

• 研究论文 •

配液结晶法制备溶菌酶蛋白质晶体的生长机理研究

于泳^{*,a} 陈万春^{a,b} 康琦^a 刘道丹^{a,b} 戴国亮^a 崔海亮^a

(^a中国科学院力学研究所微重力实验室 北京 100080)

(^b中国科学院物理学研究所 北京 100080)

摘要 采用配液结晶法制取了溶菌酶蛋白质晶体, 使用动态光散射测量了溶液中聚集体的颗粒度几率分布; 使用 Zeiss 显微镜测定了溶菌酶(110)晶面的生长速度. 实验表明: 随着蛋白质和 NaCl 浓度的增加, 溶液中聚集体的颗粒尺寸也相应增加. 随着反应时间的增加, 溶菌酶分子在溶液中的聚集反应, 逐渐达到平衡; 在蛋白质和 NaCl 浓度较高时, 溶菌酶晶体的(110)面生长较快, 而在蛋白质和 NaCl 浓度较低时, 该晶面生长较慢. 基于二维成核生长机理, 从晶体生长动力学理论方程出发, 计算了二维成核的形成能 $\alpha = 4.01 \times 10^{-8} \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$.

关键词 蛋白质晶体; 晶体生长机理; 动态光散射

Study on Growth Mechanism of Lysozyme Crystal Grown by Batch Crystallization Method

YU, Yong^{*,a} CHEN, Wan-Chun^{a,b} KANG, Qi^a LIU, Dao-Dan^{a,b}

DAI, Guo-Liang^a CUI, Hai-Liang^a

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

(^b Institute of Physics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

Abstract The lysozyme crystals were grown by batch crystallization method. The distribution of the aggregate particles in the lysozyme solution was measured by dynamic light scattering (DLS). The growth rate of lysozyme crystal was obtained by Zeiss microscope. The experimental results showed that the dimension of aggregate particles was increased with the concentration of protein and NaCl in the solution. The aggregation reactions of lysozyme molecules in the solution were increased with time gradually and arrived at equilibrium finally. The finding indicated that the higher the concentration of protein and NaCl, the faster the growth rate of (110) face. According to kinetics of crystal growth, the formation energy of two-dimensional nucleation, α was calculated to be about $4.01 \times 10^{-8} \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ based on two-dimensional nucleation mechanism.

Keywords protein crystal; crystal growth mechanism; dynamic light scattering

空间环境被认为是蛋白质晶体生长的理想环境. 这主要是由于空间环境处于微重力状态, 它可以减少重力场引起的沉降运动和浮力对流^[1,2]. 这种沉降运动和浮力对流, 会引起晶体生长母液中流场的变化, 影响到蛋白质分子在溶液中的传输^[3]. 而且重力可以使溶液中聚

集体或杂质沉降在晶体表面, 从而影响到蛋白质晶体的质量. 而在微重力环境下, 不仅使蛋白质分子在溶液中的传输仅靠扩散过程, 也可以减少杂质对蛋白质晶体的干扰, 增大蛋白质晶体的尺寸, 优化蛋白质晶体的质量. 目前国内外利用不同的空间飞行器已取得了一定的进

* E-mail: yuyong@imech.ac.cn; Tel.: 010-82617752; Fax: 010-62615524.

Received May 19, 2005; revised December 30, 2005; accepted March 7, 2006.

中国科学院知识创新工程(Nos. KSCX2-SW-322, KJCX2-SW-L05)、国家自然科学基金(No. 10472127)、国家自然科学基金重点项目(No. 10432060)资助项目.

展, 生长出了一些比地面更好的晶体. 但空间实验也表明, 相当部分的蛋白质样品与地面结晶的样品相比, 并无明显的改进^[4-6].

蛋白质分子的结晶是一个多参数控制的复杂过程. 温度、pH 值、沉淀剂、蛋白浓度以及流场情况等都是重要的影响因素. 不同蛋白质晶体或同一种蛋白质在不同条件下的生长机理也不相同. 因此, 对蛋白质晶体的研究是一个系统过程, 要求对每一种参数的变化都尽可能深入地研究, 再加以全面分析, 从而找出最佳的条件来生长晶体. 结晶过程主要包括: 溶液传输、成核和晶体生长等各个阶段. 微重力环境的影响主要体现在通过改变蛋白质分子在溶液中传输过程, 来影响蛋白质晶体的生长过程^[1]. 十几年来, 在蛋白质晶体生长机理研究方面的主要工作是: 使用光学显微镜^[7-10]、原子力显微镜^[11-16]、激光共聚焦显微镜^[17]等技术观察台阶形貌; 使用激光干涉仪观察浓度场、流场及晶体生长过程; 使用计算机开展微重力条件下蛋白质晶体生长的计算机模拟^[24-27]. 这些研究很大程度上使我们对蛋白质结晶的整个过程有了比较深入的了解. 但是, 由于蛋白质分子本身就比较复杂, 蛋白质分子结晶更是一个复杂的过程. 迄今为止, 有关于蛋白质结晶过程的许多问题还没有完全弄清楚.

在本文中, 采用 Zeiss 显微镜测量了晶体的生长速度, 并结合动态光散射(DLS)的测量, 研究了配液结晶法制备溶菌酶晶体生长过程的动力学特性.

1 实验

1.1 试剂

缓冲溶液: HOAC-NaOAC ($50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 4.5, 分析纯, 市场购买); 蛋白质: 鸡蛋蛋白溶菌酶(Sigma 公司购买, 美国); 化学试剂: 分析纯, 市场购买.

1.2 仪器

Zeiss 显微镜(Zeiss 公司, 德国), BI-200SM 动态光散射仪(美国 Brookhaven 仪器公司), Ar^+ 激光器(上海亿奥激光公司生产, 150 mW). LTD6G 型恒温循环器(英国 Grant 仪器公司).

1.3 实验方法

1.3.1 溶菌酶晶体的制备

使用配液结晶法制备溶菌酶晶体: 将一定量溶菌酶粉末和 NaCl 分别溶于缓冲溶液中, 配成相应浓度的溶液, 置于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存. 实验时, 取等体积的溶菌酶溶液和含 NaCl 溶液的上层清液, 于样品池中混合, 制取晶体.

1.3.2 蛋白质浓度的测量

溶液中溶菌酶的浓度是使用紫外-可见分光光度计

测量的. 实验步骤是, 首先称取溶菌酶蛋白粉末, 溶于缓冲溶液中, 配成一系列不同浓度的溶液. 然后, 使用紫外-可见分光光度计测量溶液在 280 nm 处的吸光度, 将不同浓度与不同的吸光度对应, 绘出工作曲线. 最后从溶菌酶晶体生长溶液中, 抽取少量溶液, 适当稀释后测量其在 280 nm 处的吸光度, 根据工作曲线, 得出溶菌酶晶体生长溶液中的蛋白质浓度.

1.3.3 聚集体颗粒度几率分布的测量

使用动态光散射仪测量溶液中聚集体的颗粒分布: 先分别取等体积的溶菌酶溶液与 NaCl 溶液在样品池中混合, 配制成过饱和溶液. 然后将过饱和溶液注入样品池中, 再将样品池置于光散射仪的散射腔中, 进行动态光散射测量. 散射角固定在 90° . 用恒温循环器使散射腔中的十氢萘和样品池的溶液恒温在 $26.5 \pm 0.1 \text{ }^\circ\text{C}$. 实验数据的采集由计算机自动控制. 实验数据处理则使用随机附带的计算机软件 NNLS (non-negatively constrained least squares: multiple pass) 进行.

1.3.4 蛋白质晶体生长速率的测定

我们采用显微镜测量技术测定晶面的法向生长速率. 图 1 是本实验中使用的显微镜测量装置示意图. 蛋白质晶体生长过程在样品池中进行, 其生长温度控制在 $(28.8 \pm 0.1) \text{ }^\circ\text{C}$. 样品池的制作方法是将载波片和盖波片进行疏水处理, 然后在二者之间夹入一塑料边框, 镶嵌制成. 晶体生长溶液加入样品池后, 先用凡士林密封好. 再将样品池移到显微镜下观察. 放置一段时间后, 蛋白质晶体开始生长. 此后, 用图像监视器观察蛋白质晶体生长的动态过程, 并用 CCD 连续拍摄蛋白质晶体

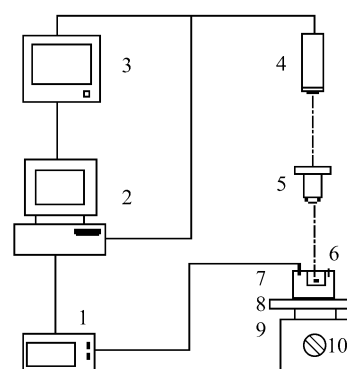


图 1 溶菌酶晶体生长速率测量的显微镜观察实验装置 (1) 温度控制器; (2) 台式计算机; (3) 图像监视器; (4) CCD; (5) 显微镜物镜; (6) 单晶体; (7) 样品池; (8) 回旋平台; (9) 转台组合装置; (10) 转台操纵杆

Figure 1 Experimental set-up for measuring the growth rate of lysozyme crystals

(1) temperature controller; (2) personal computer; (3) monitor; (4) CCD; (5) microscope objective; (6) growing crystal; (7) crystal growth cell; (8) stage ring; (9) turret assembly; (10) manipulator

生长的照片. 在保持实验温度和缓冲溶液浓度不变的条件下, 改变溶菌酶溶液的浓度, 测出不同浓度下蛋白质溶液中晶体的生长速率. 每次晶体生长实验周期短于 1.5 h.

2 结果与讨论

2.1 聚集体颗粒度的几率分布

动态光散射测量的实验结果如图 2, 3 所示, 其中 X 轴表示参与散射的蛋白质颗粒尺寸(以直径表征), Y 轴表示相应粒径溶菌酶颗粒的散射光强百分比(以最强的散射光强作为 100%). 由于散射光强度与参与散射的颗粒数成正比, 因而 Y 轴可表示聚集体颗粒度的几率. 图 2 显示的是 NaCl 含量不同时, 溶菌酶溶液中的聚集体几率分布情况. 图 2(A)与(B)相比, 最大聚集体的直径都是 5.62 nm. 但在 NaCl 含量为 5% 时, 溶液中存在的最小聚集体的直径是 2.37 nm, 而 NaCl 含量为 7% 时, 溶液中存在的最小聚集体的直径是 3.16 nm. 这说明随着 NaCl 含量的增加, 溶液中聚集体颗粒的直径也在增加.

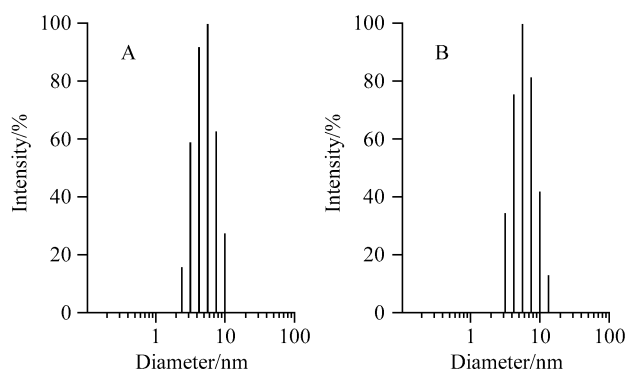


图 2 不同 NaCl 含量时的聚集体颗粒度的几率分布

50 mmol·L⁻¹ HOAC-NaOAC, $\sigma=2.58$, 26.5 °C, 溶液混合 40 min 后测量. (A) 5% NaCl; (B) 7% NaCl

Figure 2 Probability distribution of the aggregates particle size with NaCl concentration in solution at 50 mmol·L⁻¹ HOAC-NaOAC

$\sigma=2.58$, 26.5 °C, the measurement was operated after the solution was mixed for about 40 min. (A) 5% NaCl; (B) 7% NaCl

图 3 显示了在初始饱和度 $\sigma=4.68$ 时, 颗粒度几率分布随时间的变化. 表 1 则列出了聚集体最大颗粒直径随时间的演变关系, 表中 t 表示反应时间, R 表示颗粒直径. 我们看到, 随着反应时间的增加, 当晶体生长进行到 40 min 时, 颗粒尺寸达到最大 7.50 nm. 此后, 颗粒尺寸不再改变, 这说明溶菌酶分子的聚集过程, 在 40 min 时已达到平衡. 聚集体最大颗粒直径也与溶液的初始饱和度有关, 这可通过相比图 3(D)和图 2(B)看出来. 除初始饱和度 σ 外, 与这两幅图相对应的实验条件都相同.

与图 3(D)相对应的 $\sigma=4.68$, 最大的聚集体的直径是 7.50 nm, 而图 2(B)则分别为 $\sigma=2.58$ 和 5.62 nm, 这表明随着蛋白质浓度的增加, 溶液中聚集体的尺寸也相应地增加.

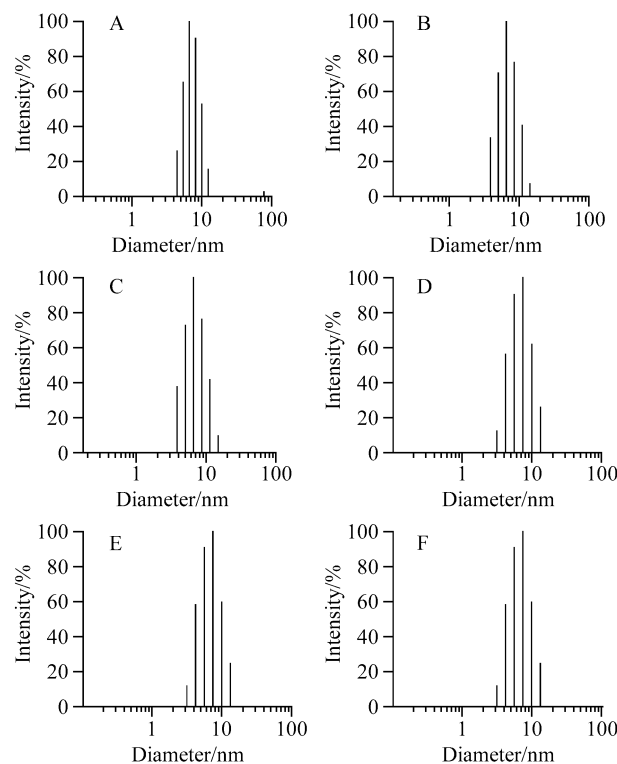


图 3 聚集体颗粒度几率分布随时间的变化

50 mmol·L⁻¹ HOAC-NaOAC, 7% NaCl, 26.5 °C, $\sigma=4.68$, 溶液混合不同时间后测量. (A) 10 min; (B) 20 min; (C) 30 min; (D) 40 min; (E) 50 min; (F) 60 min

Figure 3 Probability distribution evolution of the aggregates particle size with time at 50 mmol·L⁻¹ HOAC-NaOAC

7% NaCl, 26.5 °C, $\sigma=4.68$. The measurement was operated after the following time: (A) 10 min; (B) 20 min; (C) 30 min; (D) 40 min; (E) 50 min; (F) 60 min

表 1 聚集体最大颗粒直径随时间的演变

Table 1 Evolution of the maximum diameter of aggregates with time

t/min	R/nm
10	7.10
20	6.89
30	6.33
40	7.50
50	7.50
60	7.50

2.2 蛋白质溶液浓度随时间的变化

为了探索晶体生长动力学机制, 弄清生长过程中蛋白质溶液浓度的变化是十分重要的. 为此, 我们测量了

溶液中蛋白质浓度随时间的变化, 实验结果如表 2 和图 4 所示, 图表中 c 为溶菌酶浓度. 我们发现, 在初始过饱和度和 $\sigma=2.58$ 时, 从开始至 70 min 时间内, 溶液中蛋白质浓度基本不变; 而在过饱和度 $\sigma=4.68$ 的情况下, 自 30 min 后浓度开始缓慢地下降, 浓度缓慢下降的原因与晶体成核过程有关. 当过饱和度 $\sigma=2.58$ 时, 溶液中形成的晶体数目较少, 消耗的蛋白质分子较少, 因此蛋白质浓度基本不变, 而在 $\sigma=4.68$ 时, 溶液中形成的晶体数目较多, 消耗的蛋白质分子也较多. 虽然图 4(B)中蛋

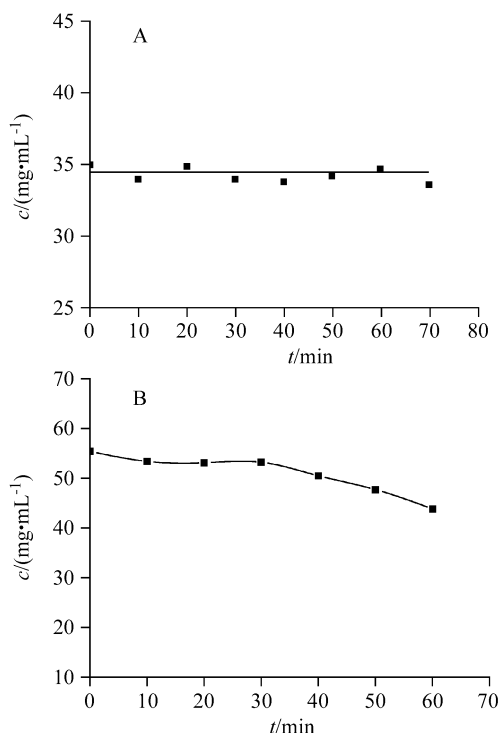


图 4 溶液中蛋白质浓度随时间的变化

50 mmol·L⁻¹ HOAC-NaOAC, 7% NaCl, 26.5 °C. (A) 初始 $\sigma=2.58$; (B) 初始 $\sigma=4.68$

Figure 4 Change of protein concentration in solution with time at 50 mmol·L⁻¹ HOAC-NaOAC

7% NaCl, 26.5 °C. (A) $\sigma=2.58$ at start point; (B) $\sigma=4.68$ at start point

表 2 溶液中溶菌酶浓度随时间的变化

Table 2 Change of the lysozyme protein concentration in the solution with time

t/min	c/(mg·mL ⁻¹)	
	$\sigma=2.58$	$\sigma=4.68$
0	35.0	55.5
10	34.0	53.3
20	34.9	53.2
30	33.8	53.3
40	34.2	50.6
50	34.7	47.8
60	33.6	43.9

白质浓度从 30 min 后开始缓慢地下降, 但从聚集体最大颗粒直径随时间的演变关系(如表 1 所示)看, 颗粒直径将随反应时间而增加, 逐渐达到 7.50 nm 的稳定值.

2.3 蛋白质晶体的生长形貌和生长速率

图 5 是我们采用显微镜测量技术观察到的溶菌酶晶体生长形貌. 该照片拍摄时间选在晶体开始生长后 45 min, 其有效放大倍数为 332.4. 图 5(A)和(B)分别对应两个不同的初始过饱和度 $\sigma=2.58$ 和 $\sigma=4.68$. 从该图可以看出, 在 $\sigma=2.58$ 时, 晶体的(110)面较为明显, 而在 $\sigma=4.68$ 时, 晶体生长过程开始时(110)面却较小, 但随着溶菌酶晶体的继续生长, 该(110)晶面会不断扩大, 最终变得如图 5(A)显示的生长形态.

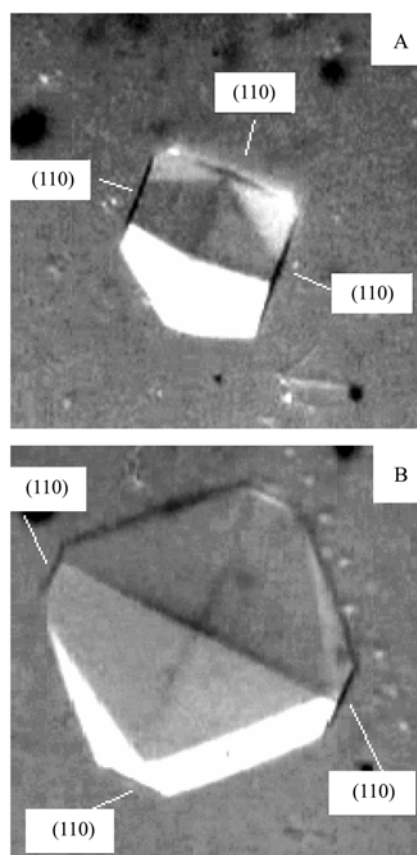


图 5 溶菌酶晶体的生长形貌($\times 332.4$, 拍摄时间: 晶体开始生长后 45 min)

50 mmol·L⁻¹ HOAC-NaOAC, 7% NaCl, 26.5 °C. (A) $\sigma=2.58$; (B) $\sigma=4.68$

Figure 5 Morphology of lysozyme crystal (screen was made when the crystal started to grow in 45 min later) at 50 mmol·L⁻¹ HOAC-NaOAC

7% NaCl, 26.5 °C. (A) $\sigma=2.58$; (B) $\sigma=4.68$

表 3 实验数据是我们采用显微测量技术所得到的生长速率. 它表明溶菌酶蛋白质晶体(110)面的生长速率随其溶液浓度的降低而递减. 图 6 是由表 3 实验数据获得的 $\ln(\frac{R}{\sigma^{5/6}})$ 对 $\frac{1}{\sigma}$ 关系曲线.

表3 不同 σ 条件下溶菌酶蛋白质晶体(110)面的生长速率^aTable 3 The growth rates of (110) face of lysozyme crystal at different supersaturation σ

$c/(\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1})$	σ	$\frac{1}{\sigma}$	$R/(\text{cm}\cdot\text{s}^{-1})$	$\ln(R/\sigma^{5/6})$
52.3	2.92	0.34	9.61×10^{-7}	-14.9
51.4	2.85	0.35	8.49×10^{-7}	-15.0
50.2	2.77	0.36	7.33×10^{-7}	-15.1
49.1	2.68	0.37	6.16×10^{-7}	-15.3
48.0	2.59	0.38	5.00×10^{-7}	-15.5
46.4	2.48	0.40	3.94×10^{-7}	-15.6
44.8	2.35	0.42	2.73×10^{-7}	-16.0
42.6	2.20	0.45	1.67×10^{-7}	-16.4

^a 28.8 °C, 平衡浓度为: 13.34 mg/mL.

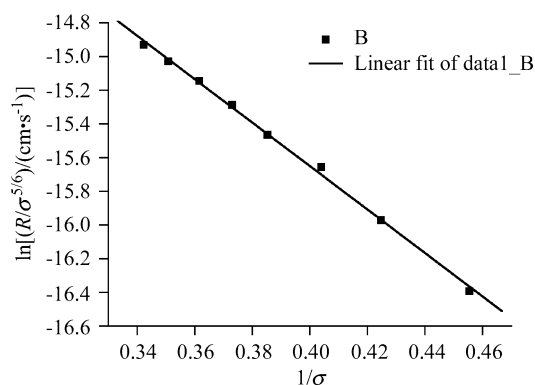
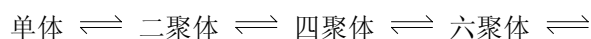
图6 $\ln\left(\frac{R}{\sigma^{5/6}}\right)$ 对 $\frac{1}{\sigma}$ 关系曲线

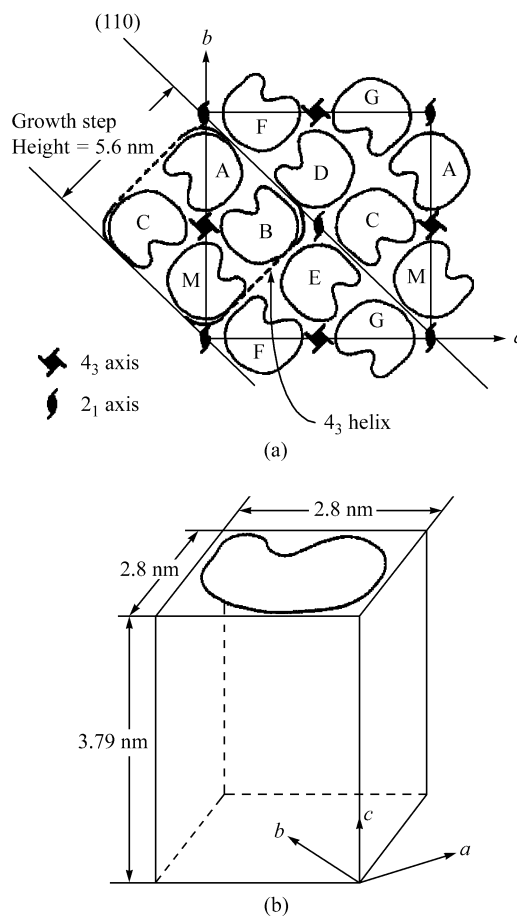
Figure 6 Curve of the relationship between $\ln\left(\frac{R}{\sigma^{5/6}}\right)$ and $\frac{1}{\sigma}$
50 mmol·L⁻¹ HOAC-NaOAC, 7% NaCl, 28.8 °C

2.4 蛋白质晶体的生长机理

关于溶菌酶蛋白质晶体的结构和生长机理的研究, 前人已作了许多工作. 据文献报道^[29], 溶菌酶蛋白质属于四方晶系, 其空间点群为 $P4_32_12$. 图 7(a)显示了沿 C 轴方向的单个晶胞. 每个单胞包含 8 个不同取向的蛋白质分子, 图中选参考分子的标记为 M , 其它 7 个分子分别标记为 $A\sim G$. 图 7(b)显示了一个蛋白质分子的三维结构, 呈四方柱体形态, 其边长尺寸分别为: 28.0 nm×28.0 nm×37.9 nm. 图 7(a)还表明: 4_3 螺旋对称元素在溶菌酶蛋白质晶体的结构对称性中占支配地位. 单胞的对角线表示 (110) 晶面. 原子力显微镜与光散射的研究表明, 4_3 螺旋结构并不是在溶菌酶分子进入晶体后形成的^[29], 而是在进入晶体之前, 在溶液中形成的有序聚集体. 这些聚集体含有数目不等的溶菌酶分子, 它们可以互相转化, 最终达到平衡, 即具有以下关系式:



八聚体 \rightleftharpoons 更高的 n -阶聚集体

图7 溶菌酶晶体结构的简化示意图^[29]

(a) 四方晶系溶菌酶晶体单胞, 参考分子标记为 M , 其它 7 个分子用 $A\sim G$ 表示. 4 个分子形成一个 4_3 螺旋对称结构. 对角线对应 (110) 面. (b) 表示单个的溶菌酶分子

Figure 7 Simplified representation of structure of lysozyme crystal^[29]

(a) Unit cell of tetragonal lysozyme crystal with the reference molecule labeled M and the other seven molecules labeled A to G . The four molecules form a 4_3 helix and the diagonal lines correspond to (110) faces. (b) Individual lysozyme molecules

电子显微镜和原子力显微镜实验还表明, 这些聚集体从溶液中被传输到晶体表面后, 对于台阶生长速率起支配作用的是具有 4_3 螺旋结构的聚集体. 也就是说, 具有 4_3 螺旋结构的聚集体是溶菌酶晶体的主要生长单元^[29]. 对于不同的晶面, 虽然起支配作用的生长单元均具 4_3 结构, 但聚集体内所含蛋白质的分子数可能是不同的. Nadarjah 等^[29]的研究认为, 4_3 螺旋结构的八聚体为 (110) 面的生长单元, 而 Li 等^[30]的研究认为 4_3 螺旋结构的四聚体为 (101) 面的生长单元. 图 8 显示了三种具有 4_3 螺旋结构的聚集体形态. 我们动态光散射测量结果表明: 当 $\sigma=4.68$ 和 $\sigma=2.58$ 时, 最大聚集体的直径分别是 7.50 和 5.62 nm. 有理由认为, 在这两种过饱和度条件下, 聚集体的形态分别是八聚体和四聚体. 关于溶菌酶晶体生

长过程中形貌的演变,也可以用动态光散射测量结果来解释,在过饱和度 $\sigma=2.58$ 时,由于四聚体的分布几率大于八聚体,所以,晶体的(101)面生长较快,而(110)面生长较慢,致使(110)面明显显露.在过饱和度 $\sigma=4.68$ 时,由于八聚体的分布几率大于四聚体,所以(110)面生长较快,(101)面生长较慢,致使(101)面明显显露.

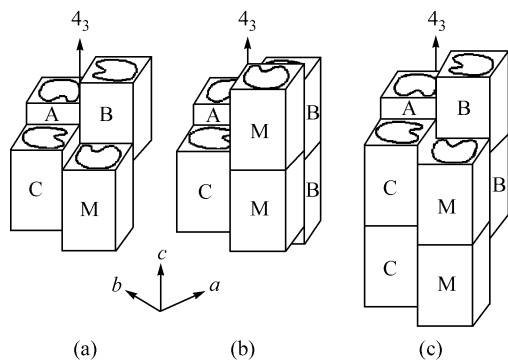


图8 几种具有 4_3 螺旋结构的聚集体^[29]

(a) 四聚体, (b) 六聚体, (c) 八聚体

Figure 8 Possible aggregates corresponding to 4_3 helix

(a) tetramer, (b) hexamer, (c) octamer

在前言已提到,蛋白质分子的结晶是一个多参数控制的复杂过程.迄今为止,有关于蛋白质结晶过程的许多问题还没有完全弄清楚.在晶体生长机制方面,目前已提出了二维成核生长机制理论,单螺旋位错和多螺旋位错等生长机制理论.有的理论在实验上已得到验证,比如, Rong 等^[14]关于原子力显微镜的研究工作.他们发现:在过饱和度 $\sigma > 1.22$ 时,溶菌酶晶体(110)面出现数个二维岛状生长台阶,而且过饱和度 σ 越大,二维岛状生长台阶也越多.因此,溶菌酶晶体(110)面属于二维成核生长机理.我们关于生长速率的显微测量实验是在 $\sigma > 1.22$ 条件下完成的,如表3所示.假定认为其生长机理为二维成核机理.以下从无机盐晶体生长动力学理论方程出发,计算二维成核的形成能.

晶面法向生长速率 R (cm/s)可以用方程(1)表示,其中台阶的横向生长速率 v ,二维晶核的成核速流 J 分别由方程(2)和(3)表示.临界核的形成能 $\delta\phi_c$ 由方程(4)表示.在计算二维成核的形成能时,还要使用方程(5)~(8).方程(1)~(8)式中各符号的物理意义详见表4.我们用作图法求解成核的形成能.

$$R = h(v^2 J)^{\frac{1}{3}} \tag{1}$$

台阶的横向生长速率:

$$v = \omega c_e \beta_1 \sigma \tag{2}$$

二维成核速率 J 为:

$$J = B \exp(-\delta\phi_c/kT) \tag{3}$$

临界核的形成能:

$$\delta\phi_c = \pi\omega\alpha^2 h/kT\sigma \tag{4}$$

因子

$$B = \zeta a h Z n_s c_e \nu \exp(-\varepsilon/kT) \tag{5}$$

这里 Zel'dovich 因子 Z 为:

$$Z = kT\sigma^{3/2}/2\gamma \tag{6}$$

晶核的周长 $\zeta = 2\pi\gamma a/kT\sigma$. $\gamma = aah$, 公式(2)中的动力学常数

$$\beta_1 = a \nu \exp(-\varepsilon/kT) \tag{7}$$

因此,

$$B = Z n_s \zeta h c_e \beta_1 \tag{8}$$

将这些公式代入方程(1)中,得:

$$\ln\left(\frac{R}{\sigma^{5/6}}\right) = \ln\{h c_e \beta_1 [\omega^2 \pi a n_s]^{1/3}\} - \frac{\pi\omega\alpha^2 h}{3(kT)^2 \sigma} \tag{9}$$

通过 $\ln\left(\frac{R}{\sigma^{5/6}}\right)$ 对 $\frac{1}{\sigma}$ 作图,求出斜率,就可以得到有效台阶表面能 α .图6是由我们的实验结果而得到的 $\ln\left(\frac{R}{\sigma^{5/6}}\right)$ 对 $\frac{1}{\sigma}$ 关系曲线.直线的斜率为-12.94.

表4 公式(1)~(9)中符号的物理意义

Table 4 Physical meaning of the symbols used from equations (1) to (9)

符号名称	物理意义
R	晶面法向生长速率
J	二维晶核的成核速流通量
S	光滑界面的面积
h	二维晶核的台阶高度
ν	台阶的横向生长速率
ω	溶菌酶晶体晶胞的体积
c_e	溶液的平衡浓度
β_1	动力学常数
σ	过饱和度
α	有效台阶表面能
ϕ_c	临界核的形成能
Z	Zel'dovich 因子
n_s	在表面的蛋白质分子的密度
ζ	晶核的周长
a	相邻分子间的距离
ε	吸附新分子到晶核上的活化能

对于具有 4_3 螺旋结构的聚集体,根据聚集体的特性,选(110)面生长单元的晶胞体积 $\omega = 8 \times 2.97 \times 10^{-20} =$

$2.38 \times 10^{-19} \text{cm}^3$ [29], 二维晶核台阶高度 $h = 5.6 \times 10^{-7} \text{cm}$ [14]. 计算出台阶的有效表面能: $\alpha = 4.01 \times 10^{-8} \text{J} \cdot \text{cm}^{-2}$. 我们的计算工作, 是基于这一假设条件: 溶菌酶晶体(110)面属于二维成核生长机理. 我们与 Nadarajah 等 [29] 的结果进行了比较, 两者十分一致. 结果如表 5 所示.

表 5 有效表面能的计算结果比较

Table 5 Comparison of the effective surface energy

Reference No.	pH	$c_{\text{NaCl}}^a/\%$	$\alpha/(\text{J} \cdot \text{cm}^{-2})$
	4.0	5	5.8×10^{-8}
[29]	4.6	3	5.0×10^{-8}
	5.0	5	2.6×10^{-8}
This paper	4.5	7	4.01×10^{-8}

^a c_{NaCl} : Concentration of NaCl in the solution (g/100 mL).

References

- McPherson, A. *Crystallization of Biological Macromolecules*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, **1999**, pp. 437~450.
- Bi, R. C. *Chin. J. Space Sci.* **1996**, *16*, 208 (in Chinese). (毕汝昌, 空间科学学报, **1996**, *16*, 208.)
- Grant, M. J.; Saville, D. A. *J. Cryst. Growth* **1991**, *1008*, 8.
- DeLucas, L. J.; Smith, C. D.; Carter, D. C.; Twigg, P.; He, X. M.; Snyder, R. S.; Weber, P. C.; Schloss, J. V.; Einspahr, H. M.; Clancy, L. L.; McPherson, A.; Koszelak, S.; Vandonselaar, M. M.; Prasad, L.; Quail, J. W.; Delbaere, L. T.; Bugg, C. E. *Adv. Space Res.* **1992**, *12*, 393.
- Bi, R. C.; Gui, L. L.; Shi, K.; Wang, Y. P.; Chen, S. Z.; Han, Q.; Hu, Y. L.; Shen, F. L.; Niu, X. T.; Hua, Z. Q.; Lu, G. Y.; Zhang, J.; Li, S. L.; Gong, W. M.; Niu, L. W.; Huang, Q. C. *Sci. China, Ser. B* **1993**, *23*, 1153 (in Chinese). (毕汝昌, 桂璐璐, 师珂, 王耀萍, 陈世芝, 韩青, 胡永林, 沈福苓, 牛秀田, 华子千, 卢光莹, 张健, 李松林, 龚为民, 牛立文, 黄其辰, 中国科学 B 辑, **1993**, *23*, 1153.)
- Bhattacharjee, P.; Riahi, D. N. *Microgravity Sci. Technol.* **2003**, *XIV*(4), 36.
- Malkin, A. I.; Chernov, A. A.; Alexeev, I. V. *J. Cryst. Growth* **1989**, *97*, 765.
- Pusey, M.; Naumann, R. *J. Cryst. Growth* **1986**, *76*, 593.
- Gallagher, D. T.; Pan, Q. W.; Gilliland, G. L. *J. Cryst. Growth* **1998**, *193*, 665.
- Nadarajah, A.; Forsythe, E. L.; Pusey, M. L. *J. Cryst. Growth* **1995**, *151*, 163.
- McPherson, A.; Kuznetsov, Y. G.; Malkin, A.; Plomp, M. *J. Struct. Biol.* **2003**, *142*, 32.
- Plomp, M.; McPherson, A.; Malkin, A. *J. Cryst. Growth* **2002**, *237~239*, 306.
- Kuznetsov, Y. G.; Malkin, A. J.; McPherson, A. *J. Cryst. Growth* **2001**, *232*, 114.
- Rong, L.; Yamane, T.; Niimura, N. *J. Cryst. Growth* **2000**, *217*, 161.
- Wiechmann, M.; Enders, O.; Zeilinger, C.; Kolb, H. A. *Ultramicroscopy* **2001**, *86*, 159.
- Li, H. Y.; Nadarajah, A.; Pusey, M. L. *Acta Crystallogr.* **1999**, *D55*, 1036.
- Muhlig, P.; Klupsch, T.; Kaulmann, U.; Hilgenfeld, R. *J. Struct. Biol.* **2003**, *142*, 47.
- Vekilov, P. G.; Ataka, M.; Katsura, T. *J. Cryst. Growth* **1993**, *130*, 317.
- Kuznetsov, Y. G.; Malkin, A. J.; Greenwood, A.; McPherson, A. *J. Cryst. Growth* **1996**, *166*, 913.
- Vekilov, P. G.; Monaco, L. A.; Rosenberger, F. *J. Cryst. Growth* **1995**, *148*, 289.
- Kuznetsov, Y. G.; Malkin, A. J.; Greenwood, A.; McPherson, A. *J. Struct. Biol.* **1995**, *114*, 184.
- Otalora, F.; Novella, M. L.; Gavira, J. A.; Thomas, B. R.; GarciaRuiz, J. M. *Acta Crystallogr.* **2001**, *D57*, 412.
- Duan, L.; Kang, Q.; Hu, W. R.; Li, G. P.; Wang, D. C. *Biophys. Chem.* **2002**, *97*, 189.
- Bessho, Y.; Ataka, M.; Asai, M.; Katsura, T. *Biophys. J.* **1994**, *66*, 310.
- Lin, H.; Rosenberger, F.; Alexander, J. I. D.; Nadarajah, A. *J. Cryst. Growth* **1995**, *151*, 153.
- Savino, R.; Monti, R.; Paterna, D. *Microgravity* **1997**, *7*, 1.
- Qi, J.; Wakayama, N. I. *J. Cryst. Growth* **2000**, *219*, 465.
- Vekilov, P. G.; Alexander, J. I. D.; Rosenberger, F. *Phys. Rev. E* **1996**, *54*, 6650.
- Nadarajah, A.; Li, M.; Pusey, M. L. *Acta Crystallogr.* **1997**, *D53*, 524.
- Li, M.; Nadarajah, A.; Pusey, M. L. *Acta Crystallogr.* **1999**, *D55*, 1012.
- Zhang, K. C.; Zhang, L. H. *The Growth of Crystal*, Science Press, Beijing, **1981**, p. 142 (in Chinese). (张克从, 张乐溥主编, 晶体生长, 科学出版社, 北京, **1981**, p. 142.)

(A0505191 CHENG, B.; ZHENG, G. C.)