

膜结晶技术的发展及其在蛋白质 结晶中的应用

张新妙¹, 陶凤云^{1,2}, 马润宇¹

(1. 北京化工大学生命科学与技术学院, 北京 100029; 2. 北京联合大学生物化学工程学院, 北京 100023)

摘要:膜结晶技术作为一种新兴的分离净化技术近几年得到了较快发展。阐述了膜结晶技术的产生背景、膜结晶器的类型、膜结晶技术的基本过程、原理及其优点,介绍了膜结晶蛋白质的优点及膜结晶技术在蛋白质结晶中的应用情况,最后展望了膜结晶技术的发展前景。

关键词:膜结晶;蛋白质;结晶;微孔疏水膜;非均相成核

中图分类号:TQ028.8

文献标识码:A

文章编号:0253-4320(2006)05-0018-03

Development of membrane crystallization technology and its application in protein crystallization

ZHANG Xin-miao¹, TAO Feng-yun^{1,2}, MA Run-yu¹

(1. College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China;

2. Biochemical Engineering College, Beijing Union University, Beijing 100023, China)

Abstract: The membrane crystallization, as a new separation process, has been developing rapidly in the past few years. The generation background, type, basic process, principle and the advantages of membrane crystallization are outlined in this paper. The advantages and the applications of membrane crystallization process for protein crystallization at home and aboard are introduced. At last, the developmental prospects of the membrane crystallization process are prospected.

Key words: membrane crystallization; protein; crystallization; microporous hydrophobic membranes; heterogeneous nucleation

结晶分离技术近年来得到了很快发展,在传统结晶法进一步得到完善和发展的同时,许多新型结晶技术也正进一步推广和应用,膜结晶作为一种新型的结晶技术适应时代的需要应运而生。与常规结晶技术相比,膜结晶技术具有结晶速度快、起始浓度低、诱导时间短、过程可控等优点,且可以更好地、更方便地控制晶体结晶过程,得到质量更好的晶体。此外,膜表面还可以起到非均相成核的作用。由于膜结晶过程具有上述优点,膜结晶技术被广泛用于盐溶液的结晶,废水处理回收晶体,蛋白质、酶及其他生物大分子完美晶体的制备方面^[1]。

1 膜结晶技术

1.1 膜结晶的概念、种类及基本原理

膜结晶是膜蒸馏与结晶 2 种分离技术的耦合过程,可以分为 2 种:渗透膜结晶和热驱动膜结晶。前

者以膜两侧溶液的浓度差为推动力,后者以膜两侧的温度差为推动力。在上述 2 种情况下,传质过程均可分为以下 3 步:溶剂在膜表面气化;溶剂蒸汽通过膜孔;蒸汽在膜另一侧冷凝。膜结晶的原理是通过膜蒸馏来脱除溶液中的溶剂,浓缩溶液,使溶液达到过饱和,然后在晶核存在或加入沉淀剂的条件下使溶质结晶出来。它是一种不同于常规结晶技术的新型结晶分离技术,建立在微孔疏水膜的应用基础上。膜结晶过程中,膜本身既作为 2 个液相子系统(待结晶物质溶液/提取液)接触的物理支撑,通过它进行蒸汽相的质量传递,也作为一个能促进非均相成核的表面。

1.2 膜结晶技术的产生背景

大分子蛋白质具有许多不同于无机物及小分子有机物的性质,如分子质量很高,静电特性,几何形状较复杂,物理化学性质的不稳定性,本身带有辅

收稿日期:2006-01-11;修回日期:2006-03-22

基金项目:国家科技部“973”项目子课题(项目编号 2003CB615701)

作者简介:张新妙(1978-),女,博士生,zhangxinmiao1978@163.com,010-81136399;马润宇(1944-),男,博士后,教授,博士生导师,主要研究方向为膜分离和生物化工领域。

基、配体等特殊因子,这使蛋白质的结晶过程变得复杂,一般用于小分子结晶的方法都不适合用于大分子的晶体生长^[2],因此,需要探索新的结晶方法以得到蛋白质等生物大分子的晶体。近几年,为了改进生物大分子的结晶过程,人们做了很多努力。对蛋白质结晶过程的研究越来越多地集中在促进非均相成核上,它一般被荷电的、聚合物修正的表面或外部的矿物粒子诱导。Chayen等^[3]尝试用多孔硅支撑层作为一些目标蛋白质(溶菌酶、伴刀豆球蛋白A、过氧化氢酶、藻胆蛋白、胰岛素)诱导晶核形成的载体,并获得了成功,甚至在不足以自发成核的过饱和度下也有晶体析出。Fermani等^[4]经研究发现,伴刀豆球蛋白A在聚合物薄膜表面上在较短的诱导时间内就能发生结晶,并且蛋白质浓度仅是标准蒸汽扩散技术所需浓度的1/10。Rong等^[5]研究了涂敷在玻璃底层上的聚L-赖氨酸选择性地控制四边形的溶菌酶晶体的晶面指标为(110)面或(101)面。

以上这些虽然不是膜结晶技术,但其中均蕴含了将一种物质或膜作为非均相成核表面结晶蛋白质的思想,对膜结晶技术的产生给予了很大的推动力,膜结晶技术就是在这种情况下出现的。

1.3 膜结晶的条件及其与透析结晶的异同

要实现膜结晶过程,必须具备如下条件:①所用膜必须是孔径为0.1~1.0 μm的微孔疏水膜;②膜两侧要有一定的温度差或浓度差作为推动力。透析结晶所用膜为亲水膜,它是以浓度差为推动力的液相传输过程;而膜结晶是以浓度差或温度差为推动力的气相传输过程。

1.4 膜结晶器的类型

膜结晶器有两大类型:静态膜结晶器和连续式膜结晶器。静态膜结晶器是直接膜插入盛有蛋白质溶液的玻璃管里,膜内为提取剂溶液;连续式膜结晶器是用2台恒流泵分别将蛋白质溶液和提取剂溶液泵入组件壳程和膜管内,通过控制溶剂蒸发速率得到质量完美的晶体。

2 蛋白质结晶的特点及膜结晶蛋白质的优点

蛋白质结晶是一个复杂的物理化学过程,每一种蛋白质都要在某一特定的条件下结晶,而这些特定条件并不能从简单的可测量的性质如分子质量或等电点来预测。对于特定的蛋白质,它的结晶动力学受多个变量影响,蛋白质结晶通常对这些变量的微小变化都会很敏感。另外,结晶同一种蛋白质,使用不同的结晶方法(如蒸汽扩散、透析、批式结晶)即

使最后得到的母液相同,也有可能得到不同产量、质量以及不同形状的结晶。就目前来说,由于蛋白质等生物大分子特有的物理化学性质,其晶体培养工作已成为当前阻碍晶体结构分析速度提高的关键性问题。为此,人们正在做进一步的努力,探索新的结晶技术和更系统的结晶方法,以得到完美的大尺寸的蛋白质晶体,用于衍射分析,测定蛋白质分子的结构和空间构型。顺应这种需要,人们开始探索将膜结晶技术用于蛋白质溶液的结晶。

膜结晶蛋白质主要有以下优点:蛋白质与膜间的非特异性吸引和局部相互作用,可增强蛋白质分子间的相互碰撞和晶核形成;膜表面起到蛋白质晶体非均相成核的作用;膜的有效传质面积大;可通过改变推动力(膜两侧溶液浓度或提取液流率)来控制进料液中溶剂的蒸发速率;溶液起始浓度低,可以在更低的过饱和度下结晶;膜结晶所需诱导时间短,结晶速率快;控制各个结晶条件,可能得到不同晶形的晶体。

3 膜结晶技术在蛋白质结晶中的应用情况

迄今为止,国内尚未见有关用膜结晶法结晶蛋白质等生物大分子报道,现主要介绍一下国外在此方面的研究情况。

国外对于用膜结晶法结晶蛋白质的研究,主要是意大利的Curcio等做了一系列研究工作。2001年,在第三届意大利和韩国的膜与膜过程会议上,Curcio等^[6]初步探讨了用膜结晶法结晶生物大分子卵清蛋白,研究了以温度为驱动力的膜结晶法结晶卵清蛋白的过程。至此,关于用膜结晶法结晶蛋白质等生物大分子的研究才正式开展起来。

2002年,Curcio等^[7]将渗透膜结晶法用于溶菌酶溶液的结晶,制得了溶菌酶晶体,并通过对原材料和晶体的红外谱图进行比较,进一步证实了所得产品为溶菌酶晶体。实验中以NaCl为沉淀剂,高浓度的MgCl₂溶液为提取液,以醋酸钠缓冲溶液调节溶菌酶溶液的pH。实验先进行了静态膜结晶,而后进行了连续式膜结晶。在静态膜结晶中,在温度为4℃、MgCl₂质量浓度为160~220 mg/mL、NaCl质量浓度高于15 mg/mL时,24 h后可见溶菌酶晶体生成。而连续式膜结晶中,数小时后就得到了大量溶菌酶晶体。但是,该研究组没有对所得溶菌酶晶体的质量做进一步评价。

2003年,Curcio等^[8]在上述基础上对溶菌酶渗透膜结晶的结晶条件进行了进一步研究,考察了沉

淀剂浓度、提取液浓度、蛋白质溶液温度对膜结晶过程中通量的影响;用简化的尘埃气体模型预测了传质过程,并将实验通量值和理论值进行了比较;通过监控波长在 400 nm 处的溶液混浊度水平来估计诱导时间周期;实验主要研究了静态膜结晶,得到了适合于衍射分析的四角形溶菌酶晶体,并进行了解析,最大解析范围为 0.17 nm;当 NaCl 和 MgCl₂ 质量浓度分别在 20 ~ 450 mg/mL 和 160 ~ 220 mg/mL 时,24 h 内得到了尺寸为 0.3 ~ 0.5 mm 的晶体;然而,将静态膜结晶得到的结晶条件用于连续式膜结晶时,结果却不令人满意,仅得到了大量尺寸较小 (< 0.1 mm) 的溶菌酶晶体;通过与常规结晶方法比较表明,用膜结晶法结晶溶菌酶大大缩短了诱导时间。同年,Profio 等^[9]用混浊度评价了微孔疏水膜的溶菌酶结晶动力学,探讨了 NaCl 和 MgCl₂ 浓度对晶体成核和生长速率的影响;通过选择适当的提取液浓度,无论是对于高的还是低的过饱和度,都获得了较短的诱导时间(1.2 ~ 10.0 h),证明了溶菌酶在低过饱和度下就有很高的生长速率常数;在 20℃、20 mg/mL 母鸡蛋白溶菌酶(HEWL)、20 mg/mL 和 25 mg/mL NaCl、240 mg/mL MgCl₂ 条件下,实验得到了适合于衍射分析的溶菌酶晶体,诱导时间分别为 2.3 h 和 2.0 h。

2005 年,Profio 等^[10]以 0.1 mol/L 的 Tris-HCl 为缓冲溶液,其 pH 为 8.5,以硫酸铵作沉淀剂,以氯化钙为提取剂,研究了牛胰腺的胰蛋白酶(BPT)的膜结晶。研究表明,对于静态膜结晶器,24 ~ 48 h 后可得到 BPT 的晶体;对于连续式膜结晶器,4 ~ 7 天可得到 BPT 的晶体;为了控制所得晶体的形态特征,通过正确选择操作参数调整了 BPT 的结晶动力学,主要是对静态膜结晶系统的有效膜面积和溶剂提取率以及连续式膜结晶中的进料液流速等参数进行了研究。

4 膜结晶蛋白质的几点要求和建议

(1)对于特定的蛋白质,应探索适当的结晶条件,进行结晶条件的优化。结晶过程分筛选与优化 2 个过程:筛选是应用各种条件得到任何种类的晶体;优化是改变晶体的尺寸和衍射质量,得到适合于衍射分析的大分子晶体。

(2)应分析膜结晶过程动力学,研究结晶条件对晶体成核和生长速率的影响以及膜与蛋白质之间的相互作用关系。膜结晶过程不同于常规结晶过程,但是可以结合常规结晶理论分析膜结晶动力学,探

索膜与蛋白质之间相互作用的关系,并建立适当模型来预测膜结晶过程。

(3)蛋白质晶体的鉴定与解析。由于在膜结晶过程中加入了沉淀剂和添加剂,因此必须对所得到的晶体进行鉴定,确定晶体是否为蛋白质,切不可将沉淀剂的结晶认作是蛋白质晶体,这一点是非常关键的。另外,膜结晶过程所用试剂和仪器必须非常洁净,否则一旦有杂质混入,就会作为晶核长大为晶体,影响所得晶体质量。

膜结晶技术的发展仅有几年的时间,迄今为止,国内外对于膜结晶过程的研究还停留在起步阶段,膜结晶技术作为一种新型的分离净化技术还有待于进一步发展。膜结晶过程的优化及控制、动力学研究、过程模型的建立、应用领域的拓展是今后膜结晶过程研究的主要方向,其中蛋白质等生物大分子溶液的膜结晶以其独特的优势将会引起更多学者的重视。膜结晶过程的多功能性,使研究者可以在较短诱导时间内得到质量完美的生物大分子晶体。可以预言,膜结晶作为一种新兴的结晶分离技术,在未来几年内将会有广阔的发展前景。

参考文献

- [1] 马润宇,王艳辉,涂感良.膜结晶技术研究进展及应用前景[J].膜科学与技术,2003,23(4):145-150.
- [2] 汪家政,范明.蛋白质技术手册[M].北京:科学出版社,2002:265.
- [3] Chayen N E, Saridakis E, El-Bahar R, *et al.* Porous silicon: An effective nucleation-inducing material for protein crystallization[J]. *J Mol Biol*, 2001, 312: 591-595.
- [4] Fermani S, Falini G, Minnucci M, *et al.* Protein crystallization on polymeric film surfaces[J]. *Journal of Crystal Growth*, 2001, 224(3/4): 327-334.
- [5] Rong L, Komatsu H, Yoda S. Control of heterogeneous nucleation of lysozyme crystals by using poly-L-lysine modified substrate[J]. *J Crystal Growth*, 2002, 235(1/2/3/4): 489-493.
- [6] Curcio E, Criscuoli A, Drioli E. Membrane crystallization of macromolecular solutions: the albumin study[C]//Proc of 3rd Italy-Korea workshop on membranes and membrane processes, Cetraro, 2001.
- [7] Curcio E, Profio G D, Drioli E. Membrane crystallization of macromolecular solutions[J]. *Desalination*, 2002, 145(1/2/3): 173-177.
- [8] Curcio E, Profio G D, Drioli E. A new membrane-based crystallization technique: tests on lysozyme[J]. *J Crystal Growth*, 2003, 247(1/2): 166-176.
- [9] Profio G D, Curcio E, Cassetta A. Membrane crystallization of lysozyme: kinetic aspects[J]. *Journal of Crystal Growth*, 2003, 257(3/4): 359-369.
- [10] Profio G D, Curcio E, Drioli E. Trypsin crystallization by membrane-based techniques[J]. *Journal of Structural Biology*, 2005, 150: 41-49. ■