

研究工作

溶液流动对等电溶菌酶晶体生长的影响

刘山 黄悛 肖雯 周尧和

(西北工业大学凝固技术国家实验室,西安 710072)

提 要

本文对等温自由生长和强制性溶液生长的等电溶菌酶的晶体形态进行了研究,发现这些形态变化与溶液相的流动密切相关,指出生物晶体生长停止是由于生长晶体周围的溶质贫乏造成的;通过某些手段减薄或消除这一溶质贫乏区,就可以保证晶体的持续生长。本文的研究对改善大尺寸晶体的生长提供了一条途径。

关键词 蛋清溶菌酶,溶液流动,生长停止,强制性溶液生长,大尺寸晶体

前 言

由于生物芯片技术、生物电子技术、生物制药等发展需要,目前世界上许多国家都投入了大量人力、物力和财力开展大分子生物晶体的结晶过程的研究,包括微重力环境中进行的探索性实验^[1,2]。

蛋白质等生物大分子的结晶生长过程,与无机小分子相比,一个明显不同在于前者的生长停止现象(cessation of growth)。已有许多研究者对此提出了解释,以下三种观点比较流行:

1. 表面变性(denaturation)作用^[3]: 这种观点认为,晶体长大到一定程度之所以拒绝生长,是因为表面层中的分子发生变性作用,由原来的球形结构伸展成直链状,改变了表面性质。

2. 表面污染(poisoning)作用^[4,5]: 这种观点认为,晶体表面层中的一些位置由杂质原子占据,污染了晶体表面,改变了界面状态,使溶液中的溶质分子无法在晶体表面沉积。

3. 溶液相的流动破坏了固/液界面状态,导致晶体停止生长^[6]。目前,有人报道溶液相流

动造成溶菌酶晶体的(110)晶面的生长速度降低^[6]。

然而,以上三种观点均不能完满地解释实验现象,有的甚至与之相矛盾。

为了弄清楚生物大分子的生长停止机制,为了能够使生物晶体长大,以便进行结构分析和生物物理性能测试,作者分析了生长晶体界面附近的传热传质行为,提出了稳定换液的强制性溶液生长的生物物理技术。利用常用于研究的模型蛋白质——蛋清溶菌酶,定性考察了等温自由生长时的自然对流效应和强制性溶液生长时的强迫对流效应,对生长停止机制提出了自己的观点,并且初步找到了使生物晶体长大的方法。

材 料 和 方 法

对强制性溶液生长,实验装置如图1所示,冷端固定在4℃,热端固定在25℃,抽拉速度平稳宽幅可调,调节范围为 $\text{\AA}/\text{s}$ — mm/s ,实验溶液密封在厚度为0.5mm的薄型试样盒中,试样盒位于热端的部分放置叶片,利用磁力驱动叶片旋转造成溶液相的强迫对流,达到连续稳

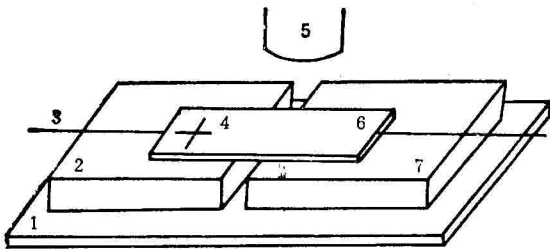


图1 实验装置示意图

Fig. 1 Schematic diagram of experimental apparatus

1. 实验平台, 2. 热端, 3. 抽拉系统, 4. 叶片,
5. 体视显微镜, 6. 试样盒, 7. 冷端
1. horizontal plat, 2. heater, 3. pulling system,
4. propeller, 5. stereomicroscope, 6. sample cell,
7. cooler

定换液的目的。

等温自由生长时, 把配制的一定浓度的溶液密封在内径为 4mm、长度为 30mm 的导管中, 放入 4°C 的冷阱中进行恒温生长。

实验选用 5% 溶菌酶 (lysozyme) + 5% NaCl 溶液, 用 1mol/L 的 NaOH 调整其 pH 在 10—11 之间。选用的是北京生物物理所生产的电泳纯蛋清溶菌酶材料。为方便分析起见, 没有加入缓冲液。

结果和结论

1. 等温自由生长

图 2a—c 是三种不同取向的等电溶菌酶的生长形态。图 2a 是等电束的轴向与重力加速度 \vec{g} 的方向成直角时的情形, 等电束的两侧基本对称发展; 图 2b 是等电束的轴向与 \vec{g} 成锐角时的情形, 可以看出束的两侧并不对称发展, A 侧的发展高于 B 侧; 图 2c 是等电束的轴向与 \vec{g} 平行的情况, 生长方向与 \vec{g} 一致的一侧完全发展, 而另一侧的发展被完全抑制, 形成单侧发展的形态。

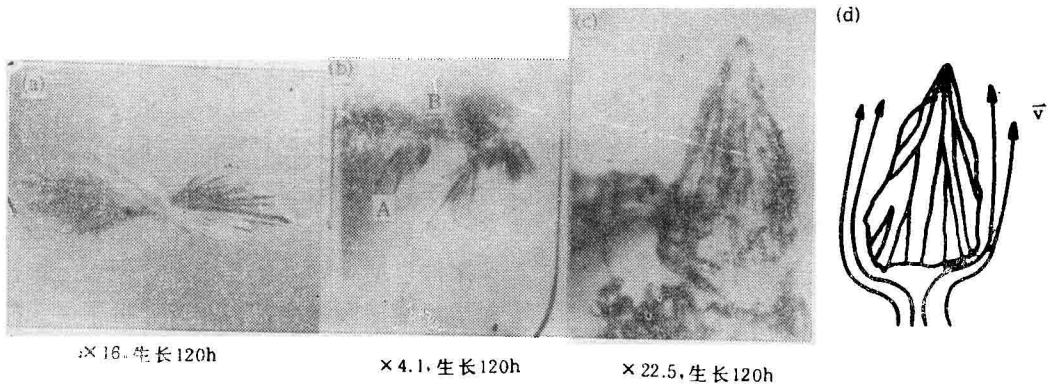


图2 不同生长形态和界面附近的溶液流动

Fig. 2 Different growth morphologies and solution flow around a growing interface

a: $\alpha = 90^\circ$; b: $\alpha \approx 40^\circ$; c: $\alpha = 0^\circ$; d: $\alpha = 0^\circ$ 时的溶液流动

α : 束生长轴向与 \vec{g} 的夹角

\vec{v} : 溶液流动速度

a: $\alpha = 90^\circ$; b: $\alpha \approx 40^\circ$; c: $\alpha = 0^\circ$; d: solution flow when $\alpha = 0^\circ$

α : Angles between growth direction and gravitational acceleration \vec{g}

\vec{v} : solution flow velocity

造成这种形态差别的原因是: 在晶体生长过程中, 晶体表面附近由于界面反应会形成一定厚度的溶质贫乏层^[4], 由于溶质贫乏层内的溶液密度比其它地方的低 (针对蛋清溶菌酶晶体生长的体系而言), 一旦两者的差别达到一定程度, 由此产生的浮力作用足以克服粘滞力的作用, 就会发生浮力流, 流动模式示意于图 2d;

流动的发生使晶体表面附近的溶质贫乏的溶液离开晶体表面而上浮, 而富含溶质的新鲜溶液就被不断地送到生长晶体的表面, 因而生长方向与 \vec{g} 一致的一侧一直接触到富含溶质的溶液, 溶质分子就会不断地进入到晶体表面的生长位置, 造成这一侧的持续生长; 而生长方向与 \vec{g} 相反的一侧则一直受到自下而上的溶质贫乏

的热溶液的作用而生长缓慢,极端情况下形成图 2c 所示的单侧发展的等电束。

这就是说,由于晶体生长过程中的界面反应造成界面附近溶液的过饱和度降低,晶体生长的驱动力减小;与此同时,浮力流的发生,使新鲜溶液不断接触到晶体表面,界面附近的溶液的过饱和度重新增加,驱动晶体不断生长。

2. 强制性溶液生长

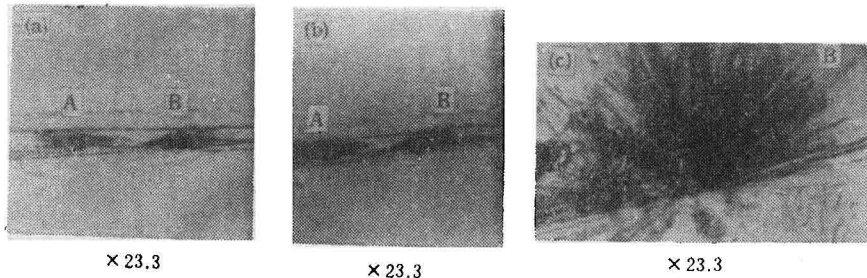


图 3 强制性生长时的等电束形态演化

Fig. 3 Morphological evolution of crystals grown under constrained condition

a: 生长初期的等电束 b: 约 10h 的等电束 c: 液相流动下的等电束(液相流动约 48h)

a: Growth morphology at the early stage b: Morphology after ~10h growth c: Morphology after solution flows ~48h

等电束的这三阶段形态演化,也是与溶液的过饱和度即从溶液中生长晶体的驱动力密切相关。一开始形成核及最初的生长,晶体的尺寸很小,等电束两侧所遇到的溶液的过饱和度(由于温度引起的热过饱和度)相差无几,两侧生长速度相差不大,基本上对称发展;待晶体生长到某一尺寸后,由于 A 侧面向冷端,A 侧的生长端遇到的溶液温度较低,过饱和度也就较大;B 侧则正好相反,从而 A 侧的生长较快(图 3b);当溶液经过旋转叶片搅动后,驱使溶液强迫对流,使得生长界面附近的溶质贫乏的溶液强制性地被富含溶质的溶液所代替,这样,因溶质浓度引起的溶质过饱和度提高,对晶体生长起主导作用,使 B 侧持续不断地迅速生长,形成图 3c 所示的等电束。

从上述的定性讨论可以看出:晶体生长界面上的过饱和度降低(包括热过饱和度和溶质过饱和度),使得晶体生长的驱动力减小;当减小到一定程度,不能推动液相的溶质分子越过能垒进入晶体中时,就会导致晶体生长停止。

图 3 是强制性生长的等电束菌酶的形态演化。图 3a 是等电束形成初期的形态,两侧比较对称发展;图 3b 是经过一段时间(约 10h)后的形态,可以看出 A 侧(靠近冷端的一侧)生长快于 B 侧(面向热端的一侧);图 3c 是液相经过强迫对流、稳定换液后的溶菌酶的生长形态,B 侧生长十分迅速,经过约 48h 的生长后,将 A 侧的晶体基本上掩盖掉,形成类似于图 2c 的形态。

但是,如果采取某种手段,如连续换液或像本实验设计的靠液相对流造成界面前沿稳定换液的方法,使生长界面上一直保持有大的过饱和度,可以一直使晶体生长,得到大尺寸的生物晶体。当然,一个前提是溶液中的形核率要低。

对溶菌酶等生物大分子的晶体生长,之所以其周围的溶质贫乏层能够稳定存在,可能是由于如下两个原因引起的:(1)生物分子的尺寸大,在溶液中的扩散系数小,分子的扩散均匀化能力差;(2)生物大分子本身多带电荷,周围存在扩散双电层,这样晶体表面层的分子所带电荷与溶液中的溶质分子所带电荷同性,静电斥力使得溶质贫乏层能稳定存在。

由以上的分析可以得到这样的结论:生长晶体界面附近稳定存在的溶质贫乏层是生物大分子晶体生长停止的根本原因,改善该区域内的溶质传输,提高晶体生长的驱动力是获得适合于结构分析和性能测试的大尺寸晶体的有效手段。

参 考 文 献

- 1 Delucas L J, Suddath F L, Snyder R *et al.* *J Crystall Growth*, 1986; 76: 681
- 2 Bugg C E. *Protein crystal growth in space*. AIAA-87-0387, AIAA 25th Aerospace Science Meeting, Nevada: Reno, Jan. 12, 1987
- 3 Timasheff S N, Arakawa T. *J Crystall Growth*, 1988; 90: 39
- 4 Blundell T L, Johnson L M. *Protein Crystallography*. New York: Academic Press, 1976: 108
- 5 Seiker L C. *J Crystall Growth*, 1988; 90: 31
- 6 Pusey M, Witherow W, Naumann R. *J Crystall Growth*, 1988; 90: 105
- 7 Kam Z, Shore H B, Feher G. *J Mol Biol*, 1978; 123: 539

[本文于1990年9月7日收到,11月17日修回]

EFFECTS OF SOLUTION FLOW ON THE GROWTH MORPHOLOGIES OF EGG-WHITE LYSOZYME CRYSTALS AT ISOELECTRIC POINT

Liu Shan, Huang Tao, Xiao Wen, Zhou Yaohe

(National lab of solidification processing, northwestern polytechnical university, Xi'an 710072)

Abstract

A careful study has been made on different morphologies of lysozyme crystals at isoelectric point under isothermal and constrained growth conditions. It is found that the morphologies are closely related to solution flow. Judging by the experimental results, the cessation of biological crystal growth is due to the solute-depletion zone stably existing around the growing crystals. Reducing or removing the solute-depletion zone may ensure the continuous crystal growth. This approach throws some light on the possibility of growing large-dimensional biological crystals.

Key words egg-white lysozyme, solution, flow, cessation of crystal growth, constrained solution growth, large-dimensional crystals

(上接第 387 页)

糖结合部位无特异性,因此, hCG 的纯度无法保证,并且,解离液中的糖不易除去,柱再生也受到一定限制。我们制备的亲和层析柱已使用十数次,时间半年以上,尚未见有明显活性丧失。与其它几种纯化方法比较,本法的回收率,免疫活性明显提高,生物活性基本相同^[1,6]。

目前, hCG 纯品已广泛用于诊断试剂和临床用药,特别是对闭经、子宫出血、黄体功能不全及不孕等疾病的治疗。本文介绍的亲和层析提纯 hCG 的方法由于具有简便、经济、快速、活性高等优点,为大量生产和纯化 hCG 提

供了一条很有希望的途径。

参 考 文 献

- 1 Bahl Omp. *J Biol Chem*, 1969; 244: 567
- 2 Yuki Y, Nishimura R, Mochizuki M. *Acta Obst Gynaec Jpn*, 1986; 38: 417
- 3 戚少然,唐玉钗,杨春富等. 解放军医学杂志,1986;11: 377
- 4 Koyama K, Toda K, Kuriyama D *et al.* *Acta Endocrinologica*, 1986; 112: 579
- 5 Kato Y, Braunstein G D. *J Clin Endocrinol Metab.* 1988; 66: 1197
- 6 王海云,徐一树,德淑兰等. 生殖与避孕,1982; 2: 12

[本文于1990年7月9日收到,11月16日修回]