

6 РЕНТГЕНОСТРУКТУРНЫЙ АНАЛИЗ

В основе рентгеновской кристаллографии лежит анализ дифракции рентгеновских лучей, проходящих через кристалла. Заметим сразу, что принцип рентгеновской кристаллографии совершенно отличен от принципа получения изображения оптическими приборами, такими как микроскоп.

Рентгеновские лучи – это электромагнитные волны с очень небольшой длиной волны (около 1 ангстрема, т.е. $1 \cdot 10^{-8}$ см), которые рассеиваются электронными облаками атомов, размеры которых имеют тот же порядок величины. Анализируя рассеянное атомами кристалла рентгеновское излучение, удается воссоздать пространственное распределение электронной плотности в кристалле. Это, в свою очередь, дает нам знание пространственного расположения атомов в молекулах, из которых построен кристалл, например в определенном белке. Помимо знания структуры, данные белковой кристаллографии дают возможность предсказывать поведение белковых молекул в различных ситуациях, поскольку позволяют судить о подвижности определенных частей белковой молекулы и влиянии окружения на форму белка и укладку полипептидных цепей.

Зачем это нужно?

Знание точной пространственной структуры белка важно, прежде всего, для понимания механизма работы белковых машин: ферментов, белковых гормонов, рецепторов. Это, в свою очередь, может служить основой для создания лекарственных препаратов нового поколения, лекарств, молекулы которых определенным образом воздействуют на функцию определенных ферментов или рецепторов.

6.1 В чем разница между микроскопией и рентгеноструктурным анализом?

Чтобы понять разницу между работой микроскопа и аппаратурой, позволяющей анализировать дифракцию рентгеновских лучей на кристаллах, сравним рисунки 6.1 и 6.2.

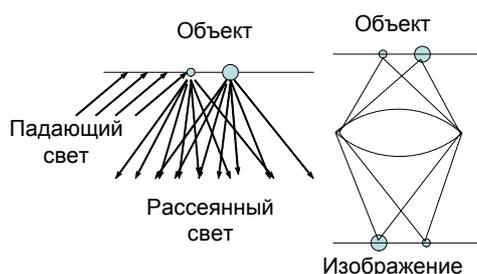


Рис. 6.1. Формирование изображения с помощью линзы.

Есть множество методов для изучения трехмерной структуры. Наиболее очевидный – это просто посмотреть на объект с разных сторон. Если предмет очень мал, мы используем микроскоп. Известно, что есть предел размеров объекта, который можно увидеть в микроскоп, а именно, мы не можем рассмотреть предметы, размер которых заметно меньше длины волны света, который мы используем (*дифракционное ограничение*). Длина волны видимого света лежит в пределах от 400 до 700 нанометров, и поэтому мы можем

рассматривать в световом микроскопе эритроцит размером в 10 000 нм, но не можем разглядеть мембрану эритроцита, имеющую толщину около 5 нм, или увидеть молекулу белка диаметром 3 нм. Тем более мы не можем рассмотреть внутреннее строение белковой молекулы, поскольку размеры атомов и расстояния между ними измеряются несколькими ангстремами, т.е. десятными долями нанометра ($1\text{ \AA} = 1 \cdot 10^{-10}\text{ м}$; $1\text{ нм} = 1 \cdot 10^{-9}\text{ м}$).

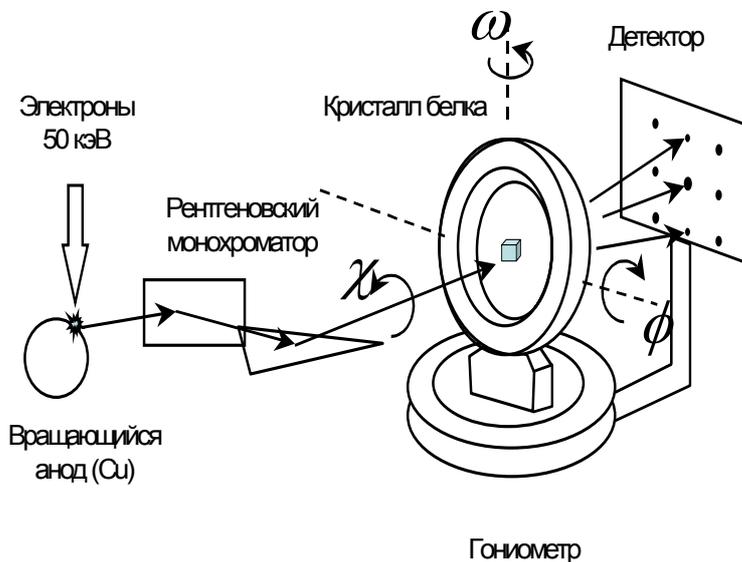


Рис. 6.2. Рентгеновский дифрактометр.

Длина волны рентгеновских лучей, используемых в белковой кристаллографии близка к одному ангстрему (например, равна $1,55\text{ \AA}$ для излучения медного электрода), а следовательно лежит в нужном диапазоне длин волн.

К сожалению, невозможно построить рентгеновский микроскоп, чтобы рассматривать молекулы, поскольку нет способа изготовить линзы для рентгеновских лучей. Совсем не потому, что мы еще не научились делать такие линзы, а по причинам принципиального характера. Для сравнительно длинных световых волн стекло, да и любое другое вещество, представляется однородной средой, а поверхность линзы можно сделать гладкой. Для рентгеновских лучей, с длиной волны меньше размеров атома, любое вещество будет “зернистым”, а любая поверхность “бугристой”. Из такого материала линзы не создать.

Между тем, это не означает, что между микроскопией и рентгеноструктурным анализом нет совершенно ничего общего. Посмотрим на рис. 6.1. Работа микроскопа, как и просто хорошей лупы, да и нашего глаза, происходит как бы в два этапа. Сначала, свет попадает на объект и рассеивается в различных направлениях. Затем линза вновь собирает рассеянные лучи и формирует изображение.

Когда рентгеновский луч падает на объект, то тоже происходит рассеяние лучей, но, за неимением линзы, нужен какой-то иной инструмент, позволяющий проанализировать рассеянное излучение и на основании этого анализа воссоздать изображение объекта. Собрать информацию, которую несут рассеянные объектом рентгеновские лучи, удастся путем измерения интенсивности рефлексов, образующихся при дифракции лучей кристаллами, например, кристаллами интересующего нас белка, а для воссоздания пространственной структуры молекул, образующих кристаллы, используются довольно сложные и трудоемкие вычисления, которые выполняют мощные компьютеры.

Связь между пространственной структурой молекул, формирующих кристалл, и свойствами рефлексов, которые возникают при попадании рентгеновских лучей на кристалл, будет рассмотрена в настоящей главе.

6.2 Основные этапы получения данных белковой структуры

Выделение и очистка белка. В последнее время все большую роль начинают играть методы белковой инженерии, позволяющие синтезировать большое количество белка с заданными свойствами и высокой степени гомогенности. Для последующего получения белковых кристаллов нужно обычно несколько десятков миллиграмм чистого белка.

Получение белковых кристаллов.

Анализ дифракции рентгеновских лучей (денситометрия).

Расчет параметров элементарной ячейки кристалла и оценка разрешения.

Анализ изоморфно-замещенных кристаллов, включающий в себя получение кристаллов и анализ интенсивности рефлексов.

Получение полной информации, содержащейся в рефлексах: нахождение *структурных факторов*.

Расчет распределения электронной плотности в элементарных ячейках.

Определение координат атомов, т.е. пространственной структуры элементарной ячейки и образующих ее белковых молекул.

6.3 Выращивание белковых кристаллов

В целом процедура получения белковых кристаллов сводится к очень деликатному и длительному осаждению белка из слегка пересыщенного раствора. Исходная концентрация белка при этом обычно берется довольно высокой, порядка 2–50 мг/мл. Постепенное добавление осадителя приводит к образованию пересыщенного раствора белка и выпадению кристаллов. Вся проблема в том, какой именно осадитель окажется наиболее подходящим для каждого конкретного белка и каким образом обеспечить действительно плавное и медленное увеличение концентрации осадителя в растворе. Один весьма распространенный прием, называемый методом висячей капли, схематически показан на рис. 6.3.



Рис. 6.3. Выращивание кристалла методом висячей капли.

Капля раствора белка, содержащего подпороговую концентрацию осадителя, помещается на пластинке, закрывающей стаканчик, в который налит более концентрированный раствор осадителя. Вода испаряется из менее концентрированного раствора в капле и переходит в более концентрированный раствор в стаканчике, благодаря чему

концентрация осадителя в капле очень медленно нарастает. Это приводит к выпадению и медленному росту кристаллов, некоторые из которых оказываются достаточно большого размера и правильной формы. Эти кристаллы и используют для измерения дифракции. Время формирования кристаллов редко бывает меньше, чем несколько дней, а порой составляет много месяцев. Поэтому в опытах с кристаллизацией готовят множество стаканчиков типа показанного на рис. 6.3, условия в которых могут варьировать, чтобы хотя бы в одном выросли качественные кристаллы, размером хотя бы в несколько десятых долей миллиметра. Пример изображения белкового кристалла дан на рис. 6.4.



Рис. 6.4. Белковый кристалл.

Для выращивания белковых кристаллов используют и другие приемы, например медленную диффузию осадителя через пленку в приспособлении для диализа.

6.4 Прибор для анализа дифракции рентгеновских лучей кристаллами (дифрактометр)

Схема установки для измерения дифракции рентгеновских лучей (дифрактометра) приведена на рис. 6.2. Источником излучения может служить рентгеновская трубка, вращающийся анод или синхротрон. На рисунке 6.2 в качестве источника рентгеновских лучей используется вращающийся медный анод, охлаждаемый изнутри проточной водой и помещенный в глубокий вакуум вместе с электронной пушкой, служащей источником пучка электронов. В результате взаимодействия электронов с металлом, происходит выделение электромагнитных квантов, основная длина волны излучения в данном случае составляет $1,55 \text{ \AA}$. Для фокусировки и одновременно монохроматизации пучка используются графитовые пластинки. Принцип действия такого рентгеновского монохроматора рассмотрен в разделе “Монохроматоры для рентгеновского излучения”. Монохроматический рентгеновский луч попадает на кристалл белка, помещенный в капилляр с маточным раствором (на рисунке капилляр не показан). Дифракция лучей и появление рефлексов на экране детектора происходят не всегда, а только при определенных ориентациях кристалла относительно направления падающего рентгеновского луча. Чтобы правильно ориентировать кристалл, его помещают в гониометр, прибор, позволяющий вращать кристалл вокруг трех осей: горизонтальной, по направлению рентгеновского луча (ось χ), горизонтальной, нормальной к направлению луча (ось φ) и вертикальной (ось ω). Подбор соответствующих углов – дело трудоемкое и в настоящее время обычно поручается компьютеру. Дифракционная картина, регистрируемая разного рода детекторами, формируется в результате того, что рассеянные лучи идут в строго определенных направлениях, заданных законом Брегга (см. раздел “Интерференция отраженных лучей. Закон Брегга-Вульфа. Рефлексы”). На рисунке схематически изображен один из наиболее распространенных детекторов – пластинка, состоящая из фосфоресцирующего экрана и светочувствительных ячеек, фотоэлектрический сигнал с которых считывается компьютером. На детальной

конструкции такой “рентгеночувствительной пластинки” и соответствующей техники обработки изображения (это устройство на английском языке называется *Image plate*) мы останавливаться не будем.

Информация, непосредственно считываемая дифрактометром, состоит из координат рефлексов (или, говоря точнее, углов отклонения рассеянного луча от направления луча, падающего на кристалл) и интенсивности соответствующего рефлекса. Грубо говоря, мы получаем таблицу, три столбца которых описывают координату рефлекса, а четвертый – его интенсивность. Уместно заметить, что сам по себе рассеянный луч характеризуется, помимо этого, еще и фазой электромагнитного колебания, которая отличается от фазы луча падающего и существенно зависит от распределения электронной плотности в ячейках кристалла. Детекторы электромагнитного излучения не регистрируют фазу волны, а регистрируют только интенсивность излучения, пропорциональную квадрату амплитуды колебаний. Информация о фазе безвозвратно теряется при регистрации. К этой *проблеме фаз* мы вернемся позже.

6.5 Некоторые сведения о кристаллах

6.5.1 Элементарная ячейка

Кристалл состоит из повторяющихся единиц, регулярно следующих по трем направлениям в нашем трехмерном пространстве. Минимальная по размерам повторяющаяся единица кристалла, сохраняющая все его свойства, называется *элементарной ячейкой* (рис. 6.5).

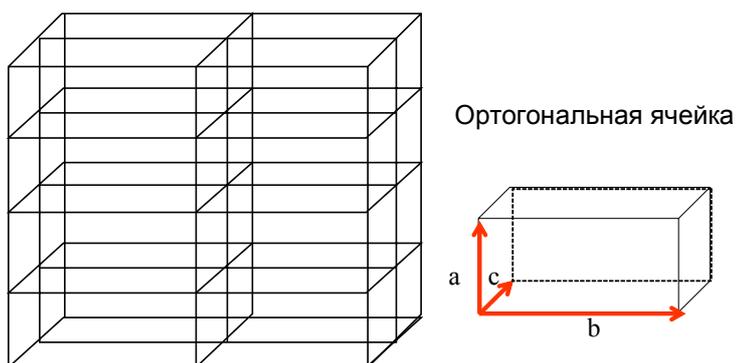
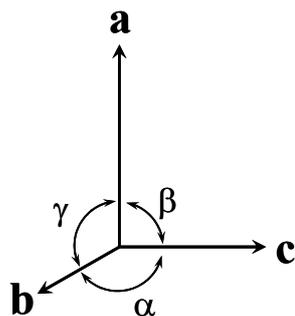


Рис. 6.5. Элементарная ячейка кристалла.

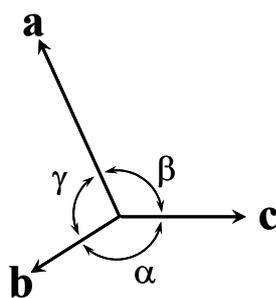
В белковых кристаллах элементарная ячейка может состоять из одной, двух или нескольких белковых молекул, расположенных определенным образом. В правильном кристалле элементарные ячейки абсолютно идентичны и расположены в пространстве строго регулярно.

Ортогональная ячейка



$$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$$

Неортогональная ячейка



По крайней мере один из углов $\neq 90^\circ$

Рис. 6.6. Векторы ортогональной и неортогональной ячеек.

Простейшая элементарная ячейка представляет собой параллелепипед и может быть охарактеризована длиной граней и углами между ними. Удобно взять одну из вершин параллелепипеда за начало координат, а координатные оси x , y и z направить вдоль граней элементарной ячейки; в этом случае элементарную ячейку можно охарактеризовать тремя векторами \mathbf{a} , \mathbf{b} и \mathbf{c} , направленными, соответственно, вдоль осей x , y и z , модуль которых равен длине граней. Приняты следующие обозначения углов между векторами: Угол α – между векторами \mathbf{b} и \mathbf{c} . Угол β – между векторами \mathbf{a} и \mathbf{c} . Угол γ – между векторами \mathbf{a} и \mathbf{b} . Если все углы α , β и γ прямые, ячейка называется ортогональной (рис. 6.5). На рисунке 6.6. показаны векторы ортогональной (слева) и неортогональной (справа) решеток. В дальнейшем мы будем во многих случаях использовать изображение двумерной решетки, поскольку трехмерные объекты не всегда легко изобразить на листе бумаги.

Результаты изучения белковых кристаллов суммируются в Международном банке данных PDB (Protein Data Base), к которому имеется открытый доступ в Интернете (<http://www.rcsb.org/pdb>). Среди прочей информации в базе данных содержатся сведения о параметрах элементарной ячейки. В таблице приведены данные о параметрах ячеек двух видов фермента супероксиддисмутазы (СОД).

Таблица 6.1

Параметры элементарной ячейки кристаллов двух типов супероксиддисмутазы

Источник СОД	Длина, Å			Угол, °		
	a	b	c	α	β	γ
Fe (или Mn) СОД <i>Propionibacterium shermanii</i>	79.83	85.69	108.59	90.00	90.00	90.00
Cu, Zn СОД прокариот	86.89	86.89	99.01	90.00	90.00	120.00

Мы видим, что ячейки несколько различаются своими размерами. Кроме того, ячейка СОД из бактерии – ортогональная, а из прокариот – нет.

Нахождение длины и направления векторов \mathbf{a} , \mathbf{b} и \mathbf{c} – первая задача рентгеноструктурного анализа белковых кристаллов, которая решается путем анализа расположения рефлексов на дифрактограмме. Следующая задача – нахождение положения атомов внутри элементарной ячейки.

6.5.2 Координаты атомов в ячейке кристалла

После того, как мы выяснили параметры элементарной ячейки, то есть нашли размеры векторов **a**, **b** и **c** и углы между ними, необходимо определить координаты атомов внутри ячейки, а для этого прежде всего следует задать систему координат. В белковой кристаллографии используют разные системы координат, в зависимости от задачи. Одна из них, называемая *мировой* системой координат, – это система декартовых координат, начало которой и направлении осей мы выбираем произвольно и в которую мы помещаем наш кристалл или его элементарные ячейки. Эта система координат используется независимо от того, что нам известно о структуре элементарной ячейки. Вторая система координат может быть использована при уже известных параметрах элементарной ячейки. Началом координат служит один из узлов элементарной ячейки, ось *x* располагается вдоль вектора **a**, ось *y* – вдоль вектора **b**, а ось *z* – вдоль вектора **c**. В такой систем координат размерность величин может быть задана в единицах длины, например, в ангстремах, или же в долях от длины соответствующего вектора, то есть в долях вектора **a** вдоль оси *x*, вектора **b** вдоль оси *y* и вектора **c** вдоль оси *z*.

Непосредственно при рентгеноструктурном анализе мы получаем не координаты определенных атомов, а распределение электронной плотности в пределах элементарной ячейки. Как мы знаем, рассеяние рентгеновских лучей, т.е. распространяющихся колебаний электромагнитного поля, происходит вследствие взаимодействия волны с электрическим полем, создаваемым электронами. Чем выше электронная плотность, то есть число электронов в единице объема, тем сильнее рассеиваются рентгеновские лучи. После обработки дифрактограммы белковых кристаллов, в результате весьма трудоемких вычислений мы получаем величины электронной плотности небольшого объема внутри элементарной ячейки как функцию координат этого объема. Теоретически этот объем может быть сколь угодно малым, но на практике предел возможностей метода лежит близко к разрешению около 1 Å по всем трем направлениям *x*, *y* и *z*.

На рис. 6.7. показана координатная сетка элементарной ячейки с векторами **a** и **b** (вектор **c** направлен от зрителя и не показан). Оба вектора разделены на 20 частей. В этих единицах координаты заштрихованного объема (на рисунке это плоская фигура) могут быть записаны в такой форме: $x = (12/20) \cdot \mathbf{a}$; $y = (5/20) \cdot \mathbf{b}$.

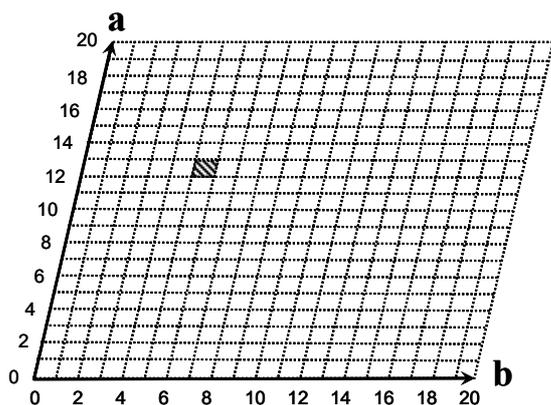


Рис. 6.7. Координатная сетка элементарной ячейки с векторами **a** и **b**.

Измерение плотности АО всем ячейкам затем используется для построения пространственной структуры; при этом чем выше разрешение, т.е. чем большее число «подячеек» содержится в элементарной ячейке кристалла, тем выше вероятность того, что мы правильно заполним атомами и химическими структурами пространство внутри этой элементарной ячейки. В качестве «промежуточного продукта» в этой работе строят карты электронной плотности, которые рисуются по принципу географических карт: точки с равными плотностями соединяются линиями, так же как на географических картах

соединяются линиями точки с одинаковой высотой гор или одинаковой глубиной океана. На рис. 6.цвет 1 слева показана карта электронной плотности части элементарной ячейки кристалла, а справа – та же карта, на которую наложена (или, точнее, в которую вписана) предполагаемая структура полипептидной цепи.

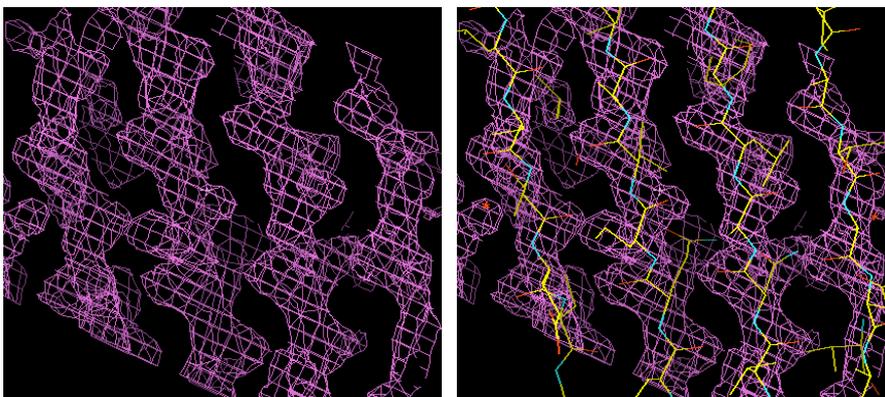


Рис. 6. цвет 1. Карта электронной плотности части элементарной ячейки кристалла, справа – та же карта, на которую наложена предполагаемая структура полипептидной цепи.

Существуют специальные методы и компьютерные программы для наиболее точной «подгонки» рассчитанной структуры под имеющиеся экспериментальные данные. (На английском языке эта процедура, как и подгонка одежды под особенности фигуры клиента, называется *fitting*). Только после создания и уточнения предполагаемого расположения атомов в ячейке мы получаем возможность составить таблицу координат всех атомов и связей и передать полученные сведения для опубликования в печати и помещения в международную «Базу белковых структур» (PDB).

6.6 Рассеяние рентгеновских волн

6.6.1 Некоторые свойства электромагнитной волны

Электромагнитная волна, будь то видимый свет или лучи Рентгена, представляет собой распространяющиеся в определенном направлении колебания электрического поля E . Очевидно, что величина E зависит как от координаты данной точки, описываемой, скажем, радиусом-вектором \mathbf{r} , так и от времени t . Эта зависимость описывается уравнением

$$\mathbf{E}(\mathbf{r}, t) = E_0 e^{2\pi i(\mathbf{k} \cdot \mathbf{r} / \lambda - \nu t + \delta)} \quad (6.1)$$

Выражение в скобках $(\mathbf{k} \cdot \mathbf{r} / \lambda - \nu t + \delta)$ представляет собой фазу колебаний в точке с координатой \mathbf{r} (в полярной системе координат) в данное время t . В этом выражении δ – это начальная фаза в точке с координатой $\mathbf{r} = 0$ в момент времени $t = 0$, ν – частота колебаний, \mathbf{k} – единичный вектор направления волны, $\mathbf{k} \cdot \mathbf{r}$ – разность хода волн в данной точке и в начале координат, $\mathbf{k} \cdot \mathbf{r} / \lambda$ – разность фаз между волнами в этих двух точках. Если не вдаваться в детали, данное уравнение аналогично уравнению гармонических колебаний, известных из общих курсов физики (см. Приложение 1).

$$x = |x| e^{2\pi i \delta} \quad (6.2)$$

Электромагнитные колебания в какой-то определенной точке пространства можно наглядно представить себе как график зависимости E от времени t . Эта зависимость представляет собой косинусоиду (рис. 6.8).

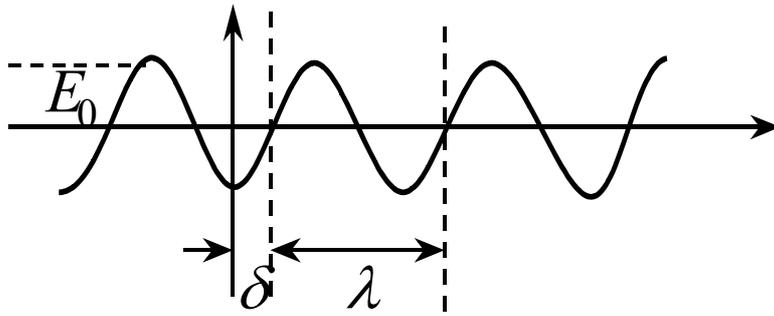


Рис. 6.8. Характеристики электромагнитной волны.

Рентгеноструктурный анализ основан на явлении дифракции рентгеновских лучей на кристаллах. При рассеянии лучей отдельными атомами или электронами происходит сложение (интерференция) рентгеновских волн. Сложение двух косинусоид – дело трудоемкое и не особенно наглядное. Чтобы упростить задачу, было предложено изображать колебания как вектор на комплексной плоскости. Пример такого графика дан на рис. 6.10.

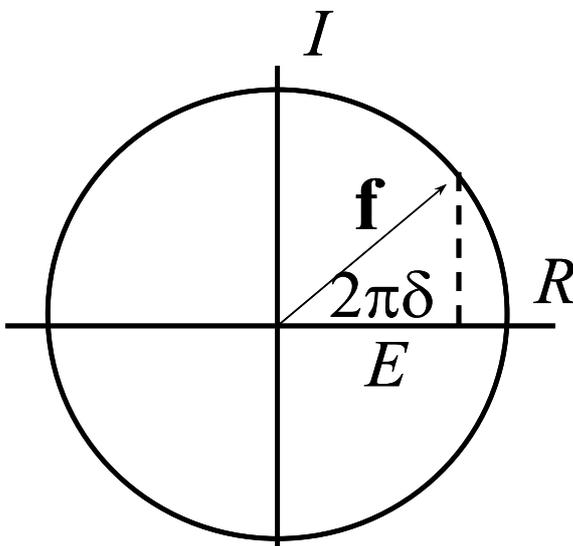


Рис. 6.9. Способ описания колебаний с помощью вектора на комплексной плоскости.

По оси абсцисс R отложены действительные числа (в нашем случае – это напряженность электрического поля), а по оси ординат I – мнимые числа. Функция времени и координаты, описывающая волну, представлена радиусом-вектором \mathbf{f} длиной $|\mathbf{E}|$ а угол между осью абсцисс и \mathbf{f} равен $2\pi\delta$, где δ – фаза колебания в данной точке пространства. Проекция \mathbf{f} на ось R равна E .

Такой способ описания колебаний удобен тем, что позволяет легко складывать колебания по правилу сложения векторов, как это показано на рис. 6.11. При сложении двух комплексных чисел, какими являются функции \mathbf{f}_1 и \mathbf{f}_2 , действительные и мнимые слагаемые складываются по отдельности.

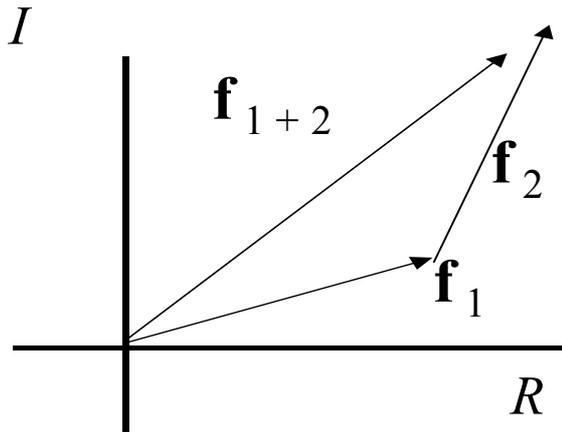


Рис. 6.10. Сложение колебаний как сложение векторов на комплексной плоскости.

Таким образом, волновая функция \mathbf{f} в общем случае представляет собой комплексное число и может быть изображена в виде вектора на комплексной плоскости. Форма представления этого комплексного числа в тригонометрическом виде удобна для векторного сложения волн. Но в других случаях, как мы убедимся позже, более удобной может оказаться экспоненциальная форма представления комплексного числа:

$$f = E_0 e^{2\pi i \delta} = (\cos 2\pi \delta + i \sin 2\pi \delta) \quad (6.3)$$

Такая замена основана на известном уравнении Эйлера:

$$\cos \alpha + i \sin \alpha = e^{i\alpha} \quad (6.4)$$

где угол α выражен в радианах.

В таблице 6.2 суммированы параметры волн, рассмотренные в этом разделе.

Таблица 6.2

Параметры рентгеновской волны

Характеристика	Обозначение	Пояснения
Направление падающего луча	\hat{s}_0	Орт (элементарный вектор)
Направление рассеянного луча	\hat{s}	Орт рассеянного луча
Длина волны излучения	λ	Измеряется в направлении распространения волны
Напряженность электрического поля	E	В направлении, нормальном к распространению волны
Амплитуда колебаний	$E = E $	
Фаза колебаний	δ	Измеряется в долях от 2π
Координата рассеивающего центра (атома или электрона)	r	Радиус-вектор при выбранном начале

		координат
Разность фаз двух волн с одинаковыми длинами волны и направлением распространения	$\Delta\delta$	Измеряется в долях от 2π
Разность хода двух волн с одинаковыми длинами волны и направлением распространения	$\Delta x = \lambda\Delta\delta$	Изменяется в направлении распространения луча

6.6.2 Вектор рассеяния

Рассеяние рентгеновских волн происходит из-за их взаимодействия с электрическими зарядами электронов. При рассеянии происходит изменение направления распространения волны, как это показано на рис. 6.12.

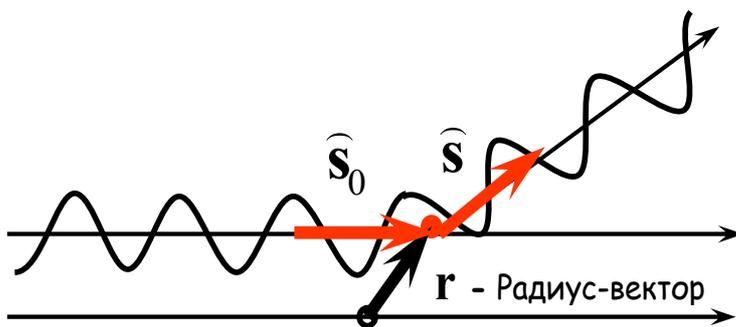


Рис. 6.11. Отклонение рентгеновской волны в результате ее рассеяния электроном.

В принципе, изменение направления распространения луча можно было бы охарактеризовать *разностью* элементарных векторов (ортов) рассеянного \hat{s} и падающего \hat{s}_0 лучей. Но по причинам, которые будут ясны несколько позже, изменение направления луча при рассеянии описывается так называемым *вектором рассеяния*, который равен разности $\hat{s} - \hat{s}_0$, деленной на длину волны λ рентгеновского излучения. Итак, по определению вектор рассеяния равен:

$$\mathbf{S} = \frac{\hat{s}}{\lambda} - \frac{\hat{s}_0}{\lambda} \quad (6.5)$$

6.6.3 Построение вектора рассеяния

Чтобы познакомиться с важными свойствами \mathbf{S} произведем следующее построение.

От начала координат (О на рис. 6.13) отложим влево против направления падающего луча отрезок ОВ, равный $1/\lambda$. Очевидно, что это можно сделать только в обратном пространстве. В направлении рассеянного луча отложим отрезок ОА, также равный $1/\lambda$.

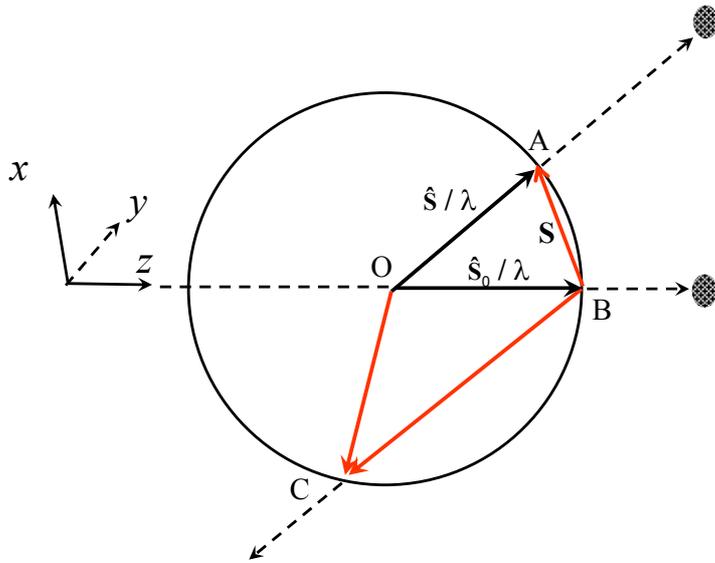


Рис. 6.13. Сфера отражений Эвальда.

Пусть отрезки OA и OC указывают направление рассеянных лучей (выбранные в данном случае случайным образом), причем концы векторов $OA = \hat{s} / \lambda$ и $OC = \hat{s} / \lambda$ лежат на сфере Эвальда.

Можно записать следующие уравнения сложения векторов:

$$OB + BA = OA, \text{ следовательно } BA = OA - OB = \hat{s}_1 / \lambda - \hat{s}_0 / \lambda ;$$

$$OB + BC = OC, \text{ следовательно } BC = OC - OB = \hat{s}_2 / \lambda - \hat{s}_0 / \lambda .$$

Сравнив эти уравнения с уравнением (6.5), мы приходим к выводу, что оба вектора BA и BC представляют собой векторы рассеяния, S_1 и S_2 , соответственно. А поскольку направления луча рассеяния мы выбрали совершенно случайным образом, то можно заключить, что сфера Эвальда представляет собой геометрическое место концов векторов рассеяния. Начало векторов рассеяния лежит при этом на поверхности сферы Эвальда в месте выхода из нее неотклоненного рентгеновского луча.

Если рентгеновские лучи равномерно рассеиваются объектом, то сфера Эвальда, можно сказать, освещается изнутри рассеянным светом равномерно, а рассеянные рентгеновские лучи проходя через поверхность этой воображаемой сферы, относительно равномерно «засветят» фотопленку или фосфоресцирующий экран, помещенные позади сферы. Так и происходит, если на пути рентгеновского луча поместить аморфное тело. Но если поместить туда кристалл, то при одних углах падения лучей на грани кристалл рассеяния не произойдет вовсе, а при других, строго определенных поворотах кристалла, в *определенных местах* на поверхности детектора вспыхнут маленькие пятна (рефлексы), тогда как на остальные участки поверхности рентгеновские лучи попадать не будут. Это происходит вследствие интерференции рентгеновских лучей, рассеянных на регулярно расположенных атомах в кристалле. В следующих разделах мы рассмотрим подробнее причину того, почему такая интерференция приводит к рассеянию лучей Рентгена лишь в строго определенных направлениях.

6.7 Интерференция рассеянных волн и формирование рефлексов

6.7.1 Сложение волн, рассеянных двумя центрами

При рассеянии волн на нескольких рассеивающих центрах, скажем на нескольких атомах, происходит интерференция волн. Свойства суммарной рассеянной волны (ее амплитуда и фаза) зависят от взаимного расположения центров, т.е. от их координат. В выбранной здесь системе координат положение каждого рассеивающего центра будет однозначно характеризоваться радиусом вектором \mathbf{r} , как это показано на рис. 6.14.

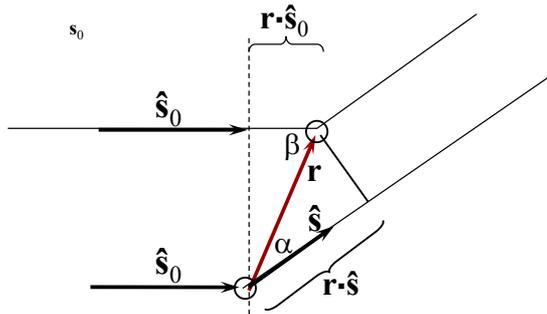


Рис. 6.14. Нахождение разности хода двух рассеянных рентгеновских лучей.

Найдем разность хода рентгеновских лучей, рассеянных двумя одинаковыми рассеивающими центрами (рис. 6.15). Один из них поместим в начало координат, а координату второго выразим через радиус-вектор \mathbf{r} .

Если, как и прежде, направление падающего луча характеризуется ортом $\boldsymbol{\xi}_0$, а направление рассеянных лучей ортом $\boldsymbol{\xi}$, то разность хода равняется разности $r \cos \alpha$ и $r \cos \beta$, где α и β – углы между радиусом-вектором и направлениями распространения, соответственно, рассеянного и падающего лучей. Из определения скалярного произведения векторов следует, что $r \cos \alpha = \mathbf{r} \cdot \boldsymbol{\xi}$, а $r \cos \beta = \mathbf{r} \cdot \boldsymbol{\xi}_0$, и таким образом, разность хода волн равна

$$\Delta \delta \lambda = r \cos \alpha - r \cos \beta = \mathbf{r} \cdot \boldsymbol{\xi} - \mathbf{r} \cdot \boldsymbol{\xi}_0 \quad (6.7)$$

Приняв фазу электрона, помещенного в начало координат, за нулевую, найдем фазу волны, рассеянной вторым электроном:

$$\delta = \mathbf{r} \cdot \frac{\boldsymbol{\xi}}{\lambda} - \mathbf{r} \cdot \frac{\boldsymbol{\xi}_0}{\lambda} = \mathbf{r} \cdot \left(\frac{\boldsymbol{\xi}}{\lambda} - \frac{\boldsymbol{\xi}_0}{\lambda} \right) \quad (6.8)$$

По определению, выражение в скобках есть вектор рассеяния \mathbf{S} .

Теперь уравнение фазы рассеянного луча выглядит совсем просто:

$$\delta = \mathbf{r} \cdot \mathbf{S} \quad (6.9)$$

6.7.2 Интерференция волн, рассеянных атомами кристаллической решетки

Рассмотрим рассеяние рентгеновских лучей атомами кристалла. Вначале рассмотрим рассеяние лучей одним из идентичных атомов в каждой элементарной ячейке, как это показано на рис. 6.16А.

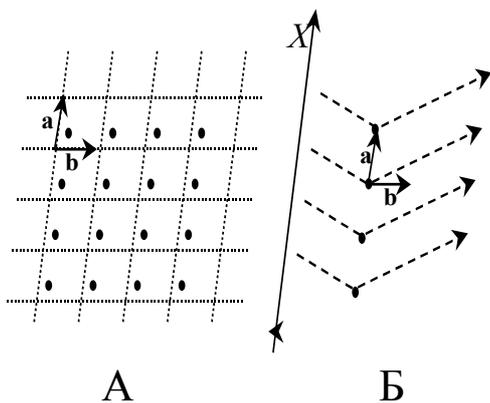


Рис. 6.16. Рассеяние лучей
единичным атомом в ячейке.

В трехмерной кристаллической решетке будет происходить сложение (интерференция) волн, рассеянных атомами в решетке, регулярно повторяющимися вдоль всех трех осей координат. Рассмотрим для простоты результат такой интерференции для случая одномерной решетки, где рассеяние осуществляется на атомах, регулярно повторяющихся вдоль оси x , как показано на рис. 6.16Б. Разность фаз лучей, рассеянных двумя соседними атомами, описывается уравнением (6.9), причем в нашем случае $\mathbf{r} = \mathbf{a}$, где \mathbf{a} – вектор элементарной ячейки. Интерференция волн сопровождается увеличением амплитуды суммарной отраженной волны при условии, что разность фаз – целое число, которое мы обозначим буквой h . Таким образом,

$$\mathbf{S} \cdot \mathbf{a} = h \quad (6.10)$$

$$\text{где } h = 0, \pm 1, \pm 2, \pm 3 \dots$$

Это выражение называется условием Лауэ. Если регулярно расположенные атомы идут вдоль оси y (относительное расположение идентичных атомов соседних ячеек характеризуется вектором \mathbf{b}), то условие Лауэ будет выглядеть так:

$$\mathbf{S} \cdot \mathbf{b} = k \quad (6.11)$$

$$\text{где } k = 0, \pm 1, \pm 2, \pm 3 \dots$$

Для третьего измерения условие Лауэ запишется аналогичным образом:

$$\mathbf{S} \cdot \mathbf{c} = l \quad (6.12)$$

$$\text{где } l = 0, \pm 1, \pm 2, \pm 3 \dots$$

В более подробных учебных руководствах по рентгеновской кристаллографии доказывается, что уравнения (6.10) – (6.12) соблюдаются тем более строго, чем большее число регулярно повторяющихся атомов участвует в рассеянии рентгеновских лучей. Опустив это доказательство, обратимся к рис. 6.17, который иллюстрирует это положение применительно к одномерному случаю.

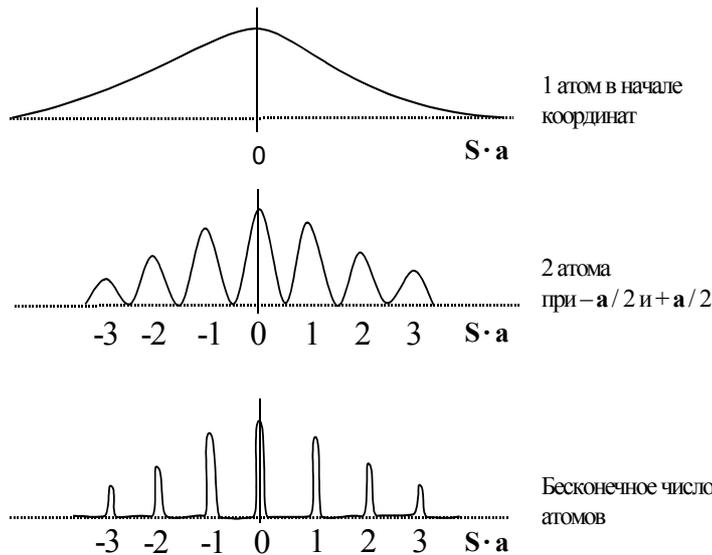


Рис. 6.17. Появление рефлексов при увеличении числа регулярно расположенных атомов.

На этом рисунке даны результаты расчета интенсивности рассеянного луча как функции произведения $\mathbf{S} \cdot \mathbf{a}$ при различном числе атомов, участвующих в рассеянии. Один атом дает рассеяние под разными углами с максимумом интенсивности при $\mathbf{S} \cdot \mathbf{a} = 0$. Интерференция лучей, рассеянных двумя атомами дает рефлекссы, однако сильно размытые. При бесконечном числе регулярно повторяющихся атомов рассеяние рентгеновских лучей происходит в строго определенных направлениях, определяемых условием $\mathbf{S} \cdot \mathbf{a} = h$.

6.7.3 Геометрическая интерпретация уравнения $\mathbf{S} \cdot \mathbf{a} = h$.

По определению скалярного произведения векторов, $\mathbf{S} \cdot \mathbf{a} = Sa \cos \alpha$, где S и a – модули векторов \mathbf{S} и \mathbf{a} , а α – угол между этими векторами. На рис. 6.18 вектор кристаллической решетки \mathbf{a} обозначен пунктирной стрелкой, начало координат – точкой O , вектор рассеяния \mathbf{S} – жирной стрелкой OA , а угол AOB между векторами \mathbf{S} и \mathbf{a} буквой α .

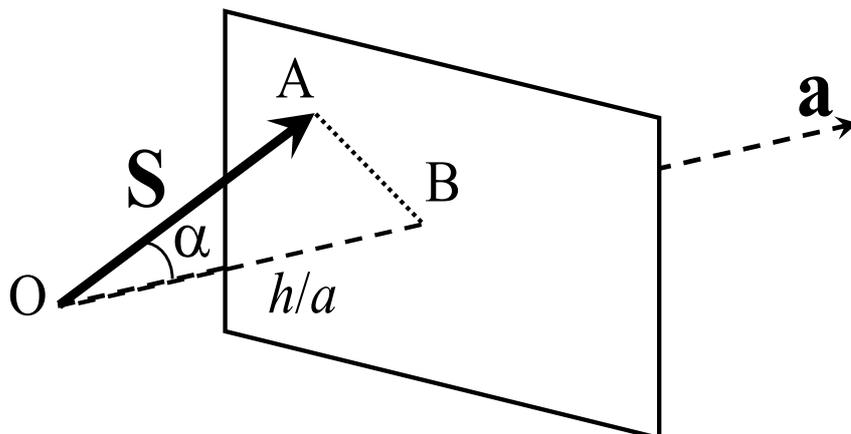


Рис. 6.18. К выводу условия Лауэ.

Проведем через конец вектора \mathbf{S} (точка A) плоскость, нормальную к вектору \mathbf{a} . Соединим точку пересечения этой плоскости B с точкой A и получим треугольник OAB , в котором

$$OB = OA \cdot \cos \alpha = S \cos \alpha$$

Из уравнения $\mathbf{S} \cdot \mathbf{a} = h$ следует, что $\mathbf{S} \cdot \mathbf{a} = Sa \cos \alpha = h$, и таким образом $OB = h/a$.

Проведем теперь построение, обратное предыдущему.

На рис. 6.19А воспроизведено то же построение, что и на рис. 6.18, но на плоскости (как бы в разрезе). Построение на 6.19В проведено следующим образом. От начала координат по ходу вектора \mathbf{a} , проводим серию плоскостей, нормальных к вектору \mathbf{a} и отстоящих друг от друга на расстояние $1/a$. Очевидно, что расстояния от точки O до этих плоскостей равны h/a , где h – целое число, включая ноль. Любой вектор \mathbf{S} , проведенный из начала координат к произвольной точке на одной из этих плоскостей, как легко убедиться, удовлетворяет уравнению: $S \cos \alpha = h/a$, то есть $Sa \cos \alpha = h$, и таким образом соблюдается условие Лауэ $\mathbf{S} \cdot \mathbf{a} = h$ (уравнение (6.10)):

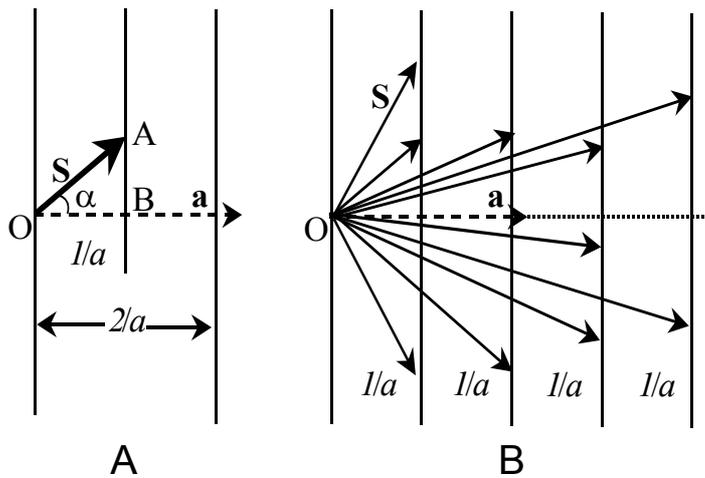


Рис. 6.19. К выводу условия Лауэ (продолжение).

Очевидно, что плоскости на рис. 6.19 можно провести и по левую сторону от начала координат, где $h = -1, -2, -3 \dots$. Таким образом, построенные плоскости представляют собой геометрическое место точек конца вектора рассеяния.

С другой стороны, геометрическим местом таких точек служит сфера отражений Эвальда. Получается, что в условиях интерференции рассеянных лучей конец вектора рассеяния должен *одновременно* находиться на сфере Эвальда и на одной из плоскостей, удовлетворяющих условию Лауэ. Это означает, что конец вектора \mathbf{S} находится на одной из окружностей, образующихся *при пересечении* сферы Эвальда и параллельных плоскостей, описанных выше (см. рис. 6.20). На этом рисунке рентгеновский луч направлен вдоль вектора \mathbf{c} неортогональной элементарной ячейки. Сфера отражений построена методом, описанным выше: от начала координат откладываем против хода рентгеновского луча отрезок длиной $1/\lambda$ и из его конца описываем сферу такого же радиуса. Нормально к вектору \mathbf{a} проводим серию плоскостей, первая из которых проходит через начало координат, а остальные отстоят от нее или от соседней плоскости на расстояние $1/a$. Вектор \mathbf{S} , проведенный из начала координат к одной из окружностей, образовавшихся при пересечении сферы отражения и плоскостей, будет вектором рассеяния, удовлетворяющему условию Лауэ $\mathbf{S} \cdot \mathbf{a} = h$.

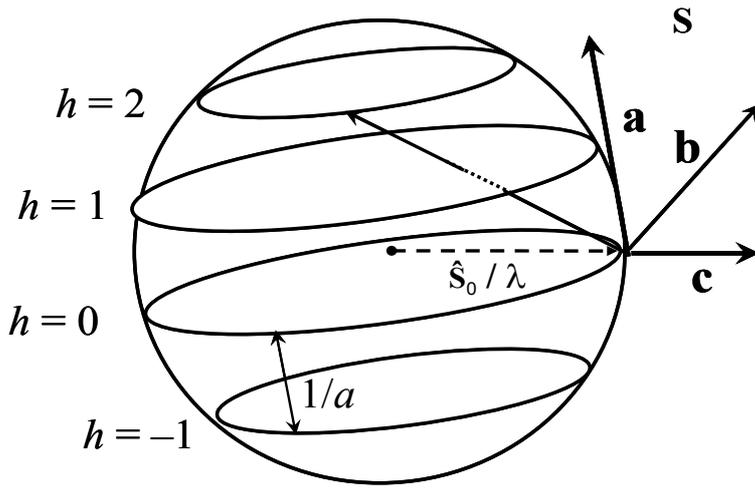


Рис. 6.20. Построение векторов рассеяния с учетом ограничений Лауэ.

6.7.4 Рефлексы как проекция узлов на сфере Эвальда

В кристалле, атомы дают регулярные ряды не только в направлении оси x , как это было рассмотрено выше, но также и в направлении осей y и z . Рассуждения, примененные для серии атомов, регулярно чередующихся вдоль оси x , полностью справедливы применительно к регулярным рядам тех же атомов вдоль двух других осей. Это означает, что в силу интерференции лучей, рассеянных регулярной трехмерной решеткой, падающий рентгеновский луч будет рассеиваться в строго определенных направлениях, задаваемых уравнениями, одно из которых (уравнение (6.10)) подробно рассмотрено выше. Совокупность уравнений ((6.10) – (6.12)) для трехмерной решетки кристалла, элементарная ячейка которой задана векторами \mathbf{a} , \mathbf{b} и \mathbf{c} , описывает так называемые условия Лауэ. Эти уравнения играют исключительно важную роль в теории рентгеноструктурного анализа. Именно ими задается направление рассеяния рентгеновских лучей от кристалла. Благодаря жестким требованиям условий Лауэ, рассеянные кристаллом лучи, попадая на флуоресцирующий экран или фотопленку, дают небольшие, четко очерченные пятна, называемые *рефлексами*. Если при этом луч распространялся вдоль, скажем, оси z , то рефлексы с индексами l мы не увидим, но зато увидим пятна рефлексов, имеющих разные значения индексов h по одной оси и индексов k по другой. Повернув кристалл на 90° , мы увидим рефлексы, образованные при другой паре индексов.

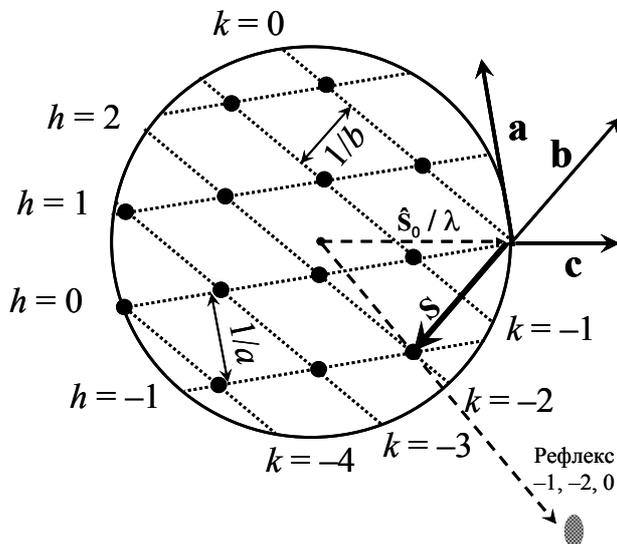


Рис. 6.20. Рефлексы как проекция узлов обратной решетки на сферу Эвальда.

Сказанное иллюстрирует рис. 6.20. Узлы на этом рисунке образованы точками пересечения двух серий плоскостей и сферой Эвальда. На плоском рисунке они лежат внутри круга; в действительности они располагаются на поверхности шара. Плоскость рисунка проходит через векторы \mathbf{a} и \mathbf{c} элементарной ячейки кристалла. Отрезки h и k , показанные на рисунке пунктиром, представляют собой пересечение плоскости рисунка и плоскостей, удовлетворяющих условиям Лауэ. Проекция узла из центра сферы Эвальда на экран дифрактометра дает рефлекс.

В упрощенном виде (сфера Эвальда опущена) образование узлов, на которые направлены концы векторов рассеяния и проекция которых формирует рефлексы, показано на рис. 6.21.

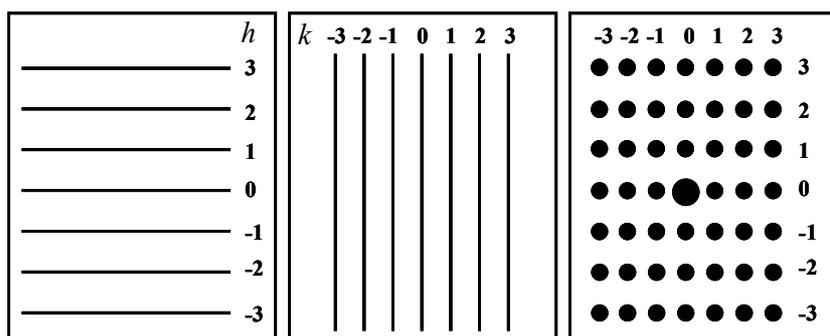


Рис. 6.21. Образование рефлексов при рассеянии на трехмерной решетке.

Горизонтальные плоскости, образуемые в результате условий Лауэ перпендикулярно векторам \mathbf{a} и \mathbf{b} (которые различаются по значениям h и k) при пересечении дают линии, которые на плоском рисунке выглядят как точки (рис. 6.22 справа). Вследствие интерференции лучей, рассеянных атомами, расположенными вдоль вектора \mathbf{c} , эти линии, пересекаясь с еще одной системой плоскостей, дают в трехмерном пространстве настоящие точки – рефлексы.

В результате проекции узлов на поверхности сферы Эвальда из центра сферы на экране дифрактометра должны появиться рефлексы, как это показано на рис. 6.22. Но в действительности этого, как правило, не происходит: чтобы рефлексы появились, один за другим, нужно поворачивать кристалл на небольшие углы (прецессировать), что выполняется с помощью гониостата, показанного на рис. 6.2. Спрашивается, почему?

Дело в том, что рассматривая образование узлов на поверхности сферы Эвальда (рис. 6.20), мы рассматривали условия Лауэ для отражения рентгеновских лучей от атомов, регулярно расположенных в направлении векторов \mathbf{a} и \mathbf{b} , но исключили из рассмотрения это условие для ряда атомов вдоль вектора \mathbf{c} . Это было сделано для наглядности, поскольку плоскости, нормальные вектору \mathbf{c} , располагаются в плоскости чертежа, и их трудно изобразить на двумерном рисунке. Между тем, если пересечение плоскостей, обусловленных регулярностью атомов вдоль *двух* направлений (векторов \mathbf{a} и \mathbf{b}) дает нам набор *прямых линий*, которые, пересекаясь со сферой Эвальда, всегда дадут точку на ее поверхности, то при пересечении *трех* серий плоскостей (включая плоскости, нормальные к вектору \mathbf{c}) получаются точки (*узлы*) в совершенно определенных местах, причем вовсе не обязательно на поверхности сферы Эвальда. Чтобы эти узлы, образующиеся пересечением трех серий плоскостей, оказались на поверхности сферы Эвальда, нужно слегка «покачать» всю систему плоскостей относительно начала координат. В

эксперименте это достигается прецессией кристалла, то есть его поворотами на небольшие углы вокруг координатных осей. При вполне определенных углах поворота один из узлов попадает на сферу Эвальда и в соответствующем месте экрана дифрактометра появляется рефлекс.

6.8 Обратная решетка кристалла

6.8.1 Обратное пространство

Пространство, в котором велось построение на рис. 6.20, обладает не совсем обычными свойствами. Радиус сферы Эвальда имеет длину, обратную длине волны, и, следовательно, размерность м^{-1} (обратный метр) или, если угодно, Å^{-1} (обратный ангстрем). Плоскости отстоят друг от друга на расстояния, обратные длинам векторов элементарной ячейки кристалла, т. е. опять таки имеют размерность обратных единиц длины. Иными словами все построение на рис. 6.20 проводилось в *обратном пространстве*.

Надо сказать, в качестве лирического отступления, что многие математические операции, используемые для вычислений и дающие вполне реальные результаты, сами по себе плохо воспринимаются нашим сознанием. Это относится как к алгебре, с ее отрицательными и мнимыми числами, так и к геометрии. Легко представить себе, например, ящик размером $50 \times 40 \times 30$ см, и даже понять, что, укоротив длину каждой стенки на 10 см, мы получим ящик меньшей величины $40 \times 30 \times 20$ см. Но наш мозг отказывается понимать, что такое ящик размером $(-50 \text{ см}) \times (-60 \text{ см}) \times (-70 \text{ см})$, который получится, если длину досок, приготовленных для первого ящика, мы уменьшим не на 10, а на 100 см каждую. Однако математическая процедура сложения как положительных, так и отрицательных чисел вполне законна, и ее применение дает обычно правильные результаты.

В полной мере это общее соображение применимо и к понятию обратного пространства, которое представить себе трудно, но которое весьма полезно при описании явлений дифракции в кристаллах.

Итак, какими же свойствами обладает обратное пространство? Проанализировав еще раз построение на рис. 6.20, мы убедимся, что обратное пространство мы наделили следующими свойствами:

1. Как и прямое пространство, обратное пространство трехмерно.
2. Все направления прямого пространства сохраняются в обратном пространстве.
3. Размерность одного измерения в обратном пространстве – обратная длине в прямом пространстве, в системе СИ – это м^{-1} . Другими словами, орты осей обратного пространства имеют размерности 1м^{-1} в системе СИ.
4. Выбранное нами начало координат в обратном пространстве может совпадать или отличаться от начала координат в прямом пространстве, в зависимости от задачи.

6.8.2 Обратная решетка кристалла

Конструкция, образуемая пересекающимися плоскостями в обратном пространстве на рис. 6.20, весьма напоминает кристалл. На рис. 6.22, где воспроизведено то же построение с некоторыми упрощениями, одна из элементарных ячеек такого кристалла заштрихована. Хотя на обоих рисунках изображена двумерная решетка, в действительности наш кристалл – трехмерный и элементарная ячейка тоже имеет третье измерение. Построенная нами в обратном пространстве кристаллическая решетка называется *обратной решеткой кристалла*. Заштрихованный четырехугольник показывает одну из граней элементарной ячейки, а черные точки – узлы обратной решетки.

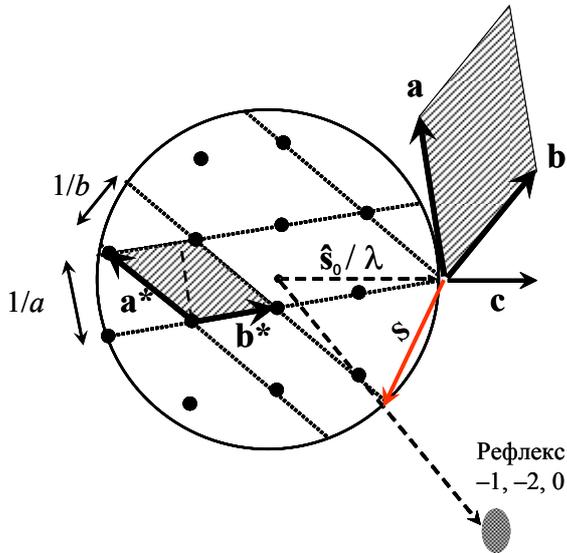


Рис. 6.22. Построение обратной решетки кристалла.

Элементарная ячейка обратной решетки задается векторами, которые мы обозначим как векторы \mathbf{a}^* , \mathbf{b}^* и \mathbf{c}^* . На рис. 6.22 векторы \mathbf{a}^* и \mathbf{b}^* показаны, а вектор \mathbf{c}^* не показан.

Таким образом, если кристаллическая решетка характеризуется тремя векторами элементарной ячейки \mathbf{a} , \mathbf{b} и \mathbf{c} , то обратная кристаллическая решетка также состоит из элементарных ячеек, которые характеризуются в обратном пространстве тремя векторами \mathbf{a}^* , \mathbf{b}^* и \mathbf{c}^* .

Докажем, что соотношения между векторами прямого и обратного пространства задаются следующими уравнениями:

$$\mathbf{a}^* \cdot \mathbf{a} = 1; \quad \mathbf{b}^* \cdot \mathbf{b} = 1; \quad \mathbf{c}^* \cdot \mathbf{c} = 1 \quad (6.13)$$

$$\mathbf{a}^* \cdot \mathbf{b} = 0; \quad \mathbf{a}^* \cdot \mathbf{c} = 0 \quad (6.14)$$

$$\mathbf{b}^* \cdot \mathbf{a} = 0; \quad \mathbf{b}^* \cdot \mathbf{c} = 0 \quad (6.15)$$

$$\mathbf{c}^* \cdot \mathbf{a} = 0; \quad \mathbf{c}^* \cdot \mathbf{b} = 0 \quad (6.16)$$

Из построения на рис.6.21 следует, что

Углы между вектором \mathbf{a} и векторами \mathbf{b}^* и \mathbf{c}^* – прямые, а следовательно, соблюдается уравнение (6.14). Действительно, скалярное произведение векторов $\mathbf{a}^* \cdot \mathbf{b}$ равно $a^* \cdot b \cos 90^\circ = 0$.

Аналогичные рассуждения показывают, что справедливы уравнения (6.15) и (6.16).

С другой стороны, если опустить из начала вектора \mathbf{a}^* перпендикуляр к плоскости, образуемой векторами \mathbf{b}^* и \mathbf{c}^* (на рис. 6.24 он показан штриховой линией), то в образовавшемся треугольнике

$$1/a = a^* \cos \alpha$$

и следовательно, $a^* a \cos \alpha = 1$.

где α — угол между векторами \mathbf{a}^* и \mathbf{a} . Но поскольку, по определению скалярного произведения векторов, $a^* a \cos \alpha = \mathbf{a}^* \cdot \mathbf{a}$, можно считать, что мы доказали справедливость уравнения $\mathbf{a}^* \cdot \mathbf{a} = 1$. Аналогичным образом можно доказать справедливость других выражений в уравнениях (6.13),

Соотношения между векторами ячеек прямой и обратной решеток могут быть выражены не только уравнениями ((6.13) – (6.16)), но и в словесной форме, а именно:

1. Направление векторов обратной решетки (\mathbf{a}^* ; \mathbf{b}^* и \mathbf{c}^*) нормально граням прямой решетки, образуемых двумя другими векторами прямой решетки (соответственно, \mathbf{b} и \mathbf{c} , \mathbf{a} и \mathbf{b}).
2. Длина векторов обратной решетки обратна расстояниям между плоскостями, в которых лежат два других вектора прямой решетки. (Для вектора \mathbf{a}^* это плоскость, в которой лежат векторы \mathbf{b} и \mathbf{c} и т.д.).

Вернемся еще раз к рис. 6.21.

Теперь мы знаем, что все построение внутри сферы отражений и сама эта сфера принадлежат обратному пространству. Узлы, показанные на этом рисунке – это узлы обратной кристаллической решетки. Рефлексы появляются на экране дифрактометра при условии, что один из узлов обратной решетки окажется на поверхности сферы отражений, что достигается поворотом кристалла вокруг одной из осей (прецессией).

Таким образом, рефлекс – это проекция на экран из центра сферы Эвальда одного из узлов обратной решетки, который оказался на поверхности сферы в результате прецессии кристалла.

6.9 Кристалл как система отражающих плоскостей

В учебной литературе по рентгеновской кристаллографии широко распространен несколько иной подход к объяснению происхождения рефлексов, чем это было сделано в предыдущих разделах, а именно, рассматривается не рассеяние рентгеновских лучей отдельными атомами, а их отражение от этих атомов, а точнее – от плоскостей, которые образуются этими атомами в регулярных структурах кристалла. На уровне атомов разница между рассеянием и отражением не так велика, как разница между этими словами. В самом деле, рентгеновский луч ведет себя одинаково, назовем ли мы изменение направления его распространения рассеянием на электронном облаке атома или отражением от его поверхности. Между тем описание дифракции рентгеновских лучей при их отражении плоскостями, образуемыми регулярно расположенными атомами, весьма наглядно и зачастую дает возможность объяснить появление и свойства рефлексов более простым способом, чем тот, который мы использовали выше.

6.9.1 Миллеровы плоскости отражения

Как известно, луч света, попадая в неоднородную среду, подвергается преломлению или отражению. И то и другое происходит на границе между участками с различной плотностью. Средой, рассеивающей и отражающей рентгеновские лучи, служат электронные облака атомов кристалла. Атомы, входящие в состав элементарной ячейки, регулярно повторяются в пространстве, как и сами ячейки. Через такие одинаковые атомы можно провести плоскости, как это показано на рис. 6.25. Эти плоскости обладают в целом повышенной электронной плотностью по сравнению с пространством между плоскостями, и поэтому должны отражать рентгеновские лучи. Каждая плоскость обладает слабой отражающей способностью, но в большом кристалле отражение от многих параллельных плоскостей суммируется, и отраженный луч оказывается достаточно интенсивным.

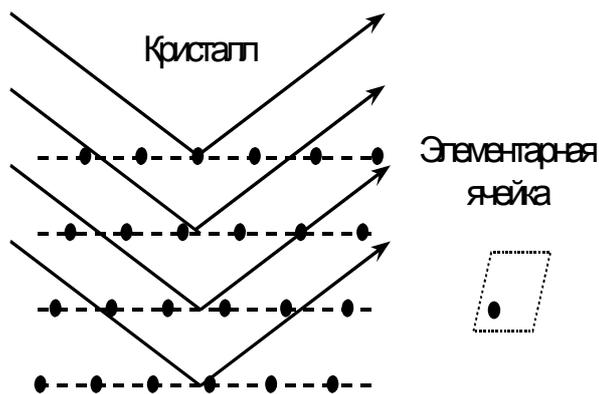


Рис. 6.25. Отражение рентгеновских лучей в кристалле.

Хотя понятие отражающих плоскостей – одно из фундаментальных в кристаллографии вообще и в белковой рентгеновской кристаллографии в частности, следует сделать небольшую оговорку. Строго говоря, отражение происходит от границы раздела между пустотой и веществом. Наличие четкой плоской границы предполагает, что длина волны излучения, падающая на совокупность атомов, лежащих в одной плоскости, будет существенно больше, чем расстояние между атомами. Между тем, весь рентгеноструктурный анализ построен именно на том, что длина волны рентгеновского излучения соизмерима с межатомными расстояниями, и поэтому, строго говоря, наше предположение некорректно. Тем не менее, мы вскоре убедимся, что выводы, полученные в предположении о существовании в кристаллах плоскостей, отражающих рентгеновские волны, хорошо согласуются с теми выводами, которые мы получили в предыдущем разделе при использовании более строгой теории рассеяния рентгеновских лучей атомами в кристаллах.

Глядя на рис. 6.25, можно подумать, что плоскости отражения образуются только в том случае, если мы соединяем атомы *соседних ячеек*. Однако, это не так. Если мы проведем плоскость через одну, через две, через три и так далее ячеек, мы тоже получим отражающие плоскости. Правда, плотность отражающих центров в этих плоскостях будет, соответственно, меньше, но, тем не менее, отражать рентгеновские лучи такие плоскости будут (рис. 6.26). Вся совокупность таких плоскостей, которые являются геометрическим местом узлов кристаллической решетки, называется *миллеровыми плоскостями отражения*.

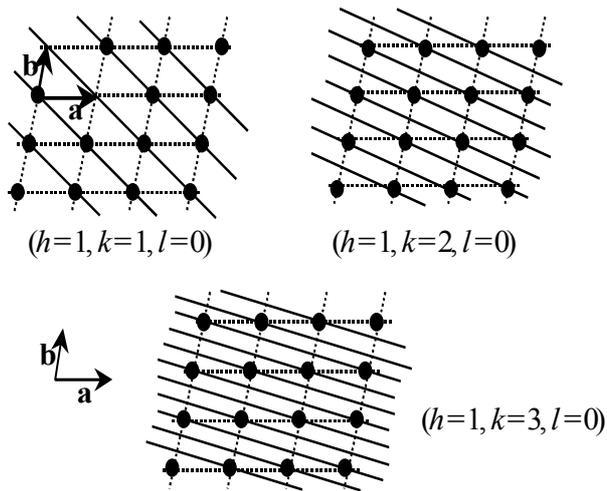


Рис. 6.24. Миллеровы плоскости отражения рентгеновских лучей.

Плоскости отражения характеризуются индексами h , k и l . Эти индексы задаются как число частей, на которые плоскости отражения делят векторы \mathbf{a} , \mathbf{b} и \mathbf{c} , соответственно, в каждой элементарной ячейке. Рассмотрим более внимательно плоскости отражения на рис. 6.26. Вектор \mathbf{c} уходит за плоскость рисунка, и мы его не показываем; однако все изображенные нами плоскости отражения проведены через этот вектор. Для такой ситуации индекс l принимается равным нулю: плоскости не делят \mathbf{c} ни на какое число раз. Вектор \mathbf{a} во всех трех случаях, показанных на рисунке, делится плоскостями на единицу, поскольку плоскости пересекают только концы этого вектора. Таким образом, везде $h = 1$. Иное дело – вектор \mathbf{b} . На рисунке вверху слева плоскости пересекают только соответствующие узлы решетки на концах вектора \mathbf{b} , и поэтому $k = 1$. На рисунке вверху справа плоскости делят вектор \mathbf{b} на две части и $k = 2$, на рисунке внизу $k = 3$. Сокращенно плоскости на рисунке обозначаются как плоскости 110, 120 и 130. Очевидно, что индексы h , k и l могут принимать любые целочисленные значения.

6.9.2 Интерференция отраженных лучей. Закон Брегга-Вульфа. Рефлексы

Рентгеновские волны, отражаясь от серии миллеровых плоскостей, интерферируют друг с другом, что может привести как к увеличению общей интенсивности излучения, так и к гашению излучения; это определяется углом падения луча на плоскости отражения.

Рассмотрим рис. 6.27.

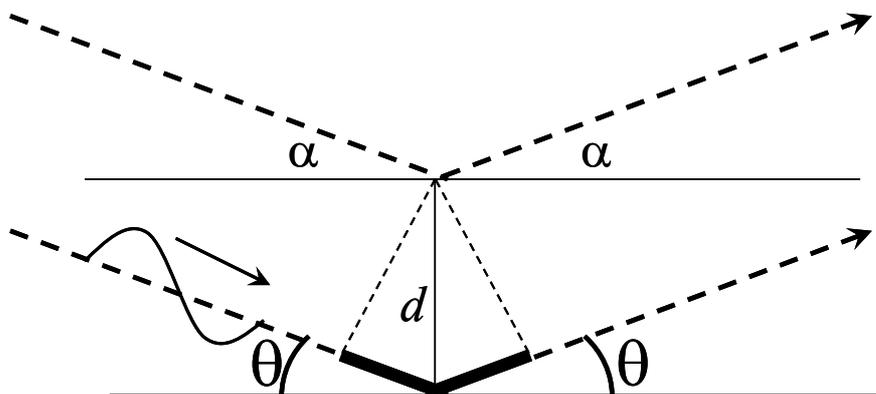


Рис. 6.27. К выводу уравнения Брегга-Вульфа.

Как видно на этом рисунке, путь, пройденный лучами, отраженными от соседних плоскостей, неодинаков. Разность хода лучей равна при этом $2d \sin \theta$, где d – расстояние между плоскостями, а θ – угол падения и угол отражения. В зависимости от величины угла θ отраженные лучи будут складываться или вычитаться, при этом максимальная амплитуда соответствует углам, при которых разность хода лучей соответствует целому числу волн, т.е. условию

$$2d \sin \theta = n\lambda \quad (6.17)$$

(Уравнение Брегга-Вульфа).

При большом количестве плоскостей лучи, не соответствующие уравнению Брегга, будут не просто ослаблены, а практически полностью погашены, так что отраженный луч будет регистрироваться *только* при условии Брегга-Вульфа.

Представим себе, что мы поместили кристалл на пути рентгеновского луча, а после кристалла поместили фотопластинку (или светочувствительную матрицу). При случайной ориентации кристалла мы увидим на фотографии (изображении) пятно от луча, непосредственно прошедшего через кристалл (*нулевой рефлекс*), и пятнышко отраженного луча, исчезающе слабое. Если теперь плавно вращать кристалл, то при определенных углах θ падения луча пятно отраженного луча станет ярким. Это пятно называется *рефлексом*. Впрочем рефлексом называют не только пятно, но и сам луч, который это пятно формирует. Вообще-то мы должны увидеть регулярно чередующуюся серию пятен выше и ниже (или правее и левее) центрального пятна (нулевого рефлекса), поскольку n в нашем уравнении может принимать любые целые значения. Но в рентгеноструктурном анализе используются только ближайшие к центру пятна, т.е. рефлексы первого порядка, соответствующие $n = 1$.

Для таких рефлексов

$$2d \sin \theta = \lambda \quad (6.18)$$

6.9.3 Монохроматоры для рентгеновского излучения

Отклонение рефлекса от центрального пятна (т.е. угол α) зависит, как мы можем видеть, как от длины волны излучения, так и от расстояния между отражающими плоскостями. Первая из этих зависимостей используется при создании монохроматора для рентгеновского излучения. Его основой служит графитовая пластинка. Атомы углерода в графите образуют чередующиеся плоскости, отражение от которых дает луч при условии Брегга-Вульфа: определенному углу поворота пластинки соответствует определенная длина волны отраженного луча (6.26).

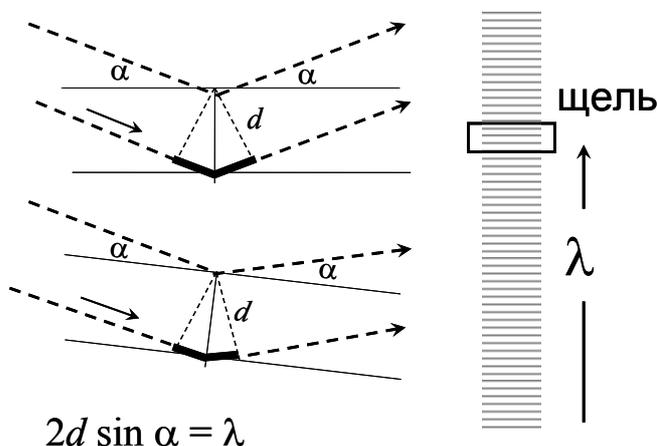


Рис. 6.26. Принцип работы рентгеновского монохроматора.

6.10 Появление рефлексов при прецессии кристалла

Со вторым следствием закона Брэгга (обратная зависимость между межплоскостным расстоянием и углом отражения) мы многократно встретимся в последующих разделах.

Рассмотрим рис. 6.27. На этом рисунке приведено отражение рентгеновских лучей Рентгена от двух соседних миллеровых плоскостей, для случая, когда расстояние между плоскостями велико (А) или мало (Б). При этом в обоих случаях разность хода отраженных волн (выделено толстой линией) одна и та же и равна длине рентгеновской волны. Наглядно видно, что при меньшем расстоянии между плоскостями угол отражения больше, как это и следует из уравнения Брэгга $\sin \theta = \lambda / 2d$.

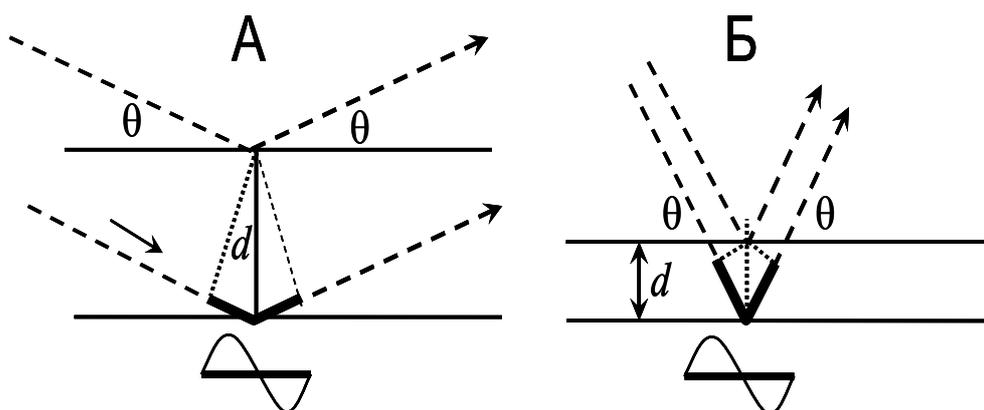


Рис.6.27. Обратная зависимость отклонения рефлекса от расстояния между Миллеровыми плоскостями отражения.

С другой стороны, межплоскостные расстояния уменьшаются с увеличением индексов hkl . Это иллюстрирует рис. 6.28.

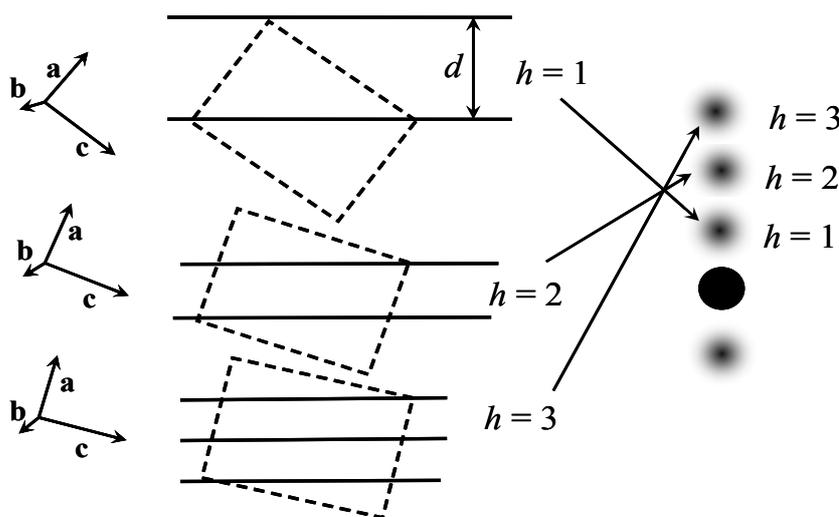


Рис. 6.28. Связь между индексами миллеровой плоскости и положением рефлекса на дафрактограмме.

На этом рисунке через вектор **b** и через концы вектора **c** проведены миллеровы плоскости. Вектор **a** делится на одну часть (плоскость 101, вверху), на две части (плоскость 201, в

середине) и на три части (плоскость 301, внизу). Поскольку число плоскостей, приходящихся на каждую ячейку для этих трех случаев равно, соответственно, 1, 2 и 3, очевидно, что наибольшее расстояние между плоскостями соответствует $h = 1$, а наименьшее в нашем случае будет при $h = 3$. Вообще, с ростом h уменьшается расстояние между плоскостями. Соответственно растет угол отклонения рефлекса. В результате на дифрактограмме рефлексы будут располагаться, как это показано на рисунке справа: порядковый номер рефлекса при отсчете вверх от центрального пятна равен индексу h .

6.10.1 Связь вектора рассеяния рефлекса hkl с миллеровыми плоскостями отражения hkl .

Рассеяние рентгеновских лучей происходит в любом направлении, однако, как мы уже говорили в предыдущем разделе, благодаря интерференции рентгеновских лучей, распространение лучей становится ощутимым только в строго определенных направлениях, в направлениях рефлексов. Для каждого конкретного рефлекса, характеризующегося индексами hkl (который отражается от серии параллельных друг другу плоскостей отражения hkl) существует свой вектор рассеяния, который мы обозначим \mathbf{S}_{hkl} .

Рассмотрим сначала модуль вектора \mathbf{S} . На рис. 6.13 угол $\angle ABO = \theta$ между диагональю параллелограмма и направлением падающего луча связан с катетом и гипотенузой треугольника соотношением

$$(S/2)/(1/\lambda) = \sin \theta \quad (6.19)$$

Преобразуем полученное уравнение

$$2(1/S)\sin \theta = \lambda \quad (6.20)$$

и сравним его с уравнением Брегга-Вульфа $2d \sin \theta = \lambda$.

Оказывается, $1/S = d$. Иными словами, модуль вектора рассеяния $|\mathbf{S}_{hkl}|$ обратен межплоскостному расстоянию d_{hkl} .

$$|\mathbf{S}_{hkl}| = \frac{1}{d_{hkl}} \quad (6.21)$$

Из рис. 6.12 следует также, что вектор \mathbf{S}_{hkl} нормален к плоскости отражения hkl , а следовательно совпадает по направлению с вектором \mathbf{d}_{hkl} . Это означает, что

Оба рассмотренные свойства вектора рассеяния, описывающие его связь с миллеровыми плоскостями отражения, могут быть описаны скалярным произведением векторов:

$$\mathbf{S}_{hkl} \cdot \mathbf{d}_{hkl} = 1 \quad (6.22)$$

6.10.2 Условия Лауэ

Вероятно читатель интуитивно чувствует, что вектор рассеяния \mathbf{S}_{hkl} , характеризующий свойства отражающих плоскостей hkl , зависит как от параметров элементарной ячейки (векторов \mathbf{a} , \mathbf{b} и \mathbf{c}), так и от построения плоскостей отражения (значений индексов h , k и l). Количественно эта зависимость описывается уже известными нам условиями Лауэ. Здесь мы снова выведем соответствующие уравнения, исходя из наших предыдущих построений миллеровых плоскостей отражения.

Итак проведем в кристалле серию плоскостей отражения. Для простоты возьмем, например, $h = 1$, $k = 2$ и $l = 0$, как это показано на рис. 6.31. Такие плоскости включают в себя вектор \mathbf{c} , проходят через концы вектора \mathbf{a} и делят вектор \mathbf{b} на 2 части (в общем

случае, как мы говорили в разделе “Миллеровы плоскости отражения”, плоскость hkl делит векторы \mathbf{a} , \mathbf{b} и \mathbf{c} соответственно, на h , k и l частей).

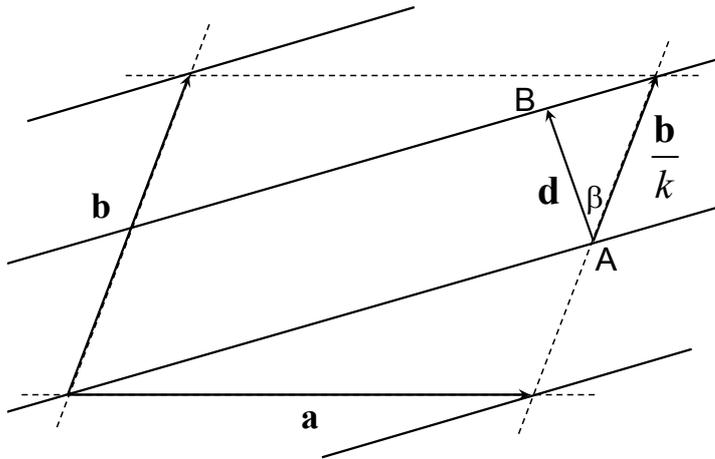


Рис. 6.31. Условие Лауэ.

Из точки A пересечения плоскости hkl с вектором \mathbf{b} опустим перпендикуляр на соседнюю плоскость hkl (рис. 6.31). Длина образовавшегося отрезка AB представляет собой межплоскостное расстояние d . Длина d и длина отрезка b/k связаны очевидным соотношением

$$d = (b/k) \cos \beta \quad (6.23)$$

Заменив d на обратную величину модуля вектора рассеяния $1/S$ (см. уравнение (6.22)), получаем

$$k = bS \cos \beta \quad (6.24)$$

Таким образом индекс k равен скалярному произведению векторов:

$$\mathbf{b} \cdot \mathbf{S} = k \quad (6.25)$$

Используя аналогичные построения, можно показать, что $\mathbf{a} \cdot \mathbf{S} = h$ и $\mathbf{c} \cdot \mathbf{S} = l$.

Эти уравнения, называемые условиями Лауэ, мы выводили ранее (см. уравнения (6.10) – (6.12)). Новое в этих уравнениях для нас то, что целые числа h , k , l , которые при первом выводе вроде бы не несли особой информации, в дальнейшем оказались порядковыми номерами рефлексов на дифрактограмме, где за ноль принято направление неотклоненного рентгеновского луча. Теперь же мы знаем, что эти индексы определяют также способ проведения гипотетических отражающих плоскостей в кристалле.

6.10.3 Зависит ли положение рефлекса от того, в каком месте элементарной ячейки расположен рассеивающий центр?

Обычно миллеровы плоскости отражения проводят через узлы кристаллической решетки. Иными словами, предполагается, что все вещество, рассеивающее рентгеновские лучи, сосредоточено в начале координат каждой элементарной ячейки ($x=0$, $y=0$, $z=0$, или, что то же самое, $\mathbf{r}=0$), как это показано на рис. 6.26 и рис. 6.32А.

Что произойдет, если центр, рассеивающий рентгеновские лучи, переместится в какое-либо иное место x , y , z в элементарной ячейке, как это показано на рис. 6.32Б. Очевидно, что при этом вся система миллеровых плоскостей отражения сдвинется вдоль координатных осей на расстояния x , y и z , но ни направление плоскостей, ни расстояние

между плоскостями при этом не изменятся. Останутся неизменными также вектор рассеяния \mathbf{S} и направление луча, формирующего соответствующий рефлекс hkl .

Итак, положение рефлексов не зависит от того, в каком месте элементарной ячейки находится рассеивающий центр.

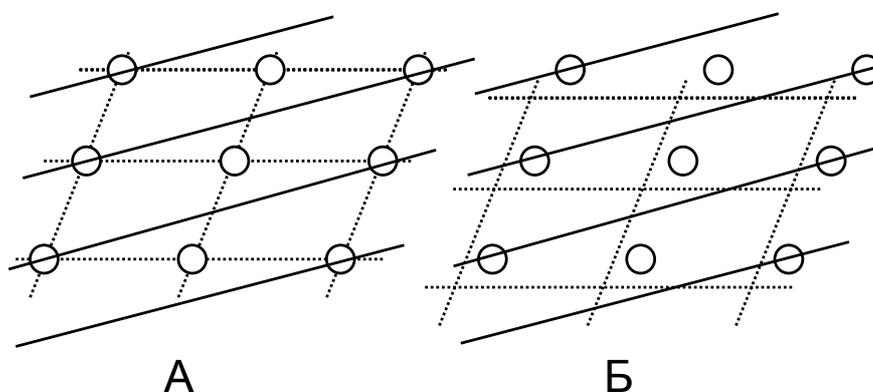


Рис. 6.32.
Независимость положения рефлекса от расположения рассеивающего центра в пределах элементарной ячейки.

Молекула белка состоит из многих тысяч атомов, каждый из которых рассеивает рентгеновские лучи. Через систему идентичных атомов в ячейках кристалла можно провести плоскости отражения hkl , и отражения от этих плоскостей будут суммироваться, но вся эта сумма будет сосредоточена в рефлексе hkl , одном и том же для всех атомов элементарной ячейки. Положение рефлекса зависит от параметров элементарной ячейки (векторов \mathbf{a} , \mathbf{b} и \mathbf{c}) и от способа проведения миллеровых плоскостей (т. е. от значений h , k и l), но не зависит от того, сколько атомов в элементарной ячейке, как сильно они рассеивают рентгеновские лучи и как они распределены в белковой молекуле. Внутренняя структура белковой молекулы непосредственно отражается не на положении или числе рефлексов, а на свойствах отраженных рентгеновских волн в каждом рефлексе. Эти свойства включают в себя интенсивность рефлекса и фазу колебаний, и объединены понятием *структурный фактор* рефлекса, к рассмотрению которого мы сейчас и переходим.

6.11 Структурный фактор

Какую информацию несет рентгеновский луч, рассеянный в кристалле в направлении рефлекса hkl ? Как в случае всякой электромагнитной волны, эта информация заключена в векторе электрического поля, меняющегося в данной точке пространства по закону:

$$|\mathbf{E}| = |\mathbf{E}| e^{2\pi i \delta} \quad (6.26)$$

где δ – фаза колебания. К сожалению, амплитуда колебания, как и фаза, не связаны однозначно ни с координатой рассеивающего центра, ни с его свойствами, поскольку зависят, помимо всего прочего, от условий измерения, таких как яркость источника, расстояние, которое проходят рентгеновские лучи от источника до приемника и т.д. Чтобы однозначно связать амплитуду и фазу луча hkl с координатой и свойствами центра рассеяния, нужно нормировать \mathbf{E} как по амплитуде, так и по фазе. Это достигается путем деления вектора \mathbf{E}_r луча, рассеянного данным центром с координатой \mathbf{r} , на вектор \mathbf{E}_e электрического поля луча, рассеянного в том же эксперименте и в том же направлении одним электроном, помещенным в начало координат ($\mathbf{r} = 0$). При этом фаза луча, рассеянного этим электроном, принимается равной нулю. Полученное отношение

$$F = \frac{\mathbf{E}_r}{\mathbf{E}_e} = \frac{fe^{2\pi i\delta}}{e^{2\pi i0}} = fe^{2\pi i\delta} \quad (6.27)$$

называется структурным фактором.

Фаза рассеянного излучения связана с координатой уравнением (6.28).

$$\delta = \mathbf{S} \cdot \mathbf{r} \quad (6.28)$$

Зная положение рефлексов на дифрактограмме, мы можем определить параметры элементарной ячейки (векторы \mathbf{a} , \mathbf{b} и \mathbf{c}) и индексы hkl для каждого данного рефлекса. Используя условия Лауэ, мы можем затем найти величины \mathbf{S} для каждого рефлекса hkl . Если известна координата атома \mathbf{r} , можно теперь рассчитать фазу электромагнитной волны по уравнению (6.28), а затем рассчитать и сам структурный фактор рассеивающего центра, если известна относительная амплитуда f .

6.12 Структурные факторы электрона и атома

Поскольку амплитуда электромагнитной волны, рассеянной в одном и том же направлении и в одних и тех же условиях, для двух электронов будет одинаковой, структурный фактор электрона для рефлекса hkl равен

$$F_{hkl} = e^{2\pi i\delta} = e^{2\pi i(\mathbf{S} \cdot \mathbf{r})} \quad (6.29)$$

В атоме, содержащем n электронов, рассеяние света будет, естественно, более интенсивным, и уравнение для структурного фактора атома будет иметь вид

$$F_{hkl} = fe^{2\pi i(\mathbf{S} \cdot \mathbf{r})} \quad (6.30)$$

где $f \approx n$. Неточное равенство f и n связано с тем, что электроны в атоме собраны не в одну точку, а занимают некоторое пространство, вполне заметное в масштабе длины рентгеновской волны. Вследствие интерференции обычно $f < n$.

6.12.1 Сложение структурных факторов

В сущности, структурный фактор – это нормированная электромагнитная волна, и структурные факторы от нескольких рассеивающих центров складываются, как обычные волны. Другими словами, структурные факторы обладают свойством аддитивности: структурный фактор от нескольких центров равен структурному фактору каждого из них.

Следует, однако, не забывать, что структурный фактор – комплексное число (см. уравнение (6.30)), и сложение структурных факторов производится по правилам сложения комплексных чисел. Как всякое комплексное число, структурный фактор может быть представлен в виде вектора на комплексной плоскости (см. рис. 6.33).

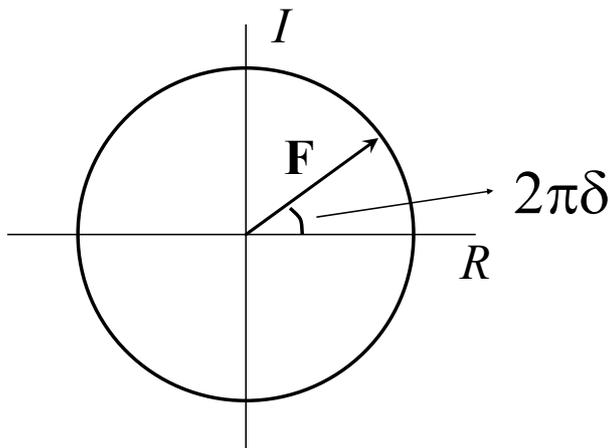


Рис. 6.33. Структурный фактор как вектор на комплексной

Сложение структурных факторов может производиться по правилам сложения векторов, как это показано на рис. 6.34.

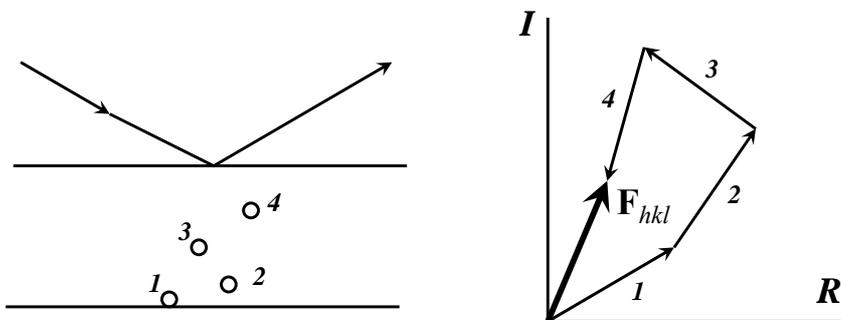


Рис. 6.34. Сложение структурных факторов. Структурные факторы атомов 1-4 (слева) складываются как векторы на комплексной плоскости (справа), образуя общий структурный фактор данного рефлекса F_{hkl} .

6.12.2 Расчет структурных факторов атомов в элементарной ячейке кристалла

Каждый рефлекс обусловлен суперпозицией волн, рассеянных всеми атомами кристалла, и идущими в направлении, которое задается вектором рассеяния S_{hkl} . Структурный фактор рефлекса hkl складывается из структурных факторов всех атомов, входящих в элементарную ячейку, т.е. равен

$$F_{hkl} = \sum_j f_j e^{2\pi i(\mathbf{S}_{hkl} \cdot \mathbf{r}_j)} \quad (6.31)$$

Выразим координаты атома в элементарной x_j, y_j и z_j в долях от длин соответствующих векторов ячейки \mathbf{a}, \mathbf{b} и \mathbf{c} . Тогда проекции радиус-вектора \mathbf{r} координаты атома на координатные оси будут равны, соответственно $\mathbf{a} \cdot x_j, \mathbf{b} \cdot y_j$ и $\mathbf{c} \cdot z_j$, а полностью вектор координаты равен

$$\mathbf{r} = \mathbf{a} \cdot x_j + \mathbf{b} \cdot y_j + \mathbf{c} \cdot z_j \quad (6.32)$$

Фаза структурного фактора для j -го атома равна

$$\delta = \mathbf{S} \cdot \mathbf{r} = \mathbf{S} \cdot \mathbf{a} \cdot x_j + \mathbf{S} \cdot \mathbf{b} \cdot y_j + \mathbf{S} \cdot \mathbf{c} \cdot z_j \quad (6.33)$$

С учетом условий Лауэ, получаем выражение для фазы

$$\delta = \mathbf{S} \cdot \mathbf{r} = hx_j + ky_j + lz_j \quad (6.34)$$

Подставив это выражение в уравнение (6.31), получаем окончательное уравнение структурного фактора рефлекса hkl :

$$F_{hkl} = \sum_j f_j(\mathbf{S}) e^{2\pi i(hx_j + ky_j + lz_j)} \quad (6.35)$$

где $f_j(\mathbf{S})$ – атомный фактор рассеяния, зависящий от атомного номера (числа электронов в атоме) и (в небольшой степени) от вектора рассеяния \mathbf{S} изучаемого рефлекса hkl .

6.12.3 Структурный фактор как функция электронной плотности

Как уже говорилось во введении, основной результат рентгеноструктурного анализа белковых кристаллов – это выяснение распределения электронной плотности внутри элементарной ячейки кристалла. Поэтому сейчас нам нужно понять, как зависит структурный фактор от электронной плотности?

Представим себе, что мы разбили элементарную ячейку на множество маленьких элементов, проведя плоскости, параллельные граням ячейки и равноотстоящие друг от друга (см. рис. 6.7). Число электронов внутри такого элемента (с координатами x, y, z) равно произведению его объема ΔV на электронную плотность $\rho(x, y, z)$, а структурный фактор рефлекса hkl в $\rho(x, y, z)\Delta V$ раз превышает структурный фактор электрона (сравни уравнение (6.29)), т.е. равен:

$$F_{hkl} = \rho(x, y, z)\Delta V e^{2\pi i\delta} \quad (6.36)$$

С учетом уравнения (6.34) получаем уравнение структурного фактора элемента объема для рефлекса hkl

$$F_{hkl} = \rho(x, y, z)\Delta V e^{2\pi i(hx + ky + lz)} \quad (6.37)$$

Структурный фактор всей элементарной ячейки равен сумме структурных факторов всех элементов, т. е.

$$F(h, k, l) = V \sum_x \sum_y \sum_z \rho(x, y, z) e^{2\pi i(hx + ky + lz)} \quad (6.38)$$

Здесь V – объем элементарной ячейки, равный сумме объемов всех элементов (ΔV).

Уравнение (6.38) представляет собой сумму рядов Фурье. При достаточно малых величинах элементарных объемов ΔV суммирование заменяется интегрированием, и мы получаем уравнение, называемое преобразованием Фурье. Преобразование Фурье, как известно из математики, обладает тем свойством, что, повторенное дважды, оно приводит

к исходному результату, наподобие умножения на минус единицу. Осуществив с суммой (6.38) процедуру, аналогичную преобразованию Фурье, мы получим величину электронной плотности как функцию координат и структурных факторов.

$$\rho(x, y, z) = 1/V \sum_h \sum_k \sum_l F(h, k, l) e^{-2\pi i(hx+ky+lz)} \quad (6.39)$$

6.13 Расчеты электронной плотности внутри элементарной ячейки

Уравнение (6.39) используется для расчетов электронной плотности в любой точке элементарной ячейки с координатами x , y и z (выраженными в долях длины векторов **a**, **b** и **c**). Расчет включает в себя следующие этапы:

Задав координаты x , y и z и зная значения индексов h , k , l для данного рефлекса, рассчитываем величину $e^{-2\pi i(hx+ky+lz)}$. Заметим, что мы получаем комплексную величину, которая характеризуется амплитудой и фазой.

Умножаем результат 1 на величину структурного фактора данного рефлекса $F(h, k, l)$. Структурный фактор – комплексная величина, а получаемое нами скалярное произведение двух комплексных величин представляет собой величину скалярную.

Процедуры 1 и 2 производим для всех рефлексов.

Суммируем результаты расчетов в процедуре 3.

Разделив полученный результат на объем элементарной ячейки V , получаем электронную плотность в точке с заданными координатами x , y и z .

Чтобы получить представление о распределении электронной плотности по всей элементарной ячейке, процедуры 1 – 5 необходимо произвести много раз при разных величинах x , y и z . Попробуем оценить объем необходимых вычислений. Чтобы рассчитать распределение электронной плотности с разрешением (шагом) в 1 \AA по каждой из координатных осей, например, для супероксиддисмутазы, имеющей ячейку размером $79.83 \times 85.69 \times 108.59 \text{ \AA}$ нужно провести более 700 000 вычислений по процедуре 1–5. При каждом из этих вычислений мы производим суммирование данных, полученных для множества рефлексов (процедура 1 – 3). Теоретически суммирование производится по всем значениям h , k и l (от $-\infty$ до $+\infty$). На практике стремятся использовать значения структурных факторов возможно большего числа рефлексов. Интуитивно понятно и можно доказать строго математически, что чем большее число рефлексов мы использовали, тем выше разрешение на картах электронной плотности, а следовательно тем увереннее мы можем представить структуру молекулы белка и определить координаты всех атомов. Для разрешения 1 \AA необходимо использовать структурные факторы, собранные по меньшей мере с 10 000 рефлексов. Это означает, что общее число вычислений по циклу 1–5 приближается к 10 миллиардам; при этом часть операций производится с комплексными числами. Естественно, что если нам даже известны структурные факторы всех рефлексов, вычисления можно сделать лишь с использованием вычислительных машин. К сожалению, определить структурные факторы на основании анализа дифрактограмм тоже непростая задача, к рассмотрению которой мы сейчас перейдем.

6.14 Проблема фаз

6.14.1 Измеряя интенсивность рефлекса, мы можем рассчитать амплитуду структурного фактора, но не знаем его фазу

В сущности, структурный фактор – это нормированная величина электрического поля рассеянной рентгеновской волны. Это поле изменяется в данной точке во времени по

периодическому закону, и это его колебание имеет амплитуду $|F|$ и фазу ϕ . Уравнение этого колебания $F = |F|e^{2\pi i\delta}$. Как известно, энергия колебания пропорциональна произведению

$$I(\mathbf{S}) = F(\mathbf{S}) \cdot F^*(\mathbf{S}) = |F|^2 \quad (6.40)$$

В опытах по изучению дифракции рентгеновских лучей легко найти *амплитуду* структурного фактора, поскольку она пропорциональна квадратному корню энергии излучения, т.е. интенсивности рефлекса

$$|F| = \sqrt{I(\mathbf{S})} \quad (6.41)$$

Но как найти *фазу* структурного фактора и рассчитать $e^{2\pi i\delta}$? Непосредственные измерения интенсивности рефлексов не дают нам возможности это сделать, а детекторов, которые измеряли бы и амплитуду и фазу падающей на них волны, не существует. Чтобы проиллюстрировать ситуацию, в которой мы находимся, вернемся к изображению структурного фактора в виде вектора на комплексной плоскости. На рис. 6.33 слева показан структурный фактор в виде вектора \mathbf{F} . Справа построено геометрическое место конца вектора структурного фактора – окружность, радиус которой равен модулю структурного фактора. Этот радиус мы можем получить из данных интенсивности рефлекса. Однако вектор мы построить не можем, поскольку его направление (т.е. фаза δ) нам неизвестно.

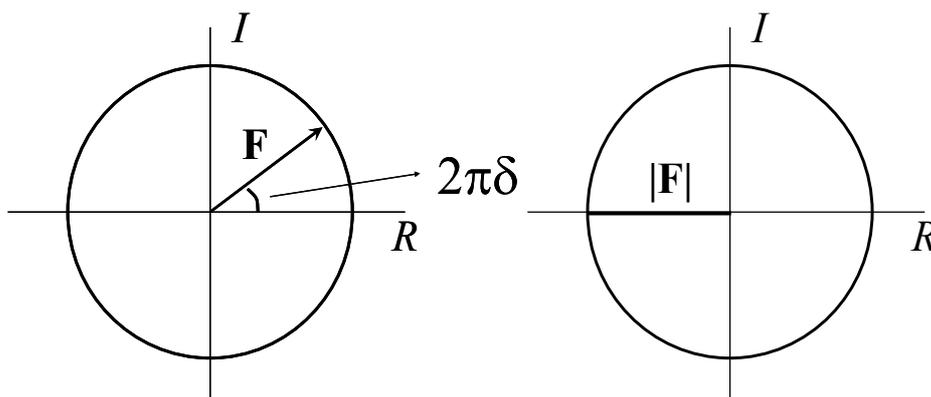


Рис. 6.33.
Невозможность нахождения структурного фактора по величине амплитуды.

В руководствах по белковой кристаллографии часто приводят аргументы в пользу того, что для расшифровки структуры важнее знание фазы, чем амплитуды структурных факторов рефлексов. На нашем графике это означало бы, что для проведения правильной стрелки важнее знать ее направление, чем длину. Возможно, что тут что-то есть, но все-таки надо знать как фазу, так и амплитуду структурного фактора каждого рефлекса.

6.14.2 Метод изоморфного замещения

Основной метод, используемый для расшифровки структуры новых белков – это метод множественного изоморфного замещения. Этот метод заключается в том, что к готовому кристаллу, находящемуся в маточном растворе, добавляют соль тяжелого металла или низкомолекулярное соединение, содержащее ион тяжелого металла. Ион проникает в толщу кристалла и присоединяется к определенным химическим группам в белковой молекуле. Например, ион ртути присоединяется к тиоловым группам; при этом, заметим, Ag заменяет H, так что речь идет о *замещении* атомов. Форма кристалла и его внутренняя структура при этом могут не измениться, в этом случае мы говорим об *изоморфном* замещении. Основной признак того, что замещение было изоморфным, заключается в том,

что сохраняются параметры элементарной ячейки и, следовательно, не меняется положение рефлексов на денситограмме. На рис. 6.34 показаны две прецессионные фотографии кристалла лизоцима. Изоморфное замещение было осуществлено путем диффузии в кристалл HgBr_2 . Фотографии смещены по горизонтальной оси, чтобы рефлексы от двух снимков не заслоняли друг друга. Видно, что положение рефлексов на двух фотографиях идентично. В то же время некоторые заметно различаются по интенсивности, другие тоже различаются по интенсивности, но не так заметно для глаза.

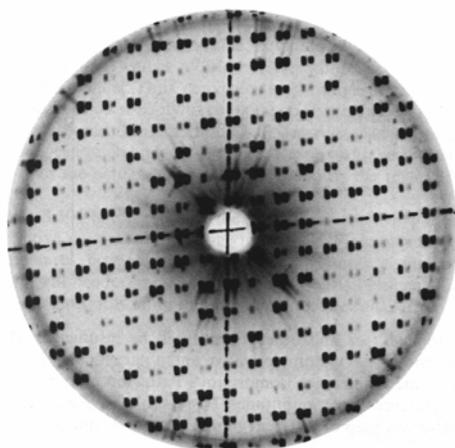


Рис. 6.34. Сравнение рефлексов от кристалла лизоцима и его изоморфно-замещенного производного.

Как мы увидим ниже, чтобы найти фазы всех рефлексов нужно иметь несколько (минимум два) изоморфно-замещенных кристалла, в которых тяжелый атом расположен в разных участках белковой макромолекулы.

Структурный фактор каждого из рефлексов $F(h, k, l)$ изотопного деривата равен сумме структурного фактора «родительского» кристалла и структурного фактора тяжелого атома, занимающего в элементарной ячейке определенное положение. Это показано на рис. 6.35, где на комплексной плоскости суммированы структурные факторы условной молекулы, состоящей из четырех легких атомов (таких как С, N и O) и тяжелого атома, скажем Ag. Легкие атомы на рисунке перенумерованы, а тяжелый атом Н заштрихован. Структурные факторы обозначены на комплексной плоскости в виде векторов \mathbf{F}_P , \mathbf{F}_{PH} и \mathbf{F}_H для исходного белка, изоморфно замещенного белка и тяжелого атома, соответственно.

Рассматривая рис. 6.35, можно понять, почему замещающий атом должен быть «тяжелым», т.е. иметь большую молекулярную массу. В сущности, он должен иметь большой атомный номер, т.е. много электронов. Как мы помним, амплитуда структурного фактора атома приблизительно пропорциональна числу электронов в атоме, поскольку именно электроны ответственны за рассеяние рентгеновских волн. Поэтому длина стрелки вектора \mathbf{F}_H , а следовательно и влияние тяжелого атома на структурный фактор изоморфно замещенного кристалла примерно пропорциональны атомному номеру замещающего атома.

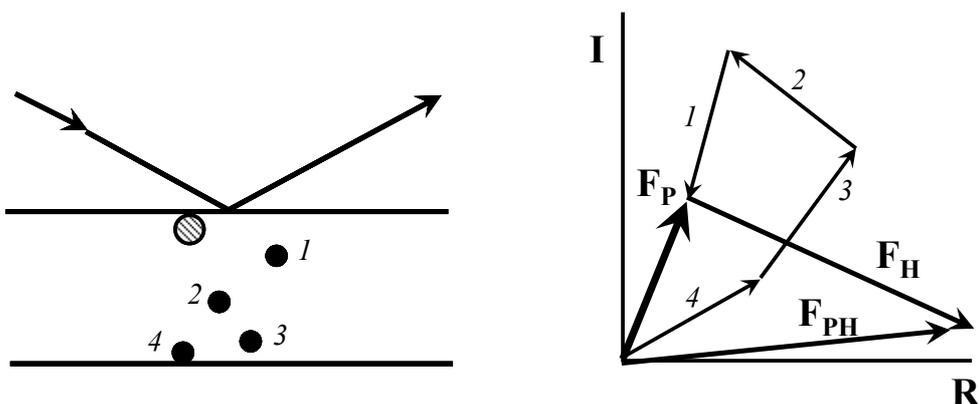


Рис. 6.35.
Суммирование структурных факторов при изоморфном замещении.

6.14.3 Определение координат тяжелого атома в элементарной ячейке белкового кристалла

Для того чтобы найти структурный фактор рефлекса $F(h, k, l)$ белкового кристалла, необходимо знать, по меньшей мере, пять величин:

1. Амплитуду структурного фактора данного рефлекса от белкового кристалла.
2. Амплитуду структурного фактора данного рефлекса от изоморфно замещенного белкового кристалла 1.
3. Амплитуду структурного фактора данного рефлекса от белкового кристалла 2, где изоморфное замещение проведено в другом центре по сравнению с предыдущим случаем.
4. Амплитуду и фазу структурного фактора тяжелого атома в изоморфном кристалле 1.
5. Амплитуду и фазу структурного фактора тяжелого атома в изоморфном кристалле 2.

Получение двух изоморфных замещений – необходимое условие определения структурных факторов «родительского» белкового кристалла. На практике стремятся приготовить максимально возможное число изоморфно-замещенных дериватов, поскольку это позволяет определить структурный фактор с большей точностью.

Определение структурного фактора тяжелого атома – самостоятельная и непростая задача. Для этого используются данные интенсивностей рефлексов исходного и изоморфно-замещенного кристалла и Фурье-синтез этих интенсивностей, называемый преобразованием Паттерсона. В результате дальнейших расчетов появляется возможность определить координаты тяжелого атома в элементарной ячейке, что в свою очередь позволяет рассчитать структурные факторы для всех рефлексов по уравнению (6.35).

Мы не будем здесь останавливаться на деталях этих процедур, отсылая читателя к соответствующим руководствам. Так или иначе, имеется возможность определения структурных факторов тяжелого атома для рефлексов h, k, l по данным, полученным из результата измерения интенсивностей рефлексов на дифрактограммах.

6.14.4 Построение Харкера

Принцип расчета структурного фактора рефлекса белкового кристалла при методе изоморфного замещения поясняется путем построения на комплексной плоскости, показанного на рис. 6.36.

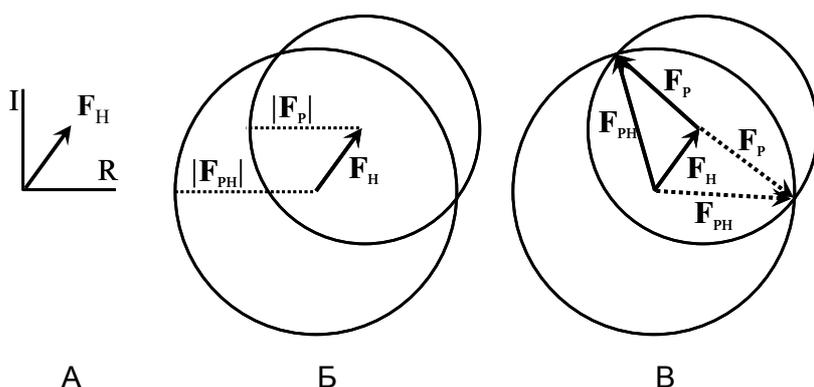


Рис. 6.36. Построение Харкера.

На 6.36, *A* и 6.36, *B* показано то, чем мы располагаем в начале построения: модули структурных факторов белка $|F_P|$ и его изоморфного деривата $|F_{PH}|$, а также полная комплексная величина структурного фактора атома тяжелого металла F_H .

На 6.36, *B* показаны векторы, которые мы получаем в конце построения: интересующий нас структурный фактор F_P , а также структурный фактор F_{PH} .

Построение Харкера проводится таким образом:

1. На комплексной плоскости откладывают известный вектор F_H (рис. 6.36, *A*).
2. Взяв начало вектора F_H в качестве центра окружности, проводят окружность радиусом F_{RH} , затем, взяв в качестве центра окружности конец вектора F_H , проводят окружность радиусом $|F_{RH}|$ (рис. 6.36, *B*).
3. Начало и конец вектора F_H соединяют прямыми с точками пересечения двух окружностей (рис. 6.36, *B*). Точки пересечения удовлетворяют одновременно двум условиям: там могут лежать концы как вектора F_P так и вектора F_{RH} . Другие точки на нашей плоскости этим условиям не удовлетворяют, и мы можем исключить их из числа кандидатов на конец векторов F_P и F_{RH} . К сожалению, точек пересечения две и это создает неопределенность полученного результата. Для любой из этих точек, как видно из рисунка, соблюдается условие

$$F_{RH} = F_P + F_H \quad (6.42)$$

которое, как мы знаем, соответствует правилу сложения структурных факторов.

Так или иначе, построение Харкера дает нам *два* значения структурного фактора, но только одно из них соответствует действительности. Ситуация получается подобной той, с которой сталкиваются, решая квадратные уравнения, где мы получаем два корня, из которых лишь один соответствует физической реальности.

Выход из положения заключается в использовании еще одного изоморфного замещения; полученные рентгенограммы позволяют провести второе построение Харкера и получить еще два возможных значения F_P . Одно из этих значений окажется примерно таким же, как при первом построении; именно оно и будет истинным структурным фактором данного рефлекса «родительского» белкового кристалла.

Использование нескольких (минимум двух) изоморфных замещенных позволяет не только «отсечь» лишнее значение структурного фактора, но и уточнить значение истинного структурного фактора каждого рефлекса. Величины, полученные при первом и втором построениях Харкера (или при соответствующих расчетах на ЭВМ), обычно не вполне совпадают; истина лежит где-то посередине, и правильнее всего брать среднюю из двух определений. Если мы сможем приготовить несколько изоморфно-замещенных

производных, можно взять среднюю величину из всех полученных значений структурного фактора, и это даст наиболее точную его оценку.

6.15 Расшифровка пространственной структуры макромолекул

6.15.1 Основные этапы расшифровки структуры макромолекул

Суммируем еще раз основные этапы расшифровки структуры макромолекул путем анализа дифракции рентгеновских лучей кристаллами

1. Выращивают подходящие кристаллы нативного белка. Это самая трудоемкая часть задачи. Часто получается кристалл на вид превосходный, но внутренняя его структура настолько неупорядочена, что получить хорошие дифракционные данные с достаточным разрешением невозможно.

Снимают дифрактограмму и на основании анализа расположения рефлексов определяют пространственные группы и размеры элементарной ячейки. Затем собирают данные амплитуд рассеяния.

2. Получают, если удастся, несколько производных, изоморфно замещенных тяжелыми атомами. Это кристаллы, имеющие такие же элементарные ячейки, пространственные группы и структуру как и кристаллы немодифицированного белка, не считая того, что в определенных местах макромолекулы введены один или несколько тяжелых атомов. Для каждого такого производного кристалла собирают свой набор данных амплитуд рассеяния.

3. Находят положение тяжелых атомов в кристалле. Наиболее популярный способ – использование изоморфного синтеза Паттерсона, о котором ниже мы скажем несколько слов.

4. Уточняется положение тяжелого атома с использованием методов, разработанных для малых молекул.

5. Путем сопоставления данных о структурных факторах исходного кристалла с этими же данными для одного или нескольких изоморфно-замещенных кристаллов, находят фазы каждого h, k, l рефлекса исходного кристалла. Чем больше изоморфно-замещенных производных мы используем, тем обычно точнее могут быть определены фазы.

6. Используя найденные фазы «родительского» кристалла, нередко удается уточнить положение тяжелого атома, используя специально разработанные методы. А это в свою очередь дает возможность уточнить фазы рефлексов «родительского» кристалла.

7. Используя рассчитанные фазы и экспериментально найденные амплитуды каждого h, k, l рефлекса, рассчитывают электронную плотность по уравнению (6.39).

8. Строят карту электронной плотности. Обычно на этой стадии разрешение бывает невысоким (что-нибудь между 5,5 и 7 Å) и на карте атомные детали структуры не видны. Затем стадии 4 – 8 повторяют с более высоким разрешением (2,5 – 3 Å) пока не будет построена молекулярная модель. Для получения высоких разрешений используют синхротронное излучение, поскольку интенсивность рентгеновских лучей в синхротронном пучке на несколько порядков выше, чем в «лабораторных» источниках рентгеновских лучей.

9. Иногда после расчета структуры проводится ее уточнение. После уточнения, в котором используются самые разнообразные соображения, включая расчеты энергии конформации и т.д., можно заново рассчитать структурные факторы и еще раз проверить их соответствие рентгеновским данным.

Практически все расчеты, о которых здесь говорилось, проводятся на высокопроизводительных ЭВМ с использованием специализированного программного обеспечения.