

Введение в биологическую кристаллографию

Лекция 1, 2024 г.

Владимир Юрьевич ЛУНИН

Институт Математических Проблем Биологии РАН

(филиал Института Прикладной Математики
им. М.В. Келдыша РАН)

Пушино

Определение атомной структуры вещества на основе результатов рентгеновского дифракционного эксперимента

- рентгеноструктурный анализ (РСА);
- белковая кристаллография;
- кристаллография макромолекул;
- биологическая кристаллография;
- coherent diffraction imaging;
- рентгеновская микроскопия.

Методы экспериментального определения трехмерной структуры с атомным разрешением

- рентгеноструктурный анализ (дифракция рентгеновских лучей);
- дифракция нейтронов или электронов;
- двумерный ЯМР (ядерный магнитный резонанс);
- трехмерная реконструкция объекта по данным электронной крио-микроскопии.

Теоретический расчет структуры

(квантовая механика; минимизация энергии)

- отдельные атомы, небольшие фрагменты.

Предсказание структуры “по аналогии”

- AlphaFold ...

Биология, медицина

выбор объекта исследования, интерпретация результата

Биохимия

Выделение белка, очистка, кристаллизация

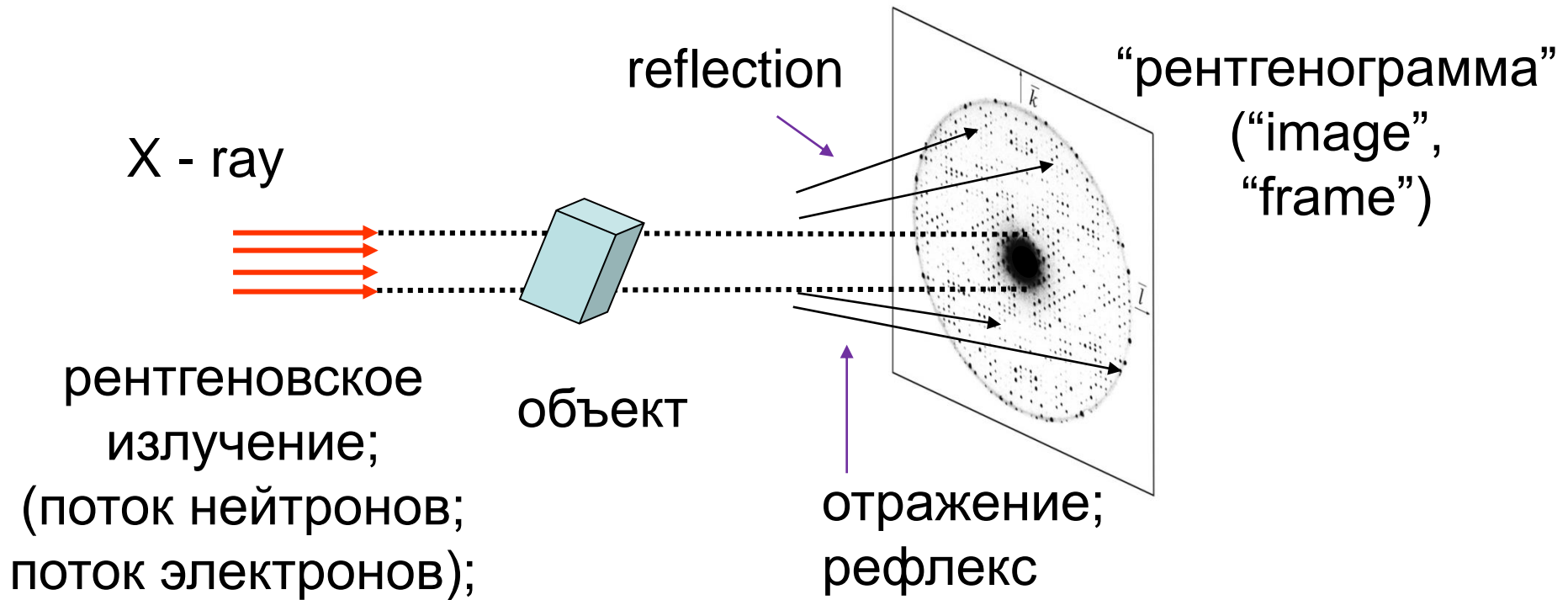
Физика

источники рентгеновского излучения, системы регистрации, теория рассеяния рентгеновских лучей

Математика, компьютерные технологии

алгоритмы решения обратной задачи теории рассеяния, управление экспериментом, обработка экспериментальной информации, визуализация результатов

Дифракционный эксперимент



- изучаем «отраженные» от объекта лучи;
- нет фокусирующих линз;
- вращение объекта – трехмерный набор данных;
- разные объекты – разная картина рассеяния;
- ХОТИМ «восстановить» структуру объекта.

кристаллограф

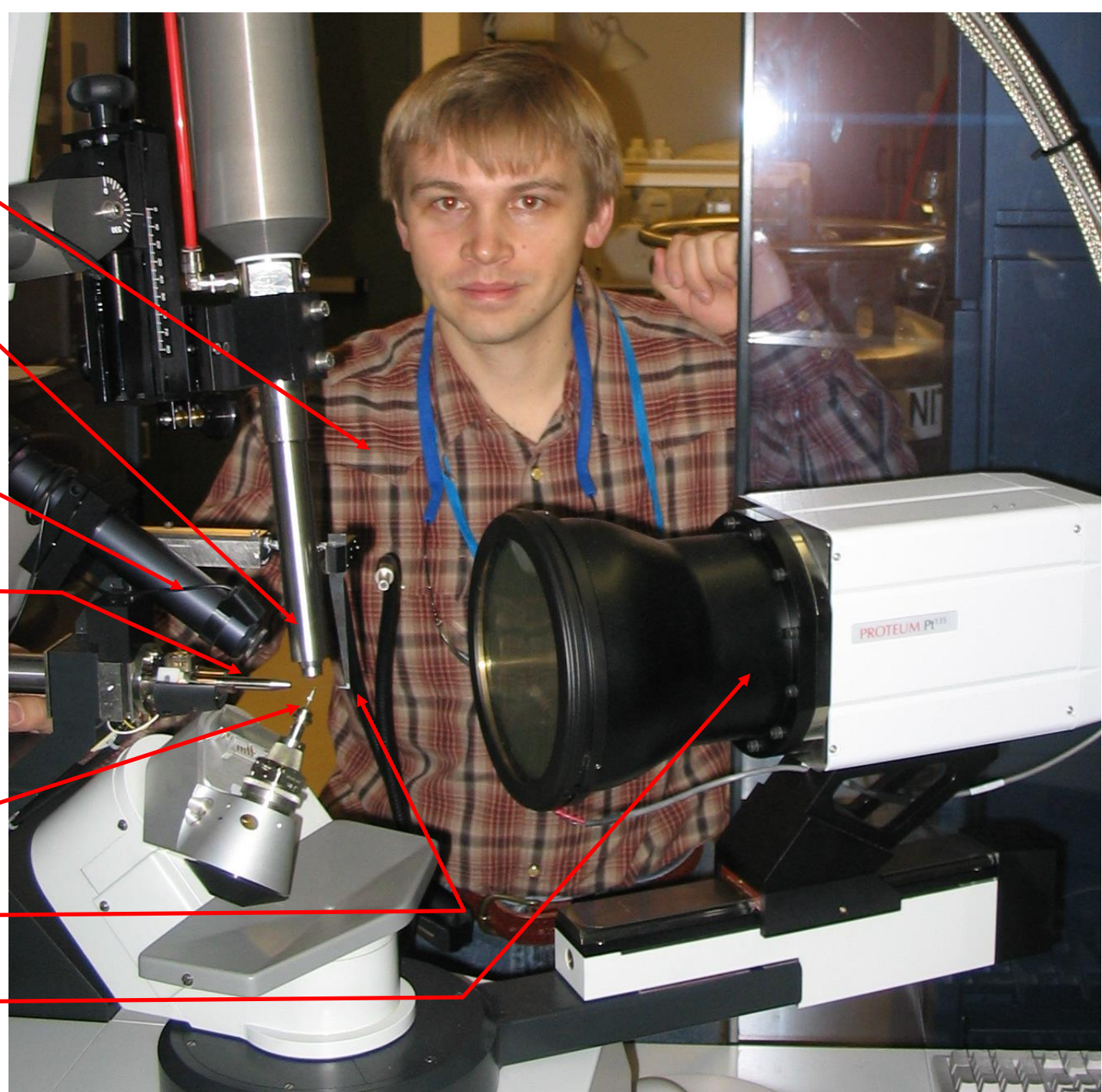
охлаждение
микроскоп

рентгеновский
пучок

образец

заглушка

детектор



Task: Screen Collect and Process

STOP

Sample: rt2

Collection Image Display - C:\Program Files\Rigaku MSC\CrystalClear\Administrator\test1\rt2\Images\rt2_screen0001.osc

Initialize Instrument

Setup

Crystal Evaluation

Mount Crystal

Initial Images

Assign Unit Cell

Strategy

Collect Images

Integrate Reflections

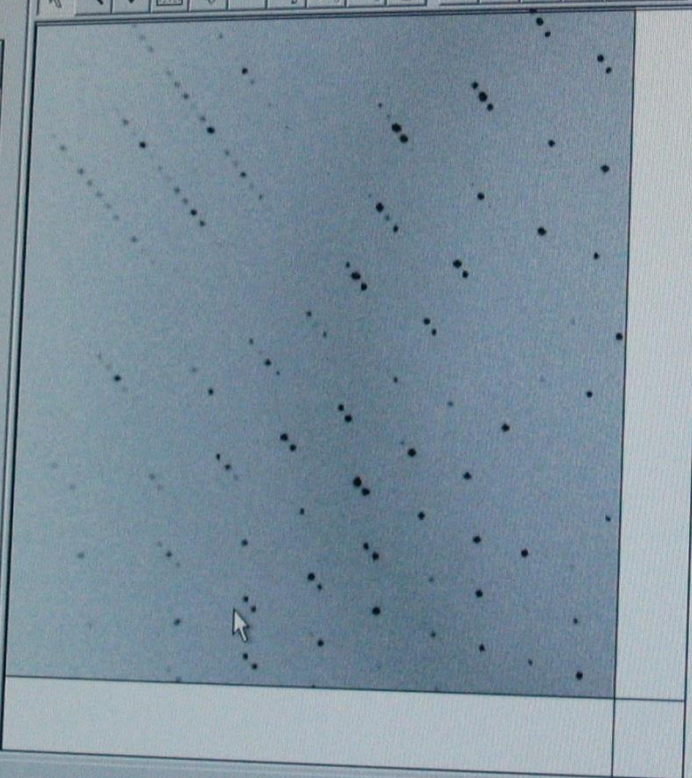


Image name	rt2_screen0001.o
Image number	1
Reflection list	
Start angle (°)	0.00
Image width (°)	0.50
Exposure time (min)	1.00
CrysTo Det dist. (mm)	150.00
Detector 2θ (°)	0.00
Pixel position	2166.9, 816.7
Pixel value	55
Peak intensity	-29.9
Resolution (Å)	2.76 Arcs...
Intensity/Sigma	-0.5
HKL	

Messages:

Mount your crystal and then click OK. Response = OK (11/16/04 17:36:25)

Please secure or lock the sample rotation axis then click OK. Response = OK (11/16/04 17:36:36)

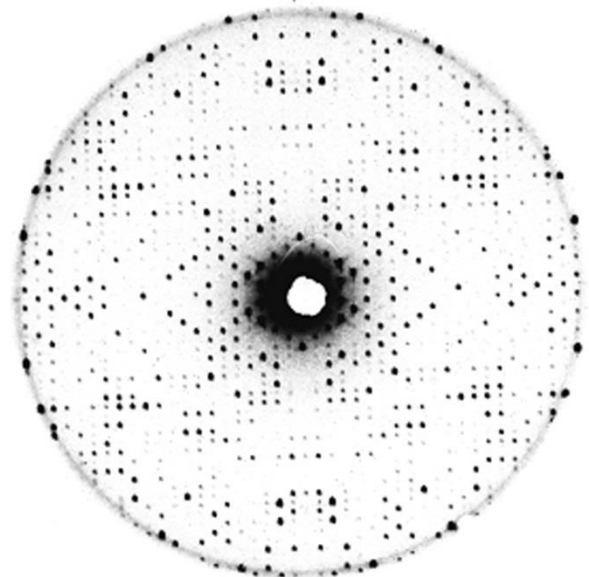
Image C:\Program Files\Rigaku MSC\CrystalClear\Administrator\test1\rt2\Images\rt2_screen0001.osc collected. (11/16/04 17:43:57)

IP2 Reading Estimated scan collection finish time: Tue Nov 16 05:44 PM

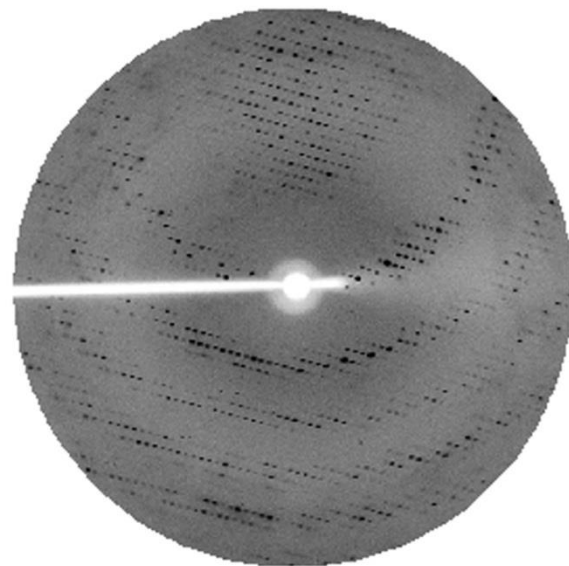
CrystalClear - Sample: rt2

STOP Instrument

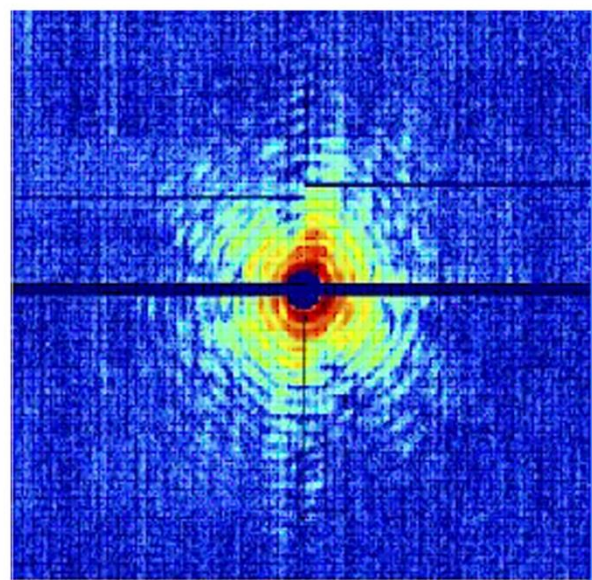




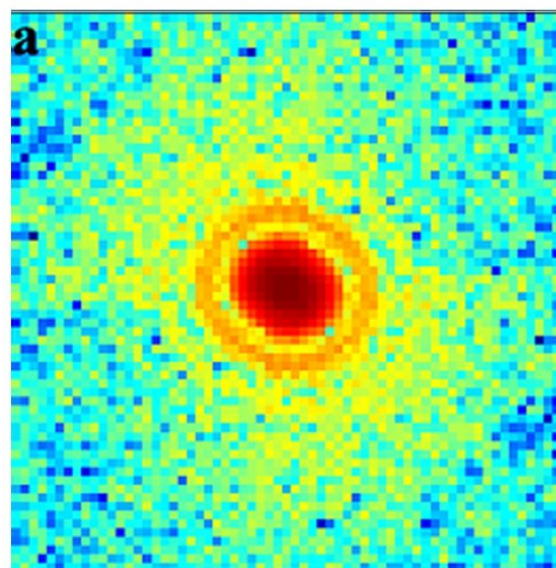
crystal: endonuclease Sm



Petrova *et al.*, 2012, Acta Cryst. F68, 163-165
crystal: DNA ligase



Schot *et al.* 2015 NatCommun.6 5704
live cyanobacteria cell



Song *et al.* 2008 PhysRevLet. 101 158101-4
murine herpesvirus-68 (MHV-68) virions

Метод проб и ошибок

Гипотетическая
структура; координаты
атомов $(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \dots, \mathbf{r}_N)$



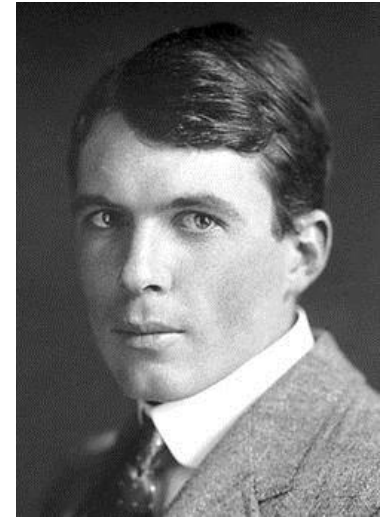
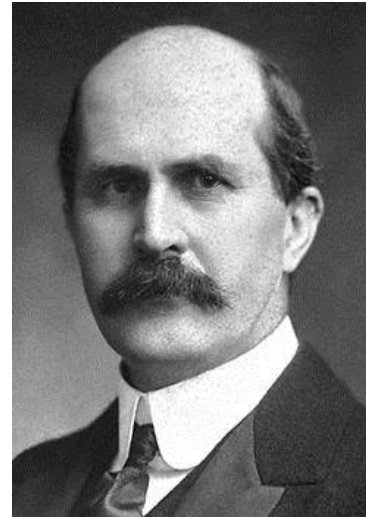
Расчет соответствующей
картины дифракции

$$F(\mathbf{s}_1), F(\mathbf{s}_2), \dots, F(\mathbf{s}_K)$$



Сравнение с
экспериментом

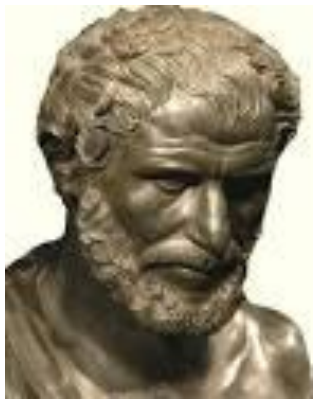
$$R = \sum_{k=1}^K (F^{obs}(\mathbf{s}_k) - F^{calc}(\mathbf{s}_k))^2$$



Sir William Henry Bragg
Sir William Lawrence Bragg

Нобелевская премия 1915 г.

**Кинематическая теория
рассеяния рентгеновских лучей**



V век до н.э.
Демокрит

АТОМЫ

XVII век
Рене Декарт

Координаты



An Information Portal to [225399](#)
Biological Macromolecular
Structures

established in 1971 at Brookhaven National Laboratory

ATOM	719	CG	PRO	A	36	5.814	-20.800	18.406	1.00	5.79
ATOM	720	CD	PRO	A	36	6.304	-19.896	17.288	1.00	5.14
ATOM	728	N	GLY	A	37	6.021	-17.853	20.161	1.00	5.00
ATOM	730	CA	GLY	A	37	6.460	-17.080	21.310	1.00	5.65
ATOM	732	C	GLY	A	37	6.310	-15.586	21.073	1.00	5.00
ATOM	734	O	GLY	A	37	5.798	-15.167	20.034	1.00	5.43
ATOM	742	N	ALA	A	38	6.827	-14.792	22.008	1.00	4.32

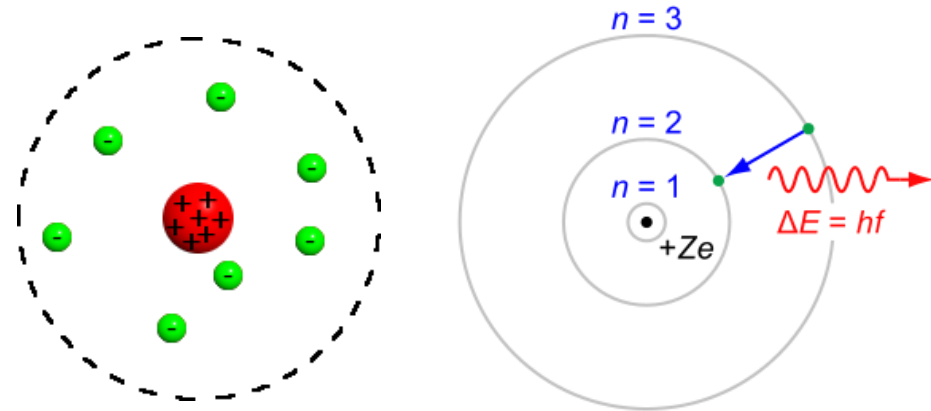
Crambin 327 атомов

Шаперон GroEL 30 000 атомов

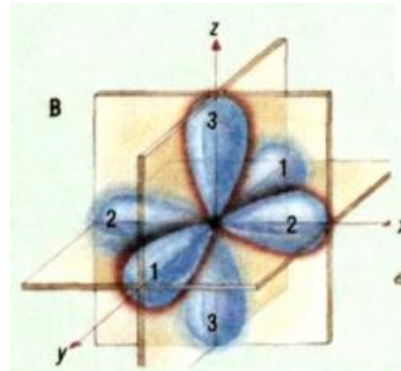
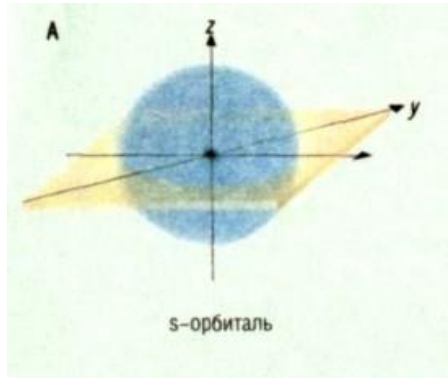
Планетарная модель атома

*“Электрон вокруг протона обращается
Эта штука ‘атом Бора’ называется”*

1911-1913 Эрнест Резерфорд,
Нильс Бор
планетарная модель атома



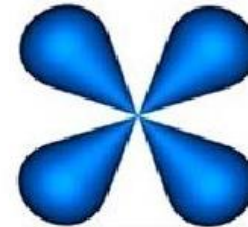
Э.Шредингер, М.Борн
орбитали



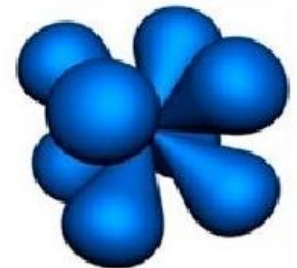
S - орбиталь



P - орбиталь



D - орбиталь

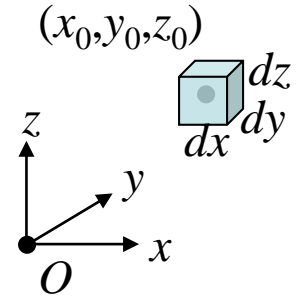
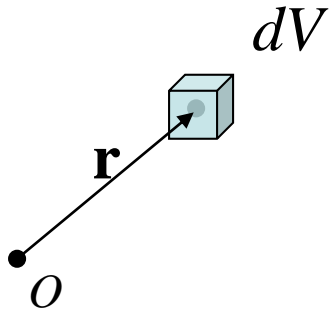


F - орбиталь

Функция распределения электронной плотности

$\rho(\mathbf{r})$ (или $\rho(x,y,z)$) - функция распределения электронной плотности

$\rho(\mathbf{r})dV$ (или $\rho(x_0,y_0,z_0)dxdydz$) - средний (по времени) заряд в объеме dV

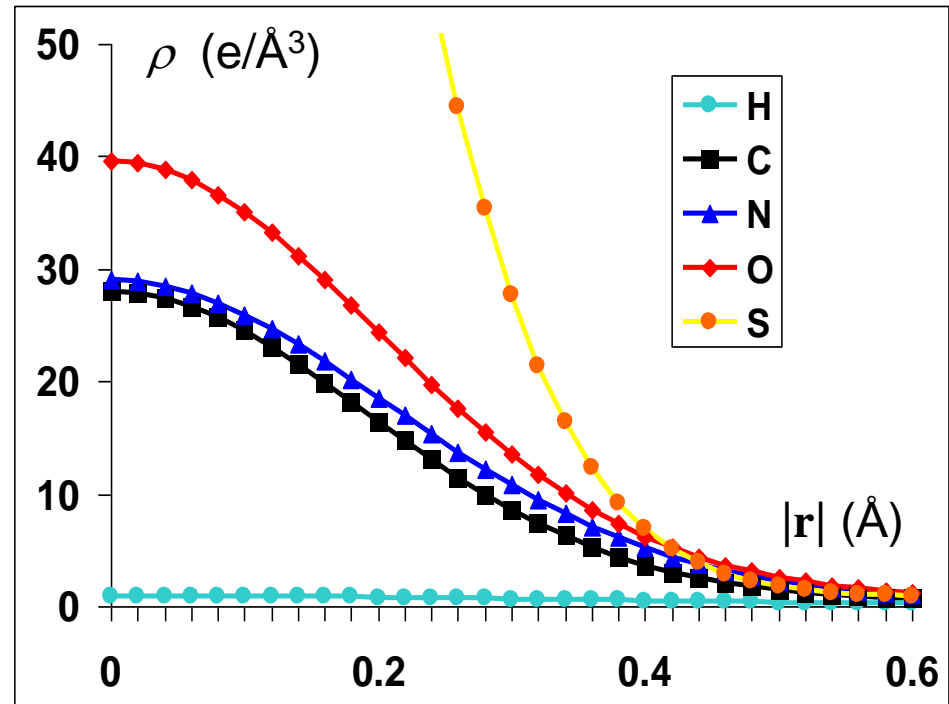


Распределение электронной плотности в атоме (гауссово приближение)

$$\rho(\mathbf{r}) \approx \alpha \exp\left(-\frac{|\mathbf{r}|^2}{\beta}\right)$$

Таблицы:

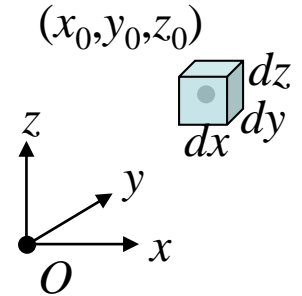
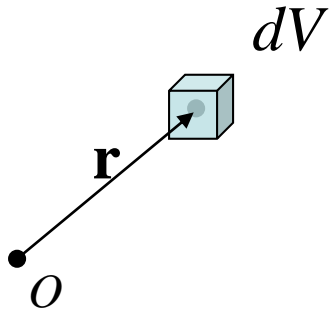
5-гауссовое приближение



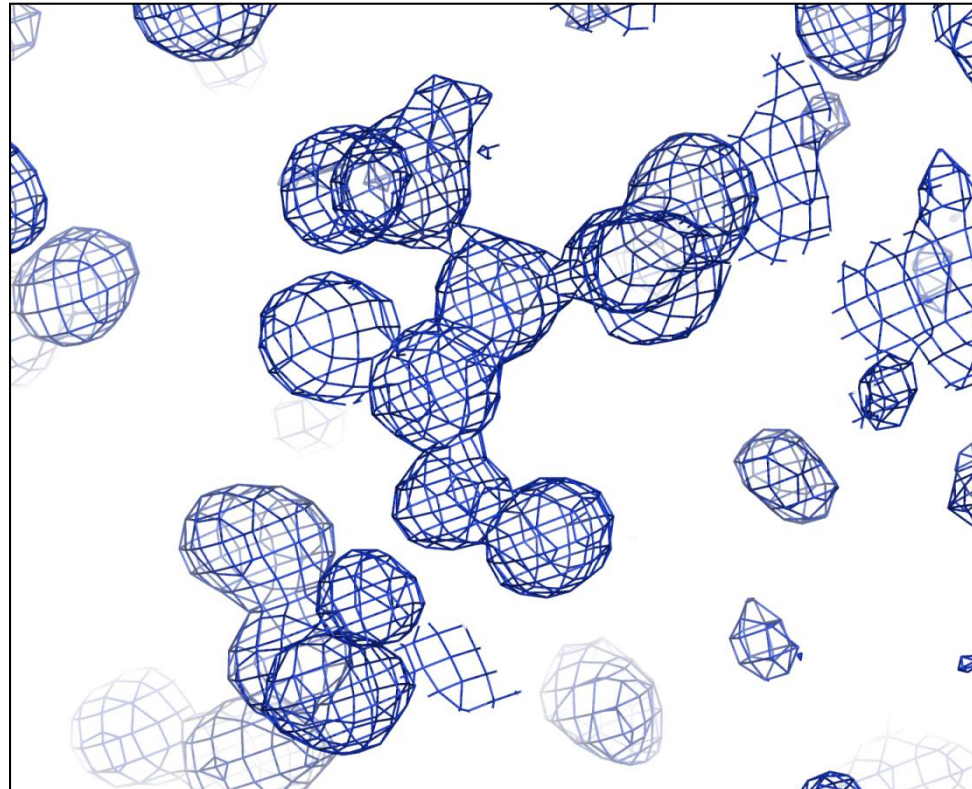
Electron density distribution

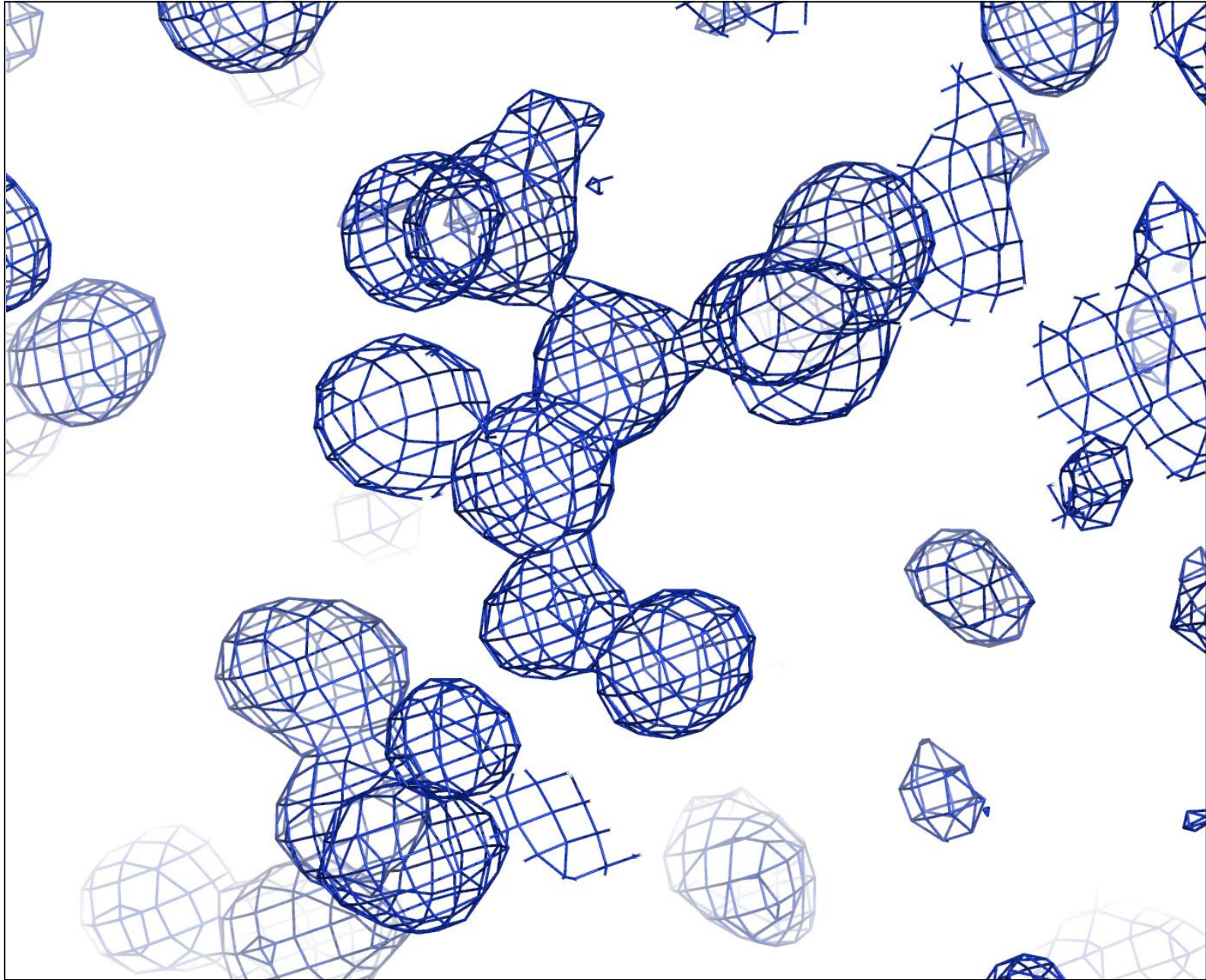
$\rho(\mathbf{r})$ (или $\rho(x,y,z)$) - функция распределения электронной плотности

$\rho(\mathbf{r})dV$ (или $\rho(x_0,y_0,z_0)dxdydz$) - средний (по времени) заряд в объеме dV



Распределение электронной плотности в белке альдоз-редуктазе (экспериментально полученная карта – “синтез Фурье электронной плотности”).

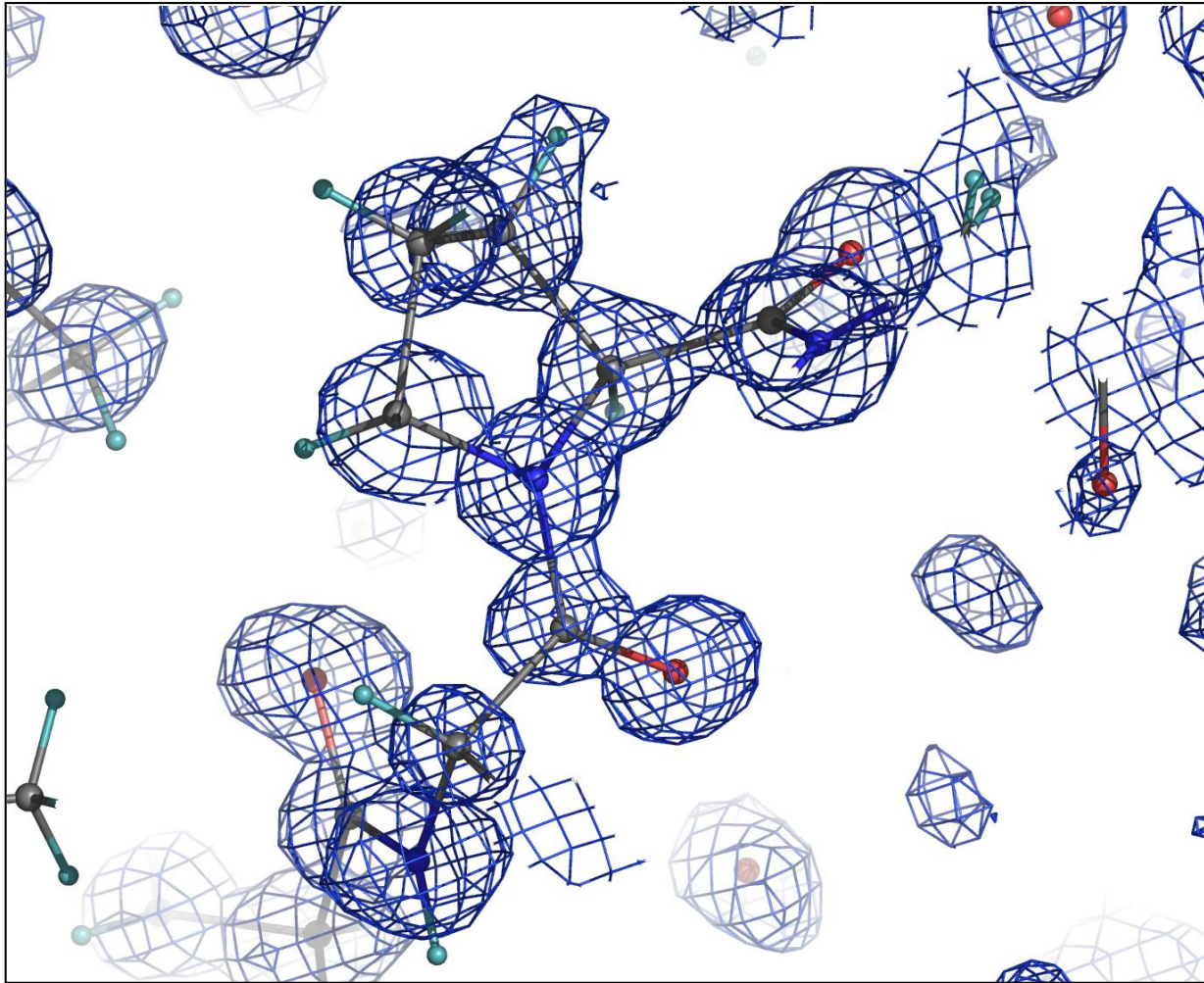




aldose reductase, 0.9Å, MAD

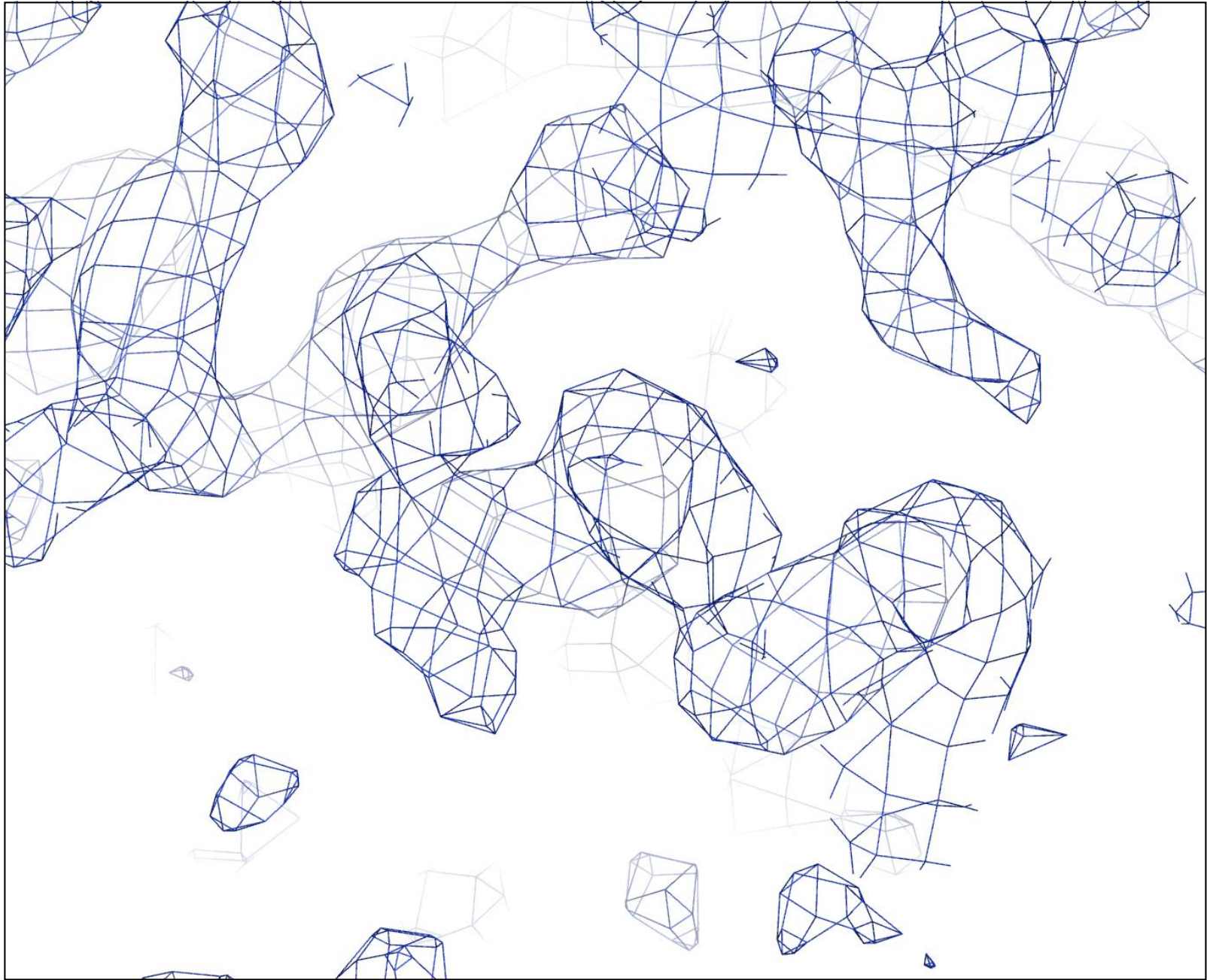
Интерпретация распределения электронной плотности

$$\rho(\mathbf{r}) \approx \sum_{j=1}^{N^{atoms}} \rho_{type(j)}^{atom}(\mathbf{r} - \mathbf{r}_j)$$

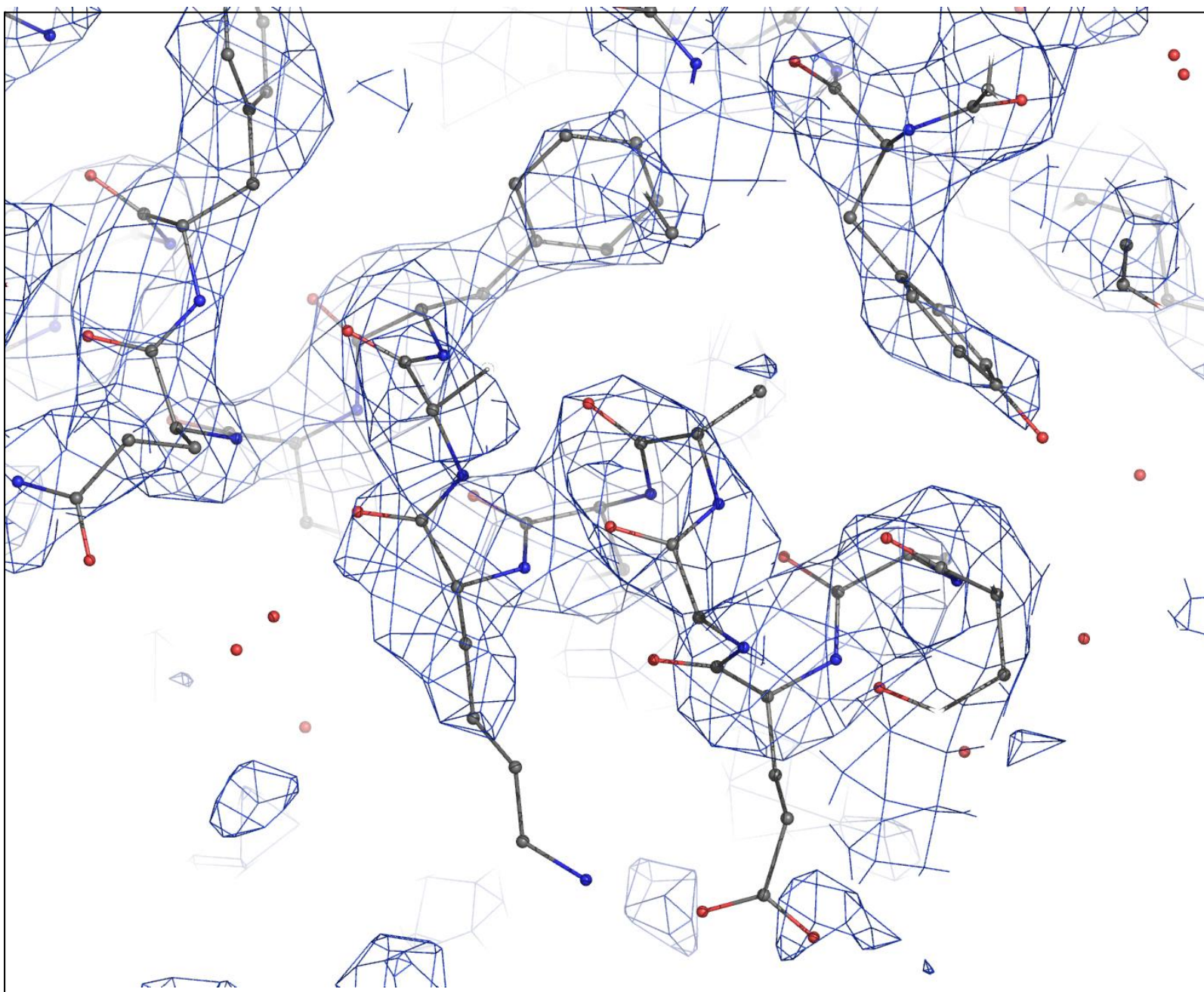


Построение
атомной
модели

PDB



RNase sa, 2.5Å, MIR



RNase sa, 2.5Å, MIR

Интерпретация электронной плотности

Рентгеновский эксперимент дает информацию о распределении электронной плотности в исследуемом объекте.

Удобно представлять электронную плотность в виде суммы вкладов отдельных атомов.

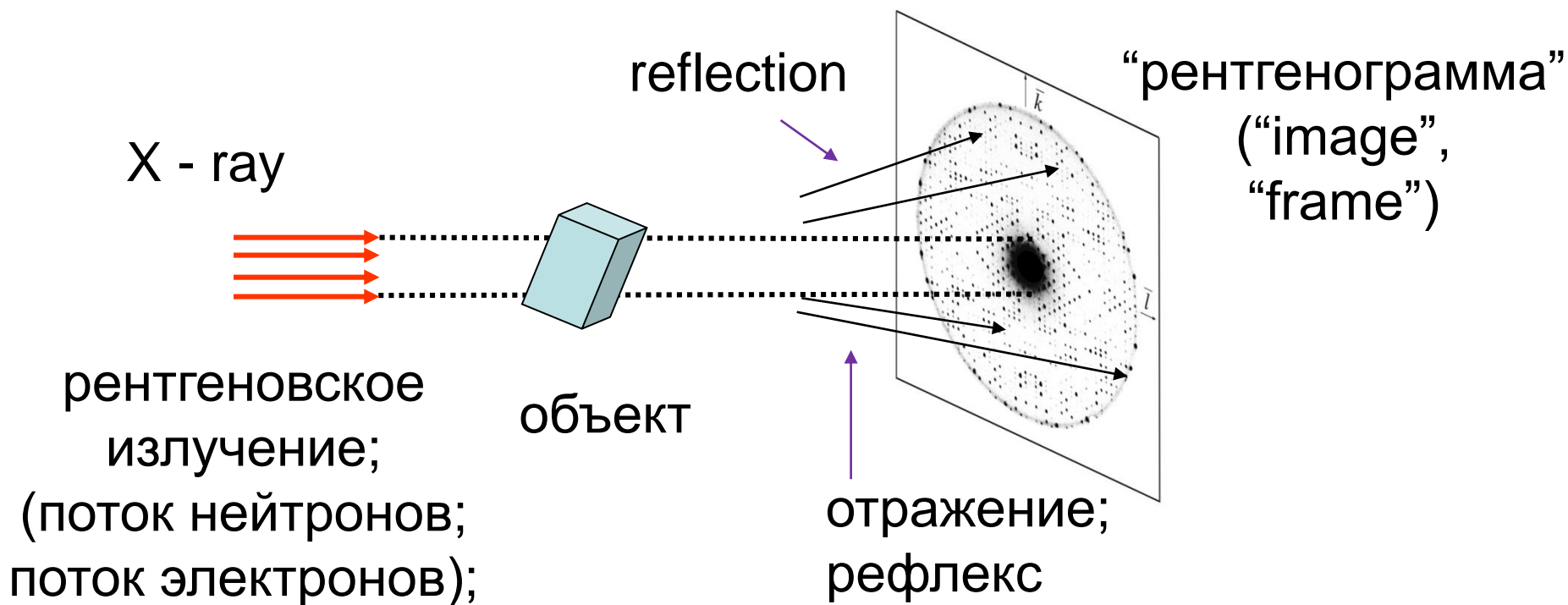
Разбивка плотности на атомы – интерпретация электронной плотности.

В PDB хранится результат интерпретации электронной плотности – координаты атомов.

Как связана картина рассеяния с распределением электронной плотности?

Вопрос 1:

откуда берутся «отраженные» лучи?



Рентгеновские лучи

РСА

$$\lambda \approx 1 \text{ \AA} = 10^{-10} \text{ m}$$

А. Электромагнитная синусоидальная волна:

длина волны λ ; амплитуда волны \mathbf{E} ;

регистрируется интенсивность (энергия) $I \sim |\mathbf{E}|^2$

Б. Поток фотонов:

энергия фотона E_{photon} ; плотность потока фотонов j $\left[\frac{\text{photons}}{\text{\AA}^2 \cdot \text{sec}} \right]$;

регистрируется число фотонов (энергия) $J = j \cdot \Delta S \cdot \Delta t$

Два способа описания взаимосвязаны:

$$E_{\text{photon}} = \frac{hc}{\lambda}, \quad j = \frac{\lambda}{8\pi h} |\mathbf{E}|^2$$

Кинематическая теория рассеяния рентгеновских лучей

Рентгеновские лучи – электромагнитные волны с длиной волны в диапазоне $0.01 - 100 \text{ \AA}$ ($1 \text{ \AA} = 10^{-10} \text{ м}$)

Прямая задача теории рассеяния:

- знаем: как устроен образец (распределение электронов);
- хотим знать: картину рассеяния (направление и интенсивность “вторичных” рентгеновских лучей).

Цель:

получить формулы для расчета интенсивности вторичных лучей при условии, что известно распределение электронов (атомов).

Польза: проверка гипотез; *R*-factor

Электромагнитные волны

Электромагнитное поле

- на заряд q действует сила $\mathbf{F}=q\mathbf{E}$
- \mathbf{E} - вектор напряженности электрического поля
- $\mathbf{E}(\mathbf{r})$ - стационарное электрическое поле
- $\mathbf{E}(\mathbf{r},t)$ - электрическое поле
- электрические поля суммируются
- имеется магнитная составляющая поля $\mathbf{H}(\mathbf{r},t)$

синусоидальная ЭМ волна – специальный вид поля, при котором изменение поля и во времени и в пространстве имеет синусоидальный характер

$q\mathbf{E}(\mathbf{r},t)$ – волна силы, действующей на электрон;

Два подхода к изучению нестационарного поля $\mathbf{E}(\mathbf{r},t)$

“Мгновенный снимок”

Фиксируется момент времени $t=t^0$. Изучается распределение поля в пространстве $\mathbf{E}^0(\mathbf{r})=\mathbf{E}(\mathbf{r},t^0)$.

Фиксация точки наблюдения.

Фиксируем точку наблюдения $\mathbf{r}=\mathbf{r}^0$. Изучаем, как меняется поле в этой точке с течением времени.
 $\mathbf{E}_{\mathbf{r}^0}(t)=\mathbf{E}(\mathbf{r}^0,t)$.

Одномерная электромагнитная волна

$$E(x, t) = E_0 \sin \left[2\pi \left(\frac{x}{\lambda} - vt - \delta \right) \right]$$

$$E(x, t) = E_0 \sin \left[2\pi \left(\frac{x}{\lambda} - vt - \delta \right) \right]$$

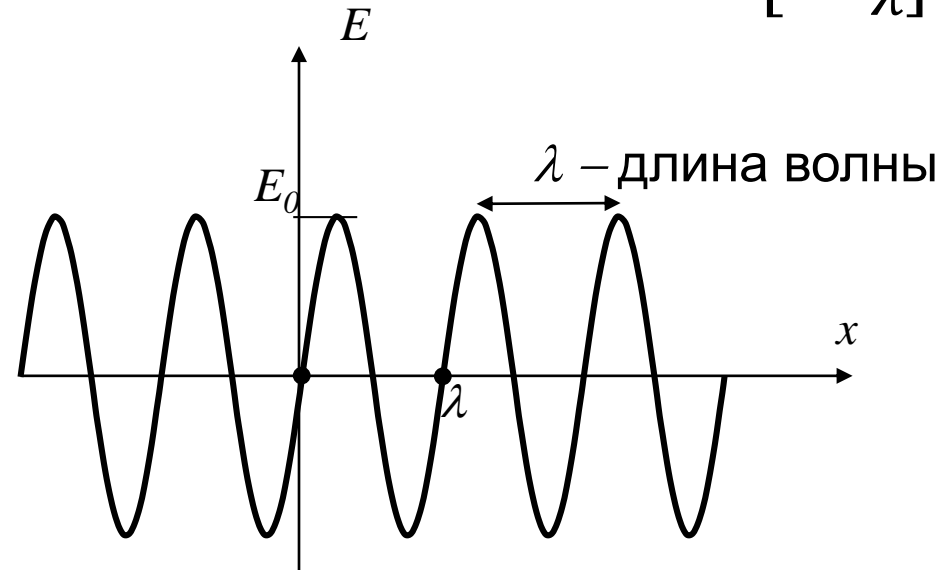
↑
амплитуда волны

↑
"пространственная"
компонента

"мгновенный снимок", время фиксировано

$$t=0, \delta=0$$

$$E(x) = E_0 \sin \left[2\pi \frac{x}{\lambda} \right]$$



РСА:

$$\lambda \approx 1 \text{ \AA} = 10^{-10} \text{ m}$$

λ — "разрешение" синусоиды

Одномерная электромагнитная волна

$$E(x, t) = E_0 \sin \left[2\pi \left(\frac{x}{\lambda} - vt - \delta \right) \right]$$

↑
амплитуда волны

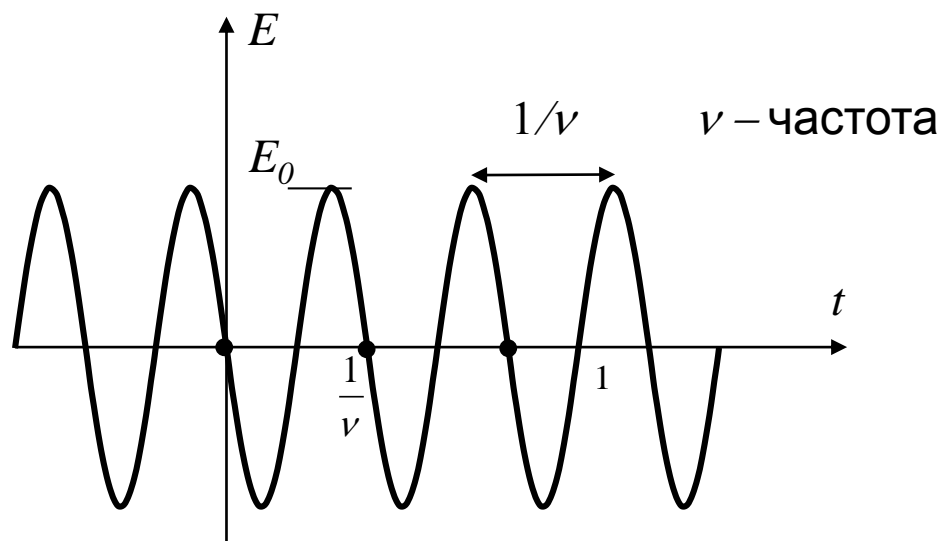
"пространственная"
компонента

"временная" компонента

Точка наблюдения фиксирована

$$x=0, \delta=0$$

$$E(x, t) = E_0 \sin[-2\pi vt]$$



(ν колебаний в единицу времени)

РСА:

$$\nu = \frac{c}{\lambda}, \quad c - \text{ скорость света}$$

- на заряд q действует сила $\mathbf{F}=q\mathbf{E}$
- \mathbf{E} - вектор напряженности электрического поля
- $\mathbf{E}(\mathbf{r},t)$ - электрическое поле

“Бегущая волна”

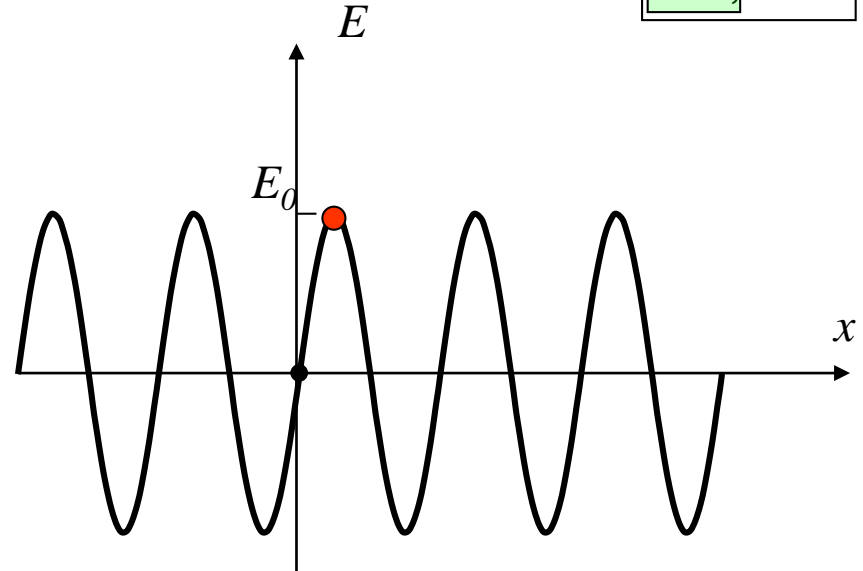
$$E(x, t) = E_0 \sin \left[2\pi \left(\frac{x}{\lambda} - vt - \delta \right) \right]$$

↑
амплитуда волны

“пространственная”
компонента

“временная” компонента

$t=0, \delta=0$



“МГНОВЕННЫЙ СНИМОК”

- на заряд q действует сила $\mathbf{F}=q\mathbf{E}$
- \mathbf{E} - вектор напряженности электрического поля
- $\mathbf{E}(\mathbf{r},t)$ - электрическое поле

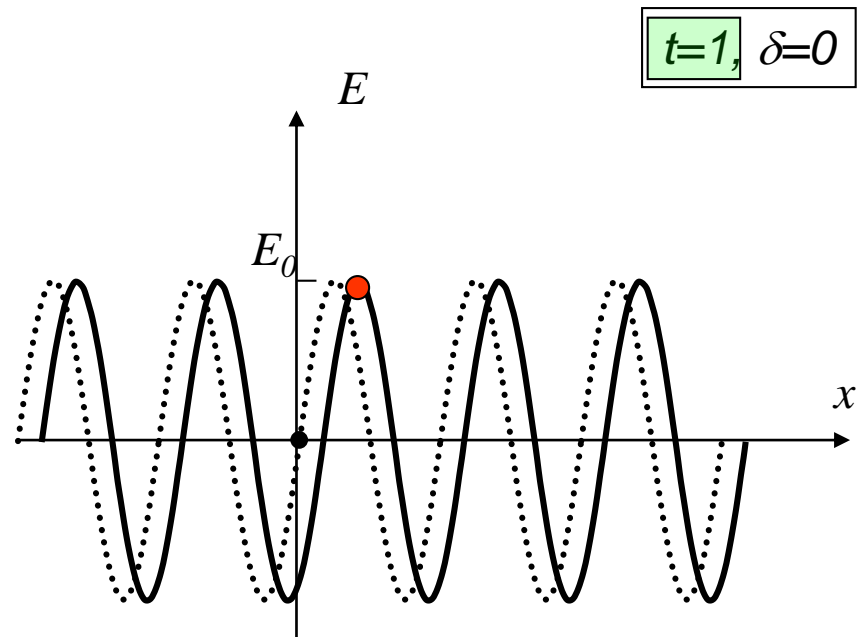
Одномерная электромагнитная волна

$$E(x, t) = E_0 \sin \left[2\pi \left(\frac{x}{\lambda} - vt - \delta \right) \right]$$

↑
амплитуда волны

"пространственная"
компонента

"временная" компонента



"МГНОВЕННЫЙ СНИМОК"

- на заряд q действует сила $\mathbf{F}=q\mathbf{E}$
- \mathbf{E} - вектор напряженности электрического поля
- $\mathbf{E}(\mathbf{r},t)$ - электрическое поле

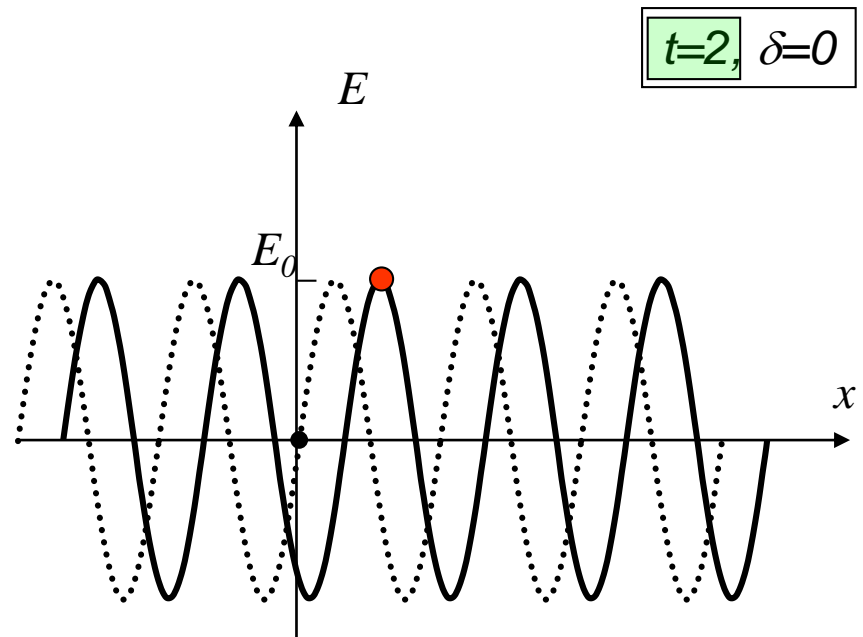
Одномерная электромагнитная волна

$$E(x, t) = E_0 \sin \left[2\pi \left(\frac{x}{\lambda} - vt - \delta \right) \right]$$

↑
амплитуда волны

"пространственная"
компонента

"временная" компонента



"МГНОВЕННЫЙ СНИМОК"

- на заряд q действует сила $\mathbf{F}=q\mathbf{E}$
- \mathbf{E} - вектор напряженности электрического поля
- $\mathbf{E}(\mathbf{r},t)$ - электрическое поле

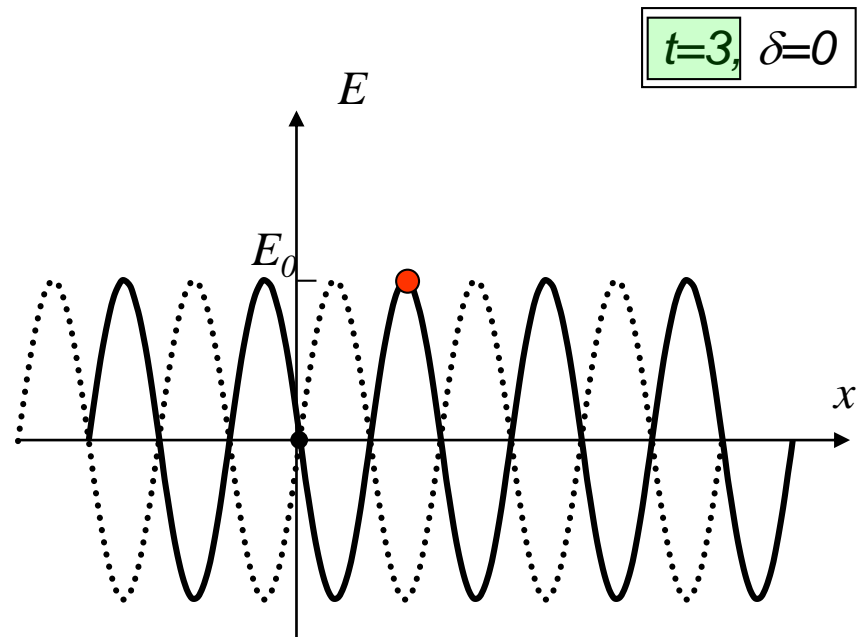
Одномерная электромагнитная волна

$$E(x, t) = E_0 \sin \left[2\pi \left(\frac{x}{\lambda} - vt - \delta \right) \right]$$

↑
амплитуда волны

"пространственная"
компонента

"временная" компонента



"МГНОВЕННЫЙ СНИМОК"

- на заряд q действует сила $\mathbf{F}=q\mathbf{E}$
- \mathbf{E} - вектор напряженности электрического поля
- $\mathbf{E}(\mathbf{r},t)$ - электрическое поле

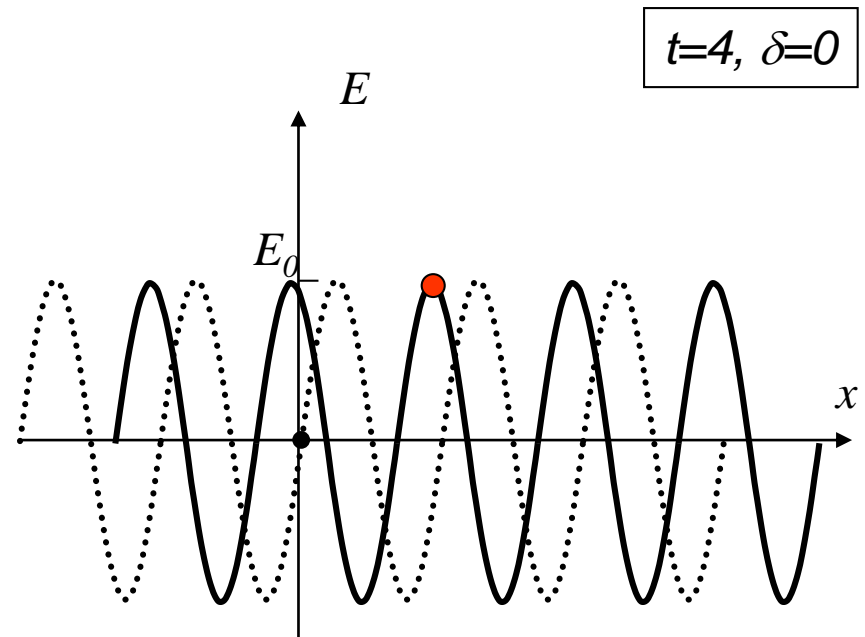
Одномерная электромагнитная волна

$$E(x, t) = E_0 \sin \left[2\pi \left(\frac{x}{\lambda} - vt - \delta \right) \right]$$

↑
амплитуда волны

"пространственная"
компонента

"временная" компонента



$t=4, \delta=0$

"МГНОВЕННЫЙ СНИМОК"

$$E(x, t) = E_0 \sin \left[2\pi \left(\frac{x}{\lambda} - vt - \delta \right) \right]$$

↑
амплитуда волны

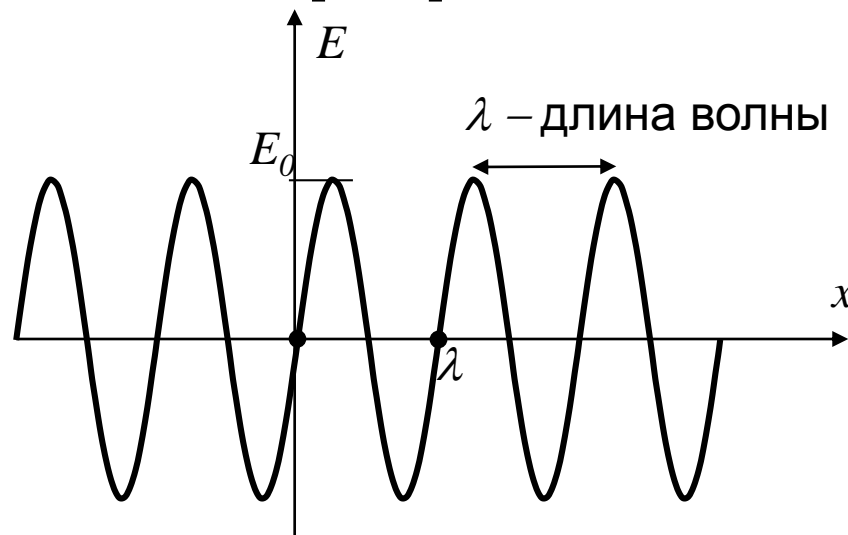
"пространственная"
компонента

"временная" компонента

фаза

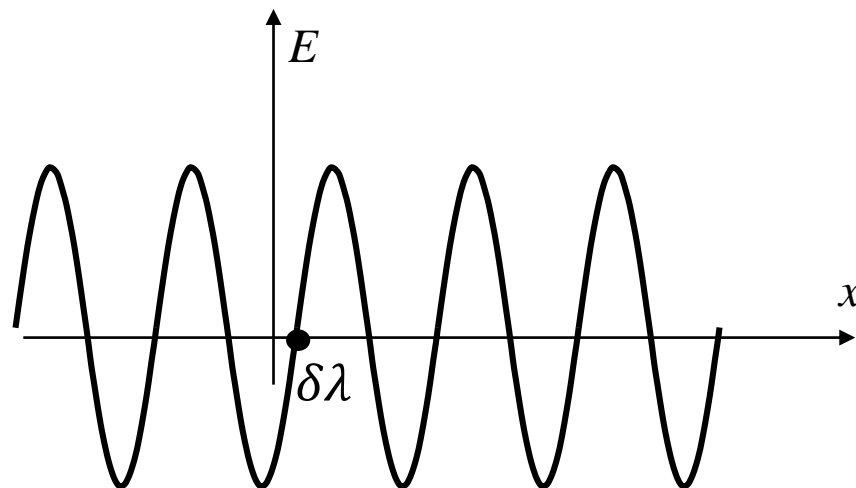
$$E(x) = E_0 \sin \left[2\pi \frac{x}{\lambda} \right]$$

$t=0, \delta=0$



$$E(x) = E_0 \sin \left[2\pi \left(\frac{x}{\lambda} - \delta \right) \right]$$

$t=0$



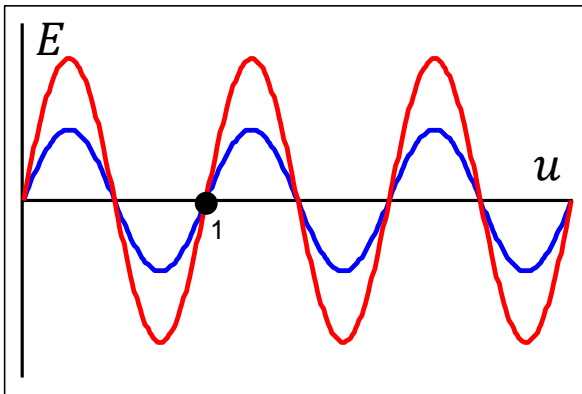
важны разности
фаз различных волн

Сложение волн с разными фазами

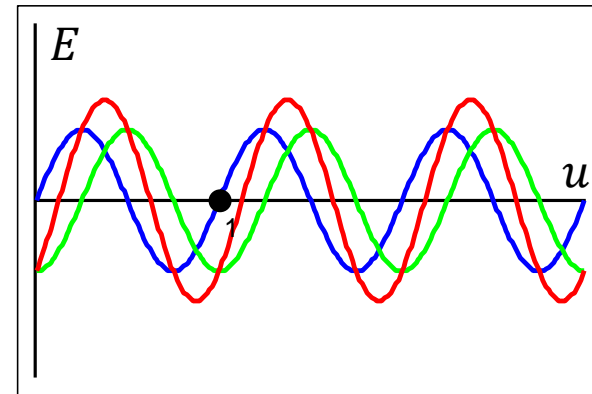
$$E(u) = E_0 \sin[2\pi u] + E_0 \sin[2\pi(u - \Delta)]$$

$$= \sqrt{2(1 + \cos 2\pi\Delta)} \cdot \sin 2\pi(u - \theta)$$

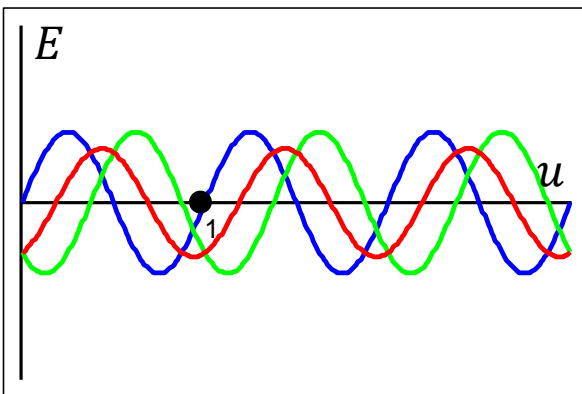
$$\tan 2\pi\theta = \frac{\sin 2\pi\Delta}{1 + \cos 2\pi\Delta}$$



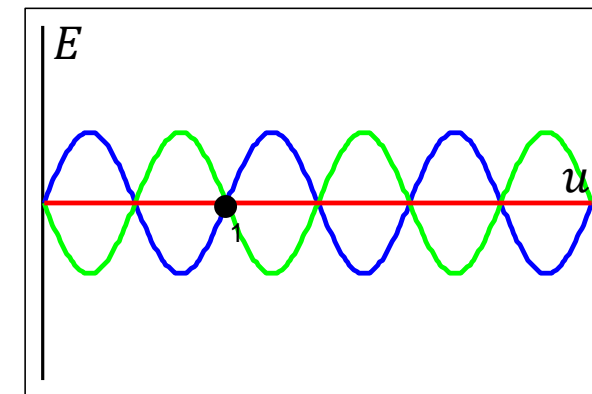
$$\Delta=0$$



$$\Delta=2/8$$



$$\Delta=3/8$$



$$\Delta=4/8$$

Амплитуда суммарной волны зависит от разности фаз двух волн.

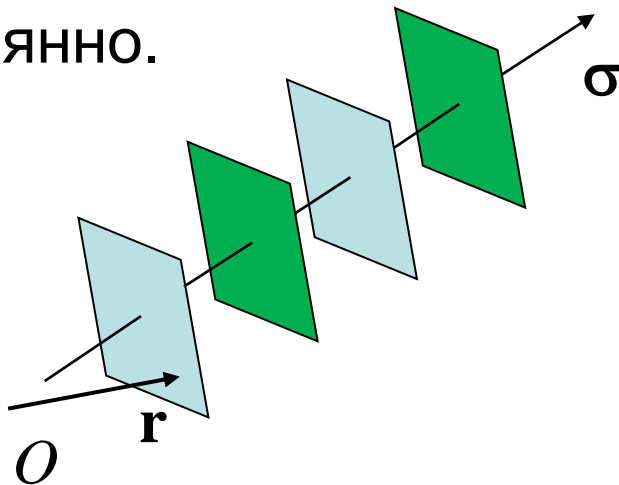
Плоская электромагнитная волна

$$E(\mathbf{r}, t) = E_0 \sin \left[2\pi \left(\frac{(\mathbf{r}, \boldsymbol{\sigma})}{\lambda} - vt - \delta \right) \right]$$

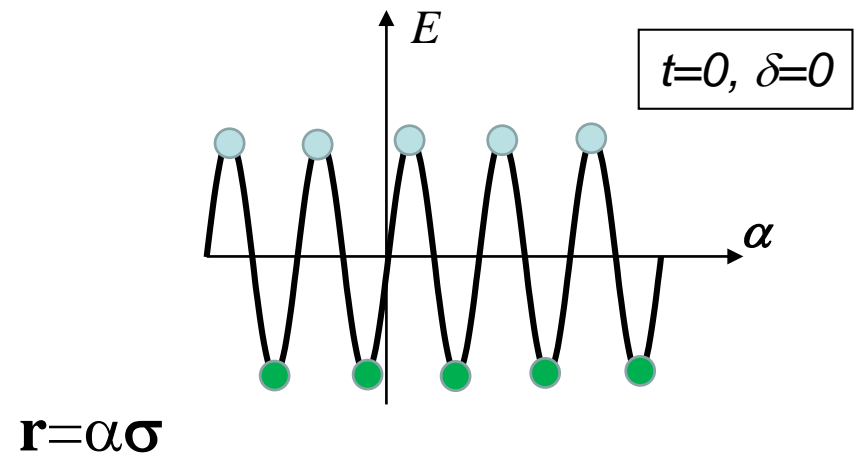
$|\boldsymbol{\sigma}|=1$, $\boldsymbol{\sigma}$ – направление распространения волны
 $(\mathbf{r}, \boldsymbol{\sigma})$ – проекция \mathbf{r} на направление $\boldsymbol{\sigma}$

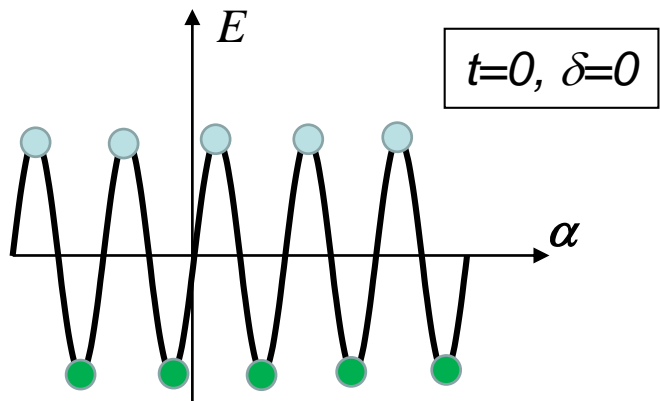
“Мгновенный снимок” (момент времени фиксирован)

В любой плоскости, перпендикулярной направлению $\boldsymbol{\sigma}$, поле постоянно.

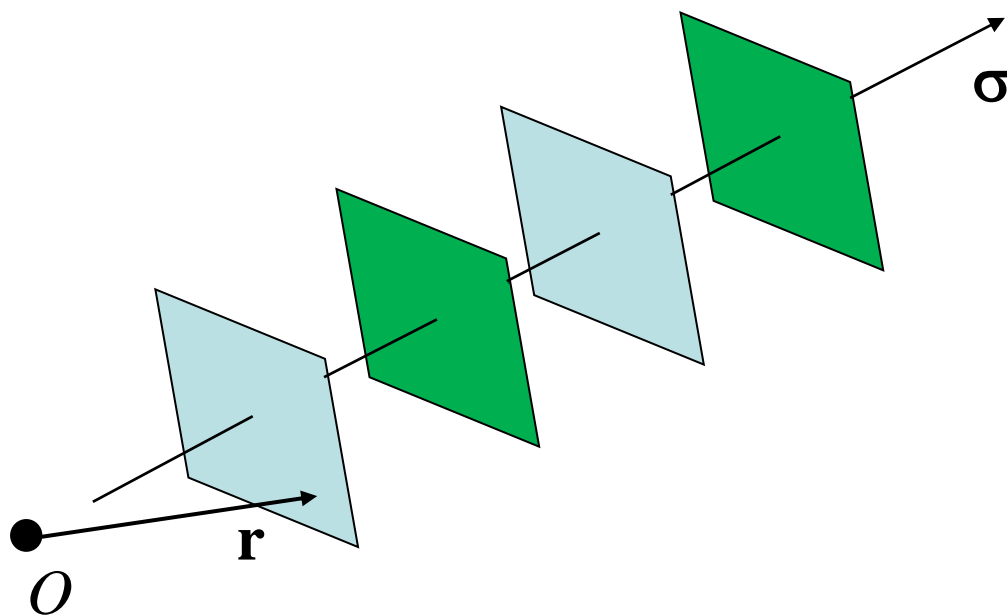


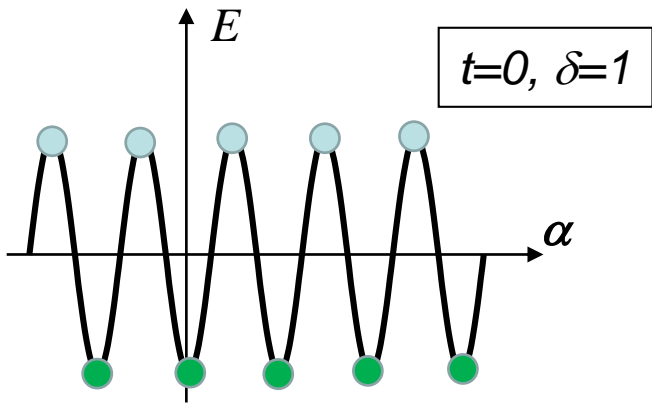
Вдоль $\boldsymbol{\sigma}$ поле меняется синусоидально.



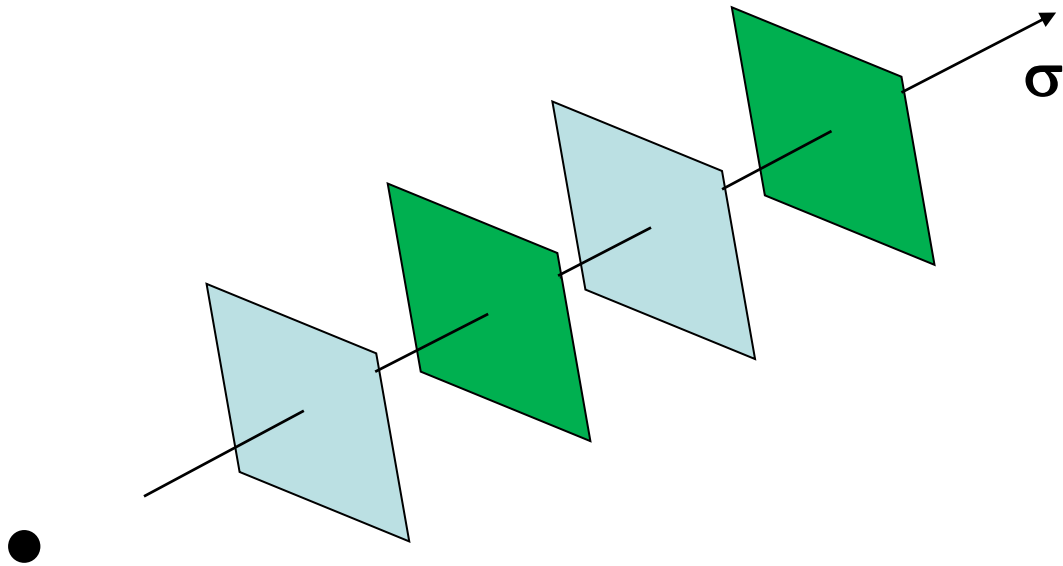


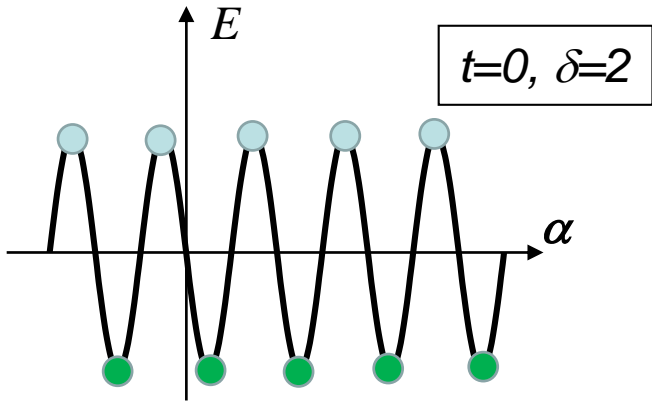
$$\mathbf{r} = \alpha \boldsymbol{\sigma}$$



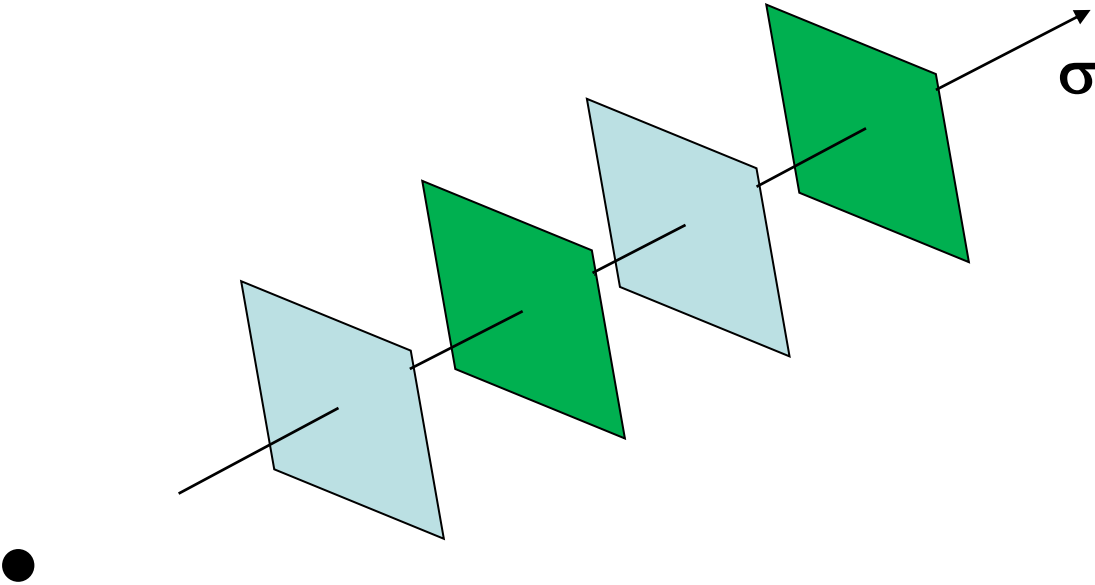


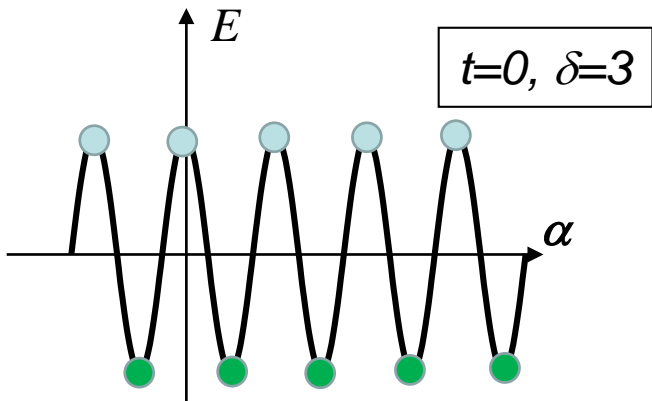
$$\mathbf{r} = \alpha \boldsymbol{\sigma}$$



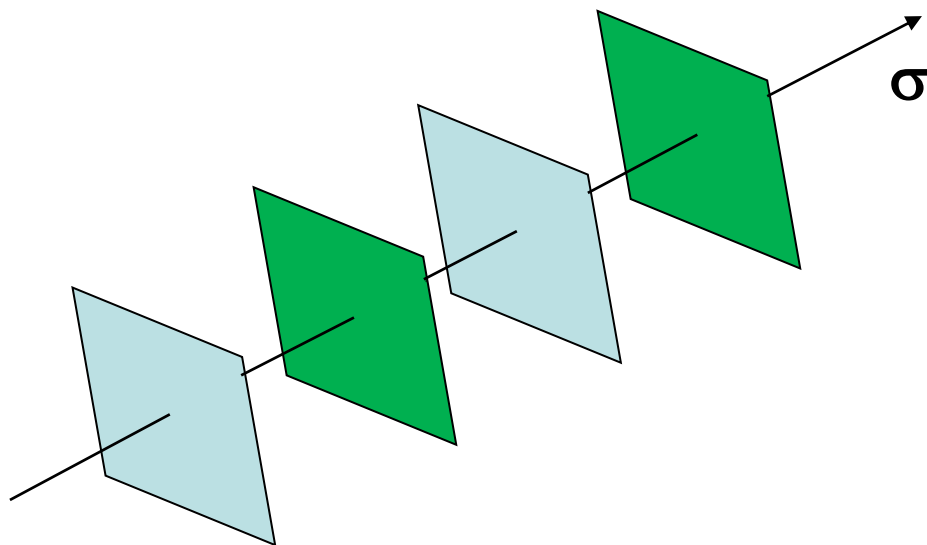


$$\mathbf{r} = \alpha \boldsymbol{\sigma}$$



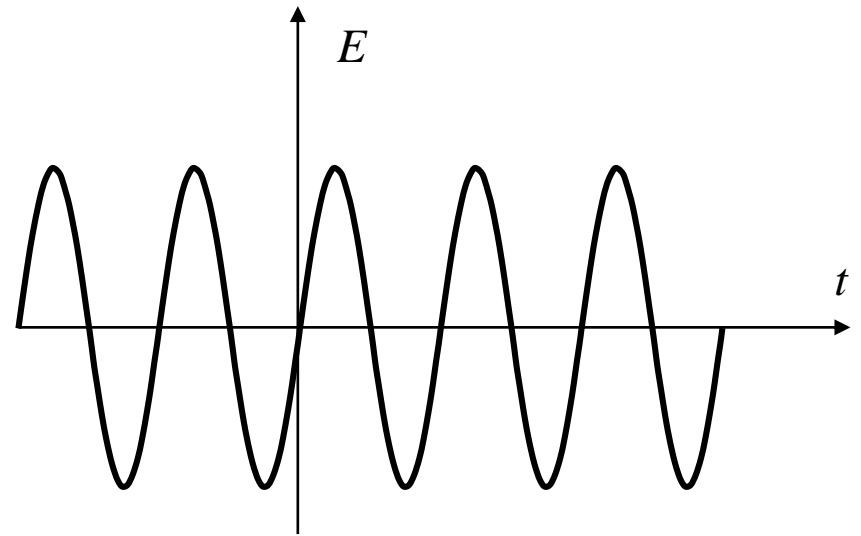


$$\mathbf{r} = \alpha \boldsymbol{\sigma}$$



Плоская электромагнитная волна

В фиксированной точке пространства – синусоидальное изменение поля во времени.



Одномерная волна

$$E(x, t) = E_0 \sin \left[2\pi \left(\frac{x}{\lambda} - vt - \delta \right) \right]$$

Плоская волна

$$E(\mathbf{r}, t) = E_0 \sin \left[2\pi \left(\frac{(\mathbf{r}, \boldsymbol{\sigma})}{\lambda} - vt - \delta \right) \right]$$

Сферическая электромагнитная волна

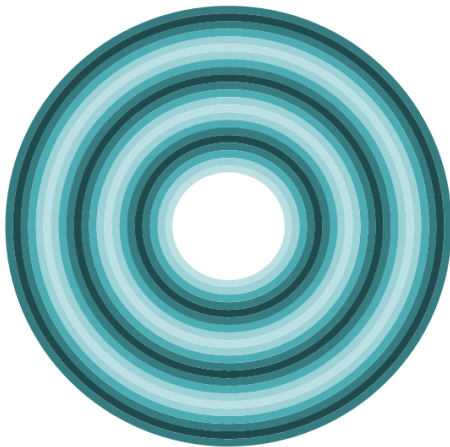
$$E(\mathbf{r}, t) = \frac{1}{|\mathbf{r}|} E_0 \sin \left[2\pi \left(\frac{|\mathbf{r}|}{\lambda} - vt - \delta \right) \right]$$

\mathbf{r} – точка в трехмерном пространстве;

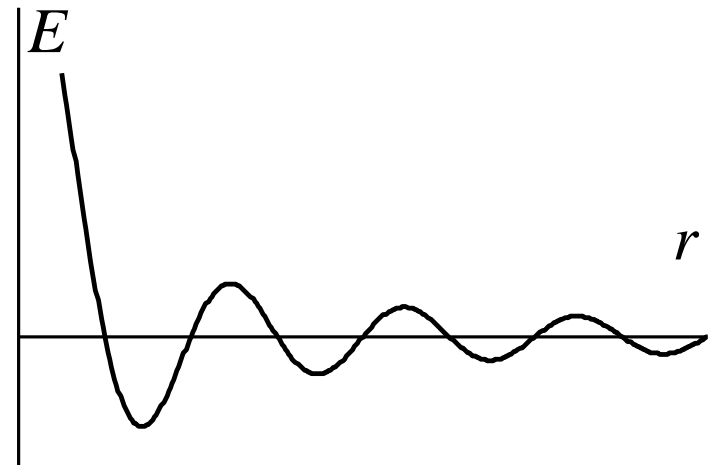
$r = |\mathbf{r}|$ - длина вектора \mathbf{r}

“Мгновенный снимок” (момент времени фиксирован)

На любой сфере поле постоянно.

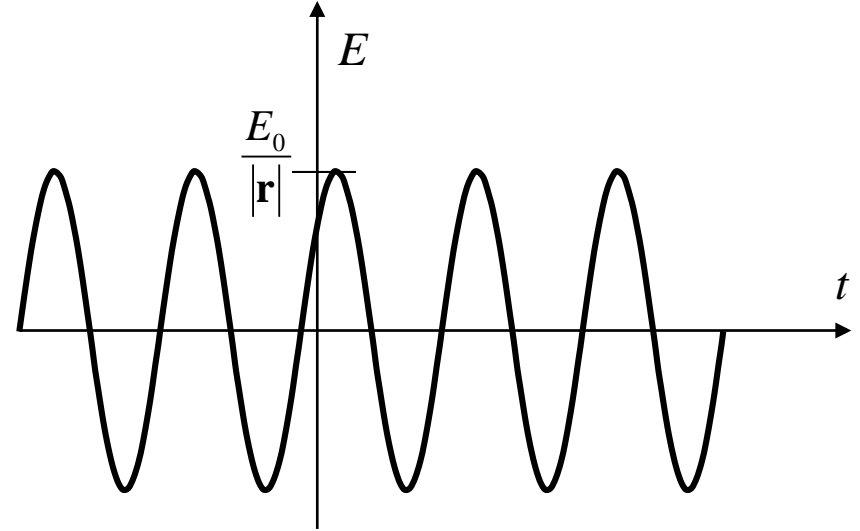


Вдоль радиуса поле затухает синусоидально.



Сферическая электромагнитная волна

В фиксированной точке пространства – синусоидальное изменение поля во времени.



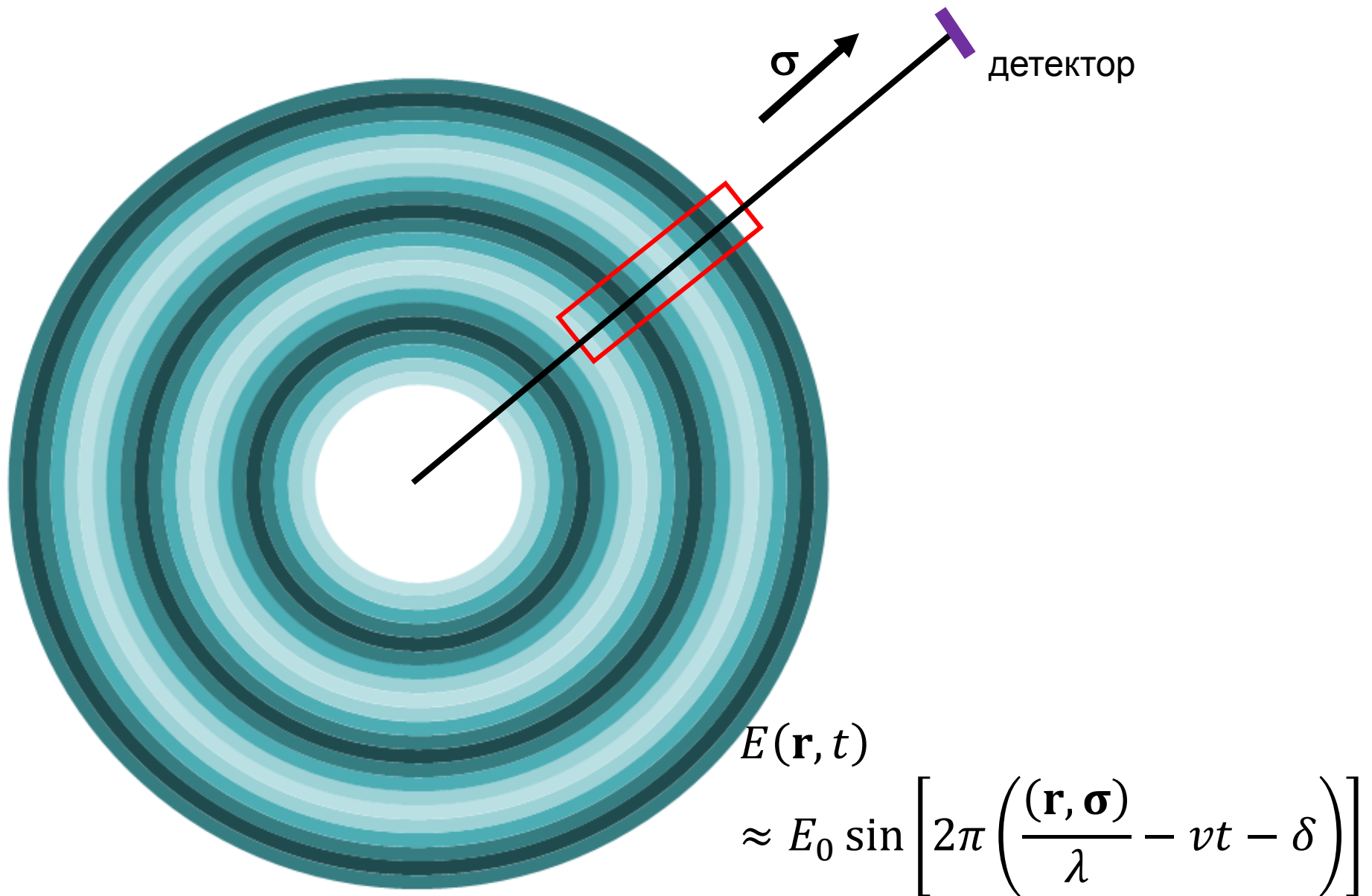
Одномерная волна

$$E(x, t) = E_0 \sin \left[2\pi \left(\frac{x}{\lambda} - vt - \delta \right) \right]$$

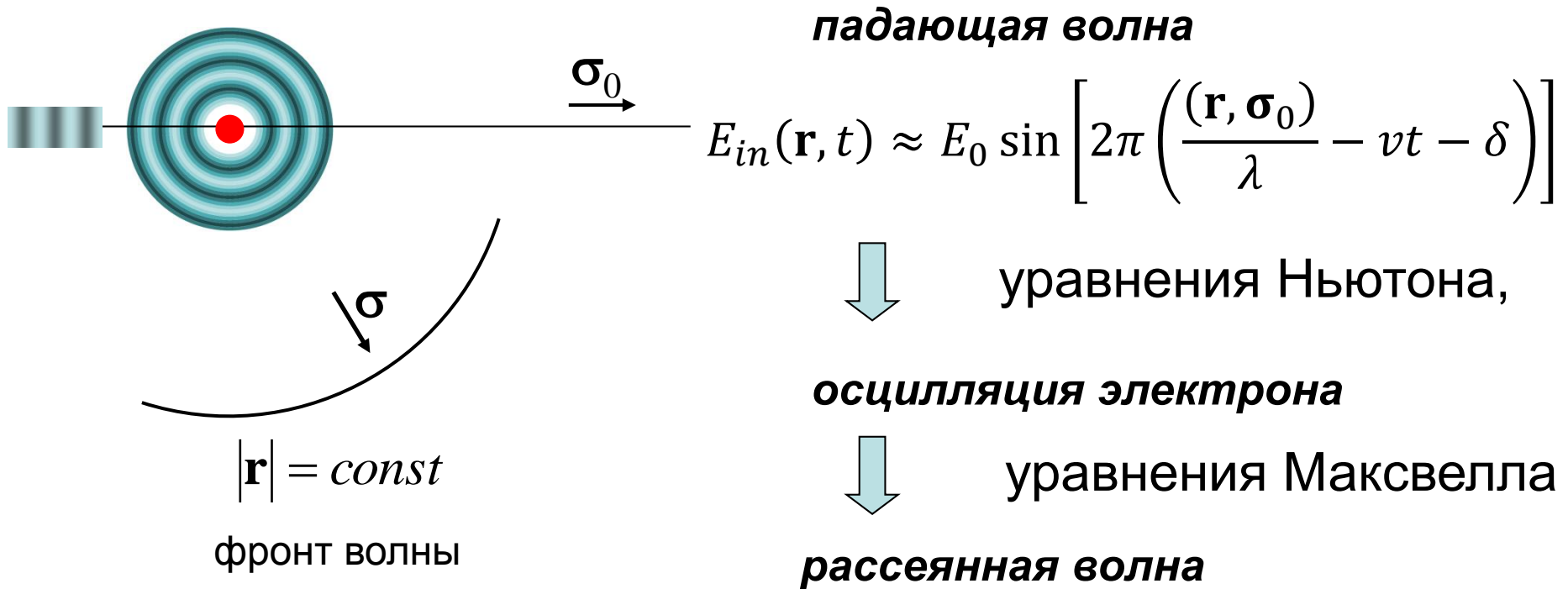
Сферическая волна

$$E(\mathbf{r}, t) = \frac{1}{|\mathbf{r}|} E_0 \sin \left[2\pi \left(\frac{|\mathbf{r}|}{\lambda} - vt - \delta \right) \right]$$

На больших расстояниях от центра сферическая волна локально похожа на плоскую волну.



Рассеяние рентгеновских лучей электроном



$$E(\mathbf{r}, t) = \frac{\varepsilon}{|\mathbf{r}|} E_0 \sin \left[2\pi \left(\frac{|\mathbf{r}|}{\lambda} - vt - \delta \right) \right] \quad \frac{\varepsilon}{|\mathbf{r}|} \approx 10^{-12} \quad !!!$$

На детекторе рассеянная волна “похожа” на плоскую волну.

$$E(\mathbf{r}, t) \approx \frac{\varepsilon}{|\mathbf{r}|} E_0 \sin \left[2\pi \left(\frac{(\mathbf{r}, \boldsymbol{\sigma})}{\lambda} - vt - \delta \right) \right]$$

Рассеяние рентгеновских лучей электроном

падающая волна

$$E_{in}(\mathbf{r}, t) = E_0 \sin \left[2\pi \left(\frac{(\mathbf{r}, \boldsymbol{\sigma}_0)}{\lambda} - vt - \delta \right) \right]$$

рассеянная волна

$$E(\mathbf{r}, t) \approx \frac{\varepsilon}{|\mathbf{r}|} E_0 \sin \left[2\pi \left(\frac{(\mathbf{r}, \boldsymbol{\sigma})}{\lambda} - vt - \delta \right) \right]$$

распространяется во всех направлениях

Эксперимент позволяет измерить интенсивность рассеянной волны. Интенсивность пропорциональна квадрату амплитуды.

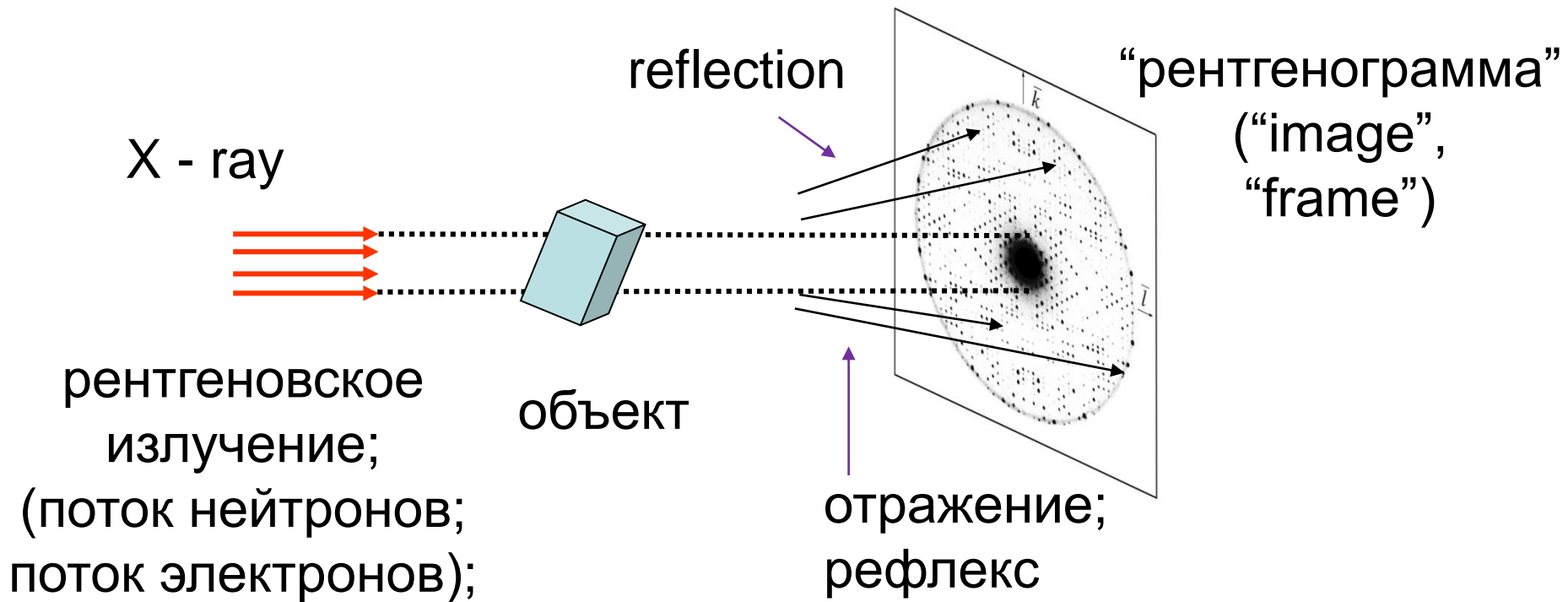
$$I = \left(\frac{\varepsilon}{|\mathbf{r}|} \right)^2 I_0$$

$$\left(\frac{\varepsilon}{|\mathbf{r}|} \right)^2 \approx 10^{-24} \quad \text{!!!}$$

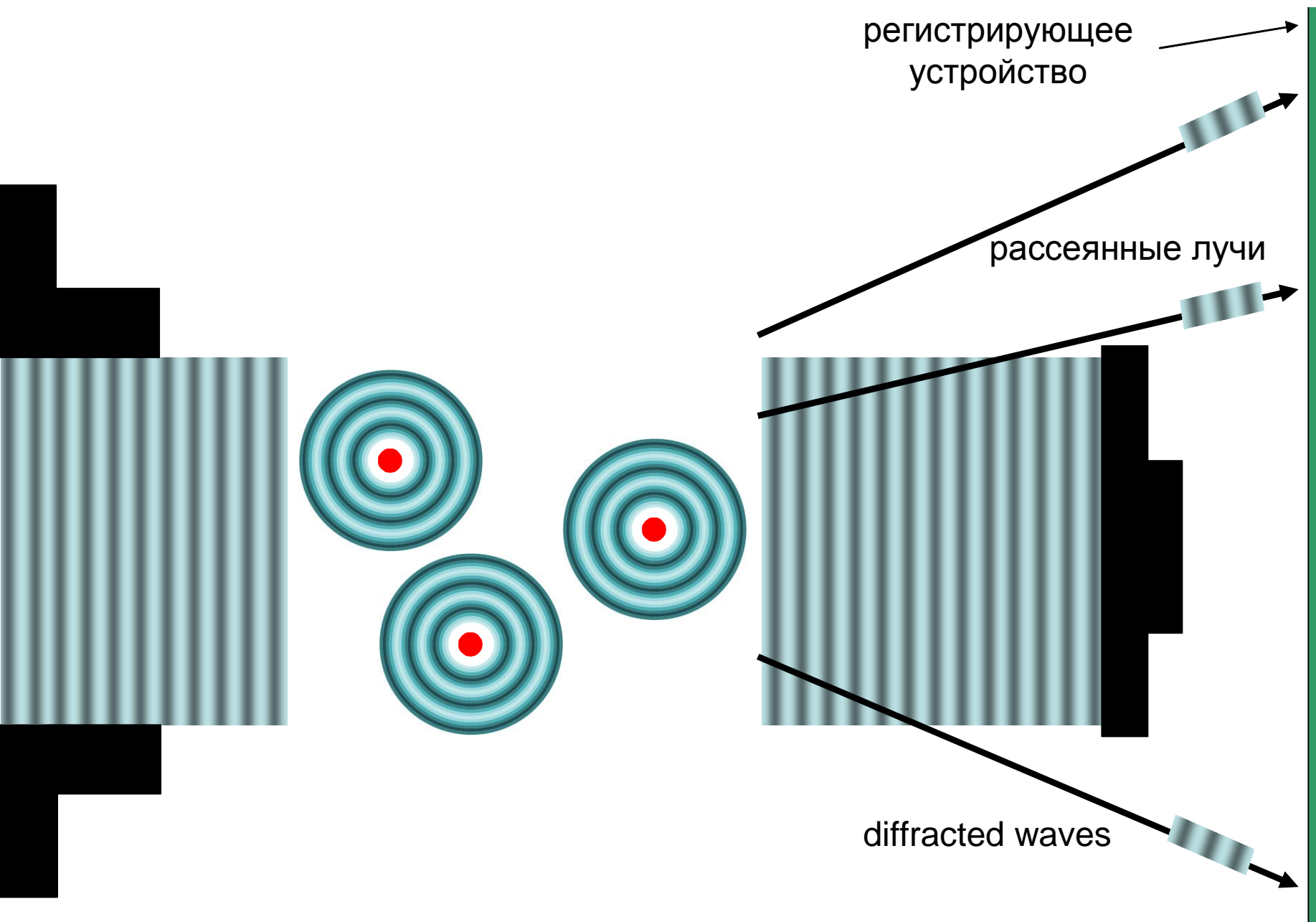
Дифракционный эксперимент

Вопрос 2:

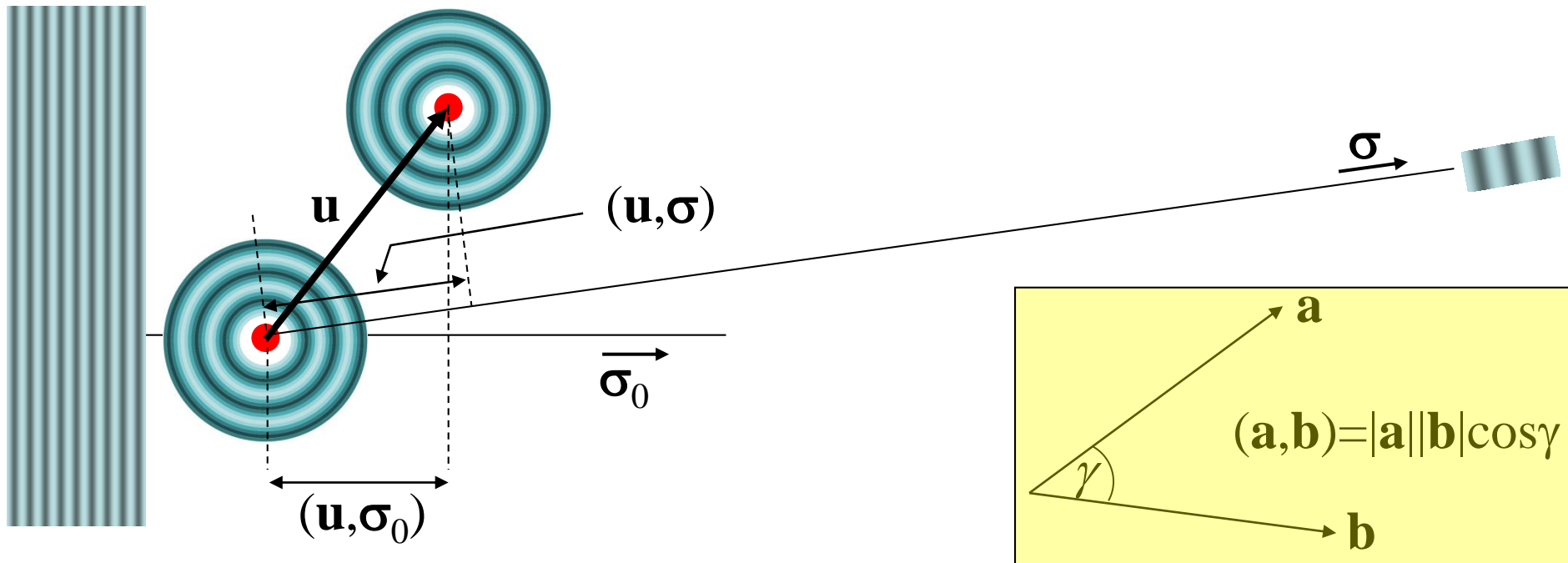
почему «отраженные» лучи имеют разную интенсивность ?



Рассеяние системой электронов



Рассеяние рентгеновских лучей двумя электронами



- В «точке» детектора складываются два электрических поля
- Можно измерить амплитуду суммарной волны

$$E(\mathbf{r}, t) = E_0 \sin \left[2\pi \left(\frac{(\mathbf{r}, \boldsymbol{\sigma}_0)}{\lambda} - vt \right) \right]$$

$$\Delta_1 = \frac{(\mathbf{u}, \boldsymbol{\sigma}_0)}{\lambda} \quad \Delta_2 = \frac{(\mathbf{u}, \boldsymbol{\sigma})}{\lambda}$$

$$\Delta = \Delta_2 - \Delta_1 = (\mathbf{u}, \mathbf{s})$$

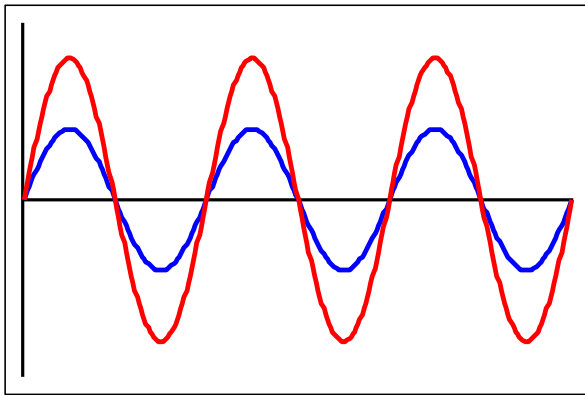
$$E_1(t) \propto E_0 \sin[2\pi(-vt)]$$

$$E_2(t) \propto E_0 \sin[2\pi(-vt - \Delta)]$$

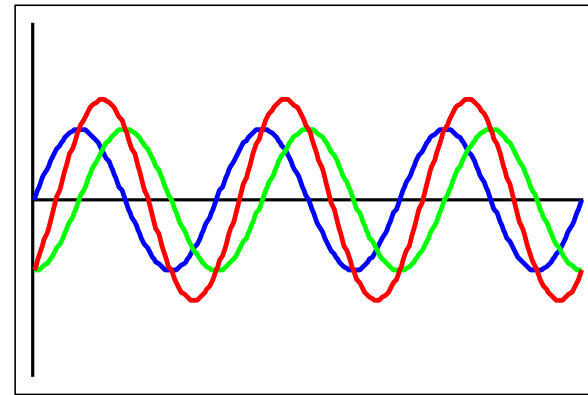
$$\mathbf{s} = \frac{\boldsymbol{\sigma} - \boldsymbol{\sigma}_0}{\lambda} \quad \text{вектор рассеяния}$$

Сложение волн от двух электронов

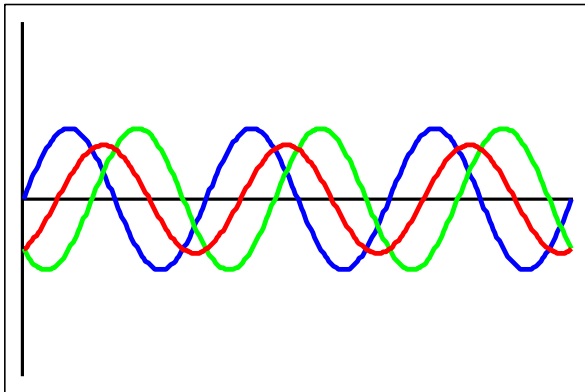
$$E(t) = E_0 \sin[2\pi(-vt)] + E_0 \sin[2\pi(-vt - \Delta)] \quad \Delta = \left(\frac{\sigma - \sigma_0}{\lambda}, \mathbf{u} \right)$$



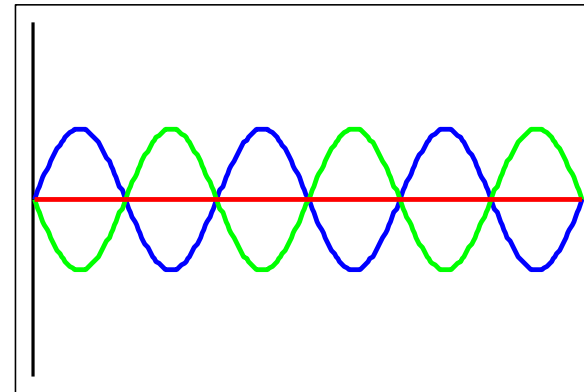
$$\Delta=0$$



$$\Delta=1/4$$



$$\Delta=3/8$$



$$\Delta=4/8$$

Амплитуда рассеянной волны зависит от взаимного расположения рассеивающих электронов.

по амплитуде рассеянной волны можем сделать вывод о сдвиге фазы Δ ;

$$\frac{1}{|\mathbf{s}|} \left(\frac{\boldsymbol{\sigma} - \boldsymbol{\sigma}_0}{\lambda}, \mathbf{u} \right) - \text{проекция вектора } \mathbf{u} \text{ на направление } \mathbf{s} = \frac{\boldsymbol{\sigma} - \boldsymbol{\sigma}_0}{\lambda} ;$$

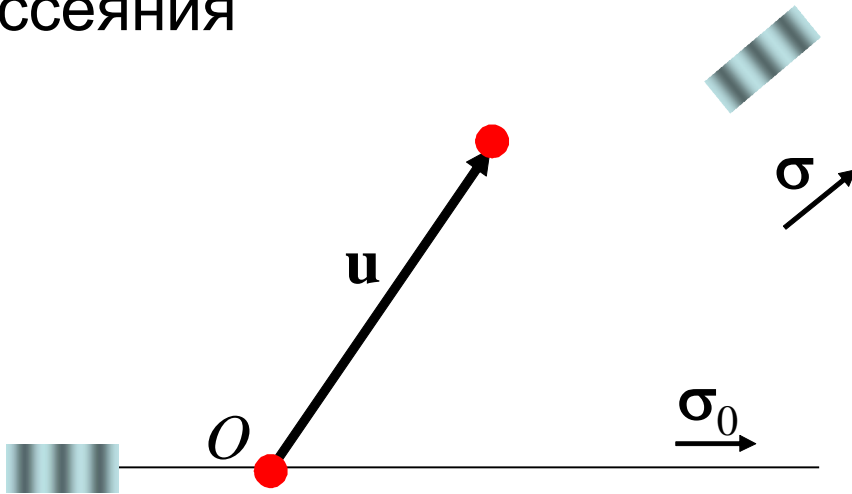
при известном векторе рассеяния \mathbf{s} получаем величину этой проекции;

меняя направление первичного пучка и положение детектора, определяем проекции вектора \mathbf{u} на разные направления $\mathbf{s}_1, \mathbf{s}_2, \mathbf{s}_3$;

можем определить вектор \mathbf{u} ;

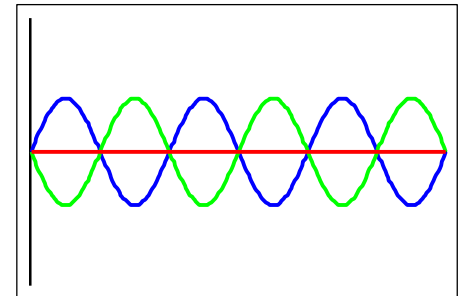
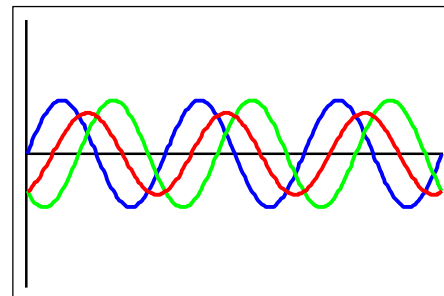
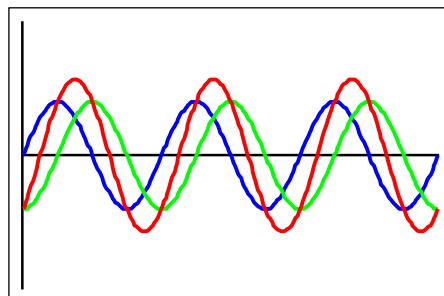
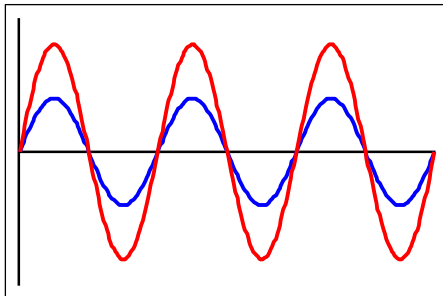
Основа рентгеноструктурного анализа

- амплитуда рассеянной волны зависит от взаимного расположения рассеивающих электронов;
- амплитуда рассеянной волны зависит от направления рассеяния



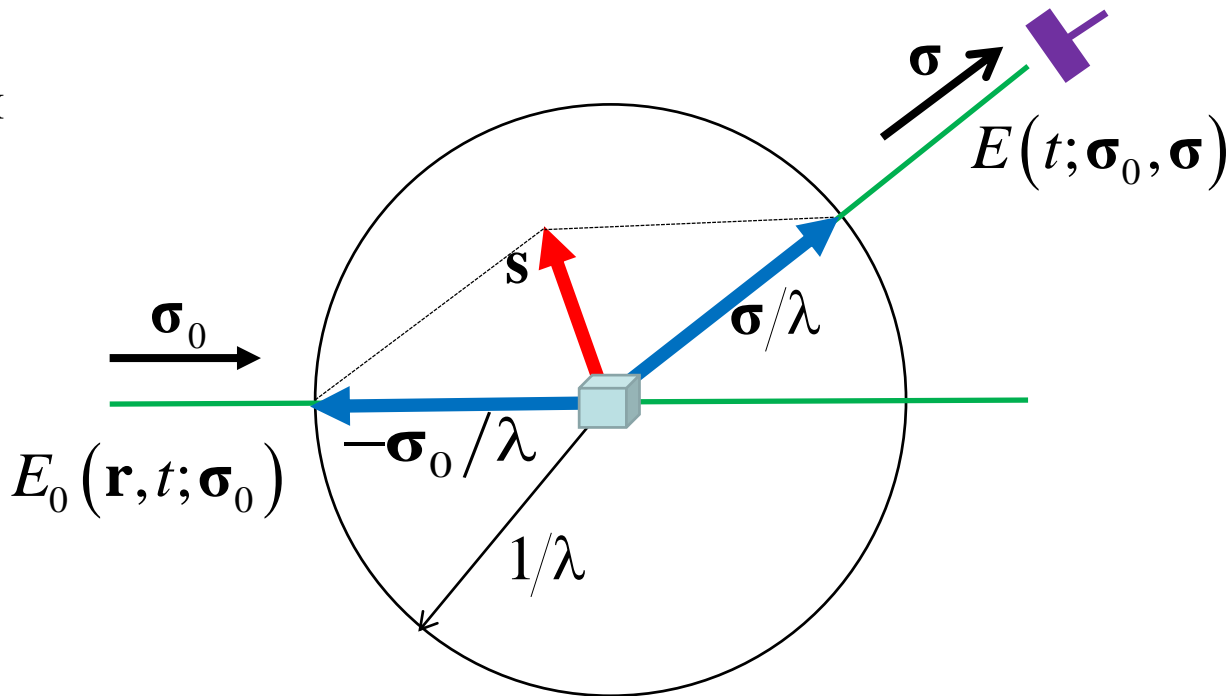
$$\Delta = \left(\frac{\sigma - \sigma_0}{\lambda}, \mathbf{u} \right)$$

$$\mathbf{s} = \frac{\sigma - \sigma_0}{\lambda} = \frac{(-\sigma_0) + \sigma}{\lambda}$$



$$|\boldsymbol{\sigma}_0| = |\boldsymbol{\sigma}| = 1$$

λ - длина волны

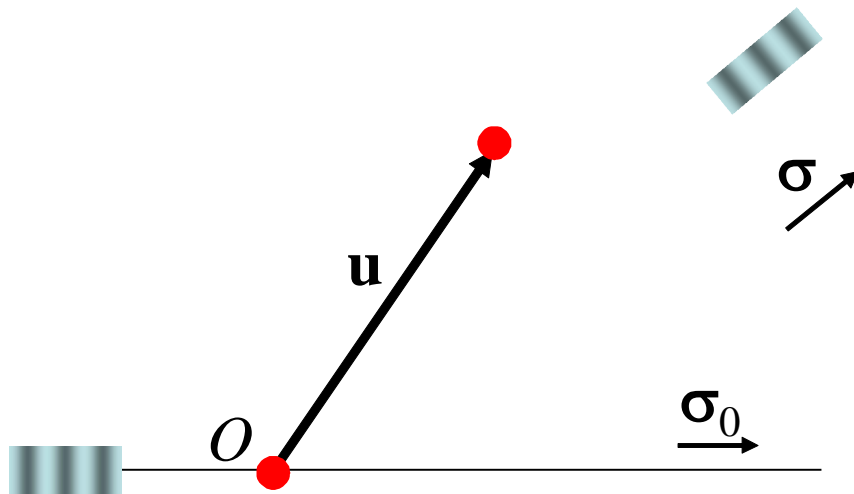


$$\mathbf{s} = \frac{\boldsymbol{\sigma} - \boldsymbol{\sigma}_0}{\lambda} \quad \text{- вектор рассеяния}$$

$$\Delta = (\mathbf{u}, \mathbf{s})$$

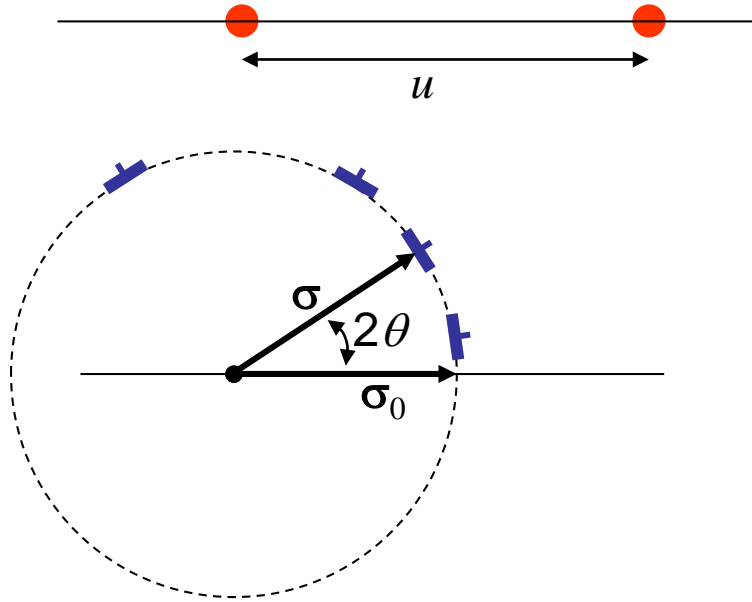
Метод проб и ошибок

- гипотеза - вектор \mathbf{u} ;
- для разных направлений σ рассчитываем сдвиг фазы Δ и ожидаемую амплитуду рассеянной в этом направлении волны;
- измеряем соответствующие амплитуды в эксперименте;
- сравниваем предсказанные значения с экспериментом



$$\Delta = \left(\frac{\sigma - \sigma_0}{\lambda}, \mathbf{u} \right)$$

«Определение расстояния между двумя электронами»

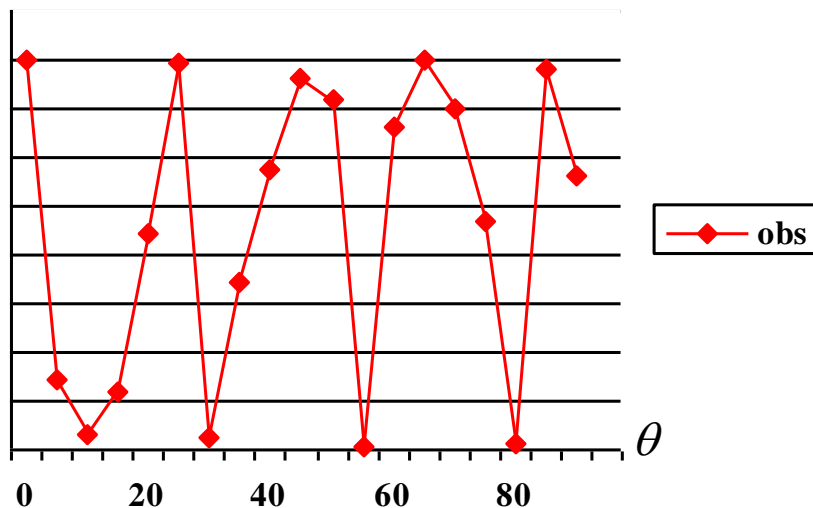


Проблема:

Направление вектора u известно, не знаем только длину (расстояние между электронами). Хотим определить это расстояние

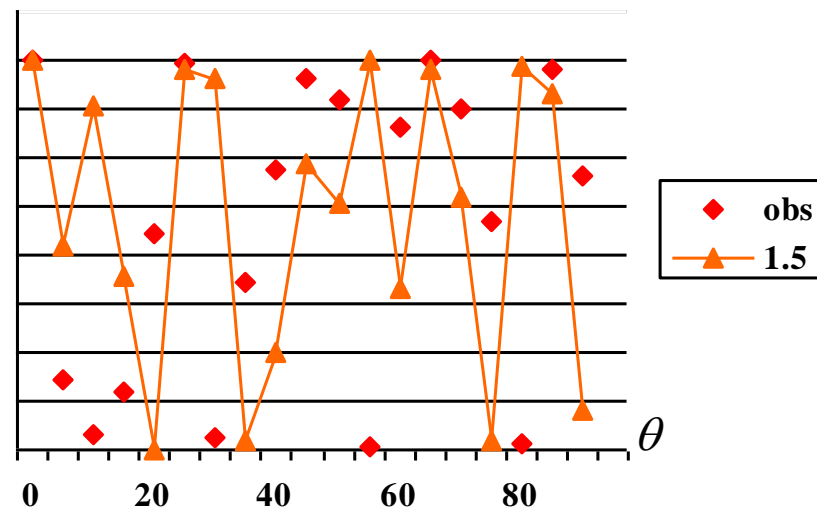
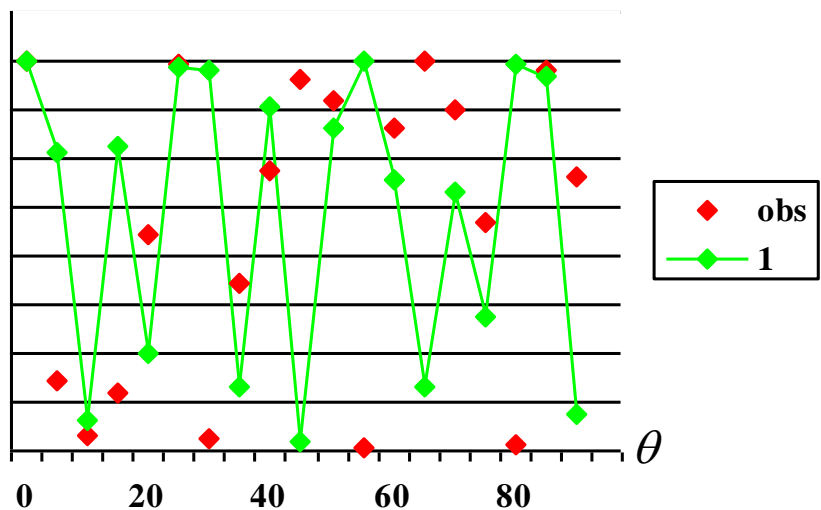
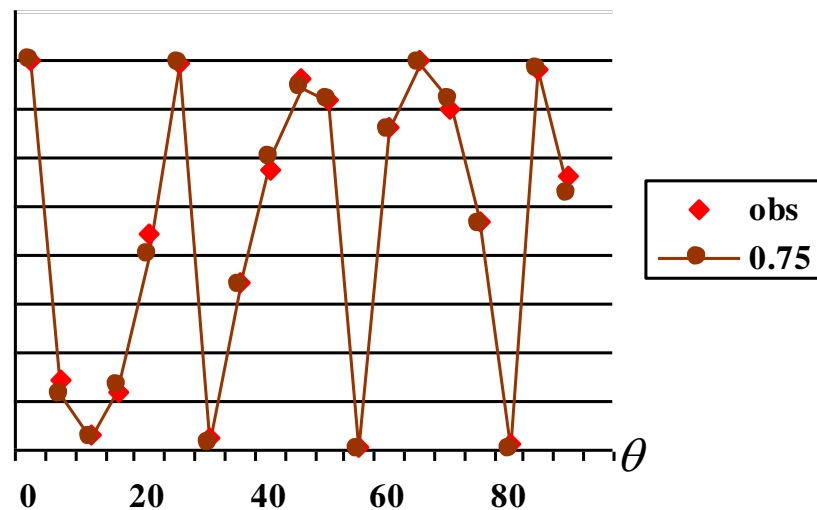
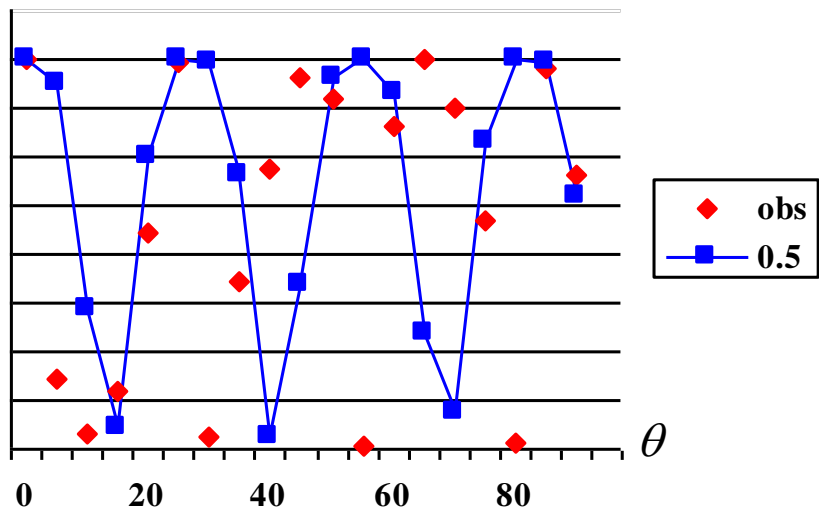
Эксперимент:

- направляем первичный пучок в направлении u
- вращаем детектор с шагом 10 градусов
- измеряем интенсивность

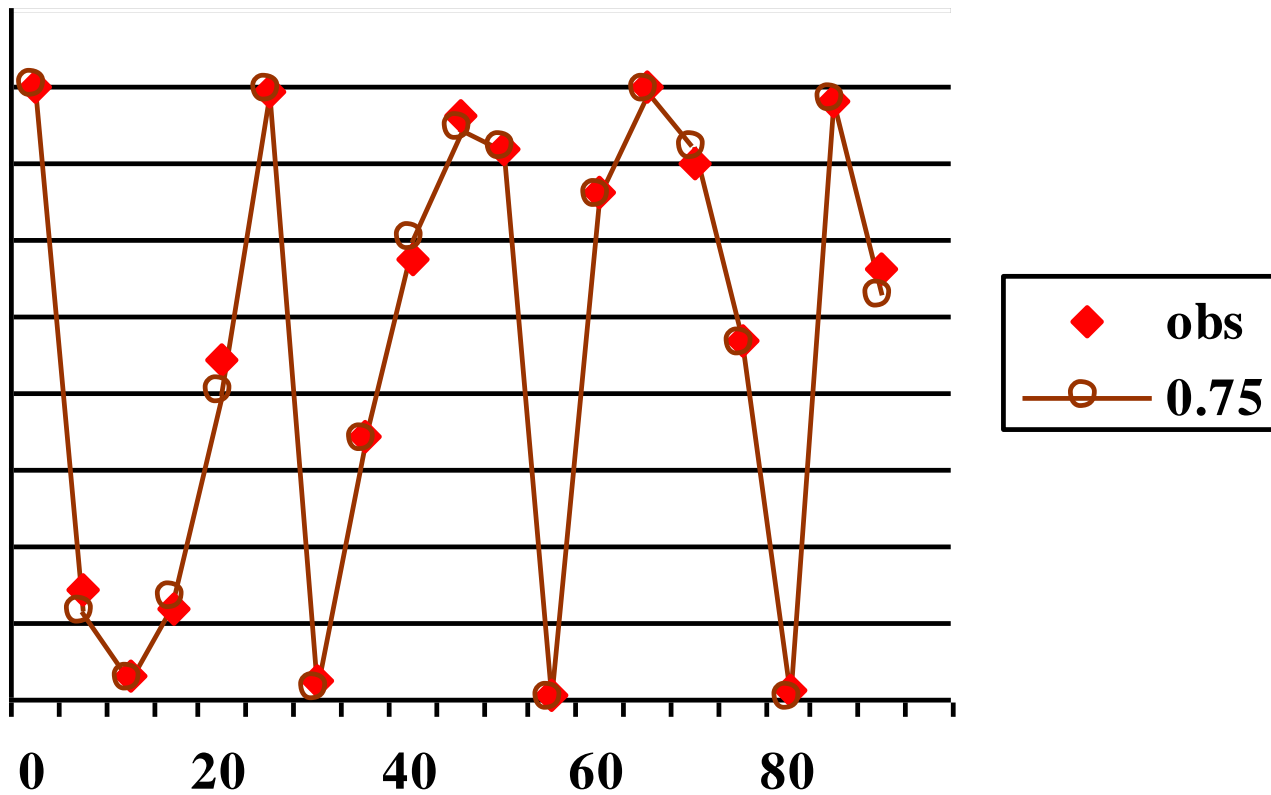


$$E(t) = E_0 \sin[2\pi(-vt)] + E_0 \sin[2\pi(-vt - \Delta)] \quad \Delta = \left(\frac{\boldsymbol{\sigma} - \boldsymbol{\sigma}_0}{\lambda}, \mathbf{u} \right) = -2u \sin^2 \theta$$

$$I^{theoretical}(\theta) = 4 \cos^2[2\pi u \sin^2 \theta] \quad E_0 = 1., \lambda = 1.$$



$$I^{theoretical}(\theta) = 4 \cos^2 [2\pi u \sin^2 \theta]$$



«правильное» значение $u=0.74 \text{ \AA}$

Как заметить рассеяние рентгеновских лучей?

падающая волна $E_{in}(\mathbf{r}, t) = E_0 \sin \left[2\pi \left(\frac{(\boldsymbol{\sigma}_0, \mathbf{r})}{\lambda} - vt - \delta \right) \right]$

рассеянная волна $E(\mathbf{r}, t) = \frac{\varepsilon}{|\mathbf{r}|} E_0 \sin \left[2\pi \left(\frac{|\mathbf{r}|}{\lambda} - vt - \delta \right) \right]$

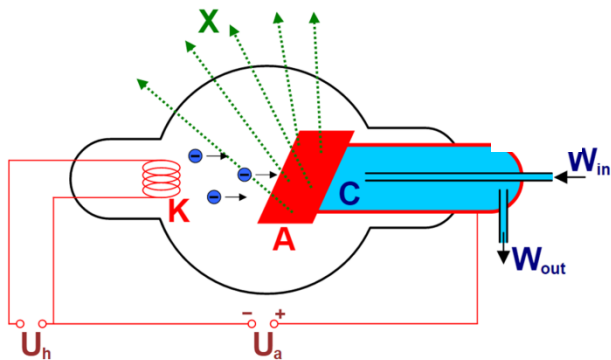
распространяется во всех направлениях

Эксперимент позволяет измерить интенсивность рассеянной волны. Интенсивность пропорциональна квадрату амплитуды.

$$I = \left(\frac{\varepsilon}{|\mathbf{r}|} \right)^2 I_0$$

$$\left(\frac{\varepsilon}{|\mathbf{r}|} \right)^2 \approx 10^{-24} \quad !!!$$

Источники рентгеновского излучения. Рентгеновские генераторы.



Генераторы с
вращающимся анодом.

Генераторы с жидким
анодом. (Ga, $t_{пл} = 29.8 \text{ } ^\circ\text{C}$)

кристаллограф

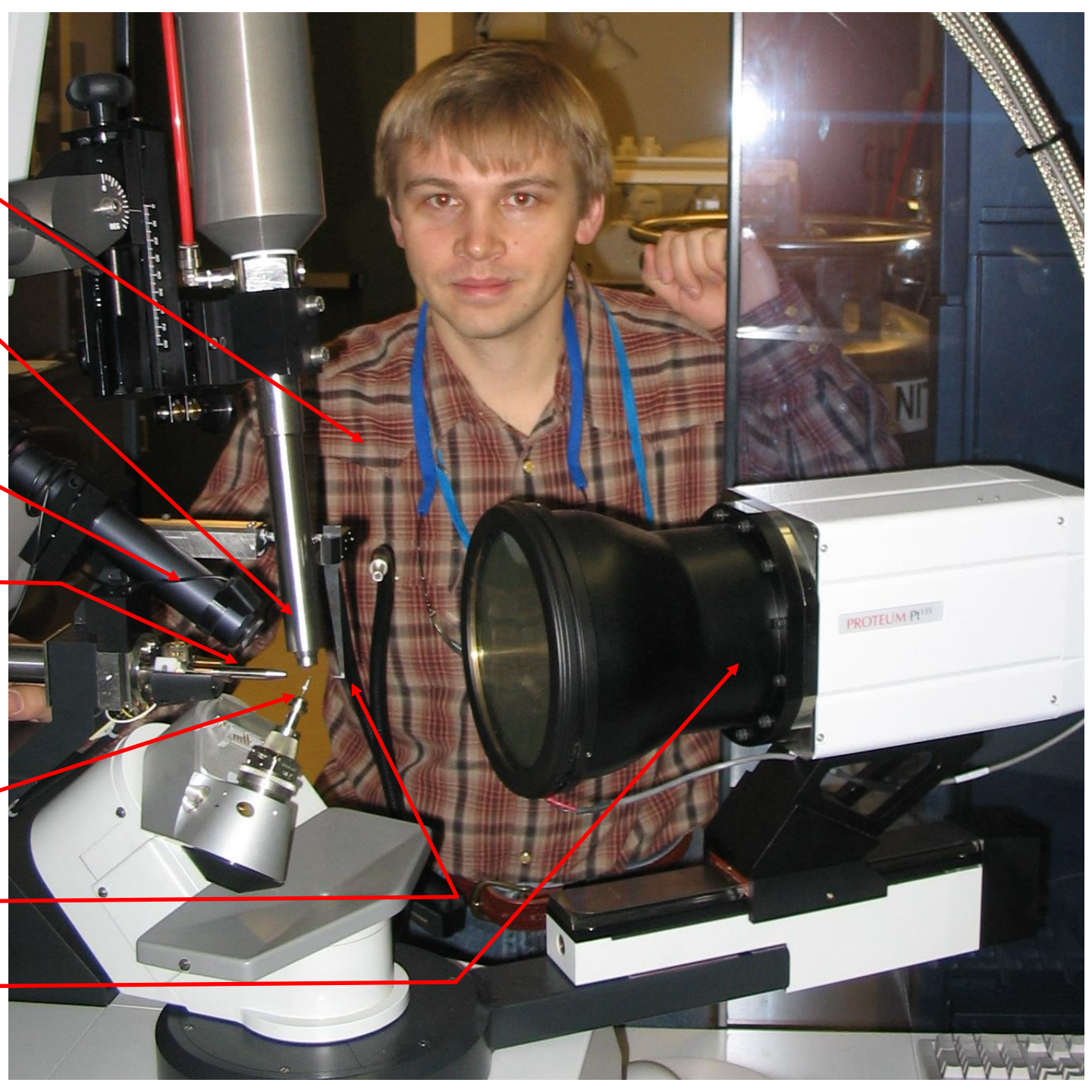
охлаждение
микроскоп

рентгеновский
пучок

образец

заглушка

детектор

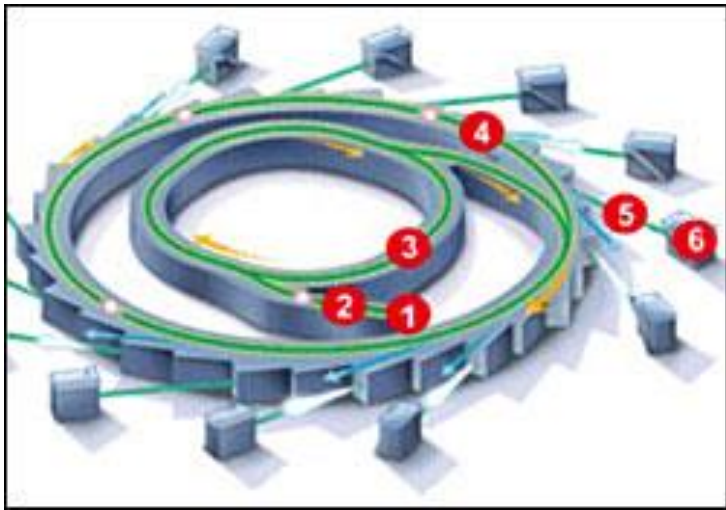


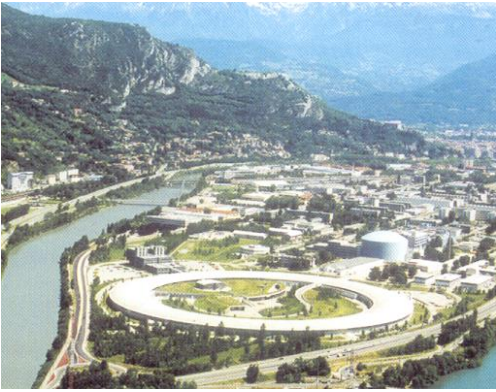
Villigen, Switzerland



Синхротронные ускорители

Grenoble, France





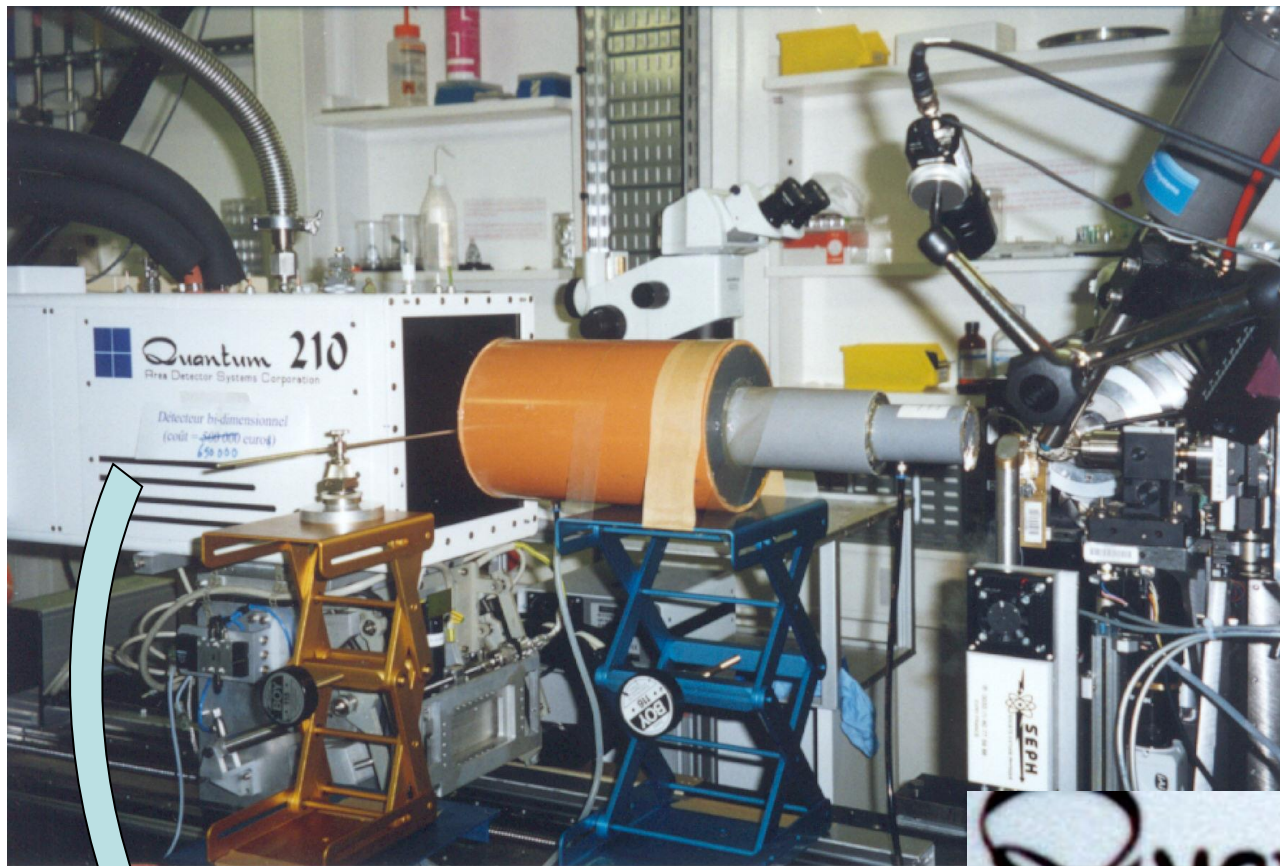


MAATEL

Quantix
Area Detector System

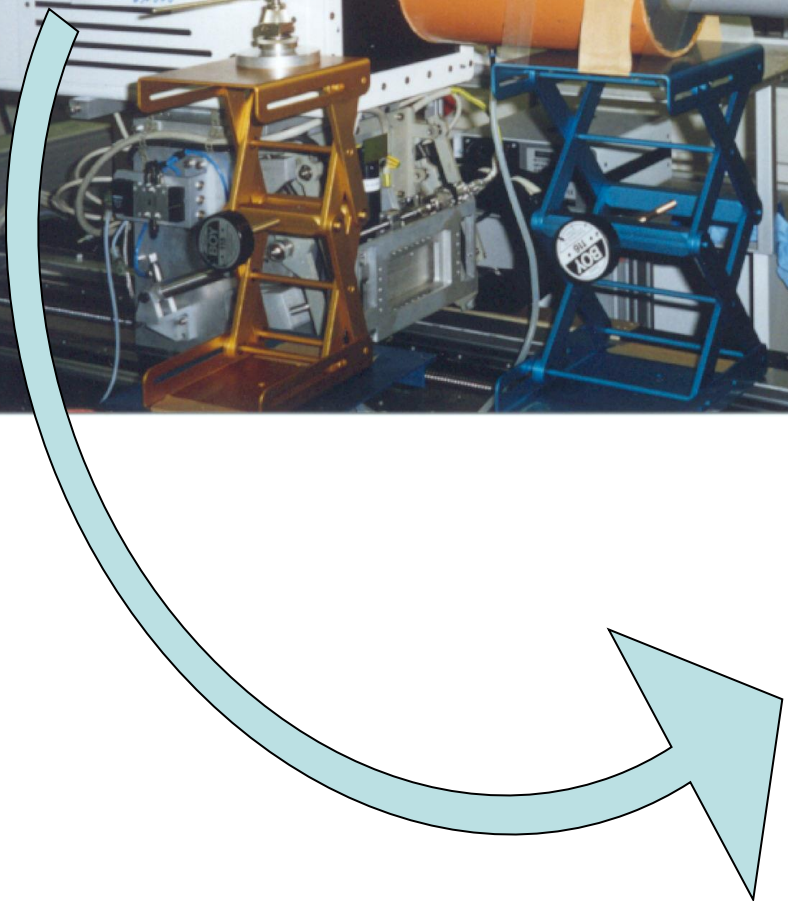
OLYMPUS

ESR



Quantum 210
Area Detector Systems Corporation

Détecteur bi-dimensionnel
(coût = ~~500 000~~ euro\$)
650 000



ID14 35

FRONT
END
OPEN

HUTCH
INTERLOCKED

EMERGENCY
DOOR
RELEASE



Il est interdit d'ouvrir la porte de la machine en fonctionnement. Toute tentative de forçage de la porte sera considérée comme une violation de la sécurité et sera punie de manière exemplaire.

Il est interdit d'ouvrir la porte de la machine en fonctionnement. Toute tentative de forçage de la porte sera considérée comme une violation de la sécurité et sera punie de manière exemplaire.

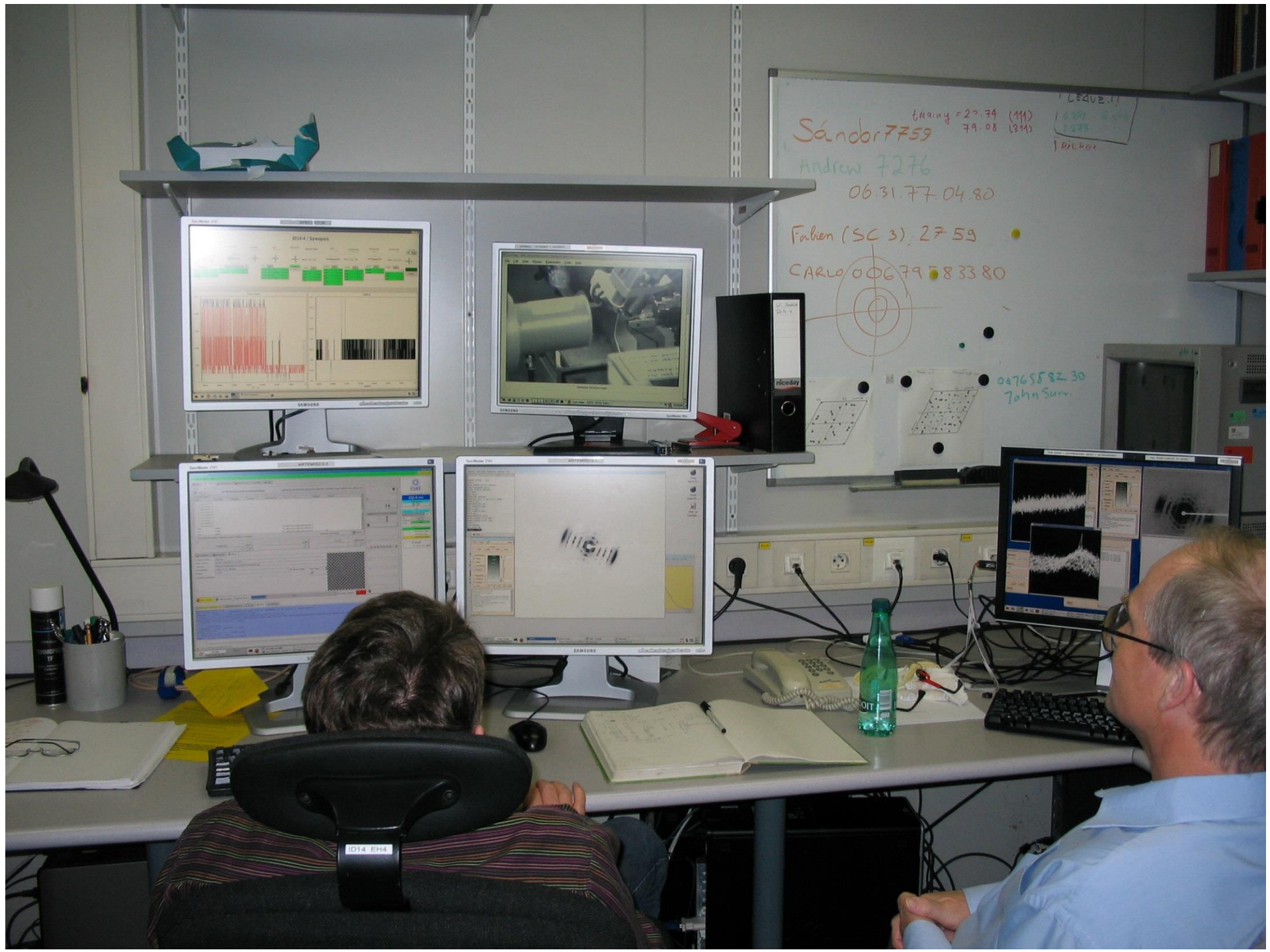


SAFETY

During operation
Access strictly forbidden



Pendant fonctionnement
Accès strictement interdit



Sándor 7759

thany = 27.79 (111)
79.08 (311)

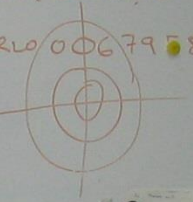
LEAVE 11
6291 6.08
7023
↓ PIRKOL

Andrew 7276

06.31.77.04.80

Fabien (SC 3), 2759

CARLO 00679 583380



0076558230
John Sum.

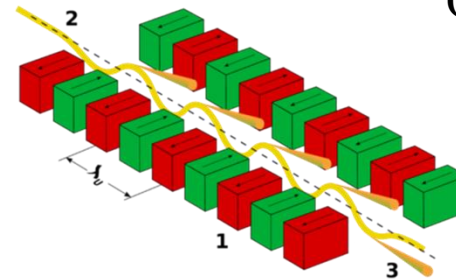
ID14 EH4

Источники рентгеновского излучения

Синхротронное излучение.



Ондуляторы.



Генераторы с
вращающимся анодом.

Генераторы с жидким
анодом.

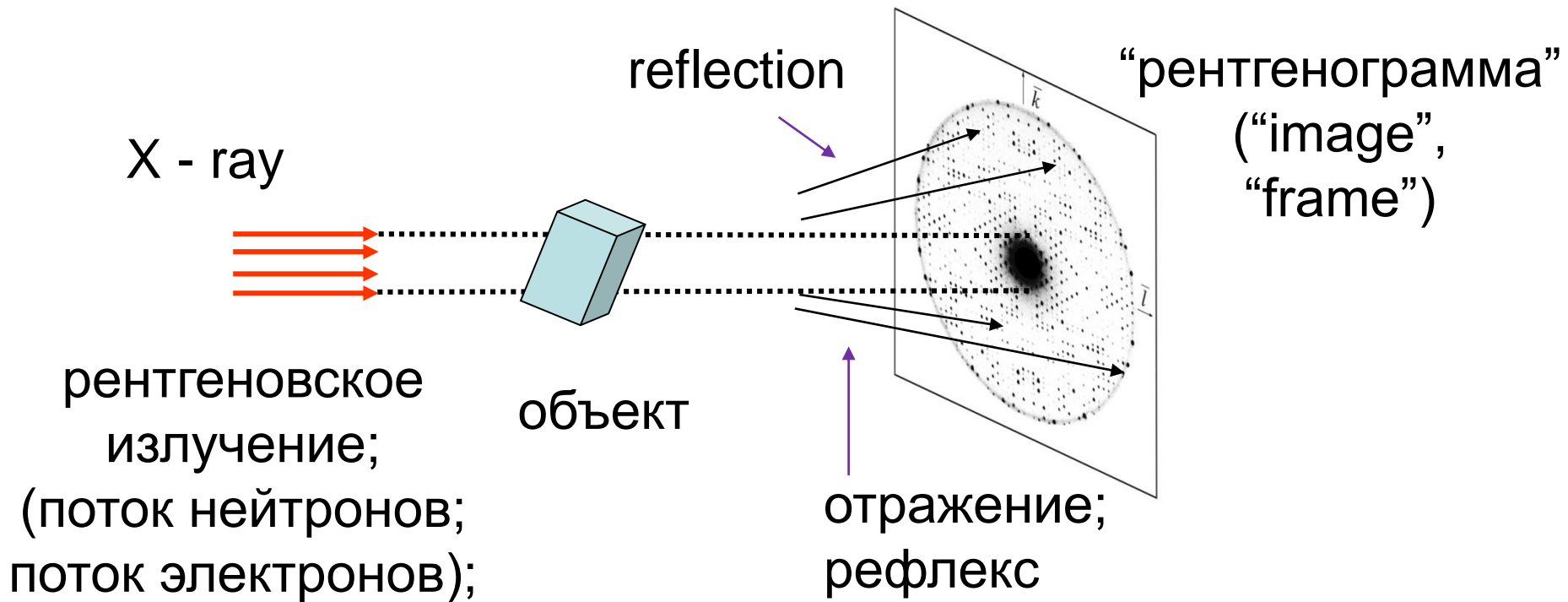
X-ray Free-Electrons Laser



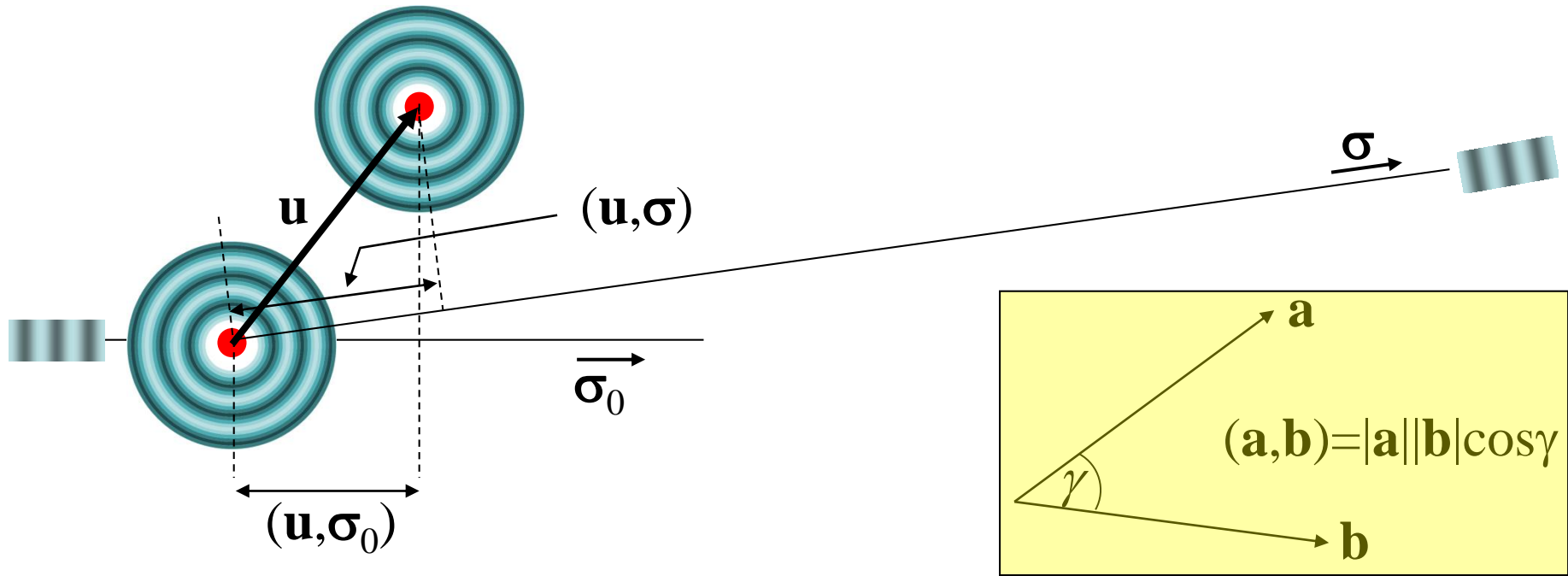
Дифракционный эксперимент

Вопрос 2:

почему «отраженные» лучи имеют разную интенсивность ?



Рассеяние рентгеновских лучей двумя электронами



- В «точке» детектора складываются два электрических поля
- Можно измерить амплитуду суммарной волны

$$E_1(t) \propto E_0 \sin[2\pi(-vt)]$$

$$\Delta_1 = \frac{(\mathbf{u}, \boldsymbol{\sigma}_0)}{\lambda}$$

$$\Delta_2 = \frac{(\mathbf{u}, \boldsymbol{\sigma})}{\lambda}$$

$$E_2(t) \propto E_0 \sin[2\pi(-vt - \Delta)]$$

$$\Delta = \Delta_2 - \Delta_1 = (\mathbf{u}, \mathbf{s})$$

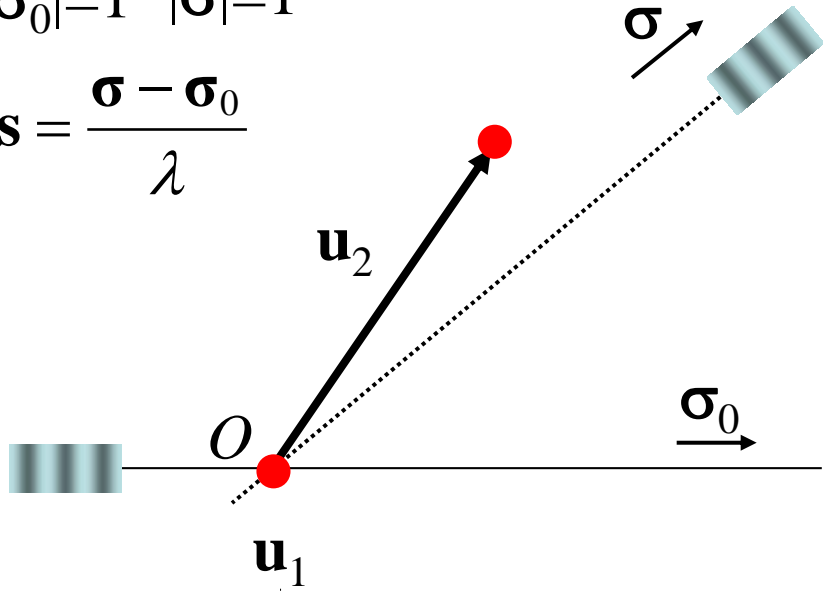
$$\mathbf{s} = \frac{\boldsymbol{\sigma} - \boldsymbol{\sigma}_0}{\lambda}$$

вектор рассеяния

Рассеяние волны системой электронов

$$|\sigma_0|=1 \quad |\sigma|=1$$

$$\mathbf{s} = \frac{\boldsymbol{\sigma} - \boldsymbol{\sigma}_0}{\lambda}$$



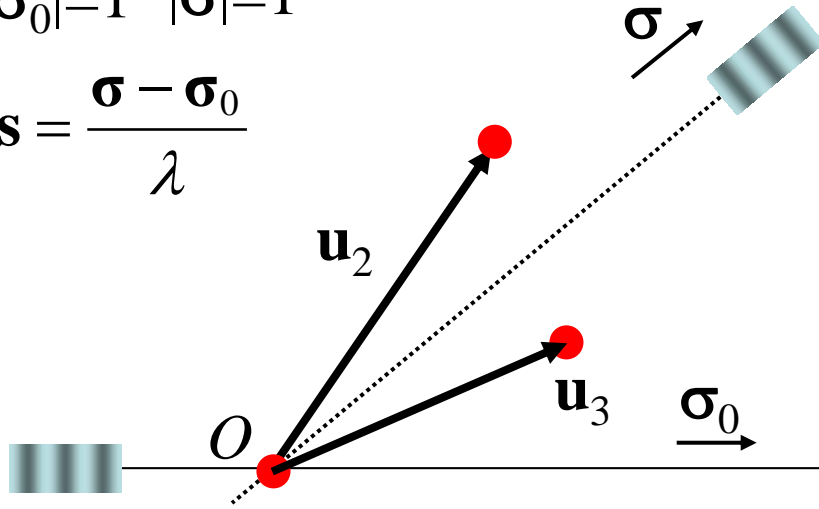
$$E(t) \propto E_0 \sin[2\pi(-\nu t)]$$

$$+ E_0 \sin[2\pi(-\nu t - (\mathbf{s}, \mathbf{u}_2))]]$$

Рассеяние волны системой электронов

$$|\sigma_0|=1 \quad |\sigma|=1$$

$$\mathbf{s} = \frac{\boldsymbol{\sigma} - \boldsymbol{\sigma}_0}{\lambda}$$

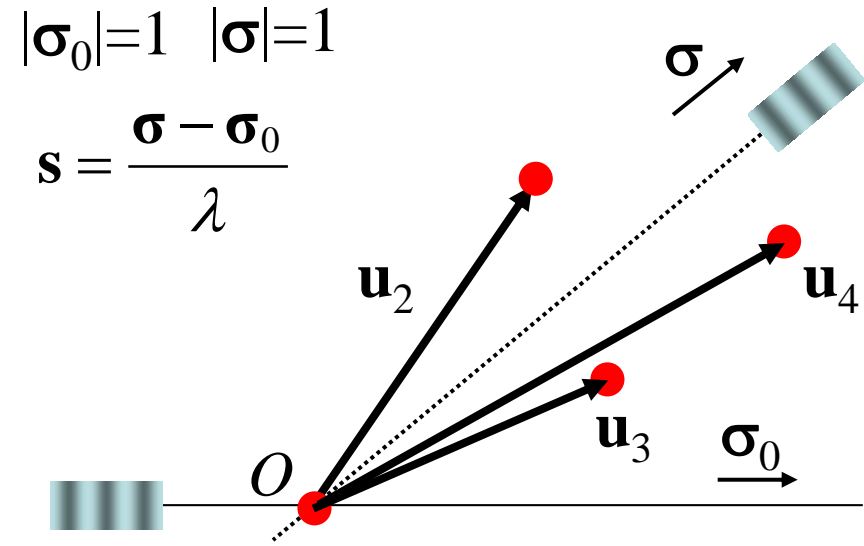


$$E(t) \propto E_0 \sin[2\pi(-\nu t)]$$

$$+ E_0 \sin[2\pi(-\nu t - (\mathbf{s}, \mathbf{u}_2))]]$$

$$+ E_0 \sin[2\pi(-\nu t - (\mathbf{s}, \mathbf{u}_3))]]$$

Рассеяние волны системой электронов



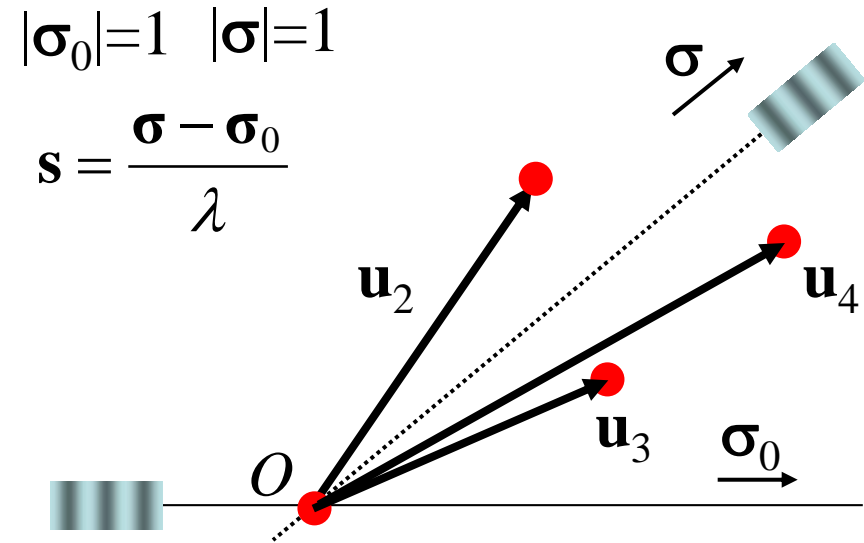
$$E(t) \propto E_0 \sin[2\pi(-\nu t)]$$

$$+ E_0 \sin[2\pi(-\nu t - (\mathbf{s}, \mathbf{u}_2))]]$$

$$+ E_0 \sin[2\pi(-\nu t - (\mathbf{s}, \mathbf{u}_3))]]$$

$$+ E_0 \sin[2\pi(-\nu t - (\mathbf{s}, \mathbf{u}_4))]]$$

Рассеяние волны системой электронов



$$E(t) \propto E_0 \sin[2\pi(-\nu t)]$$

$$+ E_0 \sin[2\pi(-\nu t - (\mathbf{s}, \mathbf{u}_2))]]$$

$$+ E_0 \sin[2\pi(-\nu t - (\mathbf{s}, \mathbf{u}_3))]]$$

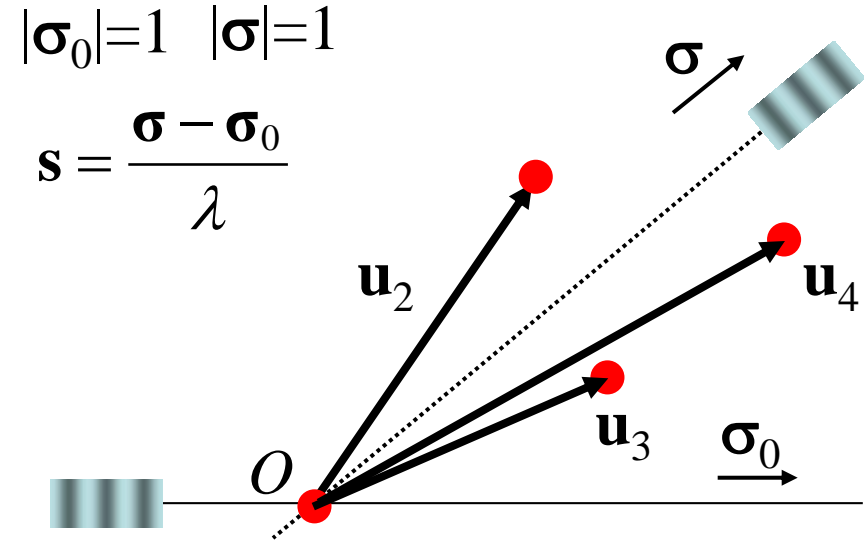
$$+ E_0 \sin[2\pi(-\nu t - (\mathbf{s}, \mathbf{u}_4))]]$$

$$= \boxed{F(\mathbf{s})} E_0 \sin[2\pi(-\nu t) - \boxed{\varphi(\mathbf{s})}]$$

$$F(\mathbf{s}) \cos \varphi(\mathbf{s}) = \sum_j \cos 2\pi(\mathbf{s}, \mathbf{u}_j)$$

$$F(\mathbf{s}) \sin \varphi(\mathbf{s}) = \sum_j \sin 2\pi(\mathbf{s}, \mathbf{u}_j)$$

Рассеяние волны системой электронов



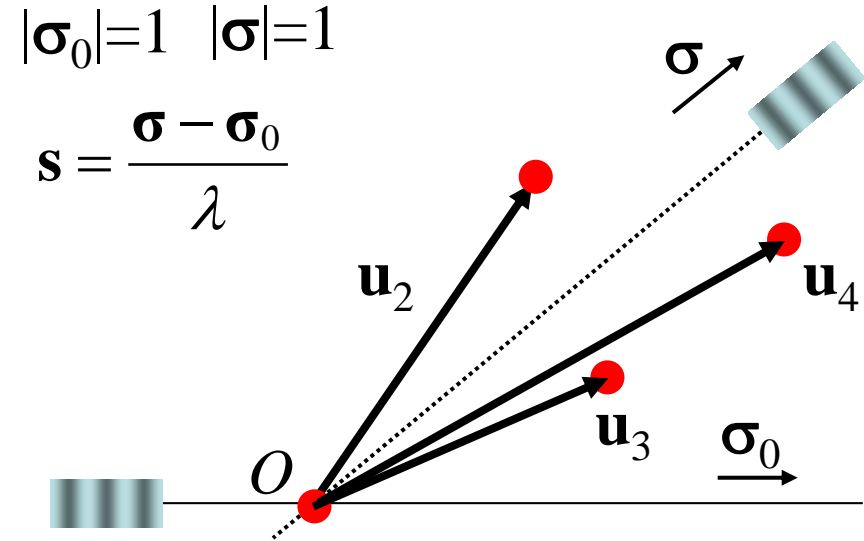
$F(\mathbf{s})$ - модуль структурного фактора;
 $\varphi(\mathbf{s})$ - фаза структурного фактора;

$$F(\mathbf{s}) \cos \varphi(\mathbf{s}) = \sum_j \cos 2\pi(\mathbf{s}, \mathbf{u}_j)$$

$$F(\mathbf{s}) \sin \varphi(\mathbf{s}) = \sum_j \sin 2\pi(\mathbf{s}, \mathbf{u}_j)$$

$$E(t) \propto F(\mathbf{s}) E_0 \sin[2\pi(-\nu t) - \varphi(\mathbf{s})]$$

Рассеяние волны системой электронов



$F(\mathbf{s})$ - модуль структурного фактора;
 $\varphi(\mathbf{s})$ - фаза структурного фактора;

$$F(\mathbf{s}) \cos \varphi(\mathbf{s}) = \sum_j \cos 2\pi(\mathbf{s}, \mathbf{u}_j)$$

$$F(\mathbf{s}) \sin \varphi(\mathbf{s}) = \sum_j \sin 2\pi(\mathbf{s}, \mathbf{u}_j)$$

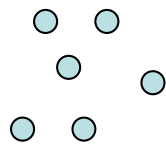
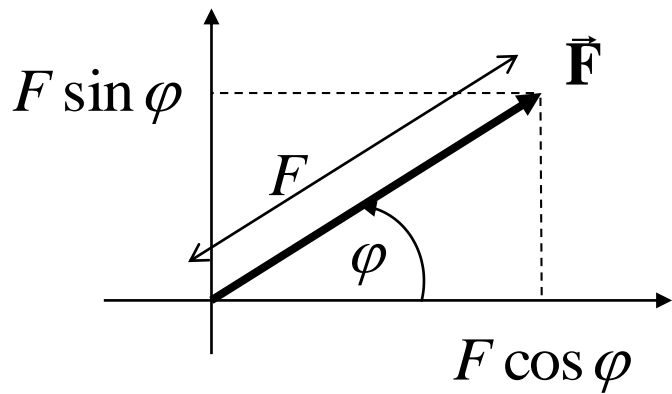
$$E(t) \propto F(\mathbf{s}) E_0 \sin[2\pi(-\nu t) - \varphi(\mathbf{s})]$$

Измеряемая в эксперименте интенсивность рассеянной волны

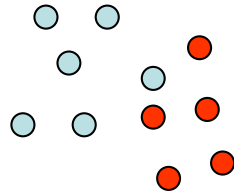
$$I(\mathbf{s}) = I(\sigma_0, \sigma) \propto \left[\sum_j \cos 2\pi(\mathbf{s}, \mathbf{u}_j) \right]^2 + \left[\sum_j \sin 2\pi(\mathbf{s}, \mathbf{u}_j) \right]^2 = F^2(\mathbf{s})$$

Структурный фактор

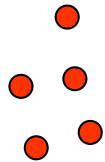
\vec{F} - вектор



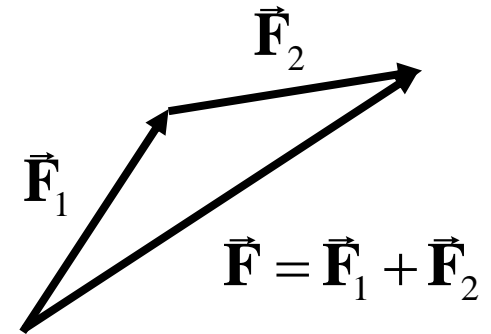
\vec{F}_1



$$\vec{F} = \vec{F}_1 + \vec{F}_2$$



\vec{F}_2



Комплексная запись

$$\vec{F}(\mathbf{s}) = F(\mathbf{s})e^{i\varphi(\mathbf{s})} = \sum_j e^{i2\pi(\mathbf{s}, \mathbf{u}_j)}$$

$$e^{i\varphi} = \cos \varphi + i \sin \varphi$$

$$F(\mathbf{s}) \cos \varphi(\mathbf{s}) =$$

$$F(\mathbf{s}) \sin \varphi(\mathbf{s}) =$$

Электроны в точках
 $\mathbf{u}_1, \mathbf{u}_2, \dots$

$$\sum_j \cos 2\pi(\mathbf{s}, \mathbf{u}_j)$$

$$\sum_j \sin 2\pi(\mathbf{s}, \mathbf{u}_j)$$

"Неединичные заряды
в точках $\mathbf{u}_1, \mathbf{u}_2, \dots$

$$\sum_j Z_j \cos 2\pi(\mathbf{s}, \mathbf{u}_j)$$

$$\sum_j Z_j \sin 2\pi(\mathbf{s}, \mathbf{u}_j)$$

Непрерывное
распределение $\rho(\mathbf{r})$

$$\sum_n \rho(\mathbf{r}_n) dV \cos 2\pi(\mathbf{s}, \mathbf{r}_n)$$

$$\sum_n \rho(\mathbf{r}_n) dV \sin 2\pi(\mathbf{s}, \mathbf{r}_n)$$

$$\int \rho(\mathbf{r}) \cos 2\pi(\mathbf{s}, \mathbf{r}) dV_{\mathbf{r}}$$

$$\int \rho(\mathbf{r}) \sin 2\pi(\mathbf{s}, \mathbf{r}) dV_{\mathbf{r}}$$

$F(\mathbf{s})$ - модуль структурного фактора (structure factor magnitude);
 $\varphi(\mathbf{s})$ - фаза структурного фактора (structure factor phase)

Комплексная запись

$$F(\mathbf{s}) e^{i\varphi(\mathbf{s})} = \int \rho(\mathbf{r}) e^{i2\pi(\mathbf{s}, \mathbf{r})} dV_{\mathbf{r}}$$

Рассеяние атомом

$$F(\mathbf{s}) = \sqrt{\left[\int \rho(\mathbf{r}) \cos 2\pi(\mathbf{s}, \mathbf{r}) dV_{\mathbf{r}} \right]^2 + \left[\int \rho(\mathbf{r}) \sin 2\pi(\mathbf{s}, \mathbf{r}) dV_{\mathbf{r}} \right]^2}$$

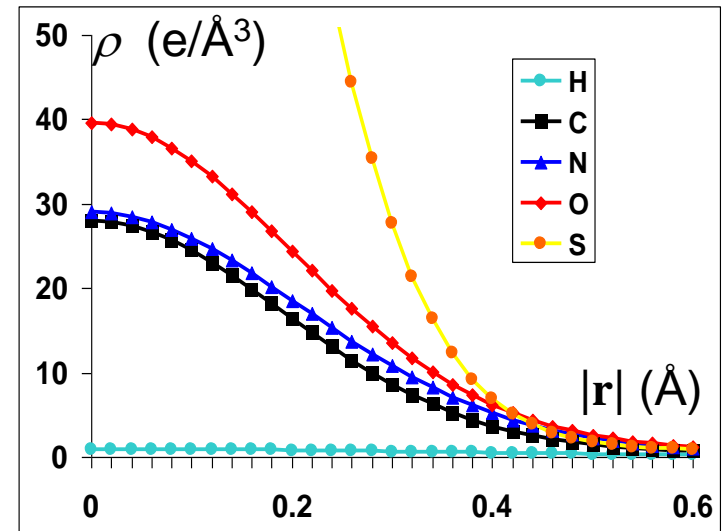
Для атома, находящегося в начале координат

$$\rho(\mathbf{r}) = C \left(\frac{4\pi}{B} \right)^{3/2} \exp\left(-\frac{4\pi^2 |\mathbf{r}|^2}{B} \right)$$

$$F(\mathbf{s}) = f(|\mathbf{s}|) \quad \varphi(\mathbf{s}) = 0$$

$$f(s) = C \exp\left(-B \frac{s^2}{4} \right)$$

$f(s)$ - фактор атомного рассеяния
(атомный формфактор)



$$F(\mathbf{s})\cos\varphi(\mathbf{s}) =$$

$$F(\mathbf{s})\sin\varphi(\mathbf{s}) =$$

Электроны в точках
 $\mathbf{u}_1, \mathbf{u}_2, \dots$

$$\sum_j \cos 2\pi(\mathbf{s}, \mathbf{u}_j)$$

$$\sum_j \sin 2\pi(\mathbf{s}, \mathbf{u}_j)$$

Непрерывное
распределение $\rho(\mathbf{r})$

$$\int \rho(\mathbf{r}) \cos 2\pi(\mathbf{s}, \mathbf{r}) dV_{\mathbf{r}}$$

$$\int \rho(\mathbf{r}) \sin 2\pi(\mathbf{s}, \mathbf{r}) dV_{\mathbf{r}}$$

Атомы с формфакторами
 $f_j(s)$ в точках $\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \dots$

$$\sum_j f_j(|\mathbf{s}|) \cos 2\pi(\mathbf{s}, \mathbf{r}_j)$$

$$\sum_j f_j(|\mathbf{s}|) \sin 2\pi(\mathbf{s}, \mathbf{r}_j)$$

$F(\mathbf{s})$ - модуль структурного фактора (structure factor magnitude);

$\varphi(\mathbf{s})$ - фаза структурного фактора (structure factor phase)

Комплексная запись

$$F(\mathbf{s})e^{i\varphi(\mathbf{s})} = \sum_j f_j(|\mathbf{s}|) e^{i2\pi(\mathbf{s}, \mathbf{r}_j)}$$

Основы рентгеноструктурного анализа

- амплитуда регистрируемой суммарной волны зависит от взаимного расположения рассеивающих электронов; измеряя эту амплитуду, мы получаем возможность делать выводы о взаимном расположении электронов в объекте;
- амплитуда зависит от направления, в котором расположен детектор; измеряя амплитуду в разных направлениях, мы получаем набор независимых измерений;

- результаты эксперимента определяются расположением электронов; поэтому та информация, которую мы можем извлечь из эксперимента - это распределение электронной плотности в изучаемом объекте; координаты атомов - это упрощенное описание электронной плотности; метод РСА дает больше, нежели только координаты атомов;
- если нам известна структура, мы можем рассчитать и амплитуду, и фазу суммарной волны, но в эксперименте может быть измерена только амплитуда.

Метод проб и ошибок

Гипотетическая
структура; координаты
атомов $(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \dots, \mathbf{r}_N)$



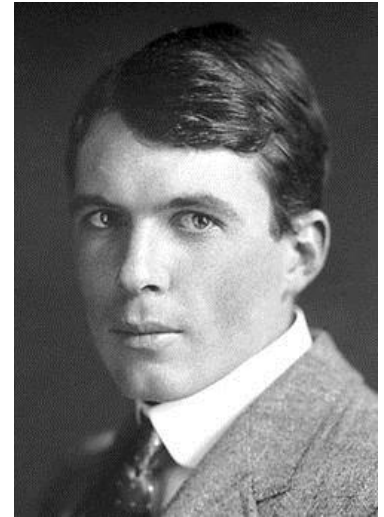
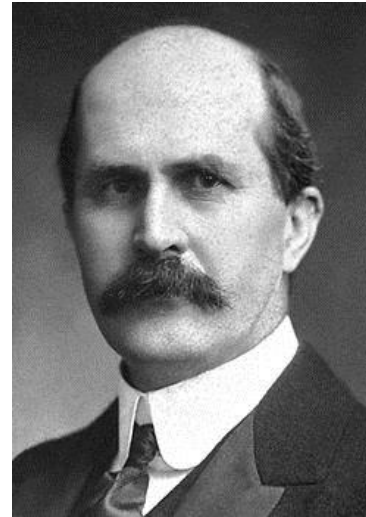
Расчет соответствующей
картины дифракции

$$F(\mathbf{s}_1), F(\mathbf{s}_2), \dots, F(\mathbf{s}_K)$$



Сравнение с
экспериментом

$$R = \sum_{k=1}^K (F^{obs}(\mathbf{s}_k) - F^{calc}(\mathbf{s}_k))^2$$



Sir William Henry Bragg
Sir William Lawrence Bragg

Нобелевская премия 1915 г.

Определение структуры как задача МИНИМИЗАЦИИ

- имеем набор экспериментально определенных значений модулей структурных факторов $F^{obs}(\mathbf{s}_1), F^{obs}(\mathbf{s}_2), F^{obs}(\mathbf{s}_3), \dots$
- для каждой пробной структуры $\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \mathbf{r}_3, \mathbf{r}_4, \dots$ умеем рассчитывать "теоретические" значения модулей

$$F^{calc}(\mathbf{s}) = \sqrt{\left[\sum_j f_j(|\mathbf{s}|) \cos 2\pi(\mathbf{s}, \mathbf{r}_j) \right]^2 + \left[\sum_j f_j(|\mathbf{s}|) \sin 2\pi(\mathbf{s}, \mathbf{r}_j) \right]^2}$$

- хотим подобрать координаты атомов структуры $\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \mathbf{r}_3, \mathbf{r}_4, \dots$ так, чтобы минимизировать расхождение между теоретическими и экспериментальными значениями

$$Q(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \mathbf{r}_3, \dots) = \sum_k \left[F^{obs}(\mathbf{s}_k) - F^{calc}(\mathbf{s}_k; \mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \dots) \right]^2 \Rightarrow \min$$

Проблема

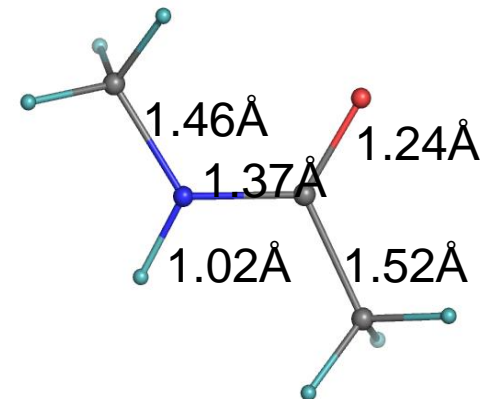
Число неизвестных значений координат может достигать сотен тысяч. Число экспериментальных наблюдений - миллионов. Такие задачи наука, на сегодняшний день, решать не умеет.

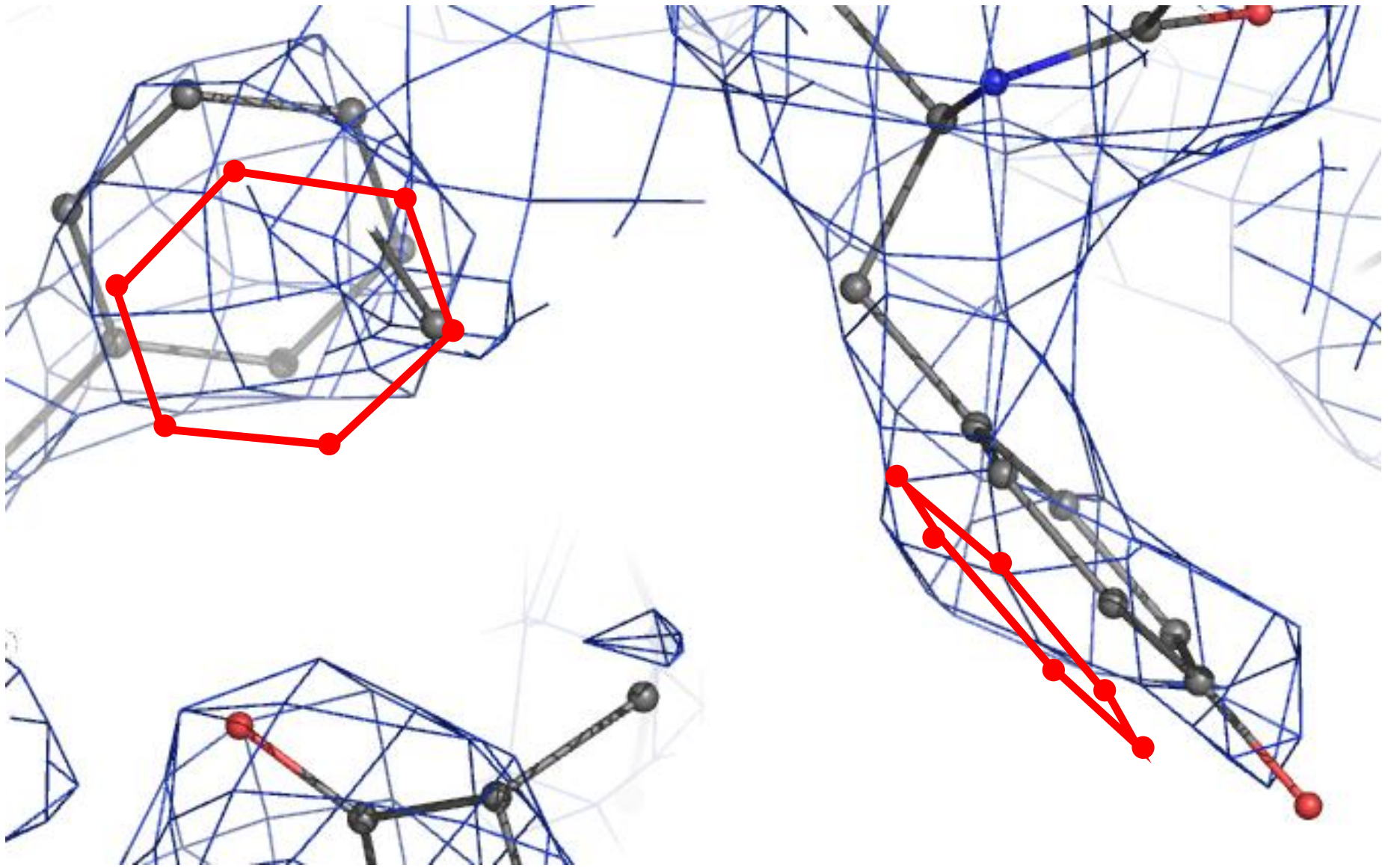
Однако

Если удалось найти значения координат приближенно, то их можно уточнить, минимизируя погрешность $Q(\mathbf{r}_1, \dots, \mathbf{r}_N)$

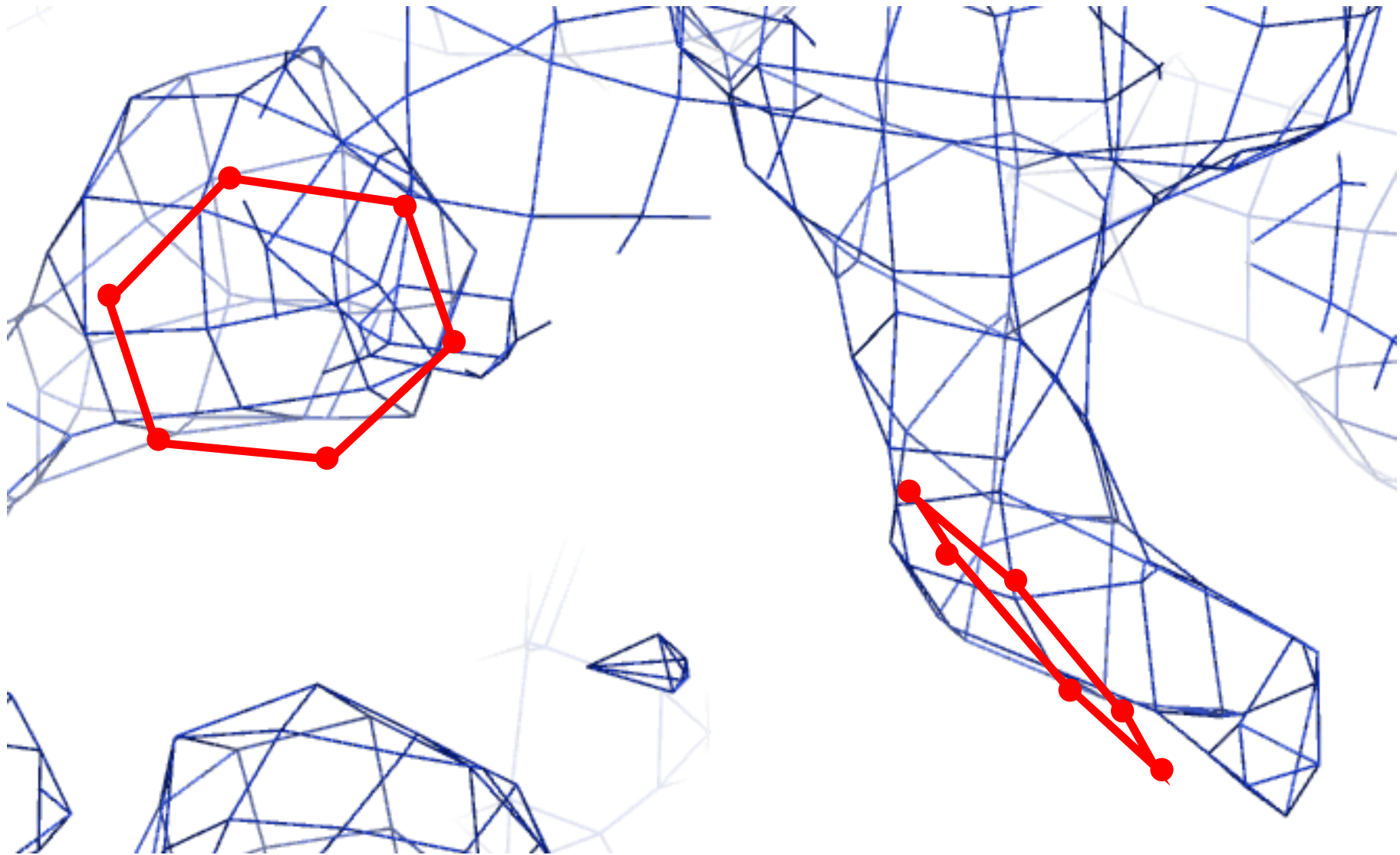
$$Q(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \mathbf{r}_3, \dots) = \sum_k [F^{obs}(\mathbf{s}_k) - F^{calc}(\mathbf{s}_k; \mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \dots)]^2 \Rightarrow \min$$

Необходимая точность определения стартовых координат: $\sim 0.7 \text{ \AA}$





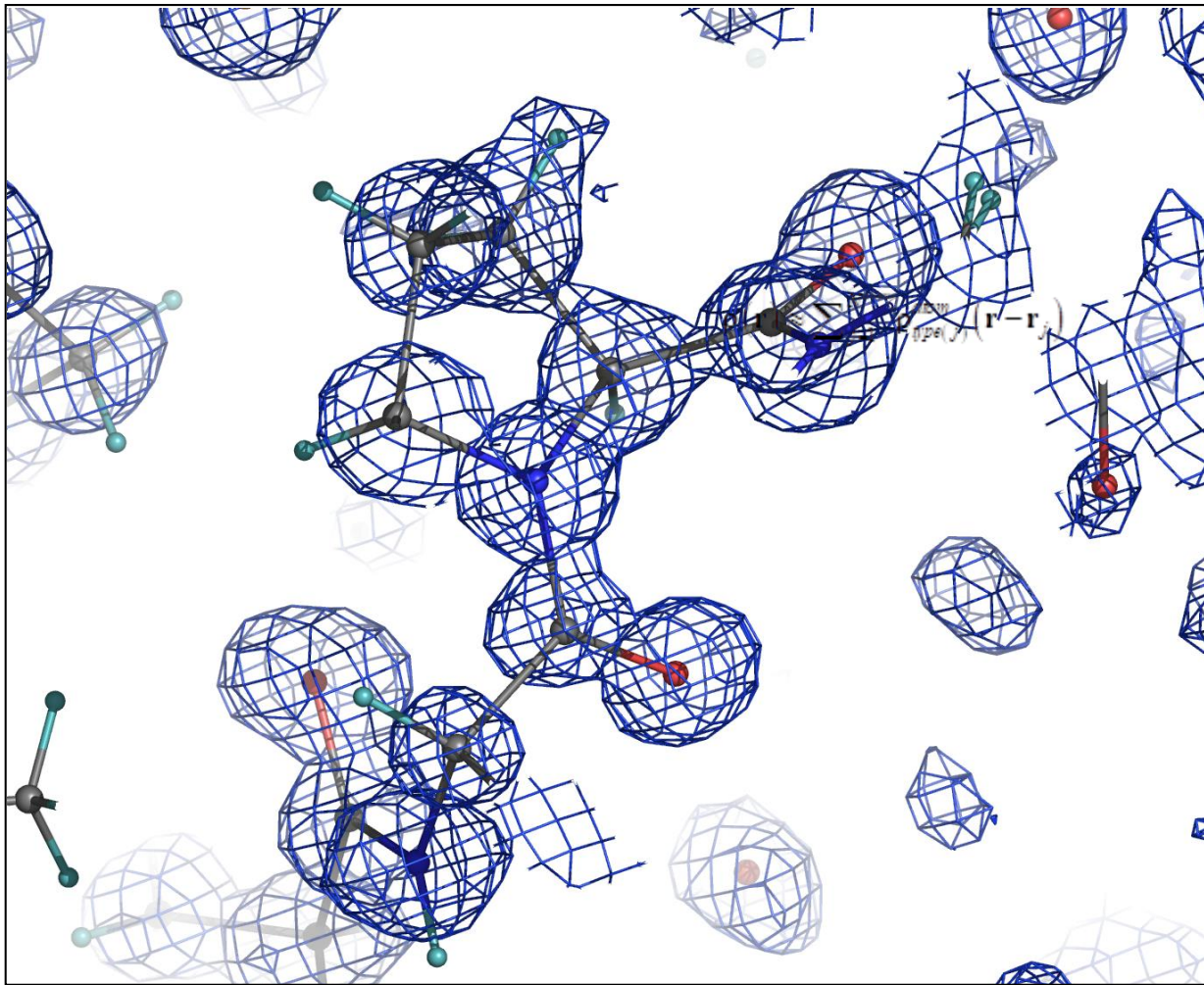
RNase sa, 2.5Å, MIR



RNase sa, 2.5Å, MIR

Интерпретация распределения электронной плотности

$$\rho(\mathbf{r}) \approx \sum_{j=1}^{N^{atoms}} \rho_{type(j)}^{atom}(\mathbf{r} - \mathbf{r}_j)$$



Уточнение
модели

PDB

Как измерить энергию рассеянной волны?

падающая волна

$$E(\mathbf{r}, t) = E_0 \sin \left[2\pi \left(\frac{(\boldsymbol{\sigma}_0, \mathbf{r})}{\lambda} - \nu t + \delta \right) \right]$$

рассеянная волна

$$E(\mathbf{r}, t) = \frac{\varepsilon}{|\mathbf{r}|} E_0 \sin \left[2\pi \left(\frac{|\mathbf{r}|}{\lambda} - \nu t + \delta \right) \right]$$

распространяется во всех направлениях

Эксперимент позволяет измерить интенсивность рассеянной волны. Интенсивность пропорциональна квадрату амплитуды.

$$I = \left(\frac{\varepsilon}{|\mathbf{r}|} \right)^2 I_0$$

$$\left(\frac{\varepsilon}{|\mathbf{r}|} \right)^2 \approx 10^{-24} \quad \text{!!!}$$

Проблема

Интенсивность рассеяния отдельной молекулой слишком мала для регистрации.

Возможное решение:

- увеличение мощности источника излучения;
- повышение чувствительности регистрирующего устройства;
- увеличение времени экспозиции;
- рассеяние большим числом идентичных молекул.

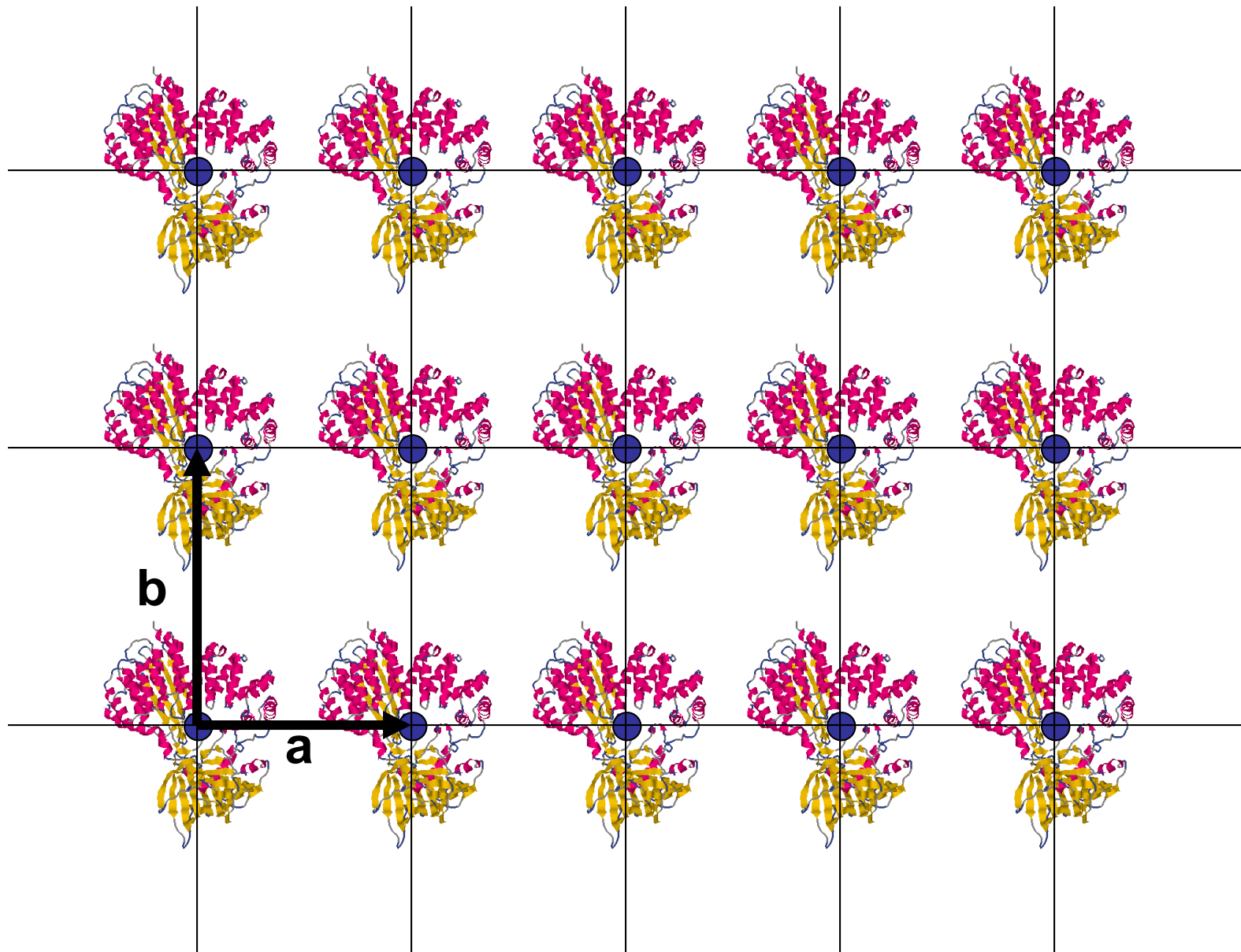
Много молекул:

- растворы;
- газы;
- порошки;
- **кристаллы.**

Рассеяние кристаллами



Buried a thousand feet (300 meters) below Naica mountain in the Chihuahuan Desert, the cave was discovered by two miners excavating a new tunnel for the Industrias Peñoles company in 2000.



линейные размеры кристалла $0.1\text{мм}=10^6\text{\AA}$
линейные размеры элементарной ячейки 100\AA

количество копий молекулы в кристалле $(10^4)^3=10^{12}$

Кристалл усиливает интенсивность
в 10^{24} раз !!!

Условия дифракции
(Лауэ):

$$(\mathbf{s}, \mathbf{a}) = h$$

$$(\mathbf{s}, \mathbf{b}) = k$$

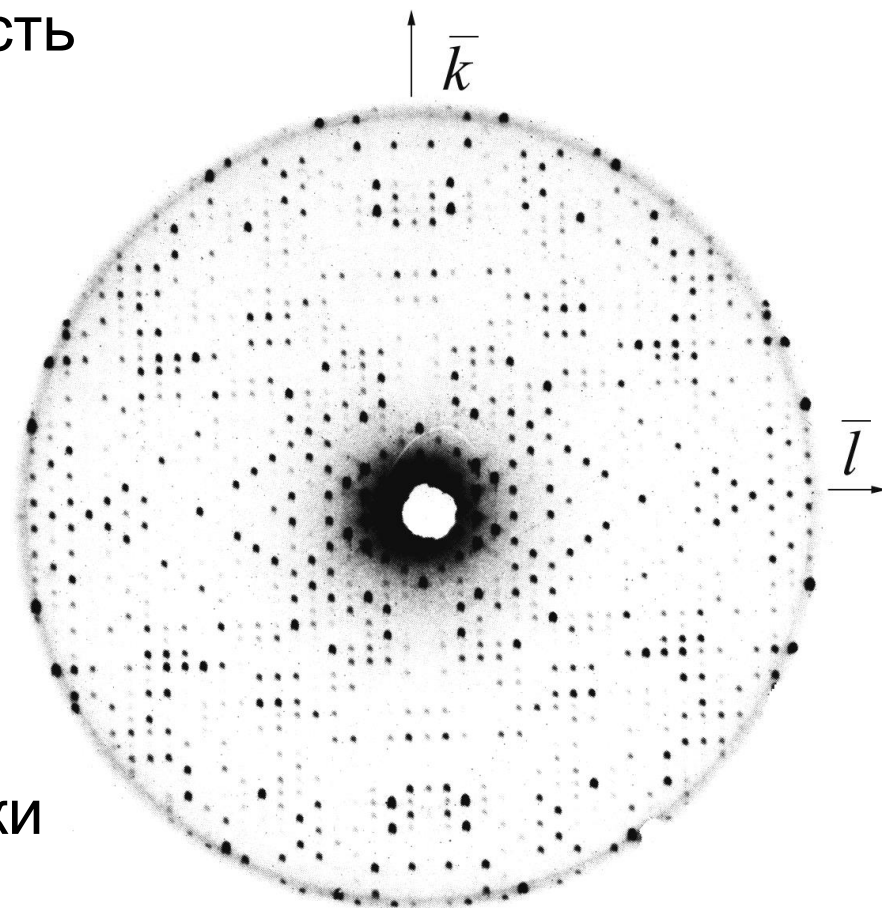
$$(\mathbf{s}, \mathbf{c}) = l$$

h, k, l - целые числа

(индексы рефлекса)

$\mathbf{a}, \mathbf{b}, \mathbf{c}$ - ребра элементарной ячейки

$$\mathbf{s} = \frac{\boldsymbol{\sigma} - \boldsymbol{\sigma}_0}{\lambda} \text{ - вектор рассеяния}$$



Т.Бландел, Л.Джонсон. Кристаллография белка. "Мир", Москва, 1979

М.А.Порай-Кошиц. Основы структурного анализа химических соединений. Москва, "Высшая школа", 1989

Ч.Кантор, П.Шиммел. Биофизическая химия, том 2. Москва, "Мир", 1984

International Tables for Crystallography, vol. F. Crystallography of biological macromolecules. Second Edition. Wiley, 2011

И.Сердюк, Н.Закаи, Дж.Закаи. Методы в молекулярной биофизике. т.2. М.КДУ, 2010

Urzhumtsev A.G., Lunin V.Y. (2019). Introduction to crystallographic refinement of macromolecular atomic models. *Crystallography Reviews*. 25:3, 164-262.