缩到直径约 $10\mu\text{m}$ 量级的细胞核中,这是大自然的一个杰作。DNA 与组蛋白八聚体相互作用形成的核小体结构即是 DNA 压缩的第一个层次。核心组蛋白进化的保守性提示我们在亿万年的时间长河中这一结构是相当稳固的,大自然可能赋予了它在真核生物各物种中的相似功能。如能够找出这一结构中 DNA 与组蛋白相互作用的规律和本质,对于人们加深理解生命系统中大分子间的相互作用本质无疑有很大的启示作用。近来越来越多的研究表明,组蛋白与 DNA 的结合,不仅仅是为了将 DNA 压缩成紧密结构,更是在基因调控中起至关重要的作用。这方面的研究不断出现新的进展。例如,最近人们发现,通过修饰组蛋白,可以进行核小体的重组,从而实现 DNA 损伤的修复。

我们通过布朗动力学方法,系统研究了 DNA 与组蛋白的相互作用动力学。研究了核小体的形成,提出了组蛋白八聚体旋转模型来解释 DNA 与组蛋白八聚体的作用过程。模拟了在拉伸时,核小体被拉开的过程^[6]。通过可调的组蛋白手征性模型,模拟了核小体手征性的形成,发现 DNA 的缠绕方向强烈依赖于组蛋白的手征性,结果还显示出环境温度对核小体手征性有重要影响,提高温度可打破核小体的手征性^[7]。模拟了由染色质重组复合体引起的 DNA 弯曲对组蛋白定向滑移的影响,结果表明,在核小体一边的 DNA 上产生一个弯曲环后,组蛋白八聚体会向这个弯曲环滑动,直至这个弯曲环消失。DNA 弯曲环的大小是影响组蛋白八聚体会滑动的重要因素^[8]。通过改变 DNA 与组蛋白八聚体之间的相互作用力,我们研究了组蛋白修饰(磷酸化、乙酰化等)对核小体结构的影响。布朗动力学结果显示核小体的结构稳定性很敏感地依赖于相互作用力的大小。DNA 从修饰后的组蛋白八聚体上一圈一圈地解离

下来。我们还研究了温度的影响, DNA 断点的影响以及修饰后的组蛋白八聚体与非修饰组蛋白八聚体的竞争效应。解释了前人观察到的 DNA 断点处的磷酸化核小体更容易解离的现象^[9]。

利用分子梳技术我们研究了一价(Na^+ , K^+)和二价(Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+})金属离子对 DNA 与组蛋白结合的影响。我们将 λ -DNA-组蛋白复合体在疏水表面上进行了拉伸,用荧光显微镜直接观察加入金属离子后的变化。结果表明, Na^+ 、 K^+ 在一定程度上抑制 DNA 与组蛋白的结合; Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 增强 DNA 与组蛋白的结合,并能明显增加 DNA 与疏水表面的吸附; Mn^{2+} 容易导致 DNA-组蛋白复合体聚集^[10]。我们还利用偏振荧光研究了二价金属离子(Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+})对 DNA 与组蛋白相互作用的影响^[11]。结果显示,当二价金属离子、组蛋白、DNA 共同培育时, DNA 可与更多的组蛋白结合。我们还发现, Mn^{2+} 比 Mg^{2+} 和 Ca^{2+} 更容易使 DNA-组蛋白复合体发生凝聚。

利用单分子磁镊装置,我们研究了恒定拉伸力下 DNA 与蛋白作用的动力学,得到加入组蛋白后 DNA 长度随时间的变化曲线^[12]。实验发现,在小于 1 pN 的拉力作用下, DNA 的长度随时间曲线很平缓地缩短,组蛋白使 DNA 凝聚,而在大于 1.3 pN 的力作用下,曲线会呈现锯齿形状,表明存在 DNA 与组蛋白结合的动态平衡。在低浓度时, DNA 的凝聚曲线呈指数下降,这是由于蛋白的结合是随机而且独立造成的,而在高浓度时, DNA 的凝聚曲线呈 S 形状,理论分析表明,在高浓度时,组蛋白之间存在协同相互作用, S 形状的曲线是 DNA 结合协同性的体现。对已经凝聚的 DNA 施加大的拉力后, DNA 与组蛋白形成的结构被逐渐打开, DNA 的长度-时间曲线呈阶跃性伸长,表明 DNA 从组蛋白上一圈一圈地解离下来。

2.3 生物分子马达

生命在于运动,生物体的运动离不开生物分子马达的驱动。生物体内存在着各种各样的马达分子,多数利用化学反应(主要是水解三磷酸腺苷,即 ATP)产生的能量驱动机械运动,也可以反过来利用机械运动合成 ATP(如 ATP 合酶)。生物分子马达大多是蛋白质分子(称为马达蛋白),也有的含有核酸分子(如核糖体)。正如我们日常接触到的宏观机械马达,生物分子马达是维持生命活动的运动机器。从运动方式上区分,有线性运动马达(如驱动蛋白、动

力蛋白等), 旋转马达(如 ATP 合酶, 鞭毛马达等), 杠杆臂式马达(如某些肌球蛋白), 还有沿 DNA 或 RNA 运动的分子马达(如解旋酶, 核糖体等)。

对于线性运动马达, 我们提出了一个描述生物分子马达动力学行为的二维模型^[13]。这一模型同时包括了分子马达沿轨道的行进性运动和从轨道上的解离。理论上给出的对于给定的 ATP 浓度时跑程和停留时间的分布, 平均跑程、平均停留时间和平均速度与 ATP 浓度及负载的依赖关系与前人的实验结果很好地一致。

驱动蛋白是细胞内通过蛋白质分子间相互作用而沿微管做定向运动的一种重要的分子马达。它参与细胞内染色体运动、细胞器运输、细胞核运动、细胞收缩、微管分布、纺锤体形成、细胞分裂等许多重要过程。驱动蛋白马达在实验和理论上已被进行了广泛的研究。然而, 其行进运动的微观机理仍未确定。我们基于化学、力学和电学耦合提出了一个交臂模型来描述这种行进运动^[14]。在该模型中, 驱动蛋白两个头的 ATP 水解化学反应速率由作用在其颈上的力(包括内部弹性力和外部负荷)来调控。在低外部负荷情况下, 驱动蛋白的后头的 ATP 水解化学反应速率远大于前头的速率, 因而两个头在 ATP 水解化学反应和力学周期循环中是协调的, 且马达以每步消耗一个 ATP 的方式行走。在大的前向负荷情况下, 两个头的 ATP 水解化学反应速率变得可比拟, 因而两个头在 ATP 水解化学反应和力学周期循环中不再很好地协调。该模型与驱动蛋白的结构研究结果以及 ATP 水解化学反应路径一致。利用此模型所估算的驱动力(约 5.8 pN)与实验结果(5—7.5 pN)一致, 所估算的每步中的运动时间(约 10 μs)也与实验测量值(0—50 μs)符合, 解释了已观察到的每步(8 nm)分为两个半步的现象。基于结构和生物化学信息, 我们分析了描述生物分子马达双头驱动蛋白行进运动的交臂模型, 使得突变的同二聚体和异二聚体驱动蛋白谜一般的动力学行为得到了解释^[15]。我们提出双头驱动蛋白的两个头是沿着微管以部分协调而不是以紧密协调的方式行走。协调的程度依赖于驱动蛋白的两个头酶解 ATP 的速率, 而这一速率则由内在弹性力和外负载共同确定^[16]。常规驱动蛋白在各类细胞中沿微管以跛行的方式运输货物。基于我们提出的部分协同交臂模型, 我们提出了一个跛行行为的新机制, 认为这一跛行行为是由于马达二聚体行进时, 在连续的两步中作用到马达头上的垂直力不同而引起的^[17]。我们还利用蒙特卡

罗方法模拟了驱动蛋白的前向运动^[18]及偶尔发生的后向运动^[19]。

动力蛋白也是沿微管做定向运动的一种重要的分子马达, 主要有两类: 鞭毛动力蛋白和胞质动力蛋白。鞭毛动力蛋白最早发现是驱使纤毛及鞭毛运动的分子马达。胞质动力蛋白发现较晚, 目前已知它有多种重要生物学功能: 参与细胞内的细胞器及囊泡的运输(通常与驱动蛋白运输方向相反), 细胞纺锤体的组装, 染色体的分离等。我们基于已有的结构信息及生化实验结果, 建立了动力蛋白的单向运动模型^[20]。在这个模型中, 动力蛋白与微管的结合力不依赖于它的核苷状态, 而是由动力蛋白的柄相对于微管的取向变化而自然确定, 因此我们的模型不需要假定相距很远的 ATP 结合位点与柄端的微管结合位点之间通讯的存在, 而从前的模型这一假定是必须的。利用我们的模型可以很好地解释已有的实验结果, 例如, ATP 及 ADP(二磷酸腺苷)对动力蛋白从微管上解离的影响, 饱和 ATP 浓度下单头鞭毛动力蛋白的运动, 双头胞质动力蛋白运动的步长与负载的关系, 停止力的大小与 ATP 浓度的关系等。对于动力蛋白和驱动蛋白共同运输货物的情况, 我们利用蒙特卡罗方法模拟了两者的协调工作^[21]。

肌球蛋白不仅负责肌肉的伸缩运动, 它还有一类是在细胞内沿肌动蛋白丝定向运动而起运输作用, 例如肌球蛋白 V 和肌球蛋白 VI。我们提出了一个交臂模型来描述肌球蛋白 V 和肌球蛋白 VI 这两种双头分子马达^[22]。在这个模型中, 双头分子马达的运动方向自动地由双头在自由状态下的相对取向和马达头在肌动蛋白丝上的结合方向所决定。这决定了肌球蛋白 V 向肌动蛋白丝正端运动而肌球蛋白 VI 向负端运动。该模型给出的动力学特性与已有的实验结果一致。我们利用交臂模型详细分析了肌球蛋白 V 的行进运动^[23]。而对于肌球蛋白 VI, 我们则建议了一个交臂扩散模型, 用于描述其定向运动^[24]。

ATP 合酶是一个旋转的生物分子马达。它是生物体内的“能源工厂”, 通过质子梯度驱动, 制造 ATP。它由包含一个 c 环的“转子”F₀ 和包含有一个 α₃β₃ 六聚体的“定子”F₁ 构成。在不同的物种里, 构成 c 环的 c-亚单元个数从 10 到 14 各有不同, 但 α₃β₃ 六聚体却始终保持其三重对称性。我们通过数值模拟研究了不同 c-亚单元个数的 F₀ 与 F₁ 的转动耦合。我们发现, 对于不同个数 c-亚单元的 ATP 合酶, 转子 F₀ 在 F₁ 周期的作用下, 平均每三步前进

一周,且其停留的位置由 F_0 自身的周期决定.当 c -亚单元个数是 3 的倍数时,上述的三步大小相等.当 c -亚单元个数不是 3 的倍数时,三步的大小及停留的时间均不同^[25].

我们还利用单分子磁镊研究了 DNA 易位酶的工作机理,发现 SpoIIIE 易位酶识别 DNA 分子上的一个位点,由该位点决定 SpoIIIE 的易位方向,以每步约 24 个碱基的步距,在 DNA 上以每秒约 7000 个碱基的速度快速运动.根据实验分析提出了一个 SpoIIIE 易位酶的蠕虫爬行工作模型.

2.4 解旋酶

解旋酶是作用于 DNA 或 RNA 的一类特殊马达蛋白.解旋酶能够利用水解 ATP 产生的能量,沿 DNA 分子运动.其主要功能是将双链 DNA 分子碱基对之间的氢键打开,将双链 DNA 解旋成单链 DNA.有的解旋酶还有 DNA 外切功能(如 RecB-CD),有的解旋酶在一定条件下还能够促进单链 DNA 的退火(annealing).解旋酶广泛存在于原核、真核生物和病毒体内,从简单的复制叉处核酸双链分离到复杂的 Holliday 结构分支移位等核酸代谢过程它都起着十分重要作用.因此,解旋酶在 DNA 的复制、修复、基因重组以及转录等过程中扮演着非常重要的角色.

我们与法国的奚绪光研究组合作主要研究了 RecQ 和 PcrA 这两种解旋酶. RecQ 属于 SF2 超家族. RecQ 家族解旋酶对保持遗传的稳定性起着重要的作用.在人体细胞内,至少有 5 种 RecQ 解旋酶,其中 BLM,WRN 和 RecQ4 解旋酶的缺失或变异分别会导致 Bloom,Werner 和 Rothmund-Thomson 综合征,这些遗传性疾病主要表现为成年早老症和各种肿瘤症状.在人们日益关注衰老和肿瘤防治的今天,RecQ 解旋酶逐渐成为研究的热点. PcrA 属于 SF1 超家族,是枯草杆菌、金黄色葡萄球菌等的基本解旋酶,与大肠杆菌中的 Rep 和 UvrD 同源. PcrA 在质粒的滚环复制中起重要作用并与紫外损伤的修复有关.

我们利用偏振荧光方法研究了解旋酶 RecQ 与 DNA 分子的结合,定出了 RecQ 与 DNA 相互作用的热力学参数.通过测量荧光标定的寡核苷酸的偏振荧光,发现一个 RecQ 单体结合 10 个核苷酸. AMP-PNP 和 ADP 对 RecQ 与 dsDNA 的结合没有明显影响. RecQ 有一个强结合位点,无论是 ssDNA 还是 dsDNA 都是结合于这一位点.每个 DNA-解旋酶复

合体的形成伴随着 3—4 个离子的释放^[26].进一步的实验结果显示,RecQ 的锌指结构域在保持整个蛋白质的完整性和与 DNA 的结合力上是至关重要的^[27].

我们利用荧光显微和原子力显微直接观察了 RecQ 解旋酶与 DNA 的相互作用. DNA-RecQ 复合物通过分子梳方法被拉伸到疏水表面上,通过荧光显微法观察到 RecQ 与 DNA 的结合和解旋导致 DNA 分子的缩短.原子力显微镜观察发现 RecQ 主要是以单体形式存在于溶液中和结合到 DNA 上^[28].

我们应用荧光检测方法研究了 RecQ 解旋酶的 DNA 解旋动力学特性.该实验基于荧光共振能量转移并在停流装置中进行,通过检测 DNA 双链分离导致的荧光素荧光发射增强来观察 DNA 的解旋过程.利用该方法测定了不同酶浓度下 RecQ 的 DNA 解旋速度,并给出了解旋速度对镁离子浓度的依赖性以及 RecQ 对 DNA 的解旋极性^[29].

结合快速停流技术,利用荧光共振能量转移的方法,我们系统地研究了 RecQ 解旋双链 DNA 的动力学机制. RecQ 解旋酶对 ss/dsDNA 底物的结合实验结果表明,RecQ 优先结合于 DNA 的 3'尾部 ss/dsDNA 连接处,每个 DNA 底物结合 RecQ 分子的数目随单链尾部的长度呈线性递增关系.预稳态动力学分析结果表明,瞬态解旋幅度与 RecQ 浓度之间的比率是 1:1,这说明了参与解旋的 RecQ 解旋酶是以单体的形式工作的.在单转换动力学实验中,RecQ 解旋 DNA 并不依赖于 3'尾部的单链长度,表明在 DNA 解旋过程中 RecQ 分子之间并不具有协同效应.通过动力学实验数据分析,我们还给出了 RecQ 的解旋步幅大小约为 4 bp,解旋速率高达 21 步/秒.我们的动力学实验结果表明,不仅 RecQ 能够以活性单体形式快速高效地解旋 DNA 底物,而且 SF2 家族的解旋酶也能以蠕虫爬行方式解旋双链 DNA^[30].

我们研究了 Bloom 综合征蛋白(BLM,属 RecQ 家族解旋酶)的精氨酸指在 ATP 水解以及能量耦合中所起的作用^[31].结构模型、点突变、生化和生物物理分析表明,围绕 ATP 结合位点周围残基的突变严重影响 BLM 的 ATP 酶活性.这些突变同时也削弱了 BLM 解旋 DNA 的能力,但不影响 BLM 与 ATP 及 DNA 的结合能力.我们还详细研究了多个 BLM 致病突变体与 DNA 的相互作用动力学,揭示了每个具体的突变点对解旋活性、单链及双链 DNA 结合能

力、ATP 结合能力以及 ATP 水解能力的影响^[32], 提供了关于其致病机理的信息。

解旋酶 PcrA 的晶体结构已经解出, 但人们对它解旋动力学的功能状态还缺乏了解。我们在单转换和多转换两种条件下, 利用荧光反应 - 停流方法研究了 PcrA 对 DNA 解旋的动力学机制^[33], 发现解旋强烈地依赖于 PcrA 的浓度和底物的 3' 端单链 DNA 尾部长度, 表明多体 PcrA 是高效解旋的必要条件。解旋速率与 ATP 浓度的关系给出 Hill 系数大约等于 2, 意味着 PcrA 以二聚体方式工作。我们确定了 PcrA 的运动步长是 4bp, 运动速率大约是每秒 9 步。另外, 我们还发现 PcrA 解旋 16bp 的 DNA 要比解旋 12bp 的 DNA 高效得多, 显示出蛋白与双链 DNA 之间相互作用在解旋酶活性中的重要性。

我们还用磁镊研究了解旋酶 UvrD 的解旋机理。实验表明, UvrD 以二聚体的形式工作。二聚体协同作用解开 DNA 双链。在解旋过程中, 二聚体有可能作为一个整体从 3' 单链转移到 5' 单链上, 使得解开的 DNA 再慢慢退火。当二聚体在解旋过程中分解时, 解旋暂停。这时候如果解旋酶从 DNA 上脱离, 则解旋停止, 并且解开的 DNA 迅速退火。如果又形成一个二聚体, 则解旋恢复。实验还发现, UvrD 的解旋速度随施加到 DNA 上的拉力增加而减小。结合上述实验结果, 我们提出了一个二聚体蠕虫爬行模型, 来描述 UvrD 的解旋机理。

2.5 朊病毒

蛋白质变性 (protein denaturation) 引起的疾病 (如阿尔茨海默病, 克雅氏病, 白内障等) 随着社会的发展和人类平均寿命的延长已逐渐凸显出对健康的危害。近年来, 随着研究的深入, 人们对于这些疾病已经有了较多的了解, 并发展出了许多治疗方法。但要从分子生物学的层次彻底研究清楚其机理仍有很长的路要走。我们针对可引起克雅氏病的朊病毒 (prion) 开展了分子动力学 (MD) 研究。根据已被广泛接受的假说, 传染性海绵状脑病 (TSEs, 又称 prion disease) 的发病原因是朊病毒的羊痒病异构体 PrP^{Sc}。而 PrP^{Sc} 与它的良性异构体 PrP^C (并不引起疾病) 拥有同样的氨基酸序列。尽管 PrP^C 真正的生物学功能目前并不清楚, 但异构体 PrP^{Sc} 却能够在脑中聚集成斑块导致 TSEs。这表明 PrP^{Sc} 与 PrP^C 的生化性质有很大的不同, 这也强烈地暗示了它们的三维空间结构也有区别。PrP^C 具有 3 个 α 螺旋, 从 N 端到 C 端这 3 个 α 螺旋依次被命名为 H1, H2 和 H3。

在 PrP^{Sc} 中, H1 不存在。因此, 在 PrP^C 到 PrP^{Sc} 结构转变中, H1 的稳定性起着至关重要的作用。MD 为研究从 PrP^C 到 PrP^{Sc} 的结构转变提供了强有力的工具。通过 MD, 我们模拟了野生型以及变异体 F198S, F198N, F198G, F198K, F198E, F198M, F198C, F198A, F198D 和 F198T 的转变。其中的 F198S 已知可引起 PrP^{Sc} 的形成。我们的模拟结果显示, F198M, F198C, F198A, F198D 和 F198T 的 H1 稳定性与野生型的 H1 相当, 而 F198S, F198N, F198G, F198K 和 F198E 的 H1 比野生型的 H1 更不稳定^[34]。因此, 这后 5 种变异体更容易形成 PrP^{Sc}, 从而导致 TSEs 的可能性更大。我们还通过分子动力学探索了朊病毒片段 PrP106—126 在酸性环境下的纤维生长过程。结果显示, 在纤维边沿的影响下, 单个的 PrP106—126 多肽能够形成 β 片并生成为纤维的新单元。这意味着纤维能够沿着两端延长, 并且只有横截面具有传染性。如果长纤维具有一定的断裂成两段的概率 (这一概率将正比于纤维长度), 这一纤维延长机制将导致纤维量的指数增长, 最终导致 TSEs。我们发现在酸性环境下, 单个的 PrP106—126 片段表现出比中性环境下远多的构象变化。表明溶液中 pH 值的降低会增加纤维增长的速度^[35]。

2.6 蛋白质动态结构及其折叠动力学的脉冲升温 - 时间分辨中红外光谱研究

肽链是如何折叠成具有确定空间三维结构的蛋白质是生命科学有待进一步回答的重要科学问题。目前研究蛋白质折叠动力学的商用设备 (如快速停流设备) 的时间分辨率为毫秒量级, 为了开展更高分辨率的蛋白质折叠动力学研究, 我们经过多年努力, 基于国内的红外激光技术 (CO 气体可调谐激光器), 自行研制了脉冲升温 - 时间分辨中红外光谱仪, 获得的时间分辨率为 30ns, 吸光度差值分辨率为千分之五, 光谱范围能够覆盖整个酰胺 I 带, 也是目前国际同类研究设备中光谱范围最宽的一套设备。在该套设备上, 我们开展了细胞色素 C 的去折叠过程的研究。细胞色素 C 参与细胞呼吸链的电子传递过程, 含有一个血红素基团, 其中心为一铁离子与卟啉环平面内的 4 个 N 原子配位, 轴向与蛋白质环折结构中蛋氨酸的 S 原子配位形成 Fe—S 键。以往的研究依据 Fe 离子的可见瞬态吸收光谱的变化, 给出 Fe—S 键断裂的时间常数为 300ns。然而无法确认是蛋白质局域结构先发生变化导致 Fe—S 键断裂, 还是 Fe—S 键先断裂再导致蛋白

质的失稳. 我们应用脉冲升温 - 纳秒时间分辨中红外光谱追踪蛋白质环折结构的变化, 发现环折结构向无规结构变化的时间常数为 140ns, 并在其他结构单元的变化中观察到了约 300ns 的动力学分量, 从而确定是蛋白质局域结构的失稳导致 Fe—S 键的断裂, 并引起蛋白质的进一步失稳, 阐明了细胞色素 C 热不稳定的原因^[36]. 此外, 我们还利用脉冲升温 - 纳秒时间分辨中红外激光光谱研究了氨基酸分子间氢键的模式以及通过氢键相连的氨基酸链长与氨基酸分子结构的关系^[37].

2.7 光合细菌外周捕光天线膜蛋白在溶液中的拓扑结构、畸变及对传能效率影响的研究

光合细菌含有两种捕光天线膜蛋白: 一种是包含反应中心的内周天线膜蛋白 LH1, 负责将激发能传递给反应中心; 另外一种是外周天线膜蛋白 LH2, 其功能是捕获光能并传给相邻的内周天线 LH1. 我们与中科院高能物理所同步辐射中心合作, 应用国内的同步辐射装置, 开展了小角 X 射线散射测量 LH2 在溶液中拓扑结构的研究. 小角 X 射线散射在结构生物学中是一种十分有效的方法, 虽然该方法不能用于测定高分辨率的分子结构, 但能够通过测定生物大分子在溶液中的小角散射曲线, 再构生物大分子低分辨形貌, 给出有关生物大分子拓扑结构的信息. 我们的研究表明, LH2 在水溶液中的拓扑结构是一个扁形的椭圆盘, 外面包有一个单分子层的表面活性剂. 在扣除表面活性剂单分子层厚度后, 得到 LH2 为长轴 80Å, 短轴 55Å, 椭圆度为 0.59 的椭圆结构. 该结构与单分子光谱得到的结论十分相近, 从而直接验证了 LH2 在溶液中的椭圆结构^[38].

我们进一步通过在溶液中引入纳米粒子和蛋白质的相互作用, 控制结构畸变, 对膜蛋白内的细菌叶绿素激子态进行调控. 由于色素分子呈环状聚集体分布在膜蛋白骨架中, 其排列方式也会随蛋白质结构的变化而改变. 激子理论分析表明, 同一个环内的叶绿素分子有较强的相互作用, 光激发后能形成离域的激子态, 便于能量的传递. 同时环状结构的最低激发态为光学暗态, 有利于激发能的储存. 瞬态光谱实验表明, 当纳米粒子和 LH2 膜蛋白结合后, 叶绿素激子态的寿命变短. 我们设计了一系列实验, 通过改变不同的纳米粒子材料 (TiO₂, SiO₂)、膜蛋白环的直径 (LH2, LH1)、含类胡萝卜素和不含胡萝卜素 LH2 的突变体, 排除了叶绿素激发态和 TiO₂ 纳米粒

子间的电荷传递及类胡萝卜素分子参与电荷传递的可能性, 揭示出激子态寿命与光合天线膜蛋白与纳米粒子的相互作用相关. 证明激子态寿命的变短是因为膜蛋白的畸变, 导致激子态的对称性降低, 使得能量最低激子态由光学禁阻态变成光学跃迁部分允许态, 令激子态的寿命变短^[39].

3 结束语

通过近几年对生物软物质的研究, 我们有点体会: (1) 尽管生物是一个复杂体系, 但我们可以从中选择科学问题较为清晰和明确的方向, 从而适于从物理学的视点和用物理学的手段开展 (理论和实验) 研究, 在这个物理学与生命科学的交叉点上找到突破口; (2) 选择在生命科学中具有很大重要性 (例如与癌症、阿尔茨海默症等严重危害人类健康疾病的发生机理和治疗相关) 的课题, 这些课题研究的突破不但会大大加深我们对生物大分子相互作用和运动规律及其与生物功能关系的认识, 而且为进一步发展应用打下基础; (3) 目前这个研究领域存在许多悬而未决的重大科学问题, 处于学术前沿领域, 并且有明确的研究目标, 是研究者的“金矿”; (4) 随着研究工作的逐渐深入, 根据需求, 需要不断地改进和发展研究手段, 从而会带动新方法、新技术的发展.

尽管我们近年来在生物软物质物理方面的研究取得了一些重要进展, 但仍处于起步阶段. 由于软物质与生物大分子的物理研究前景在全球学术界被许多著名研究者看好, 尤其是欧、美、日纷纷投入大量研究经费支持, 国际竞争也异常激烈. 因此, 这方面的研究既是机遇也是巨大挑战.

致谢 感谢国家自然科学基金、中国科学院创新工程等相关项目的资助.

参 考 文 献

- [1] De Gennes P G. *Rev. Mod. Phys.*, 1992, 64 645
- [2] Schrödinger E. *What is Life?* Cambridge University Press, Eleventh printing, 2004
- [3] Liu Y Y, Wang P Y, Dou S X *et al.* *J. Chem. Phys.*, 2004, 121 4302
- [4] Ran S Y, Wang X L, Fu W B *et al.* *Chin. Phys. Lett.*, 2006, 23 504
- [5] Fu W B, Wang X L, Zhang X H *et al.* *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, 128 15040
- [6] Li W, Dou S X, Wang P Y. *J. Theor. Biol.*, 2004, 230 375
- [7] Li W, Dou S X, Wang P Y. *J. Theor. Biol.*, 2005, 235 365
- [8] Li W, Dou S X, Xie P *et al.* *Phys. Rev. E*, 2006, 73: 051909

[9] Li W , Dou S X , Xie P *et al.* Phys. Rev. E , 2007 , 75 : 051915

[10] Liu Y Y , Wang P Y , Dou S X *et al.* Chin. Sci. Bull. , 2005 , 50 731

[11] Liu Y Y , Wang P Y , Dou S X *et al.* Chin. Sci. Bull. , 2007 , 52 :1166

[12] Ran S Y , Wang X L , Fu W B *et al.* Chin. Sci. Bull. , 2008 , 53 836

[13] Xie P , Dou S X , Wang P Y. Chin. Phys. , 2004 , 13 :1569

[14] Xie P , Dou S X , Wang P Y. Chin. Phys. , 2005 , 14 734

[15] Xie P , Dou S X , Wang P Y. BioSystems , 2006 , 84 24

[16] Xie P , Dou S X , Wang P Y. Biophys. Chem. , 2006 , 123 58

[17] Xie P , Dou S X , Wang P Y. J. Mol. Biol. , 2007 , 366 976

[18] Wang H , Dou S X , Wang P Y. Chin. Phys. Lett. , 2005 , 22 2980

[19] Wang H , Zhang Y , Dou S X *et al.* Chin. Phys. B , 2008 , 17 1513

[20] Xie P , Dou S X , Wang P Y. Acta Biochim. Biophys. Sin. , 2006 , 38 711

[21] Wang H , Dou S X , Wang P Y. Chin. Phys. Lett. , 2008 , 25 321

[22] Xie P , Dou S X , Wang P Y. Chin. Phys. , 2005 , 14 744

[23] Xie P , Dou S X , Wang P Y. Biophys. Chem. , 2006 , 120 225

[24] Xie P , Dou S X , Wang P Y. Biophys. Chem. , 2006 , 122 90

[25] Qian J , Xie P , Dou S X *et al.* Chin. Phys. , 2005 , 14 2214

[26] Dou S X , Wang P Y , Xu H Q *et al.* J. Biol. Chem. , 2004 , 279 :6354

[27] Liu J L , Rigolet P , Dou S X *et al.* J. Biol. Chem. , 2004 , 279 :42794

[28] Liu Y Y , Wang P Y , Dou S X *et al.* Sci. Technol. Adv. Mater. , 2005 , 6 842

[29] Zhang X D , Dou S X , Xie P *et al.* Acta Biochim. Biophys. Sin. , 2005 , 37 593

[30] Zhang X D , Dou S X , Xie P *et al.* J. Biol. Chem. , 2006 , 281 :12655

[31] Ren H , Dou S X , Rigolet P *et al.* Nucleic Acids Res. , 2007 , 35 :6029

[32] Guo R B , Rigolet P , Ren H *et al.* Nucleic Acids Res. , 2007 , 35 :6297

[33] Yang Y , Dou S X , Ren H *et al.* Nucleic Acids Res. , 2008 , 36 :1976

[34] Zhang Y , Qian J , Wang P Y *et al.* J. Comput. Theor. Nanosci. , 2006 , 3 964

[35] Zhang Y , Zhao X , Wang P Y. J. Theor. Biol. , 2007 , 245 238

[36] Ye M , Zhang Q L , Li H *et al.* Biophys. J. , 2007 , 93 2756

[37] Ye M P , Li H , Zhang Q L *et al.* Chin. J. Chem. Phys. , 2007 , 20 :461

[38] Hong X , Weng Y X , Li M. Biophys. J. , 2004 , 86 :1082

[39] Chen X H , Zhang L , Weng Y X *et al.* Biophys. J. , 2005 , 88 :4262



· 书评和书讯 ·

科学出版社物理类新书图书推荐

书名	作(译)者	定价	出版日期
晶体振荡器	赵声衡	62.00	2008年5月
凝聚态物理的格林函数理论	王怀玉	78.00	2008年5月
肿瘤热疗物理学	刘静	58.00	2008年5月
惯性聚变物理	沈百飞	75.00	2008年5月
激光的衍射及热作用计算(修订版)	李俊昌	68.00	2008年5月
天文学科、数学学科发展研究报告	国家自然科学基金委员会数学物理科学部	35.00	2008年4月
物理学学科发展研究报告	国家自然科学基金委员会数学物理科学部	48.00	2008年1月
力学学科发展研究报告	国家自然科学基金委员会数学物理科学部	28.00	2007年1月
仿真影像学技术	罗立民等	58.00	2008年4月
微纳米 MOS 器件失效机理与可靠性理论	郝跃 刘红侠	78.00	2008年3月
磁性量子理论——材料的磁学性能(第三版)(影印)	R. M. White	68.00	2008年2月
半导体物理电子学(第二版)(影印)	Sheng S. Li	98.00	2008年2月
碳纳米管——从基础到应用(影印)	A. Loiseau	90.00	2008年2月
统计力学(第二版)(影印)	F. Schwabl	96.00	2008年2月
量子统计力学(第二版)	张先蔚	52.00	2008年2月
输运理论(第二版)	黄祖洽	68.00	2008年1月
高磁场超导磁体科学	王秋良	68.00	2008年1月
聚变能及其应用	邱励俭	96.00	2007年12月
拉曼 布里渊散射(第二版)	程光照	98.00	2007年12月
现代物理学前沿选讲	黄祖洽	36.00	2007年9月
半导体的检测与分析(第二版)	许振嘉	98.00	2007年8月

凡购书者免邮费,请按以下方式联系我们:
 电话 010-64017957 64033515 电子信箱:mlhukai@yahoo.com.cn yandeping@cspg.net
 通讯地址 北京东黄城根北街16号 科学出版社 100717 联系人:胡凯 鄢德平 主页 http://www.sciencep.com