

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: 03.04.02 — Физика

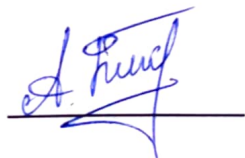
Профиль: Медицинская физика

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

**Малоугловое рентгеновское рассеяние гуанозинтрифосфат
связывающего белка γ sxC из золотистого стафилококка**

Студент 2 курса группы 06-019

« 16 » июня 2022 г.

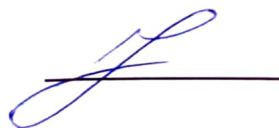


(Биктимиров А. Д.)

Научный руководитель

д.ф.-м.н., профессор

« 16 » июня 2022 г.



(Усачев К. С.)

Заведующий кафедрой

медицинской физики

д.х.н., профессор

« 16 » июня 2022 г.



(Аганов А. В.)

Содержание

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	8
1. Патогенная бактерия <i>Staphylococcus aureus</i>	8
1.1. Белоксинтезирующий аппарат бактерий	8
1.2. ГТФ-связывающий белковый фактор $\Upsilon_{sx}C$	10
2. Основные физические методы исследования структуры белков	11
2.1. Рентгеновское излучение и вещество	13
2.2. Рассеяние и поглощение рентгеновского излучения	14
2.3. Рассеяние на точечном объекте. Вектор рассеяния	15
3. Малоугловое рентгеновское рассеяние	17
3.1. Концентрация частиц и получаемая информация	18
3.2. Радиус инерции, кривая рассеяния, аппроксимация Гинье	21
3.3. Экспериментальная кривая рассеяния. Функция распределения расстояний	22
3.4. Информативность функций $p(r)$ и $I(Q)$ для монодисперсного приближения	24
3.5. Случай взаимодействующих объектов и его связь с реальным объектом	26
3.6. Получение набора структур	27
3.7. Поиск глобального минимума и метод Монте-Карло	28
4. Используемая аппаратура для проведения эксперимента по малоугловому рассеянию	29
4.1. Особенности малоугловых установок	29
4.1.1 Угловое разрешение	30

4.1.2	Рентгеновская трубка как источник излучения	32
4.1.3	Детектор рентгеновского излучения	33
4.1.4	Синхротронное излучение и эксперимент	34
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ		37
5.	Объект исследований	37
5.1.	Материалы и методы	38
5.1.1	Трансформация в компетентные клетки	40
5.1.2	Выделение белка	40
5.1.3	Аффинная хроматография	41
5.1.4	Гель-фильтрация	42
5.1.5	Электрофорез и проверка стабильности	43
5.2.	Малоугловое рассеяние и обработка данных	44
5.2.1	Определение инвариантов	45
5.2.2	Функция пар расстояний	47
5.2.3	Восстановление формы электронной плотности	48
5.3.	Сопоставление плотности	50
ЗАКЛЮЧЕНИЕ		53
НАУЧНАЯ ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ		54
БЛАГОДАРНОСТИ		54
Список литературы		55

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ГДФ — гуанозиндифосфат

ГТФ — гуанозинтрифосфат

ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота

ИПТГ — изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид

КРИО-ЭМ — криоэлектронная микроскопия

мг - миллиграмм

мкл — микролитры

мл — миллилитры

мМ — миллимоль

MPP, MUPP, SAXS — малоугловое рентгеновское рассеяние

ПААГ — полиакриламидный гель

ПЗС — прибор зарядовой связи

РНК — рибонуклеиновая кислота

РСА — рентгеноструктурный анализ

ЯМР — ядерный магнитный резонанс

His-tag — гистидиновый таг

LB — lysogeny broth

MQ — деионизированная вода Milli-Q (Millipore)

Ni-NTA — нитрилотриуксусная кислота (nickel-nitrilotriacetic acid)

PIC — ингибитор протеаз (protease inhibitor cocktail)

PSA — персульфат аммония (ammonium persulfate)

SDS — ларилсульфат натрия (sodium dodecyl sulfате)

TEMED — тетраметилэтилендиамин (tetramethylethylenediamine)

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день изучение структур различных биологических макромолекул является одним из основных направлений, которое активно развивается при помощи различных физических методов. Такое тесное переплетение на стыке фундаментальных наук приводит к решению задач, которые дают ответы на многие основополагающие вопросы. Так как белки являются элементарной единицей структурной и функциональной организации клетки, то одной из стратегий борьбы с патогенными микроорганизмами является изучение белоксинтезирующего аппарата бактерии. Таким образом, применение различных физических методов для исследования белковых молекул открывает возможность получить информацию о их пространственной структуре, которая в свою очередь может помочь в понимании протекания различных внутриклеточных процессов. Такие знания увеличивают базу мишеней-объектов, воздействие против которых составляет основу лекарственных препаратов узконаправленного спектра действия. Например [1], на основе имеющейся информации о взаимодействии между рибосомой и белком, можно создать ингибитор, который будет действовать избирательно против белоксинтезирующего аппарата клетки, что в конечном счете может привести к её угнетению и последующей гибели.

Несмотря на существующее разнообразие лекарственных средств, закономерно появление антибиотико-резистентных штаммов патогенных бактерий. Например, активными переносчиками вирулентной бактерии золотистый стафилококк, по разным оценкам, являются 25–40 % населения Земли [2]. Именно по причине высокой степени резистентности патогенных микроорганизмов возникает необходимость в поиске новых стратегии борьбы с ними. Одной из таких стратегий и является изучение белковых факторов и белоксинтезирующего аппарата клетки.

Несомненно, определение пространственных структур является трудоемким процессом, поскольку исследуются биологические объекты, размеры которых порядка десятков нанометров. Исследование состоит из корректной пробоподготовки с целью стабилизации образца на время длительных экспериментов, включающих в себя различные физические воздействия. На сегодняшний день в определении пространственных структур высокомолекулярных органических соединений одну из основных ролей играют такие методы, как: спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР) в растворе, малоугловое рассеяние рентгеновских лучей (МРР), рентгеноструктурный анализ (РСА) кристаллов белков и криоэлектронная микроскопия (крио-ЭМ). Каждый из методов по отдельности, имеет ряд преимуществ и недостатков по сравнению с другими отдельно взятыми методами. Но использование совокупности этих методов увеличивает вероятность получения полного представления о структуре и механизмах взаимодействия исследуемого объекта с другими внутриклеточными системами.

В качестве объектов наших исследований был выбран белковый ГТФ-связывающий фактор $\Upsilon_{sx}C$ из патогенной бактерии *Staphylococcus aureus*, поскольку данный белок является энергозависимым фактором и участвует в сборке большой рибосомальной субъединицы. Такая функциональная особенность делает данный белок привлекательной мишенью для определения его структурных характеристик.

Целью данной работы является определение структурных характеристик белка $\Upsilon_{sx}C$ из золотистого стафилококка методом малоуглового рассеяния. Для достижения данной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Выделение рекомбинантного белка $\Upsilon_{sx}C$ из *S. aureus* и его очистка методами аффинной хроматографии и гель фильтрации;
2. Подбор буферных условий для стабилизации белковой молекулы;

3. Проведение эксперимента по малоугловому рассеянию;
4. Анализ и обработка полученных данных.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1. Патогенная бактерия *Staphylococcus aureus*

Золотистый стафилококк является шаровидной бактерией с положительной окраской по Граму, которая вызывает широкий спектр инфекций и заболеваний. Название бактерии получено из-за золотистого цвета при наблюдении под микроскопом, который обусловлен специфичными пигментами.

С того момента, как человечество начало массово использовать различные антибиотики (пенициллин, метициллин и т. д.), из-за влияния естественного отбора среди данного патогена начали развиваться мутации, которые помогают бактериям выживать в угнетающих условиях. Тем самым создаются новые устойчивые штаммы патогенов, которые приобретают резистентность к новым поколениям антибиотиков. Именно поэтому, золотистый стафилококк является одним из наиболее частых причин возникновения внутрибольничных инфекций [3].

1.1 Белоксинтезирующий аппарат бактерий

Синтез белковой цепи происходит на основе информации, которая закодирована в матричной РНК. В целом, процесс перехода информации происходит согласно *центральной догме молекулярной биологии*. Происходит это по следующей схеме: ДНК \longrightarrow РНК \longrightarrow БЕЛОК. Для поддержания правильности считывания информации и предотвращения различного рода мутаций, синтез белка происходит с помощью *рибосомы* — специальной каталитической биологической машины, которая состоит из порядка 50-ти рибосомальных белков и 3-х цепочек рибосомальных РНК (рисунок 1). Когда отсутствует необходимости в синтезе белка, большая и малая субъединица находятся в диссоциированном на самостоятельные субъединицы состоянии. Для начала

синтеза белка они соединяются на матричной РНК ближе к 5'-концевому участку (инициация трансляции). После этого матричная РНК протягивается через 70S рибосому на 3 нуклеотида за одну протяжку. Когда нуклеотидные триплеты протягиваются через ядро рибосомы, происходит процесс транслирования последовательности в аминокислотную последовательность с помощью транспортной РНК, которая предоставляет по одной аминокислоте к формирующейся белковой цепи. После того, как рибосома достигла специального участка из трёх аминокислот который называется стоп-кодон, происходит процесс остановки биосинтеза белка и две субъединицы вновь диссоциируют на малую и большую самостоятельные субъединицы. Скорость работы такой молекулярной машины порядка 20 аминокислот в секунду с точностью 1 ошибка на 3000 аминокислот. Таким образом, процесс биосинтеза белка является очень энергоёмким и важным процессом в жизнедеятельности клетки.

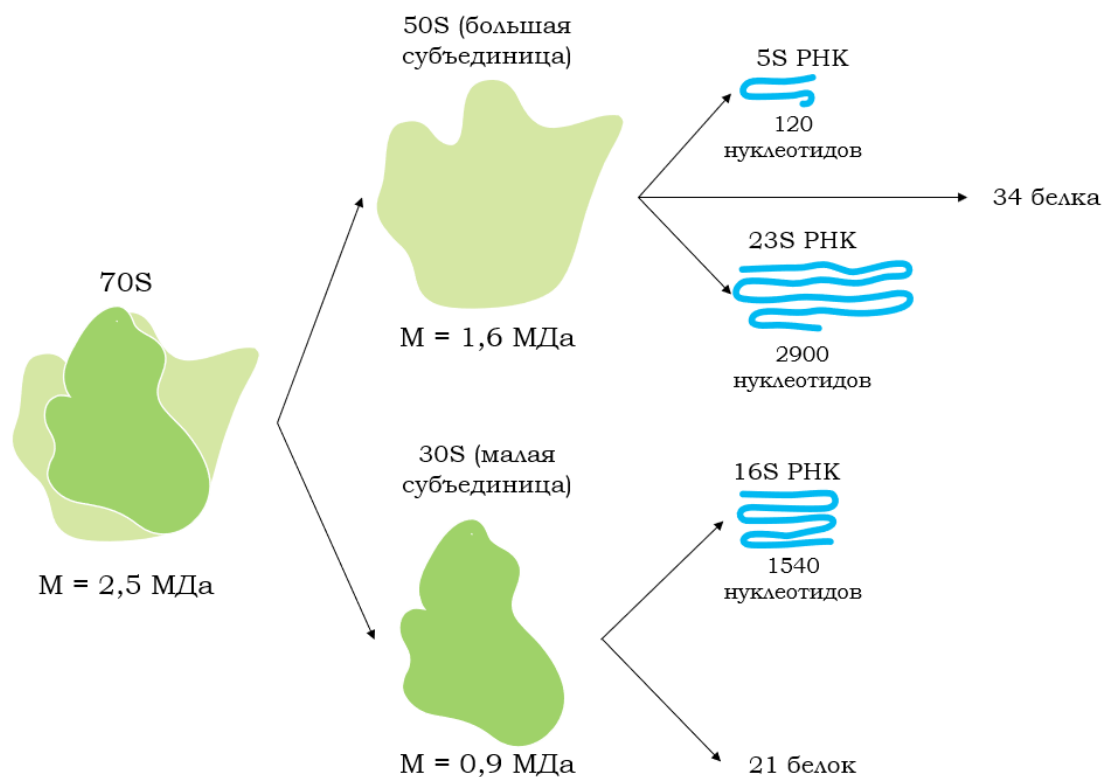


Рисунок 1 — Схематическое представление структуры 70S рибосомы прокариот [4]

1.2 ГТФ-связывающий белковый фактор YsxC

Белки – это высокомолекулярные органические соединения, состоящие из 20 основных аминокислот, последовательно соединенных между собой в полипептидную цепочку. Большое количество вариантов расположения аминокислот влечет за собой разнообразие функциональных особенностей, поскольку именно структурная организация белков непосредственно связана с функциями, которые они выполняют внутри клетки. Несомненно, белки являются основополагающими компонентами живых систем и выполняют в них наиболее важные функции, такие как: каталитическая, структурная, защитная, регуляторная и т. д.

Существуют белки, которые выполняют одновременно несколько функциональных задач, таким образом являясь неотъемлемой частью протекающих внутриклеточных процессов. Например, белок YsxC патогенной бактерии *Staphylococcus aureus* является белковым фактором, который посредством гидролиза ГТФ до ГДФ (энергетическая функция), способствует связыванию белков на поверхности большой рибосомальной субъединицы (структурная функция).

Для микроорганизма *Bacillus subtilis* было показано [5], что отсутствие белка YsxC привело к отсутствию 6 рибосомальных белков большой субъединицы (рисунок 2). Такая функциональная особенность указывает на значимость целевого белка в процессе биосинтеза и делает белковый фактор YsxC привлекательной мишенью для структурных исследований и определения механизмов связывания белка с рибосомой.

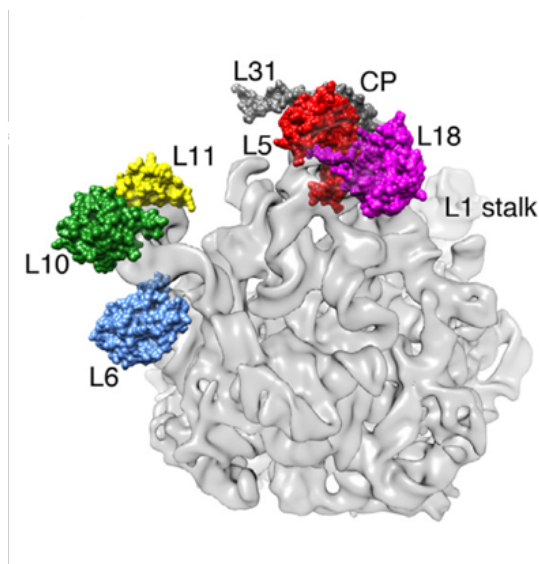


Рисунок 2 — Кристо-ЭМ рибосомальной 50S субъединицы *Bacillus subtilis*. Цветами отмечены белки, которые отсутствуют в плотности при искусственном обеднении белком YsxC [5]

2. Основные физические методы исследования структуры белков

Практически все экспериментальные методы определения пространственных структур биологических молекул основаны на интерпретировании результатов взаимодействия излучения (чьи изначальные свойства известны) с объектом. Поскольку размеры биомолекул и их межатомные расстояния лежат в нанометровом диапазоне, возникает необходимость в использовании физических методов, разрешающая способность которых так же находится в диапазонах 0.1–1 нм.

Ярким примером метода, излучение которого удовлетворяет заданным характеристикам, является метод рентгеноструктурного анализа. Для исследования структурной организации с помощью данного метода, необходимо обладать монокристаллами белка, получение которых представляет собой трудоемкий процесс по подбору условий, в которых белковые молекулы будут объединяться в кристаллическую структуру. Сродственным по характеристикам способом исследования формы белковых молекул является метод

малоуглового рассеяния рентгеновского излучения. В представленном методе не требуется наличие кристаллов, поскольку изучается не дифракционная картина белка, а его способность упруго рассеивать излучение на малые углы. Необходимая информация находится из зависимости интенсивности рассеянного излучения от углов рассеяния.

Как уже оговаривалось ранее, биомолекулы слишком малы, чтобы их можно было детально разглядеть в оптический микроскоп. Для решения проблемы с дифракционным ограничением, вместо оптического диапазона используется диапазон длин волн электронов. Такой метод получил название криоэлектронной микроскопии. В нём образец наносится тонким слоем на сетку, охлаждается до температуры 4 К и просвечивается пучком электронов. Крио-ЭМ может выступать как альтернатива другим методам, поскольку для исследований не требуется специальной пробоподготовки, а разрешение метода близко к атомарному [6].

Спектроскопия ядерного магнитного резонанса является одним из основополагающих методов в изучении структур биомолекул. Представляет собой мощный инструмент, с помощью которого можно отследить локальные магнитные поля, которые образуются вокруг ядер и, с помощью этой информации, воссоздать структуру молекулы в том состоянии, в котором она находится в растворе. Представленный метод является низкочувствительным, что приводит к необходимости накопления сигналов путем повторения эксперимента, что в свою очередь накладывает требования на высокую концентрацию очищенного образца, меченного по ядрам изотопов (^{13}C , ^{15}N и т. д.) с ненулевым спином [7].

Несомненно, каждый из упомянутых выше методов имеет ряд преимуществ и недостатков по сравнению с другими структурными методами. Несмотря на все это, каждый метод является достаточно информативным

в той области, которая удовлетворяет его физическим требованиям проведения эксперимента. Полученные таким образом данные интерпретируются с помощью обширного математического аппарата, который включает в себя методы описания волн, а также квантовую механику и статистическую физику. Методы, а также способы обработки полученных данных, которые были использованы в данной работе, будут рассмотрены детальнее и описаны подробнее далее.

2.1 Рентгеновское излучение и вещество

При наличии кристаллической решетки в экспериментах по дифракции рентгеновского излучения, рассеивание последнего происходит на различных центрах рассеяния, которые являются объектами исследуемого вещества. Вследствие таких взаимодействий наблюдается интерференционная картина, анализируя которую можно прийти к определенным выводам о структуре исследуемого объекта. Интерференция будет наблюдаться тогда, когда происходит когерентное рассеяние и длина волны первоначального излучения сопоставима с межатомными расстояниями в объекте. В этих целях используется три вида излучения: электроны (длина волны 0.01 \AA), нейтронное излучение (длина волны $0.5\text{--}10 \text{ \AA}$) и рентгеновское излучение (длина волны порядка 1 \AA). Но сопоставимость длины волны с межатомными расстояниями не является достаточным для определения этого вида излучения как подходящего для проведения структурных экспериментов. Поэтому для проведения конструктивных исследований необходимо удовлетворить некоторым требованиям: иметь не высокий уровень абсорбции, но иметь достаточный уровень для эффективного рассеивания. Помимо свойств, необходимо так же учитывать и доступность генерации интенсивного излучения; уровень повреждений, которому будет подвержен исследуемый объект. В связи с этим, в изучении

структур белковых молекул решающую роль играют методы, которые основаны на использовании рентгеновского излучения: это рентгеноструктурный анализ и малоугловое рентгеновское рассеяние.

2.2 Рассеяние и поглощение рентгеновского излучения

Непосредственное взаимодействие рентгеновского излучения с веществом происходит через электроны объекта. Поскольку электронная оболочка имеет вытянутую форму, то допущение рассмотрения рассеяния излучения как от точечного объекта невозможно. Количество электронов атома непосредственно влияет на рассеивающую способность: чем больше электронов, тем выше уровень рассеяния. Поэтому атомы тяжелых химических элементов будут вносить наибольший вклад в дифракцию, что открывает возможность в использовании тяжелоатомных элементов в роли меток, которые будут вносить контрастность относительно этого атома на дифракционной картине. Наоборот, легкие атомы такие как водород, гелий и т. д. являются «неосязаемыми» для рентгеновского излучения, и информация о них будет недоступна при анализе данных [8].

Но не только наличие легкоатомных элементов может негативно сказываться на качестве получаемой информации. Одним из отрицательных факторов является процесс поглощения рентгеновского излучения, который в значительной степени уменьшает глубину проникновения излучения, как следствие, уменьшается количество полученной информации о структурах, которые находятся вне зоны досягаемости излучения из-за эффектов поглощения. Данный эффект происходит по причине воздействия фотонов излучения на электронные оболочки атома, что ведет к энергетическому переходу в возбужденное состояние – на более высокий энергетический уровень. Ещё одним негативным эффектом является и радиационное повреждение образца из-за

вышеописанных энергетических переходов. Поскольку поглощение зависит от длины волны, то при её увеличении наблюдается усиление уровня радиационного повреждения. Для нивелирования данного эффекта необходимо введение специальных радиационных поправок, которые будут компенсировать пагубный эффект рентгеновского излучения на образец.

2.3 Рассеяние на точечном объекте. Вектор рассеяния

Для дальнейшего описания процессов необходимо рассмотреть атом как набор точечных рассеивателей, которые после взаимодействия с излучением рассматриваются как самостоятельные источники сферических волн (рисунок 3). Амплитуда рассеяния b есть амплитуда волны в единичном телесном угле. Так как интенсивность есть квадрат амплитуды волны, тогда для интенсивности рассеянного излучения можно записать следующую формулу:

$$I = I_0 b^2, \quad (1)$$

где I_0 – интенсивность падающего излучения, I – интенсивность рассеянного излучения, b – амплитуда волны. Тогда, полная интенсивность будет определяться как интенсивность во всех направлениях, то есть во всём телесном угле 4π : $I_n = 4\pi I_0 b^2$.

Каждый электрон в атоме рассеивает рентгеновское излучение с одинаковой амплитудой, называемой фактором Томсона f_{el} , который отражает эффективное поперечное сечение рассеяния электромагнитных волн в отсутствии эффектов поглощения. Такое утверждение будет иметь место даже для точечного объекта рассеяния, поскольку наблюдается угловая зависимость поляризации волны. В прямом направлении, то есть, когда угол падения равен нулю, поляризационный параметр $P = (1 + \cos^2 2\theta)/2$ будет равен единице, тогда как на малых рассеяния углах данный параметр обретает значение $n f_{el}$

(где n – количество центров рассеяния). По причине того, что электронная оболочка является протяженным объектом, амплитуды имеют угловую зависимость и они становятся меньше при увеличении угла рассеяния.

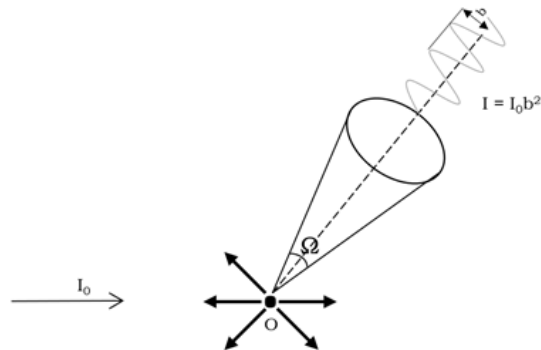


Рисунок 3 — Рассеяние отдельной точкой O

Рассмотрим фазовое различие между рассеянием на двух точках O и P (схематическое представление на рисунке 4). Волновой фронт обозначим как перпендикулярное к вектору распространения \mathbf{u}_0 волны геометрическое место точек с одинаковой фазой, например на рисунке 4 это PM (до того, как волна рассеялась на точке P). Тогда PN – это фронт волны после взаимодействия с обеими точками, рассеянной под углом 2θ вдоль относительно первоначального направления распространения волны.

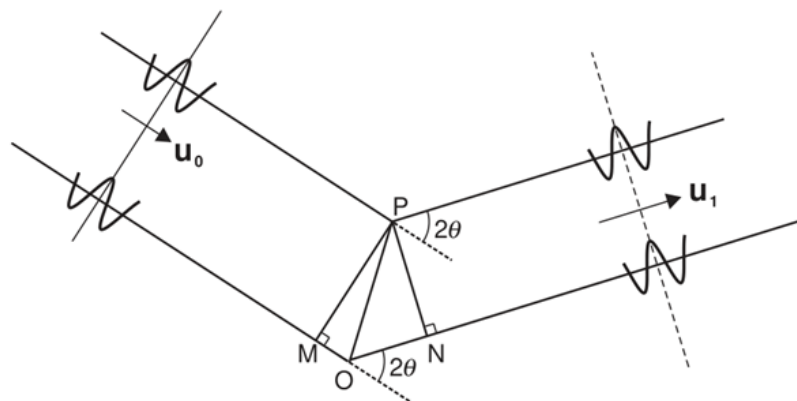


Рисунок 4 — Рассеяние двумя точками

Разность фаз обозначим как $\Delta = \text{ON} - \text{OM} = r \cdot u_1 - r \cdot u_0 = r \cdot (u_1 - u_0)$. В радианах данное значение будет представлено в виде:

$$\delta = \frac{\Delta}{\lambda} 2\pi, \quad (2)$$

где λ – длина волны излучения. Если мы поместим в точку Р рассеиватель (атом) с параметром амплитуды рассеяния f , выражение рассеяния для точки О можно записать в следующем виде:

$$A = f \exp(i\sigma) = f \exp\left(i \frac{2\pi}{\lambda} (\mathbf{u}_1 - \mathbf{u}_0) \cdot \mathbf{r}\right) = f \exp(i\mathbf{Q} \cdot \mathbf{r}), \quad (3)$$

где $k_0 = \frac{2\pi}{\lambda} \mathbf{u}_0$ и $k_1 = \frac{2\pi}{\lambda} \mathbf{u}_1$ - волновые векторы, а \mathbf{Q} - вектор рассеяния, который является разностью волновых векторов.

3. Малоугловое рентгеновское рассеяние

Метод малоуглового рентгеновского рассеяния является одним из прикладных используемых физических методов в современной биологии и биохимии, с помощью которого можно получить информацию о взаимодействиях между молекулами, их размерах, форме и массе. Свое широкое применение данный метод получил с приходом интенсивных синхротронных источников излучения. Данный факт позволил получать информацию о кривых рассеяния за более короткое время в большем интервале углов, что является очень ценным для биологических молекул, поскольку они являются весьма нестабильными соединениями. Для получения качественных сигналов в методе МУРР, необходимо выполнить необходимые условия относительно концентрации и стабильности образца в буферном растворе [9].

3.1 Концентрация частиц и получаемая информация

Для достижения высокого уровня сигнала от монодисперсного раствора в экспериментах по малоугловому рентгеновскому рассеянию, необходимо наличие как минимум десятка миллиграмм на миллилитр образца в объёме 100 мкл (порядка 10^{15} частиц для белка средней массы). Рассмотрим случай раствора (рисунок 5), частицы которого являются полностью невзаимодействующими и независимыми друг от друга. Такая концентрация является состоянием *безграничного разведения*.

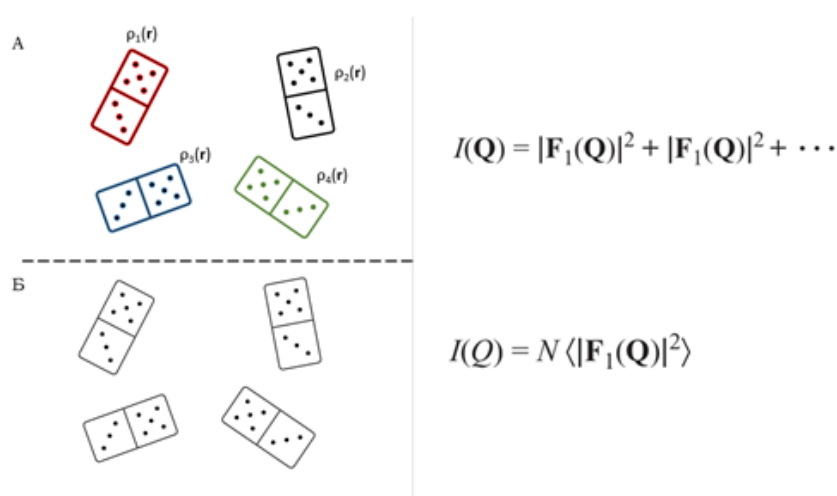


Рисунок 5 — Реальная пространственная структура в схематическом представлении (справа представление в обратном пространстве): А — раствор неидентичных молекул с различными плотностями амплитуды рассеяния, Б — идентичные невзаимодействующие молекулы

Запишем уравнение рассеянной волны в зависимости от вектора рассеяния для одной частицы:

$$F(\mathbf{Q}) = \sum_j f_j \exp(i\mathbf{Q} \cdot \mathbf{r}_j), \quad (4)$$

где r_j — вектор положения рассеивателя j , f_j — его амплитуда. Поскольку интенсивность излучения есть квадрат амплитуды, в случае отсутствия взаимных влияний друг на друга, интенсивность в единице объема раствора может быть

записана как:

$$I_N(Q) = \sum_{n=1}^N |F_n(Q)|^2, \quad (5)$$

где N – количество частиц. Случай тождественных частиц можно интерпретировать как одна частица в множестве различных ориентаций. Движение частицы есть перемещение, а перемещение можно описать изменением начала координат что, в свою очередь, не влияет на определения амплитуды, поскольку она зависит от взаимного расположения, а не от начала координат. Поэтому они будут обладать различными рассеивающими свойствами и можно записать уравнение для этого случая в виде: $I_n(Q) = N \langle |F(Q)|^2 \rangle$ (угловые скобки есть усреднение по пространству и ориентациям). Суммируя конечную интенсивность рассеяния для всех амплитуд, можно прийти к формуле Дебая для системы частиц, которые рассеивают излучение, находясь при этом в хаотичных ориентациях [10]:

$$I(s) = \sum_{n=1}^N I_j(s) + 2 \sum_{(j \neq k)} F_j(s) \cdot F_k(s) \cdot \frac{\sin sr_{jk}}{sr_{jk}}, \quad (6)$$

где функции F есть усредненные амплитуды рассеяния от отдельно взятых частиц. Двойная сумма есть интерференционный член, которым можно пренебречь (поскольку какие-либо эффекты присутствуют на сверхмалых углах, которые на эксперименте не наблюдаются). Отсюда следует, что в монодисперсной системе можно пренебречь вторым членом в уравнении (6). Тогда, форма кривой от такого образца будет эквивалентна форме кривой рассеяния от одной частицы:

$$I(s) = N \cdot I_j(s). \quad (7)$$

Выражение (7) даёт четкую установку по определению структуры на основании полученных экспериментальных данных.

Если усреднить интенсивность рассеяния в обратном пространстве по всему телесному углу, то можно прийти к выводу о том, что усреднение интенсивностей в обратном и прямом пространстве связаны между собой. Принимая во внимание этот факт, можно записать следующее выражение для интенсивности рассеяния:

$$I(s) = \langle I(s) \rangle_{\Omega} = 4\pi \int_0^{\infty} r^2 \gamma(r) \cdot \frac{\sin(sr)}{sr} dr \quad (8)$$

Выражение (8) является прямым Фурье-преобразованием, а параметры s и r в нём теперь являются скалярными

Функция $\gamma(r)$ есть функция распределения усредненного по ориентациям объёма и называется *корреляционной функцией*. Её выражение выводится из усреднения функции Паттерсона $P(\mathbf{r})$ по ориентациям, которая даёт представление о картине межатомных векторов и находит прикладное применение в методе прямого определения структуры без информации о фазах из экспериментов по дифракции. Хотя данная функция имеет и ограничения, поскольку её применение ограничивается лишь 15-20 атомами в элементарной ячейке. Запишем выражение для корреляционной функции:

$$\gamma(r) = \langle P(r) \rangle_{\omega} = \frac{1}{2\pi^2} \int_0^{\infty} s^2 I(s) \cdot \frac{\sin(sr)}{sr} ds \quad (9)$$

Выражение (9), в свою очередь, является обратным фурье преобразованием. Корреляционная функция есть усредненное от произведения двух флуктуаций плотности от точек, которые находятся на расстоянии r друг от друга.

3.2 Радиус инерции, кривая рассеяния, аппроксимация Гинье

Используем разложение в ряд для выражения Дебая. Получим следующее:

$$\frac{\sin(sr)}{sr} = 1 - \frac{s^2 r^2}{3!} + \frac{s^4 r^4}{5!} - \dots \quad (10)$$

Подставим полученное разложение в выражение (8) для интенсивности рассеяния в обратном пространстве по второму приближению:

$$\begin{aligned} I(s) &= 4\pi \int_0^D r^2 \gamma(r) dr - \frac{s^2}{6} 4\pi \int_0^D r^4 \gamma(r) dr = \\ &= I(0) \cdot \left[1 - \frac{s^2}{3} \cdot \frac{\int_0^D r^4 \gamma(r) dr}{2 \int_0^D r^2 \gamma(r) dr} \right] = I(0) \cdot \left[1 - \frac{s^2}{3} R_g^2 \right], \end{aligned} \quad (11)$$

где R_g^2 есть радиус инерции рассматриваемого объекта. Вместо массового распределения в его явном виде (по аналогии с механикой), используется распределение электронной плотности:

$$R_g^2 = \frac{\int \rho(r) r^2 dr}{\int \rho(r) r dr}. \quad (12)$$

Если перейти обратно, в прямое пространство, то полученное выражение (11) можно представить в виде аппроксимаций Гинье:

$$\begin{aligned} I(Q) &= I(0) \exp\left(-\frac{1}{3} R_g^2 Q^2\right) \\ \ln I(Q) &= \ln I(0) - \left(\frac{1}{3}\right) R_g^2 Q^2. \end{aligned} \quad (13)$$

Данная аппроксимация, в общем случае, будет применима, когда численно $QR_g \leq 1$.

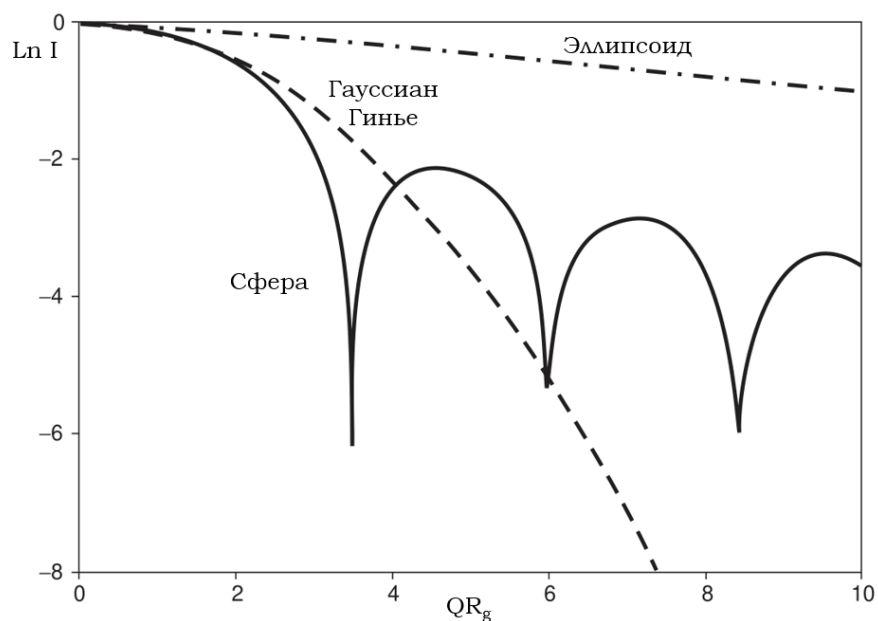


Рисунок 6 — Логарифм интенсивности рассеяния как функция QR_g для различных геометрий

Кривые рассеяния представлены на рисунке (6). Как видно, при малых QR_g , аппроксимация Гинье очень хорошо согласовывается с экспериментальными кривыми. Напротив, при больших QR_g видно расхождение между аппроксимирующей кривой и полученными данными [11].

Интерпретация и обработка экспериментальных данных должны включать в себя построение зависимости логарифма интенсивности рассеяния от квадрата вектора рассеяния. Таким образом, из данного построения можно получить два параметра: $Q = 0$ (линейная аппроксимация) и угол наклона данной кривой, из которой уже, в свою очередь, согласно уравнению (13) будут найдены радиус инерции и доверительный интервал.

3.3 Экспериментальная кривая рассеяния. Функция распределения расстояний

График зависимости рассеяния в зависимости от Q есть кривая в обратном пространстве. Необходимо понять каким образом связана информация из реального пространства с информацией от кривой рассеяния в обратном

пространстве. Для этого, вспомним про Фурье-преобразование, которое явно связывает между собой два пространства: прямое и обратное. Поскольку $I(Q)$ это усреднение $|F(Q)|^2$ по всем вращательным осям, сделав обратное Фурье преобразование, $I(Q)$ будет зависеть от расстояний между частями структуры:

$$V\gamma(r) = \frac{1}{2\pi^2} \int_0^{\infty} Q^2 I(Q) \frac{\sin Qr}{Qr} dQ. \quad (14)$$

Функция $V\gamma(r)$ равносильна функции Патерсона. Фактически, верхний предел интеграла в предыдущем выражении можно заменить на D_{max} , потому что разностная плотность равна 0 для значений r , больших чем D_{max} . Перепи-сывая уравнение (14) в интегральной форме Дебая для $I(Q)$ можно записать:

$$I(Q) = V \int 4\pi r^2 \gamma(r) \frac{\sin Qr}{Qr} dr = \int p(r) \frac{\sin Qr}{Qr} dr, \quad (15)$$

$p(r) = 4\pi r^2 V\gamma(r)$ -распределение пар расстояний в исследуемом объекте. Данная функция может однозначно определять структуру в случае, когда исследуется всего лишь несколько атомов. Когда речь заходит об объекте, количество атомов которого является большим, осуществить точное определение структуры не предоставляется возможным, так как единые пики на графике функции распределения вероятности будут сливаться в единое целое от всех векторов межатомного распределения расстояний. Сопоставив выражения (14) и (15), приходим к выводу, что функция распределения пар расстояний есть ничто иное, как обратное Фурье-преобразование зависимости интенсивности от вектора Q . Таким образом, получаем окончательное выражение для $p(r)$:

$$p(r) = \frac{2}{\pi} r^2 \int_0^{\infty} Q^2 I(Q) \frac{\sin Qr}{Qr} dQ \quad (16)$$

Для данного выражения измерения при $I(Q=0)$ и при очень больших Q не предоставляется возможным, поскольку в первом случае поиск $I(0)$ производится с помощью аппроксимации и поиска точки пересечения с осью; а во втором случае – измерить бесконечно большие Q просто не возможно физически, поскольку существует аппаратное ограничение.

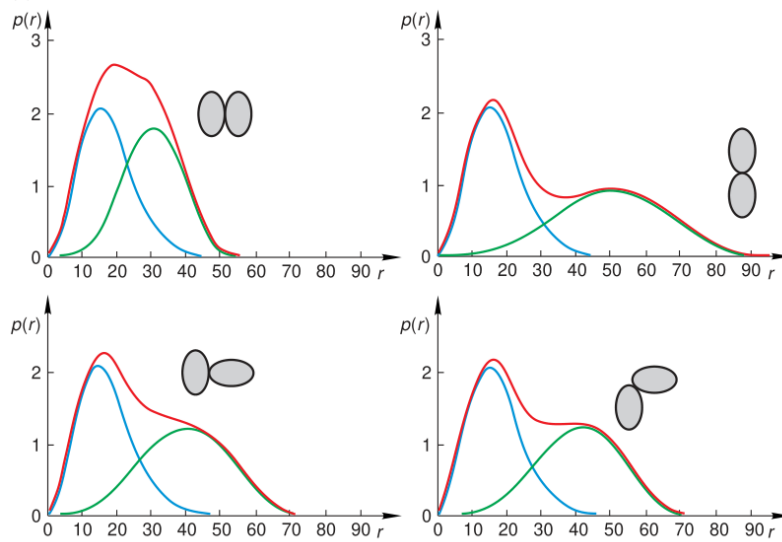


Рисунок 7 — Отличия функций пар расстояний для различных ориентаций друг относительно друга двух составных частей одного объекта. Синяя линия – мономер, красная линия – общая функция, зеленая – их разность [12]

3.4 Информативность функций $p(r)$ и $I(Q)$ для монодисперсного приближения

Функции $p(r)$ и $I(Q)$ различными способами описывают одну и ту же информацию. В целом, вышеперечисленные функции взаимно-определяемы, поскольку они связаны между собой Фурье преобразованием. Каждая отдельно взятая зависимость может быть использована в качестве инструмента для описания или составления модели, которая будет сравниваться с экспериментальными данными. Согласно этому, в определенных случаях предпочтение для описания данных отдаётся одной из функций. К примеру, в случае частиц с контрастными, относительно растворителя, границами используется функция распределения пар расстояний. Таким образом получается, что функции

$p(r)$ и $I(Q)$ не содержат в себе четкой информации о структурной организации на уровне координат, а лишь накладывают некоторые ограничения, исходя из которых становится понятна стратегия по определению структуры.

При проведении эксперимента по малоугловому рентгеновскому рассеянию фиксируется только интенсивность рефлексов, поэтому информация о фазе волны теряется. Такая потеря данных сказывается на информативности метода в худшую сторону, поскольку волна описывается амплитудой и фазой. Потеря данных так же наблюдается и из-за того, что в эксперименте производится усреднение по всем вращательным проекциям; в таком случае зависимость интенсивности является не функцией вектора \mathbf{Q} , а как функция от скаляра.

Несмотря на приведенные выше недостатки, получить информацию все же можно. Анализируя свойства функций $I(Q)$ и $p(r)$ приводит к тому, что интегрирование $p(r)$ по всей поверхности равно квадрату амплитуды рассеяния:

$$\int_0^{D_{max}} p(r)r^2 dr = \left| \int (\rho(r) - \rho^0) dV \right| = \left| \sum m_j \right|^2 = I(0), \quad (17)$$

где интегрирование производится до максимального расстояния. Так же, можно определить радиус гирации по контрасту амплитуды рассеяния:

$$R_g^2 = \frac{\frac{1}{2} \int_0^{D_{max}} p(r)r^2 dr}{\int_0^{D_{max}} p(r) dr}. \quad (18)$$

Так же и разложение второго порядка функции $I(Q)$ есть инвариант Порода. Из-за интегрирования до бесконечного верхнего предела, инвариант является чувствительным к тенденции зависимости интенсивности от рассеяния при её конечных значениях, где она обычно описывается с большой

погрешностью. Таким образом, из информации по кривой рассеяния можно получить данные о структурных параметрах частицы, таких как: *радиус гирации, максимальное расстояние, объем, площадь поверхности и масса объекта.*

3.5 Случай взаимодействующих объектов и его связь с реальным объектом

Отойдем от допущения в пункте (3.1) для монодисперсных невзаимодействующих частиц. Пусть частицы начнут взаимодействовать между собой, соответственно, раствор становится не бесконечно разведенным. Такой вариант рассмотрения системы является наиболее приближенным к реальной жизни, поскольку внутри клетки количество белков настолько велико, что даже после их выделения и очистки, концентрация раствора далека от случая бесконечного разбавления. Поскольку весь приведенный выше математический аппарат относительно интерпретации данных построен на предположении усреднения по всем вращательным симметриям, в реальном случае такое допущение работает не во всем объеме. В случае рассмотрения не идеализированной системы, начинают появляться эффекты, когда положение и ориентированность каждой частицы очень сильно зависит от другой частицы. Таким образом, создается взаимозависимая система, в которой вокруг частиц создается недостаток места для степеней свободы.

Зависимость потенциальной функции и коэффициент рассеяния от формы и количества молекул показаны на рисунке (8). На основе этого, можно "предсказать" тенденцию для группы частиц со сферической симметрией. При потенциале отталкивания рассеивающий коэффициент возрастает, обратно, форм-фактор уменьшается. В результате этого, кривая рассеивания в областях, где возможна аппроксимация Гинье, приводит к радиусу гирации и

значению нулевого рассеивания, которые теоретически должны быть меньше случая идеализированного раствора.

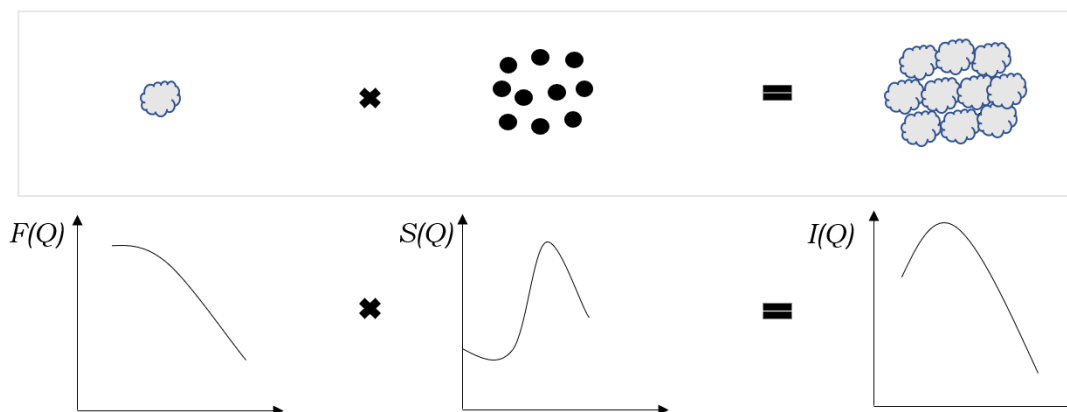


Рисунок 8 — Зависимость форм-фактора $F(Q)$ и структурного фактора $S(Q)$ от типа и количества. Результат их умножения – интенсивность рассеянного излучения

В свою очередь, эффекты интерференции от частиц настолько малы, что они *не вносят* существенного вклада в результаты эксперимента. Данный факт так же подтвержден и экспериментально на кривых раствора белка лизоцима для различных концентраций [13].

3.6 Получение набора структур

Задача по однозначному определению структуры на основе данных по малоугловому рассеянию является нерешаемой, поскольку в силу вступают условия, которые обсуждались в 3.4 об информативности функций. Появляется необходимость в решении обратной задачи рассеяния из-за отсутствия информации о фазах и вращательного усреднения. На сегодняшний день существуют различные методы, которые уменьшают количество погрешностей и ошибок в конечном определении структуры [14]. Суть этих методов состоит в методе подгонки теоретических данных $I(Q)$ для экстраполяции экспериментальных данных с как можно меньшими погрешностями. Проверка согласованности полученных данных с экспериментом проводится на основании

сопоставления $R_g^2, D_{max}, V, S, \sum m^2$.

3.7 Поиск глобального минимума и метод Монте-Карло

Поиском глобального минимума является метод имитации процессов кристаллообразования при переходе из жидкости в твердофазное состояние. В таком состоянии система имеет минимум свободной энергии, отсюда и название - поиск глобального минимума.

Методом Монте-Карло принято называть совокупность различных численных методов, которые базируются на большом количестве воссоздания случайных процессов с целью приближения вычисленных теоретических характеристик к реальным аналогическим характеристикам исследуемого объекта [15].

Вышеописанные методы находят свое применение для определения структур с над-атомным разрешением, которые получаются из экспериментов по малоугловому рассеянию. Их основой является поиск случайных структур, совпадающих по параметрам наилучшим образом с экспериментальными данными. Непосредственными плюсами данных методов является отсутствие необходимости в энергетической минимизации и её корректировке, а так же длительных расчетов зависимостей рассеяния по уже известным многочисленным структурам.

Для определения структуры в качестве отправной точки выбирают сферу с радиусом D_{max} , который определяется из функции распределения пар расстояний. Сфера заполняется большим количеством сфер маленьких радиусов, которые называются *виртуальными атомами (модельные атомы)* и имитируют реальные атомы в структуре. Происходит смещение заданных виртуальных атомов с определенной заданной заранее дисперсией, расчёт модельной кривой рассеяния и сравнение её с эмпирической кривой. Если

происходит сближение, то полученная конфигурация частиц принимается с некоторой вероятностью. После этого, по-новой происходит смещение и вновь пересчёт. К полученной модели применяются некоторые условия относительно её объема, массы, непрерывности объема и компактности. Таким образом, описанный метод занимается поиском такой искусственно созданной модели атома, которая минимизировала бы функцию расхождения между экспериментальной и модельной кривой рассеяния [16].

4. Используемая аппаратура для проведения эксперимента по малоугловому рассеянию

Целью любого эксперимента по малоугловому рассеянию излучения является получение конструктивных данных об интенсивностях дифракции на малых углах, которые могут помочь в поиске структурных неоднородностей исследуемой фазы. При измерении зависимости интенсивностей от малых углов рассеяния сталкиваются с некоторыми трудностями: хоть и пучок будет иметь достаточную энергию, всё же эксперимент может не в полной мере предоставлять информацию в области малых углов.

Безусловно, вид излучения будет определять и конструкционную особенность прибора, на котором будут проводиться эксперименты, а так же некоторые условия проведения эксперимента. Для этого, используется два основных источника излучения: рентгеновские трубки как источник *рентгеновского излучения* и кольцевые синхротроны как источник *синхротронного излучения*

4.1 Особенности малоугловых установок

Для более детального рассмотрения принципов построения и параметров малоугловых установок, следует, для начала, рассмотреть основные усло-

вия проведения измерения интенсивностей на малых углах рассеяния. Данные принципы не имеют зависимости от типа излучения и детектора. Главное отличие от других установок – это высокое угловое разрешение, с помощью которого можно получить информацию в отличии интенсивностей при самых малых углах отклонения.

4.1.1 Угловое разрешение

Основная идея эксперимента по малоугловому рассеянию состоит в измерении интенсивности рассеяния $I(q)$ от малых значений вектора рассеяния, которые в свою очередь, являются меньше, чем межатомное расстояния. Эти значения варьируются в интервале $q = 10^{-4} - 10^{-1} \text{ \AA}$. Поэтому, для более крупных систем следует использовать более крупные q . Такое решение не является необоснованным, поскольку для малых углов необходимо использовать длины волн, которые не могут превышать межплоскостное расстояние. Отсюда следует, что даже небольшое увеличение длины волны λ приводит к облегчению проведения эксперимента по рассеянию.

Обратимся к схеме малоуглового рассеяния, которая представлена на рисунке (9). Создание узкого пучка первоначального излучения, которое взаимодействует с образцом, производится с помощью системы коллиматоров, которая состоит из круглых диафрагм малого диаметра, разнесенных друг относительно друга. Такая конструкция представляет возможность приблизиться к идеальным условиям плоской волны. Соотношение диаметра отверстия к расстоянию между ними есть величина, которая задаёт разрешение для исследования малоуглового рассеяния, и соответственно, верхний предел по размеру, который может быть изучен на соответствующей схеме установке.

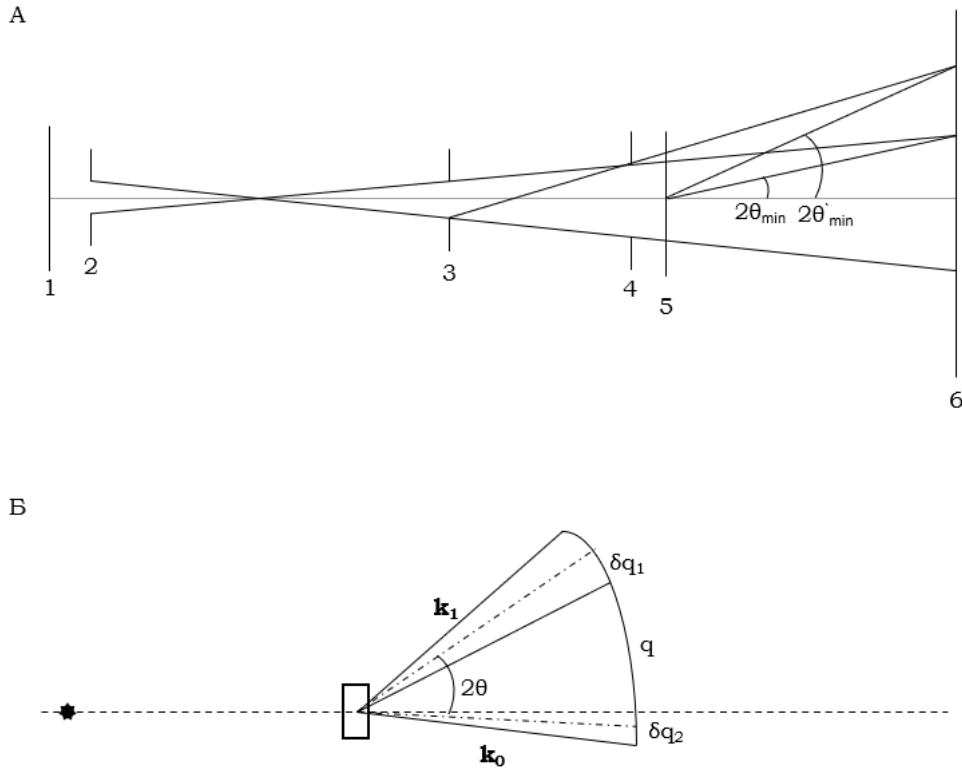


Рисунок 9 — Схематическое представление рассеяния в прямом (А) и обратном (Б) пространствах: 1 – источник, 2, 3, 4 – она коллиматора, 5 – объект исследования, 6 – детектор

Оценим величину Δq , которая является неопределенностью в точном определении параметра. Согласно [17]:

$$\Delta q = \frac{\partial q}{\partial(2\theta)} \Delta 2\theta + \frac{\partial q}{\partial \lambda} \Delta \lambda = \frac{2\pi}{\lambda} \Delta(2\theta) + s \frac{\Delta \lambda}{\lambda}, \quad (19)$$

где $\Delta(2\theta)$ – неоднозначность угла, описывающий рассеяние, $\Delta \lambda$ – немонохроматичность излучения (приближенный к реальности случай). Расходимость пучка обозначим за $\Delta \Omega_1$, а разрешение детектора $\Delta \Omega_2$. Из геометрических соображение рисунка (9Б) следует, что $\Delta(2\theta) = \Delta \Omega_1^{1/2} + \Delta \Omega_2^{1/2}$. Сопоставляя полученное выражение с выражением (19), получим выражение для уровня углового разрешения:

$$\frac{\Delta q}{q} = \frac{\Omega_1^{1/2}}{2\theta} + \frac{\Omega_2^{1/2}}{2\theta} + \frac{\Delta \lambda}{\lambda}. \quad (20)$$

Помимо параметров q_{min} и Δq есть величина, которая описывает пространственное разрешение — q_{max} . Этот параметр численно описывает момент, до которого производятся измерения интенсивности. Характеризует предел различных разнородностей, которые можно определить в эксперименте.

4.1.2 Рентгеновская трубка как источник излучения

Для проведения различных структурных исследований и первичного анализа используется характеристическое излучение рентгеновского диапазона от атомов металлов, которые бомбардируются термоэмиссионными электронами с энергией 10 — 100 кэВ.

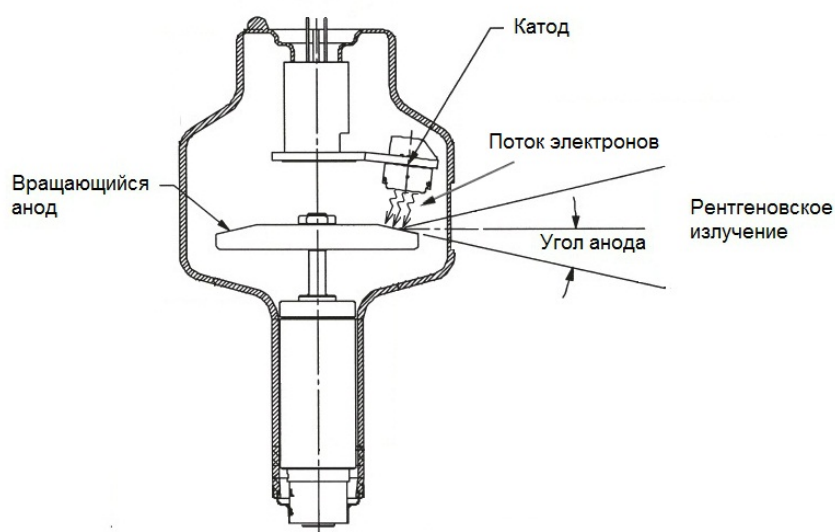


Рисунок 10 — Схематическое устройство рентгеновской трубки [18]

Такой принцип получения рентгеновского излучения является относительно дешевым способом и осуществляется в больших масштабах в виде вакуумных отпаянных рентгеновских трубок с анодом и катодом, которые задают уровень мощности рентгеновской трубки [19].

Используемые в экспериментах длины волн рентгеновского излучения

находятся в промежутках 0,2 - 2,3 Å. Из-за эффектов неупругого взаимодействия (поглощение веществом), длинноволновый диапазон, обычно, не используется. В качестве материала анода в рентгеновской трубке чаще всего используются Cr (2,3 Å), Cu (1,54 Å) и другие вещества. Между трубками так же существует отличие и в размере фокусного пятна, размерам анода и его статичности либо наличия вращения. Интенсивность пучка задаётся его мощностью, которая находится в пределах десятка киловатт. При уменьшении пятна, удельная мощность пучка возрастает, поскольку мощность зависит от нагрева материала анода [20].

Относительно мощными лабораторными источниками рентгеновского излучения является трубки с вращающимся анодом. Такая конструкция создает равномерный износ материала анода и улучшает теплоотвод. Постоянный вакуум создается либо когда трубка герметична (запаяна), либо при постоянной работе вакуумного насоса, который параллельно работает в режиме охлаждения трубки. Разницы в длинах волн между статичным анодом и вращающимся не наблюдается, поскольку длина волны излучения определяется только материалом анода [21].

4.1.3 Детектор рентгеновского излучения

В зависимости от типа используемого детектора существует две стратегии регистрации полученного сигнала: *последовательная* регистрация (точка за точкой) и *многоканальная* (регистрируется одновременно вся область). В начале научного развития метода малоуглового рассеяния использовались фотопластинки. Применение фотопластинок повышало уровень пространственного разрешения, но чувствительность такого метода была все же низкой для сбора относительно хороших данных, из которых можно было бы получить желаемую информацию. На смену фотопластинкам пришли сцинтилля-

ционные детекторы, которые могли уже не только регистрировать кванты, но и определять их энергию [22]. Такие решения и стали основой детекторов с последовательной регистрацией точек. Данные счётчики имеют высокую скорость счета, малое "мертвое" время, а так же удобны для отображения "real-time" информации на компьютере. Недостатком такого метода является то, что происходит непосредственное механическое перемещение детектора в места, где должен регистрироваться рефлекс.

На смену последовательным детекторам пришли позиционно чувствительные (координатные) детекторы, которые могут работать в параллельном (многоканальном) режиме и регистрируют численное количество попавших на плоскость детектора квантов. В данном виде детекторов сочетаются преимущества описанной ранее фотопленки (высокая разрешающая способность) и одноканального счетчика (в области способности вычислить энергию квантов и точности измерений).

На сегодняшний день большее применение приходится на *твердотельные* датчики излучения, которые являются двумерными матрицами детекторов. Такое высокое пространственное разрешение достигается за счёт фотодиодных матриц, либо приборов зарядовой связи (ПЗС). У каждого из них есть свои плюсы, к примеру, у фотодиодных – высокая скорость счёта, у ПЗС – более высокий порядок уровня насыщения.

4.1.4 Синхротронное излучение и эксперимент

Открытие синхротронного излучения открыло большие возможности в области исследований методами малоуглового рассеяния. В отличие от рентгеновского излучения, синхротронное генерируется при отклонении ускоренных электронов по замкнутой круговой орбите [23]. Данное излучение обладает важным рядом свойств, которые в хорошей степени удовлетворяют

условиям проведения структурных экспериментов:

- широкий спектр излучения;
- высокая поляризации;
- большая интенсивность начального пучка;
- крайне малая угловая расходимость;
- возможность проведения искусственных прерываний излучения во времени.

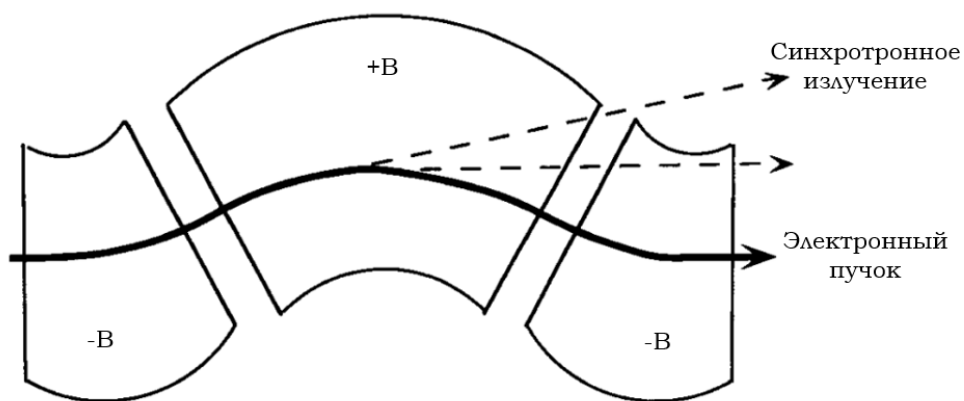


Рисунок 11 — Схематическое представление генерации СИ на отклоняющих магнитах

Перечисленные свойства, либо их комбинация, в значительной повысили качество экспериментов по рассеянию. Основные характеристики, которые прямым образом влияют на качество эксперимента – это низкая угловая расходимость первоначального пучка и его высокая степень интенсивности наряду с широким спектральным окном.

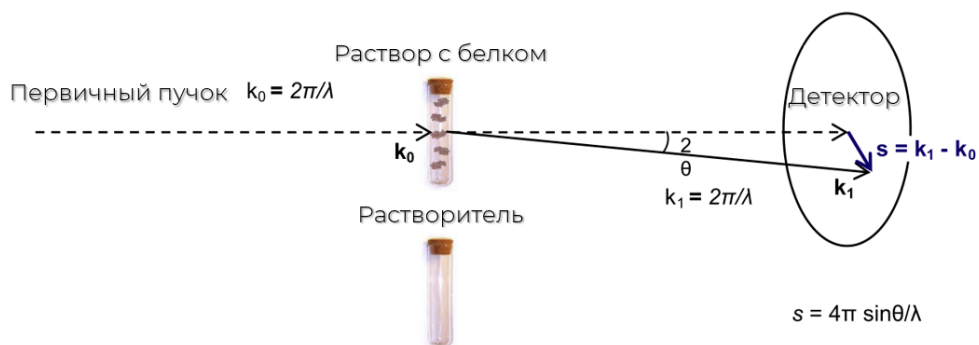


Рисунок 12 — Принципиальная схема проведения эксперимента по малоугловому рассеянию: k_0 , k_1 – волновые векторы начального и рассеянного направления, s вектор рассеяния

На рисунке (12) представлена принципиальная схема проведения эксперимента. Данная схема не зависит от типа используемого излучения. Для проведения эксперимента необходимо наличие двух растворов: исходный белковый раствор (1) и буферная среда (2), в которой находится объект исследования. Производится измерение интенсивностей от двух растворов, затем из интенсивностей первого вычитается интенсивности второго, поскольку буферный раствор тоже участвует во взаимодействиях с излучением и вносит «лишнюю» информацию, предоставляя информацию об эксперименте как о полидисперсном растворе [24]. Все измерения биологических молекул производятся с охлаждением до $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ с целью предотвращения агрегации образца вследствие радиационного повреждения. Оценка степени агрегации происходит с помощью контроля радиуса гирации: при увеличении или уменьшения данного параметра эксперимент прекращается.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

5. Объект исследований

В качестве объекта исследований нами был выбран ГТФ-связывающий белковый фактор YsxC из патогенного микроорганизма *Staphylococcus aureus*, который был выделен и очищен в НИЛ «Структурная биология» ИФМиБ Казанского (Приволжского) Федерального университета.

Основные физико-химические данные получены в программе ProtParam tool [25] на основе аминокислотной последовательности. Аминокислотная последовательность представлена 196 аминокислотными остатками. Путём молекулярного клонирования нуклеотидной последовательности в выбранный нами вектор, получен образец с N-концевым гистидиновым тагом. Полученные данные (без учета гис-тага):

- Молекулярная масса 22,6 кДа;
- Изоэлектрическая точка 6,84;
- Коэффициент экстинкции $E = 18910$ (в пересчёте Abs 0.1 % (=1 g/l) 0.834);

Аминокислотная последовательность, на основе которой производились вычисления, представлена ниже:

MKVNPNNIELIISAVKKEEQYPETELSEVAL SGRSNVVGKSTFINSMIGRKNMARTSQQPGK
TQTLNFYNIDEQLIFVDVPGYGYAKVSKTQ REKFGKMIEEYITKRENQLVIQLVDLRHD
PTQDDILMYNYLKHFDIPTLVICTKEDKIP KGKVQKHIKNIKTQLDMDPDDTIVSYSSIQ
NNKQQQIWNLIEPYIS

5.1 Материалы и методы

В настоящей работе использовалось большое количество различных растворов, поскольку путём вариации параметров буферного раствора (рН, концентрация солей, состав и т.д.), достигаются стабилизирующие белок условия [26].

- Бактотриптон, дрожжевой экстракт, NaCl, дистиллированная вода, де-ионизированная вода (MQ);
- Ингибитор протеаз PIC (Complete Protease Inhibitor cocktail EDTA-free), Аммония сульфат $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, ИПТГ;
- Соли имидазола, хлорида аммония; гидроксид натрия, гидрофосфат натрия и дигидрофосфат натрия;
- Смола для аффинной хроматографии Ni-NTA Superflow, фильтры 0,45 и 0,22 мкм;
- Механические дозаторы, наконечники, концентратор центрифужный (Amicon) 10 кДа;
- Бактериальный штамм *E. coli* BL21 Star (DE3), плазида pet28 α со вставкой гена исследуемого белка YsxC.

Таблица 1 — Стоковые растворы

Название раствора	Состав
Среда LB	натрия хлорид 1%, бактотриптон 1%, дрожжевой экстракт 0,5 %; + 1,5 агара (для чашек Петри)

Продолжение таблицы 1

Лизирующий буфер (CRB)	50 мМ натрий фосфатного буфера (pH 6,0) + 300 мМ хлорида натрия, MQ
Буфер А (Wash A)	50 мМ натрий фосфатного буфера (pH 6,0) + 700 мМ хлорида натрия, MQ
Буфер Б (Wash B)	50 мМ натрий фосфатного буфера (pH 6,0) + 700 мМ хлорида натрия + 20 мМ имидазола, MQ
Элюирующий буфер	50 мМ натрий фосфатного буфера (pH 6,0) + 300 мМ хлорида натрия + 300 мМ имидазола, MQ
Гель-фильтрационный буфер	50 мМ натрий фосфатного буфера (pH 6,0) + 300 мМ хлорида натрия, MQ
Гель для электрофореза	<p>Концентрирующий слой: Tris-HCl pH 6,8 0,13 M, 5% акриламид, 0,1 % SDS, 0,1 % PSA, 1 мкл на 1 мл, MQ</p> <p>Разрешающий слой: Tris-HCl pH 8,8 0,375 M, 15% акриламид, 0,1 % SDS, 0,1 % PSA, 1 мкл на 1 мл, MQ</p>
Трис-глицин буфер	Tris-base 25 мМ, глицин 250 мМ, SDS 0,1 %, MQ

5.1.1 Трансформация в компетентные клетки

Процесс трансформации представляет собой встраивание чужеродной части ДНК исследуемой клетки с последующим переносом в модельную систему, в данном случае в *E. coli*. с помощью кольцевых молекул ДНК - плазмид. В нашем случае, компетентные клетки трансформировались плазмидой *pet28 α* со вставкой гена целевого белка *usxC*.

Для этого аликвота компетентных клеток (100мкл) размораживалась на льду. После разморозки, добавляли 1.5 мкл (0.1 мкг) плазмидной конструкции ДНК к клеткам, затем инкубировали во льду в течении 20 минут. Производили процедуру «температурного шока» (heat shock) с целью улучшения работы кальциевых каналов клетки и окончательного проведения этапа трансформирования плазмидной ДНК внутрь клетки. Полученный субстрат с добавлением 900 мкл питательной среды LB инкубировался при 37 °С в течение часа. После этого, 100 мкл клеточной культуры растерли с помощью шпателя Дригальского на чашке с агаризованной средой LB с добавлением двух антибиотиков (канамицин и хлорамфеникол). Добавление антибиотиков нужно для проведения селекции только тех клеток, в которых успешно прошла трансформация. Полученная чашка инкубировалась 12 - 18 часов при 37 °С в термошкафу.

5.1.2 Выделение белка

С целью наработки клеточной массы с геном нашего целевого белка, одну колонию с чашки Петри перенесли в 25 мл жидкой среды LB с добавлением антибиотиков, соответствующих маркеру селекции. Полученный субстрат инкубировался в термошейкере при 37 °С 180 rpm ночь (16 – 18

часов). После этого, жидкая биомасса переносилась в 1 литр среды LB с добавлением антибиотиков и разливалась по колбам. Колбы с жидкой средой с добавлением клеток инкубировались в термошейкере при 37 °С 180 об/мин до достижения оптической плотности OD = 1 о. е. После достижения нужного показателя оптической плотности, производили индукцию экспрессии добавлением 0.1 mM IPTG. На данном этапе колбы с культурой инкубировали при комнатной температуре в течение 3 часов при постоянном перемешивании 180 об/мин. Клеточную биомассу отделяли от жидкой среды методом центрифугирования на центрифуге BECKMAN Avanti J-25. Полученный осадок хранился в морозильном шкафу при температуре -20 °С. Осажденные клетки далее оттаивали на льду и ресуспендировали в буфере CRB с добавлением PIC. После получения гомогенного раствора, разрушали клеточную стенку с помощью ультразвуковой установки BANDALIN (мощность 50 %, цикл 5 раз 50 секунд) при температуре термостатируемой комнаты 4 °С. Полученный субстрат отделяли от разрушенной массы с помощью центрифугирования на центрифуге BECKMAN Avanti J-25 25000 об/мин в течение 30 минут при температуре 4 °С, и финальным этапом было контрольное центрифугирование на ультрацентрифуге BECKMAN COULTER при 45000 об/мин в течение 45 минут при температуре 4 °С. При таком сочетании ультрацентрифугирования все тяжелые клеточные субстраты оседают на дне в виде дебриса, а белок, в силу своей малой степени осаждаемости, остается находиться в жидкой фазе [27].

5.1.3 Аффинная хроматография

Полученная на предыдущем этапе недоосажденная жидкость наносилась на 20 мл колонку с 2 мл Ni-NTA Superflow сорбента. За счёт наличия гистидинового тага белок связывался с ионами никеля вследствие образо-

вания аффинной связи. После прохождения всего объема жидкости через колонку, промывали сорбент от неспецифически связанных белков последовательным нанесением 20-ти миллилитров буферов А и Б. После этого, с помощью элюирующего буфера отмывали целевой белок с никелевой смолы. При отмывке белок отбирали во фракции по 500 мкл. После этого, измеряли концентрацию по длине волны 280 нм (без учета коэффициента экстинкции). На данном этапе получалось в массовом эквиваленте порядка 30 мг белка.

5.1.4 Гель-фильтрация

Завершающим этапом очистки белка является метод гель-фильтрации. Данный метод основан на разнице скорости проникания сквозь стационарную фазу пористого материала (сорбента) в зависимости от размера белков. Таким образом, происходит разделение белковых молекул в зависимости от их молекулярной массы.

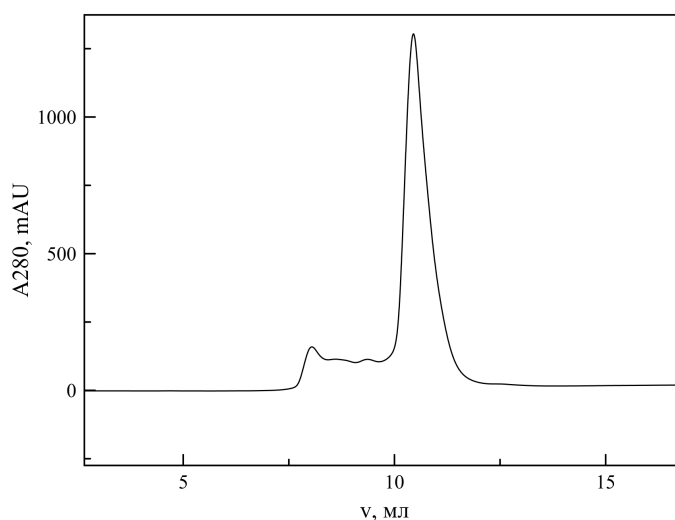


Рисунок 13 — Профиль гель-фильтрации исследуемого белка: v - объем, прошедший через колонку, A_{280} - поглощение на заданной длине волны

Очистку производили с помощью хроматографа BioRad на колонке Superdex 75 10/300 в термостатируемом помещении при 4° . На колонку на-

носился образец объемом 250 мкл с концентрацией не более 10 мг/мл. Анализ качества очистки производили по профилю гель-фильтрации на длине волны 280 нм (рисунок 13). Скорость гель-фильтрационного потока буфера через колонку был установлен на уровне 0,5 мл/мин. После этапа гель-фильтрации, отобрали фракции и анализировали с помощью полиакриламидного гель-электрофореза для проверки чистоты образца. Пиковые фракции были отобраны и сконцентрированы на концентраторе Amicon-Ultra (Merck Millipore, Германия) до двух концентраций: 6 мг/мл и 12 мг/мл.

5.1.5 Электрофорез и проверка стабильности

В полиакриламидном гель-электрофорезе разделение белков происходит по их молекулярным массам, которые связаны с поверхностным зарядом. Между стеклами для гель-электрофореза залили 15 % раствор разрешающего геля.

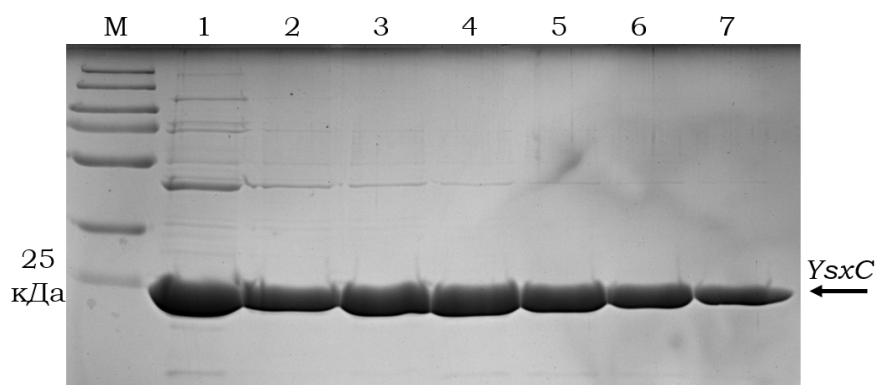


Рисунок 14 — Электрофоретическая картинка белка *YsxC* после завершающего этапа очистки: М - маркерная лестница, 1 - контроль до очистки, 2-7 - фракции белка

После того, как нижняя часть геля заполимеризовалась, залили 5 % раствор концентрирующего слоя. Далее в лунки поместили образцы, смешанные с денатурирующим красителем, поместили систему в трис-глицин буфер и подали напряжение 110 В. После того, как электрофорез закончился, поместили гель в ванночку с красителем кумаси, затем отмыли окрашенный гель

в дистилляте от лишней окраски. Анализировали проявившиеся зоны с белком относительно маркерной лестницы с известными массами. Подтвердили необходимый уровень чистоты и наличие исследуемого белка.

После этого, оставили образец для оценки его стабильности при комнатной температуре на несколько суток. Затем сделали аналитическую оценку стабильности с помощью ПААГ электрофореза. Данный этап является важным для дальнейшего проведения эксперимента по малоугловому рассеянию, поскольку для проведения измерений требуется стабильный образец, который не образует агрегатов при комнатной температуре. На этом этапе пробоподготовка образца для дальнейшего проведения эксперимента по малоугловому рассеянию рентгеновского излучения является завершённой, после чего можно переходить к следующему этапу.

5.2 Малоугловое рассеяние и обработка данных

Эксперимент по малоугловому рассеянию исследуемым образцом проводился на курчатовском специализированном источнике синхротронного излучения «КИСИ-Курчатов».

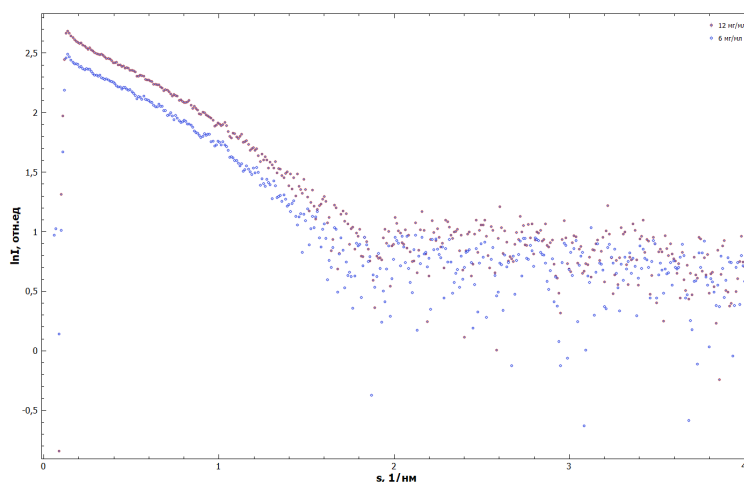


Рисунок 15 — Разностные кривые, полученные из эксперимента по малоугловому рассеянию для двух концентраций

Ниже приведены некоторые параметры экспериментальной станции син-

хротронного излучения БиоМУР, на которой проводился эксперимент по малоугловому рентгеновскому рассеянию исследуемого белка:

- Энергия пучка 8 КэВ;
- Диапазон исследуемых параметров структур: 0,2 - 200 нм;
- Детектор DECTRIS Pilatus3 1M, 1043x981 точек, 20 бит 500 Гц.

5.2.1 Определение инвариантов

Для исключения влияния межчастичного взаимодействия между молекулами белков, эксперимент производился на двух концентрациях образца: 6 мг/мл и 12 мг/мл. Измерения проводились при температуре 4 °С. Полученные кривые рассеяния представлены на рисунке (15). Первичный анализ и обработка данных производилась в программном пакете PRIMUS [28]. Данная программа предназначена для первичной обработки данных из эксперимента по малоугловому рассеянию, имеет минимальный набор функций, который помогает эффективно обработать начальные данные.

В программе PRIMUS производилось статистическое усреднение кривых по времени, а так же их калибровки и вычитании сигнала от буфера, чтобы получить информацию только о монодисперсной системе. Дополнительными возможностями данной программы является и возможность получить первичную информацию о молекулярной массе исследуемого белка, радиусе гирации и аппроксимации Гинье и Кратки. На основе полученных данных имеется возможность рассчитать распределение пар расстояний $p(r)$ с помощью Фурье-преобразования полученных данных зависимости интенсивности от рассеяния. Данный этап является серьезным шагом в начале обработки данных, поскольку качество конечной электронной плотности напрямую зависит от первоначальной обработки данных.

Анализ графика, который представлен на рисунке (15) показывает, что влияния межчастичного взаимодействия от концентрации белка не наблюдается, поэтому можно в дальнейших этапах обработки использовать данные от более высокой концентрации, поскольку интенсивность от более высоких концентраций больше, соответственно качество конечных данных будет лучше.

Для определения структурных инвариантов выполнили построения Гинье и Кратки. Полученные графики представлены на рисунке (16). Поскольку в координатах Гинье есть линейная зависимость, это свидетельствует о том, что раствор является монодисперсным и условия для применения математического аппарата для обработки данных является уместным. Кривая рассеяния в координатах Кратки имеет куполообразную форму, что свидетельствует о том, что белок является глобулярным и можно работать в приближении сферической молекулы.

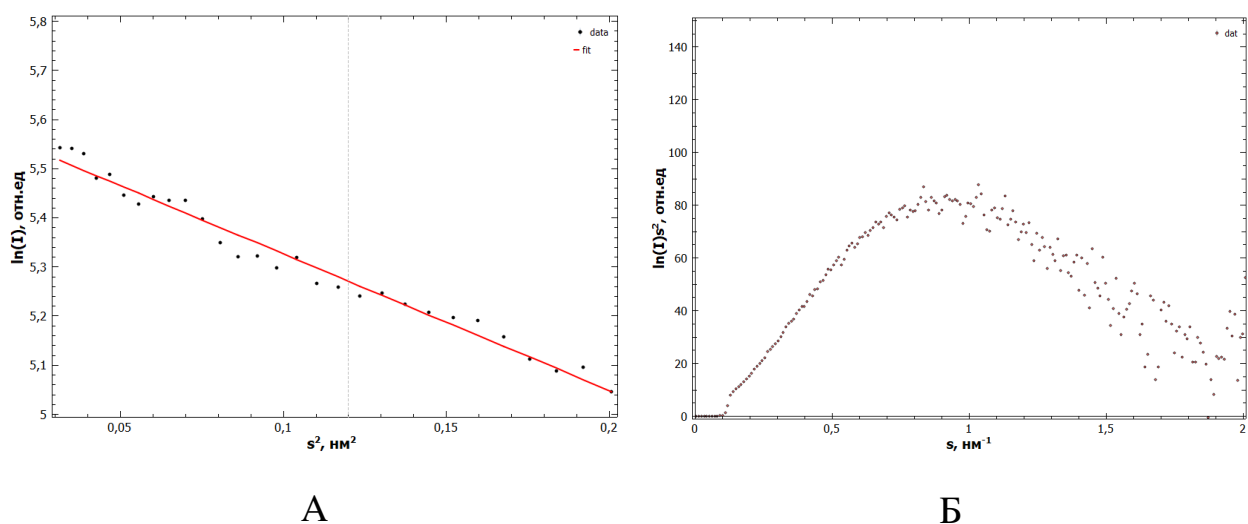


Рисунок 16 — Построения для определения инвариантов белка *YsxC*. А: в координатах Гинье, Б: в координатах Кратки

Инварианты, которые были определены на основе данных в координатах Гинье и Кратки представлены в таблице 2. Основным инвариантом в данном случае является молекулярная масса. Поскольку M_p расчётная совпадает с M_0

массой белка, то можно переходить к следующему этапу - получение функции распределения пар расстояний. Радиус гирации можно найти из графика в координатах Гинье, где выполняется линейная зависимость. Экстраполируя линейный участок, и найдя пересечение с осью ординат (согласно уравнению 13), нашли заданное значение.

Таблица 2 — Вычисленные инварианты

Белок	R_g , нм	D_{max} , нм	V_p , нм ³	M_p , кДа	M_b , кДа
УsxC	2,74	3,77	277,01	23,67	23,71

Параметр радиуса гирации является очень значимым в проведении эксперимента по малоугловому рассеянию, поскольку, если он начинает изменяться во время накопления данных, то такой эксперимент перестаёт находиться в рамках упругого рассеяния, что является радиационным повреждением образца, и как следствие, он начинает агрегировать.

5.2.2 Функция пар расстояний

Для определения функции пар расстояний воспользовались программным пакетом PRIMUS, Pair distribution function. Как оговаривалось ранее в п. 3.4, функции $p(r)$ и $I(Q)$ являются взаимно-определяемыми. Используя косвенное Фурье преобразование зависимости интенсивности от рассеяния, можно перейти к зависимости функции пар расстояний:

$$p(r) = \frac{1}{2\pi^2} \int_{s_{min}}^{s_{max}} I_{exp}(s) \cdot \frac{\sin(sr)}{sr} ds. \quad (21)$$

Данная функция описывает распределение количества всевозможных расстояний между двумя заданными частицами в выбранном интервале рас-

стояний. Обычно, нижний предел в интеграле 21 можно заменить на 0, а верхний - на инвариант D_{max} , поскольку вне заданных рамок частиц нет. Полученная функция представлена на рисунке (17).

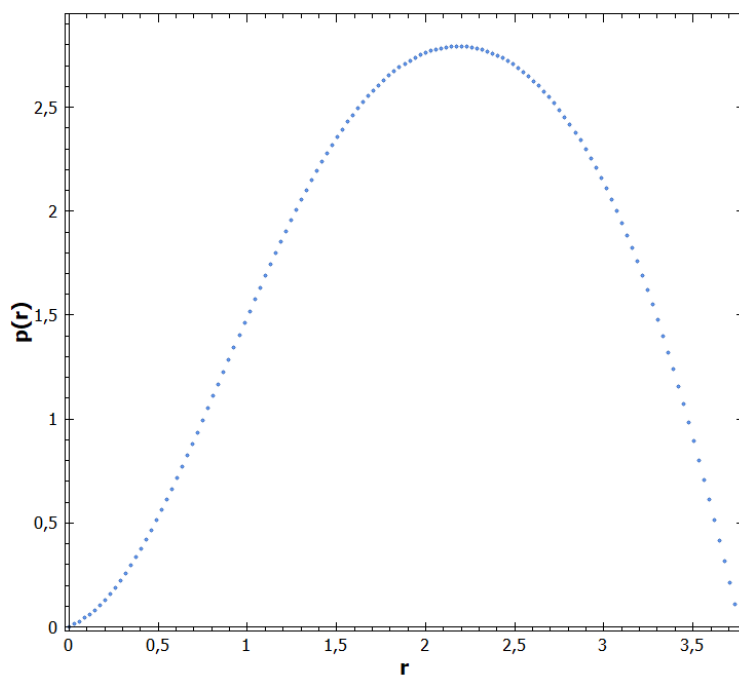


Рисунок 17 — Функция распределения пар расстояний белка $YsxС$

По виду данной зависимости без последующих вычислений можно «предсказать» в каком виде находилась белковая молекула в растворе во время проведения эксперимента: глобулярном, частично развернутом или полностью развернутом. Куполообразная форма полученной зависимости свидетельствует о том, что белок является глобулярным. Наличие же долго спадающего «плеча» функции в области больших расстояний *свидетельствовало бы* о неструктурированных частях в белковой молекуле [29].

5.2.3 Восстановление формы электронной плотности

Один из методов *ab initio* восстановления формы электронной плотности с помощью применения виртуальных сферических атомов был предложен в работе [30]. Для этого, задаётся сфера радиусом $R = D_{max}/2$, которая упаково-

ывается N шариками с радиусом, который много меньше радиуса заданной сферы. Каждый шарик описывается вектором \mathbf{X} , в котором описаны его конфигурационные параметры. В предположении того, что шарики с номером j обладают некоторой плотностью рассеяния $\Delta\rho_j$, получим выражение для интенсивности рассеяния сферической модели [31]:

$$I(s) = \left\langle \sum_j^Z \Delta\rho_j A_j(s) \right\rangle_{\Omega}, \quad (22)$$

Z — количество молекул фазы, рассматриваемое для модели ($Z = 2$ в случае белка и растворителя), $A_j(s)$ — амплитуда объема j -ой фазы. Определение амплитуд представляет собой отдельную задачу, которая решается с помощью сферических гармоник.

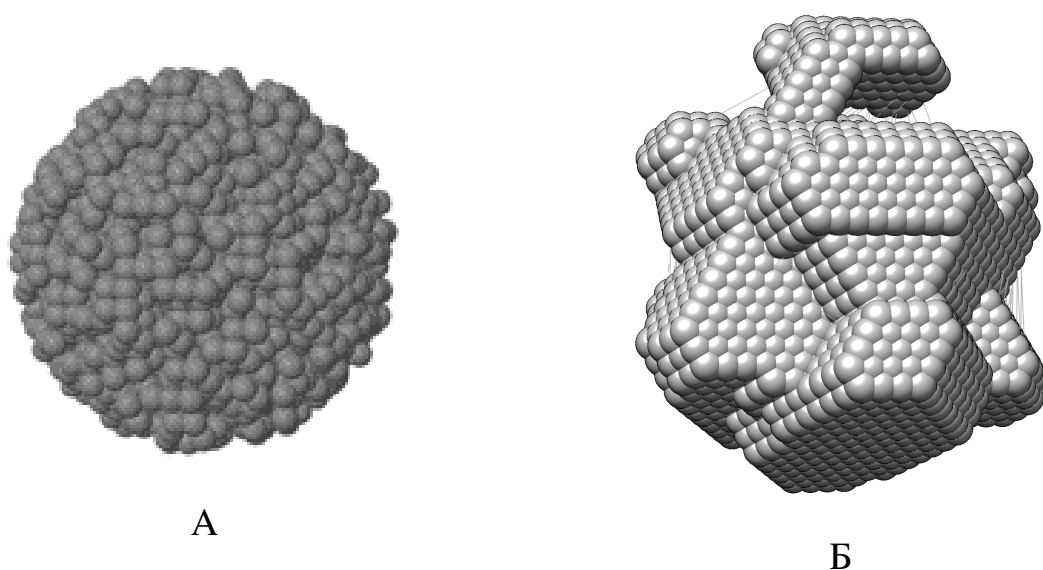


Рисунок 18 — Изменение заданной сферической поверхности в начале (А) и в конце (Б) моделирования

Описанное выше представлено в программном пакете DAMMIN [32], в которой определяется форма молекулы из экспериментальных данных путем имитации отжига. Для начала поиска требуется задать `dat` файл с экспериментальными данными, а так же скорость расчётов. Последнее прямым образом

влияет на качество модели: в медленных расчётах используется большее количество сфер с меньшим радиусом (модель лучше), когда в быстрых — малое количество сфер с большим радиусом (модель хуже). В случае наличия дополнительной информации о имеющейся симметрии (димер, тример и т.д.) он будет принят во внимание при расчётах. В данной работе использовался режим с большим количеством виртуальных сферических атомов. Тенденция изменения искомой поверхности представлена на рисунке (18). Как видно из рисунка, конечная модель электронной плотности имеет определенные особенности поверхности, которые отличаются от заданной вначале сферической системы. Благодаря наличию таких особенностей, можно однозначно сопоставить уже имеющуюся (или предсказанную) структуру с расчётными экспериментальными данными. Анализ и интерпретация полученной электронной плотности будут представлены и описаны далее.

5.3 Сопоставление плотности

Для дальнейшего анализа полученных данных использовали структуру из базы данных AlphaFold (рисунок 19), предсказанную с помощью искусственного интеллекта [33]. Для сопоставления данных и графического отображения полученных результатов, использовали программу Chimera [34]. Данный программный пакет обладает большим функционалом в области интерактивного представления данных. Для того, чтобы сопоставить полученную электронную плотность, воспользовались функцией *fit in map* во вкладке *Tools/Volume Data*. Функция производит размещение выбранной структуры в электронную область так, чтобы она находилась целиком в заданной плотности равнозначенно от всех её крайних точек.

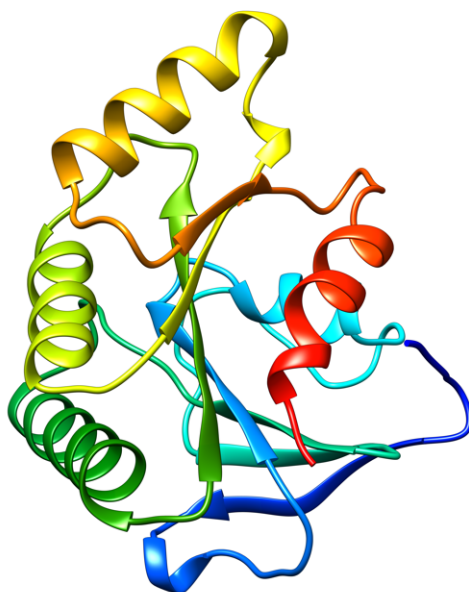


Рисунок 19 — Структура белка YsxC из базы данных AlphaFold

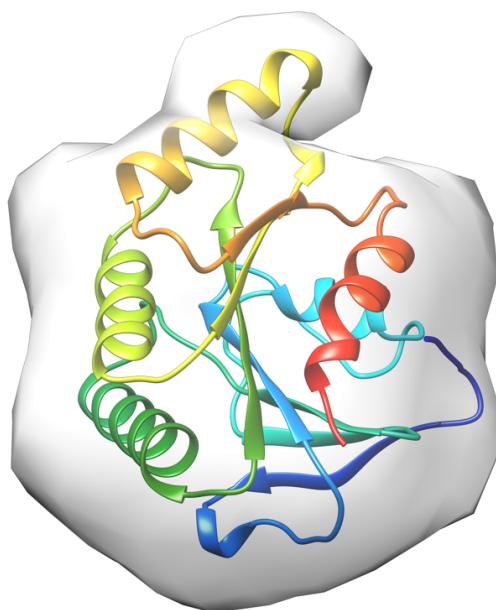


Рисунок 20 — Сопоставление структуры и полученных данных

Результат работы функции `fit in map` представлен на рисунке (20). Как видно из анализа полученных результатов, полученная плотность хорошо сопоставляется с предсказанной структурой. Такой вид поверхности свидетельствует о том, что белковая молекула в растворе находится в компактном виде,

не имеет неструктурированных частей, которые бы могли мешать дальнейшей его кристаллизации и решению точной структуры.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проделанной работы получены следующие **результаты**:

- Выделен рекомбинантный белок Υ схС из *S. aureus*. Произведена очистка методами аффинной хроматографии и гель фильтрации;
- Подобраны буферные условия для стабилизации белковой молекулы;
- Полученный образец сконцентрирован в двух концентрациях: 6 мг/мл и 12 мг/мл для исследования концентрационной зависимости;
- Проведён эксперимент по малоугловому рентгеновскому рассеянию;
- Полученные данные обработаны и проанализированы

На основе полученных данных сделаны следующие **выводы**:

Исходя из данных эксперимента по малоугловому рентгеновскому рассеянию получена электронная плотность, достоверность которой подтверждается сходимостью структурных параметров. Показано, что для кривых рассеяния отсутствует концентрационная зависимость. Анализ данных показал, что ГТФ-связывающий белок Υ схС находится в растворе в виде мономера, имеет компактную упаковку, основные участки являются структурированными. Разработанный протокол получения образца белка Υ схС из *S. aureus* позволяет получить образец пригодный для структурных исследований методами спектроскопии ЯМР высокого разрешения и рентгеноструктурного анализа.

НАУЧНАЯ ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ

- Участие в школе молодых ученых «Применение синхротронного излучения для решения задач биологии». Новосибирск, Академгородок, 11.05.2022 – 13.05.2022;
- Диплом за III место в Конкурсе на лучшую научную работу студентов КФУ 2022 г. по естественно-научному направлению;
- Биктимиров, А. Д. Малоугловое рентгеновское рассеяние гуанозинтрифосфат связывающего белка γ sxC из золотистого стафилококка: Сборник научных статей Казанского федерального университета 2022 года [В печати].

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность научному руководителю д.ф.-м.н, профессору кафедры медицинской физики Усачеву Константину Сергеевичу, а также коллективу НИЛ «Структурная биология» ИФМиБ Казанского (Приволжского) Федерального университета за помощь и консультации по молекулярной биологии.

Список литературы

1. Kobayashi, S. D. Pathogenesis of Staphylococcus aureus Abscesses [Электронный ресурс] / S. D. Kobayashi, N. Malachowa, F. R. DeLeo // The American Journal of Pathology. — 2015. — Т. 185, № 6. — С. 1518-1527. — Режим доступа: <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.11.030>.
2. Kluytmans, J. Nasal carriage of Staphylococcus aureus: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks [Электронный ресурс] / J. Kluytmans, A. van Belkum, H. Verbrugh // Clinical Microbiology Reviews. — 1997. — Т. 10, № 3. — С. 505-520. — Режим доступа: <https://doi.org/10.1128/cmr.10.3.505>.
3. Treatment of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Bacteremia: A Meta-Analysis [Электронный ресурс] / P. Vijayvargiya [и др.] // Open Forum Infectious Diseases. — 2015. — Т. 2, № supplementary_1. — Режим доступа: <https://doi.org/10.1093/ofid/ofv133.554>.
4. Нэльсон, Д. ОСНОВЫ БИОХИМИИ ЛЕНИНДЖЕРА / Д. Нэльсон, М. Кокс. — Изд. 3-е. — Москва : Лаборатория знаний, 2006. — Т. 1. — 694 с. — ISBN 978-5-00101-014-.
5. YphC and YsxC GTPases assist the maturation of the central protuberance, GTPase associated region and functional core of the 50S ribosomal subunit [Электронный ресурс] / X. Ni [и др.] // Nucleic Acids Research. — 2016. — Т. 44, № 17. — С. 8442-8455. — Режим доступа: <https://doi.org/10.1093/nar/gkw678>.
6. Namba, K. Electron cryomicroscopy: evolution of equipment and methods [Электронный ресурс] / K. Namba, T. Kato // Laboratory and production. —

2019. — № 3. — С. 92-102. — Режим доступа: <https://doi.org/10.32757/2619-0923.2019.3.7.92.102>.
7. Аюпов, Р. Х. Выделение и очистка белка для исследования методом ЯМР высокого разрешения / Р.Х. Аюпов., К.С. Усачев. – Казань: Казан. ун-т, 2016. – 39 с.
 8. Сивухин, Д. В. Общий курс физики. Том 5. Атомная и ядерная физика / Д. В. Сивухин. — 3-е издание, стереотипное. — Москва : ФИЗМАТЛИТ, 2008. — 784 с. — Текст : непосредственный.
 9. Lipfert, J. Small-Angle X-Ray Scattering from RNA, Proteins, and Protein Complexes / J. Lipfert, S. Doniach. — Текст : непосредственный // Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure. — 2007. — № 36. — С. 307-327. — Режим доступа: <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.36.040306.132655>
 10. Ландау, Л. Д. Теоретическая физика. Т. V. Статистическая физика. / Л. Д. Ландау, Е. М. Лифшиц. — 5-е изд., стереот. — Москва : ФИЗМАТЛИТ, 2002. — 616 с. — Текст : непосредственный.
 11. Свергун, Д. И. Рентгеновское и нейтронное малоугловое рассеяние / Д. И. Свергун, Л. А. Фейгин. — 1-е изд. — Москва : Наука. Гл. ред. физ.-мат. лит., 1986. — 280 с. — Текст : непосредственный.
 12. Сердюк, И. Н. Методы в молекулярной биофизике. Структура. Функция. Динамика. Учебное пособие. Том 2 / И. Н. Сердюк, Д. Закаи, Н. Закаи. — 1-е изд. — Москва : КД, Вольное дело, Базовый элемент, 2010. — 702 с. — Текст : непосредственный. — ISBN 978-5-98227-454-0-.
 13. Nhat, V. P. Coupling High Throughput Microfluidics and Small-Angle X-ray Scattering to Study Protein Crystallization from Solution [Электронный

- ресурс] / V. P. Nhat, Radajewski Dimitri, R. R. Adam [и др.]. // *Analytical Chemistry*. — 2017. — № 89(4). — С. 2282-2287. — Режим доступа: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b03492>
14. Svergun, D. I. Advances in structure analysis using small-angle scattering in solution [Электронный ресурс] / D. I. Svergun, Michel H Koch // *Current Opinion in Structural Biology*. — 2002. — № 12. — С. 654-660. — Режим доступа: [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(02\)00363-9](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(02)00363-9)
15. Metropolis, N. The Monte Carlo Method / N. Metropolis, S. Ulam. — Текст : непосредственный // *Journal of the American Statistical Association*, . — 1949. — № 247. — С. 335-341. — Режим доступа: <https://doi.org/10.2307/2280232>
16. Konarev, P. V. Direct shape determination of intermediates in evolving macromolecular solutions from small-angle scattering data [Электронный ресурс] / P. V. Konarev, D. I. Svergun. // *IUCrJ*. — 2018. — № 5. — С. 402-409. — Режим доступа: <https://doi.org/10.1107/S2052252518005900>
17. Бекренев, А. Н. Малоугловая рентгенография деформации и разрушения материалов / А. Н. Бекренев, Л. И. Миркин. — Москва : МГУ, 1991. — 247 с. — Текст : непосредственный.
18. Рентгеновская трубка: принцип работы. — Изображение : электронное // XRAYTUBE : [сайт]. — URL: <https://xraytube.ru/articles/rentgenovskaya-trubka-printsip-raboty/> (дата обращения: 25.04.2022).
19. Svergun, D. I. Determination of Domain Structure of Proteins from X-Ray Solution Scattering [Электронный ресурс] / D. I. Svergun, M. V. Petoukhov, H. J. Koch // *Biophysical Journal*. — 2001. — Т. 80, № 6. — С. 2946-2953. — Режим доступа: [https://doi.org/10.1016/s0006-3495\(01\)76260-1](https://doi.org/10.1016/s0006-3495(01)76260-1).

20. Компактные источники рентгеновского излучения / В. А. Буртелов [и др.] // Труды МФТИ. — 2019. — Т. 11, № 2. — С. 116-155.
21. Болдырев, В. В. Дифрактометрия с использованием синхротронного излучения / В. В. Болдырев. — Новосибирск : Наука, Сибирское отделение, 1989.
22. Горкин, А. Техника энциклопедия / А. Горкин, Г. Белов. — Москва : Росмен, 2007. — 488 р. — ISBN 9785353024125.
23. Glatter, O. Small angle x-ray scattering / O. Glatter. — London : Academic Press, 1982.
24. Дадинова, Л. А. МАЛОУГЛОВОЕ РЕНТГЕНОВСКОЕ РАССЕЙЯНИЕ В ИССЛЕДОВАНИИ ТРЕХМЕРНЫХ СТРУКТУР БИОНАНОКОМПОЗИТОВ НА ОСНОВЕ ДНК И РЯДА БЕЛКОВ, УЧАСТВУЮЩИХ В КАТАБОЛИЗМЕ *ESCHERICHIA COLI* В СТАЦИОНАРНОЙ ФАЗЕ РОСТА : дис. ...канд. физ.-мат. наук : 01.04.07 / Дадинова Л. А.; ИНСТИТУТ КРИСТАЛЛОГРАФИИ ИМ. А.В. ШУБНИКОВА РАН. — Москва, 2016. — 139 с.
25. ExPasy - ProtParam tool [Электронный ресурс] // ProtParam : [сайт]. — URL: <https://web.expasy.org/protparam/> (дата обращения: 25.04.2022).
26. Биктимиров, А. Д. Установление пространственной структуры С-концевого домена фактора гибернации рибосом из золотистого стафилококка методом рентгеноструктурного анализа: Диплом. работа: 03.03.02 – Казань: Казанский федеральный университет, 2020. – 52 с.
27. Аюпов, Р.Х. Выделение и очистка белка: Учебно-методическое пособие / Р.Х. Аюпов, М.М. Юсупов – Казань: Казан. ун-т, 2015. – 19 с.

28. Konarev, P. V. PRIMUS: a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis [Электронный ресурс] / P. V. Konarev, V. V. Volkov, A. V. Sokolova [и др.] // Journal of Applied Crystallography. — 2003. — №36. — С. 277-1282. Режим доступа: <https://doi.org/10.1107/S0021889803012779>
29. Kikhney, A. G. A practical guide to small angle X-ray scattering (SAXS) of flexible and intrinsically disordered proteins [Электронный ресурс] / A. G. Kikhney, D. I. Svergun // Febs Letters. — 2015. — № 589. — С. 2570-2577. Режим доступа: <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2015.08.027>
30. Chacon, P. Low-resolution structures of proteins in solution retrieved from X-ray scattering with a genetic algorithm [Электронный ресурс] / P. Chacon, F. Moran, J.F. Diaz [и др.] // Biophys.J. — 1998. — № 74. — С. 2760-75. — Режим доступа: [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(98\)77984-6](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(98)77984-6)
31. Shturman, B. Interpretation of small-angle scattering of dilute solutions and gases. A representation of the structures related to a one-particle scattering functions / B. Shturman // Acta Crystallographica. — 1970. — Vol. 26. — P. 297-306.
32. Svergun, D. I. Ab initio shape determination by simulated annealing using a single phase dummy atom model / D. I. Svergun. — [Электронный ресурс] // ATSAS Online : [сайт]. — URL: <https://www.embl-hamburg.de/biosaxs/dammin.html> (дата обращения: 25.04.2022).
33. Varadi, M. AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models / Mihaly Varadi, Stephen Anyango, Mandar Deshpande [и др.] // Nucleic Acids Research. — Volume 50, Issue D1. — 2022. — С. D439–D444. Режим доступа: <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1061>

34. UCSF Chimera an Extensible Molecular Modeling System. — [Электронный ресурс] // UCSF CHIMERA : [сайт]. — URL: <https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/> (дата обращения: 25.04.2022).