2004 年第 62 卷
第 8 期，757 ~ 761

化 学 学 报
ACTA CHIMICA SINICA

Vol. 62，2004
No. 8，757 ~ 761

溶菌酶晶体生长前期溶液中聚集体研究

戴国亮* 于 泳 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 100080）

摘要 用动态光散射法研究了不同浓度 NaCl 对溶菌酶晶体生长前期溶液中聚集体状态的影响，并将这些溶液中的聚集体吸附到硅片表面，用原子力显微镜进行了观察．结果表明，在 NaCl 浓度为 0 ~ 0.5 mol·L^{-1}时，随着 NaCl 浓度的升高，溶液中大的聚集体逐渐消失，直至基本上只存在几纳米大小的聚集体．测量了相应条件下溶液的 Zeta 电势值以说明 NaCl 与溶菌酶之间的相互作用的变化情况．本文从溶液中无序聚集体的角度出发提出了判断晶体能否生长的一个可能的标准，并对动态光散射与原子力显微镜的结果进行了对比和分析．

关键词 动态光散射，原子力显微镜，晶体生长，溶菌酶，聚集体

Study of the Aggregates in Lysozyme Solution before Crystal Growth

DAI，Guo-Liang* YU，Yong KANG，Qi HU，Wen-Rui
（*National Microgravity Laboratory*，*Institute of Mechanics*，*Chinese Academy of Sciences*，*Beijing 100080*）

Abstract The aggregates in lysozyme solution with different NaCl concentrations in which nuclei have not appeared were studied by dynamic light scattering (DLS) method. In addition, the aggregates absorbed on the silicon wafer surface were observed by atomic force microscope (AFM). The results showed that when the NaCl concentration was lower than 0.4 mol·L^{-1}, the higher the NaCl concentration was, the smaller the dimension of the aggregates was. The big aggregates disappeared and only aggregates with the dimension of 3 ~ 4 nm in lysozyme solution remained when NaCl concentration was 0.4 or 0.5 mol·L^{-1}. The result of Zeta potential showed the change of the interaction between NaCl and lysozyme molecules. From the experimental results, we conclude that lysozyme crystal could not grow in solution in the presence of amorphous aggregates bigger than 100 nm in dimension. Additionally, the difference between results of DLS and AFM was analyzed.

Keywords dynamic light scattering, atomic force microscope, crystal growth, lysozyme, aggregate

寻找蛋白质晶体生长的优化条件一直是晶体生长工作者的目标，但是生长蛋白质晶体在某种程度上是‘科学 + 经验’的工作，不同的蛋白质有着不同的生长条件，很难提出某种完全适应于所有蛋白质的晶体生长条件以及判断晶体能否生长的标准．从文献[1]看，对于判断晶体能否生长的研究比较少而且绝大多数集中在对成核后期的研究上，很少有对成核前期研究的报道．目前，即使对于溶菌酶这一最常用的模型蛋白也鲜有对成核前聚集体的研究．而成核前溶液中蛋白质形成的聚集体的状态（包括聚集体的大小，形貌，甚至于构象等）的变化会直接影响到成核的情况．这是由于，在蛋白质（至少是溶菌酶）成核前出现的聚集体呈现出无序的聚集状态（mass-fractal clusters）[2]，而形成的晶核以及晶体生长中出现的聚集体，都是蛋白质分子有序堆积而成．因此，对无序聚集体状态的变化进行研究，有助于分析有序聚集体的出现条件并由此提供蛋白质晶体生长的合适条件．另外，聚集体状态的变化与蛋白质与沉淀剂相互作用的结果是密切相关的，故研究聚集体状态的变化还有助于了解沉淀剂是如何与蛋白质分子发生相互作用的．这对于在未知的蛋白质晶体生长过程中选择合适的沉淀剂十分有益．

NaCl 是溶菌酶晶体生长最常用的沉淀剂．一些晶体生长工作者已经对溶菌酶的晶体生长过程以及 NaCl 的作用和影响进行了研究，研究手段包括动态光散射（DLS）[3~6]，小角

* E-mail：dspr@imech.ac.cn；Tel：010-62543864；Fax：010-62615524.
Received September 4，2003；revised November 3，2003；accepted December 26，2003.
国家自然科学基金（No. 30270302）和中国科学院知识创新工程重要方向（Nos. KSCX2-SW-322，KSCX2-SW-L05）资助项目．
万方数据

中子散射技术等. DLS 技术特别适用于研究溶液中聚集体的变化情况[2]. 它通过测量聚集体的自相关函数,来获得聚集体在溶液中的分布情况,同时也可以得到聚集体的流体力学半径. 目前已有相当多的研究工作采用了 DLS 技术[7,8]. 实验中发现[9],如果要生长出较好的蛋白质晶体,蛋白质母液的浓度一般较低或者中等,而沉淀剂溶液的浓度较高. 从我们的了解看,这方面的原因尚未彻底研究清楚. 由 Binnig 等发明的原子力显微镜(AFM)可以观测物体表面的形貌,其分辨率达到纳米级,是研究生物样品形貌极为有用的工具[10].

在我们的前期工作中,已经发现溶菌酶在晶体生长的初期,溶液中的聚集体的大小会发生一定的变化[11,12],这种变化显示,聚集体从无序状态转变为有序状态,即无序聚集体消失后,晶体开始生长(即出现有序状态的聚集体). 但这一现象我们并未深入研究. 另外,Georgalis 等[2]用 DLS 技术重点考察了 NaCl 浓度高于 0.5 mol·L^{-1}时在溶菌酶溶液中的聚集体的变化情况,但对于 NaCl 浓度为 0.3 和 0.4 mol·L^{-1}时的研究不够深入,只是粗略地给出了结果,而且对结果也未加以解释. 从 Georgalis 等的结果看,NaCl 浓度低于 0.5 mol·L^{-1}时的情况与浓度更高时相差很大. 基于此,本文用鸡蛋清溶菌酶 (HEWL) 作为研究对象,利用 DLS 技术重点考察了沉淀剂 (NaCl) 浓度小于 0.5 mol·L^{-1}时,随着 NaCl 浓度的变化,溶菌酶溶液中聚集体大小的变化情况;并利用 AFM 观察了上述变化情况下,吸附在硅片上的溶菌酶聚集体的大小和形貌的变化. 由此初步探讨了 NaCl 与溶菌酶分子相互作用的情况.

1 实验

1.1 试剂

实验中所用化学试剂均为分析纯,并在使用前用离心机离心 30 min (13000 r/min),再用 0.22 μm 微孔滤膜(美国 Millipore 公司产)过滤,以尽可能除去灰尘. 溶菌酶(产品号: L6876)从美国 Sigma 公司购买(已经过三次重结晶),未作进一步处理. 缓冲溶液为含不同浓度 NaCl 的 0.1 mol·L^{-1}醋酸盐缓冲溶液,pH 4.5. 本实验中,溶菌酶溶液的浓度为 15, 25 和 50 mg·mL^{-1}. NaCl 的浓度分别为 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 和 0.5 mol·L^{-1}.

1.2 仪器

BI-200SM 光散射仪(美国 Brookhaven 仪器公司). 其光源为波长 488 nm 的 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). DLS 用样品池由光学玻璃制成,底面为正方形,边长 5 mm,高 75 mm,壁厚 1 mm. 用 Zeta PALS(美国 Brookhaven 仪器公司)和 Pd 电极测量 Zeta 电势. 原子力显微镜和 Ultralevers20 微悬臂均由 Park Scientific Instrument 公司产.

1.3 实验方法

DLS 测量时固定散射角度为 90°. 散射腔中的十氢萘和样品溶液用外置的恒温循环器恒定温度为(20 ± 0.1) ℃. 用随动态光散射仪附带的计算软件进行处理. 计算方法采用 NNLS (non-negatively constrained least squares: multiple pass). DLS 给出的实验结果(如图 2A),其 X 轴采用的是对数坐标,反映的是发生散射的颗粒的直径分布情况,Y 轴反映的不是光强的绝对值,而是各粒径颗粒的散射光强百分比(以最强的散射光强作为 100%).

测量 Zeta 电势时,恒定样品温度为 20 ℃,每个样品测量一次 Zeta 电势,一个 Zeta 电势值由 3 个相同样品测量值平均而得.

硅片的处理方法是:将硅片在含有 30% H_2O_2, 70% 硫酸(V/V)的溶液中浸泡 20 min 后,用去离子水冲洗. 制好的硅片在去离子水中保存. 所有制好的硅片都在 1 h 内使用.

用 AFM 观察硅片表面上吸附的聚集体的大小和形貌. 实验时将一定浓度的溶菌酶溶液滴到硅片表面,等待 5 min (这个吸附时间的选择是根据一系列吸附实验确定的)后,用去离子水清洗,再用氮气吹干. 用 AFM AutoProbe CP Research Scanning Probe Microscope 观察. 采用 IC-AFM 模式及 Ultralevers20 微悬臂,实验结果是在 20 ℃室温,湿度 50% ~ 60% 下获得的. AFM 所得聚集体的大小用仪器自带软件进行测量,以聚集体的最长轴的长度作为聚集体的大小.

2 结果与讨论

2.1 无 NaCl 存在时,不同浓度溶菌酶溶液中的聚集体分布情况

图 1A 是用 DLS 测量的无 NaCl 存在时 15, 25 和 50 mg·mL^{-1}溶菌酶溶液中的聚集体分布情况. 图 1B 是用 AFM 测量

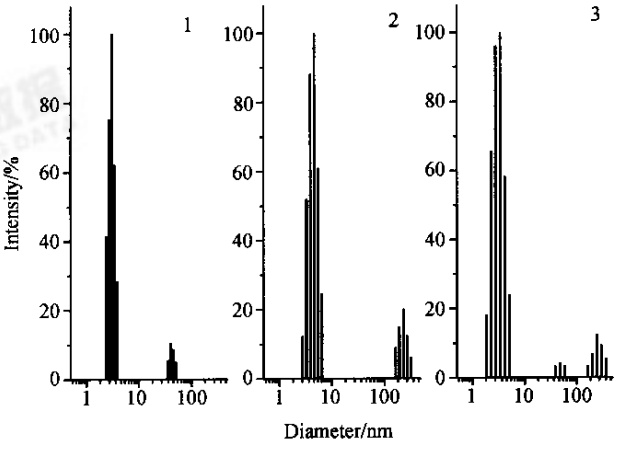

图 1A 动态光散射测量的不同浓度溶菌酶溶液(不含 NaCl)中的聚集体分布情况

1, 2, 3 分别为 15, 25 和 50 mg·mL^{-1}溶菌酶溶液

Figure 1A Distribution of aggregates in lysozyme solution of different concentrations (without NaCl in it) measured by DLS

1, 2 and 3 are 15, 25 and 50 mg·mL^{-1} of lysozyme solution, respectively

万方数据

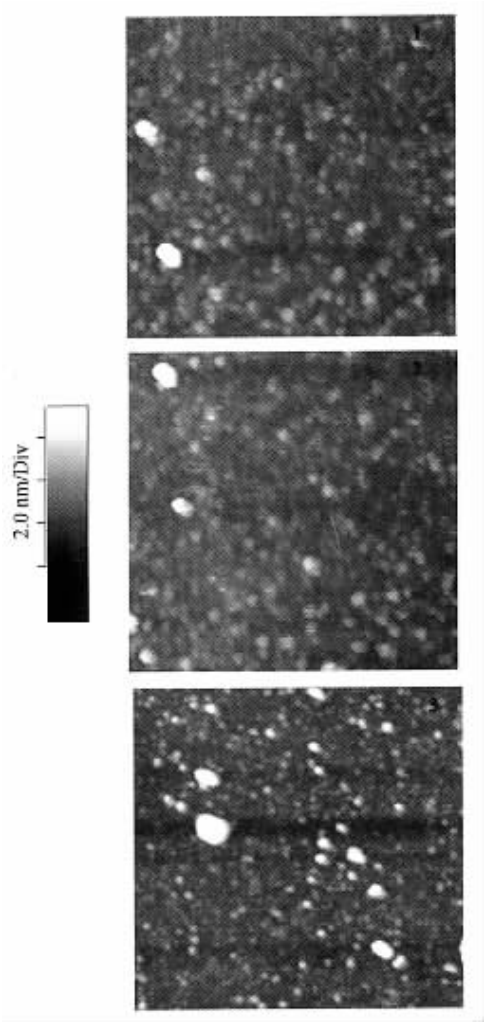

图 1B AFM 测量的不同浓度溶菌酶溶液(不含 NaCl)在硅片上吸附 5 min 后,硅片表面上的聚集体图

扫描范围均为 1 μm × 1 μm,灰度从黑到白为 10 nm. 1, 2, 3 分别为 15, 25 和 50 mg·mL^{-1}溶菌酶溶液

Figure 1B AFM images showing the morphology of aggregates on the surface of silicon wafer after lysozyme solution of different concentrations absorbed for 5 min on it

Size: 1 μm × 1 μm. 10 nm black to white. 1, 2 and 3 are 15, 25 and 50 mg·mL^{-1} of lysozyme solution, respectively

的上述三溶液在硅片上吸附 5 min 后,硅片表面上的聚集体的形貌和大小(本文未对浓度更低的情况进行研究,主要是考虑到浓度更低的条件不适宜于生长晶体). 从图 1A 和 1B 可以看出,无 NaCl 时,溶菌酶溶液的浓度对溶液中聚集体尺寸的影响不明显,但对聚集体的分布有所影响. 随着溶菌酶浓度的增加,溶液中聚集体的多分散度增加,而且 25 和 50 mg·mL^{-1}溶菌酶溶液中较大聚集体的尺寸比 15 mg·mL^{-1}溶液中的要大. 三种浓度下,溶液中均既存在几纳米的小聚集体,也存在几十至一百多纳米的聚集体. 根据文献[13],溶菌酶分子 X 射线的结构大小为 4.5 nm × 3.0 nm × 3.0 nm,如果将溶菌酶分子作为一个球体,其直径是 3.2 nm. 可以认为,在溶液中溶菌酶的小聚集体基本上以单个溶菌酶分子(3.0 nm)或两个溶菌酶分子的聚集体(4 ~ 5 nm)存在. 当然,对大的聚集体而言,DLS 与 AFM 的结果是有差异的,详细原因在后文中给出. 基于图 1A 和 1B 的结果,以下实验中溶菌酶溶液均选用浓度为 25 mg·mL^{-1},这种浓度同时也是生长溶菌酶晶体经常采用的浓度.

万方数据

2.2 不同 NaCl 浓度时,25 mg·mL^{-1}溶菌酶溶液中的聚集体分布情况

图 2A 是 DLS 测量的含不同浓度 NaCl 的 25 mg·mL^{-1}溶菌酶溶液中的聚集体分布情况. 图 2B 是 AFM 测量的含不同浓度 NaCl 的 25 mg·mL^{-1}溶菌酶溶液在硅片上吸附 5 min 后,硅片表面上的聚集体图. 图 2A 和 2B 中 NaCl 的浓度均分别是 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 和 0.5 mol·L^{-1}.

从图 2A 的结果可以看出,随着 NaCl 浓度的增加,溶菌酶溶液中的小聚集体的尺寸基本不变,基本为 3 ~ 5 nm 大小,亦即溶菌酶分子的单体与二聚体大小. 而大的聚集体尺寸呈现出逐渐减小的趋势,到 NaCl 浓度增大为 0.4 mol·L^{-1}时,溶液中的大聚集体就已经消失了. 图 2B 与图 2A 的结果也基本相同. 这说明 NaCl 的存在会不同程度地使原先存在于溶液中的溶菌酶的聚集体发生解聚集,在NaCl浓度达到

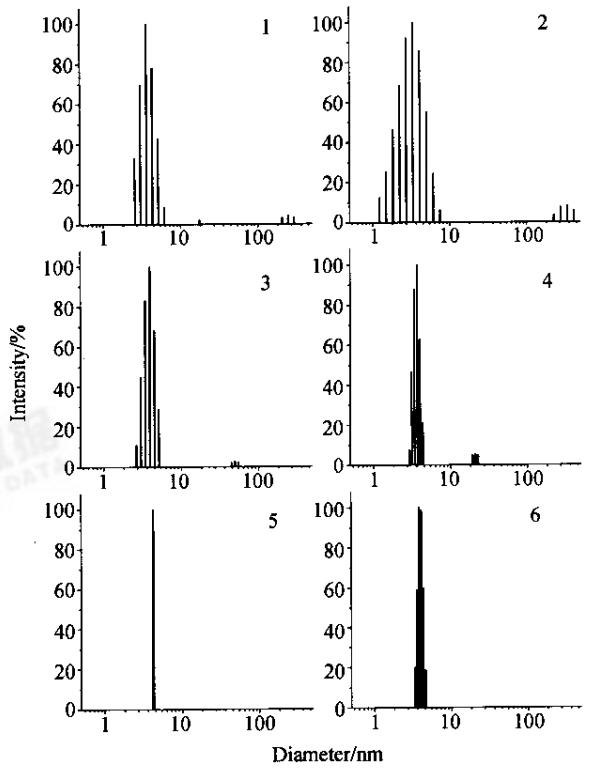

图 2A DLS 测量的含不同浓度 NaCl 的 25 mg·mL^{-1}溶菌酶溶液中的聚集体分布情况

1, 2, 3, 4, 5, 6 分别代表 NaCl 浓度为 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 和 0.5 mol·L^{-1}

Figure 2A Distribution of aggregates in 25 mg·mL^{-1} of lysozyme solution with different NaCl concentrations measured by DLS

1, 2, 3, 4, 5 and 6 are 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 and 0.5 mol·L^{-1} of NaCl solution, respectively

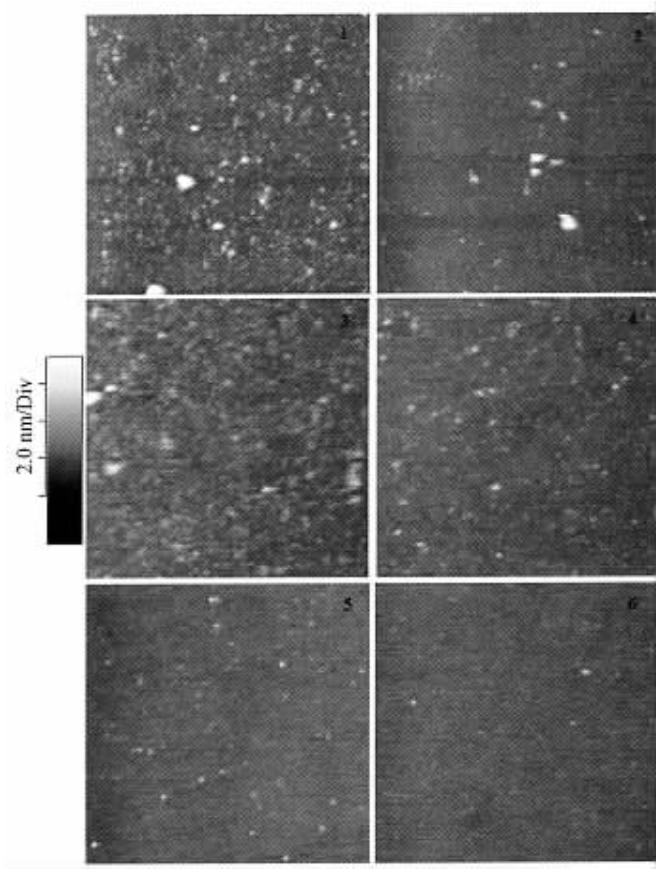

图 2B AFM 测量的含不同浓度 NaCl 的 25 mg·mL^{-1}溶菌酶溶液在硅片上吸附 5 min 后,硅片表面上的聚集体图

扫描范围均为 1 μm×1 μm,灰度从黑到白为 10 nm. 1, 2, 3, 4, 5, 6 分别代表 NaCl 浓度为 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 和 0.5 mol·L^{-1}

Figure 2B AFM images showing the morphology of aggregates on the surface of silicon wafer after 25 mg·mL^{-1} of lysozyme solution (with different NaCl concentrations) absorbed for 5 min on it

Size: 1 μm × 1 μm. 10 nm black to white. 1, 2, 3, 4, 5, 6 are 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 and 0.5 mol·L^{-1} of NaCl solution, respectively

一定程度(0.4 mol·L^{-1})以后,原先存在于溶液中的一些较大的聚集体均基本解聚成较小(3 ~ 5 nm)的聚集体,溶液中基本上是溶菌酶分子的单体或者二聚体.这是由于溶液中的 Cl^- 浓度增加,使得溶菌酶分子与 Cl^- 结合的机会增加了.溶菌酶分子原先带 10 个正电荷[14],结合上 Cl^- 后其所带正电荷的数目应该有所下降,而且结合上的 Cl^- 越多,这种趋势也就越明显[15].表 1 中 Zeta 电势的变化结果清楚地表明了这一点.另外,从培养晶体的实验中发现,对于 25 mg·mL^{-1} 的溶菌酶溶液,在 20 ℃时,当其溶解在含 NaCl 浓度低于 0.3 mol·L^{-1}, 0.1 mmol·L^{-1}醋酸盐缓冲溶液中后,采用批量法(降温)生长溶菌酶晶体,未能生长出晶体(25 mg·mL^{-1}的溶菌酶溶液,用 280 nm 紫外吸收测量得到的浓度为 10.6 mg·mL^{-1},文献[16]测量的溶菌酶在 20 ℃, pH 4.5 条件下结晶的临界 NaCl 浓度值结果证明了我们实验结果的可靠性).而从图 2A 和 2B 的结果来看,NaCl 浓度低于 0.3 mol·L^{-1}时,在溶菌酶的溶液中较大的聚集体未能全部解聚.由此可看出,对于溶菌酶溶液而言,若要生长出晶体,首先必须要满足这样的条件,即晶体开始生长时,溶液中不能存在较大的无序聚集体 如果溶液中存在较大的无序聚集体,它们也需要在沉淀剂的作用下首先基本上解聚成较小(3 ~ 5 nm)的聚集体,然后才有可能生长出晶体.文献[1]对几个蛋白质(未包括溶菌酶)进行了研究后也认为,对于一些蛋白质,当溶液中存在着聚集体时,晶体无法生长出来,可能是聚集体阻止了晶体的生长.由此,从溶液中无序聚集体的分布可以给出判断溶菌酶晶体能否生长的一个可能的标准.对于其它未进行过实验的蛋白质晶体,这样一个判断晶体能否生长的标准是否可行,目前还在实验验证中.

表 1 含不同浓度 NaCl 的 25 mg·mL^{-1}溶菌酶溶液的 Zeta 电势

Table 1 Zeta petential of 25 mg·mL^{-1} lysozyme solution with different NaCl concentrations

NaCl 浓度/(mol·L^{-1})	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
Zeta 电势/mV	15.4	14.3	13.9	11.5	10.8	10.2

另外,聚集体的大小发生变化是由于 NaCl 与溶菌酶分子发生了相互作用造成的.这种相互作用的情况从溶菌酶带电荷的多少基本能够反映出来.在溶菌酶分子带 10 个正电荷的情况下,分子之间的静电斥力要大于其与 Cl^- 结合后.单从静电斥力的角度看,溶菌酶与 Cl^- 结合后,由于静电斥力减小,可以有更多的溶菌酶分子互相结合在一起而形成更大的聚集体,即形成的聚集体的大小应该比没有 NaCl 时要大.但事实正好相反.因此应该有其它的作用力起主导作用.溶菌酶分子在醋酸盐缓冲溶液(pH 4.5)中存在着静电斥力、疏水作用、氢键、范德华力等相互作用力.其结构的稳定在很大程度上有赖于分子内的疏水作用[17].在水溶液中,溶菌酶分子的表面常被一层亲水残基包围,带有疏水侧链的残基原则上处于分子内部.严格地说,整个溶菌酶分子由里到外,疏水残基是逐渐减少,亲水残基则不断增多.在溶菌酶分子与 Cl^- 结合前,溶菌酶分子之间所形成的是一个比较松散的聚集体(即无序聚集体),这是分子之间疏水作用的结果.当 NaCl 在诱导结晶的过程中,会形成很强的溶剂环境[18],使得盐键很难形成,从而促使溶菌酶分子表面形成面积很大而且疏水性很强的接触面[19],将分子的非极性表面包埋起来,稳定分子的堆积[20].因此分子与分子之间的疏水作用减弱,从而发生了聚集体解聚的现象.当然,这个解释还有待进一步的实验证实,这部分的工作目前正在进行中.

对图 2B 的结果分析后可发现,小聚集体的大小都在 3 ~ 5 nm,而且这种小聚集体数目最多,这与相应条件下 DLS 测得的结果基本相同.但对于大的聚集体,AFM 和 DLS 测量出的值相差较大.AFM 测量出的大聚集体最大尺寸在 60 ~ 70 nm,而 DLS 的测量值在 100 多 nm.这种差异的产生原因估计是,DLS 得到的是水溶液中的聚集体大小,而在水溶液中,溶菌酶的分子与聚集体都存在着水化层,DLS 测得的结果要比真实结果稍微大些[21].对于溶菌酶的大聚集体吸附到硅片上的情况而言,从水溶液转移到固体表面,溶菌酶分

万方数据

子的构象会发生一定的变化[22],可能使部分的大聚集体发生了解聚.这就是为什么 AFM 测量出的大聚集体要比 DLS 小的原因.对于小聚集体,溶液中的 lysozyme 聚集体与吸附在固体表面上的聚集体的差异之处仅在于前者有水化层,后者没有.但由于水化层的因素可以忽略,故 AFM 与 DLS 的结果基本相同.由此可见,在采用硅片吸附技术用 AFM 研究溶液中聚集体的大小和形貌时,比较适宜于研究较小的聚集体,而溶液中聚集体较大时,DLS 是一种比较合适的研究手段,当然其缺点是无法观察到聚集体的形貌.

3 结论

成核前期的溶菌酶溶液中存在着大小不一的聚集体,而这些聚集体的状态与溶液中的 NaCl 浓度密切相关.在本文的实验条件下,溶液中的聚集体大小随着 NaCl 浓度的增加而减小,直至溶液中最终基本上只存在溶菌酶的单个分子或二聚体.对实验结果的分析得到了一个在采用批量法生长溶菌酶晶体时判断晶体能否生长的可能标准,即溶液中存在大的无序聚集体时晶体无法生长出来.NaCl 与溶菌酶分子之间的相互作用,可能使溶菌酶分子的构象发生了一定的变化,从而造成了聚集体的解聚.对于小的聚集体,AFM 和 DLS 的结果相同,而对于大的聚集体,AFM 的结果比 DLS 的结果偏小.

References

1 Zulauf, M.; D'Arcy, A. *J. Cryst. Growth* **1992**, *122*, 102.

2 Georgalis, Y.; Umbach, P.; Raptis, J.; Saenger, W. *Acta Crystallogr.* **1997**, *D53*, 691.

3 Kam, Z.; Shore, H. B.; Feher, G. *J. Mol. Biol.* **1978**, *123*, 539.

4 Georgalis, Y.; Saenger, W. *Adv. Colloid Interface Sci.* **1993**, *46*, 165.

5 Georgalis, Y.; Schüler, J.; Frank, J.; Soumpasis, D. M.; Saenger, W. *Adv. Colloid Interface Sci.* **1995**, *58*, 57.

6 Muschol, M.; Rosenberger, F. *J. Chem. Phys.* **1995**, *103*, 10424.

7 Chu, B. In *Dynamic Light Scattering*, Academic Press, New York, **1991**, p. 297.

8 Schmitz, S. K. In *An Introduction to Dynamic Light Scattering by Macromolecules*, Academic Press, New York, **1990**.

9 Kuznetsov, Y. G.; Malkin, A. J.; McPherson, A. *J. Cryst. Growth* **2001**, *232*, 114.

10 Baranauskas, V.; Vidal, B. C.; Parizotto, N. A. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1998**, *69*, 91.

11 Dai, G.-L.; Dong, X.-Q.; Sun, Z.-W.; Hu, W.-R. *Acta Phys.-Chim. Sin.* **2001**, *17*, 531 (in Chinese).
(戴国亮, 董向群, 孙祉伟, 胡文瑞, 物理化学学报, **2001**, *17*, 531.)

12 Dai, G.-L.; Dong, X.-Q.; Sun, Z.-W.; Hu, W.-R. *Acta Phys.-Chim. Sin.* **2002**, *18*, 70 (in Chinese).
(戴国亮, 董向群, 孙祉伟, 胡文瑞, 物理化学学报, **2002**, *18*, 70.)

13 Phillips, D. C. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **1967**, *57*, 484.

14 Roxby, R.; Tanford, C. *Biochemistry* **1971**, *10*, 3348.

15 Dai, G.-L.; Hu, W.-R. *Acta Chim. Sinica* **2003**, *61*, 520 (in Chinese).
(戴国亮, 胡文瑞, 化学学报, **2003**, *61*, 520.)

16 Sandra, B. H.; Pamela, J. T.; James, K. B.; Edward, J. M. *J. Cryst. Growth* **1988**, *90*, 94.

17 Wang, K.-Y. *Chem. Life* **1999**, *55*, 233 (in Chinese).
(王克夷, 生命的化学, **1999**, *55*, 233.)

18 Lu, G.-Y.; Hua, Z.-Q. *Basis of Biomacromolecules Crystallography*, Beijing University Press, Beijing, **1995**, pp. 3~5 (in Chinese).
(卢光莹, 华子千, 生物大分子晶体学基础, 北京大学出版社, 北京, **1995**, pp. 3~5.)

19 Dai, X.-H.; Bi, R.-C. *Acta Biophys. Sinica* **2002**, *18*, 394 (in Chinese).
(代小虎, 毕汝昌, 生物物理学报, **2002**, *18*, 394.)

20 Xu, X.; Bi, R.-C. *Acta Biophys. Sinica* **2000**, *16*, 673 (in Chinese).
(徐兴, 毕汝昌, 生物物理学报, **2000**, *16*, 673.)

21 Mikol, V.; Hirsch, E.; Giegé, R. *J. Mol. Biol.* **1990**, *213*, 187.

22 Willem, N.; Charles, A. H. In *Proteins at Interfaces II: Fundamentals and Applications*, Eds.: Hhomas, A. H.; John, L. B., American Chemical Society, Washington, DC, **1995**, p. 27.

(A0309045 CHENG, B.; LING, J.)

万方数据