

# 目錄

1. 前言 .....	2
2. 研究目的與文獻探討 .....	2
3. 研究方法 .....	3
i. 型態微擾能引導單分子在其能量圖景上的演進行為 .....	3
ii. 單分子酵素 AK1 高階統計行為 .....	5
iii. 活體細胞超解析度影像 .....	7
4. 結果與討論 .....	7
i. 型態微擾引導單分子在其能量圖景上的演進行為 .....	7
ii. 單分子酵素 AK1 高階統計行為 .....	10
iii. 活體細胞超解析度影像 .....	15
5. 參考文獻 .....	15

## 1. 前言

許多環境因子及酵素均會影響細胞進行生化功能的表現，這些細胞內訊號傳遞的複雜過程均為隨機過程，在巨觀下會平均掉少數事件的表現，而展現大量表現的過程。因此有許多暫態訊息會被忽略掉，但這些微弱的少數事件資訊卻是連結不同巨觀動態之間的關鍵；近年來為了更進一步瞭解不同動態之間的關連性，而發展單分子偵測技術，以試圖補足中間遺失的關連性。其原理是利用隨機過程的特性將待研究體系投影到實驗量測的物理量上，但這也讓隨機雜亂的訊號寫入數據中，因此如何從數據中萃取出動態資訊是相當重要的技術與理論發展。

## 2. 研究目的與文獻探討

細胞的生理功能是由許多複雜的體系構成，拆解後可以利用能量觀點來描述。最近 NMR 實驗發現，酵素進行催化會受到外部形態調變[1-3]，因此可以將所有的穩態對應到能井，外部的形態擾動(conformational perturbation)可以視為形態微調和回饋，能夠彈性的調整其功能表現。任何複雜的功能呈現過程中均包含反應中心與週圍胺基酸側鏈之間的氫鍵交互作用；目前對此形態動態調變的機制尚未清楚理解，為了進一步了解可以將複雜體系拆解成基本單元，一個氫鍵與週圍蛋白基質 (protein matrix) 的交互作用。光活化激發螢光蛋白，之構造就是由一個發光中心 (chromophore) 與週圍蛋白基質組成，因此活化激發的機制吻合上述的基本分割單元，可以將動態寫入光子放射過程。另一方面，質量輕的氫原子相較於其他原子更容易顯現其量子特性，利用第一原理計算將古典物理的氫鍵作用力與加入量子效應後比較[4]，發現氫鍵強弱與量子現象展現呈正相關，這是一個相當令人驚訝的發現，解決半個世紀以來對於氫鍵的疑惑。氫鍵應具有量子天性，在複雜的生化過程中容易被忽略或是被平均行為掩蓋，但不能否認其調變過程含有量子力學行為的調變機制；因此我們在建立模型敘述實驗體系的過程將從量子的觀點出發。

酵素主要在維持細胞基本生理功能，可隨著細胞微環境的變化而動態調整以維持在最佳操作狀態，因此演化常賦予酵素結構具可塑性 (structural plasticity) 以增進其功能表現[5]。許多酵素能經由大幅度的結構調整提高受質 (substrate) 鍵結區的熱穩定性，使反應區周圍之胺基酸維持在催化的最佳位置。酵素進行催化反應的路徑並不唯一，會隨著周圍環境變化而調整。因此定量描述這些多路徑動態變化，與每一路徑間之暫態或中間態所扮演的角色，對整體催化機制的了解相當重要；然而受限於量測與分析技術，科學界目前對於這些機制的了解並不十分清楚。

以目前量測技術而言，FRET 的觀測距離約在 2nm~8nm，雖能觀察到酵素次區域 (subdomain) 的相對位移，但偵測短距離 (<1nm) 變化並不靈敏 [6]，因此無法解析暫態與中間態的結構變化。其次有關動態解析部份，FRET 是以某一分子為中心，同時平行觀測周圍多個分子，再統計分析其座標，萃取出動態結構資訊。但這種處理方式有兩個缺點：(1) 根據上述酵素催化反應為多路徑的動態過程，以一單分子為中心的量測方式，會讓整個樣本空間被投射到對應的特定座標系，而喪失多路徑的資訊。此外若不小心投射到奇異點也會造成誤判；(2) 單一分子 FRET 觀測是將分子動態轉換成標定染料的螢光放射特性，FRET 對距離變化 <1nm 形態微擾並不靈敏，再加上單一染料放射光子數有限，使得 FRET 不易獲得多路徑的分子機制與其動態資訊；在文獻上 NMR 雖能量測到中間態的存在，但 NMR 需比較 DNA 變異 (mutation) 前後之蛋白構造差異，推論相對應的行為模型，並非”直接”觀測到動態的變化。

要了解酵素催化的多路徑動態過程以及暫態和中間態所扮演的角色，量測工具至少要克服兩個困難：(1) 需能觀測到 <1nm 的結構位移變化；(2) 有效的取樣方式，能用於反推動態樣品空間。本研究我們運用 photo-induced electron transfer (PET) 機制[6]，使標識在 AK 上的兩顆相同染劑經由 van der Waals contact，抑制螢光放射 (quenching) [note 1]，以便將催化中心的動態形態編碼入光子放射過程；我們並使用微流體精確控制單一酵素流過聚焦

光點的時間，故能夠長時間均勻的對單分子動態隨機過程取樣，因此可獲得多路徑動態過程的機率密度。

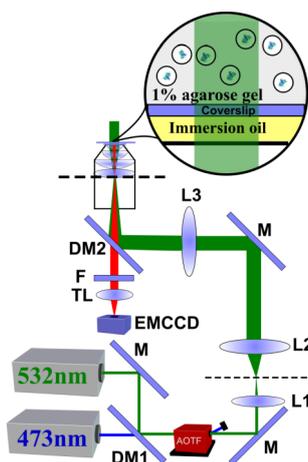
**note 1:** 利用在 core 最外圍與 ATP binding domain 外 lid 底部的兩個胺基酸，以一對相同染料標定。根據 x-ray 繞射資料庫的數據，兩者距離約~1.2nm，較能真正反映催化中心的形態變化。而 PNAS 46, 18055 (2007) 的方法是利用 mutation 在 lid 最頂點和最後一個  $\beta$ -sheet 上，各產生一個 cysteine，以標定一對 FRET 染料，此缺點是 lid 頂端催化時會插入 core，染料標識有影響動態的疑慮；同時此 FRET Pair 所追蹤的是 lid 與 core 的相對位移，而非催化中心真正的形態變化。

### 3. 研究方法

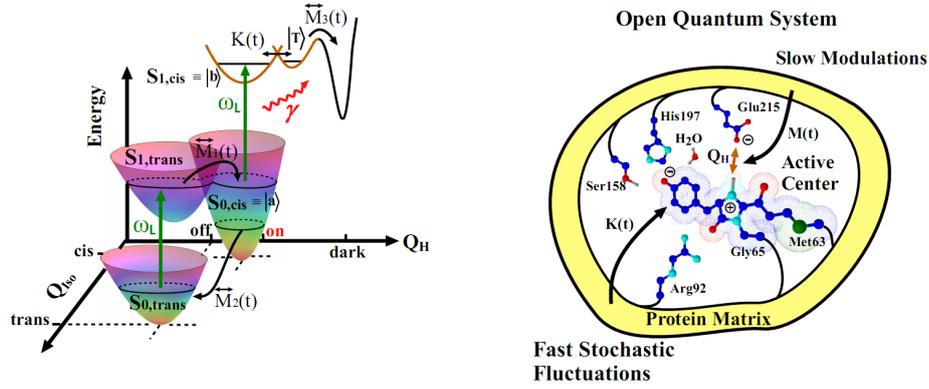
本研究計畫成果包含三項結論

#### i. 型態微擾能引導單分子在其能量圖景上的演進行為

- 1) 實驗樣品為光活化激發螢光蛋白 KFP1，其 Glu215 與發光中心所形成的氫鍵穩定性主宰發光穩定性 [7]，因此利用此一特點將這些資訊寫入光子放射的過程。
  - a) 為了觀察 KFP1 型態微擾對其發光特性的影響，我們利用其動態隨機過程的特性，以單分子量測技術同時平行偵測許多單分子，集結足夠數量的樣本後即可描繪此動態；因此要避免人為影響 KFP1 的發光行為，因此不採用固定在表面的方式，我們利用 agarose gel 的水性環境特性，將一顆 KFP1 包覆在 agarose gel 故化後的孔洞中。
  - b) 利用 1% 的 agarose gel 並選擇低固化溫度 ( $< 30^{\circ}\text{C}$ ) 減低溫度對 KFP1 的破壞。
  - c) agarose gel 粉末先溶於室溫的水溶液中，接著加熱到  $150^{\circ}\text{C}$  等待約半小時待其沸騰後，以約  $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$  的速度降溫至  $37^{\circ}\text{C}$  左右即可混入 KFP1。取  $2\mu\text{l}$  滴在洗淨的玻璃上，並利用相同大小之玻璃夾住，形成約  $5\mu\text{m}$  厚度的 gel，並靜置室溫半小時待其固化。
- 2) 實驗量測架構利用 532nm 綠光固態雷射開啟 KFP1 並開始發射光子，473nm 藍光固態雷射使 KFP1 停止發射光子；經 L1 與 L2 闔束後利用 L3 聚焦在顯微物鏡的後焦平面上，以 EPI 的照射架構下均勻激發包覆在 agarose gel 固化後所形成的孔洞內的 KFP1，示意圖如下所示。



- 3) 理論模型：KFP1 的光子放射過程蘊含與週圍環境的交互作用，因此可以視為一個開放的量子系統 (open quantum system)，我們根據系統動態較活化中心的快與慢分成兩類：
  - (1) 響應比較快的部份利用記憶核心 (memory kernel)  $K(t)$  來描述其動態過程；
  - (2) 較慢的部份可以進一步切割成許多拓譜學單元，每個單元均具有隨機過程的特性，以轉換矩陣  $M(t)$  描述。



- a) 此系統為 non-Markovian 系統，包含了複雜的電子能階與發光中心 2-level 系統的耦合，以及周圍蛋白基質速度較慢的微擾；在此複雜的體系下，我們依據響應速度將整個系統切割，每一個小區域都是 Markovian 系統，不同小區域的線性組合即可描述一個 non-Markovian 系統。因此從核心的活化中心開始，活化中心的運動可以利用 density matrix 描述一個量子系統受外界的複雜影響，接著利用 generating function  $G(t,s)$ ，將這些單獨的作用利用線性組合，做統計上的平均，而考慮進所有的外在作用影響，對應的 Hamiltonian 為  $H_i$ ，因此可以利用 Quantum Liouville equation，以 Liouville 算符  $\mathcal{L}_{H_i}$  描述活化中心的動態，其表示式為 [8]：

$$\partial_t G(t, s) = \mathcal{L}_{H_i} G(t, s)$$

- b) 接著考慮周圍蛋白基質較緩慢的調變過程，利用 generating function 表達其動態，可以表示成  $e^{\int_0^t d\tau \mathbb{M}(\tau)}$ ；當活化中心受其調變時，可以將 generating function 改寫成  $\mathcal{G}(t, s) = e^{\int_0^t d\tau \mathbb{M}(\tau)} G(t, s)$ ，因此 KFP1 受到周圍環境調變的動態可以寫成：

$$\partial_t \mathcal{G}(t, s) = (\mathcal{L}_{H_i} + \mathbb{M}) \mathcal{G}(t, s)$$

- c) 外在環境的調變耦合到雙能階系統，接著要將所有響應速度差不多的能階體系耦合，KFP1 光子放射的過程中有一個暗態，會使得雙能階系統的電子消散回到 ground state，我們利用記憶核心  $K(t)$  來敘述此過程，並利用 Lindblad superoperator  $\mathcal{J}_D$  來描述耦合到屬於 Markovian reservoir 的雙能階系統。為了簡化公式，我們將所有對於雙能階的調變利用 Hamiltonian  $H_p$  來表達，並化簡成 Liouville 算符  $\mathcal{L}_{H_p}$ ，可將 Liouville equation 改寫成 Lindblad equation：

$$\begin{aligned} \partial_t \mathcal{G}(t, s) &= (\mathcal{L}_{H_i} + \mathbb{M}) \mathcal{G}(t, s) \\ &+ \int_0^t d\tau K(t - \tau) \mathcal{J}_D \mathcal{G}(\tau, s) \\ &= (\mathcal{L}_{H_i} + \mathcal{L}_{H_p}) \mathcal{G}(t, s) = \mathcal{L}_{H_{eff}} \mathcal{G}(t, s) \end{aligned}$$

- d) KFP1 受到外界環境影響會寫入光子放射過程，因此將系統動態  $\mathcal{G}(t, s) = e^{\int_0^t d\tau \mathbb{M}(\tau)} G(t, s)$  分解成 [9]

$$\begin{aligned} \text{dipole moment} &= \mathcal{U}(t, s) = e^{\int_0^t d\tau \mathbb{M}(\tau)} U(t, s), \\ \text{dipole current} &= \mathcal{V}(t, s) = e^{\int_0^t d\tau \mathbb{M}(\tau)} V(t, s), \\ \text{population inversion} &= \mathcal{W}(t, s) = e^{\int_0^t d\tau \mathbb{M}(\tau)} W(t, s), \\ \text{total probability} &= \mathcal{Y}(t, s) = e^{\int_0^t d\tau \mathbb{M}(\tau)} Y(t, s), \end{aligned}$$

[G→U, V, and Y : Phys. Rev. Lett. 90, 238305 (2003)]

再將 Lindblad 方程式改寫成

$$\dot{\mathcal{U}}(t, s) = -\frac{1}{2}[K_c * \mathcal{U}](t, s) + \mathbb{M}\mathcal{U}(t, s)$$

$$\dot{\mathcal{V}}(\tau, s) = -\frac{1}{2}[K_c * \mathcal{V}](t, s) - \Omega\mathcal{W}(t, s) + \mathbb{M}\mathcal{V}(t, s)$$

$$\dot{\mathcal{W}}(t, s) = \Omega\mathcal{V} - \frac{1+s}{2}[K * (\mathcal{W} + \mathcal{Y})](t, s) + \mathbb{M}\mathcal{W}(t, s)$$

- e) 利用  $\dot{\mathcal{Y}}(t, s) = \frac{s-1}{2}[K * (\mathcal{W} + \mathcal{Y})](t, s) + \mathbb{M}\mathcal{Y}(t, s)$ . Laplace transform 可以解出上面聯立微分方程組

$$\mathcal{Y}(t, s) = e^{\int_0^t d\tau \mathbb{M}(\tau)} Y(t, s) = e^{\int_0^t d\tau \mathbb{M}(\tau)} \frac{(1-s)K(u)\Omega^2}{[u^2 + uK(u)][2u + \gamma] + \Omega^2[2u + (1-s)K(u)]}$$

再利用此系統總機率轉換成光子數：

$$\langle N \rangle(t) = 2\partial_s \mathcal{Y}(t, s) |_{s=1} = 2P[\vec{M}_1(t)] \partial_s Y(t, s) |_{s=1}$$

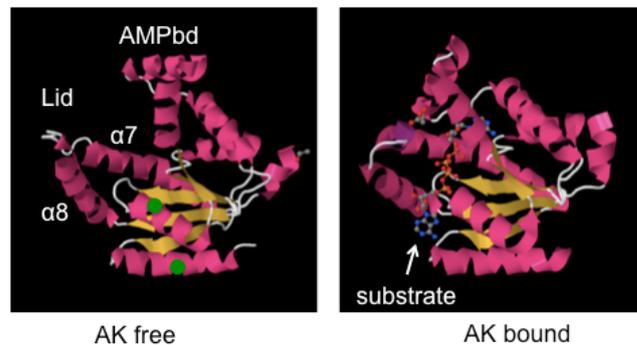
$$K(u) = \gamma \{1 + [\beta(u + \phi)^{-1}]\}^{-1}$$

$$\begin{aligned} \langle N \rangle(t) &= \sum_{i=0}^k I(\omega_L) P[\vec{M}_1(t_i)] t_i \\ &= \sum_{i=0}^k \frac{\Omega^2 \gamma P[\vec{M}_1(t_i)] t_i}{\gamma^2 + \Omega^2 [1 + \beta/w_\phi(t_i)]} \\ I(\omega_L) &= \lim_{t \rightarrow \infty} \partial_t [\partial_s Y(t, s) |_{s=1}] \end{aligned}$$

- f) 不同狀態下的轉換，可以根據轉換矩陣經由聯力方程組計算出相對應的機率密度  $\partial_t P[\vec{M}_i(t)] = \sum_j k_{ij} P[\vec{M}_j(t)]$ ，其中轉換的過程屬於隨機過程，根據環境對 KFP1 的擾動而決定，能障高低分佈利用 Metropolis-Hastings algorithm，由 Markov Chain Monte Carlo (MCMC) [10] 取樣得出。

## ii. 單分子酵素 AK1 高階統計行為

- 1) 本實驗使用的 AK 為 human Adenylate Kinase isoenzyme 1，長度：194 個胺基酸，質量：21.6 kDa, Nucleotide Binding Sites: 15-23 (ATP), 94-101 (AMP)；加入受質前的 AK 結構：綠點為標示染劑處，一個接在距受質鍵結處兩個胺基酸以外的位置，另一個接在在 core 的最外圍，最後一個  $\alpha$ -helix 上。



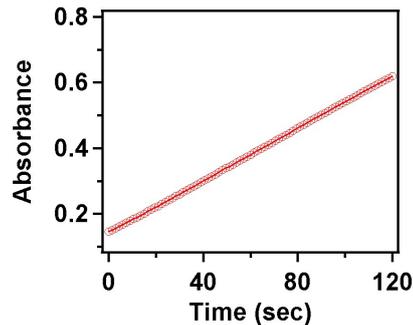
上述 x-ray 繞射結構重建資料取自 protein data bank (<http://www.pdb.org>)，編號分別為 3ADK (free) 與 2C95(bound)。

- 2) 酵素活性測試

- a) Reaction:  $\text{Mg}^{2+}\text{-ADP} + \text{ADP} \leftrightarrow \text{Mg}^{2+}\text{-ATP} + \text{AMP}$   
b) The coupled assay reaction mixture :

0.1 M Tris · HCl (pH 7.5),  
 0.1 M KCl ,  
 0.5 mM NADP<sup>+</sup>,  
 10 mM glucose ,  
 1 mM TCEP ,  
 2 mM MgCl<sub>2</sub> ,  
 2 mM ADP ,  
 1.2-unit hexokinase, and  
 0.6-unit glucose-6-phosphate dehydrogenase mixture

c) 催化反應會產生 NADH，其 UV 吸收峰在 340nm



- 3) 利用酵素的胺基酸 Cystine 上的 SH 標定染料，AK 上有兩個 Cystine
  - a) 將染料 Alexa-532 maleimide (812.884 g/mole) 溶於 DMSO 裡，調整到過量於 AK 5 ~10 倍的莫耳濃度，加入 AK 反應三小時。
  - b) 為了避免標定產生雙硫鍵，加入 5 倍過量的 TCEP
  - c) 反應完成後需要進一步純化樣品，我們分兩步驟進行，第一步先去除未反應的染料，接著將只有標上一顆染料的 AK 移除。第一步利用 HiTrap (GE Health) 膠體過濾，利用 AK 與染料分子的重量差，低於 1k Da 的分子會跑進膠體的孔洞中，減慢流速，而大分子受重力影響直接流出管住，根據原廠使用手冊操作，收取最前端 1/3 的液體接著進行下一步；第二步利用未標定的 SH 官能基與 SulfoLink resin (Pierce) 反應 30 分鐘，剩下未反應的部分即為純化後標上兩個染料的 AK 分子，SulfoLink resin 裝載入管住以及保存方式請參考原廠使用手冊
- 4) 量測方法是基於單分子的隨機特徵，其樣本空間有 N 個 states 的 non-Markov process。假設在適當的時間間隔內，酵素進行了 n 個步驟，最後一步與前面 n-1 步皆相關，因此在離散的時間區間內酵素的動態可用 n-1 order Markov process 描述。換句話說，這個時間區間的行為被視為整體樣本空間的第 n 階展開式，其係數是由大量取樣後的機率密度決定。因此當取樣數足夠時，可以利用片段的 Markov process 的線性組合得到整個酵素的樣本空間。因此將樣品放入微流體中，使其以定速度流過顯微物鏡的共軛焦焦點，調整光路使光子計數與 G(0) 達最大值後，便可以開始進行量測。
- 5) 模型與分析方法：
  - a) 當一個系統淨化學位能不為零時即處於 nonequilibrium steady states (NESS)，其特徵是具有時間反轉奇對稱性，因此高階 correlation function 會呈現時間非對稱性，因此可以利用這個數學特徵偵測 NESS；第 n 階 correlation function 的定義為：

$$g^{(n-1)}(\tau_1, \tau_2, \dots, \tau_{n-1}) = \frac{\left\langle \delta I(t) \delta I(t + \tau_1) \delta I(t + \tau_2) \dots \delta I(t + \sum_{i=1}^{n-1} \tau_i) \right\rangle}{\langle I(t) \rangle^n}$$

- b) 計算實驗數據  $\Delta g^{(2)}(\tau_1, \tau_2) = g^{(2)}(\tau_1, \tau_2) - g^{(2)}(\tau_2, \tau_1)$ ：由於數據量大，無法一點一點計算，因此利用 time-tag-to-correlation algorithm [OPTICS EXPRESS 11, 3583 (2003)] 加快運算速度。此演算法較一般硬體 correlator 用 multiple-tau 計算更靈活，適合應用於計算複雜體系。
- c) 利用 HMM of Bayesian inference [Biophysical Journal, 97, 3196 (2009)] 的數據轉換可以得到下列動態資訊：(1) 越過能障的等待時間 ( $t_{waiting}$ )；(2) 兩個不同 states 之間的轉換次數 ( $A$ )；(3) 在等待時間內光子擾動 (fluctuation) 量 ( $\sigma^2$ )。我們進一步定義  $B \rightarrow C$  的轉換機率密度 =  $A \times e^{-\frac{(x-B)^2+(x-C)^2}{2\sigma^2}}$ ；其中  $A$  = events of transitions,  $\sigma^2$  = Intensity fluctuations in state B

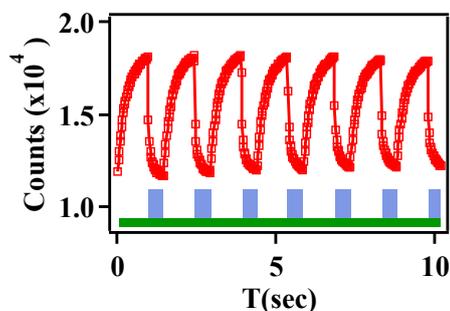
### iii. 活體細胞超解析度影像

- a) 超解析顯微影像校正測試：將稀釋的光活化螢光基團滴在乾淨玻璃上，待其乾燥後利用 532nm and 473nm 固態雷射連續切換造影，目的在於確認：(1) 繞射極限光點大小；(2) 顯微鏡上電動平移台的機械穩定性；(3) 螢光漂白特性。
- b) 細胞實驗：
1. 實驗前三天需將細胞換成沒有添加 phenol red 以及血清的培養液，並放置在微流體中。
  2. 標定已固定的 CHO 細胞株的微管：在 Goat anti-mouse antibody 的 NH<sub>2</sub> 端標定 Cy3 與 Cy5.5 (GE Health)，此為第二級抗體；以第一級抗體 mouse anti- $\alpha$ -tubulin primary antibody 先與 CHO 細胞株在室溫下反應半小時，接著經由 washing buffer 沖洗三次後，在室溫下每次間隔 10 分鐘，加入以標定上染料的第二級抗體，一樣在室溫下靜置半小時，接著以 washing buffer 沖洗三次，在室溫下每次間隔 10 分鐘，在造影前換上 PBS 保存，注意此時應避免光照，確保染料的新鮮度。
  3. 為了減少螢光閃爍並增強螢光穩定性，造影前需將細胞培養液換成造影緩衝液，其成分如下：
    - 50mM Tris, pH 7.5,
    - 10mM NaCl,
    - 0.5mg/mL glucose oxidase,
    - 40ug/mL catalase,
    - 10% (w/v) glucose, and
    - 1% (v/v)  $\beta$ -mercaptoethanol
  4. 調整好光路後，開啟影像擷取程式與自行撰寫的 Labview 控制程式，使 EMCCD 與 AOTF 同步。
  5. 利用 QuickPALM 分析影像

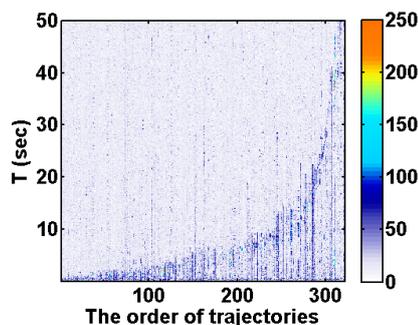
## 4. 結果與討論

### i. 型態微擾引導單分子在其能量圖景上的演進行為

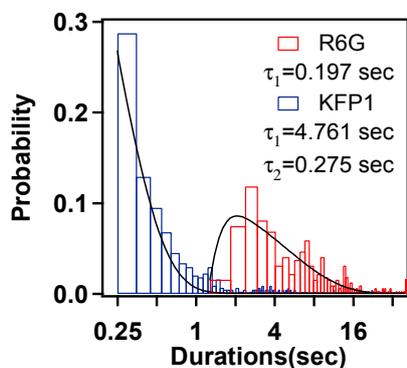
- 1) 將 114nM 的 KFP1 混入 1% agarose gel 中，測試光開關的特性，確定樣品特性



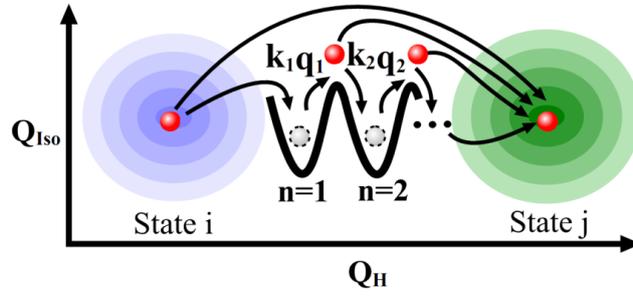
接著將濃度再調低到 1nM，進行實驗量測，總共取得 321 條單分子的光子放射軌跡，如下圖



- 取出單分子螢光放射存活時間，並與 R6G 比較。R6G 的螢光存活時間可以利用一個指數方程式 (exponential function) fitting，photobleaching 時間為 197msec；然而 KFP1 的表現不太一樣，屬於兩個指數方程式的卷積 (convolution)，所對應的兩個特徵時間一個是 photobleaching 時間 (4.761 sec)，另一個時間 (275 msec) 特性未知，以前的文獻也未記載過，我們推測與 KFP1 kindling 的過程相關；從 molecular dynamic s 的計算知道 KFP1 從暗態照綠光後會由 trans 轉成 cis 之後胺基酸側鏈 Glu215 與 chromophore 之間的相對位置才正確處於可發螢光的狀態，兩者之間的氫鍵受其他胺基酸鏈影響並不穩定；KFP1 kindling 的過程我們利用 multi-trap 的模型進行理論發展與分析實驗數據。



活化激發的過程中，trans 轉 cis 的過程中經由不同位能井之間的轉換，因此在兩個位能井中間會形成不連續面，會造成多次的 trap-escape 的循環，因此我們利用拓樸網路(topological network)的概念建立此模型，示意圖如下：



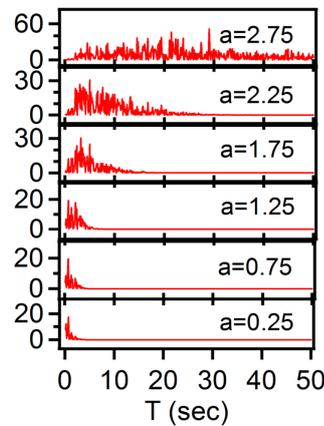
此過程可以寫成微分方程描述， $\partial_t P(n, t) = -k_n P(n, t) + q_{n-1} P(n-1, t)$ ，其解為一連串的疊代轉換以及 scale-free 網路的特性[11]可以得到疊代關係式為：  

$$P(n, t) = \frac{q_{n-1}}{k_n} P(n-1, t) = \frac{1}{n} e^{\Delta E} P(n-1, t)$$

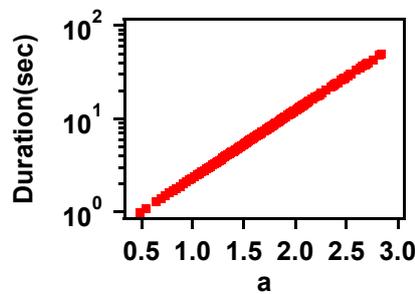
假設總 trap 次數為  $N$  次，反射式邊界條件為  $k_0 = q_0 = k_{N+1} = q_{N+1} = 0$  定義一個參數 average trapping strength， $a = e^{\Delta E}$ ，最後的 trap 機率密度經歸一化後可得：

$$P_{trap}(n) = \frac{\frac{a^n}{n!}}{1 + \sum_{m=1}^N \frac{a^m}{m!}} \approx \frac{a^n e^{-a}}{n!} \Big|_{N \gg 1}$$

- 3) 利用 MCMC 取樣能障以及 trap 次數，可以模擬出 KFP1 的放射過程，其中計算參數除了  $a$  以外均固定不變，計算參數為： $\Omega = 10^5$  Hz， $\beta = 10^6$  Hz， $\gamma = 10^8$  Hz，下圖為計算 100 次後的平均結果

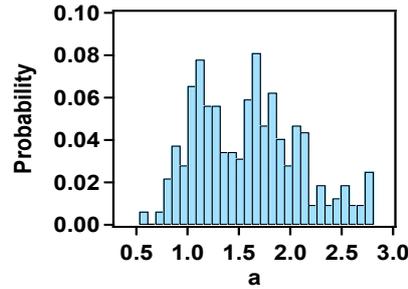


- 4) 接著將實驗量測到的單分子光子發射軌跡與 trap 的次數最對應



轉換後的統計圖如下圖所示，此統計代表 KFP1 受力的機率分布圖，其中一個峰值在  $a=1.33$ ，代表小於熱擾動（25 meV）的行為，另一個相距 0.55 的部份，是 KFP1 受熱擾動影響周圍蛋白基質，進而耦合到發光中心的影響；這兩部分有接近的機率密度，表示受熱擾動後會相對應有一個小於熱擾動的力量做型態

微擾調整 KFP1 的能量圖景 (energy landscape)，應屬於能量圖景上的 roughness，是一個小範圍的形態微擾。



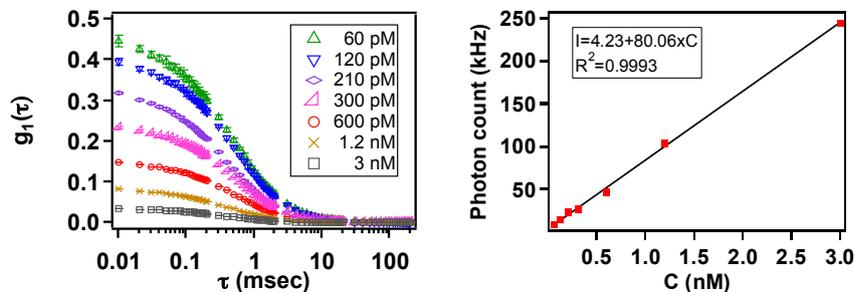
5) 結論：

單光子的技術量測上隱藏許多分子的動態資訊，欠缺的是分析的方法，進而解析出來，目前文獻上尚未有利用單分子技術量測與分析觀察到能量圖景上的動態，我們利用 KFP1 上的胺基酸側鏈 Glu215 與發光中心之間的不穩定氫鍵將環境微擾寫入光子放射過程，放射光子數總量對應於一般體系上蛋白或酵素的功能表現程度強弱，經由理論建模與分析觀察到 KFP1 受環境熱擾動時會隨之調整蛋白基質的形態變化，藉由一連串在能量圖景上的 roughness 細調後可達最穩定的發光狀態 (note\_1)，因此型態變化會引導一個蛋白的功能表現並隨環境擾動而動態調整。

note\_1: 由 ensemble 的 photoswitch 可知，綠光活化後螢光發射會越來越強最後達飽和，直到有部分分子放完光子達 photobleaching，螢光總強度才會開始使變弱，由此可知 KFP1 從 turn on 一開始會慢慢調整到最穩定的狀態，直到放完光子為止。

ii. 單分子酵素 AK1 高階統計行為

1) 利用染劑 Alexa-532 做光子計數量測校正，後續實驗均根據此數據操作在線性區內



酵素過了兩個管柱後濃度不易估計，因此利用上述校正資料，稀釋到平均光子計數值與 60 pMAlexa 532 一樣 (直徑 200nm 的球體裡平均 0.15 顆染料)。

2) Mg 離子與酵素的靜電作用力可以有效降低催化過程的  $pK_a$ ，胺基酸 arginine (R), lysine(K), or glutamic acid (E) 均會影響 AK 酵素作用，下列為 E. Coli AK (左) 與 human AK1 (右) 的胺基酸序列，胺基酸處標上黃色底

10	20	30	40	50	60	10	20	30	40	50	60
MRILLGAPG	AGKGTQAQFI	MEKYGIPQIS	TGDMLEAAVK	SGSELGKQAK	DIINDAGKLVY	MEEKLKIKTKI	IFVVGPGPGSG	KSTQCEKIVQ	KYGYTHLSTG	DLLEKSEVSSG	SARHGKILSEI
70	80	90	100	110	120	70	80	90	100	110	120
DELVIALVKE	RIAQEDCRNG	FLLDGFPRTI	PQADAMKAG	INVDVLEFD	VPDELIVDRI	MEKGLVPLE	TVLDMLRDAM	VAKVMTSEGF	LIDGYPREVQ	QGEFEFRIG	QPTLLLYVDA
130	140	150	160	170	180	130	140	150	160	170	180
VGRKRVHAPSG	RYYHWKFNFP	KVEGKDDVYG	EELTRKDDQ	EETVKKKLV	YHQMTAPLIG	GFETHTQRL	KRGETSGRYD	DNEETIKKRL	ETYYKATEPY	IAPYEKGLV	KKVNAEGSVD
190	200	210				190					
YYSKEAEGN	TKYAKVDGTK	PVAEVRADLE	KILG			SVFSQVCTHL	DALK				

Lysine(K)

```

10      20      30      40      50      60
MRILLGAPG AGKGTQAQFI MEKYGIPQIS TGDMLRAAVK SGSELGKQAK DIMDAGKLVV
MEEKLKKTKI IFVVGPGSG KGTQCEKIVQ KYGYTHLSTG DLLRSEVSSG SARGKLSSEI
70      80      90      100     110     120
DELVIALVKE RIAQEDCRNG FLLDGFPRTI PQADAMKEAG INVYVLEFD VPDELIVDRI
MEKQQLVPLE TVLDMLRDAM VARVNTSKGF LIDGYPREVQ QGEFFERRIG OPTLLLYVDA
130     140     150     160     170     180
VGRRVHAFSG RVYHVKNFNP KVEGKDDVTG EELTRKDDQ EETVRKRLVE YHQMTAPFLIG
GPETMTQRLR KRGETSGRVD DNEETIKKRL ETTYKATEPV IAFYKRGIV RKNVAEGSVD
190     200     210
YYSKEAEAGN TKYAKVDGTR PVAEVRADLE KILG
190
SVFSQVCTHL DALK

```

### Glutamic acid (E)

```

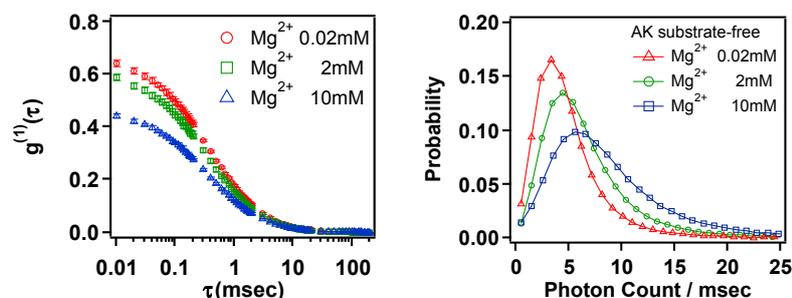
10      20      30      40      50      60
MRILLGAPG AGKGTQAQFI MEKYGIPQIS TGDMLRAAVK SGSELGKQAK DIMDAGKLVV
MEEKLKKTKI IFVVGPGSG KGTQCEKIVQ KYGYTHLSTG DLLRSEVSSG SARGKLSSEI
70      80      90      100     110     120
DELVIALVKE RIAQEDCRNG FLLDGFPRTI PQADAMKEAG INVYVLEFD VPDELIVDRI
MEKQQLVPLE TVLDMLRDAM VARVNTSKGF LIDGYPREVQ QGEFFERRIG OPTLLLYVDA
130     140     150     160     170     180
VGRRVHAFSG RVYHVKNFNP KVEGKDDVTG EELTRKDDQ EETVRKRLVE YHQMTAPFLIG
GPETMTQRLR KRGETSGRVD DNEETIKKRL ETTYKATEPV IAFYKRGIV RKNVAEGSVD
190     200     210
YYSKEAEAGN TKYAKVDGTR PVAEVRADLE KILG
190
SVFSQVCTHL DALK

```

**Human AK1:** <http://www.uniprot.org/uniprot/P00568>

**E. Coil. AK:** <http://www.uniprot.org/uniprot/P69441>

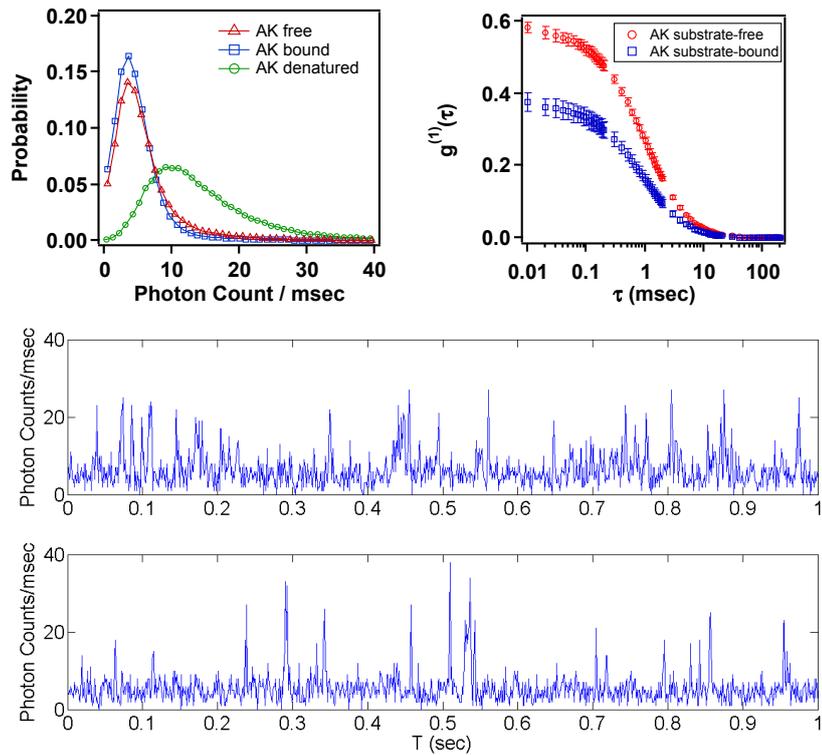
- 3) **探討鎂離子對AK的影響：**根據x-ray繞射結構，在 lid domain有4個 arginine 會與鎂離子靜電吸引；ATP鍵結區域無 arginine，但有一個 lysine。若鎂離子會調變酵素的次級結構（secondary structure），而在ATP鍵結區域只有一個 lysine會受鎂離子影響。假設AK催化過程與周圍  $\alpha$ -helix無關，鎂離子增加至某個濃度後，AK催化應會飽和。根據 J. Biol. Chem. **284**, 3306 (2009)使用 random bi-bi model 的計算，鎂離子濃在0.8mM之後turnover rate會達飽和狀態。他們從鎂離子濃度對turnover rate的ensemble實驗結果，推論2個鎂離子會直接作用在AK的催化中心，但這些僅是現象報導，並無物理機制之討論。我們的研究結果卻顯示，鎂離子濃度越高，平均光子數越高，G(0)值越低。當鎂離子濃度在2mM至10mM之間，在ATP鍵結區域的 lysine應呈飽和狀態，但實驗仍可觀測到螢光強度增加，顯示鎂離子的影響仍未呈飽和狀態，這應解釋為受鎂離子影響的周圍胺基酸，其效應耦合到催化中心仍會繼續增加；或從另一個觀點來看，增加鎂離子濃度在增加酵素催化反應環境的異質性（inhomogeneity）。



我們使用Mandel's Q-parameter來分析實驗觀測到的光子統計機率變寬的趨勢，其中  $Q = \left[ \frac{\langle I^2(t) \rangle - \langle I(t) \rangle^2}{\langle I(t) \rangle} \right] - 1$ 。Q=1為Poisson統計，在一般量子系統內，Q>1代表光子bunching。在酵素體系內的光子'bunching'應是周圍環境的異質性所造成 [Phys. Chem. Chem. Phys. **2011**, 13, 6734]。在單分子酵素研究，鎂離子濃度由0.02mM→2mM→10mM，對應的Q值為1.80→2.09→2.38。顯示當鎂離子濃度增加，酵素內  $\alpha$ -helix結構異質性變大，而影響到AK催化反應。因此AK除了一般廣為人知在調整生物細胞之能量平衡外，也與酵素周圍環境之離子有關，是一個雙功能性耦合的酵素。但目前對於細胞內的離子調變功能還未被深入研究，可以設計in vivo實驗確認其功能。

局部結論：鎂離子會調變酵素次級結構，其次級結構異質性增加所產生之型態微擾，會進一步耦合到 AK 催化中心，而影響其催化反應。

- 4) 2mM 鎂離子下 AK1 行為探討：受質加入後，螢光強度減弱，但還是比鎂離子 0.02mM 時的光子數高；光子統計機率沒有位移只有波峰稍微增強。與加入鎂離子不同的是加入受質後發光總數些微下降。在線性響應範圍內， $G(0)$  值應該要升高，但實驗量測的  $G(0)$  在加入受質後降低了。可能的原因是：（1）AK 與受質鍵結後使得催化中心熱穩定性提高，結構變 compact 造成 fluctuation 變小，而影響到  $G(0)$ ；（2）受質加入後會降低活化能，因此在每個 state 停留的時間會變短，從光子數的原始數據上來看，會變得比較離散，導致  $G(0)$  值下降。



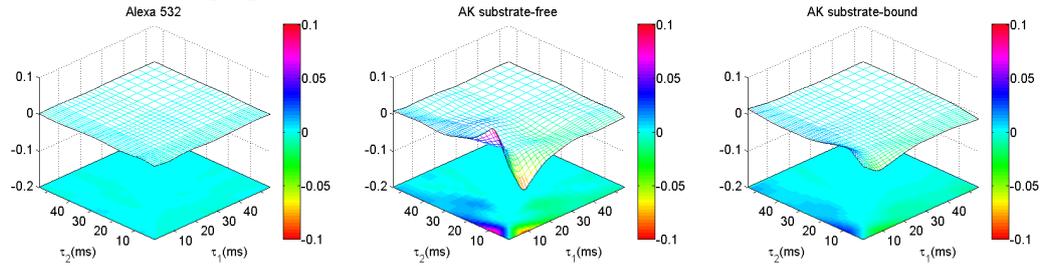
加入受質後，AK 發光的 Mandel's Q-parameter 由 2.87 $\rightarrow$ 1.48，顯示與受質鍵結其結構異質性減弱，變得更 compact。從原始數據可清楚看出 fluctuation 變小。從 correlation 的定義上來看， $\delta I(t)$  變小， $G(0)$  因此變小。從原始數據亦可發現加入受質後 dwell 時間變短。在一定的時間長度內，當 dwell 的區間變短代表經過時間延遲  $\tau$  後  $\delta I(t)$  變成 background 的機率變高，因此時間平均後  $\langle \delta I(t)\delta I(t+\tau) \rangle$  會比較小。

總結上述兩點，AK 受到鎂離子與受質的影響並不一樣。加入鎂離子造成酵素型態擾動的異質性增加，但加入受質後反而是抑制酵素型態擾動，影響  $G(0)$  呈相反的表現。（上述 Q 值的比較，都在同一個微流體盤，同樣的聚焦點上。前述鎂離子濃度調變與加入受質的比較唯一不同是取下微流體盤換過樣品再次聚焦，並調到相同的  $G(0)$  值。因此可能聚焦點差一點造成前後數值（鎂離子 2mM 的部份）不一致，但是每一組的比較是可以看出趨勢不同）。

局部結論：催化中心周圍的  $\alpha$ -helix 受環境影響的動態會耦合到催化中心；受質加入後，AK 會使受質鍵結區域熱穩定性提高，以利進行催化。

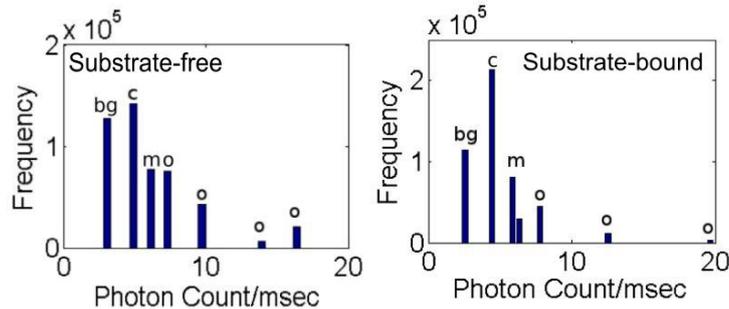
- 5) 單分子 AK 酵素的 NESS 與 Cooperativity：

- 1) 計算實驗數據  $\Delta g^{(2)}(\tau_1, \tau_2) = g^{(2)}(\tau_1, \tau_2) - g^{(2)}(\tau_2, \tau_1)$ ，當  $\Delta g^{(2)}(\tau_1, \tau_2) \neq 0$  時，代表系統處於 NESS，因此 AK 型態變化需存在至少三個 states，且整個系統的淨化學位能不為零，表示在整個催化流程中存在至少一個不可逆的過程[12]；



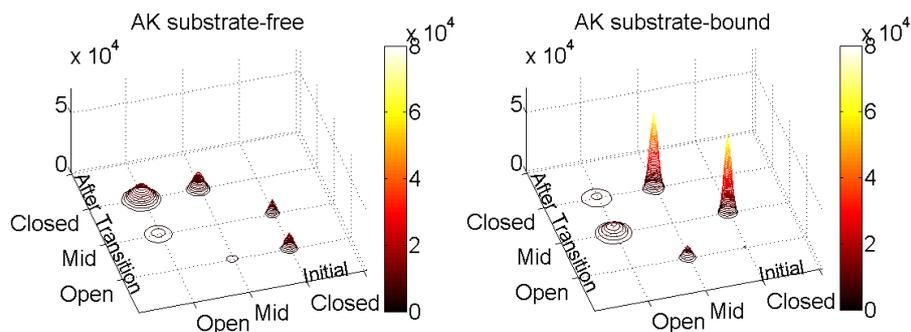
推論：酵素在整個催化的過程當中，藉由型態轉變顯現每一步驟的功能。每一步路以 minimal frustration 為原則，其中某一個過程以釋放熱的形式達到 minimal frustration，表示此步驟的形態轉變存在應力，需要消散掉才能順利進行下一步驟。

- 2) 根據 1) 的推論，利用 Hidden Markov Model 進一步分析 AK 動態。HMM of Bayesian inference [13]可發現原始光子放射數據中 states 的數目，將其歸納成三類，分別是 open, intermediate (abbr. : mid), closed states，其統計圖如下：background=bg; closed=c; intermediate=m; open=o



由於酵素上不同次區域的擾動會耦合到催化中心，運用 HMM 的數據轉換可以得到下列動態資訊：(1) 越過能障的等待時間 ( $t_{waiting}$ )；(2) 兩個不同 states 之間的轉換次數 ( $A$ )；(3) 在等待時間內光子擾動 (fluctuation) 量 ( $\sigma^2$ )。我們進一步定義  $B \rightarrow C$  的轉換機率密度 =

$$A \times e^{-\frac{(x-B)^2 + (x-C)^2}{2\sigma^2}}; \text{其中 } A: \text{events of transitions}, \sigma^2: \text{Intensity fluctuations in state B}$$



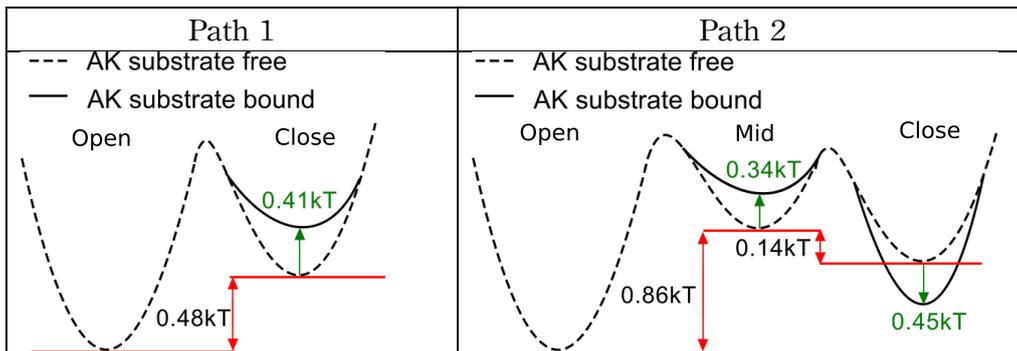
$t_{\text{waiting}}$ (msec)	From open	From mid	From close	Transition %	From open	From mid	From close
To open		3.24 (1.28)	3.8 (1.97)	To open		4.5 (7)	23 (1.4)
To mid	7.68 (4.25)		3.53 (2.02)	To mid	5 (5.6)		21.5 (42.8)
To close	7.86 (4.79)	3.06 (1.2)		To close	21 (2.2)	24 (40.9)	

\*\*括號內為加入受質後

加入受質後最明顯的差異在於：(1) open/close 之間的轉換被抑制一個數量級，而 mid/close 的轉換增加；(2) 等待時間縮減；(3) 順序性的 states 轉換多 1~2 個數量級。代表酵素因為受質加入強迫性進行不同次區域的順序性運動，抑制原本在熱擾動下所走的路徑，因此有比較大的機率經過中間態。而且在完全閉合進行催化前，會在中間態與閉合之間進行調整，使周圍胺基酸位於正確位置和達到最佳熱穩定性後，才開始進行催化。受質加入前後的路徑變化可以歸類成兩種模型：(1) 受質加入前是藉由鎂離子的靜電吸引力調變，屬於不同次區域間的相對運動，可以 induced-fit model 來描述；(2) 加入受質後，中間態的角色被凸顯，前一類的路徑被抑制。定義從 state  $a$  越過能障到達  $b$  的 free energy 差為：

$$\Delta G_{ab} = -kT \ln \left( \frac{t_{\text{waiting},b}}{t_{\text{waiting},a}} \right) \Delta G_{ab} = -kT \ln \left( \frac{t_{\text{waiting},b}}{t_{\text{waiting},a}} \right)$$

free energy 差算出。結果如下圖所示，mid→close 的位能差增加，可能原因是 lid 與 AMPbd 的 cooperative motion，造成 lid domain 上應力增加，因而經過中間態釋放較多熱，再轉到 close state，屬於酵素分子為了達到 minimal frustration 的調整過程。根據 coarse-grain 的理論計算並假設酵素形態變化會依照 minimal frustration 原則 [14, 15]，加入受質後會增加 cooperativity，lid 附近的  $\alpha$ -helix 會增加應力（在我們的體系裡為  $\alpha$ -Helix 7 與  $\alpha$ -Helix 8），為了釋放應力  $\alpha$ -helix 會 unfold 再 refold (這個過程即 open 與 close 之間的中間態所進行的動作)；Nature Communications 1, 111 (2010) 利用 NMR 證實在 E. Coil. AK 和其他 AK 家族，前述模型正確。



局部結論：加入受質後，AK 催化反應之 cooperativity 增強加入受質後，AK 酵素不同次區域會被迫依序做開閉的動作，造成應力累積。(1) 根據 PRB 53, 6271 的理論計算，以一個具有長鏈 polymer 為體系，其 folding 或 conformational change 的 cooperativity 作用加強時，topological constraint 會使得整個系統的 entropy 下降。以 AK 為例，其 Gibbs free energy = H-TS，其中 H：enthalpy (Joule), T：temperature (K), S：entropy (Joule/K)，當催化反應之 cooperativity 增強，會使得 free energy 差變大。

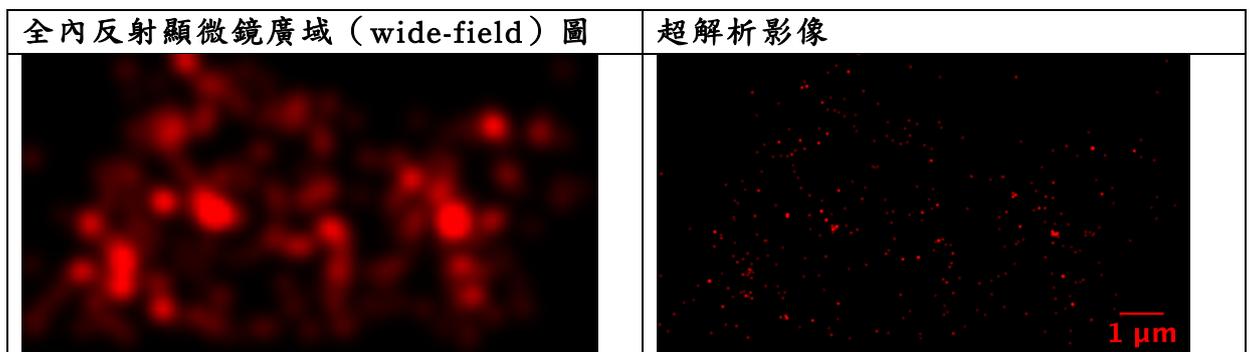
- 3) AK 酵素在 open 時有兩條路徑可以選：(1) open→mid; (2) open→close，其中第二條路自由能的差比較小。加入受質後會走第一條路，與未加入受質前比，其 free energy 差變大。從萃取出來的數據顯示受質加入後 cooperativity 增強，因此推論走這條路有應力累積。過了能障後，進行 mid→close 的轉換，加入受質後所減低的自由能較多，open→mid→close:  $1.2kT-0.59kT=0.61kT$ ; open→close:  $0.89kT$ 。酵素走總自由能差低的路徑頗合理，雖經中間態時自由能會升高，但之後會將應力以熱的方式釋放，與 NMR 實驗 [Nature Communications 1, 111 (2010)] 吻合，但在單分子實驗尚未被觀察過。因此酵素為了實現 minimal frustration，會選擇經過中間態，釋放出應力。
- 4) 結論：AK 同時存在兩種催化的路徑：(1) induced fit; (2) minimal frustration。AK 會隨微環境變化和受質結合而調整，選擇性走不同路徑。受質加入前的  $\alpha$ -Helix 7 與  $\alpha$ -Helix 8 之間的結構擾動，造成較大機率走 induced fit 路徑；受質加入後會強迫 lid 與 AMPbd 依序運動，造成受質鍵結處之熱穩定性增加，因此 AK 採經過中間態方式釋放應力，以符合 minimal frustration。

### iii. 活體細胞超解析度影像

超解析度影像是突破繞射極限的技術，在瞭解技術本質前，必須先了解 Abbe 的成像理論，其光學系統假設為：(1) 傳統架構下的觀測是以一個物鏡收光的系統；(2) 激發光均勻照射在樣品上並發射一個光子；(3) 螢光的激發是基於染料分子或螢光蛋白的線性吸收；因此只要克服上述三點任何一點都可以得到超解析影像，近年來 STORM 或 PALM 的技術是克服第 2 點，利用單分子的隨機激發特性取得超解析影像，超解析度影像定位精準度以此式估計[16]：

$$SD = \sqrt{\frac{S^2 + a^2}{N} + \frac{4\sqrt{\pi}S^3b^2}{aN^2}}$$

其中，S 為在系統架構下點擴散函數 (point spread function) 的標準差；a 為 CCD 畫素的等校尺寸；b 為背景雜訊；N 為平均偵測光子數；我們的系統架構下，S=241.1nm, a=133nm, b=1, N=4300，其造影精準度為 1.23nm，下圖為 CHO 的  $\alpha$ -tubulin 上標定 Cy3 與 Cy5.5 的超解析造影圖：



本研究發展單分子偵測與分析技術對於光活化螢光基團物理機制以及酵素催化動態的瞭解，未來結合超解析造影技術可用來探測單細胞的生理與動態過程，可更進一步探究生化過程的細節，助於了解疾病以及病毒感染的根本成因。

### 5. 參考文獻

- [1] E. Z. Eisenmesser et al., Nature 438, 117 (2005)  
 [2] K. A. Henzler-Wildman et al., Nature 450, 838 (2007)

- [3] K. Henzler-Wildman et al., *Nature* 450, 964 (2007)
- [4] Xin-Zheng Li et al., *PNAS*, 108, 6369, (2011)
- [5] Urika Olsson et al., *naturecommunications*, 1, 111, (2010)
- [6] SorenDoose et al., *ChemPhysChem*, 10, 1389 (2009)
- [7] L. V. Schafer et al., *PLoSComput. Biol.* 4, e1000034 (2008)
- [8] A. A. Budini, *J. Chem. Phys.* 126, 054101 (2007)
- [9] Y. Zheng and F. L. H. Brown, *Phys. Rev. Lett.* 90, 238305 (2003)
- [10] D. Gamerman, *Markov Chain Monte Carlo: Stochastic Simulation of Bayesian Inference* (Taylor & Francis Ltd, 1997).
- [11] E. V. Koonin, Y. Wolf, and G. Karev, eds., *Power Laws, Scale-Free Networks and Genome Biology* (Springer, 2006).
- [12] Hong Qian et al., *PNAS*, 101, 2828 (2004)
- [13] Jonathan E. Bronson et al., *Biophysical Journal*, 97, 3196 (2009)
- [14] Miyashita et al., *PNAS*, 100, 12570 (2003)
- [15] P. C. Whitford et al., *J. Mol. Biol.*, 366, 1661 (2007)
- [16] R. E. Thompson et al., *Biophys. J.* 82, 2775 (2002)

## 國科會補助專題研究計畫成果報告自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現或其他有關價值等，作一綜合評估。

### 1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以 100 字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

### 2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文：已發表 未發表之文稿 撰寫中 無

專利：已獲得 申請中 無

技轉：已技轉 洽談中 無

其他：（以 100 字為限）

### 3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）（以 500 字為限）

生物體中微觀的機制往往影響後續的生化功能以及疾病的表現，但會被巨觀的行為掩蓋，因此本研究發展單分子量測技術偵測微觀的動態行為，並以物理模型以及數學工具將複雜體系模型化，可以將複雜的生化過程量化處理，未來進一步控制微觀動態並依所需功能設計人造蛋白治療基因疾病以及優化酵素催化功能。

