

ИССЛЕДОВАНИЯ МОНОКРИСТАЛЛОВ БЕЛКОВ
В КООРДИНАТНЫХ РЕНТГЕНОВСКИХ ДИФРАКТОМЕТРАХ
С ПРОПОРЦИОНАЛЬНОЙ КАМЕРОЙ ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ

М.Е. Андрианова*, Ю.В. Заневский, А.Б. Иванов,
А.Н. Попов*, В.Д. Пешехонов, Д.М. Хейкер*,
С.Н. Черненко

Описывается координатный автоматический рентгеновский дифрактометр КАРД-3/4/, предназначенный для исследований атомной структуры белков. Дифрактометр создан на основе пропорциональной камеры с плоским дрейфовым промежутком и быстрыми линиями задержки, двукружного гониометра, мини-ЭВМ СМ-2. Дается методика получения полного набора интегральных отражений. На дифрактометре за 2 года получено около 40 массивов дифракционных данных от 40 монокристаллов белков, измерено более $3 \cdot 10^6$ отражений. Приведены результаты съемки монокристаллов белков.

Работа выполнена в Лаборатории высоких энергий ОИЯИ и Институте кристаллографии АН СССР.

Investigation of Protein Single Crystals
in a Coordinate X-Ray Diffractometer
with a High Resolution Proportional Chamber

Andrianova M.E. et al

A coordinate automatic X-ray diffractometer KARD-3(4) is described. The diffractometer is used to study the atomic structure of proteins. It has been constructed using a proportional chamber with a flat drift gap and fast delay lines, a two-circle goniometer and an SM-2 minicomputer. The method of obtaining the total set of integral reflections is described. Using the diffractometer, 40 massives of diffraction data from 40 protein single crystals have been obtained, more than $3 \cdot 10^6$ reflections have been measured. The results of studying the protein single crystals are presented.

The investigation has been performed at the Laboratory of High Energies, JINR and the Institute of Crystallography, USSR Academy of Sciences.

* Институт кристаллографии АН СССР им. А.В. Шубникова,
Москва

Параллельное измерение интенсивности одновременно возникающих дифрагированных лучей в случае монокристаллов с большими периодами решетки приводит к ускорению эксперимента в координатных рентгеновских дифрактометрах более чем на порядок по сравнению с одноканальными дифрактометрами при таком же уменьшении дозы облучения образца ^{1-5/}. Это позволяет исследовать с высоким разрешением атомную структуру белков с большим молекулярным весом, нестабильные белковые комплексы, уменьшить число необходимых для исследования образцов, их величину, исследовать кристаллы при меньшей степени радиационного повреждения.

В Институте кристаллографии АН СССР и Лаборатории высоких энергий ОИЯИ был создан координатный автоматический рентгеновский дифрактометр КАРД-3 ^{5/} с двумерной многокитевой пропорциональной камерой на быстрых линиях задержки с числом элементов пространственного разрешения 256x256 и временным разрешением 0,55 мкс ^{6/} с двукружным гониометром наклонного типа и управляющей системой реального времени на базе мини-ЭВМ СМ-2 ^{7/}.

В дифрактометре КАРД-3 для получения полного набора интегральных интенсивностей применена наклонная геометрия съемки, при которой пропорциональная камера неподвижна и параллельна оси вращения кристалла, а наклоняется рентгеновская трубка. Благодаря повороту более легкой трубки и введению поправки на нелинейность камеры обеспечивается высокая точность предварительного вычисления положения дифракционных пятен /ошибка менее 0,5 канала/. Наклонная геометрия позволяет в пять раз уменьшить мертвую зону в обратном пространстве. При установке камеры на расстоянии 300, 500 и 750 мм от образца дифракционное пятно попадает в область, не превышающую 5x5 каналов ^{8/}. Для $\text{CuK}\alpha$ -излучения это соответствует предельным параметрам a_{\max} - 90, 130 и 180 Å и разрешению съемки d_{\min} - 1,6; 2,5 и 3,5 Å. Число одновременно измеряемых отражений пропорционально $(a_{\max} / d_{\min})^2 \approx 50^2$ или квадрату отношения числа каналов на диаметре детектора к размерам дифракционного пятна. Предельная скорость счета всей пропорциональной камерой определяется циклом инкрементного канала /4 мкс/ и составляет 250000 имп./с при потерях счета около 30%, определяемых мертвым временем и временем кодирования в пропорциональной камере /0,55 мкс/ ^{9/}. Такое быстроедействие позволяет пренебречь ошибкой из-за потерь счета в дифрактометре КАРД-3.

В дифрактометре КАРД-4 в многокружном гониометре трубка не только наклоняется, но и поворачивается, расстояние образец - детектор изменяется от 400 до 1000 мм ^{10/}. Предельный параметр равен 250 Å при разрешении съемки 1,7 Å.

Процесс получения дифракционных данных в дифрактометрах КАРД-3,4 разбивается на три этапа. На первом этапе предварительных исследований производится установка и определение установочных параметров детектора, ориентировка и юстировка кристалла, составление первичного списка индексов отражений hkl в зависимости от угла поворота кристалла ω , съемка кривых поглощения, получение данных для определения дрейфа и съемка интенсивности контрольных отражений.

Ориентировка кристалла производится с помощью устройства визуализации дифракционной картины, юстировка по отражениям $00l$ для кристаллов нетриклинной сингонии и отражениям $hk0$ для триклинных кристаллов, с помощью программ-интенсиметра и символьного дисплея.

На втором этапе уточняется матрица ориентировки кристалла v_B , уточняются индексы hkl отражений, попадающих в текущий интервал поворота кристалла $\Delta\omega_i$, измеряется дифракционная интенсивность в текущем интервале $\Delta\omega_i$, по уточненной матрице v_B и индексам hkl рассчитываются координаты дифракционных пятен в пропорциональной камере, суммируются интенсивности в группе каналов вблизи центров дифракционных пятен. Интегральная интенсивность отражения и фон для данного отражения измеряются в постоянной группе каналов при непрерывном сканировании в пяти последовательных интервалах $\Delta\omega_i$. По первому и пятому интервалам определяется величина фона, по трем средним - интегральная интенсивность с фоном. Такой метод измерения интегральной интенсивности позволяет хранить только одну полную дифракционную картину, исключить погрешности, связанные с неоднородностью ширины каналов при вычитании фона, правильно выбрать величину интервала измерения интегральной интенсивности. На втором этапе подсчитываются интегральная интенсивность отражения I , ошибка статистики счета σ , перекос фона, производится анализ уровня средней ошибки статистики счета по отношению к средней интегральной интенсивности. Расчетные программы на втором этапе по времени совмещены с накоплением дифракционной картины.

На третьем этапе вводятся поправки на множители Лоренца, поляризации, на поглощение, на дрейф. Определяется качество полученного массива данных путем расчета фактора расходимости массивов, связанных симметрией; повторно измеренных массивов; массивов, измеренных в различных дифрактометрах:

$$R = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |\bar{I} - I_{hkl}^i \cdot g_i|}{\sum_{hkl} \sum_i I_{hkl}^i \cdot g_i}$$

Таблица

Результаты съемки монокристаллов белков
в дифрактометрах КАРД-3 и КАРД-4
с плоской пропорциональной камерой

Белок	Молекулярный вес	Параметры ячейки. Пространственная группа	Размеры образца мм	d_{\min} Å	ω град/ммл.
Леггемоглобин и 4 производных	17000	$a = 92,3\text{Å}$ $b = 38,3\text{Å}$ $c = 52,2\text{Å}$ $\gamma = 99^\circ$	0,4x0,7x2	3,0	0,3
					0,6
		B2		1,8	0,6
12 комплексов трансаминазы	94000	$a = 62,7\text{Å}$ $b = 118,1\text{Å}$ $c = 124,4\text{Å}$ $P2_1^2I^2I_1$	0,6x0,3x3	2,7	0,08
Термитаза и 5 производных	30000	$a = 47,7\text{Å}$ $b = 64,2\text{Å}$ $c = 72,9\text{Å}$ $P2_1^2I^2I_1$	0,02x0,4x0,4	2,5	0,16
					1,8
Каталаза и 5 производных	200000	$a = b = c = 0,45x0,45x0,45$ $=138,4\text{Å}$ P32	2,7		0,08
Рибонуклеаза и комплекс	23000	$a = 31,6\text{Å}$ $b = 51,1\text{Å}$ $c = 57,3\text{Å}$ $\gamma = 93,5^\circ$ P2I	0,2x0,15x0,12	1,75	0,08
Форматдегидро- геназа и 4 про- изводных	80000	$a = 118,5\text{Å}$ $b = 70,1\text{Å}$ $c = 54,6\text{Å}$ P2I =113	0,3 x 0,4 x 1	3,0	0,125
Церулоплазмин	130000	$a = 268\text{Å}$ $b = 129\text{Å}$ I ₄	2 x 0,5 x 0,4	4,0	0,03

Время съемки в час.	Число неза- висимых областей (K)	Число из- меренных отражений	Число отра- жений в % для которых $I > \sigma$	R экв %	$\frac{\Sigma \sigma}{\Sigma I}$ %	$\frac{\Sigma \sigma}{\sqrt{k} \Sigma I}$ %
20	4	14000	94	4	2,3	1,2
10	4	14000	91	5,3	3	1,5
40	2	108000	68+75	5,6+9,5	5,3+8,8	3,7+ 6,2
480	2	612000	78+85	6+8	5,8+7,5	4,1+5,3
40	4	75000	81+87	7+10	6+10	3+5
200	4	400000	63+71	18+25	18+28	9+14
80	12	221000	86	7	8,4	2,4
200	12	1105000	73+79	8+10	8,4+17	2,4+4,9
80	2	60000	78	7,5	7	5
52	2	215 000	72+89	4,2+8,3	3,1+7,4	2,2+5,2
50	1	50 000	67	7,5	7	7

где g_i - коэффициент приведения массивов к одному масштабу,

$$\bar{I}_{hkl} = \frac{\sum_i I_{hkl}^i g_i}{\sum_i g_i}$$

В дифрактометрах КАРД-3 и КАРД-4 за 2 года было получено около 40 массивов интегральных интенсивностей от 40 монокристаллов белков леггемоглобина, трансаминазы, термитазы, каталазы, рибонуклеазы и их производных /см. таблицу/. В общей сложности было измерено более $3 \cdot 10^6$ отражений от кристаллических белков.

Проверка методики съемки и отладка программного обеспечения дифрактометра была проведена на кристалле нативного леггемоглобина. Детектор устанавливался на расстоянии 270 мм от кристалла, монохроматизированный пиролитическим графитом первичный пучок был перпендикулярен оси вращения кристалла ω и падал в центр детектора. Полный набор дифракционных данных 14000 отражений был получен за 20 и 10 часов при скорости вращения кристалла $0,3^\circ$ и $0,6^\circ$ в минуту. Фактор расходимости при повторных измерениях со скоростью вращения $0,3^\circ$ в минуту составил 2,3%, средний уровень ошибки статистики - 2,3%. Фактор расходимости между массивами, связанными симметрией, составил 4%; между массивами, полученными в КАРД-3/4/ и в одноканальном дифрактометре, - 5%. Проведенные на кристалле леггемоглобина измерения подтвердили правильность методики и отсутствие заметных систематических ошибок.

Съемка очень нестабильных кристаллов производных леггемоглобина / $a = 92,3 \text{ \AA}$ / с графитовым монохроматором с разрешением $1,8 \text{ \AA}$ при скорости вращения кристаллов $0,6^\circ$ в минуту и расстоянии образец - детектор 326 мм показала, что за 10 часов измеряется массив из 27000 отражений. Производительность КАРД-3/4/ в 50 раз выше, чем одноканального дифрактометра при съемке того же образца с тем же уровнем статистических ошибок. Фактор расходимости связанных симметрией отражений составил от 5,6 до 9,5%. Было показано, что в группе 5×5 каналов измеряется от 92 до 99% интегральной интенсивности.

Съемка комплексов трансаминазы / $c = 124,4 \text{ \AA}$ / в отфильтрованном $\text{CuK}\alpha$ -излучении при скорости вращения кристалла $0,08^\circ$ в минуту, расстоянии образец - детектор 541 мм показала, что разрешение съемки равно $2,7 \text{ \AA}$, производительность - 51000 отражений за 40 часов, в 50 раз больше, чем в одноканальном дифрактометре при том же уровне статистической ошибки. Фактор расходимости интенсивностей отражений, связанных симметрией, составил от 6 до 8% при таком же уровне статистических ошибок. На ряде отражений показано, что в группе 5×5 каналов измерялось от 96 до 99% интегральной интенсивности.

Кристаллы термитазы и пяти производных имели очень малые размеры $0,02 \times 0,4 \times 0,4$ мм. При скорости съемки $0,16^\circ$ в минуту и разрешении съемки $1,8 \text{ \AA}$ было измерено за 40 часов 80000 отражений для каждого кристалла с фактором расходимости 18-25% при средней ошибке статистики 18-28%. После усреднения 4 эквивалентных отражений уровень ошибки статистики составил 9-14%.

Кристаллы каталазы и ее пяти производных - наиболее сложный белок, снятый в КАРД-3 / $a = b = c = 133,4 \text{ \AA}$, молекулярный вес 200000/. С разрешением $2,7 \text{ \AA}$ за 40 часов при скорости съемки $0,16^\circ$ в минуту было снято 300000 отражений для каждого комплекса с фактором расходимости по эквивалентным отражениям, равным 8-10%, и средней ошибкой статистики 8,4 - 17% /после усреднения по 12 эквивалентным отражениям ошибка статистики составила 2,4-4,9%/.

Литература

1. Arrndt U.W., Ambrose B.K. IEEE Trans.Nucl.Sci., 1968, vol.NS-15, No.3, p.92.
2. Вайнштейн Б.К. и др. Кристаллография, 1975, т.20, №4, с.829.
3. Xuong N.H. et al. Acta Cryst., 1978, vol.A34, p.289.
4. Мокульская Т.Д. и др. Кристаллография, 1982, т.27, № 4, с.775.
5. Andrianova M.E. et al. Journ.Appl.Cryst., 1982, vol.15, p.626.
6. Анисимов Ю.С. и др. Кристаллография, 1981, т.26, № 6, с.1305.
7. Андрианова М.Е. и др. ОИЯИ, 18-83-48, Дубна, 1983.
8. Заневский Ю.В. и др. В сб.: Аппаратура и методы рентгеновского анализа. "Машиностроение", Л., 1983, с.37.
9. Заневский Ю.В. и др. ОИЯИ, P13-83-121, Дубна, 1983.
10. Хейкер Д.М. Авт.свид. СССР № 1004834 от 20.11.81. Бюл. ОИ, 1983, № 10, с.183.

Рукопись поступила 23 декабря 1985 года.