

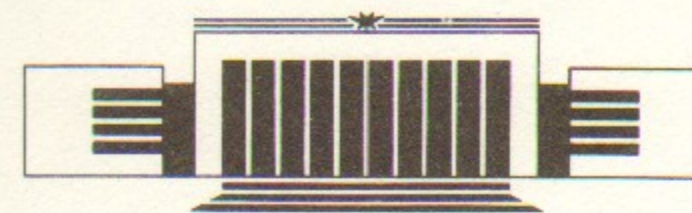


ИНСТИТУТ ЯДЕРНОЙ ФИЗИКИ СО АН СССР

А.Н. Попов, А.А. Антсон, В.В. Беляев,
К.П. Бондаренко, Э.Г. Арутюнян,
Д.М. Хейкер, М.А. Шеромов, С.В. Мытниченко

**ПОЛУЧЕНИЕ ДИФРАКЦИОННЫХ ДАННЫХ
ДЛЯ МОНОКРИСТАЛЛОВ БЕЛКОВ
НА СИНХРОТРОННОМ ИЗЛУЧЕНИИ
ОТ НАКОПИТЕЛЯ ВЭПП-3**

ПРЕПРИНТ 90-118



НОВОСИБИРСК

А. Н. Попов, А. А. Антон, В. В. Белая,
К. И. Зондаринок, Э. Т. Абутов,
Д. М. Хейбер, М. А. Шеромов, С. В. Мытлягин

ПОЛУЧЕНИЕ ДИФРАКЦИОННЫХ ДАННЫХ
ДЛЯ МОНОКРИСТАЛЛОВ ВДВ
НА СИНХРОТРОННОМ ИЗЛУЧЕНИИ
В ПЕРИОДЫ РАВНОУСЛОВИЯ

1977-00-11111111

ИЗДАТЕЛЬСТВО

© Институт ядерной физики СО АН СССР

1. ВВЕДЕНИЕ

Рентгеноструктурный анализ макромолекулярных монокристаллов является основным методом, который дает возможность получить надежную информацию о пространственной структуре сложных молекул белков, нуклеиновых кислот, рибосом, нуклеосом и вирусов. Большие периоды решетки макромолекулярных кристаллов, на порядок большие чем в обычных кристаллах, порождают трудности, связанные с необходимостью измерения интенсивности десятков и сотен тысяч отражений вместо нескольких тысяч для обычных кристаллов. Интенсивности этих отражений малы и накладываются на значительный фон. Все это увеличивает в сотни раз длительность эксперимента, которая в современном рентгеновском дифрактометре с отпаянной рентгеновской трубкой составляет несколько тысяч часов. Ситуация осложняется радиационной нестабильностью макромолекулярных кристаллов. Становятся практически невозможными исследования с высоким разрешением сложных белков, имеющих большой молекулярный вес, надмолекулярных комплексов: рибосом, нуклеосом, вирусов; изучение функционирования белков на серии многочисленных комплексов, исследование нестабильных кристаллов и кристаллов малых размеров.

Однако большие периоды решетки приводят к возникновению десятков и сотен отражений одновременно. При параллельных измерениях одновременно возникающих отражений в фотографических камерах колебаний [1], в координатных дифрактометрах с

двумерными позиционно-чувствительными детекторами [2] на один-два порядка сокращается время эксперимента и в том же отношении сокращается доза облучения исследуемого образца. При использовании в камерах и дифрактометрах коллиматоров с двумя круглыми диафрагмами предельный период исследуемого кристалла составляет около 200—250 Å. Этот предел связан с наложением соседних дифракционных отражений и с ослаблением интенсивности при коллимации первичного пучка. Для исследования кристаллов с периодами до 350 Å необходимо использовать фокусировку с помощью двух изогнутых зеркал [3]. Использование источника синхротронного рентгеновского излучения, обладающего в несколько сот раз большей спектральной яркостью, чем трубка с вращающимся анодом (табл. 1), открывает возможность дополнительного сокращения времени эксперимента и увеличения предельного периода решетки [4]. Сокращение времени эксперимента приводит к уменьшению радиационных повреждений образца во время съемки. Улучшение отношения пик—фон на рентгенограмме приводит к повышению разрешения съемки.

Таблица 1

Характеристики источника синхротронного излучения ВЭПП-3

Энергия электронов, E	2,0 ГэВ
Магнитное поле, B	13,4 КГс
Критическая длина волны, λ	3,5 Å
Ток электронов, I	200 мА
Вертикальная расходимость, ψ_v	0,4 мрад
Размер источника: вертикальный, B_v горизонтальный, b_h	0,2 мм
	2 мм
Длительность импульса, δt	0,2 нс
Интервал между импульсами, Δt	250 нс
Яркость источника ($\Delta\lambda = 0,001 \lambda_{СИ}$)	$1,3 \cdot 10^{13} \frac{\text{фотон}}{\text{с} \cdot \text{мм}^2 (\text{мрад})^2}$
Яркость проекции фокуса трубки (0,1 × 0,1 мм) с вращающимся анодом мощностью 3 кВт ($\Delta\lambda = 0,003 \lambda_{СИ}$)	$1,4 \cdot 10^{10} \frac{\text{фотон}}{\text{с} \cdot \text{мм}^2 (\text{мрад})^2}$

Большая протяженность квазинепрерывного линейчатого спектра (0,5—5 Å) синхротронного излучения позволяет использовать большой интервал длин волн, длины волн, не соответствующие имеющемуся ограниченному набору анодов рентгеновских трубок; легко переходить от одной длины волны к другой. Например, использование длины волны, равной 1 Å, позволяет уменьшить поправку на поглощение в образце. Возможность перехода от одной длины волны к другой позволяет подбирать длины волн, близкие к краям поглощения, при использовании аномального рассеяния для решения фазовой проблемы. Использование широкого интервала длин волн в Лауэ-съемках позволяет проводить экспрессное получение набора интегральных интенсивностей [7].

Импульсный характер синхротронного излучения (длительность импульса около 0,2 нс, периодичность повторения около 250 нс) позволяет использовать методы исследования структуры макромолекул с высоким временным разрешением.

Временная структура и поляризация синхротронного излучения в плоскости орбиты должны учитываться при построении аппаратуры, при создании быстродействующих детекторов, расположении плоскости дифракции перпендикулярно орбите, при введении соответствующих поправок в измерение интенсивности.

В Советском Союзе ранее был проведен ряд пионерских работ по применению СИ в кристаллографии макромолекул [5], однако эти работы имели эпизодический характер. В данной статье описывается стационарная кристаллографическая станция на пучке СИ от накопителя ВЭПП-3 и результаты работы на этой станции.

2. КОНСТРУКЦИЯ СТАНЦИИ

Основная задача, которая решается на кристаллографической станции СИ накопителя ВЭПП-3, — высокоскоростной сбор рентгенодифракционных данных от макромолекулярных кристаллов с большими периодами решетки с высоким разрешением съемки.

Для этого оптическая система станции должна обеспечить:

- 1) фокусировку излучения на детекторе в пятно с размерами $\sim 0,5 \times 0,5$ мм;
- 2) возможность работать с заданной длиной волны в широком диапазоне длин волн от 0,6 до 1,8 Å;
- 3) монохроматизацию излучения с $\delta\lambda/\lambda \sim 10^{-3}$.

Блок-схема станции представлена на рис. 1. Станция расположена на канале СИ № 5 от змейки ВЭПП-3. На этом же канале перед кристаллографической станцией располагается станция рентгеновской микроскопии, которая отодвигается в сторону от пучка при работе кристаллографической станции. Монохроматизация излучения осуществляется с помощью изгибаемого для обеспечения фокусировки в горизонтальной плоскости совершенного монокристалла треугольной формы. Расстояние от источника излучения до монохроматора составляет 17 м. Для ограничения белого пучка СИ, падающего на монохроматор, используются автоматические вертикальные и горизонтальные щели от станции микроскопии, которые находятся перед монохроматором на расстоянии около 5 м в вакуумном защитном боксе.

Однокристалльный монохроматор смонтирован на нижнем фланце вакуумного бокса кубической формы с отверстиями под фланцы по всем граням. Через два противоположных боковых отверстия вводится белый и выводится монохроматизированный пучок, боковое отверстие, параллельное пучку СИ, закрыто фланцем со смотровым стеклом, остальные закрыты глухими фланцами. Бокс изготовлен из нержавеющей стали с толщиной стенок 20 мм и обеспечивает радиационную безопасность персонала. Ввод пучка СИ в бокс монохроматора осуществляется по вакуумной телескопической трубе, которая укорачивается на время работы станции микроскопии. Внутри бокса, кроме монохроматора, находится блок автоматических щелей для ограничения выхода фонового излучения.

Для получения дифракционных данных от монокристаллов используется фотографическая камера Арндта—Вонакотта фирмы Инраф—Нониус [1]. Стандартное расстояние монохроматор—исследуемый кристалл составляет 3,6 м. Монохроматизированный пучок попадает на кристалл по вакуумной телескопической трубе, сопряженной с боксом монохроматора. В промежутке между концом трубы и коллиматором фотокамеры расположены ручные вертикальные и горизонтальные щели, ионизационная камера, используемая в качестве монитора, противофоновый экран, предохраняющий фотопленку от рассеянного на деталях конструкции излучения. Все эти устройства вместе с фотокамерой находятся внутри домика, обеспечивающего радиационную защиту персонала станции во время работы.

Защитный домик и телескопическая труба закреплены на пятиметровой скамье, которая поворачивается вокруг вертикальной оси коаксиальной оси монохроматора при смене используемой длины

волны излучения. Угол между первичным и монохроматизированным пучком можно менять от 15 до 32°. Ограничение диапазона связано с расположением соседних станций.

3. МОНОХРОМАТИЗАЦИЯ И ФОКУСИРОВКА ИЗЛУЧЕНИЯ

Кристаллы-монохроматоры из совершенных кристаллов Si и Ge, вырезанные в виде равнобедренного треугольника, широко используются на различных станциях СИ [6—9]. Такие монохроматоры обеспечивают достаточно высокую степень монохроматизации излучения ($\Delta\lambda/\lambda \sim 10^{-3}$) и позволяют собрать на исследуемом образце значительную часть пучка СИ. Фокусировка излучения достигается изгибом кристалла по круговому цилиндру при нажатии на кончик треугольника и зажиме основания. Наиболее часто используется отражение от кристаллографической плоскости (111), гармоника (222) отсутствует из-за погасания. Кристаллы вырезают так, чтобы отражающая плоскость составляла угол α с поверхностью кристалла.

Радиус изгиба треугольной пластины длиной L , толщиной t и длиной основания h

$$R = \frac{E h t^3}{12 L W}, \quad (1)$$

где W —сила, приложенная к кончику треугольника, E —модуль упругости.

Связь между величиной отклонения кончика Δ и радиусом определяется выражением

$$R = \frac{L^2}{2\Delta}. \quad (2)$$

Отражающая способность совершенных кристаллов в угловом диапазоне кривой качания ω близка к единице. Ширина Брэгговского отражения в симметричном случае ($\alpha = 0^\circ$):

$$\omega_{\text{симм}} = \frac{2}{\sin 2\theta_B} \frac{r_e \lambda^2}{\pi V} C |F_{hr}| l^{-M}, \quad (3)$$

где $r_e = e^2/mc^2$, e —заряд электрона, m —масса электрона, c —скорость света; V —объем элементарной ячейки кристалла; C —фак-

тор поляризации; F_{hr} — структурный фактор кристалла; l^{-M} — температурный фактор; θ_B — угол отражения.

В случае асимметричного среза ($\alpha \neq 0^\circ$) угол приемки

$$\omega_0 = \omega_{\text{симм}} / A^{1/2} \quad (4)$$

и угол отражения

$$\omega_h = \omega_{\text{симм}} A^{1/2}, \quad (5)$$

где $A = \sin(\theta + \alpha) / \sin(\theta - \alpha)$ — фактор асимметрии. Из-за угловой конверсии происходит изменение в сечении пучка:

$$S_h = S_0 / A,$$

и $\omega_h S_h = \omega_0 S_0$ — теорема Лиувилла (рис. 2), индексы 0 и h относятся к прямому и отраженному лучам, соответственно.

Асимметричный срез позволяет сжать дифрагированный пучок в A раз, при этом интенсивность отраженного пучка уменьшается в $A^{1/2}$ раз, а плотность потока увеличивается в $A^{1/2}$ раз по сравнению с симметричным срезом.

В пучке СИ монохроматор ведет себя как зеркало, и при радиусе изгиба R выполняется соотношение

$$\frac{2}{R} = \frac{\sin(\theta + \alpha)}{P} + \frac{\sin(\theta - \alpha)}{P'}, \quad (7)$$

где P и P' — расстояния от источника до монохроматора и от монохроматора до точки фокусировки, соответственно.

Размер получаемого фокуса

$$F = \left[\left(\frac{B_h}{A'} \right)^2 + (P' \omega_{\text{симм}})^2 A + D^2 \right]^{1/2}, \quad (8)$$

где D — абберация системы, которую можно оценить через радиус кривизны каустической поверхности фокуса: $\rho \cong R \cdot \cos(\theta - \alpha)$, тогда $D = L^2 \cos(\theta - \alpha) / 8R$ и $A' = P/P'$ [7]. Энергетическое разрешение по фокусу монохроматора

$$\frac{\Delta\lambda}{\lambda} = \left[\left(\frac{B_h}{P} + \frac{L}{2} \left| \frac{\sin(\theta - \alpha)}{P'} - \frac{\sin(\theta + \alpha)}{P} \right| \right)^2 + \frac{\omega_{\text{симм}}^2}{A} \right]^{1/2} \cdot \text{ctg}\theta. \quad (9)$$

Наименьшее $\Delta\lambda/\lambda$ достигается при выполнении условия Гинье $P' = P/A$. По длине фокуса существует градиент энергии, обуслов-

ленный длиной источника, поэтому, если исследуемый образец меньше фокуса, то принимаемое им $\Delta\lambda/\lambda$ будет меньше. В Гинье-положении $\Delta\lambda/\lambda \cong \omega_{\text{симм}} A^{1/2} \text{ctg}\theta$ в центре фокуса и улучшается к краям фокуса. При несоблюдении условия Гинье возникает градиент энергии по углу рассеяния [7].

Знание спектрального распределения плотности потока источника СИ позволяет оценить плотность потока излучения в фокусе:

$$\rho_{\text{мон}} \left[\frac{\text{фотон}}{\text{с} \cdot \text{мм}^2} \right] \cong (\rho_{\text{ист}} \cdot J_{\text{СИ}}) \frac{L \sin(\theta + \alpha)}{P} \frac{1}{(P + P')} \frac{\omega_{\text{симм}} \text{ctg}\theta}{A^{1/2} F} \quad (10)$$

и

$$I_{\text{мон}} = [\text{фотон}/\text{с} \cdot \text{мм}] = \rho_{\text{мон}} \cdot F$$

— поток излучения в 1 мм по вертикали, где $\rho_{\text{ист}}$ — плотность потока источника [фотон/с · мрад · мА], проинтегрированная по вертикали с $\Delta\lambda/\lambda = 1$; $J_{\text{СИ}}$ — ток накопителя. На рис. 3—6 приведены расчетные зависимости параметров монохроматора от длины волны при выполнении и невыполнении условия Гинье. Для расчетов константы, входящие в (3), взяты из [9], фактор поляризации $C = \cos 2\theta$, $L = 120$ мм.

При проведении экспериментов нами были использованы кристаллы-монохроматоры из Si с $\alpha = 8,25^\circ$ и Ge с $\alpha = 7^\circ$ длиной 120 и толщиной 1 мм. Экспериментальная оценка с $\lambda = 1,49 \text{ \AA}$ (край поглощения Ni) и $P' = 3,4$ м для кристалла Ge дала значения $F = 700$ мкм и $I_{\text{мон}} = 7 \cdot 10^{10}$ [фотон/с · мм]. Оценка потока производилась с помощью ионизационной камеры, помещенной за вертикальной и горизонтальной щелями с размерами 1 мм. Оценка ширины пучка была сделана путем перемещения узкой вертикальной щели с шагом 50 мкм, находящейся перед ионизационной камерой. Полученный профиль пучка приведен на рис. 7. Экспериментальная оценка интенсивности излучения хорошо согласуется с расчетной величиной. Ускорение съемки должно составлять 50—100 раз по сравнению с рентгеновской трубкой с вращающимся анодом, снабженной фокусирующей оптикой ($\rho_{\text{трубка}} = 9 \cdot 10^8$ фотон/с · мм²).

4. КОНСТРУКЦИЯ И НАСТРОЙКА МОНОХРОМАТОРА

Схема разработанного для станции монохроматора представлена на рис. 8. Конструкция монохроматора напоминает автоматическую гониометрическую головку, которая позволяет:

1) поворачивать кристалл-монохроматор вокруг вертикальной оси

с «грубым» и «точным» шагом для настройки на нужный угол отражения;

- 2) перемещать кончик треугольного кристалла для его изгиба;
- 3) поворачивать кристалл вокруг горизонтальных взаимно перпендикулярных осей α и β для юстировки;
- 4) смещать кристалл в вертикальном и горизонтальном, перпендикулярном прямому пучку, направлениях для выведения на пучок.

Все движения осуществляются шаговыми двигателями, положение монохроматора и работа двигателей контролируется с помощью многооборотных потенциометров, при этом регистрируются каждые пять шагов двигателя. Монохроматором управляют через стандартные блоки КАМАК с помощью ЭВМ.

Таблица 2

Основные параметры монохроматора

Наименование перемещения	Диапазон перемещения	Дискретность перемещения
Смещение вершины кристалла-монохроматора, Δ	0,5 мм	$1,5 \cdot 10^{-4}$ мм
Поворот вокруг осей α и β	$16^\circ (\pm 8^\circ)$	$5^\circ \cdot 10^{-3}$
Поворот вокруг оси Ω , грубый	$69^\circ (-5 \div 64^\circ)$	$2,2^\circ \cdot 10^{-2}$
Поворот вокруг оси ω , точный	$3,6 \cdot 10^{-2}^\circ$	$4^\circ \cdot 10^{-5}$
Линейное перемещение x	16 мм	$6 \cdot 10^{-3}$ мм
Линейное перемещение z	38 мм	$5 \cdot 10^{-3}$ мм

В табл. 2 собраны основные показатели, характеризующие возможности монохроматора. Дискретность выбора нужной длины волны оцениваем из дискретности поворота вокруг оси Ω монохроматора, дифференцируя формулу Вульфа — Брэгга:

$$\delta\lambda = \lambda \operatorname{ctg}\theta \delta\theta.$$

Для «грубого» поворота $\delta\lambda \sim 2 \cdot 10^{-3} \text{ \AA}$, для «тонкого» не хуже 10^{-5} \AA .

Смещение кончика монохроматора с дискретностью $\delta\Delta$ приводит к дискретности установки R и P' :

$$\delta R = \frac{1}{2} \left(\frac{L}{\Delta} \right)^2 \cdot \delta\Delta,$$

$$\delta P' = \frac{4P'^2}{L^2 \sin(\theta - \alpha)} \cdot \delta\Delta,$$

что следует из (2) и (7). Отсюда легко вычислить возможный вклад неточности установки P' в энергетическое разрешение монохроматора (9) при выполнении условий Гинье:

$$\delta \left(\frac{\Delta\lambda}{\lambda} \right) = \frac{2\delta\Delta}{L} \sim 10^{-6}.$$

Настройка на нужную длину волны и на максимальную плотность монохроматизированного излучения производится с помощью ионизационной камеры и набора фольг с известными краями поглощения. Показания ионизационной камеры выдаются на экран дисплея как в цифровой, так и в графической форме. Первоначально по свечению люминесцентного экрана находится край поглощения фольги, соответствующий искомой длине волны, после чего его положение уточняется с помощью монитора с узкой вертикальной щелью, расположенной перед ним. Зафиксировав положение щели, которое отвечает углу 2θ для данного края поглощения, путем последовательного изгиба кристалла-монохроматора и поворота вокруг оси ω добиваются максимальной интенсивности излучения, проходящего через щель, что соответствует максимальной плотности потока монохроматизированного излучения. Данная процедура проводится автоматически с помощью ЭВМ.

5. СЪЕМКИ БЕЛКОВ

Для снижения уровня ошибки, возникающей (при регистрации дифракционной картины на одну фотопленку) из-за непрерывного падения интенсивности пучка со временем (в среднем уменьшение для ВЭПП-3 пучка на 1% происходит за 3 минуты), в стандартную камеру Арндта — Вонакотта внесено изменение, позволяющее проводить съемку при высоких скоростях вращения с большим количеством колебаний. Такая модернизация снижает ошибку,

связанную с дрейфом пучка, до допустимого уровня. В 1988 году на созданной станции был проведен ряд первых контрольных съемок. В качестве объектов были выбраны радиационно устойчивые кристаллы каталазы из *Micrococcus lysodeikticus* [10] и кристаллы пирогосфатазы из *E. Coli* [11]. Характеристики этих объектов представлены в табл. 3. Наборы дифракционных данных были получены с использованием одного кристалла каждого белка,

Таблица 3

Характеристики объектов

Белок	Параметры ячейки, Å	Молекулярный вес независимой части	Размер кристаллов, мм	Разрешение съемки, Å
* <i>Micrococcus lysodeikticus</i> каталаза	P4 ₂ 2 ₁ 2 a = b = 106,6 c = 106,3	58000	0,3 × 0,5 × 0,5	1,8
* <i>E. Coli</i> пирогосфатаза	R32 a = b = 110,4 c = 155,4	36000	0,3 × 0,2 × 0,35	2,5
*Карбоксипептидаза T	P6 ₃ 22 a = b = 159,5 c = 106,9	38000	0,3 × 0,5 × 0,5	2,3
*Тирозин-фенол-лиаза (нативный)	P2 ₁ 2 ₁ 2 a = 75,8 b = 138,0 c = 93,2	90000	0,3 × 0,3 × 0,25	2,7
**Тирозин-фенол-лиаза + (производное)	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ a = 75,7 b = 138,3 c = 93,8	90000	0,7 × 0,7 × 0,4	2,7
**Нитрогеназа	B2 a = 160 b = 212 c = 74 γ = 104,5°	220000	0,3 × 0,3 × 2,0	4,0

* Съемка проводилась с кристаллом-монокристаллом из Si(111), α = 8,25°

** Съемка проводилась с монокристаллом из Ge(111), α = 7°

что особенно существенно для пирогосфатазы, эффективное время жизни которой возросло по крайней мере в 6 раз. В обоих случаях достигнуто высокое разрешение съемки: 1,8 Å для каталазы и 2,5 Å для пирогосфатазы. Условия съемки представлены в табл. 4.

Таблица 4

Условия сбора данных

Белок	Угол колебания, градус	Длина волны, Å	Полный диапазон вращения	Монокристалл	Объем зарегистрированных данных	Ток накопителя, мА	Угловая скорость, с/град
Каталаза	1,0	1,38	C* установка 22° один кристалл	Si	80% с 1,8Å	150	750
Пирогосфатаза	2,5	1,38	C* установка 17° один кристалл	Si	75% до 25Å	150	500
Тирозин-фенол-лиаза	1,0—2,0	1,38	C* установка 62° 7 кристаллов	Si	75% до 2,8Å	100	1000
Карбоксипептидаза	1,0	1,38	C* установка 18° один кристалл	Si	85% от 2,1Å	100	1000
Тирозин-фенол-лиаза +	1,5	1,49	C* установка 90° 3 кристалла	Ge	95% до 2,7Å	150	250
Нитрогеназа	1,5	1,49	C* установка 125° 7 кристаллов	Ge	75% до 4Å	150	400

Время сбора данных составило 10 часов для каталазы и 6 часов для пирогосфатазы. Использовался монокристалл из Si с α = 8,25°.

Для сравнения со стандартным рентгеновским источником, были получены рентгенограммы вращения от тех же кристаллов белков на трубке с вращающимся анодом GX-20 (40 кВ, 40 мА, β-фильтр, Cu K_α). Диаметр коллиматора пришлось уменьшить от 0,6 мм при использовании СИ до 0,3 мм для каталазы и 0,4 мм для

пирофосфатазы, чтобы избежать перекрытия рефлексов. Сравнение показало, что выигрыш во времени в данном случае от применения СИ составил 30—40 раз, качество рентгенограмм, полученных на СИ, существенно выше, как по разрешению съемки, так и по уровню фона (рис. 9).

Обработка пленок проводилась на автоматическом денситометре Optronics, по комплексу программ AW-NORD [9]. Шаг сканирования и растр светового пучка составил 50 мкм. Матрицы ориентации вычислялись по парам рентгенограмм, снятым через 90° по ф. Эмпирическая оценка интервалов отражения дала 0,15° для кристалла каталазы и 0,2° для пирофосфатазы.

Типичная рентгенограмма вращения для каталазы содержала до 5,5 тыс. отражений. Примерно 150 из них выбраковывалось из-за перекрытия и 40 из-за ограниченного динамического диапазона рентгеновской пленки. Отметим, что регистрация велась на рентгеновскую пленку РТ-1В (Шостка), имеющую уровень вуали 0,06 ОД. Было обнаружено, что уровень вуали быстро растет со временем и после четырех месяцев хранения пленки составляет величину 0,3 ОД, что сравнимо с плотностью почернения от некогерентного рассеяния и приводит к ухудшению статистических показателей (особенно для слабых отражений). Результаты обработки рентгенограмм представлены в табл. 5.

Таблица 5

Результаты обработки

Белок	Разрешение	Общее количество рефлексов	Количество независимых	Количество (%) с $I > \sigma$	R
Каталаза	1,8	85857	37972	71,6	0,125
Тирозин-фенол-лиаза (производное)	2,7	125779	24435	82,1	0,098

R-факторы по структурным множителям симметричных отражений составили 9 и 12,5%, соответственно, для рефлексов в одном пакете и по всем пакетам. Сравнение набора отражений для каталазы с набором данных, полученным на дифрактометре КАРД-4 с двумерным детектором [2], дало R-фактор равный 0,042 для разрешения 2,5 Å.

$$R = \frac{\sum_h |F_{1h} - F_{2h}|}{\sum_h |F_{1h} + F_{2h}|}$$

Кроме описанных съемок, которые позволили убедиться в достаточно высоком качестве получаемых данных, собраны наборы данных для кристаллов белков карбоксипептидазы, тирозин-фенол-лиазы (нативный и производное) и нитрогеназы. Две последние съемки проведены с использованием кристалла-монокроматора из Ge(111), $\alpha = 7^\circ$, что позволило увеличить скорость съемки в 2—2,5 раза. Информация о кристаллах и параметрах съемок собрана в табл. 3 и 4. Остановимся подробно на съемке кристаллов тирозин-фенол-лиазы [12], поскольку эти данные к настоящему времени уже обработаны и использованы при расшифровке структуры. На источнике с вращающимся анодом предел разрешения нативных кристаллов этого фермента составляет 2,7 Å. При проведении тест-съемок с использованием СИ на мелких кристаллах ТФЛ было замечено увеличение дифракционного поля до 2,5 Å. Аналогичный результат был получен группой К. Вильсона на накопителе DORIS (ФРГ, неопубликованные данные), которой удалось с крупных кристаллов нативной ТФЛ собрать полный набор дифракционных данных с разрешением 2,5 Å.

Трудности при съемке кристаллов ТФЛ возникают из-за быстрого радиационного распада. На пучке от рентгеновской трубки с неподвижным анодом для рефлексов, соответствующих разрешению 5 Å, затухание составляет величину порядка 1%/час. По нашим оценкам, эффективное время жизни кристаллов на пучке СИ возросло в 7—8 раз: полный набор отражений для уранильного производного ТФЛ был собран с трех кристаллов с разрешением 2,7 Å за 12 часов пучкового времени. R-фактор по симметричным отражениям составил 0,098, при этом в суммирование включались отражения с $I > \sigma$ (табл. 5). Получение этого набора дифракционных данных позволило перейти к расшифровке структуры ТФЛ с высоким разрешением.

Авторы благодарят Г.Н. Кулипанова и Б.К. Вайнштейна за поддержку и интерес к работе, В.Р. Мелик-Адамана, Г.Н. Муршудова, К.М. Полякова, Н.Н. Чиргадзе, Н.И. Сосфенова за предоставление кристаллов белков и помощь во время съемок, Б.П. Толочко и сотрудников его группы за помощь при создании и монтаже станции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Arndt U.W., Wonacott A.J. The Rotation Method in Crystallography. — North Holland, Amsterdam, 1978.
2. Andrianova M.E., Kheiker D.M., Popov A.N. et al. J. Appl. Cryst., 1982, v.15, p.626—631.
3. Harrison S.C., Winkler F.K., Schutt C.E., Durbin R.M. Oscillation Method with Large Unit Cells. — In: Methods in Enzymology, v.114., p.211—237, Academic Press, 1985.
4. Bartunik H.D., Fourme R., Phillips J.C. Macromolecular Crystallography using Synchrotron Radiation. — In: Uses of Synchrotron Radiation in Biology, p.145—202. Academic Press, 1982.
5. Мокульская Т.Д., Кузев С.В., Дубнин М.Ю. и др. Препринт ИАЭ-3370/15.
6. Hendrix J., Koch H.J., Bordas J. J. Appl. Cryst., 1979, v.12, p.467—472.
7. Helliwell J.R. Rep. Prog. Phys., 1984, v.47, p.1403—1497.
8. Lemmonier M., Fourme R., Rousseaux F., Kahn R. Nucl. Instrum. Methods, 1978, v.152, p.173—177.
9. Caciuffo R., Melone S., Rustichelli F. Physics Reports, 1987, v.152, N 1, p.1—71.
10. Юсифов Э.Ф., Гребенко А.И., Барынин В.В. и др. Кристаллография, 1989, т.34, вып.6, с.1451—1456.
11. Мороз О.В., Срокопытов Б.В., Оганесян В.Ю. и др. Кристаллография. В печати.
12. Demidkina T.V., Myagkikh I.V., Antson A.A., Harutyunyan E.G. Febs Lettr., 1988, v.232, p.381.

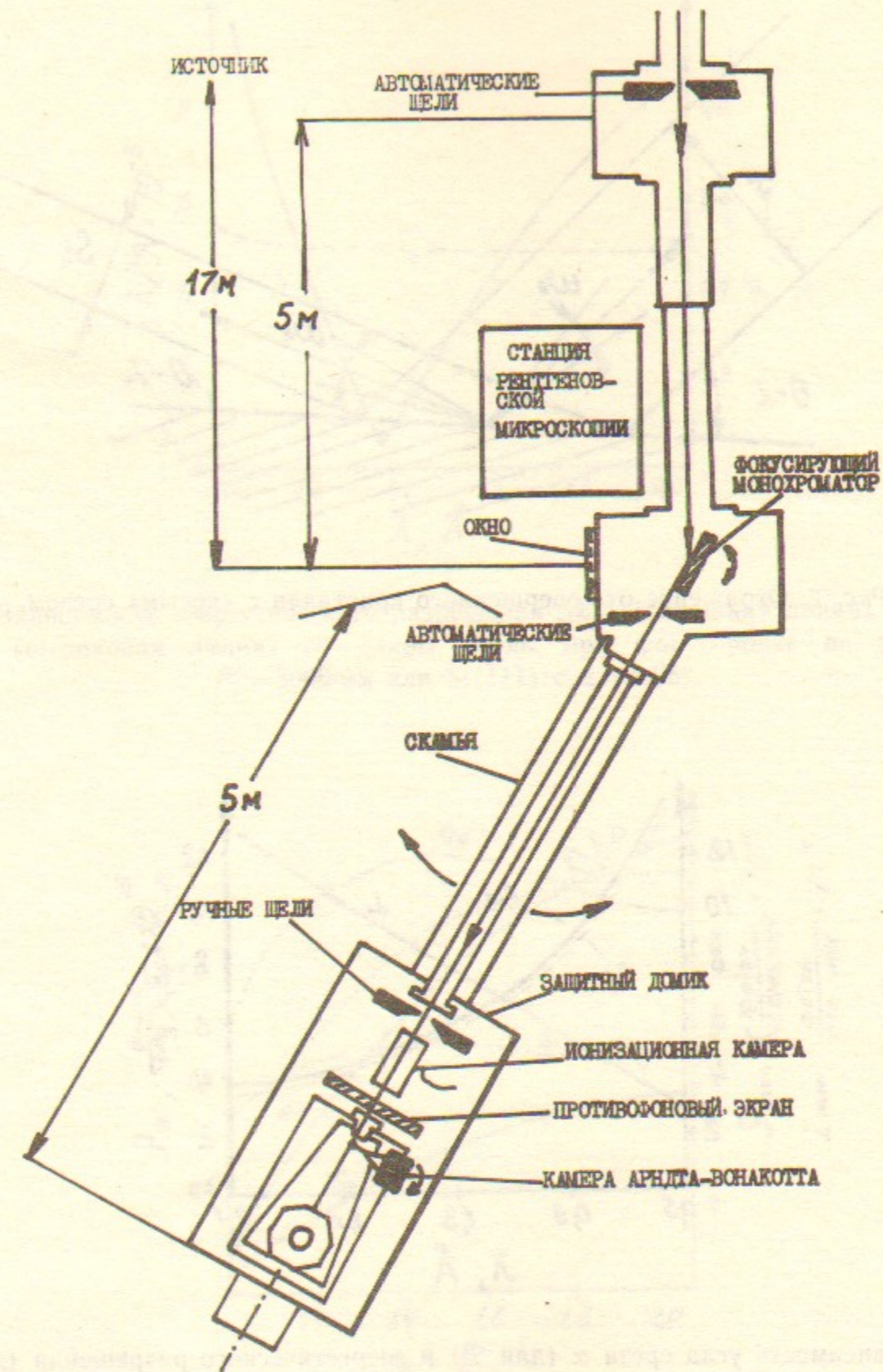


Рис. 1. Блок-схема кристаллографической станции.

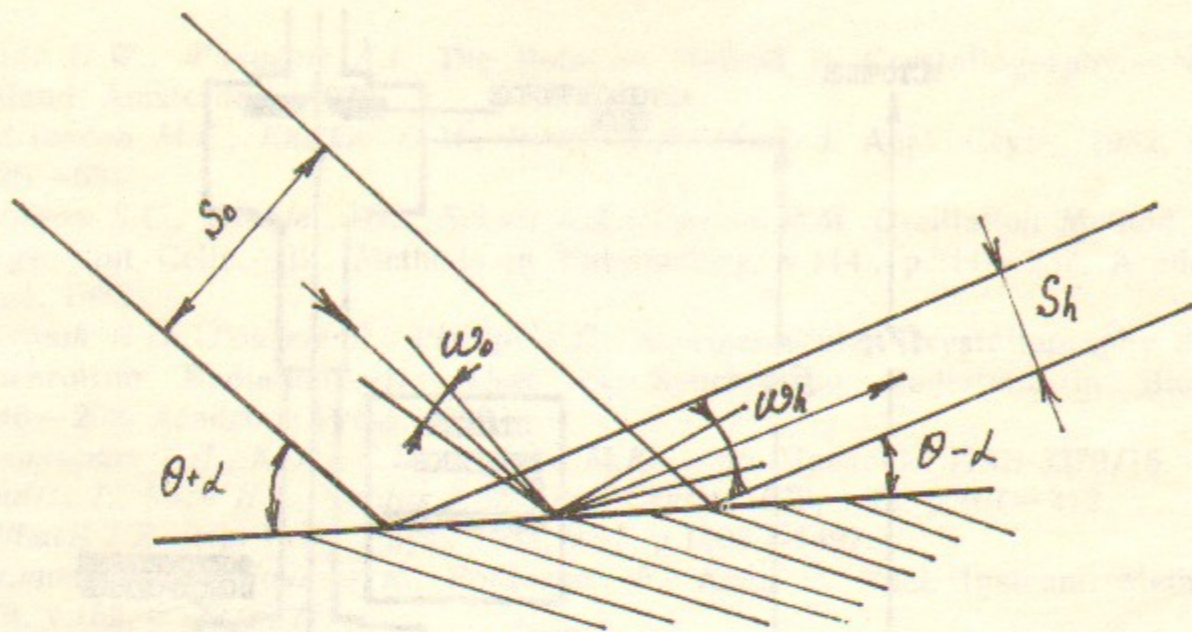


Рис. 2. Отражение от совершенного кристалла с «косым» срезом.

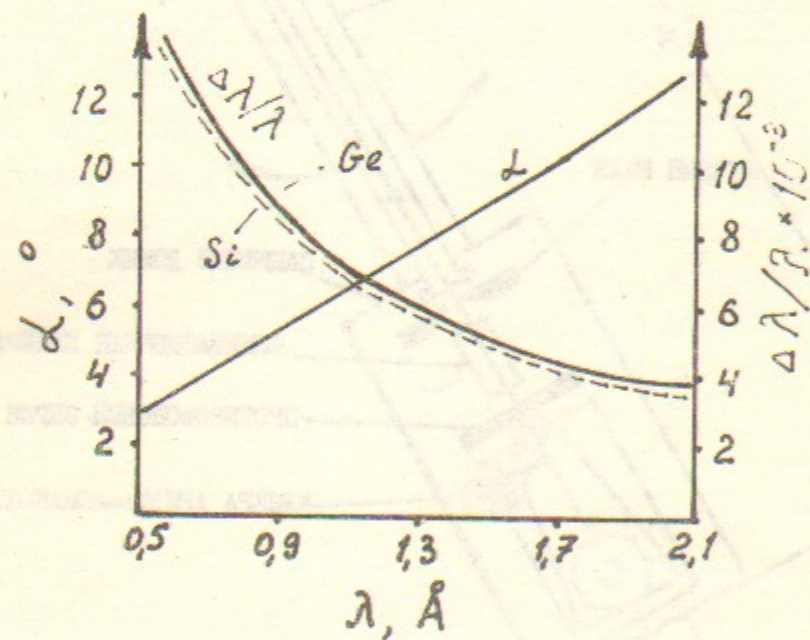


Рис. 3. Зависимость угла среза α (для Si) и энергетического разрешения (для Si и Ge) от длины волны при выполнении условия Гинье ($P=17$ м, $P'=3,6$ м).

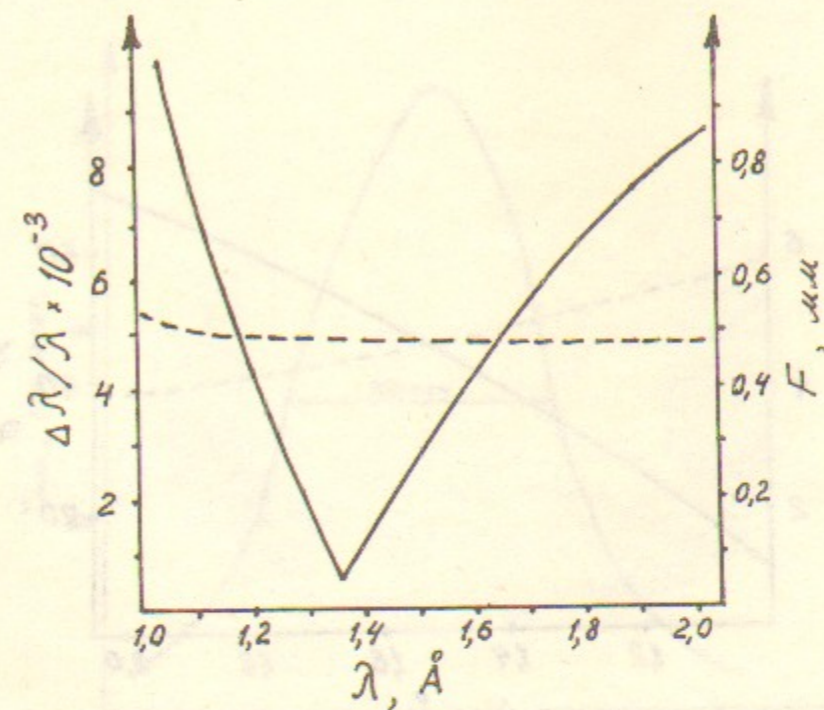


Рис. 4. Зависимость энергетического разрешения $\Delta\lambda/\lambda$ (сплошная линия) и размера фокуса (штриховая линия) от длины волны при фокусировке на расстояние $P'=3600$ мм для Si(111) с $\alpha=8,25^\circ$.

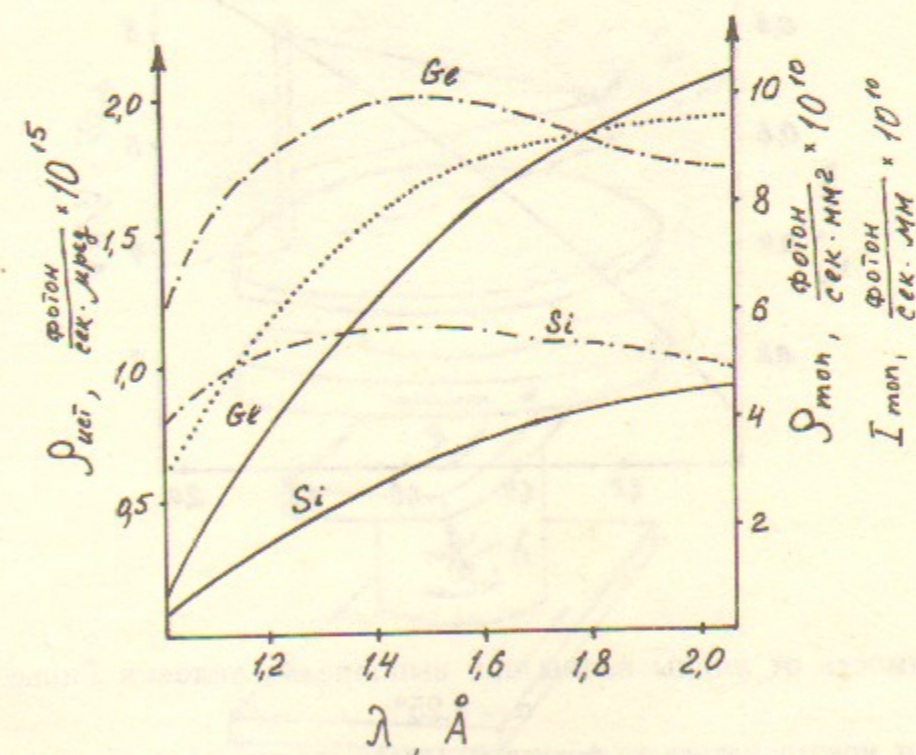


Рис. 6. Зависимости: 1) плотности потока СИ $\rho_{источ}$ проинтегрированного по вертикали при токе $I_{СИ}=100$ мА и $\Delta\lambda/\lambda=1$ (пунктирная линия); 2) плотности потока монохроматизированного излучения в фокусе $\rho_{мон}$ (штрих-пунктирная линия) и потока излучения $I_{мон}$ (сплошная линия) для монохроматоров из Si и Ge с $\alpha=8,25^\circ$ при выполнении условия Гинье от длины волны.

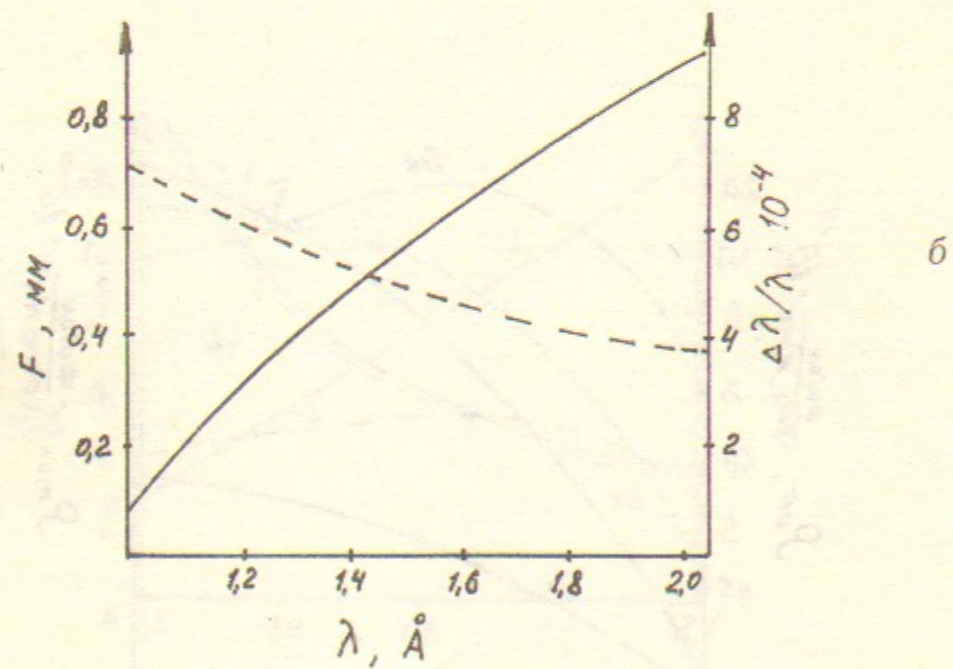
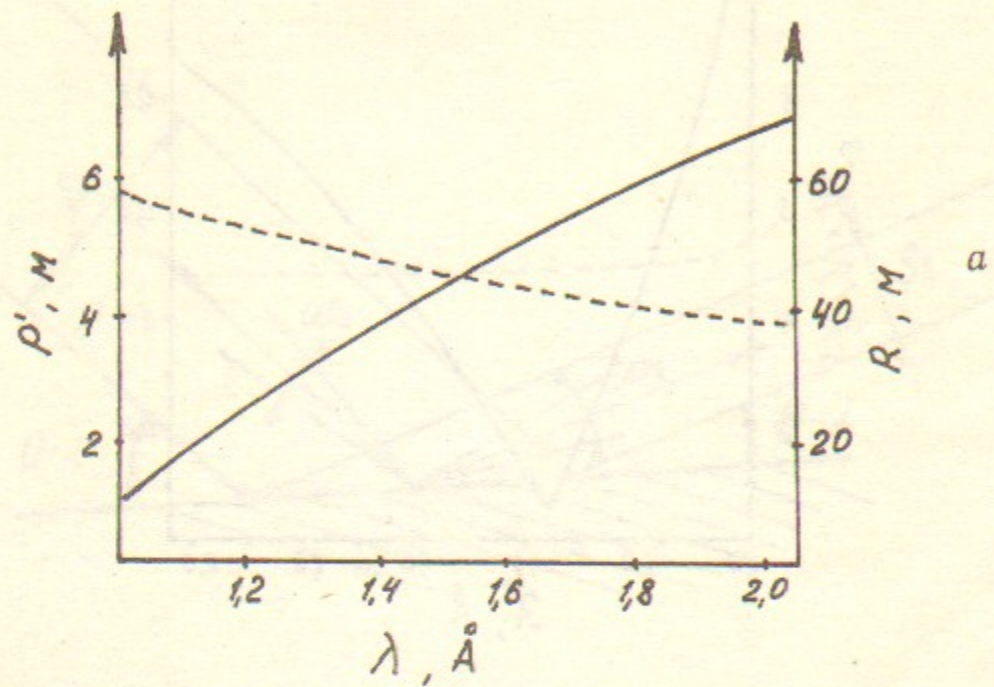


Рис. 5. Зависимость от длины волны при выполнении условия Гинье для Si(111) с $\alpha = 8,25^\circ$:

a — расстояния от монохроматора до фокуса P' (сплошная линия) и радиуса изгиба кристалла R (штриховая линия); b — размера фокуса F (сплошная линия) и энергетического разрешения $\Delta\lambda/\lambda$ (штриховая линия).

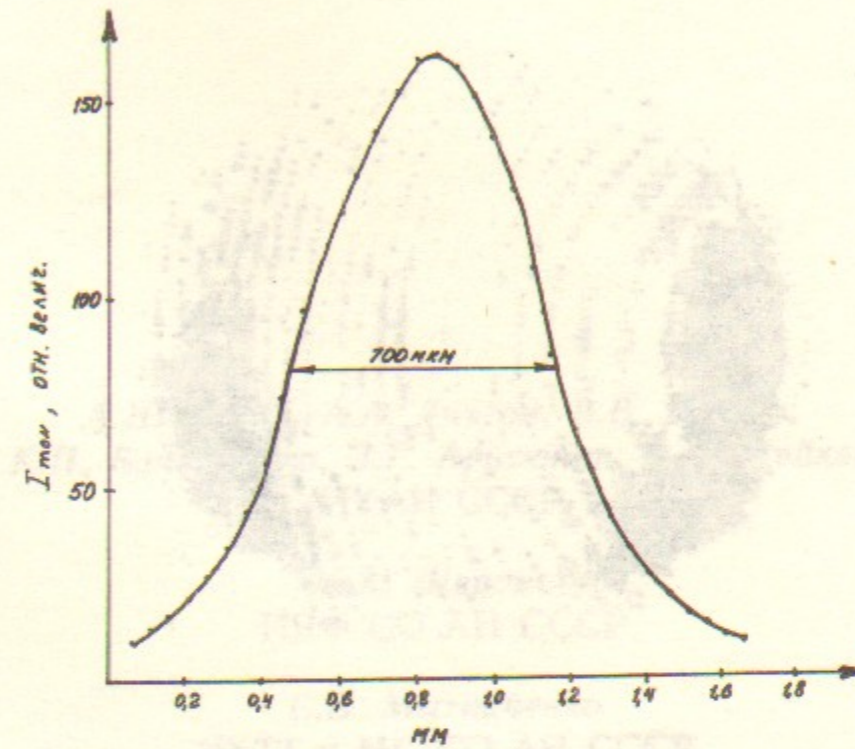


Рис. 7. Экспериментальный профиль пучка от Ge(111) с $\alpha = 7^\circ$.

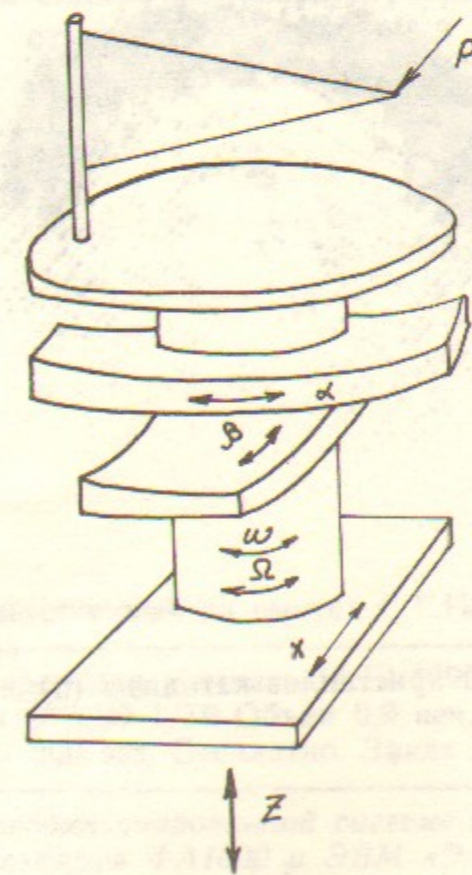
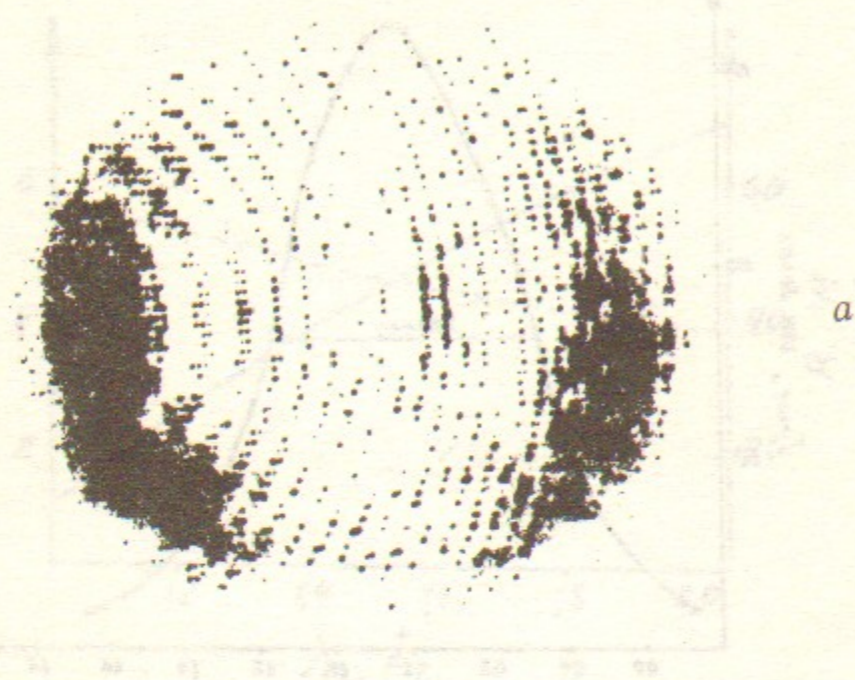
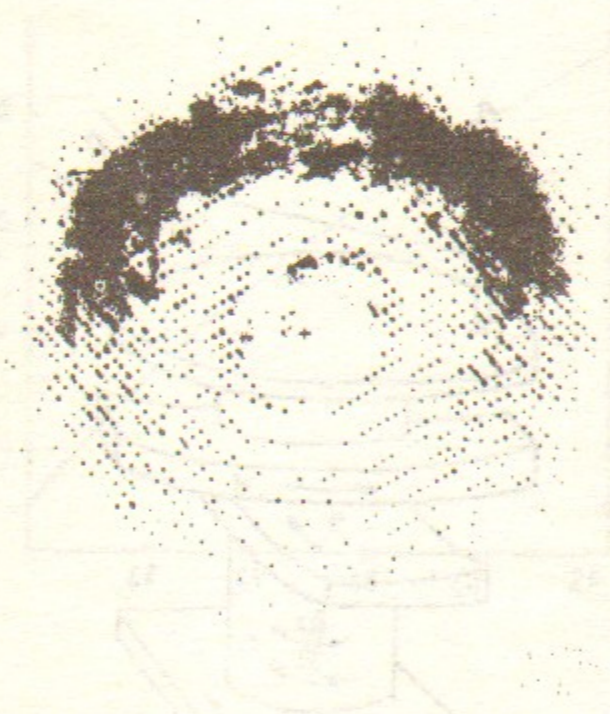


Рис. 8. Схематическое изображение монохроматора.



a



b

Рис. 9. Рентгенограммы от кристаллов каталазы (а) и пирофосфатазы (б).

А.Н. Попов, А.А. Антсон, В.В. Беляев,
К.П. Бондаренко, Э.Г. Арутюнян, Д.М. Хейкер
ИКАН СССР

М.А. Шеромов
ИЯФ СО АН СССР

С.В. Мытниченко
ИХТТ и МС СО АН СССР

**Получение дифракционных данных
для монокристаллов белков
на синхротронном излучении
от накопителя ВЭПП-3**

Ответственный за выпуск С.Г.Попов

Подписано в печать 16.10 1990 г.
Формат бумаги 60×90 1/16 Объем 0,9 печ.л., 0,8 уч.-изд.л.
Тираж 200 экз. Бесплатно. Заказ № 118.

Набрано в автоматизированной системе на базе фото-
наборного автомата ФА1000 и ЭВМ «Электроника» и
отпечатано на ротапринтере Института ядерной физики
СО АН СССР,
Новосибирск, 630090, пр. академика Лаврентьева, 11.