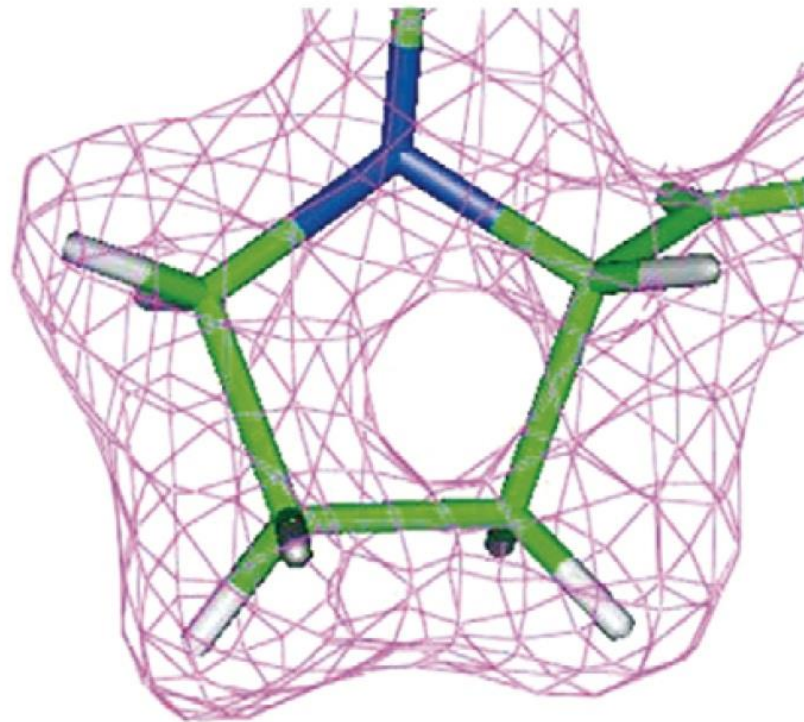
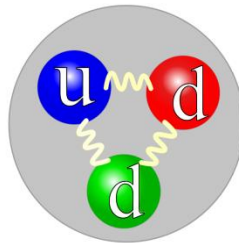
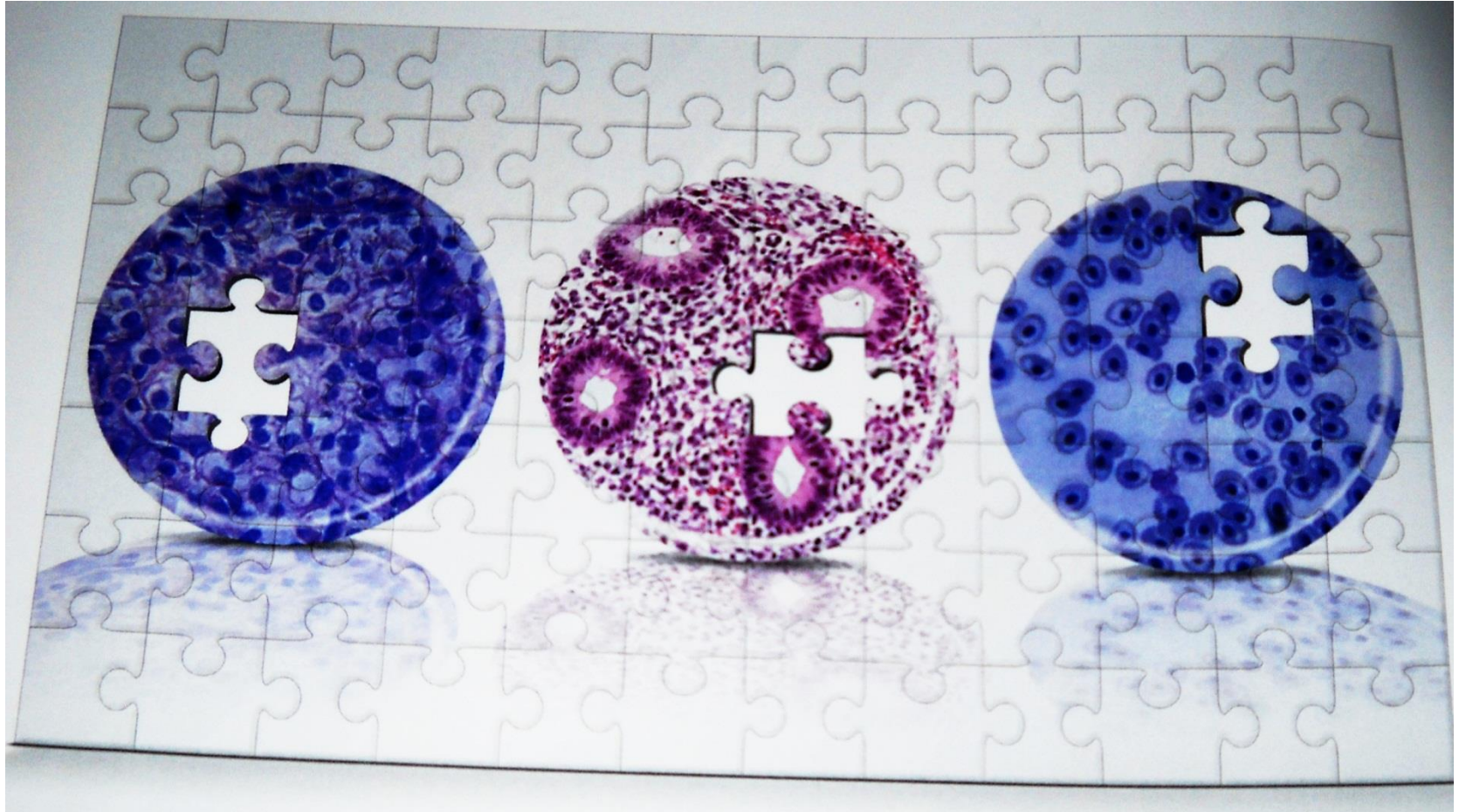


Нейтроннография



Дополнительность биофизических методов исследования



«Проблема водорода» в рентгеноструктурном анализе

- Атомы водорода определяются только при ультра-высоком разрешении $\sim 1 \text{ \AA}$ ($< 1\%$ структур PDB)
- Около 50 % атомов в структуре типичного белка – это атомы водорода
- Большинство могут быть определены из положения тяжелых атомов – но далеко не все.

Возможность определения положения атомов водорода в структуре позволяет исследовать:

- 1) состояние функциональных групп
 - 2) взаимодействие растворителя с белком (ДНК)
 - 3) взаимодействие субстрата с ферментом
 - 4) особенности динамики растворителя вблизи макромолекулы
-
- Механизмы ферментативных реакций

Основные свойства рассеяния нейтронов ядрами

- Близкое значение длины рассеяния для различных ядер (то есть отличия не на порядок – как в случае с рассеянием рентгеновского излучения)
- Сечение взаимодействия может значительно измениться для изотопа данного химического элемента
- Нейтроны намного слабее поглощаются веществом, чем X-лучи -> время облучения можно значительно увеличить

Neutron coherent scattering lengths and incoherent scattering cross-sections of interest in biological materials.

Element	Isotope	Atomic number	Neutron incoherent cross-section (barns)	Neutron coherent scattering length (10^{-12} cm)
H	^1H	1	80.27	-0.374
	$^2(\text{D})$		2.05	0.667
C	^{12}C	6	0.00	0.665
N	^{14}N	7	0.49	0.937
O	^{16}O	8	0.00	0.580
Mg	^{24}Mg	12	0.00	0.549
S	^{32}S	16	0.00	0.280
K	^{39}K	19	0.25	0.379
Mn	^{55}Mn	25	0.40	-0.375
Fe	^{56}Fe	26	0.00	1.012

Преимущества D над H

- В 40 раз меньшее сечение некогерентного рассеяния
- В 2 раза большая длина когерентного рассеяния
- Отсутствие эффектов фазового гашения

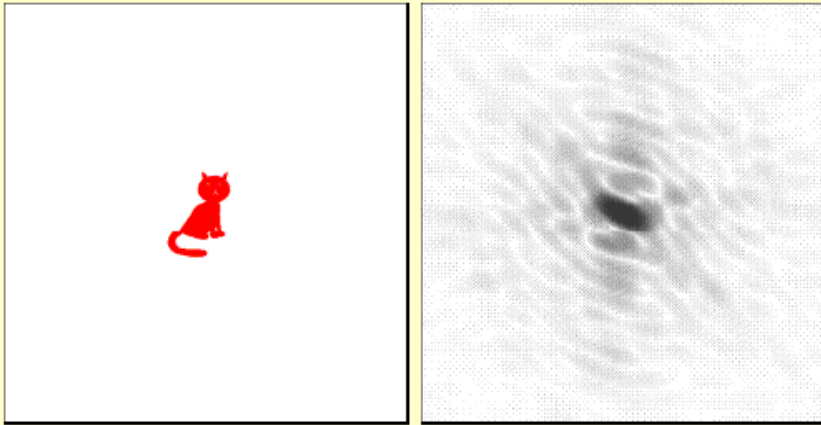
Данные рентгеноструктурного анализа свидетельствуют об отсутствии значимого влияния H->D замен на структуру кристаллов

Усовершенствования за последние годы

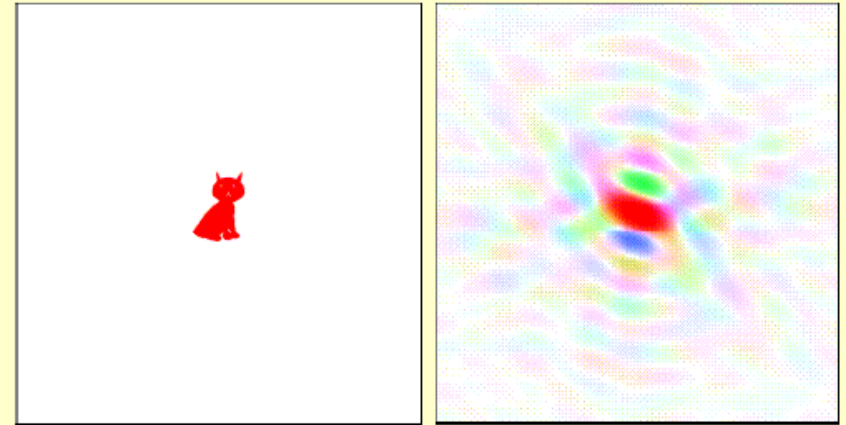
- Источники тепловых нейтронов стали на 2-3 порядка более интенсивными
- Эффективные экспериментальные протоколы замен H на D (дейтерирования)
- Регистрация сигнала

Как следствие – возможность наблюдения дифракции на кристаллах объемом около 0.1 мм^3 (все же больших, чем нужно для рентг.)

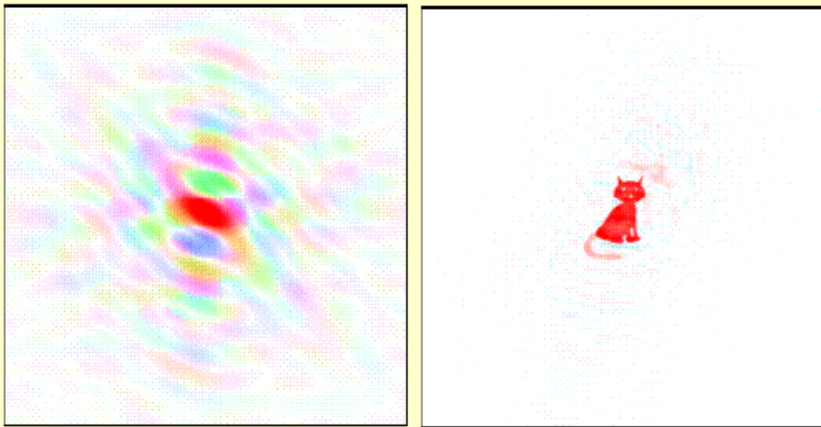
* Криогенная нейтронография (15 K)



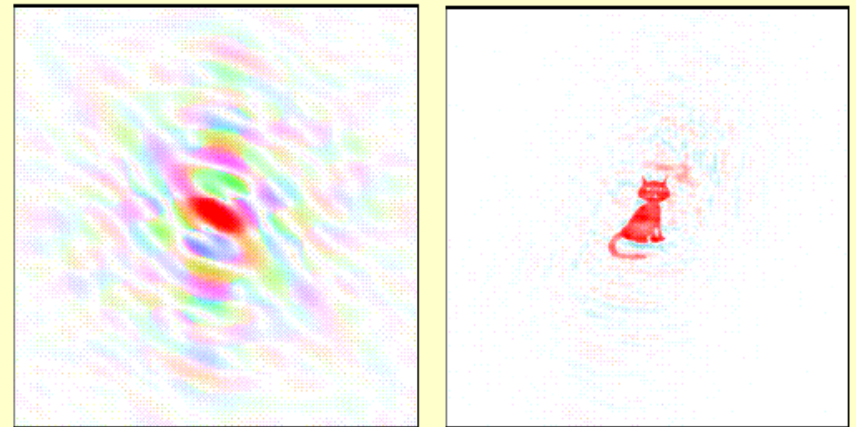
A cat with no phase information



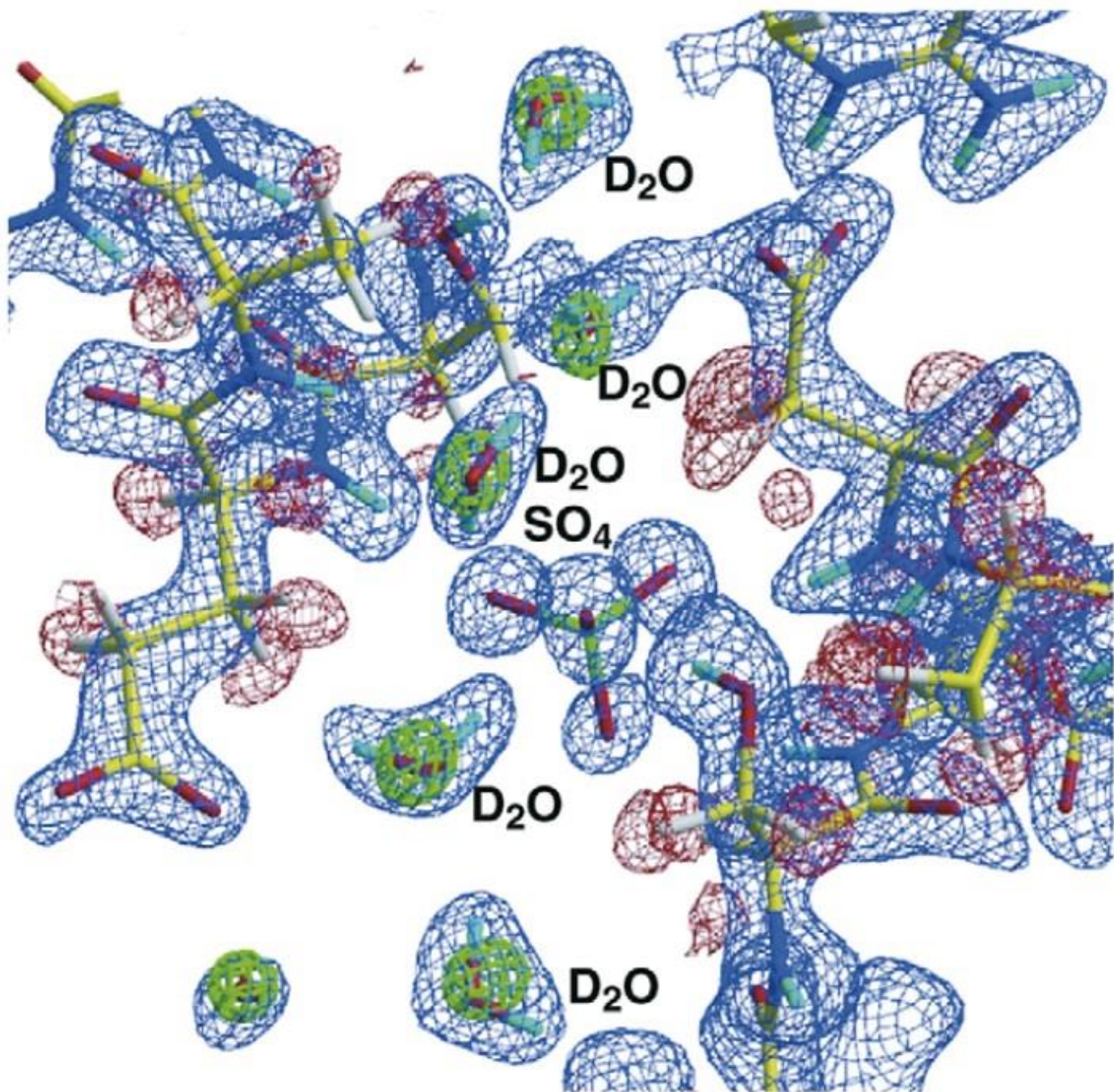
A tailless cat with phases



Use tailless phases as a guess for phases – tail weak. Works since good approximation.



Combine twice the observed magnitude of the “cat” minus the tailless cat magnitude: $2F_o - F_c$ map.



Сравнение данных рентгеноструктурного анализа и нейтронографии

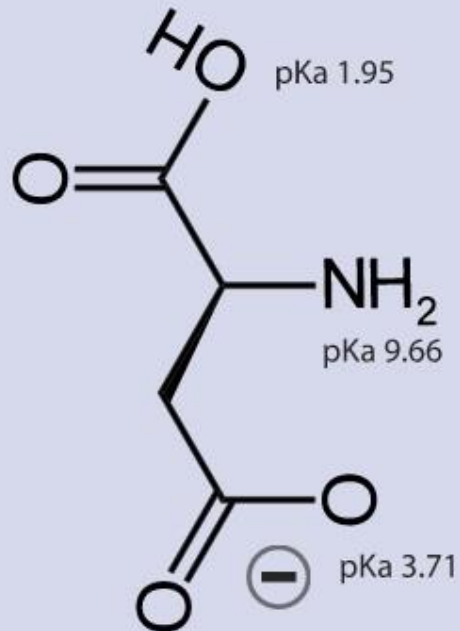
This work complements an exceptional ultrahigh-resolution 0.66 \AA X-ray structure of this enzyme, in which a remarkable 54% of the expected hydrogen atoms were located — the remainder were obscured by the degree of thermal motion when atomic B-factors are greater than 10 \AA^2 [4]. Although both studies enable the determination of protonation states of the protein, comparison of the neutron (2.2 \AA at room temperature) and X-ray (0.66 \AA at 100 K) crystallographic studies showed a clear advantage for neutrons in the case of less-ordered atoms (B-factors $> 5 \text{ \AA}^2$)

- Side chain charge at physiological pH 7.4

Negative

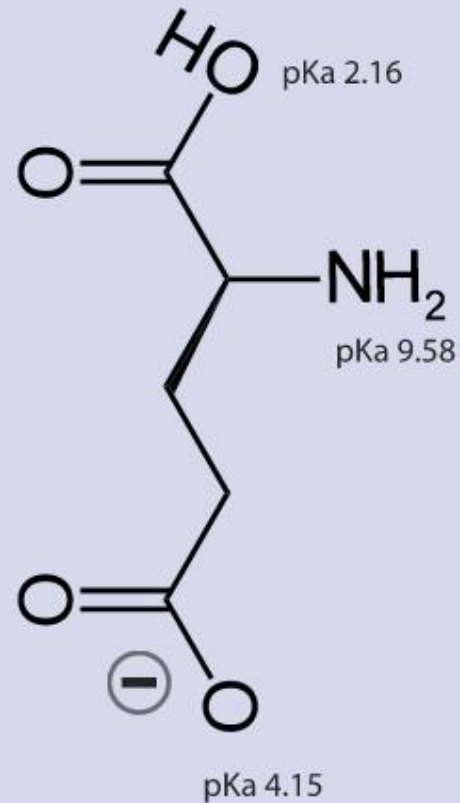
Aspartic Acid
(Asp)

D



Glutamic Acid
(Glu)

E



«Проблемный» гистидин

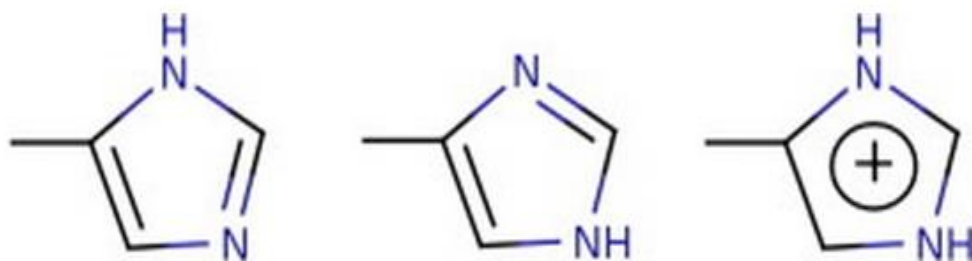
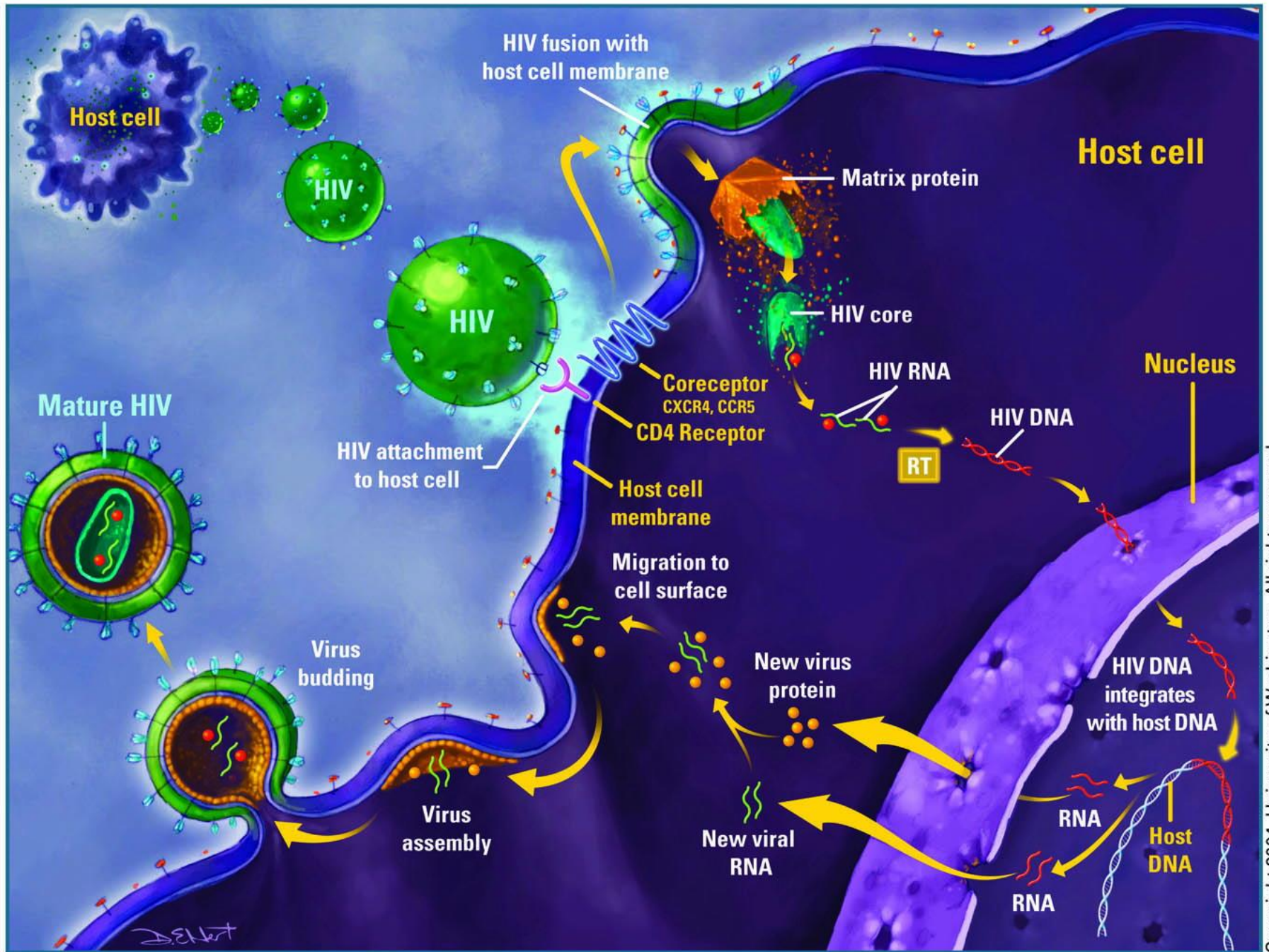


Fig. 1.

The three possible protonation states for the His residue, HID (left), HIE (middle), and HIP (right).



ing 1.5 mg/mL of HIV-1 protease. A large crystal was subsequently obtained with the dimension of $3.6 \times 2.0 \times 0.5$ mm. For neutron diffraction data collection, the crystal was soaked for 2 weeks at 293 K in the crystallization solution (pD 5.0), containing D₂O. This pD 5.0 is near the optimum in enzymatic activity of HIV-1 protease (11). A crystal obtained at the same crystallization condition was used for X-ray diffraction data collection at room temperature. Before data collection, the crystal was also soaked into D₂O based crystallization solution (pD 5.0) at 293 K.

Data Collection. Neutron diffraction data were collected to 1.9-Å resolution by using a crystal ($3.6 \times 2.0 \times 0.5$ mm) at room temperature on the BIX-4 diffractometer (41) installed at the 1G-A site of the JRR-3 reactor in the Japan Atomic Research Agency. Data collection was carried out by using the step-scan method with an interval angle of 0.3° and exposure times of 360 min per frame. The total time required to collect the total of 181 frames was 46 days. The diffraction data were integrated, scaled, and merged by using the programs DENZO and SCALEPACK (42). The detailed statistics of data collection are listed in [Table S3](#). Additional X-ray diffraction data were collected to 1.4-Å resolution at room temperature for the use of joint refinement. The data collection was performed by using the oscillation method with rotation angle of 1° and exposure times of 5 s per frame at BL6A at the Photon Factory (Ibaraki, Japan). The diffraction data were integrated, scaled, and merged by

