

丙酮酸脱氢酶的光子相关动态光散射研究

张 渭 滨

(华侨大学应用物理系, 泉州 362011)

提 要

本文利用动态光散射技术研究丙酮酸脱氢酶, 得到其微观结构方面的若干信息。测量出其 PDC 结构及 E_2-X-K 结构的半径; 发现在较低浓度下, 聚集现象可以忽略, 尺寸分布呈单分散性分布, 动态光散射谱的线宽 Γ 与散射波矢 q 分别呈 $\Gamma \propto q^2$ 及 $\Gamma \propto q^3$ 关系。而在较高浓度下, $\Gamma \propto q^\alpha$, α 为分数, 这时尺寸分布呈多分散性分布。

关键词: 光子相关技术, 线宽 Γ , 散射波矢。

光子相关谱技术 (Photon Correlation Spectroscopy 简称 PCS) 是国外近十年来迅速发展起来的一项新的动态光散射技术, 它可用作生物大分子的研究, 范围包括蛋白质、核酸、病毒、核蛋白复合体、多糖、磷脂等^[1]。本文用 PCS 技术研究丙酮酸脱氢酶 (Pyruvate Dehydrogenase) 的两种微观结构: E_2-X-K 与 PDC (丙酮酸脱氢酶络合物) 的结构特点, 即单分散性与多分散性尺寸的分布, 测量它们的尺寸以及 E_2-X-K 臂状物的长度。

1. 原理

光散射场中粒子的布朗运动引起散射光频率的变化, 散射光频谱的展宽与粒子平动扩散、转动及位形空间自由度有关。

1.1 单分散性分布的情况

对单分散性尺寸分布的球形刚性粒子(只有平动扩散), 其散射光频谱具有洛仑兹函数的形式^[2]:

$$P(\omega) = \frac{D_t I^2 q^2 / \pi}{(D_t q^2)^2 + \omega^2}, \quad q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \frac{\theta}{2}, \quad (1)$$

式中 q 为散射波矢, θ 为散射角, D_t 为平动扩散系数, 谱函数的线宽 $\Gamma = D_t q^2$ 。

PCS 技术根据 Winner-Khintchine 原理, 把频域测量变换成时域测量, 归一化的光散射场光强自相关函数为^[3]:

$$S(q, t) = e^{-q^2 D_t t}. \quad (2)$$

相关时间 $\tau = 1/q^2 D_t$, 即 $\Gamma = 1/\tau$ 。利用 PCS 技术测出 τ , 再由 Stokes-Einstein 关系 $D_t = KT/6\pi\eta R$ 得到半径:

$$R = q^2 KT / 6\pi\eta \Gamma. \quad (3)$$

实际情况则要复杂得多, 即使是单分散性分布的粒子, 由于存在转动及内部运动, 上述结果不再成立, 一般情况下^[4,5],

$$S(q, t) = e^{-q^2 D_t t} H(qR, \Omega t), \quad (4)$$

式中 $H(qR, \Omega t)$ 是计及转动及内部运动对光散射贡献的函数, 对刚性非球状粒子而言, Ω 是转动扩散系数, 对柔性粒子而言, Ω 是内部运动模的特征频率, 两种情况均有 $\Omega \propto D_t/R^2$, 这时线宽可以表示为:

$$\Gamma = D_t q^2 h(qR). \quad (5)$$

当 $qR \ll 1$ ($R \ll \frac{\lambda}{4\pi \sin \theta/2}$), $h(qR) \sim 1$, 于是仍有 $\Gamma = D_t q^2$. 但对于 $qR \gg 1$, 这时转动及内部运动对散射谱的影响不可忽略. 不同情况下 $h(qR)$ 具有不同形式. 对于本文实验所属的具有强的流体动力学相互作用的柔性粒子而言, $h(qR) \sim (qR)^{d-2}$, 因此 $\Gamma \propto q^d$, (d 为欧氏维数), 本实验中, $d=3$.

1.2 多分散性分布的情况

理论和实验都证实^[4,5], 当 $qR \ll 1$ 时, 仍有 $\Gamma \propto q^2$ 关系; 而当 $qR \gg 1$, $\Gamma \propto q^\alpha$, α 依赖于多分散性指数 σ , 对于有强的流体动力学相互作用的柔性粒子, 当 $\sigma > 2$ 时, $\Gamma \propto q^3$, 在其他情况下, α 为分数.

在普遍情况下, 定义算术平均相关时间:

$$\langle \tau \rangle = \int_0^\infty S(q, t) dt. \quad (6)$$

这时,

$$1/\langle \tau \rangle \propto \Gamma = q^2 D_t h(qR).$$

本文结合光散射自相关函数形式的拟合来研究粒子尺寸分布的特点, 在多分散性尺寸分布的情况下, 归一化的自相关函数可按伸展指数形式来拟合^[6]:

$$S(q, t) = \exp[-(t/\tau)^\beta] \quad (7)$$

式中 β 为宽度参数, 对于单分散性尺寸分布, $\beta=1$, 而对于多分散性尺寸分布, $\beta < 1$.

2. 实验方法和实验结果

2.1 实验方法

光子相关谱技术的实验装置如图 1 所示, 样品池采用正方形截面的试管, 可以方便地调出 32° 及 58° 散射角. 所有实验均在室温下完成. 实验还用 He-Ne 激光器以改变 q 值. 小角度 (7.5°) 散射属外差式散射, 这时 (7) 式成立, 而较大角度 ($32^\circ, 58^\circ, 90^\circ$) 散射属自差式

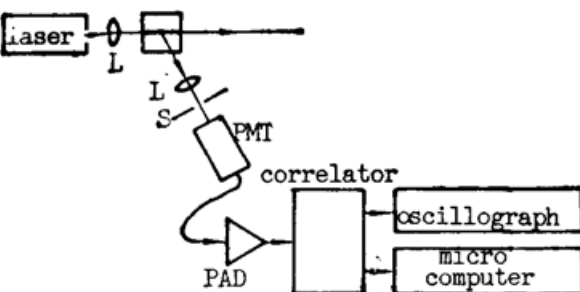


Fig. 1 Schematic representation of the dynamic light scattering system: L, lens; S, slit; PMT, photomultiplier; PAD, pulse amplifier-discriminator

散射, 必须用 $S(q, t) = \exp[-2(t/\tau)^\beta]$ 代替 (7) 式.

2.2 实验结果

对 PDC 进行了如下测量

(1) 对浓度 $c=1$ mg/ml 的 PDC 样品用 Ar^+ 激光器在 $\theta=15^\circ, 32^\circ, 58^\circ, 90^\circ$ 以及用 He-Ne 激光器在 $\theta=90^\circ$ 下测量了 $\langle \tau \rangle$. 其值分别为 $2.5 \times 10^{-8}, 7.0 \times 10^{-4}, 2.3 \times 10^{-4}, 1.0 \times 10^{-4}, 1.4 \times 10^{-4}$ sec, 实验发现有 $\langle \tau \rangle \propto q^{-2}$ (即 $\Gamma \propto q^2$), 结果如图 2 所示.

(2) 鉴于光散射自相关函数的展宽. 实验中选择相关器的三档取样时间 2, 20, 200 μs 测量自相关函数, 归一化后得到弛豫谱 $S(q, t)$. 显然, 若 $S(q, t) = \exp[-(t/\tau)^\beta]$ 成立, 则

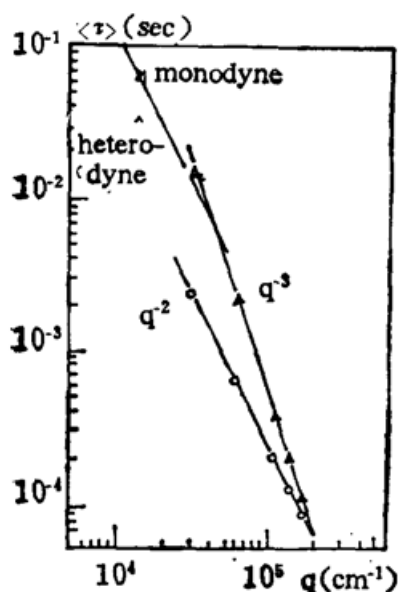


Fig. 2 The q dependence of arithmetic average relaxation time $\langle \tau \rangle$

○ PDC ($c=1\text{mg/ml}$), $\langle \tau \rangle \propto q^{-2}$ ($\Gamma \propto q^2$). Δ E_2 - $X-K$ ($c=1\text{mg/ml}$), $\langle \tau \rangle \propto q^{-2}$ for small θ and $\langle \tau \rangle \propto q^{-3}$ for large θ .

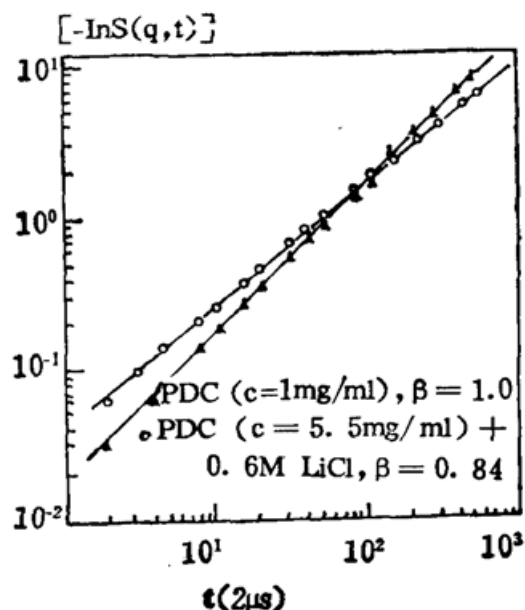


Fig. 3 The double logarithm of $[-\ln S(q, t)]$ against t

The linear behavior indicated a stretched exponential with slope β

$[-\ln S(q, t)]$ 与时差 t 在双对数坐标图中呈线性关系, 且斜率就是宽度参数 β 。对于 $c=1\text{mg/ml}$ 的 PDC, $\beta=1$, 如图 3 所示。

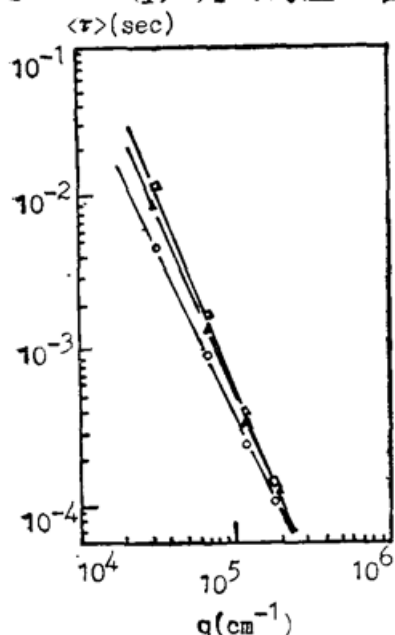


Fig. 4 The q dependence of $\langle \tau \rangle$. ($\langle \tau \rangle \propto q^{-\alpha}$)

○ PDC ($c=5.5\text{mg/ml}$), $\alpha=2.15$;
 \blacktriangle PDC+LiCl, $\alpha=2.4$; \square $E_2-X-K+E_1+E_3$, $\alpha=2.55$

(3) 增加 PDC 的浓度 ($c=1.5, 2.0, 3.0, 4.0\text{mg/ml}$), 发现 $\langle \tau \rangle$ 基本不变, 仍有 $\Gamma \propto q^2$ 关系。但是 c 增至 5.5mg/ml 时, $\langle \tau \rangle$ 有轻微增加, 而且 $\Gamma \propto q^{2.15}$, 如图 4 所示。

(4) 对于 $c=5.5\text{mg/ml}$ 的 PDC 样品, 加入 0.6M 浓度的 LiCl, 欲把 PDC 分解成 E_2-X-K 及 E_1, E_3 。在 90° 下测得 $\langle \tau \rangle$ 从 $1.13 \times 10^{-4}\text{sec}$ 上升到 $1.35 \times 10^{-4}\text{sec}$ 。测量不同散射角的 $\langle \tau \rangle$, 发现有 $\Gamma \propto q^{2.4}$, 如图 4 所示。此外, 拟合出伸展指数函数的宽度参数 $\beta=0.84$, 如图 3 所示。

(5) 对 $c=1\text{mg/ml}$ 的 PDC 样品在室温下放置 4 小时后再进行测试, 发现 $\langle \tau \rangle$ 不变, 仍有 $\Gamma \propto q^2$ 及 $\beta=1$ 。

对 E_2-X-K 进行了如下测量

(1) 对浓度为 $c=1\text{mg/ml}$ 的 E_2-X-K 样品, 用 Ar^+ 激光器在 $\theta=15^\circ, 32^\circ, 58^\circ, 90^\circ$ 下, 以及用 He-Ne 激光器在 $\theta=90^\circ$ 下测得 $\langle \tau \rangle$ 分别为 $1.7 \times 10^{-2}, 2.5 \times 10^{-3}, 4.0 \times 10^{-4}, 1.2 \times 10^{-4}, 2.1 \times 10^{-4}\text{sec}$ 。发现有 $\langle \tau \rangle \propto q^{-3}$ (即 $\Gamma \propto q^3$, 见图 2), 这说明 $qR \gg 1$ 。在小角度 $\theta=7.5^\circ$ 时, 测得 $\langle \tau \rangle$ 为 $3.5 \times 10^{-2}\text{sec}$, 由于小角度下为外差式散射, 换算成自差式散射, $\langle \tau \rangle$ 应为 $7.0 \times 10^{-2}\text{sec}$ 。对于 15° 及 7.5° 散射, 有 $\Gamma \propto q^2$ (见图 2)。这说明 $qR \ll 1$ 。既然 $\theta > 15^\circ$, 有 $qR \gg 1$, 而 $\theta < 15^\circ$, 有 $qR \ll 1$ 。由此可近似认为在 $\theta=15^\circ$ 下, 有 $qR \approx 1$, 进而估算出 $R \sim 300\text{nm}$ 。

(2) 对 $c=1\text{mg/ml}$ 的样品, 选取 $0.02, 0.2, 2.0\text{ms}$ 三种取样时间进行测量, 归一化

的自相关函数有伸展指数函数的宽度参数 $\beta=1$ 的结果。

(3) 在 $c=1 \text{ mg/ml}$ 的样品中加入形成 PDC 所需的 E_1, E_3 , 结果测得 $\Gamma \propto q^{2.55}$, 如图 4 所示。拟合出伸展指数函数的宽度参数 $\beta=0.85$ 。

(4) 为验证 $c=1 \text{ mg/ml}$ 的样品有无聚集效应, 先加入 0.1 M 浓度的 NaCl , 发现 $\langle \tau \rangle$ 不变, 再加入 0.2 M 浓度的 NaCl , $\langle \tau \rangle$ 仍不变, 因此仍有 $\Gamma \propto q^3$ 关系。

(5) 用 He-Ne 激光器在 $\theta=90^\circ$ 下测量了不同浓度的 E_2-X-K 样品中的 $\langle \tau \rangle$, 结果如表 1 所示。

Table 1 The arithmetic average relaxation time $\langle \tau \rangle$ of different concentration E_2-X-K .

$c(\text{mg/ml})$	7.5	3.75	1.875	1.125
$\langle \tau \rangle (10^{-4} \text{ sec})$	2.38	2.15	2.16	2.13
	2.37	2.13	2.19	2.16
	2.30	2.17	2.14	2.09
	2.36	2.18	2.17	2.10

从结果中可以看出, 与 PDC 类似, 在较低浓度下, $\langle \tau \rangle$ 基本不变, 而浓度增到 7.5 mg/ml , $\langle \tau \rangle$ 有所增加。

3. 讨论

3.1 关于单分散性与多分散性分布

对低浓度 PDC, 有 $\Gamma \propto q^2$ 。由于在 $qR \ll 1$ 条件下, 无论单分散性分布及多分散性分布, 均有此结果, 故单凭 $\Gamma \propto q^2$, 尚不能判断出 PDC 尺寸分布特点。但是若结合光散射弛豫谱的宽度参数 $\beta=1$, 则可确定低浓度下 PDC 具有单分散性尺寸分布。

对于低浓度 E_2-X-K , 当 θ 较大时, 有 $\Gamma \propto q^3$ 。由于在 $qR \gg 1$ 条件下, 对于具有强的流体动力学相互作用的柔性粒子, 在单分散性分布及多分散性分布且分散性指数 $\sigma > 2$ 条件下, 都有 $\Gamma \propto q^3$ 。但是结合光散射弛豫谱宽度参数 $\beta=1$ 的结果, 可确定低浓度 E_2-X-K 具有单分散性尺寸分布。

对于以下三种情况的样品: (1) 在 PDC 中加入 LiCl , PDC 分解成 E_2-X-K 及 E_1, E_3 ; (2) 在 E_2-X-K 中加入 E_1, E_2 以形成 PDC; (3) 较高浓度 ($c=5.5 \text{ mg/ml}$) 的 PDC, 都有 $\Gamma \propto q^\alpha$ (α 为分数, 上述三种情况下 α 分别为 2.4、2.55、2.15), 可确定上述三种样品都是多分散性尺寸分布。对应的光散射弛豫谱宽度参数 $\beta \approx 1$ (0.84 及 0.85), 亦证实样品属多分散性分布。

3.2 PDC 与 E_2-X-K 的半径

低浓度 PDC 呈单分散性尺寸分布, 且 $qR \ll 1$, 此时有 $\Gamma = D_t q^2$, 由 (3) 式计算出 R 为 $44 \text{ nm} \sim 49 \text{ nm}$ 。当然, 由于刚性条件不成立, 这儿的 R 是有效半径 (即流体动力学半径), 这个结果与电镜测出的核半径为 $40 \text{ nm} \sim 44 \text{ nm}$ 基本相符。由于 PDC 在核上附有 E_1, E_3 , 半径略大些。

对于 E_2-X-K , 由于 $qR \gg 1$, 且呈单分散性分布, (5) 式中 $h(qR) \sim (qR)^{d-2}$ ($d=3$), 于是 $\Gamma \propto D_t q^3 R = \frac{KTq^3}{6\pi\eta}$, 即 Γ 与 R 无关, 因此不能从 Γ 求出 R 。但是, 从 $\theta=15^\circ$ 时有

$qR \sim 1$ 估算出 $R \sim 300$ nm。尽管这种估算有一定误差, 但 E_2-X-K 在尺寸上比 PDC 更加伸展则是无疑义的。此外, 此结果也可以估算出 E_2-X-K 臂状物长度为 200 nm 量级。

3.3 关于聚集(aggregation)作用

在较低浓度下(对 E_2-X-K , c 小于 3.75 mg/ml, 对 PDC, c 小于 4.0 mg/ml), 聚集作用可以忽略。证据之一是加入 NaCl 后 $\langle \tau \rangle$ 不变(若有聚集作用, NaCl 会破坏聚集); 证据之二是样品放置 4 小时后 $\langle \tau \rangle$ 不变; 证据之三是前面关于 α 与 β 的讨论结果。但是, 当样品浓度较高时, $\langle \tau \rangle$ 略为增加, $\Gamma \propto q^\alpha$ 关系中 α 为分数, 这说明存在聚集效应, 造成粒子尺寸的多分散性分布。

作为比较, 我们测量了具有立方结构的 KGDC 样品 ($c = 5$ mg/ml), 发现开始时, $\Gamma \propto q^2$, 但是经过 1 小时后, $\Gamma \propto q^{2.7}$ 。这种变化是聚集效应造成粒子尺寸的多分散性分布。

本文实验工作是在美国堪萨斯州立大学物理系完成的。作者感谢 O. M. Sorensen 教授提供的各种帮助, 感谢 T. Rodge 教授提供了实验所需的各种样品。

参 考 文 献

- [1] R. Pecora *et al.*; *«Dynamic Light Scattering»*, (R. Pecora, Plenum Press, New York and London, 1985),
- [2] M. R. Zachariah *et al.*; *Appl. Opt.*, 1989, **28**, No. 3 (Feb), 530~536.
- [3] 张渭滨; *«激光杂志»*, 1991, **12**, No. 3 (Jun), 113~117.
- [4] J. E. Martin *et al.*; *Phys. Rev. (A)*, 1986, **34**, No. 3 (Sep), 2346~2350.
- [5] J. E. Martin *et al.*; *Phys. Rev. (A)*, 1986, **33**, No. 5 (May), 3540~3543.
- [6] 张渭滨等; *«华侨大学学报»*(自然科学版), 1991, **12**, No. 2 (Apr), 151~161.

Study on dynamic light scattering by photon correlation spectroscopy for pyruvate dehydrogenase

ZHANG WEIBIN

(Department of Applied Physics, Huaqiao University, Quanzhou 362011)

(Received 16 July 1991; revised 20 November 1991)

Abstract

This paper studied pyruvate dehydrogenase using dynamic light scattering (DLS) with photon counting technique and obtained some data on its microstructure. Radii of PDC and E_2-X-K are measured. It is found that at lower concentration the aggregation can be neglected, the size distribution is monodispersion, and the linewidths of DLS spectra of PDC and E_2-X-K are proportional to q^2 and q^3 respectively. But at higher concentration the size distribution is polydispersion and Γ is proportional to q^α , where α is fractional.

Key words: photon correlation spectroscopy, the linewidth Γ , scattering wave vector.