

## 气相扩散法生长溶菌酶晶体的动态光散射研究\*

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** 首次采用动态光散射研究了气相扩散法生长溶菌酶晶体. 实验中采用了两种溶解溶菌酶的方法, 所得实验结果是有区别的. 这种区别表明了 NaCl 对溶菌酶分子间相互作用产生十分重要的影响. 实验结果表明, 晶体生长过程中, 溶液中溶菌酶始终保持单分子与两分子聚集体的状态, 这种状态是生长晶体的基础.

**关键词:** 动态光散射, 气相扩散法, 晶体生长, 溶菌酶, 扩散系数, 批量法

蛋白质晶体生长过程的研究有十分重要的意义, 它有助于人们了解并控制晶体生长的过程, 提供新的生长晶体的有效手段. 从 Kam 等人<sup>[1]</sup>首先采用光散射法研究蛋白质溶液中的晶体生长至今, 许多科研工作者用光散射 (包括动态和静态光散射) 的方法对蛋白质晶体生长的过程及机理进行了研究<sup>[2-8]</sup>.

科研工作者常用气相扩散法和批量法培养蛋白质晶体, 而前者最为常用. 用气相扩散法进行实验的优点是沉淀剂的浓度梯度可以很方便地进行调节, 从而使蛋白质溶液缓慢地形成过饱和溶液, 晶体生长的速度得到了很好的控制. 因此, 气相扩散法较之批量法更容易生长出较好的晶体 (比如晶体较大, 晶型较好). 另外, 气相扩散法生长晶体只使用很少量的蛋白, 这在生长蛋白晶体时是非常有益的. 但是几乎所有用光散射研究蛋白晶体生长的实验都采用的是批量法, 尚未见到有应用气相扩散法的报导. 这样气相扩散法的优势就无法应用到蛋白晶体生长的光散射研究中. 为便于比较, 我们自制了样品池, 使得蛋白晶体的生长既可以用气相扩散法进行, 也可以用批量法进行.

溶菌酶晶体生长的条件较温和<sup>[4]</sup>, 而且其结构前人已研究得较为清楚<sup>[9]</sup>, 因此我们选用了溶菌酶作为模型蛋白来进行研究.

## 1 实验

### 1.1 试剂和仪器

实验中所用化学试剂均为分析纯, 并在使用前用离心机离心 15 min (13, 000 rpm), 再用 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜 (美国 Millipore 公司产) 过滤, 以尽可能除去灰尘. 母鸡蛋白溶菌酶从美国 Sigma 公司购买 (已经过三次重结晶), 未作进一步处理. 缓冲溶液为 40  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  醋酸盐缓冲溶液, pH 4.5. 动态光散射仪型号是 BI-200SM (美国 Brookhaven 公司生产), 所用光源是波长 532 nm 的激光 (美国 Uniphase 公司生产, 50 mW). 恒温循环器 (Grant LTD6G, 英国 Grant 仪器公司产). 样品池是用光学玻璃自制的, 示意图见图 1. 散射池底面为正方形, 边长为 5 mm, 高 75 mm, 池壁厚 1 mm. 散射池中插入一较细的玻璃池, 内置 1  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl 溶液. 我们将它简称为“盐棒”. 盐棒中空, 边长为 2 mm, 长 45 mm. 由于毛细现象, 内置的 NaCl 溶液仅在重力作用下不会流出.

### 1.2 溶菌酶溶液的配制

用两种方法溶解溶菌酶. 一种是将溶菌酶溶解于二次蒸馏水中 (以下简称水溶法), 另一种是将溶菌酶溶于含 NaCl (0.345  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 的缓冲溶液中 (以下简称盐溶法). 将上述溶解后的溶液在 22  $^{\circ}\text{C}$  用离心机离心 15 min (13, 000 rpm), 取上层清液 (约占总体积的 80%), 用 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤三次,

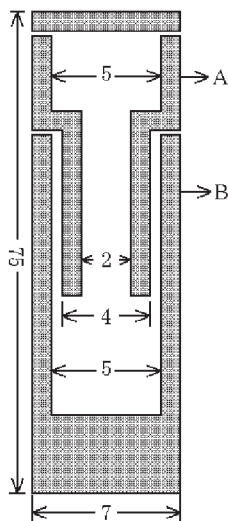


图 1 样品池示意图

Fig. 1 Sample cell for vapor diffusion approach (dimension: mm)

A) salt tube, B) scattering cell, 2, 4, 5, 7, and 75 are dimension values of the different parts of the sample cell

过滤后的溶菌酶溶液在 22 °C 静置约 24 h 后再进行光散射实验。

### 1.3 光散射实验

水溶法的溶菌酶溶液与高浓度的 NaCl 溶液混合, 以配成含  $0.345 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl 的溶菌酶溶液。盐溶法的溶菌酶溶液只需直接用微量注射器加入到样品池中即可。气相扩散法生长晶体时, 盐棒中加入的 NaCl 溶液占整个盐棒体积的 70%。在用批量法时, 盐棒中什么也不需要加。整个实验均是用气相扩散法生长晶体。在散射池中加入 50  $\mu\text{L}$  溶菌酶溶液, 此后将盐棒倒转, 插入散射池中, 盐棒的底面凸出, 正好用作散射池的盖子。实验时, 散射池口与盐棒的底面相接触处抹上少许凡士林, 以防溶液挥发, 然后用封口膜将散射池口封好。

固定散射角度为 90°。散射腔中的十氢萘和样品溶液用外置的恒温循环器恒定温度为 22 °C。实验过程中每隔一段时间采集一次数据, 每次采集数据时间为 5 min。

为防止灰尘的干扰, 同时做两组条件完全相同的实验。区别在于, 一组实验是样品池放置在散射腔中, 用光散射观察。而另一组实验是样品池放置在显微镜下观察。

### 1.4 数据的处理

用随机附带的计算软件进行处理。当粒子的多分散度大于 0.1 小于 0.5 时, 用 NNLS (non-negatively constrained least squares: multiple pass) 解析, 当多分散度大于 0.5 时, 用 Contin (non-negatively constrained least squares regularized) 解析。

## 2 结果和讨论

为了检验自制的样品池的可靠性, 用 Brookhaven 公司随仪器附带的两种型号的样品池 (圆形, 直径分别为 27 mm 和 12 mm) 作为参考标准, 分别用动态光散射对标准 96 nm 聚苯乙烯乳胶粒子 (美国 Duke scientific 公司) 进行了测量, 结果见表 1。

从上述结果可见, 用自制的样品池进行实验, 结果与另两种商品样品池的结果很接近, 考虑到动态光散射实验测量粒子直径大小本身会有一些误差 (由于实际体系与理想体系之间有一定差距), 因此用自制的样品池所得结果是比较可靠的。

从图 2 可以看到, 水溶法气相扩散生长溶菌酶晶体时, 在晶体生长的初始阶段 ( $t$  为 30–545 min), 溶液中始终有几百纳米的颗粒存在, 而盐溶法中只是偶尔出现这一现象 ( $t = 470 \text{ min}$ ) (见图 3)。

这种差别的出现, 反映了溶液中 NaCl 对溶菌

表 1 三种样品池对标准 96 nm 聚苯乙烯乳胶颗粒的测量结果

Table 1 Results of 96 nm latex from light scattering study using different cells

	$10^8 \cdot D^* / \text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$	$D_E^* / \text{nm}$	$P_m^*$	$10^3 \cdot \text{RMS}$	$D_m^* / \text{nm}^{**}$
$\Phi 27 \text{mm}$	5.325	95.7	0.196	0.841	89.8
$\Phi 12 \text{mm}$	5.163	96.3	0.161	1.063	104.6
Our cell	5.235	99.6	0.173	1.169	93.2

\*  $D$  is diffusion coefficient,  $D_E$  is effective diameter,  $P$  is polydispersity, RMS is RMS error, and  $D_m$  is mean diameter. \*\*calculated by NNLS

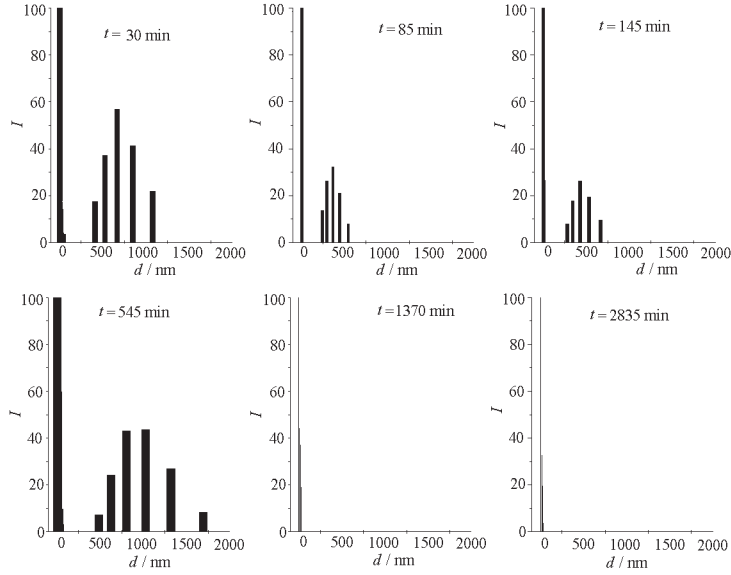


图 2 水溶法生长晶体时  $50 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  溶菌酶溶液中颗粒直径随时间的变化图

Fig. 2 Lysozyme size distribution with time during crystallization using water dissolving method

The concentration of lysozyme is  $50 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , Y axis is the intensity of scattering light

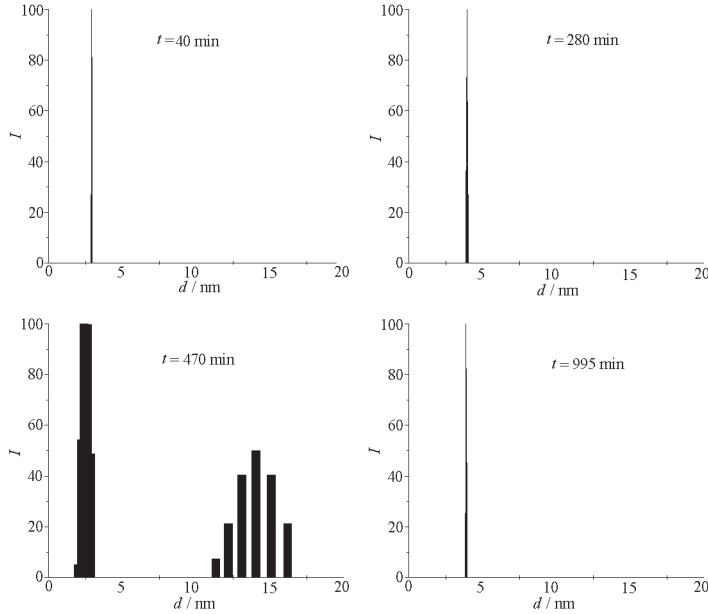


图 3 盐溶法生长晶体时  $50 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  溶菌酶溶液中颗粒直径随时间的变化图

Fig. 3 Lysozyme size distribution with time during crystallization using NaCl solution dissolving method

The concentration of lysozyme is  $50 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , Y axis is the intensity of scattering light

酶分子的作用情况。水溶法中是将溶菌酶直接溶解于水中，由于溶剂化效应，溶菌酶分子间的电场交错，并且缺少静电屏蔽，在溶菌酶-溶菌酶之间相互作用中起十分重要的作用，分子间的斥力相对只起较次要的作用<sup>[5]</sup>。溶菌酶分子倾向于相互作用而形成多个溶菌酶分子的聚集体。反映到光散射的结果

上，就是有几百纳米的颗粒存在。应该指出的是，几百纳米并非聚集体的真实大小。这是因为根据 Einstein-Stokes 公式：

$$R = \frac{kT}{6\pi\eta D}$$

其中， $R$  为颗粒的直径， $k$  为 Boltzmann 常数， $\eta$  为

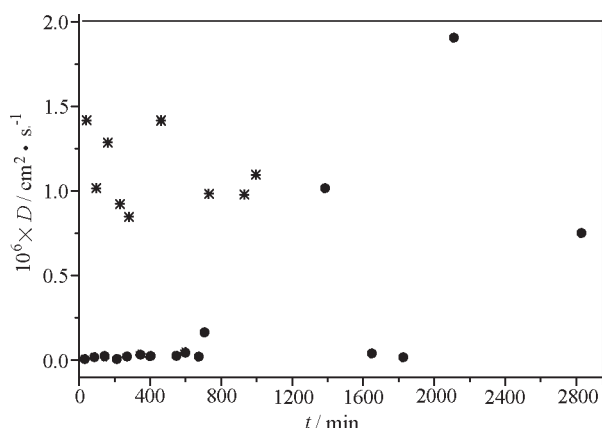


图4 50 mg·mL<sup>-1</sup>溶菌酶溶液中颗粒的扩散系数随时间的变化图

Fig. 4 The changes in diffusion coefficient during 50 mg·mL<sup>-1</sup> lysozyme crystallization

\* dissolved in NaCl solution, ● dissolved in water

溶液的粘度,  $D$  为扩散系数.

存在着的聚集体与聚集体之间的相互作用客观上使得扩散系数下降, 从而使聚集体直径变大. 因此, 最终计算出的聚集体大小的分布向大的方向有一个偏移, 但这并不能掩盖溶液中确实有较大的颗粒(几百纳米)存在的事实.

根据 Einstein-Stokes 公式, 用扩散系数比用直径更能反映真实情况. 只是实验所得到的扩散系数是平均值, 不能反映溶液中颗粒分布的情况. 我们在这儿给出了晶体生长过程中扩散系数随时间的变化情况(见图4). 从图4中可见, 水溶法扩散系数在一段时间内基本不变, 然后逐渐增大再变小, 而盐溶法扩散系数随时间增长基本保持不变.

水溶法气相扩散生长晶体开始后, 溶菌酶水溶液与含 NaCl 的缓冲溶液相混合, 混合溶液中的 NaCl 分子首先使溶菌酶分子之间产生了静电屏蔽, 聚集体逐渐解聚集, 最终溶液中几乎全部是单个的溶菌酶分子及二个溶菌酶分子的聚集体. 然后由于 NaCl 的盐析效应<sup>[10]</sup>, 晶体生长就从溶菌酶解聚集形成单分子后开始进行了. 这验证了文献所说的“要得到晶体, 在溶液过饱和前, 不能发生反应或有聚集存在”<sup>[4, 11]</sup>. 同样的道理, 用盐溶法生长溶菌酶晶体, 由于开始实验前溶液静置了 24 h, NaCl 已经使溶菌酶分子的相互作用力大为减弱. 从图3中可见, 从开始实验到 280 min 时, 溶液中基

本上只有 3–5 nm 大小的颗粒存在. 根据文献[9], 溶菌酶分子 X 射线的结构大小为 4.5 nm × 3.0 nm × 3.0 nm, 如果将溶菌酶分子作为一个球体, 其直径是 3.2 nm. 那么可以认为, 在溶液中基本上以单个溶菌酶分子(3.0 nm)或两个溶菌酶分子的聚集体(4–5 nm)存在.

为了佐证上面的解释, 我们用水溶法做了浓度为 25 mg·mL<sup>-1</sup> 溶菌酶的晶体生长实验(见图5).

对比图2和图5可看出, 25 mg·mL<sup>-1</sup> 溶液在晶体生长的起始阶段, 没有出现 50 mg·mL<sup>-1</sup> 那样的较大的颗粒(几百纳米), 只出现了 8–17 nm 大小的颗粒. 这表明, 由于溶菌酶的浓度较小, 分子间的距离较大, 分子与分子之间电场重叠的程度就比较低, 相互之间的作用力也较小.

前人的工作已经清楚地证明了 NaCl 能够使溶菌酶溶液生长出来的是晶体而非无定形沉淀<sup>[4, 12]</sup>. Kam<sup>[1]</sup> 等认为, 结晶是协同地一步一步地增加单体的过程. 但 Mikol 等<sup>[4]</sup> 认为要从实验上证明这一点很困难. 本文从实验上证明了 Kam 等的观点是正确的, 即 NaCl 使得溶菌酶以单个分子形式存在从而才能使溶菌酶分子以正确的形式相接触, 并最终形成晶体.

我们的气相扩散法结果和文献[7]用批量法得到的结果有不同之处. 前者在实验过程中偶尔才观察到晶体的存在(即使已经有晶体生长出来了), 而后者在晶体生长出来后一直都能观察到晶体的存在. 因此前者更多的是得到了溶菌酶生长过程中溶液的情况, 后者更多的是反映溶菌酶核的情况. 我们认为这种情况的出现与这两种生长晶体的机理不同有关系. 过饱和度是晶体生长的最终驱动力, 形成过饱和的速率在结晶过程中起着十分重要的作用. 过饱和度定义为  $\sigma = \ln(c/s)$ , 其中  $c$  和  $s$  分别为蛋白质浓度和溶解度. 气相扩散法和批量法达到过饱和的方法是不同的. 气相扩散法是通过改变浓度获得过饱和, 而批量法是通过改变溶解度获得. 前者通过改变浓度梯度的不同, 可使达到过饱和的速率非常小; 而后者由于受降温装置的限制, 通过降温所产生的浓度变化不可能非常小.

另外, 在水溶法实验中, 我们发现这样一种现象: 图2中颗粒大小随时间呈波浪形变化, 即 30 min 时, 大小在 300–1200 nm 之间; 85 min 时, 减

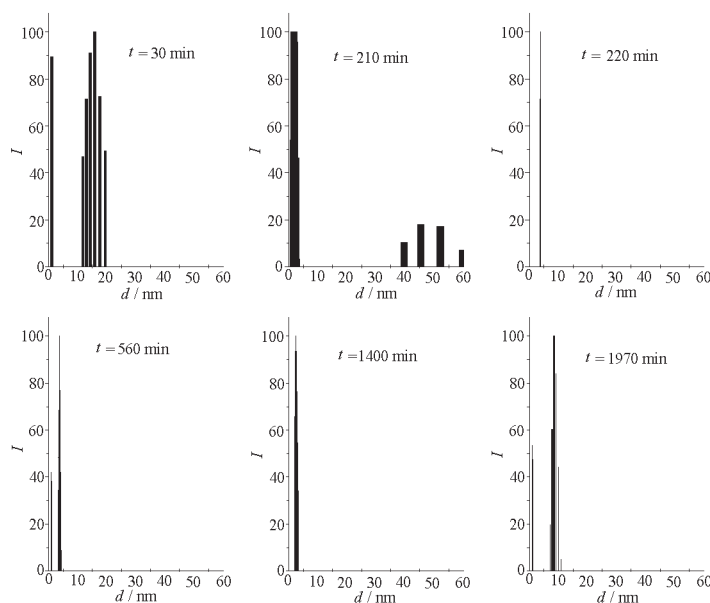


图5 水溶法生长晶体时  $25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  溶菌酶溶液中颗粒直径随时间的变化图

Fig. 5 Size distribution with time during lysozyme crystallization using water dissolving method

Lysozyme concentration is  $25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , Y axis is intensity of scattering light

小到  $200 - 500 \text{ nm}$ ; 到了  $145 \text{ min}$ , 颗粒大小又增大到了  $300 - 800 \text{ nm}$ . 随着时间的进行, 这种颗粒大小“逐渐增大 - 逐渐减小 - 逐渐增大”的过程还在继续着. 直到  $1370 \text{ min}$  后, 检测出的颗粒大小才基本稳定在几纳米左右.

我们认为产生上述现象是由于在晶体生长的过程中, 光散射实验检测到的是生长晶体的溶液的情况, 而并非检测某个晶体颗粒逐渐生长的过程. 由于用气相扩散法生长晶体, 晶体生长的过程是较缓慢、有序地进行, 不会爆发式出现晶体. 因此在实验过程中整个溶液中的晶核或晶体数非常少. 散射体积约为  $0.07 \mu\text{L}$ , 占整个溶液体积的  $0.1\%$ , 那么在散射体积中出现晶核或晶体的几率就更小, 反映到检测结果上是在整个检测过程中, 大多出现  $3 - 4 \text{ nm}$  颗粒大小的情况, 甚至在用光学显微镜观察到有微晶体生长出来后, 这种情况仍然存在. 但是在图 2 中为什么有时候有较大的颗粒出现呢? 一种可能是前面所解释的, 实验刚开始时, 溶菌酶分子之间存在较强的相互作用, 溶液中普遍存在较大的聚集体; 另一种可能是, 随着气相扩散的进行, 溶菌酶溶液中的  $\text{NaCl}$  浓度越来越大, 使得溶菌酶分子之间存在的净斥力逐渐变为净吸引力<sup>[10]</sup>, 逐渐形

成晶核, 再生长成晶体. 由于重力和表面张力的作用, 溶菌酶晶体易在晶体生长池底与溶液交界面形成<sup>[13]</sup>. 实验过程中, 在散射体积中出现的晶核随时间逐渐增大 (反映在结果上是有几百纳米的颗粒) 到一定程度后, 会由于重力或表面张力的作用, 向下或向上最终在池底或气液界面上形成微晶体, 从而从散射体积中消失. 使得检测到的颗粒大小减小为几个纳米, 于是用动态光散射检测出来的最终结果就是出现颗粒大小忽大忽小的情况.

### 3 结论

气相扩散法生长溶菌酶晶体过程用光散射观察是首次采用的一种方法. 它较用批量法生长晶体更易观测到生长晶体的溶液的情况以及由于盐的存在溶菌酶分子之间相互作用逐渐生长出晶体的情况. 晶体生长过程中, 溶液中溶菌酶始终保持单分子与两分子聚集体的状态. 即使溶菌酶在起始时存在着一定大小的聚集体, 最终也会在盐的作用下, 逐渐解聚集成单分子, 再由单分子之间以正确的方式接触形成晶体, 这种溶液中的溶菌酶分子保持单分子的状态是生长晶体的基础.

## References

- 1 Kam Z, Shore H B, Feher G. *J. Mol. Biol.*, **1978**, **123**: 539
- 2 Feher G, Kam Z. *Methods Enzymeology*, **1985**, **114**: 77
- 3 Kadima W, McPherson A, Dunn F D, *et al. Biophys. J.*, **1990**, **57**: 125
- 4 Mikol V, Hirsch E, Giege R. *J. Mol. Biol.*, **1990**, **213**: 187
- 5 Muschol M, Rosenberger F. *J. Chem. Phys.*, **1995**, **103**: 1995
- 6 Neal B L, Asthagiri D, Velez O D, *et al. J. of Crystal Growth*, **1999**, **196**: 377
- 7 Bishop J B, Fredericks W J, Howard S B, *et al. J. of Crystal Growth*, **1992**, **122**: 41
- 8 Malkin A J, McPherson A. *Acta Cryst.*, **1994**, **D50**: 385
- 9 Phillips D C. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **1967**, **57**: 484
- 10 Piazza R. *J. of Crystal Growth*, **1999**, **196**: 415
- 11 Zulanf M, D'Aray A. *J. of Crystal Growth*, **1992**, **122**: 102
- 12 Guo B, Kao S, McDonald H, *et al. J. of Crystal Growth*, **1999**, **196**: 424
- 13 Duan L, Shu J Z. *J. Crystal Growth*, (in press)

## Study on Lysozyme Crystal Growth by Vapor Diffusion Approach Using Dynamic Light Scattering Method

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** Both vapor diffusion approach and batch mode are often used approaches for protein crystallization. The light scattering method is a powerful tool particularly for prenucleation study. However, all light scattering studies were limited to the crystallization process of the batch mode. To apply dynamic light scattering technique to the protein crystallization study for the vapor diffusion approach, as well as the batch mode, a special sample cell (see Fig. 1) was desired in the present work. It has two separate parts, a scattering cell and a thin tube filled with salt solution. The results showed that our special cell was reliable for light scattering study (see table 1). In our experiments, vapor diffusion approach was mainly used. Sodium acetate buffer solution,  $0.04 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 4.5$ , was mixed with sodium chloride, whose final concentration was  $0.345 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ . Chicken egg white lysozyme was dissolved in the above solution with a concentration of  $50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  and  $25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ . Two lysozyme dissolution ways were used. One was lysozyme dissolved in only sodium acetate buffer solution and another is in buffer solution with sodium chloride. Their results were different (see Fig. 2 and Fig. 5), that showed NaCl played an important role in the interaction of lysozyme molecules. Due to the feature of vapor diffusion approach, it was verified that the force between lysozyme molecules in the solution is weak during the whole crystallization process, which is desirable for crystal growth, namely, lysozyme molecules kept in monomolecule or aggregation of bimolecules in solution when lysozyme crystal grew. Besides, our results show that there is a significant difference between this approach and the batch mode (decreasing temperature) even if other parameters are the same. This significant difference is the direct result of different ways of supersaturation. Vapor diffusion approach, compared to batch mode is a more temperate, precisely controlled way to realize supersaturation.

**Keywords:** Dynamic light scatter, Vapor diffusion approach, Crystal growth, Lysozyme, Diffusion coefficient, Batch method