

# 蛋白質摺疊與去摺疊反應的原子力顯微鏡實驗與理論分析

## Atomic Force Microscopic and Theoretical Study of Protein Folding and Unfolding

葉玉玲、張仲宏、錢佳琳、林聖賢

Y. L. Yeh, C. H. Chang, C. L. Chyan, S. H. Lin

在本篇文章中，將針對原子力顯微鏡的蛋白質摺疊與去摺疊實驗，提出理論模型。利用此模型可以探討原子力顯微鏡與蛋白質作用間的機械能，與蛋白質去摺疊之化學能間的關聯。這樣的模型也可以說明溫度、酸鹼度與變性劑對原子力顯微鏡實驗的影響。我們將會以 ubiquitin 四合體的實驗結果，實際分析說明如何應用此模型。同時將文獻上的其他結果，加以分析討論置於本文中。此外，我們發現吸附在金箔表面的蛋白質之去摺疊化程度，大於常態溶液狀態下的蛋白質。

In this paper, a theoretical model for the force-extension experiment applied to protein folding-unfolding is presented. This model explicitly takes into account the interplay between the mechanical energy and chemical energy. It can treat the effect of denaturing agents (like pH, GdnHCl, urea *etc.*) and temperature on the force-extension experiment of protein folding-unfolding. We further apply the model to analyze our own force-extension experiment on ubiquitin tetramers and further to the experimental data of other protein systems reported in literatures. We have found that the proteins adsorbed on gold surfaces are partially unfolded in comparison with the bulk state.

### 一、前言

原子力顯微鏡 (atomic force microscopy, AFM) 實驗，測量拉力與伸長量的關係，可以提供蛋白質摺疊與去摺疊 (folding and unfolding) 的研究數據。利用原子力顯微鏡的懸臂探針夾住蛋白質的末端，

將其延伸把蛋白質展開，蛋白質的結構區域 (protein domain) 逐步去摺疊，而拉力與伸長量的關係則呈現鋸齒狀的圖形模式。一般利用高分子研究中熟知的蠕蟲鏈模型 (worm-like-chain, WLC model) 來分析數據。蠕蟲鏈模型係使用一個連續變化的曲率參數，探討彎曲程度與能量的關係。這樣的模型

普遍用來描繪高分子的形變彈性，得到拉力與溫度成正比的關係。然而此模型既不包含像化學能這種描述反應的物理量，當以這種模型描述蛋白質摺疊與去摺疊的現象時，也無法預測蛋白質的摺疊與去摺疊時的摩爾分量的變化。

雖然此簡單蠕蟲鏈模型可以適當的密閤實驗數據，然而我們相信，拉力與伸長量的數據，應該可以提供原子力顯微鏡與蛋白質作用間的機械能，與蛋白質去摺疊之化學能間的相關資訊。而由於曲率連續性的變化所導得的模型，實在不適合描述蛋白質摺疊與去摺疊的反應系統。在此之前，筆者利用 kinetic Ising model，導得蛋白質摺疊與去摺疊熱力學與動力學的理論。此推導不僅可以適當的描繪並密閤蛋白質摺疊與去摺疊反應中，熱力學與動力學反應量與溫度及變性劑的濃度變化關係，並且得到蛋白質反應的通則圖 (universal plot)。在本文中我們將應用相同的概念，來導得拉力與伸長量的關係。並且處理這種機械性的蛋白質摺疊與去摺疊反應量的變化，以及拉力與與溫度及變性劑的濃度關係。

## 二、理論

假設蛋白質是由單元所組成 (例如：醯胺鍵)，有些單元處於原態 ( $n$ )，長度為  $l_n$ ；有些單元處於去摺疊態 ( $u$ )，長度為  $l_u$ 。單元間的狀態是可以互變的，且定義去摺疊態單元的長度大於原態的長度 ( $l_u > l_n$ )。當外界的拉力作用在蛋白質上時，有些原態單元會轉變成長度較長的去摺疊態，此時蛋白質將會拉長。若組成這兩種狀態的總單元量為：

$$N = N_n + N_u$$

則此蛋白質的總長度為：

$$l = N_n l_n + N_u l_u$$

在熱力學上的基本關係為：

$$dA = Fdl - SdT + \mu dN$$

因此每單元的平均化學能為：

$$\mu = (N_n \mu_n + N_u \mu_u) / N$$

將原本為  $\{l, N, T\}$  的參數改變成  $\{N_n, N, T\}$  的參數，進而導出熱力學上的關係式為：

$$dA = (l_n - l_u)F dN_n - SdT + (l_u F + \mu) dN \quad (1)$$

上式對  $N_n$  微分後得到

$$\left( \frac{\partial A}{\partial N_n} \right)_{T,N} = (l_n - l_u)F \equiv -\Delta l F \quad (2)$$

而得到去摺疊單位的分量與長度的關係為

$$f_u \equiv \frac{N_u}{N} = \frac{l - N l_n}{\Delta l N} \equiv \frac{\lambda}{L} \quad (3)$$

其中， $L = \Delta l N$ ，為實驗終結時的總伸長量。而  $\lambda \equiv l - N l_n$  為作用力下的伸長量。所以摺疊與去摺疊單元的比例與伸長量的關係為

$$\frac{f_u}{f_n} \equiv \frac{f_u}{1 - f_u} = \frac{\lambda}{L - \lambda} \quad (4)$$

根據上述的定義，我們就可以分析作用力與伸長量的數據。

### 1. 理想蛋白質模型

為計算此正則系統的自由能，我們進一步引進統計熱力學中的配分函數 (partition function)：

$$A = -kT \ln Q \quad (5)$$

顯然的，此配分函數是由原態與去摺疊態的配分函數 ( $q_n(T)$ 、 $q_u(T)$ ) 所組成。其相對的標準自由能分別為：

$$\mu_n^0 = -kT \ln q_n, \quad \mu_u^0 = -kT \ln q_u \quad (6)$$

則此蛋白質摺疊與去摺疊的反應平衡常數為：

$$K \equiv \frac{q_u}{q_n} = \exp\left(-\frac{\mu_u^0 - \mu_n^0}{kT}\right) \equiv \exp\left(-\frac{\Delta\mu^0}{kT}\right) \quad (7)$$

首先我們討論何謂理想蛋白質的模型。與理想溶液的概念類似，理想蛋白質指的是：原態與原態間、原態與去摺疊態間、去摺疊態與去摺疊態間的作用力是相同的。因此其配分函數可以表示為：

$$Q(N_n, N, T) = \frac{N!}{N_n!(N - N_n)!} q_n^{N_n} q_u^{N - N_n} \quad (8)$$

由上述第 (2)、(5) 及 (7) 式，我們可以導得理想蛋白質模型下，作用力與伸長量的關係為：

$$F(\lambda) = \frac{kT}{\Delta l} \ln\left(\frac{f_u}{1 - f_u} \cdot \frac{1}{K}\right) = \frac{kT}{\Delta l} \ln\left(\frac{\lambda}{L - \lambda} \cdot \frac{1}{K}\right) \quad (9)$$

其中未施力前的平衡常數為： $K = f_u/(1 - f_u)|_{F=0} \equiv f_{u0}/(1 - f_{u0})$ 。根據我們的定義， $\Delta l \equiv l_u - l_n > 0$ ，因而有  $dF/d\lambda > 0$  的關係。

若想導出變性劑濃度變化與拉力的關係，只需將標準自由能引進變性劑濃度即可得到：

$$\Delta\mu^0 = \Delta\mu_0^0 + \alpha_c C \quad (10)$$

## 2. 常態蛋白質模型

所謂常態蛋白質與常態溶液的概念相同，指的是原態與原態間、原態與去摺疊態間、去摺疊態與去摺疊態間的作用力是不同的。利用平均場近似的方式，處理鄰近單元的能量作用。將此三種形式作用力分別以  $\epsilon_m$ 、 $\epsilon_{nu}$  和  $\epsilon_{uu}$  來代表，則正則配分函數可以表示成：

$$Q(N_n, N, T) = \frac{N!}{N_n!(N - N_n)!} q_n^{N_n} q_u^{N - N_n} \exp\left(-\frac{\Delta\epsilon_{nu}}{kT} \cdot \frac{N_n N_u}{N}\right) \quad (11)$$

其中

$$\Delta\epsilon_{nu} \equiv \frac{1}{2}(\epsilon_m + \epsilon_{uu}) - \epsilon_{nu} \quad (12)$$

代入式 (2) 與式 (4) 得到常態蛋白質模型下，拉力與伸長量的關係為：

$$F(\lambda) = \frac{kT}{\Delta l} \ln\left(\frac{\lambda}{L - \lambda} \cdot \frac{1}{K}\right) + \frac{\Delta\epsilon_{nu}}{\Delta l} \left(1 + \frac{2\lambda}{L}\right) \quad (13)$$

而未施力前的蛋白質的去摺疊與原態的分率比為：

$$\frac{f_{u0}}{1 - f_{u0}} \equiv \left.\frac{f_u}{1 - f_u}\right|_{F=0} = K \exp\left[-\frac{\Delta\epsilon_{nu}}{kT}(1 - 2f_{u0})\right] \quad (14)$$

上述的討論，我們是將理想蛋白質模型類比成理想溶液理論。而常態蛋白質模型則是以常態溶液理論的方式來探討。進一步我們也可以引入常態溶液理論中的活性，於常態蛋白質模型之中。在拉力尚未作用前，自由能可以下列形式表示：

$$\mu_j = -kT \left(\frac{\partial \ln Q}{\partial N_j}\right)_{N_j, T} = \mu_j^0 + kT \ln a_j \quad (15)$$

for  $j' \neq j = n$  or  $u$

引進式 (6) 標準自由能的形式得到：

$$a_j = f_{j0} \exp\left(\frac{\Delta\epsilon_{nu}(1 - f_{j0})^2}{kT}\right) \quad (16)$$

for  $j = n$  or  $u$

而平衡常數則可以以原態與去摺疊態的活性來表示得到：

$$K = a_u/a_n$$

## 三、實驗結果

### 1. 示範說明

首先我們示範不同平衡常數下，拉力與去摺疊分率的關係圖。圖 1 中，溫度為 300 K， $\Delta l = 0.6 \text{ \AA}$ 。當去摺疊分率  $f_{u0} = 0.09$  時，表示大部分的蛋白質處於原態狀態。此時圖形有偏折點 (kink) 現象。去摺疊分率  $f_{u0} = 0.5$  時，表示幾乎一半的蛋白質已

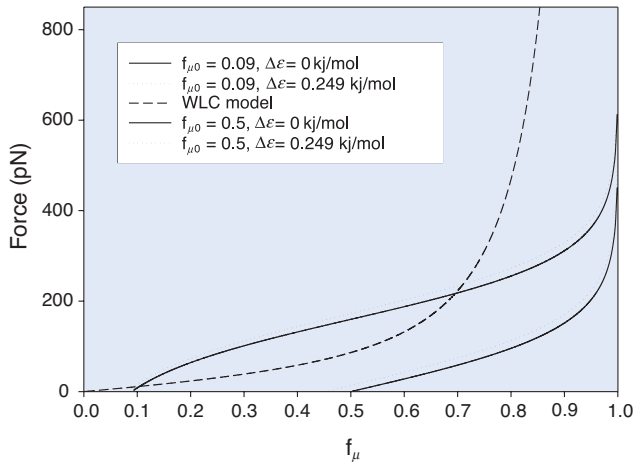


圖 1. 模型示範圖形。實線圖是說明理想蛋白質模型在不同的蛋白質去摺疊分率下所呈現的圖形輪廓。折線圖則是蠕蟲鏈模型得到的結果。虛線圖則是說明常態蛋白質模型所預測得到的結果。

處於去摺疊的狀態。此時圖形成曲線上升，近似蠕蟲鏈模型所描述的情況。我們在先前已討論過的，蠕蟲鏈模型是基於一種曲率的連續變化所導得到的方程式。而根據 kinetic Ising model 所導出的蛋白質摺疊與去摺疊模型，是根據能量狀態產生變化，所得到的熱力學上與動力學上的方程式。圖 1 中，亦顯示蠕蟲鏈模型下預測出的圖形。其預測的拉力與伸長量的關係為：

$$F = \frac{k_B T}{\Delta l} \left[ \frac{1}{4} \left( 1 - \frac{x}{L} \right)^{-2} - \frac{1}{4} + \frac{x}{L} \right] \quad (17)$$

在圖 1 中，將  $x/L$  暫定為去摺疊分率  $f_\mu$ 。此時，我們來探討作用力與去摺疊分率的關係。使用蠕蟲鏈模型預測，去摺疊分率增大時，拉力即變大。增加的幅度不僅快速，而越接近完全反應，拉力則無限延伸。大部分的實驗數據，在拉力約 200–300 pN 狀況下，蛋白質與探針就失去關係。如以蠕蟲鏈模型預測，蛋白質約伸展 70% 的長度時，就進行下一階段的反應。實在無法理解會是在拉力 200–300 pN 下，蛋白質與探針間的作用力就中斷。利用 kinetic Ising model 所得到的模型，是一種能量狀態

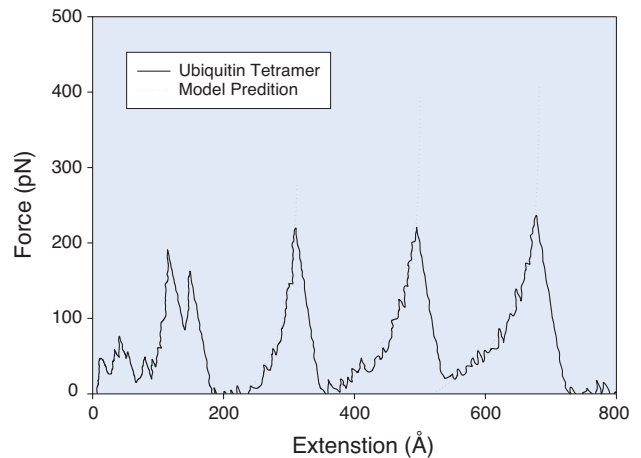


圖 2. Ubiquitin tetramer 的原子力顯微鏡實驗與模型結果預測。

的變化。根據模型的預測，約在 600 pN 就到達極大值。倘若因為氫鍵間的作用力牽引，最終的幾個原態無法完全去摺疊，且在懸臂探針拉扯的速度影響下，造成蛋白質就與探針間的作用力中斷。此時蛋白質在 200–300 pN 的拉力下，也已經達成 95%–97% 的去摺疊率。在圖 1 中，我們亦模擬出理想蛋白質模型與常態蛋白質模型的差異。在 300 K 溫度下，能量約為 2.49 kJ/mol。倘若在常態蛋白質的模型中，原態與原態間、原態與去摺疊態間、去摺疊態與去摺疊態間的作用力差異值為 0.249 kJ/mol，約為常溫下能量的十分之一，所得到的圖形於圖 1 中，以虛線表示。我們看出起始點會往較低去摺疊比例值移動，但並不影響圖形的總體輪廓。

## 2. Ubiquitin 四合體實驗

在此單分子實驗中，將 ubiquitin 四合體吸附在金箔的表面上。將 ubiquitin 蛋白質四合體溶於 pH = 7.4 的 PBS 溶液中，再以  $\text{Si}_3\text{N}_4$  為探針的原子力顯微鏡來偵測。將針頭插入表面數秒後，使蛋白質吸附在針頭上，然後將針頭移離表面，成功率約為 40–50%。而此時拉力與伸長量的關係，則呈現典型鋸齒狀的圖形模式。其中一個較完整的實驗結果列於圖 2。由此典型的實驗圖形，可以看出吸附在金箔上的 ubiquitin 四合體，受到探針針頭機械力的作用下，每一個單體逐步去摺疊。拉力上

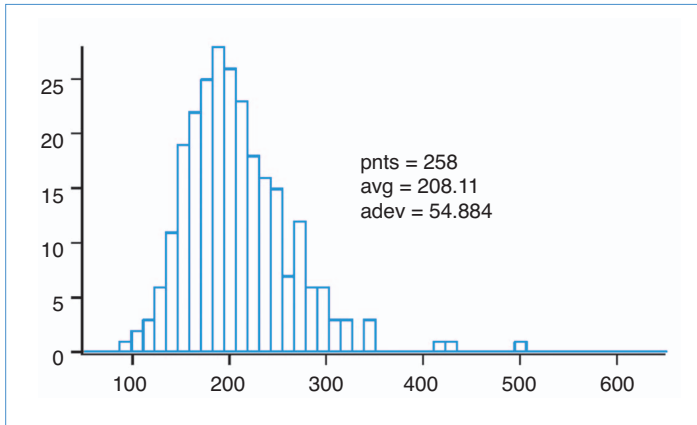


圖 3. 原子力顯微鏡實驗拉力的作用值分布圖。

升，表示蛋白質的某一個單體正處於去摺疊狀態。而作用力驟降，則表示此單體已完成去摺疊作用。當另一個鋸齒出現時，則是另一個單體的去摺疊反應。這樣的單分子實驗共進行了 258 次。而每次拉力的作用值分布圖，則列於圖 3。由此圖形可以得到平均力約為 200 pN，數值有大有小，然極大值不超過 600 pN，與我們的預測一致。我們同時探討了牽引速度、酸鹼值與變性劑濃度，對此單分子實驗所造成的影響。由圖 4 拉力與牽引速度的圖形來看，可以看出牽引的速度越快，平均拉力似乎也越大。然而牽引速度越慢時，平均拉力似乎也達成一極值，約為 170 pN。而酸鹼值對拉力的影響，則由圖 5 可以看出。當酸鹼值愈高時，平均拉力需

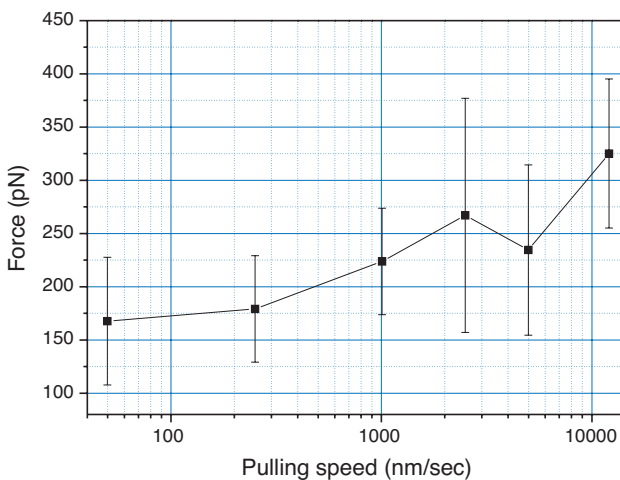


圖 4. 原子力顯微鏡實驗拉力與牽引速度關係圖。

表 1. 由模型預測所得到的數值。

	每單位伸長量	平衡常數 (K)	完成率
Ubiquitin Tetramer	0.6 Å	0.7	98.3%
Titan <sup>a</sup>	0.5 Å	0.93	95.1%
Titan <sup>b</sup>	0.5 Å	1.75	97.5%

a. data fitting from ref. 8.

b. data fitting from ref. 9.

要越大。這一點是可以理解的。當酸鹼值越低時，蛋白質去摺疊的情形越明顯，因此需要的拉力很顯然就會變小。同樣的道理，當變性劑的濃度升高時，蛋白質處於去摺疊的狀態，因此所需的平均拉力亦變小。實際數據則顯示在圖 6 中。

接著我們要說明，利用 kinetic Ising Model 所導得的蛋白質模型分析實驗數據所得到的資訊。由本模型可以得到結果列於表 1。並將模型所預測的數據與實驗結果一併畫於圖 2 之中。根據模型所得到的結果，預測每單元的蛋白質由摺疊狀態轉變成為去摺疊態時，其伸長量為 0.6 Å。而本實驗一開始時，平衡常數為 0.7，表示蛋白質已經去摺疊約達 40.5% 的程度。這一點則是一般的原子力顯微鏡實驗所無法預測的。而從其他的光譜實驗結果，也得到類似的結論。由文獻 17 的報告中，筆者發現在矽表面上，cytochrome C 已經先去摺疊化達 50% 的程度，與本模型預測之趨勢一致。另外我們選擇不

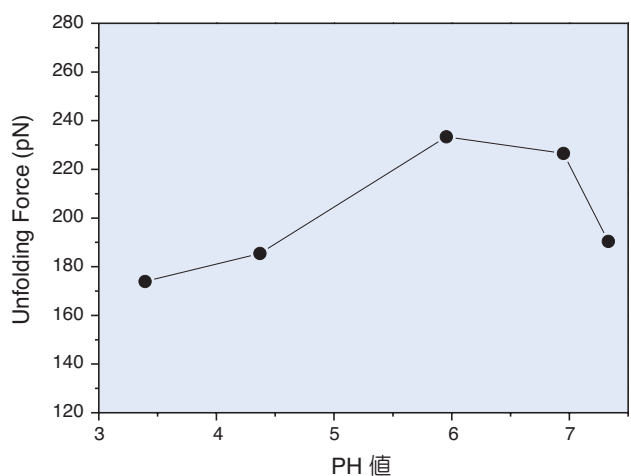


圖 5. 原子力顯微鏡實驗拉力與溶液酸鹼度關係圖。

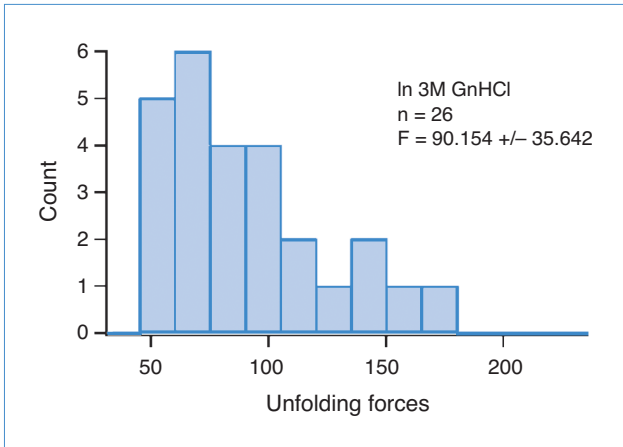


圖 6. 原子力顯微鏡實驗拉力在 3 M GdnHCl 溶液下的分布圖。

同實驗作者的實驗結果，分析 titan 蛋白質的原子力顯微鏡結果。由模型所預測的數據與實驗結果，畫於圖 7 (數據摘自文獻 8) 及圖 8 (數據摘自文獻 9) 之中。可以看出本模型所預測的實驗數值與結果相當吻合。由模型所得到的數據，則列於表 1 中。雖是由不同的實驗組所得到的數據，但其結果相當一致。首先是伸長量部分。兩組數據皆預測，每單元蛋白質由摺疊態變化到去摺疊態時，其伸長量皆為 0.5 Å。而一開始的平衡常數，可能因為溶液濃度與酸鹼度的改變，而略有不同。然而這樣的平衡常

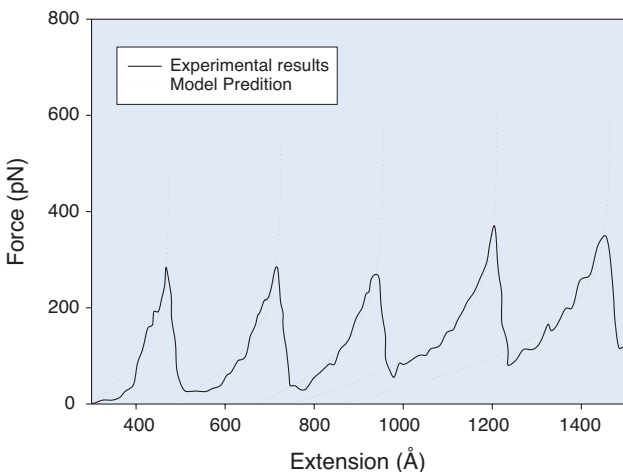


圖 7. 本實驗是由文獻 8 所摘錄的結果。實線部分為原子力顯微鏡所得到的數據，虛線部分則是本模型所預測的結果。

數，皆說明了在原子力顯微鏡實驗狀況下，由於蛋白質分子處於金屬的載體上，去摺疊化的程度相當明顯。數據顯示，蛋白質分子顯然已部分去摺疊化。而拉力約在 200 pN 附近時，蛋白質已達成 95–97% 的去摺疊率，表示反應已接近完成。

#### 四、結論

本文中，我們根據 kinetic Ising model 提出模型。此模型可以預測原子力顯微鏡的實驗數據，也可以探討原子力顯微鏡與蛋白質作用間的機械能，與蛋白質去摺疊之化學能間的關聯。事實上，我們根據相同的理論基礎，已說明蛋白質摺疊與去摺疊反應的熱力學以及動力學上的原理。現在我們又以相同的方式，成功的密閣原子力顯微鏡的實驗數據。未來我們會繼續運用相同的方式，陸續討論不同的實驗下，蛋白質摺疊反應的預測結果。希望能以相同的物理原理，一以貫之不同的蛋白質摺疊與去摺疊反應機制。

#### 參考文獻

1. M. Carrion-Vazquez, A. F. Oberhauser, T. F. Fisher, P. E. Marszalek, H. Li, and J. M. Fernandez, *Prog. Biophys. Molec. Biol.*, **74**, 63 (2000).

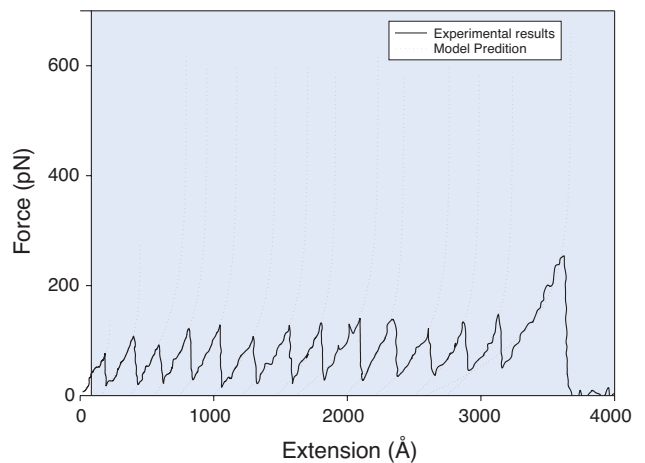


圖 8. 本實驗是由文獻 9 所摘錄的結果。實線部分為原子力顯微鏡所得到的數據，虛線部分則是本模型所預測的結果。

2. A. Engel, H. E. Gaub, and D. J. Muller, *Curr. Biol.*, **9**, R133 (1999).
3. H. P. Erickson, *Science*, **276**, 1090 (1997).
4. M. S. Kellermayer, S. B. Smith, H. L. Granzier, and C. Bustamante, *Science*, **276**, 1112 (1997).
5. H. Li, A. F. Oberhauser, S. B. Fowler, J. Clarke, and J. M. Fernandez, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **97**, 6527 (2000).
6. M. Ludwig, M. Rief, H. Schmidt, H. Li, F. Oesterhalt, M. Gautel, and H. E. Gaub, *Appl. Phys.*, **A68**, 173 (1999).
7. M. Rief, F. Oesterhalt, B. Heymann, and H. E. Gaub, *Science*, **275**, 1295 (1997).
8. A. F. Oberhauser, P. K. Hansma, M. Carrion-Vazquez, and J. M. Fernandez, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **98**, 468 (2000).
9. X. Zhuang, T. Ho, H. D. Kim, T. Centner, S. Labeit, and S. Chu, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **97**, 14241 (2000).
10. H. M. James and E. Guth, *J. Polymer Sci.*, **4**, 153 (1949).
11. F. T. Wall, *J. Chem. Phys.*, **10**, 132, 485 (1942); *ibid*, **11**, 527 (1943).
12. L. R. G. Treoar, *The Physics of Rubber Elasticity*, Oxford (1958).
13. T. L. Hill, *An Introduction to Statistical Thermodynamics*, Dover (1986).
14. H. Eyring, D. Henderson, B. J. Stover, and E. M. Eyring, *Statistical Mechanics and Dynamics*, Wiley-Interscience (1964).
15. A. F. Oberhauser, P. K. Hansma, M. Carrion-Vazquez, and J. M. Fernandez, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **98**, 468 (2001).
16. C. Bustamante, J. F. Morko, E. D. Siggia, and S. Smith, *Science*, **265**, 1599 (1994).
17. Y. Y. Cheng, S. H. Lin, C. H. Chang, and M. C. Su, *J. Phys. Chem. A*, **107**, 10687 (2003).

- 
- 葉玉玲小姐為國立台灣大學化學博士，現任中央研究院原子與分子科學研究所博士後研究員。
  - 張仲宏先生為國立台灣大學化學博士，曾任中央研究院原子與分子科學研究所博士後研究員。
  - 錢嘉琳小姐為美國羅格斯大學化學系博士，現任東華大學助理教授。
  - 林聖賢先生為中央研究院院士，現任中央研究院原子與分子科學研究所研究員。
  - Y. L. Yeh received her Ph.D. in chemistry from National Taiwan University. She is currently a post doctor at the Institute of Atomic and Molecular Sciences, Academia Sinica.
  - C. H. Chang received his Ph.D. in chemistry from National Taiwan University. He was a post doctor at the Institute of Atomic and Molecular Sciences, Academia Sinica.
  - C. L. Chyan received her Ph.D in chemistry from Rutgers University, USA. She is currently an assistant professor in the Department of Chemistry at Dong-Hwa University
  - S. H. Lin was elected as a member of Academia Sinica. He is currently a research fellow at the Institute of Atomic and Molecular Sciences, Academia Sinica.