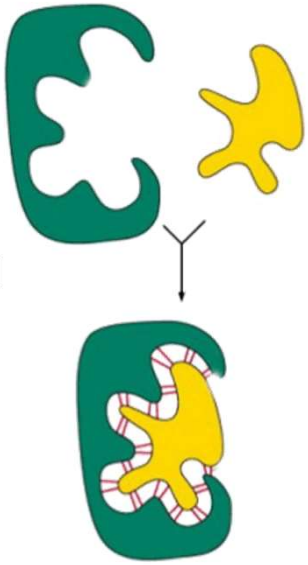
# Возможности решения биологических задач на станциях 1-й и 2-й очереди синхротронного источника поколения 4+ ЦКП «СКИФ»

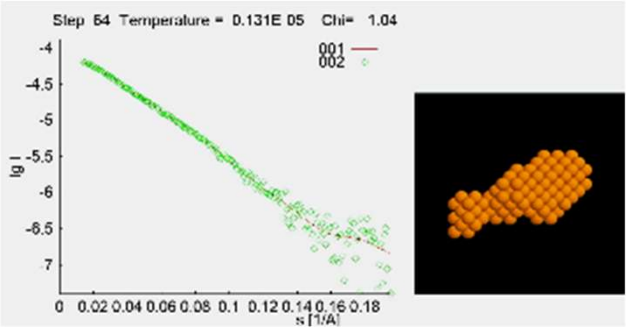
Зубавичус Ян
*Лаборатория перспективных синхротронных методов исследования, Проектный офис ЦКП «СКИФ»*
*Институт катализа СО РАН*
*yvz@catalysis.ru*

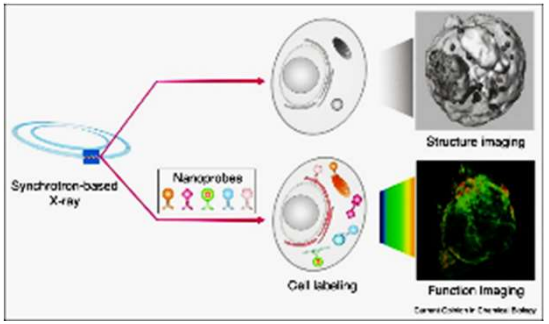
**ЦКП «СКИФ» для решения задач биологии, Круглый стол**
**ИК СО РАН, 22 августа 2019 г.**

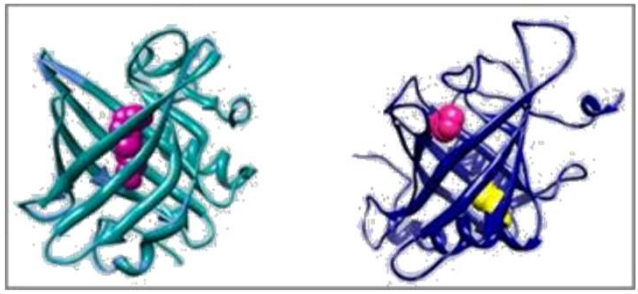
# Синхротронное излучение для структурной биологии

- Белковая кристаллография, MX (кристаллическая структура)
- Малоугловое рассеяние (форма белковых молекул в растворе)
- Рентгеноабсорбционная спектроскопия EXAFS ( степень окисления и координация атомов металла в металлопроеинах ), NEXAFS/XRS
- Рентгеновская микроскопия и томография



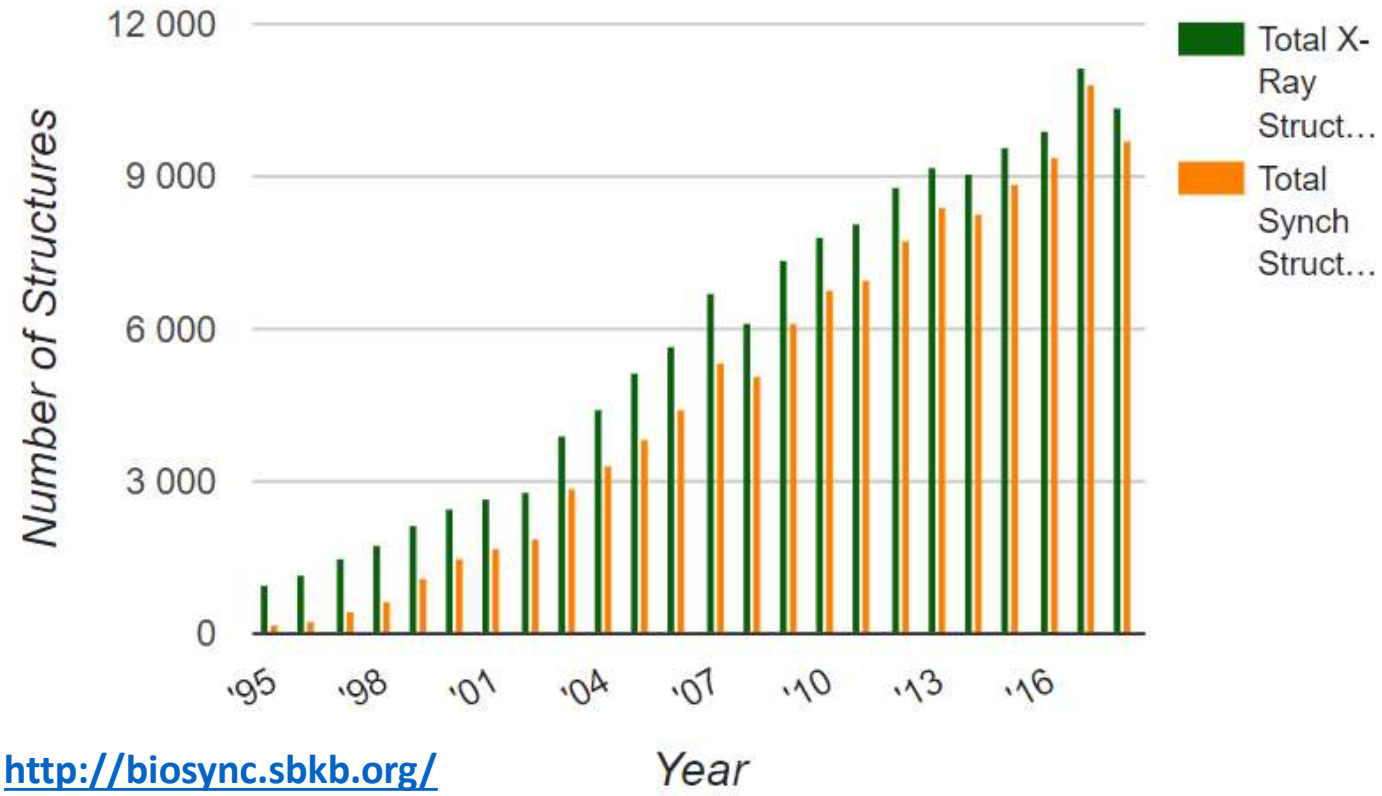


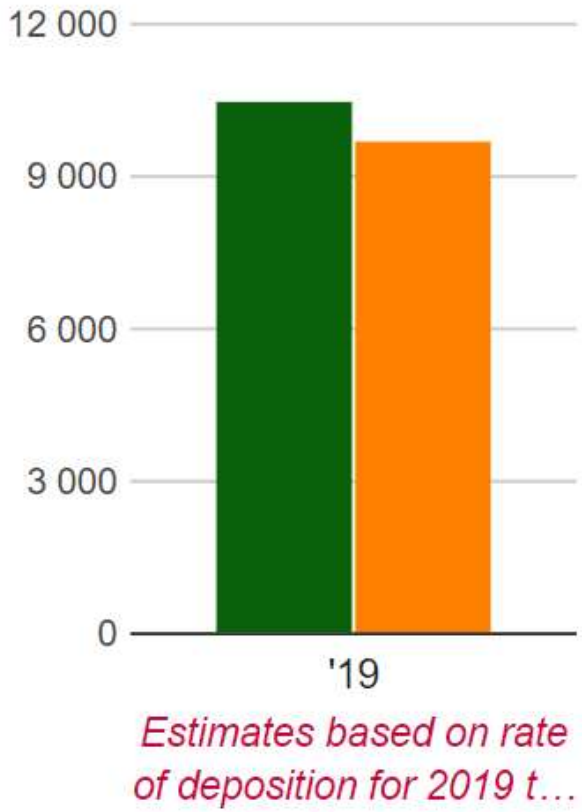


# Синхротронное излучение и белковая кристаллография

**130 специализированных станций белковой кристаллографии в международных синхротронных центрах**




http://biosync.sbkb.org/

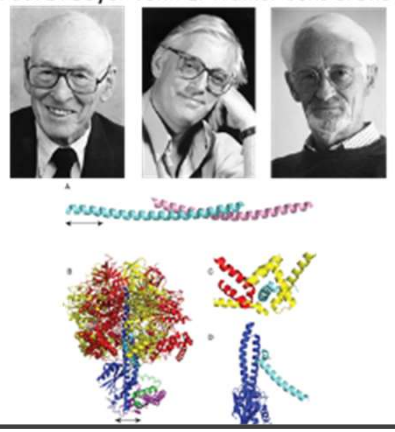
# Белковая кристаллография на синхротронном излучении.

## Общенаучная значимость: 7 Нобелевских премий с 1997 г.

**1997 г.**

**F1 АТФ-синтаза**

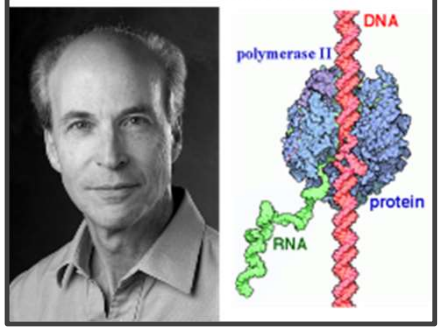
Paul D. Boyer John E. Walker Jens C. Skou



**2006 г.**

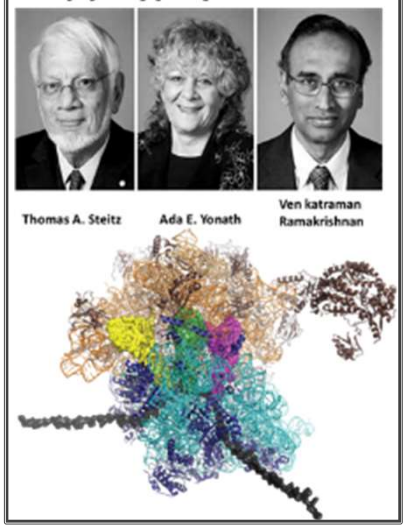
**Транскрипция у эукариот**

Roger D. Cornberg




**2009 г.**

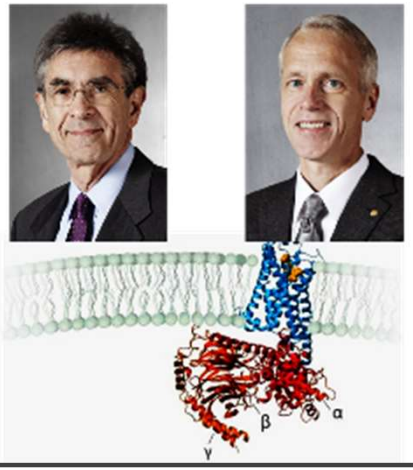
**Структура рибосомы**




**2012 г.**

**Рецепторы, сопряженные с G-белками**

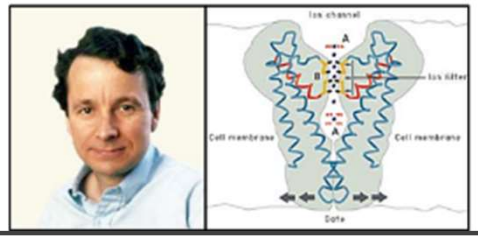
Robert J. Lefkowitz Brian K. Kobilka




**2003 г.**

**Структура ионных каналов**

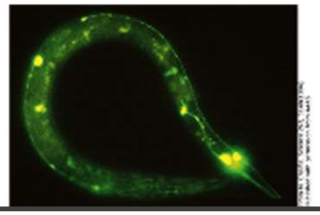
Roderick MacKinnon



**2008 г.**

**Зеленые флуоресцентные белки**

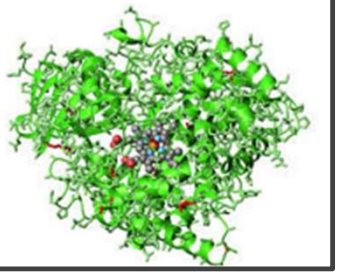
Osamu Shimomura Martin Chalfie Roger Y. Tsien



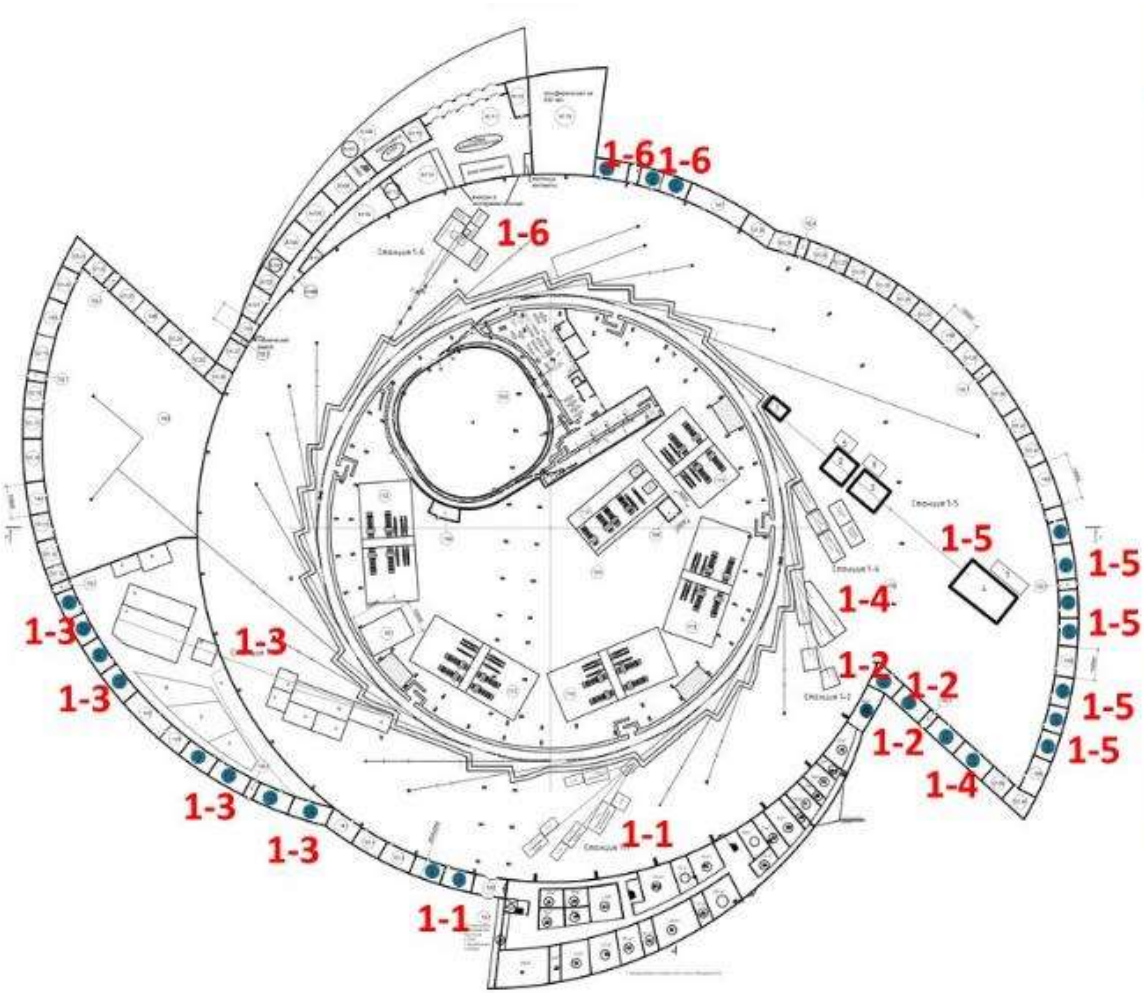
**2018 г.**

**Направленная эволюция энзимов**

Frances H. Arnold George P. Smith Sir Grogory P. Winter



# Биологическая тематика в функционале станций 1-й очереди




| Шифр | Название (ответственный) |
|---|---|
| 1-1 | МИКРФОКУС (С.В. Ращенко) |
| 1-2 | СТРУКТУРНАЯ ДИАГНОСТИКА (Б.А. Захаров) |
| 1-3 | БЫСТРОПРОТЕКАЮЩИЕ ПРОЦЕССЫ (И.А. Рубцов) |
| 1-4 | XAFS-СПЕКТРОСКОПИЯ И МАГНИТНЫЙ ДИХРОИЗМ (А.А. Сараев) |
| 1-5 | ДИАГНОСТИКА В ВЫСОКОЭНЕРГЕТИЧЕСКОМ РЕНТГЕНОВСКОМ ДИАПАЗОНЕ (К.Э. Купер) |
| 1-6 | СПЕКТРОСКОПИЯ МЯГКОГО ДИАПАЗОНА (А.В. Бухтияров) |

Секция 1-1-2 «Макромолекулярная кристаллография»

Секции 1-2-2 «Моно-РСА» и 1-2-4 «МУРР»

Секция 1-4-1 «XAFS»

Секция 1-5-2 «Фазово-контрастная томография»

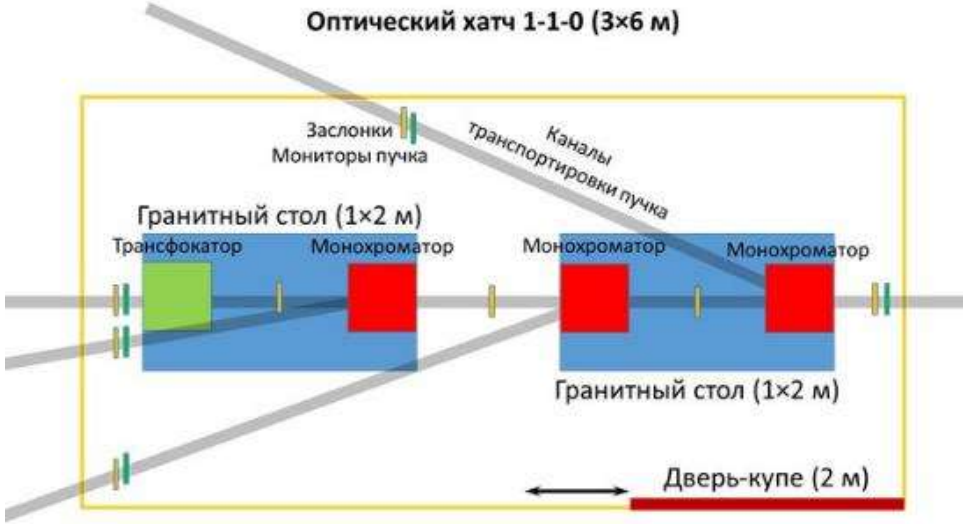
Секция 1-6-1 «РФЭС ВД»

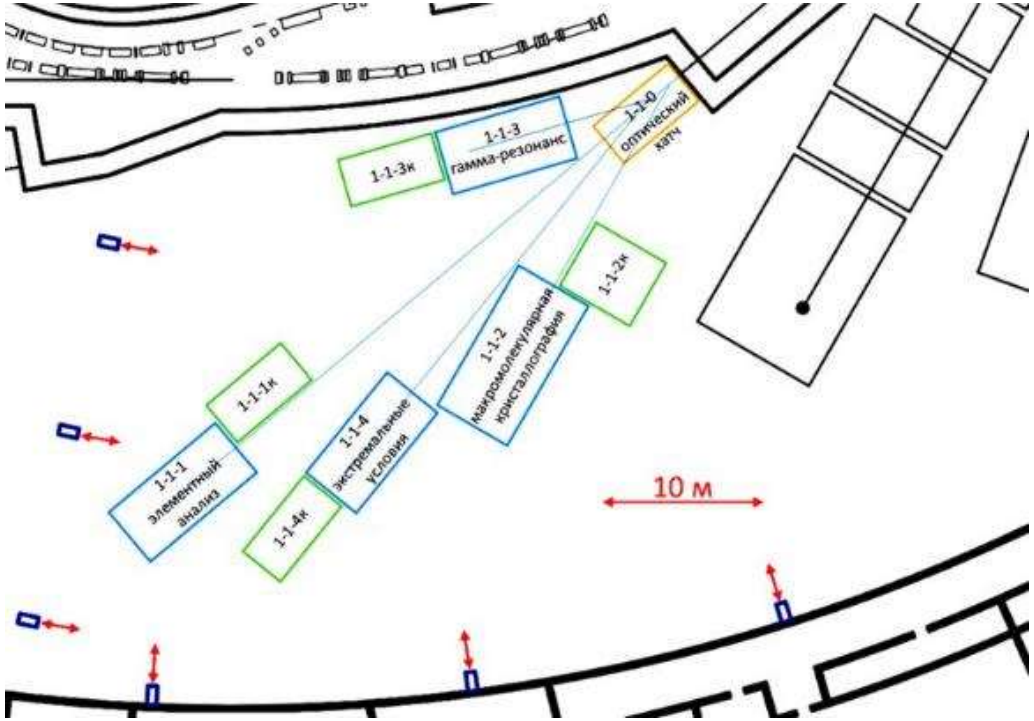
# Станция 1-1 «Микрофокус»

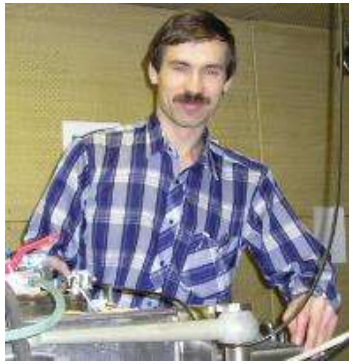
- **Используется излучение сверхпроводящего ондулятора**
- **Однокристальные алмазные монохроматоры-расщепители пучка (в Брэгговской геометрии) отводят ондуляторные гармоники по секциям**

- **Композитные рефракционные линзы из бериллия и алмаза (трансфокаторы) фокусируют пучок на образце до субмикронных размеров (10-100 нм) с сохранением когерентных свойств**

**Ращенко Сергей Владимирович (ИГМ, ИК)**

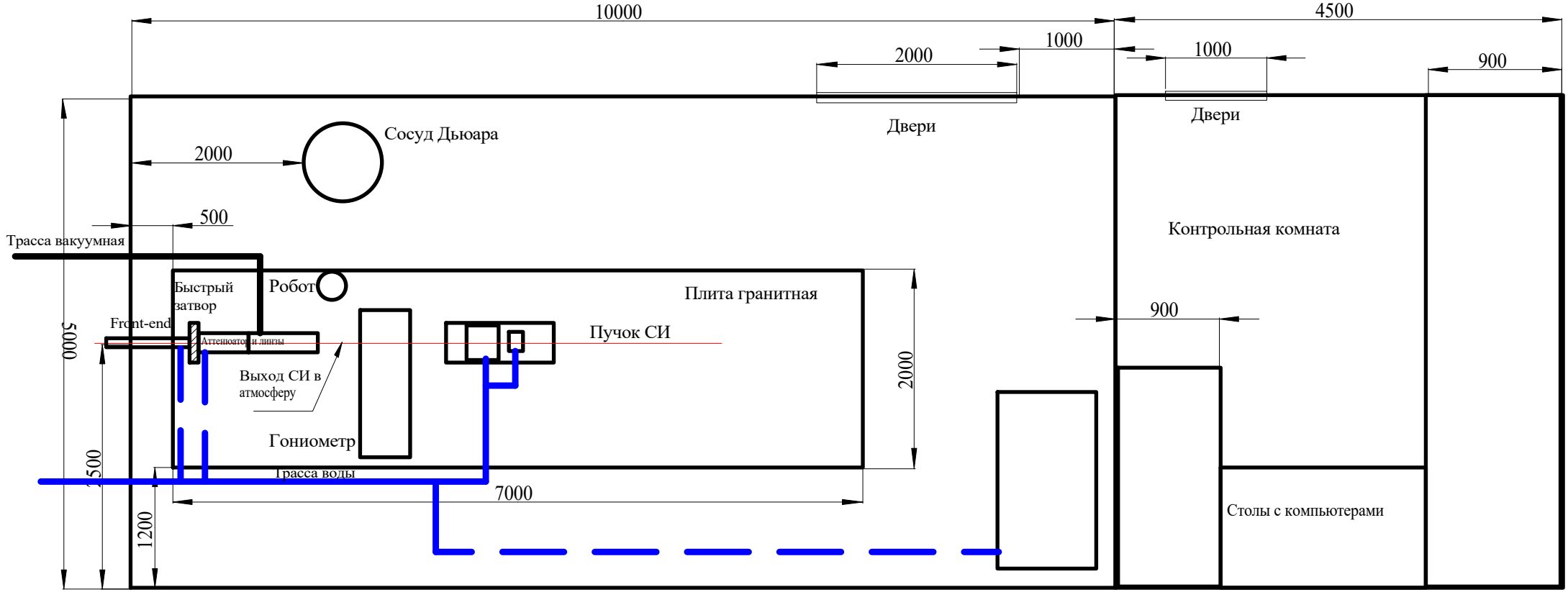




# Шарафутдинов Марат Рашидович (ИХТТМ, ИЯФ)

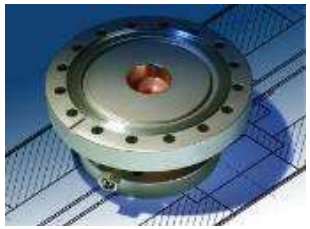
# Секция 1-1-2 «Макромолекулярная кристаллография»



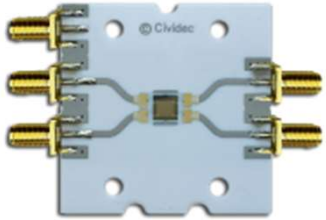
# Компоненты рентгенооптической схемы

Фронтэнд

Выходное окно



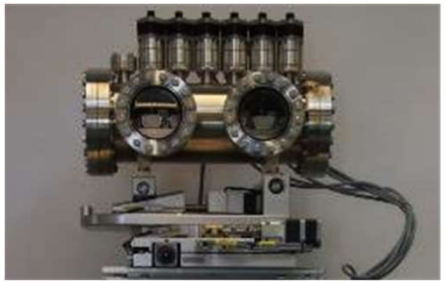
Датчик положения пучка




Однокристальный монохроматор-сплиттер (алмаз)

Блок аттенюаторов

Трансфокатор на базе рефракционных линз (Be, алмаз)



# Дифрактометр и система образца

Гониометр

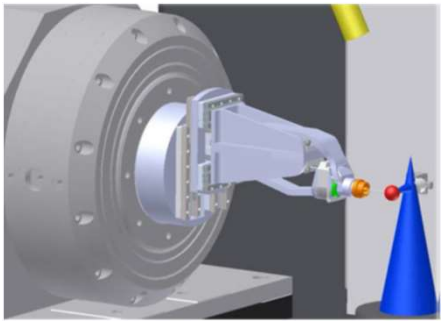
Детекторы

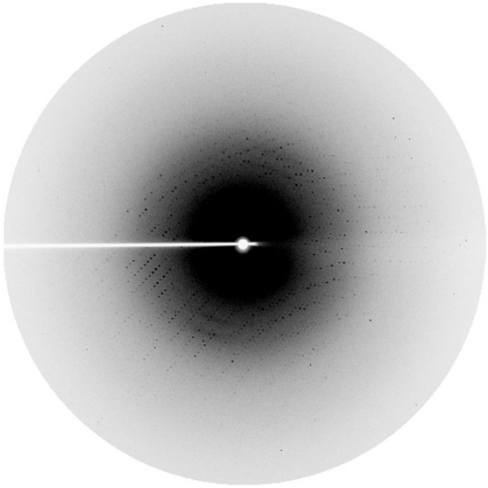
Робот-сменщик

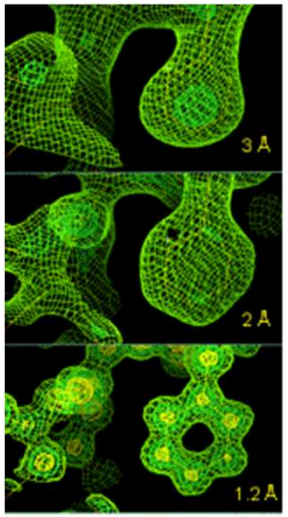
Кассета для образцов

Магнитный держатель

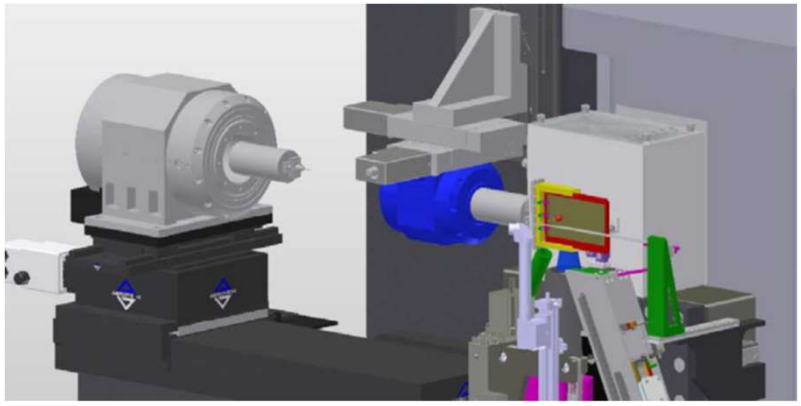
# «Рутинная» белковая кристаллография (Macromolecular Crystallography, MX)

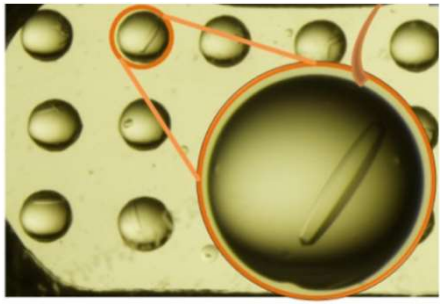







| Разрешение | Структурные особенности |
|---|---|
| 5.0 Å | Общая форма молекулы |
| 3.5 Å | Выявление катионов (Ca/K) с дробной заселенностью |
| 3.0 Å | Грубая идентификация боковых цепей |
| 2.8 Å | Выявление атомов кислорода пептидных групп |
| 2.5 Å | Точная идентификация боковых цепей, определение плоскости пептидной связи |
| 1.5 Å | Минимумы электронной плотности в центрах ароматических колец (Phe, Tyr) |
| 0.8 Å | Наилучшее разрешение для современных экспериментов |

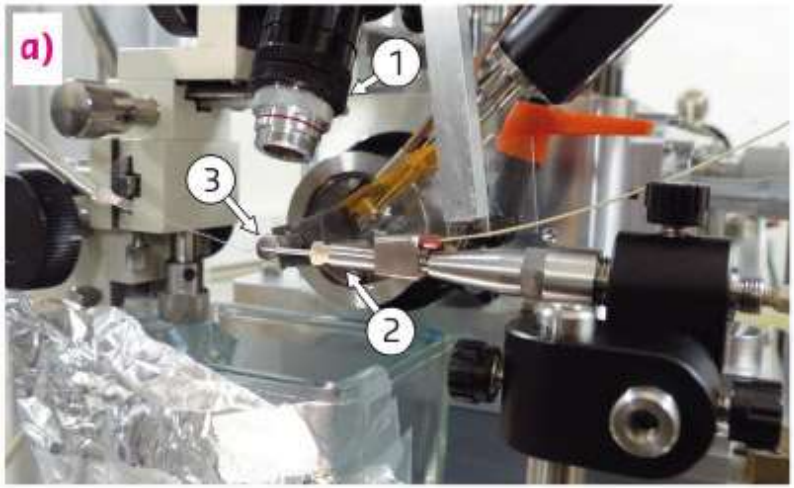


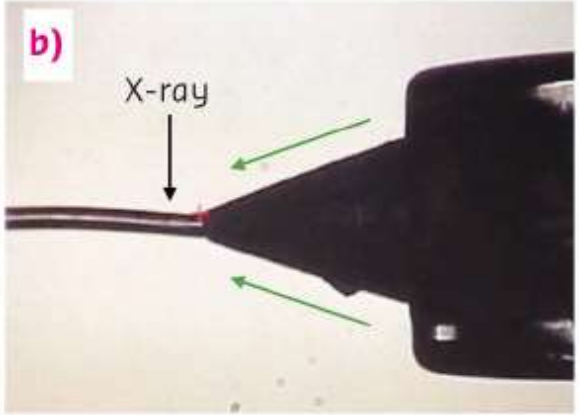


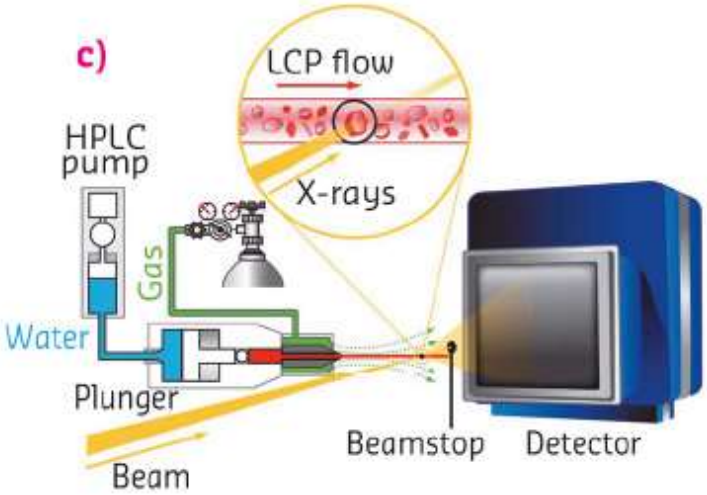
Монокристаллы размером до 1 мкм

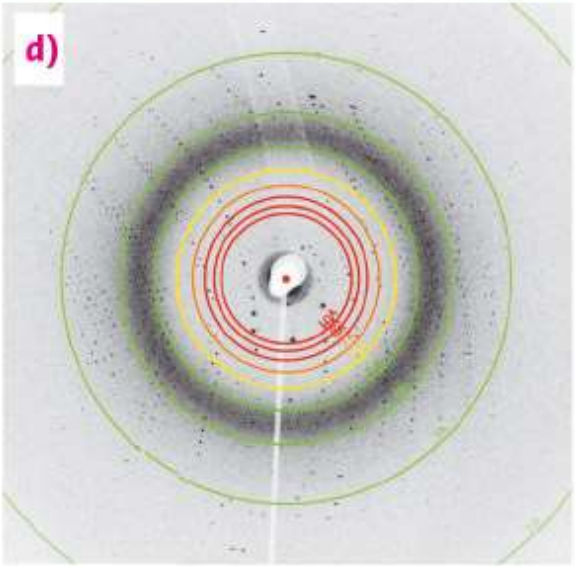
Время полного набора данных ~с

# Серийная кристаллография с инжектором микрокристаллов в струе носителя



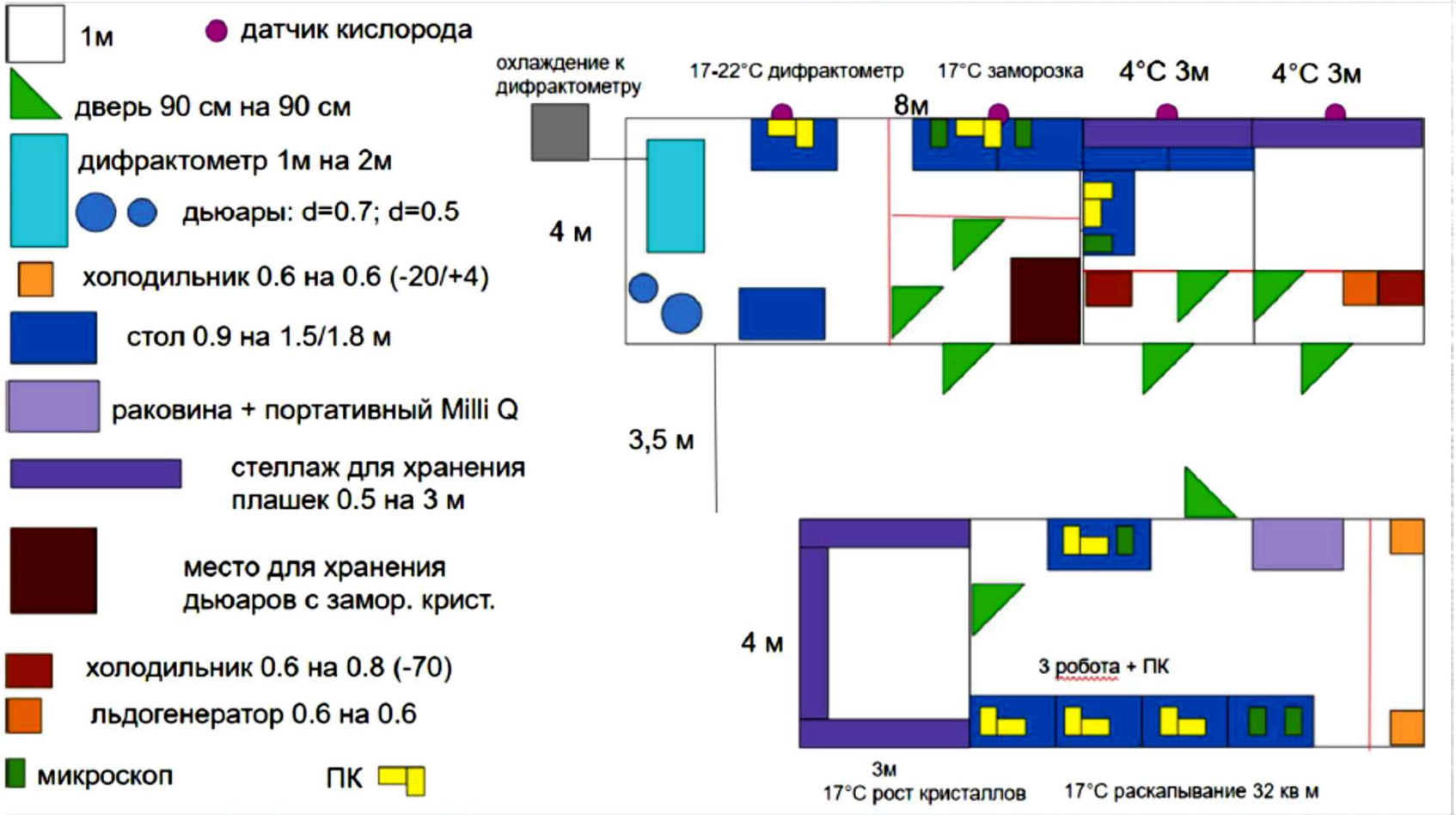

**Липидная кубическая фаза (LCP) для кристаллизации мембранных белков**

Experimental LCP-injector setup at ID13 (ESRF)

# Вспомогательная инфраструктура пробоподготовки

**Архипов Сергей Григорьевич (НГУ, ИК)**

## План комнат в лабораторном корпусе для получения кристаллов макромолекул (подвал)



**пользователь приехал с раствором белка**

## проверка и подготовка белка к кристаллизации

| важный для кристаллизации параметр | метод проверки, оборудование | | | |
|---|---|---|---|---|
| чистота | гель-электрофорез (Serva Electrophoresis) | Да | Нет → | очистка хроматографией (AKTA Pure) |
| гомогенность | Светорассеяние (Zetasizer Nano S) | Да | Нет → | |
| концентрация | Спектрофотометрия (Nanodrop 2000C) | Да | Нет → | диализ – ячейки + центрифуги (SL40R, SL16R) |
| буферный раствор | обычно известен | Да | Нет → | |

## кристаллизация белка

| этап | метод, оборудование |
|---|---|
| Подготовка растворов осадителей | смешивание, робот №1 |
| Раскапывание препарата белка | sitting drop, робот №2; microbatch, робот №3 + LCP опция; |
| Наблюдение за ростом кристаллов | визуально, микроскопы, термостатируемые комнаты (17°C; 4 °C) |

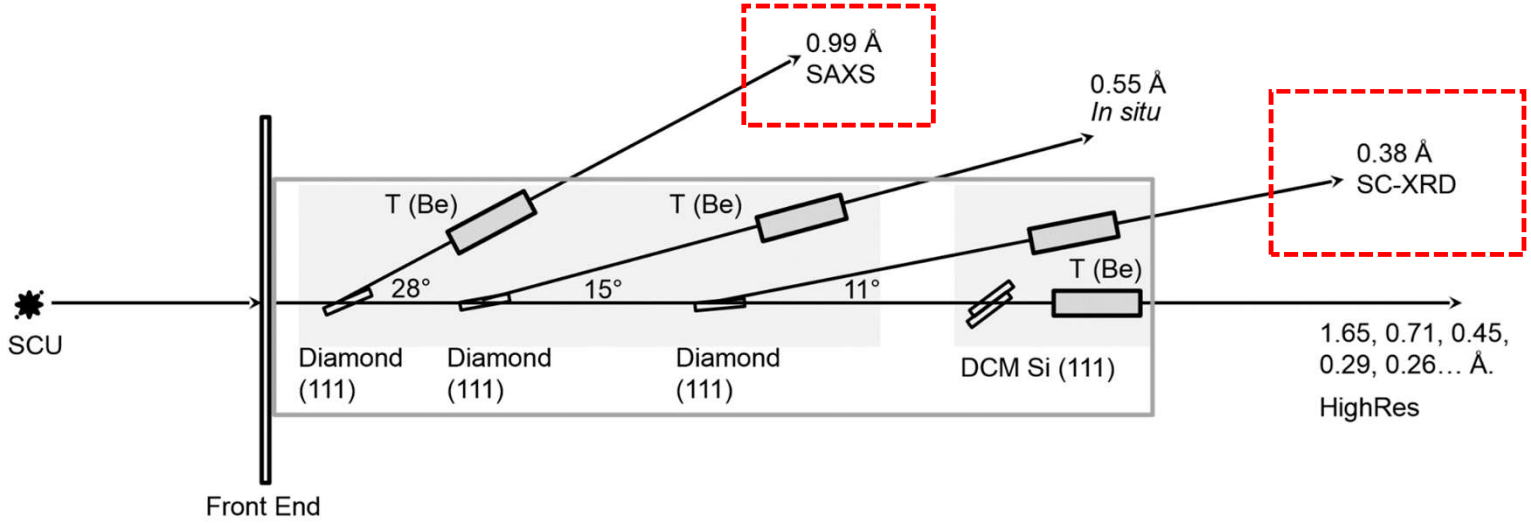
## манипуляции с кристаллами

Извлечение, вымачивание, заморозка, хранение кристаллов – совместимые с роботом на станции наборы

СКИФ

# Станция 1-2 Структурная диагностика

**Дифракционные методики: РСА монокристаллов, порошковая дифракция, малоугловое рассеяние**





**Захаров Борис Александрович, НГУ, ИК**

**Особенности**

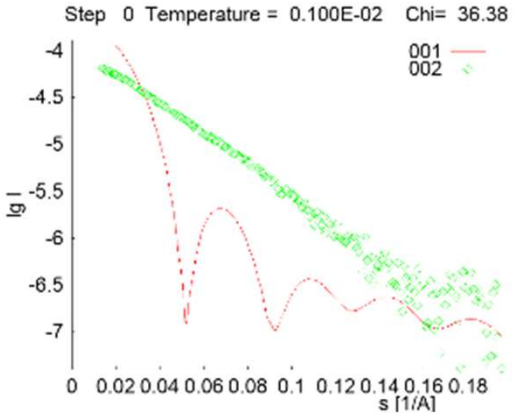
- Генератор излучения – сверхпроаодящий ондулятор
- Одновременная работа всех секций на фиксированной энергии (основной режим)
- Работа с варьируемой энергией (только центральная секция)

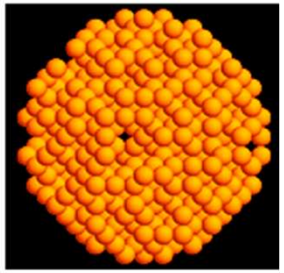
**Приложения**

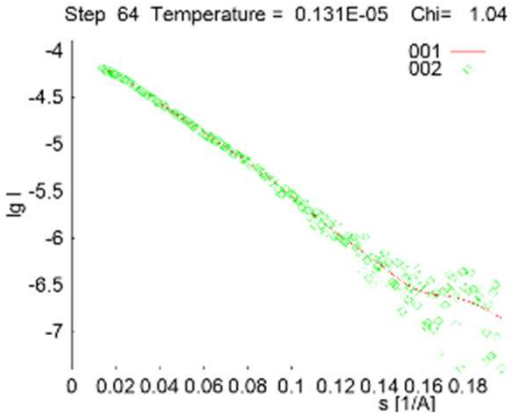
- Водородная энергетика, топливные элементы
- Катализ
- Керамика, энергетические материалы
- Пленки и мембраны
- Полимеры и углеродные материалы
- Фармацевтические материалы
- Высокодисперсные материалы
- Наноматериалы

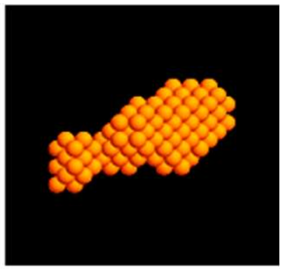
# «Малоугловое рентгеновское рассеяние»
# Секция 1-2-4

**Ларичев Юрий Васильевич, ИК**



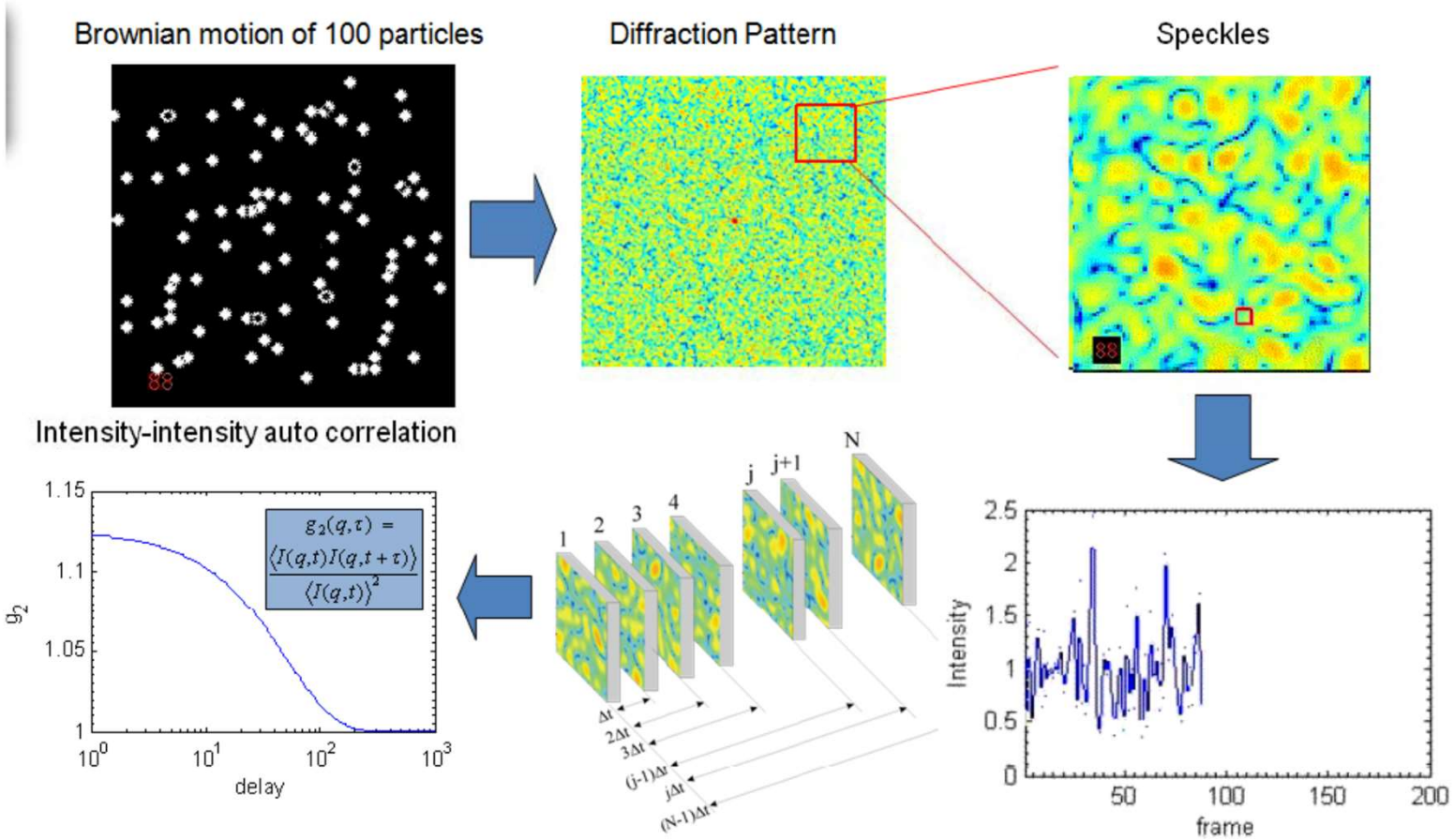





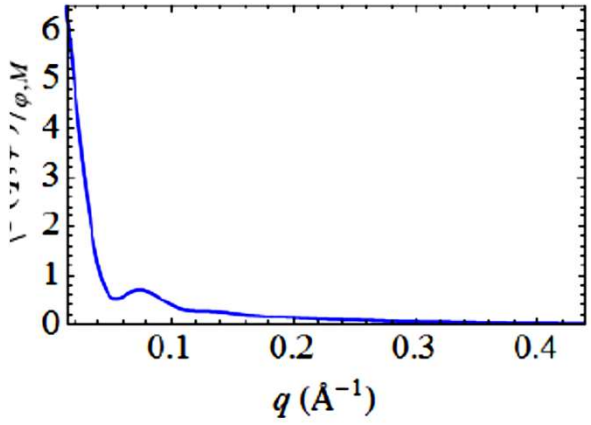
# Направления развития: рентгеновская фотон-корреляционная спектроскопия (XPCS)

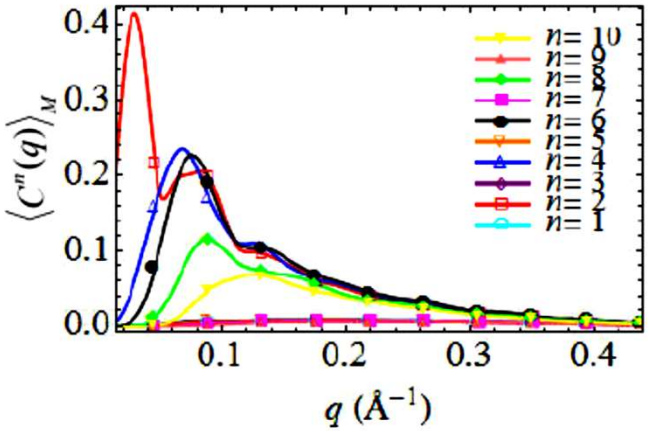
Характерное время флуктуаций интенсивности → Коэффициент диффузии рассеивающего объекта в растворе

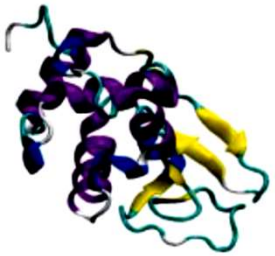


# Флуктуационное рентгеновское рассеяние (FXS или XCCA)

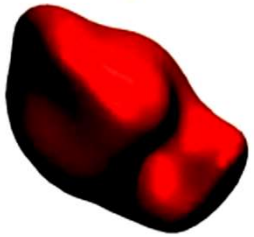
$$\langle I(q,\varphi)\rangle_{\varphi,M} = \langle I^0(q)\rangle_M \qquad \langle C^n(q)\rangle_M \Rightarrow \langle |I^n(q)|^2\rangle_M,\ n=1,2,3...$$

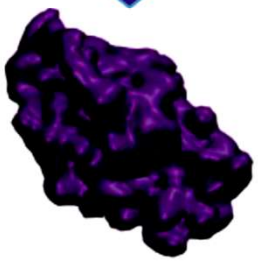


Bead model, *etc*

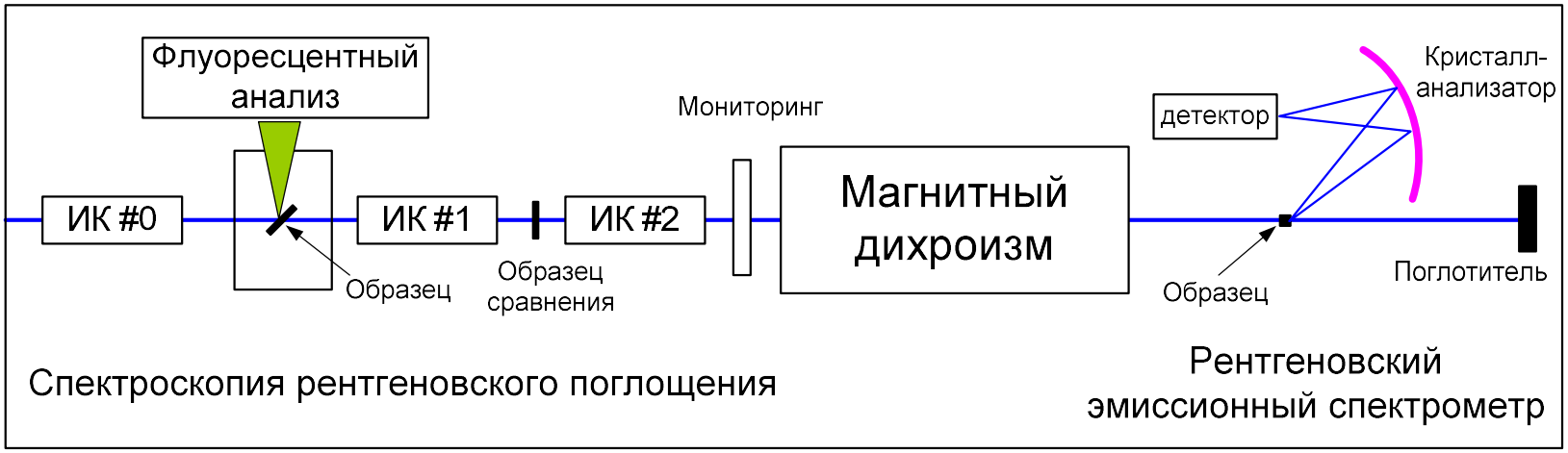




Conventional SAXS analysis

Higher-order SAXS analysis

# Станция «1-4 XAFS-спектроскопия и магнитный дихроизм»



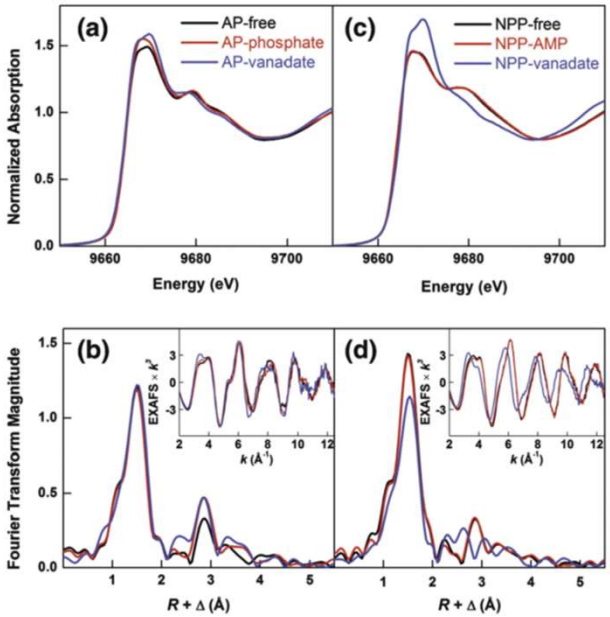

**Сараев Андрей Александрович, ИК**

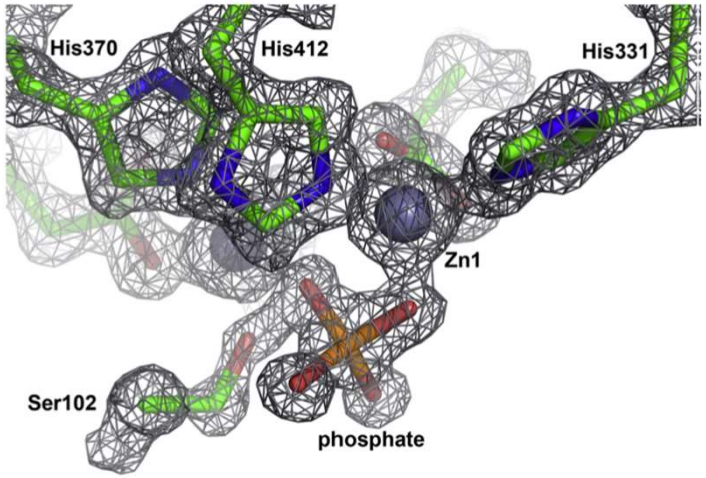
**Методики:**

Рентгеноабсорбционная спектроския EXAFS/XANES, Quick-EXAFS (до 100 Гц), HERFD-XAFS

Рентгеноэмиссионная спектроскопия XES, RIXS, XRS

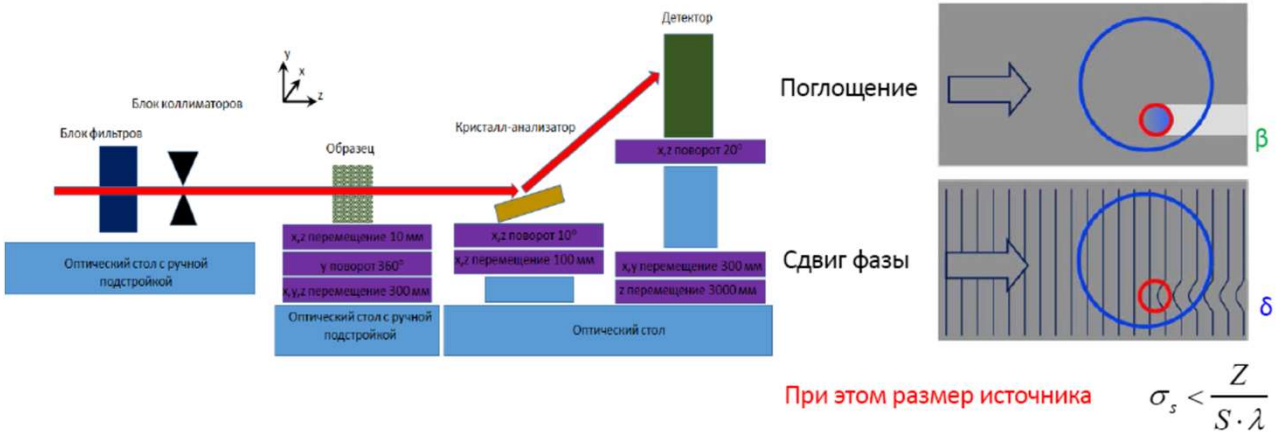
Рентгеновский магнитный/круговой дихроизм

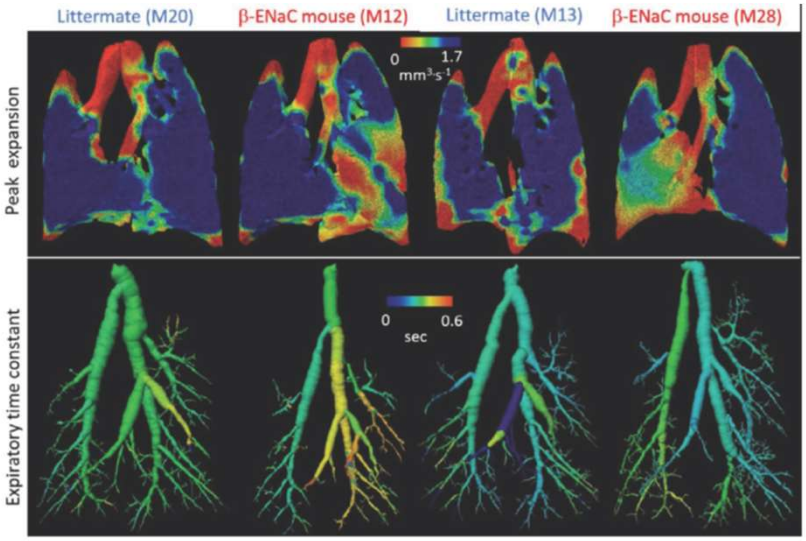


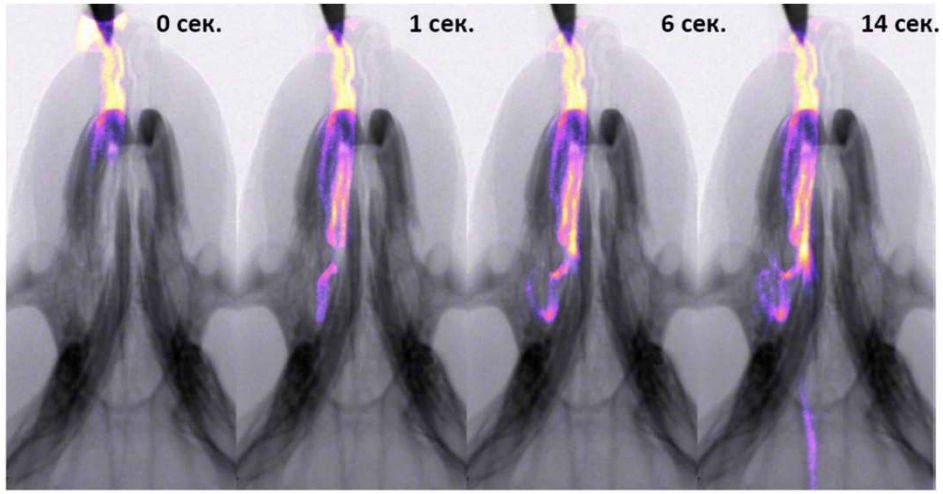



# Станция 1-5 «Диагностика в высокоэнергетическом рентгеновском диапазоне» (секция фазово-контрастных изображений)

**Купер Константин Эдуардович, ИЯФ**





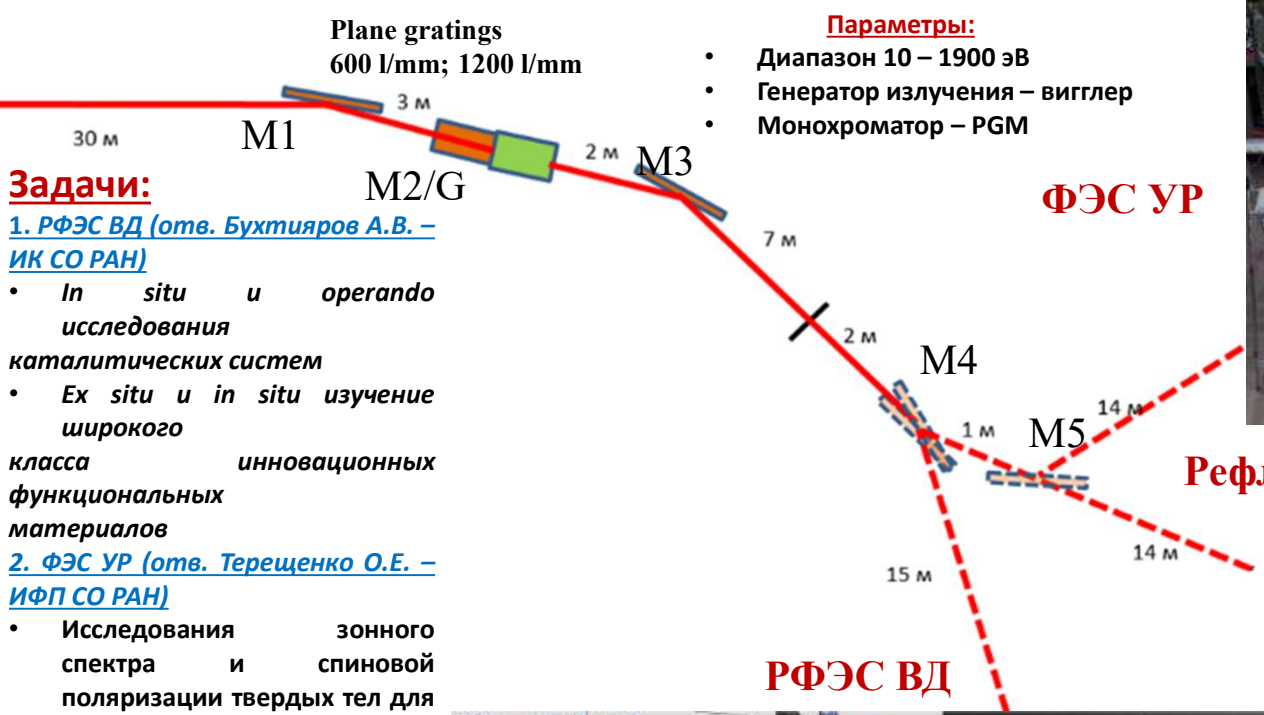



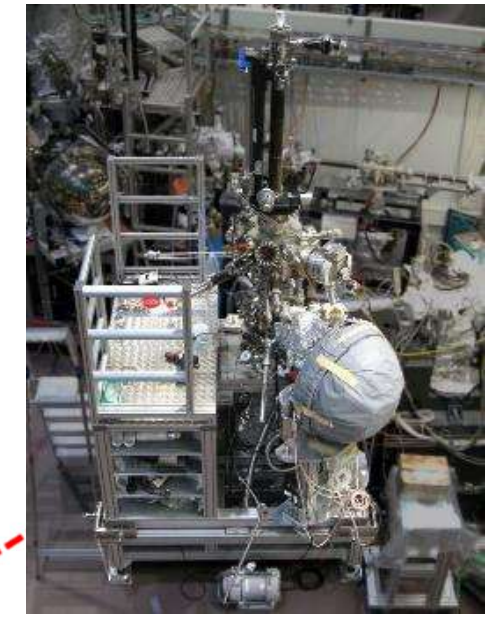
# Станция 1-6 «Электронная структура»

**Бухтияров Андрей Валерьевич, ИК**

**Параметры:**

- Диапазон 10 – 1900 эВ
- Генератор излучения – вигглер
- Монохроматор – PGM



**Задачи:**

***1. РФЭС ВД (отв. Бухтияров А.В. – ИК СО РАН)***

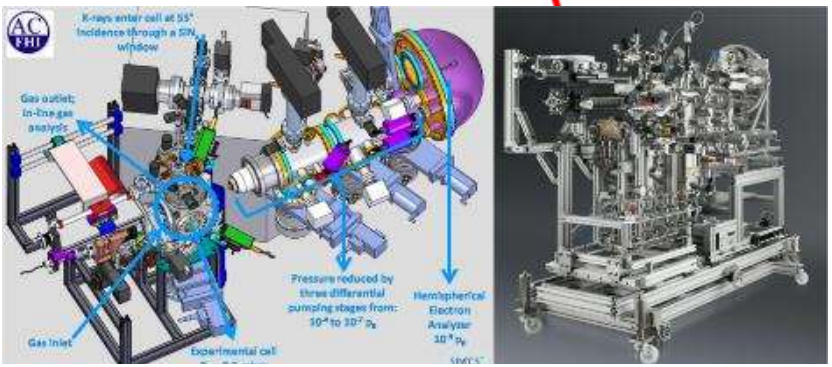
- *In situ и operando исследования каталитических систем*
- *Ex situ и in situ изучение широкого класса инновационных функциональных материалов*

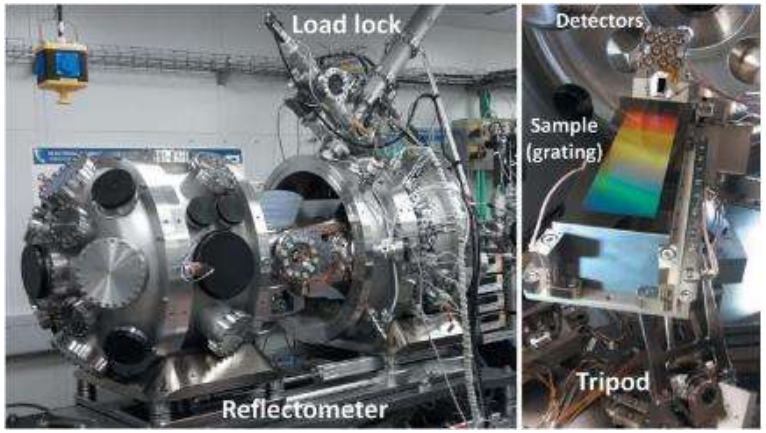
***2. ФЭС УР (отв. Терещенко О.Е. – ИФП СО РАН)***

- Исследования зонного спектра и спиновой поляризации твердых тел для приложений наноэлектроники и спинтроники

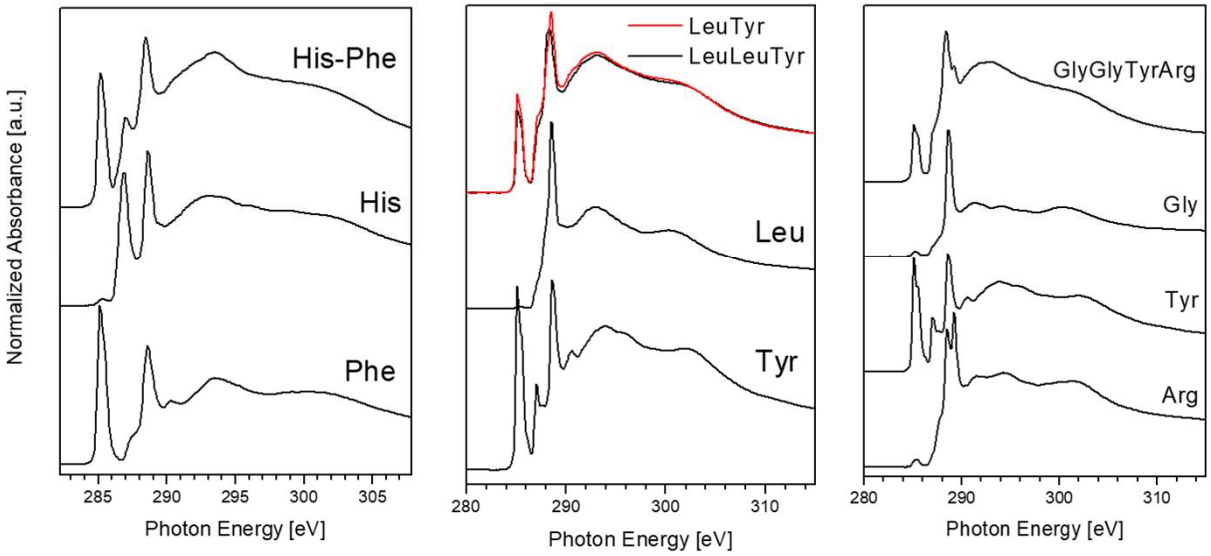
***3. Рефлектометрия (отв. Николенко А.Д. – ИЯФ СО РАН)***

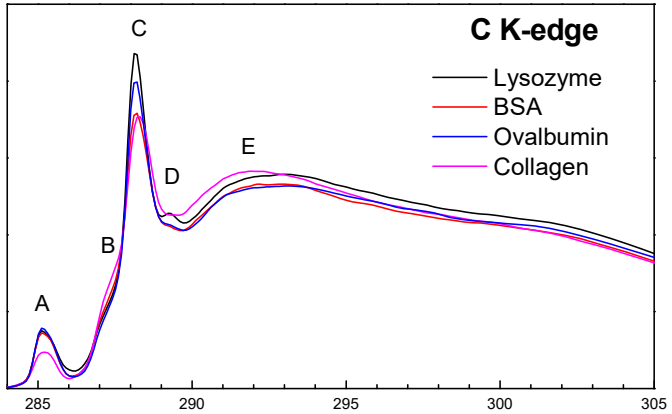
- Аттестация спектральных оптических элементов, фокусирующих элементов и детекторов рентгеновского излучения



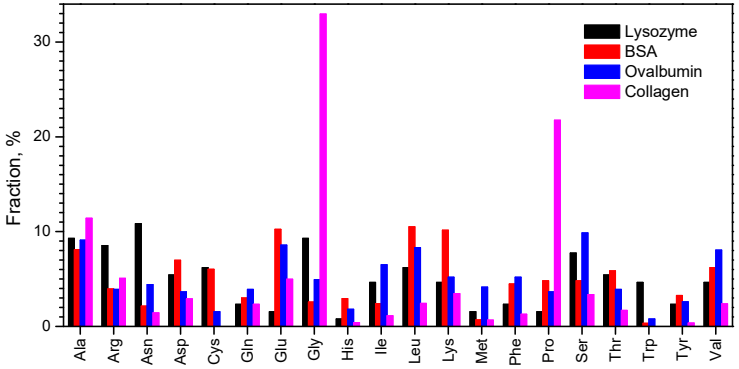


# Спектроскопия NEXAFS на К-крае углерода пептидов и белков




Fractions of amino acid residues




Is X-ray absorption spectroscopy sensitive to the amino acid composition of functional proteins?, Y.Zubavichus, et al., *J. Phys. Chem. B* **112** (2008) 4478.

# Станции 2-й очереди (на стадии проработки)

<u>Критерии отбора</u>

- Реализация методик, не вошедших в функционал станций 1-й очереди, но важных и актуальных в ближайшее десятилетие
- Нестандартные условия пробоподготовки и проведения измерений
- Образовательная функция
- Обеспечение 100% доступности базовых синхротронных методик (резервирование функциональных возможностей в случае возникновения технических неисправностей на секциях станций 1-й очереди)

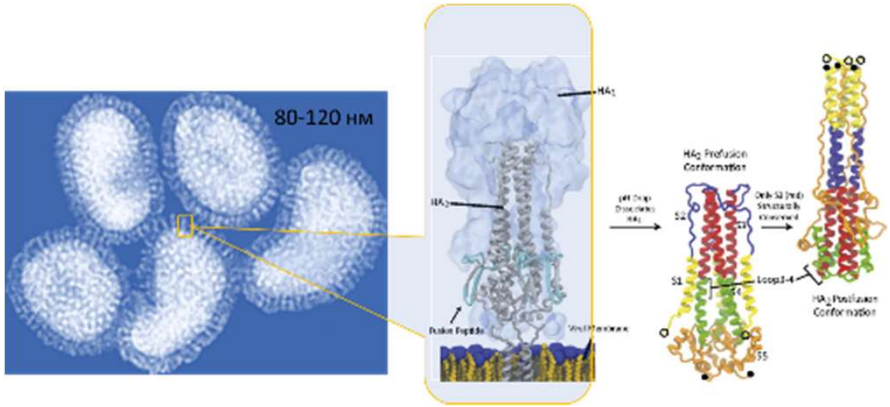
При проектировании станций второй очереди будут использованы наиболее эффективные технические решения, выработанные для станций первой очереди.

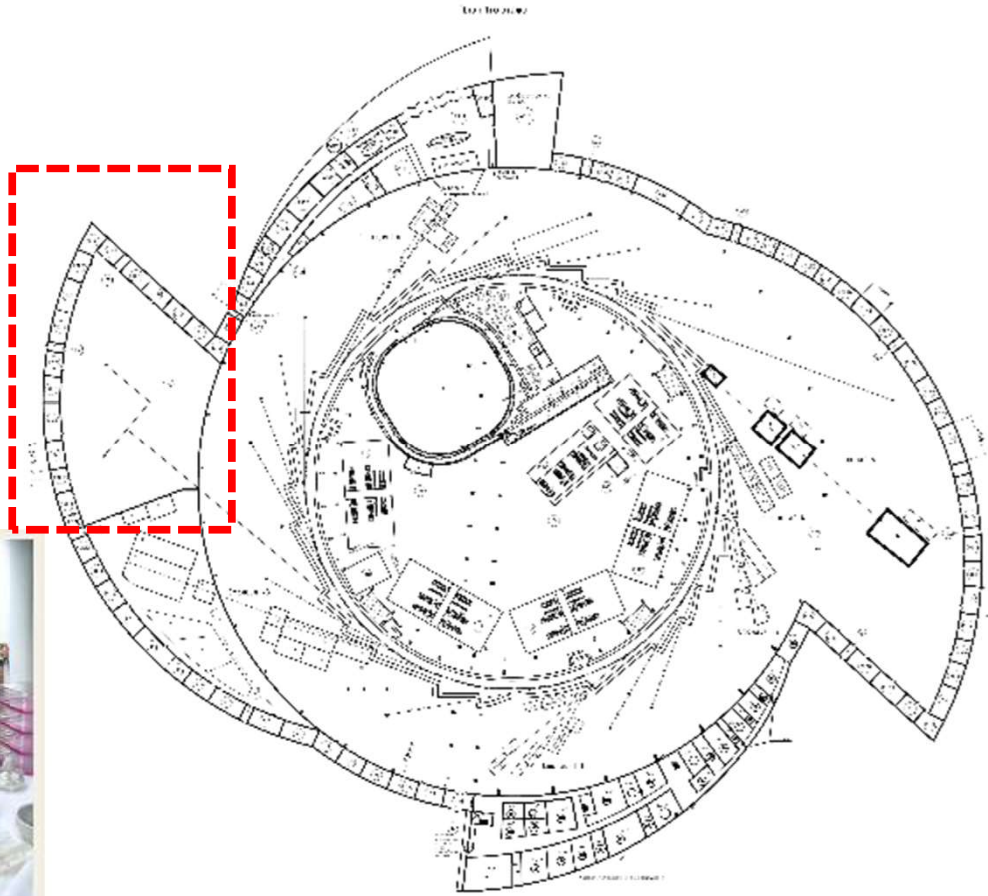
# Специализированная станция структурной вирусологии (ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора)

Решение задач эпидемиологии, вирусологии и биологической защиты

- Малоугловое рассеяние
- Макромолекулярная кристаллография
- Когерентный дифракционный имиджинг

Изолированный участок здания площадью ~400 м$^2$ с классом биологической защиты BSL-3





| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 2-2 | Белок | Ондулятор | Реализация методов белковой кристаллографии с использованием эффектов аномального рассеяния (метода аномальной дифракции на нескольких длинах волн, MAD) с акцентом на режим серийной кристаллографии для микрокристаллов, а также когерентной визуализации биологических объектов | Функциональный аналог секции 1-1-2 «Белковая кристаллография», будут использоваться те же помещения пробоподготовки (биохимическая лаборатория и комнаты кристаллизации) желательно разместить в здании недалеко от секции 1-1-2 и Лабораторного корпуса |
| 2-3 | Монокристалл | Ондулятор | Реализация метода рентгеноструктурного анализа монокристаллов низкомолекулярных соединений в условиях различных внешних воздействий с высоким временным разрешением с использованием источника с перестраиваемой энергией | Функциональный аналог секции 1-2-2 «Моно-РСА» |
| 2-16…2-20 | Бесперебойная работа | Поворотный магнит | Станции, функционально дублирующие секции первой очереди для обеспечения 100%-ной доступности основных методов:<br>- XPS/NEXAFS в мягком диапазоне;<br>- МУРР с непрерывно-варьируемым спектром;<br>- EXAFS;<br>- РСА (прецизионные измерения для реконструкции распределения электронной плотности;<br>- визуализация | Аналог секции 1-6-1<br>Аналог секции 1-2-4<br>Аналог секции 1-3-1<br>Аналог секции 1-2-2<br>Аналог секции 1-5-3 |
| | | Поворотный магнит / Краевое излучение | ИК-спектромикроскопия | Требуется ультрамягкая часть спектра; даже при использовании излучения «мягкого» поворотного магнита большая часть спектра должна поглощаться фильтром. Возможно, целесообразен переход на краевое излучение |

# Заключение

Задачи текущего момента:

- Скоординированная работа по усилению российского сообщества пользователей синхротронных источников в области {структурной} биологии
- Продуманная программа подготовки молодых кадров
- Подготовка специалистов по использованию наиболее современных синхротронных методик (оборудование, пробоподготовка, программы обработки данных)
- Стратегия проведения научных исследований (текущие и будущие задачи)
- Детальное техническое проектирование станций и вспомогательной инфраструктуры