

# 气相扩散速率对溶菌酶晶体生长的影响\*

戴国亮 董向群 孙祉伟 胡文瑞

(中国科学院力学研究所 国家微重力实验室, 北京 100080)

**摘要** 为研究气相扩散速率对溶菌酶晶体生长的影响, 特设计了一种可方便调节气相扩散速率的晶体生长样品池, 并用动态光散射法对不同气相扩散速率下晶体生长过程进行了研究. 实验结果表明, 随着气相扩散速率的增加, 晶体生长过程中的成核阶段缩短. 气相扩散速率通过影响溶菌酶溶液形成过饱和的速率来影响生长出的晶体的数量和大小.

**关键词:** 气相扩散, 溶菌酶, 晶体生长, 动态光散射, 样品池

**中图分类号:** O648

动态光散射是研究蛋白质晶体生长成核阶段的一个十分有用的工具<sup>[1-2]</sup>. 近二十年来, 陆续有许多用动态光散射研究蛋白质晶体生长的报导<sup>[3-8]</sup>. 在这些报导中, 培养蛋白质晶体普遍使用的是批量法(降/升温法), 即通过改变体系的温度, 使蛋白质溶液由不饱和逐渐变为饱和、过饱和, 最后得到晶体. 通常采用这种方法产生的晶核数目非常多, 满足了动态光散射研究统计上的要求, 因而在用动态光散射研究蛋白质晶体生长的实验中广泛使用. 然而生物学家培养晶体时却较少使用批量法, 更多的是用气相扩散法(如悬滴法)<sup>[9]</sup>, 采用此法可以得到尺寸更大数目更少的蛋白质晶体. 但鲜见此法结合动态光散射的研究报导. 为此, 我们设计了一个样品池, 用动态光散射对气相扩散法培养溶菌酶晶体的过程进行了研究<sup>[10]</sup>. 结果表明, 用气相扩散法和批量法生长溶菌酶晶体的过程有明显不同之处. 我们认为二者实现过饱和的速率和途径不同造成的<sup>[10]</sup>. 为深入研究用气相扩散法生长蛋白质晶体的规律, 本文对前述样品池作了改进, 并通过选用不同沉淀剂或改变沉淀剂溶液的浓度来调节气相扩散的速率, 从而对晶体生长的速率加以控制. 本文选用溶菌酶作为模型蛋白.

## 1 实验部分

### 1.1 样品池

气相扩散法, 尤其是悬滴法, 在蛋白质晶体生长中是最普遍的一种方法. 其原理是: 将欲结晶的蛋白质、缓冲溶液及沉淀剂混合成一小液滴(体积一般为 2  $\mu\text{L}$  或更小)附着在一不浸润板上, 其下(相距数毫米)放置大量沉淀剂溶液, 沉淀剂浓度较液滴中要大. 这样小液滴中的水份会不断扩散到沉淀剂溶液中, 直至两溶液中水的蒸气压相等这一过程才结束. 在此过程中小液滴中蛋白质的浓度不断增大, 最终达到过饱和而生长出晶体. 气相扩散法中常采用盐、有机溶剂和聚乙烯乙二醇作为沉淀剂<sup>[11]</sup>.

样品池的剖面图见图 1, 图中给出了其真实尺寸. 样品池主要由三部分构成: 调节器(图 1 中 A)、散射池(图 1 中 B)及盖子(图 1 中 C). 调节器由聚四氟乙烯制成, 为中空圆柱体, 壁厚 4 mm, 它的作用是保证散射池位于激光散射仪散射腔的中心处及放置一定量沉淀剂. 散射池由光学玻璃制成, 四面透光, 底面正方形, 其一部分位于调节器内部. 入射激光从散射池在调节器外的部分通过. 溶菌酶溶液置于散射池中(图 1 中 D), 体积约为 70  $\mu\text{L}$ . 调节器

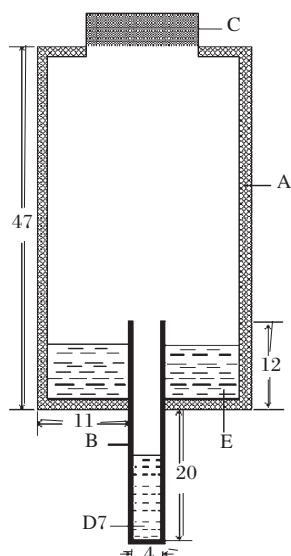


图1 样品池剖面图

Fig. 1 Cutaway view of the sample cell

Dimension in mm.

A) holder; B) cell for light scattering; C) cap;

D) lysozyme solution; E) precipitators

(NaCl solution or silica gel particles).

与散射池接触处用502胶仔细粘接(以免液体渗漏). 沉淀剂(NaCl溶液或硅胶颗粒)经由调节器口加入到调节器中,控制其液面高度在散射池口以下(图1中E).用密封性很好的盖子将调节器的口封好后,散射池和调节器内部就形成了一个封闭体系,确保了水分的扩散只在溶菌酶溶液与沉淀剂之间进行.通过调节沉淀剂溶液与溶菌酶溶液中NaCl的浓度差,就可以控制气相扩散的速率,因此很容易实现气相扩散速率的调节.

实验中采用1 mL不同浓度NaCl溶液或者球形硅胶颗粒(总质量约0.2 g,粒径约2.5~3.0 mm)作为沉淀剂.以前的样品池气相扩散速率很小,生成的晶核数目少<sup>[10]</sup>,信号难以反映出晶核以及晶体的变化.样品池经过这样的改进,大大增加了沉淀剂溶液的面积,减小了沉淀剂溶液的厚度,可方便地获得不同气相扩散速率.

## 1.2 仪器

激光散射仪:BI-200SM光散射仪(美国Brookhaven公司).光源:ILT5500BSL型Ar<sup>+</sup>激光器(上海亿奥信息光学科技有限公司),波长488 nm,功率(可调节)最大150 mW,长期稳定性为功率变化<0.5%.恒温循环器:LTD6G型(英国Grant

仪器公司).

## 1.3 试剂

鸡蛋清溶菌酶:三次重结晶(美国Sigma公司),未作进一步处理.将其溶于缓冲溶液中,配成浓度为35 mg·mL<sup>-1</sup>的溶液,置于22℃恒温箱中待用.缓冲溶液为含NaCl的HAc-NaAc溶液,pH 4.5,Ac<sup>-</sup>浓度为40 mmol·L<sup>-1</sup>,NaCl浓度为0.5 mol·L<sup>-1</sup>.所有溶液均在13 000 rpm的转速下离心20 min,然后经0.2 μm微量过滤膜(美国Pall公司)过滤备用.变色硅胶(国营青岛海洋化工厂):球形,吸湿率≥20%.实验时尽可能选粒径基本相同(约为2.5~3.0 mm)的硅胶,以保证实验的重复性.

## 1.4 实验过程

在经典的气相扩散法(悬滴法)中蛋白质小液滴在上方,下方是大量的高浓度沉淀剂溶液.本文实验两者的相对位置有所不同:蛋白质溶液在下,沉淀剂在上(类似于坐滴法).两者体积的比例足以模拟用气相扩散法培养蛋白质晶体的真实情况.先将溶菌酶溶液加入到散射池中,然后小心地加入沉淀剂.晶体生长的起始时间均从加入沉淀剂开始.为了改变气相扩散速率,分别做了沉淀剂是1、3和4 mol·L<sup>-1</sup>NaCl溶液及变色硅胶颗粒的一系列实验.用动态光散射对晶体生长全过程进行了监测,每隔30 min测量一次相关函数,信号累积3 min.所得实验数据用光散射仪所带软件进行处理.光散射仪中散射腔内温度控制在(22.0±0.1)℃.

## 2 结果与讨论

生物工作者在用气相扩散法生长溶菌酶晶体时常采用1 mol·L<sup>-1</sup>NaCl溶液作为沉淀剂,主要是因为此条件下气相扩散速率较小,易生长出较大的晶体.本文对此条件下生长溶菌酶晶体的过程也进行了研究,以便与气相扩散速率增大后的实验结果相比较,其结果见图2(a).实验结束(12天后)在溶液中只生长出3~5个晶体.从图2(a)中可见,晶体生长过程似乎只经历了一个阶段,即成核阶段.颗粒大小在整个生长过程中几乎都在4~6 nm范围内,和以往实验结果一致<sup>[10]</sup>.可以认为当NaCl溶液浓度较低时,水分从溶菌酶溶液扩散到NaCl溶液的速率较慢,使得溶菌酶溶液达到过饱和的速率较慢,从而在成核阶段形成的晶核数目少,最终生长出来的晶体较大.这和文献[12]中的观点一致.由于

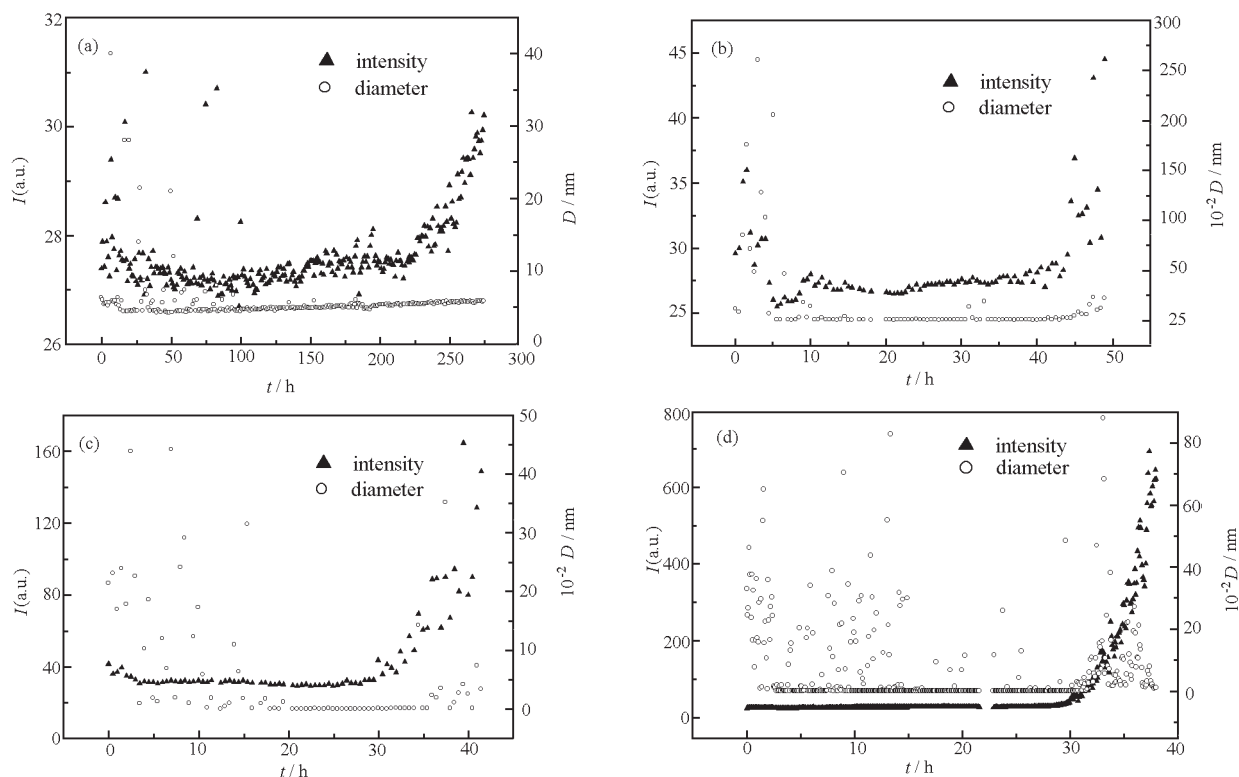


图 2 采用不同沉淀剂浓度生长溶菌酶晶体过程中散射光强和粒径随时间的变化

Fig. 2 Changes of scattering light intensity and diameters in lysozyme crystal growth using different precipitator concentration

The precipitators of (a), (b) and (c) are 1, 3 and 4 mol · L<sup>-1</sup> NaCl solution, respectively, and the precipitators of (d) are silica gel particles.

晶核或晶体落在散射体积内的概率非常小,造成了光散射数据没有明显变化,从而不能反映出过程中成核及结晶的情况。

图 2(b)和(c)分别是用浓度为 3 mol · L<sup>-1</sup> 和 4 mol · L<sup>-1</sup>NaCl 溶液作为沉淀剂的实验结果。结果很清晰地反映出在这两个条件下晶体生长均经历了三个阶段:第一阶段,颗粒大小不规则变化(粒径变化较大);第二阶段,颗粒大小保持在 4~6 nm 左右;第三阶段,颗粒大小逐渐增大。散射光强的变化也相应分为三个阶段。散射光强在第一阶段无规则变化,然后一段时间内在某一值附近波动,最后从某一时刻开始明显增大。散射光强的变化从另一方面印证了颗粒大小的变化。起始阶段粒径起伏很大,导致散射光强的起伏也较大;在第二阶段,颗粒大小基本保持不变,但溶菌酶不断成核使得其在溶液中的浓度有所下降,因此光强也略微下降;第三阶段,晶核不断长大,散射光强也随之逐渐增大,此时可以忽略由成核引起的溶菌酶浓度降低而减小的光强部分。可粗略认为第一阶段相当于溶菌酶的过饱和形

成阶段,第二阶段相当于溶菌酶的成核阶段。成核阶段颗粒大小基本为 4~6 nm(相当于 1~2 个溶菌酶单体大小),表明溶菌酶成核时以单体或二聚体形式存在,这与文献报导<sup>[2,5]</sup>一致。图 2(b)和(c)的结果说明,增大沉淀剂溶液浓度即增大气相扩散速率,则增大了溶菌酶溶液形成过饱和的速率,使成核数量增加,缩短了成核阶段的时间(图 2(b)和(c)中成核阶段分别约 30 h 和 20 h)。

本实验还采用了吸水性较 NaCl 溶液更大的变色硅胶颗粒作为沉淀剂,以获得更大的气相扩散速率。其结果见图 2(d)。结果表明前述晶体生长过程三个阶段之间的界限变得模糊了。起始阶段颗粒大小的变化更大,成核阶段缩短为十几个小时。这表明溶菌酶溶液形成过饱和的速率更快,晶核生成速率更快且数量更多。另外,成核阶段出现颗粒大小起伏的现象表明,由于晶核生成太快且数量很多,一些晶核之间可能发生了聚集<sup>[7-8]</sup>而出现大的颗粒。

图 2(b)、(c)和(d)三种条件下在实验后期均能用显微镜观察到溶液中遍布小的溶菌酶四方形晶

体,但图 2(d)条件下生长出的晶体尺寸要更小些(根据显微镜的放大倍数判断)。由于生成晶体数目很多,散射体积内的变化可以代表整个溶液的变化,因此实验数据(包括散射光强和粒径大小)的变化反映了溶菌酶存在形式的变化。

图 2(b)和(c)条件下起始阶段大约是 10 h,而图 2(d)条件下起始阶段的时间要少些(由于起始阶段与成核阶段界限模糊,具体时间不太清楚),说明在本文实验条件下,体系饱和度达到的速率是不太相同的,这使成核阶段时间也有所不同,并最终导致生长的晶体有所差异(生长所需时间与晶体的大小)。当然,气相扩散速率增大导致的溶菌酶溶液中液体流动的变化也可能对生长溶液中溶菌酶分子的扩散及成核造成影响,一个较明显的结果是在晶体生长的起始阶段,粒径的变化随着气相扩散速率的增大而增大。这方面的研究正在进行中。

综上所述,气相扩散速率对晶体生长的影响是通过达到和改变过饱和的速率而体现出来的。扩散速率的变化使晶体生长初始阶段形成过饱和的速率有所变化,成核阶段时间相应发生变化,并最终影响生长出的晶体的数量和大小。为得到较大的晶体,精确控制气相扩散的速率是一个必要条件。

## The Effect of Vapor Diffusion Rate on Lysozyme Crystal Growth\*

Dai Guo-Liang Dong Xiang-Qun Sun Zhi-Wei Hu Wen-Rui

(National Microgravity Laboratory, Institute of Mechanics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

**Abstract** A sample cell was specially designed and improved for studying crystal growth of lysozyme using vapor diffusion approach by dynamic light scattering. Various rates of vapor diffusion can be easily achieved by adjusting the concentration of the precipitator. A series of experiments using 1, 3 and 4 mol · L<sup>-1</sup> NaCl solution and silica gel particles as precipitator were performed and lead us to the conclusion that the rate of vapor diffusion was of great importance for controlling crystal growth. For higher precipitator concentrations (3, 4 mol · L<sup>-1</sup> NaCl solutions and silica gel particles), the sizes of particles in the initial stage fluctuate very considerably, while it was not the case for lower concentrations (1 mol · L<sup>-1</sup> NaCl solution). During the nucleation stage, the time period decreased with the increasing concentration of the precipitator, but the diameters of particles remained at about 4 ~ 6 nm in despite of different rates of vapor diffusion. This shows that the rate of forming supersaturation plays an important role in crystal growth process.

**Keywords:** Vapor diffusion, Lysozyme, Crystal growth, Dynamic light scattering, Sample cell

## References

- 1 Bishop J B, Martin J C, Rosenblum W M. *J. Cryst. Growth*, **1991**, **110**: 164
- 2 Bishop J B, Fredericks W J, Howard S B, Sawada T. *J. Cryst. Growth*, **1992**, **122**: 41
- 3 Mikol V, Hirsch E, Giege R. *J. Mol. Biol.*, **1990**, **213**: 187
- 4 Saikumar M V, Glatz C E, Larson M A. *J. Cryst. Growth*, **1998**, **187**: 277
- 5 Pusey M L. *J. Cryst. Growth*, **1991**, **110**: 60
- 6 Francois T, Jorg L, Reuben L. *J. Cryst. Growth*, **1992**, **122**: 50
- 7 Georgalis Y, Umbach P, Raptis J, Saenger W. *Acta Cryst.*, **1997**, **D53**: 691
- 8 Georgalis Y, Umbach P, Raptis J, Saenger W. *Acta Cryst.*, **1997**, **D53**: 703
- 9 McPherson A. *Preparation and Analysis of Protein Crystals*. New York: Wiley, 1982: 96
- 10 Dai GL, Dong XQ, Sun ZW, Hu WR. *Acta Phys. -Chim. Sin.*, **2001**, **17**(6): 531 [戴国亮,董向群,孙祉伟,胡文瑞.物理化学学报(*Wuli Huaxue Xuebao*), **2001**, **17**(6): 531]
- 11 Ducruix A, Giege R. *Crystallization of Nucleic Acids and Proteins: A Practical Approach*. New York: Oxford University Press, 1992: 82
- 12 Stanley K, David M, Joseph N. *J. Cryst. Growth*, **1991**, **110**: 177