

**СООБЩЕНИЯ
ОБЪЕДИНЕННОГО
ИНСТИТУТА
ЯДЕРНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ
ДУБНА**

A-659

P13-87-937

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

**ПРОГРЕСС В РАЗРАБОТКЕ АППАРАТУРЫ
И МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ
МОНОКРИСТАЛЛОВ БЕЛКОВ В КООРДИНАТНЫХ
РЕНТГЕНОВСКИХ ДИФРАКТОМЕТРАХ
НА ОСНОВЕ ДВУМЕРНЫХ
ПРОПОРЦИОНАЛЬНЫХ КАМЕР**

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

1987

Основным методом, который дает возможность получить надежную информацию о пространственной структуре сложных молекул белков, является рентгеноструктурный анализ белковых монокристаллов. Большие периоды решетки этих монокристаллов, на порядок большие, чем в обычных, порождают трудности, связанные с необходимостью измерения интенсивности десятков и сотен тысяч отражений. Интенсивности этих отражений малы и накладываются на значительный фон. Все это увеличивает в сотни раз длительность эксперимента, которая в современном одноканальном рентгеновском дифрактометре составляет несколько тысяч часов. Ситуация осложняется радиационной нестабильностью кристаллов белка. Становится практически невозможным исследование с высоким разрешением сложных белков, имеющих большой молекулярный вес, изучение функционирования белков на серии многочисленных белковых комплексов, исследование нестабильных кристаллов, кристаллов малых размеров. Однако большие периоды решетки кристаллов белков приводят к возникновению десятков и сотен отражений одновременно, которые могут быть зарегистрированы параллельно. При параллельных измерениях сокращается время эксперимента и в том же отношении сокращается доза облучения исследуемого образца.

Разработка и применение методов параллельной регистрации дифракционной картины в координатных дифрактометрах КАРД-3 и КАРД-4, основанных на двумерной пропорциональной камере с быстрыми линиями задержки (число разрешаемых элементов — 256×256), позволяет сочетать преимущества счетчиков фотонов с двумерным характером фотографической пленки^{1/}. Скорость измерений в указанных дифрактометрах в 50 раз выше, чем в современном одноканальном дифрактометре, что позволило за короткий срок получить полные наборы интенсивностей отражений от 37 монокристаллов^{2/}.

В 1986 и 1987 гг. с помощью дифрактометра КАРД-4 получены полные наборы интенсивностей отражений еще от 30 монокристаллов (см. таблицу). Были получены наборы интегральных интенсивностей от кристалла вируса $CM_t V$ (молекулярный вес 7 800 000, $a = 480 \text{ \AA}$) с разрешением 6 \AA ; производной церуллоплазмينا (молекулярный вес 130 000, $a = 268 \text{ \AA}$) с разрешением 4 \AA ; каталазы ML и трех ее производных (молекулярный вес 180 000, $a = 106,6 \text{ \AA}$) с разрешением $2,5 \text{ \AA}$; формиатдегидрогеназы (холофермент) и 6 производных (молекулярный вес 80000, $a = 116 \text{ \AA}$) с разреше-

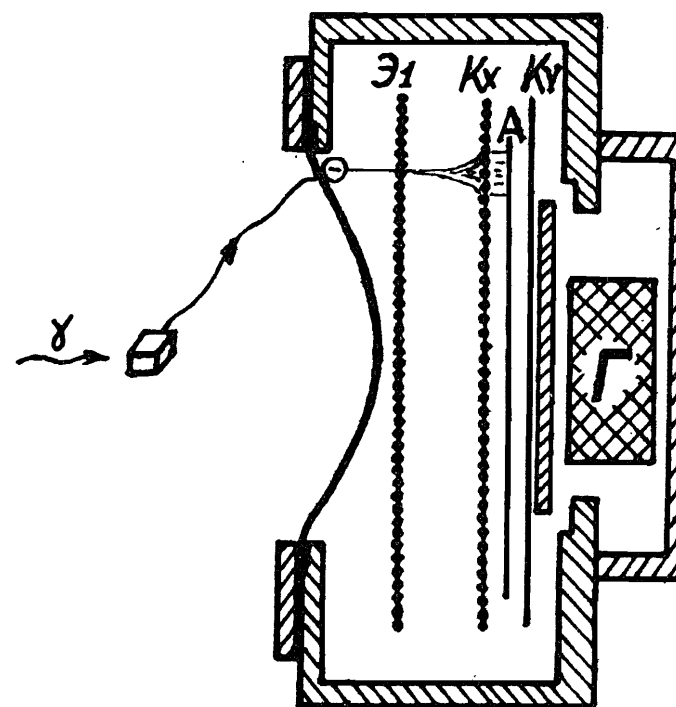
нием 3 \AA ; термитазы, рибонуклеазы, леггемоглобина с разрешением $1,5 \div 1,7 \text{ \AA}$; Сго-репрессора с ДНК; трансаминазы, лейцинаминопептидазы, пирозифосфатазы, лейцин-специфичного белка и их комплексов.

На основании экспериментальных данных, полученных на координатных дифрактометрах КАРД-3 и КАРД-4, в лаборатории структуры белков Института кристаллографии АН СССР была определена пространственная структура термостабильного белка термитазы^{/3/}, сложного фермента Т-каталазы с молекулярным весом 210 000 и параметром кубической ячейки $a = 133,4 \text{ \AA}$ ^{/4/}, исследован пространственный механизм функционирования аминотрансферазы^{/5/}, проведено рентгеноструктурное исследование формиатдегидрогеназы^{/6/}. Установлена пространственная структура и исследован механизм функционирования ряда других ферментов, получены данные о пространственной структуре СМ_tV вируса.

В 1987 г. в Институте кристаллографии АН СССР совместно с Лабораторией высоких энергий ОИЯИ создан дифрактометр КАРД-5, в основе которого рентгеновский детектор с чувствительной площадью $460 \times 460 \text{ мм}$ ^{/7/}. Увеличение площади пропорциональной камеры при сохранении ее прежней толщины позволяет уменьшить параллакс. Хотя размеры этого детектора существенно увеличены (по сравнению с детектором в дифрактометре КАРД-4), быстродействие линий задержки стало выше, что позволило сохранить величину мертвого времени на прежнем уровне — не более 0,6 мкс. Детектор имеет хорошую однородность ширины каналов по обеим координатам, число разрешаемых элементов дифракционной картины 250×250 . Электронная регистрирующая аппаратура дополнительно содержит буферную память емкостью 64К слов, имеющую инкрементный канал с быстродействием 2,5 мкс. Дифрактометр функционирует на линии с ЭВМ СМ-2М с широким набором внешних устройств. Для визуализации дифракционной картины применяется цветной телевизионный дисплей.

Для исследования структуры больших макромолекул белков, нуклеиновых кислот и вирусов с помощью синхротронного излучения в Лаборатории высоких энергий совместно с Институтом кристаллографии АН СССР разрабатывается новый рентгеновский детектор высокого разрешения со сферическим окном, аналогичный описанному в работе^{/8/}. Однако быстродействие создаваемого нами детектора увеличено в ~30 раз. Схематично детектор представлен на рисунке. Входное окно диаметром 120 мм выполнено из бериллия толщиной 1 мм в виде части сферы с радиусом 120 мм. В герметичном боксе размещена пропорциональная камера с дрейфовым промежутком. Шаг намотки сигнальных нитей — 1 мм.

Конверсия гамма-квантов происходит в промежутке между сферической поверхностью входного окна и первым плоским проволочным электродом. Размеры образовавшегося электронного облака в про-



Схематическое изображение детектора. А, К_х, К_у — анод и катоды МПК; Э₁ — ближайший к входному окну из вакуумно-плотного бериллия проволочный электрод; Г — пассивный геттер.

цессе дрейфа заметно увеличиваются, что приводит к срабатыванию нескольких анодных проволочек. Это обеспечивает высокую точность по обеим координатам. Бокс заполняется ксеноном с добавками метана, избыточное давление 5 атм. Для обеспечения долговременной чистоты газа в объеме бокса располагается пассивный геттер. Информация с детектора считывается с помощью секционированных линий задержки. Мертвое время прибора — не более 0,15 мкс, что обеспечивает быстродействие до 2×10^6 соб/с (при просчетах не более 30%). Общее число элементов разрешения дифракционной картины 500×500 элементов. Детектор предназначен для регистрации гамма-квантов с энергией до 25 кэВ.

Таким образом, дифрактометры, созданные нами на основе пропорциональных камер с быстрыми линиями задержки, открыли новые возможности в исследовании кристаллов белков. За четыре года получено более 60 полных интенсивностей отражений с высоким разрешением

Таблица

Результаты съемки монокристаллов белков
в дифрактометре КАРД-4 в 1986, 1987 г.г.

Образец	Молекулярный вес	Параметры ячейки (Å)	Разрешение съемки (Å)	Время съемки (час)	Число независимых областей K	Число измеренных отражений I > σ (%)	Число отражений	R _{экв} , %	R _{ст} = $\frac{\sum \sigma}{\sqrt{K \sum I}}$ (%)
Форматдегидрогеназа холмофермент и 6 производных	80000	a=116,0; b=63,4; c=113,35; P ₂ _I ⁰ ₂ _I ⁰ ₂ _I ⁰	3	350	4	597500	98	4,7	3,0
Термиптаза (2 образца)	30000	a=47,55; b=64,05; c=72,95; P ₂ _I ⁰ ₂ _I ⁰ ₂ _I ⁰	1,65	80	4	130000	92	5,7	4,0
Рибонуклеаза	10000	a=30,51; b=31,8; c=49,7 P ₂ _I ⁰ ₂ _I ⁰ ₂ _I ⁰	1,50	45	4	48500	60	7	4
Рибонуклеаза T=263°K T=293°K	11000	a=55,8; b=55,8; c=80,0 P ₃ _I ⁰	2,0	60	1	87000	80	6	7
σ ₈₀ -репрессор + ДНК (2 комплекса)	18000	a=81,4; b=88,8; c=81,2 O ₂₂₂ _I ⁰	2,0	86	4	128000	35	7	3,5
Трансаминаза (3 комплекса)	94000	a=124,6; b=125,9; c=56,4 P ₂ _I ⁰ ₂ _I ⁰ ₂ _I ⁰	3,0	90	4	180000	95	3	2,5
Лейцинаминопептидаза	70000	a=132,4; b=132,4; c=122,1 P ₆ ₂ ₂ _I ⁰	2,0	25	3	58000	30	12	13
Вирус σ ₁₃ V	7800000	a=b=c=480 Å P ₂ ₃	6,0	160	8	117000	50	20	10
Леггемоглобин T=293°K T=253°K	17000	a=92,9; b=38,3; c=52,3 γ=81,2 P ₂ _I ⁰	1,7	40	4	70000	90	4	2,5
Леггемоглобин-окси-форма T=253°K	17000	a=92,9; b=38,3; c=52,3 γ=81,2 P ₂ _I ⁰	1,7	20	4	35000	90	4	2,5
Церуллоплазмин (производная)	130000	a=b=269,0; c=130 I ₄	4,0	55	4	180000	55	15	20
Пирофосфатаза (2 комплекса)	64000	a=56,3; b=116,0; c=106,8 P ₂ _I ⁰ ₂ _I ⁰ ₂ _I ⁰	2,5	100	3	112000	75	7	3
Каталаза (3 производных)	180000	a=b=106,6; c=106,3 P ₄ ₂ ₂ _I ⁰ ₂ _I ⁰	2,5	144	8	360000	90	6	3
Лейцин-специфичный белок	37500	a=68,7; b=69,3; c=74,1 P ₂ _I ⁰ ₂ _I ⁰ ₂ _I ⁰	2,0	36	4	76000	70	9	6
Трансаминаза	94000	a=124,6; b=125,9; c=56,4 P ₂ _I ⁰ ₂ _I ⁰ ₂ _I ⁰	2,0	40	4	160000	70	13	8

от монокристаллов различных белков. В общей сложности измерено более $4,5 \times 10^6$ отражений. На основе полученных данных определена пространственная структура целого ряда белков, представляющих большой научный интерес, в том числе и в области генной инженерии. Для исследований белков с помощью синхронного излучения разрабатываются новые двумерные рентгеновские детекторы с высоким пространственным разрешением и быстродействием в несколько мегагерц.

ЛИТЕРАТУРА

1. Andrianova M.E. et al. – *Journ. Appl. Cryst.*, 1982, v.15, p.626.
2. Андрианова М.Е. и др. – В сб.: *Краткие сообщения ОИЯИ, Дубна, 1985, №13-85, с.41-47.*
3. Тепляков А.В. и др. – *Кристаллография*, 1986, 31, №5, с.931-936.
4. Барынин В.В. и др. – *ДАН СССР*, 1986, 288, №4, с.877-880.
5. Andrianova M.E. et al. – In: *Proceeding of the 4-th Soviet-Italian Symposium "Macromolecules in the functioning cell"*, Pushchino, 1986, p.153-160.
6. Алешин А.Е. и др. – *ДАН СССР*, 1987, т.294, №4, с.973-976.
7. Анисимов Ю.С. и др. – *ПТЭ*, 1986, №4, с.60-62.
8. Durbin R.M. et al. – *Science*, 1986, v.232, с.1127-1132.

Рукопись поступила в издательский отдел
30 декабря 1987 года.

НЕТ ЛИ ПРОБЕЛОВ В ВАШЕЙ БИБЛИОТЕКЕ?

Вы можете получить по почте перечисленные ниже книги, если они не были заказаны ранее.

Д13-84-63	Труды XI Международного симпозиума по ядерной электронике. Братислава, Чехословакия, 1983.	4 р. 50 к.
Д2-84-366	Труды 7 Международного совещания по проблемам квантовой теории поля. Алушта, 1984.	4 р. 30 к.
Д1,2-84-599	Труды VII Международного семинара по проблемам физики высоких энергий. Дубна, 1984.	5 р. 50 к.
Д17-84-850	Труды III Международного симпозиума по избранным проблемам статистической механики. Дубна, 1984. (2 тома)	7 р. 75 к.
Д11-85-791	Труды Международного совещания по аналитическим вычислениям на ЭВМ и их применению в теоретической физике. Дубна, 1985.	4 р. 00 к.
Д13-85-793	Труды XII Международного симпозиума по ядерной электронике. Дубна, 1985.	4 р. 80 к.
Д4-85-851	Труды Международной школы по структуре ядра. Алушта, 1985.	3 р. 75 к.
Д3,4,17-86-747	Труды V Международной школы по нейтронной физике Алушта, 1986.	4 р. 50 к.
—	Труды IX Всесоюзного совещания по ускорителям заряженных частиц. Дубна, 1984. (2 тома)	13 р. 50 к.
Д1,2-86-668	Труды VIII Международного семинара по проблемам физики высоких энергий. Дубна, 1986. (2 тома)	7 р. 35 к.
Д9-87-105	Труды X Всесоюзного совещания по ускорителям заряженных частиц. Дубна, 1986. (2 тома)	13 р. 45 к.
Д7-87-68	Труды Международной школы-семинара по физике тяжелых ионов. Дубна, 1986.	7 р. 10 к.
Д2-87-123	Труды Совещания "Ренормгруппа - 86". Дубна, 1986.	4 р. 45 к.
Д4-87-692	Труды Международного совещания по теории малочастичных и кварк-адронных систем. Дубна, 1987.	4 р. 30 к.
Д2-87-798	Труды VIII Международного совещания по проблемам квантовой теории поля. Алушта, 1987.	3 р. 55 к.
Д14-87-799	Труды Международного симпозиума по проблемам взаимодействия мюонов и пионов с веществом. Дубна, 1987.	4 р. 20 к.

Заказы на упомянутые книги могут быть направлены по адресу: 101000 Москва, Главпочтамт, п/я 79. Издательский отдел Объединенного института ядерных исследований.

ТЕМАТИЧЕСКИЕ КАТЕГОРИИ ПУБЛИКАЦИЙ
ОБЪЕДИНЕННОГО ИНСТИТУТА ЯДЕРНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ

Индекс	Тематика
1.	Экспериментальная физика высоких энергий
2.	Теоретическая физика высоких энергий
3.	Экспериментальная нейтронная физика
4.	Теоретическая физика низких энергий
5.	Математика
6.	Ядерная спектроскопия и радиохимия
7.	Физика тяжелых ионов
8.	Криогеника
9.	Ускорители
10.	Автоматизация обработки экспериментальных данных
11.	Вычислительная математика и техника
12.	Химия
13.	Техника физического эксперимента
14.	Исследования твердых тел и жидкостей ядерными методами
15.	Экспериментальная физика ядерных реакций при низких энергиях
16.	Дозиметрия и физика защиты
17.	Теория конденсированного состояния
18.	Использование результатов и методов фундаментальных физических исследований в смежных областях науки и техники
19.	Биофизика

Андрианова М.Е. и др.
Прогресс в разработке аппаратуры и методов исследования монокристаллов белков в координатных рентгеновских дифрактометрах на основе двумерных пропорциональных камер

P13-87-937

Представлены результаты рентгеноструктурных исследований белковых монокристаллов с помощью дифрактометров КАРД-3 и КАРД-4, созданных на основе двумерных рентгеновских детекторов. Получено более 60 полных наборов интенсивностей отражений с высоким разрешением для различных белков. Эти данные позволили определить пространственную структуру целого ряда белков, представляющих большой научный и практический интерес. Приведены основные параметры новых разрабатываемых рентгеновских детекторов.

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

Сообщение Объединенного института ядерных исследований. Дубна 1987

Перевод О.С.Виноградовой

Andrianova M.E. et al.
Advances in the Development of Apparatus and Methods for Studies of Protein Single Crystals in Coordinate x-Ray Diffractometers Based on Two-Dimensional Proportional Chambers

P13-87-937

Results of x-ray structure studies of protein single crystals performed by means of the KARD-3 and KARD-4 diffractometers based on two-dimensional x-ray detectors are presented. Over 60 total sets of reflections with a high resolution have been obtained for a variety of proteins. The data make it possible to determine the spatial structure of a series of proteins which are of great interest from the scientific and practical viewpoint. The main parameters of new developed x-ray detectors are given.

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

Communication of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna 1987