宇际互影
Mutiin Scientific Service

1XOA 二硫键功能与还原电位分析

蛋白二硫键结构动力学与还原电位分析报告

项目编号：SAMPLE-04

报告日期：2026 年 10 月 18 日

版本号：v1.0

上海宇际互影科技服务有限公司

www.mutiin.com

摘要

针对客户提交的 1XOA 结构中识别的 1 条二硫键，分别开展氧化态与还原态端点分子动力学、双向快速增长热力学积分（FGTI）及 Crooks Gaussian intersection（CGI）分析，比较构象变化与局部受力。CYS 32-35 的原始计算电位为 −134.2 mV，Li 等（2015）经验校正后为 −244.3 mV，校正电位的条件统计 95% 置信区间为 −247.5 至 −241.2 mV。上述区间仅反映现有功样本的重采样不确定性；高斯近似、端点采样相关性及力场误差仍需考虑。经验校正采用 Li 等（2015）的固定关系：原始电位乘 1.5 后减 43 mV；校正区间不包含经验系数与模型误差，仍需与匹配条件的实验数据比较。

关键词：功能二硫键；还原电位；分子动力学；FGTI；Crooks Gaussian intersection；构象动力学

目录

1 引言 **2**

2 模型与方法 **2**

2.1 模型来源与二硫键识别 2

2.2 CYD 单拓扑与端点分子动力学 2

2.3 双向 FGTI 与 Crooks Gaussian intersection 2

2.4 电位换算与经验校正 3

2.5 结构动力学与残基对力分析 3

3 结果与分析 **4**

3.1 输入结构与二硫键几何 4

3.2 氧化态与还原态结构动力学 5

3.2.1 CYS 32-35 5

3.3 氧化态与还原态残基对力分析 6

3.4 FGTI 功分布与逐键计算电位 7

3.4.1 CYS 32-35 7

3.5 结果边界 9

4 结论 **9**

A 附录：附件文件说明 **11**

1 引言

蛋白质二硫键既可稳定局部折叠，也可作为受氧化还原状态调控的功能开关。静态几何能够反映潜在预应力，而氧化态与还原态的分子动力学比较可揭示断键后构象和协同运动的变化。对于还原电位，本任务按照 Gräter 与 Li 提出的单拓扑快速增长热力学积分（FGTI）流程，以 Crooks Gaussian intersection（CGI）估计逐条二硫键的自由能差，并按 $E_{\mathrm{raw}} = -\Delta G/(nF)$ 换算计算电位，其中 $n = 2$，F 为法拉第常数 [1, 2, 3, 4]。该数值反映所用模型和反应方向下的自由能换算结果，不能仅凭负值判定二硫键在实际生理条件下会自发断裂。

2 模型与方法

2.1 模型来源与二硫键识别

本任务以客户提交的单链蛋白（1XOA）结构作为起始模型。以同一蛋白链内半胱氨酸 SG 原子的 S–S 距离 1.75–2.25 Å 作为二硫键几何识别范围，共识别 1 条待分析二硫键。残基位置沿用输入结构编号，随后使用 Reduce 补充氢原子。该距离范围用于识别候选共价连接，不是动力学稳定性或氧化还原活性的判据。

2.2 CYD 单拓扑与端点分子动力学

采用 CHARMM27 蛋白力场与 TIP3P 水模型。对目标半胱氨酸构建文献所述 CYD 混合残基，使用 Vc、Vs 虚拟位点和 HUD dummy 原子在同一拓扑中描述氧化态与还原态。每次只处理目标二硫键，其余二硫键保持原连接。体系经能量最小化和位置限制平衡后，在 300 K、1 bar、加盐目标浓度 0.154 mol·L^{-1} 条件下分别进行氧化态与还原态 NPT 生产模拟。采用随机速度重标度恒温器（V-rescale）控制温度，压力采用 Parrinello–Rahman barostat，长程静电采用 PME，与氢原子相连的共价键由 LINCS 约束 [5, 6, 7]。

CYS 32-35 的两态各进行 1 ns 位置限制平衡和 15 ns 生产模拟，每个方向设置 500 次非平衡转换、每次 200 ps。

2.3 双向 FGTI 与 Crooks Gaussian intersection

从两态端点轨迹等间隔提取包含坐标和速度的起始状态。正向过程将氧化态从 $\lambda = 0$ 均匀切换到还原态 $\lambda = 1$；反向过程执行相反切换，并记录 $\partial H/\partial\lambda$。实际功样本数见结果表。对每条轨迹积分得到正向功 W_f，反向过程以 Crooks 定理要求的 $P_b(-W)$ 形式反射后参与比较。两组功分别进行高斯拟合，选取位于两组均值之间的交点作为 ΔG；通过 2,000 次非参数 bootstrap 重采样估计 95% 置信区间。等间隔取样不自动保证样本相互独

立，区间也不包含力场、有限端点采样或高斯近似造成的系统误差。按每条二硫键分别给出结果，不将其相加为全蛋白“总电位”。

2.4 电位换算与经验校正

原始计算电位由 $E_{\mathrm{raw}} = -\Delta G/(nF)$ 换算，其中 $n = 2$，$F = 96485.33212\ \mathrm{C \cdot mol^{-1}}$，$\Delta G$ 在换算时采用 $\mathrm{J \cdot mol^{-1}}$。为与实验电位比较，本报告同时给出 Li 等（2015）针对 CHARMM27/TIP3P 二硫键 CGI 方法的经验校正值 [2]：

$$E_{\mathrm{corr}}(\mathrm{mV}) = 1.5E_{\mathrm{raw}}(\mathrm{mV}) - 43\ \mathrm{mV}.$$

等价的伏特表达为 $E_{\mathrm{corr}}(\mathrm{V}) = 1.5E_{\mathrm{raw}}(\mathrm{V}) - 0.043\ \mathrm{V}$。该关系来自文献测试集的线性拟合，不是本任务重新拟合的系数，也不能直接移用于其他力场或自由能方案。原始自由能、功样本和原始电位均保留。校正后区间对原始区间的两个端点执行同一线性变换，区间宽度扩大为原来的 1.5 倍；其中不包含经验系数的不确定性或力场、质子化状态及有限采样等模型误差。

2.5 结构动力学与残基对力分析

氧化态与还原态轨迹分别进行 Cα RMSD、逐残基 RMSF、主成分分析、Ramachandran 分布、动态互相关矩阵和五个二硫键扭转角分析。PCA 分析中，两态在共同参考构象上对齐并联合建立基底；DCCM 差值定义为还原态减氧化态。五扭转角符号序列用于描述局部几何，不单独用于判定功能类别或变构机制。FDA 对原氧化态和还原态端点轨迹进行力重算，保留各自原子顺序和端点参数；不重新采样动力学。各帧的残基间作用力先汇总为有符号标量，再作时间平均；差值为还原态减氧化态，单位为 $\mathrm{kJ \cdot mol^{-1} \cdot nm^{-1}}$。采用 FDA 的 norm 约定：负值表示吸引，正值表示排斥；差值的正负仅表示有符号均值的变化。该结果只描述 FDA 已记录的蛋白内部残基对力，不含 PME/Ewald 倒易空间的配对贡献及蛋白与溶剂的作用力，不等同于体系总力，也不能单独证明因果力传导路径。该边界遵循功能二硫键的几何与受力分析应分别解释的原则 [8]。

3 结果与分析

3.1 输入结构与二硫键几何

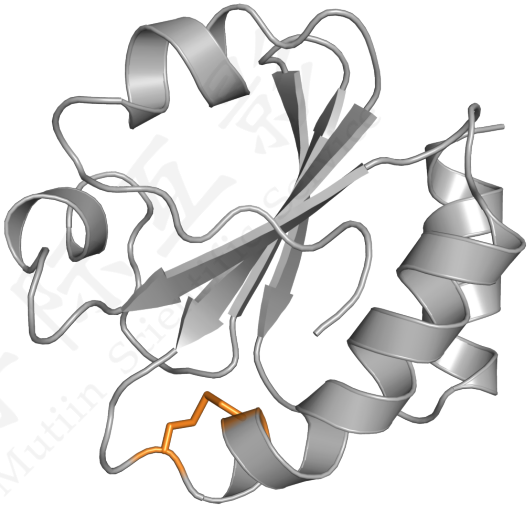


图 1: 输入蛋白整体结构及二硫键位置。二硫键位点以橙色棒状显示。

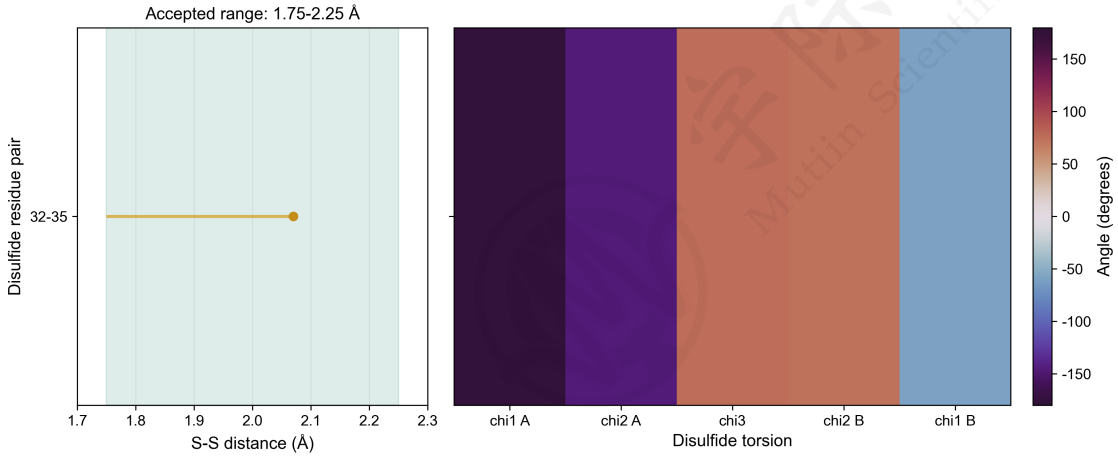


图 2: 输入结构的 S–S 距离与五个二硫键扭转角。绿色带表示二硫键的几何识别范围（1.75–2.25 Å）。

表 1: 输入结构中的二硫键几何参数；扭转角单位为度（°）

二硫键	S–S (Å)	χ_1^A	χ_2^A	χ_3	χ_2^B	χ_1^B
CYS 32-35	2.07	−175.5	−145.9	76.2	74.0	−59.5

表中 A、B 表示每条二硫键两端的半胱氨酸，不是蛋白链名称；五角顺序为 χ_1^A、χ_2^A、χ_3、χ_2^B、χ_1^B。静态几何仅描述输入构象，不能替代轨迹采样。

3.2 氧化态与还原态结构动力学

RMSD 和 RMSF 用于描述所采样时间窗内的构象偏移与局部波动；PCA 和 DCCM 反映构象分布与协同运动，不等同于自由能或作用力。RMSD 分别以各态轨迹首帧为参考，因此两态 RMSD 的差不等于两态平均结构的直接差异。下述时间平均量来自单次端点轨迹，不能视为独立重复实验的统计显著性结论。

3.2.1 CYS 32-35

该二硫键氧化态与还原态 Cα RMSD 的时间平均值分别为 0.774 Å 和 0.900 Å。氧化态/还原态五扭转角符号序列分别为 (+, −, +, +, −) 和 (−, −, +, +, −)。共同 PCA 基底的 PC1、PC2 分别解释 29.7% 和 10.9% 的构象方差；二维投影仅呈现其中一部分运动。

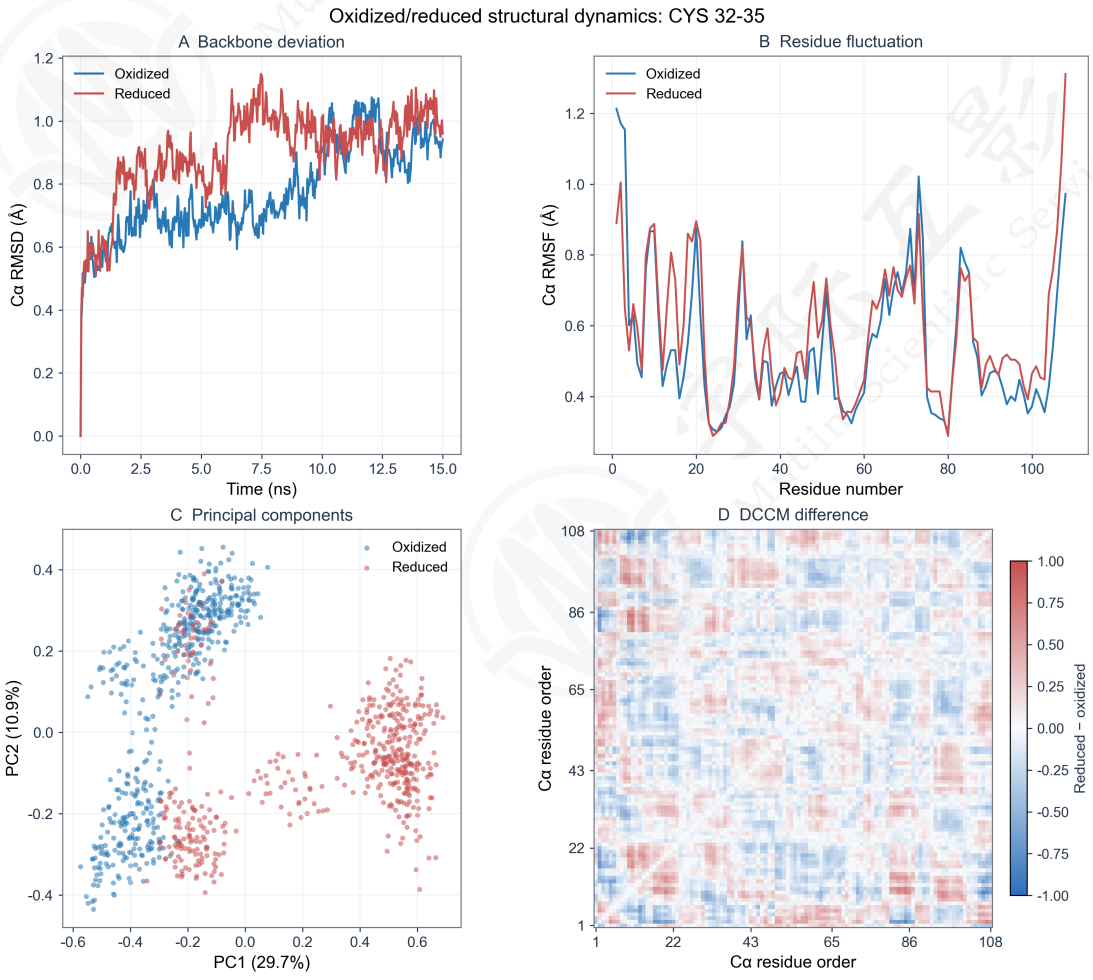


图 3: CYS 32-35 氧化态与还原态的结构动力学。左上：RMSD；右上：逐残基 RMSF；左下：共同基底上的 PCA 投影；右下：DCCM 差值（还原态减氧化态，无量纲）。

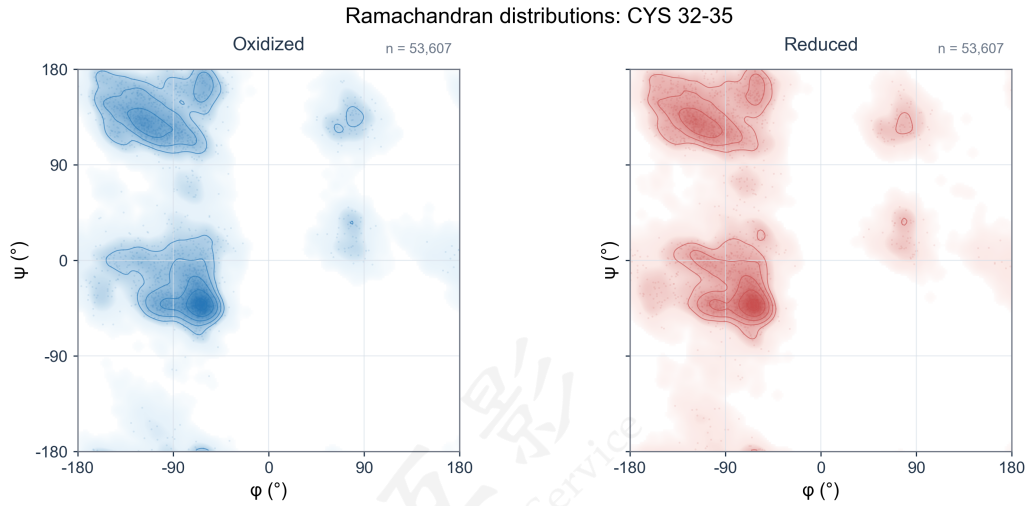


图 4: CYS 32-35 氧化态（左）与还原态（右）的主链 φ–ψ 分布；颜色深浅表示采样密度，不作为结构合格率。

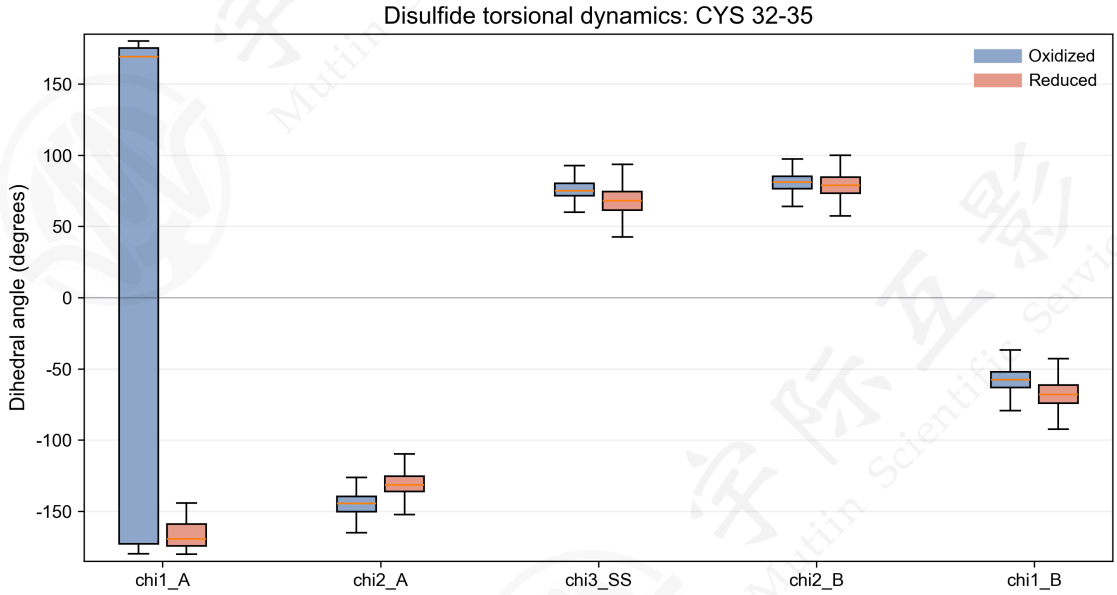


图 5: CYS 32-35 五个扭转角的轨迹分布。还原态以对应原子定义同一几何量，不表示还原态仍保留 S–S 共价键。

3.3 氧化态与还原态残基对力分析

两态按对应残基配对比较，稀疏记录中未出现的作用力按零计入各态全部帧的均值。图中为有符号均值，附件另列每帧标量绝对值的均值，两者不混用。坐标标签依次标识蛋白、分子副本及原拓扑残基编号；图中副本编号从 1 开始，数据表索引从 0 开始。差值为正可能表示吸引减弱或排斥增强，差值为负则相反，应结合两态原始符号解释，不能一概称为作用增强或减弱。

CYS 32-35 分别采用氧化态 501 帧和还原态 501 帧。逐残基对的两态均值及差值见 Excel 工作簿和对应 FDA 数据表。

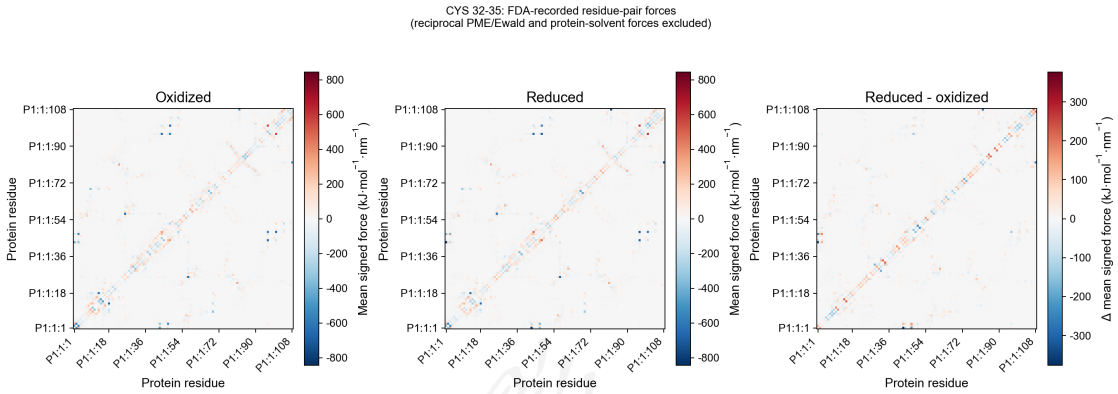


图 6: CYS 32-35 氧化态、还原态残基对力均值及还原态减氧化态差值；前两图共用色标，差值图单独对称色标。

3.4 FGTI 功分布与逐键计算电位

表 2: 逐条二硫键的 CGI 自由能差及未校正原始电位

二硫键	N_f	N_b	ΔG (kJ · mol^{-1})	E_{raw} (V)	95% CI (V)
CYS 32-35	500	500	25.90	−0.1342	−0.1364 至 −0.1321

表 3: Li 等（2015）经验校正后的逐键电位

二硫键	E_{raw} (mV)	E_{corr} (mV)	校正后 95% CI (mV)
CYS 32-35	−134.2	−244.3	−247.5 至 −241.2

N_f、N_b 分别为正向和反向非平衡功样本数。第一表以 V 列出原始电位及区间，第二表以 mV 并列原始与经验校正电位及校正后区间。区间为本次功样本重采样得到的条件统计区间，不是实验测量误差，也不构成独立的收敛证明。

3.4.1 CYS 32-35

正向与反向分别获得 500 和 500 个功值；拟合高斯分布的重叠系数为 0.310（0 表示无重叠，1 表示完全重叠）。CGI 交点位于两组拟合均值之间。所得 ΔG 为 25.90 kJ·mol^{-1}，对应未校正原始电位为 −0.1342 V，Li 等（2015）经验校正电位为 −244.3 mV。

已有 Shapiro–Wilk 正态性检验结果为：正向功的 $p = 4.69 \times 10^{-3}$，反射反向功的 $p = 7.63 \times 10^{-2}$。至少一个方向的功分布在 0.05 水平下偏离单一高斯分布；因此 CGI 点估计及区间应结合该拟合局限解释。负功和分布尾部均保留，不因偏离拟合曲线而删样本。

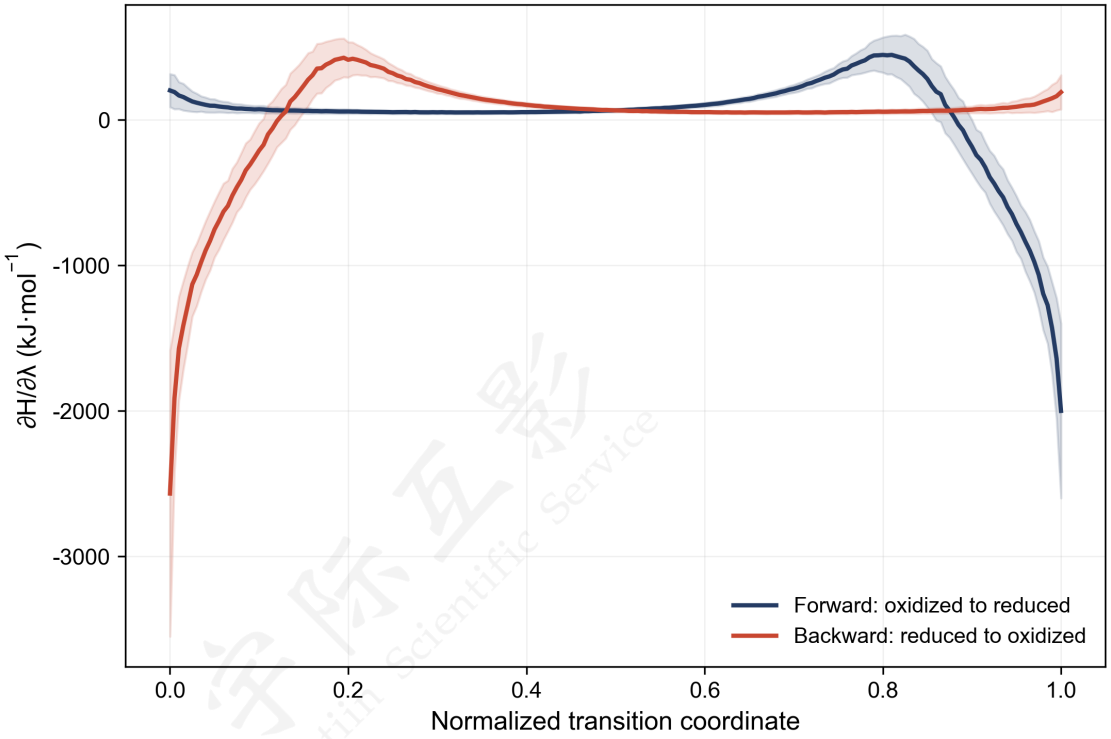


图 7: CYS 32-35 正向与反向 FGTI 的平均 $\partial H/\partial\lambda$ 曲线。横轴为各自转换过程的归一化时间；阴影为样本标准差，不是均值的置信区间。

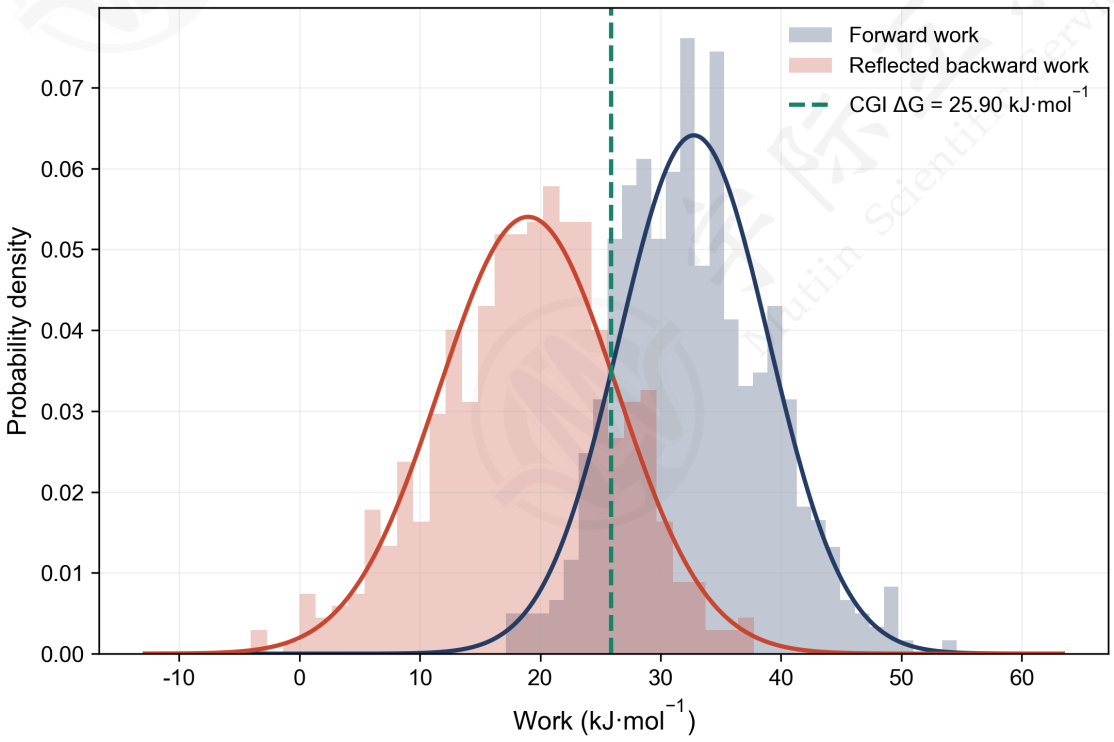


图 8: CYS 32-35 正向功 W_f 与反射反向功 $-W_b$ 的概率密度直方图。实线为全样本高斯拟合，虚线为 CGI 点估计；曲线与直方图的偏离反映高斯近似的局限。

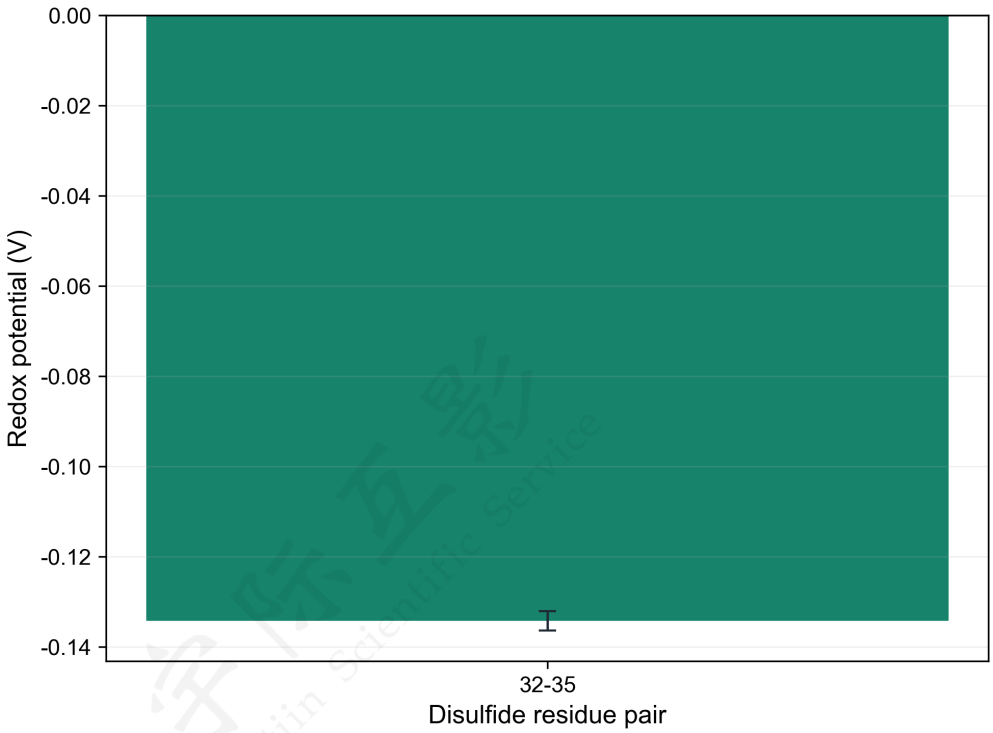


图 9: 未校正原始电位及 bootstrap 95% 置信区间（V）；经验校正结果见表3。颜色沿用基于样本数、拟合重叠及重采样成功率的数值评级；它不包含正态性或系统误差评估，不代表结果已获独立验证。

3.5 结果边界

本结果以指定经典力场、固定质子化状态、有限端点轨迹及非平衡切换协议为条件。本次已应用 Li 等（2015）的文献经验校正，但未针对本蛋白重新开展实验标定或评估 pH 依赖；校正值仍需在匹配实验条件下验证。单次轨迹内部相关性、尚未采到的构象及高斯近似误差均可能使统计区间低估总不确定性。

Li 等在其 12 个蛋白或突变体测试集上报告经验拟合残差约 42 mV[2]；这是该文献测试集的表现，不是本蛋白的误差保证，也不是校正公式中的 43 mV 偏移量。后续若需定量比较，应评估端点分段稳定性与独立重复采样，并复核功分布的非高斯特征。结构运动与 FDA 差值可以提出局部耦合假设，不能单独证明变构调控、断键动力学或生物学功能。

4 结论

本次比较了 1 条目标二硫键的氧化态与还原态，逐键计算结果如下。

CYS 32-35 的原始计算电位为 −134.2 mV，Li 等（2015）经验校正后为 −244.3 mV，校正电位的条件统计 95% 置信区间为 −247.5 至 −241.2 mV。

这些结果用于描述当前模型下的逐键热力学差异，需与前述采样和拟合限制同时阅读；小幅电位差不应直接用作生理还原先后顺序或功能强弱的排序。逐样本功值、结构统计及 FDA 数据随报告提供，便于追溯和再分析。

A 附录：附件文件说明

附件路径相对于结果目录。TPR 保存模拟输入参数，GRO 保存端点结构；两者不等同于完整的时间序列轨迹。

表 4: 附件文件说明

附件文件	内容说明	建议用途
single_protein_disulfide_potential_report.pdf	正式 PDF 分析报告	阅读、归档
single_protein_disulfide_potential_report_editable.docx	可编辑 Word 报告	二次编辑
disulfide_analysis_data.xlsx	原始与经验校正电位及各自区间、原始 CSV、逐样本双向功值、几何和结构动力学数据工作簿	复核、重新制图
input_disulfide_structure.png	蛋白整体结构和二硫键位置图	展示
input_disulfide_geometry.png	输入结构的逐键 S–S 距离和五扭转角概览	几何复核
disulfide_redox_potential_summary.png	未校正原始电位及区间汇总图	原始结果展示
pairs/CYS_32-35/endpoint_trajectories/	氧化态与还原态端点 TPR、GRO 文件	端点结构与参数复核
pairs/CYS_32-35/figures/	动力学、Ramachandran、扭转角和 CGI 图件	结果解释
pairs/CYS_32-35/fda/	两态残基对力均值、差值数据表和图	FDA 数据复核

参考文献

[1] Gräter, F. & Li, W. Studying functional disulphide bonds by computer simulations. In Hogg, P. (ed.) *Functional Disulphide Bonds: Methods and Protocols*, vol. 1967 of *Methods in Molecular Biology*, 87–114 (Springer, 2019).

[2] Li, W., Baldus, I. B. & Gräter, F. Redox potentials of protein disulfide bonds from free-energy calculations. *The Journal of Physical Chemistry B* **119**, 5386–5391 (2015).

[3] Crooks, G. E. Nonequilibrium measurements of free energy differences for microscopically reversible markovian systems. *Journal of Statistical Physics* **90**, 1481–1487 (1998).

[4] Goette, M. & Grubmüller, H. Accuracy and convergence of free energy differences calculated from nonequilibrium switching processes. *Journal of Computational Chemistry* **30**, 447–456 (2009).

[5] Bussi, G., Donadio, D. & Parrinello, M. Canonical sampling through velocity rescaling. *The Journal of Chemical Physics* **126**, 014101 (2007).

[6] Hess, B. P-LINCS: A parallel linear constraint solver for molecular simulation. *Journal of Chemical Theory and Computation* **4**, 116–122 (2008).

[7] Essmann, U. *et al.* A smooth particle mesh ewald method. *The Journal of Chemical Physics* **103**, 8577–8593 (1995).

[8] Schmidt, B., Ho, L. & Hogg, P. J. Allosteric disulfide bonds. *Biochemistry* **45**, 7429–7433 (2006).