

• 研究论文 •

溶菌酶晶体生长过程中的扩散传质问题

段 俐 康 琦* 李根培

(中国科学院力学研究所 国家微重力实验室 北京 100190)

摘要 采用 Mach-Zehnder 干涉测量系统与图象处理系统相结合实时观测溶菌酶蛋白质晶体生长过程中的流体动力学现象, 对汽相扩散法溶菌酶蛋白质晶体生长过程进行了研究, 观测到溶菌酶晶体生长时晶体周围存在的干涉条纹. 分析了晶体生长时的重力沉降效应和溶质扩散过程. 实验结果表明, 该生长过程中的流体物理特征直接影响了生长晶体的晶面. 根据实验结果, 给出对蛋白质晶体生长过程流体物理现象的讨论.

关键词 干涉测量; 晶体生长; 扩散; 重力沉降

Diffusion Mass Transfer in Lysozyme Crystal Growth

Duan, Li Kang, Qi* Li, Genpei

(National Microgravity Laboratory, Institute of Mechanics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190)

Abstract An optical diagnostic system consisting of a Mach-Zehnder interferometer with an image processor was used to study the kinetic process of crystal growth. The crystallization process of lysozyme protein by vapor diffusion was investigated. The interference fringes around the growing lysozyme crystal were observed in real time. The effects of sedimentation and diffusion were analyzed. The experiment demonstrates that the fluid physics characteristic has an obvious influence on the solidification of the crystal growing face. According to the present experiment, a discussion on the protein crystal growth has been advanced.

Keywords interference measurement; crystal growth; diffusion; sedimentation

随着分子生物学、物理学、化学、以及计算机科学的发展, 各种生物大分子晶体生长技术也在不断地发展. 由于蛋白质晶体生长过程的复杂性使人们还不能完全地理解蛋白质晶体生长过程和晶体的特征. 尽管人类获得蛋白质晶体的历史(已有一个半世纪)相当长, 但至今尚无定量的晶体生长原理来指导蛋白质晶体生长. 因此目前本领域中技艺多于科学, 偶然因素(运气)和经验起相当作用, 基本上是“hit-and-miss”或者“trial-and-error”, 人们无法控制结晶过程而达到预期目标, 更无法预测其结果. 近年来人们开始注意到该领域, 借助其它学科的最新实验技术, 注重研究生长机制和影响因素, 并出现新的概念《生物大分子发生学》.

晶体生长动力学实验在晶体生长科学和技术的发

展进程中起着关键的作用. 目前, 在国际上, 采用光学干涉法或全息法等光学手段对于一些尺度较大的无机盐晶体的生长规律已作了一些研究^[1-5]; 而对于蛋白质晶体, 由于其尺度小, 最大尺度约在1 mm左右, 应用常规的光学实验方法很难研究蛋白质晶体的生长机制. Miyashita^[6,7]用载波条纹的方法观测了溶菌酶晶体生长过程的浓度分布, 他是通过判断条纹在晶体处的弯曲判断浓度扩散层的存在, 认为扩散层厚度为170 μm , 并且在他的研究中没有给出定量的浓度分布.

在重力环境中生长晶体, 浓度的变化可能导致浮力对流的产生. 固有的分子结构和分子间的相互作用以及其它的许多因素(包括对流)影响了晶体的结构, 因此许多研究者们认为微重力环境中由于重力水平的降低, 浮

* E-mail: kq@imech.ac.cn; Tel: 010-82544112

Received December 15, 2007; revised September 25, 2008; accepted November 15, 2008.

国家自然科学基金(Nos. 10672171, 10432060)和中国科学院三期创新重要方向资助项目.

力对流和重力沉降效应被抑制, 生长晶体的尺寸和质量要优于地面生长的同类蛋白质晶体. 近些年来空间蛋白质晶体生长实验表明, 只有 60% 空间蛋白质晶体生长优于地面生长的同类蛋白质晶体, 还有 40% 的空间生长的蛋白质晶体没有达到人们预测的结果.

本文采用 Mach-Zehnder 干涉系统研究溶菌酶蛋白质晶体生长过程中的流体动力学现象, 实时观测到与浓度变化有直接关系的干涉条纹. 本实验结果表明, 影响蛋白质晶体生长的主要因素是重力引起的重力沉降效应、浓度变化引起表面张力的不均匀导致的浓度毛细对流现象、以及溶质的扩散过程. 本文集中讨论重力沉降效应和扩散过程, 浓度毛细对流现象将在其它地方讨论.

1 实验设备

将溶菌酶蛋白(Cat, NO L6876, Lot NO 46F-80601)溶于蒸馏水中, 使蛋白质浓度为 25 mg/mL. 混合 2 min, 然后用每分钟 8000 转的离心机分离 15 min. 其它的本实验中所使用的化学试剂均是分析纯而没有再做其它的净化, 但是所有的溶液均用过滤器过滤. 采用汽相扩散法进行蛋白质晶体结晶. 其晶体形貌简图如图 1 所示, 顶部有 4 个晶面为(101), 底部有 4 个晶面为(101), 两个侧面为(110)面.

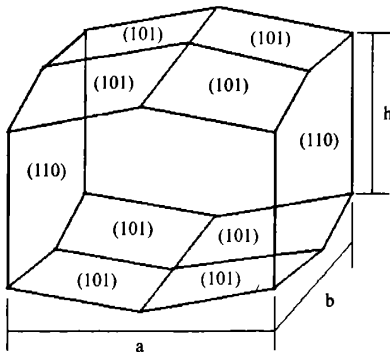
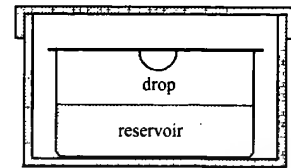


图 1 溶菌酶蛋白质晶体晶面分布

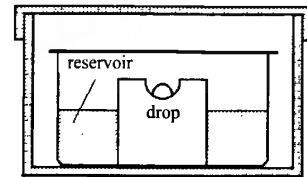
Figure 1 The crystal faces of lysozyme protein crystal

悬滴法和座滴法是蛋白质晶体生长经常采用的汽相扩散生长方法. 悬滴法汽相扩散是将少量母液悬在盖玻片下面, 然后放在含沉淀剂的小穴上, 通过汽相扩散结晶蛋白质晶体, 如图 2(a)所示. 座滴法汽相扩散是将少量母液滴在小槽内, 然后将小槽放在含沉淀剂的小池内, 通过汽相扩散结晶蛋白质晶体, 如图 2(b)所示. 池液中的沉淀剂、样品中的盐、以及有机溶液的浓度通过汽相扩散达到平衡. 通常, 蛋白样品中的盐浓度低于池

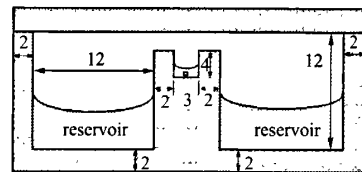
液中的盐浓度, 蛋白样品中的水份将蒸发扩散至池液中, 蛋白质晶体将在样品液中生长.



(a)



(b)



(c)

图 2 (a)和(b)常规的汽相扩散方法; (c)适合于光学测量的汽相扩散方法

Figure 2 (a) and (b) the conventional vapor diffusion methods; (c) the vapor diffusion method which is fitting for interference measurement

实验室中所采用的传统的汽相扩散方法由于座滴或悬滴液面的弯曲而使得该方法不能用光学干涉的方法进行观测. 因此本项研究中设计了一种适合于光学干涉测量的汽相扩散法生长蛋白质晶体的生长池模型, 如图 2(c)所示, 它采用 K9 光学玻璃制成, 一个 3 cm×2 cm×4 mm 的小池用于盛装蛋白质样品溶液, 两个大池用于盛装沉淀剂. 这种生长池生长晶体的方法与传统的座滴法非常相似.

本实验中采用了显微 Mach-Zehnder 干涉技术和四步相移技术. 光学诊断系统简图如图 3 所示. 一束 He-Ne 激光经过透镜 L1 和 L2 后形成平行光束, 经过分束镜 Bs1 分成两束, 一束光作为物光, 一束光作为参考光. 物光经反射镜 M1 反射后垂直地通过晶体生长池, 然后经过分束镜 Bs2. 参考光经装有益于四步相移的压电陶瓷的反射镜 M2 反射后, 再被分束镜 Bs2 反射. 此时, 物光与参考光在空间相遇形成干涉条纹, 该条纹记录了生长池中溶液浓度的变化情况. 图象采集系统由透

镜 L3, L4, 以及 CCD 组成, 图象测量范围是 $2.0 \text{ mm} \times 1.6 \text{ mm}$, 测量精度是 $2 \mu\text{m}$.

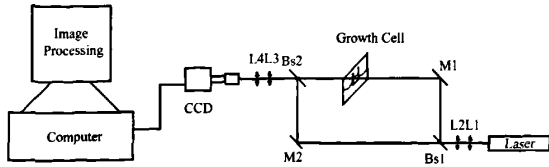


图3 Mach-Zehnder 干涉测量系统

Figure 3 Mach-Zehnder interferometer

2 蛋白质晶体生长实验

采用汽相扩散法结晶时保持恒温 292 K . 母液由 $6 \mu\text{L}$ 的浓度为 25 mg/mL 的溶菌酶溶液加 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 pH 为 4.5 的 $6 \mu\text{L}$ 醋酸钠所组成. 将母液注入中间小池中, 将 $400 \mu\text{L}$ 的池液注入两侧大池中, 然后将该样品池密封好, 置于 Mach-Zehnder 干涉仪上. 首先将该干涉系统的干涉条纹调节到无限宽状态. 此时图象中无任何干涉条纹.

在实验的最初的 2 d 没有晶体生长出来. 2 d 后, 晶体池中出现一些小晶体, 出现晶体的地方有干涉条纹出现. 该干涉条纹反映了晶体生长时溶液中浓度的变化, 实验过程如图 4 所示. 显微 Mach-Zehnder 干涉系统每隔 1 h 采集一次图象, 每次做四步相移, 历时 8 d . 采集图像 408 次, 共采集图像 $408 \times 4 = 1632$ 帧, 图像采集的时间计算机均有记录.

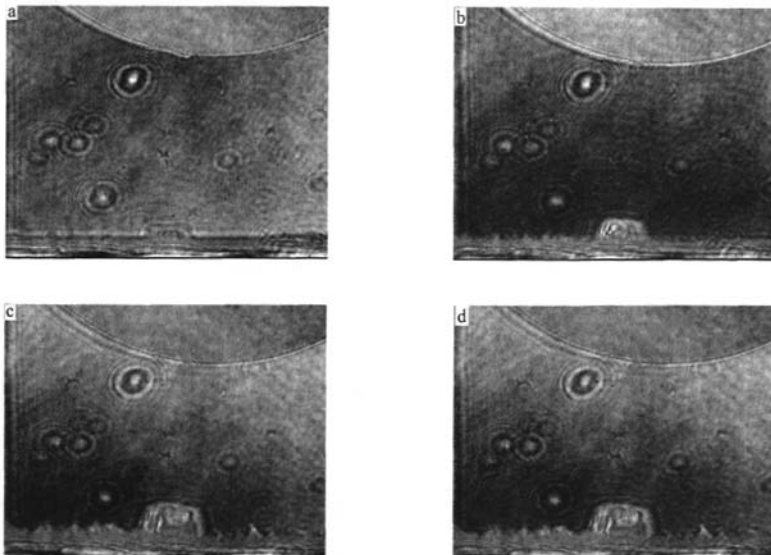


图4 溶菌酶晶体生长过程干涉条纹图($2 \text{ mm} \times 1.6 \text{ mm}$)

Figure 4 The interference fringes in the process of the lysozyme protein crystal

(a) $t = 78 \text{ h } 50 \text{ min}$; (b) $t = 163 \text{ h } 7 \text{ min}$; (c) $t = 259 \text{ h } 14 \text{ min}$; (d) $t = 321 \text{ h } 21 \text{ min}$

生长池底部生长了一个晶体最终尺寸达 0.5 mm 的晶体, 该晶体周围产生围绕它的圆环状干涉条纹. 该晶体生长速率快, (110) 面和上部 (101) 面均发育良好, 而下部的四个 (101) 面发育不完全, 在该晶体生长过程中产生围绕它的圆环状干涉条纹, 而没有产生如 NaClO_3 晶体生长时的羽毛状的干涉条纹^[4,5]. 本次实验中, 生长池内还生长了一些小晶体, 在这些小晶体的周围依然有干涉条纹的存在.

通过求解干涉条纹的四步相移干涉图, 可以得到溶液折射率的变化情况, 折射率与浓度的关系由 WAY-15 ABBE 折射率计测得. 测量不同溶菌酶浓度的蛋白质溶液的折射率, 实验结果如表 1 所示, 根据实验数据给出浓度与折射率的关系曲线, 如图 5 所示, 折射率与浓度的关系表达式为

$$n = 1.3492155 - 0.0002266c \quad (2.1)$$

微分后得:

$$\Delta c = -4413.1 \Delta n \quad (2.2)$$

式中浓度变化与折射率变化成正比关系.

根据四步相移技术, 计算出溶液的浓度梯度分布, 如图 6 所示, 其中(a)图是浓度变化分布图, (b)图是等浓度变化图. X 轴代表被测量区域的长度, Y 轴代表被测量区域的宽度, Z 轴代表浓度的变化. 生长池的底部中间处生长了一个尺寸大的溶菌酶晶体. 扩散层内的浓度变化可以通过计算扩散层内外的浓度变化的差值而得到.

表1 折射率和浓度的关系

Table 1 The relationship between the refractive index and the concentration

Concentration $c/(\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1})$	5.0	7.5	10.0	15.0	20.0	30.0	40.0
Refractive Index n	1.3492	1.3473	1.3467	1.3463	1.3444	1.3426	1.3400
Average n	1.3491	1.3473	1.3467	1.3462	1.3444	1.3427	1.3399

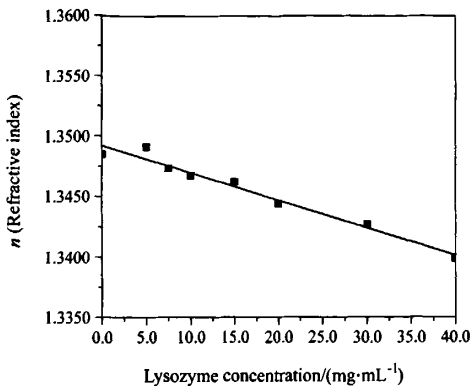
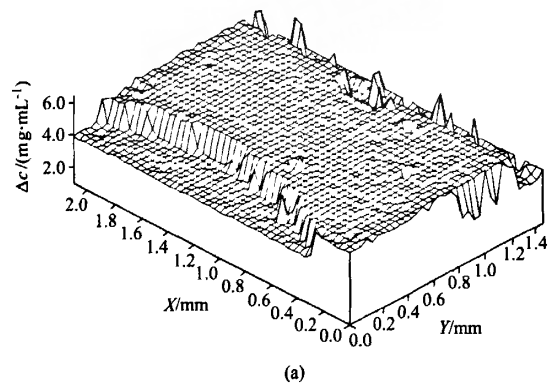


图5 折射率与浓度关系曲线

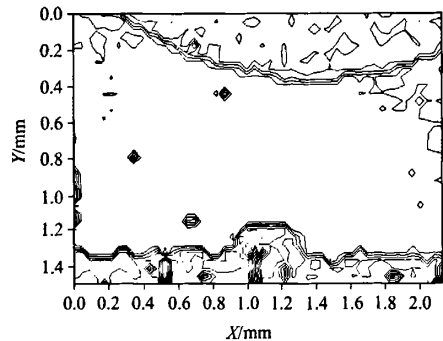
Figure 5 The relation curve between refractive index and concentration

在 $t=259\text{ h }14\text{ min}$ 时刻采集的图象中, 扩散层内外的浓度变化分别为 5.749360 mg/mL 和 5.639849 mg/mL , 因此扩散层的浓度变化为 0.1095 mg/mL .

根据四步相移的计算结果给出 $t=259\text{ h }14\text{ min}$ 时刻采集的图象中浓度变化情况与距离晶体上表面位置的关系, 如图7所示. X 轴代表距离晶体上表面的距离, Y 轴代表该位置处的浓度与远处浓度的比值. 该曲线清楚地表现出晶体生长过程中扩散层的厚度为 $\delta\approx 22\text{ }\mu\text{m}$, 扩散层内浓度变化明显, 扩散层外浓度变化非常小, 接近于零.



(a)



(b)

图6 浓度梯度和等浓度变化图

Figure 6 The concentration gradient and the counter map

3 扩散和对流

根据流体动力学的理论, Rayleigh 数的大小表征浮力对流的有无, 由于重力场中浓度梯度的存在引起的浮力对流是一个典型的流体力学问题, 也被广泛应用于许多工程问题之中. 对流的影响在文献^[5]中已做了讨论. 本文主要讨论浮力对流效应. 由于温度或浓度的不均匀而造成流体的密度不均匀, 密度低的流体趋于向重力场相反的方向运动, 即受到浮力的作用. 当浮力和热效应足以克服粘性阻力的作用时, 流体中就会产生对流, 称之为自然对流. 通常引用 Rayleigh 数作为临界参数, 浓度对流的 Rayleigh 数定义为:

$$Ra = \frac{g\beta_c \cdot \Delta c d^3}{D\nu} \quad (3.1)$$

其中 β_c , ν , D 分别为液体的溶质膨胀系数、运动粘性系数和溶质扩散系数, d 为特征尺度, Δc 为浓度差. 当 Rayleigh 数 Ra 小于临界 Rayleigh 数 Ra_c 时, 就不会产生浮力对流.

晶体生长过程中晶体周围出现围绕该晶体的干涉条纹, 该现象以及根据实验图象计算得出的浓度分布情况表明蛋白质晶体生长过程中无浮力对流的影响. 这一结论可以通过计算 Rayleigh 数的大小给出有无浮力对流的理论依据.

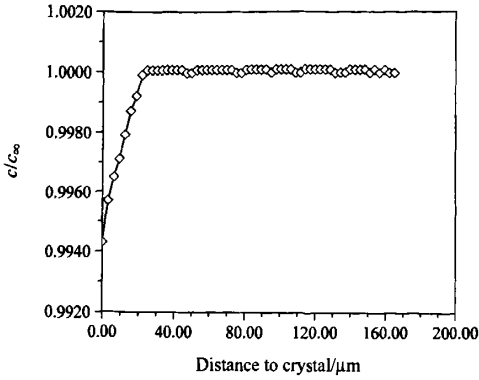


图7 溶菌酶浓度与距离晶体位置的关系

Figure 7 The concentration distribution of the lysozyme protein around the crystal

蛋白质晶体生长体系是多组分体系, 其中包含了蛋白质、沉淀剂等。在我们的汽相扩散生长体系中, 晶体生长池中的水份被蒸发到大池中的池液中, 因此蛋白质溶液的浓度与醋酸钠的浓度不断增加, 但这是非常缓慢的、均匀的汽相扩散过程, 以至于从实验采集的单幅图象中观察不到由于水分的蒸发而引起的溶液内部浓度的空间变化。因此可以认为, 在溶菌酶蛋白质晶体生长体系中, 醋酸钠溶液的浓度在任一时刻不存在空间浓度的变化, 因此为了计算 Rayleigh 数, 我们可以简化生长体系, 认为该体系是单组分体系。当晶体生长时, 靠近晶体处由于溶质的析出而造成蛋白质浓度偏低, 而远离晶体处的浓度分布趋于均匀。根据四步相移计算结果, 蛋白质晶体生长过程中, 扩散层内存在 0.1095 mg/mL 的浓度变化。由于溶菌酶的分子量为 14300, 浓度差用 mol/L 表示为:

$$\Delta c = \frac{0.1095}{14300} = 7.658 \times 10^{-6} \text{ mol/L} \quad (3.2)$$

特征尺度取远大于扩散层厚度 $d \approx 0.1 \text{ mm} = 1.0 \times 10^{-4} \text{ m}$, 粘性系数为 $\nu = 1.32 \times 10^{-6} \text{ m}^2/\text{s}^{[8]}$, 溶菌酶晶体生长体系的溶质扩散系数 $D = 7 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}^{[26]}$, 蛋白质溶液的浓度差 $\Delta c = 7.658 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ 。由于蛋白质晶体生长体系中含有大量的盐溶液, 因此溶质膨胀系数的最大值估计为 $\beta_c = 10^{-1} \text{ L/mol}$ 。根据公式计算出溶菌酶蛋白质溶液的 Rayleigh 数 Ra 为:

$$Ra = \frac{g \beta_c \Delta c d^3}{D \nu} = \frac{9.8 \times 10^{-1} \times 7.658 \times 10^{-6} \times (1.0 \times 10^{-4})^3}{7 \times 10^{-11} \times 1.32 \times 10^{-6}} \approx 8.1 \times 10^{-2} \quad (3.3)$$

从计算结果可知, 蛋白质晶体生长体系的 Rayleigh 数 Ra 小于 Turner^[10] 在 Buoyancy effects in fluids 一书中给出临界 Rayleigh 数 $Ra_c = 600$ 。因此蛋白质晶体生长体系中无浮力对流的影响。

实验结果表明, 蛋白质晶体生长过程主要由扩散过程所控制, 其通量 J 用 Fourier 定律和 Nernst 定律表示为:

$$\vec{J} = \vec{J}^T + \vec{J}^C = -k \cdot \nabla T - D \cdot \nabla C \quad (3.4)$$

k 是热扩散系数, D 是溶质扩散系数。本实验中保持温度恒定, 通量表示为:

$$\vec{J} = \vec{J}^C = -D \cdot \nabla C \quad (3.5)$$

根据实验数据, $2.2 \times 10^{-5} \text{ m}$ 厚的扩散层内浓度变化为 $0.1095 \text{ mg/m} = 0.1095 \text{ kg/m}^3$ 。计算溶质扩散通量得:

$$\vec{J} = -7 \times 10^{-11} \times \frac{0.1095}{2.2 \times 10^{-5}} = -3.484 \times 10^{-7} \text{ kg}/(\text{m}^2 \cdot \text{s}) = -0.3484 \text{ mg}/(\text{m}^2 \cdot \text{s}) \quad (3.6)$$

计算所得到的溶质通量值很小, 因此晶体的生长速率很小。

根据图 6 和图 7, 扩散层的厚度为 $\delta \approx 22 \mu\text{m}$ 。质量输运过程存在该扩散层内, 该扩散层外没有浓度的变化。本实验中, 一个晶体生长在晶体池的底部, 一些小的晶体悬浮在晶体池的溶液中, 没有晶体生长在液面处。根据图 4 的浓度分布, 液面处没有浓度变化。因此本实验中, 晶体生长时, 没有对流产生。

由于重力场中, 重力沉降效应的存在, 大尺寸的蛋白质晶体经常生长在晶体池的底部。由于晶体底部与生长池相接触而不利于溶质交换, 因此溶菌酶晶体底部 4 个(101)面发育不完全, 而晶体顶部的 4 个(101)面发育比较好。

4 结论

采用实时相移干涉系统可以观测蛋白质晶体生长过程中的浓度变化情况, 研究溶质输运过程。该技术可以观测晶体生长及其流体过程, 探索晶体生长过程中的流体动力学问题。采用显微 Mach-Zehnder 干涉系统成功地观测到蛋白质晶体生长过程中的浓度变化情况。

通过观测蛋白质晶体的结晶过程, 给出了该过程的浓度变化情况, 分析了该过程中的扩散过程和重力沉降效应, 指出蛋白质晶体生长过程中存在扩散层, 其厚度约为 20 几个微米, 浓度变化仅存在于该扩散层内, 扩散

层外浓度分布均匀. 生长在晶体池内部的晶体不能影响到液面处的浓度变化, 因此本实验中, 没有浓度毛细对流存在.

这些物理现象直接影响了晶体的生长, 晶体生长速率缓慢的原因在于晶体生长主要靠扩散过程所控制. 由于重力沉降效应, 晶体池底部溶液浓度大, 因此底部容易生长出大尺寸的晶体. 晶体生长过程中的流体物理现象影响了晶体的生长速率和晶体的表面形貌. 根据本实验结果, 我们提出重力条件下生长蛋白质晶体, 浮力对流现象对晶体生长的影响可以忽略不记.

References

- 1 Onuma, K.; Tsukamoto, K.; Nakadate, S. *J. Cryst. Growth* **1993**, *129*, 706.
- 2 Duan, L.; Shu, J. Z. *J. Cryst. Growth* **2001**, *223*, 181.
- 3 Onuma, K.; Kameyama, T.; Tsukamoto, K. *J. Cryst. Growth* **1994**, *137*, 610.
- 4 Kang, Q.; Duan, L.; Hu, W. R. *Int. J. Heat Mass Transfer* **2001**, *44*, 3213.
- 5 Schmit, J. *Appl. Opt.* **1995**, *34*(19), 3610.
- 6 Miyashita, S.; Komatsu, H.; Suzuki, Y. *J. Cryst. Growth* **1994**, *141*, 419.
- 7 Komatsu, H.; Miyashita, S.; Suzuki, Y. *Jpn. J. Appl. Phys.* **1993**, *32*, L1855.

(A0712151 Cheng, F.; Fan, Y.)