

# VYUŽITÍ METODY SAXS V BIOLOGII

*Maloúhlový RTG rozptyl (Small-Angle X-ray Scattering), krátce SAXS, se řadí mezi stále populárnější techniky pro strukturální studium v molekulární biologii, která nabízí cenné doplňkové informace k již standardně používaným technikám.*

Běžnými metodami strukturální analýzy biologických makromolekul a komplexů jsou krystalografie a NMR. SAXS tvoří vhodnou kombinaci k oběma zmíněným technikám s vysokým rozlišením a přináší cenné doplňující informace. V porovnání s krystalografií současně nabízí specifické výhody.

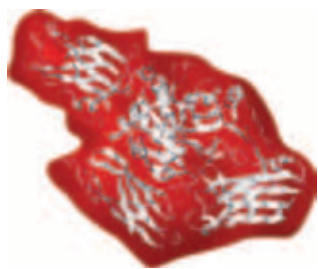
Krystalografie vyžaduje jednoduchý krystal biomolekuly a nedává odpověď na otázky týkající se vlivů okolí na strukturu materiálu. NMR a SAXS přinášejí informace popisující vlivy přirozeného okolí zkoumané struktury. Zatím co NMR poskytuje strukturální informace s vysokým rozlišením, signál je velmi často tak komplexní, že jej nelze interpretovat bez doplňujících dat.

Využitím metody SAXS lze biologické makromolekuly studovat v roztoku, čili ve fyziologických podmínkách.

Analýza vzorků v jejich přirozeném stavu je naprosto zásadní pro studium dynamických procesů, jako jsou strukturální změny při tvorbě ligandů nebo skládání / rozkládání proteinů při environmentálních změnách.

Na základě obsáhlé strukturální informace, jednoduché přípravy vzorku a flexibilních experimentálních podmínek je SAXS klíčovou technikou v biologickém výzkumu.

**Obr. 1 – Model proteinu**



## Základní princip

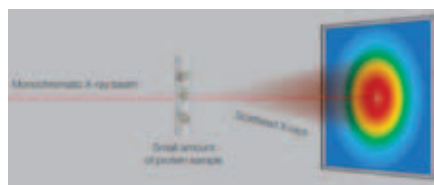
Měření SAXS slouží ke stanovení rozptylové intenzity molekuly jako funkce rozptylového úhlu, typicky při rozlišení od 1 nm do 100 nm. Při procházení RTG záření pevným nebo kapalným materiálem obsahujícím nano částice dochází k jeho malouhlovému rozptylu, jelikož takové struktury jsou v porovnání s vlnovou délkou RTG větší. Výsledný rozptylový záznam je charakteristický pro velikost částic, tvar částic a interní strukturu.

Typické aplikace:

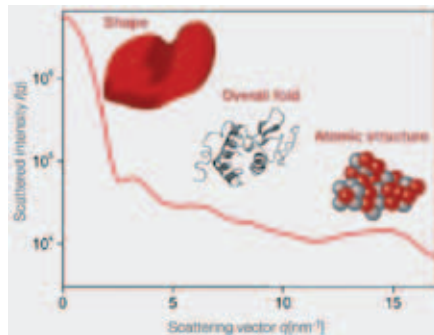
- velikost a tvar biologických makromolekul,
- 3D proteinové obálky nebo proteinové

- komplexy,
- stupeň agregace,
- hmotová analýza,
- skládání a rozkládání proteinů,
- stabilita proteinů při změnách externích parametrů,
- strukturální změny následkem tvorby ligandů.

**Obr. 2 – SAXS**



**Obr. 3 – Tvar / skládání / struktura proteinů**



## SAXSess Pro

SAXSess Pro je konfigurace renomovaného SAXSess mc<sup>2</sup> systém pro nanostrukturální analýzu speciálně uzpůsobený výzkumu proteinů, DNA a dalších biologických makromolekul.

Základními charakteristikami je krátká doba měření umožňující vysoce účinný screening, splňuje požadavky na malá množství vzorku a kompaktní uspořádání a jednoduchou obsluhu. SAXSess Pro v kombinaci se softwarem SAXSquant<sup>™</sup> pokrývá všechny Bio-SAXS aplikace.

## Stanovení velikosti a hmotnosti proteinů

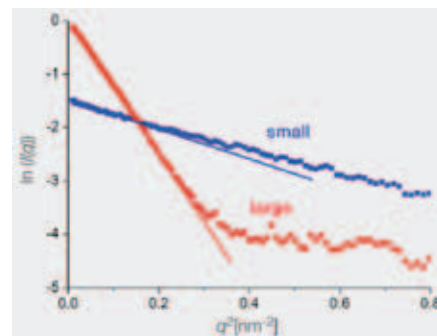
Ke studiu geometrických charakteristik proteinů je určena standardně používaná Guinierova extrapolace, na základě které lze získat informaci o objemu částic, který je úměrný hmotnosti (viz Obr. 4).

## Monitoring skládání proteinů

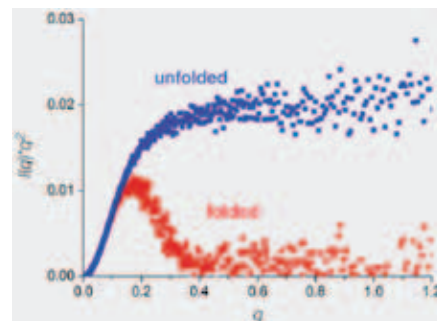
Omezení velkých rozptylových úhlů nabízí informaci o skládání a rozkládání proteinů.

Kratky plot využívá fakt, že se rozptylová křivka rozkládá v případě kompaktních částic a rozložených proteinů pro velké úhly při různých signálech. Tímto způsobem lze využít SAXS experimenty ke sledování procesu denaturace proteinů.

**Obr. 4 – Stanovení velikosti a hmotnosti proteinů**



**Obr. 5 – Monitoring skládání / rozkládání proteinů**



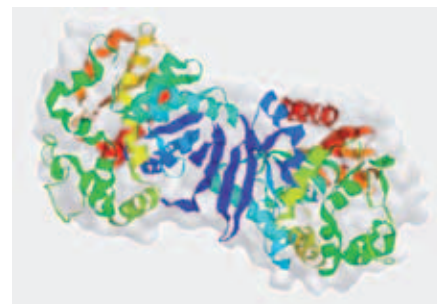
## Tvorba 3D obálek globulárních proteinů

Fourierova transformace křivek SAXS odhaluje informaci v reálném prostoru a poskytuje přístup k párové distanční distribuční funkci.

Distribuce distancí mezi jednotlivými rozptylovými centry (elektrony) v rámci částice zvyšuje interferenci produkujících skutečný rozptylový záznam.

Párová distanční distribuční funkce sama o sobě umožňuje získat cenné informace o velikosti částic, jejich tvaru a interní struktuře. Sofistikovanější ab-initio metody přizpůsobené datům proteinů dokonce produkují obálky s nízkým rozlišením anebo zobrazují skládání páteře proteinů.

**Obr. 6 – Tvorba 3D obálek**



## Model struktury protein-protein / komplexů protein-DNA

Informace získané jinými technikami (např. proteinovou krystalografií) lze kombinovat se SAXS daty za účelem stanovení relativní

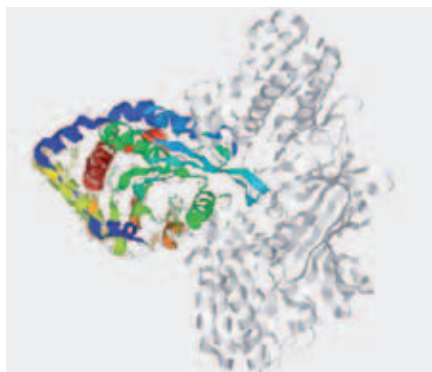
orientace a umístění individuálních oblastí v komplexu. Tento proces je znám jako rigid body modeling. Umožňuje nalézt struktury komplexů nejlépe vyhovujících experimentálním datům. Například strukturu proteinového komplexu lze řešit přidáním ustanovující krystalové struktury.

### **Bodová nebo čárová kolimace – Jeden systém, dvě možnosti**

Jednotlivé typy kolimace mají odlišné aplikačně specifické výhody: SAXSess Pro nabízí oba.

V analýze SAXS se RTG paprsky transformují do definovaného paprsku – bodového nebo čárového – v procesu nazývaném kolimace. Běžné SAXS systémy nabízejí pouze bodovou kolimaci. Na principu Kratkeho blokového kolimátoru je SAXSess Pro jediný SAXS systém umožňující rychlou

**Obr. 7 – Model struktury protein-protein/ komplexů protein-DNA**



změnu mezi bodovou a čárovou kolimací, a to v průběhu 15 minut. Bodová kolimace se doporučuje pro analýzu anizotropních materiálů a pevných vzorků s nehomogenní strukturou. Použití čárové kolimace

je výhodné při měření kapalin, speciálně v případě nízkého signálu, kterým se vyznačují právě roztoky proteinů.

RTG paprsek související s čárovou kolimací zasahuje velký objem vzorku a ozařuje velký počet proteinů. To poskytuje silný rozptylový signál současně udržující nízkou míru ozáření jednotlivých proteinů. Tímto způsobem čárová kolimace v porovnání s bodovou kolimací významně redukuje dobu měření. V případě izotropických vzorků bez efektu orientace jsou výsledky měření v režimu čárové kolimace předmětem kalkulace, tzv. desmearing kalkulace, aby se zamezilo ztrátě jakékoliv informace.

*Ing. Martina VILIMOVSKÁ,*

*Ing. Karel VOLDŘICH,*

*Anton Paar GmbH, organizační složka,  
martina.vilimovska@anton-paar.com*