

通过人工智能设计的 Talin 靶向肽结合物 调控细胞黏附斑功能

Modulating cell focal adhesion function by AI designed peptide
binders for talin

一级学科： 物理学

研究方向： 生物物理

作者姓名：

指导教师：

答辩日期	20 年 月 日		
答辩委员会	姓名	职称	工作单位
主席			
委员			

天津大学福州国际联合学院

二〇二五 年 六 月

独创性声明

本人声明所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作和取得的
研究成果，除了文中特别加以标注和致谢之处外，论文中不包含其他人已经发
表或撰写过的研究成果，也不包含为获得 天津大学 或其他教育机构的学位
或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在
论文中作了明确的说明并表示了谢意。

学位论文作者签名：

签字日期：

年 月 日

学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解 天津大学 有关保留、使用学位论文的规
定。特授权 天津大学 可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进
行检索，并采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编以供查阅和借阅。同
意学校向国家有关部门或机构送交论文的复印件和磁盘。

（保密的学位论文在解密后适用本授权说明）

学位论文作者签名：

导师签名：

签字日期： 年 月 日

签字日期： 年 月 日

摘要

本文围绕细胞迁移与黏着斑功能调控，设计了人工智能（AI）辅助设计的 Talin 蛋白调控肽结合物（binder），并验证其与 talin 的结合力。Talin 作为连接整合素与肌动蛋白细胞骨架的核心力敏蛋白，其结构域 R3 对机械力高度敏感，构象变化直接影响黏着斑的组装与稳定性。为实现对 Talin-R3 结构域构象状态的特异性调控，我们借助 AlphaFold2、RFdiffusion 与 ProteinMPNN 等 AI 工具，设计了可稳定结合 Talin-R3 折叠态的肽结合物。通过荧光偏振实验、磁镊单分子力谱测量、TIRF 显微成像及细胞迁移实验，验证了 binder 对 Talin 结构及细胞黏着功能的调控效应。为应对 binder 大规模设计带来的验证挑战，我们构建了基于 SMMS（Single-Molecule Mechanical Selection）的高通量 PPI 检测平台，能够实现同时对上百种候选 binder 的快速、定量筛选，并具备高灵敏度、低成本与可扩展性等优势。本研究提出了研究靶向力敏蛋白功能的新方案，为 AI 驱动蛋白设计在细胞力学调控中的应用提供了新方法，有望在抗肿瘤转移、组织工程与药物开发等领域发挥广泛作用。

关键词：黏着斑；Talin 蛋白；肽结合物；人工智能蛋白设计；SMMS 高通量筛选平台

Abstract

This study focuses on cell migration and the regulation of focal adhesion function through the development of artificial intelligence (AI)-assisted peptide binders targeting the Talin protein. Talin is a core mechanosensitive protein that links integrins to the actin cytoskeleton, and its R3 domain is highly responsive to mechanical force—undergoing conformational changes that directly affect the assembly and stability of focal adhesions. To specifically modulate the conformational state of the Talin-R3 domain, we employed AI tools such as AlphaFold2, RFdiffusion, and ProteinMPNN to design peptide binders that stably interact with the folded conformation of Talin-R3. The binding affinity and functional effects of these binders were validated through fluorescence polarization assays, single-molecule force spectroscopy using magnetic tweezers, TIRF microscopy, and cell migration experiments. To address the challenge of validating large-scale binder libraries, we developed a high-throughput protein–protein interaction (PPI) screening platform based on Single-Molecule Mechanical Selection (SMMS), which enables rapid and quantitative screening of hundreds of candidate binders with high sensitivity, low cost, and scalability. This work presents a novel strategy for probing the function of mechanosensitive proteins and provides a new approach for applying AI-driven protein design in the regulation of cellular mechanics, with potential applications in anti-metastasis therapy, tissue engineering, and drug development.

KEY WORDS: Cell focal adhesion, Talin protein, Peptide binder, AI-based protein design, SMMS high-throughput screening platform

目录

第 1 章 绪论.....	1
1.1 引言.....	1
1.2 细胞迁移与黏着斑.....	2
1.2.1 细胞迁移的机制.....	2
1.2.2 黏着斑的组成、结构和作用机制.....	3
1.2.3 调节黏着斑功能的研究策略概述.....	4
1.3 作为力传感器的 Talin.....	6
1.3.1 Talin 的结构和机制.....	6
1.3.2 Talin 介导的黏附斑中的力转导.....	7
1.3.3 设计针对 Talin 蛋白的肽结合物.....	8
1.4 人工智能蛋白质工程.....	10
1.4.1 AI 设计 Talin 肽结合物.....	10
1.4.2 分子动力学模拟.....	11
1.5 SMMS pull down 平台.....	12
1.5.1 高通量蛋白-蛋白相互作用检测平台.....	12
1.5.2 AI 设计的结合分子的高通量验证平台.....	13
第 2 章 实验方法及原理.....	15
2.1 细胞及细菌实验.....	15
2.1.1 分子克隆与蛋白表达.....	15
2.1.2 荧光偏振实验.....	16
2.1.3 细胞培养与转染.....	18
2.1.4 细胞迁移实验.....	18
2.2 细胞黏附斑的荧光成像分析.....	19
2.2.1 免疫染色实验.....	19
2.2.2 全内反射荧光显微镜 (TIRF) 成像.....	19
2.3 单分子磁镊实验.....	20
2.3.1 磁镊实验的装置与原理.....	21
2.3.2 力的定量标定.....	22
2.3.3 磁镊实验中的典型测量内容.....	23
2.4 传统 pull-down 实验与蛋白质印迹 (Western Blot) 分析.....	23
2.5 基于 SMMS 的 Pull-down 实验用于蛋白-蛋白相互作用 (PPI) 检测.....	25
第 3 章 验证 AI 设计的肽结合物功能.....	27

3.1 分子动力学 (MD) 模拟验证结合物	27
3.2 细胞体外验证结合物有效性	28
3.2.1 Binder 以中等亲和力与 Talin R3 结合	28
3.2.2 Talin R3 的拉伸曲线分析	29
3.3 细胞体内验证结合物有效性	31
3.3.1 引入 Binder 减少细胞黏附斑尺寸	32
3.3.2 引入 Binder 后细胞迁移速度下降	33
3.3.3 体内 Pull-down 实验	34
第 4 章 开发高通量结合物筛选平台	35
4.1 基于 SMMS 的高灵敏度蛋白 - 蛋白相互作用定量分析	35
4.1.1 探索蛋白 - 蛋白相互作用的最优检测环境	35
4.1.2 检测常见标签的蛋白 - 蛋白相互作用 (PPI)	39
4.1.3 构建用于验证 AI 设计 Binder 的高通量筛选平台	41
4.2 结果讨论	45
4.2.1 小结	45
4.2.2 局限性与展望	47
4.2.3 未来潜力	48
第 5 章 总结	49
参考文献	50
发表论文和参加科研情况说明	50
致谢	56

第1章 绪论

1.1 引言

作为从简单的单细胞生物（如变形虫）到复杂的多细胞生物（如哺乳动物）中均普遍存在的生物学行为^[1]，细胞迁移（cell migration）在其中至关重要。在胚胎发育过程中，细胞迁移在原肠胚形成、神经系统建构等关键形态发生阶段反复出现^[2-3]。在成年个体中，迁移亦在多种生理与病理过程中发挥重要作用，例如在炎症反应中，白细胞定向迁移至损伤区域以发挥吞噬与免疫功能^[4-5]；成纤维细胞与血管内皮细胞的迁移则是伤口愈合不可或缺的环节^[6-7]。此外，在肿瘤转移过程中，癌细胞通过迁移实现从原发灶脱离、进入循环系统并在远端组织定植的过程^[8]。近年来，细胞迁移在组织工程、再生医学等领域的研究与应用愈发受到重视，例如细胞在生物材料支架上的定植能力直接影响构建组织的结构与功能^[9]。正因细胞迁移在生命过程中扮演着如此多样且关键的角色，过去几十年来相关调控机制的研究不断深入，逐渐形成包括单细胞迁移与集体迁移^[10]、三维迁移机制^[11]、细胞骨架动力学^[12]、迁移形态学^[13]以及黏着斑调控等多个重要子方向。

在众多参与细胞迁移的分子机制中，黏着（附）斑（focal adhesions, FAs）是细胞感知并响应细胞外基质（ECM）机械信号的核心枢纽。它不仅作为物理锚点介导细胞附着，还整合细胞内外的机械与化学信号，从而驱动迁移行为，并在细胞增殖、分化等过程中发挥调控作用^[14-15]。随着高分辨成像与力学测量技术的发展，研究人员发现黏着斑的结构特征（如大小、密度、分子组成）与细胞迁移的速度、方向性和群体协调性密切相关^[16]。因此，调控黏着斑功能不仅有助于理解基础细胞行为，也在抗肿瘤转移、组织工程等应用领域具有重要前景。目前，调节黏着斑功能的研究手段不断丰富，包括信号通路干预、小分子抑制剂、基因编辑、光遗传学调控及蛋白-蛋白相互作用干预等方法（详见第1.2节）。然而，针对特定力敏蛋白，如Talin等，对其特异性、可控性调节手段的研究仍处于初步阶段，从而限制了在精细调控黏着斑结构与功能上的进一步突破。

近年来，人工智能（AI）驱动蛋白质工程迅速发展，特别是AlphaFold2、RF Diffusion、ProteinMPNN等工具的出现，为特异性结合蛋白或短肽（binder）的结构预测与功能设计提供了新路径^[17-19]。这些方法有望以更高效的方式，开发

出针对组成黏着斑复合蛋白的关键力响应蛋白如 **Talin** 等的高亲和力调节分子，为实现对黏着斑的精准操控提供新手段。本章将围绕以下几个方面展开：首先回顾细胞迁移和黏着斑的基本机制与关键组成成分，并讨论当前调节黏着斑功能的研究策略（第 1.2 节）；随后，我们聚焦于 **Talin** 蛋白，分析其结构、功能与力学特性，并探讨通过设计结合 **Talin** 的短肽分子调控黏着斑功能的可能性（第 1.3 节）；然后介绍实现该目标所采用的 AI 辅助设计工具（第 1.4 节）；最后，为了推进 AI 设计结合物的方法广泛应用，我们提出了采用 **SMMS**（Single-molecule-mechanical-selection）来实现一个针对 AI 设计的蛋白的高通量筛选平台（第 1.5 节）。

1.2 细胞迁移与黏着斑

1.2.1 细胞迁移的机制

细胞迁移是一个由多个步骤协调进行的动态过程，包括极性建立、前缘伸展、黏附形成、细胞体推进与后缘解离^[1]。迁移的起始阶段，细胞首先建立前后极性，并在前缘通过肌动蛋白聚合作用形成伪足（如板状伪足 **lamellipodia** 和丝状伪足 **filopodia**），由此推动细胞膜向外延展。随后，细胞通过整合素和黏着斑与细胞外基质形成锚定点，为后续力的传递提供物理基础^[20]。细胞体推进主要依赖肌动蛋白-肌球蛋白（**actomyosin**）系统所产生的收缩力，由 **RhoA-ROCK** 通路调控的应力纤维结构提供牵引力，将胞体向前拉动^[21]。与此同时，后缘黏着斑解离，使得细胞后部能够顺利脱附，保证迁移效率。整个过程中，小 GTP 酶家族（如 **Rac1**、**Cdc42** 和 **RhoA**）通过调控肌动蛋白动力学与黏附的形成与解离，确保迁移各阶段协调推进^[22]。

不同类型的细胞可采用多种迁移模式，包括依赖强黏附的间充质迁移、快速穿行但黏附依赖较弱的变形虫式迁移，以及保持细胞间连接的集体迁移^[23]。其中，间充质型迁移对黏着斑高度依赖，细胞通常呈拉伸状态，通过“黏附形成—力传递—黏附解离”的循环进行运动。黏着斑在前缘的组装提供了有效的牵引力，而其在后缘的解离保证了细胞的持续推进^[16]。

另外，黏着斑不仅是细胞与 **ECM** 之间的物理连接点，更是信号传导平台，它能够整合机械力和生化信号，以调控迁移的方向性、速度与稳定性^[24]。因此，解析黏着斑的结构与调控机制，对于深入理解细胞迁移过程具有重要意义。本小节之后将专门讨论黏着斑的组成、功能以及调节策略。

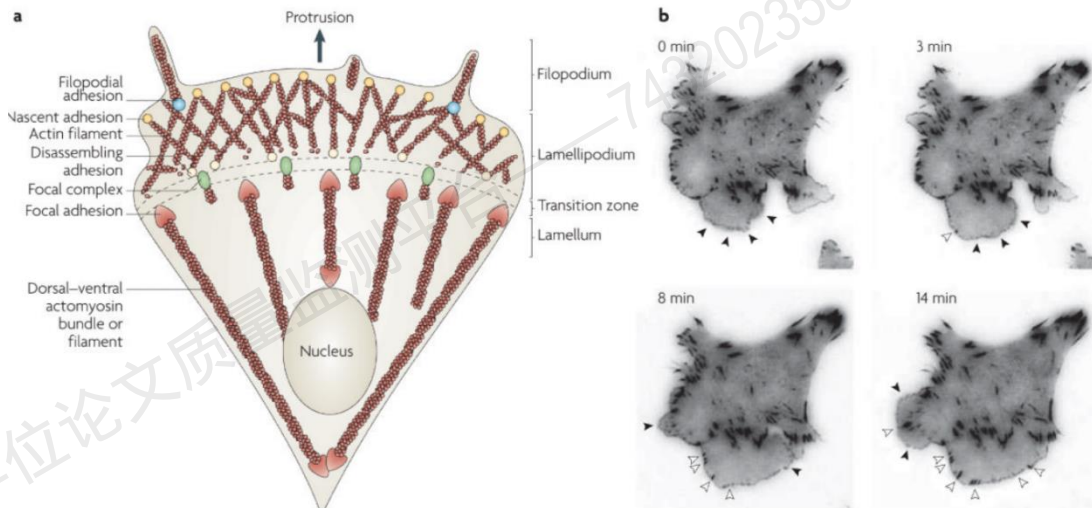


图 1.1 正在迁移的细胞的结构组成 (Adapted from Parsons et al., 2010)。(a) 黏附与细胞前缘突出结构 (丝状伪足 filopodia 和板状伪足 lamellipodia) 的形成密切相关。最初的黏着 (新生黏着) 形成于板状伪足中 (尽管黏着也可能与丝状伪足有关), 新生黏附的组装速率与突出结构的形成速率相关。新生黏附要么在板状伪足与板层 (lamellum, 即过渡区域) 交汇处解体, 要么延伸并成熟。黏着从新生阶段向黏着复合体 (focal complexes) 和黏着斑 (focal adhesions) 成熟的过程中, 伴随着肌动蛋白丝的束化与交联, 肌动蛋白-肌球蛋白 (actomyosin) 介导的收缩力可稳定黏附形成并增大其面积。(b) 表达 paxillin-mEGFP 的 CHO 细胞贴附在纤连蛋白 (fibronectin) 上的 TIRF (全内反射荧光) 显微镜图像。0、3、8 和 14 分钟的图像捕捉了新生黏附的周转与成熟过程。实心箭头标记新生黏附, 空心箭头则指示正在朝细胞中心延伸的成熟黏着结构^[15]。

1.2.2 黏着斑的组成、结构和作用机制

黏着斑 (focal adhesions, FAs) 作为细胞与细胞外基质 (ECM) 之间的多蛋白连接结构, 是细胞黏附、力传导和信号整合的核心平台^[14]。它通过多种细胞骨架和信号分子介导细胞的运动、分化、生长和存活。黏着斑的形成、结构与功能反映了细胞对周围环境物理与化学信号的感知和响应能力。

在组成上, 黏着斑是由上百种结构和信号蛋白组装而成的多分子复合物, 被称为“黏着复合体” (adhesome) ^[25]。核心蛋白包括整合素 (integrins)、Talin、Vinculin、Paxillin、FAK (focal adhesion kinase)、Kindlin、Zyxin 等 (图 1.2)。这些蛋白通过直接或间接方式连接细胞骨架与 ECM, 并参与力学调控和信号传导。整合素是最外层与 ECM 直接结合的跨膜受体, Talin 通过其 FERM 结构域激活整合素并连接 actin 细胞骨架^[26]。Vinculin 可被张力激活, 与 Talin 和 actin 结合, 进一步增强黏着斑的机械稳定性^[27]。在信号通路的激活中, FAK 和 Src 等激酶通过磷酸化作用调节 Paxillin 等蛋白的活性, 从而调控黏着斑的组装和解离^[28]。

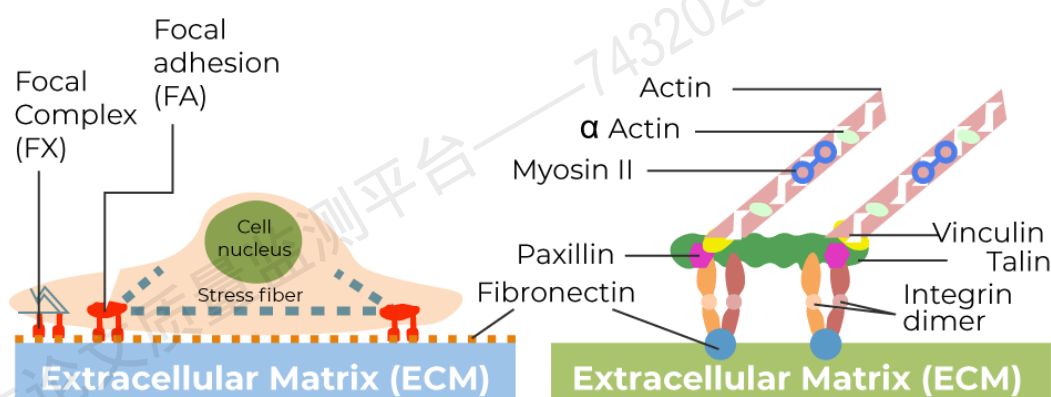


图 1.2 黏附斑的组成与结构示意图简图。左图显示黏附斑主要位于细胞与细胞外基质（ECM）之间的界面处。右图呈现了黏着斑组成成分以及它们之间的空间位置与结构。这些多蛋白复合体由一系列结构和信号蛋白组成，包括 paxillin、纤连蛋白（fibronectin）、整合素（integrin）、talin、vinculin 以及肌动蛋白（actin）等，它们共同介导细胞与 ECM 之间的黏附、力的传递以及力转导过程。

在结构层面，超高分辨成像显示黏着斑具有明显的垂直分层结构，包括底部的整合素层、中间的连接层（如 Talin、Vinculin）和上部的信号层（如 FAK、Paxillin）^[29]，揭示了力与信号在空间上的传导路径。

功能上，黏着斑不仅传递细胞骨架产生的牵引力，还感知外部 ECM 的刚度、拓扑与化学属性。通过“外力-蛋白构象变化-信号传导”的路径，黏着斑能将力学输入转化为生化反应，从而调控基因表达、细胞生命行为与运动方向^[30]。此外，黏着斑还具有动态性，其组装与解离受肌动蛋白牵引力、 Ca^{2+} 信号、磷酸化事件等多因素调节^[31]。由此可见，黏着斑不仅是静态的结构单元，而是一个动态响应的“力学-生化接口”。其核心蛋白的构象变化（如 Talin 在力加载下的解折叠）、相互作用强度的变化以及亚细胞定位的改变，均影响细胞的迁移能力与形态稳定性。

1.2.3 调节黏着斑功能的研究策略概述

细胞黏着斑（focal adhesions, FAs）作为连接细胞骨架与胞外基质（ECM）的关键机械和信号界面，其功能调控对于理解细胞行为与开发抗肿瘤策略具有重要意义^[32]。近年来，针对黏着斑结构与功能的调控方法不断拓展，主要包括信号通路干预、小分子药物、基因调控技术、光遗传学方法、以及蛋白-蛋白互作抑制剂等。

在通过信号通路干预方案中,研究表明可以利用 Rho 家族小 GTP 酶(如 RhoA、Rac1、Cdc42)来调控黏着斑形成和细胞骨架动态重塑^[33]。例如,RhoA-ROCK 信号轴控制应力纤维形成和黏着斑成熟^[21]; Rac1 激活可促进新生黏着斑形成,支持细胞迁移前突的扩张^[34]。此外,FAK/Src 通路通过磷酸化 Paxillin 和其他黏着斑蛋白,调节其组装、解离与下游信号活化^[15,28]。在小分子药物干预方案中,研究人员基于上述信号调控轴开发了多种小分子靶向药物,如 FAK 抑制剂(PF-573228,VS-6063)、ROCK 抑制剂(Y-27632)、Src 抑制剂(SU6656)等。这些药物可抑制黏着斑形成或促进其解组装,被广泛应用于抑制肿瘤细胞迁移和侵袭^[35-38]。在基因编辑与光遗传调控方案中,RNA 干扰(siRNA)与 CRISPR-Cas9 系统被用于特异性敲低 Talin、Vinculin、Kindlin 等核心 FA 蛋白,从而研究其在力传导与信号整合中的功能^[39-41]。近年来,光遗传学手段也被引入细胞黏附调控,如利用光敏蛋白控制 RhoA/FAK 激活状态,进而调节黏着斑组装与细胞极性^[42-43]。蛋白-蛋白互作抑制与合成肽干预方案近年来发展为针对 FA 蛋白间相互作用界面的抑制。例如,设计短肽 peptides 或小分子干扰 Talin 与整合素、Talin 与 Vinculin 的结合界面,已被证明可显著影响 FA 稳定性与细胞迁移行为^[44-46]。Stapled peptides、macrocytic peptides 等具备结构稳定性强、亲和力高的优势,已成为靶向 FA 关键蛋白的研究热点^[47-49]。

以上的这些调节黏着斑功能的方案各有优缺点:信号通路调控常涉及 Rho GTP 酶、FAK/Src 等多个通路,具有靶点丰富、机制明确的特点,但由于作用链条较长,往往缺乏特异性,如果作为药物副作用较大。小分子抑制剂如 FAK 或 ROCK 抑制剂具有合成简便、细胞通透性好等优点,但在靶向性与稳定性方面仍存在诸多问题^[37]。基因干预手段(如 RNAi、CRISPR)可敲除或沉默特定 FA 蛋白,从源头上改变其表达水平,但其不可逆性、不可控性及时效限制使其在功能精细调节方面存在不足。光遗传学方法可实现对 FA 相关通路的时空精准调控,但对系统构建要求高,技术门槛较高,难以实现临床转化^[42]。蛋白-蛋白相互作用抑制策略通过干扰特定蛋白界面比如 Talin-Integrin,具有较高靶向性,但其分子设计复杂,通透性与稳定性仍需进一步优化^[47]。

综上所述,以上策略在特定场景中取得了较好效果,但如何以高特异性、良好可控性、明确结构基础的方式,直接调控核心力敏蛋白(如 Talin),仍是该领域极具挑战的前沿问题。近年来,伴随 AI 驱动蛋白结构预测与设计工具的快速发展,一种新兴策略逐渐浮现:通过 AI 辅助设计、开发可结合 Talin 蛋白的合成肽分子(binder)以调节其功能状态。该策略在理论上具备结构明确、作用位点精准、结合亲和力可控、序列优化空间大等多重优势,有望成为实现高精度调控

黏着斑功能的有效工具。我们将在下节介绍该方法的研究关注对象，Talin 和它所主导的力传导通路。

1.3 作为力传感器的 Talin

1.3.1 Talin 的结构和机制

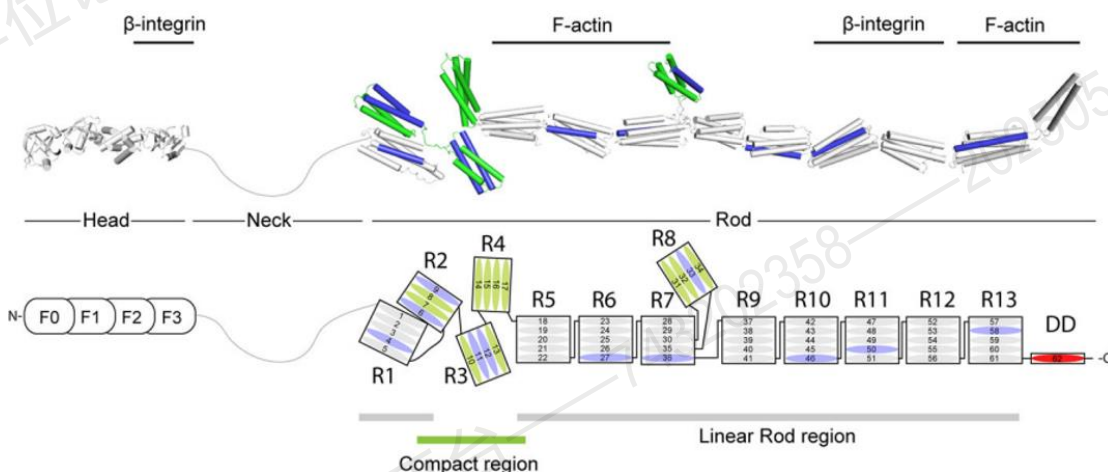


图 1.3 全长 Talin 的结构 (Adapted from Yan et al., 2015)。Talin 是一种大型多结构域蛋白，它由一个 N 端的“头部”，通过一个长且无结构的“颈部”区域（约 10 kDa）连接至一个大型的 C 端“杆状”区域（约 220 kDa）。其中，头部含有一个非典型的 FERM 结构域（约 50 kDa）。Talin 的杆状部分由 13 个螺旋束（R1–R13）组成，并以一个末端单螺旋结构结束，该结构支持 Talin 的二聚化。该杆状区域包含 11 个 vinculin 结合位点（VBS，图中以蓝色显示），这些位点全部埋藏在螺旋束内部^[50]。

Talin 是生物系统中一种高度保守、约 270 kDa 的细胞骨架连接蛋白。作为整合素活化与黏着斑组装的关键桥梁分子，Talin 在细胞迁移、形态维持与力信号转导中发挥核心作用^[51]。哺乳动物细胞中主要表达 Talin-1 和 Talin-2 两个同源亚型，Talin-1 广泛存在于迁移性细胞和肿瘤细胞（如 HeLa 细胞）中，在力学感应和细胞运动中尤其关键^[52]。

如图 1.3 所示，Talin 的主要结构域由 N 端的 FERM 结构域（HEAD）（F0–F3）、C 端的 Rod 结构域（R1–R13）和一个二聚化结构域（DD）组成，N 端与 C 端借由一段不规则的链接区（NECK）连接^[50]。其中，FERM 结构域通过 F3 亚结构域直接结合整合素 β 亚基胞质尾部，从而激活整合素构象变化，诱导其与 ECM 的高亲和结合状态^[53]。此外，FERM 结构域还能与磷脂膜上的 PIP2 结合，协助 Talin 定位至质膜内侧^[54]。Talin 的 Rod 结构域由一系列螺旋束组成，它们在

未受力时呈折叠闭合状态，多个亚结构域中包含 Vinculin 结合位点（VBSs）和 Actin 结合位点（ABS2/ABS3）^[55]。在受到机械拉伸时，Rod 区域特定模体（如 R3、R9）发生部分或完全展开，暴露出这些隐蔽的相互作用位点，从而招募 Vinculin、Actin 等下游因子^[56-57]。

Talin 激活过程遵循“自抑制 - 构象释放 - 活化组装”的多级调控模型。在细胞静息状态下，Talin 的 Rod 结构域与 FERM 域之间存在稳定的“自抑制”构象，阻止其与整合素和 Actin 等结合^[58]。而在 PIP2 聚集、Rap1-GTP 上调或外部牵引力刺激下，Talin 构象被解锁，其 FERM 结构域转为开放状态，与整合素胞质尾结合并激活整合素，同时 Rod 区在拉伸下暴露 VBSs 并招募 Vinculin^[59-60]。这一“力控构象开关”机制使 Talin 具备了力学调节与信号整合的双重能力。

1.3.2 Talin 介导的黏附斑中的力转导

Talin 作为黏着斑中的核心桥梁分子，其独特之处在于兼具机械连接功能与力学感应能力。Talin 被 PIP2 聚集、Rap1-GTP 上调或外部牵引力刺激下等因素激活后，它的自抑制构象被解锁，从而 FERM 结构和活化态的整合素尾部结合，将整合素从低亲和力状态转变为高亲和力构象，使其牢固结合 ECM^[58]。同时，Talin 与质膜上的 PIP2 结合，协助其定位至黏附点。随着细胞骨架张力的增加，Talin 的杆状区折叠的螺旋束结构被逐步展开，暴露出多个隐藏的 Vinculin 结合位点（VBSs）^[57]，从而招募大量 Vinculin 与之结合，进一步增强整合素-Talin 复合物与肌动蛋白细胞骨架之间的连接，并促进肌动蛋白的聚合^[61-62]，从而增强黏附斑的稳定性，并强化细胞与 ECM 之间的黏附^[63]。这种构象驱动的力响应过程也使 Talin 成为一个“机械信号开关”：其受力状态不仅决定了下游蛋白的招募，还反过来调节黏着斑的生长速度与方向性^[64-65]。

单分子力谱实验与张力传感器研究表明，不同 Rod 亚结构域的展开力阈值不同（如 R3 与 R9 较易解折叠，R1 和 R11 较稳定），暗示 Talin 可通过分段展开方式调节不同功能位点的开放顺序，构建出一种“力控调控序列”^[66-67]。此外，其构象变化还可能改变其与其他调控蛋白（如 RIAM、KANK、DLC1 等）的结合状态，进一步扩展其调控网络^[68]。

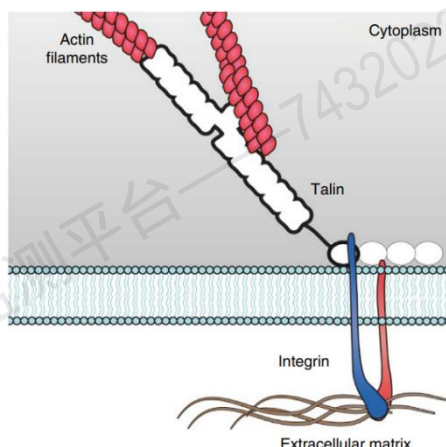


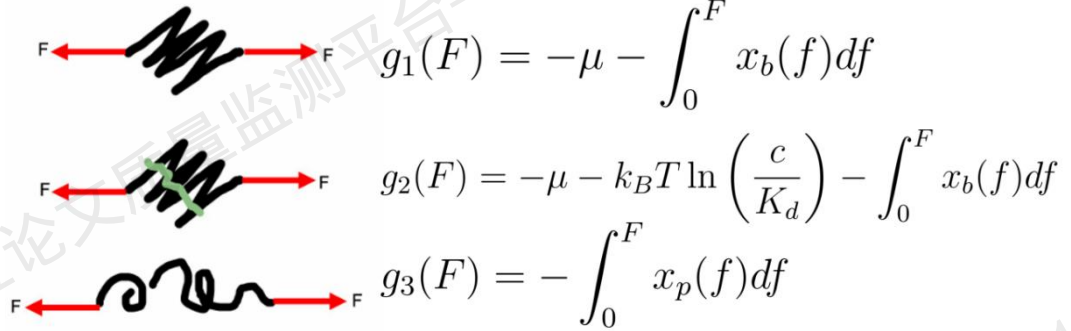
图 1.4 Talin 力传导结构示意图 (Adapted from Yao et al., 2016)。图中被标注为蓝色的细胞膜将细胞内 (上) 与细胞外基质 (下) 分隔。Talin 的头域通过连接跨膜蛋白整合素和外部的 ECM 连接, 另一端杆状域 (白色) 连接到肌动蛋白细胞骨架 (红色)。该 Talin-Integrin-Actin 结构构成 FA 的力传导通路^[64]。

Talin 构象变化与其功能状态存在显著对应关系。静息状态下, Talin 处于“自抑制折叠”构象, 仅少量与整合素结合, 黏着斑处于初期组装阶段; 而在强牵引力作用下, Talin 逐步解折叠, 暴露出多个功能位点, 黏着斑向成熟状态发展, 招募 Vinculin、Actin 等形成稳定结构^[56]。若外部力降低或收缩力解除, Talin 重新折叠, VBSs 遮蔽, 黏着斑随之解体。这种构象-功能耦合机制使 Talin 成为连接细胞骨架与黏附界面之间的动态调控核心。Talin 所调控的力转导在包括心脏、肺、肝脏和肾脏等多个器官中起关键作用, 而其功能失调已被证明与多种疾病相关^[30]。

1.3.3 设计针对 Talin 蛋白的肽结合物

目前, 针对如 Talin 等力传导蛋白的研究方法主要依赖于基因扰动技术, 如基因敲除、敲低和突变技术。然而, 考虑到 Talin 的力敏感特性, 迫切需要一种无需基因修改的机制来调节其结构域的力学稳定性。因此本课题提出了设计结合 Talin 结构域的调控肽分子结合物。在选取设计结合物对应的 Talin 的杆状结构域中, 基于对机械刺激的高敏感性, R3 被选为首要研究对象。与其他杆状结构相比, R3 在较低的力 (约 5 pN) 下便可快速发生展开和重新折叠, 意味着它是最先响应生理小力的结构域。此外, R3 含有两个 VBSs, 是最早招募 vinculin 的区域, 从而启动黏附加强过程^[64]。那么, 设计一种专门与 R3 折叠态结合的肽结合物 (binder), 就能显著延长其处于折叠构象的时间, 使 vinculin 难以被激活, 从而导致下游的一系列力传导机制大大削弱, 比如减少了 vinculin 的招募, 削弱与

肌动蛋白的关联，进而降低黏附斑强度和尺寸。此策略在如降低肿瘤的迁移与转移能力等多个重要医学领域具有极高应用价值的潜力。



$$\begin{aligned}
 & \text{State 1 (Unbound, Folded): } g_1(F) = -\mu - \int_0^F x_b(f) df \\
 & \text{State 2 (Bound, Folded): } g_2(F) = -\mu - k_B T \ln\left(\frac{c}{K_d}\right) - \int_0^F x_b(f) df \\
 & \text{State 3 (Unfolded): } g_3(F) = - \int_0^F x_p(f) df
 \end{aligned}$$

图 1.5 结合物存在时 Talin R3 的三种状态。图中黑色为 Talin，绿色为 binder。从上到下三种状态分别是：未结合的折叠态、结合后的折叠态和展开态。对应的公式是这些状态在力 F 作用下的自由能。

下面简单介绍肽结合物 binder 将 Talin R3 锁定在其折叠状态的理论依据：当 binder 与杆状结构域相互作用时，存在三种可能的状态：未结合的折叠态、结合后的折叠态和展开态（如图 1.5 所示）。每种状态的自由能如图 1.5 右侧公式所示。在未结合的折叠态下，受力 F 时，其自由能为：

$$g_1(F) = -\mu - \int_0^F x_b(f) df \quad (1.1)$$

其中， $x_b(f)$ 是在力 F 下折叠的杆状结构域的伸长量， μ 是杆状结构域的折叠能量。在结合后的折叠状态下，受力 F 时，其自由能为：

$$g_2(F) = -\mu - k_B T \ln\left(\frac{c}{K_d}\right) - \int_0^F x_b(f) df \quad (1.2)$$

其中， K_d 是 binder 与杆状结构域结合的解离常数， c 是 binder 的浓度， k_B 是玻尔兹曼常数， T 是温度。对于展开态，自由能为：

$$g_3(F) = - \int_0^F x_p(f) df \quad (1.3)$$

其中， $x_p(f)$ 是在力 F 下展开的杆状结构域的伸长量。由于存在临界力 F_c 使得杆状结构域在展开和折叠状态之间具有相等的概率，我们可以得到以下关系：

$$\int_0^{F_c} (x_p(f) - x_b(f)) df = \mu + k_B T \ln\left(1 + \frac{c}{K_d}\right) \quad (1.4)$$

从式 1.4 中我们可以推断出，如果结合亲和力较强，即 K_d 值较低，临界力 F_c 将会更高。如果我们为 Talin 杆状结构域设计了一个强结合的 binder，我们可以显著提高展开杆状结构域所需的临界力。

1.4 人工智能蛋白质工程

近年来,人工智能(AI)在蛋白质结构预测和功能设计领域取得了突破性进展,极大推动了蛋白质工程的革新。尤其在 AlphaFold2 和 RoseTTAFold 等结构预测算法成功之后,蛋白质的三维结构获得了前所未有的解析速度和精度,使得蛋白功能预测与靶向设计成为可能^[18,69]。同时,以扩散模型(diffusion models)和图神经网络(GNN)为基础的蛋白设计工具,如 RFdiffusion、ProteinMPNN 和 ESMfold 等,也逐渐在靶点结合肽、纳米抗体、人工酶等方向展示出强大的生成能力^[19,70-71]。

1.4.1 AI 设计 Talin 肽结合物

AI 驱动蛋白设计流程一般包括:目标蛋白结构建模、功能位点识别、初始序列生成、结合界面优化和候选结构的物理-化学打分^[17-19]。在本研究中,我们首先从 UniProt 数据库中获取 Talin R3 的氨基酸序列,并将其输入 AlphaFold2。AlphaFold2 会预测 Talin R3 结构域的三维结构。然后,R3 的三维结构的 PDB 文件将会作为结合对象输入给 RF Diffusion,随着扩散过程的进行,与 Talin R3 结合位点互补的高置信度的结合物骨架 backbone 得以生成。该过程确保所设计的蛋白 binder 能够良好地匹配 Talin 的分子表面,最大化相互作用潜力。随后,将 RF Diffusion 所生成的主链 backbone 输入到 ProteinMPNN,它将对结合界面进行序列优化,生成多种具有高结合亲和力和结构稳定性的候选肽序列。最后,使用 AlphaFold 对设计的结合物与 Talin R3 结构域的结合进行了测试。每个设计的结合物与 Talin R3 序列分别输入进行分析。计算了结合界面处的 PAE 值(iPAE),并将其作为评估结合物质量的标准。根据评分选出了排名靠前的序列进行后续的实验验证。

综上所述,这些 AI 工具协同工作,实现了对 Talin 靶向肽类 binder 的高效优化设计,接下来可通过分子动力学模拟和实验结合分析进一步验证其效果。这种 AI 辅助的工作流程加速了基于肽的治疗手段与力生物学研究的发展,提供了一种精准设计分子相互作用的强大手段。

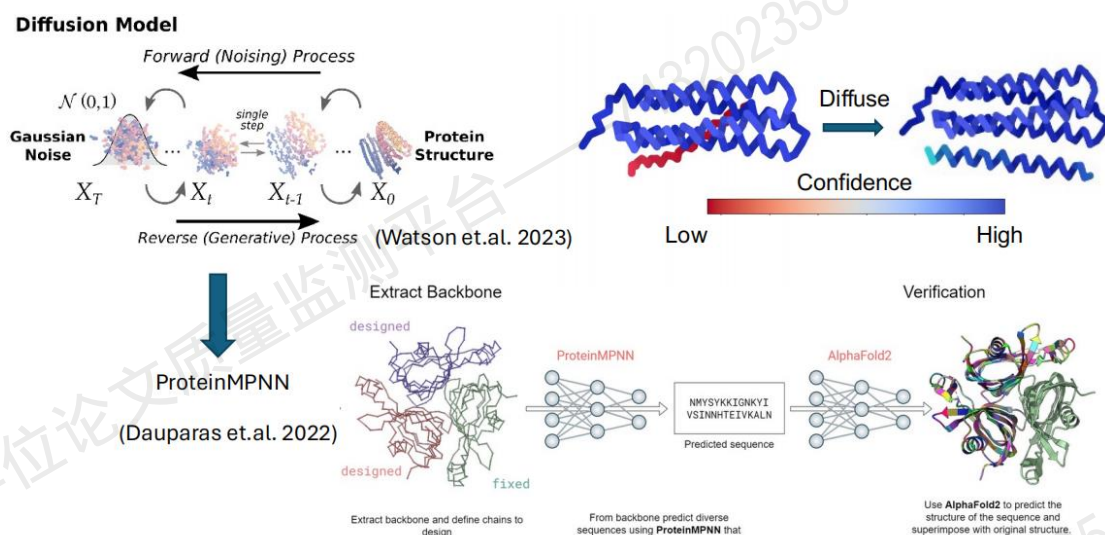


图 1.6: Talin R3 binder 设计流程 (Adapted from Dauparas et al., 2022, Watson et al., 2023)。以 AlphaFold2 预测的 Talin R3 结构作为 RF Diffusion 的输入，RF Diffusion 通过一个基于噪声的正向过程和一个生成式的反向过程生成全新的蛋白质主链结构。主链随后通过 diffusion 模型进行基于置信度的优化，以提高其与 Talin R3 的互补性。ProteinMPNN 用于为该主链设计氨基酸序列，使其能够准确折叠成目标结构，并确保高度稳定性和特异性。最终结构将通过 AlphaFold2 进行验证^[17-19]。

1.4.2 分子动力学模拟

分子动力学(molecular dynamics, MD)模拟是一种基于经典力场的计算方法，广泛应用于蛋白质构象变化、稳定性分析及分子间相互作用的研究中。通过追踪原子随时间的运动轨迹，MD 能在原子水平揭示蛋白质在不同环境条件下的构象变化与动态行为，为结构预测和功能分析提供了重要补充^[72]。

本研究中，我们拟利用 GROMACS 平台对 Talin-R3 与设计结合肽的复合结构进行 100 ns 经典 MD 模拟。首先，MD 可通过自由能计算(如 MM-PBSA/GBSA 或 FEP)来估算结合亲和力，从而量化 binder 与 Talin R3 之间的相互作用强度。此外，MD 还可通过分析模拟过程中形成的氢键、疏水相互作用以及盐桥等，识别关键的结合位点。模拟还可以评估 binder-Talin R3 复合物的稳定性，常用的评估参数包括 RMSD (均方根偏差) 及关键相互作用在时间上的持续性^[73-74]。通过上述详细信息，MD 模拟可以辅助进一步筛选具有良好结构稳定性与结合能力的结合物的候选序列以用作后续的实验验证。

1.5 SMMS pull down 平台

在表达了肽结合物蛋白后，我们需对其结合 Talin 的能力做实验验证。更一般地，我们需要一个能够高通量测试蛋白-蛋白相互作用（PPI）的平台。AI 可以在一次运行中生成数十到数百个候选 binder，这对传统的 PPI 验证方法如 pull-down 实验构成了巨大挑战。这是因为传统的 PPI 检测方法耗时较长：在蛋白表达之后，pull-down 实验通常还需进行过夜孵育、洗脱、电泳、膜转印和免疫印迹（Western blot）等多个步骤，实验时间数以天计。而且这些方法的通量有限，通常一次最多只能检测十种蛋白，成为当前验证大规模 AI 设计的 binder 库的瓶颈。

为了解决这一难题，在完成对 AI 设计的 binder 的初步实验验证之后，我们进一步尝试将单分子力学筛选（SMMS, Single-Molecule Mechanical Selection）技术开发为一种高通量、定量的平台用于研究 PPI、验证 AI 设计的 binder，并测试了一些其他的蛋白的相互作用网络。SMMS 技术通过施加精确可控的机械力，仅保留高亲和力、特异性的相互作用，同时有效排除弱或非特异性相互作用^[75]。这种内建的特异性筛选机制，结合其可同时并行筛选数百个蛋白对的潜力，有望克服传统方法的关键限制。

1.5.1 高通量蛋白-蛋白相互作用检测平台

SMMS 技术基于利用经过校准的机械力来剥离通过待测分析物连接在孔板表面的超顺磁性微珠。分析物可以是蛋白质，此时微珠和孔板表面分别预涂被两种能够结合该蛋白不同位点的特异性传感分子（Sensor），如抗体等。该检测方式可用于识别目标分析物的存在，在生物化学研究中具有重要意义，尤其在液体疾病生物标志物检测方面^[75]。对于这类应用，SMMS 展现出多个优势，包括依赖机械门控的高特异性、单颗微珠级别的高灵敏度、检测时间快（约 30 分钟）、操作简便以及成本低廉。在本研究中，我们将扩展 SMMS 的应用，使其能够用于蛋白-蛋白相互作用（PPI）的检测。与现有主要用于检测单一蛋白不同，此处的分析物为两个蛋白形成的复合物。我们将在两个相互作用蛋白的末端分别融合不同标签，从而使微珠和孔板表面能够分别包被能够特异性识别这些标签的传感分子。PPI 的检测不仅对于理解生物功能至关重要，也有助于发现疾病生物标志物，并推动靶向结合分子的设计。

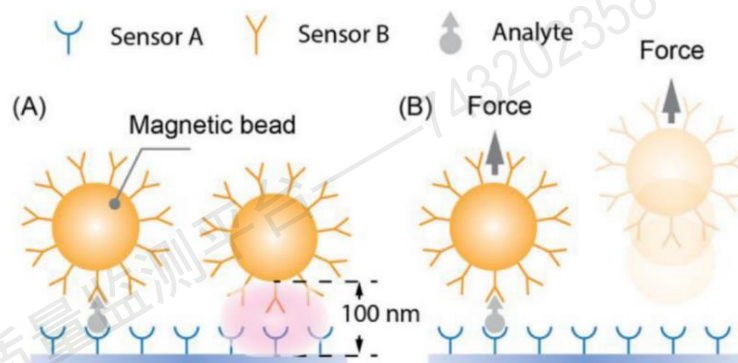


图 1.7 SMMS 原理示意图 (Adapted from Zhou et al., 2023)。(A) 实验中，底板和磁珠表面分别修饰探针分 Sensor A 和 Sensor B，可分别识别分析物 (Analyte) 中的 Tag A 和 Tag B；(B) 当磁珠与底物通过 Analyte 介导形成连接后，施加磁力，磁力会将分析物种没有发生 PPI 的非特异性信号都去除。最终保留下来的微珠密度作为检测信号，通过普通光学显微镜即可进行定量分析^[75]。

1.5.2 AI 设计的结合分子的高通量验证平台

在本工作中，我们将优化 SMMS 技术，实现对 AI 预测的蛋白结合分子进行高通量、定量验证。我们将建立 SMMS 实验流程，能够在 1–2 小时内验证超过 100 个 AI 设计的结合分子，实时对候选分子进行亲和力排名。SMMS 的性能将与 ELISA、Western blot 和 Co-IP 等传统方法进行对比评估，并建立自动化数据处理流程，将 SMMS 结果直接整合至 AI 驱动的结合分子设计平台中。

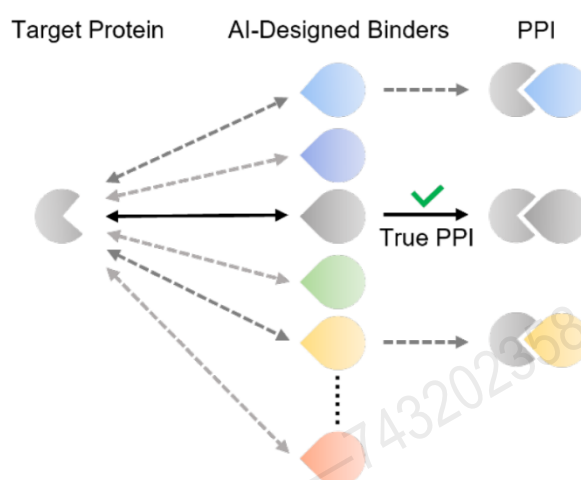


图 1.8: 一个由 AI 设计生成的大型结合分子库，其中只有一小部分是真正能与目标结合的有效分子。

蛋白设计的目标是识别具有期望结构和功能的新序列，其中一个重要应用是设计能够以高亲和力结合特定目标蛋白的结合分子。目前先进的 AI 蛋白设计方法通常需要从大量 AI 预测的候选分子中进行广泛的实验验证，以确保设计成功

^[17-19]。在实际操作中，只有极少数 AI 生成的候选分子是真正有效的结合分子（见图 1.8）。大量候选分子迫切需要高通量筛选方法。而现有的常规方法如 Western blot 和 ELISA 通量低，扩展性差；酵母表面展示等高通量方法则依赖诸如流式细胞仪（FACS）等专用设备，限制了其普及性。我们将对 SMMS 技术进行优化，该技术具有高特异性、高灵敏度、低成本和快速处理等优势，用于建立一个高通量的结合分子筛选平台。

第 2 章 实验方法及原理

本研究的实验部分主要聚焦于人工智能设计的结合物分子 binder 的筛选及其与 Talin 蛋白结合能力的验证。所采用的关键实验技术和仪器包括：分子克隆与蛋白表达、荧光偏振实验、pull-down 实验、蛋白质印迹（Western blotting）、全内反射荧光显微镜（TIRF）、磁镊（magnetic tweezers）技术以及单分子力学筛选（SMMS: single-molecule-mechanical-selection）pull-down 实验。

2.1 细胞及细菌实验

2.1.1 分子克隆与蛋白表达

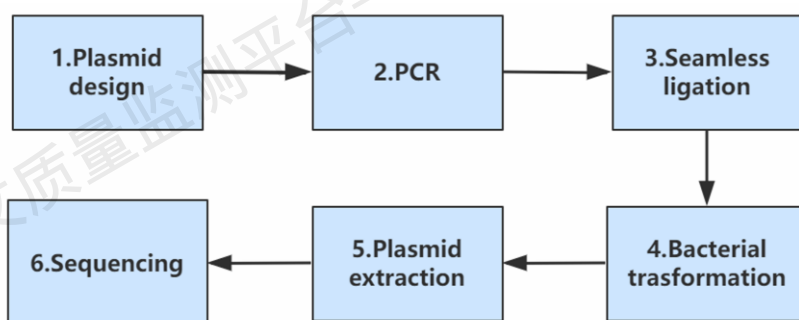


图 2.1: 分子克隆流程图

分子克隆是一种通过将目标基因片段插入载体并在宿主细胞中扩增，从而实现基因表达或功能研究的 DNA 重组技术。首先，在 SnapGene 软件中根据实验需求选择合适的表达载体（如 PET151），并引入特定标签（如 His、FLAG、GST、AVI 或 GFP）。随后，利用聚合酶链式反应（PCR）扩增目标基因序列，同时对质粒骨架进行扩增以获得去除插入片段的线性载体，相关质粒和引物从 IDT gBlock 和 RxnReady primer pool 采购。之后，采用无缝克隆技术（如 Gibson Assembly 或 HIFI 连接）将扩增后的基因片段插入载体中，以提高克隆效率与准确性。构建完成后，将重组质粒转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中，并通过抗生素筛选阳性克隆。随后进行小规模质粒提取，并将提取得到的质粒送样测序，

以验证插入序列的正确性。测序结果确认无误后, 继续进行下游实验, 包括大规模质粒扩增及蛋白表达等。

本研究采用原核表达系统。首先, 将测序验证无误的重组质粒转化至表达宿主菌株 (如大肠杆菌 BL21), 通过抗生素筛选获得阳性克隆。随后挑取单个克隆接种于含相应抗生素的液体培养基中, 在 37°C、摇床条件下培养, 直至菌液生长至对数生长期。当培养液在 600 nm 波长处的光密度 (OD_{600}) 达到 0.6–0.8 时, 加入异丙基- β -D-1-硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导蛋白表达。根据目标蛋白的性质, 对诱导条件 (包括 IPTG 浓度、温度及诱导时间) 进行优化, 以获得较高的蛋白溶解度。诱导完成后, 通过离心收集菌体, 并重悬于裂解缓冲液中, 利用超声波破碎细胞以释放表达的蛋白。裂解液经高速离心去除细胞碎片, 收集上清中可溶性蛋白部分。通过 SDS-PAGE 检测蛋白条带, 初步确认目标蛋白的成功表达。对于带有亲和标签 (如 GST、MBP 或 GFP) 的重组蛋白, 分别使用谷胱甘肽琼脂糖磁珠、麦芽糖磁珠或 GFP-Trap 磁珠进行亲和纯化, 洗脱等。

纯化后的蛋白进一步通过透析处理, 以去除非特异性结合的杂质组分, 并置换至合适的储存缓冲液 (如 PBS 或 Tris-HCl), 为后续的结构与功能研究做好准备。此外, 蛋白浓度通过 BCA 蛋白定量法 (Bicinchoninic Acid Protein Assay) 进行测定。成功表达并纯化的蛋白可用于后续实验, 例如通过 pull-down 实验和荧光偏振法对蛋白-蛋白相互作用 (PPI) 进行定量分析。

2.1.2 荧光偏振实验

本研究采用荧光偏振 (Fluorescence Polarization, FP) 技术, 该方法是一种非破坏性测量荧光配体与大分子之间结合情况的手段。只要具备合适的荧光标记配体, FP 技术即可适用于任何纯化的配体结合体系。该方法能够在无需放射性标记的前提下, 实现对低亲和力相互作用的实时监测^[76]。在本研究中, 我们利用该技术测定了表达的带有 MBP 标签的 Talin 蛋白与一系列 Megfp 标记的 binder (配体) 之间的结合亲和力。

当一个带有荧光标记的小分子配体在受到平面偏振光激发后, 由于在激发与发射之间的短暂时间内发生快速旋转, 其发射光通常呈现去偏振状态 (见图 2.2a)。然而, 当该配体与较大的分子 (如蛋白质) 结合后, 其转动速度显著减慢, 从而使发射光在激发光平面中保留更高程度的偏振性 (见图 2.2b)。

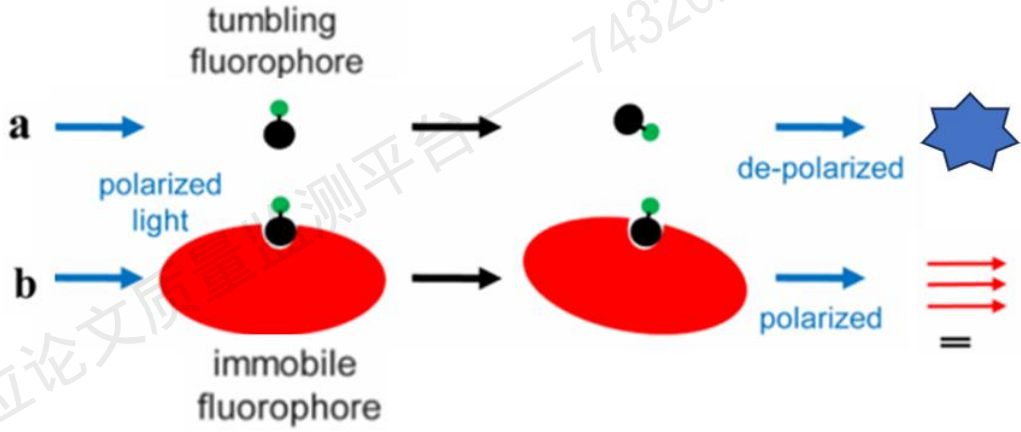


图 2.2: 通过荧光偏振分析配体结合情况 (Adapted from Rossi and Taylor, 2011)。(a) 自由状态下的小分子荧光配体在溶液中被平面偏振光激发 (黑色为小分子, 绿色是它所带荧光分子)。自由状态下的分子在其荧光寿命期间会发生转动, 转动会导致被荧光分子被偏振光激发后的发射光方向去偏振化。(b) 当小分子和一个大质量分子 (红色) 结合后, 其有效体积增大, 转动速度减慢, 从而使发射光在与激发光相同平面内保持偏振状态的比例增加 [76]。

通过监测荧光偏振值的变化, 可以判断配体是否与蛋白发生结合。进而可以利用这些结合信息计算结合亲和力, 如解离常数 (K_d) 等。荧光偏振值 (P) 通常可通过以下公式计算:

$$P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}} \quad (2.1)$$

其中, I_{\parallel} 和 I_{\perp} 分别表示沿激发光偏振方向和垂直于该方向检测到的荧光强度。较高的各向异性值表明分子转动受限程度更高, 意味着结合相互作用更强; 而较低各向异性值则表明结合较弱或不存在结合。



其中, 解离常数 K_d 定义为:

$$K_d = \frac{[P][L]}{[PL]} \quad (2.3)$$

总浓度的守恒关系为:

$$c_0^{R3} = [R] + [RL] \quad (2.4a)$$

$$c_0^{Binder} = [L] + [RL] \quad (2.4b)$$

其中, c_0^{R3} 表示 $R3$ 的总浓度, c_0^{Binder} 表示 binder 的总浓度。结合分数定义为:

$$\alpha = \frac{[RL]}{c_0^{Binder}} \Rightarrow [RL] = \alpha \cdot c_0^{Binder} \quad (2.5)$$

在本实验中, 荧光标记配体的浓度固定为 $[L]_T$, 而蛋白浓度 $[R]_T$ 为变量。实验步骤概述如下:

1. 配制一系列不同浓度的蛋白 Talin 溶液[R]。

2. 在每种蛋白浓度下测量各向异性值 P 。由于游离态配体分子较小，在溶液中旋转较快，因而其测得各向异性值较低，记为 P_f ；而当配体与蛋白结合形成较大复合物后，其转动显著受限，对应的各向异性值则较高，记为 P_b 。完全游离状态和完全结合状态对应的偏振值 P_f 和 P_b ，分别通过在0 nM 和饱和浓度（8000 nM）R3 条件下的测量获得。随后，根据下式计算每一个滴定点的结合分数 α ：

$$\alpha = \frac{P - P_f}{P_b - P_f} \quad (2.6)$$

3. 基于上述公式，可推导出相应的拟合模型。随后使用数据分析软件对实验数据进行非线性拟合分析可得 K_d ：

$$\alpha^2 - \frac{c_0^{R3} + c_0^{Binder} + K_d}{c_0^{Binder}} \alpha + \frac{c_0^{R3}}{c_0^{Binder}} = 0 \quad (2.7)$$

2.1.3 细胞培养与转染

将 HeLa 细胞放在含有 10%胎牛血清（FBS）的 Dulbecco 改良型 Eagle 培养基（DMEM）中并置于 37°C、5% CO₂ 湿润培养箱中维持培养，以模拟生理条件。培养基每 2–3 天更换一次，当细胞融合度达到约 80–90%时进行传代。

在具体实验操作前，将细胞接种于合适的培养皿或多孔板中，并静置过夜以促使其贴壁。次日，使用 JetPrime 转染试剂将前期分子克隆实验获得的编码设计肽类 binder 的质粒转染入细胞。细胞被分为四组：两个实验组（binder-EGFP，分别对应 talin 敲除与未敲除状态）和两个对照组（仅表达 EGFP，分别对应 talin 敲除与未敲除状态）。转染完成后，细胞继续培养至所需时间点，随后进行免疫染色等后续实验。

2.1.4 细胞迁移实验

本研究采用划痕实验（wound healing assay）检测细胞的迁移速度。具体方法为：HeLa 细胞在含 10%胎牛血清（FBS）的 Dulbecco 改良型 Eagle 培养基（DMEM）中于 37°C、5% CO₂ 湿润培养箱中培养，直至细胞融合度达到 80–90%。随后分别转染 EGFP 或 EGFP-binder 质粒，转染 24 小时后更换为无血清的 DMEM，以抑制细胞增殖的影响。使用无菌移液枪头在细胞单层上划出一条均匀的划痕（即“伤口”），划痕后用磷酸盐缓冲液（PBS）轻柔冲洗以去除细胞碎片。随后在 6–24 小时内定时拍摄细胞迁移图像，并利用图像分析软件对剩余伤口区域进行量

化,以评估伤口愈合程度。所有实验均重复三次,以确保结果的可重复性与可靠性。

2.2 细胞黏附斑的荧光成像分析

本研究利用荧光成像技术观察在引入 binder 前后细胞黏附斑的变化。首先,将细胞培养并转染表达 paxillin-EGFP 构建体,以可视化黏附斑的分布和形态。在基础条件下,通过全内反射荧光显微镜(Total Internal Reflection Fluorescence, TIRF)观察到清晰且边界明确的黏附斑结构。

2.2.1 免疫染色实验

本实验通过免疫染色观察 HeLa 细胞中黏附斑标志蛋白 Paxillin 来定位黏着斑。HELA 细胞在含 10%胎牛血清(FBS)的 Dulbecco 改良型 Eagle 培养基(DMEM)中,并于 37°C、5% CO₂ 湿润培养箱中培养。转染 EGFP 或 EGFP-binder 24 小时后,将细胞接种于带玻片底的培养皿中,并使用 4%多聚甲醛在室温下固定 15 分钟。随后采用 0.1% Triton X-100(溶于 PBS)对细胞进行通透处理 10 分钟,再使用 5%牛血清白蛋白(BSA)封闭 1 小时,以阻断非特异性结合。之后,将细胞置于 4°C 环境中,孵育一抗(Paxillin, ab32084, Abcam)过夜。PBS 洗涤后,加入荧光标记的二抗(Invitrogen A21422),在室温下孵育 1 小时。成像采用全内反射荧光显微镜(TIRF)进行,并使用 ImageJ 软件分析 Paxillin 的定位情况。

2.2.2 全内反射荧光显微镜(TIRF)成像

TIRF 显微镜(全内反射荧光显微镜)是一种强有力的光学成像技术,能够选择性地激发并成像位于细胞质膜附近的荧光分子。该技术利用全内反射所产生的局部激发场——即倏逝波(evanescent wave)来实现极高的轴向分辨率(约 100–200 nm)。当激光束从高折射率介质(如玻片)中传播,并以大于临界角的入射角照射到低折射率介质(如含细胞的水溶液)界面时,会发生全内反射(Total Internal Reflection, TIR)。虽然激光束会完全反射回玻片中,但在介质交界面处会形成一个倏逝的电磁场。该电磁场不会在细胞液中传播,而是以指数形式迅速衰减,仅可穿透约 100–200 nm 的深度^[77]。因此,只有位于此浅层区域内的荧光分

子，比如如位于基底质膜上的分子，能够被激发，而胞质中较深处的荧光分子则不会被激发，从而不产生背景信号。

这种选择性激发极大地减少了焦外荧光背景干扰，使得 TIRF 成像在研究细胞表面附近事件（如黏附斑动态变化、膜蛋白聚集或受体-配体相互作用等）方面具有极高的灵敏度与分辨率。

在本研究中，TIRF 显微镜被应用于观察经 EGFP 转染后 HeLa 细胞中免疫染色的 Paxillin 所发出的荧光信号。TIRF 技术使我们能够在细胞腹侧膜（即黏附斑形成区域）选择性地监测 Paxillin 的定位与聚集状态，并有效排除胞质背景干扰。

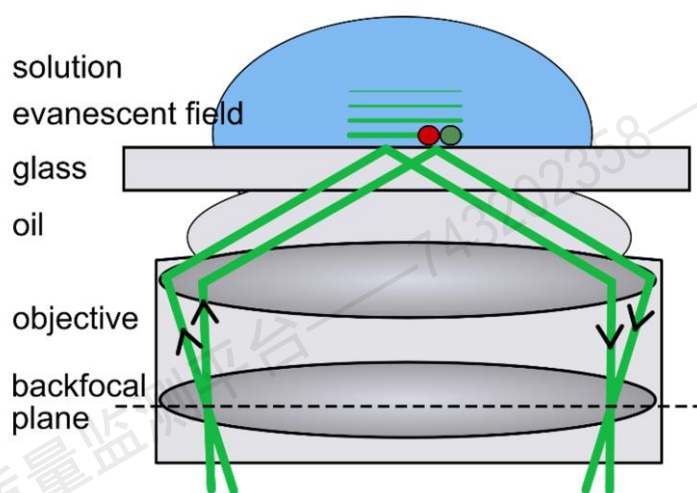


图 2.3: TIRF 显微镜的成像原理 (Adapted from Axelrod, 2001)。激光在玻片与样品之间的界面发生全内反射，产生一个消逝波场，用于激发样品与玻璃交界面的荧光分子^[77]。

在成像过程中，TIRF 显微镜配备了适用于 EGFP 和 Cy5 激发的相应激光通道。EGFP 荧光用于识别转染成功的细胞，而 Cy5 荧光则标记 Paxillin 的定位信息。通过对这两种荧光信号的联合检测，能够高特异性、高分辨率地获取目标 EGFP 阳性细胞中黏附斑的空间分布情况。随后，使用 ImageJ 软件对获取的图像进行分析，突出显示 Paxillin 的定位，并统计细胞中 Paxillin 的斑点大小与数量。

2.3 单分子磁镊实验

我们采用磁镊 (magnetic tweezers) 装置对 Talin 在结合肽作用下对力响应行为的调控效果进行单分子水平的探测。磁镊是一种能够在纳米尺度上对单个分子施加稳定、可控张力的实验技术，广泛应用于蛋白质构象变化与分子力学行为的

研究。其基本原理是通过调节磁铁的位置来调节作用于带有微米级超顺磁性颗粒（磁珠）的生物分子的磁场梯度，从而精确控制施加在磁珠以及其链接的生物分子（蛋白等）上的外力，且这个外力可以精确到 pN 量级，精度远高于 AFM^[78]。在本研究中，我们使用了课题组自行搭建的磁镊装置进行单分子操控实验，其原理示意如图 2.4 所示。蛋白结构域在展开过程中会引起磁珠高度的突然上升，由此可判断蛋白结构域的机械稳定性及其展开长度。该方法不仅可用于观察外力诱导下的蛋白伸展过程，还可监测蛋白结构域的展开与复折行为。

2.3.1 磁镊实验的装置与原理

本研究所采用的磁镊系统为基于奥林巴斯 X71 显微镜平台自建的高精度单分子力谱实验装置。系统核心由一对永磁体构成，安装在显微镜顶部，并通过纳米定位系统（VT 40, Physik Instrumente）精确调控其与样品之间的垂直距离，从而实现对外加磁力的微调。显微镜下部配备压电驱动的载物平台及高数值孔径油镜物镜，可实现亚纳米级别的焦距控制，确保成像稳定性与空间分辨率。

在实验中，目标蛋白的一端通过 SpyCatcher/SpyTag 反应固定在底部盖玻片表面，另一端则连接于功能化的超顺磁性磁珠（M270，来源于 Dynabeads）^[79]。磁珠置于磁铁下方时，在非均匀磁场作用下沿垂直方向（z 轴）受到拉力，其大小依赖于磁铁-磁珠间距。具体而言，当该距离由约 4.5 mm 缩短至 1 mm 时，所施加的拉力可从约 1 pN 增至 40 pN，具有良好的力控动态范围。

由于磁珠在受力方向上的位移对力大小的反馈影响极小，磁镊系统本身具备类“力钳”（force-clamp）模式，能够在实验过程中施加稳定、恒定的外力。这一特性使其特别适用于蛋白质的构象变化研究，尤其是力敏结构域的解折叠、构象跃迁及其在不同条件下的动力学行为分析。

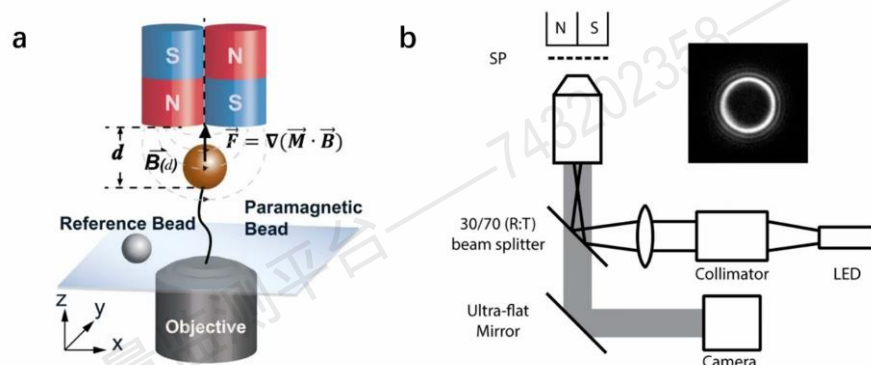


图 2.4: 磁镊实验的基本装置与原理示意图 (Adapted from You et al., 2017)。(a) 磁镊原理图：目标蛋白分子一端锚定于玻片表面，另一端连接至功能化的超顺磁性磁珠。磁珠置于

两块永磁体之间，受磁场梯度作用产生 z 轴方向的拉力 $\vec{F} = \nabla(\vec{M} \cdot \vec{B})$ ，该力大小可通过控制磁体 - 样品之间的距离 d 进行调节。参考珠用于漂移校正。(b) 反射照明磁镊系统的光学结构图。LED 光源经准直器照射入样品，反射光经 30/70 分光镜及超平反射镜导入 CCD 相机，实现磁珠位置的环形衍射成像（如右上示意图所示）。通过追踪磁珠中心位置，可高精度测定其在 z 轴方向上的位移变化，从而反演蛋白的构象状态^[78]。

2.3.2 力的定量标定

理论上，施加在分子连接结构（tether）上的力可以通过分析磁珠在 x - y 平面内的热运动来确定，该运动可视为具有有效长度 l_e 的单摆运动。所施加力 F 可通过以下公式计算：

$$F \approx \frac{k_B T}{d^2} l_e \quad (2.8)$$

其中， k_B 为玻尔兹曼常数， T 为温度， d^2 表示磁珠在 y 方向上的热涨落方差。在图 2.5 所示的磁珠连接结构中，有效摆长 l_e 为分子延展长度 l_0 与磁珠半径 r 之和。磁珠的热涨落方差可以通过图像分析获得，从而计算出施加在磁珠上的力^[80]。

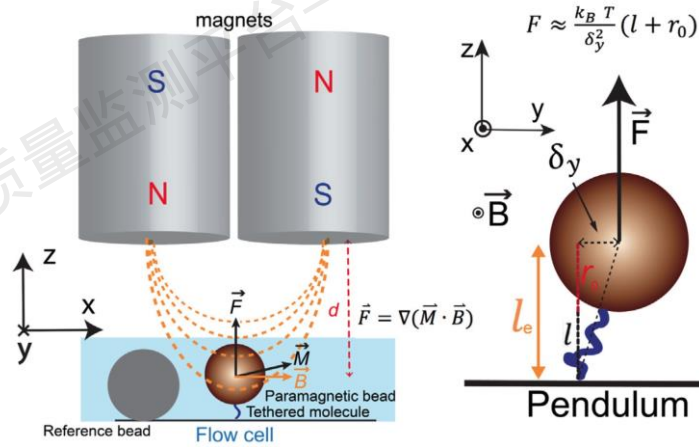


图 2.5: 基于磁珠热涨落的力标定示意图 (Adapted from You et al., 2017)。左图: 展示磁场方向 \vec{B} 、磁珠磁化方向 \vec{M} 及施加力 \vec{F} 的关系。右图: 有效摆长 l_e 为磁珠半径 r 与分子延展长度 l 之和^[78]。

2.3.3 磁镊实验中的典型测量内容

在磁镊实验中,常见的测量内容包括单分子蛋白质的解折叠(unfolding)与再折叠(refolding)、构象跃迁、延展长度变化及力-长度关系等。通过记录磁珠在 z 轴方向的位移,可以实时追踪分子的延伸状态,并与所施加的外力进行相关分析,从而建立分子的力-构象响应曲线。当逐步增大施加在分子两端的拉力时,蛋白质结构中的螺旋束、 β 折叠等亚结构可能依次展开,表现为突跃式的长度增加(stepwise extension),每一级构象变化均可对应特定的延展长度与跃迁力值。通过统计这些跃迁事件,可获得蛋白的解折叠路径、能垒高度及动力学参数。

在恒力模式(force-clamp)下,磁镊系统可持续施加稳定拉力,观察蛋白质在该力值下的稳定构象与动力学行为,包括折叠-展开之间的双稳态跃迁。这些特征可借助 Hidden Markov Model (HMM) 分析识别,并从轨迹中获得跃迁速率(k_{on}/k_{off})等动力学参数。除恒定拉力条件下的力谱测量外,磁镊系统还可通过快速改变磁铁位置,实现跳变力(force-jump)实验模式。该模式模拟了细胞中力快速变化的生理环境,适用于研究蛋白质在不同力阈值下的构象转变速率与顺序。相较于恒力模式,跳力模式可避免在中间力值区间长时间停留,减少力钳中应力稳定化对蛋白构象稳定性的干扰,特别适用于研究多态结构之间的转换动力学(如 Talin 中 R9-R13 等模体)^[64]。

2.4 传统 pull-down 实验与蛋白质印迹(Western Blot)分析

Pull-down 实验是一种广泛应用于研究蛋白-蛋白及蛋白-配体相互作用的经典生化技术。该方法依赖于将带有亲和标签的诱饵蛋白(bait protein)固定在固相载体(如磁珠)上,从细胞裂解液或纯化体系中捕获与其发生相互作用的猎物蛋白(preys protein)。结合完成后,通过洗涤去除未结合的成分,保留的特异性结合蛋白则可通过 SDS-PAGE、电泳转膜(Western blot)或质谱等方式进行后续分析。

Pull-down 实验的核心原理是基于亲和力的相互作用捕获。通常,将诱饵蛋白(目标蛋白)与亲和标签(如 GST 标签)融合表达,并固定于对应的亲和树脂上(如用于结合 GST 蛋白的谷胱甘肽磁珠)。随后将含有潜在相互作用蛋白(如预扩展肽段)的样品加入,在优化的条件下与固定化的诱饵蛋白孵育。孵育完成

后，采用洗涤步骤去除非特异性结合蛋白，仅保留与诱饵蛋白特异性结合的猎物蛋白，最终通过 SDS-PAGE 和 Western blot 等手段进行进一步分析。

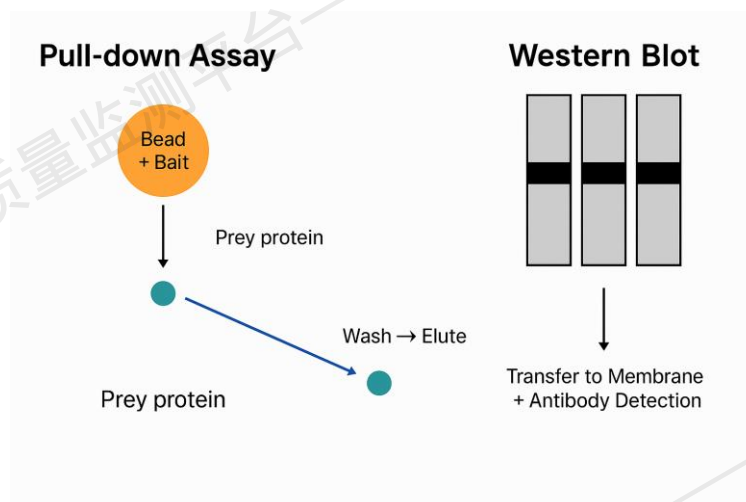


图 2.6: Pull-down 实验与蛋白质印迹 (Western Blot)

蛋白质印迹 (Western blot) 是一种在复杂样品中检测特定蛋白的生物技术。该过程首先通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 按分子量对蛋白进行分离。电泳完成后，蛋白由凝胶转移至膜上 (通常为 PVDF 膜或硝酸纤维素膜)，该膜作为后续免疫检测的固相载体。为了防止非特异性结合，膜首先使用封闭液 (如 BSA) 进行封闭处理，随后加入可特异性识别目标蛋白的一抗，经过过夜孵育后，再加入与偶联有酶或荧光分子的二抗，孵育数小时使其与一抗充分结合。依据所用二抗的类型，可通过化学发光、荧光或比色法对目标蛋白进行可视化。Western blot 具有高度的灵敏性与特异性，是验证蛋白表达、测定分子量以及研究蛋白-蛋白相互作用的重要手段。

在本研究中，为验证 Talin R3 与各 binder 之间的相互作用，采用了 GST pull-down 实验对其结合能力进行评估。实验中，Talin R3 携带 AVI 标签，而各 binder 与 GST 融合表达。纯化后的 GST-tagged binder 在 PBS 中与谷胱甘肽琼脂糖磁珠于 4°C 缓慢旋转孵育过夜，使其固定于磁珠上。经三次洗涤以去除未结合蛋白后，向结合磁珠的 binder 中加入 AVI-tagged Talin R3，并继续在 4°C 孵育过夜。之后再次洗涤以去除非特异性结合成分，最终通过加入 SDS-PAGE 上样缓冲液，在 95°C 加热 5 分钟以洗脱结合蛋白。GST pull-down 的结果通过 Western blot 进行分析。首先在 10% SDS-PAGE 胶中分离蛋白，并将其转膜至 PVDF 膜上。膜用 5% 脱脂奶粉 TBS-T 溶液封闭 1 小时，然后在 4°C 条件下用抗 AVI 抗体 (CST 10643S) 与抗 GST 抗体 (CST 2624) 在含 5% BSA 的 TBS-T 缓冲液中孵育过夜。洗膜后，加入 HRP 标记的二抗，在室温下孵育 1 小时。最终，使用增强型化学

发光试剂 (Clarity ECL Substrate, Bio-Rad) 显影, 并通过 ChemiDoc Go 成像系统 (Bio-Rad) 进行图像采集。

2.5 基于 SMMS 的 Pull-down 实验用于蛋白-蛋白相互作用 (PPI) 检测

本课题组开发了一种名为 SMMS (Single-Molecule Mechanical Selection, 单分子力学筛选) 的试剂盒, 目前可用于实现 pull-down 实验以检测蛋白-蛋白相互作用 (PPI)。SMMS 检测 PPI 的原理示意图如图 2.7A 所示。其中, 标注为灰色的待分析物代表待研究的蛋白-蛋白相互作用复合物。为了检测该相互作用, 我们在方法上借鉴了传统 pull-down 实验的原理。具体而言, 我们使用涂有传感器 A 的磁珠来在缓冲液中 pull down PPI 复合物中的其中一个组分, 孵育约 30 分钟。孵育完成后, 通过洗涤步骤去除未结合的蛋白以及非特异性结合。此时, 磁珠表面已经结合了完整的 PPI 复合物 (蛋白 A 与蛋白 B, 灰色部分)。随后, 这些磁珠被洗涤后重悬于缓冲液中, 并转移至测试孔中 (如图 2.7B 所示), 每个孔中含有不同浓度的蛋白 B。

每个测试孔的底部 (图 2.7A 中蓝色区域) 预先包被有传感器 B (黄色), 该传感器可特异性结合蛋白 B (图中灰色圆形结构)。在加入磁珠后, 进行 30 分钟孵育, 以促使复合物中的蛋白 B 与底部传感器结合。随后, 将微孔板插入水盒中, 并使用磁针施加磁力作用 1 分钟。这段短时间的磁力足以移除那些仅包被蛋白 A 的磁珠 (即未形成真正 PPI 复合物的磁珠), 从而有效排除非特异性结合。由于传感器 A (蓝色) 仅捕获蛋白 A, 传感器 B 则仅结合蛋白 B, 因此最终保留在孔底表面的磁珠即反映了蛋白 A 与蛋白 B 之间的特异性相互作用。孔底保留的磁珠数量可作为两种蛋白相互作用强度的定量指标: 相互作用蛋白 B 的浓度越高, 形成的 PPI 复合物越多, 保留在孔底的磁珠数量也越多。这一过程展示了 SMMS (单分子力学筛选) 技术在灵敏、定量检测蛋白-蛋白相互作用中的基本原理。

目前开发的 16 孔检测试剂盒可实现多重 PPI 检测, 其装置如图 2.7B-C 所示, 后续计划扩展至 96 孔板, 以实现更高通量的检测。该 PPI 检测系统的主要硬件组件包括: 16 孔检测试剂盒 (可加载不同浓度的待测样品)、用于固定试剂盒并协助其插入水盒的橡胶圈、水盒 (用于去除系统中的气泡) 以及磁针 (用于去除非特异性结合的磁珠)。基于孔底保留磁珠的表面密度, 信号读取方式可分

为两种：一种是通过 CCD 拍摄图像后，肉眼观察颜色强度进行直观判断(图 2.7C)；另一种是施加外力后，通过低倍光学显微镜采集图像。

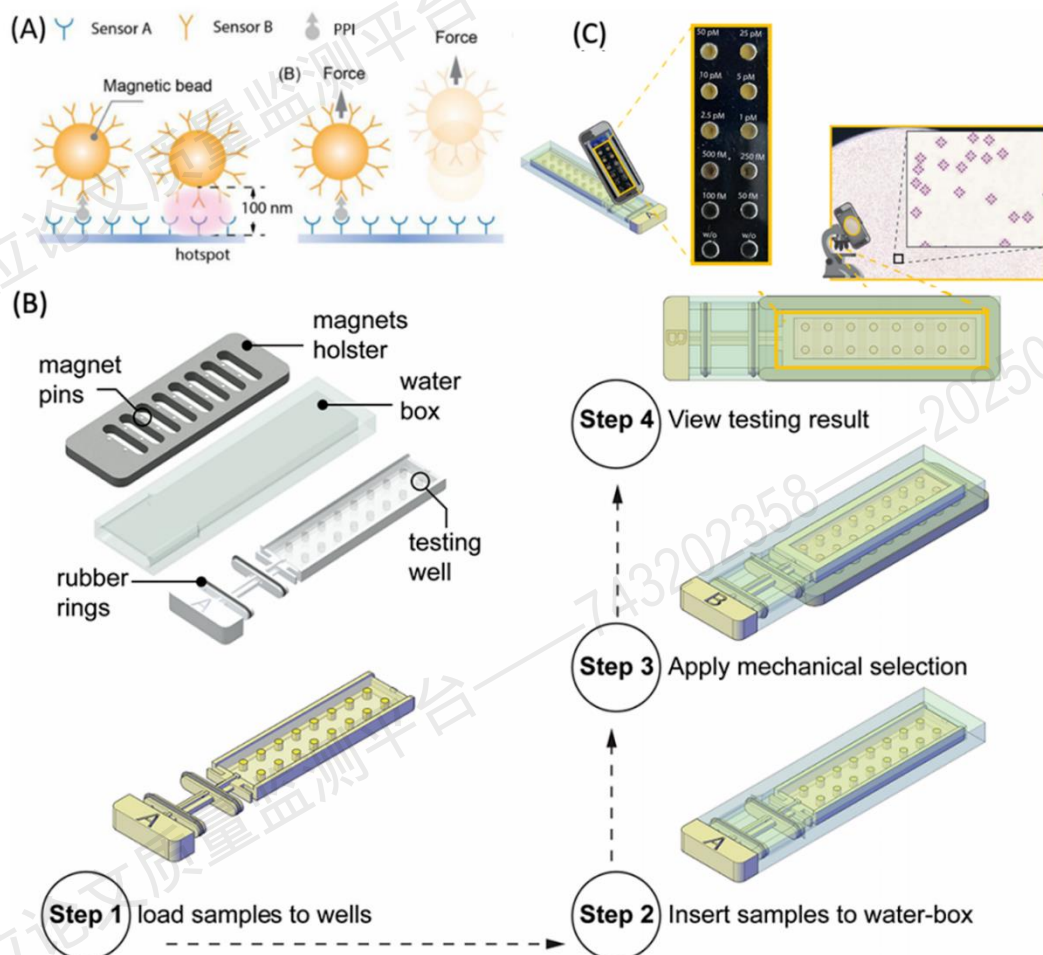


图 2.7 基于 SMMS 的高通量蛋白-蛋白相互作用 (PPI) 检测 (Adapted from Zhou et al., 2023)。 (A) SMMS 检测原理示意图：微珠在孔底表面附近形成局部热点区域，用于构建特异性的传感器 A/PPI/传感器 B 复合物。施加经过校准的磁力可迅速去除未连接或非特异性连接的磁珠。该依赖于外力的解离步骤的施加时间经过精确调控，以确保在最低分析物浓度下的阳性对照中保留足够密度的磁珠，同时在阴性对照（不含分析物）中最大限度降低背景信号。本研究开发了 16 孔检测试剂盒。 (B) 基于 SMMS 的高通量 PPI 检测实验的装置与流程图。 (C) 通过光学显微镜拍摄的孔底保留磁珠的图像。

第 3 章 验证 AI 设计的肽结合物功能

在获得基于人工智能工具设计的 binder 后,我们通过计算模拟与实验手段对其效能进行了验证。计算验证部分采用分子动力学 (Molecular Dynamics, MD) 模拟方法进行分析;实验验证则借助第二章中介绍的多种技术手段,包括细胞体外与体内实验,从多个层面评估 binder 的结合能力与功能表现。

3.1 分子动力学 (MD) 模拟验证结合物

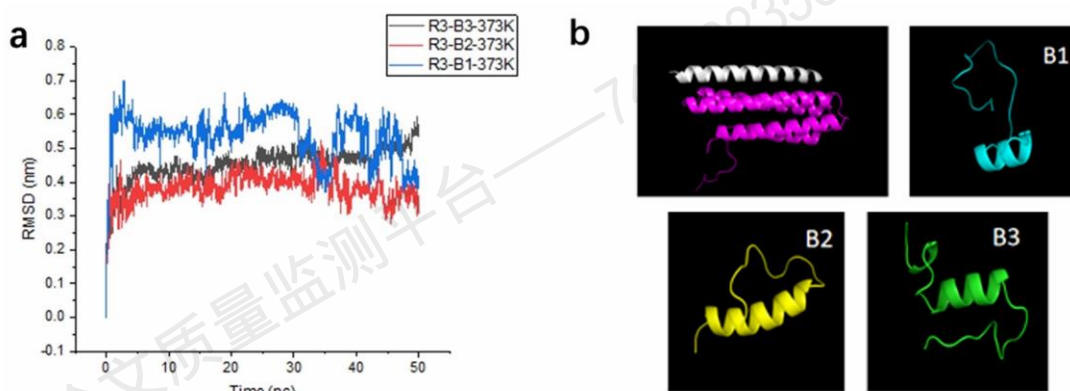


图 3.1: (a) R3 与各 binder 形成的复合物的 RMSD 分析。B1、B2 和 B3 分别以蓝色、红色和黑色标注。(b) B1 至 B3 在 310 K 下模拟 200 ns 后的构象行为分析。

在进行分子动力学模拟前,本课题采用 AlphaFold 对设计获得的各 binder 与 Talin R3 结构域的结合情况进行预测分析。每个设计的 binder 与 Talin R3 的氨基酸序列分别作为输入进行建模。随后计算其结合界面的 PAE 值(interface Predicted Aligned Error, iPAE),并以该指标评估结合构象的可信度。根据 IpaE 评分,筛选出排名前 3 的序列,作为后续分子动力学模拟与实验验证的对象。

在分子动力学 (MD) 模拟中,我们分别对 Talin R3 与每个 binder 形成的复合物进行模拟,以比较它们的结合亲和力与稳定性。具体方法为:将各结合复合物置于高温水盒中,理论上结合亲和力较强的 binder 应表现出更小的结构波动。复合物被置于含 150 mM NaCl 的溶液中,并采用显式 SPC 水模型进行模拟^[81]。MD 模拟使用 GROMACS 2019.6plumed2 版本完成,采用 AMBER99SB-ILDN 力场参数^[82]。每组模拟包含 50 ns 的平衡相 (equilibration phase) 与 50 ns 的生产相

(production phase), 在带有周期性边界条件的 NVT 系综中进行, 体系总体积维持在约 2000–4000 nm³ 之间, 温度设定为 300–373 K 不等。我们采用目标复合物的 RMSD (均方根偏差) 值作为评估结合稳定性的指标。

如图 3.1a 所示, R3-B2 复合物的 RMSD 值明显低于与 B1 或 B3 结合的复合物, 说明 B2 与 Talin R3 之间的结合最为稳定。从图 3.1b 进一步观察, 在 310 K 下模拟 200 ns 后, B1 仅维持了 2 个螺旋结构, 其余结构发生无序化; B3 维持了 3 至 4 个螺旋结构; 而 B2 则保持了与初始构象最为相似的状态, 几乎维持了 5 个螺旋。这两组模拟结果均表明, 在 B1 至 B3 候选 binder 中, B2 是与 R3 结合最稳定的肽类 binder。

3.2 细胞体外验证结合物有效性

3.2.1 Binder 以中等亲和力与 Talin R3 结合

首先用 pull-down 实验验证本研究从 AI 设计获得的 binder 序列中筛选出排名前三的候选序列。我们采用 GST pull-down 实验评估 binder 与 Talin R3 结构域之间的相互作用。实验中, binder 融合表达了 GST 标签和 EGFP 标签, Talin R3 则携带 AVI 标签。两种蛋白均在 BL21 大肠杆菌中表达并纯化。将两种蛋白按 1:1 摩尔比混合, 并使用抗 GST 标签磁珠进行 pull-down 实验以收集 GST 标记的 binder 蛋白, 随后通过 Western blot 检测 GST 标签与 AVI 标签的存在情况。如图 3.2a 所示, binder2 显示出最显著的与 Talin R3 的结合信号, binder1 也具有一定的结合能力, 而 binder3 未检测到明显的 Talin R3 条带信号, 这些结果与前述图 3.1 中的计算预测结果一致。在阴性对照组中, binder 所携带的另一中 tag EGFP 未与 Talin R3 发生结合, 排除了相关干扰。

因此, 我们选择 binder2 用于荧光偏振实验验证。我们用 thrombin 酶切除 binder 所带 GST 标签, 此时该 binder 仅携带 GFP 标签。在未与 R3 结合时, binder 在溶液中的旋转速度较快, 因而荧光偏振值较低; 一旦与 R3 结合, 分子整体尺寸增大, 旋转速度减慢, 从而导致荧光偏振值升高。通过测定荧光偏振值, 可判断 binder 与 R3 的结合比例, 进而计算其结合亲和力。

Binder 和 R3 蛋白均由大肠杆菌表达并纯化。在实验中, 每个孔中加入 500 nM 的 GFP 标记 binder, 并对 R3 进行滴定, 使其终浓度在 0 nM 至 8 μ M 之间变化。反应体系在室温下孵育 1 小时, 以确保结合达到平衡。每组条件重复三次。实验结果显示, 结合状态下 binder 的荧光偏振值约为 80 mP。通过将实验数据拟

合至公式(2.7)，计算得出其解离常数 (K_d) 为 276 nM (如图 3.2b 所示)。结果表明，该 binder 能够以中等亲和力与 Talin R3 发生特异性结合。

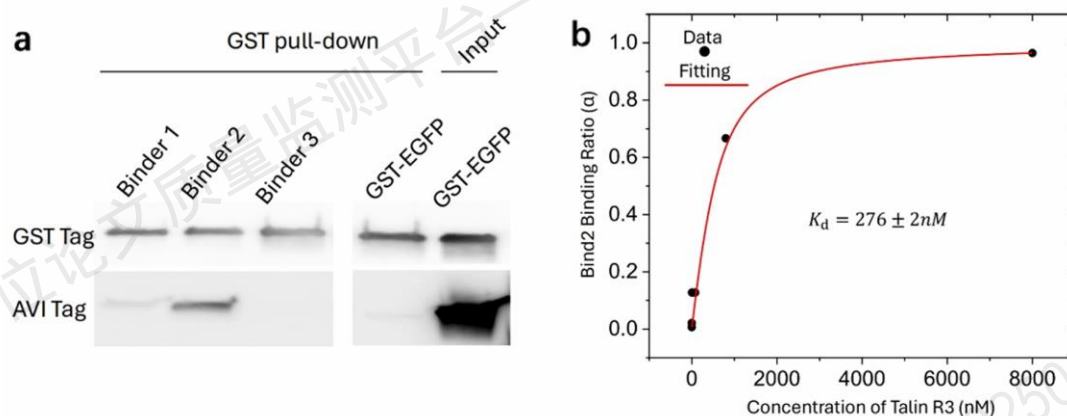


图 3.2: (a) Binder 与 Talin 的 GST pull-down 实验结果。图中从左至右依次显示五组样品。前三条泳道分别代表含有 Talin 与 binder1、binder2、binder3 的混合物进行的 GST pull-down 实验。其中，binder2 显示出最强的 AVI 标签信号，Binder1 显示出较弱信号，表明其虽可结合但亲和力较低；而 binder3 未检测到任何 AVI 标签信号，说明其在本实验条件下未能与 Talin 发生结合。第四泳道为阴性对照，使用 GST-EGFP 与 Talin 的混合物进行 pull-down，以排除 binder 中 EGFP 标签可能带来的干扰。第五泳道为输入样品（阳性对照），即未经过 pull-down 操作的 GST-EGFP 与 Talin 混合物，显示出最强的 AVI 标签信号，说明原始溶液中 Talin 浓度较高。(b) 通过荧光偏振实验定量测定 Binder2 与 Talin R3 的结合亲和力。图中的黑色 data point 表示各浓度的 R3 上 binder2 被 R3 结合的比例；红色拟合曲线则依据公式 2.7 进行非线性拟合所得，反映了二者的结合关系。

3.2.2 Talin R3 的拉伸曲线分析

为进一步验证 binder 与 Talin R3 之间的结合强度，我们开展了单分子磁镊实验，实验装置如图 3.3a 左侧所示。如图中所示，当在 Talin R3 上施加 pN 级别的外力时，其结构会在折叠态与展开态之间迅速转换。然而，当体系中加入 $1 \mu M$ 的 binder 后，R3 可长时间稳定维持在折叠状态，其平均“锁定时间”约为 10 秒。这一现象与我们设计 binder 以特异性识别并稳定 R3 折叠态的目标高度一致。进一步通过定量分析发现，在该条件下，Talin R3 的平均锁定时间约为 10 秒（见图 3.4）。

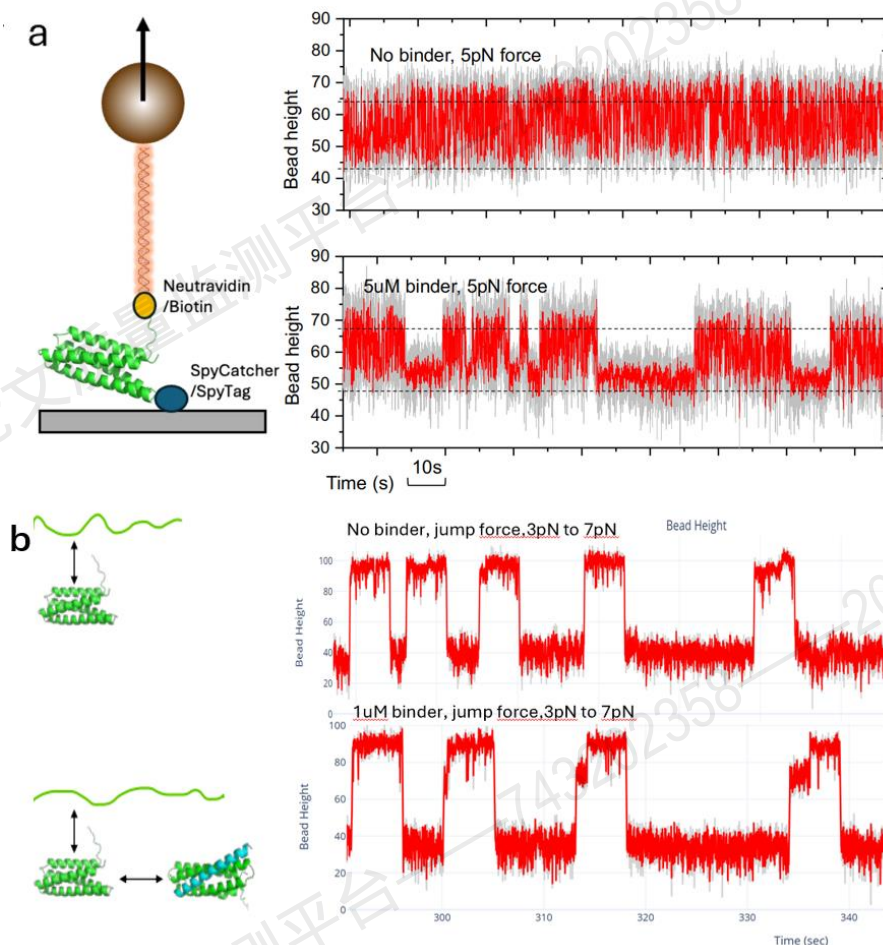


图 3.3: (a) 左图: 单分子操控实验装置示意图。包含 Talin R1-R3 的蛋白构建体在 N 端标记 AVI 标签, 在 C 端标记 Halo 标签, 并被连接于磁珠与玻璃盖玻片之间, 形成单分子拉伸构型。右图: binder 锁定 Talin R3 的折叠态。上图: 磁珠高度波动显示 Talin R3 结构域在无 binder 条件下频繁发生快速的折叠与解折叠行为, 比例约为 1:1。下图: 在加入 5 μM binder 后, Talin R3 偶尔会长时间稳定维持在折叠态。(b) 在 3 pN 与 7 pN 周期性加载力条件下, Talin R3 的拉伸曲线。图中展示了 290 s 至 370 s 之间的一个循环过程, 实际总循环时间约为 3000 s。

从图 3.3b 可观察到, 在加入 1 μM binder 的条件下, 即使施加较高的外力, Talin R3 结构域也未完全展开。磁珠高度在部分时间段内稳定在约 80 nm (图中黑框区域), 表明 binder 有效抑制了 R3 向完全展开态的转变。该现象反映了 binder 结合引发的 R3 结构域在部分折叠构象下的稳定化效应。推测 binder 的结合提高了 R3 结构域完全展开所需的能垒, 使其即使在较高机械力下也倾向维持在半折叠状态。在实际进行的 3000 秒“跳力”实验中, 每一循环持续约 80 秒, 共观测到 19 次类似于上述的结合事件 (见图 3.5)。

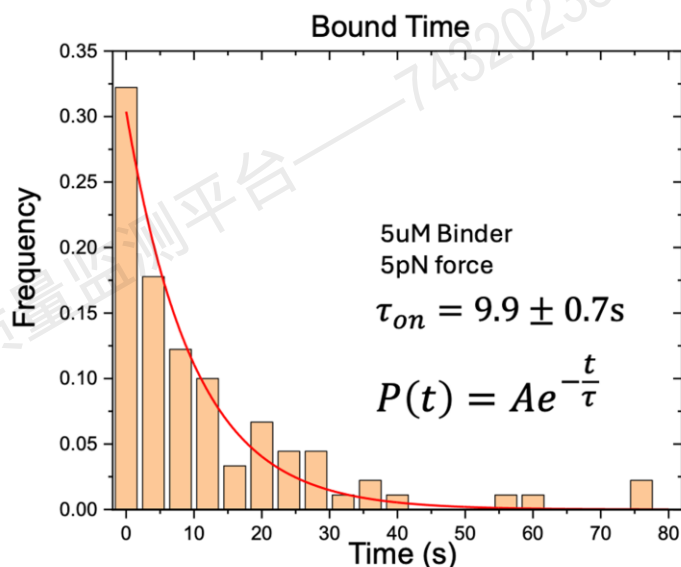


图 3.4: Talin R3 处于锁定状态的驻留时间分析。柱状图显示了 Talin R3 保持在折叠锁定状态下的驻留时间分布。这些时间间隔数据来源于原始实验数据的统计分析。

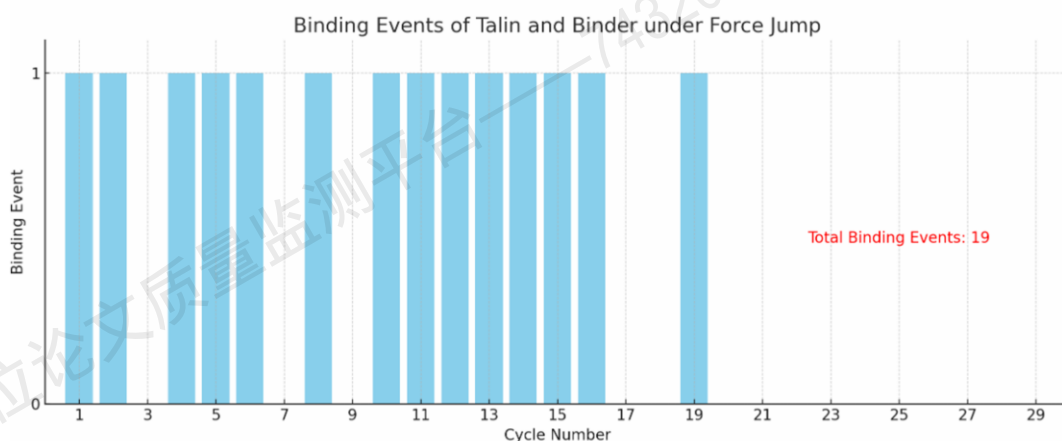


图 3.5: Talin 与 Binder 在 3 pN 至 7 pN 力跳条件下的结合事件统计。纵轴中, 数值为 1 表示该循环中发生了结合事件, 数值为 0 表示未发生结合。在共计 30 次力跳循环中, 共观测到 19 次结合事件, 每次结合事件持续约 1–2 秒。

3.3 细胞体内验证结合物有效性

接下来我们进一步探究该 binder 在细胞水平上是否具有生物学效应。相关实验选用 HeLa 细胞进行, 这是一种 Talin1 表达水平相对较高的细胞系。

3.3.1 引入 Binder 减少细胞黏附斑尺寸

HeLa 细胞接种于经纤连蛋白包被的玻片底培养皿中，随后转染带有 EGFP 标签的 binder，转染试剂为 Lipofectamine 3000，以仅表达 EGFP 的细胞作为对照组。转染 24 小时后，对细胞进行固定并进行免疫染色。黏附斑标志蛋白 Paxillin 被用于可视化细胞黏附斑的位置与大小。实验结果如图 3.6 所示，在转染 binder 后，细胞平均铺展面积有所减少，表明细胞铺展能力在一定程度上受到抑制。细胞面积的统计分析显示，p 值为 0.052，提示该变化为中等程度，但尚未达到统计学显著差异。此外，如图 3.7 所示，转染 binder 的细胞中，黏附斑面积亦呈现出下降趋势。

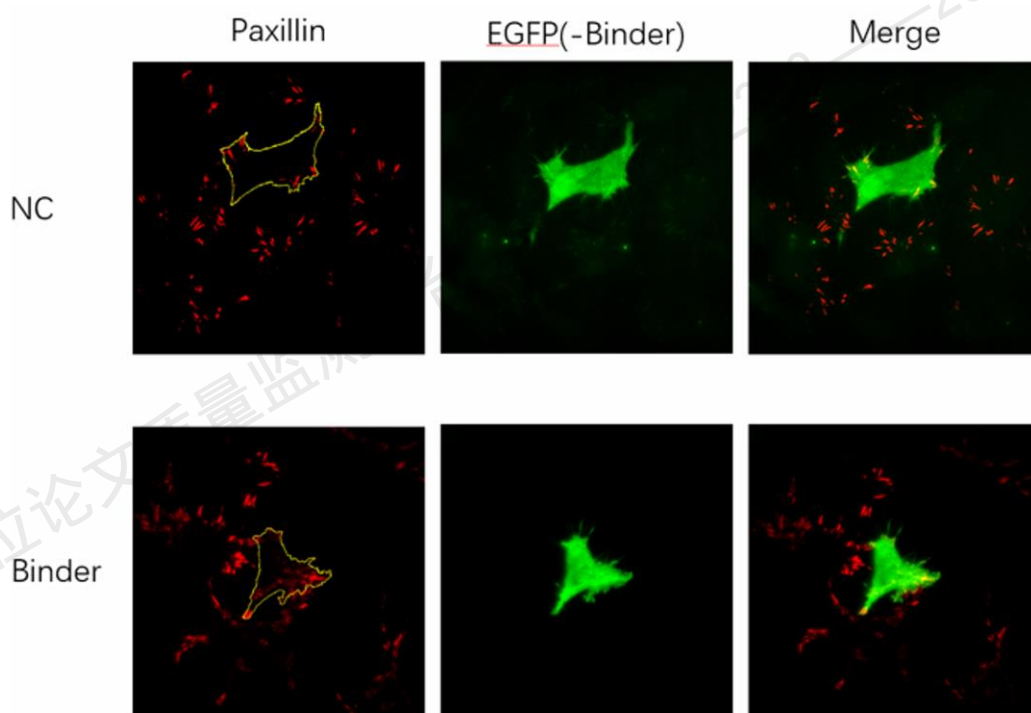


图 3.6: 染色后细胞的代表性图像。红色通道表示 Paxillin 染色信号，绿色通道显示转染了 EGFP (NC 组，阴性对照，未转染 binder) 或 EGFP-Binder 的细胞。在每个固定细胞的玻片底培养皿中，随机选取约 15 个细胞用于分析，图中展示的是其中一个典型细胞的成像结果。绿色荧光表明 EGFP 成功转染进入细胞。图像第三列为合并通道图，用于定位选中细胞中 Paxillin 的表达区域。借助 ImageJ 软件，对选中细胞的轮廓面积以及对应的 Paxillin 阳性区域面积进行测量，并据此得出图 3.7 中呈现的数据。

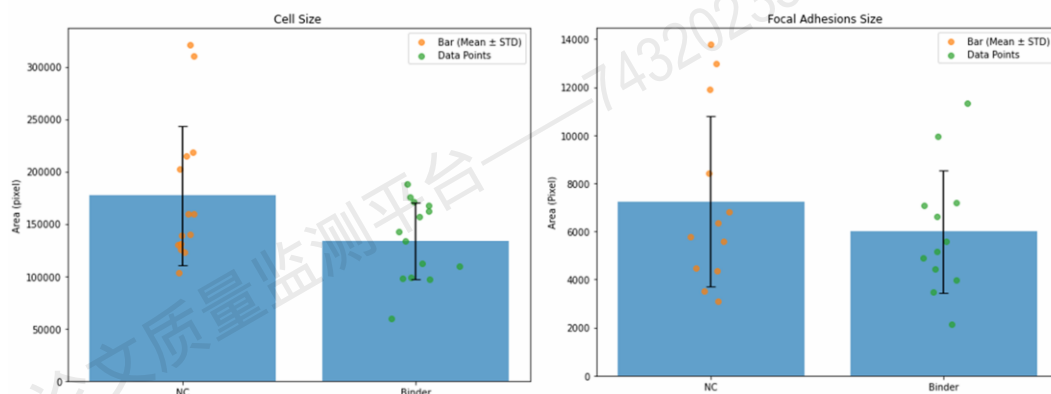


图 3.7: 细胞面积及黏附斑 (FAs) 面积的定量分析。与阴性对照组相比, binder 处理组的细胞面积明显较小; 同时, binder 处理组的平均黏附斑尺寸也显著减小。

3.3.2 引入 Binder 后细胞迁移速度下降

为检验 binder 的引入是否对细胞迁移产生影响, 我们开展了划痕实验 (wound healing assay)。具体方法为: 将 HeLa 细胞接种于 6 孔板中, 待细胞融合度达到 100% 后, 在每孔中部划出一道伤口。随后更换为无血清培养基, 以排除细胞分裂对实验结果的干扰, 并在不同时间点观察伤口愈合情况, 从而评估细胞迁移速度。如图 3.8 所示, 与对照组相比, 转染 binder 的细胞其迁移速度明显下降, 表明 binder 在细胞内可有效抑制迁移行为。

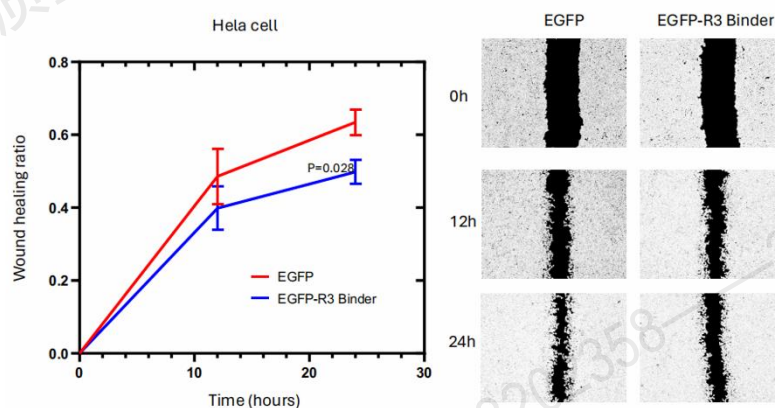


图 3.8: Binder 显著降低细胞迁移速度。右图: 划痕实验的代表性成像图。左列为仅转染 EGFP 的对照组, 右列为转染 EGFP-Binder 的实验组。图像分别在划痕处理后的 0 小时、12 小时和 24 小时拍摄。实验共重复三次。左图: 伤口愈合率的定量分析。红色曲线表示对照组, 蓝色曲线表示 Binder 处理组。Binder 组的伤口愈合率明显低于对照组, 表明其细胞迁移速度显著减慢。

3.3.3 体内 Pull-down 实验

为进一步验证 binder 是否能在细胞内与 Talin 发生相互作用，我们将编码 binder-EGFP 融合蛋白或仅编码 EGFP（阴性对照）的质粒转染至 HeLa 细胞中。成功转染的细胞在荧光显微镜下表现出绿色荧光。当约 80% 的细胞呈现荧光信号后，使用裂解液对细胞进行裂解，并离心去除细胞碎片。所得上清液中包含目标蛋白，即表达的 binder 与 Talin 蛋白。随后，我们进行了 GFP pull-down 实验以检测 binder 与 Talin R3 结构域之间的相互作用。使用包被抗-GFP 抗体的磁珠富集 GFP 标签的 binder 蛋白，并通过 Western blot 分析各样品中的蛋白条带，分别使用抗-EGFP 抗体检测 binder，抗-Talin1 抗体检测 Talin。如图 3.9 所示，左图（输入对照组）验证了在细胞裂解后，EGFP 与 Talin 均成功释放至上清液中。右图（GFP pull-down 实验组）中，在 EGFP-Binder2 样品中使用抗-Talin1 抗体检测到一条较弱的条带，提示存在一定程度的相互作用；而阴性对照（仅 EGFP 组）中背景干净，未检测到 Talin1 条带，进一步支持了该相互作用的特异性。

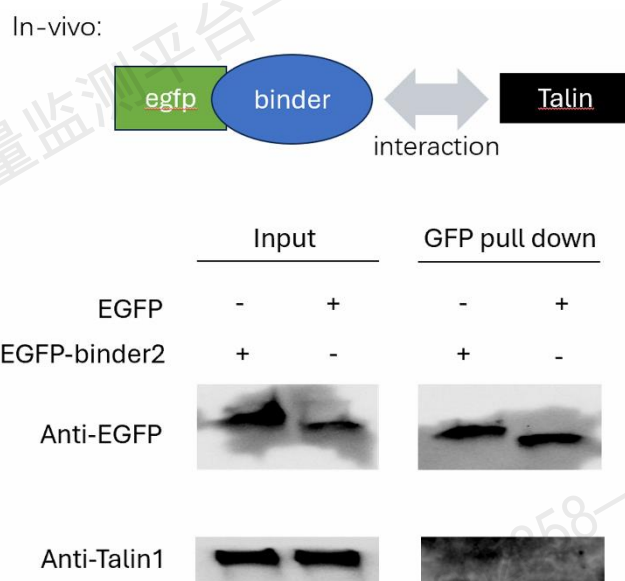


图 3.9: 体内 GFP pull-down 实验的 Western blot 条带结果。左侧两条泳道为输入对照组样品，未进行 pull-down 操作；右侧两条泳道为 GFP pull-down 结果。“+” 符号表示各样品中所含的荧光蛋白类型。第三泳道为转染 EGFP-binder 构建体的样品，第四泳道为仅转染 EGFP（无 binder）的阴性对照组。结果显示，在 EGFP-binder 样品的 GFP pull-down 泳道中检测到一条较弱的条带，提示存在一定程度的相互作用信号。

第4章 开发高通量结合物筛选平台

4.1 基于 SMMS 的高灵敏度蛋白-蛋白相互作用定量分析

我们开展了多项概念验证实验，以证明利用 SMMS 技术检测蛋白-蛋白相互作用(PPI)在多个模型体系中的可行性。这些模型体系包括：CR3022 抗体与 RBD 结构域的相互作用、ACE2 蛋白与 RBD 结构域的相互作用。上述实验均展现出极高的检测灵敏度，验证了 SMMS 技术在 PPI 定量分析中的优越性能。

4.1.1 探索蛋白-蛋白相互作用的最优检测环境

我们首先使用 CR3022 (IgG 抗体) 与生物素标记的 SARS-CoV-2 受体结合结构域 (RBD) 作为模型体系，以探索蛋白-蛋白相互作用 (PPI) 检测的最优实验条件与环境。如我们对图 2.7A 中的元素进行了对应的替换：将原有的传感器 A 及其结合对象替换为包被于板底的蛋白 A 和 CR3022 抗体（其 Fc 结构域可特异性结合蛋白 A）。传感器 B 采用中性链亲和素 (Neutravidin)，通过粘合剂固定于 M270 超顺磁性磁珠表面。生物素化的 RBD 可与包被有 Neutravidin 的磁珠形成稳定结合。

在初步实验中，我们选择了缓冲液 (PBS+2% BSA) 作为反应体系，开展 PPI 检测。首先，将 Neutravidin (传感器 B) 包被的磁珠与浓度为 10 nM 的生物素标记 RBD (Tag-B) 孵育 30 分钟。孵育后用缓冲液洗涤一次，然后与不同浓度的 CR3022 抗体 (10 nM、1 nM、100 pM、10 pM、1 pM 和 0 pM) 孵育 30 分钟。再次洗涤后，将磁珠重悬并转移至包被有蛋白 A (传感器 A) 的孔中。

实验设立了三组阴性对照：仅含磁珠、磁珠+CR3022、磁珠+RBD。在最后 30 分钟孵育后，我们在所有设定浓度下均成功检测到 CR3022 与 RBD 之间的特异性相互作用 (图 4.1)。结果表明，该基于 SMMS 的 pull-down 策略可在 90 分钟内完成完整的 PPI 检测流程，显著快于传统 pull-down 方法。此外，实验中观察到了明显的浓度依赖梯度，最低可检测浓度达到 1 pM。三组阴性对照背景信号极低，进一步验证了该方法的高特异性与高灵敏度。

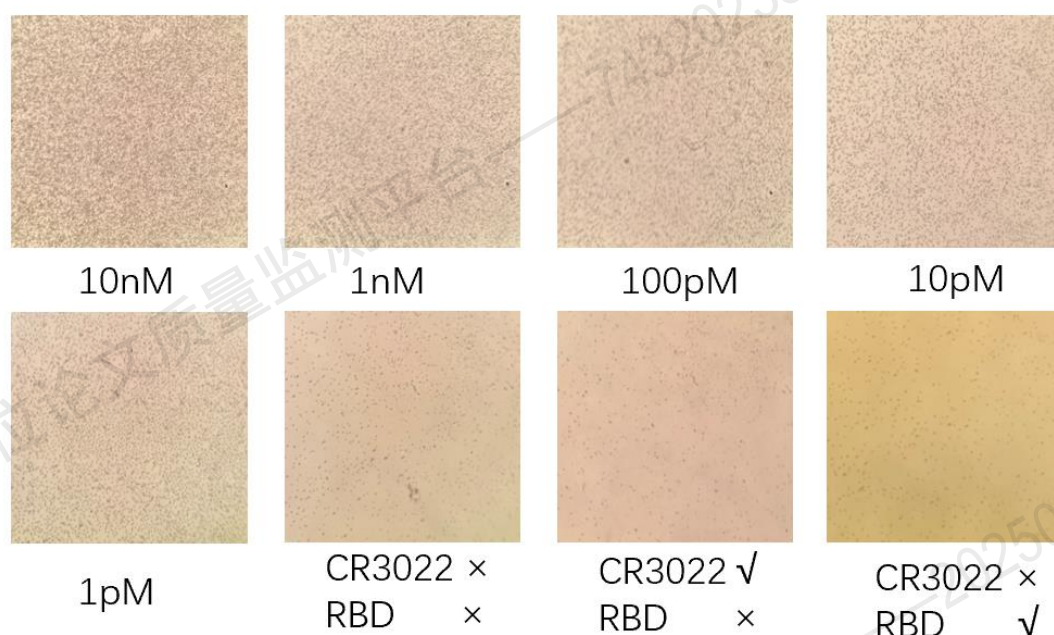


图 4.1: 在 PBS-BSA 缓冲液中, 以 10 nM RBD 和不同浓度的 CR3022 (10 nM、1 nM、100 pM、10 pM、1 pM 和 0 pM) 检测 CR3022 与 RBD 的蛋白-蛋白相互作用 (PPI)。实验结果显示出明显的浓度依赖性梯度。三组阴性对照均表现出清晰可辨的低背景信号。

随后, 我们在不同缓冲液条件下评估了磁珠 sequential pull-down 策略的检测性能, 实验方案与上述一致。使用的缓冲体系包括: PBS-BSA (2%), PBS-BSA (2%) + Tween-20 (0.1%), AT 缓冲液 (由 RIPA 和 EDTA 按 24:1 体积比混合后, 再加入 2% (w/v) 牛血清白蛋白), PBS-BSA (2%) + Tween-20 (0.1%) + NP-40 (0.1%)。其中, Tween-20 用于有效阻断非特异性背景信号, 而 NP-40 是一种常用的温和去污剂, 用于模拟细胞裂解液中蛋白的生理环境。实验结果 (图 4.2) 显示, 该磁珠 sequential pull-down 策略在 PBS-BSA (2%) + Tween-20 (0.1%) 和 PBS-BSA (2%) + Tween-20 (0.1%) + NP-40 (0.1%) 缓冲液中均表现出良好的检测效果, 并能清晰显示出浓度依赖性信号梯度。相比之下, 在 AT 缓冲液条件下未观察到明显的浓度梯度信号, 这可能是由于其中的成分 (如 EDTA 和 SDS) 破坏了溶液中蛋白的构象完整性, 从而削弱了正向检测信号。

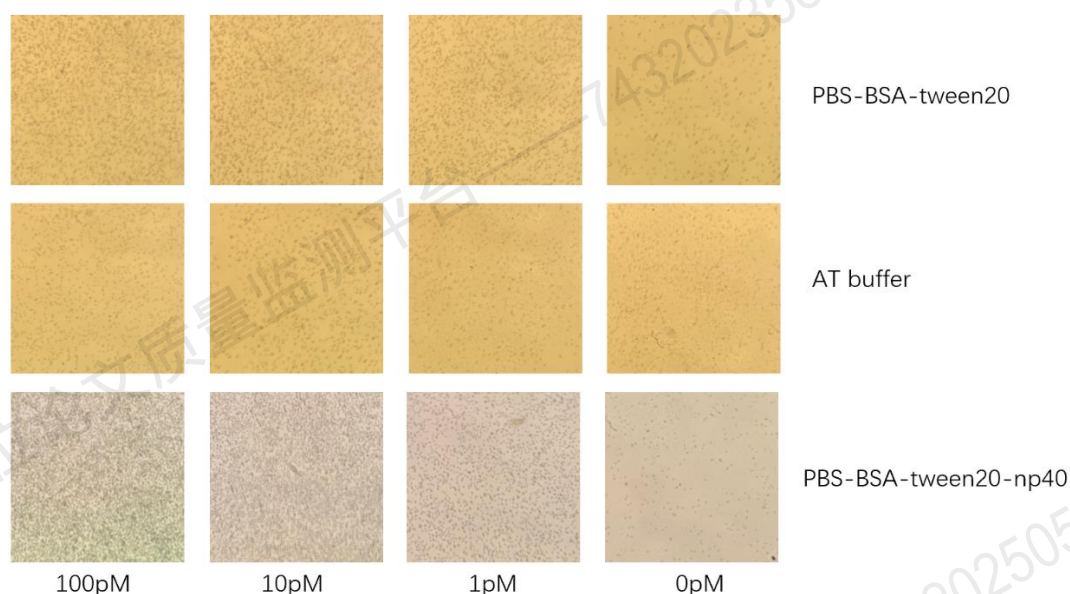


图 4.2: 在不同缓冲液条件下, 以 10 nM RBD 和不同浓度的 CR3022 (100 pM、10 pM、1 pM 和 0 pM) 检测 CR3022 与 RBD 的蛋白-蛋白相互作用 (PPI)。

接下来, 我们对 pull-down 实验流程进行进一步优化, 并选定 PBS-BSA-Tween20 作为后续实验的工作缓冲液。图 4.3a 所示的实验均采用磁珠串联 pull-down (bead sequential pull-down) 策略进行。此外, 我们引入了另一种并行 pull-down 实验流程 (bead/well parallel pull-down, 如图 4.3c 所示)。在该方案中, Neutravidin (传感器 A) 包被的超顺磁性微珠与浓度为 10 nM 的生物素 (Tag-A) 标记 RBD 进行 30 分钟孵育。同时, 包被有蛋白 A (传感器 B) 的孔中分别加入不同浓度的 CR3022 抗体 (100 pM、10 pM、1 pM、0 pM), 以模拟两种蛋白质浓度悬殊的检测情形, 其中 0 pM 为阴性对照。30 分钟孵育后, 磁珠被回收、重悬于工作缓冲液中, 并转移至已处理的孔中。经过 20 分钟孵育, CR3022 与 RBD 的相互作用在所有设定浓度下均被成功检测到。该结果表明, 在 bead/well 并行 pull-down 模式下, 基于 SMMS 的 PPI 检测流程可在 60 分钟内完成, 并且该方法对结合蛋白之间浓度比严重失衡的情况具有良好适应性。与 sequential pull-down 相比, 该方法表现出更强的正向信号与更干净的背景信号, 同时仍保持清晰的浓度依赖性梯度。

在磁珠预混 (bead premix pull-down) 实验流程中 (图 4.3b), 其与磁珠串联 pull-down (bead sequential pull-down) 的唯一区别在于: CR3022 和 RBD 在不同浓度条件下预先混合后, 直接与磁珠共同孵育 30 分钟。随后进行洗涤与重悬, 并将磁珠加入孔中继续孵育 30 分钟。该策略意图通过省略初始的 30 分钟预孵育步骤, 以缩短整体实验时间。然而, 实验结果显示, 即便在 100 pM 浓度下也未

观察到明显的阳性信号，1 nM 下的信号强度与 sequential pull-down 中 100 pM 所获得的信号相当。因此，该预混流程不适用于后续的高灵敏度实验。

此外，在孔内预混（well premix pull-down，图 4.3d）实验中，表现结果与磁珠预混组（图 4.3b）一致，同样未能获得良好的阳性信号。这进一步说明预混策略在当前体系下并不适合作为标准检测流程。

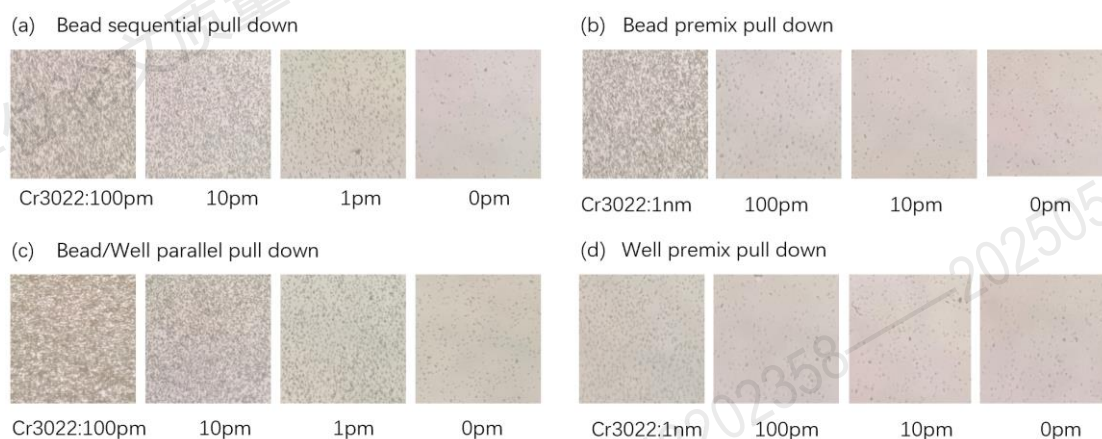


图 4.3: 在 10 nM RBD 条件下，采用不同实验流程检测 CR3022 与 RBD 的蛋白-蛋白相互作用（PPI），CR3022 浓度设为多个梯度。(a) 磁珠串联 pull-down（Bead sequential pull-down）；(b) 磁珠预混 pull-down（Bead premix pull-down）；(c) 磁珠/孔并行 pull-down（Bead/Well parallel pull-down）；(d) 孔内预混 pull-down（Well premix pull-down）

我们进一步在细胞裂解液中重复了相关实验。具体流程如下：将 COS-7 细胞在含有 10% FBS 和 1% 青霉素/链霉素的 DMEM 培养基中维持培养。尽管 COS-7 并非酵母细胞系，但其裂解产物可用于模拟复杂的细胞裂解液环境。细胞经离心收集后，在添加蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液中裂解。裂解后再次离心，收集澄清的上清液，并分为两组，分别进行磁珠串联 pull-down（bead sequential pull-down）和磁珠/孔并行 pull-down（bead/well parallel pull-down）实验。在两组实验中分别加入不同浓度梯度的 CR3022 或 RBD 以评估相互作用。如图 4.4 所示，在细胞裂解液中获得的检测结果与工作缓冲液中的实验结果几乎一致，说明经离心处理后的细胞裂解液在以工作缓冲液进行梯度稀释后，依然能够维持低背景信号，并呈现出清晰的浓度依赖性响应。这表明 SMMS 平台在复杂生物样本中的适用性良好。

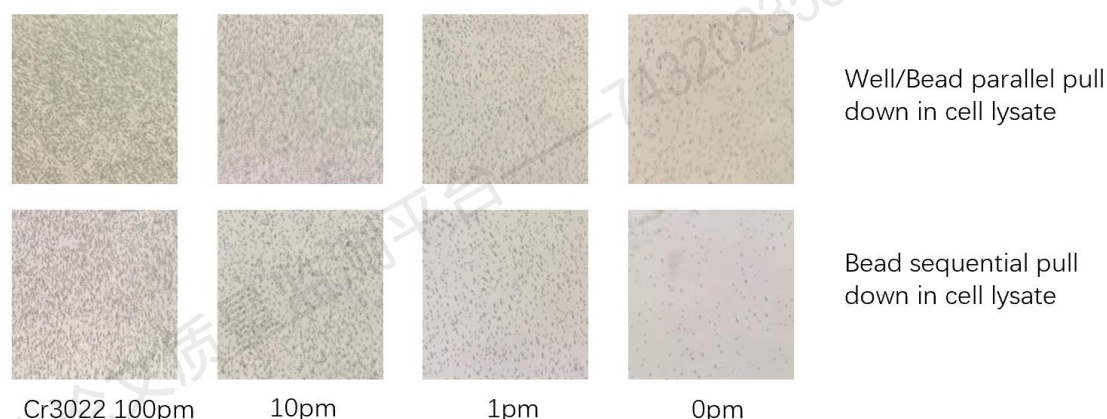


图 4.4: 在细胞裂解液中, 以 10 nM RBD 和不同浓度的 CR3022 条件下, 采用两种策略检测 CR3022 与 RBD 的蛋白-蛋白相互作用 (PPI): (1) 孔/磁珠并行 pull-down (Well/Bead Parallel Pull-down) (2) 磁珠串联 pull-down (Bead Sequential Pull-down)

4.1.2 检测常见标签的蛋白-蛋白相互作用 (PPI)

我们首先构建了一个由带有 Fc 结构域的生物素标记 ACE2 蛋白 (Tag A) 和生物素标记的 SARS-CoV-2 受体结合结构域 (RBD, Tag B) 组成的模型体系。值得注意的是, ACE2 和 RBD 都携带生物素标签, 这种构型在传统的 pull-down 结合 Western blot 的检测体系中通常不适用, 因为该方法依赖于不同标签与不同抗体的特异性识别来区分两种蛋白。然而, 在我们的 SMMS pull-down 实验中, 我们采用了孔/磁珠并行 pull-down (well/bead parallel pull-down) 策略。在此流程中, ACE2 与 RBD 分别与包被蛋白 A 的孔底表面和包被 Neutravidin 的磁珠进行独立孵育, 随后分别洗涤去除非特异性结合物。之后, 将两组反应物合并并在同一孔中共同孵育 30 分钟。尽管在该过程中可能会出现一定程度的非特异性结合 (如生物素标记的 ACE2 与磁珠表面的 Neutravidin 直接结合), 但如图 4.5 所示, 在所有测试浓度下, 阳性信号仍能明显区分于相应的阴性对照。该结果表明, 孔/磁珠并行 pull-down 策略能够有效检测携带相同亲和和标签的蛋白间的相互作用, 体现了 SMMS 平台在标签兼容性方面的独特性与创新性。

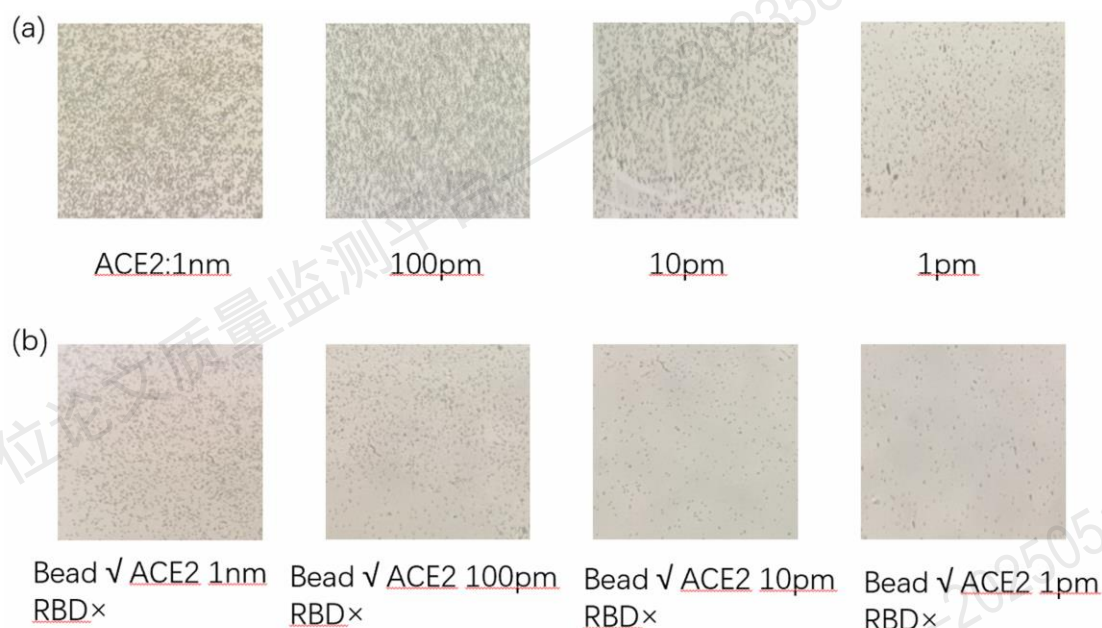


图 4.5: (a) 在 PBS-BSA-Tween20 缓冲液中, 采用孔/磁珠并行 pull-down 策略检测带有相同生物素标签的 ACE2 与 RBD 之间的蛋白-蛋白相互作用 (PPI), 其中 RBD 浓度为 10 nM, ACE2 浓度设为多个梯度。(b) 对应的阴性对照组结果。

随后, 为评估该系统在不同亲和标签条件下的通用性, 我们将 RBD 上的生物素标签替换为 His 标签, 并使用 anti-His 抗体包被磁珠, 替代原先的 Neutravidin 包被方式。如图 4.6 所示, 实验结果依然呈现出清晰的浓度梯度信号, 且各浓度对应的阴性对照组的背景干净, 表明该系统同样适用于替代标签策略, 具有良好的标签兼容性与适应性。

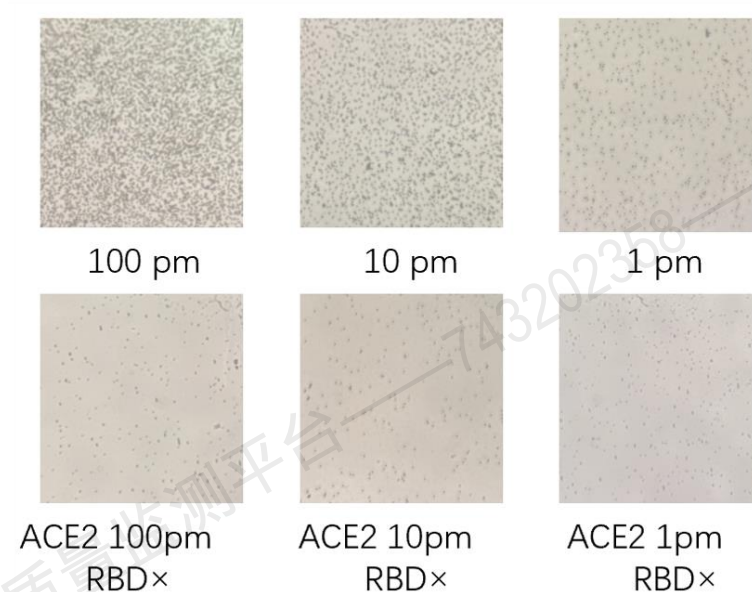


图 4.6: 在 PBS-BSA-Tween20 缓冲液中, 采用孔/磁珠并行 pull-down 策略检测 ACE2 与 RBD (此处 RBD 携带 His 标签, ACE2 为生物素标签) 之间的蛋白-蛋白相互作用

(PPI)。第一排所示数据中 RBD 浓度为 10 nM, ACE2 浓度分别为 100 pM, 10 pM, 1 pM, 第二排是其对应的阴性对照组, RBD 为 0 pM。

在上述实验结果的基础上, 我们进一步检测了携带 AVI 标签的 Talin 与携带 GST 标签的 Binder2 之间的蛋白-蛋白相互作用 (图 4.7)。在该实验中, 孔底表面包被抗-AVI 抗体, 而磁珠则包被抗-GST 抗体, 用以分别捕获 Talin 与 Binder2。然而, 实验仅获得较弱的阳性信号。这可能是由于 Talin 与 Binder2 之间的结合亲和力相对较低, 弱于此前测试的高亲和力模型对 (如 CR3022-RBD 和 ACE2-RBD)。因此, 尽管 SMMS 系统可用于不同标签组合的检测, 但在低亲和力相互作用的检测中, 信号强度可能受到一定限制。

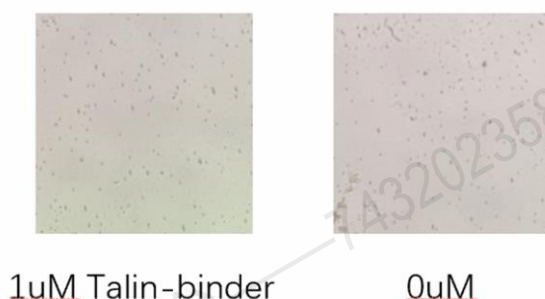


图 4.7: (a) 在 PBS 缓冲液中, GST tagged Binder 以 1 μ M 浓度、1:1 摩尔比检测携带 AVI 标签的 Talin 与携带 GST 标签的 Binder 之间的蛋白-蛋白相互作用 (PPI)。

这些结果表明, 我们开发的基于 SMMS 的检测方法非常适用于筛选高亲和力的 binder。该方法具有高灵敏度, 检测限可达皮摩尔 (picomolar) 级别, 同时相比传统的基于 Western blot 的 pull-down 实验, 显著节省时间。尽管在当前实验条件下, 该方法对低亲和力蛋白-蛋白相互作用的检测能力仍存在一定局限, 但这并不影响我们整体的研究目标——即用于高通量筛选高亲和力的 AI 设计 binder。对于结合亲和力较低 (即 K_d 较高) 的 binder, 该平台也能实现有效的筛选与剔除。

4.1.3 构建用于验证 AI 设计 Binder 的高通量筛选平台

前一小节的实验结果已充分验证了 SMMS 技术在检测蛋白-蛋白相互作用 (PPI) 中的成功应用。基于此, 我们进一步提出构建一个用于验证 AI 设计 binder 的高通量筛选平台。鉴于硕士课题时间有限, 本节所述内容主要为该平台的理论设计构想, 旨在为后续研究提供完整的技术路径与实现框架。

为了从大量 AI 预测的候选 binder 库中筛选并验证其与特定靶标蛋白的结合能力，我们设计了一种双标签系统。其中，binder 候选序列将融合 Tag A（例如生物素），以便被传感器 A（如包被 Neutravidin 的磁珠）捕获；靶标蛋白则融合 Tag B（例如 His 标签），以便固定于传感器 B（如包被 anti-his 的孔底表面）。该策略确保了 binder 与靶标蛋白之间的相互作用在高度特异性和效率下得以检测。整体工作流程如图 2.7A 所示。

表达 binder 候选分子的原核细胞将被培养在标准的深孔 96 孔板中，每个孔中转染不同的质粒，编码唯一的 binder 候选序列。蛋白表达完成后，对细胞进行裂解，释放出含 binder 的裂解液，并立即加入广谱蛋白酶抑制剂混合物，以防止蛋白快速降解。随后，向每个孔中加入包被有传感器 A 的磁珠，以捕获携带 Tag A 的 binder 候选蛋白。此步骤利用了传感器-标签之间的高亲和力相互作用机制，是蛋白纯化中广泛应用的方法。孵育完成后，磁珠被回收并重悬于 PBS 等工作缓冲液中，确保只有表达成功且正确标记的 binder 候选体被保留下来，用于后续分析。

与此同时，表达 Tag B 融合靶标蛋白的原核细胞将在另一管中培养并裂解。裂解液经高速离心去除细胞碎片，收集上清液，其中含有目标蛋白。该上清液随后被分配至预包被有传感器 B 的 SMMS 多孔板（如 96 孔板）中。经过 30 分钟孵育，使靶标蛋白与孔底结合，随后用携带 binder 候选蛋白的磁珠悬液替换掉上清液。接下来的 30 分钟孵育用于促进 binder 与靶标蛋白之间的特异性结合。之后，进行 SMMS 检测以评估是否存在目标-binder 的 PPI。此流程即为第 4.1.1 节中所述的孔/磁珠并行 pull-down（bead/well parallel pull-down）流程。另一种可选策略为：首先使用包被传感器 A 的磁珠捕获 Tag A 融合的 binder 候选蛋白（孵育 30 分钟），随后回收磁珠并将其重悬于含有 Tag B 融合目标蛋白的裂解液中继续孵育 30 分钟。第二次回收磁珠后，将其重悬于 PBS-BSA-Tween20 工作缓冲液中，并转移至 SMMS 多孔板中继续检测（孵育 30 分钟）。该流程即为磁珠串联 pull-down（bead sequential pull-down）流程。

此外，该系统还可进一步扩展应用为直接互作组图谱（Direct Interactome）高通量验证平台。通过利用 SMMS 技术的高灵敏度、高特异性和可并行处理能力，该平台不仅适用于筛选 AI 设计的高亲和力 binder，还可用于系统性绘制特定靶蛋白的直接互作网络。通过将不同候选蛋白或肽段与目标蛋白进行高通量配对检测，可在较短时间内识别出直接结合的互作伙伴，为蛋白功能研究、药物靶点挖掘、信号通路解析等提供有力的技术支持。

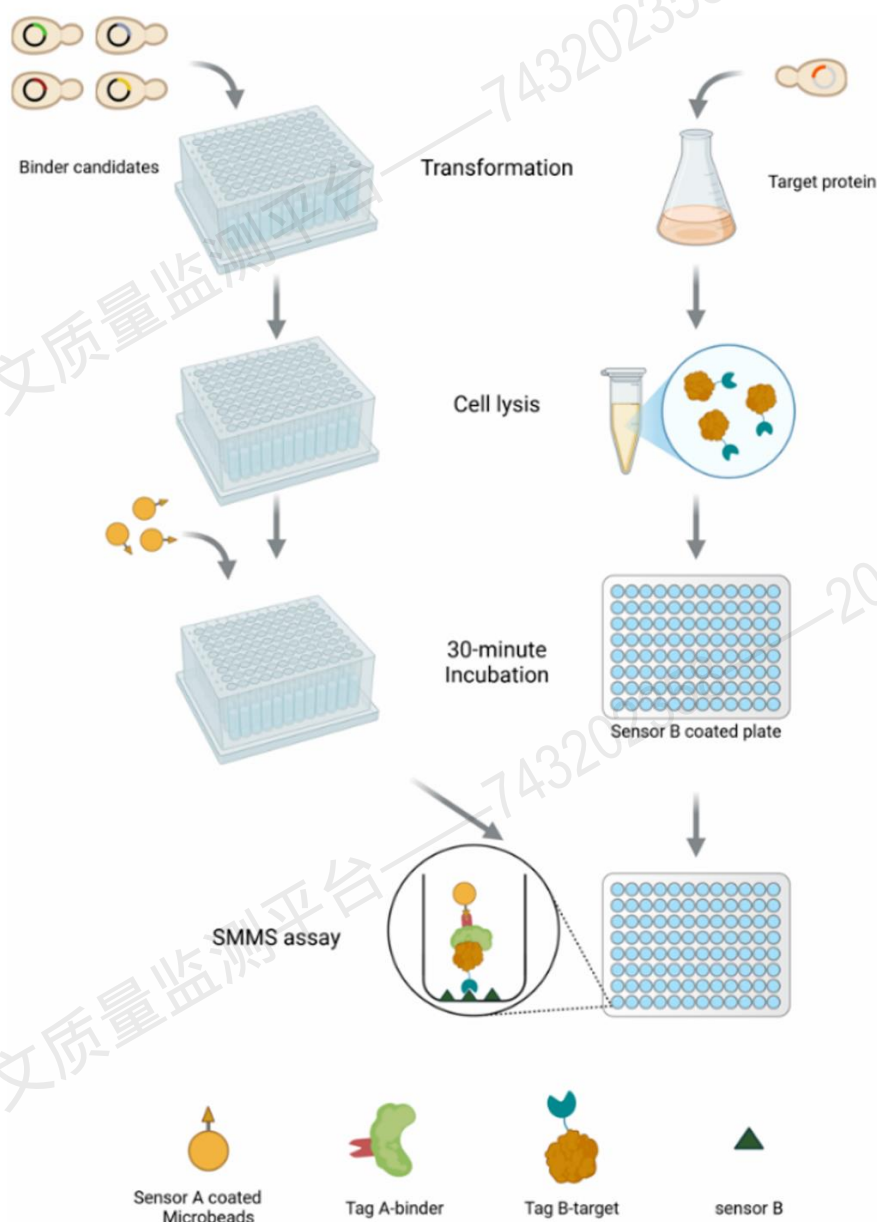


图 4.8: 从大量 AI 工程化候选序列中筛选针对特定蛋白的 binder 的设计流程图。

为了系统性绘制包含 $N=8$ 个蛋白的互作组 (Interactome) 中的蛋白-蛋白相互作用 (PPI) 图谱, 我们提出结合双标签策略与 SMMS 技术的高通量检测方案。将待测蛋白记为 P_1, P_2, \dots, P_N 。我们将在原核细胞中分别表达带有两种不同标签的同一组蛋白: A 组蛋白融合 Tag A, B 组蛋白融合 Tag B (与 Tag A 互补且互不干扰)。这种双标签策略确保每个蛋白可被唯一识别并与任意其他蛋白配对, 以用于两两相互作用的检测。表达完成后, 对原核细胞进行裂解, 并立即加入广谱蛋白酶抑制剂混合物防止降解。裂解液经高速离心澄清后, 其中一部分用于 SMMS PPI 检测, 剩余部分则储存于 -80°C 以备后用。SMMS 技术具有极高的灵敏度, 可检测低至亚皮摩尔 (sub-pM) 浓度的分析物。相比之下, 经质粒转染表

达的蛋白浓度通常可达微摩尔 (μM) 级别, 因此裂解液可在检测前稀释数个数量级。这种稀释不仅充分利用了 SMMS 的高灵敏度特性, 还允许将单一蛋白与多个潜在互作对象进行并行检测, 并有效稀释裂解液中的残留干扰成分, 从而最大限度减少其对 PPI 的影响。

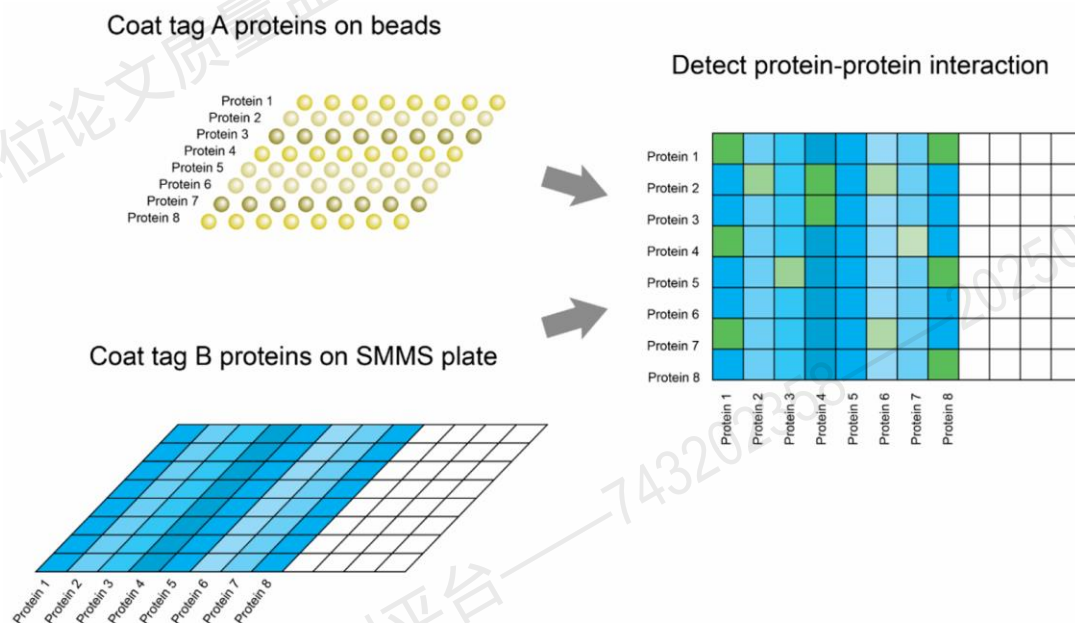


图 4.9: SMMS 技术用于八种蛋白两两之间相互作用 (PPI) 检测的示意图。Tag B 融合蛋白固定于 SMMS 板孔表面, Tag A 融合蛋白固定于超顺磁性磁珠表面。将磁珠与孔板孵育后, 可通过 SMMS 技术实现最多 64 种潜在蛋白-蛋白相互作用的高通量检测。

在 bead/well 并行 pull-down 的 SMMS 工作流程中, 稀释后的 Tag B 蛋白溶液将被转移至 SMMS 多孔板中已包被传感器 B 的孔内; 与此同时, Tag A 蛋白将在另一体系中与包被传感器 A 的超顺磁性磁珠孵育 30 分钟。孵育结束后, 磁珠将被回收并重悬于含有 BSA 和 Tween-20 的 PBS 缓冲液中。同时, SMMS 孔板中原有的 Tag B 蛋白溶液将被移除, 随后将重悬后的磁珠加入孔中继续孵育 20 分钟, 以促进蛋白-蛋白之间的特异性结合。完成孵育后, 即可进行 SMMS 检测。从裂解液上清收集到最终检测的全过程仅需约 1 小时, 大幅提高了蛋白互作验证的通量与效率。

在 bead sequential pull-down 的 SMMS 工作流程中, 首先将包被传感器 A 的超顺磁性磁珠与 Tag A 蛋白孵育 30 分钟。孵育后, 回收磁珠并将其重悬于含有 Tag B 蛋白的溶液中, 继续孵育 30 分钟, 以促进目标蛋白之间的结合。随后, 将磁珠转移至预先包被传感器 B 的 SMMS 多孔板孔中, 再次孵育 20 分钟, 最后进

行 SMMS 检测以判断是否存在蛋白-蛋白相互作用 (PPI)。从上清液收集到最终检测完成,该流程总耗时约为 1.5 小时,适用于更严格结合顺序控制的实验需求。

以 $N = 8$ 个蛋白为例,共可检测 $8 \times 8 = 64$ 组两两配对的蛋白-蛋白相互作用 ($PPI_{i,j}$),如图 4.9 所示的 PPI 矩阵。由于该矩阵具有对称性 (即 $PPI_{i,j} = PPI_{j,i}$),因此每一组潜在的互作都可在矩阵中被双重验证,从而为每一个 PPI 检测结果提供内在的交叉确认。在一个 96 孔的 SMMS 检测板中,剩余的 32 个孔可用于设定阴性对照、缓冲液空白对照及其他实验质量控制项,从而提高整个体系的准确性与可靠性。

尽管上述示例聚焦于一个 $N = 8$ 的较小规模的互作组,但该方法具备良好的可扩展性。通过在多个 96 孔板上并行开展检测实验,该策略可轻松扩展至更大规模的互作组体系。这种高度可扩展性使 SMMS 技术非常适用于复杂生物系统中的 PPI 图谱绘制,支持高通量、低人工干预的互作组研究,显著提升实验效率与自动化水平。

4.2 结果讨论

4.2.1 小结

在本研究中,我们系统性地应用人工智能工具,设计了特异性识别并结合 Talin 折叠态 R3 结构域的肽类 binder。Talin 作为关键的力敏感蛋白,在黏附斑动力学和细胞迁移过程中发挥核心作用。所设计的 binder 候选体通过多层次、多手段的策略进行了全面验证,包括计算模拟 (in silico modeling)、体外生化表征 (如 GST pull-down 实验、磁镊、荧光偏振实验) 以及细胞水平验证 (如基于 TIRF 的 Paxillin 荧光成像、细胞迁移实验和体内 GFP pull-down 实验)。在多个候选 binder 中, Binder2 表现出中等但具有潜力的结合亲和力 (K_d 约为 200–300 nM),并在多项实验中稳定发挥对 Talin R3 的结合与稳定作用。这表明 Binder2 有望作为调控细胞力传导机制的有效工具,具备良好的研究与应用前景。

我们采用分子动力学 (Molecular Dynamics, MD) 模拟对排名前三的 binder 候选体的结构稳定性与结合潜力进行了评估。在 200 ns 的模拟过程中, Binder2 显示出最低的均方根偏差 (RMSD) 值,表明其具有较高的结构完整性及良好的结合界面保持能力。这些计算预测结果在后续的体外实验中得到了验证,包括 GST pull-down 实验和荧光偏振实验。其中,荧光偏振实验测得 Binder2 与 Talin

R3 的解离常数约为 276 nM, 进一步确认了其具备中等强度但较强特异性的结合能力。

为评估 Binder2 与 Talin 相互作用所带来的力学效应, 我们开展了单分子磁镊实验。实验结果显示, Binder2 显著延长了 Talin R3 在施加周期性机械力时维持折叠态的时间。在一项具有代表性的 3000 秒力跳实验中, 共观测到 19 次明确的结合事件, 其中大部分出现在实验初期的周期内。这一结果证实了 Binder2 能在动态机械应力条件下稳定 Talin R3 的折叠构象, 表明其具备作为力敏调控因子的潜力。

为进一步验证 Binder2 的在细胞内的功能作用, 我们在 HeLa 细胞中转染了携带 EGFP 标签的 Binder2 并开展相关细胞实验。通过 Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF) 显微镜对免疫染色的 Paxillin 进行成像发现, 相较于对照组, 表达 Binder2 的细胞黏附斑面积明显减少, 细胞铺展能力下降。在划痕实验中, 表达 Binder2 的细胞迁移速度显著降低, 提示 binder 在细胞水平上能够干扰 Talin 的功能及其参与的黏附斑动力学过程。为进一步验证该结合作用的细胞内特异性, 我们对细胞裂解液进行了 GFP pull-down 实验。Western blot 结果显示, 在 anti-Talin1 抗体的检测下, Binder2 表达组出现了特异性但较弱的 Talin 条带, 而 EGFP 仅表达的对照组则未检测到信号。这说明 Talin 与 Binder2 的相互作用具有特异性, 且该作用依赖于 Binder2 的存在。

为拓展 binder 的验证体系, 我们开发了名为单分子机械选择 (Single-Molecule Mechanical Selection, SMMS) 的新型检测方法, 用于快速且高灵敏地定量蛋白-蛋白相互作用 (PPI)。该技术通过施加机械力场, 根据分子结合寿命与结合特异性, 区分强相互作用与弱相互作用。与传统的 pull-down 方法相比, SMMS 具有显著优势: 检测灵敏度高 (最低可达皮摩尔级)、实验周期短 (约 90 分钟即可完成), 且能够兼容如细胞裂解液等复杂样本, 背景信号低、特异性强。这使得 SMMS 成为一种高效且实用的 PPI 验证工具, 尤其适用于高通量筛选任务。

我们首先使用已知的高亲和力蛋白对对 SMMS 系统进行了验证, 包括 CR3022 抗体与 SARS-CoV-2 RBD 结构域的相互作用, 以及带有生物素标签或 His 标签的 ACE2-RBD 蛋白对。实验结果在不同浓度范围内均表现出良好的浓度梯度响应, 最低可检测浓度达 1 pM, 且背景信号极低, 体现出该方法的高灵敏度与特异性。有趣的是, SMMS 甚至能够检测带有相同标签的蛋白之间的相互作用 (如生物素-生物素), 这类组合在传统 pull-down 流程中由于交叉反应和信号识别困难而往往被排除, 显示出 SMMS 在标签兼容性方面的显著优势。

最后, 我们利用 SMMS 技术评估了 binder2 与 Talin R3 之间的相互作用。虽然检测到了信号, 但其强度明显低于 CR3022-RBD 等高亲和力标杆对的水平,

这表明 SMMS 在识别强相互作用方面表现出极高的效果，但对于中等亲和力的 binder，其检测灵敏度可能存在一定限制。尽管如此，该检测方法凭借高通量和多样化的适用性，仍是一种初筛大规模 binder 库的有力工具。

4.2.2 局限性与展望

尽管本研究成功展示了 AI 设计 binder 的概念验证，并验证了 SMMS 平台的可行性，但仍存在若干值得关注的局限性，未来工作可从以下几个方面进行改进与拓展：首先，虽然 binder2 通过多种手段得到了验证，但其结合亲和力仍处于中等水平，且在细胞水平上表现出的生物效应相对较弱。未来可尝试设计多种 binder，同时靶向 Talin 的多个结构域（如 R2、R4 或 R7-R9），以增强总体结合强度，实现更有效的构象稳定。此外，还可结合全原子级的 ProteinMPNN 设计策略，获得更精确的结合肽分子；同时对现有 binder 进行位点定向突变，并结合 *in-silico* 模拟筛选可能提高亲和力的突变体。其次，结合特异性尚待系统验证：当前尚未全面确认 binder2 是否具有专一性识别 Talin R3 的能力，在复杂的细胞背景下可能存在非特异性结合的风险。未来可通过细胞内 pull-down 联合质谱 (MS) 分析，鉴定其完整的结合谱系，从而更深入地评估其靶向特异性与潜在脱靶效应。最后，SMMS 平台的检测下限仍有限：对于如 binder2 这类中等亲和力的分子，SMMS 所检测到的信号明显减弱，提示该方法在结合动力学与亲和力较弱的情境下存在检测灵敏度瓶颈。未来可通过使用一系列已知亲和力的标准蛋白对进行系统校准，进一步明确 SMMS 的实际检测阈值并优化其应用边界。

在未来的研究中，可通过进一步优化 binder 的设计策略以提升其亲和力与特异性。例如，可引入 RF Diffusion、深度突变扫描 (deep mutational scanning) 以及定向进化 (directed evolution) 等方法，系统探索更优的序列变异体。同时，可结合酵母展示 (yeast display) 或噬菌体展示 (phage display) 平台，实现大规模筛选具备更高结合性能的候选分子。在 SMMS 平台方面，可将其扩展至 96 孔甚至更高通量的格式，以提高筛选效率。此外，引入机器学习算法对实验数据进行自动化分析与候选排序，也将进一步提升数据处理速度与准确性。综上，这些优化策略的协同推进将有助于建立一套稳定、高效的 AI 设计 binder 筛选流程，推动其在药物研发、力学生物学及合成生物学等领域的广泛应用。

4.2.3 未来潜力

单分子磁镊已被证明是研究力敏感蛋白功能的强大工具。然而，从这些实验中获得的数据的解释往往需要蛋白的额外结构信息。传统的蛋白质结构确定方法既耗时又昂贵。幸运的是，随着基于 AI 的蛋白质结构预测技术（如 AlphaFold）的发展，研究人员现在可以快速且高精度地预测蛋白质结构。这一进展不仅为研究那些以前难以进行结构分析的蛋白质开辟了新的途径，还帮助解释来自单分子实验的数据。此外，将基于 AI 的蛋白质结构预测与分子动力学模拟相结合，可以进一步深入了解蛋白质的行为。例如，在本研究中，通过 MD 模拟，我们预测了 binder2 是 AI 设计的 binder 中最稳定且最具鲁棒性的分子，并且展示了最高的结合亲和力，这与实验验证结果一致。这种综合方法突显了将计算预测与模拟技术与实验方法相结合的强大优势，从而实现了对蛋白质结构和功能的更精确理解。

随着强大 AI 算法的出现，*de novo* 蛋白质设计领域正在迅速发展。许多新型蛋白质已被设计用于特定目的，尤其是在针对各种疾病的靶向疗法中。在本论文中，我们展示了力敏感蛋白质作为 AI 基于蛋白设计疗法的有希望靶标，这一概念被称为“力药理学”（*mechano-pharmacology*）。力敏感蛋白质以两种方式响应外部机械力：首先是通过力的反应发生拉伸变化，其次是通过力调控其构象转变速率。通过利用 AI 工具，我们可以设计出特异性靶向力敏感蛋白折叠态或展开态的结合分子，从而稳定其中一个状态，进而改变该蛋白的力传导功能。例如，在我们的研究中，设计了一种 binder 靶向 Talin R3 结构域的折叠态。该 binder 即使在施加临界力（5 pN）下，也能有效地将 Talin R3 锁定在其折叠状态中数十秒。这种结合在细胞水平上产生了显著影响，包括细胞迁移速度的降低和黏附斑面积的减少。

尽管这一研究仍处于初步阶段，但它为 AI 基于力药理学的潜力提供了有力的概念验证，并为未来通过靶向 Talin 及其他力敏感蛋白的治疗干预开辟了有前景的道路。

第 5 章 总结

本研究围绕 Talin 蛋白在细胞黏附与力传导中的核心作用，设计并验证了 AI 辅助生成的肽结合物 (binder)，并建立了 SMMS 高通量验证平台。在实验方面，我们首先通过 RFdiffusion 与 ProteinMPNN 设计了一系列与 Talin R3 结构域折叠态具有高亲和力的 binder 候选分子。结合 AlphaFold 预测与分子动力学模拟，初步筛选出具有良好结合位点覆盖与构象稳定性的序列。在功能验证中，荧光偏振实验证实 binder 与 Talin R3 具有中等亲和力结合；磁镊实验进一步表明 binder 可显著提升 R3 结构域的解折叠力阈值，延长其折叠状态存在时间。在细胞水平，TIRF 显微成像显示 binder 表达后黏附斑尺寸显著减小，免疫染色与迁移实验表明细胞迁移能力受到抑制。这些结果共同证明了 binder 对 Talin 构象及其力传导功能的干预能力。为解决 binder 验证过程中的通量瓶颈，我们开发并优化了基于 SMMS 技术的 pull-down 平台，成功实现同时对超百种 binder 候选的定量筛选。与传统方法相比，该平台在灵敏度、速度与操作简便性上展现出显著优势，具备良好的推广与集成潜力。尽管取得了系列成果，本研究仍存在若干局限，如 binder 稳定性及在体内环境下的功能持续性尚未评估，SMMS 平台的自动化程度亦有待提升。未来我们将结合深度学习筛选算法与结构优化策略，进一步提升 binder 质量，并拓展该策略至其他力敏蛋白靶点，实现更广泛的细胞力学调控与精准干预应用。

参考文献

- [1] Lauffenburger D A, Horwitz A F. Cell migration: a physically integrated molecular process[J]. *cell*, 1996, 84(3): 359-369.
- [2] Gilbert S F. An introduction to early developmental processes[M]//*Developmental Biology*. 6th edition. Sinauer Associates, 2000.
- [3] Rakic P. Principles of neural cell migration[J]. *Experientia*, 1990, 46(9): 882-891.
- [4] Friedl P, Weigelin B. Interstitial leukocyte migration and immune function[J]. *Nature immunology*, 2008, 9(9): 960-969.
- [5] Lämmermann T, Germain R N. The multiple faces of leukocyte interstitial migration[C]//*Seminars in immunopathology*. Springer Berlin Heidelberg, 2014, 36: 227-251.
- [6] Martin P. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration[J]. *Science*, 1997, 276(5309): 75-81.
- [7] Singer A J, Clark R A F. Cutaneous wound healing[J]. *New England journal of medicine*, 1999, 341(10): 738-746.
- [8] Yamaguchi H, Wyckoff J, Condeelis J. Cell migration in tumors[J]. *Current opinion in cell biology*, 2005, 17(5): 559-564.
- [9] Murphy W L, McDevitt T C, Engler A J. Materials as stem cell regulators[J]. *Nature materials*, 2014, 13(6): 547-557.
- [10] Friedl P, Gilmour D. Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer[J]. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2009, 10(7): 445-457.
- [11] Cukierman E, Pankov R, Stevens D R, et al. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension[J]. *Science*, 2001, 294(5547): 1708-1712.
- [12] Small J V, Herzog M, Anderson K. Actin filament organization in the fish keratocyte lamellipodium[J]. *Journal of Cell Biology*, 1995, 129(5): 1275-1286.
- [13] Lee J, Ishihara A, Theriot J A, et al. Principles of locomotion for simple-shaped cells[J]. *Nature*, 1993, 362(6416): 167-171.
- [14] Geiger B, Spatz J P, Bershadsky A D. Environmental sensing through focal adhesions[J]. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2009, 10(1): 21-33.
- [15] Parsons J T, Horwitz A R, Schwartz M A. Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension[J]. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2010, 11(9): 633-643.
- [16] Kim D H, Wirtz D. Focal adhesion size uniquely predicts cell migration[J]. *Biophysical Journal*, 2013, 104(2): 319a.
- [17] Dauparas J, Anishchenko I, Bennett N, et al. Robust deep learning-based protein sequence design using ProteinMPNN[J]. *Science*, 2022, 378(6615): 49-56.

- [18] Jumper J, Evans R, Pritzel A, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold[J]. *nature*, 2021, 596(7873): 583-589.
- [19] Watson J L, Juergens D, Bennett N R, et al. De novo design of protein structure and function with RFdiffusion[J]. *Nature*, 2023, 620(7976): 1089-1100.
- [20] Vicente-Manzanares M, Ma X, Adelstein R S, et al. Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration[J]. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2009, 10(11): 778-790.
- [21] Amano M, Nakayama M, Kaibuchi K. Rho-kinase/ROCK: a key regulator of the cytoskeleton and cell polarity[J]. *Cytoskeleton*, 2010, 67(9): 545-554.
- [22] Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton[J]. *Science*, 1998, 279(5350): 509-514.
- [23] Friedl P, Wolf K. Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model[J]. *Journal of Cell Biology*, 2010, 188(1): 11-19.
- [24] Geiger B, Spatz J P, Bershadsky A D. Environmental sensing through focal adhesions[J]. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2009, 10(1): 21-33.
- [25] Zaidel-Bar R, Itzkovitz S, Ma'ayan A, et al. Functional atlas of the integrin adhesome[J]. *Nature cell biology*, 2007, 9(8): 858-867.
- [26] Calderwood D A, Campbell I D, Critchley D R. Talins and kindlins: partners in integrin-mediated adhesion[J]. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2013, 14(8): 503-517.
- [27] Carisey A, Tsang R, Greiner A M, et al. Vinculin regulates the recruitment and release of core focal adhesion proteins in a force-dependent manner[J]. *Current biology*, 2013, 23(4): 271-281.
- [28] Mitra S K, Hanson D A, Schlaepfer D D. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility[J]. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2005, 6(1): 56-68.
- [29] Kanchanawong P, Shtengel G, Pasapera A M, et al. Nanoscale architecture of integrin-based cell adhesions[J]. *Nature*, 2010, 468(7323): 580-584.
- [30] Sun Z, Guo S S, Fässler R. Integrin-mediated mechanotransduction[J]. *Journal of Cell Biology*, 2016, 215(4): 445-456.
- [31] Webb, D. J., Donais, K., Whitmore, L. A., Thomas, S. M., Turner, C. E., Parsons, J. T., & Horwitz, A. F. (2004). FAK–Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. *Nature Cell Biology*, 6(2), 154–161.
- [32] Ridley A J, Hall A. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors[J]. *Cell*, 1992, 70(3): 389-399.
- [33] Burridge K, Wennerberg K. Rho and Rac take center stage[J]. *Cell*, 2004, 116(2): 167-179.
- [34] Etienne-Manneville S, Hall A. Rho GTPases in cell biology[J]. *Nature*, 2002, 420(6916): 629-635.

- [35] Slack-Davis J K, Martin K H, Tilghman R W, et al. Cellular characterization of a novel focal adhesion kinase inhibitor[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(20): 14845-14852.
- [36] Sulzmaier F J, Jean C, Schlaepfer D D. FAK in cancer: mechanistic findings and clinical applications[J]. *Nature reviews cancer*, 2014, 14(9): 598-610.
- [37] Nakagawa O, Fujisawa K, Ishizaki T, et al. ROCK-I and ROCK-II, two isoforms of Rho-associated coiled-coil forming protein serine/threonine kinase in mice[J]. *FEBS letters*, 1996, 392(2): 189-193.
- [38] Blake R A, Broome M A, Liu X, et al. SU6656, a selective src family kinase inhibitor, used to probe growth factor signaling[J]. *Molecular and cellular biology*, 2000, 20(23): 9018-9027.
- [39] Zhang X , Jiang G , Cai Y ,et al.Talin depletion reveals independence of initial cell spreading from integrin activation and traction.[J].*Nature Cell Biology*, 2008, 10(9):1062-1068.
- [40] Yamada K M, Sixt M. Mechanisms of 3D cell migration[J]. *Nature Reviews molecular cell biology*, 2019, 20(12): 738-752.
- [41] Sailem H Z, Bakal C. Identification of clinically predictive metagenes that encode components of a network coupling cell shape to transcription by image-omics[J]. *Genome research*, 2017, 27(2): 196-207.
- [42] Valon L, Marín-Llauradó A, Wyatt T, et al. Optogenetic control of cellular forces and mechanotransduction[J]. *Nature communications*, 2017, 8(1): 14396.
- [43] Oakes P W, Wagner E, Brand C A, et al. Optogenetic control of RhoA reveals zyxin-mediated elasticity of stress fibres[J]. *Nature communications*, 2017, 8(1): 15817.
- [44] Goult B T, Yan J, Schwartz M A. Talin as a mechanosensitive signaling hub[J]. *Journal of Cell Biology*, 2018, 217(11): 3776-3784.
- [45] Bakolitsa C , Cohen D M , Bankston L A ,et al.Structural basis for vinculin activation at sites of cell adhesion.[J].*Nature*, 2004, 430(6999):583.
- [46] Franz F , Tapia-Rojo R , Winograd-Katz S ,et al.Allosteric activation of vinculin by talin[J].*Nature communications*, 14(1):4311[2025-04-03].
- [47] Gao T , Cho E A , Zhang P W J .Inhibition of talin-induced integrin activation by a double-hit stapled peptide[J].*Structure*, 2023, 31(8):948-957.
- [48] Bird G H, Madani N, Perry A F, et al. Hydrocarbon double-stapling remedies the proteolytic instability of a lengthy peptide therapeutic[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010, 107(32): 14093-14098.
- [49] Chang Y S , Graves B , Guerlavais V ,et al.Stapled α -helical peptide drug development: a potent dual inhibitor of MDM2 and MDMX for p53-dependent cancer therapy.[J].*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(36).
- [50] Yan J, Yao M, Goult B T, et al. Talin dependent mechanosensitivity of cell focal adhesions[J]. *Cellular and molecular bioengineering*, 2015, 8: 151-159.

- [51] Critchley D R. Biochemical and structural properties of the integrin-associated cytoskeletal protein talin[J]. Annual review of biophysics, 2009, 38(1): 235-254.
- [52] Debrand E, El Jai Y, Spence L, et al. Talin 2 is a large and complex gene encoding multiple transcripts and protein isoforms[J]. The FEBS journal, 2009, 276(6): 1610-1628.
- [53] Wegener K L, Partridge A W, Han J, et al. Structural basis of integrin activation by talin[J]. Cell, 2007, 128(1): 171-182.
- [54] Niland S , Riscanevo A X , Eble J A .Matrix Metalloproteinases Shape the Tumor Microenvironment in Cancer Progression[J].International journal of molecular sciences, 2021, 23(1).
- [55] Papagrigoriou E, Gingras A R, Barsukov I L, et al. Activation of a vinculin-binding site in the talin rod involves rearrangement of a five-helix bundle[J]. The EMBO journal, 2004, 23(15): 2942-2951.
- [56] Yao M, Qiu W, Liu R, et al. Force-dependent conformational switch of α -catenin controls vinculin binding[J]. Nature communications, 2014, 5(1): 4525.
- [57] Del Rio A, Perez-Jimenez R, Liu R, et al. Stretching single talin rod molecules activates vinculin binding[J]. Science, 2009, 323(5914): 638-641.
- [58] Goult B T, Bate N, Anthis N J, et al. The Structure of an Interdomain Complex That Regulates Talin Activity [J]. Journal of Biological Chemistry, 2009, 284(22): 15097-15106.
- [59] Jansen K A , Atherton P , Ballestrem C .Mechanotransduction at the Cell-Matrix Interface[J].Seminars in Cell & Developmental Biology, 2017, 71:75-83.
- [60] Goksoy E, Ma Y Q, Wang X, et al. Structural basis for the autoinhibition of talin in regulating integrin activation[J]. Molecular cell, 2008, 31(1): 124-133.
- [61] Atherton P, Lausecker F, Carisey A, et al. Relief of talin autoinhibition triggers a force-independent association with vinculin[J]. Journal of Cell Biology, 2019, 219(1): e201903134.
- [62] Atherton P, Stutchbury B, Jethwa D, et al. Mechanosensitive components of integrin adhesions: Role of vinculin[J]. Experimental cell research, 2016, 343(1): 21-27.
- [63] Elosegui-Artola A, Oria R, Chen Y, et al. Mechanical regulation of a molecular clutch defines force transmission and transduction in response to matrix rigidity[J]. Nature cell biology, 2016, 18(5): 540-548.
- [64] Yao M, Goult B T, Klapholz B, et al. The mechanical response of talin[J]. Nature communications, 2016, 7(1): 11966.
- [65] Yao M, Goult B T, Chen H, et al. Mechanical activation of vinculin binding to talin locks talin in an unfolded conformation[J]. Scientific reports, 2014, 4(1): 4610.
- [66] Haining A W M, Rahikainen R, Cortes E, et al. Mechanotransduction in talin through the interaction of the R8 domain with DLC1[J]. PLoS biology, 2018, 16(7): e2005599.
- [67] Austen K, Ringer P, Mehlich A, et al. Extracellular rigidity sensing by talin isoform-specific mechanical linkages[J]. Nature cell biology, 2015, 17(12): 1597-1606.

- [68] Kumar A, Ouyang M, Van den Dries K, et al. Talin tension sensor reveals novel features of focal adhesion force transmission and mechanosensitivity[J]. *Journal of Cell Biology*, 2016, 213(3): 371-383.
- [69] Baek M, DiMaio F, Anishchenko I, et al. Accurate prediction of protein structures and interactions using a three-track neural network[J]. *Science*, 2021, 373(6557): 871-876.
- [70] Watson J L, Juergens D, Bennett N R, et al. Broadly applicable and accurate protein design by integrating structure prediction networks and diffusion generative models[J]. *BioRxiv*, 2022: 2022.12. 09.519842.
- [71] Lin Z, Akin H, Rao R, et al. Evolutionary-scale prediction of atomic-level protein structure with a language model[J]. *Science*, 2023, 379(6637): 1123-1130.
- [72] Karplus M, McCammon J A. Molecular dynamics simulations of biomolecules[J]. *Nature structural biology*, 2002, 9(9): 646-652.
- [73] Hollingsworth S A, Dror R O. Molecular dynamics simulation for all[J]. *Neuron*, 2018, 99(6): 1129-1143.
- [74] Abraham M J, Murtola T, Schulz R, et al. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers[J]. *SoftwareX*, 2015, 1: 19-25.
- [75] Zhou Y, Zhao X, Jiang Y, et al. A Mechanical Assay for the Quantification of Anti-RBD IgG Levels in Finger-Prick Whole Blood[J]. *ACS sensors*, 2023, 8(8): 2986-2995.
- [76] Rossi A M, Taylor C W. Analysis of protein-ligand interactions by fluorescence polarization[J]. *Nature protocols*, 2011, 6(3): 365-387.
- [77] Axelrod D. Total internal reflection fluorescence microscopy in cell biology[J]. *Traffic*, 2001, 2(11): 764-774.
- [78] You H, Le S, Chen H, et al. Single-molecule Manipulation of G-quadruplexes by Magnetic Tweezers[J]. *Journal of visualized experiments: JoVE*, 2017 (127): 56328.
- [79] Zhao X, Zeng X, Lu C, et al. Studying the mechanical responses of proteins using magnetic tweezers[J]. *Nanotechnology*, 2017, 28(41): 414002.
- [80] Le S, Liu R, Lim C T, et al. Uncovering mechanosensing mechanisms at the single protein level using magnetic tweezers[J]. *Methods*, 2016, 94: 13-18.

发表论文和参加科研情况说明

发表论文和参加科研情况说明

致谢

因校级盲审要求隐去此部分