

分子生物力学研究方法与技术

龙勉

(中国科学院力学研究所)

1 前言

随着结构生物学、蛋白质组学的迅猛发展,对蛋白质功能定量化研究的需求日益增加;而力学、物理、化学、数学等基础学科的介入,为进一步定量认识蛋白质结构-功能关系提供了新概念、新方法和新技术,形成了分子生物力学研究的动力和源泉。分子生物力学研究生物大分子的力学-生物学和力学-化学耦合规律,其主要内容包括生物大分子间特异性相互作用的定量测定,受体-配体、抗体-抗原结合与解离的反应动力学,蛋白质组装动力学,作用力对蛋白质间相互作用的调控等。

生物大分子间反应动力学行为可分为游离分子的三维反应和锚定分子的二维反应。三维反应是指两种特异性相互作用的分子至少有一种在溶液中处于游离态、具有空间三维运动自由度(如血液中血浆蛋白和抗体),因而易于与另一种分子发生相互作用,并通过自由调整其空间构象、形成几何匹配的分子复合物;所反映的是大量分子的统计平均性质,通常可用确定性的化学反应动力学来描述。二维反应是指两种特异性相互作用的分子均分别被锚定在两个表面上,具有沿表面横向扩散的二维运动自由度、但缺乏沿垂直于表面法向运动的自由度(如白细胞或内皮细胞表面的选择素-配体、整合素-配体);所反映的是有限数目分子反应的随机动力学行为;同时,所形成的分子复合物提供了两表面间的物理连接,其反应动力学行为和结合与解离动力学受到外力及其它物理因素的影响。当前,分子生物力学研究的重点正是考察分子间二维反应动力学行为及其受外力及物理因素的调控规律。由于基于分子间三维相互作用的传统确定性化学反应动力学理论不再适用,分子间二维相互作用的分子生物力学研究需要新的理论、模型、方法和技术。本文拟从分子生物力学研究的代表性方法与技术入手,着重介绍其基本原理及其在定量测定分子间二维相互作用中的应用。

2 微管吸吮技术

2.1 基本原理

微管吸吮技术(Micropipette Aspiration Technique, MAT)早期被应用于细胞生物力学研究,即

通过测量一定负压作用下细胞变形动力学过程、考察细胞力学和粘弹性性质。近二十年来微管吸吮技术逐渐拓展到分子生物力学研究领域,其工作原理是采用微管吸吮方法捕获分别表征特异性相互作用分子的细胞或小球,通过压电晶体驱动器操控微管、实现两细胞或小球间靠近-接触-回拉的动力学循环,记录回拉过程中细胞变形与否(或小球运动速度改变)和解离时间长短来研究分子间相互作用的动力学性质。

微管吸吮技术的主要研究方法包括基于分子间反应动力学参数测定的微管粘附频率方法(Micropipette Adhesion Frequency Assay, MAFA)和基于分子键断裂力和寿命测定的生物膜力探针方法(Biomembrane Force Probe, BFP)。在微管粘附频率方法中,两种特异性相互作用分子分别表征于红细胞和其它细胞或小球表面,在控制分子密度(m_r, m_l)和细胞接触面积(A_c)条件下系统测量细胞间粘附频率 P_a (以回拉过程中红细胞变形与否作为判断分子间粘附是否发生的标准)随接触时间 t 的变化规律,并通过基于二维反应动力学理论的小系统概率动力学模型拟合实验数据、从而获得无外力下分子间负反应率 k_r^0 和反应亲和性 K_a^0 :

$$P_a = 1 - \exp[-A_c m_r m_l K_a^0 (1 - e^{-k_r^0 t})] \quad (2.1)$$

在生物膜力探针方法中,首先将一种分子表征于小球表面、并将其与已被微管吸吮的红细胞进行组装,然后操控微管与表征另一种分子的其它细胞或小球实现其结合与分离过程,在控制加载率或作用力条件下分别测量分子键断裂力或寿命、获得加载率-断裂力谱和作用力-寿命谱,通过动力学力谱理论和力学-化学耦合理论拟合实验数据、从而得到无外力下分子间负反应率 k_r^0 (参见第二节)。需要指出的是,上述两种方法可以相互替换,具体应用可视研究目的、分子体系、载体性质等进行选择。

2.2 方法实现

与用于细胞力学和粘弹性研究的实验系统相似,分子生物力学研究的微管吸吮系统主要由显微操控单元、压力控制单元和视频图像采集单元等部分组成。其中显微操控单元主要由吸吮表征目标分子的细胞或小球的微管、控制微管运动的压电晶体驱动器及相应控制软件构成,压力控制单元主要由调控微管管口与贮水瓶间水位差的运动部件、量化水位差的数码显示器构成,视频图像采集单元主要由记录分子间相互作用实时图像的电荷耦合器件(CCD)与录像机、实现图像后处理和分析的相应软件构成。

采用微管吸吮技术实现分子生物力学研究的关键在于生物学体系的合理构建。在分子表征方面,除利用固有表达于细胞表面的分子外,纯化蛋白质可采用 CrCl_3 化学包被、物理吸附、生物素-亲和素耦联等方式直接或间接(通过其捕获抗体耦合)表征于(红)细胞或小球表面;需要注意的

是分子取向、长度、作用位点显著影响分子间相互作用的动力学特征。在载体选择方面,除分子固有表达的细胞外,红细胞因其表面光滑、易变形等特点成为分子表征的重要候选细胞,聚苯乙烯小球和玻璃小球也因其表面无其它分子干扰的特点常被选为候选载体;需要注意的是载体的刚度和粗糙度明显影响分子间相互作用的动力学特征。在方法建立方面,合理控制表面分子密度是保证粘附频率灵敏度、满足断裂力和寿命测试中单个分子键假设的重要前提,细胞或载体接触面积(尽管难以直接测量)应尽可能控制一致。

2.3 应用范围与局限性

微管吸吮技术在分子生物力学领域中具有广泛应用。微管粘附频率方法主要应用于认识表面表征的受体-配体间二维反应动力学规律,通过量化其反应动力学参数研究分子结构(分子取向与长度、载体刚度与表面拓扑结构、氨基酸变异等)影响其相互作用的机制。生物膜离探针方法主要应用于考察外力对受体-配体、抗体-抗原间结合与解离动力学规律,通过分子键断裂力谱和寿命谱量化外力和物理因素(加载率、靠近速度、接触时间等)调控分子间相互作用规律及其内在的物理机制。微管吸吮技术的优势不仅在于可直观观察粘附事件的发生,而且每次粘附事件均可控(即可以精确控制两个细胞或小球在什么时候开始接触,什么时候开始分离,以及用多大的力去接触等);同时,与小系统随机动力学理论、动力学力谱理论和力学-化学耦合理论相结合,可获到无外力下分子间相互作用的正/负反应速率和反应亲和性,以及断裂力谱和寿命谱等更加全面反映其反应动力学行为的多重信息,而传统三维反应动力学检测技术(如基于表面等离子共振技术的生物传感器)则难以达到的。其主要局限性在于通量低、每次只能实现单对细胞检测,且由于受单对细胞测试周期较长、体外难以长时间维持细胞功能状态的限制,难于获得大样本的统计数据。

3 原子力显微技术

3.1 基本原理

原子力显微技术(Atomic Force Microscopy, AFM)是在扫描隧道显微技术(Scanner Tunnel Microscope, STM)基础上发展而来的。与扫描隧道显微技术相比,其主要优势是利用原子间范德华相互作用而不是电子隧道效应、使待测样品不再局限于导电材料,从而具备更广阔的应用空间。其基本原理是将特异性相互作用的两种分子分别表征于微悬臂梁探针和样品池底板表面,通过压电晶体驱动器驱动探针(或底板)实现两表面间靠近-接触-回拉的动力学循环,记录回拉过程中探针挠度改变和解离时间长短来研究分子间相互作用的动力学性质。

作为一种重要的单分子测量技术,原子力显微技术主要有两种加载模式:一是寿命模式(Lifetime Mode),即施加在分子键上的外力为恒值(亦称为恒力模式);二是断裂力模式(Rupture Force Mode),

即施加在分子键上的加载率为恒值、外力随时间匀速增加（又称为恒加载率模式）。

在寿命模式中，通过对单个分子键施加恒定外力 f ，可测量外力 f 作用下分子键的寿命，其倒数即为外力 f 下分子间的负反应率 $k_r(f)$ 。分子间结合与解离的随机性质决定了即便在同一外力作用下分子键寿命表现表现为一个分布谱而非确定值，在该外力下分子间负反应率 $k_r(f)$ 需要通过一阶不可逆动力学分析获得。系统改变给定外力值可获得分子间负反应率 $k_r(f)$ 随外力 f 的变化关系，通过将实验数据与分子键力学-化学耦合模型比较，

$$\text{理想键} \quad k_r(f) = k_r^0 \quad (3.1)$$

$$\text{滑移键} \quad k_r(f) = k_r^0 \exp[\alpha f / (k_B T)] \quad (3.2)$$

$$\text{逆锁键} \quad k_r(f) = k_r^0 \exp[-\alpha f / (k_B T)] \quad (3.3)$$

不仅可确定特定分子体系的力学-化学耦合关系，而且可获得无外力下分子间负反应率 k_r^0 。这里 α 为势垒宽度， k_B 为玻尔兹曼常数， T 为绝对温度。

在断裂力模式中，通过对单个分子键施加恒加载率 r_f 的外力 f ，可测量分子键断裂时的临界外力。分子间结合与解离的随机性质决定了即便在同一加载率下分子键断裂力表现为一个分布谱而非确定值，在该加载率下分子键最可几断裂力 f_m 需要通过一阶不可逆动力学分析获得，系统改变给定加载率值可获得分子间分子键最可几断裂力 f_m 随加载率 r_f 的变化关系。若分子键力学-化学耦合关系满足“滑移键”假设（公式（2.2）），则通过将实验数据与分子键动力学力谱（Dynamic Force Spectroscopy, DFS）模型比较，

$$r_f^{-1} = \sum_{i=1}^N [(k_i^0 k_B T / a_i) \exp(a_i f_m / k_B T)]^{-1} \quad (3.4)$$

可获得解离过程中对应于不同势垒的势垒宽度 a_i 和无外力下负反应率 k_i^0 。一个不依赖于“滑移键”假设的理论是利用外力 f 作用下分子键断裂概率函数 $P_c(f)$ 和概率密度函数 $P_d(f)$ ：

$$k_r(f) = r_f P_d(f) [1 - P_c(f)] \quad (3.5)$$

3.2 方法实现

原子力显微系统主要由微悬臂梁探针及其操控单元、样品池及其操控单元和光学位移检测单元等部分组成。其中微悬臂梁探针及其操控单元主要由功能化表征一种分子的弹性微悬臂梁和压电晶体驱动器构成，样品池及其操控单元主要由功能化表征另一种分子的底板和压电晶体驱动器构成，光学位移检测单元主要由光源、四象限探测器等构成。

原子力显微技术具有表面形貌扫描和力曲线测定两种功能。当压电晶体驱动器驱动样品池（或微悬臂梁）与微悬臂梁（或样品池）靠近、接触时，分子间特异性相互作用导致微悬臂梁发生形变，

从而使经由微悬臂梁背面反射的激光束方向发生改变。通过四象限探测器检测反射激光束信号可得到变形量，其与微悬臂梁弹性系数的乘积即为分子间作用力值。对于形貌扫描，反馈回路将测得的变形信号和给定的扫描判据相比较并修正微悬臂梁的运动，从而通过微悬臂梁的空间轨迹来反映表面的形貌信息。对于力曲线测定，则是通过样品与微悬臂梁间重复的靠近-接触-回拉动力学循环，获得分子间相互作用的动力学信息。正如第一节指出一样，分子在载体表面的功能化表征是原子力显微技术应用于生物学体系的关键，同时控制分子密度降低粘附频率是保证单个分子键的前提。

3.3 应用范围与局限性

应用原子力显微技术可开展不同生物大分子间(如生物素-亲和素、抗体-抗原、受体-配体、DNA-蛋白质等)相互作用的研究。作为分子生物力学研究的一种主要实验技术，其优势在于：1、空间精度高(可达亚纳米尺度)，可提供准确空间定位和保证实验可重复性；测力范围宽(可达 $\sim 10^1$ - 10^5 pN 量级； $1 \text{ pN} = 10^{-12} \text{ N}$)，适用于不同作用强度的分子体系；2、可独立、定量控制分子间相互作用的接触速率、接触时间、分离速率以及接触力大小，从而避免不同物理因素对分子间反应动力学的耦合影响；3、通常采用纯化蛋白质开展研究，可减少细胞表面非特异性相互作用的干扰。其局限性则主要表现为：1、难以测量分子间低结合强度($< 10^1 \text{ pN}$)的相互作用；2、蛋白质纯化和功能化表征过程相对烦琐，且纯化蛋白质的生物力学性质有别于固有表达于细胞膜的蛋白质。

4 光镊操控技术

4.1 基本原理

光镊是利用光与物体间动量传递引起的光力学效应实现对物体的操控。它不仅具有夹持和操纵微小物体的功能，而且与传统机械镊子相比，它是以一种非机械接触方式完成操控功能，故称为光镊或光阱。光镊产生的 pN 量级作用力适合于研究生物细胞、亚细胞以及生物大分子的力学性质，迄今已实现了对微米尺寸活细胞/细胞器的固定与分选、细胞融合的操控等应用，近年来开始被应用于 pN 和亚 pN 量级微小力的测量，从而成为研究纳米尺度生物大分子间相互作用的一种重要单分子测试技术。

光作为一种电磁波，在传送能量的同时也传送动量，因而可对被照射的物体施加一定的作用力。以折射率大于周围媒质的透明电介质小球为例，当一束光穿过小球时，根据几何光学可知光线在进入和穿出小球时其传播方向发生改变，从而导致光动量发生改变。根据动量守恒定律，光线传播方向的改变可施加给小球一个动量变化值相等、但方向相反的作用力。当小球处于具有强度分布的梯度光场时，小球在光场中可获得一个指向光最强处的合力。因此，光镊可作为一种力传感器，用于测定表征于小球表面的生物大分子间的定量相互作用(如分子键断裂力和寿命、正/负反应速率和反

应亲和性等)。

4.2 方法实现

光镊实验系统主要由激光光源、显微镜、移动载物台、光学耦合光路以及探测单元等部分组成。激光从激光器输出,通过扩束整形后经外荧光通道耦合进入显微镜,充满物镜后瞳,并由物镜聚焦在样品池中形成光镊。采用 CCD 光能重心提取、四象限探测器、光学相干装置等方法可实现精确的位移测定,从而使光镊从简单的操控装置发展成为可精确测量纳米尺度位移和 pN 量级作用力的测量装置。相比较而言,CCD 光能重心提取法原理简单、容易实现,可以达到纳米尺度位移测量精度,但其时间分辨率受 CCD 采样频率限制;而四象限探测器和光学相干装置则可获得高时空分辨率的位移信号。

在高斯光场形成的轴对称圆锥光束中,接近于光轴的光线可以看作平面波,平面波对梯度力的贡献很小。当一个比光斑尺寸小的小球置于光束中心时,可视为一束平行光线,此时小球所受到的作用力为推力,即小球将沿光线传播方向被辐射压力推出焦点外。因此,对于尺寸小于光波波长的生物分子,光镊是无法对其进行直接操控的。通常的做法是用微米尺度的二氧化硅或聚苯乙烯小球作为光阱施加作用力的“手柄”,将采用物理吸附或化学耦联方法将蛋白质分子表征于小球表面,通过测量小球运动测定分子间是否发生相互作用以及分子复合物的受力状况。

光镊刚度系数 k 的标定是应用光镊操控技术准确测量作用力的前提,对光镊刚度系数的标定实际上是对光镊施加于小球的外力和小球受外力后在光镊中平衡位置的标定。光镊刚度系数标定的常用方法有三种:粘滞力法、功率谱法和能量均分法。粘滞力法是基于小球运动的临界粘滞力与光镊施加的外力间保持平衡、通过测量克服小球粘滞力所需最大速度获得光镊刚度系数。由于小球运动雷诺数为 $\sim 10^{-5}$ 、惯性项可忽略,根据 Stokes 公式和力平衡关系可标定光镊刚度系数,

$$F = 6\pi\eta a v \quad (4.1)$$

其中 η 是流体粘性, a 是小球半径, v 是流体速度。功率谱法和能量均分法可以统称为布朗运动法 (Brownian motion method): 布朗运动法假设光阱为简谐势阱,小球在弱光阱中作随机布朗振动,在 x - y 平面位移满足高斯分布。功率谱方法采用位移函数 $x(t)$ 的功率谱密度函数 $S_x(f)$ 可得到光镊刚度系数,

$$S_x(f) = \frac{k_B T}{\gamma \pi^2 (f_c^2 + f^2)} \quad (4.2)$$

其中 $f_c = \frac{\kappa}{2\pi\gamma}$, $\gamma = 3\pi\eta d$, d 为小球直径。能量均分法基于在温度为 T 平衡态、物质分子(颗粒)的每个自由度都有相同的平均动能、其大小等于 $k_B T/2$ (k_B 为 Boltzman 常数)的原理,在不考虑小球转

动的情况下, 小球在 x - y 平面内的动能可表述为,

$$\frac{1}{2}k(\langle x \rangle^2 + \langle y \rangle^2) = 2 \cdot \frac{1}{2}k_B T \quad (4.3)$$

其中 $\langle \bullet \rangle$ 表示最可几位移。由于光镊刚度系数不仅与光源强度以及光束性质有关, 也与小球形状、大小、材质等性质有关, 因此变换不同的光阱或小球时, 需要对光镊刚度系数重新进行标定。

与原子力显微技术相似, 光镊操控技术同样可以实现恒力和恒加载率两种力加载模式。在恒力模式中, 通常的作法是将表征一种分子的小球固定在液池玻璃底板上, 用光镊捕获表征另一种分子的小球靠近、接触底板上的固定小球, 然后光镊驱动捕获小球回拉至一个给定位置; 当分子间发生结合时, 小球就会偏离光阱中心给定距离并保持距离不变, 从此时开始所记录的小球偏离光阱中心直至分子键断裂的时间, 即为该外力下分子键寿命; 通过改变光阱功率和回拉距离即可改变外力大小、从而获得作用力-寿命谱。在恒加载率模式中, 光镊捕获小球靠近、接触固定小球后, 然后以恒定加载率回拉; 当分子间发生结合时, 小球偏离光阱中心的位移将随回拉过程而增加直至分子键被拉断, 记录分子键断裂前小球偏离光阱中心的最大位移并乘以光镊刚度系数即为该加载率下分子键断裂力; 通过改变光镊回拉速度和光阱功率即可改变加载率、从而获得加载率-断裂力谱。

4.3 应用范围与局限性

与前述单分子技术手段(如生物膜力探针技术、原子力显微技术等)相比, 光镊操控技术的优势主要体现在可测量分子间很小的作用力(如 10^{-2} - 10^0 pN), 其精度可达到 10^{-3} pN, 这是其它技术无法比拟的。光镊作为力传感器和探测器所具有独特的精度优势, 可弥补其它技术在低作用力范围外力施加和探测方面的不足, 使单分子力学水平的研究进入了一个新的阶段。其局限性主要表现为不适用于作用强度大的分子体系, 且对温度敏感、易受载体布朗运动的影响。

5 平行流室技术

5.1 基本原理

平行流室技术是一种接近生理情况的实验技术, 可在体外模拟生理流动下研究生物大分子间相互作用介导的细胞粘附行为。其基本原理是将特异性相互作用的两种分子中的一种表征在流室底板上, 流体驱动表征另一种分子的细胞或小球在流道中流动, 通过记录由分子间特异性相互作用介导的细胞或小球与底板粘附的动力学过程, 可获得分子间特异性相互作用的动力学信息。以受体-配体相互作用为例, 其动力学特征主要表现为: 1、捕获 (Tether): 运动细胞或小球可由受体-配体分子相互作用介导、形成与底板的捕获, 并可进一步演化为滚动或重新回到流体中。2、滚动 (Rolling): 在特定受体、配体分子密度和流体剪切应力条件下, 细胞前端分子键结合和后端分子键解离达到动

态平衡,表现为细胞在底板上随流体方向的滚动。3、暂态捕获(Transient tether):运动细胞或小球被捕获后不会滚动反而解离,解离细胞既可能被流体带走,也可以因细胞与底板的碰撞而再次被捕获、产生一种接近于滚动的跳跃式前进。在平行流室技术中,受体-配体分子的结合和解离是外力作用下的二维反应动力学过程,表现为上述捕获或锚定、滚动、暂态捕获等动力学特征。对于暂态捕获过程,可通过记录不同剪切应力作用下细胞发生暂态捕获的停留时间获得单个受体-配体分子键的寿命谱,即为前述的恒力模式。

5.2 方法实现

平行流室实验系统主要由平行流室单元、微量直线注射泵、显微镜和视频图像采集单元等部分组成。其中功能化表征一种分子的玻片与透明盖板、垫圈一起构成平行流室单元,可为表征另一种分子的细胞或小球提供流动的流道;微量直线注射泵提供流动所需的流体动力并控制流动剪切应力(或应变率);视频图像采集单元主要由记录分子间相互作用实时图像和普通或高速 CCD 与录像机、实现图像后处理和相应软件的相应软件构成。

平行流室技术作为研究体外模拟生理流动的较为理想方法,可在不同层面上研究受体-配体相互作用:1、细胞积聚方法(Accumulation assay):量化在低剪切应力作用下由受体-配体介导的、细胞粘附于底板的数目随时间变化的动力学过程。2、细胞解离方法(Detachment assay):量化粘附细胞随剪切流动而解离的剪切应力和时间依赖性。3、细胞捕获或滚动方法(Tethering or rolling assay):量化细胞初始粘附频率或滚动速度随剪切应力变化的动力学过程。4、细胞暂态捕获方法(Transient tether assay):通过测定细胞暂态捕获停留时间与剪切应力改变的关系、量化外力作用下分子间负反应率。

5.3 应用范围与局限性

与前述三种研究技术与方法相比,平行流室技术的主要优势体现在对分子间相互作用的定量研究更加接近生理流动状态,可更加直接地阐明分子间相互作用的二维反应动力学参数及其外力调控规律的生物学意义(尤其针对在炎症反应、肿瘤转移、免疫应答等生物学过程中起重要作用的选择素-配体、整合素-配体、T 细胞受体-主要组织复合物等分子体系)。其局限性主要体现在剪切流动下分子间二维反应动力学理论和模型尚不完善、难以全面地量化分子间结合与解离动力学的信息。

6 力致分子动力学模拟

6.1 基本原理

分子动力学模拟(Molecular Dynamics Simulation, MD)是一种既可以获得原子水平的微观结构信息又可以得到分子构象动态演化过程的模型化研究手段。其基本思路是:以原子为基本元素,以

牛顿第二定律为控制方程，在经验势场作用下采用计算机模拟由多个原子组成的分子体系随时间变化的动态演化过程。分子动力学模拟在生物大分子间相互作用研究方面的应用主要集中在：一是提供其微观动态结构信息并与已有实验结果相结合，考察其内在机理；二是通过分析动力学模拟所获得的微观结构特征，预测发挥其生物学功能的可能模式或可能的关键氨基酸，指导实验设计、减小盲目性。

分子动力学模拟需要在计算精度和计算能力两个相互制约方面保持平衡。为弥补计算精度的不足，目前常用的策略是选择更为精确的经验势场参数，或采用分子-量子耦合动力学模拟。为克服计算能力的限制，目前常用的措施是简化模拟系统（如系统环境简化为连续介质或将分子系统粗粒化）、减小计算量，或对模拟系统进行外界干预（如施加外力、电场等）、加速模拟进程。力致分子动力学模拟（Steered Molecular Dynamics, SMD）征是通过施加外力加速动力学模拟的典型方法。

6.2 技术实现

目前，用于生物大分子体系的分子动力学模拟程序包已有很多，包括 NAMD¹，AMBER²，X-PLOR³，CHARMM⁴，GROMOS⁵，GROMACS⁶等，具有类似的系统建立、动态模拟和结果分析等运行流程。除所用经验势场参数不同外，各程序包所处理问题的着重点也稍有差别。其中，SMD方法是 NAMD 程序包中施加外力调控的一个功能模块，该方法不仅是可通过施加外力来缩短系统的模拟时间、以期在计算能力许可的时间尺度内完成动力学模拟，而且外力调控本身也具有特定的生物学意义。正因为如此，SMD 加载方式与原子力显微、光镊操控等单分子测量技术的加载方式相似，主要有恒速（恒加载率）模式（断裂力模式）和恒力模式（寿命模式）两种。在恒速（*cv*-SMD）模式中，外力通过一个一端固定于受力原子或原子簇质量中心、另一端以恒定速率运动的虚拟弹簧实现，通过获得外力-时间变化曲线来反映分子结构演化。在恒力（*cf*-SMD）模式中，其加载方式则是直接在受力原子或原子簇质量中心上施加恒定不变的力，通过得到位移-时间变化曲线来反映分子结构响应。

受计算能力限制，目前分子动力学模拟通常可达到的时间尺度为纳秒量级，而大多数生物学行为（如分子去折叠、分子复合物解离等）过程的特征时间尺度为~毫秒-秒量级。因此，应用 SMD 方法必需施加很强的调控、才能在计算能力许可的时间尺度内完成对相关物理过程的模拟（在 *cv*-SMD 中采用的弹簧弹性系数和加载速率通常比原子力显微技术分别高~ 10^3 和~ 10^6 倍）。人为加速的 SMD 模拟导致该过程为远离平衡的非平衡过程，而现有的单分子测量技术（如原子力显微、光镊操控等技术）因其外力小、离体测量与在体生物学过程时间特征尺度可比等特点可视为准平衡过程，二者间难以直接比较。一种可能的解决方法是通过计算分子复合物沿解离路径的平均力势（Potential Mean Force, PMF）或沿反应坐标的自由能分布、建立连接 SMD 方法与单分子测量技术

的桥梁。

6.3 应用范围与局限性

SMD 方法的应用主要集中在两个方面：其一是外力作用下生物分子去折叠的模拟（如 Titin 蛋白去折叠等）；其二是外力作用下分子复合物解离的模拟（如生物素-亲和素、选择素-配体、整合素-配体等复合物解离等）。其优势体现在可提供高时空分辨率的动态、统计学信息，可在高温、高压等实验技术难以达到条件下模拟分子复合物解离的动力学行为；通过提供原子水平、动态、外力调控下蛋白质相互作用动力学的微观结构信息，深入理解分子间相互作用内在机理，预测分子间结构-功能关系，指导实验设计和数据分析。尽管 SMD 方法的应用目前还受到计算能力的限制、在时间和空间尺度上与实验技术存在很大差异，但日新月异的计算机发展水平和日趋成熟的计算算法使人们有理由相信，分子动力学模拟在生物学领域的应用将发挥愈加重要的作用。

注：¹<http://www.ks.uiuc.edu/Research/namd/>；²<http://amber.scripps.edu/>；³<http://nmr.cit.nih.gov/xplor-nih/>；⁴<http://www.charmm.org/>；⁵<http://www.igc.ethz.ch/GROMOS/>；⁶<http://www.gromacs.org/>。

7 结束语

20 世纪 90 年代后期分子生物力学飞速发展，体现在小系统概率动力学、一阶不可逆反应动力学等理论模型的提出，以及基于上述理论的系列测量方法与技术的出现。小系统概率动力学理论模型在微管粘附频率、原子力显微、光镊操控等技术中的应用可获得分子间相互作用的固有反应动力学特性，一阶不可逆反应动力学理论模型在生物膜力探针、原子力显微、光镊操控、平行流室等单分子测量技术中的应用可得到外力影响分子间相互作用解离率、作用强度以及结合能谱等信息，为深入理解生物大分子间相互作用的结构-功能关系提供信息。随着计算机水平的发展、计算能力的提高以及计算算法的改进，分子动力学模拟方法在阐明结构-功能关系、预测内在机理和指导实验设计等方面发挥愈加重要的作用。单一实验或模拟方法具备其独特优势、但也存在局限性，而上述方法的联合应用既可以在方法与技术上取长补短，又可以从不同角度更加全面认识分子间相互作用的生物力学性质和生物学功能。同时，发展新的理论模型、实验方法与技术，可以更全面了解生物大分子间相互作用的定量规律，进一步阐明理解其生物学功能。