

基于 Aerolysin 纳米孔道的单个 β -淀粉样多肽 N-端片段分析

陈天泽^{1#}, 胡方舟^{2#}, 林绪波³, 应佚伦⁴, 邹爱华¹

(1. 上海师范大学化学与材料科学学院, 上海 200237; 2. 华东理工大学化学与分子工程学院, 上海 200237;
3. 北京航空航天大学医学科学与工程学院, 北京 100191;
4. 南京大学化学化工学院, 生命分析化学国家重点实验室, 南京 210023)

摘要 β -淀粉样蛋白(β -amyloid, $A\beta$)引起的淀粉样蛋白异常沉积被认为是诱发阿尔茨海默症的因素之一. 与人类不同, 啮齿动物较少出现这类特征性病变. 与人类 $A\beta$ 相比, 啮齿动物 $A\beta$ 的第 5, 10 和 13 位氨基酸由 Arg, Tyr 和 His 分别变为 Gly, Phe 和 Arg. 本文采用分子动力学模拟和 Aerolysin 纳米孔道单分子分析技术对人类 $A\beta_{1-15}$ 和啮齿动物 $A\beta_{1-15}$ 的结构差异进行研究. 实验结果表明, 与人类 $A\beta_{1-15}$ 相比, 啮齿动物 $A\beta_{1-15}$ 穿过纳米孔道时具有更低的阻断频率和能垒, 证明了 Aerolysin 纳米孔道可以辨别具有细小结构差异的 $A\beta$ 多肽分子. 本文以硫酸盐 K_2SO_4 作为糖胺聚糖(Glycosaminoglycans, GAGs)的简化模型, 对 $A\beta_{1-15}$ 与硫酸根离子的相互作用进行研究. 统计分析显示, 两种多肽均能与硫酸根离子结合, 降低它们被纳米孔道捕获的频率, 人类 $A\beta_{1-15}$ 的捕获频率降低 25%, 啮齿动物 $A\beta_{1-15}$ 的捕获频率降低 59%. 然而, 加入硫酸根离子后, 两种多肽阻断时间的变化存在明显差异, 与未加入硫酸根时相比, 人类 $A\beta_{1-15}$ 的阻断时间延长了 14%, 啮齿动物 $A\beta_{1-15}$ 的阻断时间则缩短了 7%. 由实验结果推测, 两种多肽不同的序列和构象导致它们与硫酸根离子结合的方式和强度不同, 对过孔行为产生了不同影响. 本文研究结果对于筛选用于阿尔茨海默症治疗的小分子抑制类药物具有参考价值.

关键词 β -淀粉样蛋白; 气单胞菌溶素; 多肽单分子分析; 生物纳米孔道

中图分类号 O657 文献标志码 A doi: 10.7503/cjcu20240192

Analysis of N-Terminal Fragment of β -Amyloid Peptides Using an Aerolysin Nanopore

CHEN Tianze^{1#}, HU Fangzhou^{2#}, LIN Xubo³, YING Yilun⁴, ZOU Aihua^{1*}

(1. College of Chemistry and Materials Science, Shanghai Normal University, Shanghai 200237, China;
2. School of Chemical and Molecular Engineering,
East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China;
3. School of Medical Science and Engineering, Beihang University, Beijing 100191, China;
4. State Key Laboratory of Life Analytical Chemistry, School of Chemistry and Chemical Engineering,
Nanjing University, Nanjing 210023, China)

Abstract Alzheimer's disease (AD) is one of the most common diseases caused by multiple neurodegenerative protein misfolding and aggregation disorders. Abnormal deposition of amyloid protein caused by β -amyloid ($A\beta$) peptides has been suggested as a possible predisposing factor for Alzheimer's disease. Unlike human $A\beta$ peptide, rodent $A\beta$ peptide rarely has these characteristic lesions. The difference between rodent $A\beta$ peptide and human $A\beta$

收稿日期: 2024-04-17. 网络首发日期: 2024-05-28.

联系人简介: 邹爱华, 女, 博士, 教授, 主要从事农药、医药及化妆品方面的研究. E-mail: aihuazou@shnu.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 22334006)资助.

Supported by the National Natural Science Foundation of China(No.22334006).

共同第一作者.

peptide is that the 5th, 10th and 13th amino acids (Arg, Tyr, His) are replaced by Gly, Phe and Arg, respectively. In this study, molecular dynamics simulation and nanopore-based single molecule detection technology were used to study the structural differences between human $A\beta_{1-15}$ and rodent $A\beta_{1-15}$. The experimental results show that rodent $A\beta_{1-15}$ has lower blocking frequency and energy barrier when passing through nanopore than human $A\beta_{1-15}$, which proves that aerolysin nanopore can distinguish $A\beta_{1-15}$ with small structural differences. Furthermore, the interaction between $A\beta_{1-15}$ and sulfate ion was studied by using sulfate K_2SO_4 as a simplified model of glycosaminoglycan (glycosaminoglycans, GAGs). Statistical analysis showed that both peptides could bind to sulfate ions and reduce their capture frequency by aerolysin nanopore, reducing the capture frequency of human $A\beta_{1-15}$ by 25% and rodent $A\beta_{1-15}$ by 59%. However, after the addition of sulfate ion, there was a significant difference in the dwell time of the two peptides. Compared with the results in the absence of sulfate, the dwell time of human $A\beta_{1-15}$ increased by 14% and that of rodent $A\beta_{1-15}$ decreased by 7%. It is inferred from the experimental results that the different sequences and conformations of the two peptides lead to different binding ways and binding intensity to sulfate ions, which have different effects on the translocation behavior. This study is helpful to better screen small molecular inhibitors and further promote the diagnosis and treatment of Alzheimer's disease.

Keywords β -Amyloid; Aerolysin; Single molecule analysis of peptide; Biological nanopores

阿尔茨海默症(AD)是多种神经退行性蛋白质错误折叠和聚集性疾病中最常见的一种。其病理特征为细胞内神经原纤维缠结(NFT)和细胞外淀粉样蛋白沉积形成老年斑。老年斑的主要成分是 β -淀粉样多肽(β -Amyloid, $A\beta$), 多为40~42个氨基酸的多肽片段。其序列包含6个带负电荷的残基(D1, E3, D7, E11, E22和D23)和3个带正电荷的残基(R5, K16和K28), 使其净电荷为-3, 整条多肽的等电点约为5.5^[1]。当足够多的 $A\beta$ 单体聚集在一起时, 会形成具有高度有序的 β -sheet结构的原纤维, 并最终形成成熟的纤维。这些纤维会以斑块的形式沉积在神经元的细胞外空间^[2-4]。可溶性、无毒的 $A\beta$ 单体转变为聚集的、富含 β -sheet结构的有毒 $A\beta$ 被认为是阿尔茨海默症发展的关键步骤。与人类相比, 啮齿动物较少出现阿尔茨海默症的特征性病变, 这在很大程度上可能归因于其大脑中较少形成 $A\beta$ 纤维状聚集沉积物^[5]。研究表明, 与人类 $A\beta$ 相比, 啮齿动物 $A\beta$ 在水溶液和膜模拟溶剂中形成 β -sheet结构的倾向更小^[6-8]。具体而言, 啮齿动物 $A\beta$ 含有3个人类 $A\beta$ 氨基酸序列的突变, 即5号位的精氨酸(Arg)被甘氨酸(Gly)取代、10号位的酪氨酸(Tyr)被苯丙氨酸(Phe)取代、13号位的组氨酸(His)被精氨酸取代^[9]。氨基酸序列的改变对 $A\beta$ 的结构特性造成了影响, 减少了啮齿动物 $A\beta$ 形成与阿尔茨海默症相关病理结构的可能性^[10-12]。阿尔茨海默症临床试验中许多抑制剂的失败表明, 详细解析老年斑形成过程中发生的复杂相互作用, 包括与糖类、脂类、核酸和金属离子的结合, 对了解该病的多样性表现非常重要^[13]。阐明各种关键大分子如何与 $A\beta$ 相互作用和改变其聚集性质可能会为开发新的治疗方法提供机会。糖胺聚糖(GAGs)是一种在细胞表面和细胞外基质中表达的高度带负电的线性多糖^[14], 其在抑制 $A\beta$ 的神经毒性、促进聚集和纤维的形成等过程中具有复杂的调节作用^[15]。研究表明, GAGs中的肝素硫酸(HS)链, 尤其是其带负电荷的硫酸根离子, 在分子间的相互作用中起着重要作用^[16]。与GAGs和 $A\beta$ 之间相互作用机制的复杂性相比, 以硫酸根离子作为简化模型可以更好地控制实验条件, 减少复杂的生物分子可能带来的变量^[17, 18]。

纳米孔道单分子检测技术是一种高灵敏的单分子检测手段, 其利用外加电场驱动待测物分子逐个穿过纳米孔道产生特征性的时序电流信号, 通过解析单分子电信号阻断程度和阻断时间等多种不同特征^[19, 20], 在单分子水平实时获取待测物分子的结构、电荷及尺寸等信息^[21-23]。纳米孔道单分子检测技术具有无需标记、高灵敏、高通量及低成本等优点。由蛋白质自组装形成的生物纳米孔道传感检测界面包含多种不同的氨基酸残基, 利用基因工程和蛋白质工程手段定点改变孔道检测界面氨基酸种类和性质, 通过调控待测分子和孔道界面相互作用能够有效改善检测灵敏度和电流分辨率^[24, 25], 并可以在单分子水平实现对生物分子的动态行为分析^[26]。这为探索 $A\beta$ 的结构特性, 研究与阿尔茨海默症相关的生物学效应提供了一种新的思路。

本文利用高灵敏度的 Aerolysin 纳米孔道检测了人类 $A\beta_{1-15}$ 和啮齿动物 $A\beta_{1-15}$ 的结构差异。实验结果表明, 人类 $A\beta_{1-15}$ 和啮齿动物 $A\beta_{1-15}$ 阻断事件的频率及时间存在明显差异。结合分子动力学模拟进一步分析发现, 氨基酸序列差异使得 $A\beta_{1-15}$ 的大小、形状及电荷分布等结构特征发生变化, 引起了多肽与纳米孔道相互作用程度的差异, 改变了单分子事件的发生频率及持续时间。本文进一步以硫酸钾 (K_2SO_4) 作为 GAGs 的简化模型, 研究了 $A\beta_{1-15}$ 与硫酸根离子之间在单分子水平上的相互作用。统计分析结果表明, 硫酸根离子影响了人类 $A\beta_{1-15}$ 和啮齿动物 $A\beta_{1-15}$ 与 Aerolysin 纳米孔道的相互作用。向体系中添加硫酸根离子后, 两种多肽的捕获效率降低, 其中人类 $A\beta_{1-15}$ 的捕获频率降低 25%, 啮齿动物 $A\beta_{1-15}$ 的捕获频率降低 59%。同时, 人类 $A\beta_{1-15}$ 与硫酸根离子结合后的阻断时间增加 14%, 而啮齿动物 $A\beta_{1-15}$ 结合后的阻断时间缩短 7%, 表明硫酸根离子与两种 $A\beta$ 多肽之间相互作用差异使得 $A\beta$ 多肽-硫酸根离子复合物的构象不同。

以上实验结果表明, Aerolysin 纳米孔道能够通过监测待测物分子在相互作用过程中引起的电流变化, 实现对分子间相互作用的识别与区分。其高效的样本处理能力使其成为一种有效的药物筛选工具。本文研究结果有望推动 Aerolysin 纳米孔道在药物开发及阿尔茨海默症治疗方面发挥重要作用。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

1,2-二植烷酰基磷脂, 纯度 > 99%, 美国 Avanti Polar Lipids 公司; 乙二胺四乙酸(EDTA)和三羟甲基氨基甲烷(Tris), 分析纯, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 氯化钾和正癸烷, 分析纯, 上海 Sigma-Aldrich 有限公司; 人类 $A\beta_{1-15}$ (DAEFRHDSGYEVHHQ) 和啮齿动物 $A\beta_{1-15}$ (DAEFGHDSGFVRRHQ), 纯度 > 98%, 南京肽业生物科技有限公司; 实验所用 Aerolysin 成孔蛋白由南京大学龙亿涛教授实验室提供。

Axopatch 200B 型膜片钳放大器, 美国 Molecular Devices 公司; Axon Digidata 1440A 型数模转换器, 美国 Molecular Devices 公司; CV 203BU 型膜片钳探头, 美国 Molecular Devices 公司; 缩醛树脂检测池, 美国 Warner Instruments 公司; 静电屏蔽箱, 北京骏硕伟业科技发展有限公司。

1.2 实验过程

1.2.1 纳米孔道单通道实验 实验所用缩醛树脂检测池由两个腔室组成。两个腔室由中间直径为 150 μm 的小孔连通, 用于磷脂双分子层的形成。将检测池的两个腔室设为 *cis* 侧和 *trans* 侧, 其中 *cis* 侧为接地端。向 *cis* 侧和 *trans* 侧分别注入 1 mL 缓冲溶液 (1.0 mol/L KCl + 10 mmol/L Tris + 1.0 mmol/L EDTA, pH=8.0)。将 1,2-二植烷酰基磷脂用正癸烷溶解, 制备浓度为 3 mg/mL 的磷脂溶液, 并将其涂于检测池小孔处, 形成磷脂双分子层。将 Aerolysin 蛋白溶液 (0.5 mg/mL) 加入检测池 *cis* 侧, 利用蛋白自组装原理形成稳定纳米孔道。孔道形成后, 将待测物加入检测池 *cis* 侧并记录电流。实验在室温 [(24 \pm 1) $^{\circ}\text{C}$] 下完成。电流信号由膜片钳放大器和数模转换器进行采集和放大。输出信号由低通 Bessel 滤波器在 5 kHz 频率下进行滤波, 在 100 kHz 频率下进行采集。使用 Clampfit9 (Axon Instruments) 和 PyNanoLab 软件对电流信号进行数据分析。

1.2.2 $A\beta_{1-15}$ 和 K_2SO_4 的共同孵化 将人类 $A\beta_{1-15}$ 用不同的缓冲溶液 (0, 5, 10, 15, 20 或 50 mmol/L K_2SO_4 + 10 mmol/L Tris + 1.0 mmol/L EDTA, pH=8.0) 溶解, 在室温下孵化 1 h。将啮齿动物 $A\beta_{1-15}$ 用缓冲溶液 (10 mmol/L K_2SO_4 + 10 mmol/L Tris + 1.0 mmol/L EDTA, pH=8.0) 溶解, 在室温下孵化 12 h。孵化液中 $A\beta_{1-15}$ 的浓度为 500 $\mu\text{mol/L}$ 。孵化完成后, 将含有 $A\beta_{1-15}$ 的孵化液添加到 *cis* 侧检测池中, 记录数据。*cis* 侧检测池中 $A\beta_{1-15}$ 的最终浓度均为 10 $\mu\text{mol/L}$ 。

1.2.3 全原子分子动力学模拟 利用 CHARMM36m 力场以及基于网格的能量校正图模拟人类/啮齿动物 $A\beta_{1-15}$ 多肽在溶液或膜包埋的野生型 Aerolysin (PDB ID: 5JZT) 中的行为。人类 $A\beta_{1-15}$ 多肽片段 (DAEFRHDSGYEVHHQ) 的初始结构是从晶体结构 (PDB ID: 1IYT) 中截断获得。在人类 $A\beta_{1-15}$ 多肽的序列基础上进行点突变, 获得啮齿动物 $A\beta_{1-15}$ 多肽 (DAEFGHDSGFVRRHQ) 的初始结构。本文中所有

AAMD 仿真系统均使用 CHARMM-GUI Web 服务器构建, 并使用 GROAMCS 软件(2016. 5 版)执行. 对于所有模拟, Lennard-Jones 电势在 1.0~1.2 nm 之间平滑地移动至零, 且截止(cutoff)值为 1.2 nm 以减少截止噪声. 采用 Particle Mesh Ewald(PME)算法, 实空间(real-space)截止值为 1.2 nm. 蛋白质与多肽、脂质、水与离子分别在 $T=310$ K 条件下耦合入 Nose-Hoover 热浴(耦合常数 $t=1$ ps). 系统使用 Parrinello-Rahman 压力耦合方式在 1.0×10^5 Pa 压力下进行模拟, 耦合常数 $t=5$ ps, 压缩系数(compressibility)为 4.5×10^{-10} Pa⁻¹. 线性约束求解器(LINCS)算法约束了 H 原子的键. 非键接相互作用(Nonbonded interaction)邻居列表每 20 步更新一次, 截止值为 1.2 nm. 此外, 还使用了 Leap-frog Verlet 算法和周期性边界条件. 所有的模拟运行时间为 200 ns, 时间步长为 2 fs, 轨迹保存(Trajectory-saving)频率为 10 ps.

2 结果与讨论

2.1 $A\beta_{1-15}$ 与 Aerolysin 单分子界面的相互作用

研究表明, $A\beta$ 的 N 端在免疫治疗^[27,28]、金属结合机制^[29]、 $A\beta$ 的聚集和纤维形成方面^[30]均具有重要意义. 目前, 针对 $A\beta$ 的 N 端序列的抗体已被证明能有效防止 $A\beta$ 聚集体的形成并溶解已形成的聚集体. 其次, $A\beta$ 的 N 端含有最小的金属结合区, 能够与金属离子结合导致构象变化, 影响 $A\beta$ 的聚集过程. 此外, 人类 $A\beta$ 与啮齿类动物 $A\beta$ 的区别仅在于 3 个氨基酸, 即 5 号位、10 号位及 13 号位的氨基酸. 人类 $A\beta$ 在水溶液和膜模拟溶剂中形成 β -sheet 的倾向高于啮齿类动物 $A\beta$ ^[6-8], 说明在 β -sheet 结构形成过程中 $A\beta$ 的 N 端扮演着重要角色^[6]. $A\beta_{1-40}$ 和 $A\beta_{1-42}$ 是体内最常见的 $A\beta$ 形式, 但在体外研究 N 末端序列差异对淀粉样多肽变性过程的影响往往会受到阻碍, 因为它们很容易自组装并沉积在无定形斑块中. 因此, 本文实验中选择截短的、可溶性更好的 $A\beta$ 肽 N 端序列 $A\beta_{1-15}$ 作为待测物.

本文在磷脂双分子层上通过蛋白自组装构建了单个野生型 Aerolysin 纳米孔道, 并在 pH=8.0 的条件下对两种多肽进行了检测(图 1). 在外加电压的驱动下, 人类 $A\beta_{1-15}$ 和啮齿动物 $A\beta_{1-15}$ 通过 Aerolysin 纳米孔道, 产生与 Aerolysin 相互作用的特征阻断电流信号. 人类 $A\beta_{1-15}$ 的相对分子质量(1826.82)与啮齿动物 $A\beta_{1-15}$ (1730.74)相近, 且在 pH=8.0 的条件下两者所带电荷均为 -3, 可受到相近的电泳驱动力. 然而, 在 160 mV 下人类 $A\beta_{1-15}$ 的阻断事件的频率及时间均明显高于啮齿动物 $A\beta_{1-15}$ (图 2).

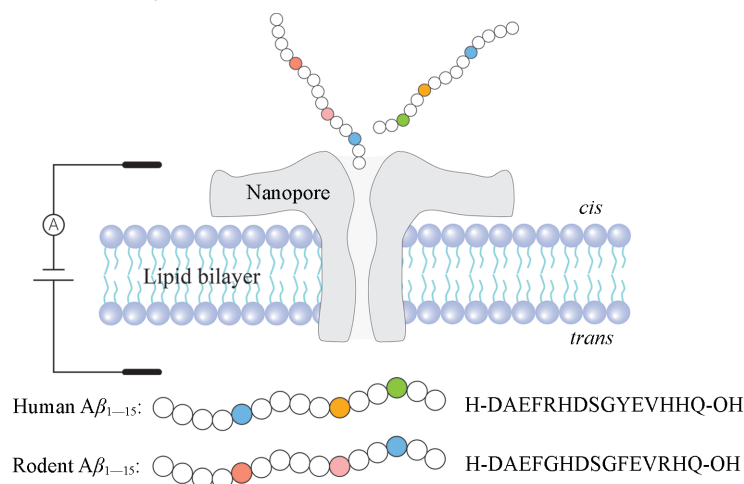


Fig. 1 Single-molecule analysis of $A\beta_{1-15}$ with an aerolysin nanopore

将阻断事件的残余电流值记为 I (pA), 纳米孔道的开孔电流记为 I_0 (pA), 则单个分子进入纳米孔道造成的电流阻断程度可用 I/I_0 表示, I/I_0 越小代表阻断程度越大, 停留时间(Dwell time, ms)则代表分子进入纳米孔道导致电流阻断的持续时间. 人类和啮齿动物 $A\beta_{1-15}$ 的散点图[图 3(A)和(B)]和残余电流统计直方图[图 3(C)和(D)]中阻断事件的不同分布表明它们在通过纳米孔道时具有不同的单分子行为.

统计的频率和阻断时间随电压变化的情况如图 4(A)和(B)所示. 人类 $A\beta_{1-15}$ 阻断事件的频率高于啮齿动物 $A\beta_{1-15}$. 啮齿动物 $A\beta_{1-15}$ 表现出更好的线性频率-电压依赖关系, 表明其为扩散控制的捕获过

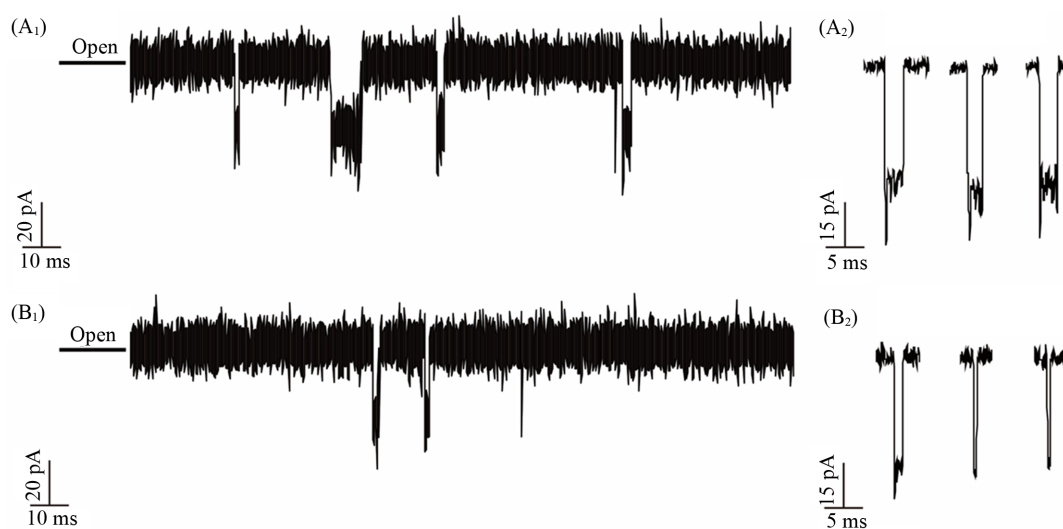


Fig. 2 Current blockade traces(A_1 , B_1) and the typical current blocked event(A_2 , B_2) of human $A\beta_{1-15}$ (A_1 , A_2) and rodent $A\beta_{1-15}$ (B_1 , B_2)

Data were acquired at the applied voltage of 160 mV.

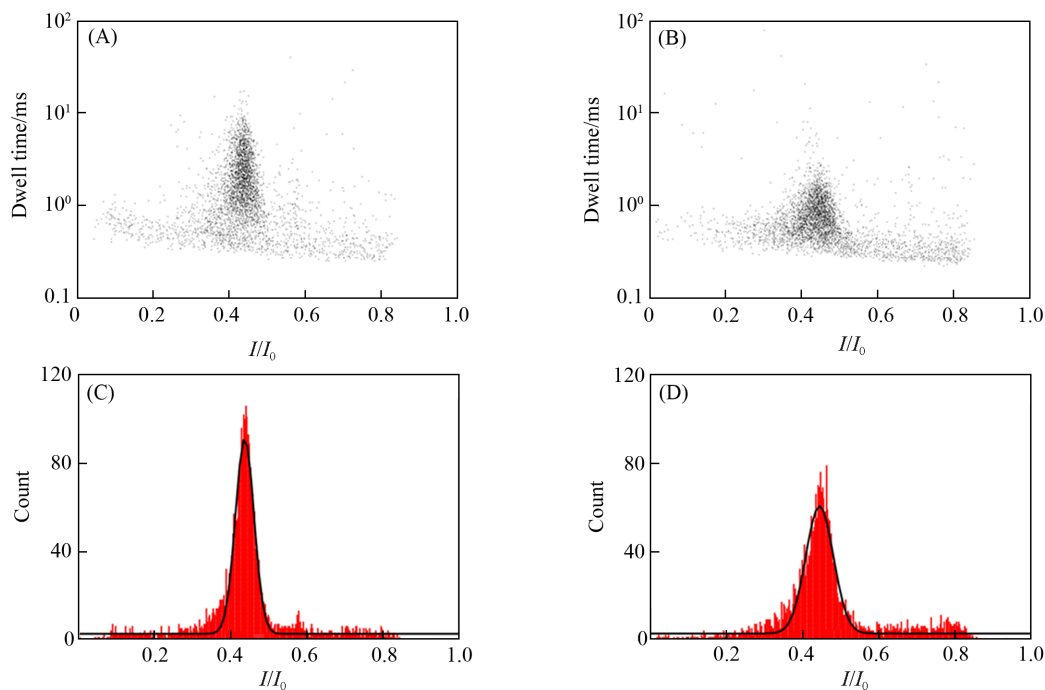


Fig. 3 Scatter plots(A , B) and histogram of residual current(C , D) of human $A\beta_{1-15}$ (A , C) and rodent $A\beta_{1-15}$ (B , D) at the applied voltage of 160 mV

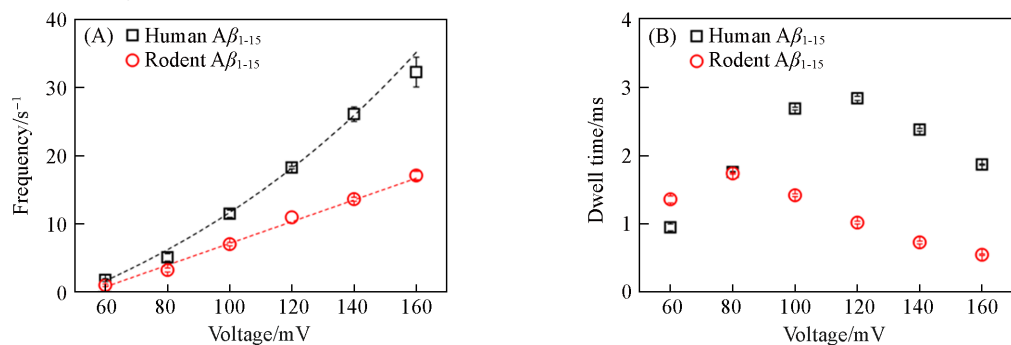


Fig. 4 Voltage dependence of frequency(A) and dwell time(B) for the translocation events of $A\beta_{1-15}$

The error bars based on three separate experiments.

程^[31,32]. 而人类 $A\beta_{1-15}$ 的频率-电压关系呈指数型, 说明其捕获过程存在较高能垒限制[图 4(A)]. 在 60~160 mV 电压范围内, 可以看到两种多肽的阻断时间呈现先升高后下降的变化趋势[图 4(B)]. 这种非线性行为可解释为两种多肽在 Aerolysin 纳米孔道中的过孔行为需克服一定的能垒^[33]. 人类 $A\beta_{1-15}$ 通过纳米孔道所需的最小阈值电压约为 120 mV, 而啮齿动物 $A\beta_{1-15}$ 的能垒较低, 其过孔的阈值电压约为 80 mV. 当电压低于阈值电压时, 检测到的阻断事件多数为碰撞事件. 此时当电压增加时, 待测物受到更大的电泳力驱动, 在纳米孔道中停留时间增长. 而当电压超过阈值电压后, 待测物克服通过纳米孔道的能垒, 随电压增加, 阻断时间缩短. 文献报道, 能垒和纳米孔道与待测物的相互作用程度有关, 相互作用越强, 待测物穿过纳米孔道的能垒越高^[34]. 因此, 本文实验结果说明人类 $A\beta_{1-15}$ 与啮齿动物 $A\beta_{1-15}$ 相比与 Aerolysin 纳米孔道具有更强的相互作用.

分子动力学模拟显示人类与啮齿动物 $A\beta_{1-15}$ 在溶液中均呈现螺旋构象(图 S1, 见本文支持信息), 但不同于人类 $A\beta_{1-15}$ 在溶液中舒展的构象, 氨基酸序列的差异使得啮齿动物 $A\beta_{1-15}$ 的构象略显卷曲(图 S2, 见本文支持信息), 且其二级结构中转角结构(Turn)的占比更多(图 S3, 见本文支持信息). 人类 $A\beta_{1-15}$ 在 pH=8.0 时结构较松散, 因氨基酸序列使得精氨酸所携带的正电荷与其相反电荷位置邻近, 有利的静电相互作用使得人类 $A\beta_{1-15}$ 不需要剧烈的构象变化. 相反, 啮齿类动物 $A\beta_{1-15}$ 的 C 端和 N 端携带总电荷不同, C 端和 N 端相互吸引导致其结构更紧密, 形成卷曲的构象. 这种结构变化减小了啮齿动物 $A\beta_{1-15}$ 进入纳米孔道入口处的有效电荷, 同时略微弯曲的结构也增大了其进入纳米孔道的难度. 因而, 在 pH=8.0 时 Aerolysin 纳米孔道对啮齿动物 $A\beta_{1-15}$ 的捕获频率小于人类 $A\beta_{1-15}$. 此外, 二级结构演变显示, 与人类 $A\beta_{1-15}$ 相比, 在水溶液中啮齿动物 $A\beta_{1-15}$ 的主体结构由螺旋结构(Helix)转变为无规卷曲(Coil)结构所需时间更短, 这意味着啮齿动物 $A\beta_{1-15}$ 的螺旋结构更不稳定, 穿过纳米孔道时更容易转化为空间位阻更小的无序结构(图 S4, 见本文支持信息)^[35]. 图 S5(见本文支持信息)是基于分子动力学模拟得到的二维自由能图, 不同颜色的区域代表不同自由能状态下的多肽构象. 自由能越低的区域, 出现对应多肽构象的几率越高. 该二维自由能图选取 N 端-C 端距离和回转半径(R_g)建立坐标轴. 这两种坐标与多肽构象紧密相关, 其中回转半径是所有质量可以被集中获得相同质量惯性矩的轴距, 可用来表示蛋白质的紧密程度^[36]. 低自由能状态下, 溶液中的啮齿动物 $A\beta_{1-15}$ 的回转半径及 N 端-C 端距离较小, 即多肽构象较紧密, 整体尺寸较小. 而相对地, 低自由能状态下, 人类 $A\beta_{1-15}$ 的构象更加分散, 回转半径及 N 端-C 端距离的变化范围较大, 说明多肽构象整体较松散, 在通过 Aerolysin 孔道时需要克服更高的自由能^[33].

与啮齿动物 $A\beta_{1-15}$ 相比, 人类 $A\beta_{1-15}$ 具有更高的通过纳米孔道的能垒, 这一结论也可通过分子动力学模拟验证. 由二维自由能图可以看出, 当同样处于低自由能时, 在 Aerolysin 纳米孔道入口处人类 $A\beta_{1-15}$ 比啮齿动物 $A\beta_{1-15}$ 具有更大的 R_g (图 S5), 而两种多肽具有相近的分子质量, 这说明人类 $A\beta_{1-15}$ 具有比啮齿动物 $A\beta_{1-15}$ 更大的整体尺寸和更松散的构象. 这使得人类 $A\beta_{1-15}$ 在过孔过程中具有更强的空间位阻效应, 表现出更高的通过纳米孔道的能垒.

2.2 Aerolysin 纳米孔道检测 $A\beta_{1-15}$ 与 GAGs 模型分子的相互作用

Aerolysin 纳米孔道可以有效区分具有细微结构差异的多肽分子, 这为使用 Aerolysin 纳米孔道研究药物作用下 $A\beta$ 的结构变化提供了可能性. 本文以 K_2SO_4 作为 GAGs 的简化模型, 探究了 GAGs 与 $A\beta$ 蛋白的相互作用. 图 5 示出了在不同硫酸钾浓度下, 人类 $A\beta_{1-15}$ 与 Aerolysin 纳米孔道的相互作用.

由图 5(A), (C)和(E)可见, 加入硫酸根离子后 Aerolysin 纳米孔道对人类 $A\beta_{1-15}$ 的捕获频率降低. 这表明硫酸根离子与人类 $A\beta_{1-15}$ 发生了结合. 野生型 Aerolysin 纳米孔道入口处存在许多带负电荷的残基, 如 Asp216, Asp207, Glu307 和 Glu415, 因此带有大量负电荷^[37]. 硫酸根离子与人类 $A\beta_{1-15}$ 结合产物携带更多负电荷, 这增大了其与孔道入口的静电斥力, 导致阻断事件的捕获频率降低. 硫酸根离子的浓度变化也对阻断时间产生了影响[图 5(B), (D), (F)]. 当电压低于 120 mV 时, 加入硫酸根离子后, 阻断时间缩短. 在此电压范围内, 检测到的阻断信号多数为不成功的过孔事件, 与硫酸根离子结合的人类 $A\beta_{1-15}$ 携带更多负电荷, 与孔口的静电排斥作用增强, 因此更快速地退回到 *cis* 侧溶液中. 当电压

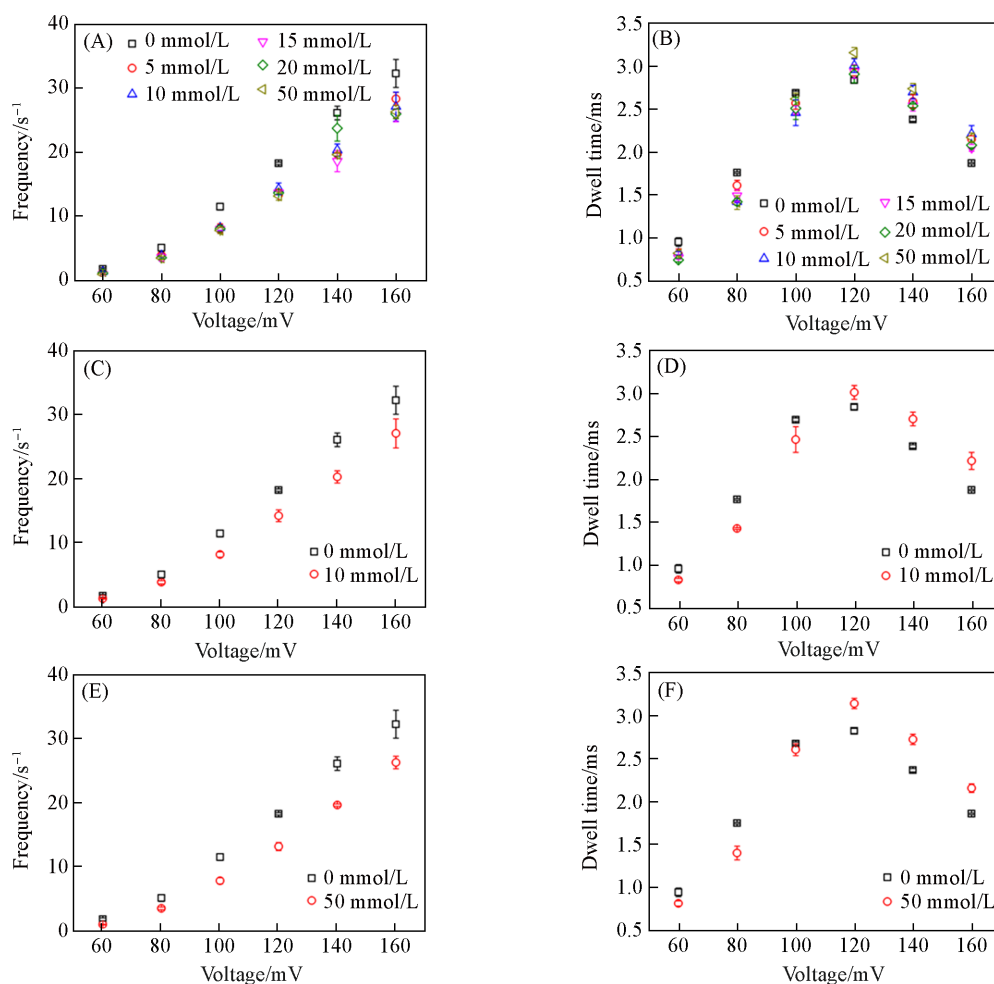


Fig. 5 Voltage dependence of frequency(A, C, E) and dwell time(B, D, F) for the translocation events of human $A\beta_{1-15}$ incubated in buffer solutions containing different concentrations of K_2SO_4

The error bars based on three separate experiments.

高于 120 mV 时, 加入硫酸根离子后, 阻断时间延长. 在此电压范围内, 多数阻断信号为成功的过孔事件. 进入纳米孔道后, 结合硫酸根离子的人类 $A\beta_{1-15}$ 与阴离子选择性的 Aerolysin 纳米孔道相互作用更强, 表现出更长的阻断时间.

为探究啮齿动物 $A\beta_{1-15}$ 是否也能够与硫酸根离子发生相互作用, 分别对人类 $A\beta_{1-15}$ 和啮齿动物 $A\beta_{1-15}$ 加入硫酸钾后的过孔现象进行了研究, 得到阻断事件统计散点图[图 6(A)和(B)]. 之前的实验结果表明, 在硫酸钾浓度为 10 mmol/L 和 50 mmol/L 下, 人类 $A\beta_{1-15}$ 捕获频率及阻断时间相近, 说明硫酸钾浓度为 10 mmol/L 时, 多肽与硫酸根离子的结合已接近饱和, 因此, 选取 10 mmol/L 作为孵化液中硫酸钾的浓度. 为增加过孔事件在总阻断事件中的比例, 选择高于两种多肽过孔临界电压的 140 mV 作为实验电压. 残余电流统计直方图的高斯拟合曲线表明, 加入硫酸根离子后两种多肽的阻断事件仍呈现不同的分布[图 6(A)和(B)]. 图 6(A)中的高斯峰峰宽小于图 6(B)中的高斯峰峰宽, 说明人类 $A\beta_{1-15}$ 阻断事件的分布比啮齿动物 $A\beta_{1-15}$ 更加集中. 由图 6(A)和(B)还可以看出, 人类 $A\beta_{1-15}$ 的阻断时间普遍大于啮齿动物 $A\beta_{1-15}$. 捕获频率和阻断时间的改变表明啮齿动物 $A\beta_{1-15}$ 与人类 $A\beta_{1-15}$ 相同, 能够与硫酸根离子结合. 硫酸根离子的引入降低了两种多肽的捕获频率, 人类 $A\beta_{1-15}$ 的捕获频率降低 25%, 啮齿动物 $A\beta_{1-15}$ 的捕获频率降低 59%[图 7(A)]. $A\beta_{1-15}$ 与硫酸根的结合提高了复合物的负电荷密度, 使其与纳米孔道入口处的静电斥力增大, 导致纳米孔道对 $A\beta_{1-15}$ 的捕获频率减小. 而阻断事件的持续时间则随硫酸根离子的加入呈现出不同的变化, 人类 $A\beta_{1-15}$ 的阻断时间延长 14%, 而啮齿动物 $A\beta_{1-15}$ 的阻断时间缩短 7%[图 7(B)]. 研究报道, GAGs 可以与人类 $A\beta$ 13—16 位的残基 His-His-Gln-Lys(HHQK) 相互作

用, 其与 $A\beta$ 的相互作用既受静电相互作用控制, 也与非离子相互作用(如氢键和范德华力)相关^[38]. $A\beta_{1-15}$ 的 C 端结构由人类的 HHQ 替换为啮齿动物的 RHQ 可能导致其与硫酸根的相互作用改变. 此外, 人类 $A\beta_{1-15}$ 和啮齿动物 $A\beta_{1-15}$ 的构象差异对其与硫酸根的结合能力也有影响, 使得 $A\beta$ 多肽与硫酸根复合物在纳米孔道内过孔行为产生了较大的差异.

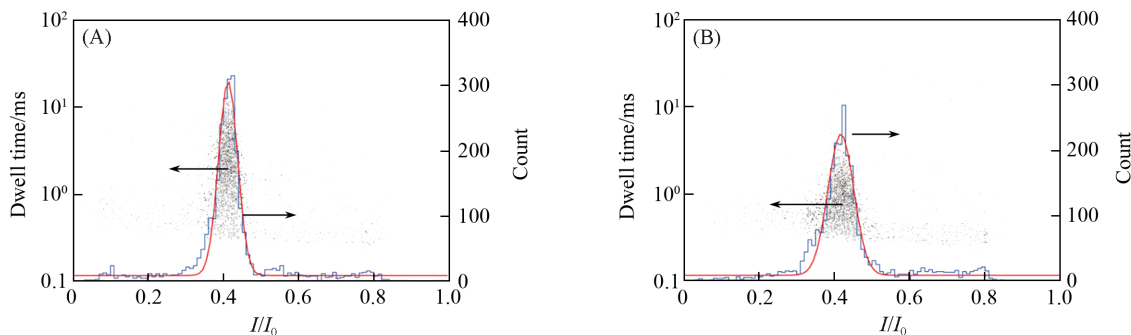


Fig. 6 Scatter plots and histogram of human $A\beta_{1-15}$ (A) and rodent $A\beta_{1-15}$ (B)

Data were acquired at the applied voltage of 140 mV.

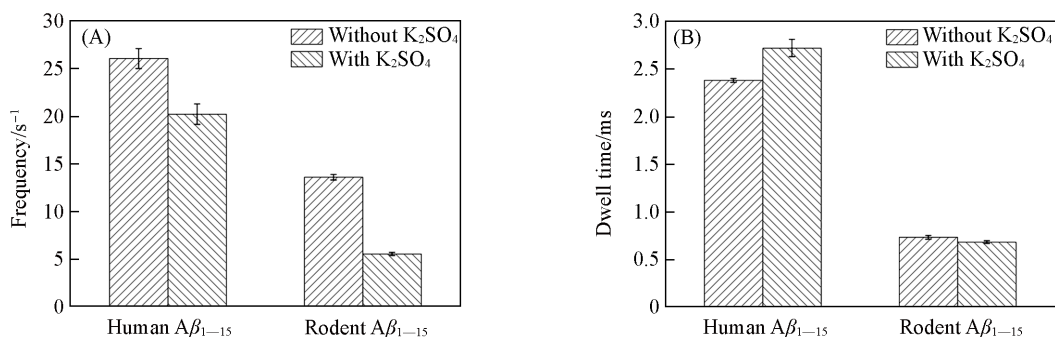


Fig. 7 Frequency(A) and dwell time(B) of human $A\beta_{1-15}$ and rodent $A\beta_{1-15}$ before and after the addition of K_2SO_4

Data were acquired at the applied voltage of 140 mV. The error bars were based on three separate experiments.

3 结 论

利用单个 Aerolysin 纳米孔道分辨了 5, 10 和 13 位氨基酸种类不同的人类 $A\beta_{1-15}$ 和啮齿动物 $A\beta_{1-15}$. 结果显示, 两种多肽具有不同的阻断频率和阻断时间. 结合分子动力学模拟发现, 与人类 $A\beta_{1-15}$ 相比, 啮齿动物 $A\beta_{1-15}$ 具有更加卷曲的结构和更小的整体尺寸, 这使它具有更低的阻断频率和通过纳米孔道的能垒. 两种多肽不同的构象导致了它们与纳米孔道不同的相互作用. 这表明 Aerolysin 纳米孔道可以辨别具有细微结构差别的 $A\beta$ 多肽分子. 在此基础上以 K_2SO_4 作为 GAGs 的简化模型, 进一步研究了人类 $A\beta_{1-15}$ 和啮齿动物 $A\beta_{1-15}$ 与硫酸根离子的相互作用. 实验结果表明, 硫酸根离子与人类 $A\beta_{1-15}$ 和啮齿动物 $A\beta_{1-15}$ 存在的静电和非离子相互作用对它们的过孔行为产生了不同影响. 这证明了 Aerolysin 纳米孔道具有识别不同待测物分子间相互作用的能力. 因此, 利用高灵敏度的 Aerolysin 纳米孔道能够有效识别药物与特征多肽间相互作用所引起的包括电荷、体积、形状等方面的结构变化, 通过对所产生的特征电流信号进行深入分析, 能够揭示药物与特征多肽之间相互作用的机制, 筛选出能够抑制病理过程的小分子药物. 在高通量药物筛选和精准医疗的背景下, 纳米孔道技术为理解药物与致病性多肽之间的结合机制及药物筛选提供了新的研究工具, 可提升药物筛选的效率与准确性, 在药物开发的早期阶段或将发挥重要作用.

支持信息见 <http://www.cjcu.jlu.edu.cn/CN/10.7503/cjcu20240192>.

参 考 文 献

[1] Rauk A., *Chem. Soc. Rev.*, **2009**, 38(9), 2698—2715

- [2] Kumar A., Singh A., Ekavali, *Pharmacol. Rep.*, **2015**, 67(2), 195—203
- [3] Asandei A., Iftemi S., Mereuta L., Schiopu I., Luchian T., *J. Membr. Biol.*, **2014**, 247(6), 523—530
- [4] Zhang H., Qing H., *Sci. Technol. Rev.*, **2017**, 35(10), 52—63(张贺, 庆宏. 科技导报, **2017**, 35(10), 52—63)
- [5] Kimball D. B., Sultana R., Abdul H. M., Butterfield D. A., *J. Alzheimer's Dis.*, **2004**, 6(5), 515—525
- [6] Clippingdale A. B., Wade J. D., Barrow C. J., *J. Pept. Sci.*, **2001**, 7(5), 227—249
- [7] Dyrks T., Dyrks E., Masters C. L., Beyreuther K., *FEBS Lett.*, **1993**, 324(2), 231—236
- [8] Otvos L., Szendrei G. I., Lee V. M., Mantsch H. H., *Eur. J. Biochem.*, **1993**, 211(1/2), 249—257
- [9] Jankowska T. K., Dolejsz M. R., Wisniewska K., Lankiewicz L., Kozlowski H., *Environ. Health Perspect.*, **2002**, 110(5), 869—870
- [10] Ono K., Condrón M. M., Teplow D. B., *J. Biol. Chem.*, **2010**, 285(30), 23186—23197
- [11] Roychaudhuri R., Zheng X. Y., Lomakin A., Maiti P., Condrón M. M., Benedek G. B., Bitan G., Bowers M. T., Teplow D. B., *ACS Chem. Neurosci.*, **2015**, 6(12), 1941—1955
- [12] Ueno H., Yamaguchi T., Fukunaga S., Okada Y., Yano Y., Hoshino M., Matsuzaki K., *Biochemistry*, **2014**, 53(48), 7523—7530
- [13] Stewart K. L., Radford S. E., *Biophys. Rev.*, **2017**, 9(4), 405—419
- [14] Fennouri A., Ramiandrisoa J., Bacri L., Mathé J., Daniel R., *Eur. Phys. J. E*, **2018**, 41(10), 127
- [15] Nido J. D., Wandosell F., Avila J., *Peptides*, **2002**, 23(7), 1323—1332
- [16] Kisilevsky R., Snow A., *Med. Hypotheses*, **1988**, 26(4), 231—236
- [17] Reggio H., Dagorn J. C., *J. Cell Biol.*, **1978**, 78(3), 951—957
- [18] Li M., Hao Y. J., Wu B., Jia C. D., Huang X. J., Yang X. J., *Org. Biomol. Chem.*, **2011**, 9(16), 5637—5640
- [19] Yang C. Y., Gu Z., Hu Z. L., Ying Y. L., Long Y. T., *J. Electrochem.*, **2019**, 25(3), 312—318(杨铨宇, 顾震, 胡正利, 应佚伦, 龙亿涛. 电化学, **2019**, 25(3), 312—318)
- [20] Ni X., Xin K. L., Hu Z. L., Jiang C. L., Wan Y. J., Ying Y. L., Long Y. T., *Acta Chim. Sinica*, **2023**, 81(8), 912—919(倪雪, 辛凯莉, 胡正利, 蒋翠玲, 万永菁, 应佚伦, 龙亿涛. 化学学报, **2023**, 81(8), 912—919)
- [21] Cao C., Liao D. F., Ying Y. L., Long Y. T., *Acta Chim. Sinica*, **2016**, 74(9), 734—737(曹婵, 廖冬芳, 应佚伦, 龙亿涛. 化学学报, **2016**, 74(9), 734—737)
- [22] Cao C., Long Y. T., *Acc. Chem. Res.*, **2018**, 51(2), 331—341
- [23] Li Q., Lin Y., Ying Y. L., Liu S. C., Long Y. T., *Sci. Sin. Chim.*, **2017**, 47(12), 1445—1449(李巧, 林瑶, 应佚伦, 刘少创, 龙亿涛. 中国科学: 化学, **2017**, 47(12), 1445—1449)
- [24] Wu X. Y., Ying Y. L., Long Y. T., *Chem. J. Chinese Universities*, **2019**, 40(9), 1825—1831(武雪原, 应佚伦, 龙亿涛. 高等学校化学学报, **2019**, 40(9), 1825—1831)
- [25] Li M. Y., Ying Y. L., Long Y. T., *Acta Chim. Sinica*, **2019**, 77(10), 984—988(李孟寅, 应佚伦, 龙亿涛. 化学学报, **2019**, 77(10), 984—988)
- [26] Niu H. Y., Hu Z. L., Ying Y. L., Long Y. T., *Acta Chim. Sinica*, **2019**, 77(10), 989—992(牛红艳, 胡正利, 应佚伦, 龙亿涛. 化学学报, **2019**, 77(10), 989—992)
- [27] Gardberg A. S., Dice L. T., Ou S., Rich R. L., Helmbrecht E., Ko J., Wetzte R., Myszka D. G., Patterson P. H., Dealwis C., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2007**, 104(40), 15659—15664
- [28] Lavie V., Becker M., Kupiec R. C., Yacoby I., Koppel R., *J. Mol. Neurosci.*, **2004**, 24(1), 105—113
- [29] Asandei A., Schiopu I., Iftemi S., Mereuta L., Luchian T., *Langmuir*, **2013**, 29(50), 15634—15642
- [30] Kheterpal I., Williams A., Murphy C., Bledsoe B., Wetzel R., *Biochemistry*, **2001**, 40(39), 11757—11767
- [31] Wang Y., Tian K., Du X., Shi R. C., Gu L. Q., *Anal. Chem.*, **2017**, 89(24), 13039—13043
- [32] Bhattacharya S., Muzard J., Payet L., Mathé J., Bockelmann U., Aksimentiev A., Viasnoff V., *J. Phys. Chem. C*, **2011**, 115(10), 4255—4264
- [33] Hu F. Z., Angelov B., Li S., Li N., Lin X. B., Zou A. H., *ChemBioChem*, **2020**, 21(17), 2467—2473
- [34] Movileanu L., Schmittschmitt J. P., Scholtz J. M., Bayley H., *Biophys. J.*, **2005**, 89(2), 1030—1045
- [35] Pangen S., Prajapati J. D., Bafna J., Nilam M., Nau W. M., Kleinekathöfer U., Winterhalter M., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2021**, 60(15), 8089—8094
- [36] Zhang W. W., Kang W. Y., Zou J. J., Bi Z. F., Dou R. K., Mao C. Q., *Prog. Mod. Biomed.*, **2018**, 18(4), 610—615(张雯雯, 康文渊, 邹金晶, 毕振飞, 豆荣昆, 茆灿泉. 现代生物医学进展, **2018**, 18(4), 610—615)
- [37] Montal M., Mueller P., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1972**, 69(12), 3561—3566
- [38] McLaurin J., Fraser P. E., *FEBS J.*, **2000**, 267(21), 6353—6361

(Ed.: W, K, M)