

• 研究论文 •

分子间相互作用对蛋白质晶体生长的影响

戴国亮* 彭玲 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 采用原子力显微镜对溶菌酶和刀豆蛋白 A 的分子间相互作用力的情况进行了研究, 并用动态光散射研究了此二种分子间相互作用力有较大差异的蛋白质在晶体生长条件和非生长条件下, 溶液中的聚集体的状态(大小和分散度)随浓度和温度的变化情况. 实验结果表明, 范德华力强的刀豆蛋白 A 在成核前, 溶液中的聚集体不能很快转变为生长基元, 导致晶体生长时间长; 而范德华力弱的溶菌酶, 溶液中的聚集体可以很快转变成生长基元, 晶体生长时间也较短.

关键词 分子间相互作用; 刀豆蛋白 A; 溶菌酶; 聚集体; 晶体生长

Effect of Intermolecular Interaction on Protein Crystal Growth

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

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

Abstract The intermolecular interaction of lysozyme and concanavalin A were investigated by atomic force microscopy, respectively. The mean size and polydispersity of both lysozyme and concanavalin A aggregates in solution under crystallization and non-crystallization conditions as the function of protein concentration and temperature were studied by dynamic light scattering method. The results showed that the intermolecular interaction of protein molecules had a strong effect on nucleation during protein crystal growth. Because the van der Waals force among concanavalin A molecules was stronger than that among lysozyme molecules, the growth unit of concanavalin A crystal could not appear quickly after the precipitator was mixed with concanavalin A solution, which caused the longer crystal growth time than that for lysozyme.

Keywords intermolecular interaction; concanavalin A; lysozyme; aggregate; crystal growth

水溶性蛋白质的数目众多, 目前已知数目已经超过了一万. 不同蛋白质的晶体生长条件不同, 生长晶体所需要的时间长短也不同. 此现象出现的原因是多方面的, 其中一个重要的原因就是蛋白质分子间相互作用力的差异. 蛋白质结晶或沉淀过程的微观本质是由分子间相互作用力引起的分子聚集过程. 当采用溶液法生长蛋白质晶体时, 溶液的 pH 值总是不等同于蛋白质分子的 pI 值, 以使蛋白质分子带上一定的电荷, 从而通过加入沉淀剂屏蔽部分电荷后, 减小蛋白质分子彼此之间的斥力, 在生长条件合适时(即本文后面所称“生长条件”), 可实现蛋白质分子与分子之间正确接触, 最后开始晶体

生长; 而生长条件不适合时(即本文后面所称“非生长条件”)分子之间无法正确接触, 最后只能生成沉淀^[1]. 分子间相互作用力可以分为短程相互作用力及远程相互作用力^[2]. 最重要的短程相互作用力是范德华力, 长程相互作用主要是静电相互作用及氢键^[3]. 例如, 在一价盐浓度约 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 范德华力的距离约 0.3 nm ^[4], 小于一般蛋白分子的直径. 因此当蛋白质的浓度较小时(如蛋白质溶液未达到饱和时), 较之静电相互作用及氢键等作用力而言, 范德华力可以忽略. 但是, 当固定沉淀剂的浓度而逐渐增加蛋白质的浓度时, 蛋白质分子彼此间的距离逐渐减小, 范德华力所起的作用越来越大^[5,6]. 特别是在蛋白

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

Received November 20, 2006; revised March 19, 2007; accepted April 23, 2007.

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

质晶体生长过程中, 由于蛋白质溶液均处于过饱和状态, 而且有时过饱和度和值还比较大, 分子与分子间的距离非常小, 范德华力对蛋白质晶体生长的影响很大。

蛋白质分子的聚集体或团聚体是晶体生长时蛋白质溶液中普遍存在的现象。在成核前出现的聚集体一般呈现出无序的聚集状态^[7], 而形成的晶核以及后续的晶体生长过程中出现的生长基元都是蛋白质分子有序堆积而成, 它们的形成是晶体生长中十分重要的步骤^[8], 它在一定程度上决定了蛋白质分子能否正确接触而生长成晶体, 否则在加入沉淀剂后只能生长成无定形沉淀。一般认为, 晶体的生长基元由溶液中的无序聚集体转变而成。在此无序状态到有序状态的转变过程中, 有时聚集体的大小并未发生变化^[9], 而有时聚集体的大小发生了很大的变化。因此我们推测在此转变过程中, 分子间相互作用力也同样扮演了一个十分重要的角色。目前, 主要通过第二维里系数来表征蛋白分子间相互作用力的变化^[10~12]。研究表明, 当第二维里系数为正时, 蛋白质分子之间的净作用为排斥力, 晶体不可能生长; 为负时, 净作用为吸引力, 晶体才有可能生长。然而, 在已有的研究结果中, 对于特定相互作用力如范德华力的强弱对晶体生长过程的影响, 特别是如何影响成核前蛋白质溶液中无序聚集体的状态变化的研究还不是很成熟^[9,13~15]。为此, 本文研究了分子间相互作用力中范德华力大小不同的两种蛋白质(溶菌酶和刀豆蛋白 A), 在各自的晶体生长条件和非生长条件下, 溶液中蛋白质分子形成的聚集体的差异以及这种差异对蛋白质晶体生长的影响。

原子力显微镜(Atomic force microscopy, AFM)由于具有较高的分辨率, 是生物大分子研究中常用的观察分子和聚集体的形状和构象的重要工具。此外, 通过 AFM 也可以获得分子间相互作用力的值^[16,17]。溶菌酶和刀豆蛋白 A 是晶体生长研究中常用的两种模型蛋白, 本文通过 AFM 观察了它们的聚集体的大小并比较了在分子间相互作用力上的差异。在此基础上, 采用动态光散射(dynamic light scattering, DLS)方法, 获得了上述二种蛋白质溶液中的聚集体状态(大小与分散度)随蛋白质溶液的浓度和温度的变化情况。

1 实验试剂与方法

1.1 试剂

刀豆蛋白 A (type IV): Sigma 公司(产品号: c2010, 未做进一步处理)。刀豆蛋白 A 的生长条件^[18]: 缓冲溶液为 $0.05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的磷酸盐溶液, $\text{pH}=7.0$; 非生长条件^[19]: 缓冲溶液为醋酸-三羟甲基氨基甲烷(HOAc-Tris)溶液,

$\text{pH}=4.5$; 生长条件和非生长条件下的沉淀剂均为 $0.7 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ NaCl 溶液。溶菌酶: 日本 Seikagaku 公司(产品号: 100940, 未做进一步处理)。溶菌酶的生长条件^[20]: 缓冲溶液为 $0.05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的醋酸-醋酸钠(HOAc-NaOAc)溶液, $\text{pH}=4.5$, 生长溶液中的沉淀剂(NaCl)浓度固定为 $25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; 非生长条件^[21]: 缓冲溶液为 $0.04 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 HOAc-NaOAc 溶液, $\text{pH}=4.6$ 。非生长溶液中的沉淀剂 $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ 浓度固定为 $1.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

1.2 仪器

光散射仪: BI-200SM(美国 Brookhaven 公司)。其光源为波长 532 nm 的半导体激光器(长春新产业激光实业有限公司, 200 mW)。恒温水循环器控温精度为 ± 0.1 。原子力显微镜和 Ultralevers20 微悬臂均由 Park Scientific Instrument 公司生产。

1.3 实验方法

DLS 的具体实验过程及数据处理方法参见文献^[22]。实验时, 固定散射角 90° 。实验时调节外置恒温水循环器的温度, 可实现不同温度条件下的测量。每次实验样品用量 $200 \mu\text{L}$, 样品溶液通过 $0.22 \mu\text{m}$ 的滤器后, 注入样品池, 并避免产生气泡。每个样品重复测量至少 10 次, 结果取平均值。

将蛋白质溶液滴到硅片表面, 待蛋白质在硅片表面吸附 7 min , 氮气吹干。用 AFM 观察吸附后的硅片表面的情况。AFM 的实验过程和样品处理方法参加文献^[22]。AFM 实验中采用敲击模式(Tapping mode)及 Ultralevers20 微悬臂, 实验结果是在湿度 $50\% \sim 60\%$ 、室温 20 的条件下获得的。蛋白质溶液中沉淀剂的浓度与 DLS 测量时蛋白质晶体生长条件下的沉淀剂浓度相同。溶菌酶溶液浓度为 $12 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 刀豆蛋白 A 浓度为 $0.4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2 实验结果与讨论

2.1 分子间相互作用力的比较

虽然第二维里系数可以定性表征同一类蛋白质分子间相互作用力的变化情况, 但是对于不同种类的蛋白质分子, 则无法反映出相互作用力的强弱对比。根据 AFM 设备的特点, 我们采用定性比较分子间相互作用力强弱的方法, 即通过吸附到硅片上的蛋白质分子形成的聚集体的大小来说明所研究的两种蛋白质分子的分子间相互作用力强弱不同。

取加入沉淀剂溶液 1 h 后的蛋白质溶液, 用 AFM 观察了此溶液在硅片上吸附后的硅片表面情况。实验中所选择的溶菌酶和刀豆蛋白 A 的浓度接近但小于实验温度(室温, 约 20)下的饱和度值, 缓冲溶液和沉淀剂均

与相应蛋白质晶体生长条件相一致, 以便了解晶体生长前溶液中无序状态聚集体的情况。

McAllister 等^[17]给出了 pH 4.5 时溶菌酶分子之间相互作用力的值(约 200 pN), 但是, 至少我们尚未在文献中看到有关刀豆蛋白 A 分子间相互作用力的具体数值, 因此, 本文通过 AFM 观察了溶菌酶和刀豆蛋白 A 在硅片表面上吸附后的聚集体的大小和形状, 来定性比较二者分子间相互作用力的大小。

溶菌酶只有在较低的离子强度及溶液的 pH 大于 5 的条件下才会形成二聚体或多聚体(寡聚体)^[23]。故在本文 AFM 实验的条件下(pH 4.5), 即使是在聚集体中, 溶菌酶也是以单体的形式存在。而溶液中刀豆蛋白 A 的基本形式一般是四聚体^[24]。由图 1 可以看出, 在相同的放大倍数下, 溶菌酶聚集体远比刀豆蛋白 A 聚集体要小。即使考虑到溶菌酶分子比刀豆蛋白分子小的因素(溶菌酶单体的大小是: $4.5 \text{ nm} \times 3.0 \text{ nm} \times 3.0 \text{ nm}$ ^[25]。刀豆蛋白 A 四聚体的大小是: $6.0 \text{ nm} \times 7.0 \text{ nm} \times 7.0 \text{ nm}$ ^[26]), 每个溶菌酶聚集体中所包含的溶菌酶单体的数目也要少于刀豆蛋白 A 聚集体中包含的刀豆蛋白 A 四聚体的数目。较之刀豆蛋白 A, 溶菌酶不易形成大聚集体。而对于刀豆蛋白 A 而言, 其以四聚体为基本单位而形成的聚集体的尺寸较大, 数目较多, 在本文的实验条件下甚至出现了环状大聚集体。可见, 在本文的实验条件下, 刀豆蛋白 A 分子的分子间相互作用力(此处主要指范德华力, 因为分子与分子间的距离很小)较强, 这样保证了四聚体不会在一定的离子强度下发生解聚集。刀豆蛋白

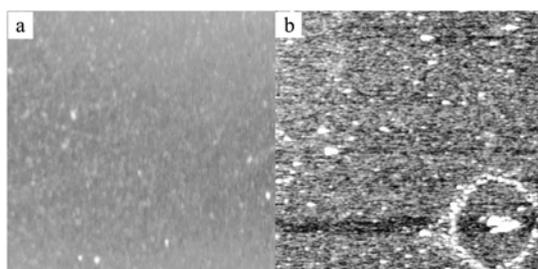


图 1 AFM 观察二种蛋白质溶液与沉淀剂混合 1 h 后硅片上吸附的蛋白质聚集体的情况

a: 溶菌酶(溶解在 pH 4.5 的 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HOAc-NaOAc 缓冲溶液中, 浓度为 $12 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。沉淀剂为 $25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 NaCl 溶液); b: 刀豆蛋白 A(溶解在 pH 7.0 的 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的磷酸盐缓冲溶液中, 浓度为 $0.4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。沉淀剂为 $0.7 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 NaCl 溶液)。图 1(a)和(b): $2 \mu\text{m} \times 2 \mu\text{m}$

Figure 1 Morphology of aggregates of concanavalin A and lysozyme molecules on silicon wafer surface 1 h after the protein solution was mixed with precipitation solution observed by AFM (a) lysozyme. concentration: $12 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, buffer: $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HOAc-NaOAc solution, pH=4.5, precipitation solution: $25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ NaCl solution; (b) concanavalin A. concentration: $0.4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, buffer: $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ phosphate solution, pH=7.0, precipitation solution: $0.7 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ NaCl. Figure (a) and (b): $2 \mu\text{m} \times 2 \mu\text{m}$ size.

A 的四聚体之间彼此也通过疏水相互作用力, 形成环状聚集体, 以降低整个体系的能量, 提高稳定性。溶菌酶分子的范德华力则较小, 在一定离子强度下绝大多数大聚集体解聚集成为单体形式, 体系的稳定性也较高, 不会出现环状聚集体。因此, 从 AFM 的结果可以定性得出这样的结论, 即溶菌酶和刀豆蛋白 A 的分子间相互作用力, 特别是范德华力的大小是不同的, 后者的范德华力更强。

2.2 范德华力的差异对无序大聚集体状态的影响

蛋白质晶体生长时, 随着溶液由不饱和逐渐转为饱和, 晶体生长过程也随即开始。已有的实验结果^[7,9]表明, 溶液中的聚集体需要经过两步骤才能实现无序大聚集体到有序小聚集体的转变。第一步骤是从大的无序状态聚集体转变成小无序聚集体。此步骤是几种不同强度和距离依赖特征的相互作用力(如范德华力、氢键、疏水相互作用、静电力等)的协同结果^[2]; 第二步骤是经过蛋白质分子间的重排, 小无序聚集体转变成成为有序生长基元。根据本文 AFM 的结果, 溶菌酶和刀豆蛋白 A 分子的范德华力具有明显差异, 此外考虑到范德华力与作用力的距离密切相关这一特点, 如果能对溶菌酶和刀豆蛋白 A 溶液中上述第一步骤(大的无序状态聚集体转变成成为小无序聚集体)的差异进行研究, 就可以了解范德华力的强弱对晶体生长的影响。因此, 本文选择了不同浓度的蛋白质溶液(分子间的距离随溶液浓度而变化), 通过其中聚集体状态的变化情况, 来获得范德华力的变化情况。此外, 考虑到 AFM 的结果存在一些不足之处, 如, 所得结果是聚集体吸附到硅片上以后的结果, 而固体表面的聚集体和溶液中的聚集体在大小和形状上均有一定程度的变化。因此, 本文采用了 DLS 来获得溶液中聚集体状态的信息。本文中 DLS 的结果反映的是混合了沉淀剂后 0.5 h 到 1 h 内, 温度和浓度变化条件下刀豆蛋白 A 和溶菌酶溶液中聚集体状态的变化情况。

采用生长条件时, 刀豆蛋白 A 和溶菌酶溶液中聚集体大小随浓度和温度的变化结果分别见图 2-1 和图 2-2。DLS 的实验时间是沉淀剂加入后 1 h 之内, 因此溶液中的聚集体仍处于无序聚集体状态(或三维网状结构)^[9]。由图 2-1 和图 2-2 可以看出, 在生长条件下的刀豆蛋白 A 和溶菌酶溶液中, 随着蛋白质溶液浓度的增大, 溶液中的无序大聚集体的尺寸均是先逐渐减小, 在浓度增大到一定程度后, 聚集体的尺寸基本不再随溶液的浓度变化而变化。对于刀豆蛋白 A, 聚集体大小是 75 nm 左右, 远大于其生长基元的大小(本文条件下, 在晶体生长过程中, 溶液中刀豆蛋白 A 的生长基元大小为 23.8 nm ^[27]); 对于溶菌酶, 聚集体大小是 4 nm 左右, 与其生

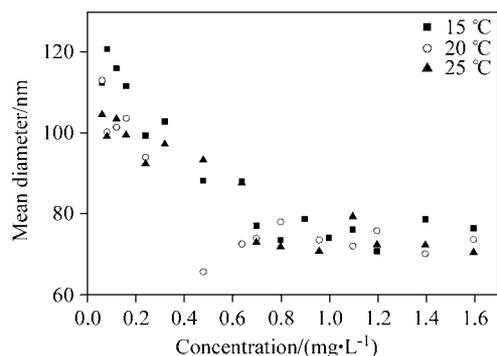


图 2-1 DLS 测量的刀豆蛋白 A 溶液中聚集体大小随浓度和温度的变化

缓冲溶液: pH 7.0, $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的磷酸盐溶液, 沉淀剂: $0.7 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ NaCl 溶液.

Figure 2-1 The mean size of concanavalin A aggregates in solution as the function of temperature and concanavalin A concentration measured by dynamic light scattering

Buffer: $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ phosphate solution, pH=7.0, precipitation: $0.7 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ NaCl

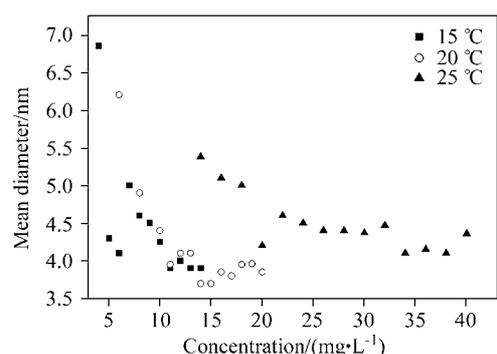


图 2-2 DLS 测量的溶菌酶溶液中聚集体大小随浓度和温度的变化

缓冲溶液: pH=4.5, $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 HOAc-NaOAc 溶液, 沉淀剂: $25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ NaCl 溶液

Figure 2-2 The mean size of lysozyme aggregates in solution as the function of temperature and lysozyme concentration measured by dynamic light scattering

Buffer: $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ sodium acetate solution, pH=4.5, precipitation: $25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ NaCl

长基元的大小基本一致^[25]. 由于成核后的晶体生长阶段是以生长基元作为生长单位生长晶体的, 而无序聚集体的大小远大于生长基元的大小, 因此对于刀豆蛋白 A, 此无序大聚集体(或三维网状结构)在生长过程中必然要发生解聚集(或破裂)(即前文所说的第一步骤). 而溶菌酶的聚集体均稳定在 4 nm 左右的结果则表明, 溶菌酶解聚集的过程在本文用 DLS 观测前已经完成了. 从本文 AFM 的结果中出现一个由疏水作用力维持的一个较松散的环状结构, 以及无序聚集体在晶体生长过程中消失, 出现尺寸更小的生长基元来看, 我们更倾向于

认为刀豆蛋白 A 溶液中出现的无序聚集体是一个三维网状结构, 而非真正意义上的聚集体. 本文为称呼方便起见, 仍然用“无序大聚集体”的称谓来指这一类三维网状结构.

刀豆蛋白 A 溶液中聚集体的基本单元是刀豆蛋白 A 分子的四聚体, 所有的聚集体都是以四聚体作为基本单元构成的. 这体现了分子间相互作用的交互效应. 四聚体内是强的相互作用, 而四聚体和四聚体之间是相对较弱的相互作用. 当刀豆蛋白 A 溶液不饱和时, 四聚体与四聚体彼此之间相距较远. 范德华力中的交换-排斥力的大小与溶液的离子强度有关, 由于本实验中固定了溶液的离子强度, 因此交换-排斥力基本不变. 而范德华力中的色散力的大小和距离密切相关. 当四聚体之间的距离较远时, 色散力非常小, 相对于长程作用力——静电力和氢键而言基本不起作用. 因此四聚体和四聚体之间主要是通过静电力和氢键共同作用而形成尺寸较大的无序大聚集体, 甚至有时出现环状聚集体. 当刀豆蛋白 A 溶液达到饱和、过饱和后, 较之在不饱和状态下, 四聚体与四聚体之间的距离减小, 色散力增大, 使得四聚体与四聚体之间进一步靠近, 所组成的无序大聚集体的尺寸减小. 随着四聚体与四聚体之间距离的逐渐减小, 静电排斥力也逐渐增加, 并最终和范德华力达成平衡, 无序大聚集体的大小于是得以稳定在 75 nm 左右. 而对于溶菌酶的不饱和溶液, 以上的分析同样适用, 差别仅仅是溶液中构成聚集体的基本单元是溶菌酶单体. 而对于溶菌酶的饱和与过饱和溶液, 由于其范德华力较弱, 无法和静电排斥力达到平衡, 故溶液中无序大聚集体最终解聚集的结果是溶液中出现的聚集体以溶菌酶的单体为主.

我们还对晶体生长中常用的温度变化范围(对于蛋白质而言, 一般约为 10 °C 左右)下分子间相互作用力的影响情况做了研究. 图 2-1 和图 2-2 的结果反映了刀豆蛋白 A 溶液温度的改变对溶液中聚集体变化的影响情况. 结果表明, 在本实验温度的变化范围内(10 °C), 温度的变化对无序大聚集体尺寸变化的整体趋势没有本质的影响, 只是改变了无序大聚集体达到稳定大小时刀豆蛋白 A 和溶菌酶溶液浓度的大小. 由图 2-1 看出, 各温度下拐点处浓度大小为 $25 \text{ °C} > 15 \text{ °C} > 20 \text{ °C}$. 这与刀豆蛋白的溶解度有关, 由文献^[28]可知刀豆蛋白 A 不同温度下溶解度的变化情况是: $25 \text{ °C} > 15 \text{ °C} > 20 \text{ °C}$, 此变化趋势和图 2-1 中聚集体大小发生变化而形成的拐点处刀豆蛋白 A 的浓度的变化趋势一致. 对于溶菌酶而言, 结果是类似的. 图 2-2 的结果表明, 拐点处溶菌酶的浓度与该温度下溶菌酶的溶解度值一致.

此外, 我们的 DLS 结果还表明, 在三种温度(15, 20, 25 °C)下, 非生长条件下刀豆蛋白 A 和溶菌酶溶液中的聚集体的变化均是杂乱无章, 毫无规律可言的. 对比这

两种蛋白质的生长与非生长条件下聚集体状态的结果可以看出, 只有在生长条件下, 成核前溶液中的无序聚集体状态的变化才是有规律的, 蛋白质溶液浓度达到饱和后, 无序聚集体大小稳定, 不再变化. 此结果和 Koichi 等^[9]对于分子间相互作用力(范德华力、静电力、氢键等)的方向性的解释是一致的, 即在生长条件下, 分子间相互作用力的方向具有特异性, 而非生长条件下, 方向具有随意性. 因此, 只有分子间相互作用力的大小和方向合适, 才可能生长出晶体. 否则, 或者是由于溶液中蛋白质分子间的吸引力太强, 以至于蛋白质分子没有足够的时间进入各自的晶格中, 从而生长出无定形沉淀, 或者是分子间的吸引力太弱, 以至于无法产生生长基元.

另外, 通过对 DLS 数据的分析还得到了刀豆蛋白 A 溶液中无序大聚集体的多分散度随蛋白质溶液浓度的变化情况. 图 3 给出了 20 时刀豆蛋白 A 的结果(刀豆蛋白 A 在 15 和 25 时的结果, 以及溶菌酶在 15, 20, 25 时的结果均与此类似, 未给出). 由图 3 可见, 对于生长条件下的刀豆蛋白 A 溶液, 当蛋白质浓度较小的时候, 溶液中的无序大聚集体尺寸较大, 并且大小相近. 随着浓度的增加, 溶液中无序大聚集体的多分散度逐渐增大, 说明无序大聚集体逐渐解聚集的程度随溶液浓度增加而增加, 溶液中出现大小不等的小聚集体和无序大聚集体共存的情况. 当浓度增加到一定值时, 多分散度基本稳定在 0.26 左右, 说明无序大聚集体解聚集的程度不再增加, 聚集体之间的吸引力和排斥力达到了某种程度上的平衡. 对于 20 时的刀豆蛋白 A 溶液, 聚集体多分散度发生变化的拐点是浓度在 $0.45 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 与图 2-1 中 20 时聚集体大小变化的拐点处刀豆蛋白 A 溶液浓度基本一致.

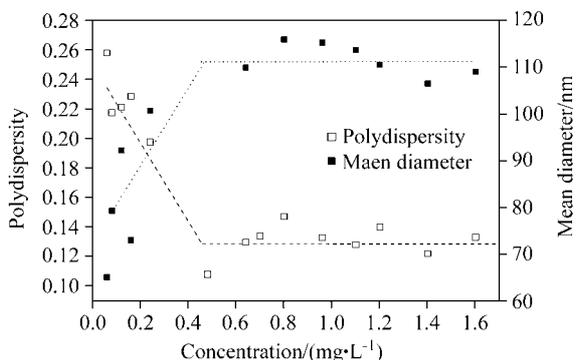


图 3 20 刀豆蛋白 A 溶液中多分散度随浓度的变化
Figure 3 The polydispersity of concanavalin A aggregates in solution as the function of concanavalin A concentration at 20

采用本文所用生长条件, 溶菌酶在加入沉淀剂 1 d 后就可以出现微晶, 而在刀豆蛋白 A 溶液中却需要 8 d 的时间才有微晶出现. 本课题组另外的 AFM 实验结果

表明, 刀豆蛋白 A 采用与本文相同的生长条件, 对加入沉淀剂后的刀豆蛋白 A 溶液进行跟踪观察, 发现混合了沉淀剂溶液 3~4 d 后, 溶液中聚集体的大小才进一步减小为生长基元的大小. 看来, 范德华力强弱的差异在宏观上表现为改变了溶液中无序大聚集体转变为生长基元所用的时间. 这也是各种蛋白质晶体生长的时间有很大差异的原因之一.

3 结论

生长条件下, 在晶体成核前蛋白质溶液中聚集体的状态随溶液浓度的变化有一定规律. 聚集体大小随蛋白质浓度增大逐渐减小, 当溶液达到饱和、过饱和后, 聚集体大小不再变化, 其值与蛋白质范德华力的强弱有关. 范德华力强, 无序大聚集体比生长基元大, 最终解聚集至生长基元大小所需的时间也长. 范德华力弱, 无序大聚集体迅速解聚集与生长基元大小相同的小聚集体. 非生长条件下聚集体大小的变化毫无规律. 温度的变化对聚集体大小变化的趋势没有本质的影响.

References

- 1 Retaillieu, P.; Ducruix, A.; Ries-Kautt, M. *Acta Crystallogr.* **2002**, *D58*, 1576.
- 2 Xu, X.-J.; Tang, Y.-Q. *Chin. J. Inorg. Chem.* **2000**, *16*, 157 (in Chinese). (徐筱杰, 唐有祺, *无机化学学报*, **2000**, *16*, 157.)
- 3 Poznanski, J.; Szymanski, J.; Basinska, T.; Slomkowski, S.; Zielenkiewicz, W. *J. Mol. Liq.* **2005**, *121*, 21.
- 4 Israelachvili, J. *Intermolecular and Surface Forces*, 2nd ed., Academic Press, San Diego, CA, **1992**.
- 5 Georgalis, Y.; Umbach, P.; Saenger, W.; Ihmels, B.; Soumpasis, D. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 1627.
- 6 Ries-Kautt, M. M.; Ducruix, A. F. *J. Cryst. Growth* **1991**, *110*, 20.
- 7 Georgalis, Y.; Umbach, P.; Raptis, J.; Saenger, W. *Acta Crystallogr.* **1997**, *D53*, 691.
- 8 Garcia-Ruiz, J. M. *J. Struct. Biol.* **2003**, *142*, 22.
- 9 Koichi, I.; Masayuki, A.; Jyoji, K.; Hiroshi, O. *J. Cryst. Growth* **1999**, *204*, 191.
- 10 George, A.; Wilson, W. *Acta Crystallogr.* **1994**, *D50*, 361.
- 11 George, A.; Chiang, Y.; Guo, B.; Arabshahi, A.; Cai, Z.; Wilson, W. W. *Methods Enzymol.* **1997**, *276*, 100.
- 12 Demoruelle, K.; Guo, B.; Kao, S.; McDonald, H. M.; Nikic, D. B.; Holman, S. C.; Wilson, W. W. *Acta Crystallogr.* **2002**, *D58*, 1544.
- 13 Shinpei, T.; Masahiko, Y.; Kyoko, K. *J. Cryst. Growth* **1996**, *168*, 44.
- 14 Saikumar, M.; Glatz, C.; Larson, M. *J. Cryst. Growth* **1998**, *187*, 277.

- 15 Niimura, N.; Minezaki, Y.; Ataka, M.; Katsura, T. *J. Cryst. Growth* **1995**, *154*, 136.
- 16 Cai, J. Y.; Chen, Y.; Xu, Q. C.; Chen, Y.; Zhao, T.; Wang, X. Y.; Xia, K. *Molecules* **2003**, *8*, 86.
- 17 McAllister, C.; Karymov, M. A.; Kawano, Y.; Lushnikov, A. Y.; Mikheikin, A.; Uversky, V. A.; Lyubchenko, Y. L. *J. Mol. Biol.* **2005**, *354*, 1028.
- 18 Kadima, W.; Mcpherson, A.; Dunn, M.-F.; Jurnak, F.-A. *Biophys. J.* **1990**, *57*, 125.
- 19 Mikol, V.; Vincendon, P.; Eriani, G. *J. Cryst. Growth* **1991**, *110*, 195.
- 20 Howard, S. B.; Twigg, P. J.; Baird, J. K.; Meehan, E. J. *J. Cryst. Growth* **1988**, *90*, 94.
- 21 Skouri, M.; Munch, J.-P.; Lorber, B.; Giege, R.; Candau, S. *J. Cryst. Growth* **1992**, *122*, 14.
- 22 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.)
- 23 Sophianopoulos, A. J.; Van Holde, K. E. *J. Biol. Chem.* **1964**, *239*, 2516.
- 24 Waner, M. J.; Gilchrist, M.; Schindler, M.; Dantus, M. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 1649.
- 25 Phillips, D. C. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **1967**, *57*, 484.
- 26 Shoham, M.; Yonath, A.; Sussman, J. L.; Moulton, J.; Traub, W.; Kalb, A. J. *J. Mol. Biol.* **1979**, *131*, 137.
- 27 Webe, K.; Alexander, M.; Michael, F. D.; Frances, J. *J. Cryst. Growth* **1991**, *110*, 188.
- 28 Vincent, M.; Richard, G. *J. Cryst. Growth* **1989**, *97*, 324.

(A0611202 ZHAO, X. J.; ZHENG, G. C.)