



酶的结晶

李 钦*

(中国科学院微生物研究所,北京)

当酶被提到相当纯以后,就有可能将它结晶出来。自从1926年首次得到脲酶结晶以来,已得到了百余种酶的结晶^[1-5]。随着酶在各方面日益广泛的应用及其作用规律的深入研究,酶的结晶技术已经成为酶学研究的重要手段之一。

酶的结晶,主要是为了进行酶的提纯和制备供结构研究的样品。结晶的酶虽然不一定是完全纯的,但是酶在结晶过程中比活力一般会有显著提高。经过反复重结晶,杂质可以充分除去,酶的纯度能够明显提高。阐明酶的空间结构的主要方法是酶结晶的X-射线衍射分析^[6]。制备供结构分析的合适的结晶,也是将酶结晶的重要目的之一。某些结晶的酶还有实际用途。利用牛肝过氧化氢酶结晶的晶格间距做标准光栅,可以测定电子显微镜的放大倍数^[34]。

本文介绍酶的结晶条件、结晶方法和结晶的鉴别。这些方法对于其它蛋白质的结晶也是基本适用的。

结晶的条件

选择一定的结晶条件,不仅是为了能得到结晶,也是要保证酶不丧失活力。影响酶结晶的因素很多,要满足所需全部条件往往相当困难。而且合适的结晶条件一般只对几种甚至只对一种酶有效。摸索一个新材料的结晶条件是很费力的。正如通常所说的那样,酶的结晶工作是经验多于理论,艺术多于科学。

一、酶的纯度

一种酶要提到相当纯以后才能进行结晶。除少数例外,一般地说,酶的纯度越高,结晶也越容易,且易长成大的单晶。混杂蛋白质的存在有时是影响单晶长大的主要障碍,甚至也会影响微晶的形成。因此,最好用同一提纯方法积累数百毫克以上的样品后再进行结晶,因为摸索结晶条件需要相当数量的样品。如果样品来源不同或提纯过程中有一些改变,就会改变结晶条件。甚至用一般物理、化学技术,如凝胶电泳、色谱分析、比活测定等都难以检测出来的改变,也能直接影响结晶的形成。

当不存在与待结晶酶结合能力强的杂质时,或者待结晶酶与杂质的沉淀条件相差较大时,即使酶的纯度较低,也能形成结晶。在早期的酶结晶研究工作中,大都是由天然的酶混合物直接结晶的。例如,由鸡蛋清中可以直接获得溶菌酶的结晶^[7]。在这种情况下,结晶过程对酶往往有明显的提纯作用。

二、酶的浓度

结晶母液通常应当保持尽可能高的酶浓度。一般地说,酶的浓度越高,形成结晶的机会也越大。这是因为酶分子的扩散速度慢,在稀溶液中不易生成晶核。对于大多数酶来说,蛋白质浓度为5—30毫克/毫升较好。有人试图

* 本文承张树政同志审阅修改。

由浓度低于 1—2 毫克/毫升的母液中结晶酶，往往是浪费了时间和精力。如果样品数量有限时，可以用较稀的母液多试验几种条件，也可以用较浓的母液少试验几种条件，我们倾向于采用后者。

在大量结晶形成时，有时会有许多小结晶聚集在一起。这是因为母液的浓度过大时，可以降低酶的浓度以减慢结晶速度，使结晶较易长大，还有可能得到足够大的单晶。

三、温度

从现有文献中看，酶结晶的温度全部在 0° 至 40℃ 的范围。而且通常是在 4℃ 或 25℃ 下结晶。在低离子强度下，有些酶的活性对温度非常灵敏。选择结晶温度时，要注意酶在此温度下是否稳定。

四、时间

结晶形成的时间长短不等，从数小时到几个月都有，有的甚至需要一年或更长时间。当从浓的盐溶液中结晶时，形成结晶中心的时间较短，只需几天甚至几个小时，但结晶生长得很慢，往往在数周或数月后才不再生长。但也有例外，例如牛肝过氧化氢酶^[6]从盐溶液中形成大的单晶仅需 12 至 24 小时。相对地说，在低离子强度的情况下，用对水透析、改变温度或从有机溶剂中结晶的方法都能较快得到结晶，并且很快就能长到最大。

一般来说，比较理想的大结晶是在生长得最慢情况下得到的。一般希望使微晶的形成快些，然后缓慢地改变沉淀条件，使微晶慢慢地长大。

五、pH

除使酶析出的盐或其它化合物以外，最重要的结晶条件是 pH。有时只差 0.2 个 pH 单位就会影响结晶的形成，或者只能得到沉淀，或是形成微晶或单晶。在进行结晶试验之前，应该用微量样品先试验在不同的盐浓度和不同的 pH 值下酶的沉淀情况。所选择的 pH 值要使酶

能稳定。通过调整 pH 可以使结晶长到最适宜的大小，也可以改变晶形。

六、金属离子

已经发现许多金属离子能引起或有助于酶的结晶过程。在许多情况下，这些离子是酶表现活性所必需的。因此，可以期望这些离子能保持生物高分子结构上的一些特点。例如，对于羧肽酶^[9]，超氧化物歧化酶^[10]，碳酸酐酶^[11]就有这种情况。有些金属离子，特别是二价金属离子有促进结晶长大的作用。在酶的结晶过程中，常用的金属离子有 Ca^{2+} ， Zn^{2+} ， Co^{2+} ， Ni^{2+} ， Cd^{2+} ， Cu^{2+} ， Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 等。

汞和其它重金属离子能和酶分子中的半胱氨酸、蛋氨酸和组氨酸残基发生化合作用。因此，这时虽然能形成结晶，但酶分子已经发生了改变。这一点要注意。

七、其它

除上述以外，还有一些影响结晶形成的因素。例如，在母液中加入晶种常常容易使酶结晶。适当的搅拌或振荡有时可以加速微晶的形成。为防止在结晶过程中发霉，所使用的器皿要充分洗净。

结晶的方法

酶结晶的方法主要是缓慢地改变母液中酶蛋白的溶解度，使其略处于过饱和状态。在这种状态下，如条件适合，就可能得到结晶。改变酶的溶解度的方法很多，要得到一个新样品的结晶往往要试用几种方法。重结晶一般较容易。

一、盐析法

盐析法广泛应用于酶的结晶。这就是在适当的 pH、温度等条件下，保持酶稳定，慢慢改变盐浓度进行结晶。

结晶时采用的盐有硫酸铵、硫酸钠、柠檬酸钠、柠檬酸铵、氯化钠、氯化钾、氯化铵、醋酸钠、醋酸铵、硫酸镁、氯化钙、硝酸铵、甲酸钠等。其

中最常用的是硫酸铵,硫酸钠也较常用。硫酸铵是一种中性盐,它的饱和溶液所含盐的浓度可以很高,在水中的溶解度受温度影响很小,且不易引起蛋白质变性。但它的缓冲力差,要用缓冲液来稳定 pH。硫酸钠的优点是不含氮,不影响蛋白质测定,但它在 30℃ 以下溶解度低,故在低温下进行结晶时不宜采用。

利用硫酸铵盐析结晶时,一般是把盐加入一个比较浓的酶溶液中,直到使溶液微呈混浊为止。然后放置,并且非常缓慢地增加盐浓度。可以加入硫酸铵的固体粉末,也可以滴加饱和硫酸铵溶液。加入硫酸铵时容易形成局部过饱和而生成沉淀。所以必须慢慢地加入,并进行搅拌使之充分溶解。操作要在低温下进行,缓冲液的 pH 要接近酶的等电点。我国科学工作者曾用盐析法得到羊胰蛋白酶原、羊胰蛋白酶和猪胰蛋白酶的结晶^[32, 33]。

盐析结晶还可采用抽提的方法^[12]。这就是把离心管放在冰浴中,将较浓的酶液注入离心管,然后加入足够的硫酸铵使酶盐析。一般认为加固体粉末较好,因为可使酶液体积尽可能小。加入硫酸铵后的酶液在冰浴中放 5 分钟,然后在 2℃, 10000 × g 离心 15 分钟收集沉淀。

于沉淀中加入少量较高浓度的冷硫酸铵溶液(根据情况,硫酸铵溶液中可加有缓冲剂、蛋

白质保护剂等),进行抽提。抽提时不必振摇,在 2℃ 下,用玻璃棒研磨沉淀使其分散在溶液中,此时有的蛋白质即可溶解。经过离心,将上清液移入另一离心管中,沉淀再依次用较稀的硫酸铵溶液抽提。

抽提时所用硫酸铵溶液之浓度,应在使该酶沉淀所需硫酸铵浓度的上限附近。例如,某种酶在 45—60% 饱和度之硫酸铵溶液中沉淀,则从混合蛋白质中抽提此酶时,可依次用 65、61、58、55 及 52% 饱和度的硫酸铵溶液抽提;若某酶在 25—35% 饱和度的硫酸铵溶液中沉淀,则可依次采用 38、36、34、32 及 30% 饱和度的硫酸铵。

由于低温时酶在硫酸铵溶液中溶解度高,温度升高时溶解度降低,当把酶的抽提液放置在室温时,则蛋白质即逐渐析出,多数酶可形成结晶。有时也可交替放置在 4℃ 冰箱中和室温下,进行结晶。Jakoby 曾成功地用这种抽提方法进行了一百多种酶和其它蛋白质的结晶。表 1 列举了用硫酸铵抽提法结晶一些酶的条件。这种方法是一个重要的提纯方法,所得样品虽不十分纯,仍可满足一般研究需要。用这个方法得到的是微晶,一般只有数微米,最大也只有 50 微米左右。用电子显微镜观察这种结晶,能看到酶分子排列情况,以及分子的大小和形状等。因为是微晶做 X 射线衍射分析有一定困

表 1 用硫酸铵抽提方法结晶的酶^[12]

酶的名称	提 取 液					结晶收率 (%)
	分子量	缓冲剂 (mM)	pH	其它添加物	盐的浓度 %饱和度	
哇啉磷酸核糖酰转移酶	165,000	P _i , 50	7.1	无	50, 46, 42	82
醛脱氢酶	200,000	P _i , 50	7.0	25% 甘油 + 50mM 硫甘油	55, 51, 47, 43	<36
丙醇二酸半醛还原酶	未知	Tris, 40	7.4	5mM 巯基乙醇	50, 45, 40, 35	50
丙醇二酸半醛还原酶	104,000	P _i , 100	7.0	3mM 巯基乙醇	55, 45, 40, 35	75
苹果酸脱氢酶	43,000	P _i , 30	7.2	无	60, 55	35
酒石酸脱氢酶	145,000	P _i , 100	7.0	4mM 巯基乙醇	50, 45, 40, 35	40
二羟富马酸还原脱羧酶	63,000	Tris, 40	7.4	5mM 巯基乙醇	65, 50, 45, 40, 36	90
羟基丙酮酸还原酶	76,000	P _i , 30	7.2	3mM 巯基乙醇	50, 45, 40, 35	70

难。

我国科学工作者用硫酸铵抽提方法首次得到了红曲霉葡萄糖淀粉酶的结晶^[13]，并利用负染色法对结晶进行了电子显微镜观察，可以看到结晶内酶分子的整齐有序的排列情况^[14]。

二、有机溶剂法

向酶液中滴加有机溶剂，有时也能使酶形成结晶。这种结晶的优点是其中含盐少。结晶工作中常用到的有机溶剂有乙醇、丙酮、丁醇、甲醇、乙腈、二氧杂环己烷、异丙醇、2-甲基-2, 4-戊二烯 (MPD)、二甲亚砜、 α -丁内酯、1,3-丙二烯等。

与盐析法相比，用有机溶剂法易引起酶的失活。一般要在含稀无机盐的情况下，选择使酶稳定的 pH 值，并在冰浴中，缓慢地滴加有机溶剂，并不断地搅拌。当酶液微呈混浊时，在冰箱中放置一、二小时。然后离心去掉不定形物，取上清液在冰箱中放置令其结晶。加有机溶剂时，必须不使酶液中所含的盐被离析出来，无机盐一般不采用磷酸盐，而采用氯化物、醋酸盐。

用这种方法获得了不少酶的结晶。L-天门冬酰胺酶的结晶就是利用滴加甲基戊二醇的方法得到的^[15,16]。结晶 L-天门冬酰胺酶活力较起始酶液提高两倍以上，用免疫扩散和免疫电泳分析表现均一。

三、复合结晶法

有些酶可以利用它们与有机物分子或金属离子形成复合物或盐的性质来结晶。对于难进行结晶的酶，这个方法可能更有效些。例如，可利用与碱性色素利凡诺 (Rivanol, 乳酸-6,9-二氨基-2-乙氧基吡啶) 形成一种特异性的复合物来使 α -淀粉酶结晶^[17]。这种方法是先将 α -淀粉酶液对 0.01M Ca(Ac)₂ 溶液透析，形成酶的钙盐溶液，然后加入等体积的 1% 利凡诺溶液，即生成黄色沉淀。离心得到沉淀，用蒸馏水洗涤，直到洗涤液无色为止。然后将洗过的沉淀用 0.5M pH 6.0 的醋酸-醋酸钠缓冲液溶解。在

20°C 振荡 1.5—2 小时 (120—150 次/分) 就出现黄色结晶，此为结晶种。按相同的操作，在 0.5M pH 6.0 醋酸-醋酸钠缓冲液中，制备酶-利凡诺复合物的溶液。然后向其中加入上述结晶种，在冰箱中静置数小时后即开始出现结晶。一至二日后结晶过程完成。还可以进行重结晶。所得结晶为黄色针状或柱状，长度通常为 0.1—0.5 毫米，最大可达 2 毫米。一个 α -淀粉酶分子结晶中有一个钙原子，其它的钙原子都被利凡诺置换。

烯醇化酶曾以无活力的汞盐形式结晶，对含有氨和氯化物的硫酸铵溶液透析，可以除去金属而得到有活力的酶^[18]。

四、透析平衡法

利用透析平衡进行结晶是常用的方法之一。它既可以进行大量样品的结晶，也可以用微量样品来进行，以提供 X 射线衍射分析的单晶样品。

大量样品的透析平衡法结晶是将样品装在透析袋中，对一定的盐溶液或有机溶剂进行透析平衡，这时酶液可缓慢地达到过饱和而析出结晶。这个方法的优点是透析膜内外的浓度差减少时，平衡的速度也变慢。它需要大量的样品，但在摸索结晶条件时，也可以利用改变透析外液的浓度来连续地改变沉淀剂的浓度和 pH 值。如因盐浓度太高而出现沉淀时，可将沉淀

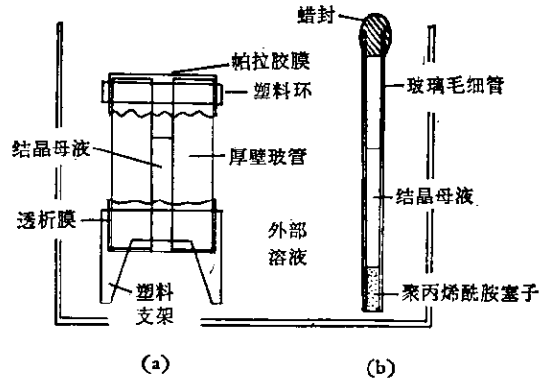


图 1

- (a) Zeppenauer^[17]设计的微量透析槽，结晶母液同外部溶液逐渐平衡。
(b) 样品量更少时的透析槽，透析膜用聚丙烯酰胺塞了代替。

溶解后再进行透析。这个方法特别适于得到微晶,也可以制备供结构分析的单晶。例如,过氧化氢酶^[8],己糖激酶 B^[19],白氨酸-tRNA 合成酶^[20],羊胰蛋白酶^[33]等都可用此法得到结晶。

微量样品的透析平衡法与大量样品的透析平衡法的透析条件基本一致,只是样品仅需 10 至 50 微升。其透析装置如图 1(a) 所示。在细玻璃管的一端用聚氯乙烯或橡皮环固定透析膜,把膜拉平,不要有气泡,并在膜与细玻璃管的接合处安上支架。将样品装在细玻璃管中。细玻璃管的另一端用帕拉胶膜(parafilm) 盖上,以塑料环把膜夹紧。整个透析管浸在透析外液中。

当样品非常少时,须用很细的毛细管做透析管,这时则在毛细管的一端用聚丙烯酰胺做塞子代替透析膜[图 1(b)]。这个方法的优点是通过改变聚丙烯酰胺的浓度可以控制扩散速度。用微量透析法曾得到了醇脱氢酶^[21]的结晶。

五、气相扩散法

用气相平衡法进行结晶是一个很理想的微量方法,进行一次实验仅需 10 至 40 微升母液。这个方法对于从多方面摸索结晶条件和单晶生长都适用。

气相扩散装置是用来保证样品小滴与沉淀剂溶液在密闭的容器中达到气相平衡。其形式可以是多种多样的。有的可利用凹玻片上的凹槽分别点 10 微升样品和 20—40 微升沉淀剂溶液,加盖玻璃片使其达到气相平衡,如图 2 所示。结晶过程可在显微镜下直接观察。

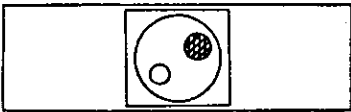


图 2 在密封的凹玻片凹槽中进行气相扩散

也可采用有许多凹槽的玻璃板,每个凹槽中加 10—40 微升样品,然后将玻璃板放在一个密闭容器中(如图 3),对 20 至 50 毫升沉淀剂进行气相扩散。利用这个装置可以摸索不同盐

浓度的样品对同一沉淀剂溶液的气相平衡状况,浓度差别可以定得很精确。

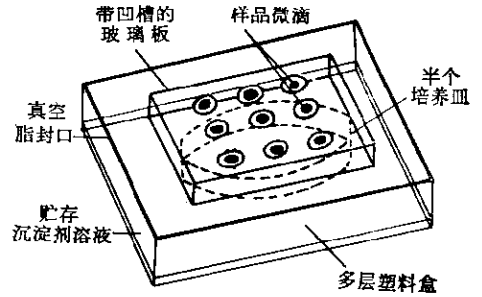


图 3 一种常用的气相平衡装置^[5]。带有许多凹槽的玻璃板用半个培养皿支起来,样品点在凹槽内。整个装置密封在塑料盒内,盒下部装沉淀溶液。

利用气相扩散法得到了许多酶的单晶。例如,肌酸激酶^[22],D-木糖异构酶^[23]等,它们可供 X 射线结构分析之用。

六、pH 诱导

在一定条件下,酶的溶解度明显地受 pH 影响。这是由酶所具有的两性离子性质所决定的。一般地说,在等电点附近大部分酶是不溶的。所以通过改变酶溶液的 pH 可以缓慢地使溶液达到过饱和,而使酶析出结晶。

在透析平衡法和气相扩散法中,都可以利用改变 pH 来结晶。透析平衡时,可以改变透析外液的氢离子浓度,达到 pH 平衡。气相平衡时,沉淀剂溶液中可以加入挥发性酸或碱,如氨水和醋酸等。这些酸或碱可以由于扩散作用使样品的 pH 缓慢地发生改变,酶达到过饱和而结晶。如果在平衡容器中放一小块干冰,则样品的 pH 可在数天内逐渐地降低。这是因为干冰释放出二氧化碳,溶解在样品滴中,形成为碳酸。

许多酶的结晶过程对 pH 相当敏感。例如,肌酸激酶^[22],胃蛋白酶^[24],胰凝乳蛋白酶^[24],胰蛋白酶^[24],过氧化氢酶^[25, 26],脱氧核糖核酸酶^[27]等。

七、温度诱导

绝大部分蛋白质的溶解度易受温度影响,

其中一些对温度的改变很灵敏。在酶的结晶中也常常利用这个特点。但微量法结晶时较少利用此特点。一般是在较高温度下配成较浓的酶溶液,然后缓慢地冷却下来结晶。猪胰 α -淀粉酶^[28]就是利用改变温度而结晶的。当有5mM CaCl₂存在并用低离子强度缓冲液维持pH 8.0,在室温下使 α -淀粉酶溶解,然后放置在4℃或12℃,即可得到结晶。另外,碱性磷酸酶^[29],脱氧核糖核酸酶^[27]也是利用改变温度来结晶的。

如果把改变温度作为取得结晶的主要手段,样品应放在杜瓦瓶或其它隔热容器中,以便减少环境温度的干扰。

结晶的鉴别

当在结晶母液中出现固体物质时,应迅速对它进行鉴别。鉴别包括两个方面,一是要确定它是结晶还是无定形物;二是要确定它是酶蛋白还是缓冲剂或其它无机盐。这两个方面有时可以分开进行,有时也可一起进行。鉴别的方法很多,一般用一两种方法即可。下面介绍几种鉴别方法。

一、目测

母液中的固体物如是结晶,在试管中摇动时应有像在强光下彩绸飘动时那样的丝光。这是因为几何形状规则的结晶晶面反光而造成的。无定形固体物一般不会有丝光。但细菌悬液也有丝光,所以有无丝光只是初步判断标准。

同时,在试管中还可以初步判断该结晶是否是酶。因为酶结晶的密度与母液密度非常接近,故摇动时它下沉较缓慢,而无机盐结晶下沉很快。

这种判别方法简便,在结晶操作中几乎都采用。

二、显微镜检查

在普通光学显微镜下,可以看到结晶的规则几何外形,易与无定形沉淀区别。如果结晶

较大,可用锋利的手术刀将结晶切开,因为酶的结晶很脆弱,切割时没有整齐的剖面。而无机盐结晶比较结实,切割的边缘整齐。

把微量的甲基紫或石炭酸复红染料加到母液中,在显微镜下可以观察结晶吸收染料的情况。如果是酶的结晶,它将比母液更强烈地吸收染料。

也可在偏光显微镜下观察结晶。由于晶体有双折射现象,在正交偏光显微镜下,如果是结晶就会有光线透过,显示出外形。而无定形沉淀不能透过光线。当转动载物台时,每转90°角,结晶的明暗状态改变一次,像夜空中繁星闪烁一般。如果在第一、三象限是亮的,在第二、四象限结晶就不透光而变暗。无机盐结晶表现很强的双折射性,在偏振光下明暗变化非常明显,而酶结晶的双折射性就弱得多。

如将载片上的结晶慢慢加热,则酶结晶会因脱水而破坏,甚至可以炭化。无机盐结晶一般不变化。

三、酶活力的测定

判定是否是酶的结晶,必须测定结晶的酶活力。一般将母液离心得到的结晶,最好再与母液相同的溶液洗涤一次,防止结晶沾上母液。然后将结晶溶解,测定其酶活力、蛋白质浓度,并计算比活力。经过结晶,酶的比活力一般比母液都应有所提高,特别是经过重结晶更是如此。

四、电子显微镜观察

酶的结晶经戊二醛固定和负染以后,可以在电子显微镜下看清它的外形和晶体内部酶分子的有序排列情况^[14, 30, 31]。通过电镜观察可以得到酶分子的大小和形状的资料。另外,还可以利用选区电子衍射技术,进行结晶的电子衍射,判断是否是结晶。当电子束对准结晶时,会出现衍射环。非结晶物则不会出现衍射环。还可以利用对结晶电镜照片的激光光学衍射的方法确定结晶内分子排列是否有序^[14]。

五、X-射线衍射分析^[5]

晶体内部具有格子构造,其重复周期与 X-射线的波长属于同一数量级。当 X-射线透入晶体时,将发生衍射效应,而衍射线的方向与强度则取决于晶体的结构。从而,量度衍射线的方向及强度,就有可能具体分析晶体结构。对于微晶,可以用粉末法进行 X-射线衍射分析。如果晶体长得足够大,还可以进行单晶衍射分析,通过 X-射线衍射分析,不可仅能确定是否为结晶,而且还可以得到有关结晶的物理参数。

参 考 文 献

- [1] Sumner, J. B.: *J. Biol. Chem.*, **69**: 435, 1926.
- [2] Поррон, Д., М. Кунитц, Р. Херриотт: *Кристаллические Ферменты*, 1950, Издательство иностранной литературы, Москва.
- [3] 赤堀四郎: 酵素研究法 1, 朝仓书店, 东京 1955, p. 174—197.
- [4] Dixon, M., and E. C. Webb: *Enzymes*, second edition, Printed in Great Britain by Spottiswoode, Ballantyne and Co Ltd. London and Colchester, 1964, p. 794—808.
- [5] Alexander McPherson, Jr.: *Methods of Biochemical Analysis*, Vol. 23, Interscience Publishers a division of John Wiley & Sons, Inc., Toronto, 1976, p. 249—345.
- [6] 袁静明: 生物化学与生物物理进展, 1975 年第 1 期, 46—55 页。
- [7] Alderton, G., and H. L. Ferold: *J. Biol. Chem.*, **164**: 1—5, 1946.
- [8] McPherson, A., and A. Rich: *Arch. Biochem. Biophys.*, **157**: 23—27, 1973.
- [9] Lipscomb, W. N., J. C. Coppola, J. A. Hartsuck, M. L. Ludwig, H. Muirehead, J. Searl, and T. A. Steitz: *J. Mol. Biol.*, **19**: 423—441, 1966.
- [10] Richardson, D. C., J. C. Bier, and J. S. Richardson: *J. Biol. Chem.*, **247**: 6368—6369, 1972.
- [11] Tilander, B., B. Strandberg, and K. Fridborg: *J. Mol. Biol.*, **12**: 740—760, 1965.
- [12] Jakoby, W. B.: *Crystallization as a Purifica-*

- tion Technique, Methods in Enzymology* (ed. Jakoby, W. B.) Vol. 22, Academic Press, New York and London, 1971, p. 248—252.
- [13] 中国科学院微生物研究所酶结构与功能研究组: 微生物学报, **16** (3):200—205, 1976.
- [14] 中国科学院微生物研究所酶结构与功能研究组: 生物化学与生物物理学报, **10**(4), 1978.
- [15] Мерлашев, С. Р., и др.: *Вопросы Медицинской химии*, **18** (3):318—321, 1972.
- [16] 孟广震, 钱世钧: 微生物学报, **15** (3), 227—230, 1975.
- [17] 田中昭: 生化学, **28** (9): 529—533, 1956.
- [18] Warburg, O., and Christian, W.: *Biochem. Z.*, **310**: 384, 1941.
- [19] Steitz, T. A.: *J. Mol. Biol.*, **61**: 695—700, 1971.
- [20] Chirekjian, J. C., H. T. Wright, and J. R. Fresco: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **69**: 1638—1641, 1972.
- [21] Zeppenauer, M., B. O. Soderberg, and C. I. Branden: *Acta Chem. Scand.*, **21**: 1099, 1967.
- [22] McPherson, A.: *J. Mol. Biol.*, **81**: 83—86, 1973.
- [23] Berman, H. M., B. H. Rubin, H. L. Carrell, and J. P. Glusker: *J. Biol. Chem.*, **249**: 3983—3984, 1974.
- [24] Northrop, J. H., M. Kunitz, and R. M. Herriott: *Crystalline Enzymes*, Columbia University Press, New York, 1948.
- [25] Gurskaya, G. V., S. V. Karpukhina, and G. M. Lobanova: *Бифизика*, **16**: 553—555, 1971.
- [26] Schnuchel, G., Hoppe Sleylers: *Z. Physiol. Chem.*, **298**: 16—23, 1954.
- [27] Kunitz, M.: *J. Gen. Physiol.*, **35**: 423, 1952.
- [28] McPherson, A., and A. Rich: *Biochem. Biophys. Acta*, **285**: 493—497, 1972.
- [29] Hanson, A. W., M. L. Applebury, J. E. Colman, and H. Wyckoff: *J. Biol. Chem.*, **245**: 4975, 1970.
- [30] 袁祖焜: 生物化学与生物物理进展, 1:47, 1976.
- [31] 辽宁林业土壤研究所固氮组, 电镜组, 中国科学院北京植物研究所第七研究室: 科学通报, **20** (7): 337—339, 1975.
- [32] 戚正武, 吴克佐, 许实荣: 生物化学与生物物理学报, **3** (2):191—205, 1963.
- [33] 吴克佐, 戚正武: 生物化学与生物物理学报, **6** (1): 32—39, 1966.
- [34] Meek, G. A.: *Practical Electron Microscopy for Biologists*, Wiley-interscience, 中国科学院生物物理研究所电镜组部分同志译:《生物学工作者实用电子显微术》, 科学出版社, 北京, 1976, 第 316—319 页。