МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования

«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ИНСТИТУТ ФИЗИКИ

КАФЕДРА МЕДИЦИНСКОЙ ФИЗИКИ

Направление подготовки: 03.03.02 – Физика

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

(Бакалаврская работа)

Установление пространственной структуры элонгационного фактора *P* из патогенной бактерии *Staphylococcus aureus* (золотистого стафилококка) методом рентгеноструктурного анализа

Работа завершена:
«19» июня 2020 г._____(Хайбрахманова Ю.А.)

Работа допущена к защите:
Научный руководитель: –
канд. физ.-мат. наук,
вед. науч. сотр.
«19» июня 2020 г._____(Усачев К.С.)

Зав. кафедрой
медицинской физики,
профессор
«19» июня 2020 г._____(Асанов А.В.)

Казань - 2020

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ 4

ГЛАВА 1. ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ 8

1.1 Золотистый стафилококк 8

1.2 Элонгационный Фактор Р *(EF-P) Staphylococcus aureus* 9

1.4.1 Методика получения белковых кристаллов 13

1.5 Рентгеновское и синхротронное излучения. Схема строения рентгеновской трубки 16

1.5.2 Синхротронное излучение 19

1.6 Некоторые сведения о кристаллах. Элементарная ячейка. Решетка Бравэ 21

1.6.1 Решетки Бравэ 24

1.7 Закон Брэгга 26

1.8 Сфера Эвальда 28

1.9 Рассеяние рентгеновских лучей кристаллом 31

1.10 Уравнение электронной плотности 33

1.11 Фазовая проблема 34

1.12 Метод молекулярного замещения 36

2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ 38

2.1 Объект исследования 38

2.2 Методики использованные в исследовании 39

2.2.1. Трансформация компетентных клеток E. Coli 39

2.2.3 Выделение белка *EF-P* в питательной среде LB 39

2.2.4 Очистка белка *EF-P* 40

2.2.5 Буферные растворы и реактивы 42

2.2.6 Кристаллизация белка *EF-P* 43

2.2.7 Обработка карт электронной плотности методом молекулярного замещения 46

РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ 48

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ 50

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ 51

ВВЕДЕНИЕ

Одной из ключевых задач в настоящее время является исследование структуры макромолекулы и объяснение ее биологической функции. Есть огромный класс очень важных биологических макромолекул, в частности - это молекулы белка. Задача определения молекулярной структуры решается благодаря развитию таких современных физических методов исследования трехмерной структуры молекул, как рентгеновская дифракция, криоэлектронная микроскопия и ядерный магнитный резонанс. Представленные методы позволяют визуализировать механизмы, происходящие в живых системах на молекулярном уровне.

Наиболее распространенным и первым по историческим данным методом является рентгеноструктурный (РСА) анализ кристаллов биологических молекул, с помощью которого производится расшифровка трёхмерной структуры белков, нуклеиновых кислот и других макромолекул. Общий принцип метода заключается в том, что исследуемый объект помещают в пучок рентгеновских лучей, и измеряют интенсивность рассеянного рентгеновского излучения электронами, принадлежащим атомам кристаллической решетки, в различных направлениях. Как правило, белковые молекулы в естественных условиях кристаллов не образуют. Чтобы добиться регулярного расположения белков, их кристаллизуют и затем исследуют структуру. В целом, сейчас точность таких методов достигает 80-

90%. Также РСА позволяет установить наиболее тонкие характеристики атомных структур.

Экспериментальные методы определения пространственной структуры позволяют получать информацию о трехмерном строении молекулы в нативном состоянии. Одним из наиболее важных этапов для экспериментальных методов является получение образца (его выделение, очистка и иные молекулярные манипулирования) и подбор условий эксперимента. В методе РСА – это подбор условий для роста дифрагирующего кристалла. [1] Поэтому, рентгеновская дифракция является одним из важнейших инструментов для изучения трехмерной структуры биологических макромолекул.

Золотистый стафилококк (*Staphylococcus aureus*) - один из видов стафилококковых бактерий, является одним из наиболее опасных патогенов, вызывающий широкий спектр серьезных инфекций, который колонизирует и заражает как госпитализированных пациентов со сниженным иммунитетом, так и здоровых иммунокомпетентных людей. Данный вид бактерий может стать причиной развития огромного ряда заболеваний — от самых незначительных до смертельно опасных инфекций кожи, сердечно-сосудистой, дыхательной, мочеполовой систем и т.д. Вызванные им инфекции особенно трудно поддаются лечению и данный возбудитель заболеваний представляет значительную угрозу для здоровья человека.

Возникновение подобных вирулентных и резистентных штаммов бактерий приводит к необходимости постоянной разработки новых антибактериальных препаратов, способных воздействовать на синтезирующий аппарат клетки и рибосому в том числе. Задача определения пространственной структуры белковых молекул, объяснение в деталях механизмов синтеза белка и их регуляцию, представляет возможность для разработки новых лекарственных препаратов.

Объектом исследований стал белковый фактор элонгации *EF-P.* Фактор элонгации *P* (*EF-P)* представляет собой белок из трех доменов, который связывается с рибосомой между сайтами P и E. *EF-P* патогенного *S. auerus* обеспечивает специализированную трансляцию белков с пролипролиновыми участками. Белки с такими участками часто вовлечены в процессы секреции, в том числе и факторов патогенности микроорганизмов, участвуют в различных клеточных процессах, а также влияют на стрессоустойчивость и вирулентность бактерии.

Целью данной работой является выделение и очистка белкового фактора P (*EF-P*) из золотистого стафилококка для установление пространственной структуры методом рентгеноструктурного анализа.

В соответствии с обозначенной выше целью, работа имеет следующие задачи:

-Выделение рекомбинантного белка EF-P в клетках *E. coli* и его очистка методами аффинной и эксклюзионной хроматографий;

-Поиск условий кристаллизации и заморозки белка EF-P;

-Решение структуры белка EF-P методом рентгеноструктурного анализа.

Работа разделена на 2 главы. В первой главе даются теоретические сводки, а вторая глава описывает ход экспериментальной части, результаты и выводы.

ГЛАВА 1. ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

1.1 Золотистый стафилококк

Название стафилококков происходит от греческих слов “staphylos” – виноград, гроздь и “coccos” – ягода, зерно. Среди стафилококков выделяют патогенные виды, в частности, S. aureus. Морфологически стафилококков относят к грамположительным, не спорообразующим факультативным бактериям, которые растут путем аэробного дыхания или ферментации. Бактерии имеют диаметр 0,5-1,5 мкм, характеризующиеся отдельными кокками, которые делятся более чем на одну плоскость, как правило, расположенных в виноградных гроздьях. Род стафилококков подразделяется на 32 вида и 24 подвида. Бактерии хорошо культивируются в лабораторных условиях при 37°C. На плотных средах образуют круглые ровные колонии кремового, желтого цвета. Золотистый стафилококк способен вызывать широкий спектр инфекций, которому характерны острые, агрессивные, местно-деструктивные гнойные поражения. S.aureus, безусловно, является наиболее вирулентным видом и устойчивым к множествам антибактерильных препаратов, а также способность к приобретению резистентности к антибиотиками нацеливает на разработку новых антибиотиков, механизмы действия которых направлены на подавление синтеза белка.[2] Ввиду этого, для большинства антибиотиков характерно наличие конкретной молекулы мишени, образования нескольких контактов в

активном центре которой достаточно для того, чтобы маленькая по сравнению с мишенью молекула антибиотика полностью ингибировала ее активность. За последнее десятилетие изменение структуры резистентности S. aureus подчеркнуло необходимость в новых противомикробных препаратах. Данные о структуре комплексов антибиотика и мишени помогают понять фундаментальные основы механизма действия, а также позволяют проводить рациональное усовершенствование антибактериального агента. [4]

1.2 Элонгационный Фактор P *(EF-P) Staphylococcus aureus*

Во всех живых организмах синтез белка осуществляется большой макромолекулярной машиной, известной как рибосома. Все рибосомы содержат две субъединицы: большую субъединицу, известную как 50S у бактерий (60S у эукариот), которая содержит активный сайт фермента, и небольшую субъединицу, известную как 30S (40S в эукариотах), в которой происходит кодон-антикодоновое узнавание. Эти субъединицы могут обратимо объединяться в полные рибосомы 70S или 80S. Синтез белка происходит посредством связывания т-РНК, и связанных с ними аминокислот с рибосомой в порядке, определяемой матричной РНК (м-РНК). Во время этого процесса, известного как трансляция, т-РНК движутся

последовательно через три сайта связывания рибосомы: аминоацильный (A) , пептидильный (P) и выходной (E) сайты . [5] Для обеспечения точности и эффективности синтеза требуются не только рибосомы, но и специальные белковые факторы, необходимые на разных этапах трансляции. У прокариот одним из таких факторов является *EF-P*, у эукариот имеется аналог этого фактора *eIF5A* (рис 1.1 *а*). [6] *EF-P* – трехдоменный белок, по форме напоминающий т-РНК. Структурное сходство *EF-P* с т-РНК – пример молекулярной мимикрии. (рис 1. *б*). Данный белок связывается с рибосомой между P и E участками рибосомы и располагается непосредственно P-сайте, и вплотную примыкает к т-РНК. (P-тРНК). Считается, что *EF-P* ускоряет трансляцию специализированных аминокислотных последовательностей, в состав которых входят полипролиновые участки, такие как, например PPP и APP. И отсутствие *EF-P* или же нарушение его функции, вызванная потерей его посттрансляционной модификации (PTM), приводит к значительному снижению жизнеспособности клеток [6]

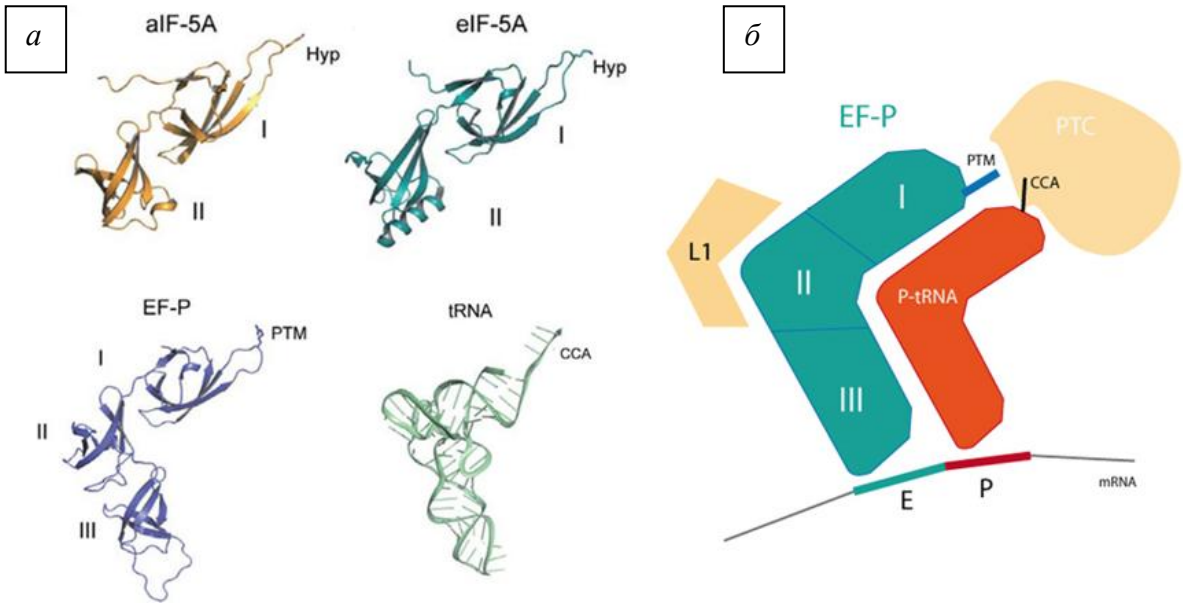

Рис. 1.1 а – Структура *EF-P* в сравнении с его аналогами у архей и эукариот (*aIF5A* и *eIF5A* соответственно); **б** – Схематичное изображение расположения *EF-P* в соответствии с контактирующими структурами внутри рибосомы **[6]**

Из-за жизненно важного значения *EF-P* в центральных процессах, связанных с синтезом белка бактериального *S. aureus*, данный белок может стать платформой для разработки перспективной лекарственной мишени для борьбы с растущей антибиотикорезистентностью *S. aureus*.

1.3 Белковая рентгеновская кристаллография

Анализ структуры белков является достаточно сложной проблемой и весьма увлекательной областью исследований в сфере естественных наук. Разработаны различные экспериментальные методы и подходы к решению задач структурного анализа. Учитывая внутреннее строение белковой молекулы, так как размеры атомов и расстояния между ними измеряются несколькими ангстремами (1Å = 1·10–10 м; 1 нм = 1·10–9 м), то для

определения трехмерной структуры конкретного белка с атомарной точностью его кристаллизованной формы является метод рентгеноструктурного анализа. Длина волны рентгеновских лучей, используемых в белковой кристаллографии близка к 1Å, поэтому данный экспериментальный способ позволяет наиболее точно определить локализацию многих атомов исследуемого белка и идентификации большей части боковых групп. Трехмерная структура белка имеет решающее значение для определения функциональности белка. В свою очередь успешная расшифровка пространственной структуры зависит от качества и величины полученного кристалла белка.[7]

1.4 Кристаллизации белка

Кристаллизация белка является значимым этапом в определении трехмерной структуры макромолекулы. При кристаллизации возникает ряд таких проблем, как: достижения точки пересыщения, при которой образуются кристаллы, и выращивание кристаллов необходимой величины. Процесс кристаллизации зависит от изменения растворимости с концентрацией белка, температуры растворителя, ионной силы, величины pH и связывания белком противоинов. Скорость образования зародышей, а следовательно, число и размеры кристаллов зависят от степени пересыщения раствора белка.[8]

1.4.1 Методика получения белковых кристаллов

Предельно важнейшим шагом в макромолекулярных кристаллографических исследованиях является получение монокристаллов. Кристаллизация достигается путем медленного приведения образца из состояния пересыщения в кристаллическое состояние, избегая неспецифической агрегации. Различают несколько методов получения кристаллов белка, но одним из наиболее широко используемых методов является метод, основанный на диффузии паров. Специфика данного метода заключается в том, что раствор осадителя, содержащий в меньшей мере компоненты буфера и соли, смешивают с раствором белка (в соотношении 1:1) , содержащим очищенные белковые комплексы и оставляют для уравновешивания. Это приводит раствор белка в состояние перенасыщения. Происходит переход в метастабильную зону, характеризующий процесс кристаллизации (образование кристаллов и их рост). В целом, медленное введение кристаллизационного раствора в белковый комплекс приводит к образованию более крупных кристаллов с меньшим количеством дефектов.[10]

Метод диффузии паров различают в нескольких модификациях, но наиболее применимые: диффузия паров в модификации «сидячая капля» и диффузия паров в модификации «висячая капля» (рис 1.2 *а* и *б*). В данной работе был осуществлен метод диффузии паров в модификации «висячая

капля». Перейдем к подробному рассмотрению метода. Капля образца, смешанная с реагентом наносится на силиконизированную стеклянную поверхность.

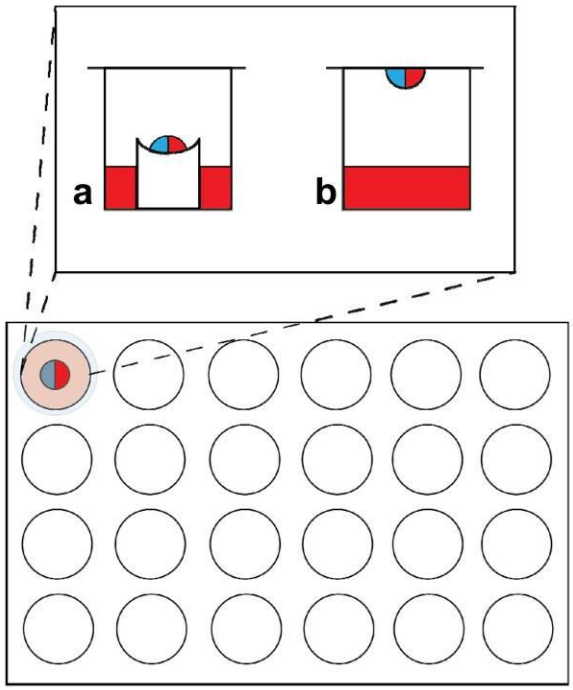

Рис. 1.2 а – Диффузия пара «сидячая капля»; **б** – Диффузия пара «висячая капля»[10]

Затем поверхность с каплей следует перевернуть над резервуаром, чтобы капля находилась в «висячем» состоянии. Начальная концентрация реагента в капле меньше, чем в резервуаре (рис 1.3).[11]

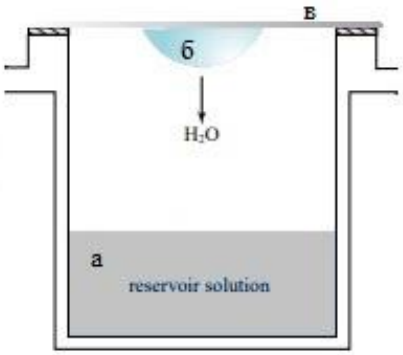

Рис. 1.3 – Кристаллизация белка в модификации «висячая капля»: **а** – резервуар с реагентом; **б** – капля образца (общий объем капли составляет 1/100 от объема реагента в резервуаре); **в** – стекло

Со временем вода начнёт испаряться из менее концентрированного раствора в капле в более концентрированный раствор в резервуаре. Благодаря чему концентрация реагента в капле постепенно начнёт нарастать, пока не будет достигнуто равновесие между каплей и раствором в резервуаре.[12]

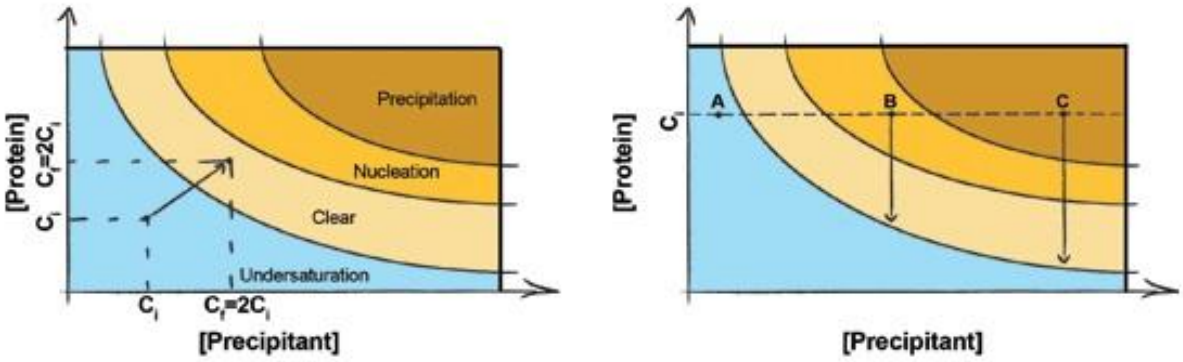

Рис. 1.4 – Принцип кристаллизации белка. В точке **А** - белок остается ненасыщенным, кристаллы не образуются, в точке **В** - происходит зародышеобразование белка, начинают образовываться кристаллы -

насыщение. Точка **C** - белок выпадает в осадок, но кристаллы могут расти.[12]

1.5 Рентгеновское и синхротронное излучения. Схема строения рентгеновской трубки

Большинство существующих в данное время источников рентгеновского излучения имеют следующую схему строения: термоэмиссионный катод, металлическая анодная часть, окна для выхода рентгеновского излучения, колба, изолирующая анодную часть трубки от катодной, выводы катода, к которым подводится напряжение накала, а также высокое (относительно анода) напряжение, электростатическая система фокусировки электронов, анод и, наконец, патрубки для ввода и вывода воды (рис 1.3).[13] Рентгеновские лучи генерируются в электронно-лучевой трубке путем нагревания нити накала до высокой температуры для испускания электронов. Электроны ускоряются в направлении анода благодаря высокой разности потенциалов, поддерживаемое между катодом и анодом. Для уменьшения вероятности столкновения электронов с атомами газа, необходим очень высокий вакуум. Подвергаемый электронной бомбардировке анод без охлаждения может нагреваться вплоть до температуры плавления. Поэтому анодный узел обычно является полым и охлаждается водой.[14] При соударении электронов с атомами вещества,

значительная часть их энергии преобразуется в тепло, а оставшаяся часть излучается в виде рентгеновских лучей.

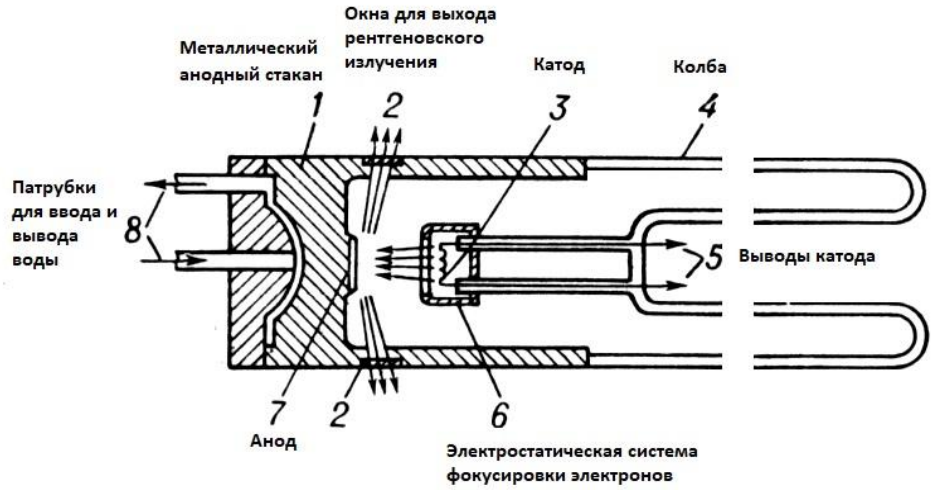

Рис 1.5 – Схема рентгеновской трубки для структурного анализа[13]

Когда электроны приобретают достаточную энергию для смещения электронов внутренней оболочки материала мишени, создаются характерные рентгеновские спектры. Рентгеновский спектр, генерируемый в типичной рентгеновской трубке, показан на (рис. 1.6). Спектр состоит из нескольких интенсивных пиков, так называемых характерных спектральных линий и непрерывной составляющей спектра. Непрерывная составляющая спектра рентгеновской трубки образуется при торможении ускоренных электронов в материале анода. При этом длина волны частиц будет минимальной (λ_{min}) и определяться следующей формулой:

$$\lambda_{min} = \frac{hc}{eV} = \frac{12.4}{V} \quad (1)$$

λ выражена в Å, а V- в вольтах. [15]

Резкие пики в спектре обусловлены результатом перехода электронов с верхних энергетических уровней в ядре атома на свободные нижние энергетические уровни в атомах анодного материала, при столкновении с ускоренными электронами. Переходы от оболочек L и M к оболочке K, т.е. L → K и M → K и обозначены как K_α и K_β излучения. Компонента K_α состоит из двух характерных линий, обозначенных как $K_{\alpha1}$ и $K_{\alpha2}$ (рис 1.6). [15] Высота пиков и относительная интенсивность излучения монотонно растет с ростом ускоряющего напряжения V рентгеновской трубки.[16]

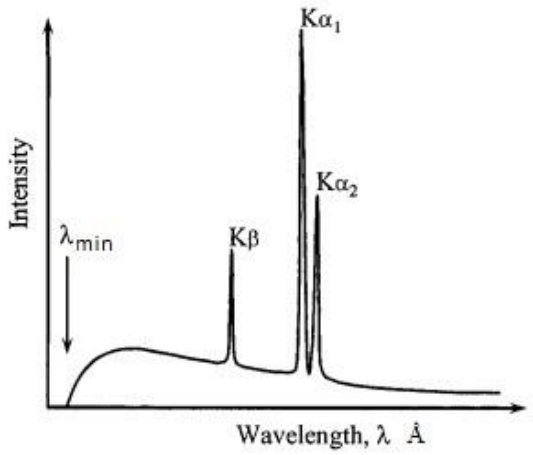

Рис. 1.6 - Схема типичного спектра рентгеновского излучения; непрерывный спектр и трех характерных линий: Kα1 , Kα2 и Kβ [15]

1.5.2 Синхротронное излучение

Благодаря исключительным характеристикам синхротронное излучение является одним из наиболее мощных инструментов для исследований. Наиболее мощными источниками синхротронного излучения являются высокоэнергетические, электронные или позитронные кольцевые ускорители, подобные накопительным кольцам. Схематично синхротрон устроен так — это электровакуумная кольцевая установка. Когда пучки электронов или других заряженных частиц, с релятивистскими скоростями, под действием магнитных полей движутся по криволинейным траекториям, они испускают электромагнитное излучение в направлении своего движения, известное как синхротронное излучение (рис. 1.7).[17] За счет ускорения заряженных частицы к центру кольца, возникает электромагнитное излучение в диапазоне от радиочастотной до коротковолновой рентгеновской области.[18] Электроны могут быть дополнительно ускорены до более высоких энергий радиочастотными полями. Когда электроны достигают ожидаемой энергии, они переходят в квазистационарное состояние. Заряженные частицы, следуя по круговым траекториям изгибающихся магнитов, теряют во время каждого поворота часть своей энергии, испуская синхротронное излучение. Энергия, потерянная таким образом, полностью восстанавливается при прохождении через радиочастотные полости.

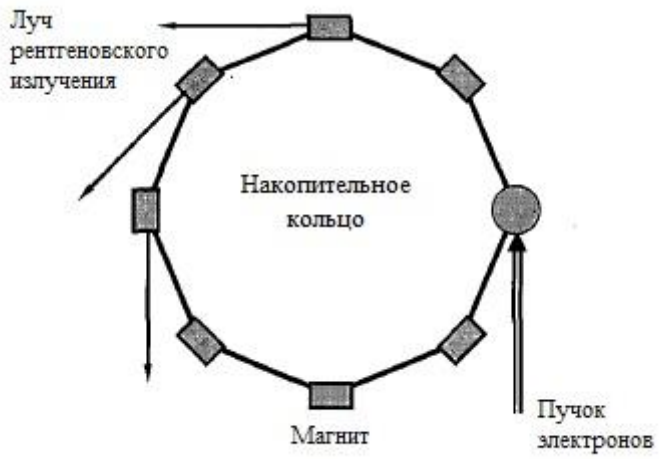

Рис. 1.7 - Схема синхротрона**[15]**

Весьма важным преимуществом источников синхротронного излучения, помимо чрезвычайно высокой яркости рентгеновского излучения, является зависимость от длины волны распространении интенсивности пучка (рис. 1.8).

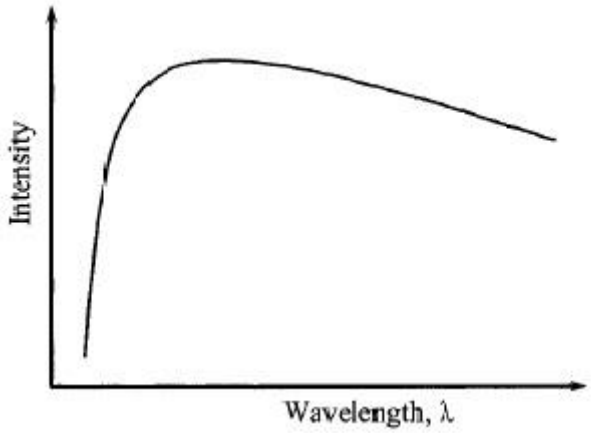

Рис. 1.8 – зависимость распространения интенсивности пучка от длины волны

1.6 Некоторые сведения о кристаллах. Элементарная ячейка. Решетка Бравэ

Трехмерная кристаллическая решетка - это математическая модель, которая не только позволяет описать структуру любого кристаллического материала, но и определяет его основные физико-химические свойства. Любой кристалл может быть представлен как периодически повторяющаяся в пространстве кристаллическая решетка. Наименьшая повторяющаяся единица в кристалле, называется элементарной ячейкой. Элементарные ячейки должны образовывать плотную упаковку без каких-либо дефектов, т.е они должны быть достаточно упорядочены, чтобы получить хорошую дифракцию.[19] Трансляционная инвариантность, периодичность и наличие решетки являются эквивалентными и взаимозаменяемыми свойствами, которые характеризуют все кристаллы. Кристаллическая решетка характеризуется следующими параметрами элементарной ячейки: тремя трансляционными некомпланарными векторами **a, b** и **c**,(и их длинами a, b, c) направленными вдоль x, y, z и тремя углами α, β и γ. (рис. 1.9) Учитывая, что в общем случае a≠b≠c и α≠β≠γ≠ 90°.[19]

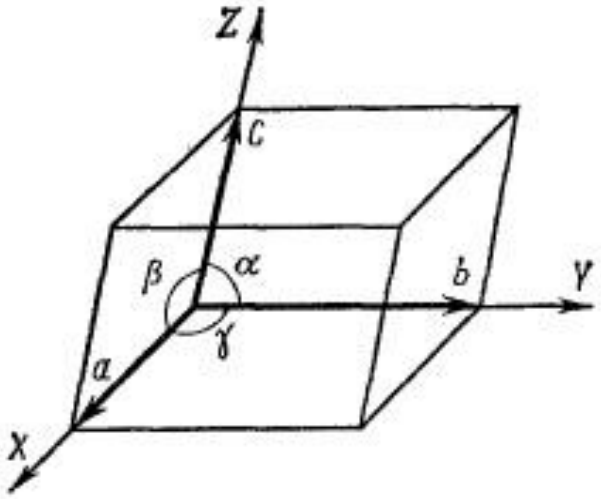

Рис. 1.9 - Элементарная ячейка

Для описания кристаллических структур применяется метод кристаллического индицирования. Любую кристаллическую решетку можно представить бесконечным набором узловых плоскостей, расположенных на равном расстоянии. В качестве характеристики ориентации плоскости и набора параллельных плоскостей атомов в кристалле вводятся обозначения индексов Миллера, группа из трех чисел (h, k, l). В первую очередь необходимо выбрать плоскость, являющуюся наиближайшей к началу координат. Пересекающиеся ребра одной из элементарных ячеек определяют набор кристаллографических осей, а индексы Миллера определяются пересечением плоскости a/h, b/k, c/l по ортогональным осям x, y, z соответственно. [20, 21] Уравнение, описывающее эту плоскость в терминах параметров решетки a, b, c элементарной ячейки, имеет следующий вид:

$$\frac{x}{a/h}+\frac{y}{b/k}+\frac{z}{c/l}=1 \qquad (2)$$

Например, плоскость, параллельная двум осям, но пересекающую третью ось на длине, равную одному ребру элементарной ячейки, имеет индексы Миллера (100), (010) или (001) в зависимости от среза оси. А плоскость, отсекающая все три оси на длинах, равных ребрам элементарной ячейки, имеет индексы Миллера (111). Индексы направления заключают в квадратные скобки. Так, к примеру, индексы оси x в кубической решетке обозначают [100].

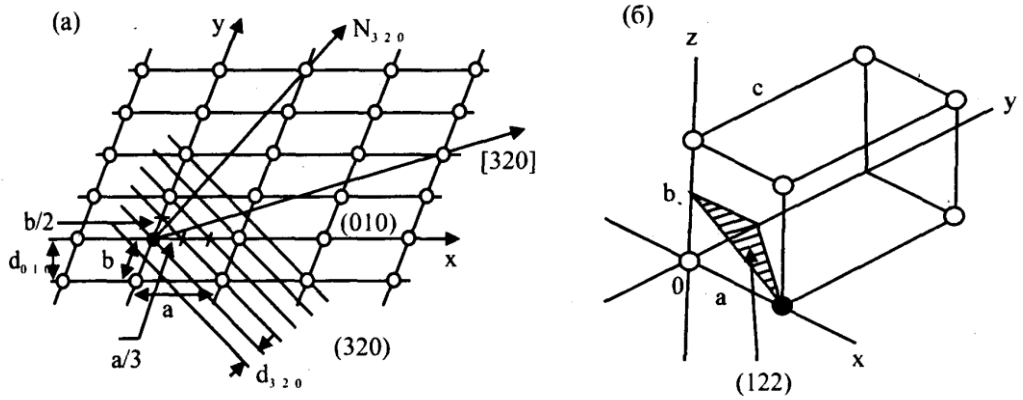

Рис. 1.10 - Примеры индицирования кристаллографических плоскостей; **а** - плоскость, параллельна оси z; **б** - общий случай

1.6.1 Решетки Бравэ

Описание кристаллической структуры в первую очередь подразумевает выбор ячейки, в качестве наименьшей повторяющейся единицы кристалла с его базисными векторами. Необходимы только 7 кристаллографических сингоний для описания огромного массива различных кристаллических структур: триклинных, моноклинных, орторомбических, ромбоэдрических, тетрагональных, гексагональных и кубических. Такое многообразие кристаллических структур можно описать с помощью 14 типов решеток, отличающихся формами элементарных ячеек и симметрией. Такие решетки получили название решеток Бравэ (рис. 1.11). Наиболее распространенные макромолекулярные кристаллические решетки относятся к моноклинным и орторомбическим пространственным группам. В двумерном случае различают всего пять плоских ячеек Бравэ. По характеру взаимного расположения узлов все кристаллические решетки разбиваются на четыре типа: примитивные (P), базоцентрированные (C, B, или A), объемно-центрированные (I), гранецентрированные (F) (рис 1.12). [22]

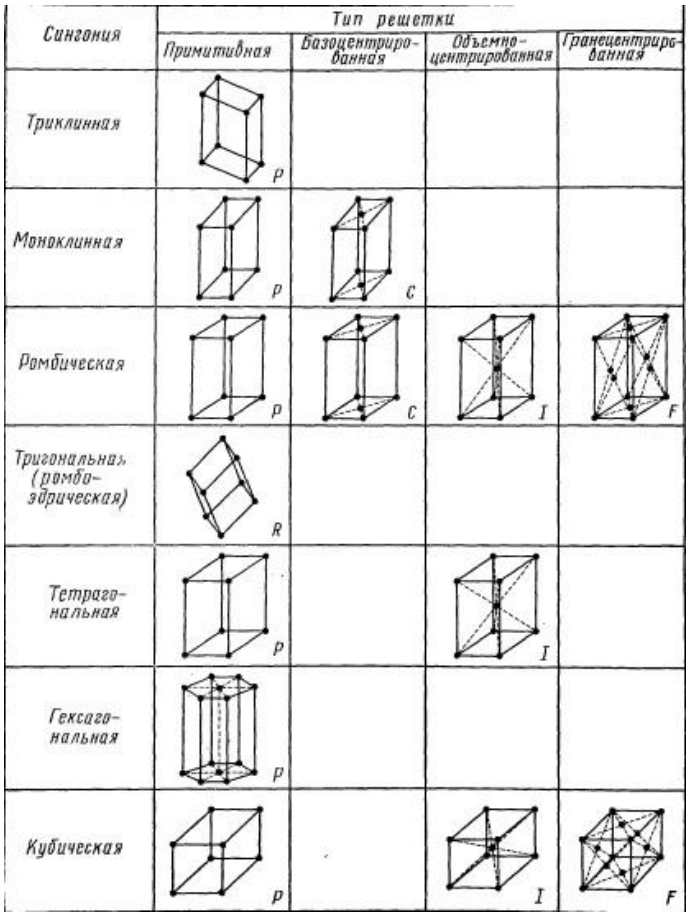

Рис. 1.11 - 14 решеток Бравэ

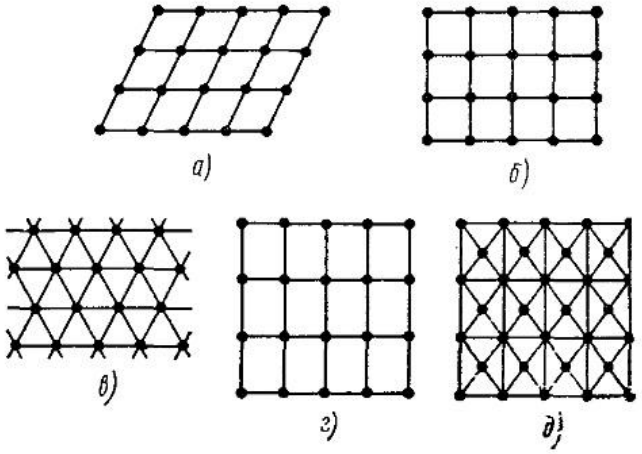

Рис. 1.12 - 5 типов плоских решеток; а - косоугольная решетка, б - квадратная решетка, в - гексагональная решетка, г - прямоугольная решетка, д - прямоугольная центрированная решетка

1.7 Закон Брэгга

Дифракция возникает, когда рентгеновские фотоны взаимодействуют с электронами (в биологической макромолекуле). Электрическое поле рентгеновских фотонов индуцирует внутрифазные дипольные колебания электронов, которые, в свою очередь, порождают когерентно дифрагированное излучение. Брэгг обнаружил, что явление дифракции можно математически рассматривать как отражение лучей параллельными плоскостями, проходящими через точки кристаллической решетки. Когда рентгеновские лучи рассеиваются от кристаллической решетки при определенных углах падения, наблюдается рассеяние рентгеновского излучения, которое соответствует следующим условиям: угол падения равен углу рассеяния и разница в длине пути равна целому числу длин волн. Рассмотрим пару параллельных рентгеновских лучей, падающих на пару горизонтальных параллельных плоскостей, расстояние между которыми равно d, как показано на (рис. 1.13). Параллельные лучи падают на плоскости в фазе. В результате отражения нижний луч проходит дополнительное расстояние, чем верхний и тогда разность путей равна AB + BC. Поскольку падающие лучи параллельны, то OA и OC перпендикулярны AB и BC соответственно, и по простой геометрии $AB = BC = d\sin\theta$. Следовательно, закон Брэгга примет следующий вид:

$$AB + BC = 2dsin\theta = n\lambda \quad (3)$$

где n (целое число), d - межплоскостное расстояние между кристаллами и Θ – угол падения. Условие максимальной интенсивности, содержащееся в законе Брэгга, позволяет вычислить детали о кристаллической структуре или, если известна кристаллическая структура, определить длину волны рентгеновского излучения, падающего на кристалл.

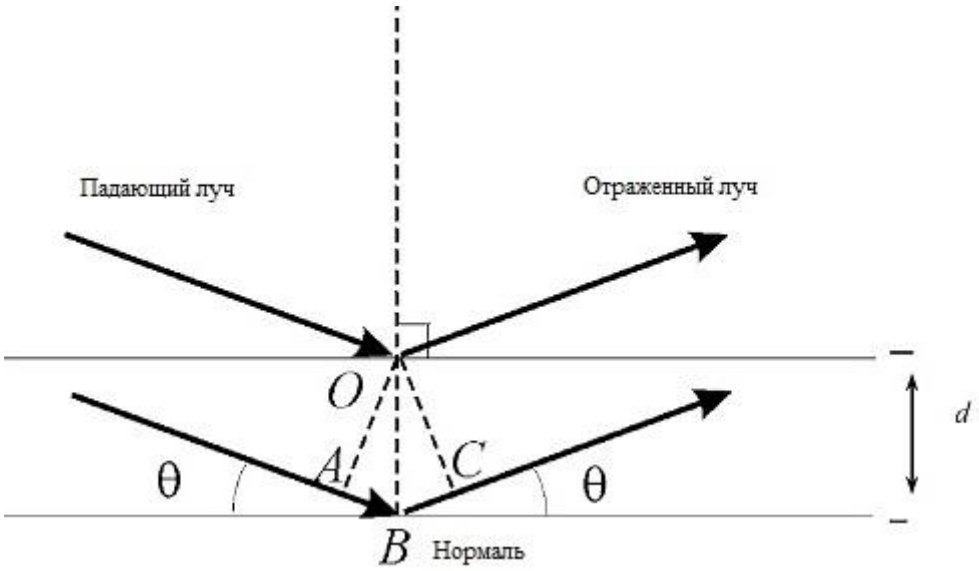

Рис. 1.13 - Закон Брэгга

1.8 Сфера Эвальда

Математически дифракция соответствует преобразованию Фурье, которое приводит к появлению пятен (отражений) в четко определенных позициях. Каждый набор параллельных плоскостей решетки представлен точками, которые имеют расстояние 1/d от начала координат. На (рис. 1.14) показаны две основные плоскости решетки (синие линии) двумерной прямоугольной решетки, которые переходят в набор пятен (синие). Диагонали решетки (зеленые линии) имеют меньшее межплоскостное расстояние и поэтому образуют пятна, которые находятся дальше от начала координат. Полный набор всех возможных отражений кристалла составляют его обратную решетку. Дифракционный принцип, который следует закону Брэгга, может быть интерпретирован геометрической конструкцией, предложенной Эвальдом в 1921 году. Если выбрать на сетке обратной решетки узел и провести через него окружность радиусом 1/λ, то для каждой точки обратной решетки, находящейся на сфере отражения Эвальда, выполняется условие Брэгга и возникает дифракция.

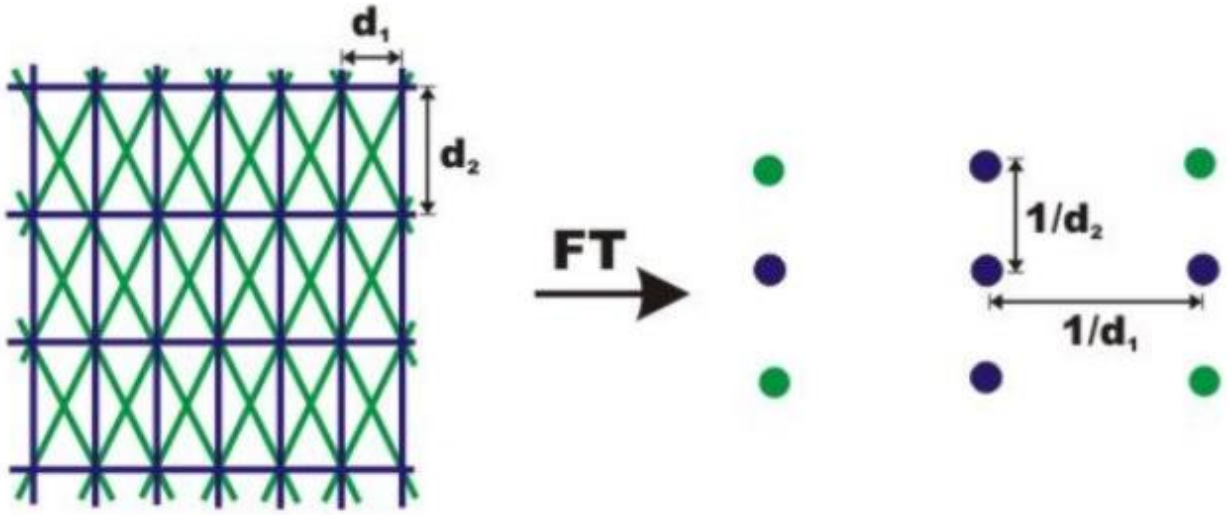

Рис. 1.14 - Обратная решетка

Цель сферы Эвальда - определить, какие плоскости решетки (представленные точками сетки на обратной решетке) приведут к дифрагированному сигналу для данной длины волны. Падающая на кристалл плоская волна имеет волновой вектор $\boldsymbol{K_i}$, длина которого составляет $2\pi/\lambda$. Дифрагированная плоская волна имеет волновой вектор $\boldsymbol{K_f}$. Если в процессе дифракции не была получена или потеряна энергия, тогда $\boldsymbol{K_f}$ имеет ту же длину, что и $\boldsymbol{K_i}$. Разница между волновыми векторами дифрагированной и падающей волн определяется как вектор рассеивания:

$$\Delta \boldsymbol{K} = \boldsymbol{K_f} - \boldsymbol{K_i} \quad (4)$$

Поскольку $\boldsymbol{K_i}$ и $\boldsymbol{K_f}$ имеют одинаковую длину, вектор рассеивания должен лежать на поверхности сферы радиуса $2\pi/\lambda$. Эта сфера называется сферой Эвальда (рис1.15). Это построение позволяет легко найти направление дифракционного максимума.

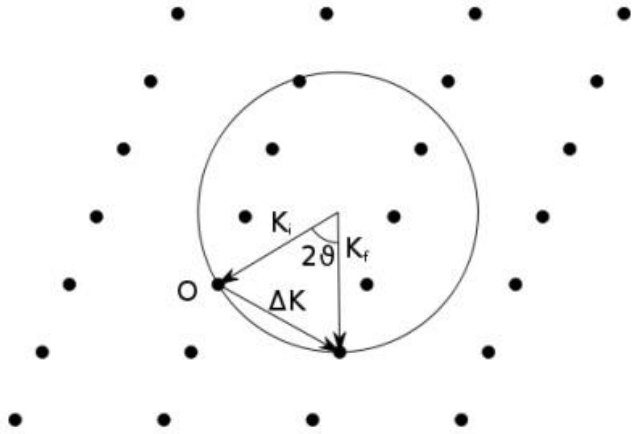

Рис. 1.15 - Сфера Эвальда;

Для того, чтобы наблюдалась дифракция необходимо, чтобы вектор рассеяния был равен обратному вектору решетки. Геометрически это означает, что если начало обратного пространства находится на вершине $\boldsymbol{K_i}$, то дифракция будет происходить только для точек обратной решетки, которые лежат на поверхности сферы Эвальда. Теория обратной решетки и сфера Эвальда являются важными инструментами для построения дифракционной картины.

1.9 Рассеяние рентгеновских лучей кристаллом

Помимо измерения размеров элементарной ячейки важно определить пространственную группу кристалла. Это достигается путем анализа расположения дифракционных пятен, а также симметричных повторений в дифракционных интенсивностях. Рассмотрим рассеяние рентгеновских лучей кристаллом с одной его элементарной ячейки, в которой может находиться несколько атомов разных химических элементов. Амплитуда волны, рассеиваемая кристаллом, определяется как сумма волн, рассеянных всеми его элементарными ячейками. Атомный фактор рассеяния дает уравнение волны рентгеновского излучения рассеянного отдельным атомом. Зная атомные факторы рассеяния и положения атомов в элементарной ячейке, амплитуду рассеяния кристалла можно представить, как суперпозицию волн, рассеянных отдельными атомами ячейки. Элементарная ячейка содержит ограниченное число атомов, распределенных по конкретным позициям, которые можно пометить номерами j. С учетом упомянутых замечаний, уравнение амплитуды рассеяния элементарной ячейки запишется следующим образом и будет называться структурным фактором:

$$\boldsymbol{F} = \sum_{j} \boldsymbol{f}_j \times \boldsymbol{exp}\left(\boldsymbol{i2\pi} \Delta K \cdot r_j \right), \tag{5}$$

где $\boldsymbol{r_j}$ обозначает положение *j*-го атома в элементарной ячейке кристалла, а $\boldsymbol{\Delta K}$ является вектором узла обратной решетки, который меняется дискретно согласно закону Брэгга. Учитывая, что $(\Delta \boldsymbol{K} \cdot \boldsymbol{r_j}) = hx_j + ky_j + lz_j$, то выражение (2) можно записать через индексы узлов решетки *h, k, l* и координаты *x, y, z* атомов в элементарной ячейке кристалла:

$$F_{hkl} = \sum_{j=1} f_j exp\left[\ 2\pi i\left(hx_j + ky_j + lz_j\right)\right] = |F_{hkl}|exp(i\alpha_{hkl}), \tag{6}$$

$$F_{hkl} = \int_{V} \rho(x,y,z)exp\left[\ 2\pi i\left(hx_j + ky_j + lz_j\right)\right] dV, \tag{7}$$

Структурный фактор F представляет собой математическую функцию, описывающую амплитуду и фазу волны, дифрагированной от плоскостей кристаллической решетки, характеризуемой индексами Миллера *h, k, l*. Величина $\boldsymbol{f_j}$ является коэффициентом рассеяния для атома *j*, V – объем элементарной ячейки. Поскольку амплитуда рассеянной волны зависит от распределения по объему элементарной ячейки рассеивающих центров, то структурная амплитуда F характеризует распределение вещества в элементарной ячейке, а следовательно атомную структуру кристалла. В этом

смысле F содержит всю информацию об элементарной ячейке и является фундаментальной характеристикой кристаллической структуры.[23, 24]

1.10 Уравнение электронной плотности

Рентгеновский кристаллографический эксперимент позволяет получить карту электронной плотности для элементарной ячейки кристалла белка. Когда кристалл подвергается воздействию рентгеновских лучей, рентгеновские лучи рассеиваются от электронных облаков атомов в кристаллической решетке, образуя дифракционную картину. Дифрагированные волны от плоскостей рассеяния *h, k, l* описываются структурным фактором. Электронная плотность *ρ(x, y, z)* рассчитывается путем суммирования всех структурных факторов в каждой (*x*, *y*, *z*) позиции в элементарной ячейке.

$$\rho(x,y,z) = \frac{1}{V}\sum_{j=1} f_j exp\left[-2\pi i\left(hx_j + ky_j + lz_j - \alpha'_{hkl}\right)\right], \quad (8)$$

Таким образом, все отражения, усредненных по всему кристаллу, вносят свой вклад в электронную плотность каждой элементарной ячейки. Уравнение структурного фактора и уравнение электронной плотности играют важную

роль во всех этапах определения структуры методом рентгеновской кристаллографии. [25]

1.11 Фазовая проблема

Интенсивности рентгеновских дифракционных максимумов определяют структуру кристалла, то есть положение атомов в элементарной ячейке кристалла. Можно измерить только интенсивность рассеянных лучей. Фазы, которые также необходимы для обработки результатов от дифракционной картины к атомным позициям, теряются в дифракционном эксперименте. Однако из-за известной атомарности реальных структур и большого числа наблюдаемых интенсивностей утраченная фазовая информация фактически содержится в измеренных интенсивностях. Проблема восстановления недостающих фаз, когда доступны только интенсивности, известна как фазовая проблема. В случае, когда структура состоит из N одинаковых атомов в элементарной ячейке, то связь между дифракционной картиной и кристаллической структурой определяется уравнением:

$$F_{hkl} = |F_{hkl}|exp(i\alpha_{hkl}) = \sum_j f_j \times exp\left(i2\pi\Delta \boldsymbol{K} \cdot \boldsymbol{r_j} \right), \quad (9)$$

Величины структурных факторов содержат информацию о расстояниях между атомами в структуре, в то время как фазы определяют положение

пиков электронной плотности по всей элементарной ячейке и, следовательно, положение атомов. Структура малых молекул может быть решена даже при отсутствии фазовой информации. Данная проблема решается путем вычисления функции Паттерсона. Функция Паттерсона получается путем вычисления карты с использованием квадратов значений структурных коэффициентов, а все фазы устанавливаются равными нулю. Вместо пиков в атомных позициях карта Паттерсона показывает пики в каждой позиции, которая соответствует межатомному вектору в структуре. Преобразование Фурье структурных факторов (с фазами) - это функция электронной плотности. Преобразование Фурье квадратов амплитуд структурных коэффициентов (измеренных без учета фаз) является функцией Паттерсона.

$$P(x,y,z) = \frac{1}{V} \sum_{hkl=1} |F_{hkl}|^2 exp[\ -2\pi i(hu + kv + lw)]\ , \tag{10}$$

Паттерсон показал, что положение пика обеспечиваемое этой функцией, соответствует векторам между двумя атомами x_1, y_1, z_1 и x_2, y_2, z_2 в кристаллической решетке, где :

$$u = x_1 - x_2;\ \ v = y_1 - y_2;\ \ u = z_1 - z_2; \tag{11}$$

1.12 Метод молекулярного замещения

Альтернативный подход к решению фазовой задачи может быть использован метод молекулярного замещения, когда зная структуру одного из белков в гомологичном ряду, мы можем определить структуру исследуемого белка. В этом случае метод молекулярного замещения позволяет получать фазы из известной структуры. Расчет молекулярного замещения включает в себя решение функций вращения и трансляции: известная молекула сначала вращается в трех измерениях, и для каждой ориентации структурные факторы вычисляются из модели. По совпадению рассчитанных структурных коэффициентов и наблюдаемых значений из дифракционного эксперимента определяется ориентация известной молекулы, наиболее близко совпадающая с ориентацией неизвестной молекулы в кристалле. Наконец, ориентация и размещение известных структур в неизвестных кристаллических структурах могут быть выполнены с помощью применении методов Паттерсона. [27]

Общепринятая интерпретация функции Паттерсона заключается в том, что она состоит из взвешенной суммы межатомных векторов, интегрированных по всей элементарной ячейке. Функция Паттерсона всегда может быть вычислена из одного набора данных при отсутствии знания фазовых углов. Вращательная функция Паттерсона включает в себя вычисление модели карты Паттерсона и вращение ее над наблюдаемой

картой Паттерсона. Наиболее вероятная ориентация обнаруживается тогда, когда происходит перекрытие между этими двумя картами Паттерсона. Трансляционная функция Паттерсона предполагает размещение центра модели во всех положениях в элементарной ячейке исследуемой структуры. Для каждой предпринятой позиции, карта Паттерсона может быть вычислена и сопоставлена с наблюдаемой картой Паттерсона исследуемой структуры. После определения правильной ориентации и положения можно рассчитать карту электронной плотности исследуемой структуры. Карта электронной плотности, рассчитанная с использованием измеренных амплитуд коэффициента дифракции рентгеновского излучения от исследуемой структуры, и полученные расчетные фазы формируют структурную модель.

2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1 Объект исследования

Исследуемый белок – элонгационный фактор Р *EF-P* был получен в НИЛ «Структурная биология» Казанского (Приволжского) Федерального Университета.

EF-P состоит из 185 аминокислотных остатков, имеет молекулярную массу 20,5 кДа, коэффициент экстинкции Е= 15930 (Абс. 0,1% (= 1 г / л) 0,745)). Функция *EF-P* заключается в том, что он участвует в синтезе полипролиновых участков и присоединяется в рибосоме между Р и Е сайтами и стабилизирует подвижный конец т-РНК с помощью специальной пострассляционной модификации.

Последовательность аминокислот белка имеет следующий вид:

MISVNDFKTGLTISVDNAIWKVIDFQHVKPGKGSAFVRSKLRNLRTGAIQE
KTFRAGEKVEPAMIENRRMQYLYADGDNHVFMDNESFEQTELSSDYLKE
ELNYLKEGMEVQIQTYEGETIGVELPKTVELTVTETEPGIKGDTATGATKS
ATVETGYTLNVPLFVNEGDVLIINTGS YISRG

2.2 Методики использованные в исследовании

2.2.1. Трансформация компетентных клеток E. Coli

Стартовым этапом выделения и очистки непосредственно является процесс трансформации клеток. Компетентные клетки E. coli BL21 (DE3)pLysS трансформировали плазмидой pET28a с клонированной вставкой структурного гена *EF-P*. В клетки добавили 1 мкл плазмидной ДНК и поместили обратно в лед на 20-30 минут. Затем полученную трансформационную смесь прогревали при температуре 37° С в течение минуты. Полученный раствор охлаждали во льду в течение минуты и добавляли 1 л питательной LB среды с добавлением канамицина (100 мкг / мл), ресуспендировали и растили в течение 1 часа при температуре 37°С. Смесь объемом 100 мкл для плазмидной ДНК высеивали на чашку Петри с агаризованной LB средой, содержащей антибиотики: канамицин и хлорамфеникол. Бактерии культивировали в течение 12 часов при температуре 37°С.

2.2.3 Выделение белка *EF-P* в питательной среде LB

Экспрессию белка *EF-P* проводили в штамме *E. coli E. coli BL21 (DE3) pLysS*. После 12 часов инкубации (инкубировали при температуре 37° С и 180 об/мин до оптической плотности OD600 = 0,5о.е.). Экспрессию белка индуцировали добавлением в клеточную культуру 0.5мМ (IPTG) изопропил-

β-тиогалактопиранозид. Для осаждения клеток проводили центрифугирование при температуре 4° С на центрифуге BECKMAN Avanti J-25. Осажденные клетки растворили в буфере CRB.

В полученную суспензию клеток добавили 12 мкл PMSF на 1 г клеток и 80 мкл PIC на 1 г клеток. PIC и PMSF являются игнибиторами и способствуют лизису клеток. Для разрушения клеточной мембраны производили механическое воздействие по клетке. Полученную гомогенную смесь подвергли ультразвуковому воздействию в ресуспензионном буфере (20 мм Трис-HCl, 500 мм NH4Cl, pH 7,6) для конечного разрушения клеток. В результате, получившуюся смесь подвергли центрифугированию (BECKMAN Avanti J-25) 25000 об/мин в течение 30 минут. После центрифугирования отобрали супернатант в роторную трубу (Ti 45 BECKMAN COULTER) и еще раз центрифугировали для осаждения крупных клеточных комплексов при 45000g в течение 45 минут при температуре 4° С.

2.2.4 Очистка белка *EF-P*

Для проведения аффинной хроматографии были использованы микроколонки с рабочим объемом 0,8–2 мл. Полученный после центрифугирования супернатант, залили в Ni-NTA колонку. За счет содержания в белковом образце шести аминокислотных остатков гистидина и возможности его связи с заряженными ионами никеля, образец

удерживается на колонке. После того, как весь супернатант прошел, колонку Ni-NTA промывали отмывочными буферами Buffer Wash A и Buffer Wash B . После промывки провели элюирование соответствующим элюирующим буфером (Elution Buffer) с концентрацией имидазола 300мМ. Отобрали аликвоты и анализировали в денатурирующем ПААГ.

Следующий этап очитки проводился методом гель-фильтрации. Гель-фильтрация - вид хроматографии, при которой молекулы веществ разделяются по размеру за счёт их разной способности проникать в поры неподвижной фазы геля специальных колонок. Образец, полученный после аффинной хроматографии, концентрировали до 0,5 мл при помощи концентраторов согласно протоколу производителя (Amicon-Ultra, Merck Millipore, Германия) при 4° С. Далее образец центрифугировали на центрифуге (MiniSpin) в течение 30 минут и растворили в буфере для гель-фильтрации. По профилю поглощения A_{280} виден резкий пик белка *EF-P*, что подтверждает чистоту образца (рис 2.1).

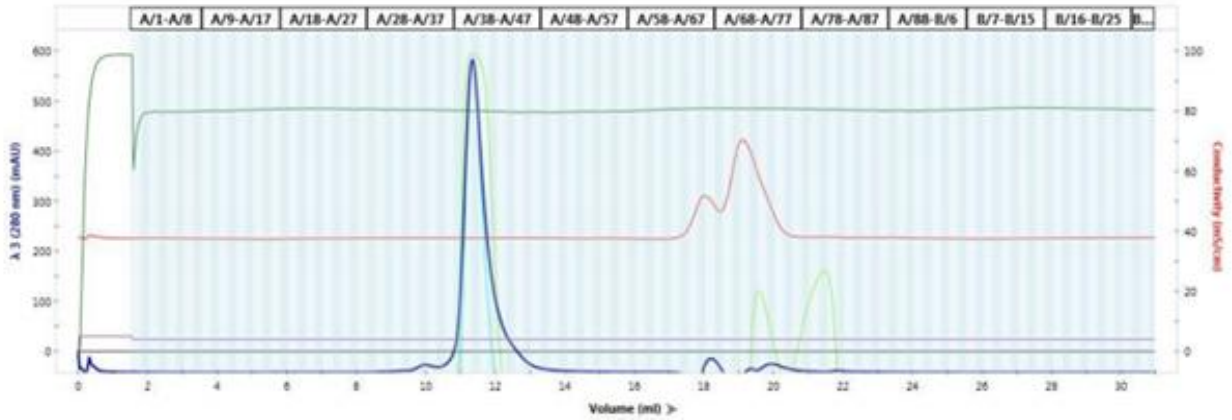

Рис.2.1 - Профиль эксклюзионной хроматографии белка *EF-P* на гель-фильтрационной колонке Enrich SEC 70

2.2.5 Буферные растворы и реактивы

Таблица 1 - Буферные растворы, реактивы

Буферные растворы:	**Состав:**
Буфер для лизиса клеток T20N500 (1000 мл)	1M Tris-HCl pH 7.6 (20 мл) 4M NH4Cl (125 мл)
Отмывочный буфер “A” с высокой концентрацией соли – T20N1000(500 мл)	1M Tris-HCl pH 7.6 (10 мл) 4M NH4Cl (125 мл)
Отмывочный буфер “B” с низкой концентрацией имидазола – T20N500I20 (500 мл)	1M Tris-HCl pH 7.6 (20 мл) 4M NH4Cl (125 мл) Имидазол (20.42 г) Уровень pH доводили до 7.6 с помощью концентрированной HCl
Элюирующий буфер для аффинной хроматографии– T20N500I300 (1000 мл)	1M Tris-HCl pH 7.6 (20 мл) 4M NH4Cl (125 мл) Имидазол (20.42 г)

	Уровень pH доводили до 7.6 с помощью концентрированной HCl
Среда LB, агаризованная среда LB	1 % бакто-триптон, 1% NaCl, 0,5% дрожжевой экстракт, (1,5% агара для агаризованной среды)
Разделяющий гель для электрофореза белков	1M Tris-HCl (pH 8,8) 375 мМ, 15% акриламид, 0,5% бисакриламид, 0,1% додецилсульфат (SDS), 0,1% персульфат аммония (PSA), 0,05% ТЕМЕД
Концентрирующий гель для электрофореза белков	1M Tris-HCl (pH 6,8) 125 мМ, 5% акриламид, 0,17% бисакриламид, 0,1% додецилсульфат (SDS), 0,1%персульфат аммония (PSA), 0,05% ТЕМЕД

2.2.6 Кристаллизация белка *EF-P*

Для осуществления экспериментов по рентгеноструктурному анализу, необходимо было получить качественные кристаллы белка *EF-P*. Эксперименты по кристаллизации проводились при температуре 293 К с

использованием метода диффузии водяных паров в модификациях «висячая капля» в различных буферных условиях.

Кристаллы белка были получены путем смешивания 1,3 мкл концентрированного белкового раствора с 1,3 мкл кристаллизующего раствора. В итоге, в растворе (0.2M Imidazole malate pH 5.5 24% v/v PEG 600) были обнаружены кристаллы белка *EF-P* размером 200 мкм (рис 2.2), удовлетворяющих условиям проведения экспериментов по рентгеноструктурному анализу.

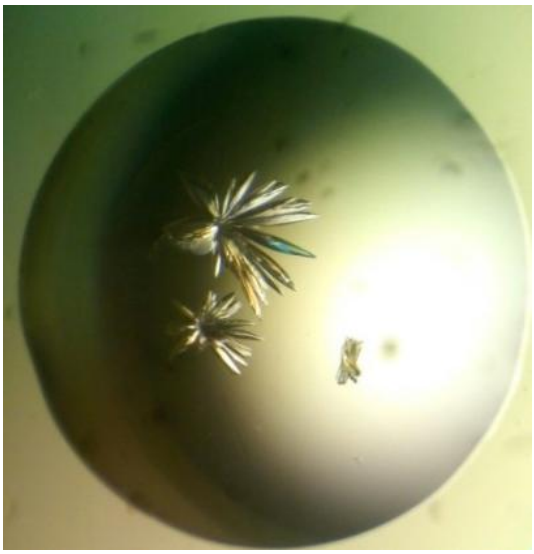

Рис.2.2 – Изображение полученных кристаллов белка *EF-P*

Рентгеноструктурное исследование кристалла было проведено на дифрактометре Rigaku XtaLab Synergy S, оборудованным детектором HyPix и источником излучения PhotonJet Cu Kα (1.54184 Å) при температуре T=100(1) K (рис 2.3).

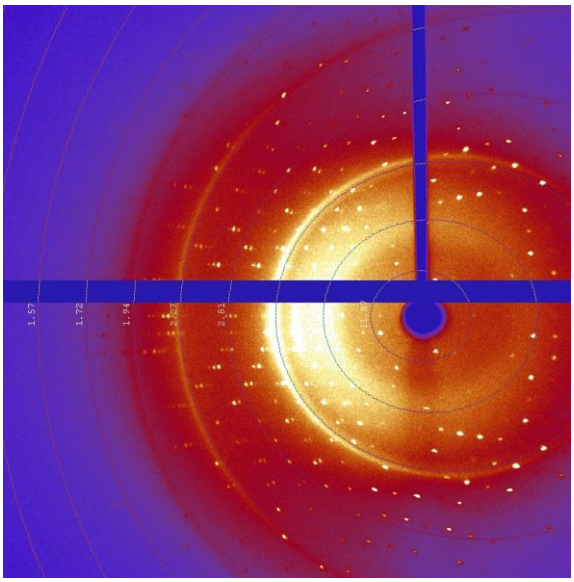

Рис. 2.3 – Дифракционная картина кристалла *EF-P* зарегистрированная на монокристалльном дифрактометре Rigaku XtaLab Synergy S

Для кристалла белка *EF-P* наблюдается дифракция рентгеновского излучения. Была получена дифракционная картина с разрешением 2.1 Å. Полученные данные проиндексированы в пакете программ CrysAlisPro. Элонгационный фактор P *(EF-P)* кристаллизуется в пространственной группе P 2_1 2_1 2_1 ромбической сингонии, с параметрами ячейки *a*=30.27 Å, *b*=43.46 Å, c=126.34 Å; *α*=*β*=*γ* 90.00˚(таб.2):

Таблица 2 - Данные о кристаллической структуре белка *EF-P*

Пространственная группа	P 2_1 2_1 2_1
a,*b*,*c* (Å)	30.27, 43.46, 126.34
α=*β*=*γ* (°)	90

Диапазон разрешения(Å)	24.1689 - 1.50002
Количество отражений	26265
Завершенность(%)	98.53

Завершенность используется для определения наличия достаточных данных для уточнения/построения моделей. Обычно требуется значение больше 90%, а значение меньше 75% считается недостаточным. Промежуточные значения приведут к менее оптимальным результатам.

2.2.7 Обработка карт электронной плотности методом молекулярного замещения

В настоящей работе структура белка была расшифрована однокомпонентным молекулярным замещением с использованием гомологов белка *EF-P* из *Clostridium thermocellum* белка *Cth-95* в программе Phenix. Уточнение структуры произведено с использованием программ Phenix и Coot. Была произведена обработка данных дифракционной картины.

На основе экспериментальных данных было показано, что белок *EF-P* представлен в трехдоменной структуре. Общая форма белка схожа со строением т-РНК в виде буквы «L», и имеет следующие параметры: ширина 52 Å, длина 64 Å, и угол между I и II доменами 95°. Структуре белка *EF-P* в

растворе содержится 1 альфа-спираль и пять 14 β-складок топологией: β1-β2-β3-β4-β5-β6-β7-α1-β8-β9-β10-β11-β12-β13-β14 (рис. 2.3).

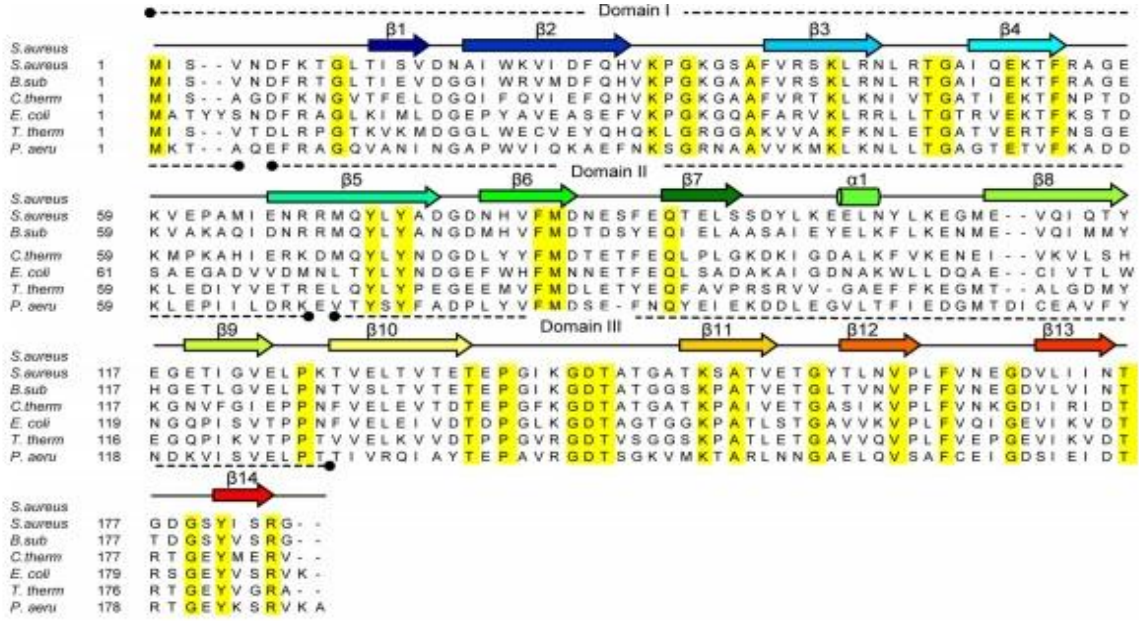

Рис. 3.3 - Выравнивание последовательностей *EF-P* из *(S. aureus; B. subtilis; C. thermocellum; E. coli; T. thermorphilus; P. aeruginosa*). Элементы вторичной структуры указаны над выравниванием. Остатки, которые сохраняются, выделены желтым цветом.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

В рамках данной работы на основе данных рентгеноструктурного анализа были получены следующие результаты:

- Выделен и очищен элонгационный фактор *P (EF-P)* для кристаллизации и дальнейших структурных исследований методами рентгеноструктурного анализа.
- Получены кристаллы белка *EF-P*.
- Методом молекулярного замещения получена структура белка *EF-P* из *Staphylococcus aureus*, установлено положение элементов вторичной структуры белка.
- Определена структура *EF-P* из *Staphylococcus aureus* с разрешением 2,1Å.

На основе полученных результатов сделаны выводы:

- Вторичная структурная организация белка состоит из: 1 α-спирали и 14 β-складок с следующей топологией: β1-β2-β3-β4-β5-β6-β7-α1-β8-β9-β10-β11-β12-β13-β14
- В структуре белка имеются три домена: домен I (остатки 1–64), домена II (остатки 65–126) и домен III (остатки 127–185). Общая форма белка схожа со строением т-РНК в виде буквы “L” шириной 52 Å, длинной 64 Å и углом 95° между доменами I и II, что является примером

молекулярной мимикрии. Таким образом, *EF-P* может имитировать молекулу т-РНК и присоединяться в Е-сайте рибосомы.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Хайбрахманова Ю.А Установление пространственной структуры элонгационного фактора *P* из патогенной бактерии *Staphylococcus aureus* (золотистого стафилококка) методом рентгеноструктурного анализа / Хайбрахманова Ю.А., Валидову Ш.З., Бикмуллину А.Г., Фатхуллину Б.Ф., Голубеву А.А., Хусаинову И.Ш., Клочковой Э.А., Гараевой Н.С., Нуруллиной Л.И., Юсупову М.М. // Сборник Итоговой научной конференции студентов КФУ 2020.

БЛАГОДРАНОСТИ

Автор выражает признательность научному руководителю: канд. физ.-мат. наук, вед. науч. сотр. Усачеву К.С. Сотрудникам НИЛ Структурная биология КФУ: Валидову Ш.З., БикмуллинуА.Г., Фатхуллину , Б.Ф.Голубеву А.А., Хусаинову И.Ш., Клочковой Э.А., Гараевой Н.С., Нуруллиной Л.И., Юсупову М.М. Работа выполнена в рамках гранта РНФ17-74-20009.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аюпов, Р.Х. Выделеие и очистка белка: Учебно-методическое пособие /Р.Х. Аюповб, М.М. Юсупов – Казань: Казан. Ун-т, 2015. – 19 с.
2. Maczulak A. Allies and enemies : how the world depends on bacteria [Text] // New Jersey, FT Press Pub. – 2011. – 210 p.
3. Kenneth J. R. Medical microbiology, seventh edition [Text] / Ryan, Nafees Ahmad, J. Andrew Alspaugh, W. Lawrence drew, Michael lagunoff, Paul Pottinger, Charles R. Sterling, Scott Weissman // New York, Pub. McGraw-Hill Education. – 2018. – 1056 p.
4. Остерман, И.А Поиск и изучение новых антибиотиков ингибиторов синтеза белка [Текст]: дис. канд. хим. наук.: 02.00.10/ Остерман Илья Андреевич. - М., 2018. – 291 с.
5. Voorhees R.M. Structural basis of the translational elongation cycle [Text]/ Ramakrishnan V., Annu Rev Biochem // MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, UK. – 2013. – Vol. 82: 203-236 DOI: 10.1146/annurev-biochem-113009-092313
6. Голубев, А. А ,Элонгационный фактор Р: новые механизмы работы и эволюционное разнообразие регуляции трансляции [Текст] / А.А. Голубев, Ш. З. Валидов, К. С. Усачев, М. М. Юсупов // Казань: Казан. Ун-т. – 2019. – Т53. – № 4. – С. 1–13. DOI: 10.1134/S0026898419040037

7. Jenny Pickworth Glusker Crystal Structure Analysis: A Primer 3rd Edition [Text] / Kenneth N. Trueblood // Oxford University Press, Oxford / New York. – 2010. – 304 p. ISBN: 978-0199576357.

8. Бланделл, Т. Кристаллография белка [Текст] / Т. Бландел, Л. Джонсон. - М.: Мир, 1979. – 620 с.

9. Structural Biochemistry/ Proteins / X-ray Crystallography [Электронный ресурс] / Режим доступа:https://en.wikibooks.org/wiki/Structural Biochemistry/Proteins/X-rayCrystallography(Дата обращения: 15.03.20)

10. Jared A. Delmar Crystallization of Membrane Proteins by Vapor Diffusion [Text]/ Jared A. Delmar, Jani Reddy Bolla, Chih-Chia Su, and Edward W. Yu// Department of Physics and Astronomy, Iowa State University, Ames, Iowa, USA. – Elsevier Inc. Pub. – 2015. – DOI: 10.1016/bs.mie.2014.12.018

11. Crystal Growth Techniques [Электронный ресурс] / Режим доступа: http://skuld.bmsc.washington.edu/~merritt/bc530/local_copies/Crystal_Growth_Techniques_(Hampton_Research).pdf(Дата обращения: 11.10.19)

12. Dessau, M. A Protein Crystallization for X-ray Crystallography [Text] / Moshe A. Dessau, Yorgo Modis // J. Vis. Exp, Yale University. – 2011. – Vol. 47. – e2285. – DOI: 10.3791/2285

13. Шмелев, В. К. Рентгеновские аппараты [Текст] / В. К. Шмелев //. – М.; Ленинград : Изд. и тип. Госэнергоиздата в М., 1949. - 303 с.

14. Бояркина О.В. Физ. методы исследования твердых тел: электронная микроскопия и рентгеноструктурный анализ: Учебно-методическое пособие [Текст] / О. В. Бояркина, М. И. Зотов, В. М, Кяшкин В. М. // – Саранск: Изд. Мордовского уни-а. – 2012. – 96 с.
15. Pecharsky V. K. Fundamentals of Powder Diffraction and Structural Characterization of Materials [Text] / V. K. Pecharsky, P. Y. Zavalij // A Springer Science, Business Media, Inc., NY, USA. – 2005. – 731 p. ISBN 0-387-24147-7
16. Пирогов А.В. Энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия электронное: Учебно-методическое пособие [Текст] / А.В. Пирогов, Н. В. Малехонова, А.И. Бобров // – Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет. – 2014. – 73 с.
17. Источник синхротронного излучения (синхротрон) [Электронный ресурс] / Режим доступа: https://iz.ru/730150/2018-04-09/istochnik-sinkhrotronnogo-izlucheniia-sinkhrotron (Дата обращения: 01.04.20)
18. Winicka H. Synchrotron radiation research [Text] / H. Winicka, S. Doniach // Springer US Pub. – 1980. – 776 p. – DOI: 10.1007/978-1-4615-7998-4
19. Parker M.W. Protein Structure from X-Ray Diffraction [Text] / M.W. Parker // J. Biol. Phys, Kluwer Academic Pub. – 2003. – Vol. 29. – 341–362 p.

20. Шехтман В.Ш. Введение в рентгеновскую кристаллографию: Учебное пособие [Текст] / В. Ш. Шехтман, Р.А. Диланян // ИФТТ РАН, Подмосковный филиал МГУ им. М.В. Ломоносова, Черноголовка. – ИПХФ РАН. – 2002. – 144 с. – ISBN 5-901675-07-X

21. Суворов Э. В. Дифракционный структурный анализ : Учебное пособие [Текст] / Э. В. Суворов // – М. : Юрайт. – 2019. – 272 с. – ISBN 978-5-534-09995-9

22. Шаскольская М. П. Кристаллография: Учебное пособие [Текст] / М. П. Шаскольская // – М. : Высш. шк. – 2-е изд., 1984. – 376 с.

23. Authier A. Dynamical Theory of X-ray Diffraction [Text] / Andr´e Authier // Oxford University Press, Oxford. – 2001. – 661 p. – ISBN 0198559607, 9780198559603

24. Фетисов, Г. В. Синхротронное излучение. Методы исследования структуры веществ [Текст]/ Г.В. Фетисов – М.: ФИЗМАЛИТ, 2007. – 672 с.

25. Crystal Structure and Dynamics [Электронный ресурс] / Режим доступа: http://www2.physics.ox.ac.uk/students/course-materials/c3-condensed-matter-major-option (Дата обращения: 07.03.20)

26. Warren B. E. X-Ray diffraction / B. E. Warren // Courier Corporation. – 1990. – 381 с. – ISBN 0486663175, 9780486663173

27. Rossmann M. G. Molecular replacement – historical background / Michael G. Rossmann // J. IUCr, Acta Cryst. – 2001. – Vol. 57. – 1360–1366 p.

28. Литусов, Н. В. Общая микробиология : Учебное пособие [Текст] / Н. В. Литусов – Екатеринбург : УГМУ, 2015. – 517 с.