

• 研究论文 •

## 溶液热历史对蛋白质晶体生长影响的内在原因研究

戴国亮\* 解莹 康琦 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** 从溶液中聚集体的角度研究了溶液的热历史改变生长出的蛋白质晶体的数目和尺寸的内在原因. 将在 281 和 309 K 下保存 1 d 的两组溶菌酶溶液按不同比例混合, 加入沉淀剂生长晶体. 随着高温溶液的比例增加, 生长出的晶体数目减少, 同时溶液中生长基元的尺寸增大. 在 5 周内, 采用动态光散射对 281, 293 和 309 K 三种温度下保存的溶菌酶溶液中聚集体的变化情况进行监测, 发现溶液中均存在大小不同的两部分聚集体, 称之为小聚集体与多聚体. 前者的尺寸基本不随保存时间而变化, 而后者尺寸随保存时间增加而减小, 减小的速度与保存温度有关. 多聚体的尺寸经过 5 周后和小聚集体基本相同. 研究表明, 处于无序聚集阶段的溶液的均一化程度和成核阶段生长基元的尺寸受到了溶液热历史的影响, 并最终对晶体的数目产生影响.

**关键词** 热历史效应; 溶菌酶; 聚集体; 光散射

## Study of Intrinsic Reason of Effect of Solution Thermal History on Protein Crystal Growth

DAI, Guo-Liang\* XIE, Ying KANG, Qi HU, Wen-Rui

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

**Abstract** In this paper, the aggregates in protein solution were investigated in order to study the change inside bulk solution that affect the amount and size of protein crystal after suffering thermal history effect. Two groups of lysozyme solution stored at 281 and 309 K separately were mixed with different ratio and precipitation agent was added. It was found that the amount of crystals decreased as the increase of the ratio of the heated solution, and the size of the growth units in solution increased at the same time. The situations of aggregates in lysozyme bulk solution stored at 281, 293 and 309 K separately were investigated by dynamic light scattering method for 5 weeks. The results showed that there always existed two separated aggregate groups in bulk solution. The group with smaller size was called units and that with the larger size was called clusters. The size of units kept almost constant as the stored time period increased. However, the size of clusters decreased to almost the same size as that of units after 5 weeks. The size decreasing rate of clusters was dependent on the storage temperature. Our results indicated that the homogeneity of protein solution in the induction time period and the mean size of units during nucleation process were affected by thermal history, which would finally affect the number of crystals grown.

**Keywords** thermal history effect; lysozyme; aggregate; light scattering

\* E-mail: dspr@imech.ac.cn

Received October 19, 2006; revised November 30, 2006; accepted March 1, 2007.

国家自然科学基金(Nos. 20603043, 10432060)资助项目.

采用批量(batch)法生长蛋白质晶体时, 通过温度控制蛋白质的过饱和度、生长动力学以及生长出的晶体的晶形和质量是最为常见的手段之一<sup>[1,2]</sup>. 例如, 对于在蛋白质晶体生长研究中最常使用的模型蛋白溶菌酶而言, 不同生长温度下长出的晶体的晶形和数量会发生变化. 温度对最终生长出的晶体的数量也会产生较明显的影响<sup>[3-5]</sup>. 已有的实验结果<sup>[5]</sup>还表明, 即使生长温度相同, 如果蛋白质溶液保存的时间和温度曾经发生过变化, 最终生长出的晶体的数目和尺寸也会发生变化. 蛋白质母液的保存时间及保存温度的不同影响了最终生长出的晶体的数目和尺寸, 这就是蛋白质晶体生长中的溶液热历史效应. 虽然热历史效应对熔体法生长半导体材料和高分子材料晶体的影响研究较多<sup>[6,7]</sup>, 但在溶液法蛋白质晶体生长中, 这方面的工作还未能深入进行. 特别是, 由于蛋白质晶体与半导体以及高分子材料晶体等相比有其独特之处, 如极易变性、不耐高温、含水量大等, 从半导体和高分子材料晶体研究中得到的热历史效应方面的结果对蛋白质晶体未必是适用的. 目前, 在蛋白质晶体生长方面已有的研究结果仅限于对热历史的宏观影响研究. 如 Ewing 和 Burkea 等<sup>[5,8]</sup>发现, 保存 4 周的溶菌酶溶液在加入沉淀剂后生长出的晶体数目有减少的趋势. 不过, 他们的工作未对热历史效应产生的原因做进一步深入分析. 而且从目前文献看, 也鲜见对此进行进一步研究分析的报道. 此外, 我们认为, Ewing 和 Burkea 等<sup>[5,8]</sup>的结果是保存时间和温度二因素混合后的热历史效应. 各个因素对晶体生长的影响是否相同? 如果不相同, 各自的影响又是如何? 这些都是深入了解热历史影响必须要回答的问题. 要了解此宏观变化的原因, 需要从微观角度入手. 晶体数目的减少其原因主要是由于成核的数目减少, 而成核的情况与溶液中的聚集体的情况是密切相关的. 基于此, 我们利用动态光散射(Dynamic Light Scattering, DLS)技术对溶菌酶溶液中聚集体随保存时间、保存温度的变化进行了研究, 以期能发现宏观变化的微观原因. DLS 技术具有检测速度快、无破坏性、测定方便等优点, 因此, 从 1978 年开始就被应用于蛋白质晶体生长的研究中<sup>[9]</sup>. 利用此技术可以很方便地获得溶液中蛋白质单体或聚合体的流体力学半径及分布情况<sup>[10]</sup>.

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

卵白溶菌酶: Sigma 公司, 型号 L6876, 三次重结晶, 未做进一步处理. 缓冲溶液:  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaOAc-HOAc 缓冲液, pH 4.6. 晶体生长所用沉淀剂为 NaCl. 实验中

所用化学试剂均为分析纯, 并经过离心(20 min,  $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ )和  $0.22 \mu\text{m}$  微孔滤膜(美国 Millipore 公司)过滤除尘. DLS 仪: BI-200SM(美国 Brookhaven 公司). 光源: 150 mW 波长 488 nm 的  $\text{Ar}^+$  激光器(上海亿奥激光公司). 恒温水循环器控温精度为  $\pm 0.1 \text{ K}$ .

### 1.2 实验方法

溶菌酶晶体采用批量法生长, 即将溶解在缓冲溶液中的溶菌酶溶液与等体积含 NaCl 的缓冲溶液混合后于一定温度下生长晶体. 不含沉淀剂的溶菌酶母液在 281, 293 和 309 K 下保存一定时间. 溶菌酶及 NaCl 浓度根据不同实验会有所不同. DLS 的具体实验过程及数据处理方法参见文献<sup>[11]</sup>. 每个 DLS 实验结果是 10 个平行实验结果的平均值. 实验时, 固定散射角  $90^\circ$ , 恒温 293 K.

## 2 结果与讨论

### 2.1 宏观结果的影响

生长溶液经离心和微孔过滤后, 可以在很大程度上除去杂质成核核心. 此外, 晶体生长所使用的生长阱等容器在实验前均用二次去离子水涮洗过, 以尽量除去附着的灰尘颗粒. 我们认为, 本文的实验结果基本是在均质成核条件下的结果. 将二组  $40 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  溶液在 281 和 309 K 保存 24 h 后取出, 待其恢复到 293 K 后, 按照加热溶菌酶(本文指在 309 K 下保存的  $40 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  溶菌酶溶液)0%, 20%, 40%, 60%, 80% 和 100% (体积分数)的比例混合, 然后加入与蛋白质溶液等体积的含 4% NaCl 的缓冲溶液, 于 293 K 生长晶体. 所有生长溶液均在数天后生长出数目不等的晶体. 图 1 是部分实验结果的显微镜照片. 经过对照片目测计数, 图 1 中(a), (b), (c)中的溶菌酶晶体数目分别为: 77, 29, 15(共生的晶体算为一个晶体). 图 2 是加热溶菌酶的比例对最终生长出的晶体数目的影响结果.

图 1 和图 2 的结果与 Burkea 等<sup>[8]</sup>的结果相似. 即, 生长溶液的热历史效应对最终生长出的晶体的数目有很大影响, 随着加热溶菌酶比例在生长溶液中的增加, 平均每阱的晶体数目减少, 晶体的尺寸也相对越大. 所不同的是 Burkea 等<sup>[8]</sup>的实验中, 溶菌酶溶液保存在 277 和 309 K. 不过保存温度的差别并未对热历史效应产生根本影响. 需要说明的是, 本文未采用保存蛋白质溶液最普遍使用的 277 K, 其原因有二: 一是 Burkea 等<sup>[8]</sup>已经报道了 277 K 条件下的宏观结果; 二是本文主要目的是探索热历史效应的内在原因, 溶液经历不同热历史后所受影响虽然程度不尽相同, 但产生影响的趋势是相同的, 内在原因应该相同.

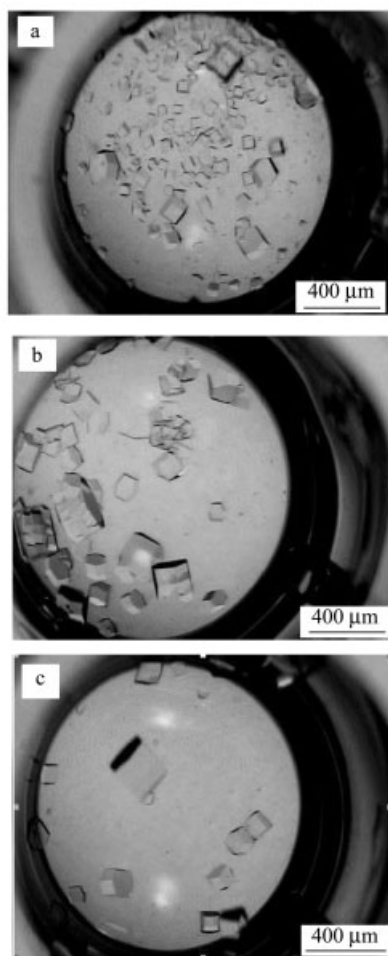


图 1 含不同比例加热溶菌酶溶液时晶体生长情况的显微镜照片

所含加热溶菌酶溶液的比例分别为: (a) 0%, (b) 60%, (c) 100%

Figure 1 Photographs of the crystals which grew from the solution containing heated lysozyme solution with different ratio

The ratios were: (a) 0%; (b) 60%; (c) 100%, respectively

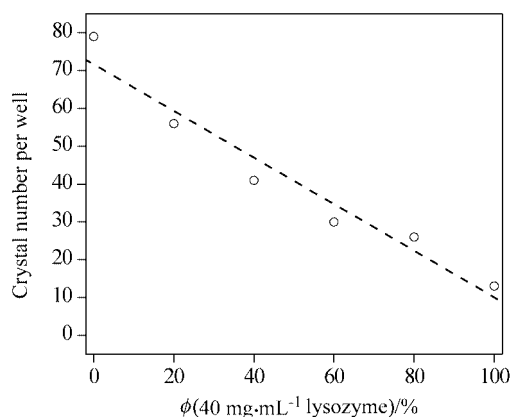


图 2 加热溶菌酶溶液的不同比例对生长出的晶体数目的影响(其中虚线为线性拟合结果)

Figure 2 The effect of ratio of heated lysozyme solution on the amount of crystals (the dash line is the result after linear fitting)

## 2.2 成核阶段的影响

在图 1 所示的实验中, 我们在晶体生长的第 3 天(显微镜下观测发现, 一般在 3 d 后才出现微小晶体), 取出部分生长溶液用 DLS 观察了溶液中聚集体的尺寸变化情况, 结果见图 3.

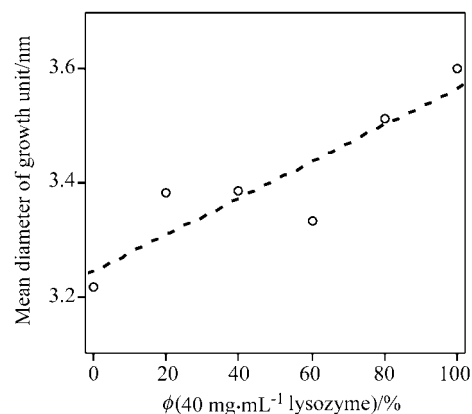


图 3 溶菌酶晶体生长单元平均尺寸随加热溶菌酶溶液比例的变化(虚线为对数据点进行线性拟合后所得结果)

Figure 3 The mean size of lysozyme growth unit in solution as the function of ratio of heated lysozyme solution (the dash line is the result after linear fitting)

从图 3 可见, 聚集体的尺寸都在 3~4 nm 范围内. 随着加热溶菌酶比例的增加, 溶液中聚集体的尺寸保持增加的趋势. 晶体生长大致可分为四个阶段: 无序聚集阶段、诱导期、成核阶段和生长阶段<sup>[12]</sup>. 无序聚集阶段时间很短. 诱导期的长短取决于蛋白质溶液的过饱和度和生长动力学等因素. 在图 3 所示的实验中, DLS 测量的时间是实验开始后的第 3 天. 根据 Bernardo 等<sup>[13]</sup>的结果, 此时溶液已经进入了成核阶段(从第 4 天开始逐渐有微小晶体出现. 而 DLS 结果并未显示出有任何大的聚集体分布在溶液中, 故晶体并未进入生长阶段). Kam 等<sup>[9]</sup>认为结晶是协同的一步一步的增加单体的过程, 即 NaCl 使溶菌酶分子以单体形式存在后, 才能使溶菌酶分子以正确的形式接触而生长出晶体. Tanaka 等<sup>[12]</sup>认为溶菌酶先以单分散状态存在, 然后转变成溶菌酶分子的有序生长单元. 因此诱导期中聚集体的任何变化, 均会对晶核(包括数目和尺寸)产生影响. 此处我们借用 Tanaka 等<sup>[12]</sup>对溶液中大小两类聚集体的称谓, 分别称尺寸较小的聚集体为小聚集体, 较大的聚集体为多聚体. 图 3 结果显示, 在溶菌酶晶体生长的成核阶段, 溶液中仅仅有 3~4 nm 的聚集体存在. 由于晶体生长已经进行了 3 d, 接近出现微晶. 因此, 我们认为此时溶液中出现的尺寸和生长单元尺寸基本一致的小聚集体应该全部或绝大部分为生长单元, 而尺寸比生长单元大得多的多聚体已经基本消失, 解聚集后转变为生长单元.

此时溶液已经达到很高的均一化程度(溶液中的多聚体基本消失, 聚集体绝大多数以生长基元形式存在). 图 3 的结果反映出, 在晶体生长的成核阶段, 由于溶液已经完全均一化, 热历史中的温度因素不会对均一化的过程产生影响(区别于后文中的诱导期阶段的情况, 详细讨论见后文), 但是成核阶段的生长基元尺寸产生影响. 保存温度越高, 生长基元的尺寸越大.

### 2.3 无序聚集阶段的影响

图 3 的结果反映出成核阶段的生长基元受到了热历史的影响. 而生长基元的尺寸和溶液中的聚集体处于无序聚集阶段时的状况密切相关<sup>[11]</sup>. 为研究热历史效应是否对无序聚集阶段也产生影响, 我们设计了如下实验方案. 将 3 组  $40 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  溶菌酶溶液(不含 NaCl)分别置于 281, 293 和 309 K 温度下保存 5 周. 其间, 每周各取出一定量(约  $50 \mu\text{L}$ )保存溶液, 置 293 K 培养箱中 5 min, 待其温度为 293 K 后, 与 293 K 含 4% NaCl 的缓冲溶液等体积混合后放置约 10 min, 待溶液混合均匀后立即用 DLS 监测溶液中聚集体的情况.

图 4 是对 293 K 溶菌酶溶液中聚集体的变化进行连续 5 周动态光散射测量的结果. 每一个独立的图都显示,

溶液中的聚集体由大小两部分相互独立的小聚集体和多聚体组合而成. 将三种温度下的 DLS 结果按照小聚集体和多聚体分别整理后的结果见图 5. 在图 4 和图 5 所示实验中, 由于每次溶菌酶溶液与 NaCl 混合后至 DLS 监测完毕, 时间约为 1~1.5 h, 根据 Bernardo 等<sup>[13]</sup>的结果, 图 4, 5 所示实验中溶菌酶溶液正处于临界晶核生成前的无序聚集阶段. 从图 5 可见, 从新配溶液到第 5 周, 热历史中保存时间因素对处于无序聚集阶段溶液中的多聚体尺寸的影响十分明显. 随着保存时间的增加, 溶液中的多聚体尺寸逐渐减小. 新配溶液中多聚体为 250 nm, 至第 5 周时尺寸已减小为 8.8 nm. 需要说明的是, 在本文实验条件下, 新配溶液与配置 24 h 后的溶液, 二者在混合了沉淀剂 1~1.5 h 后, 溶液中的聚集体的情况基本相同. 这就避免了“真假溶液”问题(新配溶液很可能处于假性溶液状态, 里面存在没有完全溶解的“微晶”对实验结果的干扰). 图 4 和图 5 的结果还表明, 在保存时间相同时, 热历史的保存温度因素影响了无序聚集阶段时溶液中的多聚体尺寸的减小速度. 281 K 时减小速度最大, 293 K 时次之, 309 K 时最小. 这反映出不同保存温度下, 尽管溶液达到完全均一化所需要的时

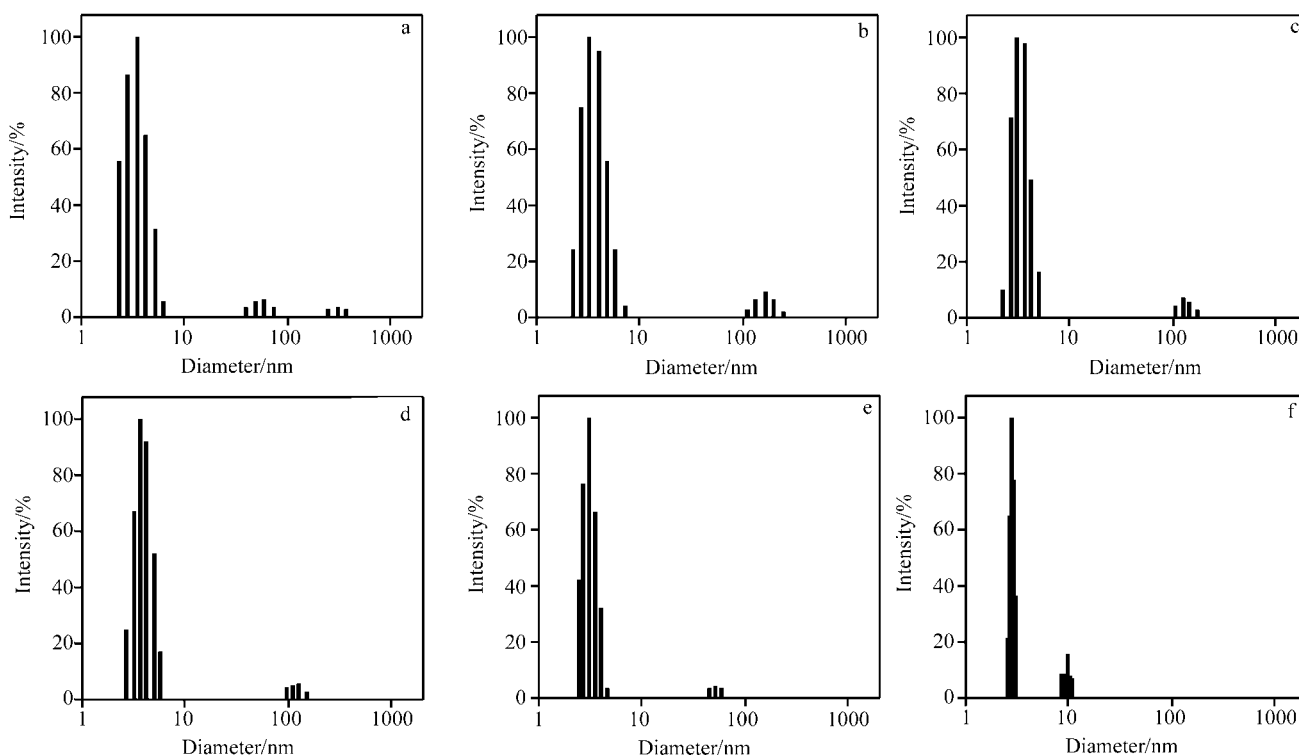


图 4 293 K 溶菌酶溶液中聚集体尺寸分布随溶液保存时间的变化

溶液均为  $40 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  溶菌酶溶液(保存时间不同)与 4% NaCl 溶液等体积的混合物. 其中, (a) 新配溶菌酶溶液(配制后约 1 h); (b)~(f) 保存 1~5 周的溶菌酶溶液. 各图坐标相同, 横坐标是对数坐标

Figure 4 Time course of the size distribution of aggregates in lysozyme solution at 293 K

All solutions were the mixture of  $40 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  lysozyme solution (storage time were different) and 4% NaCl solution with the same volume. (a) lysozyme solution of 1 h after newly prepared; (b)~(f): lysozyme solution with storage time 1~5 weeks, respectively

间基本差不多(都需 5 周左右才能达到),但是达到均一化的速度不同. 温度越低,均一化的程度越差. 而当溶菌酶溶液均一化程度较差时,成核时受 NaCl 的影响更大些,局部更易长出品核. 因此形成的晶核数目更多,最终生长出的晶体数目也就更多. 图 5b 中虚线由上至下分别代表 281, 293 和 309 K 时在 5 周内小聚集体尺寸的平均值,分别为: 3.63, 3.34 和 3.23 nm. Georgalis 等<sup>[14]</sup>假设溶菌酶有球状外形,在盐的作用下,单体的流体力学半径最多为 2 nm,二聚体不会超过 2.5 nm,四聚体要小于 4.0 nm. 按照这种理论,溶液中的小聚集体应该主要以溶菌酶单体的形式存在,而且在 5 周内,无论溶液保存多久,都会存在这样的小聚集体. 从图 5b 可以看出,在无序聚集阶段,溶液中一直存在小聚集体,而且小聚集体的尺寸和溶液的保存时间基本没有关系,仅和保存温度有关,保存温度越低,小聚集体的尺寸越大. 图 5 中保存温度和小聚集体尺寸的变化关系与图 3 的结果正好相反,也许这和二者处于不同的生长阶段有关.

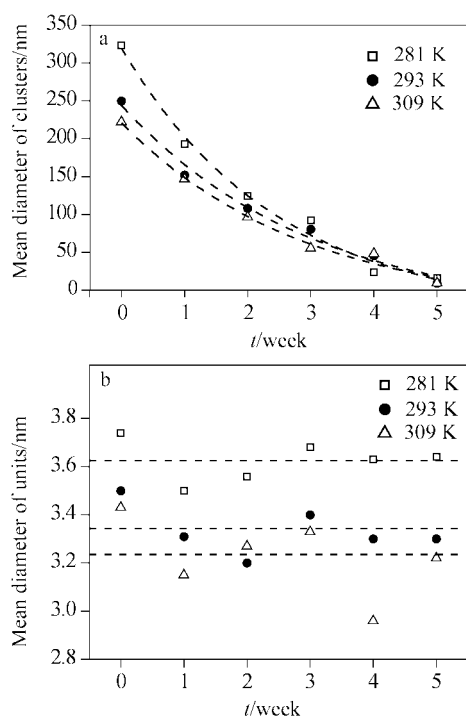


图 5 三种温度条件下溶菌酶溶液中聚集体尺寸随保存时间的变化

(a) 多聚体变化情况, 图中虚线仅起辅助了解变化趋势作用; (b) 小聚集体变化情况, 图中虚线由上至下分别代表 281, 293 和 309 K 时在 5 周内小聚集体的平均尺寸, 分别为: 3.63, 3.34 和 3.23 nm

**Figure 5** Time course of the change of mean size of lysozyme aggregates in lysozyme solution stored at three different temperatures

(a) clusters. The dash lines were used to help readers clearly find the change tendency of the mean diameters of clusters; (b) units. The dash lines from up to low represent the value (3.63, 3.34 and 3.23 nm) of mean diameter of units at 281, 293 and 309 K, respectively

图 3 反映的是成核阶段的生长基元的变化, 而图 5 是诱导期内小聚集体的变化情况. 结果的差异也反映出诱导期和成核二阶段, 小聚集体在转变成生长基元时发生了某种程度的变化. 具体的变化情况, 目前正在进一步研究中. 结晶与许多参数有关, 如温度、浓度、样品纯度、pH 值、振动干扰等, 现在看来蛋白质溶液的热历史效应也是一个不可忽略的因素<sup>[8]</sup>.

### 3 结论

溶液热历史中的二因素(保存时间和保存温度)对晶体生长不同阶段的影响并不相同. 在晶体生长无序聚集阶段, 保存时间对溶液中小聚集体的尺寸基本无影响; 溶液中的多聚体在保存时间内逐渐解聚集而使溶液逐渐达到均一化; 保存温度影响均一化的速度. 在晶体生长的成核阶段, 溶液中的多聚体全部解聚集成为生长基元, 由于溶液已经均一化, 保存温度影响生长基元的尺寸. 溶液热历史最终使生长出的晶体的数目发生变化.

### References

- 1 Kitano, K.; Motohashi, K.; Yoshida, M.; Miki, K. *J. Cryst. Growth* **1998**, *186*, 456.
- 2 Christopher, G. K.; Phipps, A. G.; Gray, R. J. *J. Cryst. Growth* **1998**, *191*, 820.
- 3 Berthou, J.; Jolles, P. *Biochim. Biophys. Acta* **1974**, *336*, 222.
- 4 Berthou, J.; Jolles, P. *Biochimie* **1978**, *60*, 209.
- 5 Ewing, F. L.; Forsythe, E. L.; Woerd, M. V.; Pusey, M. L. *J. Cryst. Growth* **1996**, *160*, 389.
- 6 Aihara, J.; Ishihara, M.; Hojou, K.; Furuno, S. *J. Am. Ceram. Soc.* **2004**, *87*, 1146.
- 7 Mamun, A.; Umamoto, S.; Ishihara, N.; Okui, N. *Polymer* **2006**, *47*, 5531.
- 8 Burkea, M. W.; Judgea, R. A.; Pusey, M. L. *J. Cryst. Growth* **2001**, *232*, 301.
- 9 Kam, Z.; Shore, H. B.; Feher, G. *J. Mol. Biol.* **1978**, *123*, 539.
- 10 Georgalis, Y.; Umbach, P.; Raptis, J.; Saenger, W. *Acta Crystallogr.* **1997**, *D53*, 691.
- 11 Dai, G.-L.; Yu, Y.; Kang, Q.; Hu, W.-R. *Acta Chim. Sinica* **2004**, *62*, 757 (in Chinese). (戴国亮, 于泳, 康琦, 胡文瑞, 化学学报, **2004**, *62*, 757.)
- 12 Tanaka, S.; Ito, K.; Hayakawa, R.; Ataka, M. *J. Chem. Phys.* **1999**, *111*, 10330.
- 13 Bernardo, A.; Calmanovici, C. E.; Miranda, E. A. *Cryst. Growth Des.* **2004**, *4*, 799.
- 14 Georgalis, Y.; Zouni, A.; Eberstein, W.; Saenger, W. *J. Cryst. Growth* **1999**, *126*, 245.

(A0610193 ZHAO, C. H.; LING, J.)