

РЕНТГЕНОВСКАЯ ТОПОГРАФИЯ КРИСТАЛЛА ТЕТРАГОНАЛЬНОГО ЛИЗОЦИМА

© 2012 г. А. Э. Волошин¹, С. И. Ковалев¹, М. С. Лясникова¹, Э. Х. Мухамеджанов²,
М. М. Борисов², М. В. Ковальчук^{1,2}

¹ Институт кристаллографии РАН, Москва
E-mail: voloshin@ns.crys.ras.ru

² Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва

Поступила в редакцию 27.04.2012 г.

Методом рентгеновской топографии с применением синхротронного излучения исследован кристалл тетрагональной модификации лизоцима, выращенный в контролируемых условиях при *in situ* мониторинге кинетики роста и морфологии грани (110). Выбор дифракционного отражения с оптимальной величиной дисперсии позволил получить информативное рентгенографическое изображение образца. Обнаружено, что полосы зонарной неоднородности, образующиеся при изменении пересыщения, отличны от наблюдаемых в неорганических кристаллах, растущих по сплошному механизму, и соответствуют типу зонарности, характерной для кристаллов, растущих по нормальному механизму.

ВВЕДЕНИЕ

Кристаллизация белков – необходимый этап на пути расшифровки их структуры. При этом получение структурных данных с высоким пространственным разрешением возможно только при использовании образцов, обладающих высоким структурным совершенством. Вместе с тем именно выращивание кристаллов белков с таким содержанием дефектов, которое не оказывало бы заметного влияния на точность рентгеновского структурного анализа, и составляет на сегодняшний день основную проблему.

В последние годы опубликовано большое количество работ по исследованию влияния дефектности кристаллов белков на разрешение рентгеноструктурного анализа. Большинство авторов (например, [1–4]) в качестве основного типа дефектов кристаллов белков называют неоднородное (зонарное и секториальное) распределение высокомолекулярных примесей, в частности димеров, тримеров и более высокомолекулярных комплексов белковых молекул. В [5] изучался вопрос о различных механизмах влияния высокомолекулярных примесей на точность рентгеновского структурного анализа и было установлено, что единственным заметным фактором влияния примесей является повышение мозаичности кристалла за счет генерации упругих напряжений и образования трещин как следствие неоднородности состава кристалла. В [2, 3] показано, что уровень напряжений, возникающих в кристаллах белков вследствие зонарной неоднородности, может достигать предела хрупкого разрушения.

При выращивании из водных растворов наиболее распространенным типом зонарной неоднородности является морфологическая (или внутренняя) зонарность, обусловленная изменением морфологии растущей грани – сменой источников ростовых ступеней, изменением наклона вицинальных холмиков, развитием морфологической нестабильности [6]. В ряде случаев, например в кристаллах алмаза, наблюдается также кинетическая (или внешняя) зонарность, связанная с изменениями содержания примеси в пограничном диффузионном слое жидкой фазы и кинетики присоединения и отрыва атомов примеси и основного вещества в результате нестабильности условий кристаллизации (температуры и пересыщения). В той или иной степени оба типа зависят от величины пересыщения и скорости роста кристалла, поэтому представляется целесообразным изучить влияние условий роста на образование дефектов в кристаллах белков. В частности, в [7] на примере тетрагональной модификации лизоцима показано, что разрешение при определении структуры постепенно снижается по мере увеличения пересыщения, а затем остается на постоянном уровне.

Наиболее удобным методом изучения дефектной структуры кристаллов является рентгеновская дифракционная топография. Существует ряд публикаций, посвященных попыткам применения этого метода к исследованию кристаллов белков [1, 5, 8–12]. Общей чертой практически всех этих исследований является крайне низкая информативность полученных топограмм, свя-

занная с высоким уровнем напряжений в кристаллах. Фактически все цитированные работы лишь подтверждают общее низкое качество кристаллов белков, оставляя за кадром более существенные детали их дефектной структуры: типы дефектов, их количество, распределение по кристаллу.

Некоторым исключением является [12], где представлены дифракционные топограммы кристалла тетрагонального лизоцима очень высокого качества, на которых отчетливо выявляется специфика дислокационной структуры кристалла. Тем не менее на топограммах не выявлена структура композиционной неоднородности кристалла, по всей вероятности, из-за особенностей применявшейся геометрии съемки: использовались отражения малых индексов ($\{002\}$, $\{102\}$, $\{440\}$), слабо чувствительные к вариациям параметра решетки из-за относительно большой ширины дифракционного максимума. Также на топограммах присутствовали обширные области сильной деформации, природа которой не выяснена. Таким образом, до сих пор не удалось выявить взаимосвязь между условиями роста кристаллов белков и их дефектностью.

В настоящей работе предпринимается попытка хотя бы отчасти устранить данный информационный пробел, а именно – установить влияние условий роста кристаллов белков на формирование в них полос зонарной неоднородности. В качестве модельного объекта выбран кристалл тетрагонального лизоцима – один из наиболее изученных кристаллов белков. Кинетика роста и морфология граней тетрагонального лизоцима изучались различными авторами методами лазерной интерферометрии [4, 13–15], атомно-силовой микроскопии [7, 16–21] и оптической микроскопии [4, 22]. Сравнительно большое количество работ посвящено вопросам зарождения кристаллов лизоцима [23–27]. Все это создает необходимую основу для выращивания крупных кристаллов с относительно низким уровнем напряжений для их последующего исследования методом рентгеновской топографии.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

В данной работе использовался подход, развитый в [28] при исследовании влияния условий роста кристаллов KDP на образование в них дефектов, а именно: выращивание кристаллов в контролируемых условиях при *in situ* мониторинге их кинетики и морфологии в интерферометре Майкельсона с последующей съемкой рентгеновских топограмм полученных образцов. Такая методика позволяет сопоставить моменты изменения параметров роста с генерацией тех или иных типов дефектов.



Рис. 1. Кристаллизационная ячейка для интерферометрических наблюдений.

Лазерная интерферометрия. В экспериментах использовался интерферометр производства компании “Инструменты нанотехнологии”. Для проведения ростового эксперимента была изготовлена проточная ячейка (рис. 1) размером $\varnothing 13 \times 15$ мм. Ячейка имеет ввинчивающееся дно и патрубки, расположенные сверху, при этом верхнее покровное стекло имеет наклон 8° , что позволяет избежать наложения интерференционных картин от кристалла и от стекла. Проточная система включает в себя кристаллизационную ячейку, промежуточную емкость для раствора и перистальтический насос (рис. 2). Прокачка раствора в системе осуществляется со скоростью 2.3 мл/мин. Эксперименты проводились при комнатной температуре, при этом температура в помещении поддерживалась с точностью $\pm 5^\circ\text{C}$.

Выращивание кристаллов. Кристаллы белка лизоцима тетрагональной модификации выращивались по стандартной методике, описанной в литературе. В экспериментах использовался шестикратно перекристаллизованный белок фирмы Selkagaku (активность – 53 000 единиц на 1 мг). На основе ацетатного буфера состава: 0.090 мл CH_3COOH , 0.13 г $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 100 г H_2O ; $\text{pH} = 4.5$ – были приготовлены растворы лизоцима различной концентрации (от 50 до 80 мг/мл). В качестве осадителя в растворы добавляли NaCl (25 мг/мл).

Для устойчивого роста кристаллов применяли ряд технологических приемов. Растворы фильтровали через специальные ультрамикрофильтры фирмы ADVANTEC. Затем растворы лизоцима и осадителя в течение суток выдерживали в термостате при температуре 40°C . После смешения растворы выдерживали в термостате при той же температуре в течение часа. Также в термостате подогревали кристаллизационную кювету, после чего в нее заливался раствор.

Для проведения интерферометрических исследований белок лизоцима спонтанно кристаллизовали в капле раствора с содержанием лизо-



Рис. 2. Система для исследования роста кристаллов методом лазерной интерферометрии: 1 – кристаллизационная ячейка, 2 – интерферометр, 3 – объектив, 4 – CCD-камера, 5 – перистальтический насос.

цима 80 мг/мл. Каплю помещали на слюдяную подложку, находящуюся на дне герметичной кюветы, предназначенной для проведения интерферометрических исследований. Начальное пересыщение $\sigma = 15$ (1500%), средняя скорость роста кристаллов в капле – 180 мкм/сут. Через двое суток после помещения капли на подложку через кювету начинали прокачивать раствор лизоцима (50 мг/мл) с прежней концентрацией NaCl ($\sigma = 9$ (900%)). Контур, по которому циркулировал раствор, состоял из кюветы, промежуточной емкости и соединительных шлангов. Общий объем раствора – 13 мл. В течение двух недель кристаллы росли со скоростью 15 мкм/сут. Затем раствор заменили на новый с концентрацией лизоцима 60 мг/мл. Пересыщение составило $\sigma = 11$ (1100%), скорость роста – 50 мкм/сут. При этих условиях кристалл рос еще 8 дней. В результате был получен кристалл размером примерно $2.5 \times 2 \times 1$ мм³.

Съемка рентгеновских топограмм. Рентгеновские топограммы снимали на источнике СИ в НИЦ “Курчатовский институт” на станции Прецизионной рентгеновской оптики. Станция оборудована двухкристальным монохроматором, используется отражение (111) от кристалла Si. При съемках использовали излучение с длиной волны 0.70 Å, угол Брэгга монохроматора составлял 6.4°.

Для проведения рентгенотопографических съемок была изготовлена специальная кювета размером $\varnothing 13 \times 5$ мм, состоящая из кольца (оргстекло) с приклеенной снизу слюдяной пластинкой. Слюдяную подложку из интерферометрической кюветы вместе с кристаллом и каплей раствора переносили в рентгенотопографическую кювету,

приклеивали ее по углам пластилином ко дну, заливали раствором и сверху приклеивали вторую слюдяную пластинку.

Съемки проводили с использованием отражения (14 – 12 5), угол Брэгга составил 5.3°. Для использованного рефлекса структурный фактор $F = 14361.7$, соответственно при выбранной длине волны экстинкционная длина составляет 260 мкм, собственная полуширина – 0.6 угл. с. Съемки проводили на максимуме кривой отражения. Уровень фона составлял 27000 имп/с, интенсивность рефлекса – 60000 имп/с, время экспозиции – 2 ч.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 3 приведена типичная интерферограмма поверхности кристалла при пересыщении $\sigma = 9$. Интерференционные полосы достаточно слабые. Это может свидетельствовать о существенной шероховатости поверхности. Интерференционные изображения вихри отсутствуют. При пересыщении $\sigma = 11$ интерференционная картина исчезает, вероятно, вследствие усиления шероховатости поверхности.

На рис. 4 приведена кривая отражения от плоскостей (14 – 12 5) образца. Значительное уширение кривой справа и менее значительное слева свидетельствует о наличии заметных деформированных областей в кристалле. Вместе с тем узкий пик в центральной части на высоте примерно 2/3 от максимума говорит о том, что в весьма существенной части кристалла уровень деформа-



Рис. 3. Интерференционная картина поверхности растущего кристалла тетрагонального лизоцима (прямые полосы – отражение от стекла ячейки).



Рис. 4. Кривая дифракционного отражения кристалла лизоцима в отражении (14 –12 5).

ций ниже предела чувствительности данного рефлекса.

На рис. 5 приведены полученная рентгеновская топограмма и фотография исследованного кристалла.

Отражение (14 –12 5) имеет сравнительно большую дисперсию, что делает его менее чувствительным к деформациям. Благодаря этому на топограмме видно изображение всего кристалла. На топограмме отсутствуют изображения дислокаций и включений, также нет областей с высоким уровнем деформаций, типичных для кристаллов белков [1, 5, 8–12]. Из полос зонарной неоднородности *S* видны лишь несколько наиболее сильных. Важной особенностью наблюдае-

мых полос является их непрерывность на границе секторов роста. Это свидетельствует о том, что локальные изменения состава кристалла при изменении температуры и/или пересыщения происходили на всех гранях одновременно. В этом состоит радикальное отличие данного образца от неорганических кристаллов, выращиваемых из растворов, в которых зонарная неоднородность является следствием морфологических процессов, происходящих на поверхности растущей грани. В этих кристаллах полосы неоднородности являются следствием смены источников роста, изменения наклона вицинальных холмиков либо образования макроступеней. В общем случае они претерпевают разрыв на границах секторов, по-

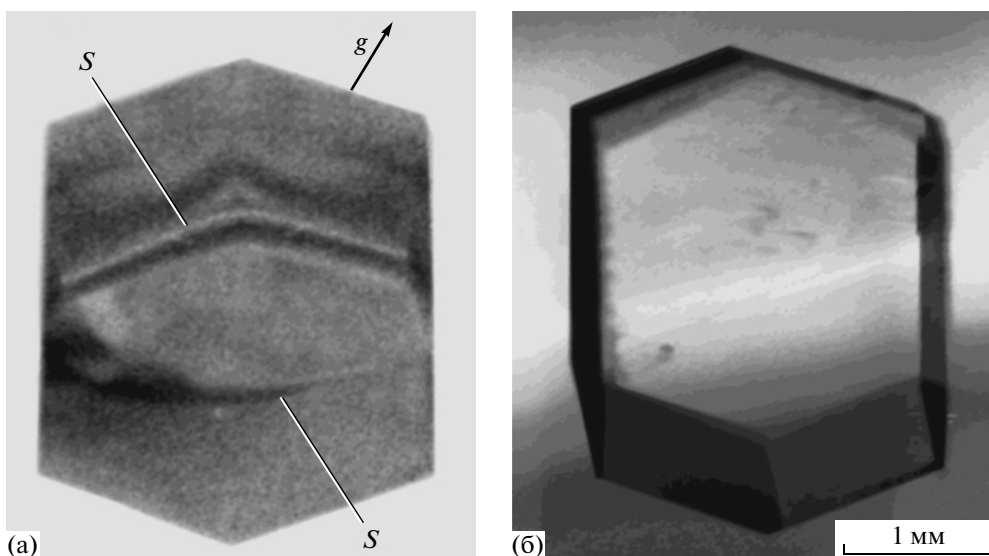


Рис. 5. Рентгеновская топограмма (а) и фотография (б) кристалла тетрагонального лизоцима.

сколько морфологические процессы на каждой грани индивидуальны, и даже если они являются следствием колебаний условий роста, то многое зависит от расположения источников роста на гранях, их количества и мощности, которая может быть различной. Впрямую колебания температуры и пересыщения практически не оказывают влияния на однородность неорганических кристаллов при росте из растворов.

Объяснение наблюдаемого факта, возможно, заключается в том, что, как показано в ряде публикаций (например, [13]), при $\sigma > 4$ в кристаллах лизоцима преобладает рост по механизму двумерного зарождения.

Действительно, при высокой скорости образования зародышей (грань является кинетически шероховатой) нормальная скорость роста [29]:

$$R = \beta \sigma^{5/6} \exp(-\delta\Phi_c/3k_B T), \quad \delta\Phi_c = \frac{\pi\Omega\alpha_l^2 h}{k_B T \sigma}, \quad (1)$$

где $\delta\Phi_c$ – работа образования зародыша, β – кинетический коэффициент ступени, h – высота элементарной ступени, α_l – поверхностная энергия, Ω – объем одной молекулы, k_B – константа Больцмана. Для лизоцима величина [4]:

$$\alpha_l \sqrt{h\Omega} \approx 3k_B T, \quad (2)$$

откуда $\delta\Phi_c/3k_B T \cong \frac{10}{\sigma}$. Тогда при росте по механизму двумерного зарождения с учетом линейного приближения экспоненты при $\sigma \approx 10$

$$R_{2D} \cong \beta \sigma^{11/6}. \quad (3)$$

При росте по дислокационному механизму

$$R = \beta \frac{hk_B T}{19\alpha_l \Omega} \sigma^2. \quad (4)$$

С учетом (2) получаем

$$R = \beta \frac{\alpha_l h^2}{171k_B T} \sigma^2. \quad (5)$$

Для тетрагонального лизоцима $\Omega \approx 3 \times 10^{-20} \text{ см}^3$, $h \approx 6 \times 10^{-7} \text{ см}$ [30]. Из (2) можно получить $\alpha_l \approx 0.9 \text{ эрг/см}^2$. Тогда скорость роста тетрагонального лизоцима по дислокационному механизму

$$R_d \approx 4 \times 10^{-2} \beta \sigma^2. \quad (6)$$

Согласно [31], в стационарном режиме роста при наличии конвекции в жидкой фазе эффективный коэффициент распределения примеси

$$k_{eff} = \frac{c_S}{c_\infty} = \frac{k}{k + (1-k)\exp(-\Delta)}, \quad \Delta = \frac{R\delta}{D}, \quad (7)$$

где c_S – концентрация примеси в твердом теле, c_∞ – концентрация примеси в растворе за пределами пограничного диффузионного слоя, k – равновесный коэффициент распределения примеси,

D – коэффициент диффузии. Отсюда в первом приближении

$$\begin{aligned} dc_S &= c_\infty \frac{\delta}{D} \frac{(1-k)\exp(-\Delta)}{(k + (1-k)\exp(-\Delta))^2} dR = \\ &= c_\infty \frac{\delta}{D} \frac{k_{eff}}{k} (1 - k_{eff}) dR. \end{aligned} \quad (8)$$

С учетом (3) и (6) имеем для механизмов двумерного зарождения и дислокационного роста соответственно

$$(dc_S)_{2D} = \frac{11}{6} c_\infty \frac{\delta}{D} \frac{k_{eff}}{k} (1 - k_{eff}) \beta \sigma^{5/6} d\sigma, \quad (9a)$$

$$(dc_S)_d = 8 \times 10^{-2} c_\infty \frac{\delta}{D} \frac{k_{eff}}{k} (1 - k_{eff}) \beta \sigma d\sigma. \quad (9b)$$

Как можно видеть из (9), при двумерном зарождении ($\sigma \sim 10$) вариации концентраций примеси в кристалле примерно в 100 раз больше, чем при росте по дислокационному механизму ($\sigma \sim 1$) при одинаковых колебаниях пересыщения. Это объясняет наблюдаемую картину зонарности в данном случае: при росте в условиях двумерного зарождения вариации скорости роста приводят к весьма заметному изменению концентрации примеси в кристалле, а поскольку изменение пересыщения меняет скорость роста всех граней, то зонарность носит характер непрерывных линий, параллельных всему фронту кристаллизации. При росте по дислокационному механизму изменения вхождения примеси в кристалл при колебаниях скорости роста очень малы и преобладающее значение приобретают морфологические факторы, обеспечивающие значительно большую неоднородность за счет анизотропии скоростей роста вицинальных секторов и различия в захвате примеси ступенями различной ориентации.

Отметим, что ранее характер зонарной неоднородности кристаллов, растущих в условиях двумерного зарождения, не исследовался главным образом в силу сложности реализации этого механизма для неорганических кристаллов.

Выполненное рассмотрение показывает, что необходимо по возможности снижать величину рабочего пересыщения при кристаллизации белков. Однако в отсутствие конвекции либо при очень слабой конвекции, когда скорость потока сравнима со скоростью роста кристалла, $k_{eff} \approx 1$ [32] и в обоих случаях $dc_S \rightarrow 0$ (формулы (9)). Это показывает важность подавления конвекции для получения совершенных кристаллов белков. Реализовать такие условия удастся, например, при использовании микрогравитации либо при проведении кристаллизации в тонких капиллярах.

Отдельного упоминания заслуживает отсутствие изображений дислокаций на топограмме (рис. 5). Поскольку экстинкционная длина использованного отражения примерно в 4 раза

меньше толщины кристалла, а отражающие плоскости не параллельны вектору Бюргерса дислокаций в кристаллах тетрагонального лизоцима, т.е. направлению [110] [12], то условия для их наблюдения полностью выполнены. Поэтому уверенно можно полагать, что данный кристалл не содержит дислокаций. Можно предположить, что это связано с реализацией механизма двумерного зарождения. Кристаллы белков растут в кинетическом режиме, а значит, распределение пересыщения вдоль грани достаточно однородно, что исключает морфологическую нестабильность. Кроме того, при высоких пересыщениях ростовые ступени должны легко преодолевать стопоры, таким образом, не должно быть причин для их изгиба, следовательно, и для захвата включений. Поскольку при росте кристаллов из растворов именно включения – основной источник дислокаций, эти обстоятельства могут объяснять отсутствие дислокаций в исследованном кристалле.

Подтверждением данному выводу могут служить результаты единственной известной авторам работы [33], в которой исследовался рост кристаллов в условиях двумерного зарождения. Приведенные в ней топограммы кристаллов ADP также демонстрируют отсутствие дислокаций.

ВЫВОДЫ

Проведено рентгенотопографическое исследование кристалла тетрагонального лизоцима при пересыщениях $\sigma \sim 10$ с известной историей роста. Обнаружено, что при изменении пересыщения в кристалле формируются полосы зонарной неоднородности кинетического типа, характерные для кристаллов, растущих по нормальному механизму. Данное обстоятельство связывается с ростом кристалла по механизму двумерного зарождения, что приводит к сильной зависимости коэффициента распределения примеси от колебаний скорости роста. Показано, что при росте по дислокационному механизму кинетическая неоднородность примерно на 2 порядка слабее.

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ (Госконтракт № 16.513.12.3014) и Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 11-02-12120-офи-м-2011). Синхротронные исследования выполнены на оборудовании Центра коллективного пользования “Курчатовский центр синхротронного излучения и нанотехнологий” в рамках государственного контракта № 16.552.11.7003.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Robert M.C., Capelle B., Lorber B., Giegé R. // J. Cryst. Growth. 2001. V. 232. P. 489.
2. Chernov A.A. // J. Cryst. Growth. 1997. V. 174. P. 354.
3. Chernov A.A. // J. Cryst. Growth. 1999. V. 196. P. 524.
4. Kurihara K., Miyashita S., Sazaki G. et al. // J. Cryst. Growth. 1999. V. 196. P. 904.
5. Caylor C.L., Dobrianov I., Lemay S.G. et al. // Proteins: Struct., Funct., Genet. 1999. V. 36. P. 270.
6. Smolsky I.L., Voloshin A.E., Zaitseva N.P. et al. // Philos. Trans. Roy. Soc. London. A. 1999. V. 357. P. 2631.
7. Yoshizaki I., Nakamura H., Sato T. et al. // J. Cryst. Growth. 2002. V. 237–239. P. 295.
8. Izumi K., Sawamura S., Ataka M. // J. Cryst. Growth. 1996. V. 168. P. 106.
9. Lorber B., Sauter C., Ng J.D. et al. // J. Cryst. Growth. 1999. V. 204. P. 357.
10. Otalora F., Garcia-Ruiz J.M., Gavira J.A., Capelle B. // J. Cryst. Growth. 1999. V. 196. P. 546.
11. Gallagher D.T., Stover C., Charlton D. et al. // J. Cryst. Growth. 2003. V. 255. P. 403.
12. Mukobayashi Yu., Kitajima N., Yamamoto Yu. et al. // Phys. Status Solidi. A. 2009. V. 206. № 8. P. 1825.
13. Vekilov P.G., Rosenberger F. // J. Cryst. Growth. 1996. V. 158. P. 540.
14. Vekilov P.G., Rosenberger F., Lin H., Thomas B.R. // J. Cryst. Growth. 1999. V. 196. P. 261.
15. Vekilov P.G., Monaco L.A., Rosenberger F. // J. Cryst. Growth. 1995. V. 148. P. 289.
16. Nakada T., Sazaki G., Miyashita S. et al. // J. Cryst. Growth. 1999. V. 196. P. 503.
17. Rong L., Yamane T., Niimura N. // J. Cryst. Growth. 2000. V. 217. P. 161.
18. Malkin A.J., Kuznetsov Yu.G., McPherson A. // J. Cryst. Growth. 1999. V. 196. P. 471.
19. Yau S.-T., Thomas B.R., Vekilov P.G. // J. Cryst. Growth. 2001. V. 232. P. 188.
20. Matsuzuki Y., Kubota T., Liu X.Y. et al. // J. Cryst. Growth. 2002. V. 242. P. 199.
21. Chernov A.A., Rashkovich L.N., Yaminski I.V., Gvozdev N.V. // J. Phys.: Condens. Matter. 1999. V. 11. P. 9969.
22. Dold P., Ono E., Tsukamoto K., Sazaki G. // J. Cryst. Growth. 2006. V. 293. P. 102.
23. Forsythe E.L., Snell E.H., Malone C.C., Pusey M.L. // J. Cryst. Growth. 1999. V. 196. P. 332.
24. Burke M.W., Judge R.A., Pusey M.L. // J. Cryst. Growth. 2001. V. 232. P. 301.
25. Tsekova D., Dimitrova S., Nanev C.N. // J. Cryst. Growth. 1999. V. 196. P. 226.
26. Carpinetia M., Piazza R. // Phys. Chem. Chem. Phys. 2004. V. 6. P. 1506.
27. Galkin O., Vekilov P.G. // J. Cryst. Growth. 2001. V. 232. P. 63.
28. Волошин А.Э., Руднева Е.Б., Смольский И.Л. и др. // Физика кристаллизации. К столетию Г.Г. Леммлейна / Под ред. Ковальчука М.В. и др. М.: ИК РАН, 2002. С. 14.
29. Чернов А.А., Гиваргизов Е.И., Багдасаров Х.С. и др. Современная кристаллография / Под ред. Вайнштейна Б.К. М.: Наука, 1980. Т. 3. 407 с.
30. Rong L., Yamane T., Niimura N. // J. Cryst. Growth. 2000. V. 217. № 1. P. 161.
31. Burton J.A., Prim R.C., Slichter W.P. // J. Chem. Phys. 1953. V. 21. № 11. P. 1987.
32. Tiller W.A., Jackson K.A., Rutter J.W., Chalmers B. // Acta Metall. 1953. V. 1. № 2. P. 428.
33. Кузнецов Ю.Г. Дисс. “Кинетика роста кристаллов ADP и рентгеновская топография дефектов” канд. физ.-мат. наук. Москва, 1987. 159 с.