

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
им. М. В. Ломоносова

ФИЗИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Гвоздев Николай Викторович

**АТОМНО-СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ КРИСТАЛЛОВ
ЛИЗОЦИМА РОМБИЧЕСКОЙ МОДИФИКАЦИИ**

Специальность 01.04 07 – Физика конденсированного состояния

АВТОРФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Москва 2001

Работа выполнена на кафедре физики полимеров и кристаллов
Физического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова

НАУЧНЫЕ РУКОВОДИТЕЛИ: доктор технических наук
профессор Л. Н. Рашкович,
доктор физико-математических наук
И. В. Яминский

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОЦЕНОЧНИКИ: член-корреспондент РАН,
доктор химических наук
И. В. Мелихов
кандидат физико-математических наук
Д. В. Клинов

ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ: Институт кристаллографии РАН
им. А. В. Шубникова

Защита состоится "17" мая 2001г в 16³⁰ на заседании
Диссертационного Совета К 501.001.02 Отделения физики твердого тела в
Московском Государственном Университете им. М. В. Ломоносова по
адресу 119899, Москва, Воробьевы горы, МГУ, Физический факультет,
ауд. СФА.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Физического
факультета МГУ

Автореферат разослан "12" апреля 2001г

Ученый секретарь
Диссертационного Совета К 501.001.02
Отделения физики твердого тела
кандидат физико-математических наук

И. А. Никанорова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы: В последние годы, одновременно с бурным развитием биотехнологий, возрос интерес к выращиванию кристаллов белков, нуклеиновых кислот, вирусов и других биологических объектов из водных растворов. Этот интерес вызван тем, что только закристаллизованные биологические объекты позволяют определить их структуру и понять механизм работы этих молекулярных машин, что крайне важно для создания новых биологических технологий. Важнейшую роль в определении структуры белков играет качество получаемых из них кристаллов. Единственным путем к получению совершенных кристаллов является глубокое понимание механизмов их роста. Особое значение имеет изучение морфологии поверхности растущего кристалла и определение кинетических параметров роста.

С появлением некоего время назад *in situ* атомно-силовой микроскопии, позволяющей детально визуализировать растущую поверхность кристалла, появились новые возможности для решения этих проблем.

Цели работы: Целями настоящей диссертационной работы были:

- исследование структуры поверхности растущего кристалла на молекулярном уровне, сравнение поверхностной структуры кристалла со структурой в объеме, наблюдение ступеней и изломов;
- определение механизма роста кристалла, изучение кинетики движения ступеней, выяснение статистики изломов, скорости их появления и движения.

Научная новизна: В диссертации получены и выносятся на защиту следующие результаты:

- Впервые экспериментально обнаружено, давно предсказанное теоретически, одномерное зародышеобразование на элементарных ступенях. По полученным данным о плотности изломов и скорости ступени определена скорость образования одномерных зародышей, скорость движения изломов, а также частоты присоединения и отрыва ростовых частиц
- Установлено, что макромолекулярные кристаллы лизоцима и кристаллы низкомолекулярных соединений растут по одному и тому же механизму (слоисто-спиральному), однако плотность изломов на ступенях кристаллов лизоцима мала по сравнению с низкомолекулярными кристаллами
- Впервые на кристаллах лизоцима отмечено явление поверхностной реконструкции

- Показано, что флуктуации положения ступеней нарастают пропорционально корню четвертой степени от времени. Это свидетельствует о том, что двумерная диффузия строительных единиц не оказывает существенного влияния на скорость роста.

Практическая ценность: Совокупность полученных в работе экспериментальных результатов позволяет считать метод атомно-силовой микроскопии в качестве основного для выявления общих закономерностей роста и изучения поверхностных свойств кристаллов белков. Изучение структуры, механизма, кинетики роста и, особенно, флуктуаций ступеней на гранях кристаллов лизоцима позволяет выработать рекомендации для технологии получения этих кристаллов.

Структура и объем диссертации: Диссертационная работа состоит из: введения, трех глав, заключения, списка литературы из 68 наименований. Она содержит 87 страниц, в том числе 25 рисунков и 4 таблицы.

Апробация работы: Основные результаты диссертационной работы докладывались на Международной конференции "Ломоносов -97" (Москва, 1997), Школе по химии и физике полимеров (Тверь, 1998), 12 Международной конференции по росту кристаллов (Иерусалим, 1998), Международной конференции по росту и физике кристаллов памяти М. П. Паскольской (Москва, 1998), Всероссийском совещании "Зондовая микроскопия-98" (Нижний Новгород, 1998), Всероссийском совещании "Зондовая микроскопия-99" (Нижний Новгород, 1999), Конференции студентов и аспирантов по химии и физике полимеров и тонких органических пленок (Пушино, 1999), XI Российском симпозиуме по растровой электронной микроскопии и аналитическим методам исследования твердых тел (Черноголовка, 1999), III Международной конференции "Single crystal growth, strength problems and heat mass transfer" (Обнинск, 1999), Конференции студентов и аспирантов по химии и физике полимеров и тонких органических пленок (Дубна, 2000), IX Национальной конференции по росту кристаллов (Москва, 2000), Международном симпозиуме "Scanning Probe Microscopy - 2001" (Нижний Новгород, 2001).

Публикации: по теме диссертации опубликовано 4 статьи в реферируемых журналах и 2 статьи приняты к печати.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **Введении** обоснована актуальность выбранной темы диссертации, сформулирована цель исследований, дано краткое содержание глав диссертации.

Первая глава содержит литературные данные о лизоциме, а также описание методики эксперимента. В первом параграфе приведены уже известные сведения о свойствах исследуемых кристаллов и растворов. Второй параграф описывает процесс приготовления растворов и получения кристаллов для опытов. В четвертом и пятом параграфах приведено описание экспериментальной установки и методики обработки результатов. Оригинальные результаты работы содержатся во второй и третьей главах.

Вторая глава посвящена изучению морфологии поверхности ромбических кристаллов лизоцима. Исследование рельефа поверхности проводилось методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) в контактном режиме при различных температурах и пересыщениях в растворе. Ставилась цель: сравнить имеющиеся данные по параметрам элементарной ячейки для объема кристалла с размерами ячейки на поверхности грани. Впервые, для ромбического кристалла лизоцима было получено изображение грани с молекулярным разрешением. На рис. 1 приведено АСМ-изображение участка поверхности грани (010). Ясно видно удвоение параметра a : вытянутые вдоль оси c соседние ряды элементарных ячеек сгруппированы попарно. Та же ситуация наблюдалась и с параметром b (рис. 2). На рис. 2 можно видеть, что в соседних слоях (лежащих в плоскости ac) удвоенные ряды строительных единиц сдвинуты на половину периода по оси a . Измеренная высота ростового слоя близка к параметру ячейки по оси b и равна 7.3 ± 0.4 нм. Измеренный период решетки вдоль оси c , равный 2.9 ± 0.2 нм, близок к рентгеновским данным (3.050 ± 0.005 нм). Удвоение параметров элементарной ячейки вдоль осей a и b вызвано реконструкцией поверхности, при которой молекулы на поверхности перестраиваются из объемного кристаллического порядка таким образом, чтобы минимизировать значение свободной поверхностной энергии системы.

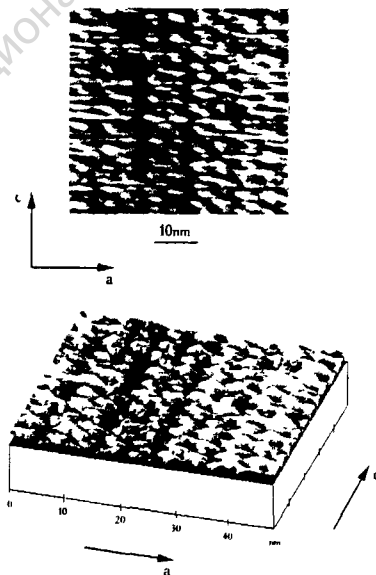


Рис. 1 Участок грани (010) с удвоенным параметром вдоль оси a Оригинальное АСМ-изображение и его 3-мерная реконструкция. Размер кадра 49×49 нм.

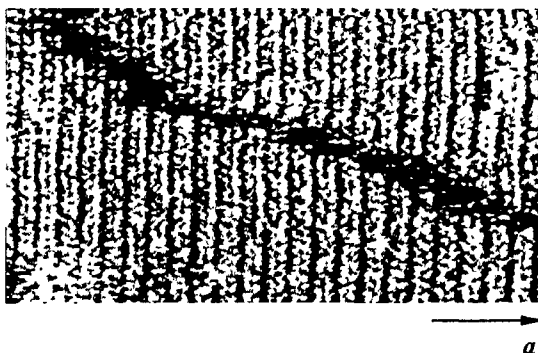


Рис. 2 Сдвиг в расположении ячеек в соседних слоях роста на $\frac{1}{2}$ периода. Ось b перпендикулярна плоскости рисунка. Размер кадра 230×120 нм

Впервые на ромбических кристаллах лизоцима было получено изображение излома. Наблюдались изломы различной глубины: от 1 до 4 параметров ячейки. На рис. 3 представлен участок элементарной ступени, содержащий

2 положительных и один отрицательный излом. Глубина всех изломов на рисунке составляет 5.8 ± 0.5 нм, что соответствует одному параметру ячейки в направлении оси a . Таким образом, излом имеет размеры элементарной ячейки и образуется четырьмя молекулами лизоцима.

Третья глава посвящена изучению механизма и кинетики кристаллизации лизоцима. В начале главы приведен обзор литературы по теории движения ступени путем образования одномерных зародышей.

Установлено, что ромбический кристалл лизоцима растет по слоисто-спиральному механизму: дислокация, выходящая на грань и имеющая перпендикулярную винтовую компоненту вектора Бюргера, образует незарастающую ступень, формирующую закрученный в спираль

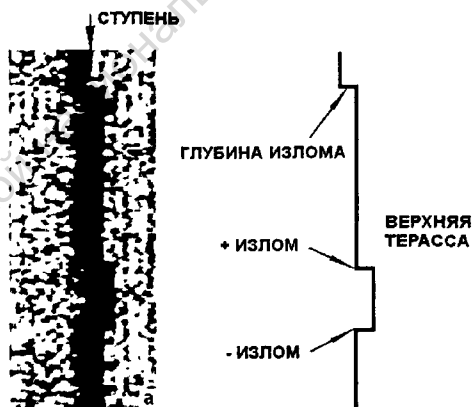


Рис. 3 а) Участок элементарной ступени, содержащий 2 положительных и один отрицательный излом. Размер кадра 65×138 нм. Ступень движется справа налево (темная полоса – ее тень). б) Схематическое изображение данного участка ступени

6

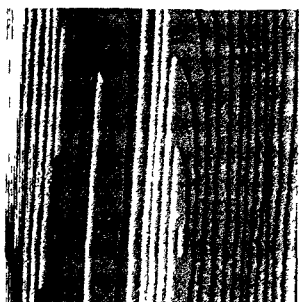


Рис.4 Три дислокационных источника на участке грани (010). Ось c проходит вертикально в плоскости рисунка. Размер кадров $11 \times 11 \text{ мкм}^2$

ростовой слой - хотмик. Три таких дислокационных источника изображены на рис. 4. Дислокационные холмы имели вытянутую вдоль оси c форму, вызванную анизотропией кинетического коэффициента ступеней (скорость ступеней в направлении оси c была примерно в 7 раз больше скорости в направлении оси a). Кроме того, наблюдалась асимметрия элементарных ступеней, движущихся в положительном и отрицательном направлениях оси a , связанная с неэквивалентным расположением макросвязей, выходящих на противоположные стороны элементарной ячейки. Таким образом, показано, что кристаллы лизоцима ромбической модификации растут по тому же механизму, что и большинство кристаллов

низкомолекулярных соединений.

По большому количеству ступеней (рис. 5) были измерены расстояния между изломами. На рис. 5 излом, движущийся вдоль ступени вниз, принимался за положительный (+), а излом, движущийся вверх - за отрицательный (-). Статистика изломов для грани (010) представлена в табл. 1. Среднее расстояние между изломами оказалось равно 575 нм, т. е. между изломами находятся прямые участки длиной (в среднем) 190 параметров элементарных ячеек. В предположении, что изломы расположены случайным образом, функция распределения для расстояний между изломами должна быть экспоненциальной. Иными словами, вероятность того, что сегмент длиной x не содержит изломов должна иметь вид:

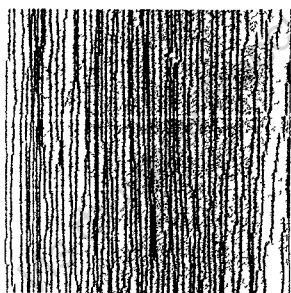


Рис. 5 {001}-ступени на грани (010). Размер кадров $9 \times 9 \text{ мкм}^2$

расположены случайным образом, функция распределения для расстояний между изломами должна быть экспоненциальной. Иными словами, вероятность того, что сегмент длиной x не содержит изломов должна иметь вид:

$$P(x) = \begin{cases} \lambda \exp(-\lambda x) & (x > 0) \\ 0 & (x < 0) \end{cases} \quad (1)$$

Гистограмма (Рис. 6), построенная на основе табл. 1 для всех изломов подтверждает это предположение. В то же время, из (1) следует, что должно выполняться соотношение

$$\rho_{i,j} = \rho_i \rho_j / (\rho_i + \rho_j) \quad (2)$$

Сравнение 3-го и последнего столбца табл. 1 показывает, что (2) выполняется плохо. Это, по-видимому, связано с наличием изломов различной глубины, которое можно объяснить адсорбцией примесей, тормозящих изломы. Действительно, если какой-либо излом на некоторое время замедлит движение, то изломы соседних рядов должны сго-

Таблица 1 Статистика изломов

Типы изломов, ±, - Типы сегментов, ij	Число изломов и сегментов	Вероятности	Линейные плотности изломов и сегментов, ρ , ρ_{ij} , 10^{-3} nm^{-1}	Среднее расстояние между изломами, \bar{x} , $\bar{x} \pm (\langle x_i^2 \rangle - \bar{x}^2 / N)^{1/2}$	s , nm (дисперсия распреде- ления x_i) ^{1/2}	$\rho\rho_{ij}/\rho^2$ 10^{-3} nm^{-1}
Сумма	269		1.74	575 ± 36	589 ± 25	
+	172 ^a	0.639	1.11			
-	97 ^b	0.361	0.672			
++	123	0.457	0.796	567 ± 49	541 ± 35	0.711
+-	49	0.182	0.317	529 ± 109	766 ± 77	0.401
-+	50	0.186	0.186	860 ± 61	430 ± 43	0.401
--	47	0.175	0.304	418 ± 79	539 ± 79	0.226

^a включая 10 двойных, 6 тройных и 1 четверной

^b включая 7 двойных и 4 тройных излома

Зная пересыщение ($s = 0.21$), среднюю плотность изломов ($\rho = 1.74 \times 10^{-3} \text{ nm}^{-1}$), скорость ступени ($V = 0.19 \text{ nm/s}$), мы оценим ряд параметров:

скорость изломов:

$$v_k = V/\rho = 19.3 \text{ nm/s},$$

здесь $a = 5.65 \text{ nm}$ – расстояние между рядами строительных единиц;

скорость образования изломов в результате возникновения одномерных зародышей:

$$J = v_k \rho^2 / 2 = 2.9 \times 10^{-5} \text{ nm}^{-1} \text{ s}^{-1} = 290 \text{ cm}^{-1} \text{ s}^{-1};$$

частоту отрыва строительных единиц от изломов при температуре опыта (близкой к комнатной):

$$\omega = v_k / cs = 30.1 \text{ s}^{-1},$$

здесь $c = 3.05 \text{ nm}$ – расстояния между строительными единицами;

энергию образования изломов:

$$W = -RT \ln(cp/2) = 3.5 \text{ ккал/моль},$$

где R – газовая постоянная, $RT \approx 0.6 \text{ ккал/моль}$;

кинетический коэффициент ступени:

$$\beta = V/s = 0.9 \text{ nm/s} \approx 10^{-7} \text{ cm/s}.$$

На ступенях грани (110) измерялось время, через которое в данной точке ступени появляется излом, т.е. изучались флуктуации положения ступени (или ее шероховатость) в процессе роста. Ставилась цель: оценить



Рис. 6 Распределение длин сегментов между изломами

величину флуктуаций и определить основные параметры, характеризующие рост грани. Для получения таких данных использовался режим атомно-силового микроскопа, при котором сканирование производилось по оси x вдоль одной выбранной координаты y , т. е. сканирование происходило по одной из 512 возможных линий развертки микроскопа. При использовании этого метода имелась возможность с большой точностью фиксировать время появления очередного излома на ступени и непосредственно определять скорость движения ступени. На рис. 7 представлен один из кадров, полученных этим методом. Таким способом была получена зависимость координаты положения ступени от времени $x(t)$. Число изломов разной глубины в процентном отношении было примерно таким же, как и на обычном изображении ступеней. Всего зафиксирован приход 190 изломов, из них присоединение частиц наблюдалось в 79% случаев и отрыв в 21% случаев. Отношение этих

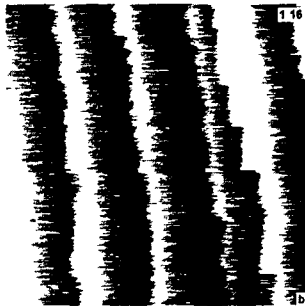


Рис. 7 Ступени на грани (110) при отключенной по оси y развертке. По горизонтали размер кадра составляет 512 нм. По вертикали отложено время (40 с).

величин было почти в два раза больше, чем отношение действительной и равновесной концентраций раствора. Причина этого пока не понятна. Для зависимости $x(t)$ была построена автокорреляционная функция:

$$W^2 = \langle [x(t+\Delta t) - x(t)]^2 \rangle \quad (3)$$

Здесь усреднение проводилось по всем t для постоянного интервала Δt . Функция W характеризует флуктуации ступени, она показывает насколько возрастают флуктуации

за время Δt . Перемещение ступени, определяемое ее скоростью ($V=2.16 \pm 0.01$ нм/с), было вычтено из значений координат $x(t)$. Зависимость $W^2(\Delta t)$ в логарифмическом масштабе представлена на рис. 8а. Первая область этой кривой ($2 \text{ с} < \Delta t < 40 \text{ с}$) может быть линеаризована, когда по оси абсцисс

отложено $\Delta t^{1/2}$ (рис. 8б). Для второй области характерна линейная зависимость $W^2 \sim \Delta t^{5/4}$, которую мы пока не можем объяснить.

В начале 80-ых годов Воронков разработал теорию флуктуаций движущейся ступени, которая предполагала, что пересыщение раствора вблизи излома такое же, как и в объеме. То есть предполагается, что процесс роста лимитируется элементарными актами присоединения к излому и отрыва от него строительных единиц. Основные зависимости, полученные Воронковым, имеют вид:

$$W^2 = (\chi t)^{1/2} \quad (4)$$

$$\chi = 2(\beta/\alpha_\epsilon) k T a c / \pi = 2 a^4 \omega^-(c\rho)^2 / \pi \quad (5)$$

$$\beta = a(c\rho)\omega^+ \quad (6)$$

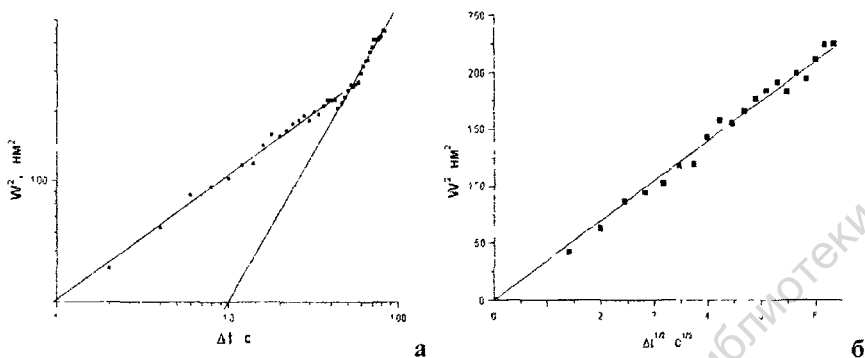


Рис. 8 а) Автокорреляционная функция W^2 , б) Линеаризованная автокорреляционная функция (первый участок) $W^2/t^{1/2}=35.0 \pm 0.3 \text{ nm}^2/\text{c}^{1/2}$

$$\alpha_e = kTc/(cp)a^2, \quad (7)$$

где β - кинетический коэффициент ступени, $\alpha_e = \alpha + d^2\alpha/d\varphi^2$ - коэффициент устойчивости ступени, отражающий увеличение свободной линейной энергии (α), вызванное отклонением ступени от сингулярного положения на угол φ , причем производная берется при $\varphi=0$, α_e/h - свободная энергия торца ступени (h - высота ступени); a - расстояние между рядами плотноупакованных строительных единиц, которые формируют ступень; c - дистанция между строительными единицами в одном ряду; cp - степень покрытия ступени изломами (вероятность найти излом в данном месте на ступени); ω - частота отрыва частиц из излома (в равновесии равна частоте присоединения); k - константа Больцмана; T - температура.

Полученные для лизоцима экспериментальные данные (при $2 \text{ c} < \Delta t < 40 \text{ c}$) также показывают, что $W^2(t) \sim t^{1/2}$ (см. рис. 8б), это позволяет применить теорию Воронкова и вычислить параметры, входящие в уравнения (4)-(7). Значения параметров сведены в табл. 2. Высота ступеней (h) определена экспериментально. Глубина излома a принята равной параметру ячейки. Значения cp и χ получены из эксперимента, а значения ω , β и α_e вычислены на основании уравнений (4)-(7). Значение кинетического коэффициента, посчитанное таким способом, отличалось от полученного непосредственно в опыте: разделив среднюю скорость движения ступени (2.16 nm/c) на пересыщение в растворе (0.74) получим $\beta = 2.9 \times 10^7 \text{ cm/c}$, т.е. на порядок меньше значения, приведенного в таблице 2.

Существуют две возможные причины этого расхождения: 1) теория не принимает в расчет роль примесей, которые всегда присутствуют и

могут становиться причиной формирования новых изломов различной глубины; 2) не понятно, что является строительной единицей и каков механизм формирования излома, другими словами, что присоединяется к кристаллу – индивидуальные молекулы или их кластеры.

Степень, перемещаясь со средней скоростью V , одновременно флуктуирует, поэтому участок ступени некоторое время задерживается на одном месте, периодически отступая от него. Элемент ступени заведомо уйдет

вперед лишь через время τ_f , которое находится из соотношения $(\chi\tau_f)^{1/4} \approx V\tau_f$. Отсюда имеем $\tau_f \approx (\chi/V^4)^{1/3}$. Если за время τ_f флуктуационное смещение достигает половины расстояния между ступенями, то ступени могут коагулировать. Это смещение равно $V\tau_f \approx (\chi/V)^{1/3}$. Для лизоцима при V порядка 1 нм/с такое возможно при расстоянии между ступенями порядка 20 нм.

Флуктуации существенны и с точки зрения равномерного распределения захваченных кристаллом примесей. Обозначим время десорбции примеси из первого поверхностного слоя кристалла через τ . Если длительность флуктуаций ступени около захваченной предыдущим монослоем примесной частицы больше времени ее десорбции ($\tau_f > \tau$), то захват примеси будет происходить в равновесных условиях, и примесь будет равномерно распределена в объеме кристалла. В противном случае кристалл окажется неоднородным.

Далее было изучено влияние длины ступени на ее скорость. Ставились цели: изучить особенности движения элементарной ступени конечной длины в случае малой плотности изломов на ней и проверить применимость уравнения Гиббса-Томсона. С этой целью, на растущей грани (010) был выбран участок поверхности, содержащий дефект упаковки, представляющий собой отрезок незарастающей ступени, параллельный [100]. Высота ступени на разных участках составляла 0.5 или 1.5 параметра решетки лизоцима по оси b . Этот дефект показан на рис. 9а. Испускаемые дислокационным источником прямолинейные ступени, вытянутые вдоль оси c и распространяющиеся как перпендикулярно, так и вдоль дефекта упаковки, обходили его сверху и снизу. Движение снизу дефекта начиналось только после того, как длина ступени достигала

Таблица 2. Параметры, характеризующие флуктуации

Параметры	Лизоцим (110), ступень [001]
χ , см ² /с	$(1.22 \pm 0.02) \cdot 10^{-25}$
a , см	$9.29 \cdot 10^{-7}$
c , см	$3.95 \cdot 10^{-7}$
h , см	$4.48 \cdot 10^{-7}$
ω (ср) ² , с ⁻¹	0.26
β/σ_b , см ² /эрг·с	16.1
ср	0.087
ω , с ⁻¹	34
β , см/с	$2.8 \cdot 10^{-6}$
α_b , эрг/см	$1.71 \cdot 10^{-7}$
α_d/h , эрг/см ²	0.38

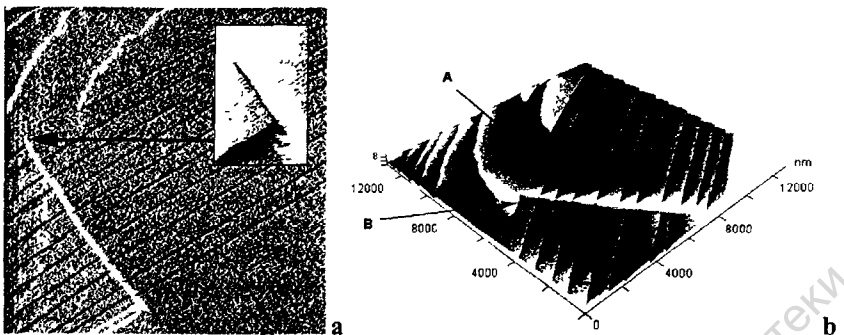


Рис. 9 Дефект упаковки на грани кристалла а) размер кадра $13 \times 13 \text{ мкм}^2$, размер врезки $320 \times 480 \text{ нм}^2$; б) 3-мерная реконструкция поверхности Дислокационный источник ступеней не виден, он расположен справа сверху.

критической величины l_c . Эта ситуация изображена на рис. 9б. Часть ступени, отмеченная буквой А, уже значительно продвинулась по поверхности сверху (справа на рис. 9а) дефекта, в то время как другая часть той же ступени (отмечена буквой В) еще не начала двигаться, так как длина этой части меньше l_c .

По серии последовательно снятых подобных кадров были измерены зависимости от времени следующих расстояний до одной и той же ступени от хорошо видной точки выхода дефекта упаковки (показана стрелкой на рис. 9а): до края ступени в направлении оси c (кривая 1, рис. 10); по нормали к участку ступени, распространяющейся сверху дефекта (кривая 2, рис. 10); по нормали к участку ступени, распространяющейся снизу (слева на рис. 9а) дефекта (кривая 3, рис. 10). Все эти зависимости оказались линейными. Уравнения этих прямых: (1) $x = 680 \pm 24 + (17.3 \pm 0.3)t \pm 31 \text{ нм}$; (2) $x = 745 \pm 27 + (2.4 \pm 0.2)t \pm 41 \text{ нм}$; (3) $x = -(58 \pm 9) + (2.2 \pm 0.1)t \pm 7 \text{ нм}$.

Таким образом скорость движения ступени в направлении оси c $V_{001} \equiv V_{\parallel} = 17.3 \pm 0.3 \text{ нм/с}$, скорость в направлении оси a сверху дефекта $V_{100} \equiv V_{\perp} = 2.4 \pm 0.2 \text{ нм/с}$, снизу дефекта $V = 2.2 \pm 0.1 \text{ нм/с}$, т. е. обе последние скорости в пределах нашей точности не отличались между собой. В тоже время движение ступени снизу дефекта начиналось лишь после того, как длина отрезка ступени вдоль оси c достигала величины $l_c = 1140 \pm 150 \text{ нм}$. Постоянство скорости V говорит о том, что она не зависит от длины ступени, которая меняется, как показано на прямой 3 рис. 10. Это противоречит формуле Гиббса-Томсона:

$$V = V_{\infty}(1 - l_c/l), \quad (8)$$

где V_{∞} - скорость бесконечно длинной ступени, l - длина ступени, l_c - длина двумерного критического зародыша.

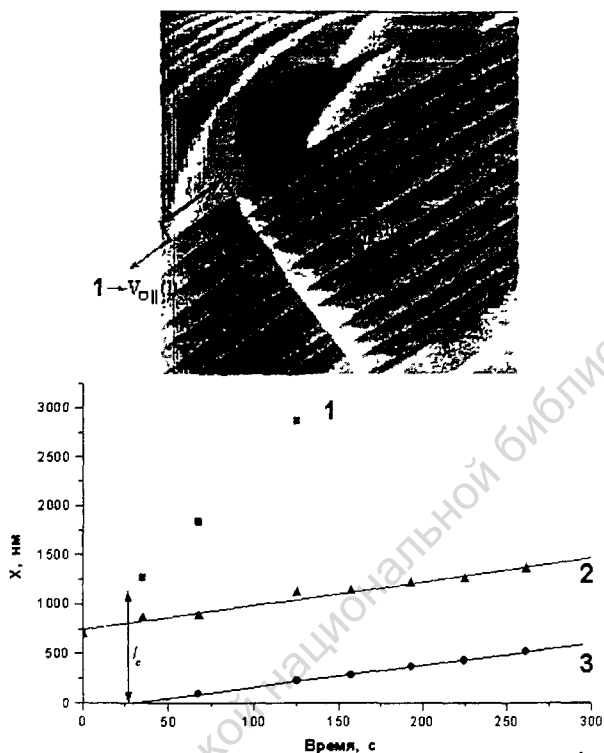


Рис. 10 К определению скорости движения ступени. Зависимость от времени расстояний от точки выхода дефекта упаковки: 1 - до края ступени в направлении оси c , 2 - по нормали к участку той же ступени, движущегося сверху дефекта, 3 - снизу дефекта

Длина двумерного зародыша критического размера, как известно, равна:

$$l_c = 8,2\Omega\alpha/kT\ln(1+s). \quad (9)$$

Здесь $\Omega = 3.16 \cdot 10^{-20} \text{ см}^3$ – объем молекулы в элементарной ячейке, k – константа Больцмана, T – температура. Численный коэффициент получен в предположении, что двумерный критический зародыш имеет форму прямоугольника с соотношением сторон равным $V_{001} / V_{100} = 7.2$, причем l_c дается для длинной стороны прямоугольника. Получив значение l_c , было вычислено значение свободной поверхностной энергии торца ступеней $\alpha = 20 \pm 2 \text{ эрг/см}^2$ ($kT = 4.25 \cdot 10^{-14} \text{ эрг}$), которая оказалась более чем на порядок выше обычных величин, характерных для белковых кристаллов. Если, однако, считать, что объем строительной единицы равен объему элементарной ячейки ($\Omega' = 4\Omega$), то получим $\alpha = 5 \pm 0.5 \text{ эрг/см}^2$, что ближе к типичным значениям 1 эрг/см^2 .

Независимость V от l может быть объяснена, исходя из работ Воронкова (1973, 1983) о скорости движения ступеней, длина которых сравнима с l_c . Согласно этим представлениям край ступени должен иметь равновесную форму и скорость ступени будет лимитироваться прямым участком длиной $l \approx l_c/2$. Итоговое выражение, связывающее длину ступени с ее скоростью, имеет вид:

$$bl_c - l = A(V/V_0)(1 - V/V_0)^{-1/2} \left(1 + \frac{2}{\pi} \arcsin V/V_0\right), \quad (10)$$

где для критического зародыша принятой нами формы константа равна $A = 0.38kT/\alpha ab \approx 0,008$ (параметр решетки $a = 5.65$ нм, для α принято наименьшее из приведенных выше значений ≈ 5 эрг/см²).

Особенность (10) состоит в том что, если $A \ll 1$, то уже при незначительном увеличении длины ступени l над l_c , ее скорость становится равной скорости бесконечно длинной ступени, то есть V не зависит от l . Согласно тем же представлениям, величина поверхностной энергии связана с плотностью изломов соотношением $\alpha \approx kT/c\alpha^2\rho$. Отсюда при наших значениях параметров для строительной единицы, равной элементарной ячейке, получаем $\alpha \approx 7$ эрг/см² - величину, близкую к рассчитанной по (9).

Другой подход к интерпретации полученных данных может состоять в следующем. Прямолинейная ступень, параллельная оси c , перемещается параллельно самой себе лишь по мере появления на ней зародышей новых молекулярных рядов и движения изломов, ограничивающих эти зародыши. Отрезок ступени конечной длины $l = Vt$, ограниченный с одной стороны (справа на рис. 10) дефектом упаковки, не получает изломов извне. Поэтому он может перемещаться нормально к себе лишь за счет появления зародышей новых рядов, т.е. пар изломов противоположных друг другу знаков, на нем самом. Пока длина отрезка l мала, на нем вообще нет изломов, так как они не успели еще возникнуть. В этот период отрезок стоит $V = 0$. После появления первого зародыша новый ряд откладывается вдоль отрезка и он смещается на глубину излома, т.е. на один параметр решетки $a = 5.65$ нм. Далее появляется второй зародыш и т.д. По мере удлинения отрезка l , зародыши новых рядов появляются на нем уже то окончатая комбинация предыдущих рядов. Когда длина отрезка l заметно превзойдет среднее расстояние между изломами на бесконечной ступени, $1/\rho_s = (v_k/2J)^{-1/2}$, скорость отрезка V выйдет на стационарное значение $V = a(2\lambda_k J)^{-1/2}$. Начальный нестационарный период появления новых зародышей отвечает отсутствию роста на кривой 3, рис. 10, а выход на постоянную скорость - линейному увеличению смещения со временем. Было вычислено время ожидания первого зародыша.

$$t_1 = (2/Jv_k)^{-1/2} = 15 \text{ с}. \quad (11)$$

Экспериментально определяемое из рис. 10 время $t_c = l_c/V_{\parallel} = 66$ с, когда скорость отрезка ступени достигает стационарного значения, отвечает условию, когда отношение длины ступени к расстоянию между изломами $(1/\rho_s = l/(v_k/2J)^{1/2})$ составляет несколько единиц. В нашем случае $1/\rho_s = 385$ нм и $l_c = 1140$ нм $\cong 3/\rho_s$. На самом деле это отношение существенно меньше, так как на коротких ступенях $\rho < \rho_s$. К моменту t_c на разрастающемся отрезке возникнет менее $JV_{\parallel}t_c^2 = Jl_c t_c/2 = 18$ зародышей и отрезок должен сместиться на величину заметно меньшую $18 \times 5,65 \cong 100$ нм, что близко к точности измерений. При $l > l_c$ скорость V_{\perp} становится постоянной, и нестационарное приближение не применимо.

Таким образом, как критическая длина l_c отрезка ступени, когда начинается его смещение, так и зависимость этой скорости от длины отрезка, по-видимому, имеют чисто кинетическое происхождение. Большое значение l_c обусловлено не большой величиной поверхностной энергии, а малой плотностью изломов на ступенях. Этой же причиной объясняется и практическая независимость скорости ступени от ее длины. Термодинамическое соотношение Гиббса-Томсона, конечно, остается в силе, но требует для своего наблюдения на ступенях с малой плотностью изломов значительно меньших пересыщений, когда кинетические эффекты не играют заметной роли.

Основные результаты и выводы:

В настоящей работе методами *in situ* атомно-силовой микроскопии исследованы морфология поверхности кристаллов лизоцима ромбической модификации, механизм и кинетика их роста.

Показано, что нет принципиальных различий между механизмом роста в растворе ромбических кристаллов лизоцима и кристаллов низкомолекулярных соединений. Те и другие растут по слоисто-спиральному механизму.

- 1) Описана форма дислокационных холмов на грани (010) и измерена анизотропия кинетического коэффициента.
- 2) Показано, что плотность изломов на ступенях кристаллов лизоцима, в отличие от низкомолекулярных кристаллов, мала (расстояние между изломами составляло порядка нескольких десятков параметров ячейки). Впервые обнаружено, давно предсказанное теоретически, одномерное зародышеобразование на элементарных ступенях. По данным о плотности изломов и скорости ступени определена скорость образования одномерных зародышей, скорость движения изломов, а также частоты присоединения и отрыва ростовых частиц. Установлено, что в случае малой плотности изломов зависимость скорости ступеней от их длины не подчиняется формуле Гиббса-Томсона

- 3) Проведено изучение статистики времен появления и расстояний между изломами на гранях (010) и (110): функция распределения этих величин близка к экспоненциальной, что доказывает независимость образования изломов друг относительно друга
- 4) Показано, что флуктуации положения ступеней нарастают пропорционально корню четвертой степени от времени и это свидетельствует о лимитирующих рост процессах присоединения и отрыва частиц от изломов, и, в частности, доказывает, что поверхностная диффузия строительных единиц не играет существенной роли.
- 5) Достигнута визуализация растущей грани кристалла с молекулярным разрешением. На грани (010) обнаружено удвоение параметров элементарной ячейки в направлениях осей a и b , что свидетельствует о реконструкции поверхности, находящейся в контакте с раствором.

Из фондов Российской национальной библиотеки

Основные результаты диссертационной работы изложены в следующих публикациях:

1) Рашкович Л Н, Гвоздев Н В, Яминский И В 1998 Механизм движения ступеней при кристаллизации лизоцима *Кристаллография* **43** 745-750

2) Chernov A A, Rashkovich L N, Yaminsky I V and Gvozdev N V 1999 Kink kinetics, exchanges fluxes, 1D nucleation and adsorption on the (010) face of orthorhombic lysozyme crystals *J Phys Condens Matter* **11** 9969-9984

3) Гвоздев Н В, Рашкович Л И, Яминский И В 2000 Атомно-силовая микроскопия грани (010) кристаллов ромбического лизоцима *Поверхность* **8** 73-77

4) Gvozdev N V, Rashkovich I N, Yaminsky I V 2000 Observation of crystal growth of lysozyme protein crystals by atomic force microscopy *Macromol Symp* **160** 49-53

5) Рашкович Л И, Гвоздев Н В, Сильникова М И, Яминский И В, Чернов А А 2001 Зависимость скорости ступени от ее длины на грани (010) ромбической модификации лизоцима *Кристаллография* **46** в печати

6) Rashkovich L N, Chernovich T G, Gvozdev N V, Shustin O A, Yaminsky I V Steps wandering on the lysozyme and KDP crystals during growth in solution *Surf Sci Lett* in press

Из фондов Российской национальной библиотеки

Из фондов Российской национальной библиотеки

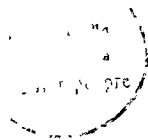
Из фондов Российской национальной библиотеки

РНБ Русский фонд

2003-4

12111

Из фондов Российской национальной библиотеки



03 Июнь 2001