

电解质溶液中牛血清白蛋白分子相互作用的动态光散射研究

李军锋 邢 达* 李绍新

(华南师范大学激光生命科学研究所, 广州 510631)

摘 要 溶液中粒子的扩散系数对浓度的依赖关系主要取决于粒子在溶液中所占的体积分数和粒子间的排斥与吸引作用力,这种依赖关系可以通过作用参数 来表示。本研究利用动态光散射技术测量了不同离子强度下牛血清白蛋白分子的扩散系数,求出了相应条件下的 值。结果表明,在低离子强度下, 是正值,蛋白质分子间的作用以排斥力为主,随着离子强度的逐渐增大, 变为负值,蛋白质分子间的作用以吸引力为主,当离子强度大于 0.5 mol/L 的时候,蛋白质开始发生聚集。利用 DLVO 理论的两体硬球相互作用模型解释了蛋白质分子间相互作用的变化规律:随着离子强度的增加,静电斥力被屏蔽,范德华分子作用力起主要作用。根据 值与离子强度变化的相关性,回归出了蛋白质参数:在实验条件下,蛋白质所带的有效电荷 $Z_p = -9.0e$ 、Hamaker 常量 $A_H = 2.8 k_B T$ 。实验结果表明:动态光散射技术可以有效地用来研究蛋白质分子间的相互作用。

关键词 动态光散射, 蛋白质相互作用, 扩散系数, 作用参数

1 引 言

长期以来,水溶液中蛋白质的相互作用问题是人们研究的热点,而蛋白质的聚集问题尤其引人注目,这是因为蛋白质的聚集跟晶体的制备和某些疾病的形成有着密切联系。首先,高质量的蛋白质晶体对于晶体结构的分析是至关重要的,而蛋白质晶体的制备关键是使溶液中蛋白质分子不断地聚集到形成的晶核上,然后从溶液中沉淀出来。但是,聚集条件与温度、pH 值、盐浓度及蛋白浓度等很多因素有关,使得这一过程相当复杂。目前,许多生物大分子的晶体培养工作仍很困难;其次,在病理上,几种严重危害人类身体健康的疾病主要是由蛋白质的聚集造成的。例如,白内障的产生是由于眼球晶状体中的 γ -晶体蛋白聚集导致光的强烈散射造成的,镰刀状细胞贫血症是由于异常血红蛋白聚集成纤维状导致红细胞变形破碎造成的^[1]。蛋白质的聚集过程是一个分子间相互作用的过程,如果能够清楚蛋白质分子间的相互作用是如何依赖实验条件的变化,基于蛋白质的基本特征提出具有预见性的蛋白质相互作用模型是非常有意义的。最近 Wu 等^[2]通过测量牛血清白蛋白在高离子强度水溶液中的渗透压的变化,来研究蛋白分子的相互作用情况,实验的结果通过硬球作用模型取得了半定量的解释。

本研究利用动态光散射技术,研究了牛血清白蛋白分子的扩散系数在不同离子强度溶液中随蛋白质浓度的变化情况。通过扩散系数的变化分析了分子间作用力的变化,采用 DLVO 理论的两体硬球相互作用模型解释了蛋白质分子间的相互作用随离子强度变化的相关性。

2 原 理

2.1 动态光散射技术

动态光散射技术是借助光子相关原理,检测因布朗运动而产生的散射光强的涨落,从而得到散射质点动态行为的信息。对于无限稀释的溶液,通过分析散射光强的自相关函数^[3],可以得到分子的平动扩散系数 D_0 ,而 D_0 与自由运动分子的流体力学半径是相联系的:

$$D_0 = \frac{k_B T}{6 \eta r} \quad (1)$$

式中 $k_B T$ 是热力学能量, η 是溶剂的粘滞系数, r 是流体力学半径。

2003-12-08 收稿;2004-05-09 接受

本文系国家重大基础研究前期专项基金(No. 2002CCC00400)、国家自然科学基金(No. 60378043)和广东省自然科学基金(No. 015012)资助项目

2.2 一阶作用参量

对于浓的大分子溶液,在流体动力学作用范围内,扩散系数与体积分数的关系为^[4]:

$$D = D_0[1 + \dots] = D_0[1 + \dots + A + s + D] + \dots \quad (2)$$

D_0 是无限稀的扩散系数, ϕ 是体积分数, A 和 D 代表 Virial 和 Oseen 项, s 代表自我作用和短程作用, D 代表偶极子项,这些贡献可以用密度分布函数 $g(r)$ ^[5,6]来表示:

$$D = -\frac{3}{a^3} \int_0^{\infty} [g(r) - 1] r^2 dr, \quad (3)$$

$$A = \frac{3}{a^2} \int_0^{\infty} [g(r) - 1] r dr, \quad (4)$$

$$s = -\frac{3}{a^3} \int_0^{\infty} \left[\frac{9}{8} \left(\frac{a}{r}\right)^6 - \frac{5}{4} \left(\frac{a}{r}\right) g(r) \right] r^2 dr, \quad (5)$$

$$D = \frac{75}{4} a^4 \int_0^{\infty} \frac{g(r)}{r^5} dr, \quad (6)$$

$$D = 1, \quad (7)$$

密度分布函数 $g(r)$ 和平均作用力相互作用势 $W(r)$ ^[7,8] 通过下式联系:

$$g(r) = e^{-W(r)/k_B T} \quad (8)$$

因此,如果 $W(r)$ 可以理想估计到, $g(r)$ 就可以求出,从而求得作用参数。

2.3 作用能

在稀的电解质水溶液中,蛋白-蛋白分子间相互作用的平均作用力势场用 DLVO^[9] 理论模型来解释。在该模型中,蛋白质分子被看作是硬球,表面是均匀分布的电荷,蛋白质分子浸没在一个连续分布的电解质溶液中,介质中包含有用点电荷表示的离子,在蛋白质分子的带电表面周围紧密结合有一带相反电荷的离子层,被称作 Stern 层。在这里作用势包括:双电层静电排斥势,范德华分子作用吸引势和硬球排斥势。

硬球排斥势的表达式如下:

$$W_{HS}(r) = \begin{cases} \infty, & r \leq 2a \\ 0, & r > 2a \end{cases} \quad (9)$$

r 表示两个球心的距离, $2a$ 表示蛋白质分子等效的球直径,它给出了两个蛋白质分子接近的最近距离。

范德华分子吸引作用势的表达式如下:

$$W_{disp}(r) = -\frac{A_H}{12} \left[\frac{4a^2}{r^2 - 4a^2} + \frac{4a^2}{r^2} + 2 \ln \left(\frac{r^2 - 4a^2}{r^2} \right) \right], \quad r > 2a \quad (10)$$

A_H 表示 Hamaker 常数^[10]。

在低浓度和低离子强度的条件下,双电层排斥势可以用平均场表达式来表示^[11]:

$$W_{elec}(r) = \frac{Z_p^2 e^2 e^{-(r-2a)}}{4 r (1 + \dots)^2} \quad (11)$$

是 Debye-Hückel 屏蔽长度的倒数^[10], e 表示电子电荷, ϵ 是溶剂的介电常数。

3 实验部分

3.1 试剂

牛血清白蛋白(上海生物公司),所用的水经去离子后 3 次蒸馏;缓冲溶液:50 mmol/L 的醋酸钠,将 pH 值调至 5.4。实验配制了 4 组不同浓度的溶液,相应的蛋白质体积分数分别为 0.01、0.02、0.03 和 0.04。将每种浓度的溶液分成 6 等份,通过加入 NaCl 电解质,将离子强度分别调为 0.03、0.04、0.05、0.10、0.20 和 0.50 mol/L。在测量之前,用 220 nm 的微孔滤膜过滤溶液 3 次,可以除去溶液中大的杂质颗粒,然后离心(10000 g) 30 min,轻取滤管上层部分溶液用于动态光散射测量。

3.2 测量和数据处理

测量用的动态光散射仪器在文献 [12] 中作过详细的介绍。光源是一个高稳定度的单模倍频激光器 (coherent, verdi-v10, 强度波动小于 0.1%), 输出功率 10 mW, 波长 532 nm。Flex99R-160B 型数字相关器 (美国 correlator 公司), 272 通道, 最小采样时间 150 ns。实验所用蛋白质是经过高度纯化的, 单一性比较好。采用累积矩^[13]的方法分析自相关函数, 每次测量重复 6 次, 测量的结果如表 1。

表 1 不同离子强度下的扩散系数

Table 1 Diffusion coefficients at different ionic strength

I (mol/L)	($\times 10^3$)	D ($\times 10^7$) cm^2/s	误差 Error	I (mol/L)	($\times 10^3$)	D ($\times 10^7$) cm^2/s	误差 Error	
0.03	10	6.92	0.01	0.04	10	6.88	0.01	
	20	7.10	0.02		20	6.96		0.03
	30	7.28	0.05		30	7.07		0.05
	40	7.47	0.03		40	7.18		0.04
0.05	10	6.85	0.05	0.10	10	6.72	0.04	
	20	6.89	0.03		20	6.70		0.03
	30	7.01	0.05		30	6.65		0.03
	40	7.05	0.03		40	6.63		0.05
0.20	10	6.67	0.03	0.50	10	6.62	0.03	
	20	6.60	0.04		20	6.51		0.05
	30	6.54	0.04		30	6.44		0.04
	40	6.44	0.05		40	6.29		0.03

I : 离子强度 (ionic strength); ϕ : 体积分数 (volume fraction); pH = 5.4; $T = 27$

对于每种离子强度下测量得到的扩散系数, 根据公式 (2), 做了扩散系数 D 对体积分数的线性拟合, 得到了在无限稀释条件下 ($\phi = 0$) 的扩散系数, $D_0 = (6.74 \pm 0.05) \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ 。由公式 (4) 计算出相应的流体力学半径为 $3.456 \pm 0.02 \text{ nm}$ 。

4 结果与讨论

4.1 计算一阶作用参量

根据实际测得的扩散系数 D 和外推之零浓度时的扩散系数 D_0 , 作了归一化扩散系数 D/D_0 随体积分数的函数图象 (图 1), 通过线性拟合, 由直线的斜率可以求得一阶作用参量。从图中可以看出, 在低离子强度下 (I 小于 0.05 mol/L), D/D_0 值为正的, 归一化的扩散系数随着蛋白质浓度的增加而增加; 随着离子强度的逐渐增大, D/D_0 值由正变为负的, 逐渐减小, 归一化的扩散系数随蛋白质浓度的增加而减小 (见表 2)。

表 2 对应不同离子强度的 ϕ 和 D/D_0 值

Table 2 Values of ϕ and D/D_0 at different ionic strength

I (mol/L)	ϕ (109 m^{-1})	D/D_0
0.03	0.57	2.52 ± 0.11
0.04	0.65	1.63 ± 0.08
0.05	0.73	1.12 ± 0.10
0.10	1.04	0.40 ± 0.11
0.20	1.46	1.15 ± 0.12
0.50	2.31	1.46 ± 0.10

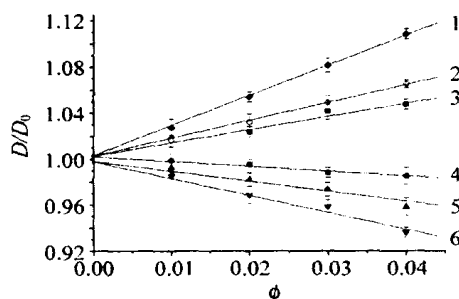


图 1 不同离子强度下归一化的扩散系数 D/D_0 随体积分数的变化

Fig. 1 At different ionic strength, normalized diffusion coefficient D/D_0 as a function of volume fraction

1. 0.03 mol/L; 2. 0.04 mol/L; 3. 0.05 mol/L; 4. 0.10 mol/L; 5. 0.20 mol/L; 6. 0.50 mol/L.

4.2 回归蛋白质分子带的电荷 Z_p 和 Hamaker 常量 A_H

公式 (6) ~ (9) 给出了 D/D_0 与平均作用势关系的定量描述, 而平均作用势包含 A_H 和 Z_p 两个可调节的参数, 是两者的非线性函数。在确定的 pH 值下, 蛋白分子带的电荷是定值, 离子强度的变化对 A_H 的影响可以忽略, 由实验确定的值可以回归出 A_H 和 Z_p 的数值。具体的做法是采用回归的方法^[14]: 先

设 A_H 为定值, 逐渐改变 Z_p 计算 值。当计算值等于测量值时, 就找到一对 A_H 和 Z_p , 然后再改变 A_H 的值, 寻找 Z_p 的值。这样往复循环, 分别把 0.05、0.10、0.20 和 0.50 mol/L 离子强度下的 (Z_p, A_H) 的轨迹画出来。图 2 中曲线的交点就是实验条件下的参数值。

4.3 离子强度对分子间作用势的影响

根据 Batchelor^[4]和 Felderhof^[15]的结论, 对于排斥相互作用来说, 值是正的; 对于吸引相互作用来说, 值为负。从图 1 中可以看出, 当溶液中的离子强度很小的时候, 比如 $I = 0.05$ mol/L 时, 的值为正, 说明蛋白质分子间的相互作用是排斥作用。根据 DLVO (Derjaguin-Verwey-Landaur-Overbeek) 理论, 溶液中分子间的作用主要是静电排斥作用和范德华分子吸引作用, 图 3a 给出了总的的作用势 $W_{total} = W_{elec} + W_{disp}$ 随蛋白质分子间距离变化的函数图象。可以看到, 在 $I = 0.05$ mol/L 时, 静电斥力是主要的, 在蛋白质分子之间存在着一个势垒阻碍蛋白质的聚集。但是, 当分子间的距离很近的时候, 范德华引力急剧增大, 分子间总的的作用表现为吸引。随着离子强度逐渐增大, 值逐渐减小, 变为负值, 说明蛋白质分子间的相互作用由排斥力变为吸引力, 原因是静电斥力作用被屏蔽, 范德华分子吸引作用逐渐突出。图 3b 给出了总的的作用势随离子强度的变化情况。在所研究的离子强度范围内, 溶液基本上是稳定的, 没有聚集体出现, 这可以由扩散系数的多分散性判断出。当离子强度大于 0.50 mol/L 的时候, 可以观察到明显的聚集体形成, 而且在蛋白质过饱和条件下, 观察到了晶体的形成。

图 4 是相互作用参数随离子强度变化的函数图象, 实线由回归的蛋白质电荷和 Hamaker 常量计算得出, 离散的点是实验测量值。随着离子强度的增加, 德拜长度减小, 相互作用参数由正逐渐变化到负, 分子间的作用由排斥变为吸引, 从而使蛋白质容易聚集。在对应盐浓度为 0.50 mol/L 的 $2a = 16$ 时 达到稳定值, 说明离子基本上已完全屏蔽了静电排斥力的作用。在大于此离子强度下, 蛋白质分子极容易聚集。

实验结果表明, 在低离子强度下, 是正值, 蛋白质分子间的作用以排斥力为主; 随着离子强度的逐渐增大, 变为负值, 蛋白质分子间的作用以吸引力为主。利用 DLVO 理论的两体硬球相互作用模型解释了蛋白质分子间相互作用的变化规律, 作用势包括双电层静电排斥势, 范德华分子

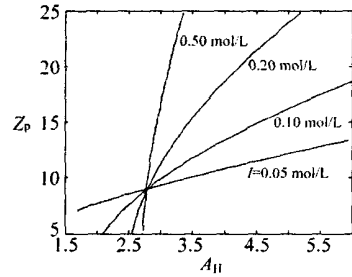


图 2 Z_p 随 Hamaker 常量的变化

Fig. 2 Protein charge Z_p versus Hamaker constant

每条曲线对应表 2 中一定离子强度下的 值 (the plotted curves correspond to the interaction parameter at different ionic strength), 图中的交点坐标 (the curves have a common locus with coordinates): $Z_p = -0.9e, A_H = 2.8 k_B T$.

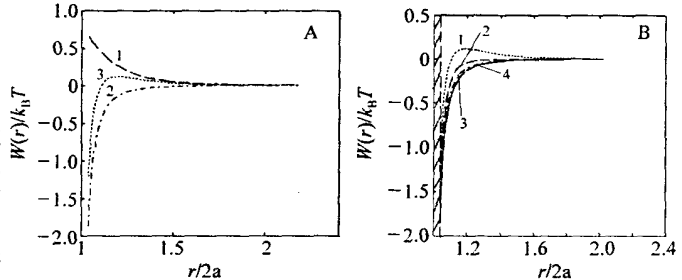


图 3 分子间的相互作用势随分子间距离变化的函数图象 (离子强度为 0.05 mol/L) (a) 和分子间作用势随离子强度变化的函数图象 (b)

Fig. 3 The potential of mean force between two protein molecule as a function of distance for $I = 0.05$ mol/L (a) and dependence of the potential of mean force on ionic strength (b)

参数 (parameters): $Z_p = -9e, A_H / k_B T = 2.8, a = 3.45$ nm. A. 1. 静电作用势 (electrostatic force); 2. 范德华作用势 (total force); 3. 总作用势 (Van der Waals force); B. 1. 0.05 mol/L; 2. 0.10 mol/L; 3. 0.20 mol/L; 4. 0.50 mol/L.

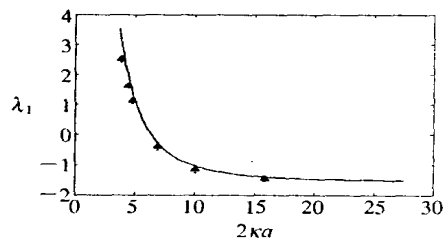


图 4 相互作用参数随离子强度变化的函数图象

Fig. 4 Interaction parameter as a function of dimensionless parameter 2

参数 (parameters): $Z_p = -0.9e, A_H = 2.8 k_B T$.

5 结 论

实验结果表明, 在低离子强度下, 是正值, 蛋白质分子间的作用以排斥力为主; 随着离子强度的逐渐增大, 变为负值, 蛋白质分子间的作用以吸引力为主。利用 DLVO 理论的两体硬球相互作用模型解释了蛋白质分子间相互作用的变化规律, 作用势包括双电层静电排斥势, 范德华分子

作用吸引势和硬球排斥势。根据 χ 值与离子强度变化的相关性, 回归出了蛋白质参数: 在实验条件下, 蛋白质所带的有效电荷 $Z_P = -9.0e$ 、 $A_H = 2.8k_B T$ 。这项工作表明动态光散射技术可以有效地用来研究蛋白质分子间的相互作用。

References

- 1 Vekilov P G, Feeling Taylor A R, Petsev D N, Galkin O. *Biophysical Journal*, **2002**, 83(2): 1147 ~ 1156
- 2 Wu J, John M. Praunitz. *Fluid Phase Equilibria*, **1999**, 155: 139 ~ 154
- 3 Bar-Ziv R, Meller A, Tlusty T, Moses E, Stavans J, Safran S A. *Phys. Rev. Lett.*, **1997**, 78(1): 154 ~ 157
- 4 Batchelor G K. *J. Fluid Mech.*, **1976**, 74: 1 ~ 29
- 5 Pecora R. *Dynamic Light Scattering, Applications of Photon Correlation Spectroscopy*. New York and London: Oxford Science Publ., **1985**: 122
- 6 Eberstein W, Georgalis Y, Saenger W. *Journal of Crystal Growth*, **1994**, 143: 71 ~ 78
- 7 Kirkwood J G. *J. Chem. Phys.*, **1934**, 2: 351 ~ 361
- 8 Kirkwood K G. *Chem. Rev.*, **1936**, 19: 275 ~ 283
- 9 Narayanan J, Liu X Y. *Biophysical Journal*, **2003**, 84(1): 523 ~ 532
- 10 Hamaker H C. *Physica*, **1937**, 4: 1058 ~ 1072
- 11 Petsev D M, Denkov N D, Nagayama K. *Chem. Phys.*, **1993**, 175: 265 ~ 270
- 12 Li Shaoxin(李绍新), Xing Da(邢达), Tan Shici(谭石慈). *Journal of Optoelectronics · Laser (光电子·激光)*, **2003**, 15: 551 ~ 554
- 13 Koppel D. *J. Chem. Phys.*, **1972**, 57: 4814 ~ 4820
- 14 Kuehner D E, Ramsch C. *Biophysical Journal*, **1997**, 73: 3211 ~ 322
- 15 Felderhof B U. *J. Phys. Math. Gen.*, **1978**, 11: 929 ~ 937

Molecular Interactions of Bovine Serum Albumin in Electrolyte Solutions Studied by Dynamic Light Scattering

Li Junfeng, Xing Da*, Li Shaoxin

(Institute of Laser Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631)

Abstract The concentration dependence of the diffusion coefficient of particles suspended in solution depends primarily on the occupied volume fraction and on repulsive and attractive forces. This dependency is expressed by the interaction parameter. In the present work we have measured the diffusion coefficient of Bovine Serum Albumin at different ionic strength and determined the interaction parameter. The results indicate: the value of χ is positive at low ionic strength and the interaction between proteins is repulsive; however, with increasing ionic strength the value of χ becomes negative and the interaction is attractive, and when ionic strength is higher than 0.5 mol/L aggregation occurs. The dependence of the interaction on ionic strength is interpreted using Derjaguin-verwey-landau-overbeek (DLVO) theory for interactions of two hard spheres: with increasing ionic strength, the repulsive electrostatic interaction is screened and Van der Waals forces become dominant. According to the correlation of χ with ionic strength, the protein parameters are regressed: the protein net charge $Z_P = -9.0e$, Hamaker constant $A_H = 2.8k_B T$. Experiments work indicate the technique of dynamic light scattering can be used effectively to study protein molecular interactions.

Keywords Dynamic light scattering, protein interaction, diffusion coefficient, interaction parameter

(Received 8 December 2003; accepted 9 May 2004)