

综述

杂质对蛋白质晶体影响研究进展*

刘兴宇 戴国亮** 王素静

(中国科学院力学研究所国家微重力实验室 北京 100080)

摘要 综述了杂质对蛋白质晶体生长影响研究领域的进展情况,对可能的杂质来源以及杂质对结晶过程的影响进行了介绍,重点介绍了和结晶蛋白质分子结构相似的杂质分子的影响,包括晶体成核、生长形态、表面形貌、生长动力学、质量等,以及杂质在晶体中的重新分配。

关键词 蛋白质晶体生长 杂质 影响

中图分类号 Q51

作为生物学、医学、生物技术以及其他有关生物大分子新应用领域的重要组成部分——蛋白分子的三维结构——能够在原子水平上揭示蛋白质作用机制。而蛋白质结晶是通过 X 射线晶体学进行结构分析的第一步,目前虽然 X 射线源、数据的采集和分析方法、分子表达系统都得到了很快的发展,但结构解析的速度仍远落后于可用于研究的新分子的产生速度,结构分析最大的障碍在于高质量晶体的获得,因此蛋白质晶体的“质量”或结晶性是一种非常重要的性质^[1~3]。结晶的成功与否很大程度上取决于蛋白质的纯度,同时,蛋白溶液的纯度也是显著影响晶体和衍射质量的重要因素之一^[4,5]。与无机晶体生长溶液相比,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]。

在结晶蛋白溶液中存在的杂质主要有两类:小分子和大分子杂质。小分子杂质主要来源于缓冲盐溶液和沉淀剂;大分子杂质来源复杂,种类繁多,包括结构上相关的遗传变异体、翻译后修饰产生的遗传变异体(如去糖基化和脱酰胺作用后的产物)、同分异构体、部分变性的蛋白质和二聚蛋白分子等;以及结构上不相关的蛋白^[7]。

虽然大多数杂质均可以通过常规的纯化手段除去

或者在结晶过程中被生长着的固相排斥在外,从而对晶相产物起到纯化作用^[8],但是对于与结晶蛋白分子结构相关的杂质分子而言,由于其结构和物理性质与结晶蛋白分子相似,加之目前纯化技术的限制,它们的分离非常困难^[9],使得这类杂质分子成为影响蛋白质晶体完整性的主要杂质之一^[10,11]。杂质吸附在固相表面或者结合进入其中,必然会对晶体生长产生显著影响,这也是晶体实验重复性差的重要原因^[7,12~21]。由于晶体生长过程中杂质存在的不可避免性,从而寻求杂质存在情况下晶体生长的优化措施成为蛋白质晶体生长研究中的核心问题之一,因此理解杂质是如何影响晶体的形态、质量和生长动力学,特别是如何弱化杂质效应对措施的形成是十分必要的。

目前,就结构类似杂质存在情况下的蛋白质结晶过程开展了大量的研究。结果表明,杂质的影响是多方面的,包括晶体成核、生长形态、生长动力学及质量等。研究中常采用溶菌酶(HEWL)作为模型蛋白^[22,23], (去)铁蛋白、胰岛素等也偶尔被用作模型蛋白^[24,25]。科学研究是一个从宏观到微观循序渐进的过程,为便于较全面和系统地介绍该领域的研究内容和最新进展,本文也将从宏观——亚微观——微观角度综述杂质对蛋白质晶体影响的研究。

1 宏观水平上杂质的影响

此类研究主要涵盖了晶体数目、生长形态、面生长

收稿日期:2007-09-04 修回日期:2007-11-05

*国家自然科学基金资助项目(20603043, 10432060)

**通讯作者,电子信箱:dspr@imech.ac.cn

速度、晶体质量及杂质在晶体中的重新分配等方面。研究结果对于理解杂质的作用机制以及提高晶体质量有一定的指导意义。

1.1 晶体数目

对晶体数目的研究,主要是围绕杂质对晶体成核的影响开展的。实验结果表明,将结构相近的杂质加入到 HEWL 晶体生长溶液中,杂质显著抑制了 HEWL 晶体的成核,从而降低了最终晶体数量^[2,9,16,18,26]。但不同蛋白质的情况不尽相同,对去铁铁蛋白晶体而言,其三聚体的存在促进了晶体的成核,使得最终生长出的晶体的数目增加^[27]。

1.2 生长形态

当杂质和基体材料的结构相近时,生长过程中晶体表面分子识别过程将发生改变。由于不同晶面的结合能不同,与杂质的作用也将发生变化,导致晶体生长形态的改变或对称性的降低。如,以火鸡卵白溶菌酶 (TEWL) 和 HEWL 互相作为杂质的体系, HEWL 作为杂质时引起了 TEWL 晶体沿 *c* 轴的缩短^[16,18,19]; 而 TEWL 作为杂质时 HEWL 晶体均沿 *c* 轴延长^[2,18]。这种晶体形态学上的变化可能是由于 HEWL 和 TEWL 分子沿四方 HEWL 晶体 [110] 方向结构上的差异引起的^[2]。而杂质的浓度决定了变短/长的效应。当蛋白溶液的浓度较低时,晶体长宽比没有实质上变化; 而当溶液的浓度较高时,晶体长宽比随着杂质浓度的增加而显著增加或下降。

1.3 面生长速度

杂质对晶面生长速度有很大的影响,但不同面生长速度所受的影响程度不尽相同^[20]。同一杂质对不同晶型的晶面生长速度的影响也不相同。如,以嫁接了罗丹明的 HEWL 分子作为杂质的 HEWL 生长体系中,杂质分子会显著降低四方晶型 HEWL 晶体的面生长速度,且 {101} 面比 {110} 面更易受影响; 而对单斜晶型的 HEWL 晶体却不明显^[9]。本研究组采用高分辨率的相差显微镜研究了四方 HEWL 晶体 {110} 面和 {101} 面生长速度随上述杂质 (为简明起见,下文统一采用 F 溶菌酶表示) 浓度的变化情况,我们的结果显示,杂质对 {110} 面的影响大于 {101} 面,结果如图 1 所示。与上述结果不同^[9],我们推测可能是由于实验中杂质浓度较小的原因造成的,结合 Kubota—Mullin 模型^[28]做出了定量解释,即,对于 {110} 面,相对晶面生长速度渐渐趋于 0,属于等于 1 的情况,拟合得到的 K (其中 K 为比例因子, K 为 Langmuir 常数) 分别为

1.18 和 0.00452 nM^{-1} ; 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,属于大于 1 的情况,对上述杂质来说,更容易吸附在 {110} 面 (K 值较大),但其对 {110} 面生长速度的抑制效果较弱 (K 值较小)。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。随着杂质浓度的增加, {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。

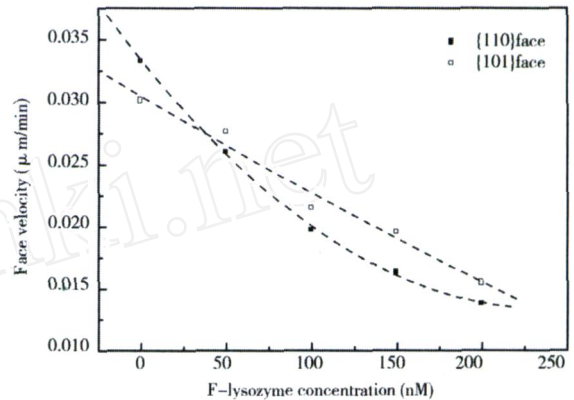


图 1 溶菌酶晶体 {110} 面和 {101} 面生长速度随杂质 F 溶菌酶浓度的变化

Fig 1 Growth rates of the lysozyme crystal {110} face and {101} face as a function of F-lysozyme concentration in solution

1.4 晶体质量

蛋白质晶体中大量杂质的结合会显著降低晶体质量,引起位错和裂缝,形成孪晶、多晶以及无定形沉淀和降低晶体的 Mosaicity 和衍射分辨率^[5,7,16,19,29~31]。为了获得高质量晶体,杂质对蛋白质晶体质量的影响近来得到了研究人员的重视。此研究有助于获得高质量的晶体,如,利用快速凝胶过滤蛋白液相色谱等方法除杂后,规则形状晶体的比例增加,衍射数据和晶体质量显著提高^[6,14,15,18,26,27,32]。此外,结构相近和不相近的杂质 (比如 HEWL 二聚体和卵转铁球蛋白) 均可导致 HEWL 晶体的摇摆曲线的全宽半峰 (FWHM) 值比纯晶体的大。结构不相近的杂质主要对晶核有影响,对于这类杂质,可以在其含杂质的溶液中使用纯籽晶而得到质量较好的晶体^[12,13]。而对于如何弱化结构相关的杂质的负面影响,目前还没有有效的措施。

2 亚微观水平上杂质的影响

为了在更深层次上理解杂质对晶体的宏观影响,

最近 10年来有关杂质对蛋白质晶体生长的研究主要集中在亚微观层面上,研究人员采用 AFM 和高级光学显微技术对晶体表面形貌、台阶速率、缺陷及杂质分配系数等进行了研究。Durbin 等^[33,34]在 1992 年利用 AFM 成功观察了四方 HEWL 晶体表面,他们观察到二维生长岛的成核——铺开——合并和螺旋位错。目前 AFM 是原位研究蛋白质晶体表面形貌和生长动力学最为常用的手段,其具有高分辨率、可原位观察的特点。但也易扰动晶体,悬臂的影响很难消除。不易控制溶液的温度和蒸发,观察区域相对较小。光学观察技术是另一种发展潜力非常广阔的研究方法,其不会损坏或干扰晶体表面,而且溶液的温度和蒸发很容易控制,垂直方向的分辨率较高(小于 1 nm),是 AFM 的一个有力的补充。

2.1 表面形貌

原位观察晶体表面形貌对于理解蛋白晶体生长过程是必须的。这有助于根据表面形貌的变化推断出杂质在生长过程中如何在表面吸附,以及哪些区域属于杂质的富集区。同时从对不同晶型晶体所受影响的对比分析还可以获得杂质分子与晶体分子相互作用的情况。研究大都围绕模型蛋白 HEWL 展开。

2.1.1 HEWL 四方晶体 蛋白质纯度不同会影响到 {110} 面 2D 生长岛的形貌。将高纯度 HEWL 和商品化的 HEWL (所含杂质主要是 18 kDa 多肽链和 HEWL 二聚体,纯度 98.5%)^[6]做对比。在高纯度 HEWL 溶液中,生长岛为具有尖头的棱镜形状;商品化 HEWL 溶液中生长岛为圆形。生长岛形貌的变化还取决于质量运输条件,在扩散运输条件下,商品化 HEWL 生长出的晶体表面生长岛的形状类似于高纯度 HEWL 溶液中的情形^[23]。在高纯度 HEWL 溶液中人为添加一定浓度的 HEWL 二聚体作为杂质,研究发现杂质浓度较低时 {110} 面没有明显变化,但浓度较高时台阶起毛,二维成核增加; {101} 面生长台阶非常粗糙,表面覆盖了大量的小颗粒,杂质粒子随机吸附在平台 (terrace) 上而不是优先吸附在特殊位点,如台阶 (step) 边缘上^[5,35]。杂质颗粒密度随二聚体的浓度增加而非线性增加,这表明二聚体杂质并不仅仅以自身吸附上去,而是伴随着一些反应的吸附,比如聚集^[35]。

2.1.2 HEWL 正交晶体 Matsuzuki 等^[36]研究了商品化 HEWL 中杂质 (主要是 18 kDa 多肽链和 HEWL 二聚体) 对正交晶型 HEWL 晶体表面形貌的影响。纯化过的溶液中正交晶的 {110} 面含有线状的台阶,未纯化

过的溶液中晶体表面绝大多数的线状的边缘变成不规则的圆形。

2.1.3 HEWL 三斜晶体 由于不同晶型的晶体其表面形貌受杂质的影响不尽相同,有研究工作从杂质与晶体分子相互作用的角度出发分析了由于相互作用位点的不同而造成生长情况的不同。如 Maurits 等^[37]对三斜晶 HEWL 硝酸盐晶体 {001} 面研究发现由于商品化 HEWL 中杂质的约束台阶形状变成锯齿状。

2.2 台阶生长速率

台阶生长速度的研究直接与晶体生长的微观动力学挂钩,是获得有无杂质条件下生长动力学变化的最直接的研究手段。

对四方 HEWL 晶体 {101} 面生长过程的研究表明:过饱和度较低时,生长不可避免地受到一些杂质分子的影响,杂质分子强烈吸附在台阶间 (平台) 的晶体表面上,阻碍台阶运动,有时甚至会导致生长停止^[29]。随着过饱和度增加,临界二维成核的半径减小和台阶能够通过杂质颗粒间隙,导致台阶动力学系数的降低及台阶速度、法向生长速度的超线性增加。当过饱和度较高时生长过程由纯 HEWL 的动力学决定^[22,38]。对四方 HEWL 晶体 {110} 面的研究发现,随着杂质比如二聚体浓度的增加,台阶速率下降^[21,35], <110> 方向的台阶速率更易受杂质的影响。晶体的上下表面分别处于对流和扩散质量运输条件下,商品化 HEWL 溶液中扩散质量运输条件下台阶的速度显著高于对流条件下的速率,而高纯度溶液中,台阶速率并没有因为运输条件的不同而发生变化^[23]。对流存在情况下抑制生长的杂质向界面处的流动运输增强,降低了台阶生长速度^[39,40]。

研究人员进一步研究了杂质对 HEWL 正交晶 {110} 面的生长动力学的影响,由于杂质的存在 {110} 面沿 <001> 和 <001> 方向台阶前进的速度显著降低 (<50%), 垂直于 c 轴方向的速度也有相同程度的降低。原因为 HEWL 二聚体对台阶的约束效应。另外其他种类的杂质吸附到扭折位点达到一定时间后也会降低扭折形成速度从而降低台阶速度。沿 <110> 和 <110> 方向运动的台阶的不同响应可能是由于一些杂质立体阻碍效应的不同。<110> 方向台阶的速度没有随着过饱和度的增加而增加^[36]。在四方 HEWL 晶体 {101} 面也出现过类似的台阶速度非单调性质^[21]。

2.3 缺陷

通过由杂质产生的晶体缺陷来研究晶体质量受到

的影响逐渐成为此类研究的新兴的研究方向。在无机材料研究中常采用的蚀刻图像法,可以很容易基于蚀刻坑的形状和密度确定无机晶体中缺陷的类型。此法直到 1993 年才初步得以在蛋白质晶体的研究采用。Monaco 等采用光学显微镜研究了四方 HEWL 晶体的形貌和溶解动力学^[29],并且在 {110} 面第一次观察到沿 [-110] 方向延长的蚀刻坑,但由于分辨率的限制无法确定蚀刻坑的形状和密度。最近, Hondoh 等^[41,42]采用一种新的固定技术——聚氨基甲酸酯覆盖的玻璃片来防止蚀刻过程中晶体的脱落,使得 AFM 得以在此类研究中发挥重要的作用。晶体分别在高纯 HEWL 溶液和商品化 HEWL 溶液中生长一定时间,然后升温蚀刻。他们在 HEWL 晶体 {110} 面观察到三种类型的侵蚀坑:平底,“深”平底和尖端蚀坑。含杂质晶体的“深”平底蚀刻坑的密度随过饱和度增加而增加,而纯晶体上的蚀刻坑的密度几乎为常数。含杂质晶体中平底蚀坑的主要来源是杂质;“深”平底蚀坑的起源是杂质诱发的线缺陷。形成平底蚀坑所需要的溶液不饱和度比形成深平底蚀坑所需要的不饱和度低,这表明平底蚀坑引起的应变比深平底蚀坑大。深平底蚀坑的位置不受平底蚀坑的影响。

本研究组最近开展了光学方法对杂质 (F 溶菌酶) 引起的晶体蚀刻坑的研究。初步结果表明蚀刻坑的数密度在商品化 HEWL 和高纯度 HEWL 晶体表面存在一个数量级的差异,结果如图 2 所示,而且蚀刻坑的数密度和分布随杂质浓度而变化,其变化规律符合 Tanahashi 等^[43]给出的点缺陷密度和杂质浓度间的关系,结果如图 3 所示。由于晶体表面的溶解过程为生长过程的逆过程,而晶体表面平底蚀刻坑的来源为溶液中的杂质,因此由蚀刻坑密度随杂质浓度的变化,随着杂质浓度的增加,晶体中结合的数量非线性增加,我们可以推测杂质在晶体中的结合情况。类似于溶菌酶晶体 {101} 面二聚体颗粒的吸附^[35]。这就表明杂质并不仅仅以其单分子的形式吸附到晶体表面,而是伴随着某些反应,比如聚集。进而,我们对溶菌酶晶体 {110} 面生长速度和平底蚀刻坑密度间的关系进行了探讨。平底蚀刻坑密度,亦即晶体中结合的杂质的含量随着晶体 {110} 面法向生长速度的增加而下降。这里的结果可借助小分子晶体生长过程中杂质结合模型得到解释:平衡吸附模型^[44]和 Bruton-Prim-Slichter 模型^[45]。另外不同生长层杂质的结合情况也可通过蚀刻坑的数密度和分布随时间的变化推断出来。这既解决

了 AFM 观测过程中对样品的干扰,也避免了荧光显微镜对观测样品的苛刻要求(详见后文)。采用此方法的研究工作目前仍在进行中。

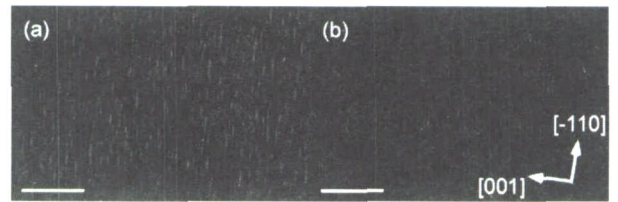


图 2 通过相差显微镜观察的溶菌酶晶体 {110} 面蚀刻后的形貌图

(a) 商品溶菌酶 (纯度 98.5%) (b) 高纯度溶菌酶 (纯度 99.99%) 生长条件: 溶菌酶溶液均为 40mg/ml, F 溶菌酶: 100nM, NaCl: 25mg/ml; HAc-NaAc 缓冲溶液: 50mM (pH4.5); 蚀刻温度: 33; 图中标尺: 50 μ m

Fig 2 Photomicrographs of the morphology of etch pits on {110} face of tetragonal lysozyme crystals taken by phase contrast microscopy

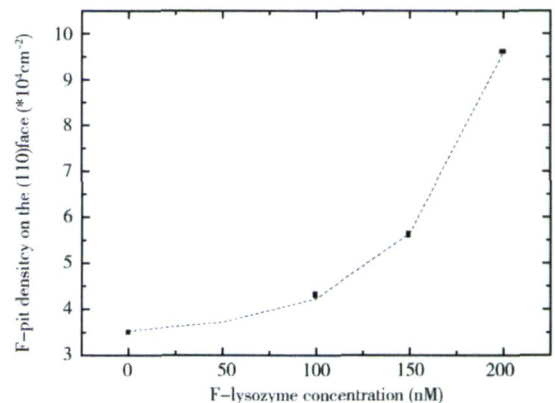


图 3 溶菌酶晶体 {110} 表面平底蚀刻坑密度随 F-lysozyme 浓度变化关系曲线

Fig 3 The density of flat etch pits on {110} face of tetragonal lysozyme crystals as a function of F-lysozyme concentration in solution

2.4 杂质在晶体中的重新分配

结晶过程中杂质在晶体中的重新分配会在晶体中产生应变和缺陷,从而降低晶体质量。对杂质重新分配现象的研究,有助于揭示杂质在晶体中的结合机制、控制杂质在晶体中的数量并获得高质量晶体。Vekilov 等对晶体中结合的无机杂质(沉淀剂)进行了定量研究,发现从杂质溶液中长出的 HEWL 晶体中盐和杂质富含区的中心直径约为 40 μ m,其上结合的盐浓度比后来生长部分要大得多^[31]。研究人员采用高效液相色谱

谱、电泳、电喷雾电离质谱、紫外分光光度计等^[12, 14, 16, 26, 27, 31, 39, 46~48]对晶体中大分子杂质的重新分配进行了研究,结果表明结构上相关的杂质在晶体中大量结合,而不相关的杂质被生长出的晶体排斥在外。但由于上述方法对杂质的重新分配仅能得到定性结果,而且不能实时原位观察,某些方法还需要大尺寸的晶体,因此,在此基础上,开展了荧光方法对杂质重新分配的研究^[11, 12]。通过在 HEWL 晶体生长溶液中加入不同杂质,发现不同杂质在晶体中优先结合的位置不同。杂质的荧光强度反映出结合进入 HEWL 晶体中杂质的浓度。该方法可定量得到晶体中局部杂质的精确浓度和不同生长条件下同一晶体中杂质的浓度。但这种方法的不足在于晶体的厚度必须始终保持一致,因为所检测得到的荧光强度为整个晶体中的总强度。近一、二年,在荧光法的基础上,利用共聚焦激光扫描显微镜沿 Z 轴方向高分辨率的特性,开发了荧光显微镜和共聚焦激光扫描显微镜联用设备,可非破坏性地原位研究晶体中杂质的重新分配^[49]。采用此方法得到的图像非常清晰,而且可以三维重构。但此法要求较苛刻,如必须在同一结晶学方向延 Z 轴在相同的聚焦点观察晶体,整个观察过程中都必须对晶体中心平面观察以便分析总的杂质含量。因此这种观察方法不适合研究通过悬滴法生长的晶体。在此基础上, Yoshikazu 等^[49]发展了一种埋入法来分析蛋白晶体内部杂质的分布。将含荧光标记的杂质用戊二醛固定和树脂包埋,在生长出晶体后将晶体切片后用共聚焦激光显微镜观察。由于切片内晶体结构保持生长时的状态,因此通过不同的切片可推断出整个晶体内部杂质的分布。此方法的优点是,由于戊二醛主要和丝氨酸残基反应,包埋法可广泛用于几乎所有含丝氨酸残基的蛋白晶体。

3 微观水平上杂质的影响

微观研究能有助于更深刻了解杂质产生影响的机理。扫描探针技术的发展,已经使得对溶液中蛋白晶体生长表面在分子和亚分子水平上成像成为可能,这些研究提供了有关生长台阶和表面点缺陷分子结构的初步定性结果^[50, 51]。Konnert 等^[52]在蛋白晶体表面第一次观察到单个分子特征并尝试性地确定了晶体表面结构。随后在分子水平上研究人员研究了导致相对完整蛋白质晶体的机制^[51, 53~56],但对于杂质导致的缺陷形成过程研究较少^[57~60]。

Yau 等^[25, 61]利用 ARM 研究了铁蛋白结晶过程中微观不均一性杂质导致缺陷形成的分子机制,发现晶体表面含有三种类型的缺陷:单个分子位点空位,三空位和含二聚体的三空位。此外空的和含聚集体的三空位会在下一生长层产生单个空位和三空位,单个的空位通常在下一层中复制。“空位柱”可通过结合一个分子而终止。这些“烟状的”空腔的平均长度大约为 5 个晶体层。空位周围的分子从它们的结晶学位点移动了大约 0.1 个分子大小,移动拉紧了晶格,从而在晶体大于 200 μm 时,积累的应变通过塑性变形分解,晶体分裂成大小为 20 ~ 50 μm 的马赛克块,马赛克出现的临界大小近似为 200 μm 。该临界值和去铁铁蛋白类似^[27],并且非常接近于 HEWL 的值^[11]。另外他们还证明了采用 ARM 端头单分子操纵可以将缺陷复原为正常的晶格。

另外,值得一提的是近年来发展起来的全内反射荧光显微观察技术 (TRFM)。将杂质分子进行荧光标记,就可以追踪杂质分子的运动过程,这在分子水平上研究杂质的吸附和结合动力学,揭示杂质的作用机制奠定了基础,可以预见该方法在不久的将来将会得到越来越广泛的应用^[62, 63]。

4 总结与展望

综上所述,研究人员就结构相近的杂质对蛋白质晶体的影响在宏观、亚微观和微观水平上进行了多方面的研究,得到了很多重要的、具有启发性的结论。但绝大多数研究还停留在宏观和亚微观水平。由于蛋白质晶体生长条件不易摸索且生长过程比较复杂,加之目前研究技术和方法的局限性,大部分研究还主要停留在定性阶段,定量的研究还很少。另外,杂质对晶体质量的影响,尤其是缺陷形成的研究还没有深入进行。从现有的文献来看,关注较多的是球蛋白,包括 HEWL、胰岛素和(去铁)铁蛋白晶体结晶过程中结构上相关杂质的影响,包括形态、生长动力学、质量等,而没有涉及纤维状蛋白和膜蛋白的相关研究。单就 HEWL 晶体而言,杂质对 HEWL 晶体影响的研究还主要集中在四方晶习,对其他晶习比如正交、单斜、三斜晶等的研究较少。

从蛋白晶体生长的研究进程来说,不断与其他学科交叉,借鉴和吸收其他研究领域的一些概念和方法,才能获得进一步发展的动力。比如应用光散射和胶体科学探索蛋白溶液中分子间的相互作用和晶体成

核^[64];运用流体动力学方法来描述晶体生长溶液中对流扩散供给场^[65];蛋白质工程领域的位点突变和化学修饰方法来揭示微观不均一性杂质的作用机制^[9];将传统的剪切和抛光加工并与交联技术结合起来研究晶体内部荧光杂质的分布^[49];首先用于无机晶体和表面科学研究的干涉和扫描探针技术可以在分子水平上揭示蛋白晶体生长过程^[38,66,67];再比如,将材料科学研究中经常使用的急速降温和退火应用到蛋白质晶体研究中,促进晶体质量的提高,在晶体中形成较大的堆积良好的区域^[68];还有采用材料科学研究中的压痕方法研究蛋白质晶体的维氏硬度^[69,70]等等。总之,随着学科间的交叉渗透和研究的深入,必将有助于在分子水平上进一步从不同角度揭示杂质的作用机制,寻求蛋白质晶体生长的优化措施和方法,生长出可用于结构解析的高质量晶体,为理解蛋白质分子的功能和作用机制奠定基础。

参考文献

- [1] Caylor C L, Dobrianov I, Kimmer C, et al Two-photon fluorescence imaging of impurity distributions in protein crystals *Phys Rev E*, 1999, 59: R3831 ~ R3834
- [2] Bhamidi V, Hanson B L, Edmundson A, et al The influence of a homologous protein impurity on lysozyme crystal growth *Journal of Crystal Growth*, 1999, 204 (4): 542 ~ 552
- [3] Durbin S D, Fether G Protein crystallization *Annual Review of Physical Chemistry*, 1996, 44: 171 ~ 204
- [4] Giegé R, Lorber B, Thöbald-Dietrich A. Crystallogenes of biological macromolecules: facts and perspectives *Acta Cryst D*, 1994, 50: 339 ~ 350
- [5] Yoshizaki I, Kadowaki A, Imura Y, et al Impurity effects on lysozyme crystal growth *J. Synchrotron Rad*, 2004, 11: 30 ~ 33
- [6] Thomas B R, Vekilov P G, Rosenberger F. Heterogeneity determination and purification of commercial hen egg-white lysozyme *Acta Cryst D*, 1996, 52: 776 ~ 784
- [7] Lorber B, Skouri M, Munch J P, et al The influence of impurities on protein crystallization: the case of lysozyme *Journal of Crystal Growth*, 1993, 128: 1203 ~ 1211
- [8] Yoshikazu I, Izumi Y, Hirohiko N, et al Development of fluorescence label and confocal laser scanning microscopy method for non-destructive local impurity distribution analysis in protein crystals *Jpn J Appl Phys*, 2003, 42: 5831 ~ 5836
- [9] Matsui T, Sasaki G, Hondoh H, et al Impurity effects of lysozyme molecules specifically labeled with a fluorescent reagent on the crystallization of tetragonal and monoclinic lysozyme crystals *Journal of Crystal Growth*, 2006, 293: 415 ~ 422
- [10] McPherson A, Malkin A J, Kuznetsov Yu G, et al Incorporation of impurities into macromolecular crystals *Journal of Crystal Growth*, 1996, 168: 74 ~ 92
- [11] Chemov A A. Estimates of internal stress and related mosaicity in solution grown crystals: proteins *Journal of Crystal Growth*, 1999, 196: 524 ~ 534
- [12] Caylor C L, Dobrianov I, Lenay S G, et al Macromolecular impurities and disorder in protein crystals *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, 1999, 36: 270 ~ 281
- [13] Dobrianov I, Caylor C, Lenay S G, et al X-ray diffraction studies of protein crystal disorder *Journal of Crystal Growth*, 1999, 196: 511 ~ 523
- [14] Skouri M, Lorber B, Giegé R, et al Effect of macromolecular impurities on lysozyme solubility and crystallizability: dynamic light scattering, phase diagram, and crystal growth studies *Journal of Crystal Growth*, 1995, 152: 209 ~ 220
- [15] Ewing F L, Forsythe E L, Woerd Mark van der, et al Effects of purification on the crystallization of lysozyme *Journal of Crystal Growth*, 1996, 160: 389 ~ 397
- [16] Abergel C, Nesa M P, Fontecilla-Camps J C. The effect of protein contaminants on the crystallization of turkey egg white lysozyme *Journal of Crystal Growth*, 1991, 110: 11 ~ 19
- [17] Vekilov P G, Monaco L A, Rosenberger F. Facet morphology response to nonuniformities in nutrient and impurity supply. I. Experiments and interpretation *Journal of Crystal Growth*, 1995, 156: 267 ~ 278
- [18] Provost K, Robert M C. Crystal growth of lysozymes in media contaminated by parent molecules: influence of gelled media *Journal of Crystal Growth*, 1995, 156: 112 ~ 120
- [19] Hirschler J, Fontecilla-Camps J C. Contaminant effects on protein crystal morphology in different growth environments *Acta Cryst D*, 1996, 52: 806 ~ 812
- [20] Hirschler J, Fontecilla-Camps J C. Protein crystal growth rates are face-specifically modified by structurally related contaminants *Journal of Crystal Growth*, 1997, 171: 559 ~ 565
- [21] Vekilov P G, Rosenberger F. Dependence of lysozyme growth kinetics on step sources and impurities *Journal of Crystal Growth*, 1996, 158: 540 ~ 551
- [22] Vekilov P G, Ataka M, Katsura T. Growth process of protein crystals revealed by laser Michelson interferometry investigation *Acta Cryst D*, 1995, 51: 207 ~ 219
- [23] Dold P, Ono E, Tsukamoto K, et al Step velocity in tetragonal lysozyme growth as a function of impurity concentration and

- mass transport conditions *Journal of Crystal Growth*, 2006, 293: 102 ~ 109
- [24] Yip C M, Brader M L, DeFelippis M R, et al Atomic force microscopy of crystalline insulins: the influence of sequence variation on crystallization and interfacial structure. *Biophys J*, 1998, 74: 2199 ~ 2209
- [25] Yau S T, Thomas B R, Vekilov P G Real time, in-situ, monitoring of apoferritin crystallization and defect formation with molecular resolution *Journal of Crystal Growth*, 2001, 232: 188 ~ 194
- [26] Thomas B R, Vekilov P G, Rosenberger F Effects of Microheterogeneity in hen egg-white lysozyme crystallization *Acta Cryst D*, 1998, 54: 226 ~ 236
- [27] Thomas B R, Carter D, Rosenberger F Effect of microheterogeneity on horse spleen apoferritin crystallization *Journal of Crystal Growth*, 1998, 187: 499 ~ 510
- [28] Kubota Noriaki, Mullin J W. A kinetic model for crystal growth from aqueous solution in the presence of impurity. *J Crystal Growth*, 1995, 152: 203 ~ 208
- [29] Monaco Lisa A, Rosenberger Franz Growth and etching kinetics of tetragonal lysozyme *Journal of Crystal Growth*, 1993, 129: 465 ~ 484
- [30] Hirschler J, Halgand F, Forest E, et al Contaminant inclusion into protein crystals analyzed by electrospray mass spectrometry and X-ray crystallography. *Protein Sci*, 1998, 7: 185 ~ 192
- [31] Vekilov P G, Monaco L A, Thomas B R, et al Repartitioning of NaCl and protein impurities in lysozyme crystallization *Acta Cryst D*, 1996, 52: 785 ~ 798
- [32] Moreno A, Thóbald-Dietrich A, Lorber B, et al Effects of macromolecular impurities and of crystallization method on the quality of eubacterial aspartyl-tRNA synthetase crystals *Acta Cryst D*, 2005, 61: 789 ~ 792
- [33] Durbin S D, Carlson W E Lysozyme crystal growth studied by atomic force microscopy. *Journal of Crystal Growth*, 1992, 122: 71 ~ 79
- [34] Durbin S D, Carlson W E, Saros M T In situ studies of protein crystal growth by atomic force microscopy. *J Phys D: Appl Phys*, 1993, 26: B128 ~ B132
- [35] Nakada T, Sazaki G, Miyashita S, et al Direct AFM observations of impurity effects on a lysozyme crystal *Journal of Crystal Growth*, 1999, 196: 503 ~ 510
- [36] Matsuzuki Y, Kubota T, Liu X Y, et al AFM observation of the surface morphology and impurity effects on orthorhombic hen egg-white lysozyme crystals *Journal of Crystal Growth*, 2002, 242: 199 ~ 208
- [37] Maurits C, Heijna R, Patrick B P, et al An atomic force microscopy study of the (001) surface of triclinic hen egg-white lysozyme crystals *Crystal Growth & Design*, 2006, 6 (5): 1206 ~ 1213
- [38] Vekilov P G, Ataka M, Katsura T Laser Michelson interferometry investigation of protein crystal growth *Journal of Crystal Growth*, 1993, 130: 317 ~ 320
- [39] Carter D C, Lin K, Ho J X, et al Lower dimer impurity incorporation may result in higher perfection of HEWL crystals grown in microgravity: A case study. *Journal of Crystal Growth*, 1999, 196: 623 ~ 637
- [40] Vekilov Peter G, Rosenberger F, Lin Hong, et al Nonlinear dynamics of layer growth and consequences for protein crystal perfection *Journal of Crystal Growth*, 1999, 196: 261 ~ 275
- [41] Hondoh H, Nakada T Impurity effect on defect formation of protein crystals *Journal of Crystal Growth*, 2005, 275: e1423 ~ e1429
- [42] Hondoh H, Nakada T Observation of etch figures on protein crystals by atomic force microscopy. *Jpn J Appl Phys*, 2004, 43: 4529 ~ 4532
- [43] Tanahashi K, Kikuchi M, Higashino T, et al Concentration of point defects in growing CZ silicon crystal under the internal stresses: effects of impurity doping and thermal stress *Physica B*, 1999, 273-274: 493 ~ 496
- [44] Botsaris G D, Mason E A, Reid R C Incorporation of ionic impurities in crystals growing from solution: lead ions in potassium chloride crystals *AIChE Journal*, 1967, 13: 764 ~ 768
- [45] Burton J A, Prim R C, Slichter W P The distribution of solute in crystals grown from the melt Part I Theoretical *J Chem Phys*, 1953, 21: 1987 ~ 1991
- [46] Thomas B R, Chemov A A, Vekilov P G et al Distribution coefficients of protein impurities in ferritin and lysozyme crystals self-purification in microgravity. *Journal of Crystal Growth*, 2000, 211: 149 ~ 156
- [47] Thomas B R, Chemov A A. Acetylated lysozyme as impurity in lysozyme crystals: constant distribution coefficient *Journal of Crystal Growth*, 2001, 232: 237 ~ 243
- [48] Yoshikazu I, Izumi Y, Hirohiko N, et al Novel method for measuring the distribution coefficient in protein crystals *Crystal Growth & Design*, 2005, 5 (1): 301 ~ 305
- [49] Yoshikazu I, Izumi Y, Shinichi Y, et al Development of an embedding method for analyzing the impurity distribution in protein crystals *Crystal Growth & Design*, 2005, 5 (1): 295 ~ 300
- [50] Kuznetsov Y G, Konnert J, Malkin A J, et al The advancement and structure of growth steps on thaumatin crystals visualized by atomic force microscopy at molecular resolution. *Surface Science*, 1999, 440(1-2): 69 ~ 80

- [51] Malkin A J, Kuznetsov Y G, Lucas R W, et al Surface processes in the crystallization of tumip yellow mosaic virus visualized by atomic force microscopy. *Journal of Structural Biology*, 1999, 127(1): 35 ~ 43
- [52] Konnert J H, Antonio P D, Ward K B. Observation of growth steps, spiral dislocations and molecular packing on the surface of lysozyme crystals with the atomic force microscope. *Acta Cryst D*, 1994, 50: 603 ~ 613
- [53] Yip C M, Ward M D. Atomic force microscopy of insulin single crystals: direct visualization of molecules and crystal growth. *Biophysical J*, 1996, 71: 1071 ~ 1078
- [54] Yip C M, DePhelippis M R, Frank B H, et al Structural and morphological characterization of ultralente insulin crystals by atomic force microscopy: evidence of hydrophobically driven assembly. *Biophysical J*, 1998, 75: 1172 ~ 1179
- [55] Yau S-T, Thomas B R, Vekilov P G. Molecular mechanisms of crystallization and defect formation. *Phys Rev Lett*, 2000, 85(2): 353 ~ 356
- [56] Yau S-T, Petsev D N, Thomas B R, et al Molecular-level thermodynamic and kinetic parameters for the self-assembly of apoferritin molecules into crystals. *Journal of Molecular Biology*, 2000, 303(5): 667 ~ 678
- [57] Malkin A J, Kuznetsov Yu G, McPherson A. Defect Structure of macromolecular crystals. *Journal of Structural Biology*, 1996, 117(2): 124 ~ 137
- [58] Malkin A J, Kuznetsov Yu G, McPherson A. Incorporation of microcrystals by growing protein and virus crystals. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, 1996, 24(2): 247 ~ 252
- [59] Vekilov P G, Alexander J I. Dynamics of layer growth in protein crystallization. *Chem Rev*, 2000, 100: 2061 ~ 2089
- [60] Yau S-T, Vekilov P G. Quasi-planar nucleus structure in apoferritin crystallization. *Nature*, 2000, 406: 494 ~ 497
- [61] Yau S-T, Thomas B R, Galkin O, et al Molecular mechanisms of microheterogeneity-induced defect formation in ferritin crystallization. *Proteins, Structure, Function, and Genetics*, 2001, 43(4): 343 ~ 352
- [62] Funatsu T, Harada Y, Tokunaga M, et al Imaging of single fluorescent molecules and individual ATP turnovers by single myosin molecules in aqueous solution. *Nature*, 1995, 374: 555 ~ 559
- [63] Wazawa T, Ueda M. Total internal reflection fluorescence microscopy in single molecule nanobiotechnology. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2005, 95: 77 ~ 106
- [64] Rosenberger F, Vekilov P G, Muschol M, et al Nucleation and crystallization of globular proteins — what we know and what is missing. *Journal of Crystal Growth*, 1996, 168: 1 ~ 27
- [65] Rosenberger F. Inorganic and protein crystal growth — similarities and differences. *Journal of Crystal Growth*, 1986, 76: 618 ~ 636
- [66] Kuznetsov Yu G, Malkin A J, Greenwood A, et al Michelson interferometric studies of protein and virus crystal growth. *Journal of Crystal Growth*, 1996, 166(1-4): 913 ~ 918
- [67] Land T A, Malkin A J, Kuznetsov Yu G, et al Mechanisms of protein and virus crystal growth: an atomic force microscopy study of canavalin and STMV crystallization. *Journal of Crystal Growth*, 1996, 166: 893 ~ 899
- [68] Kriminski S, Caylor C L, Nonato M C, et al Flash-cooling and annealing of protein crystals. *Acta Cryst D*, 2002, 58: 459 ~ 471
- [69] Tachibana M, Kobayashi Y, Shimazu T, et al Growth and mechanical properties of lysozyme crystals. *Journal of Crystal Growth*, 1999, 198 ~ 199: 661 ~ 664
- [70] Koizumi H, Tachibana M, Kawamoto H, et al Temperature dependence of microhardness of tetragonal hen-egg-white lysozyme single crystals. *Philosophical Magazine*, 2004, 84(28): 2961 ~ 2968

A Review of Studies on the Influence of Impurities on Protein Crystal

LIU Xing-yu DAI Guo-liang WANG Su-jing

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

Abstract A review of studies on the influence of impurities on protein crystallization is given. The possible sources of impurities and its effect on the protein crystallization are presented. The effects of impurities on protein crystallization, including nucleation, macroscopic morphologies, microscopic surface morphologies, growth rates, kinetics, quality, and repartitioning of impurities are reviewed.

Key words Protein crystallization Impurities Influence