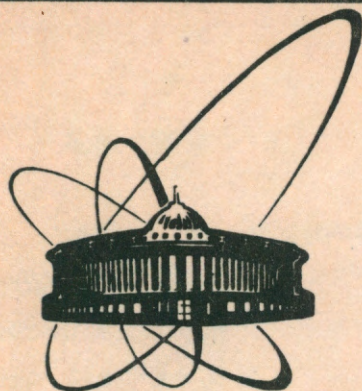


91-388



**СООБЩЕНИЯ
ОБЪЕДИНЕННОГО
ИНСТИТУТА
ЯДЕРНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ
ДУБНА**

14-91-388

**В. И. Горделий, В. И. Луциков, А. Г. Сырых,
В. Г. Черезон**

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РЕНТГЕНОВСКОГО
ДИФРАКТОМЕТРА "ДРОН" ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ
ДЛИННОПЕРИОДНЫХ СТРУКТУР**

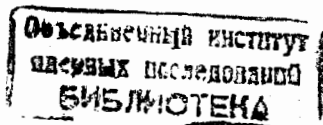
1991

1. Введение

Дифракция рентгеновских лучей используется для изучения структуры длиннопериодных веществ, в том числе и биологических объектов [1,2]. Этот метод является эффективным при изучении структуры биологических и модельных мембран [3-7]. Так, например, то что структура мембран является бислойной, впервые было показано именно с помощью дифракции рентгеновских лучей [3]. Этот результат является одним из основных достижений в науке о клетке. Широкие возможности метод предоставляет при изучении фазовых переходов в мембранах [4], а также изучении лангмюровских пленок [8].

Однако изучение указанных выше объектов требует так называемых, малоугловых дифрактометров, которые являются менее доступными для широкого круга исследователей. Особенно эффективным изучение структуры мембран является при совместном использовании дифракции рентгеновских лучей и нейтронов [9]. Начиная с 1984 года, в Лаборатории нейтронной физики ОИЯИ проводят исследования структуры липидных и биологических мембран с помощью дифракции нейтронов [10]. Практика показала необходимость комплементарного (с помощью дифракции рентгеновских лучей и нейтронов) исследования этих объектов.

В данной работе показано, что серийно выпускающийся промышленностью рентгеновский дифрактометр ДРОН, обычно используемый для изучения кристаллов с постоянными решетки в несколько ангстрем, может быть легко адаптирован для исследования длиннопериодных структур с характерными периодами повторяемости до $\sim 150 \text{ \AA}$.



2. Материалы и методы

А. Рентгеновский дифрактометр ДРОН

Измерения проводились на модернизированном в ЛНФ ОИЯИ дифрактометре ДРОН с управлением измерениями и регистрацией дифракционных спектров на РС/ХТ [11]. Данный дифрактометр предназначен для широкого круга структурных исследований кристаллических материалов. В качестве источника рентгеновского излучения использовалась трубка с медным анодом с длиной волны K_{α} линии 1.54 \AA . Для монохроматизации пучка использовался никелевый фильтр.

При съемке дифракционных спектров от ориентированных и неориентированных мультислойных мембран и лэнгмюровских пленок на тонких плоских подложках применялась фокусировка по Брэгу-Брентано. Спектры в этом случае измерялись при синхронном вращении детектора и образца вокруг вертикальной оси гониометра, проходящей через центр его круга, причем угловая скорость вращения детектора вдвое больше угловой скорости вращения образца, т. е. осуществляется так называемое сканирование $\theta - 2\theta$.

Неориентированные липидные дисперсии в кварцевых капиллярах невозможно поместить в плоскости головки гониометра, проходящей через его ось вращения и образец оказывается выдвинутым по оси пучка рентгеновского излучения в сторону детектора на ~ 1 см. Можно показать, что в этом случае в области малых углов детектора 2θ истинный угол рассеяния $2\theta_u$ равен

$$2\theta_u = 2\theta (1 + x/R) \quad , (1)$$

где x - расстояние, на которое выдвинут образец, R - расстояние от центра гониометра до детектора. В случае неориентированных мембран в кварцевых капиллярах образец при измерении дифракционных спектров оставался неподвижным и сканирование осуществлялось только детектором рентгеновского излучения.

Для регистрации рентгеновского излучения использовался точечный сцинтилляционный детектор.

В. Длиннопериодные образцы для рентгеноструктурных исследований

Для измерений использовались ориентированные и неориентированные липидные и биологические мембраны.

Лэнгмюровские пленки из 70 слоев стеарата кадмия были получены в Институте кристаллографии АН СССР.

Высокоориентированные мембраны из DPPC (~ 20 мг) (1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолина) (производства фирмы "SERVA") были приготовлены по методу, изложенному в работах [11,12], на кварцевой полированной подложке размером $25 \times 25 \text{ мм}^2$.

Ориентированные мембраны из *Halobacterium halobium* (так называемые пурпурные мембраны) получались размазыванием водной дисперсии этих мембран на майларовой пленке с последующим медленным испарением растворителя из раствора.

Неориентированные образцы из яичного лецитина и локального анестетика гептакаин-гидрохлорида (~ 5 мг), приготовленные в Университете им. Я. Коменского, г. Братислава, наносились на тонкую майларовую подложку и равномерно размазывались по ней тонким слоем. Неориентированные мультислойные дисперсии из DPPC в избыт-

ке воды (количество молекул воды на молекулу липида $n_w = 30$) были приготовлены в тонкостенном кварцевом капилляре (ФРГ) с диаметром 1 мм. 4 мг липида, растворенного в 4 мкл хлороформа, опускали на дно капилляра центрифугированием. После полного испарения форвакуумным насосом органического растворителя добавлялось 4 мкл H_2O , образец выдерживался далее в течение 8 часов при $T = 60^\circ C$ (температуре выше основного фазового перехода) и центрифугировался.

3. Коллимация рентгеновского пучка для малоугловых исследований

Большинство биологических и липидных мембран имеют период повторяемости d меньше 100 \AA . Это означает, что измерения дифракционных спектров надо вести, начиная с малых углов рассеяния

$$2\theta_{\min} \sim 2 \arcsin(\lambda/2d) \sim 0.9^\circ \quad (2)$$

В дифрактометре конструктивно предусмотрено расположение двух формирующих пучок щелей, расположенных вблизи выходного окна рентгеновской трубки на расстоянии 10 мм друг от друга. Проблема, которая обычно возникает при работе на малых углах, — это большой фон в области прямого пучка, возникающий как из-за плохой его коллимации, так и из-за паразитного рассеяния на краях второй щели.

Для лучшей коллимации пучка мы использовали вторую щель с размерами 0.05 мм. Изменяя угловое положение рентгеновской трубки, можно уменьшать расходимость пучка, за счет уменьшения видимой площади фокусного пятна рентгеновской трубки. Этот угол при исследовании ориентированных образцов составлял 1° , а неориентированных — 6° .

Уменьшение паразитного рассеяния от второй щели достигалось помещением перед образцом из неориентированных мембран в кварцевом капилляре третьей щели. Обычно в качестве щели использовалось окно в держателе образца размерами 0.4 x 5 мм. Данная система коллимации пучка является традиционной и используется в малоугловых рентгеновских дифрактометрах и камерах [1,2]. Минимальный угол с которого можно вести измерения, составляет порядка 0.5° . Это означает, что возможны исследования структур с большими периодами повторяемости вплоть до 150 \AA . Хотя $d_{\max} = \frac{\lambda}{2 \cdot \sin \theta_{\min}} \sim 180 \text{ \AA}$, но необходимо учитывать, что дифракционные пики имеют ширину $\sim 0.1^\circ$.

Отсутствие третьей коллимационной щели в случае съемки рентгенограммы от ориентированного образца на подложке приводит к появлению характерного "плеча" в области до $2\theta = 2^\circ$ за счет паразитного рассеяния на краях второй щели (рис. 3,4).

Для всех измерений входная щель детектора рентгеновского излучения составляла 0.25 мм. Разрешение можно оценить с помощью известной формулы

$$\left(\frac{\Delta d}{d}\right)^2 = \left(\frac{\Delta \lambda}{\lambda}\right)^2 + \text{ctg}^2 \theta \Delta \theta^2 \quad (3)$$

где $\Delta \lambda$ — неопределенность в длине волны падающего излучения (равная $\sim 0.004 \text{ \AA}$ — расстоянию между K_{α_1} и K_{α_2} линиями для медного анода), а $\Delta \theta$ — угловая неопределенность. Учитывая, что на малых углах $\text{ctg} \theta \sim 1/\theta$, а также то, что $\Delta \theta^2 = \Delta \theta_B^2 + \Delta \theta_S^2 + \Delta \theta_D^2$, где $\Delta \theta_B$ — собственно расходимость падающего на образец пучка, и $\Delta \theta_S, \Delta \theta_D$ — угловые неопределенности из-за конечного размера образца и детектора соответственно. Для данных условий экспериментов $\Delta \theta_B \sim 1.5 \times 10^{-3}$ рад, $\Delta \theta_S \sim 10^{-3}$ рад, $\Delta \theta_D \sim 0.6 \times 10^{-3}$ рад, и тогда формулу (3) можно переписать

для $d = 50 \text{ \AA}$ ($\theta_B = 1.5 \times 10^{-3}$ рад)

$$\left(\frac{\Delta d}{d}\right)^2 \approx \left(\frac{4 \cdot 10^{-3}}{1.54}\right)^2 + \left(\frac{1.5 \cdot 10^{-3}}{15 \cdot 10^{-3}}\right)^2 \sim 10^{-2}, \quad (4)$$

В результате специальной коллимации первичного пучка рентгеновских лучей нуль шкалы угла рассеяния (положение прямого пучка) может несколько смещаться, и это на малых углах приводит к значительным ошибкам при вычислении периода повторяемости. Для избежания ошибок применялись две процедуры при определении d . Во-первых, путем сканирования детектором прямого пучка возможно было определить с точностью ~ 0.02 нуль шкалы. Во-вторых, использовался калибровочный образец с известным периодом d . Кроме того, для мультислойных структур появляется еще одна возможность определения нуля шкалы 2θ по угловому расстоянию между дифракционными пиками, которые в этом случае расположены эквидистантно.

Сканирование по углу 2θ осуществлялось с шагом $0.02 \div 0.05^\circ$, время измерения на одном шаге составляло 2 - 16 секунд.

4. Результаты измерений и обсуждение

На рис. 1 показана рентгенограмма от ориентированной мембраны DPPC на кварцевой подложке при $T \sim 20^\circ\text{C}$ и относительной влажности паров $\Psi \sim 60\%$ ($d = 58 \text{ \AA}$ и $n_w = 4$). Отчетливо видны четырнадцать порядков отражений. Время измерения всего спектра составляло ~ 2 часа, включая время, необходимое для измерения угла рассеяния.

Время измерения рентгенограммы от лэнгмюровской пленки из стеарата кадмия ($T \sim 20^\circ\text{C}$) составило ~ 1.5 часа (рис. 2). Были измерены двенадцать порядков отражений.

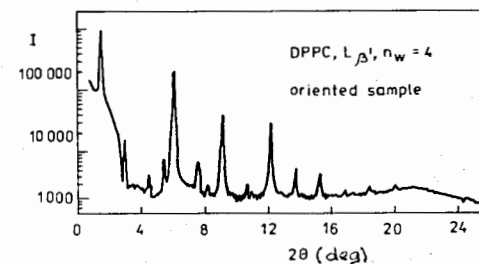


Рис. 1. Рентгенограмма ориентированных на кварцевой подложке мультислойных мембран из DPPC в L_{β}' -фазе, $T = 20^\circ\text{C}$, $\Psi = 60\%$, количество молекул воды на молекулу липида $n_w = 4$, период повторяемости равен 58 \AA .

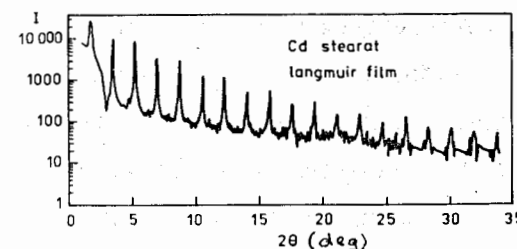


Рис. 2. Рентгенограмма от лэнгмюровских пленок стеарата кадмия (70 слоев) на плоской кремниевой подложке $T = 20^\circ\text{C}$, $d = 46 \text{ \AA}$.

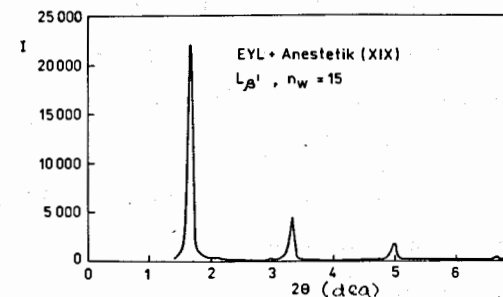


Рис. 3. Зависимость интенсивности рентгеновских лучей от угла 2θ для неориентированных мультислойных мембран из смеси яичного лецитина (EYL) и локального анестетика гептакаина (XIX) при $n_w = 15$, $T = 20^\circ\text{C}$.

На рис. 3 представлена рентгенограмма от неориентированных мембран из смеси лецитина и гептакаин гидрохлорида, нанесенного на плоскую подложку при больших содержаниях воды ($T \sim 20^\circ\text{C}$, $n_w = 15$). Время измерения спектра - 5 мин.

Дифракционный спектр от неориентированных мембран из DPPC в избытке воды, помещенных в кварцевый капилляр показан на рис. 4 ($T \sim 20^\circ\text{C}$, $n_w = 30$). Время измерения спектра - 5 мин.

Важную информацию о структуре мембран можно получить, изучая их латеральную организацию. На следующих рисунках показаны возможности дифрактометра в этой области.

Дифракция от углеводородных цепей - важный инструмент изучения фазовых переходов в мембранах. На рис. 5 показан участок дифракционного спектра от предыдущего образца. Виден рефлекс от углеводородных цепей (4.2 \AA)¹ с характерным плечом со стороны больших углов, соответствующих упаковке углеводородных цепей, наклоненных по отношению к нормали плоскости бислоя в $L_{\beta'}$ - фазе [4]. Время измерения - 6 мин.

Широкий рефлекс (4.6 \AA)¹ от неориентированных мембран из яичного лецитина (EYL) в избытке воды (при $T \sim 20^\circ\text{C}$), помещенных в кварцевый капилляр, соответствует упаковке цепей в L_{α} - фазе [14] (рис. 6). Время измерения составляло - 6 мин.

На рис. 7 показана рентгенограмма от биологических мембран - мембран *Halobacterium halobium*, одной из самых популярных структур у исследователей, изучающих фотосинтез [15]. Эти мембраны привлекают своей относительной простотой - они содержат только один тип белка - бактериородопсин, который организован в плоскости мембран в триады, образующие в свою очередь гексагональные упаковки с постоянной решетки $\sim 62.5 \text{ \AA}$. На рисунке представлена дифракционная

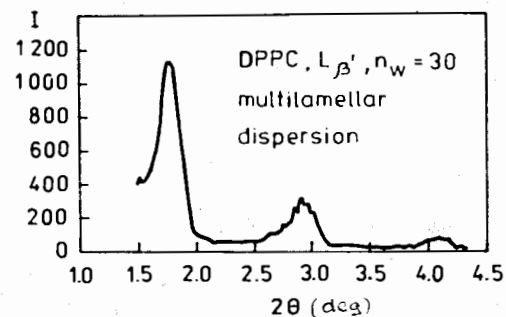


Рис. 4. Рентгенограмма мультислойной дисперсии DPPC в избытке воды ($n_w = 30$) в гелевой фазе, помещенной в кварцевый капилляр. $T = 20^\circ\text{C}$, $d = 64.5 \text{ \AA}$.

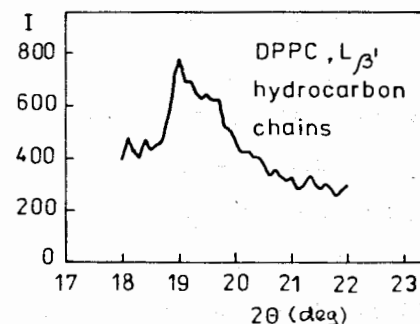


Рис. 5. Дифракция от углеводородных цепей дисперсии DPPC в избытке воды, в $L_{\beta'}$ - фазе. Рефлекс с $d = 4.2 \text{ \AA}$.

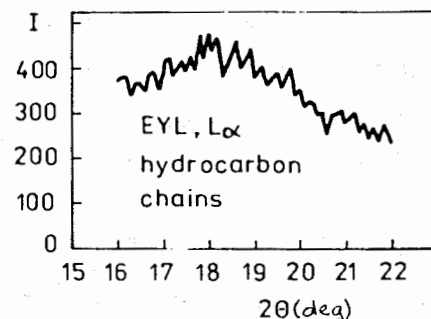


Рис. 6. Рентгенограмма от дисперсии яичного лецитина в избытке воды при $T = 20^\circ\text{C}$, $d = 4.6 \text{ \AA}$. (Жидкая L_{α} - фаза)

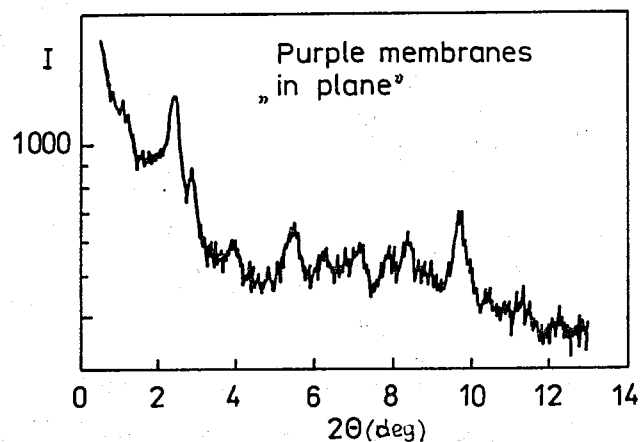


Рис. 7. Латеральная дифракция от мембран *Halobacterium halobium*.
 $T = 20^{\circ}\text{C}$.

картина от латеральной упаковки белков. Образец располагается перпендикулярно оси падающего пучка рентгеновских лучей.

Во всех перечисленных выше случаях определенные структурные параметры соответствуют литературным данным. Таким образом, адаптированный для малоугловых исследований дифрактометр ДРОН позволяет изучать структуру широкого круга длиннопериодных структур с точностью не хуже $\pm 0.5 \div 1 \text{ \AA}$.

Авторы благодарят В. К. Семину за помощь в работе, проф. Г. Бюдта за помощь в работе и приготовление образца из пурпурных мембран, В. В. Ерохина за любезно предоставленные лэнгмюровские пленки.

Литература

1. Свєргун Д. И., Фейгин Л. А. Рентгеновское и нейтронное малоугловое рассеяние, М.: Наука, 1986.
2. Small angle X-ray Scattering (Ed. Glatter O., Kratky O.) - London: Acad. Press, 1968, p. 378-431.

3. Luzzati V. X-ray Diffraction Studies of Lipid-Water Systems. - In: Biological Membranes, Ed. Chapman, London: Acad. Press, 1968, p. 71-123.
4. Tardieu A., Luzzati V. - J. Mol. Biol., 1973, v. 75, p. 711-733.
5. Levine V. K., X-ray diffraction studies of membranes. - Progr. Surf. - Sci., 1973, No 3, p. 279-352.
6. Schilep G. G. Recent X-ray Diffraction Studies of Biological Membranes and Membrane Components. - In: Biological Membranes, Ed. Chapman and Wallach D. F. H., New York: Acad. Press, 1973, v. 11, p. 1-89.
7. Blaurock A. E. - Biochem. et Biophys. Acta, 1982, v. 650, p. 167-207.
8. Блинов Л. М. - Успехи физ. наук, 1988, т. 1555, с. 443-480.
9. Blaurock A. E. X-ray and neutron diffraction by membranes: how great is the potential for defining the molecular interactions? - In: Progress in Protein-Lipid Interactions (A. Watts, D. Pont Eds.) 1986, Amsterdam, Elsevier Science Publishers.
10. Gordeliy V. I., Klose G. - JINR Communication, 1989, E14-89-69, p. 1-5.
11. Powers L., Pershar P. S. - Biophys. J., 1977, v. 20.
12. Горделий В. И., Ягужинский Л. С. - Биофизика, 1989, т. XXXIV, 6. 4 - с. 589-592.
13. Хейкер Д. М., Зевин Л. С. Рентгеновская дифрактометрия, М: Гос. Из. физ-мат. лит., 1963, с. 360.
14. Ивков В. Г., Берестовский Г. Н. Динамическая структура липидного бислоя. М: Наука, 1981.
15. Овчинников Ю. А. Биоорганическая химия, М.: Просвещение, 1987.

Рукопись поступила в издательский отдел
 21 августа 1991 года.