

# Principy a metody monokrystalové strukturní analýzy

Jaromír Marek

# Obsah přednášky

- Monokrystalová krystalografie jako chemická metodika
- Historie difrakční krystalografie, krystalografické databáze
- Principy monokrystalové krystalografie
- Přístrojová instrumentace
- Základní postupy
- Příklady výsledků

# Krystalografie

- Experimentální věda studující krystaly
- Analýza difrakčních obrazců
- Studium atomární struktury pevných látek
- Monokrystalová krystalografie

# Historie difrakční monokrystalové krystalografie

- Potřeba vhodné „sondy“ – například elektromagnetické záření (1895, N.c. za fyziku 1901- W. C. Röntgen)
- 1912 - průkaz vlnové povahy rentgenového záření difrakcí na krystalu (N.c. za fyziku 1914 - M. von Laue)
- 1913-14 - První analýzy struktur krystalů (N.c. za fyziku 1915-W.H. Bragg & W.L. Bragg)
- 1924 - vlnová povaha elektronů (N.c. za fyziku 1927 - L.V. de Broglie)
- 1927 - difrakce elektronů na krystalu (N.c. za fyziku 1937- C.J. Davisson & G. Thompson)
- Neutronová difrakce (1994 - N.c. za fyziku - C. Shull & N. Brockhouse)

# Historie monokrystalové krystalografie – další NC

- 1946 - chemie - J.B. Sumner - „enzymes can be crystallised“ (1926)
- 1954 - chemie - L. Pauling - „research into the nature of the chemical bond and its application to the structure of complex substances“
- 1962 - chemie - M.F.Perutz & J.C.Kendrew – „studies of the structures of globular protein“ (1959)
- 1962 - fyziologie a medicína - F.H.C.Crick, J.D.Watson & M.H.F.Wilkins - „helical structure of DNA“ (1953)
- 1964 - chemie - D. Crowfoot-Hodgkin - „structure of many biochemical substances including Vitamin B12“
- 1976 - chemie - W.N.Lipscomb – „Structure of boranes “

# Historie monokrystalové krystalografie – další NC

- 1982 - chemie - A. Klug - „crystallographic electron microscopy and structure of biologically important nucleic acid - protein complexes“
- 1985 - chemie - H. A. Hauptman & J. Karle - „Development of direct methods for the determination of crystal structures “
- 1988 - chemie - J. Deisenhofer, R. Huber & H. Michel – „determination of the three-dimensional structure of a photosynthetic reaction centre
- 2003 - chemie (1/2) - R. MacKinnon - „structural and mechanistic studies of ion channels“
- 2006 - chemie - R. D. Kornberg - „molecular basis of eukaryotic transcription“ (= struktura RNA polymerázy)
- 2009 - chemie - V. Ramakrishnan, T.A. Steitz, A.E. Yonath - „structure and function of the ribosome “
- 2011 - chemie - Dan Shechtman - „for discovery of quasicrystals“
- 2012 – chemie (1/2) – Brian Kobilka - "for studies of G-protein-coupled receptors"

# Oblasti užití monokrystalových difrakčních technik

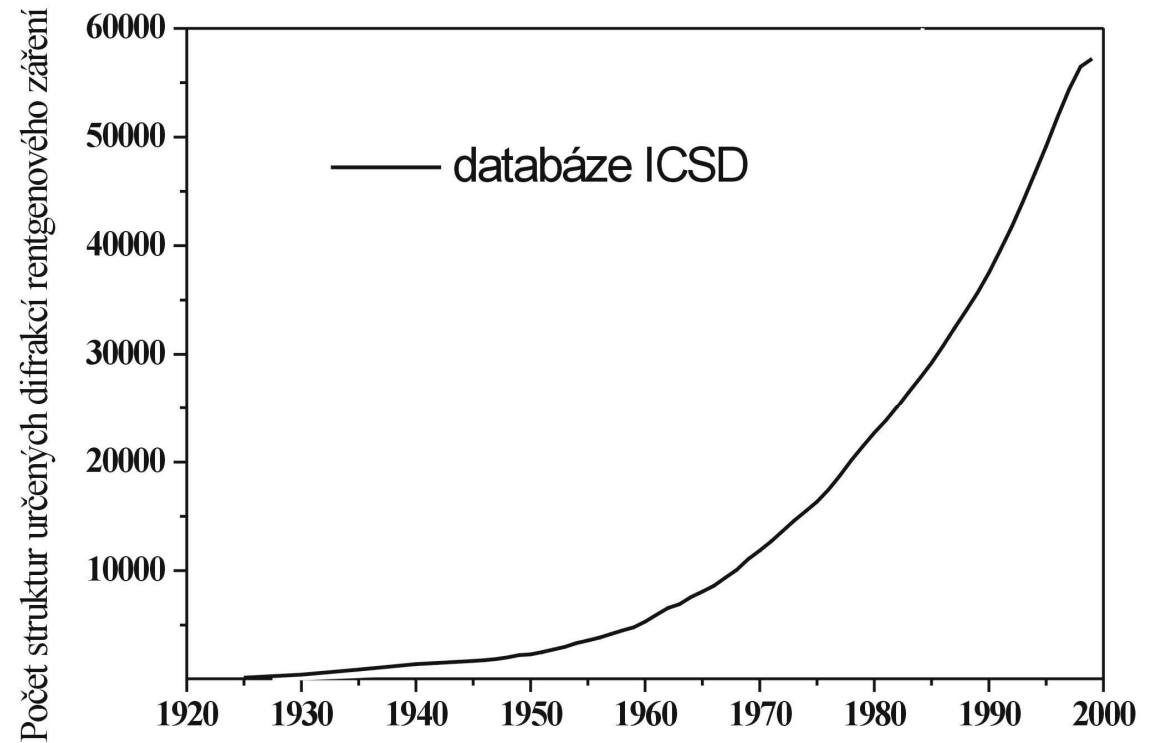
- anorganická chemie - databáze ICSD
- organická chemie - „Cambridgeská“ databáze CSDS
- biochemie a molekulární biologie - databáze PDB

# Růst užití difrakčních metodik v čase – databáze ICSD

Studované subjekty:  
anorganické krystaly

Exponenciální růst  
v 50. až 60. letech  
20. století.

Detektor = film



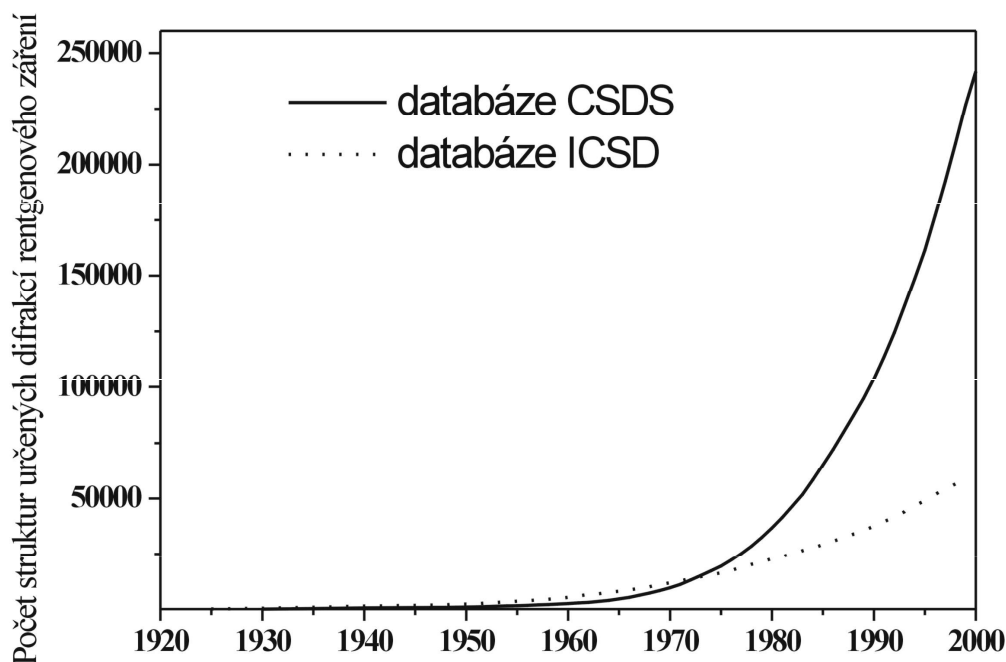


# Růst užití difrakčních metodik v čase – databáze CSDS

„Malé“ organické molekuly

Nástup v 70.-80. letech:  
automatické difraktometry  
+ „přímé metody“

90. léta – výpočty na PC

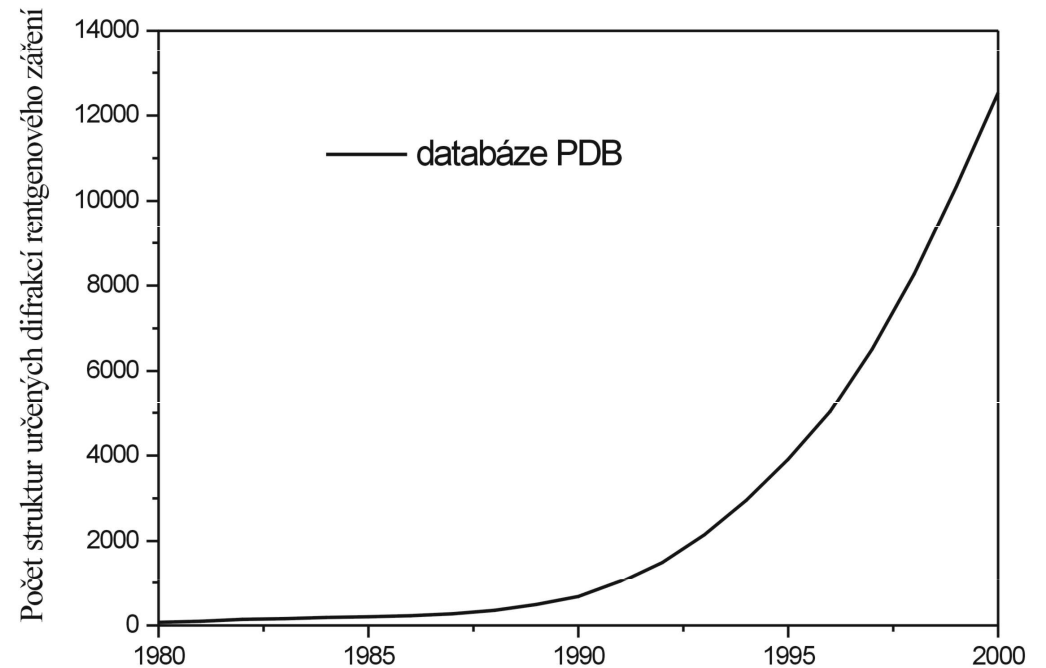


# Růst užití difrakčních metodik v čase – databáze PDB

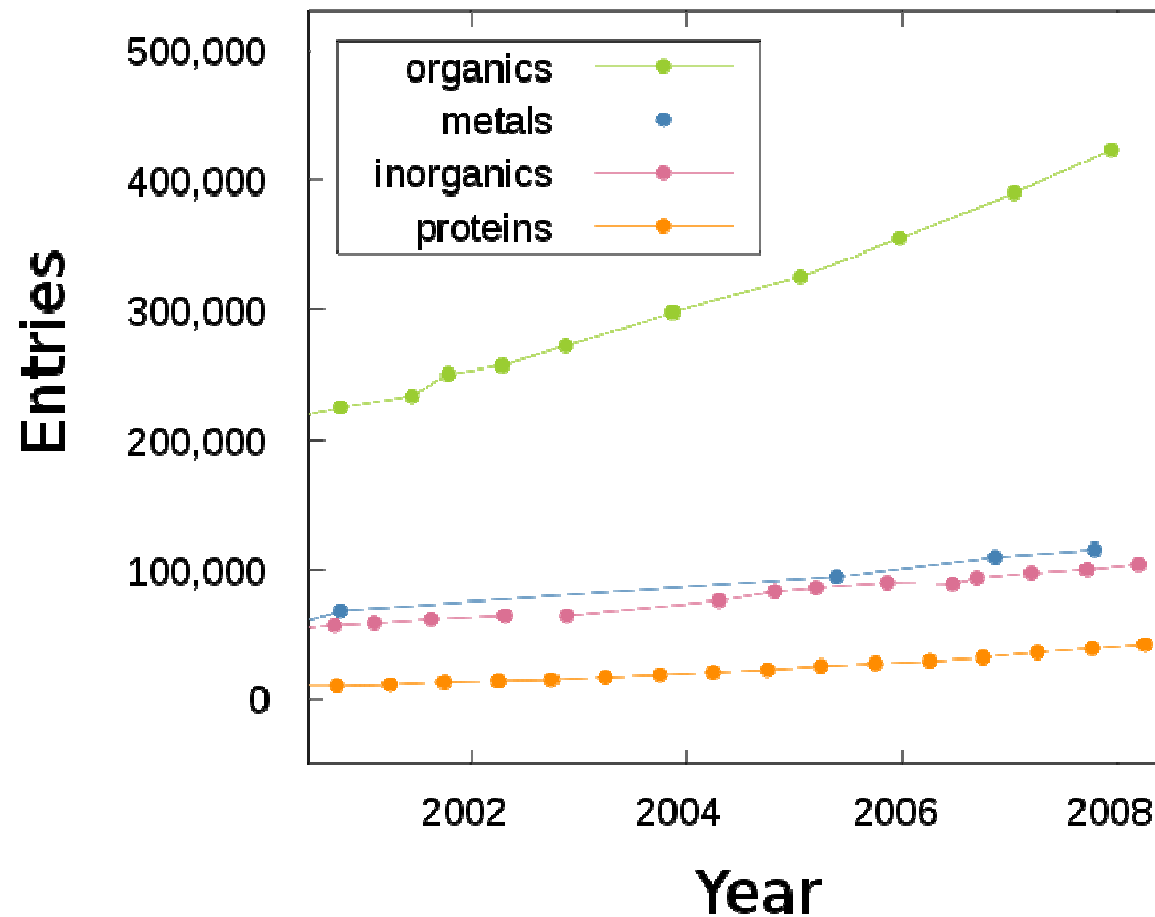
biologické makromolekuly

90. léta - PCR [objev 1983,  
(1/2) N.C. za chemii 1993 -  
Kary B. Mullis]

plošné detektory,  
synchrotronové záření



# Růst užití difrakčních metodik v čase – současnost



# Teoretické principy strukturní krystalografie: sonda

- „sonda“ velikosti vhodné pro studium atomů – elektron, neutron, foton
- rentgenové záření - vlnová délka (10 - 0.01 nm) v oboru standardních meziatomových vzdáleností ( $\sim 1 \text{ \AA}$ )
- interakce fotonu s látkou - rozptyl nebo absorpce
- Rozptyl - s energetickými ztrátami – Comptonovský
  - beze ztrát energie - Thompsonův

# Teoretické principy krystalografie: Thompsonův rozptyl

Nabitá částice je v poli rovinného monochromatického záření sekundárním zdrojem elektromagnetického pole

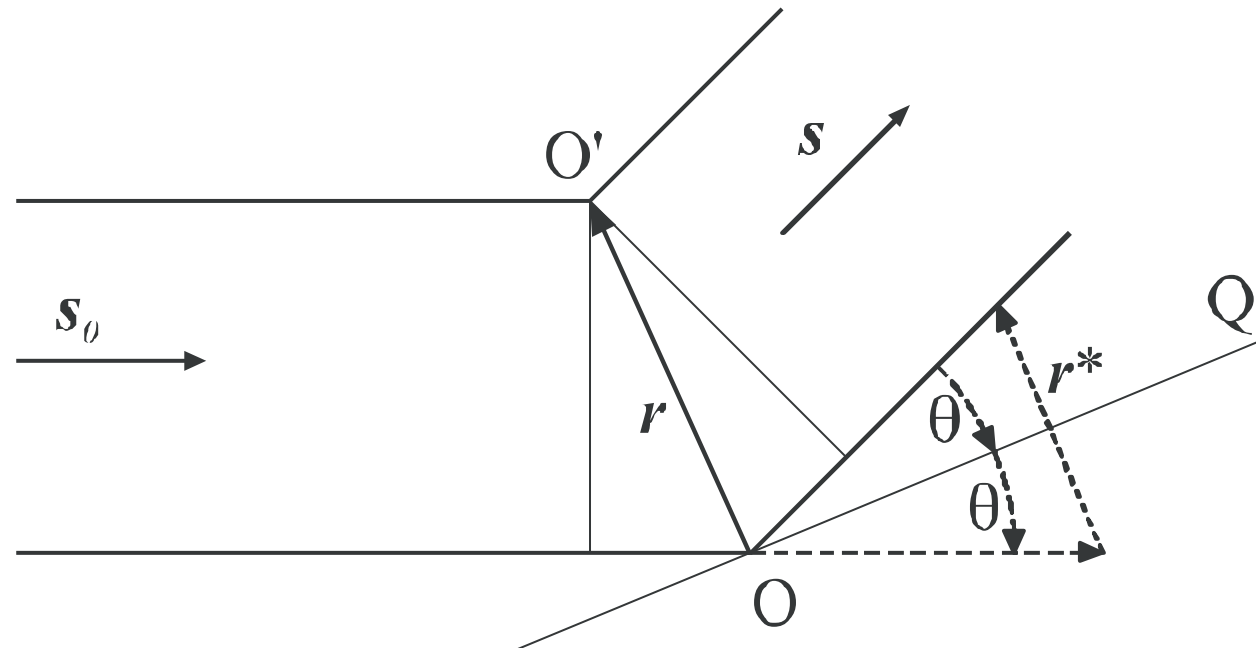
$$I_Q = I_{Oi} \frac{e^4}{m^2 r^2 c^4} \sin^2 \varphi$$

Rozptyl na protonech je nevýznamný - je 1837<sup>2</sup>x slabší než rozptyl fotonů na elektronech.

Při difrakci elektromagnetického záření studujeme **elektronovou strukturu látky**

# Teoretické principy krystalografie: dráhový a fázový rozdíl

Rovinná vlna, dvě nabitá rozptylová centra -> dráhový rozdíl



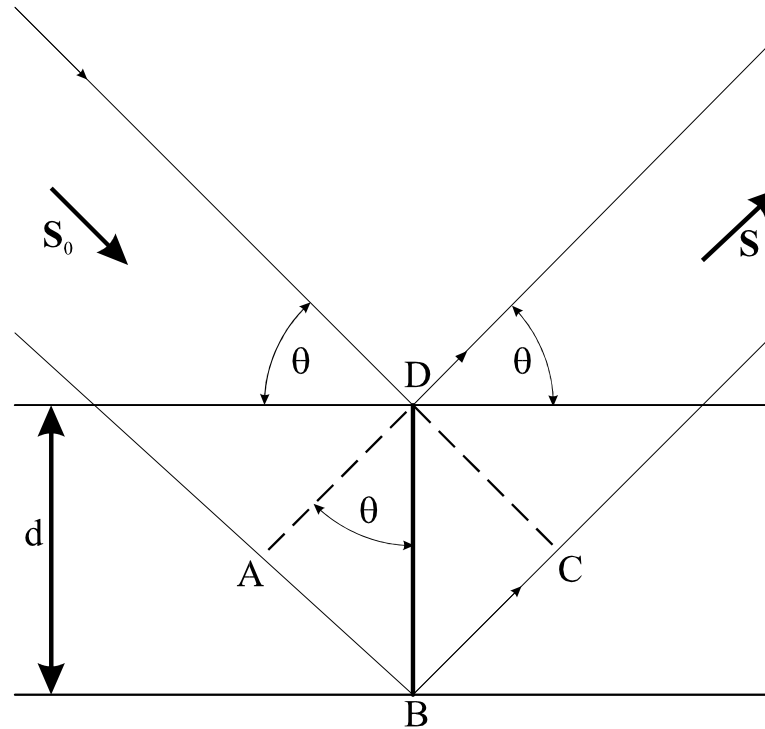
Amplituda záření rozptýleného na N centrech

$$F(\vec{r}^*) = \sum_{j=1}^N f_j \exp(2\pi i \vec{r}^* \cdot \vec{r}_j)$$

$$\vec{r}^* = \lambda^{-1}(\vec{s} - \vec{s}_0)$$

# Teoretické principy krystalografie: krystal, interference a difrakce

Rovinná vlna, dvě rovnoběžné roviny -> dráhový rozdíl



$$2(d_H/n) \sin \theta = 2d_H \sin \theta = \lambda$$

# Teoretické principy krystalografie: strukturní faktor, elektronová hustota

Strukturní faktor – popisuje amplitudu difraktované vlny

$$F_M(\vec{r}^*) = \int \sum_{j=1}^N \rho_j(\vec{r} - \vec{r}_j) \exp(2\pi i \vec{r}^* \cdot \vec{r}) d\vec{r} =$$
$$= \sum_{j=1}^N \int_V \rho_j(\vec{R}_j) \exp\left[2\pi i \vec{r}^* \cdot (\vec{r}_j + \vec{R}_j)\right] d\vec{R}_j = \sum_{j=1}^N f_j(\vec{r}^*) \exp\left(2\pi i \vec{r}^* \cdot \vec{r}_j\right)$$

**Krystalová elektronová hustota** je obráceným Fourierovým obrazem  
strukturních amplitud

$$\rho(\vec{r}) = \int_{V^*} F(\vec{r}^*) \exp(-2\pi i \vec{r}^* \cdot \vec{r}) d\vec{r}^* = \frac{1}{V} \sum_{h,k,l=-\infty}^{+\infty} F_{hkl} \exp[-2\pi i(hx + ky + lz)]$$

**Fázový problém** – neměříme strukturní amplitudy jako čísla komplexní,  
ale intenzity difrakcí = velikosti amplitud = kladná reálná čísla



# Difrakční experiment pro určení krystalové 3-D struktury

**Cíl experimentu** : s maximální možnou přesností a rychlostí naměřit co nejvíce intenzit vzniklých difrakcí rovnoběžného monochromatic. záření na různých množinách krystalových rovin

Generování intenzivního rentgenového záření

Úpravy fyzikálních parametrů záření

Detekce záření v difraktometrech

Měření na difraktometrech

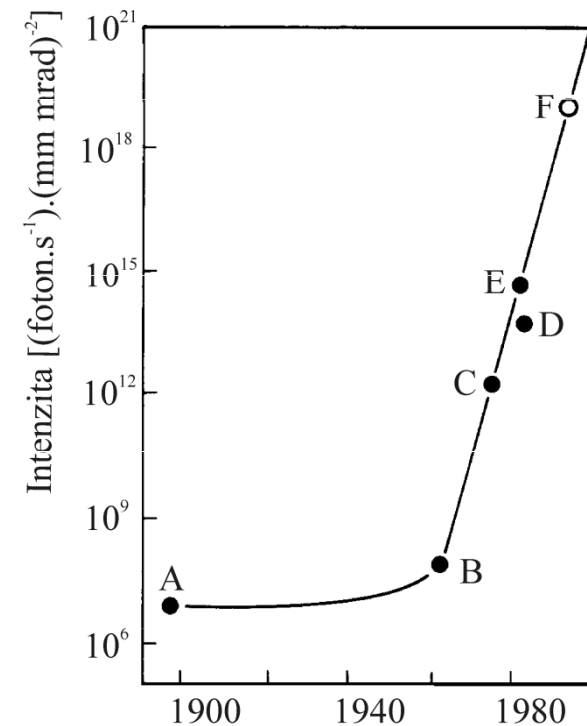
Chlazení vzorků

# Difrakční experiment : Generování RTG záření

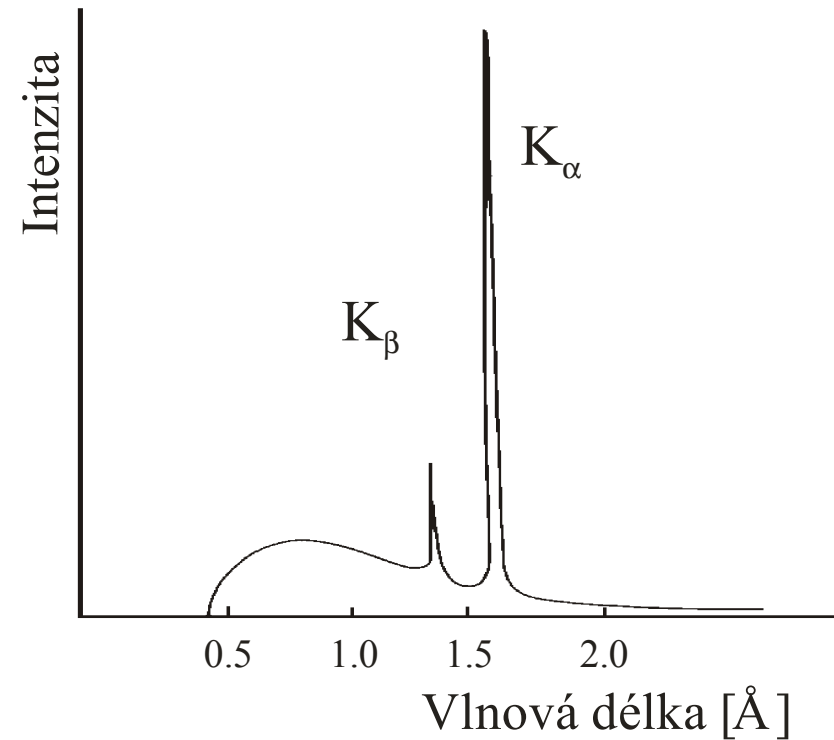
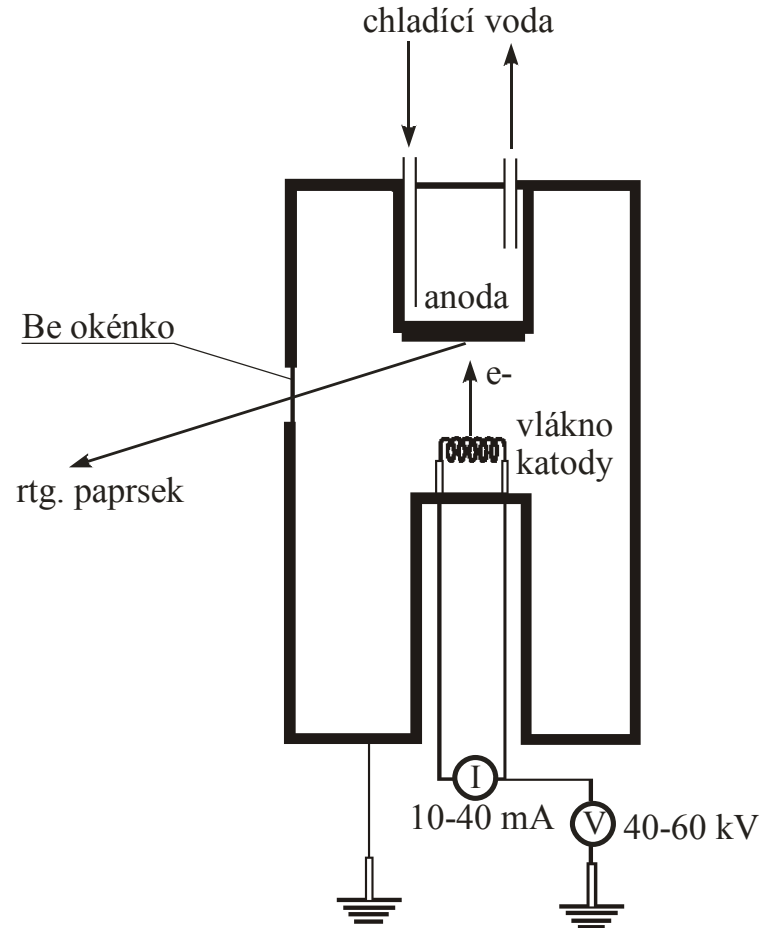
Rentgenové záření – vlnová délka 0,1 – 10 nm  
Generování „klasického“ RTG záření – elektron  
vs. kovový terčik

Limitace – „bodový“ zdroj kulových vln s malými  
možnostmi zvyšování vyzářeného výkonu  
– charakteristické spektrum

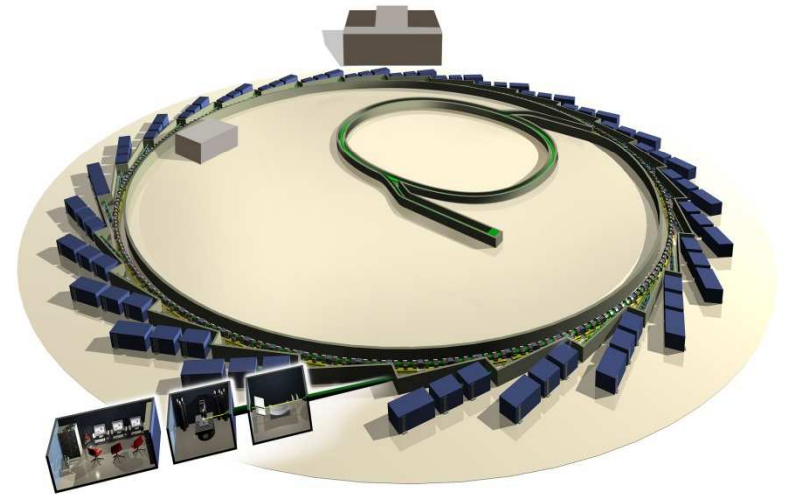
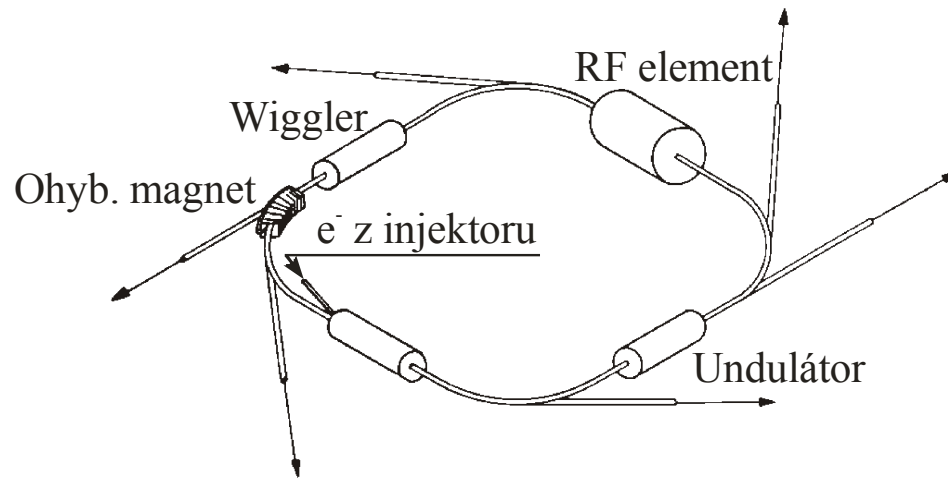
Nekonvenční zdroje RTG



# Difrakční experiment : konvenční zdroje RTG záření



# Difrakční experiment : nekonvenční zdroje RTG záření



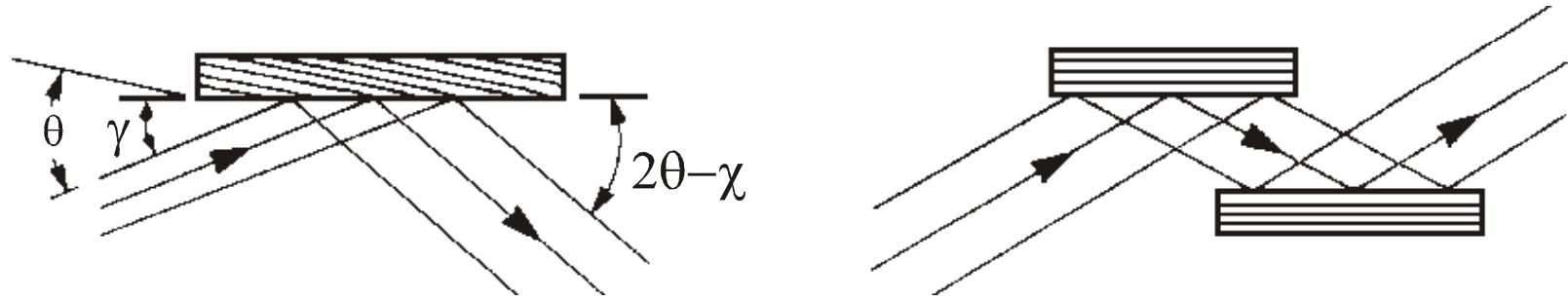
např. Diamond Light Source (UK, 2007)  
7/22/40pracovišť, obvod 560 m,  
plocha 5 fotbal. hřišť, cena 400 mil GBP



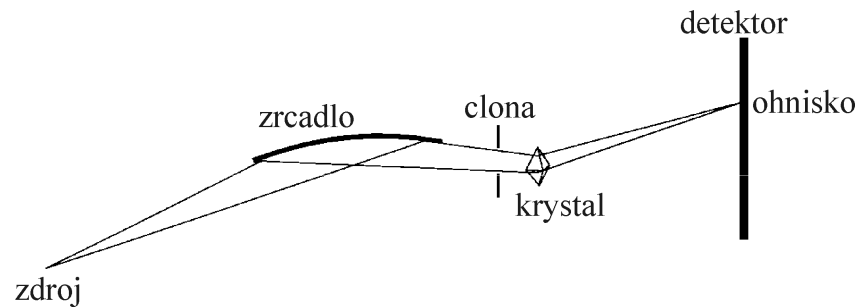
[www.diamond.ac.uk/Home/About/Facts.html](http://www.diamond.ac.uk/Home/About/Facts.html)

# Difrakční experiment : úpravy fyzikálních parametrů záření

Krystalový monochromátor – monochromatizace difrakcí



„rovinná“ vlna – clony + „zrcadla“



# Difrakční experiment: detekce ionizujícího záření

Interakce záření s detektorem

chemická modifikace

ionizace

- konverze vlnové délky

- generace páru elektron-“díra“ v polovodičích

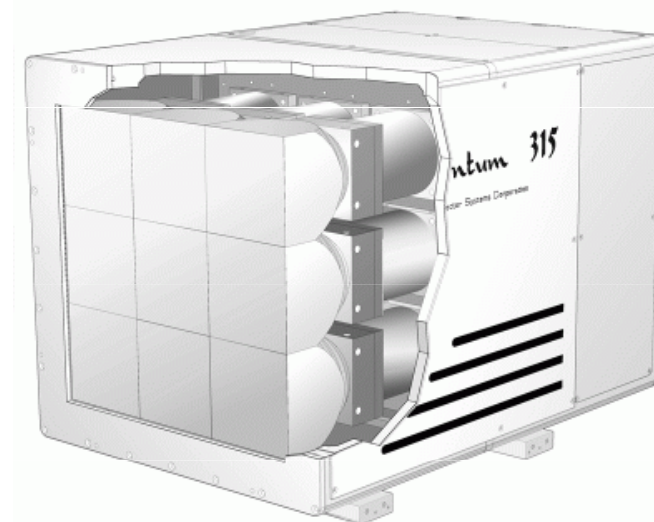
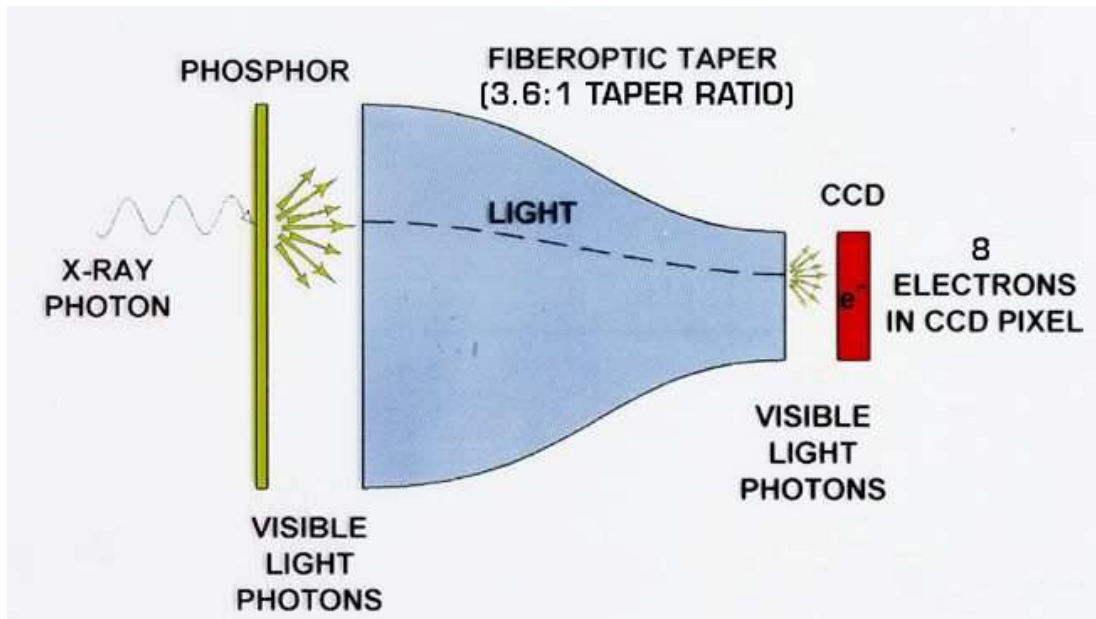
- Detektory jednobuněčné x detektory plošné

Rentgenový film

Scintilátor [ $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}(\text{Tb})$ ] + CCD detektor

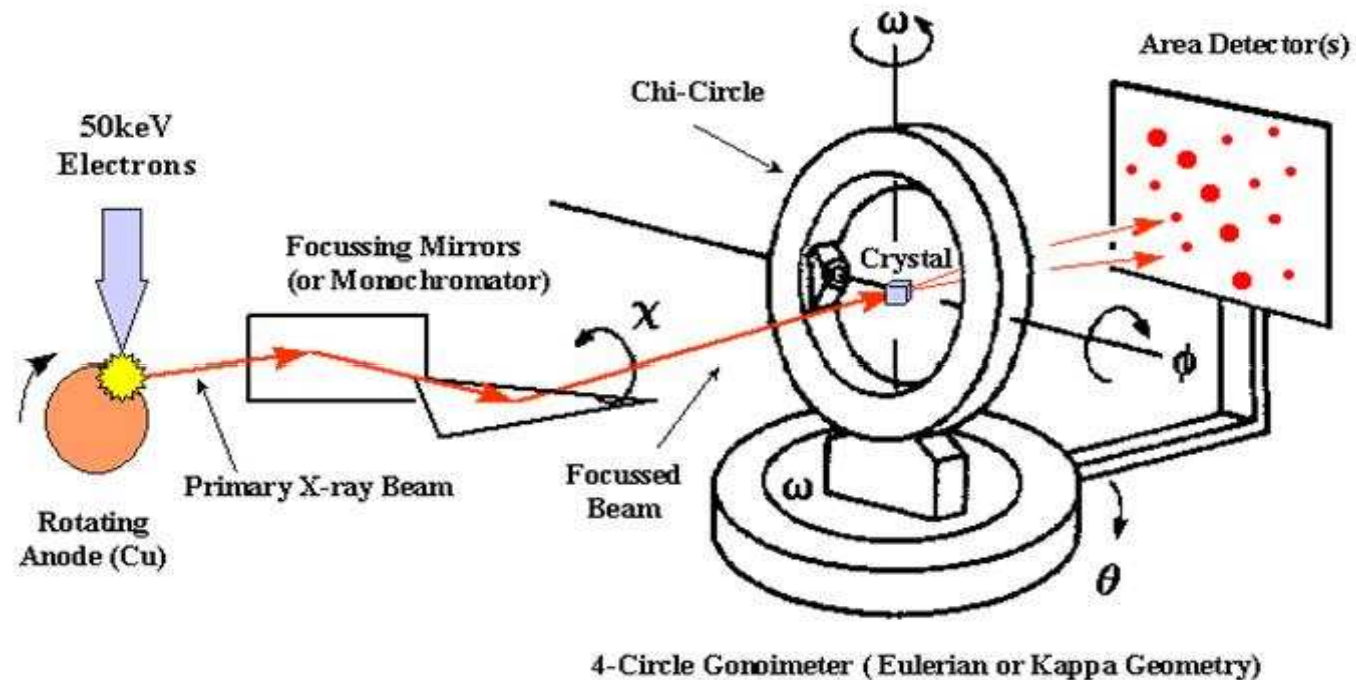
Polovodičové detektory

# Difrakční experiment: CCD detektor



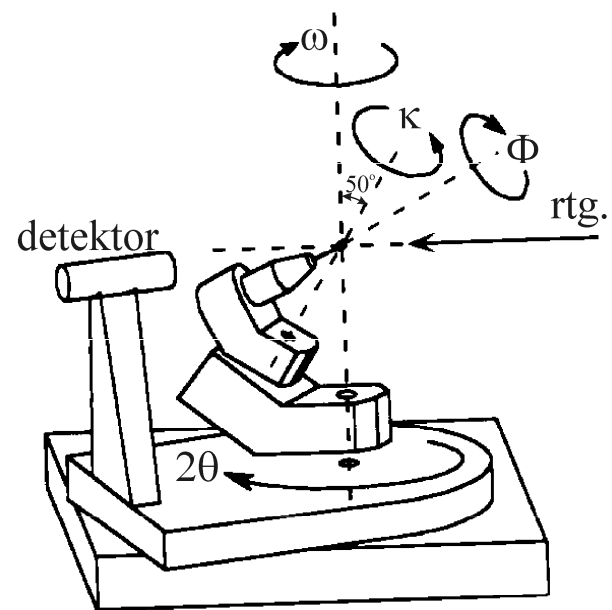
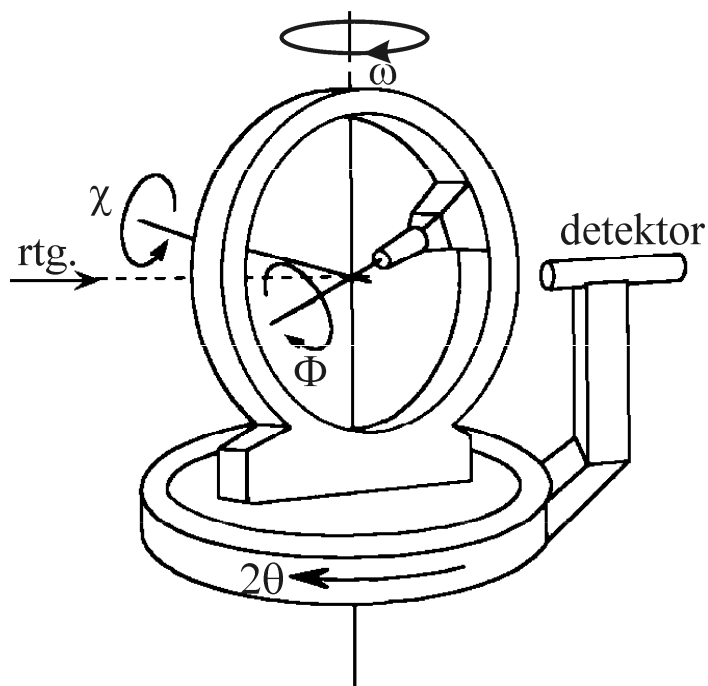
# Difrakční experiment: automatický difraktometr-schéma

Principle of an X rays diffraction  
experiment





# Difrakční experiment: difraktometr-geometrie



# Difrakční experiment: automatický difraktometr



# Monokrystalová krystalografie: základní postupy

- (0). Příprava studovaného materiálu
  - 1. Krystalizace
  - 2. Difrakční experiment
  - 3. Fázový problém, příprava modelu
  - 4. Zpřesňování 3-D modelu

# Krystalografie - postupy: krystalizace monokrystalů

časově nejnáročnější část určování 3-D struktur (je  
nutná dlouhodobá strukturní STABILITA vzorku!)

potřeba MĚŘITELNÝCH monokrystalů

organické a anorganická vzorky vs proteiny

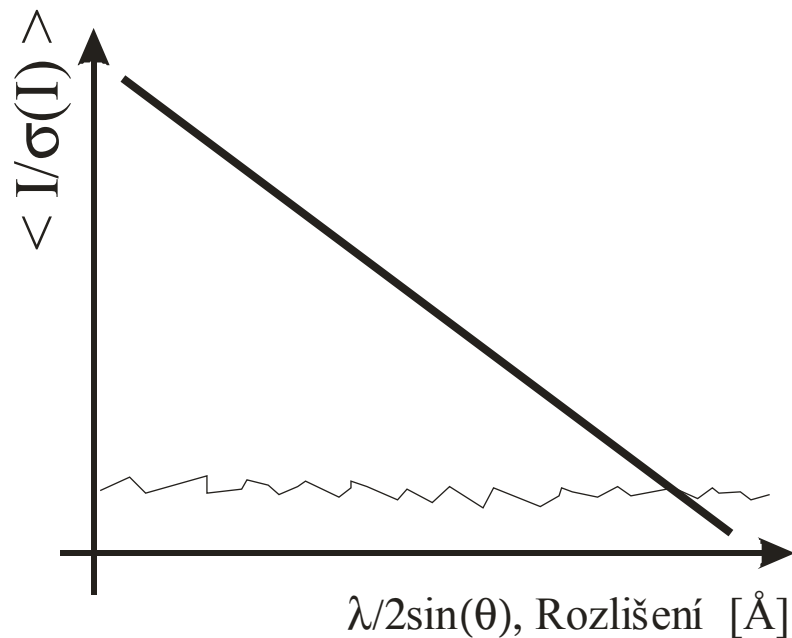
multidimenzionální (multikomponentní) problém

proteomika: empirie, automatizace/robotizace

# Krystalografie - postupy: difrakční experiment

rychlé vs přesné měření => intenzivní zdroj RTG

limitované ROZLIŠENÍ difrakčního experimentu =>  
geometrické limity na počet naměřených dat

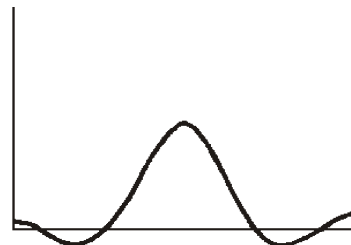
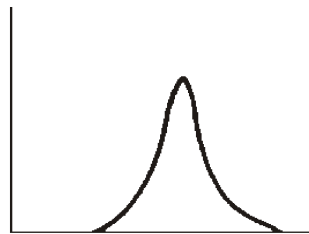


$$d_{Res} = \lambda / 2 \sin \theta$$

# Krystalografie - experiment: rozlišení + omezené množství dat

Rozlišení [ Å ]	Počet nezáv. reflexí	Poměr počtů	
		reflexí a {x,y,z}	proměnných {x,y,z,B}
40.0-2.5	6800	1.6	1.2
40.0-1.5	29800	6.8	5.1
40.0-1.0	81300	18.5	13.8

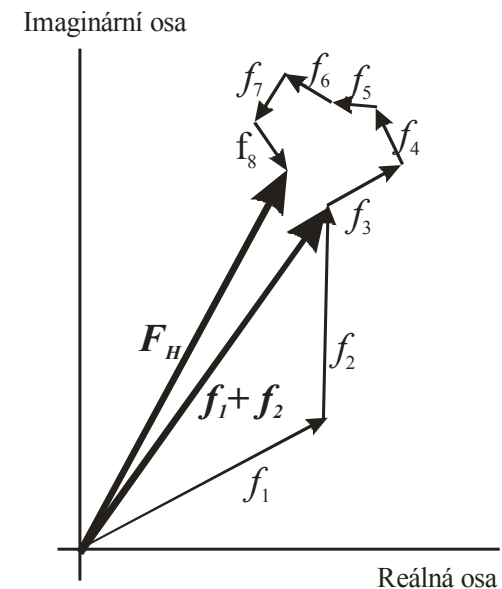
$$\rho(\vec{r}) = \int_{V^*} F(\vec{r}^*) \exp(-2\pi i \vec{r}^* \cdot \vec{r}) d\vec{r}^* = \frac{1}{V} \sum_{h,k,l=-\infty}^{+\infty} F_{hkl} \exp[-2\pi i(hx + ky + lz)]$$



# Fázový problém – anorg. struktura

$$\begin{aligned} F_H &= \sum_{j=1}^N f_j \exp(2\pi i \vec{r}_H^* \cdot \vec{r}_j) = \sum_{j=1}^N f_j \exp(2\pi i (hx_j + ky_j + lz_j)) = \\ &= \sum_{j=1}^N f_j \exp(2\pi i \mathbf{H} \cdot \vec{r}_j) = A_H + iB_H = |F_H| \exp(i\varphi_H) \end{aligned}$$

metoda těžkého atomu



# Fázový problém – organika

„přímé“ metody - Karle & Hauptman (NC 1985) -  
„žádná“ předběžná informace  
pravděpodobnostní metody  
numerický „multisolution“ přístup  
kritérium – správné/chybné řešení

délka (automatizovaného) řešení – do jednotek minut

„malé“ (do 1000 atomů=organické) molekuly  
experimentální data do „atomárního“ rozlišení



# Fázový problém – makromolekuly

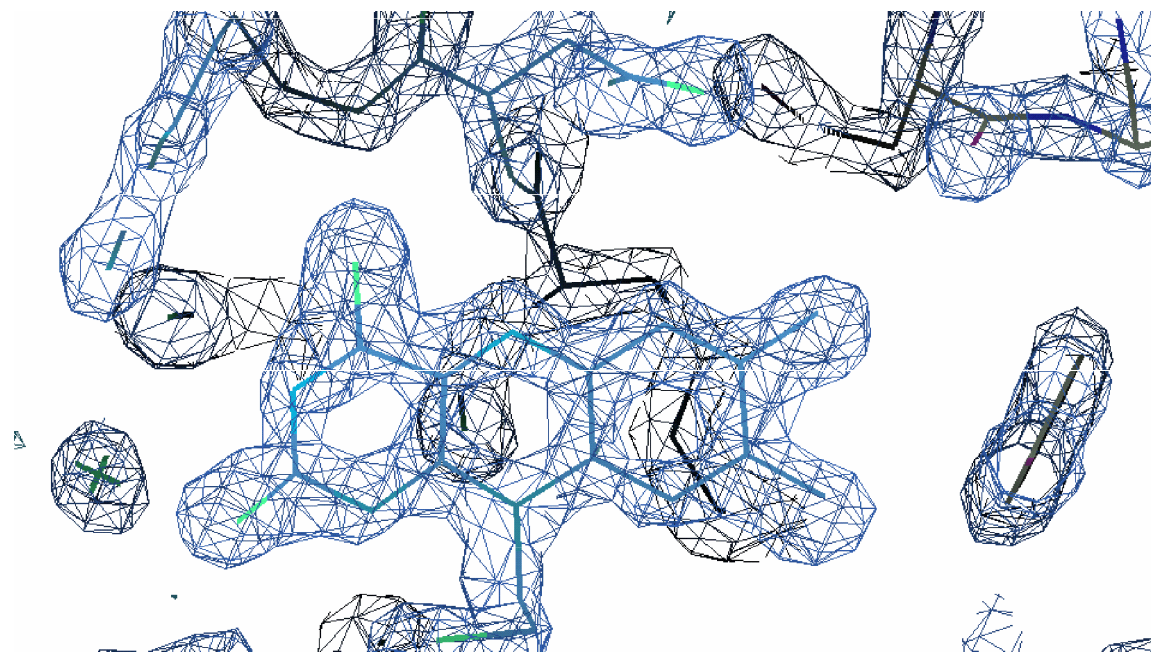
„velké“ systémy (tisíce atomů)  
limitované experimentální rozlišení

využití podobnosti (MR, molecular replacement)

Se-Met proteiny (max. několik desítek metioninů,  
resp. Se atomů) + „přímé“ metody

# Krystalografie - postupy: stavba a zpřesňování 3-D modelu

spojitá elektronová hustota vs 3-D atomární model



automatické/“ruční“ doplňování a rušení atomů

# Krystalografie – postupy při zpřesňování modelu

cíl: shoda experimentu (difrakčních dat) s 3-D modelem

experimentální data – intenzity difrakcí

nelineární závislost

$$F_H^c = \sum_{m=1}^M f_m \exp(2\pi i \mathbf{H} \mathbf{r}_m)$$

minimalizace - metoda nejmenších čtverců

různé difrakční experimenty – různé množství dat

kritérium shodnosti: R-faktor

typické hodnoty R-faktorů

$$R = \frac{\sum_H \left| |F_H^o| - K |F_H^c| \right|}{\sum_H |F_H^o|}$$

# Monokrystalová krystalografie: výstupy

monokrystal – velikost  $\sim 10^{-4}$  m,  $V \sim 10^{-10}$ - $10^{-12}$  m<sup>3</sup>

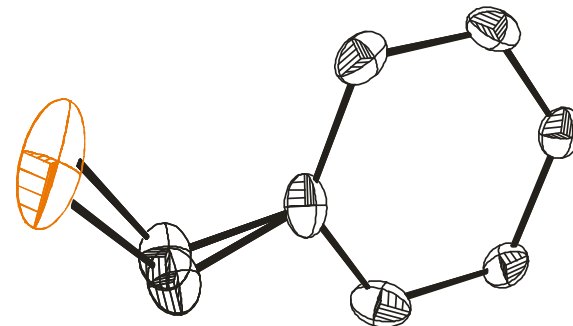
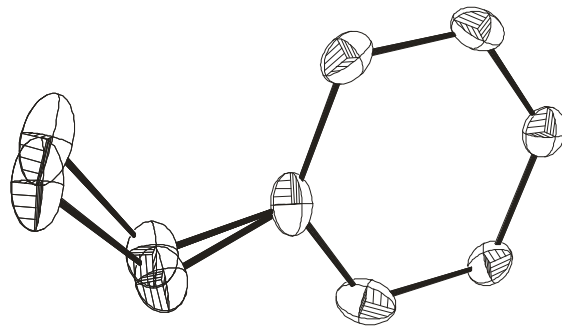
krystalová mřížka - mřížkové parametry  $\sim 10^{-8}$  -  $10^{-9}$ m

-  $V \sim 10^{-24}$ - $10^{-27}$  m<sup>3</sup>

- typicky 2-8 „molekul“

strukturní model – „průměrná“, rovnovážná struktura  
(ze vzorku  $10^{12}$ - $10^{18}$ )

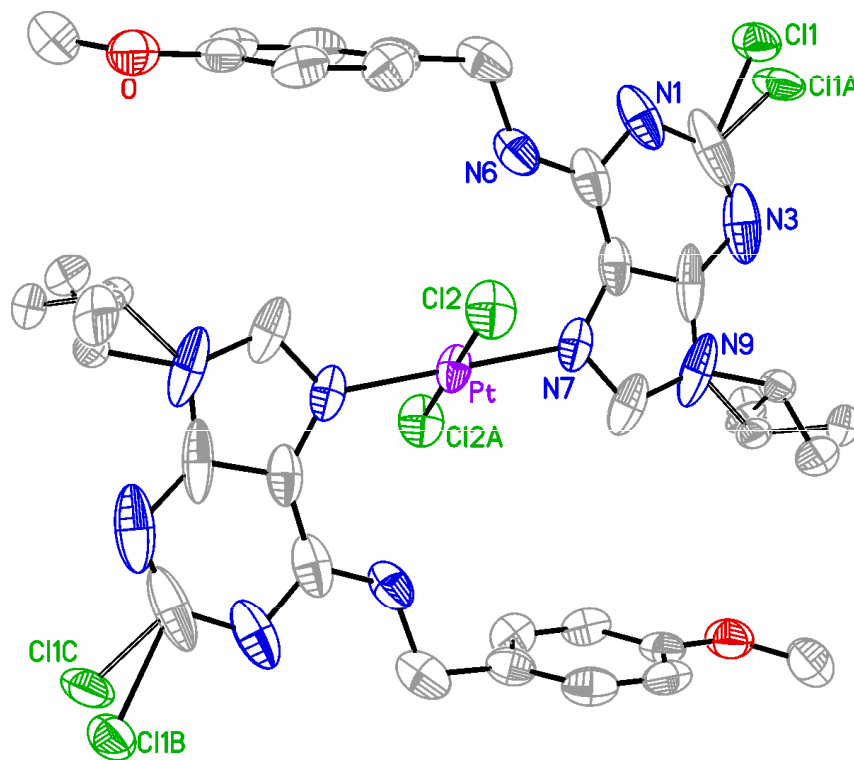
teplotní pohyb atp => pravděpodobnost + teplotní elipsoidy



# Monokrystalová krystalografie: kvalita/přesnost řešení

ORTEP obrázek + pravděpodobnost při jeho generování  
finální R-faktory  
chyby (e.s.d's) souřadnic/vazebných parametrů  
rozlišení difrakčního experimentu (limitní  $\theta$  úhel)

# Krystalografie – příklady výstupů: struktura komplexní sloučeniny



$a=8.1507(4)$  Å

$b=15.6503(7)$  Å

$c=14.1585(6)$  Å

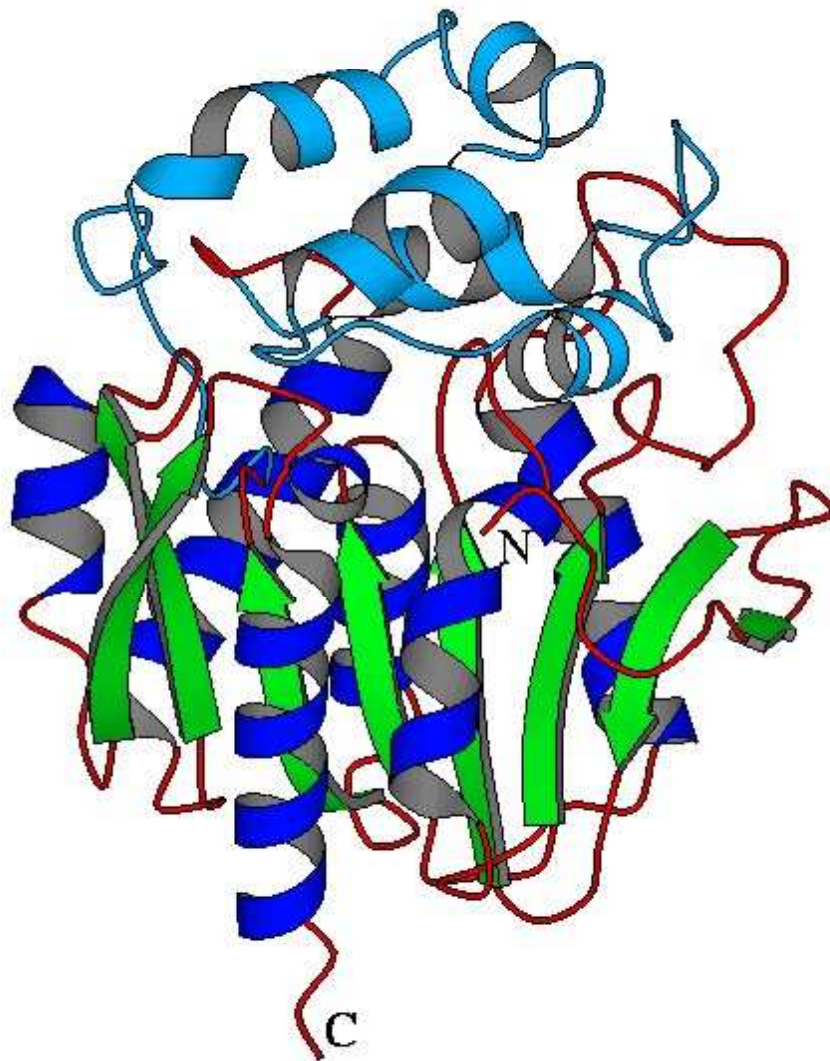
$\beta=101.086(4)^\circ$

3126 pozorování

266 parametrů

$R=2.51\%$

# Krystalografie – příklady výstupů: makromolekulární struktura



$a=50.26 \text{ \AA}$

$b=71.67 \text{ \AA}$

$c=72.70 \text{ \AA}$

rozlišení  $1.58 \text{ \AA}$

34 513 pozorování

2301+449 atomů

$R=14.5\%$

$R_{\text{free}}=20.4\%$

Marek, Vévodová, Kutá Smatanová, Nagata, Svensson, Newman, Takagi & Damborský: *Biochemistry* **39** (2000),14082-6

# Monokrystalová strukturní krystalografie:další čtení



Marek, J., Trávníček, Z.: Monokrystalová rentgenová strukturní  
analýza. Olomouc : Vydavatelství Univerzity Palackého (2002).  
169 s. ISBN 80-244-0551-2