

杂质对溶菌酶晶体表面形貌和生长动力学的影响*

戴国亮 刘兴宇 王素静 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 100190)

摘要 采用相差显微镜研究了两种杂质蛋白(荧光标记的溶菌酶和商品溶菌酶中的杂质)对四方溶菌酶晶体表面形貌、 $\{110\}$ 和 $\{101\}$ 表面生长速度以及 $\{110\}$ 面台阶生长动力学的影响. 杂质会影响晶体表面二维生长岛的形貌, 并显著降低晶体 $\{110\}$ 和 $\{101\}$ 面法向生长速度. 杂质会显著降低 $\{110\}$ 表面台阶的生长速度, 且对 $\langle 110 \rangle$ 方向速度的抑制效果显著强于 $\langle 001 \rangle$ 方向. 根据切向台阶速度和过饱和度的关系, 计算得到了台阶动力学系数 β 和台阶的有效表面能及棱边自由能.

关键词 蛋白质结晶; 杂质; 溶菌酶

中图分类号 V524

Influence of Impurity on Surface Morphology and Growth Kinetics of a Lysozyme Crystal

DAI Guoliang LIU Xingyu WANG Sujing KANG Qi HU Wenrui

(National Microgravity Laboratory, Institute of Mechanics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190)

Abstract The influences of impurity on surface morphology and growth kinetics of tetragonal lysozyme crystals were studied. There was a significant difference in morphology of 2D islands on a $\{110\}$ face when the impurities existed. Impurities significantly decreased the normal growth rates of both the $\{110\}$ and $\{101\}$ face. F-lysozyme decreased the normal growth rate of both the $\{110\}$ face and $\{101\}$ face. The values of kinetic coefficient of the steps, surface free energy, and ledge free energy of the step edge were determined.

Key words Protein crystallization, Impurity, Lysozyme

1 引言

为了能够在原子水平上揭示蛋白质作用机制, 需要得到高质量的蛋白质晶体以用于 X 射线结构分析. 20 多年的研究表明, 获得高质量的蛋白质晶体远比获得高质量的小分子化合物晶体要困难得多, 这是前者在组成、结构、表面特征和表面

能等方面的性质更复杂所致^{[1]~[3]}. 另外蛋白溶液的纯度极难达到较高的纯度也是显著影响晶体质量的重要因素之一^{[4],[5]}. 与小分子化合物晶体生长溶液相比, 即使在被认为高纯度的蛋白质晶体生长溶液中, 仍含有大量的杂质^[6].

空间微重力环境由于不存在重力场引起的沉降和对流, 被认为是蛋白质晶体生长的理想环

* 国家自然科学基金项目资助 (20603043, 10432060)

2008-01-23 收到原稿, 2008-04-28 收到修定稿

E-mail: dspr@imech.ac.cn

境^[7]. 微重力环境能够消除晶体表面附近的对流作用, 减弱溶液中杂质分子向晶体表面处的输运, 减少杂质在晶体中的结合, 从而提高晶体的衍射质量^[8]. 但是也有人认为纯扩散质量输运条件控制下晶体的缓慢生长, 将会增加台阶间平台 (inter-step terraces) 的暴露时间, 从而增加杂质在晶体中的结合^[9]. 迄今为止, 在微重力环境下所生长出的蛋白晶体的质量良莠不齐. 这表明目前杂质对蛋白质晶体的生长机制以及生长过程的影响尚不明确, 有待进一步研究.

由于空间实验的代价十分昂贵而且机会非常难得, 因此, 空间实验必然建立在大量、充分的地基实验基础之上. 特别是在地面实验中的一些晶体生长动力学的基本参数, 对于未来空间实验中实验条件的建立、实验方案的选择有着重要的参考价值. 基于此, 我们选择了二种杂质蛋白质, 一种是荧光标记的溶菌酶, 以下简称 F-溶菌酶; 另一种是商品溶菌酶, 其自身含杂质. 通过相差显微镜研究了上述二种杂质存在情况下蛋白质晶体生长动力学和表面形貌的变化, 获得了一些生长动力学的基本参数, 为进一步深入理解微重力环境下蛋白质晶体的生长机制和晶体质量改善的原因奠定了基础.

2 实验部分

2.1 试剂和仪器

商品卵白溶菌酶: 日本 Seikigaku 公司产 (批号为 E96Z04, 经过 6 次重结晶), 纯度为 98.5%. 高纯度溶菌酶: 日本 Maruwa Food Industries 公司产 (批号为 EO2Z04-D), 纯度为 99.99%. F-溶菌酶: 用四甲基罗丹明-5-异硫氰酸盐 (5-TRITC) 进行标记. 缓冲溶液: pH4.5, 50 mmol/L 醋酸盐溶液. 晶体生长溶液中 NaCl 浓度为 25 mg/mL. 实验中所用所有化学试剂纯度均为分析纯级别, 并在使用前经 0.22 μm 的微孔滤膜 (美国 Millipore 公司产) 过滤. IX71 倒置相差显微镜: 日本 OLYMPUS 公司产. 其垂直方向的分辨率为 0.005 μm , 横向分辨率近似为 0.5 μm . 样品池温度控制器的控温精度为 $\pm 0.1^\circ\text{C}$.

2.2 实验方法

溶菌酶籽晶由批量法培养得到. 籽晶的尺寸达到 200~400 μm 后, 将其转移至样品池中, 实验过程中温度控制在 20 $^\circ\text{C}$. 样品池中溶菌酶的浓度

为 40 mg/mL, 其过饱和度 $\sigma = 1.0$. 实验中 F-溶菌酶的浓度分别为 50, 100, 150, 200 nmol/L. 实验过程中可以观察与样品池底面盖玻片平行的晶体 {110} 面. 所有图像均为自动采集, 每 1~5 min 采集 1 幅.

3 结果与讨论

3.1 杂质对晶体 {110} 面二维生长岛形貌的影响

溶液过饱和度 $\sigma = 1$ 时, 四方溶菌酶晶体 {110} 表面为二维成核机制. 通过相差显微镜观察了商品溶菌酶溶液中晶体 {110} 面二维生长岛的形貌.

四方溶菌酶晶体 {110} 面二维生长岛的形状呈现出明显的各向异性, 如图 1 所示. 纯度为 98.5% 溶菌酶溶液中二维生长岛长轴的两头为圆形, 长轴与短轴方向长度的比值近似为 3. 当采用高纯度溶菌酶溶液代替商品级别溶菌酶时, 二维生长岛的形貌变化显著. 长轴与短轴方向长度的比值近似为 5.2. 当在高纯度溶液中加入 200 nmol/L F-溶菌酶时, 二维生长岛形貌的变化介于商品溶菌酶和高纯度溶菌酶两种情况之间. 长轴与短轴方向长度的比值近似为 4.7. 在图 1 中还可以看到在 {110} 面新出现的生长岛. 生长岛可以起源于吸附在表面的杂质颗粒, 如图 1(a) 所示. 当然晶体表面不存在杂质颗粒时, 也可以看到二维生长岛的出现, 如图 1(b) 所示.

3.2 杂质对晶体表面法向生长速度的影响

为了揭示 F-溶菌酶和商品溶菌酶中杂质对晶体生长速度的影响, 我们将四方溶菌酶籽晶分别转移到含 F-溶菌酶的高纯度和商品级别的过饱和溶液中, 采用相差显微镜原位观察了 {110} 面和 {101} 面的生长过程.

杂质 F-溶菌酶对晶体法向生长速度的影响如图 2 所示. 由图 2 可以看出, 加入 50 nmol/L F-溶菌酶 (0.006%, 重量百分比) 后显著降低了 {110} 和 {101} 面的生长速度 (分别为 19% 和 10%). 这说明, 吸附在晶体表面的 F-溶菌酶阻碍了分子间相互作用的形成, 从而降低了晶体法向生长速度. 与高纯度溶菌酶溶液相比, 商品溶菌酶中 {110} 和 {101} 面的生长速度显著降低 (分别为 64% 和 67%, 相关数据在图 2 中没有给出). 商品溶菌酶中杂质对 {101} 面生长速度的影响要大于 {110} 面, 而样

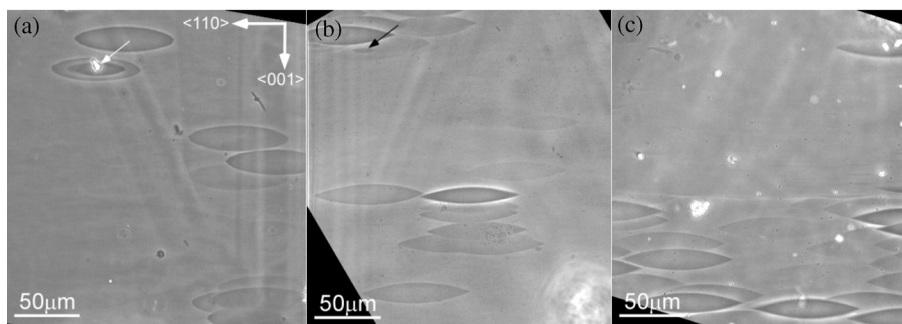


图1 溶菌酶晶体 {110} 表面二维生长岛形貌随生长溶液纯度的变化. (a) 商品溶菌酶溶液, (b) 高纯度溶菌酶, (c) 200 nmol/L F-溶菌酶. 白色箭头指向的是表面吸附的颗粒成为成核中心. 黑色箭头指向的是没有杂质颗粒存在情况下二维生长岛的成核

Fig.1 Morphology of 2D islands on {110} face of lysozyme crystal changed with the purity of lysozyme solution. (a) commercial lysozyme, (b) 99.99% purity, (c) 99.99% purity with 200 nmol/L F-lysozyme. White arrow indicates an adsorbed particle on the surface becoming the center of nucleation. Black arrow shows a growth island nucleated without an impurity particle

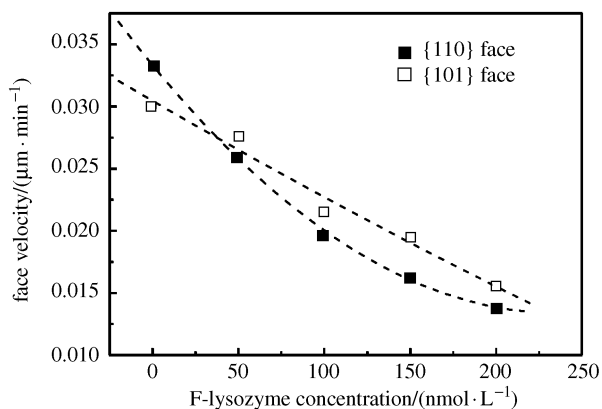


图2 溶菌酶晶体 {110} 面和 {101} 面生长速度随杂质 F-溶菌酶浓度的变化

Fig.2 Growth rates of the Lysozyme crystal {110} face and {101} face as a function of F-lysozyme concentration in solution

品中的主要杂质为共价溶菌酶二聚体和 18 kDa 多肽链^[6]. Nakada 等^[10] 认为二聚体主要吸附在 {101} 面, 而在 {110} 面没有吸附, 18 kDa 多肽链在 {101} 面吸附的量很少. 由此可以推测 {110} 面生长速度的降低主要由于 18 kDa 多肽链在晶体表面的吸附, 而 {101} 面生长速度的降低主要由于共价溶菌酶二聚体. 这些还需要进一步的实验论证.

如图 2 所示, F-溶菌酶对 {110} 面生长速度的影响显著于 {101} 面. Matsui 等^[11] 认为 F-溶菌酶对 {101} 面的影响显著于 {110} 面. 他们实验中

F-溶菌酶的浓度为 0.09%, 远高于我们实验中采用的浓度 (200 nmol/L 相当于 0.0072%, 重量百分比). 仔细分析 {101} 面和 {110} 面生长速度的数据, 可以看出, 随着杂质浓度的增加, {110} 面速度呈曲线下降, 并逐渐趋于平缓; {101} 面速度呈直线下降. 当杂质浓度增加到一定值以后, {101} 面停止生长, 而 {110} 面继续以缓慢的速度生长. 由此可以得出 F-溶菌酶对 {101} 面的影响显著于 {110} 面, 与文献 [11] 的结果一致. 之所以出现这种情况, 推测认为, F-溶菌酶较易吸附于 {110} 面, 即亲和性较高, 但其对生长速度的抑制较弱, {101} 面吸附较弱, 但其对生长速度的抑制较强, 在杂质浓度较低时, 杂质优先吸附在 {110} 面, 从而对 {110} 面生长速度的影响显著于 {101} 面, 杂质浓度较高时, 在 {110} 面吸附的量达到平衡, {101} 面吸附的杂质的量增加, 从而对 {101} 面生长速度的影响显著于 {110} 面.

Kubota 和 Mullin^[12] 提出了一个数学模型来解释杂质对溶液中无机晶体和有机分子晶体生长速度的影响. 该模型的数学表达式如下:

$$R/R_0 = 1 - \lambda\theta_{\text{eq}} = 1 - [\lambda Kx/(1 + Kx)]. \quad (1)$$

其中, R 和 R_0 分别为纯系统和杂质存在情况下晶体生长的速度, λ 为比例因子, θ_{eq} 为杂质在晶体表面的覆盖度, K 为 Langmuir 常数, x 为杂质浓度.

根据式 (1), 我们采用非线性最小二乘法 (NLSF) 对 $\{110\}$ 面和 $\{101\}$ 面生长速度的数据进行了拟合, 结果如图 3 所示. 对于 $\{110\}$ 面, 相对晶面生长速度渐渐趋于 0, 属于 λ 等于 1 的情况, 拟合得到的 λ 和 K 分别为 1.18 和 0.00452 nL/mol ; 对于 $\{101\}$ 面, 相对晶面生长速度随着杂质浓度的增加, 线性下降, 属于 λ 大于 1 的情况, 当 $\lambda \gg 1$ 且 $1 - \lambda Kx > 0$ 时, 式 (1) 可简化为

$$R/R_0 = 1 - \kappa Kx. \quad (2)$$

根据式 (2), 采用非线性最小二乘法拟合得到的 λK 为 0.00257 nL/mol . 由于 $\lambda \gg 1$, 那么 $\{101\}$ 面的 $K < 0.00257 \text{ nL/mol}$, 比 $\{110\}$ 面的 K 值小. 因此对 F-溶菌酶来说, 更容易吸附在 $\{110\}$ 面, 但其对 $\{110\}$ 面生长速度的抑制效果较弱 ($\lambda = 1$). 这一结果表明生长速度的抑制与吸附杂质分子的取向有关; 同时也表明杂质对小分子和大分子晶体生长的抑制具有相似性, 这也验证了本文前面部分提出的假设.

3.3 杂质对晶体表面台阶速度的影响

我们测量了高纯溶菌酶溶液中含杂质和不含杂质分子时, 以及商品溶菌酶溶液中二维生长岛台阶的速度. 图 4 表示不同杂质浓度下台阶速度的变化. 结果表明, 随着杂质 F-溶菌酶浓度的增加, 台阶速度下降; 商品溶菌酶中所含的杂质 (主要为 0.5% 二聚体和 1% 18 kDa 的多肽链)^[6] 对台阶速度的抑制最为显著. 无论 F-溶菌酶, 还是商品

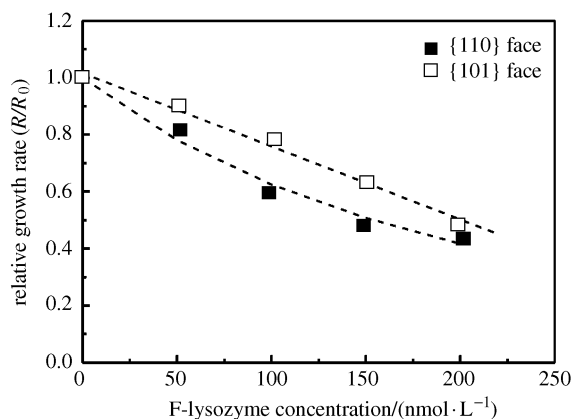


图3 杂质 F-溶菌酶对四方溶菌酶晶体不同晶面相对生长速度的影响

Fig.3 Effects of F-lysozyme on the relative growth rates for the $\{101\}$ face and $\{110\}$ face of a lysozyme crystal

溶菌酶中所含的杂质, 对生长台阶 $\langle 110 \rangle$ 方向速度的抑制效果均显著强于 $\langle 001 \rangle$ 方向. 台阶速度的各向异性, 一个原因可能与蛋白分子在两个结晶学方向沿键链吸附概率的各向异性有关^[13], 杂质存在时, 生长台阶 $\langle 110 \rangle$ 方向和 $\langle 001 \rangle$ 方向生长速度的不同响应, 可能是由于杂质分子在这两个方向上立体阻碍的差异造成的. 另一个原因可能为, 由于各个方向台阶前进的速度与曲折密度近似成比例. $\langle 110 \rangle$ 方向运动速度较快, 表明该方向的曲折密度高于 $\langle 001 \rangle$ 方向, 杂质分子封闭住一部分曲折位点后, 生长速度显著降低, 二维生长岛的两端不可避免地成为圆形. 而对 $\langle 001 \rangle$ 方向而言, 生长的限制因素为新的一维成核的出现. 一维成核指新分子列的部分不可逆地吸附到平坦台阶上^[14]. 假定杂质对一维成核的形成过程影响程度小于台阶在 $\langle 001 \rangle$ 方向的运动. 因此即使在 $\langle 001 \rangle$ 方向曲折位点被封闭的情况下, 由于新的一维成核的形成, 仍然有新曲折位点产生, 致使杂质分子对 $\langle 001 \rangle$ 方向生长速度的影响较小^[15].

台阶的切向速度和溶液过饱和度间的关系为

$$v = \Omega\beta(C - C_e). \quad (3)$$

其中, Ω 为四方晶体中溶菌酶分子的体积^[8] ($3 \times 10^{-20} \text{ cm}^3$), β 为台阶动力学系数, C 和 C_e 分别为溶菌酶的浓度和 20°C 下的平衡浓度 ($C - C_e = 25.6 \text{ mg/mL}$, 即 $1.1 \times 10^{18} \text{ cm}^{-3}$). 由式 (3) 粗略计

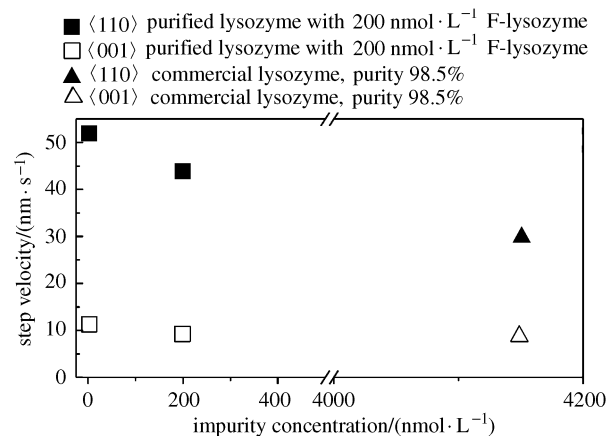


图4 含 F-溶菌酶的高纯溶液和商品溶菌酶溶液中, 四方溶菌酶晶体 $\{110\}$ 面的台阶生长速度

Fig.4 Step velocity on the $\{110\}$ face of lysozyme crystal in commercial lysozyme, high-purity lysozyme and high-purity lysozyme with 200 nmol/L F-lysozyme

算得到的台阶动力学系数见表 1, 结果与 Vekilov 等^[16] 利用 Michelson 干涉仪测量得到的结果十分一致.

表1 不同生长条件下台阶动力学系数的计算结果
Table 1 Calculation results of step kinetic coefficient (β) under different growth conditions

	$\beta_{\langle 110 \rangle}$	$\beta_{\langle 001 \rangle}$
	$(\times 10^{-4} \text{ cm/s})$	
高纯度溶菌酶(99.99%)	1.6	0.34
200 nmol/L F-溶菌酶	1.3	0.28
商品溶菌酶(98.5%)	0.9	0.27

3.4 {110} 面二维成核速度和台阶棱边自由能

{110} 面法向生长速度 R (晶体-溶液界面处的运动速度) 和台阶密度 n , 平均台阶运动速度 v , 以及生长层厚度 h 的关系为

$$R = nvh. \quad (4)$$

二维成核速度 J , 即新二维生长岛在表面出现的速度, 可通过成核机制的相关模型确定. 此处采用最简单的多核生长 (Poly-Nuclear Growth, PNG) 或产生-扩张模型 (birth-and-spread model)^[17], 则生长速度为

$$R = c_1 h (Jv^2)^{1/3}. \quad (5)$$

其中, c_1 为常数, 可由蒙特卡罗模拟法^[18] 得到, $c_1 = 1.4$, 将式 (4) 代入式 (5), 即可得到成核速度,

$$J = \frac{R^3}{1.4^3 h^3 v^2}. \quad (6)$$

由于 {110} 面小台阶为双分子台阶, 因此可以认为二维成核为双层分子. 对经典的成核理论^[19] 进行修正, 可以得到

$$J = C(\ln C/C_e)^{1/2} \exp[-\pi\gamma^2/2(k_B T)^2 \ln(C/C_e)]. \quad (7)$$

其中, k_B , T , γ 分别为 Boltzmann 常数、温度、单分子表面自由能. 单分子表面自由能 γ 与表面自由能 α ($\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$), 棱边自由能 κ ($\text{J}\cdot\text{cm}^{-1}$) 的关系为:

$$\alpha = \frac{2\gamma}{\sqrt{wh}}, \quad (8)$$

$$\kappa = 2\gamma\sqrt{h/w}. \quad (9)$$

其中, w 为溶菌酶晶体晶胞体积, {110} 面生长单元的晶胞体积 $w = 2.38 \times 10^{-19} \text{ cm}^3$; h 为二维晶

核的台阶高度, $h = 5.6 \times 10^{-7} \text{ cm}$ (参见文献 [20] 和 [21]).

由以上各式, 根据高纯度溶菌酶溶液中晶体 {110} 面的法向生长速度和 {110} 方向的平均台阶速度, 计算出了成核速度 J , 台阶的有效表面能 α , 棱边自由能 κ . 结果示于表 2.

表2 有效表面能和棱边自由能的计算结果
Table 2 Calculation results of effective surface energies and ledge free energies

σ	G	$v/$	$J/$	$\alpha/$	$\kappa/$
(nm/s)	($\mu\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	($\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$)	($\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$)	($\text{J}\cdot\text{cm}^{-1}$)	($\text{J}\cdot\text{cm}^{-1}$)
1.0	0.53	51.5	0.12	6.2×10^{-8}	3.5×10^{-14}

这里得到的 α 值与文献 [22] 和 [23] 的结果一致. 文献 [22] 通过分析较高过饱和度范围内的法向生长速度, 得到 $\alpha = 6.2 \times 10^{-8} \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$. 法向生长速度的表达式^{[24]~[26]} 如下:

$$R = K_1 \exp\left(\frac{2\Delta\mu}{3k_B T}\right) \left(\frac{\Delta\mu}{k_B T}\right)^{1/6} \left[\exp\left(\frac{\Delta\mu}{k_B T}\right) - 1\right]^{2/3} \exp\left(-\frac{\pi\gamma^2}{3\Delta\mu k_B T}\right). \quad (10)$$

Driessche 等^[23] 通过计算晶体表面的二维成核速度, 得到 $\alpha = 6.2 \times 10^{-8} \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$, 晶体表面为均一的二维成核. 这也表明在本文实验条件下, 晶体表面同样为均一的二维成核.

对于 {101} 面的台阶有效表面能 α , 可根据高纯度溶菌酶溶液中晶体 {101} 面的法向生长速度, 由式 (10) 计算得到, $\gamma = 3.0 k_B T$ ($K_1 = 1$), 这与文献 [27] 及文献 [22] 的结果一致. 由于 {101} 面为单层二维生长岛, 单分子表面自由能 γ 与表面自由能 α , 棱边自由能 κ 的关系为

$$\alpha = \frac{\gamma}{\sqrt{h\Omega}}, \quad (11)$$

$$\kappa = \gamma\sqrt{h/\Omega}. \quad (12)$$

由式 (11) 和 (12) 计算得到 $\kappa = 1.5 \times 10^{-14} \text{ J}\cdot\text{cm}^{-1}$, $\alpha = 4.3 \times 10^{-8} \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$. $\kappa_{\{110\}} > \kappa_{\{101\}}$ 相应于 {110} 面台阶的高度 (5.6 nm) 大于 {101} 面台阶的高度 (3.4 nm). α 值同样与文献 [23] 的结果吻合, 表明晶体 {101} 表面为均一的二维成核生长机制.

另外, Galkin 等^[28] 测量了四方溶菌酶晶体表面三维成核速度, 得到 $\alpha = 6.4 \times 10^{-8} \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$. 这一结果与我们实验中测得的 {110} 面和 {101} 面

的 α 值非常一致.从以上这些结果可以看出,不管晶体表面生长机制是二维成核还是三维成核,当晶体内部的键相对称时,晶体表面的自由能并没有显著差异.

4 结论

杂质会影响到晶体表面台阶的微观形貌,显著降低晶体 $\{110\}$ 面和 $\{101\}$ 面法向生长速度,且其对 $\{110\}$ 面的影响要大于 $\{101\}$ 面.杂质还会显著降低 $\{110\}$ 表面台阶的生长速度.随着F-溶菌酶浓度的增加,台阶速度显著降低,且对生长台阶 $\langle 110 \rangle$ 方向速度的抑制效果显著强于 $\langle 001 \rangle$ 方向.根据经典的成核理论可以得到高纯度溶液中台阶的有效表面能及台阶棱边自由能.

参考文献

- [1] Burton W K, Cabrera N *et al.* The growth of crystals and equilibrium structure of their surfaces. *Philos. T. R. Soc.*, 1951, **A243**:299~341
- [2] Buckley H E. *Crystal Growth*. New York: John Wiley and Sons, 1951. 243~244
- [3] Boistelle R, Astier J P. Crystallization mechanisms in solution. *J. Cryst. Growth*, 1988, **90**:14~30
- [4] Giegé R, Lorber B *et al.* Crystallogensis of biological macromolecules: facts and perspectives. *Acta Crystallog.*, 1994, **D50**:339~350
- [5] Yoshizaki I, Kadowaki A *et al.* Impurity effects on lysozyme crystal growth. *J. Synchrotron. Radiat.*, 2004, **11**:30~33
- [6] Thomas B R, Vekilov P G *et al.* Heterogeneity determination and purification of commercial hen egg-white lysozyme. *Acta Crystallog.*, 1996, **D52**:776~784
- [7] Bi R C *et al.* Protein crystal growth in microgravity. *Sci. China (B)*, 1993, **23**(11): 1153~1157. in Chinese (毕汝昌等. 微重力下的蛋白质晶体生长. 中国科学(B 辑), 1993, **23** (11):1153~1157)
- [8] Yu Y *et al.* Study on growth mechanism of lysozyme crystal by batch crystallization method. *Acta Chim. Sinica*, 2006, **64**(12):1284~1290. in Chinese (于泳等. 配液结晶法制备溶菌酶蛋白质晶体的生长机理研究. 化学学报, 2006, **64**(12):1284~1290)
- [9] Frank F C. *Growth and Perfection of Crystals*. New York: Wiley, 1958. 411~417
- [10] Nakada T, Sazaki G *et al.* Direct AFM observations of impurity effects on a lysozyme crystal. *J. Cryst. Growth*, 1999, **196**:503~510
- [11] Matsui T, Sazaki G *et al.* Impurity effects of lysozyme molecules specially labeled with a fluorescent reagent on the crystallization of tetragonal and monoclinic lysozyme crystals. *J. Cryst. Growth*, 2006, **293**:415~422
- [12] Kubota N, Mullin J W. A kinetic model for crystal growth from aqueous solution in the presence of impurity. *J. Cryst. Growth*, 1995, **152**:203~208
- [13] Durbin S D, Carlson W E *et al.* In situ studies of protein crystal growth by atomic force microscopy. *J. Phys.*, 1993, **D26**:B128~B132
- [14] Chernov A A, Rashkovich L N *et al.* Kink kinetics, exchange fluxes, 1 D nucleation and adsorption on the (010) face of orthorhombic Lysozyme crystals. *J. Phys. Cond. Matt.*, 1999, **11**:9969~9984
- [15] Dold P, Ono E *et al.* Step velocity in tetragonal lysozyme growth as a function of impurity concentration and mass transport conditions. *J. Cryst. Growth*, 2006, **293**: 102~109
- [16] Vekilov P G, Ataka M *et al.* Growth processes of protein crystals revealed by Michelson interferometry investigation. *Acta Crystallog.*, 1995, **D51**: 207~219
- [17] Wim V S, George H G. Dynamical properties of long wavelength interface fluctuations during nucleation dominated crystal growth. *Phys. Rev.*, 1986, **B33**:4927~4935
- [18] Gilmer G H. Transients in the rate of crystal growth. *J. Cryst. Growth*, 1980, **49**:465~474
- [19] Weeks J D, Gilmer G H. Dynamics of crystal growth. *Adv. Chem. Phys.*, 1979, **40**:157~228
- [20] Nadarajah A, Li M *et al.* Growth mechanism of the (110) face of tetragonal lysozyme crystal. *Acta Cryst.*, 1997, **D53**:524~534
- [21] Rong L, Yamane T *et al.* Measurement and control of the crystal growth rate of tetragonal hen egg-white lysozyme imaged with an atomic force microscope. *J. Cryst. Growth*, 2000, **217**:161~169
- [22] Kazuo K, Satoru M *et al.* Interferometric study on the crystal growth of tetragonal lysozyme crystal. *J. Cryst. Growth*, 1996, **166**:904~908
- [23] Driessche A E S, Sazaki G *et al.* Direct and non-destructive observation of two-dimensional nucleation behavior of protein crystals by advanced optical microscopy. *Cryst. Growth Des.*, 2007, **7**:1980~1987
- [24] Chernov A A. *Crystal Growth*. Berlin: Springer, 1984. 127~128
- [25] Malkin A I, Chernov A A *et al.* Growth of dipyramidial face of dislocation-free ADP crystals: free energy of steps. *J. Cryst. Growth*, 1989, **97**:765~769
- [26] Chernov A A, Komatsu H. *Science and Technology of Crystal Growth*. Dordrecht: Kluwer, 1995. 67~68
- [27] Durbin S D, Feher G. Crystal growth studies of lysozyme as a model for protein crystallization. *J. Cryst. Growth*, 1986, **76**:583~592
- [28] Galkin O, Vekilov P G. Are nucleation kinetics of protein crystals similar to those of liquid droplets. *J. Ame. Chem. Soc.*, 2000, **122**:156~163