

大分子穿越纳米孔的跨膜输运动力学

罗开富

中国科学院软物质化学重点实验室
中国科学技术大学高分子科学与工程系

2012年11月8日 北京

高分子链的尺寸和松弛时间

● 均方回转半径

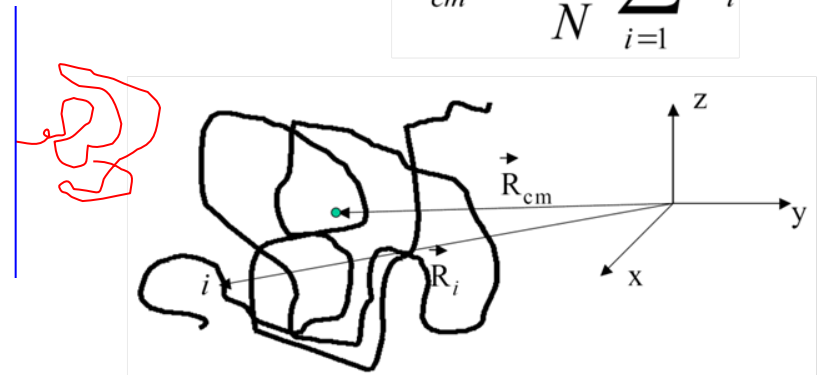
$$R_g \sim N^\nu \quad (N \text{ 为链长度})$$

$$\text{Flory 指数 } \nu = 3/(d+2)$$

1	(一维)
3/4	(二维)
0.588	(三维)
1/2	(四维或以上)

$$R_g^2 = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \left(\vec{R}_i - \vec{R}_{cm} \right)^2$$

$$\vec{R}_{cm} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \vec{R}_i$$



● 松弛时间

$$\tau_r \sim R_g^2 / D$$

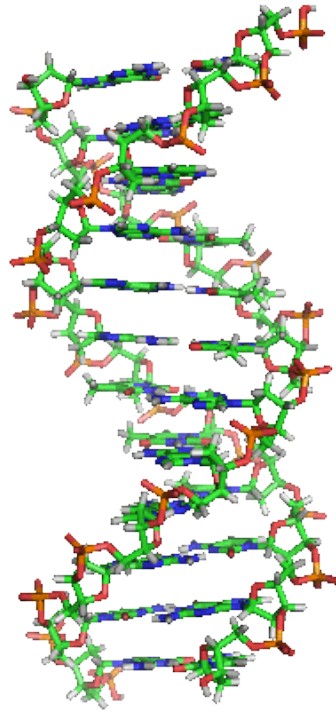
$$\sim N^{1+2\nu} \quad (D \sim 1/N) \quad (\text{Rouse 松弛时间})$$

$$\sim N^{3\nu} \quad (D \sim 1/N^\nu) \quad (\text{Zimm 松弛时间, 考虑流体力学效应})$$

报告提纲

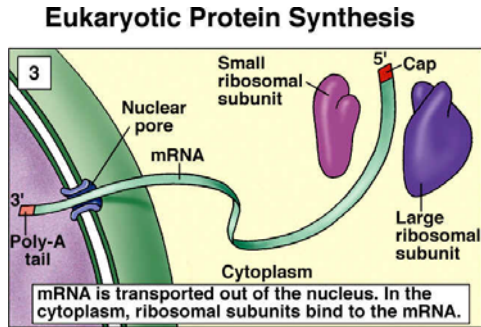
- ① 研究背景
- ② 实验研究
- ③ 理论与模拟研究
- ④ 结论

一、研究背景

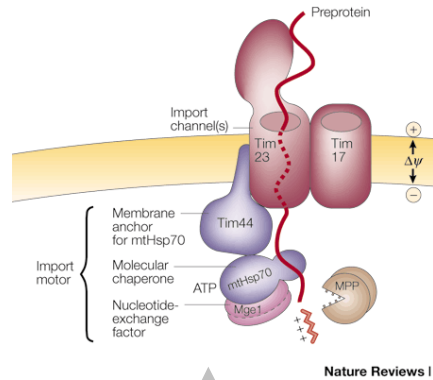


多学科前沿交叉的重要问题

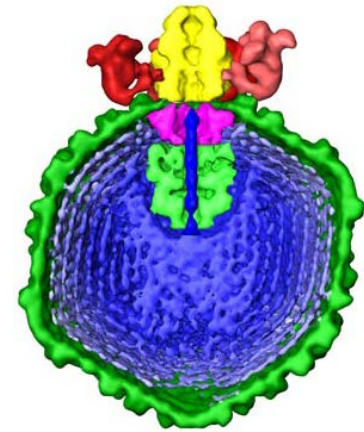
信使RNA穿过核孔



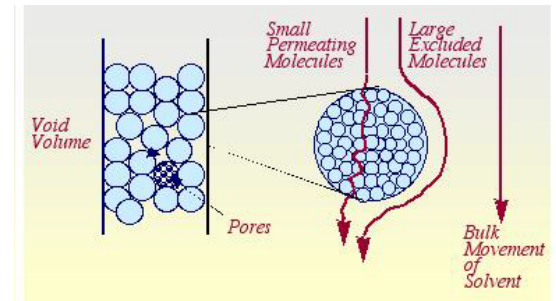
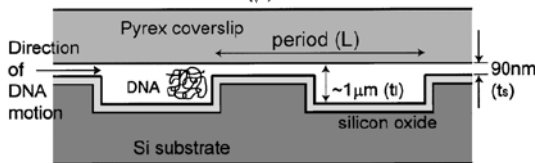
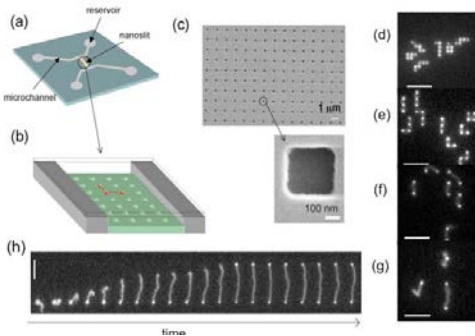
蛋白质通过膜通道



病毒注射基因



高分子穿越纳米孔



微米/纳米通道的单分子操作

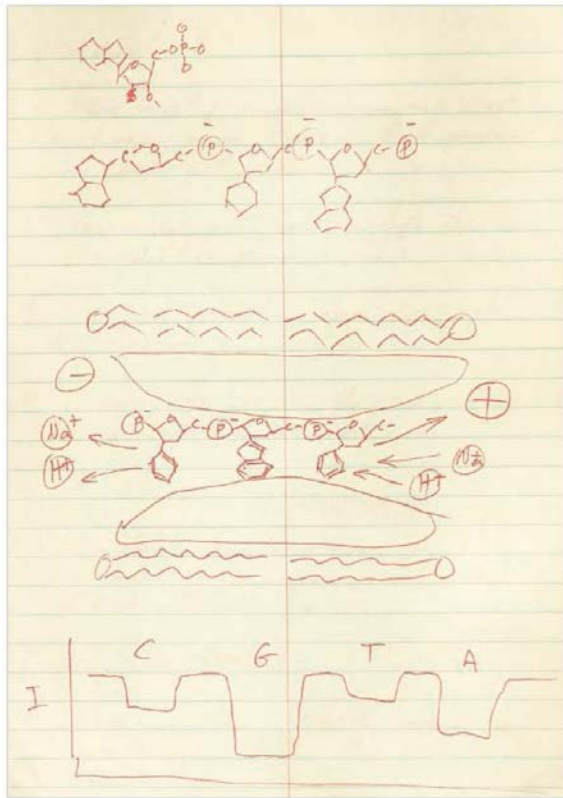
凝胶渗透色谱 (GPC)

最重要的应用：新一代基因测序技术

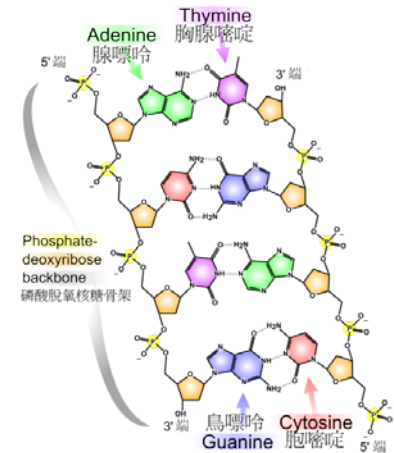
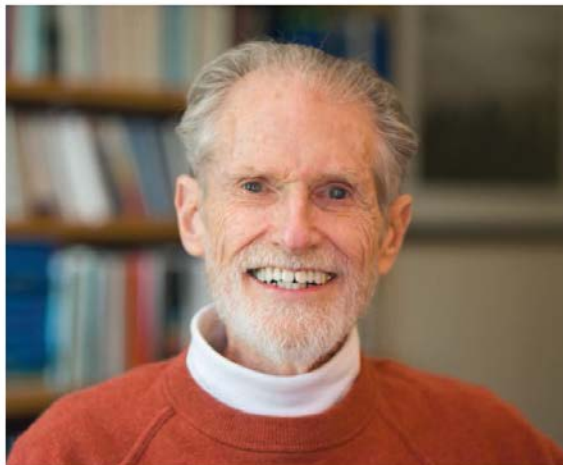
1989年提出利用纳米孔来进行DNA测序的蓝图

D. Deamer 美国加州大学教授

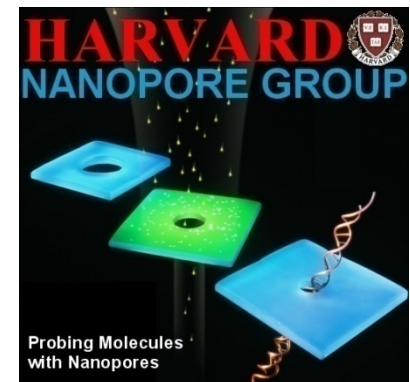
D. Branton 美国科学院院士、哈佛大学教授 [Science 2012, 336, 534]



Nanopore dreamers. After David Deamer (top right) sketched out nanopore sequencing in 1989, he teamed up with Daniel Branton (bottom right).

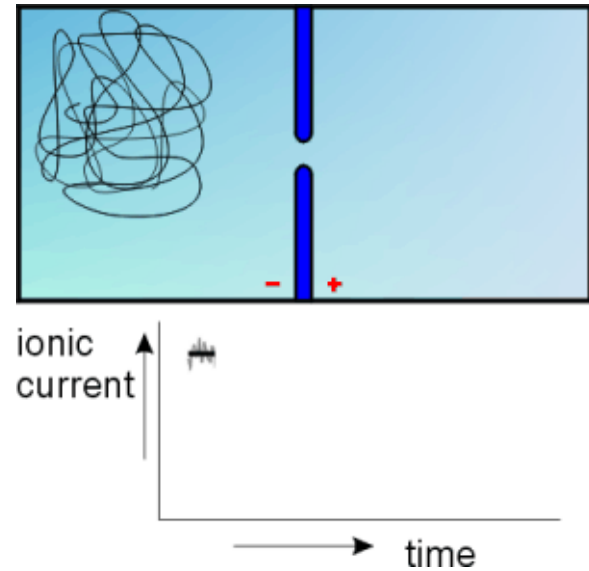
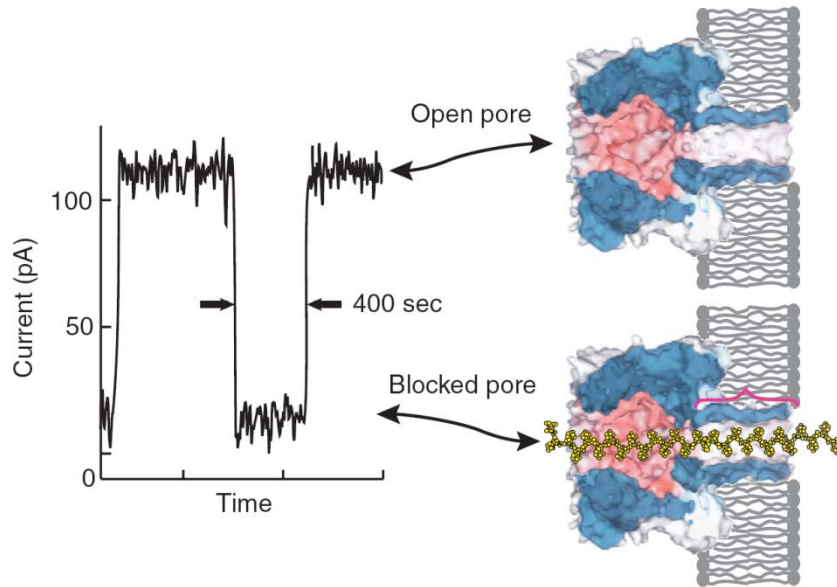


哈佛纳米孔课题组

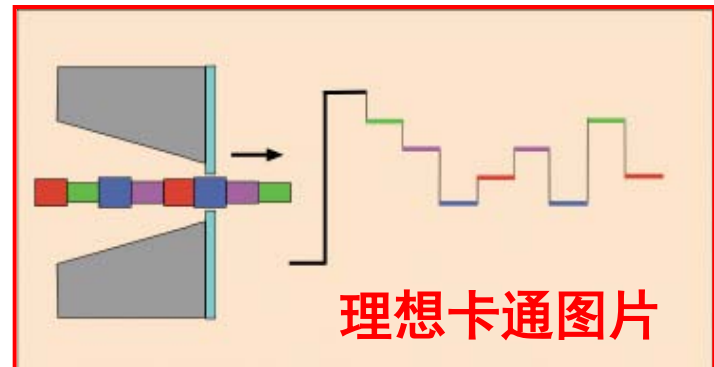


基本原理

高分子进入孔导致离子流下降

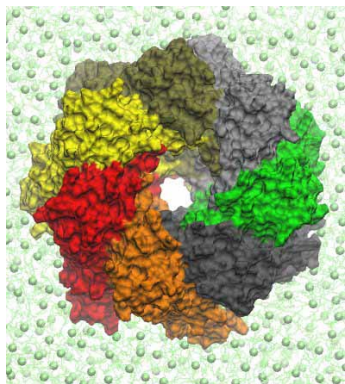


碱基尺寸差异以及与孔之间不同的相互作用导致离子流信号不同



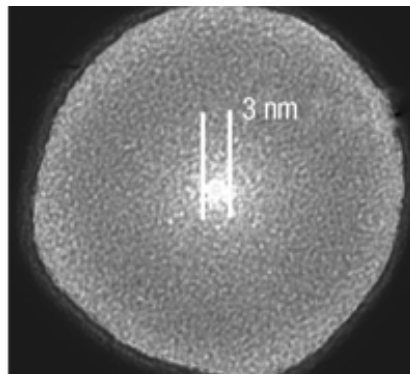
二、实验研究

蛋白质孔 (96年)



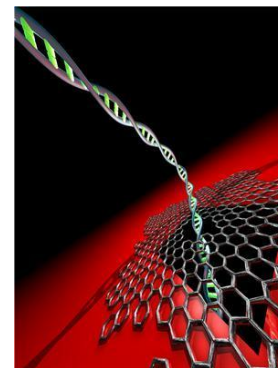
Song et al., 1996

固体孔 (01年)



Li, Golovchenko et al., 2001

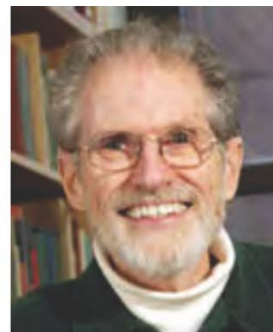
石墨烯孔 (11年)



John Kasianowicz
Amit Meller
Alek Aksimentiev
Jens Gundlach
Hagan Bayley



Jene
Golovchenko

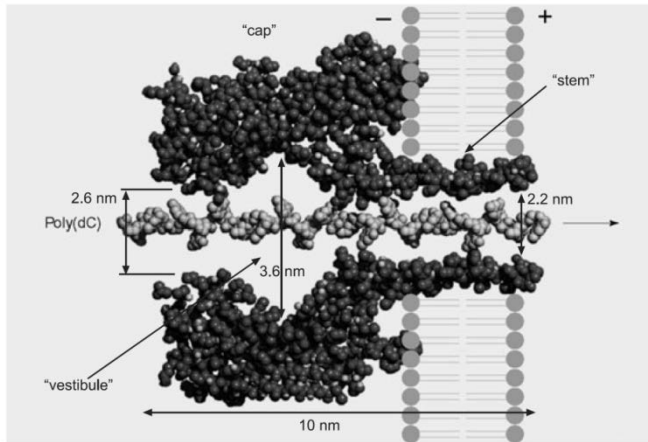
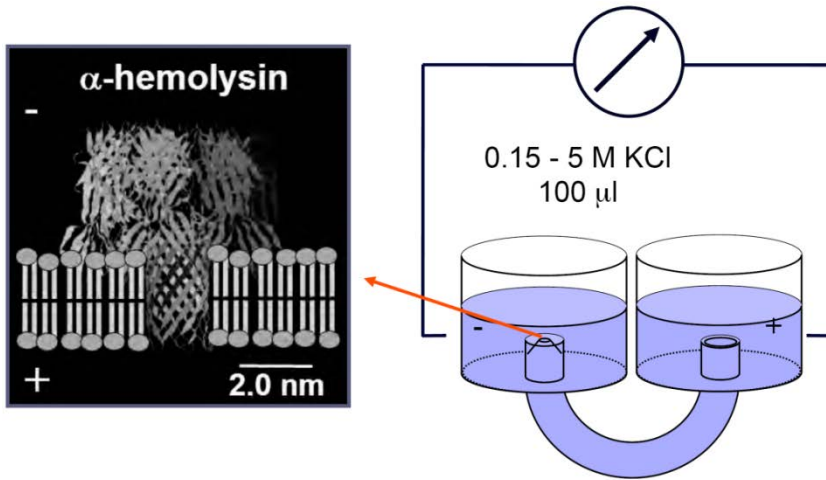


Daniel
Branton



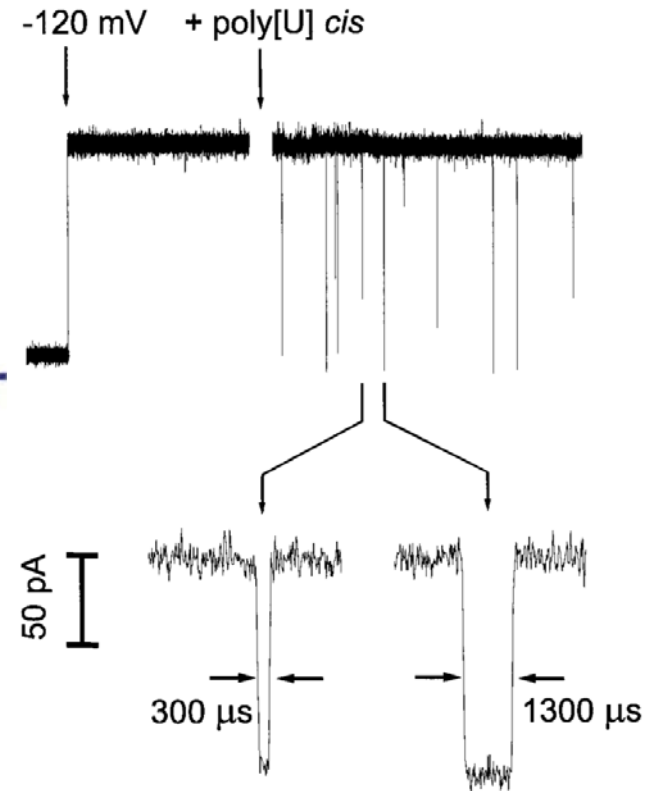
Cees
Dekker

表征DNA链长度



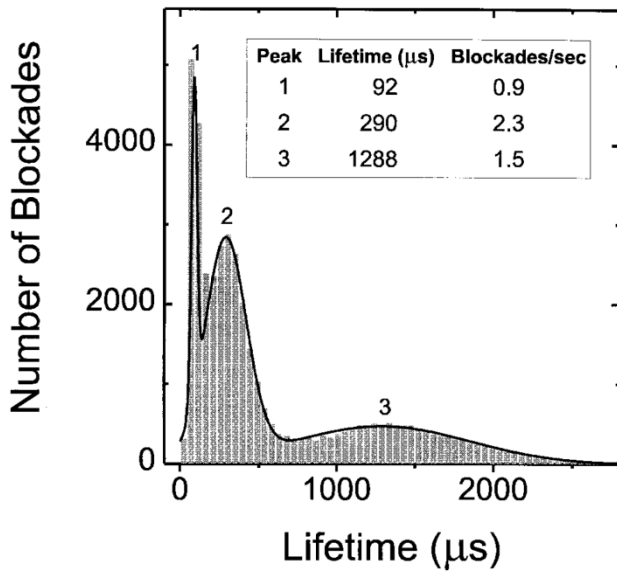
John Kasianowicz

离子流信号



- Effective charge per nucleotide = **0.2 e** in the pore lumen (**2.4 e total**)
- **5 pN** force at **120 mV** applied potential

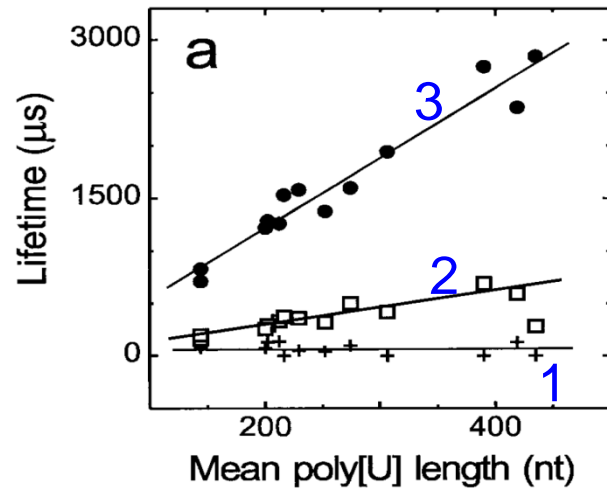
[J. J. Kasianowicz, E. Brandin, D. Branton, and D. W. Deamer, *PNAS*, **93**, 13770 (1996)]



Meller



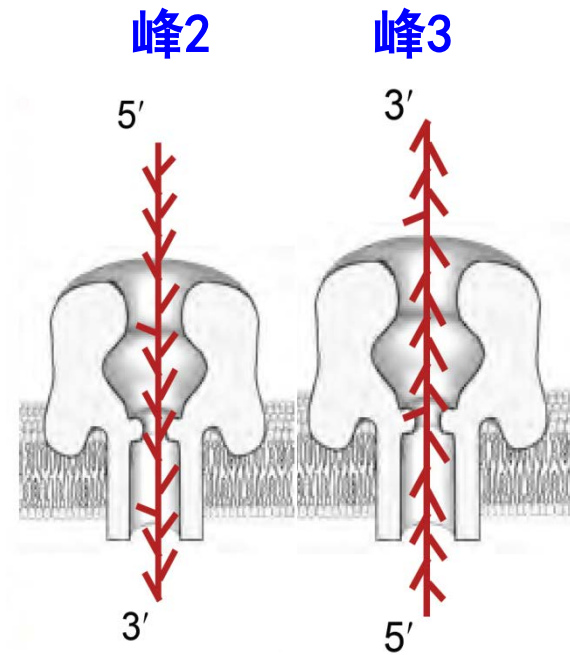
Aksimentiev



峰1：与链长无关，不成功的穿越。

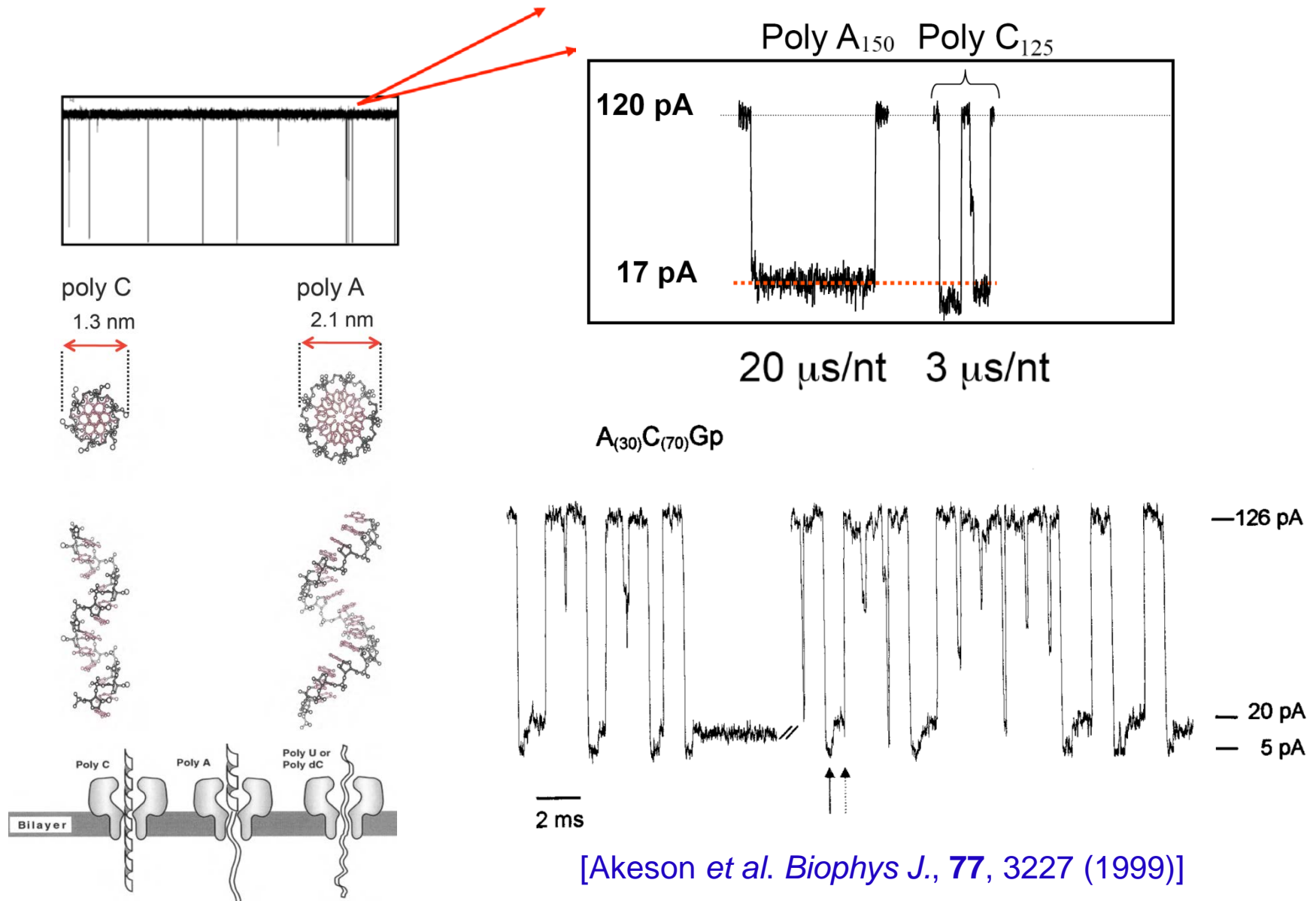
峰2：与链长成正比。

峰3：与链长成正比 $\tau \sim N^1$



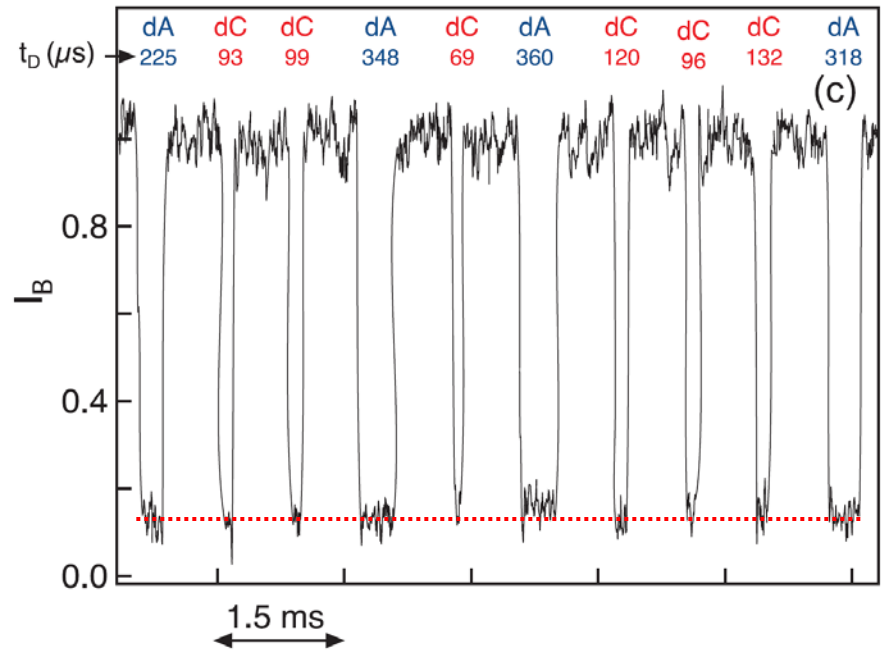
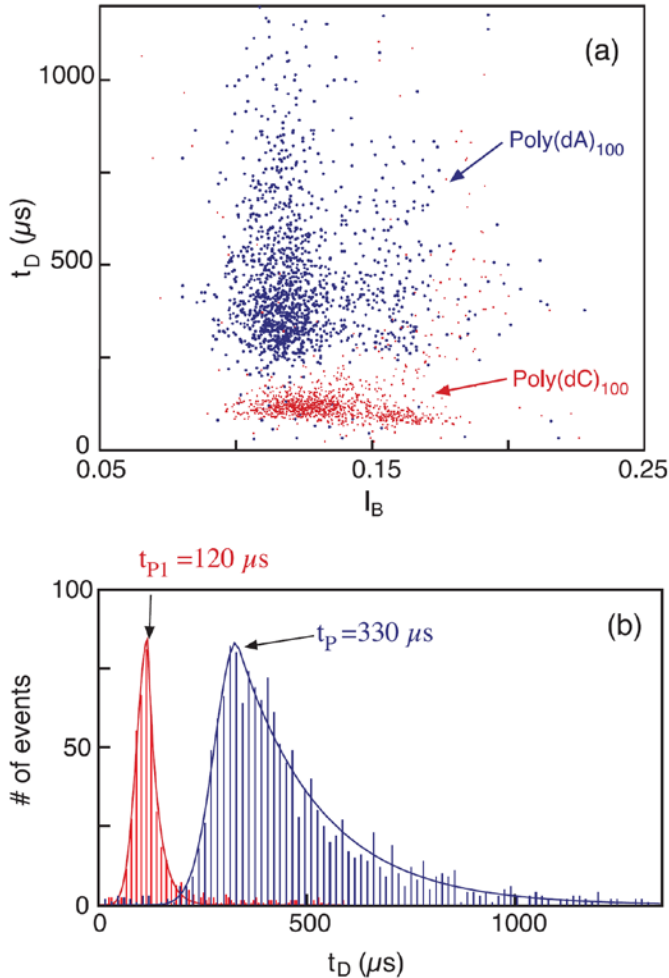
[Mathe et al. PNAS, 102, 12377 (2005)]

区分不同碱基的RNA



[Akeson *et al. Biophys J.*, 77, 3227 (1999)]

区分相同长度不同碱基的DNA



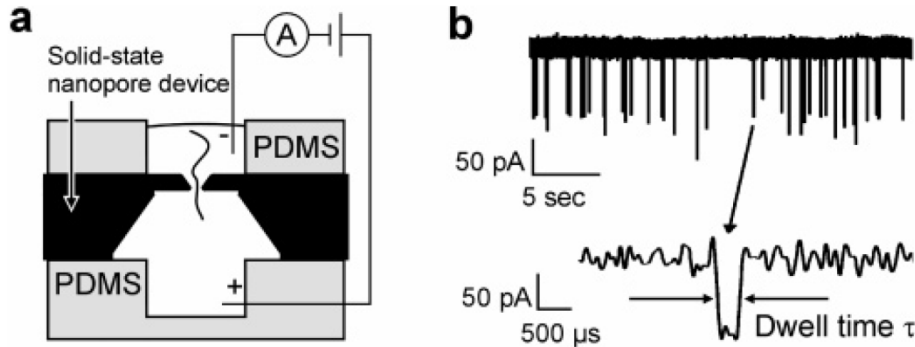
离子流下降幅度：差别不大 (<5%)
二嵌段共聚物：不容易通过 I_B 区分

Poly(dA)比Poly(dC)慢两倍，且为长尾分布。

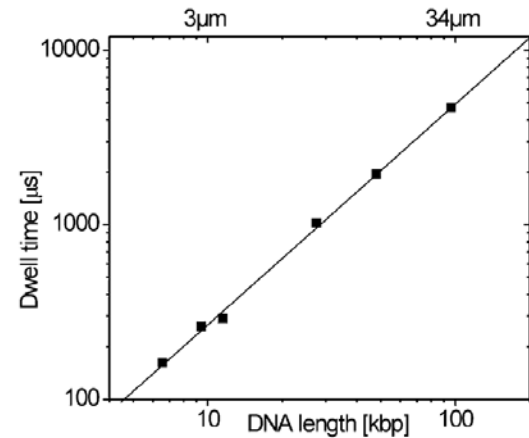
[A. Meller *et al.* PNAS, 97, 1079 (2000)]

2001年以后：固体孔

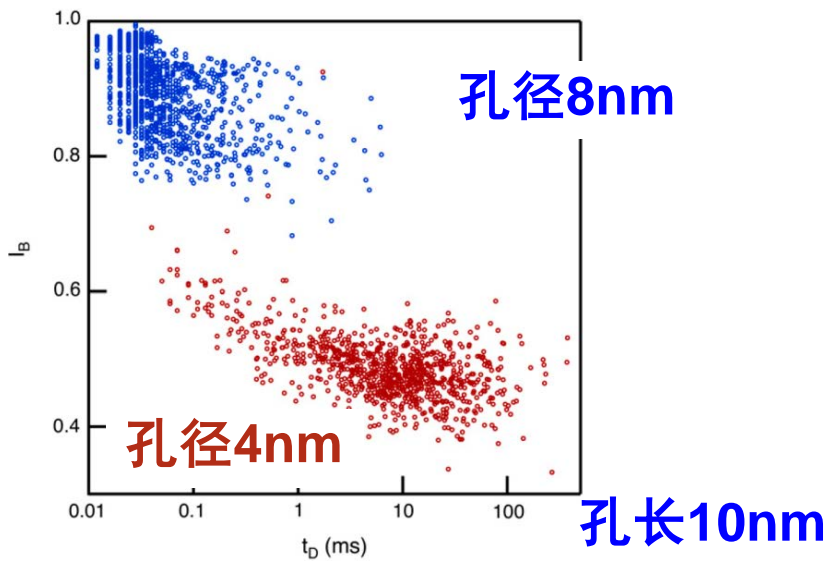
孔长20nm, 孔径10nm



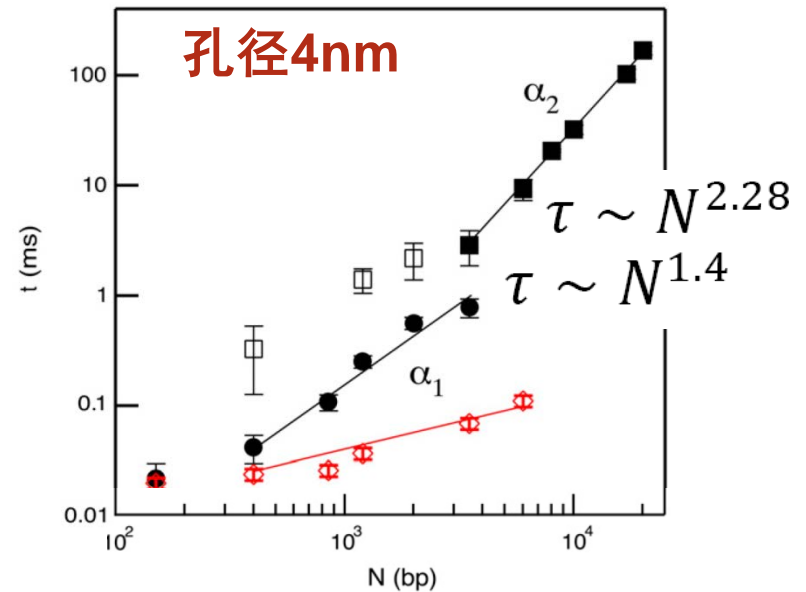
[C. Dekker et al. *Nano Lett.*, **5**, 1193 (2005)]



$$\tau \sim N^{1.27} = N^{2\nu}$$



[A. Meller et al. *Biophys. J.*, **97**, 1079 (2000)]



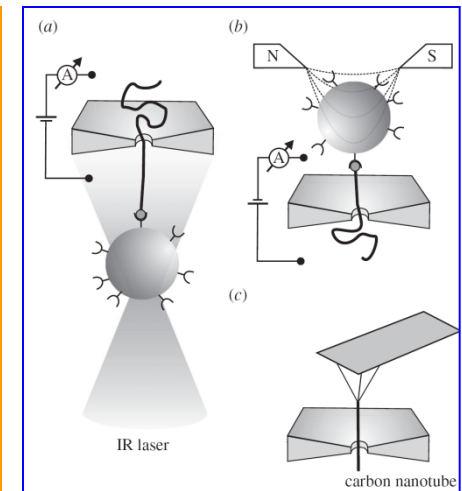
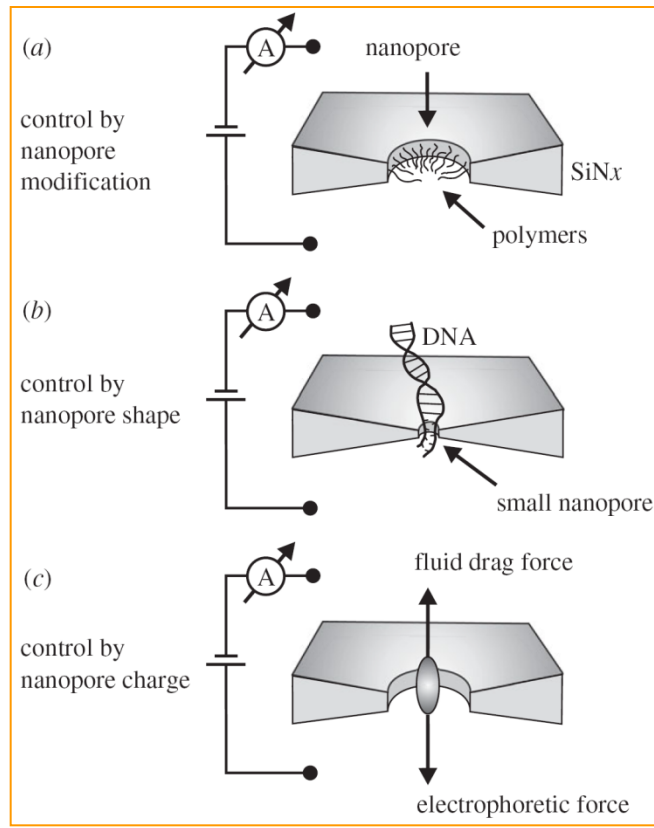
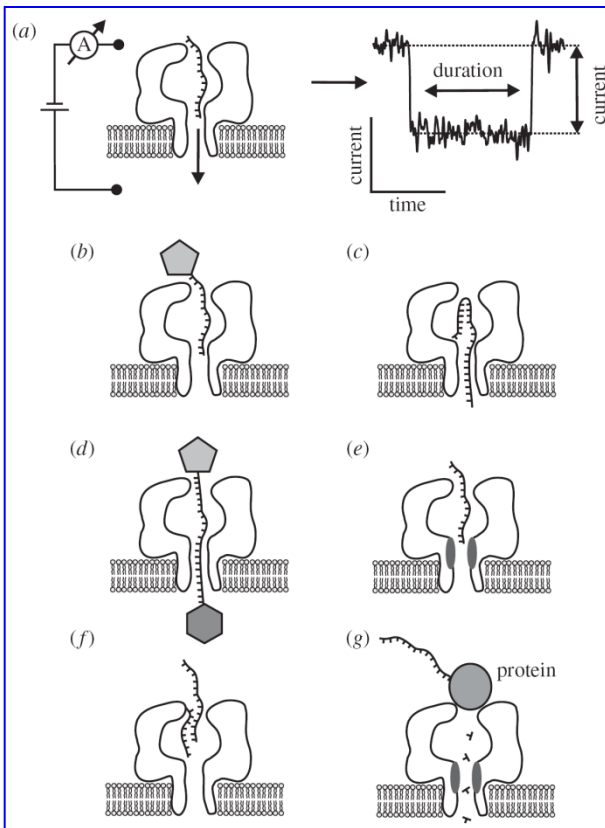
Base by base 检测存在的问题

- 离子流信号：孔长度依赖性，生物孔可容纳12个碱基
- DNA穿越速度太快 (微秒每个碱基)

生物分子和生物孔的修饰

固体孔的结构和修饰

力学控制



电压
溶液粘度

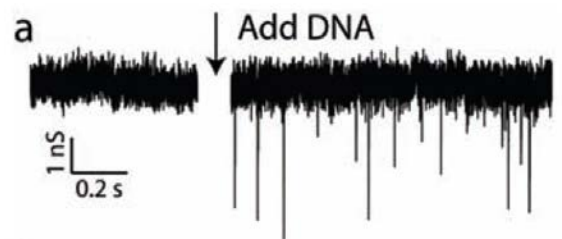
[U. F. Keyser, *J. R. Soc. Interface*, **8**, 1369 (2011)]

[B. Luan *et al.*, *Nanoscale*, **4**, 1068 (2012)]

2010年：石墨烯孔

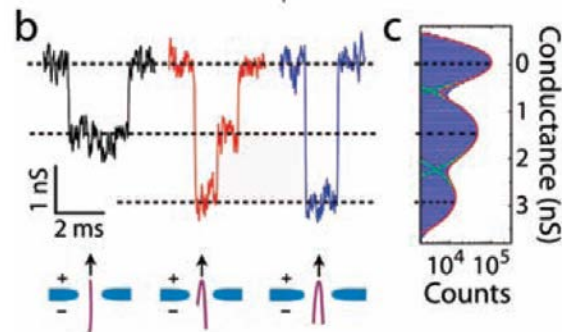
- M. Drndic: 孔厚1-5 nm, 孔径5-10 nm 离子流噪音大大增加

[C. A. Merchant *et al.*, *Nano Lett.*, **10**, 2915 (2010)]

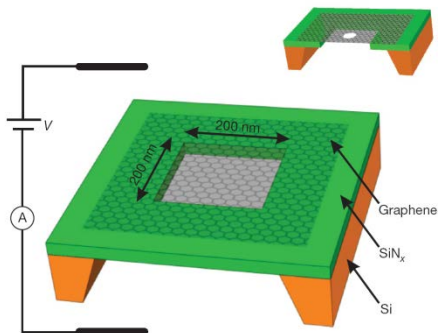


- C. Dekker: 石墨烯单层, 孔径22 nm

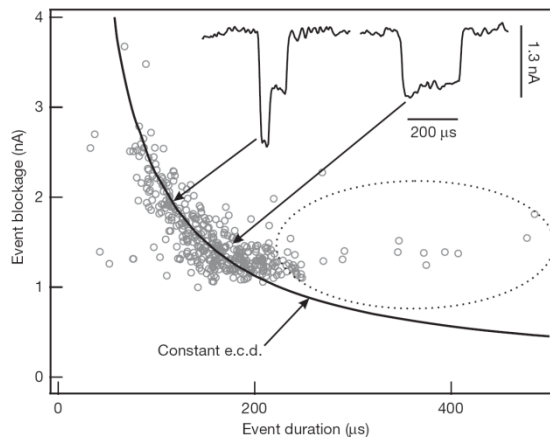
[G. F. Schneider *et al.*, *Nano Lett.*, **10**, 3163 (2010)]



- J. A. Golovchenko: 孔厚0.6-10 nm
孔径2.4-5 nm



[S. Garaj *et al.*, *Nature*, **467**, 190 (2010)]

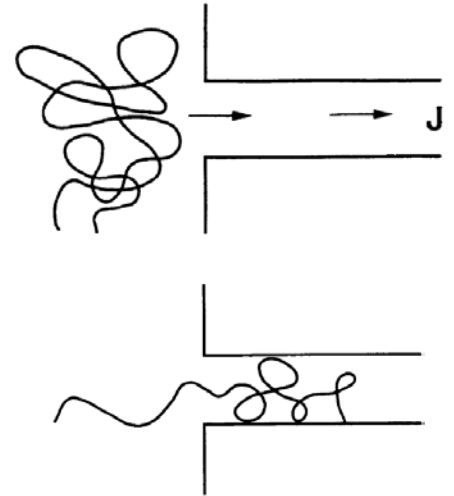
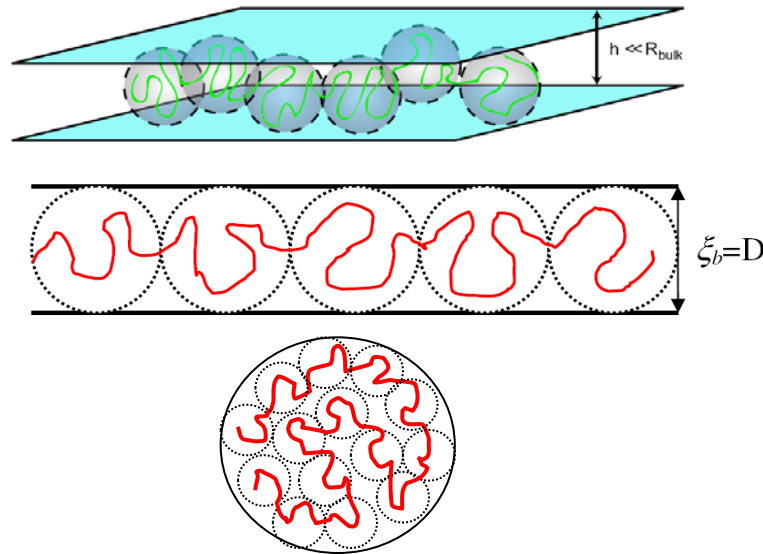


单链DNA更容易吸附在石墨烯上

三、理论与模拟研究

高分子穿越纳米孔是典型的非平衡态动力学问题

高分子在受限空间中的平衡链构象和非平衡态动力学



P. G. de Gennes
1991年诺贝尔物理学奖

M. Muthukumar, M. Kardar, A. Y. Grosberg,
K. Binder, J. F. Joanny, M. Rubinstein,
J. J. de Pablo, G. W. Slater

高分子穿越纳米孔中的理论问题

- **高分子穿越纳米孔的输运动力学还不清楚**

即便是对跨膜电场下穿越固体孔的输运动力学还有争议，其他驱动机理下的动力学还没有研究。

- **DNA与纳米孔之间的相互作用以及序列结构对运输过程的影响一直被忽略**

DNA或RNA穿越蛋白质孔与固体孔是否有差别；不同碱基的均聚物与不同碱基序列的共聚物穿越蛋白质孔出现差别的原因尚不清楚。

- **基于高分子理论来理解生命体系中的大分子运输问题还没有引起重视**

蛋白质通过膜通道是在分子伴侣辅助下完成，DNA在病毒衣壳里的组装是在分子马达作用下进入受限空间。

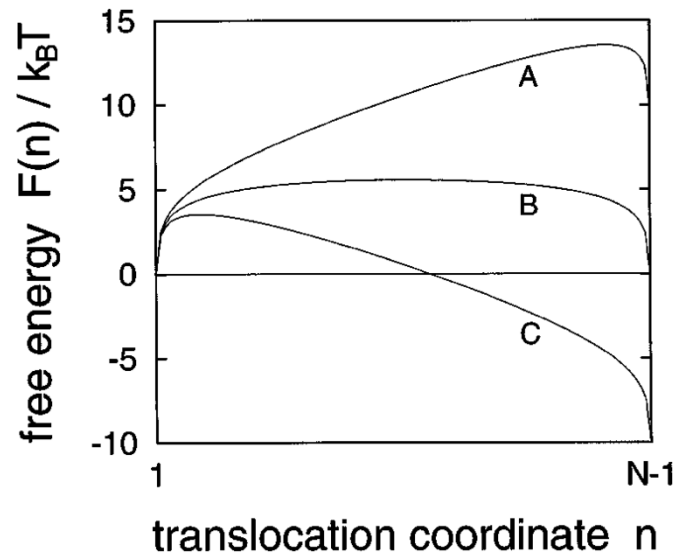
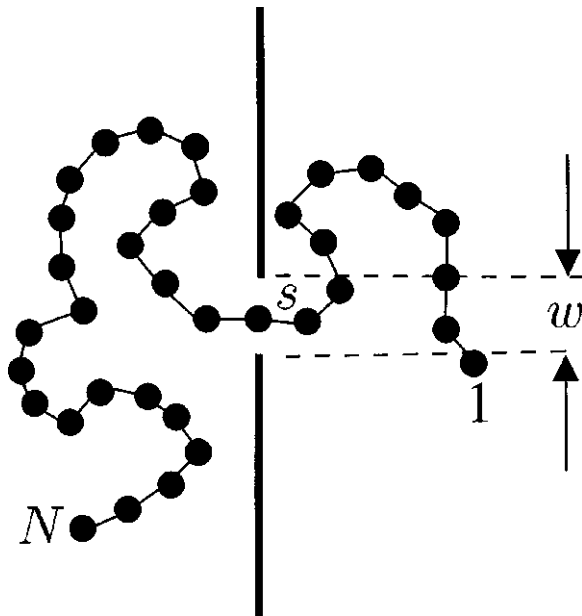
平衡自由能理论

[Sung & Park *PRL*, 77, 783 (1996); Muthukumar *JCP*, 111, 10371 (1999)]

假定:

- 无限长的Gaussian链(无排除体积效应)
- 无限薄的膜和窄的孔
- 考虑熵障碍, 忽略高分子与孔的相互作用
- 链处于准平衡态(跨膜运输非常慢)

穿越过程中链的自由能: $F(s) = (1-\gamma)k_B T \ln[(N-s)s] + s\Delta\mu$



平衡自由能理论

$$\frac{\partial p}{\partial t} + \frac{\partial j}{\partial s} = 0$$

$$j = -D \left(\frac{\partial p}{\partial s} + \frac{p}{k_B T} \frac{\partial F}{\partial s} \right)$$

Fokker-Planck 方程
Kramers' problem!

Sung (PRL, 77, 783, 1996)

Muthukumar (JCP, 111, 10371, 1999)

$D=1/N$

$$\tau_{trans} \sim N^2 / D$$

无外场

D 与 N 无关

$$\tau_{trans} \sim N^2$$

无外场：蛇形？

Rouse relaxation time:

$$\tau_{Rouse} \sim N^{2\nu+1} = N^{2.18}$$

Translocation time is less than the relaxation time of a free chain !!
(Chuang, Kantor, & Kardar, *PRE*, 65, 011802, 2002)

$$\tau_{trans} \sim N / D$$

外驱动场

$$\tau_{trans} \sim N$$

模拟方法

基于高分子bead-spring模型的 Langevin dynamics (LD)

[M. P. Allen, D. J. Tildesley, Computer Simulation of Liquid (Oxford Univ. Press, 1987)]

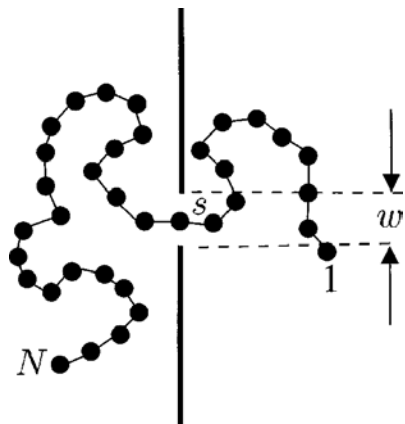
Equation of motion is given by

$$m\ddot{\mathbf{r}}_i = -\nabla(U_{\text{LJ}} + U_{\text{FENE}}) + \mathbf{F}_{\text{ext}} - \xi\mathbf{v}_i + \mathbf{F}_i^R$$

$$U_{\text{LJ}}(r) = 4\varepsilon\left[\left(\frac{\sigma}{r}\right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r}\right)^6\right] \quad \text{LJ势}$$

$$U_{\text{FENE}}(r) = -\frac{1}{2}kR_0^2 \ln(1 - r^2/R_0^2) \quad \text{FENE势}$$

$$\mathbf{F}_{\text{ext}} = F\hat{x}, \quad \text{外驱动力}$$



能量尺度 ε

长度尺度 σ

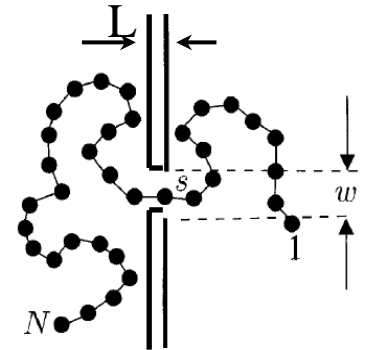
时间尺度 $t_{\text{LJ}} = (m\sigma^2 / \varepsilon)^{1/2}$

力的尺度 ε / σ

(一) 建立了输运时间与链长、驱动力、孔尺寸等参数之间的标度关系

利用理论解析与数值模拟验证相结合，研究了高分子在不同驱动机理下穿越纳米孔的输运动力学：

- 无外场
- 有外场
 - (1) 以恒力拉高分子链末端 (光镊, 带电或中性高分子)
 - (2) 流动场 (带电或中性高分子)
 - (3) 跨膜电场 (带电高分子如DNA等)



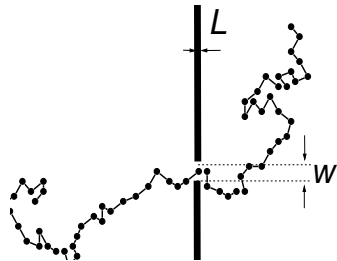
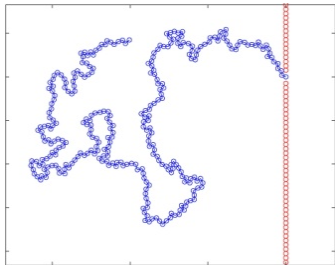
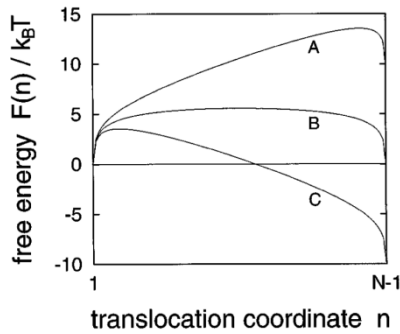
输运时间与链长的标度关系： $\tau \sim N^\alpha$

这里 α 为标度指数， N 为链长度。

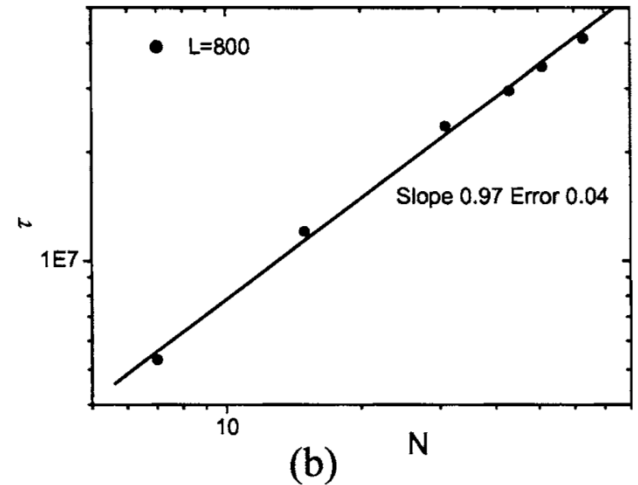
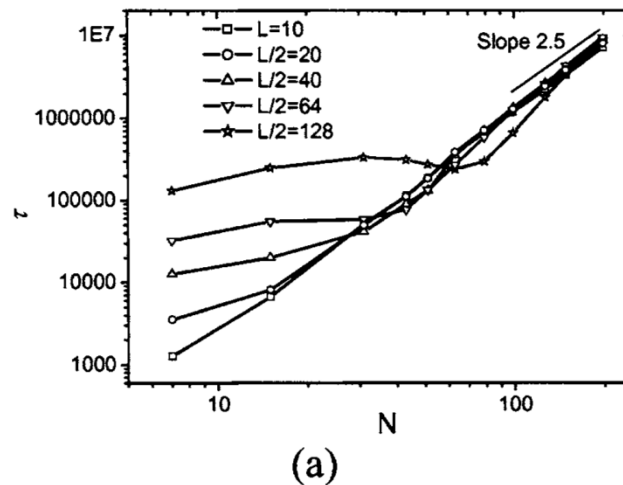
● 无外场作用下的跨膜运输时间

以前的理论用平衡自由能处理非平衡问题：要求 $\tau > \tau_r \sim N^{1+2\nu} = N^{2.18}$
 解Fokker-Planck方程所得结果： $\tau \sim N^2$ 。与假定不自洽

[M. Muthukumar *J. Chem. Phys.* 1999, 111, 10371]



推导的结果：
$$\tau \sim \frac{(R_g + L)^2}{D} = \begin{cases} N^{1+2\nu} & (L \ll R_g) \text{ 短孔} \\ NL^2 & (L \gg R_g) \text{ 长孔} \end{cases}$$



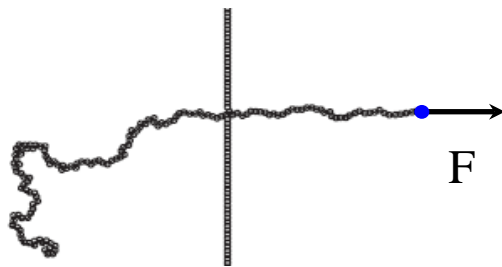
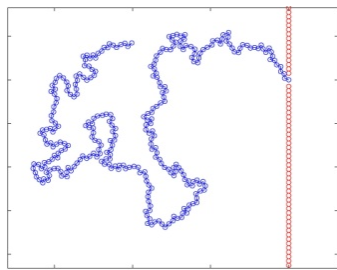
Luo* et al. *J. Chem. Phys.* 2006, 124, 034714

● 不同驱动机理下的输运时间

(1) 以恒力拉高分子链末端

预言三个动力学区：

$$\tau \sim \frac{L(F)}{v(F)} \sim \begin{cases} N^{1+2\nu} & (F < k_B T / N^\nu \sigma) \\ N^2 F^{1/\nu - 2} & (k_B T / N^\nu \sigma \leq F \leq k_B T / \sigma) \\ N^2 F^{-1} & (F > k_B T / \sigma) \end{cases}$$

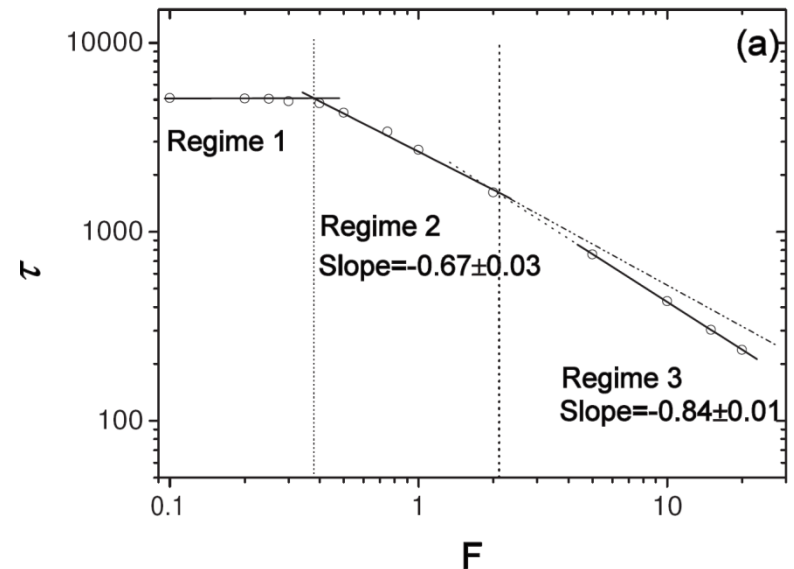


$$L(F) = R \phi\left(\frac{R}{\zeta}\right) \quad \zeta = k_B T / F$$

← $L(F) \sim N^{2\nu} \sigma \frac{F \sigma}{k_B T}$

← $L(F) \sim N \sigma \left(\frac{F \sigma}{k_B T}\right)^{(1/\nu)-1}$

← $L(F) \sim N \sigma$



...Luo* et al. Phys. Rev. E 2007, 75, 061912

(2) 流场作用下的高分子输运

✓ 推导了大分子完全进入长纳米通道的时间:

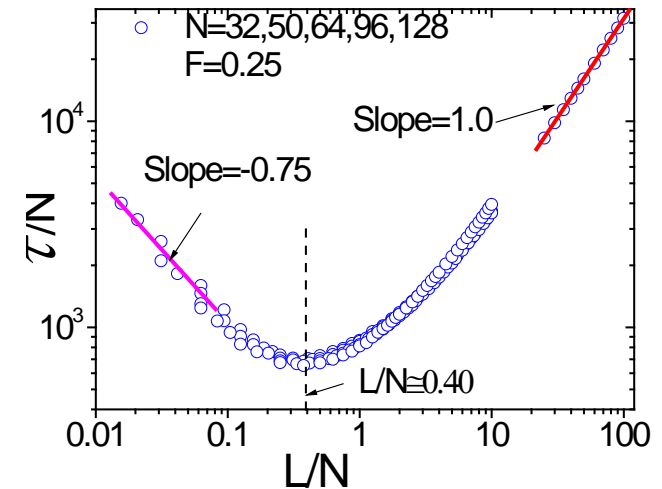
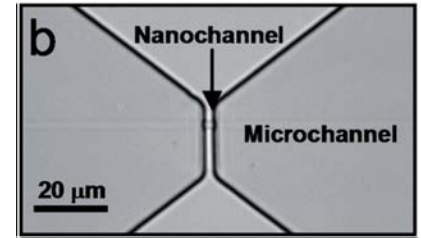
$$CR^{-1/3}\xi s(t)\frac{ds(t)}{dt} = s(t)F \longrightarrow \tau \sim \frac{N}{F}R^{-\frac{1}{3}}$$

*Luo** et al. *J. Chem. Phys.* 2011, 134, 135102

✓ 预言大分子穿越不同长度纳米通道的时间:

$$\tau \sim \frac{R_g + L}{v} = \begin{cases} N^{1+\nu} & (L \ll R_g) \\ L & (L \gg R_g) \end{cases}$$

... *Luo** *Soft Matter* 2012, 8, 2769



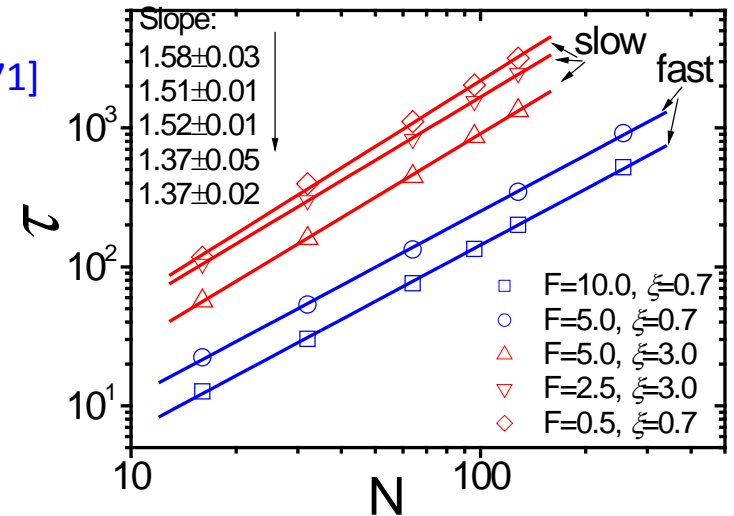
(3) 跨膜电场作用下的运输时间

以前的理论利用了高分子在平衡态的自由能，
理论结果 $\tau \sim N$ 与实验结果不符合。

[M. Muthukumar J. Chem. Phys. 1999, 111, 10371]

我们预言的结果：

$$\tau \sim \begin{cases} \frac{R_g}{v} = N^{1+\nu} & \text{慢动力学} \\ N^{2\nu} & \text{快动力学} \end{cases}$$



Luo* et al. J. Chem. Phys. 2006, 124, 114704; 2007, 126, 145101

Luo et al. Phys. Rev. E 2008, 78, 050901(R)

Luo* et al. Phys. Rev. E 2009, 80, 021907

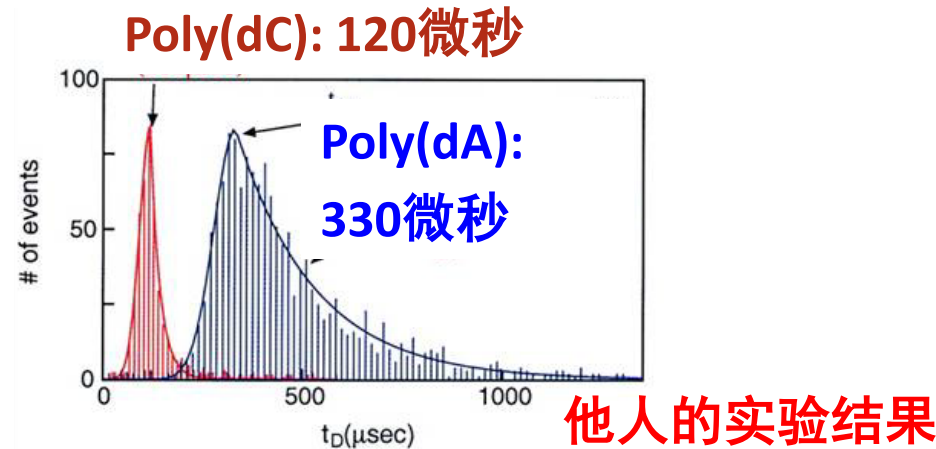
Luo* et al. Europhys. Lett. 2009, 88, 68006

...**Luo*** et al. J. Chem. Phys. 2006, 125, 124901

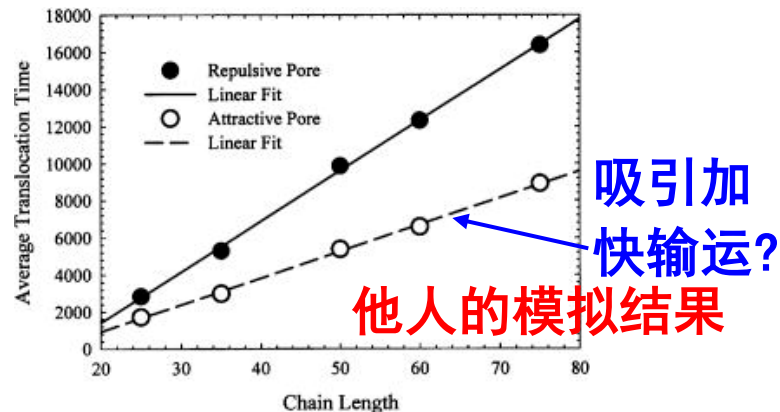
创新点：建立了不同驱动机理下跨膜运输时间与大分子链长度等相关参数之间的标度关系。

(二) 揭示了大分子与纳米孔之间的相互作用以及序列结构对运输过程的影响

(1) 大分子与纳米孔之间的相互作用对运输过程的影响

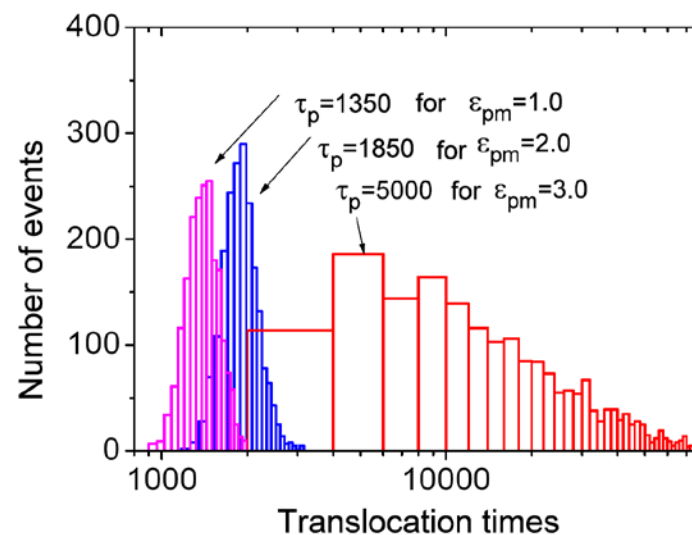
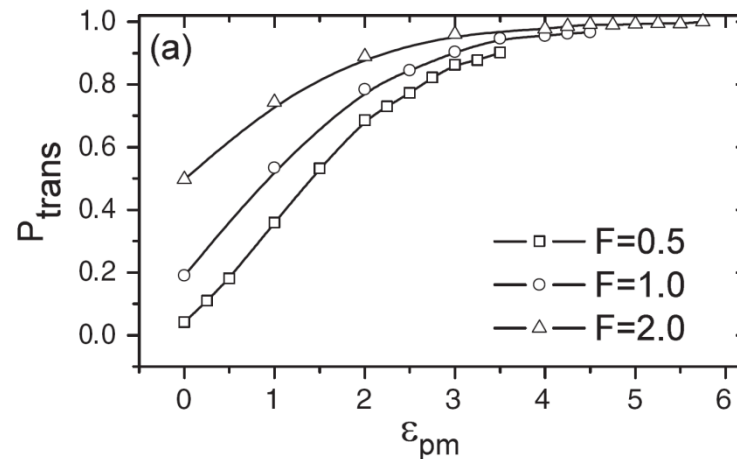
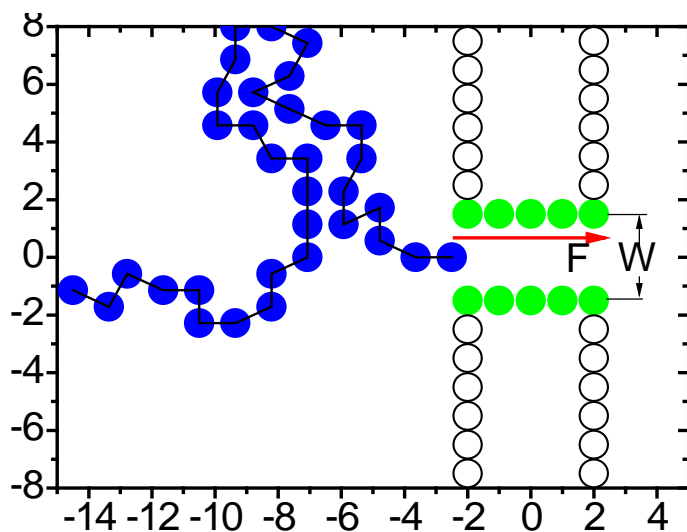


[D. Branton et al. *PNAS* 2000, 97, 1079]

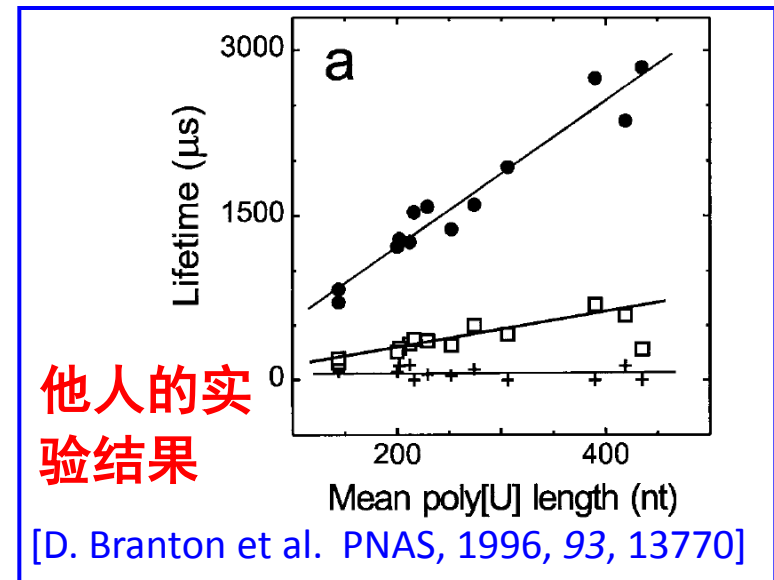
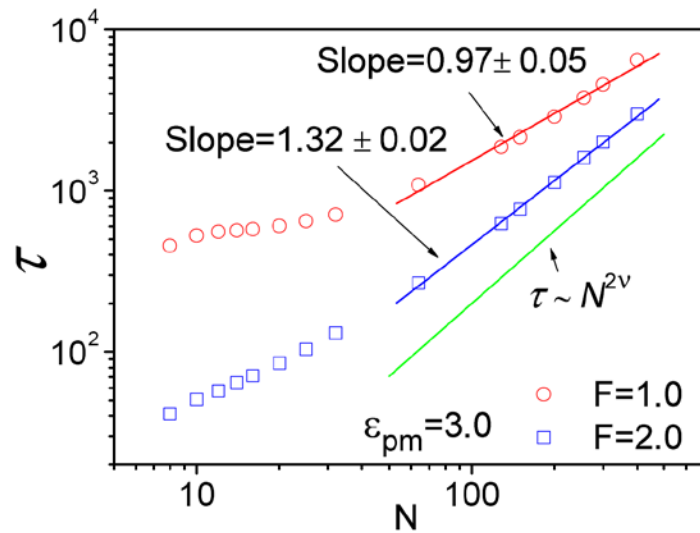


[G. D. Smith et al. *J. Chem. Phys.* 2003, 119, 11475]

(1) 大分子与纳米孔之间的相互作用对运输过程的影响



(1) 大分子与纳米孔之间的相互作用对运输过程的影响



创新点:

- (1) 碱基A与纳米孔之间的相互作用比C强，导致穿越时间变慢且分布变宽，解释了穿越蛋白质孔时Poly(dA)₁₀₀与Poly(dC)₁₀₀的差别。
- (2) 澄清了文献上认为吸引相互作用导致运输加快的错误认识。
- (3) 碱基与蛋白质孔之间的相互作用强，导致运输时间与链长成正比，解释了DNA穿越生物孔的实验结果。

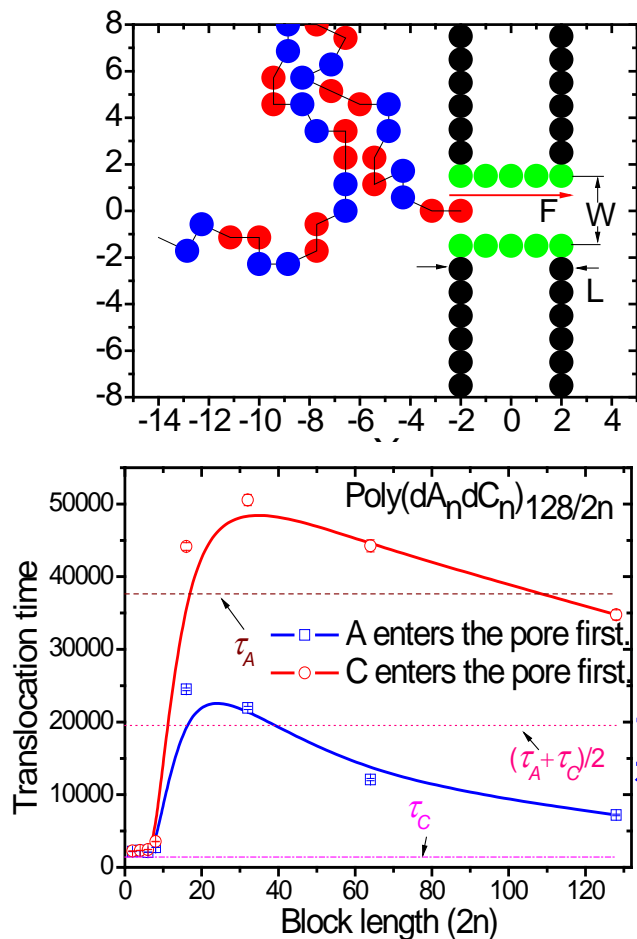
Luo* et al. *Phys. Rev. Lett.* 2007, 99, 148102

Luo* et al. *Phys. Rev. E* 2008, 78, 061918

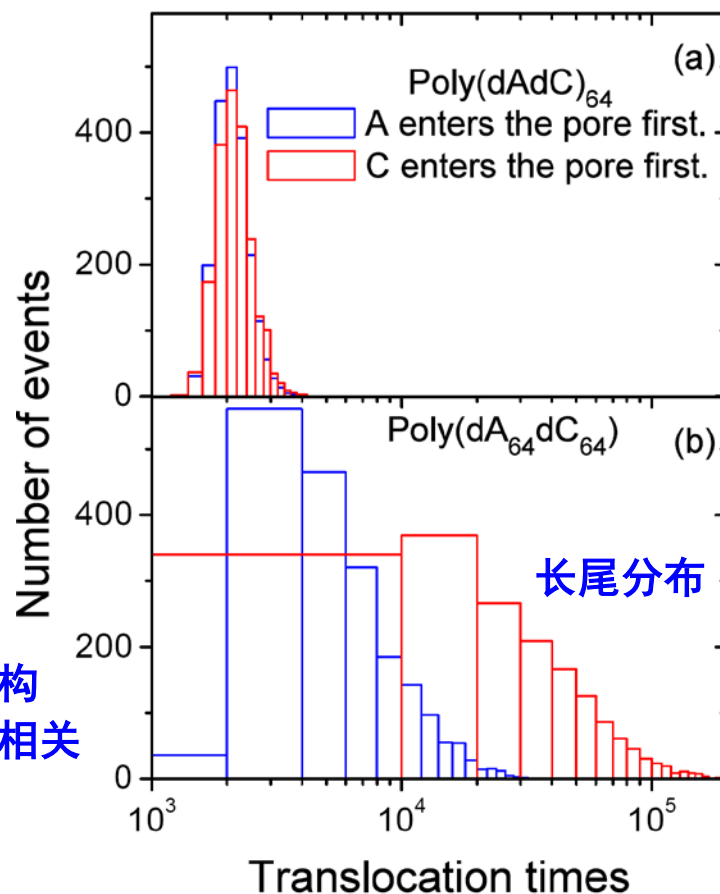
(2) DNA序列结构对跨膜输运动力学影响

他人的实验结果：**Poly(dA₅₀dC₅₀)** 比 **Poly(dAdC)₅₀** 穿越时间更长且呈长尾分布 [D. Branton *et al.* *PNAS* 2000, 97, 1097]

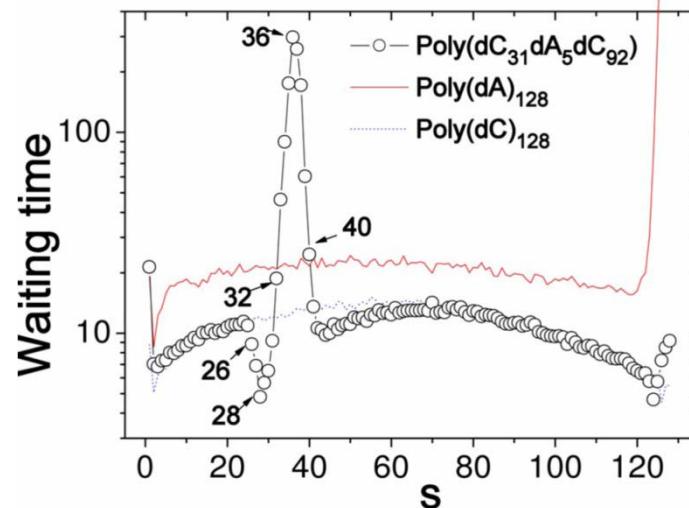
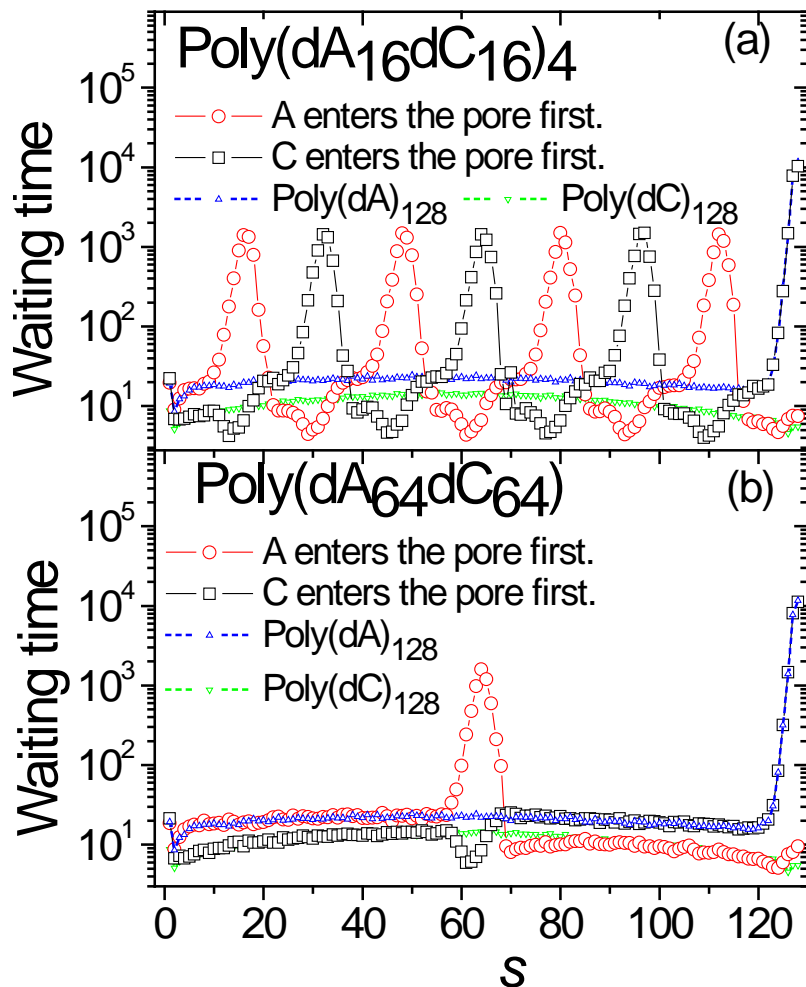
我的研究目标：**Poly(dA_ndC_n)_{128/2n}** 固定DNA长度，改变碱基序列



与序列结构
和链取向相关



预言通过测量相邻两个碱基通过纳米孔的时间间隔的分布可以读出特定DNA的序列



创新点:

- 1) 大分子穿越纳米孔的运输时间与DNA的序列结构和链取向有关，解释了实验现象。
- 2) 预言通过测量相邻两个碱基通过纳米孔的时间间隔的分布可以读出DNA序列。

Luo* et al. Phys. Rev. Lett. 2008, 100, 058101

Luo* et al. Phys. Rev. E 2008, 78, 061911

(三) 阐明了分子伴侣辅助下的跨膜输运动力学

蛋白质通过膜通道是在分子伴侣辅助下完成的
以前的理论把蛋白质粗粒化成刚性棒的处理不合理

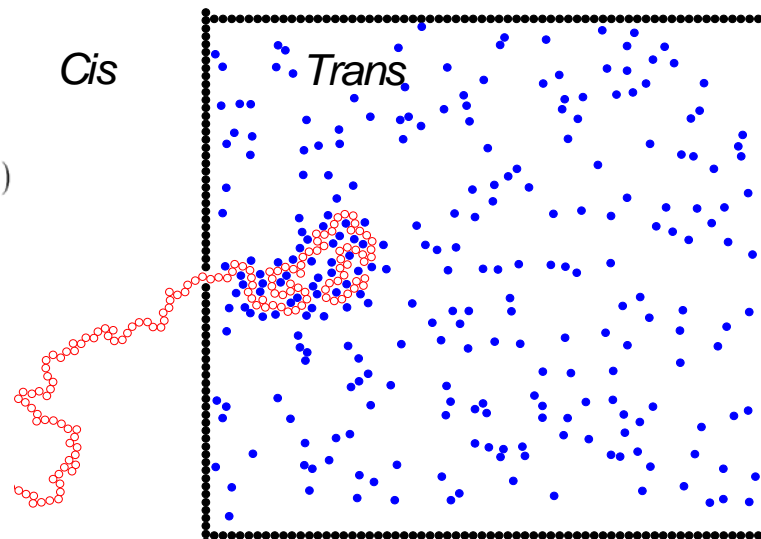
理论分析：有效驱动力

$$F_{driving} = F_{bind}(s, c_0, \varepsilon) - F_{trans,e}(s, c_0, \varepsilon) - F_{cis,e}(s)$$

$$F_{bind}(s) = \ln \left[1 + c_0 v_0 \exp \left(\frac{\varepsilon}{k_B T} \right) \right]$$

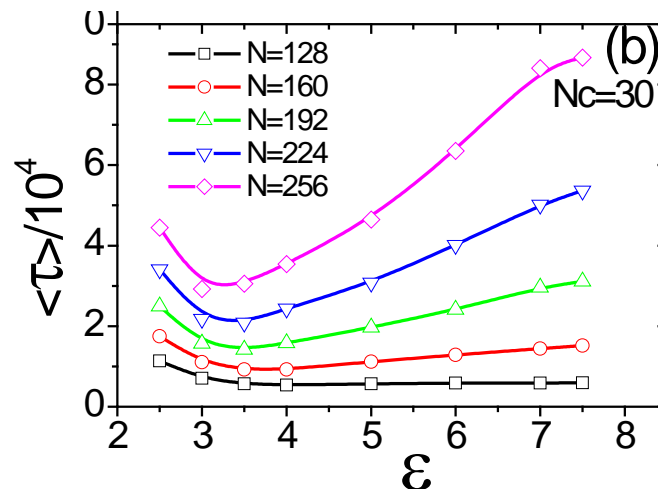
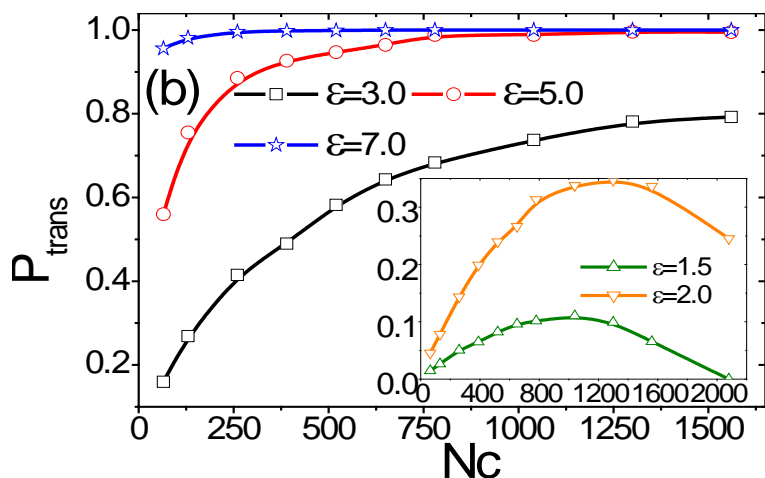
$$c_0 \uparrow \text{ or } \varepsilon \uparrow, F_{bind}(s, c_0, \varepsilon) \uparrow$$
$$F_{trans,e}(s, c_0, \varepsilon) \uparrow$$

对于柔性链，熵抵抗力重要



分子伴侣作用下链更容易折叠

模拟结果证实理论分析



创新点:

- 1) 考虑链的柔顺性是非常必要的, 分子伴侣作用下链更容易折叠。
- 2) 较低的结合强度下, 运输成功率随分子伴侣浓度增加出现最大值。
(分子拥挤效应因素)
- 3) 较低分子伴侣浓度下, 运输时间随结合强度的增加出现最小值。
(不可逆结合因素)

结论

- ◆ 建立了跨膜运输时间与链长、驱动力、孔尺寸等参数之间的标度关系，预言了实验结果。
- ◆ 揭示了大分子与纳米孔之间的相互作用以及序列结构对跨膜输过程的影响，解释了实验现象，澄清了文献上的错误报道。
- ◆ 阐明了分子伴侣辅助下的跨膜输运动力学，对理解蛋白质通过膜通道具有重要意义。

感谢各位！

恳请批评指正！