

539 [1.125.5+199]

НЕЙТРОНОГРАФИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ СТРУКТУРЫ  
БИОЛОГИЧЕСКИХ МАКРОМОЛЕКУЛ

Ю. М. Останеевич, И. Н. Сердюк

## СОДЕРЖАНИЕ

1. Введение . . . . .	85
2. Краткие сведения о взаимодействии тепловых нейтронов с ядрами . . . . .	87
3. Упорядоченность и структурные исследования . . . . .	88
4. Малоугловое диффузное рассеяние нейтронов . . . . .	89
а) Однородные частицы (90). б) Неоднородные частицы. Общий подход (91).	
в) Рассеяние в области самых малых углов, радиус инерции, приближение Гипсе (92). г) Рассеяние вперед. Определение молекулярной массы и «сухого» объема частицы (93). д) Вариация контраста с помощью $H_2O - D_2O$ -смесей (96). е) Исследования четвертичной структуры (99). ж) Обратная задача рассеяния (101). з) Экспериментальные исследования (102). 1) Определение точек компенсации, молекулярных масс и объемов (102). 2) Определение радиусов инерции (103). 3) Изучение крупномасштабных неоднородностей в частице (105). 4) Анализ формы и построение однородных моделей (106).	
5) Определение расстояний между меченными частями молекулы (106).	
5. Нейtronография белковых монокристаллов и других периодических систем . . . . .	107
а) Задачи нейтронных исследований (109). б) Исследования высокого разрешения (109). в) Фазовая проблема (111). г) Исследования низкого разрешения (112).	
6. Исследования динамики макромолекул . . . . .	112
7. Итоги и перспективы . . . . .	113
Цитированная литература . . . . .	114

## 1. ВВЕДЕНИЕ

В 1982 г. исполняется 50 лет со времени открытия нейтрона. Среди множества хорошо известных фундаментальных и прикладных следствий этого открытия одним из первых было возникновение структурной нейтронографии — одного из методов изучения пространственной структуры конденсированного состояния вещества на атомном уровне. Хотя данная статья посвящена обзору новостей последнего десятилетия в довольно узкой области — структурной нейтронографии биологических макромолекул, мы полагаем уместным привести краткий перечень событий, в какой-то мере характеризующих развитие структурной нейтронографии в целом.

1920 г. Э. Резерфорд высказывает гипотезу о существовании нейтрона.

1932 г. Дж. Чэдвик доказывает, что необычайно сильно проникающее излучение, обнаруженное двумя годами раньше В. Боте и Г. Беккером в ядерных реакциях в бериллии, состоит из частиц с массой 1 и зарядом 0, т. е. нейтронов.

1934 г. Э. Ферми, Э. Амальди, Б. Понтекорво, Ф. Розетти, Э. Сегре обнаруживают явление замедления нейтронов и получают тепловые нейтроны.

1936 г. В. М. Эльзассер проводит теоретическое рассмотрение дифракции нейтронов в поликристаллах. Х. Халбан и П. Прейсверк получают экспериментальное доказательство дифракции нейтронов в поликристаллическом железе, Д. П. Митчелл и П. Н. Пауэрс — на монокристаллах  $MgO$ .

1947 г. Э. Ферми, Л. Маршалл используют брэгговские отражения различных порядков и полное отражение нейтронов от зеркал для определения величины и знака когерентной амплитуды рассеяния 22 химических элементов.

1948 г. Дж. Е. Бэкон и Р. Д. Лауд решают задачу об учете вторичной экстинкции в крупных монокристаллах.

1951 г. К. Г. Шалл, Е. О. Воллан — таблица когерентных амплитуд рассеяния для 60 ядер.

1952 г. С. В. Петерсон, Х. А. Леви — полное нейтронографическое исследование структуры монокристалла  $KHF_2$ .

1964 г. Дж. М. Браун, Х. А. Леви — полное нейтронографическое исследование структуры сахарозы  $C_{12}H_{22}O_{11}$ .

1967 г. Д. К. Ходжкинс, Ф. М. Мур, Б. Т. М. Уиллис выполняют нейтронографическое исследование монокристалла витамина  $B_{12}$  ( $C_{63}H_{87}O_{15}N_{13}PCo \cdot 16H_2O$ ). Установлены координаты 205 атомов, в том числе 98 атомов водорода.

1969 г. И. Шелтен, А. Майер, В. Шматц, Ф. Хосфельд проводят исследования малоуглового рассеяния нейтронов в растворах биологических макромолекул. Б. П. Шёнборн предпринимает нейтронографические исследования монокристалла миоглобина.

1972 г. В таблице когерентных амплитуд рассеяния содержатся значения для 157 ядер.

1981 г. Число исследованных макромолекулярных систем в растворах — порядка 100, ведутся исследования по крайней мере пяти монокристаллов из биологических макромолекул. Изучается четвертичная структура рибосом.

Из этого заведомо неполного перечисления очевидно, что наступление «биологического периода» является вполне закономерным этапом в эволюции структурной нейтронографии.

Нейтронографические методы исследования свойств вещества описываются на свойства нейтрона как элементарной частицы, из которых наиболее важными являются отсутствие электрического заряда, наличие массы покоя, достаточно сильное взаимодействие с атомными ядрами и слабое с диамагнитными электронами. Совокупность этих свойств делает нейтроны сильно проникающим видом излучения, волновые свойства которого могут быть выбраны адекватными размерами изучаемых объектов (обычно в диапазоне 1—10 Å), а кинематические свойства (скорость, кинетическая энергия) удобны для исследования процессов относительного движения атомов и молекул в веществе. Существует глубокая аналогия между нейтронной оптикой и оптикой света и рентгеновских лучей<sup>1</sup>, ярко проявляющаяся в дифракционных методах исследования структуры вещества.

Вместе с тем рассеяние нейтронов обладает своей спецификой, делающей в большом числе случаев применение нейтронов более предпочтительным или единственным пригодным для исследования методом. Именно эта специфика определила значительные успехи структурной нейтронографии при исследовании биологических объектов.

## 2. КРАТКИЕ СВЕДЕНИЯ О ВЗАИМОДЕЙСТВИИ ТЕПЛОВЫХ НЕЙТРОНОВ С ЯДРАМИ

Нейтроны, подобно другим элементарным частицам, обладают волновыми свойствами. Для структурных исследований биологических объектов на молекулярном уровне наиболее подходят так называемые тепловые нейтроны, т. е. нейтроны, имеющие кинетическую энергию, сравнимую с кинетической энергией газа при комнатной температуре. Длина волны таких нейtronов, как это следует из уравнения де Броиля, около 1,5 Å. Максимальный поток нейtronов в реакторах, где в качестве замедлителя используется легкая или тяжелая вода при комнатной температуре, находится именно на эту область длин волн. Этот диапазон длин волн оптимален для определения координат атомов, поскольку расстояния между атомами имеют тот же порядок величины. Холодный замедлитель (жидкий дейтерий при температуре около 20 K) сдвигает максимум потока нейtronов в сторону больших длин волн (4—6 Å). Такие длины волн оптимальны для большинства малоугловых нейтронных спектрометров, предназначенных для изучения биологических объектов в растворе с помощью диффузного рассеяния.

Нейтроны рассеиваются на ядрах атомов. (Описанию деталей этого процесса посвящена специальная литература<sup>2</sup>, поэтому мы ограничиваемся минимальными сведениями.) Размеры ядер имеют порядок величины  $10^{-12}$  см, что на четыре порядка меньше длины волны тепловых нейtronов. Вследствие этого амплитуда рассеянной нейтронной волны является изотропной, действительной и практически не зависит от энергии нейтрона для всех основных атомов, входящих в состав биополимеров. Однако знак и величина амплитуды рассеяния нерегулярным образом зависят от заряда и массового числа ядра, а также от взаимной ориентации спинов нейтрона и ядра. Для удобства описания свойств простых ансамблей атомов (например, чистых элементов или их изотопов) для каждого из них вводятся две характеристики: когерентная и некогерентная амплитуды рассеяния, определяемые следующими соотношениями:

$$b_{coh} = \langle b_i \rangle, \quad (2.1)$$

$$b_{inc}^2 = \langle b_i^2 \rangle - \langle b_i \rangle^2, \quad (2.2)$$

где  $\langle \dots \rangle$  означает усреднение по всем значениям «чистых» амплитуд рассеяния с весами, отражающими изотопный состав и статистический вес спиновых состояний. Смысл такого разделения усредненных величин становится ясным, если рассмотреть выражения интенсивности когерентного и некогерентного рассеяния единичного потока нейtronов некоторым достаточно малым ( $V \ll \lambda^3$ ) ансамблем из атомов:

$$I_{coh} = 4\pi N^2 b_{coh}^2, \quad (2.3)$$

$$I_{inc} = 4\pi N b_{inc}^2. \quad (2.4)$$

Первое из них пропорционально квадрату числа частиц в ансамбле, что свидетельствует об интерференции волн, рассеянных всеми частицами. Когерентная составляющая интенсивности — структурно-чувствительна. Второе выражение, пропорциональное  $N$ , таким свойством не обладает и в структурных экспериментах отражает уровень изотропного фона, связанного с нетождественностью рассеивающих центров. В случае рентгеновских лучей нет нужды вводить по отдельности когерентную и некогерентную составляющие, поэтому для описания обычно используется так называемый атомный формфактор  $f$ , формально совпадающий с  $b_{coh}$  для нейtronов.

Таблица I  
Основные характеристики рассеяния тепловых нейтронов  
и рентгеновских лучей некоторыми атомами

Атом	Нейтроны				Рентгеновские лучи $f(\theta = 0)$
	$b_{coh}$	$\sigma_{coh}$	$\sigma_s$	$\sigma_a$	
$^1H$	-0,374	1,8	81,6	0,19	0,28
$^2H$ (D)	+0,667	5,6	7,6	0,0005	0,28
$^{12}C$	+0,665	5,55	5,6	0,003	1,69
$^{14}N$	+0,940	11,1	11,1	1,1	1,97
$^{16}O$	+0,580	4,2	4,2	0,0001	2,25
$^{31}P$	+0,51	3,3	3,6	0,09	4,23
$^{35}S$	+0,285	1,0	1,2	0,28	4,50
U	+0,85	9,1	9,2	7,68	25,90

$b_{coh}$  и  $f$  даны в единицах  $10^{-14}$  м (Фм). Сечение когерентного рассеяния ( $\sigma_{coh}$ ),  
полное сечение рассеяния (когерентное + некогерентное) ( $\sigma_s$ ) и сечение поглощения  
( $\sigma_a$ ) даны в единицах  $10^{-28}$  м<sup>2</sup> (бн). Значения  $b_{coh}$  — из <sup>3</sup>.

В табл. I приведены основные параметры нейтронного и рентгеновского рассеяния для атомов, представляющих наибольший интерес. Здесь же приведены данные для «тяжелого» атома-урана. В дальнейшем вместо  $b_{coh}$  мы употребляем  $b$ .

Несколько важных выводов следует из данных табл. I.

Амплитуда рассеяния нейтронов нерегулярно зависит от атомного номера. Амплитуды рассеяния для атомов С, N, O такой же величины, как и у тяжелых металлов. Этим нейтронное рассеяние существенно отличается от рассеяния рентгеновских лучей, в котором амплитуда рассеяния прямо пропорциональна атомному номеру. Например, рентгеновская амплитуда рассеяния урана в 15 раз больше, чем углерода, и в 12 раз больше, чем азота. Заметим, что амплитуда рассеяния рентгеновских лучей сильно зависит от угла рассеяния, так как размеры электронного облака близки к длине волны рентгеновского излучения (1,5 Å). В табл. I амплитуды рентгеновского рассеяния  $f$  приводятся для нулевого угла рассеяния.

Нейтронные амплитуды рассеяния для атомов водорода и дейтерия различаются по величине и по знаку. Таким образом, водородный атом на нейтронных картах плотности амплитуды рассеяния будет иметь отрицательную плотность, тогда как все остальные атомы из табл. I будут иметь положительную плотность. Изотопное замещение H — D позволяет «управлять» амплитудой рассеяния.

Некогерентное сечение рассеяния мало по сравнению с когерентным сечением для всех атомов, за исключением атома водорода. Следовательно, дейтерированные водородсодержащие материалы будут существенно уменьшать фоновое рассеяние.

### 3. УПОРЯДОЧЕННОСТЬ И СТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Амплитуда упруго и когерентно рассеянной волны в интересующих нас случаях может быть записана в виде фурье-преобразования <sup>4</sup>

$$A(\mathbf{x}) = \int_V \rho(\mathbf{r}) \exp(i\mathbf{kr}) dV, \quad (3.1)$$

где  $\rho(\mathbf{r})$  — пространственное распределение плотности когерентной амплитуды рассеяния, интегрирование распространяется на весь объем исследуемого образца  $V$ , а фурье-преобразование создает «изображение» исследуемой системы в  $\mathbf{x}$ -пространстве, где

$$\mathbf{x} = \mathbf{k} - \mathbf{k}_0 \text{ — вектор рассеяния,} \quad (3.2)$$

$$x = 4\pi \sin(\theta/2)/\lambda, \quad (3.3)$$

где  $\lambda$  — длина волны де Броиля,  $\theta$  — угол рассеяния. Экспериментально наблюдаемая величина  $I$  — интенсивность рассеяния нейтронов — пропорциональна

$$I(\mathbf{x}) = |A(\mathbf{x})|^2 = \left| \int_V \rho(\mathbf{r}) e^{i\mathbf{x}\cdot\mathbf{r}} dV \right|^2. \quad (3.4)$$

Задача структурных исследований — по измеренной зависимости  $I(\mathbf{x})$  восстановить пространственное распределение плотности  $\rho(\mathbf{r})$  в исследуемом объекте. Степень разрешимости этой задачи зависит от большого числа факторов, среди которых первостепенную роль играет периодичность исследуемой структуры. Наиболее полного решения удается достигнуть, если исследуемый объект — монокристалл с высокой степенью совершенства, состоящий из идентичных макромолекул. При этом оказывается возможным восстановить  $\rho(\mathbf{r})$  с пространственным разрешением порядка размеров отдельных атомов. По мере разупорядочения исследуемых систем достижимое пространственное разрешение резко ухудшается. В случае разбавленных растворов макромолекул оно оказывается порядка размеров самих молекул, и суждения об их структуре возможны лишь в специальных случаях. Оба крайних случая достаточно детально изучены в методическом отношении и широко применяются в структурных исследованиях. Разумеется, при их оценке необходимо помнить, что конечная цель структурных исследований — решение биологических проблем на том уровне структурной организации, который представляется адекватным поставленным задачам. Большое число структурных уровней в молекулярной биологии создает широкие возможности для методов как высокого, так и низкого разрешения.

#### 4. МАЛОУГЛОВОЕ ДИФФУЗНОЕ РАССЕЯНИЕ НЕЙТРОНОВ

Малоугловое диффузное рассеяние является представителем методов структурного анализа низкого пространственного разрешения<sup>5</sup>. Интегрирование в формулах (3.1) и (3.4) ограничивается объемом одной макромолекулы, что соответствует бесконечно разбавленным системам. Мы коротко остановимся на основных подходах, применяемых в настоящее время в малоугловом рассеянии нейтронов, поскольку в отечественной литературе обзоров или монографий, посвященных этой теме, пока нет.

Выражение (3.4) для одной макромолекулы в растворе (дифференциальное сечение рассеяния) можно получить, проводя усреднение (3.4) по ориентациям. Для изотропных растворов усреднение приводит к результату:

$$\left\langle \frac{d\sigma}{d\Omega} \right\rangle = \int_V \int_V \rho(\mathbf{r}) \rho(\mathbf{r}') \frac{\sin x |\mathbf{r}-\mathbf{r}'|}{x |\mathbf{r}-\mathbf{r}'|} dV dV', \quad (4.1)$$

носящему название формулы Дебая.

Интенсивность рассеянных нейтронов является четной функцией длины вектора рассеяния  $x$ , что естественно для изотропного рассеивателя.

Если макромолекула имеет характерный размер  $L$ , из выражения (4.1) сразу следуют некоторые основные свойства закона рассеяния. При  $\kappa L \ll 1$  множитель  $\sin x/x = 1$ , рассеянная интенсивность  $\sim \rho^2 V^2$  и не зависит ни от внутренней структуры, ни от формы макромолекулы. При  $\kappa L \approx 1$  интенсивность в основном зависит от размеров и формы макромолекулы. При  $\kappa L \gg 1$  в принципе возникает чувствительность к деталям внутренней структуры макромолекулы, но осциллирующий характер подынтегральной функции приводит к быстрому затуханию интенсивности с ростом  $\kappa$  (в общем случае  $\sim 1/(\kappa L)^4$ ). Основная часть рассеянной интенсивности приходится на область  $\kappa L \leq 1$ , что при типичных размерах макромолекулы 50 Å и длине волны нейтрона 5 Å соответствует  $\sin(\theta/2) \leq \leq \lambda/4\pi L = 8 \cdot 10^{-3}$  или углам  $\leq 1^\circ$ . Последнее обстоятельство поясняет происхождение термина «малоугловое рассеяние».

Предыдущие рассуждения не учитывали свойства растворителя. Если рассматривать растворитель как однородную изотропную среду, его можно характеризовать постоянной плотностью рассеяния

$$\rho_s = \frac{1}{V} \sum_{i \in V} b_i, \quad (4.2)$$

где  $V$  — некоторый, достаточно большой, объем (например, 1 см<sup>3</sup>), а сумма когерентных амплитуд берется по всем атомам, входящим в этот объем. Все предыдущие рассуждения остаются в силе, если вместо  $\rho(r)$  использовать разность плотностей рассеяния  $\rho(r) - \rho_s$ .

### а) Однородные частицы

Важным приближением для многих задач является приближение однородной частицы  $\rho(r) = \text{const} = \bar{\rho}$ . Выражение для дифференциального сечения рассеяния одной частицей (формула (4.1)) при этом преобразуется к виду

$$\left\langle \frac{d\sigma}{d\Omega} \right\rangle = (\bar{\rho} - \rho_s)^2 \left\langle \left| \int_V e^{i\kappa r} dV \right|^2 \right\rangle = (\bar{\rho} - \rho_s)^2 V^2 F^2(\kappa). \quad (4.3)$$

Функция  $F^2(\kappa)$  зависит только от формы и размеров рассматриваемой частицы; в некоторых случаях она может быть вычислена аналитически<sup>5</sup>. Например, для сферы радиуса  $R$

$$F^2(\kappa) = \left( \frac{3 \sin \kappa R - \kappa R \cos \kappa R}{\kappa^3 R^3} \right)^2. \quad (4.4)$$

Для эллипсоида вращения с полуосами  $a, a, Pa$

$$F^2(\kappa) = \int_0^{\pi/2} \Phi^2(\kappa a \sqrt{\cos^2 \theta + P^2 \sin^2 \theta}) \cos \theta d\theta, \quad (4.5)$$

где  $\Phi$  — интеграл ошибок. Для бесконечно тонкого диска радиуса  $R$

$$F^2(\kappa) = \frac{2}{\kappa^3 R^3} \left[ 1 - \frac{1}{\kappa R} J_1(2\kappa R) \right]. \quad (4.6)$$

Для бесконечно тонкого стержня длиной  $2H$

$$F^2(\kappa) = \frac{\text{Si}(2\kappa H)}{\kappa H} - \frac{\sin^2(\kappa H)}{\kappa^3 H^3}. \quad (4.7)$$

Для гибкой цепной молекулы со среднеквадратичным расстоянием между концами  $\bar{h}^2$ <sup>6</sup>

$$F^2(x) = 2(e^{-x} + x - 1)x^{-2}, \quad (4.8)$$

где  $x = \kappa^2 \bar{h}^2/6$ .

Из формул (4.2)–(4.8) видно, что аргументом функций всегда является безразмерная величина  $\kappa L$ , где  $L$  — некоторый размер частицы. Отсюда следует, что при изменении этого размера в  $\alpha$  раз (масштабное преобразование) закон рассеяния может быть получен простым изменением масштаба  $\kappa$ . Другими словами, подобные тела имеют подобные индикатрисы рассеяния, или  $F^2(x, \alpha L) = F^2(\alpha x, L)$ . Это обстоятельство делает довольно привлекательными численные расчеты  $F^2(x)$  для тел определенной формы, представляемые в виде функций безразмерного аргумента. Если простым преобразованием аргумента можно добиться согласия экспериментальной кривой рассеяния с расчетной, возникает желание делать заключения как о размерах, так и о форме макромолекулы. Такой подход, носящий название метода стандартных кривых, разработан Кратки с сотрудниками<sup>7</sup>. Однако этот метод следует применять весьма осмотрительно, так как в основе подхода лежит предположение об однородности изучаемого объекта и, что самое неприятное, кривые рассеяния могут случайно совпадать для тел совершенно разной структуры. Так, например, кривая рассеяния гауссова клубка в области 1,5 порядков спада интенсивности практически неотличима от кривой для однородного вытянутого эллипсоида вращения с отношением осей 5 : 1. Практически полезные методы вычисления  $F^2(x)$  для тел сложной формы были развиты Фейгином с сотрудниками<sup>8</sup>.

Возвращаясь к формуле (4.2), легко видеть, что для однородной частицы интенсивность рассеяния для всех  $\kappa$  обращается в нуль, если  $\bar{\rho} = \rho_s$ . Эта ситуация для нейтронов легко реализуема путем выбора подходящего изотопного состава растворителя (воды). Для света и рентгеновских лучей условие  $\bar{\rho} = \rho_s$  в некоторых случаях удается осуществить путем выбора химического состава растворителя, что сопряжено с существенно большим риском изменения структуры изучаемой макромолекулы. Изменение индикатрисы рассеяния путем вариации  $\rho_s$  получило название метода вариации контраста. Структурные аспекты, изучаемые этим методом, рассматриваются в следующих разделах.

### б) Неоднородные частицы. Общий подход

Ряд важных для молекулярной биологии вопросов связан с исследованием *неоднородных частиц*. «Неоднородности» должны быть достаточно крупными — надатомных размеров, а физическая природа неоднородностей может быть любой (химический состав, изотопический состав и т. д.), лишь бы отличались нейтронно-оптические характеристики. Наиболее общий подход к этой задаче связан с работами Штурманна и Кирсте<sup>9</sup>, которые предложили  $\rho(\mathbf{r})$  представить в виде двух составляющих

$$\rho(\mathbf{r}) = \bar{\rho} + \rho_F(\mathbf{r}), \quad (4.9)$$

где  $\rho_F(\mathbf{r})$  — флуктуирующая часть плотности, определяемая из условия

$$\int_V \rho_F(\mathbf{r}) dV = 0, \quad (4.10)$$

а

$$\bar{\rho} = \frac{1}{V} \int_V \rho(\mathbf{r}) dV \quad (4.11)$$

— среднее значение плотности. С учетом такого представления сечение рассеяния приобретает вид суммы трех членов:

$$\begin{aligned} \left\langle \frac{d\sigma}{d\Omega} \right\rangle &= \left\langle \left| (\bar{\rho} - \rho_s) \int_V e^{ixr} dV + \int_V \rho_F(r) e^{ixr} dV \right|^2 \right\rangle = \\ &= (\bar{\rho} - \rho_s)^2 F_V^2(x) + (\bar{\rho} - \rho_s) F_{VF}(x) + F_F^2(x); \quad (4.12) \end{aligned}$$

здесь  $F_V^2$  зависит только от формы и объема рассматриваемой частицы («однородная» частица),  $F_F^2$  — только от флуктуаций рассеивающей плотности вокруг среднего  $\bar{\rho}$ , а средний член  $F_{VF}$  имеет смешанный характер. Важна возможность разделения компонент  $F_V^2$  и  $F_F^2$ . Очевидно,  $F_F^2(x)$  можно измерить в точке компенсации ( $\bar{\rho} - \rho_s = 0$ ); для измерения  $F_V^2(x)$  применяют экстраполяцию к «бесконечному контрасту» ( $1/(\bar{\rho} - \rho_s) = 0$ ), и, наконец, квадратичную форму (4.12) можно анализировать как функцию  $\bar{\rho} - \rho_s$ , отыскивая для каждого  $x$  все три неизвестные  $F$ .

Изложенный здесь подход выглядит очень привлекательным, но широкого применения в полном объеме пока не нашел. При осуществлении он сталкивается с двумя серьезными трудностями. Первая из них связана с тем, что при дейтерировании растворителя (воды) часть протонов в изучаемой частице (макромолекуле) также замещается deutонами. В результате  $\rho(r)$  становится функцией большого числа новых переменных, описывающих вероятность обмена и пространственное распределение обмениваемых протонов. В частности, картину флуктуаций плотности можно исследовать только в точке компенсации, но при этом мы увидим несколько иные флуктуации, чем вдали от этой точки.  $F_V^2$  в этом отношении менее чувствительна к Н — Д обмену благодаря тому, что экстраполяция к бесконечному контрасту производится от точек с достаточно большим контрастом (первый член в (4.12) преобладает). Вторая трудность связана с тем, что по измеренным  $F_V^2$  и  $F_F^2$  трудно сделать сколь-нибудь детальное заключение о  $\rho(r)$  (см. раздел ж)).

в) Рассеяние в области самых малых углов, радиус инерции, приближение Гинье

В 1939 г. Гинье сделал важный шаг по пути превращения формулы (4.1) в рабочий инструмент <sup>5</sup>. Воспользовавшись разложением  $\sin x/x = 1 - x^2/3! + x^4/5! - \dots$  и удержав в нем первые два члена, формулу (4.1) можно упростить дальше:

$$\begin{aligned} \left\langle \frac{d\sigma}{d\Omega} \right\rangle &= \left( \int_V \rho(r) dV \right)^2 \left( 1 - \frac{1}{3} x^2 \int_V \rho(r) r^2 dV / \int_V \rho(r) dV + \dots \right) = \\ &= \left( \int_V \rho(r) dV \right)^2 (1 - x^2 R_g^2/3 + \dots), \quad (4.13) \end{aligned}$$

где  $R_g^2$  совпадает с определением квадрата радиуса инерции тела с плотностью, равной плотности рассеяния. Гинье предположил, что хорошей аппроксимацией выражения в последней скобке (4.13) является функция

$$F^2(x) = \exp(-x^2 R_g^2/3), \quad (4.14)$$

параметр  $R_g$  в которой по-прежнему является радиусом инерции (аппроксимация Гинье). Последнее выражение является основой для определения «наблюдаемого» радиуса инерции из экспериментальных данных

путем построения так называемого Гинье-графика  $\ln I(\kappa^2)$  и определения наклона прямолинейного участка:

$$R_g^2 = -\frac{1}{3} d \ln I(\kappa^2) / d\kappa^2. \quad (4.15)$$

Для однородных тел простой формы  $R_g^2$  легко вычислить:

$$R_{g_0}^2 = 3R_0^2/5 — шар с радиусом  $R_0$ , \quad (4.16)$$

$$R_{g_0}^2 = (a^2 + b^2 + c^2)/5 — трехосный эллипсоид с полуосами  $a, b, c$ , \quad (4.17)$$

$$R_{g_0}^2 = L^2/12 — бесконечно тонкий стержень длины  $L$ , \quad (4.18)$$

$$R_{g_0}^2 = \bar{h}^2/6 — гауссов клубок со среднеквадратичным расстоянием между концами  $\bar{h}^2$ . \quad (4.19)$$

Аппроксимация Гинье является точной при  $\kappa^2 \rightarrow 0$  и обычно пригодна на практике в области  $\kappa^2 R_g^2 < 1$ . Отклонения  $I(\kappa)$  от аппроксимации Гинье за пределами области Гинье служат указанием на характер анизометрии (меры несферичности) частицы.

Для двухосного эллипсоида с отношением осей  $c/a = 1,86$  эти отклонения незначительны вплоть до  $\kappa^2 R^2 = 5$ ; для эллипсоидов с меньшей анизометрией и сферы  $I(\kappa) \leq I(0) \exp(-\kappa^2 R_g^2/3)$ ; для  $c/a > 1,86$  справедливо обратное. Наравне с (4.14) существуют и другие аппроксимации. Например, при исследованиях биологических макромолекул в развернутом состоянии, моделью которых часто служит гауссов клубок, обычно используется аппроксимация Дебая

$$I^{-1}(\kappa) = I^{-1}(0) (1 + \kappa^2 R_g^2/3) \quad (4.20)$$

(см., например, <sup>6</sup>), имеющая тот же предельный смысл.

Помимо аппроксимаций, имеющих строгий предельный смысл, на практике используются построения, приводящие к так называемым радиусам инерции поперечных сечений. Соответствующие аппроксимации

$$\kappa I(\kappa) = \text{const} \cdot \exp(-\kappa^2 R_{q_1}^2/2) \quad (4.21)$$

и

$$\kappa^2 I(\kappa) = \text{const} \cdot \exp(-\kappa^2 R_{q_2}^2) \quad (4.22)$$

применяются для сильно вытянутых и сильно сплюснутых частиц соответственно <sup>7</sup>. Параметры  $R_{q_1}^2$  и  $R_{q_2}^2$ , имеют смысл квадрата радиуса инерции распределения плотности в двумерном сечении, перпендикулярном длинной оси вытянутой частицы, и второго момента распределения плотности по толщине для сплюснутой частицы. Эти параметры становятся асимптотически точными для бесконечно вытянутых (сплюснутых) частиц. Область применимости (4.21), (4.22) обычно определяется эмпирически.

### г) Рассеяние вперед. Определение молекулярной массы и «сухого» объема частицы

При длине вектора  $\kappa = 0$  сечение рассеяния (4.1) для одной частицы приобретает особо простой вид:

$$\left\langle \frac{d\sigma}{d\Omega} \right\rangle = (\bar{\rho} - \rho_s)^2 V^2. \quad (4.23)$$

Интенсивность рассеяния от достаточно разбавленного раствора, содержащего  $N$  частиц (пренебрегаем межчастичной интерференцией), имеет вид

$$I(x) = I_0 N \left\langle \frac{d\sigma}{d\Omega} \right\rangle T \Delta\Omega, \quad (4.24)$$

где  $I_0$  — число нейтронов, падающих на исследуемый раствор в единицу времени,  $T$  — множитель, учитывающий ослабление пучка нейтронов при прохождении сквозь раствор и эффективность регистрации нейтронов,  $\Delta\Omega$  — телесный угол с образца на детектор нейтронов.

Величина  $I(0)$  не может быть измерена непосредственно и из эксперимента всегда получается путем экстраполяции к  $x = 0$ , например, с помощью аппроксимации Гинье. После учета аппаратурных факторов величина

$$i(0) = N (\bar{\rho} - \rho_s)^2 V^2 \quad (4.25)$$

может быть использована для определения молекулярной массы (молекулярного веса)  $M$  исследуемых частиц. Метод основан на использовании независимо определенных парциального удельного объема  $\bar{v}$ ,

$$\bar{v} = \frac{VN_A}{M}, \quad (4.26)$$

где  $N_A$  — число Авогадро, и средней плотности амплитуды рассеяния  $\bar{\rho}$  в растворе. Если выразить  $N$  через весовую концентрацию растворенных частиц  $c$  (мг/мл), то (4.25) можно записать в виде

$$i(0) = Mc (\bar{\rho} - \rho_s)^2 \bar{v}^2 V_s N_A^{-1}, \quad (4.27)$$

где  $V_s$  — объем раствора. Это выражение служит для определения  $M$ .

Для рентгеновских лучей в этой задаче вместо объемной плотности  $\bar{\rho}$  используется плотность амплитуды рассеяния единицы массы  $\sum_i f_i/M = 0,15 \cdot 10^{-12}$  см/Дальтон, которая достаточно мало флуктуирует уже на уровне аминокислотных остатков. В случае нейтронов такое представление плотности особых преимуществ не дает, так как амплитуда рассеяния не зависит регулярным образом от  $M$ .

Новым аспектом в случае нейтронов является возможность расширить этот подход на многокомпонентные частицы<sup>10</sup>. Для таких частиц вместо (4.27) имеем

$$i(0) = c \left( \sum_j (\bar{\rho}_j - \rho_s) \bar{v}_j M_j \right)^2 V_s N_A^{-1} / \sum_j M_j, \quad (4.28)$$

где  $M_j$ ,  $\rho$ , и  $\bar{v}_j$  — соответствующие величины для каждого компонента. При этом из измерений при одном значении  $\rho_s$  можно определить  $M = \sum_j M_j$  — молекулярный вес частицы, если независимо (например, из химического анализа) известны отношения  $M_j/M$ . Независимое определение всех  $M_j$  возможно, если измерить зависимость  $i(0)$  от  $\rho_s$ , например, в точках компенсации всех компонентов и решить соответствующую систему уравнений. К двухкомпонентным системам этот подход успешно применялся (см. П.1 раздела 3)). Определенным осложнением при этом является зависимость  $\rho$ , от  $\rho_s$ , возникающая из-за Н — D-обмена. Учет этого фактора возможен лишь с определенной точностью и будет обсуждаться в следующем разделе.

Другой подход к (4.23) возникает, если известен химический состав одной частицы и ее молекулярный вес. Определив из экспериментальной зависимости  $I(0)$  от  $\rho_s$  точку  $\rho_{sc}$ , в которой  $I(0) = 0$ , мы имеем соотно-

шение  $\bar{\rho} = \rho_{sc}$ , из которого можно определить так называемый «сухой» объем частицы:

$$V = \sum_j h_j b_j \cdot \rho_{sc}^{-1}, \quad (4.29)$$

где  $h_j$  — число атомов  $j$ -го элемента в частице,  $b_j$  — соответствующая амплитуда рассеяния. При подсчете этой суммы также необходимо учитывать  $H - D$ -обмен. Определяемый нейtronографически сухой объем белков оказывается очень близким к сумме объемов аминокислотных остатков.

Таблица II

Амплитуды рассеяния аминокислотных остатков и нуклеотидов, вычисленные из их химического состава  $^{74}$ . Величины в  $D_2O$  соответствуют случаю, когда все обмениваемые атомы водорода в молекуле обменивались с растворителем на дейтерий.  $M$  — молекулярная масса остатка (нуклеотида),  $V$  — его парциальный объем

## а) Аминокислотные остатки

Аминокислота	$M$	Химический состав	Число обмениваемых водородов	$\sum h_k b_k (H_2O)$ , $10^{-12} \text{ см}$	$\sum h_k b_k (D_2O)$ , $10^{-12} \text{ см}$	$V, \text{ \AA}^3$
Глицин	57	$C_2NOH_3$	1	1,73	2,77	66,4
Аланин	71	$C_3NOH_5$	1	1,64	2,69	91,5
Валин	99	$C_5NOH_9$	1	1,48	2,52	141,7
Лейцин	113	$C_6NOH_{11}$	1	1,40	2,44	167,9
Изолейцин	113	$C_6NOH_{11}$	1	1,40	2,44	168,8
Фенилаланин	147	$C_9NOH_9$	1	4,14	5,18	203,4
Тирозин	163	$C_9NO_2H_9$	2	4,72	6,80	203,6
Триптофан	186	$C_{11}N_2OH_{10}$	2	6,03	8,12	237,6
Аспарагиновая кислота	114	$C_4NO_3H_4$	1	3,84	4,89	113,6
Глутаминовая кислота	128	$C_5NO_3H_6$	1	3,76	4,80	140,6
Серин	87	$C_3NO_2H_5$	2	2,22	4,31	99,1
Тreonин	101	$C_4NO_2H_7$	2	2,14	4,22	122,1
Аспарагин	114	$C_4N_2O_2H_6$	3	3,46	6,58	135,2
Глутамин	128	$C_5N_2O_2H_8$	3	3,73	6,50	161,1
Лизин	129	$C_6N_2OH_{13}$	4	1,59	5,75	176,2
Аргинин	157	$C_6N_4OH_{13}$	6	3,47	9,71	180,8
Гистидин	136,5	$C_6N_3OH_{6,5}$	1,5	4,96	6,52	167,3
Метионин	131	$C_5NOSH_9$	1	1,76	2,80	170,8
Цистеин	109	$C_3NOSH_6$	2	1,93	4,01	105,6
Пролин	97	$C_5NOH_7$	0	2,23	2,23	129,3

## б) Нуклеотиды

Основание	$M$	Химический состав	Число обмениваемых водородов	$\sum h_k b_k (H_2O)$ , $10^{-12} \text{ см}$	$\sum h_k b_k (D_2O)$ , $10^{-12} \text{ см}$
Аденин РНК	328	$PN_5C_{10}O_6H_{11}$	3	11,23	14,35
Аденин ДНК	312	$PN_5C_{10}O_6H_{11}$	2	10,65	12,73
Гуанин РНК	344	$PN_5C_{10}O_7H_{11}$	4	11,81	15,98
Гуанин ДНК	328	$PN_5C_{10}O_6H_{11}$	3	11,23	14,35
Цитозин РНК	304	$PN_3C_9O_7H_{11}$	3	9,26	12,39
Цитозин ДНК	288	$PN_3C_9O_6H_{11}$	2	8,68	10,77
Урацил РНК	305	$PN_2C_9O_8H_{10}$	2	9,28	11,36
Тимин ДНК	303	$PN_2C_{10}O_7H_{12}$	1	8,61	9,65

ков, большинство которых определено Замятиным <sup>11</sup>. В табл. II в удобной форме содержатся сведения, необходимые для вычисления суммы в (4.29) по известному аминокислотному или нуклеотидному составу.

### д) Вариация контраста с помощью $H_2O - D_2O$ -смесей

Величины  $\rho$  для простых и составных макромолекул в  $H_2O$ , рассчитанные по формуле (4.11), приведены в табл. III. Расчет по формуле (4.2) показывает, что плотность амплитуды рассеяния легкой воды ( $-0,56 \cdot 10^{10} \text{ см}^{-2}$ ) по знаку и по величине сильно отличается от таковой для тяжелой воды ( $+6,39 \cdot 10^{10} \text{ см}^{-2}$ ). Плотность амплитуды рассеяния всех биологических объектов имеет промежуточное значение. Поэтому, помещая частицу в разные смеси  $H_2O - D_2O$  легко добиться условий компенсации, т. е. такого состава растворителя, в котором плотности рассеяния частицы и растворителя одинаковы.

Дейтерообмен в частице осложняет ситуацию. Плотность амплитуды рассеяния  $\rho$  будет зависеть от доли  $D_2O$  в смеси  $H_2O - D_2O$ . Точная доля доступных растворителю обмениваемых водородов, вообще говоря, неизвестна. Допуская, что растворителю доступны все водороды в  $-NH_2$ ,  $-NH-$  и  $-OH$ -группах, что составляет, например, для рибонуклеиновых кислот и белков соответственно 23,8 и 21,4% от общего числа водородов в молекулах, можно рассчитать плотности амплитуд рассеяния РНК и белка в  $D_2O$ . Эти величины равны  $4,47$  и  $3,08 \cdot 10^{10} \text{ см}^{-2}$  соответственно. Принимая, что доля доступных растворителю обмениваемых водородов пропорциональна объемной доле ( $Y$ )  $D_2O$  в смеси  $H_2O - D_2O$ , получаем для разных биологических молекул следующие зависимости  $\rho$  от  $Y$  (в единицах  $10^{10} \text{ см}^{-2}$ ):

$$\begin{aligned} \text{рибосомная РНК: } \rho_{\text{РНК}} &= +3,57 + 0,90 Y, \\ \text{рибосомные белки: } \rho_{\text{белок}} &= 1,73 + 1,35 Y, \\ \text{ДНК: } \rho_{\text{ДНК}} &= 3,40 + 0,70 Y, \\ H_2O - D_2O: \quad \rho_s &= -0,56 + 6,96 Y. \end{aligned} \quad (4.30)$$

Рассчитанные из этих выражений точки компенсации приведены в табл. III.

Сравнение «вакуумных» плотностей и плотностей в точке компенсации с учетом дейтерообмена показывает, что последний сильно сказывается на картине рассеяния. Предположение о полном обмене водорода в полярных группах дает верхнюю оценку величины эффектов обмена, которая являлась до последнего времени общепринятой. Однако в ряде работ уже появились сообщения о меньшей степени обмена (80% для белков <sup>16</sup>). Другим фактором, усложняющим оценку  $\rho$ , могут стать эффекты, связанные с наличием слоя гидратной воды и конденсированных на макромолекулах малых ионов <sup>12</sup>. Эти соображения следует иметь в виду при использовании соотношений (4.30).

Радиус инерции частицы  $R_g$  также оказывается зависящим от контраста, если радиальное распределение плотности рассеяния неоднородно, или неоднородным оказывается  $H - D$ -обмен. Для двухкомпонентной частицы, состоящей из однородных компонентов, эта зависимость может быть описана следующим образом <sup>13</sup>:

$$R_g^2 = x_1 R_1^2 + (1 - x_1) R_2^2 + x_1 (1 - x_1) L^2, \quad (4.31)$$

где  $R_1$ ,  $R_2$  — радиусы инерции первого и второго компонентов,  $L$  — расстояние между их центрами тяжести,  $x_1$  — относительный вклад первого

Таблица III  
Некоторые нейтронографические характеристики  
биологических макромолекул

Макромолекулы	Экспериментальные значения			Расчетные значения	
	$\bar{\rho}_c$ (10 <sup>-12</sup> ) в точке компенсации	Точка ком- пенсации, объем, % D <sub>2</sub> O	Парциальный удельный объем, см <sup>3</sup> /г	$\bar{\rho}$ (10 <sup>-12</sup> ) в H <sub>2</sub> O	$\bar{\rho}_c$ (10 <sup>-12</sup> ) в точке компенсации
а) Белки					
1. Гемоглобин	+2,24	40 <sup>25</sup>	0,74 <sub>4</sub>	1,88	2,39 *)
2. Лизоцим	+2,55	45 <sup>33</sup>	0,70 <sub>8</sub>	1,99	2,55
3. Миоглобин	+2,24	40 <sup>15</sup>	0,75 <sub>1</sub>	1,87	2,32 *)
4. Фибриноген	+2,40	43 <sup>34</sup>	0,72		
5. Апоферритин	+2,35	42 <sup>61</sup>	0,73 <sub>9</sub>	1,95	2,46
6. Рибосомный белок S4 <i>E. coli</i>	+2,35	42 <sup>26</sup>	0,73 <sub>9</sub>	1,79	2,35
7. Цитохром С редуктаза	+2,25	40 <sup>66</sup>	0,74		
8. EF-Tu фактор <i>E. coli</i>	+2,35	42 <sup>70</sup>	0,73	1,83	2,36
9. EF-Tu фактор <i>B. stearother- mophilus</i>	+2,35	42 <sup>70</sup>	0,72 <sub>5</sub>		
10. Протромбин	+2,35	42 <sup>71</sup>	0,73	1,95	2,47
б) Липиды и их комплексы с белками					
11. Фосфолипид		37 <sup>72</sup>	0,98		-0,3
12. Липопротеид низкой плот- ности	+0,48	15 <sup>72</sup>	0,90		
в) РНК и ее комплексы с белками					
13. Фрагмент рибосомной 16S РНК	+4,32	70 <sup>26</sup>	0,54	3,80	4,32
14. Комплекс фрагмента ри- босомной 16S РНК с белком S4	+3,96	65 <sup>26</sup>		+3,30	+3,90
15. 30S субчасти- ца рибосом	+3,32	56 <sup>63</sup>	0,60	+2,82	+3,32
16. То же	+3,47	58 <sup>65</sup>	0,60	+3,00	+3,47
17. »	+3,42	57 <sup>30</sup>	0,60	+2,81	+3,32
18. 50S субчасти- ца рибосом	+3,52	5 <sup>62</sup>	0,59	+3,00	+3,50
19. То же	+3,50	58 <sup>64</sup>	0,59	+3,00	+3,50
20. »	+3,55	59 <sup>30</sup>	0,59	+3,00	+3,50
21. 70S рибосома	+3,54	59 <sup>65</sup>	0,59	+3,00	+3,50
22. Вирус гриппа	+1,63	31,5 <sup>68</sup>	0,73		
23. Та-t компо- нент $\alpha$ - $\alpha$ -ви- руса мозаики	+2,64	40 <sup>67</sup>	0,74		
24. Аденовирус типа 2	+2,57	45 <sup>69</sup>	0,76		
г) ДНК и ее комплексы с белками					
25. ДНК		64,5 ** <sup>73</sup>	0,51	+3,40 <sup>73</sup>	+3,94
26. Хроматин ти- муса теленка	+2,85	49 <sup>31</sup>	0,61		
27. Хроматин эри- троцитов ку- риных эмбри- онов	+2,85	49 <sup>31</sup>	0,62		

\*) Без учета группы гема.

\*\*) Расчетное значение.

компонента в суммарную амплитуду рассеяния

$$x_1 = \frac{(\bar{\rho}_1 - \rho_s) V_1}{(\bar{\rho}_1 - \rho_s) V_1 + (\bar{\rho}_2 - \rho_s) V_2}; \quad (4.32)$$

здесь  $V_1$  и  $V_2$  — «сухие» объемы первого и второго компонента, которые предполагаются известными независимо,  $\rho_i$  — средние плотности амплитуды рассеяния компонентов.

Взаимное пространственное расположение компонентов, имеющих разную плотность рассеивающих амплитуд, можно установить из построения зависимости квадрата радиуса инерции  $R_g^2$  от доли рассеяния одного из компонентов. Как это следует из уравнения (4.31), при равномерном распределении компонентов в двухкомпонентной частице (однородная частица,  $R_1 = R_2$ ,  $L = 0$ )  $R_g^2$  не зависит от  $x_1$ . Неоднородное, но симметричное распределение компонентов ( $R_1 \neq R_2$ ,  $L = 0$ ) создает линейную зависимость  $R_g^2(x_1)$  с отличным от нуля наклоном. И, наконец, неоднородное и асимметричное распределение компонентов ( $R_1 \neq R_2$  или  $R_1 = R_2$  и  $L \neq 0$ ) будет проявляться в параболической зависимости  $R_g^2$  от  $x_1$ .

Второй способ интерпретации зависимости радиуса инерции от контраста был предложен Штурманном<sup>14</sup> и использует представление

$$R_g^2 = R_\infty^2 + \frac{\alpha}{\bar{\rho}_c - \rho_s} - \frac{\beta^2}{(\bar{\rho}_c - \rho_s)^2}, \quad (4.33)$$

где  $\bar{\rho}_c$  — средняя плотность амплитуды рассеяния частицы (4.11) в точке компенсации,  $R_\infty^2$  — радиус инерции частиц при «бесконечном контрасте» ( $1/(\bar{\rho}_c - \rho_s) = 0$ ). Постоянные  $R_\infty^2$ ,  $\alpha$  и  $\beta$  не имеют простой геометрической интерпретации. Для двухкомпонентной частицы, которая может быть разделена на два объема  $V_1$  и  $V_2$  с плотностями  $\rho_1$  и  $\rho_2$ , постоянные  $R_\infty^2$ ,  $\alpha$  и  $\beta$  связаны с радиусами инерции каждого компонента  $R_1$  и  $R_2$  и с расстоянием между их центрами тяжести  $L$  следующими соотношениями:

$$R_\infty^2 = R_1^2 \frac{V_1}{V_1 + V_2} + R_2^2 \frac{V_2}{V_1 + V_2} + L^2 \frac{V_1 V_2}{(V_1 + V_2)^2}, \quad (4.33')$$

$$\alpha = (\rho_1 - \rho_2) \frac{V_1 V_2}{(V_1 + V_2)^2} \left( R_1^2 - R_2^2 + L^2 \frac{V_1 - V_2}{V_1 + V_2} \right), \quad (4.34)$$

$$\beta^2 = L^2 \left[ \frac{(\bar{\rho}_1 - \bar{\rho}_2) V_1 V_2}{(V_1 + V_2)^2} \right]^2.$$

Частные случаи выражений (4.34) встречаются в работе<sup>16</sup>. Достоинством (4.33) является его применимость к неоднородным однокомпонентным частицам. В этом случае по знаку  $\alpha$  можно судить о характере радиального распределения плотности рассеяния: положительным  $\alpha$  соответствует частица с «рыхлой» сердцевиной, и наоборот. Параметр  $\beta$  отличается от нуля, если центр тяжести распределения  $\rho_F(r)$  (см. (4.10)) сдвинут относительно центра тяжести частицы.

Оба рассмотренных подхода развиты в приближении однородного дейтерирования, в котором не рассматриваются неоднородности, возникающие при вариации контраста. Развит математический аппарат и для более общего случая<sup>16</sup>, однако практического применения он пока не нашел.

Помимо методов вариации контраста, связанных с изменением свойств растворителя, существует другая возможность использования разных видов излучений (света, рентгеновских лучей и нейтронов) для изучения одной и той же двухкомпонентной частицы. Эта возможность рассматривалась в<sup>13</sup> для синтетических блоксополимеров, для основных классов

двуихкомпонентных биологических частиц и применялась для рибосомных частиц.

Из всех упомянутых методов наиболее широко используется вариация контраста для нейтронов с применением  $H_2O - D_2O$ -смесей.

### е) Исследования четвертичной структуры

В молекулярной биологии термином «четвертичная структура» обозначают взаимное расположение составных частей (белков, РНК) в сложных макромолекулах и их комплексах. Примером такой сложной системы является малая субчастица рибосомы, состоящая из одной макромолекулы РНК и 21 разных молекул белков. В этом же приближении можно рассматривать и более простые системы, например фермент-субстратные комплексы или отдельные белки, имеющие четвертичную структуру, например гемоглобин. В этом разделе термином «частица» мы будем пользоваться для обозначения составных частей систем, имеющих четвертичную структуру.

Рассмотрим двухкомпонентное тело, состоящее из двух идентичных однородных частиц, разделенных вектором  $L$ . Амплитуда рассеяния от них может быть представлена в виде

$$A = \rho \left( \int_1 e^{i\kappa r} dV + \int_2 e^{i\kappa(r+L)} dV \right) = \rho (1 + e^{i\kappa L}) \int e^{i\kappa r} dV.$$

Интенсивность

$$I = \rho^2 \cdot 2 (1 + \cos \kappa L) \left| \int_V e^{i\kappa r} dV \right|^2.$$

Усреднение по ориентациям в явном виде можно выполнить только для сферических частиц, после чего интенсивность содержит осциллирующий интерференционный множитель

$$\langle I \rangle = 2V^2 \rho^2 F^2(\kappa) (1 + \sin \kappa L / \kappa L). \quad (4.35)$$

По наблюдаемому периоду осцилляций можно определить расстояние между центрами сфер<sup>17</sup>.

Этот подход получил широкую известность для рибосом благодаря возможности замены отдельных частиц, например двух белков на их копии в полностью дейтерированной форме. Для этого биологическая культура выращивается параллельно в  $H_2O$ - и  $D_2O$ -средах. В  $D_2O$ -среде практически все атомы водорода в рибосоме замещаются на дейтерий. Располагая двумя субчастицами (1, 2) в полностью протонированной (p) и дейтерированной (d) формах можно провести разборку, замену отдельных белков, сборку и получить четыре типа рибосомных субчастиц. Первый содержит обе частицы в (p)-форме, другой — обе частицы в (d)-форме, а остальные два содержат по одной дейтерированной частице (1 или 2). Можно показать, что комбинация из четырех измерений

$$I_{int} = [I(1p, 2p) + I(1d, 2d)] - [I(1p, 2d) + I(1d, 2p)] \quad (4.36)$$

содержит только интерференционный член, зависящий от расстояния между центрами тяжести двух рассматриваемых частиц. Попытки использовать период наблюдавшихся осцилляций (см. (4.35)) для определения расстояний между белками рибосом выявили чувствительность  $I_{int}$  к реальной форме частиц (несферичности) и их взаимной ориентации<sup>18</sup>.

Значительно более совершенный подход был развит в<sup>19</sup>, используя свойства моментов функции распределения расстояний.

Рассматриваемая комбинация измеренных  $I(\kappa)$  сохраняет только интерференционный член

$$I_{1,2}(\kappa) = 2 \int_{V_1} \int_{V_2} \rho_1(r_1) \rho_2(r_2) \frac{\sin \kappa |L+r_2-r_1|}{\kappa |L+r_2-r_1|} dV_1 dV_2, \quad (4.37)$$

где 1 и 2 относятся к частицам 1 и 2,  $r_1$  и  $r_2$  — радиусы, начинающиеся в центрах тяжести частиц,  $L$  — вектор, соединяющий их центры тяжести, а плотности  $\rho_1$  и  $\rho_2$  здесь — разности плотностей рассеяния в H- и D-фор-мах:

$$\rho_i(r) = \rho_{iH}(r) - \rho_{iD}(r), \quad i = 1, 2. \quad (4.38)$$

Для дальнейшего предполагается, что разность (4.38) достаточно точно воспроизводит форму и распределение плотности рассеяния в одной частице, в частности с помощью  $\rho_i(r)$  может быть вычислен радиус инерции, имеющий обычный смысл. Функция распределения расстояний  $R$  между частицами 1 и 2 интегральным преобразованием связана с  $I(\kappa)$ <sup>5</sup>:

$$p(R) = R \int_0^\infty I(\kappa) \kappa \sin(\kappa R) d\kappa \quad (4.39)$$

— и может быть вычислена, если получено  $I(\kappa) \left( \int p(R) dR = 1 \right.$ , если  $\int \int \rho_1 \rho_2 dV_2 dV_1 = 1$ , что далее и предполагается). Второй момент  $p(R)$  связан с параметрами частиц

$$M_2 = \int_0^\infty p(R) R^2 dR = L^2 + R_{g1}^2 + R_{g2}^2. \quad (4.40)$$

Эта связь положена в основу подхода к восстановлению четвертичной структуры малой субчастицы рибосомы методом триангуляции.

Идея метода триангуляции состоит в следующем. Если в пространстве дано  $n \geq 3$  точек, их взаимное расположение может быть задано с помощью  $3n - 6$  координат. Отыскание этих координат возможно, если известны не менее чем  $4n - 10$  расстояний между точками. Наконец, между  $n$  точками существует  $n(n-1)/2$  расстояний. Неравенства

$$n(n-1)/2 \geq 4n - 10 \geq 3n - 6 \quad (4.41)$$

выполняются при  $n \geq 4$ . Таким образом, если система состоит из какого-то числа «точечных» составных частей, измерение расстояний между ними позволяет восстановить их взаимное пространственное расположение. Для определения расстояний можно использовать вторые моменты (4.40), если независимо известны радиусы инерции частиц, участвующих в интерференционном опыте.

Таким образом, в работе<sup>20</sup> было восстановлено взаимное расположение 9 (из 21) белков 30S субчастицы рибосомы.

При увеличении числа измеренных расстояний исходными данными для метода триангуляции могут быть только вторые моменты, а результатом — координаты и радиусы инерции белков в рибосоме *in situ*<sup>19</sup>. В этой связи следует заметить, что дополнительное исследование других моментов функции  $p(R)$ , по-видимому, может дать некоторую информацию о форме и взаимной ориентации белков *in situ*.

В качестве иллюстрации на рис. 1 приведены две модели 30S субчастицы. Верхняя построена по большой совокупности электронно-микроскопических, биохимических и нейтронографических исследований без применения триангуляции<sup>21</sup> (а); нижняя — только на основе данных, полученных методом триангуляции<sup>20</sup> (б).

В заключение необходимо остановиться на косвенных неопределенностях, связанных с использованием H — D-смесей. Помимо упоминавшегося выше неоднородного H — D-обмена в белке, есть опасность столкнуться с существенными перестройками структуры сложных частиц при их помещении в D<sub>2</sub>O. Хорошо известно, что для высших организмов D<sub>2</sub>O токсична. В ряде работ отмечались сильное снижение константы диссоциации белков на субъединицы (лактатдегидрогеназа<sup>22</sup>) и повышение точки плавления рибосомальной РНК<sup>23</sup>. Неоднократно отмечалось повышение склонности индивидуальных белков к образованию агрегатов в D<sub>2</sub>O. Вероятным механизмом этих изменений является повышение прочности водородной связи в дейтерированной среде. В связи с этим в опытах, использующих изотопное замещение, всегда необходимы контрольные исследования, доказывающие сохранение изучаемой структуры при изменении изотопного состава среды. Такой контроль легко осуществить путем сравнения рентгеновских данных для недейтерированных и дейтерированных систем, так как электронная плотность не зависит от изотопного замещения.

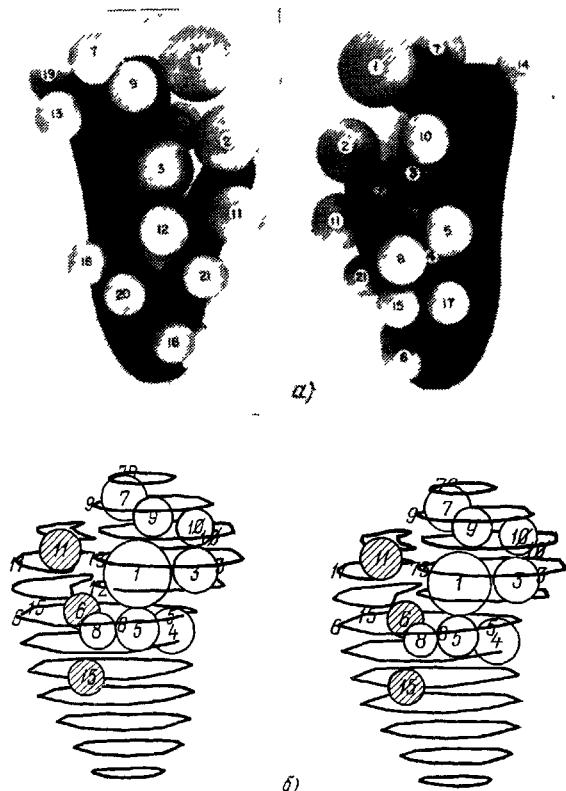


Рис. 1. Модели 30S субчастицы.

а) Расположение различных 21 белков (кружки) и РНК с двух сторон, согласно модели, по совокупности различных методов<sup>21</sup>, б) стереопара расположения в пространстве 11 белков по результатам триангуляции. (Взято из работы: Гамакгизян В. Р. et al. — J. Mol. Biol., 1981, v. 152 с любезного разрешения авторов и издательства «Академик пресс», Лондон.)

ж) **Обратная задача рассеяния**

Термином «обратная задача» мы обозначаем задачу восстановления плотности рассеяния  $\rho(r)$  по измеренной зависимости  $I(x)$ . Достаточно беглого взгляда на основные формулы (3.1) — (4.1) для того, чтобы неразрешимость этой задачи представилась очевидной. Помимо потери фазовой функции  $\exp(i\phi(x))$  (при переходе от (3.1) к (3.2)), существенная часть информации теряется из-за усреднения по ориентациям макромолекул в растворе (4.1). В связи с этим основное применение находят либо характеристики макромолеклы (радиус инерции, асимметрия), имеющие струк-

турный смысл при разрешении порядка размеров макромолекулы, либо функция распределения расстояний в однородной частице (4.39) или радиальное распределение плотности<sup>5</sup>

$$W(r) = \frac{1}{2\pi^2 r} \int_0^\infty x \sqrt{I(x)} \sin(xr) dx, \quad (4.42)$$

имеющее структурный смысл только для частиц со сферической симметрией.

Такое положение вещей привело к возникновению методов построения одной или нескольких моделей  $\rho(r)$  из множества возможных решений. В наиболее простой постановке эта задача решалась Кратки<sup>7</sup> с помощью эквивалентных гелей рассеяния. В этом методе из одного или нескольких однородных тел простой формы (эллипсоиды, цилиндры) конструируется модель, расчетная кривая рассеяния от которой удовлетворительно согласуется с экспериментальной. Кривые рассеяния практически всех биологических макромолекул могут быть описаны таким методом, что, конечно, не означает, что все макромолекулы — эллипсоиды.

Метод Кратки был развит Фейгиным с сотрудниками<sup>8</sup> и позволяет рассчитывать кривые рассеяния для тел произвольной формы. Этот шаг позволил включить в моделирование информацию, полученную как малоугловым рассеянием, так и электронной микроскопией и другими методами. Модели макромолекул, получаемые таким путем, хотя и не являются единственным решением обратной задачи, по крайней мере согласуются со всей совокупностью имеющейся экспериментальной информации.

В общем виде обратная задача была рассмотрена Харрисоном и Штурманном<sup>24</sup>. Используя математический аппарат сферических функций, этот подход также позволяет синтезировать множество моделей. Выбор между ними не может быть сделан из физических соображений, а соображения «простоты описания» по существу возвращают нас к эквивалентным эллипсоидам Кратки.

Наиболее строгим методом восстановления  $\rho(r)$  является метод триангуляции (см. (4.6)), который, однако, применяется пока только к рибосомным субчастицам.

Расширение круга объектов, изучаемых этим методом, представляется несколько проблематичным из-за необычайной сложности процедуры приготовления исследуемых препаратов. Общим ключом к решению структурной задачи является использование монокристаллов из биологических макромолекул.

### 3) Экспериментальные исследования

Экспериментальные методы и техника малоугловых исследований — тема для отдельной статьи, и мы их рассматривать здесь не будем. Цель данного раздела — дать иллюстрации к изложенным в — е) подходам.

1) Определение точек компенсации, молекулярных масс и объемов. Уже в ранних исследованиях белка в растворе с помощью малоуглового рассеяния нейтронов, проведенных для гемоглобина<sup>25</sup>, было показано, что зависимость  $\sqrt{I(0)/C}$  от доли  $D_2O$  в смеси  $H_2O - D_2O$  представляет прямую линию. Такая зависимость предсказывается формулой (4.27). В последующих экспериментах прямолинейные зависимости  $\sqrt{I(0)/C}$  от доли  $D_2O$  были наблюдены и для дру-

тих биологических макромолекул. На рис. 2 в качестве примера эта зависимость приведена для фрагмента рибосомной РНК, рибосомного белка S4 и специфического комплекса между ними<sup>26</sup>. Из этого рисунка видно, что каждой молекуле отвечает своя точка компенсации. В табл. III дается сводка экспериментальных данных по определению точек компенсации ряда биологических частиц. Как видно из данных этой таблицы, для разных белков точки компенсации оказываются близкими. Средняя точка компенсации белков составляет 42% D<sub>2</sub>O в смеси H<sub>2</sub>O — D<sub>2</sub>O, что соответствует плотности амплитуды рассеяния 2,36 · 10<sup>10</sup> см/см<sup>3</sup>. Небольшие отклонения от этой величины коррелируют с величиной парциального удельного объема белка. Экспериментально наблюдаемые значения  $\rho$  в точке компенсации для белков отличаются всего на несколько процентов от рассчитанных, исходя из их химического состава и парциального удельного объема. При этом расчете допускается, что число замещенных на действии водородов равно произведению числа всех потенциально обмениваемых водородов на долю D<sub>2</sub>O в растворителе.

Компенсация фрагмента рибосомной РНК наступает при 70% D<sub>2</sub>O, что соответствует плотности амплитуды рассеяния 4,32 · 10<sup>10</sup> см/см<sup>3</sup>. Наблюдаемые точки компенсации нуклеопротеидов (рибосомы, вирусы) располагаются в промежутке между точками компенсации РНК и белка. Для расчетов значений точки компенсации конкретного рибонуклеопротеида необходимо знать весовую долю одного из компонентов. Вирус гриппа имеет аномально низкое экспериментальное значение  $\rho_c$  (см. табл. III). Это связано с наличием в вирусе значительной доли фосфолипидов (до 20%), имеющих малое значение  $\rho_c$ . Экспериментальное значение точки компенсации ДНК еще не установлено.

Для ансамбля гетерогенных молекул, отличающихся плотностью амплитуды рассеяния, зависимость  $\sqrt{I(0)/C}$  от доли D<sub>2</sub>O в смеси H<sub>2</sub>O — D<sub>2</sub>O перестает быть линейной. Эксперименты по исследованию растворов ферритина, молекулы которого содержали внутри белковой оболочки разное количество мицелл железа, засвидетельствовали существенное отклонение от прямолинейной зависимости<sup>27</sup>.

Определение молекулярных масс двухкомпонентных частиц в точках компенсации дает возможность определять молекулярную массу каждого из компонентов в составе частицы (*in situ*). Этот подход был использован для изучения процессов ассоциации-диссоциации тРНК с аминоацил-тРНК-синтетазами. Было показано для аспарагиновой тРНК, что наиболее устойчивый комплекс образуется в том случае, когда на две молекулы тРНК приходится две молекулы синтетазы<sup>28</sup>.

2) Определение радиусов инерции. К настоящему времени определение радиусов инерции  $R_g$  макромолекул с помощью рассеяния нейтронов стало рутинной процедурой. Интервал величин  $R_g$ ,

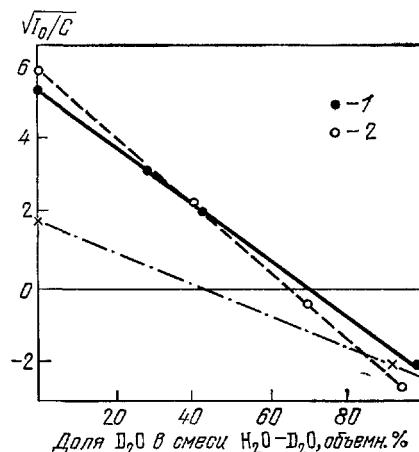


Рис. 2. Зависимость  $\sqrt{I(0)/C}$  от доли D<sub>2</sub>O в смеси H<sub>2</sub>O — D<sub>2</sub>O для изолированного фрагмента рибосомной РНК (1), комплекса (фрагмент рибосомной РНК — белок S4) (2), изолированного белка (X)<sup>26</sup>.

доступных этому методу, определяется конкретной геометрией спектрометра. Так, например, малоугловая камера D11 спектрометра Института Лауз — Ланжевена (Гренобль) позволяет измерять  $R_g$  в интервале от нескольких сотен до единиц Å. Практически такой же интервал  $R_g$  доступен методу рентгеновского диффузного рассеяния<sup>7</sup>.

Диапазон концентраций, обычно требующихся для надежных измерений  $R_g$  в легкой воде и экстраполяции на нулевую концентрацию, зависит от молекулярной массы макромолекулы. Для белков с молекулярной массой 10—20·10<sup>3</sup> дальтон он составляет 3—10 мг/мл. Существенного уменьшения концентрации белка можно добиться, перейдя к измерениям в тяжелой воде. При этом удается понизить концентрацию белка

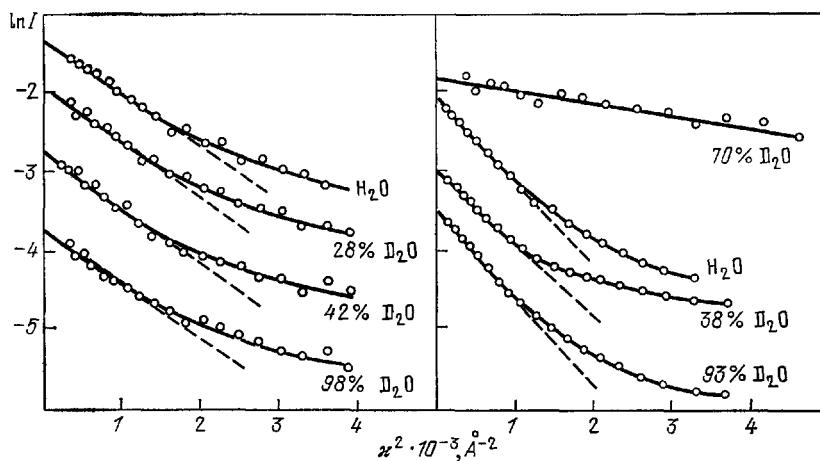


Рис. 3. Зависимость интенсивности рассеяния от длины вектора рассеяния  $x$  в координатах Гинье при разных контрастах.

а) Фрагмент рибосомной РНК; б) комплекс (фрагмент рибосомной РНК — белок S 4)<sup>28</sup>.

до 0,8—1 мг/мл<sup>29</sup>. Возможность таких измерений принципиально важна для тех частиц, которые имеют низкую растворимость. К их числу относятся, например, рибосомные белки. Измерение их радиусов инерции привело авторов работы<sup>29</sup> к выводу, что большинство рибосомных белков в растворе представляет собой обычные компактные частицы, не вытянутые и не развернутые.

Возможность измерения размеров двухкомпонентной частицы в двух точках компенсации, где поочередно становится «невидимым» каждый из компонентов, открывает экспериментальный путь исследования конформационных изменений в компонентах при образовании такой частицы. Приведем два примера таких исследований. В левой части рис. 3 показана зависимость интенсивности рассеяния нейтронов в гинье-области для фрагмента рибосомной РНК при разных контрастах. Радиус инерции оказался не зависящим от контраста и равным  $47,5 \pm 2$  Å. В правой части рис. 3 дана аналогичная зависимость для комплекса этого же фрагмента с рибосомным белком S4 при разных контрастах. Радиус инерции оказался сильно зависящим от контраста: 17—18 Å в 70% D<sub>2</sub>O и 58 Å в 98% D<sub>2</sub>O. Расчет по формуле (4.31) дал значения  $R_g = 50 \pm 3$  Å и  $R_g = 17 \pm 3$  Å соответственно для фрагмента РНК и белка S4 в составе комплекса. Эти значения в пределах экспериментальной погрешности совпали со значениями  $R_g$  изолированного фрагмента РНК ( $47,5 \pm 2$  Å).

и свободного рибосомного белка S4 в растворе ( $18 \pm 2 \text{ \AA}$ ). Отсюда был сделан вывод, что компактность фрагмента РНК и рибосомного белка S4 не меняется при образовании комплекса<sup>26</sup>.

Второй пример связан с изучением взаимодействия тРНК с синтетазами. Было обнаружено, что образование специфического комплекса между ними сопровождается значительным изменением радиуса инерции белка и интенсивности, экстраполированной к  $\chi = 0$ <sup>28</sup>. Авторы обсуждают четыре возможных механизма перестройки в системе, приводящих к указанным изменениям.

3) Изучение крупномасштабных неоднородностей в частице. Многие биологические частицы состоят из двух компонентов, сильно отличающихся по плотности амплитуды рассеяния

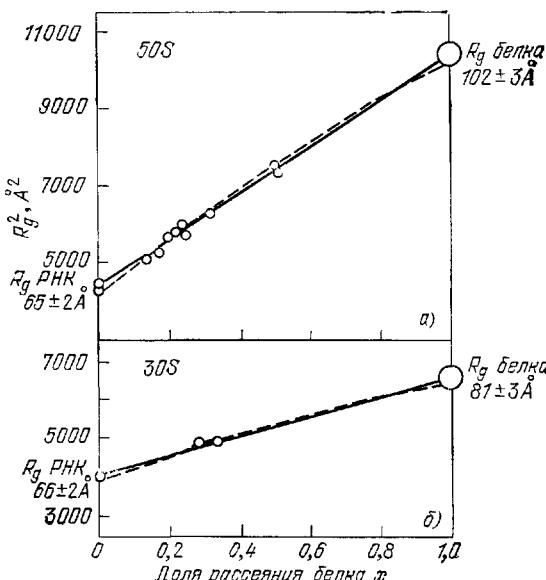


Рис. 4. Зависимость квадрата экспериментального радиуса инерции  $R_g^2$  от доли рассеяния белка  $x$  для 50S (a) и 30S (b) рибосомных субчастиц<sup>30</sup>.

Радиусы инерции РНК и белка в обеих субчастицах вычисляются при  $\chi_{\text{белка}} = 0$  и  $\chi_{\text{белка}} = 1$  соответственно. Максимальное расстояние между центрами тяжести РНК и белка, вычисленное из кривизны параболы (штриховая линия), проведенной через экспериментальные точки, не превосходит 30 Å для обеих рибосомных субчастиц.

(см. табл. III). Если каждый из компонентов занимает в частице достаточно протяженную область, то пространственное распределение компонентов можно установить, исследуя зависимость  $R_g^2$  от контраста — доли  $D_2\text{O}$  в смеси  $\text{H}_2\text{O} - D_2\text{O}$ . Такой подход широко применялся для исследования рибосом, вирусов, нуклеосом и других частиц.

На рис. 4 представлена зависимость  $R_g^2$  от доли рассеяния белка  $x_b$  для рибосомных частиц. Отсюда видно, что РНК и белок распределены в большой и малой субчастице рибосом существенно неоднородно. РНК концентрируется преимущественно в центре рибосомных частиц, тогда как белок располагается на периферии. Расстояние между центрами тяжести РНК и белка в рибосомных частицах мало (не более 30 Å). Такое пространственное расположение РНК и белка в рибосомах наблюдалось в целом ряде лабораторий. Согласно современным представлениям оно отражает каркасную роль РНК в образовании структуры рибосомных частиц<sup>30</sup>.

В противоположность рибосоме для нуклеосомы (наименьшая субъединица хроматина, состоящая из 140 пар нуклеотидных оснований и 8 гистоновых белков) методом вариации контраста установлено, что белки размещаются внутри частицы, а ДНК — снаружи<sup>31</sup>.

Применение метода вариации контраста для исследования вирусов позволило не только подтвердить хорошо известное пространственное строение большинства вирусов (размещение РНК внутри белкового чехла), но и установить новые существенные детали их структурной организации. Так, для нескольких сферических вирусов было установлено, что РНК и белок имеют протяженную зону контакта. При этом часть белковой глобулы, проникающая в РНК, имеет разупорядоченную конформацию <sup>32</sup>. По мнению авторов <sup>32</sup>, такая разупорядоченность объясняет плохое разрешение структуры внутренней части вируса, наблюдаемое в рентгеноструктурных исследованиях.

Изучение глобулярных белков методом вариации контраста показало, что эти белки в рассеянии нейтронов не могут рассматриваться как тела однородной плотности. Для лизоцима <sup>33</sup> и миоглобина <sup>16</sup> была обнаружена зависимость  $R_g^2$  от контраста. Параметр  $\alpha$  в формуле (4.33) оказался положительным. Этот факт интерпретируется как подтверждение концепции гидрофобного ядра в глобулярных белках, поскольку плотность амплитуды рассеяния гидрофобных групп меньше, чем для гидрофильных.

4) Анализ формы и построение однородных моделей. Рассмотренные экспериментальные данные показывают, что для нейтронов биологические макромолекулы выглядят как неоднородные частицы. Это обстоятельство сильно затрудняет интерпретацию экспериментальной кривой рассеяния в приближении однородного тела, и выдвигает на первый план подходы, разделяющие эффекты формы и неоднородности. В разделе б) был изложен общий подход к этой задаче. При его применении к реальным молекулам возникли отмеченные в разделе б) трудности интерпретации функции  $I_F$ , связанные с неоднородностью обмена. Функция формы  $I_U$  была использована для построения моделей лизоцима <sup>33</sup>, фибриногена <sup>34</sup> и 50S субчастицы рибосомы <sup>35</sup> методом сферических функций <sup>24</sup>. По совокупности разных данных предложена модель антитела IgG <sup>36</sup>. Ценность этих моделей проблематична, а ограниченность возможностей метода особенно ярко проявилась на примере лизоцима, для которого моделированием не удается восстановить форму молекулы, известную из рентгеноструктурного анализа монокристаллов.

5) Определение расстояний между меченными частями молекулы. Связывание активными центрами двухвалентных антител вещества, плотность амплитуды рассеяния которого отличается от таковой для антител, позволяет реализовать на практике модельный случай интерференции от двух тел, находящихся на фиксированном расстоянии друг от друга (см. формулу (4.35)). Этот подход был использован для определения расстояний между активными центрами иммуноглобулинов IgG, выделенных на ранней стадии иммунной реакции. К антителу присоединяли два достаточно крупных сферических антитела (декстран с молекулярной массой 40 000 с пришитой динитрофенольной группой). Интерференционная картина осцилляции исследовалась в смеси  $H_2O - D_2O$  (41%), в которой устранилось рассеяние от антитела. Был обнаружен один из интерференционных максимумов и определено расстояние между активными центрами, равное  $276 \pm 15 \text{ \AA}$ . Эта величина в дальнейшем была подтверждена исследованиями зависимости радиуса инерции от контраста <sup>36</sup>.

Более общая задача определения расстояний между центрами тяжести меченых участков сложной системы решалась в ходе восстановления чет-

вертичной структуры 30S рибосомной субчастицы. Схема опыта была пояснена в разделе б). Рис. 5 иллюстрирует наблюдаемые интерференцион-

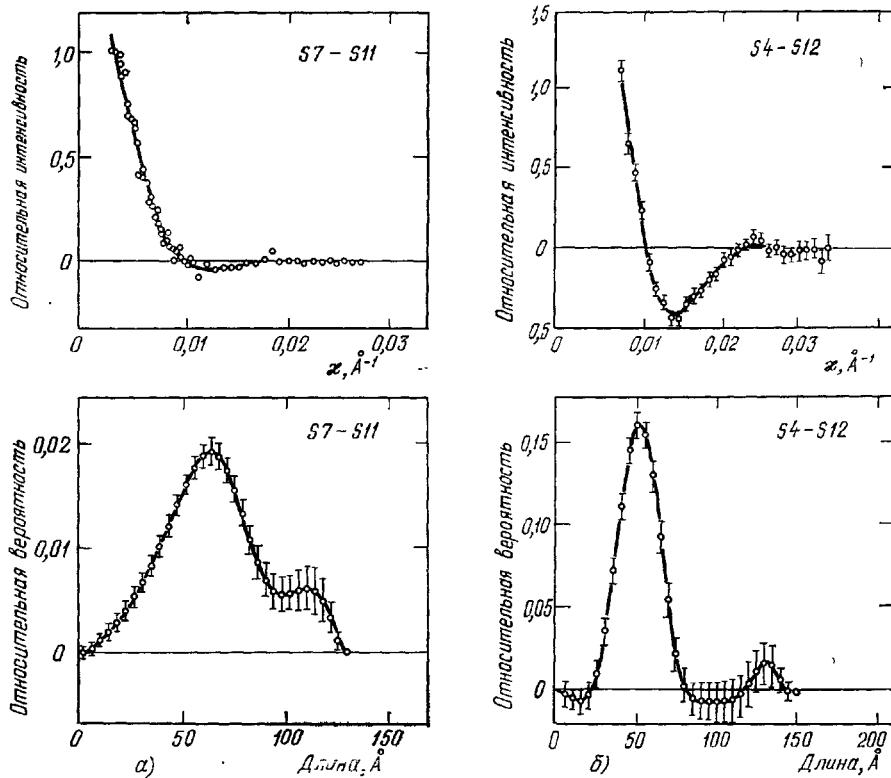


Рис. 5. Наблюдаемые интерференционные картины (верхние части рисунков) для двух пар рибосомных белков S7—S11 (а) и S4—S12 (б), а также вычисленные из этих данных по формуле (4.39) функции распределения расстояния (нижние части рисунков) для этих белков.

Интерференционные картины для пары белков S7—S11 взяты из работы: Ramakrishnan V. R. et al. — J. Mol. Biol., 1981, v. 152 с любезного разрешения авторов и издательства «Академик пресс», Лондон. Интерференционные картины для пары белков S4—S12 взяты из работы: Schindler D. G. et al. — J. Mol. Biol., 1979, v. 134, p. 595 с любезного разрешения авторов и издательства «Академик пресс», Лондон.

ные картины (верхняя часть рисунка) и вычисленные по формуле (4.39) функции распределения расстояний (нижняя часть рисунка) для двух пар рибосомных белков.

## 5. НЕЙТРОНОГРАФИЯ БЕЛКОВЫХ МОНОКРИСТАЛЛОВ И ДРУГИХ ПЕРИОДИЧЕСКИХ СИСТЕМ

Структурная нейтронография на атомарном уровне прошла путь развития от наблюдения первых брэгговских отражений (Э. Ферми, Л. Маршалл,<sup>37</sup>) до исследования структуры наиболее сложных систем — белковых кристаллов. Развитие экспериментальных методов и возможностей в нейтронной физике всегда определялось доступной мощностью источников нейтронов. В конце 60-х годов эти возможности были развиты и осознаны настолько, что появились успешные попытки применения нейтронов для структурного анализа монокристаллов биологических макромо-

лекул<sup>38</sup>. Интерес к этому направлению обоснован рядом преимуществ, которыми обладают нейтронные исследования по сравнению с рентгеновскими. К их числу относятся существенно отличная от рентгеновской «чувствительность» нейtronов к наличию в структуре легких атомов и в первую очередь водорода; уникальная чувствительность нейtronов к изотопному замещению атомов, полностью отсутствующая для рентгеновских лучей; принципиальная возможность решения фазовой проблемы с помощью одной изоморфной производной белка, содержащей атомы с аномальной дисперсией нейtronов. Наконец, в случае нейтронного излучения радиационная нагрузка на кристалл оказывается на 5—6 порядков меньше, чем для рентгеновских лучей, что позволяет практически пренебречь проблемой радиационных повреждений кристалла за время полной съемки дифракционных данных. Вместе с тем нейтронный метод исследования обладает и определенными недостатками. К их числу следует отнести сравнительно высокий уровень некогерентного рассеяния нейtronов в водородсодержащих веществах и наличие заметного неупругого рассеяния нейtronов. Эти два фактора создают фоновое рассеяние, затрудняющее измерение интенсивностей дифракционных отражений. Однако основным «недостатком» нейtronов пока является низкая интенсивность и ограниченная доступность нейтронных пучков, обусловленные техническими возможностями современных нейтронных источников и их высокой стоимостью. Исследователи «спасают» положение как применением рекордно больших (для белков) монокристаллов (до 30 мм<sup>3</sup>), так и весьма продолжительными экспозициями (несколько тысяч часов).

Применявшиеся до сих пор методы структурной нейтронографии белков мало чем отличаются от известных рентгеновских методов, а их теоретические описания практически полностью совпадают. Ввиду этого мы отсылаем интересующихся к последним монографиям<sup>39</sup> за подробными описаниями теории и методических вопросов. Здесь мы ограничиваемся напоминанием нескольких терминов, используемых в дальнейшем. *Разрешение*  $d$  определяет наименьшее расстояние, на котором возможно различить два объекта (например, атома), имеющие примерно равные амплитуды рассеяния. На практике разрешение характеризуют наименьшим межплоскостным расстоянием  $d_{\min}$ , до (и выше) которого измерены и включены в обработку интенсивности брэгговских отражений. Область «высокого разрешения» условно определена как  $d \leq 2 \text{ \AA}$ , т. е. область, в которой отдельные атомы на фурье-синтезах уже различимы. *Фазовая проблема* — проблема, связанная с тем, что для фурье-синтеза изучаемой структуры в реальном пространстве необходимы комплексные коэффициенты (структурные факторы), тогда как эксперимент позволяет измерить только квадрат модуля этих коэффициентов. Решение фазовой проблемы в рентгеноструктурном анализе основано на методе изоморфного замещения, в котором необходимо исследовать изучаемый белок и несколько (3—4) его соединений с тяжелыми атомами (ртуть, золото). *R-фактор*, или фактор расходимости, определяется как

$$R = \sum |F_0| - |F_c| / \sum |F_0|, \quad (5.1)$$

где  $|F_0|$  и  $|F_c|$  — измеренный и вычисленный модули структурных факторов. Он используется в качестве усредненной меры расхождения между структурной моделью с экспериментальными данными. Суммирование при этом ведется по всем измеренным и принятым для обработки отражениям.

### а) Задачи нейтронных исследований

В свете отмеченных выше трудностей структурной нейтронографии белковых кристаллов ясно, что нейтронные исследования целесообразны для решения задач, с которыми не справляется рентгеновская методика. К их числу в первую очередь относится непосредственная локализация атомов водорода и воды. За единичными исключениями (например,<sup>40</sup>), при рентгеновских исследованиях высокого разрешения определяются координаты углерода, азота, кислорода и более тяжелых атомов. Атомы водорода либо включаются в расчет структурных факторов на заключительной фазе анализа структуры, исходя из независимых сведений о стереохимии аминокислотных остатков, водородной связи и строения молекул воды, либо вообще не рассматриваются. Ясно, что этот подход не дает ответа на вопросы, которые неразрешимы с помощью стереохимии, и тем более не дает сведений об истинном положении дел в белках.

Роли водорода в белках весьма многочисленны<sup>41</sup>. Наиболее актуальными из них являются: водород полярных групп аминокислотных остатков, участвующий в образовании структуры белка и в ферментативных реакциях; водород в составе молекулы воды, также определяющий структуру и функционирование белка. Освещение этих вопросов требует нейтронографических исследований с высоким разрешением (лучше 2 Å). Наряду с трудоемкими и в силу этого малочисленными экспериментами, посвященными локализации водорода, самостоятельную ценность имеют исследования низкого разрешения (10—20 Å), в которых решаются вопросы укрупненной структуры — взаимного расположения однородных (в этом масштабе размеров) компонентов в многокомпонентных комплексах. К числу таких компонентов относятся белок, нуклеиновые кислоты, липиды и т. д. Подобные исследования менее трудоемки и не требуют монокристаллов очень высокого качества. Нейтроны для подобных задач оказываются эффективным инструментом из-за достаточно высоких различий плотностей амплитуды рассеяния этих компонентов. Кроме того, обсуждавшийся в п. д. 4 метод вариации контраста оказывается эффективным инструментом и для систем с периодической структурой, что позволяет однозначно идентифицировать вклад отдельных компонентов в интенсивность наблюдаемых отражений и таким способом облегчить решение фазовой проблемы для низкого разрешения.

### б) Исследования высокого разрешения

С помощью нейтронографии высокого разрешения был однозначно идентифицирован аминокислотный остаток, несущий функционально активную группу в активном центре трипсина, который выполняет функцию химического основания во время протеолиза. Более ранние исследования с помощью ЯМР, изотопного обмена, дифференциальной инфракрасной спектроскопии, а также квантовомеханические расчеты приводили к различным предсказаниям. К моменту проведения описываемых исследований общая картина протеолитического процесса сводилась к следующей цепи событий (рис. 6). Карбонильный углерод субстрата атакуется гидроксильным кислородом Ser-195, причем одновременно гидроксильный протон от этой группы переносится к имидазольной группе His-57. Неразрешенной была дилемма, является ли His-57 окончательным пунктом (основанием), связывающим протон, или His-57 играет роль посредника, а основанием является Asp-102. Для решения этой задачи трипсин был ингибитирован дизопропилфлюорофосфатом, который специфически и ковалентно связывает гидроксильную группу Ser-195 в сериновых протеазах.

Геометрия ингибитора весьма похожа на геометрию ожидаемого промежуточного состояния субстрата при реакции гидролиза, когда гидроксильный протон в ферменте уже удален, но пептидная связь еще не разорвана. Следовательно, структурный анализ комплекса трипсин — ингибитор должен дать ответ на вопрос о степени протонирования каталически важных аминокислотных остатков фермента на решающей фазе гидролиза. Нейтронография монокристалла трипсина, ингибиранного указанным выше способом, действительно позволила однозначно обнаружить дополнительный протон на His-57. Эксперимент был выполнен с разрешением 2,2 Å, монокристалл имел объем 1,5 мм<sup>3</sup> и пропитывался тяжелой

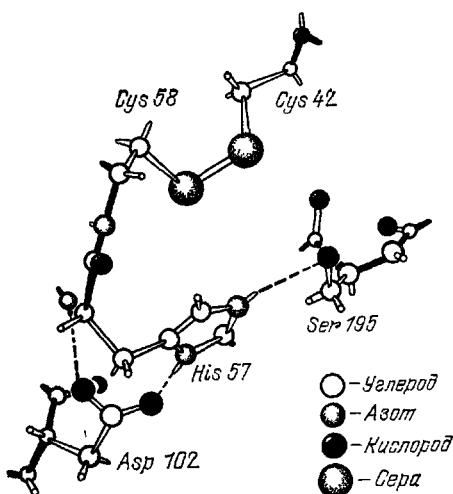
водой в течение месяца перед началом экспозиции<sup>42</sup>. Всего были измерены интенсивности 8700 рефлексов. Восстановление структуры велось на основе структурной модели трипсина, полученной методами рентгенографии. В ходе восстановления *R*-фактор уменьшился от *R* = 0,304 до *R* = 0,187. Помимо структуры активного центра, были восстановлены координаты примерно 3/4 от общего числа атомов водорода и локализованы 55 молекул воды, однако результаты анализа этих данных пока не опубликованы.

В течение последнего десятилетия стал общепризнанным тезис о решающей роли воды в образовании нативной структуры белковой макромолекулы и в протекании ферментативных процессов. В одном из по-

Рис. 6. Расположение аминокислотных остатков в активном центре трипсина<sup>39</sup>.

следних обзоров этой проблемы<sup>41</sup> отмечается, что в полную энергию упаковки полипептидной цепи в глобулу взаимодействия Ван-дер-Ваальса вносят всего 18—24%. Остальные  $\geq 75\%$  создаются взаимодействиями белковой цепи с водой. Роль воды в образовании структуры белка крайне сложна. В<sup>41</sup> предлагается классификация структурированной в белках воды на 8 типов, отличающихся по расположению молекул воды в белке (внутренняя и поверхностная вода) и по типу ближайшего атомного окружения (ионы металлов, заряженные группы, полярные группы, гидрофобные группы). Не менее разнообразным является перечень функциональных ролей воды, начиная от множества форм стабилизации структуры белка (гидрофобные взаимодействия, водородные связи, водно-солевые мостики, экранировка внутренних заряженных ионов и групп) и заканчивая участием воды в ферментативных реакциях (стабилизация связи фермент-субстрат за счет вытеснения воды из полости активного центра и соответствующего снижения диэлектрической проницаемости, участие в процессах быстрого переноса протона в реакциях кислотно-щелочного катализа и т. д.). Будущую роль нейтронографических исследований в этой области трудно переоценить, однако имеющиеся малочисленные эксперименты пока что скорее демонстрируют сложность экспериментальных подходов.

Наиболее далеко продвинулись нейтронографические исследования структуры миоглобина, ведущиеся на протяжении ряда лет в Брукхейвенской национальной лаборатории<sup>43</sup>. Исследовалась CO-производная миоглобина кашалота (CO — Mb). Монокристалл объемом 24 мм<sup>3</sup> про-



питывался тяжелой водой в течение нескольких месяцев для замещения кристаллизационной легкой воды. Набор данных обеспечивал пространственное разрешение 1,8 Å. Принятая процедура замещения легкой воды на тяжелую эффективно снизила некогерентный фон и тем самым улучшила точность измерения интенсивностей рефлексов, однако при этом возникла новая проблема, связанная с неполным замещением всех водородов дейтерием. Это явление сильно затрудняет восстановление координат атомов в реальном пространстве, поскольку для каждого атома водорода возникает новый параметр — степень замещенности. В <sup>43</sup> этому параметру придавались всего 3 значения: 0; 0,5 и 1,0.

Для изученной структуры CO — Mb определены координаты атомов кислорода и дейтерия у 40 молекул воды. Из них 7 молекул связаны только с другими молекулами воды, остальные — либо с цептидными атомами основной цепи, либо с боковыми группами, причем 27 молекул воды образуют мостики между атомами белка. Локализация молекул воды в белках пока носит неоднозначный характер. Так, в этом же белке при анализе нейтронографических данных с использованием только рентгеновских координат для тяжелых атомов было найдено 106 молекул воды <sup>44</sup>; более позднее рентгеновское исследование <sup>45</sup> сократило их число до 72, а последнее нейтронографическое исследование <sup>43</sup>, включающее уточнение координат в реальном пространстве, оставило 40 молекул, из которых только 25 совпадают с рентгеновской локализацией. Часть разногласий, возможно, связана с невыясненной пока ролью солей и pH при образовании связанной с белком воды, другая часть — с индивидуальными особенностями использованных процедур восстановления пространственной структуры. Вероятно, положение будет улучшаться по мере повышения пространственного разрешения. Ряд исследователей уже сообщили о наличии нейтронографических экспериментальных данных высокого разрешения для CO-миоглобина ( $d = 1,5$  Å) <sup>43</sup>, рибонуклеазы A ( $d = 2,0$  Å) <sup>46</sup>, лизоцима из белка куриного яйца ( $d = 1,4$  Å) <sup>47</sup>.

### в) Фазовая проблема

Как показывают рассмотренные выше исследования, набор рентгенографических фаз, полученных без учета положений атомов водорода, служит достаточно хорошим начальным приближением при анализе нейтронографических данных. В ходе этого анализа уточнение фаз является обязательным этапом и применимость соответствующих методов была проверена в <sup>48</sup>. Самостоятельный интерес представляет возможность выполнения полного структурного эксперимента с определением фаз, используя всего одну производную белка, которая содержит либо парамагнитные атомы, либо атомы с ядрами, обладающими аномальной дисперсией для нейтронов (нейтронными резонансами) <sup>49</sup>. Амплитуда рассеяния нейтронов в этих случаях становится экспериментально изменяемой величиной, что в принципе позволяет решить фазовую проблему. Как показывают оценки, если в качестве критерия принять 10% изменения интенсивности при переходе к инверсному отражению, для решения структуры достаточно иметь один атом <sup>113</sup>Cd на 1000 атомов белка. Для нецентросимметричных структур при этом необходимы измерения при двух разных длинах волн нейтрона. Экспериментально эта возможность была исследована на Cd-миоглобине <sup>48</sup>. Поправки к рентгеновским фазам в среднем составили около 37°. Хотя к настоящему времени нет более подробных экспериментальных исследований, теоретическое изучение этой возможности продолжается <sup>49</sup>.

### г) Исследования низкого разрешения

Из самых простых соображений следует, что с повышением разрешения  $d$  время экспозиции растет не медленнее чем  $V/d^3$ , где  $V$  — объем элементарной ячейки. Поэтому сравнительно большое количество исследований ведется с существенно худшим разрешением (10—20 Å), что сокращает продолжительность эксперимента до нескольких дней или часов. Естественно, при этом нет смысла рассматривать структуру изучаемых объектов на атомарном уровне, но сохраняется возможность различать компоненты, обладающие различными средними плотностями когерентных амплитуд рассеяния. Подобная «укрупненная» структурная информация во многих случаях оказывается важной и интересной. Кроме того, далеко не все биологические объекты могут быть получены в виде достаточно совершенных кристаллов. При этом весьма эффективным оказывается метод вариации контраста растворителя, рассмотренный в разделе д) гл. 4 для разбавленных растворов макромолекул. Изучение возможностей этого метода для кристаллов при низком разрешении, выполненное в<sup>50</sup>, показало, что при достаточно низком разрешении ( $d > 10$  Å) структурные факторы элементарных объемов порядка  $d^3$  линейно меняются с контрастом. В наиболее развитом виде этот подход был применен при исследовании составной части хроматина — ядерных частиц нуклеосом<sup>51</sup>, которые содержат примерно равные количества белка и ДНК. Использовались монокристаллы объемом 0,15—0,015 мм<sup>3</sup>, имеющие размер элементарной ячейки  $a = 119$  Å,  $b = 198$  Å,  $c = 111$  Å, симметрия  $p2_12_12_1$ . Съемка была выполнена до  $d = 22$  Å, что позволило зарегистрировать 114 отражений. Использовались 4 различных состава маточной жидкости ( $H_2O$ , 39%  $D_2O$ , 65%  $D_2O$  и 90%  $D_2O$ ), которой пропитывались кристаллы в течение не менее двух недель перед экспозицией. Результаты съемки были подвергнуты традиционным процедурам кристаллографического анализа: синтезу Паттерсона, отысканию фаз и восстановлению трехмерной структуры с последующим уточнением фаз. Результатом анализа явилась трехмерная модель структуры ядерных частиц, в которой спирализованная ДНК навита на белковое ядро (гистоновый октамер). Радиус суперспирали 49 Å, шаг 27,5 Å, на один октамер навито 1,8 витков ДНК. Эти результаты существенно уточнили представления, сложившиеся на основе малоугловых исследований<sup>51</sup>.

Описанный подход низкого разрешения применялся к большому кругу биологических объектов: для исследований кальцинирования сухожилий<sup>52</sup>, внутренней организации мембран<sup>50</sup>, структуры вирусов<sup>17</sup> и т. д. В этой связи интересно заметить, что для приготовления умеренно упорядоченных систем в последние годы успешно стали применяться магнитные поля<sup>50,54</sup> напряженностью до 18 тесла. Таким образом, удавалось ориентировать несколько типов мембран, палочкообразные вирусы, а также полимеризацией в магнитном поле получать ориентированные гели фибрина.

### 6. ИССЛЕДОВАНИЯ ДИНАМИКИ МАКРОМОЛЕКУЛ

Помимо собственно структурных исследований, методы нейтронографии в принципе позволяют изучать динамические процессы в биологических системах, например диффузию малых молекул (воды), сегментную подвижность, продольные и поперечные колебания полипептидных цепей и т. д. Одним из успешных шагов в этом направлении является исследование миграции гидратной воды по поверхности белка С-фикациина

с помощью квазиупругого рассеяния нейtronов<sup>55</sup>. В качестве образцов использовался дейтерированный белок, выделенный из сине-зеленых водорослей и микроорганизмов, выращенных в дейтерированной среде. Эта мера существенно снижала фоновое рассеяние нейtronов от атомов водорода, входящих в состав белка. От 300 до 500 мг белка выдерживались в атмосфере гелия с контролируемым содержанием паров  $H_2O$ , что позволяло задавать степень гидратации белка. Измерения велись при переданных импульсах в интервале  $0,11-0,33 \text{ \AA}^{-1}$  с энергетическим разрешением порядка  $2 \cdot 10^{-6}$  эВ в области переданных энергий  $\leqslant 62 \cdot 10^{-3}$  эВ. Полученные зависимости уширения квазиупругой линии от переданного импульса обнаружили осциллирующий характер, что свидетельствует о прыжковом механизме диффузии молекул воды. Авторы оценивают среднюю длину прыжка молекулы в  $7-9 \text{ \AA}$ , время оседлой жизни (между двумя соседними прыжками) —  $(1,5-3,0) \cdot 10^{-9}$  с.

## 7. ИТОГИ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Рассеяние тепловых нейtronов всего за 10 лет стало признанным инструментом структурных исследований в молекулярной биологии. Методы высокого разрешения уже позволили детализировать представления о ходе протеолитических реакций и подняли ряд новых проблем, связанных с локализацией молекул воды и  $H-D$  обменом. Методы низкого разрешения, получившие очень широкую известность благодаря относительной простоте эксперимента, успешно применяются как для собственно структурных задач, так и для изучения изменений структуры при выполнении макромолекулами их биологических функций. По-видимому, эти методы и в дальнейшем будут широко применяться для решения задач, в которых «молекулярный» структурный уровень является достаточным.

Между идеальным раствором и идеальным монокристаллом существует промежуточная область структурной организации, из которой, в общем случае, можно было бы получать структурную информацию с разрешением, промежуточным между размерами макромолекулы и атома. Большая неопределенность в формах структурной организации в этой области не позволяет дать общее решение структурной задачи. Однако в тех случаях, когда эта неопределенность снята, задача становится структурно-чувствительной. В частности, такой подход в принципе может быть использован не только для исследования расстояний и расположения частиц в специфически связанных димерах и более сложных агрегатах (см. раздел е) гл. 4), но и для извлечения информации об их форме, внутренней структуре и взаимной ориентации. Этот подход пока детально не исследовался ни в теоретическом плане, ни экспериментально, однако развитие нейтронных методов выделения интерференционных функций является многообещающим началом.

К настоящему времени распространенность и доступность нейтронографических методов оставляют желать лучшего. В Западной Европе ведущим центром для таких исследований стал Международный институт им. Лауз — Ланжевена в Гренобле (Франция). Он оборудован холодным замедлителем, двумя установками для исследования малоуглового рассеяния, а также рядом дифрактометров и спектрометров неупругого рассеяния нейtronов. В США Брукхейвенская национальная лаборатория располагает нейтронным дифрактометром и установкой малоуглового рассеяния. Поскольку реактор там не оборудован холодным замедлителем, в последние годы в ней преимущественно ведутся дифракционные исследования на монокристаллах. Национальная лаборатория в Окридже

закончила создание общенационального центра малоугловых исследований<sup>56</sup>, который располагает одновременно установками для исследования малоуглового рассеяния нейtronов и рентгеновских лучей. В Советском Союзе нейtronографические исследования биологических макромолекул начаты в Лаборатории нейtronной физики Объединенного института ядерных исследований (Дубна) и Ленинградском институте ядерной физики им. Б. П. Константинова (Гатчина)<sup>56, 57</sup>.

В ближайшие годы следует ожидать дальнейшего роста нейtronографических исследований. В экстенсивном плане увеличится число действующих установок на существующих реакторах, а также войдут в строй новые источники нейtronов: реактор «Орфей» во Франции, импульсные источники нейtronов IPNS в Англии, ZING в США, реактор ПИК в ЛИЯФ (Гатчина) и импульсный реактор ИБР-2 в ОИЯИ (Дубна). Все они оснащаются спектрометрами для нейtronографических исследований биологических макромолекул. Одновременно с этим большие перспективы имеют разработки, направленные на повышение эффективности использования нейtronных пучков. Для непрерывных источников нейtronов такими путями являются совершенствование монохроматоров и разработка двумерных координатно-чувствительных детекторов<sup>58</sup>, позволяющих одновременно регистрировать рассеянные нейtronы в широком диапазоне углов без потерь углового разрешения (двумерная съемка). Для импульсных источников нейtronов добавляется возможность одновременно с широким диапазоном углов использовать весь спектр тепловых нейtronов и тем самым вести съемки в трехмерном объеме пространства векторов рассеяния<sup>59</sup>. Все эти разработки базируются на широком применении современных достижений электроники и вычислительной техники и должны повысить эффективность структурных исследований в  $10^2$ — $10^3$  раз.

Исследования динамики биологических макромолекул нейtronографическими методами — область пока почти нетронутая. Отчасти это связано с ограниченными возможностями нейtronной техники (энергетическое разрешение  $10^{-6}$ — $10^{-9}$  эВ, что соответствует характерным временем  $10^{-10}$ — $10^{-7}$  с), отчасти с недостаточно детальным пониманием поведения макромолекул в этой области времен. Первые эксперименты в этой области только начаты<sup>60</sup>. Мы полагаем, что и в этом направлении следует ожидать быстрого прогресса.

В заключение мы считаем необходимым выразить нашу искреннюю благодарность А. С. Спирину и И. М. Франку за многолетнюю поддержку нашего интереса и усилий в области нейtronографических исследований биологических объектов.

Объединенный институт ядерных исследований,

Дубна (Московская обл.)  
Институт белка АН СССР,  
Пущино (Московская обл.)

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- Франк И. М.— Природа, 1972, № 9, с. 24.
- Ахиезер А. И., Померанчук И. Я.— Некоторые вопросы теории ядра.— М.: Гостехиздат, 1950.
- Власов Н. А. Нейтроны.— М.: Наука, 1971.
- Гуревич И. И., Тарасов Л. В. Физика нейтронов низких энергий.— М.: Наука, 1965.
- Басон С. Е. Neutron Diffraction.— 3rd ed.— Oxford: Clarendon Press, 1975.
- Басон С. Е.— Acta Cryst. Ser. A, 1972, v. 28, p. 537.
- Каули Дж. Физика дифракции.— М.: Мир, 1979.
- Гюинье А., Фурнеть Г. Small Angle Scattering of X-Rays.— N. Y.; Lond.: Wiley and Chapman, 1955.

6. Цветков В. Н., Эскин В. Е., Френкель С. Я. Структура макромолекул в растворах.— М.: Наука, 1964.
7. Краткы О., Pilz I.— Quart. Rev. of Biophys., 1972, v. 5, p. 481.
8. Рольбин Ю. А., Каюшина Р. Л., Фейгин Л. А., Шедрин Б. М.— Кристаллография, 1973, т. 18, с. 701.
9. Stuhrmann H., Kirste R.— Zs. Phys. Chem., 1965, Bd. 46, S. 247.
- Stuhrmann H.— Acta Cryst. Ser. A, 1965, v. 26, p. 297.
10. Jacrot B., Zaccai G.— Biopolymers, 1981, v. 20, p. 2413.
11. Zamyatnin A. A.— Progr. Biophys. and Mol. Biol., 1972, v. 24, p. 107.
12. Giege R., Zaccai G., Jacrot B., Li Long Ci— ILL Annual Report. Annex. Grenoble: ILL, 1980.— P. 337.
13. Serdyuk I. N., Fedorov B. A.— J. Polym. Sci., Polymer Lett., 1973, v. 11, p. 645.
- Сердюк И. Н.— ДАН СССР, 1974, т. 217, с. 232.
- Serdyuk I. N., Grenader A. K.— FEBS Lett., 1975, v. 59, p. 133.
14. Stuhrmann H. B., Kirste R. G.— Zs. Phys. Chem., 1967, v. 56, p. 334.
15. Ibel K., Stuhrmann H. B.— J. Mol. Biol., 1975, v. 93, p. 255.
16. Crichton R. R., Engelmann D. M., Haas J., Koch M. H. J., Moore P. B., Parfait R.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, p. 5547.
- Osborne H. B., Sardet C., Willaz M. M., Chabre M.— J. Mol. Biol., 1978, v. 123, p. 177.
17. Краткы О., Worthmann W.— Monatsheft Chem., 1947, Bd. 76, S. 263.
- Вайнштейн Б. К., Сосфенов Н. И., Фейгин Л. А.— ДАН СССР, 1970, т. 190, с. 574.
- Норре W.— Isr. J. Chem., 1972, v. 10, p. 321.
- Engelmann D. M., Moore P. B.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1972, v. 69, p. 1997.
18. Moore P. B., Langer J. A., Schoenborn B. P., Engelmann D. M.— J. Mol. Biol., 1977, v. 112, p. 199.
19. Moore P. B., Weinstein E.— J. Appl. Cryst., 1979, v. 12, p. 321.
20. Schindler D. G., Langer J. A., Engelmann D. M., Moore P. B.— J. Mol. Biol., 1979, v. 134, p. 595.
21. Спирин А. С., Сердюк И. Н., Шпунгин И. Л., Васильев В. Д.— Мол. биол., 1979, т. 6, с. 1384.
22. Henderson R. F., Henderson T. R.— J. Biol. Chem., 1970, v. 245, p. 373.
23. Lewin S., Williams B. A.— Arch. Biochem. and Biophys., 1971, v. 144, p. 1.
24. Harrison S. C.— J. Mol. Biol., 1969, v. 42, p. 457.
- Stuhrmann H. B.— Acta Cryst. Ser. A, 1970, v. 26, p. 297.
25. Schelten J., Schlecht P., Schmatz W., Mayer A.— J. Biol. Chem., 1972, v. 247, p. 5436.
26. Serdyuk I. N., Schpungin J. L., Zaccai G.— J. Mol. Biol., 1980, v. 137, p. 109.
27. Stuhrmann H. B.— J. Appl. Cryst., 1974, v. 7, p. 173.
28. Dessen P., Blanquet S., Zaccai G., Jacrot B.— J. Mol. Biol., 1978, v. 126, p. 293.
- Zaccai G., Morin P., Jacrot B., Moras D., Thierry J. C., Giege R.— J. Mol. Biol., 1979, v. 129, p. 483.
29. Serdyuk I. N., Zaccai G., Spirin A. S.— FEBS Lett., 1978, v. 94, p. 349.
30. Serdyuk I. N., Grenader A. K., Zaccai G.— J. Mol. Biol., 1979, v. 135, p. 691.
31. Bradbury E. M., Baldwin J. P., Carpenter B. G., Hjelm R. P., Nancock R., Ibel K.— Brookhaven Symp. Biol., 1975, v. 27, p. IV 97.
- Pardon J. F., Worcester D. L., Wooley J. C., Tatchell K., Van Holde K. E., Richards B. M.— Nucleic Acids Res., 1975, v. 2, p. 2163.
32. Chauvin C., Witz J., Jacrot B.— J. Mol. Biol., 1978, v. 124, p. 614.
33. Stuhrmann H. B., Fuess H.— Acta Cryst. Ser. A, 1976, v. 32, p. 67.
34. Marguerie G., Stuhrmann H. B.— J. Mol. Biol., 1976, v. 102, p. 143.
35. Stuhrmann H. B., Koch M. H. J., Parfait R., Haas J., Ibel K., Crichton R. R.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, p. 2316.
36. Cser L., Franek F., Gladkikh I. A., Nezlin R. S., Novotny J., Ostanevich Yu. M.— FEBS Lett., 1978, v. 93, p. 312; Immunol. Lett., 1980, v. 1, p. 185; Eur. J. Biochem., 1981, v. 116, p. 109.
37. Fermi E., Marshall L.— Phys. Rev., 1947, v. 71, p. 666.
38. Moore F. M., Willis B. T. M., Hodgkin D. C.— Nature, 1967, v. 214, p. 129.
- Schoenborn B. P.— Nature, 1969, v. 224, p. 143.

39. Бландел Т., Джонсон Л.— Кристаллография белка.— М.: Мир, 1979.  
Александров Ю. А., Шарапов Э. И., Чер Л. Дифракционные методы в нейтронной физике.— М.: Энергоиздат, 1981.

40. Dijkstra B. W., Kalk K. H., Hol W. G. J., Drent J.— *J. Mol. Biol.*, 1981, v. 147, p. 97.

41. Finney J. L.— In: *Water. A Comprehensive Treatise*/Ed. F. Franks, N.Y.; Lnd.: Plenum Press, 1979.— V. 6, p. 47.

42. Kosiakoff A. A., Spencer S. A.— *Nature*, 1980, v. 288, p. 414.

43. Schoenborn B. P., Hanson J. C.— In: *Water in Polymers*/Ed. S.P. Powlan: Am. Chem. Soc. Symp.— 1980.— V. 127, p. 215; Hanson J. C., Schoenborn B. P.— *J. Mol. Biol.* 1981, v. 153, p. 117.

44. Schoenborn B. P.— *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1971, v. 36, p. 569.

45. Takano A.— *J. Mol. Biol.*, 1977, v. 110, p. 537.

46. Wlodawer A.— *Acta Cryst. Ser. B*, 1980, v. 36, p. 1826.

47. Bentley G. A., Mason S. A.— *Phil. Trans. Roy. Soc., Lond. Ser. B*, 1980, v. 290, p. 505.

48. Schoenborn B. P., Diamond R.— In: *Proc. Brookhaven Symposium in Biology*.— Brookhaven, 1975/P. II-3.

49. Ramaseshan S.— *Curr. Sci. India*, 1966, v. 35, p. 87.  
Singh A. K., Ramaseshan S.— *Acta Cryst. Ser. B*, 1968, v. 24, p. 35.  
Шапиро Ф. Л.— Пробл. физ. ЭЧАЯ, 1972, т. 2, с. 975.

50. Saibil H., Chabre M., Worcester D.— *Nature*, 1976, v. 262, p. 266.

51. Bentley G. A., Finch J. T., Lewitt-Bentley A.— *J. Mol. Biol.*, 1981, v. 145, p. 771.

52. White S. W., Holmes D. J. S., Miller A.— *Nature*, 1977, v. 266, p. 421.

53. Jacrot B.— *Comprehensive Virology*, 1980, v. 17, p. 129.

54. Torbet J., Freyssinet J. M., Hudry-Clergeon G.— *Nature*, 1981, v. 289, p. 91.

55. Middendorf H. D., Randall J.— *Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. Ser. B*, 1980, v. 290, p. 639.

56. Koehler W. C.— *Oak Ridge Nat. Lab. Review*, Summer 1980, p. 31.

57. Агамалиян М. М., Драбкин Г. М., Довжиков А. А. и др. Кристаллография, 1982, т. 27, № 1, с. 92.

58. Springer T.— *Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. Ser. B*, 1980, v. 290, p. 673.  
Хейкер Д. М.— Кристаллография, 1978, т. 23, с. 1288.

59. Балагуров А. М., Новожилов В. Е., Останевич Ю. М., Шибаев В. Д.— Сообщения ОИЯИ Р14-12840.— Дубна, 1979.  
Балагуров А. М., Горделий В. И., Ишмухаметов М. З., Новожилов В. Е., Останевич Ю. М., Савенко Б. Н., Шибаев В. Д.— Сообщения ОИЯИ Р14-80-440.— Дубна, 1980.  
Peterson S. W., Reis A. H., Schultz A. J., Day P.— *Adv. Chem. Series*, 1980, No. 186, p. 75.

60. Randall J., Middendorf H. D.— Цит. в <sup>12</sup> сб.— Р. 346.  
Alpert Y.— *Ibid.*— Р. 347.

61. Stuhrmann H. B., Haas J. et. al.— *J. Mol. Biol.*, 1976, v. 100, p. 399.

62. Moore P. B., Engelmann D. M., Schoenborn B. P.— *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1974, v. 71, p. 172.

63. Beadry P., Peterson H. V., Grunberg-Manago M., Jacrot B.— *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1976, v. 72, p. 391.

64. Stuhrmann H. B., Haas J., Ibel K., De Wolf B., Koch M. H. J., Parfait R., Crichton R. R.— *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1976, v. 73, p. 2379.

65. Stuhrmann H. B., et. al.— *J. Mol. Biol.*, 1978, v. 119, p. 203.

66. Perkins S. J., Miller A., Weiss H., Leonard K.— Цит. в <sup>12</sup> сб.— Р. 351.

67. Mellem J. E., Cusack S., Miller A.— *Ibid.*— Р. 358.

68. Cusack S., Miller A., Krijgsmann P. C., Mellem J. E.— *Ibid.*— Р. 360.

69. Boulanger P., Devaux C., Jacrot B.— *Ibid.*— Р. 361.

70. Perkins S. J., Miller A. et. al. *Ibid.*— Р. 340.

71. Freyssinet G. M., Tourbet G.— *Ibid.*— Р. 350.

72. Stuhrmann H. B. et. al.— *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1975, v. 72, p. 2270.

73. Hjelm R. P., Jr., Baldwin J. P., Bradbury E. M.— In: *Methods in Cell Biology*/Eds G. Stein, J. Stein, P. Kleinsmith.— N.Y.,; Lnd.: Academic Press, 1978.— V. 18, p. 295.

74. Jacrot B.— *Rept. on Progr. Phys.*, 1976, v. 39, p. 911.