

[View on rigaku.com](https://www.rigaku.com)

PX022 - Thaumatin S-SAD-Phasing mit 2 Stunden Datenerfassung auf dem XtaLAB Synergy-S

Einführung

Vor kurzem haben wir ein 4-Kreis-Diffraktometer mit geschlossener Röhre für die Kristallographie kleiner Moleküle und Makromoleküle vorgestellt, das XtaLAB Synergy-S. Es verfügt über drei neue Technologien in einem kompakten Gehäuse, das in jedes Heimlabor passt: Mikrofokus-PhotonJet-S-Quellen (mit Cu-, Mo- oder Ag-Targets), ein ultraschnelles (10° pro Sekunde) Kappa-Goniometer und einen hybriden Photonenzählungsdetektor HyPix-6000HE mit $0,1 \text{ mm} \times 0,1 \text{ mm}$ großen Pixeln. Hier haben wir einen zweistündigen Datensatz an einem Thaumatin-Kristall gesammelt, um die Qualität der Daten des XtaLAB Synergy-S-Systems anhand eines Proteinkristalls mit einer durchschnittlichen Einheitszellengröße zu demonstrieren.

Experimenteller Überblick

T. daniellii Thaumatin wurde von Sigma gekauft und in hochreinem Wasser von Laborqualität in einer Konzentration von 50 mg/ml suspendiert. Thaumatin-Kristalle wurden bei 18°C aus hängenden Tropfen gezüchtet, die aus $6 \mu\text{l}$ 50 mg/ml Thaumatin plus $4 \mu\text{l}$ Kristallisationslösung [24 % (w/v) NaKTartrat, 15 % (v/v) Ethylenglykol und 0,1 M BisTris Propan, pH 6,6] über einer Vertiefung mit $500 \mu\text{l}$ Kristallisationslösung bestanden. Vor der Flash-Kühlung wurde jeder Kristall zum Kälteschutz für 15 bis 30 Sekunden in der oben genannten Kristallisationslösung mit 25 % (v/v) Ethylenglykol getränkt. Die Spezifikationen des XtaLAB Synergy-S-Systems und des Detektors sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: XtaLAB Synergy-S-Spezifikationen.

Röntgenquelle	PhotonJet-S Cu-Quelle mit kontinuierlich variablem Divergenzspalt Strahlgröße = $100 \mu\text{m}$
Betriebsleistung	$50 \text{ kV} \times 1 \text{ mA} = 50 \text{ W}$
Goniometer / Detektorbereich	4-Kreis Kappa mit ausfahrbarem 2θ -Arm / Entfernungsbereich von 30 - 250 mm
Detektor Aktive Fläche Auslesezeit Pixelgröße Kühlung	Hybride Photonenzählung HyPix-6000HE $77,5 \times 80,3 \text{ mm}$ Kontinuierlich (7 ns) $100 \mu\text{m}$ luftgekühlt

Die Datenerfassung wurde mit ^{CrysAlisPro} durchgeführt, die Verarbeitung erfolgte mit XDS¹, und die Strukturlösung wurde mit verschiedenen Programmen über HKL-3000R² durchgeführt. Ein großer (0,6 mm x 0,3 mm x 0,3 mm) Thaumatin-Kristall wurde für die Datenerfassung ausgewählt, um das Worst-Case-Szenario für die Spotausbreitung aufgrund von Strahldivergenz zu veranschaulichen (Abbildung 1).

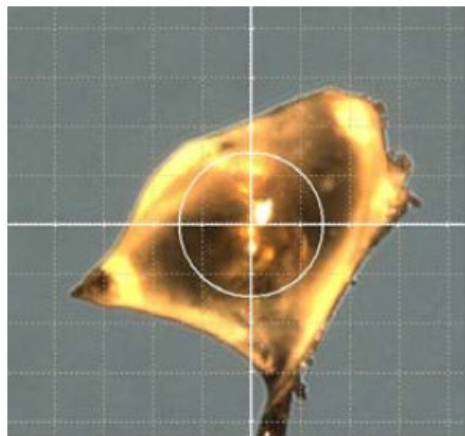


Abbildung 1: Thaumatin-Kristall. Der Rasterabstand beträgt 0,1 mm. Der Kreis ist 0,3 mm groß.

Ergebnisse

Der Thaumatin-Kristall beugte sich bis über 2 Å hinaus, und die automatische Indizierung ergab eine primitive tetragonale Einheitszelle mit $a = b = 57 \text{ Å}$ und $c = 149 \text{ Å}$. Der Punktabstand entlang der längsten Kante der primitiven Zelle wurde mit der vollen Divergenz des Röntgenstrahls und einem Detektorabstand von 60 mm erreicht (Abbildung 2).

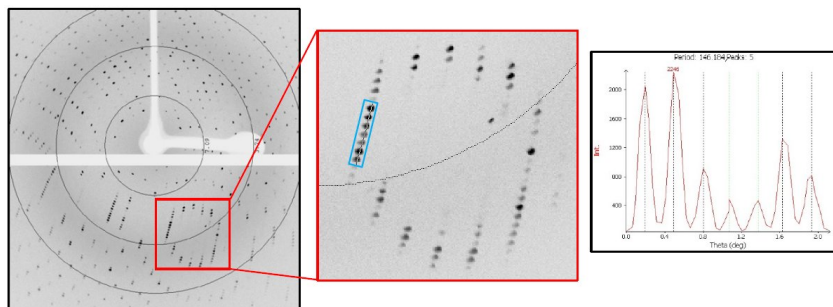


Abbildung 2: 20-Sekunden-Belichtung pro 0,2°-Drehung des Thaumatin-Kristalls bei einem Abstand von 60 mm auf der HyPix-6000HE. Die Auflösungsringe betragen 7,09, 3,74 und 2,68 Å. Die vergrößerte Darstellung zeigt die Lunen entlang der 150 Å langen Zellkante. Die Peakseparation und der d-Abstand der blau umrahmten Spots sind in der Grafik rechts dargestellt.

Sechs Scans, die mit dem Strategiealgorithmus von ^{CrysAlisPro} berechnet wurden, wurden gesammelt, um in 2 Stunden vollständige, redundante Daten bis 1,4 Å zu erhalten (Tabelle 2).

Tabelle 2: Für Thaumatin gesammelte Scans.

Scan #	ω Anfang	ω Bereich	$\Delta\omega$	φ	κ	2θ	Nr. img	Zeit/Abbildung	Gesamtbelichtung
--------	-----------------	------------------	----------------	-----------	----------	-----------	---------	----------------	------------------

1	-136°	186°	0.15°	-180°	0°	-37.8°	1240	2s	41m 20s
2	55°	37.95°	0.15°	84°	-171°	36.9°	253	2s	8m 26s
3	60°	64.05°	0.15°	-150°	178°	36.9°	427	2s	14m 14s
4	-27°	27°	0.15°	-97.7°	112°	36.9°	180	2s	6m
5	-119°	118.05°	0.15°	30°	-57°	-37.8°	787	2s	26m 14s
6	-58°	108°	0.15°	-30°	-19°	-37.8°	720	2s	24m
									2h 14s

Tabelle 3 zeigt die Ergebnisse der Datenverarbeitung. Die Daten wurden auf 1,4 Å skaliert, wobei die Friedel-Paare als unterschiedliche Reflexe behandelt wurden, da die hohe Redundanz dies zuließ. Dies führte zu einem 100% vollständigen Datensatz mit einem R_{merge} unter 10%. Um die 17 Schwefelstellen zu lokalisieren und die Daten zu phasen, wurde SHELXD³ für 500 Versuche ausgeführt. Die beste Lösung hatte einen $CC_{\text{All}} = 25,1$, $CC_{\text{Weak}} = 11,4$, $PATFOM = 0,93$ und 14 Stellen mit hoher Belegung. Die 14 Stellen wurden für die Phasenverschiebung auf 1,5 Å mit SHELXE, die Verfeinerung der Stellen und die Phasenverbesserung mit MLPHARE⁴ und die Dichtemodifikation und Phasenerweiterung auf 1,4 Å mit DM⁵ verwendet. Die Verdienstziffer nach der Dichtemodifikation betrug 0,87. Anhand der anomalen Fourier-Differenz wurden 2 zusätzliche Schwefelstellen ermittelt und der Phasenbildungsprozess wiederholt. Die Phasen wurden an ARP/wARP⁶ für 2 Zyklen automatischer Modellerstellung übergeben, die ein Ausgangsmodell mit 205 aa ergab. Dieses Modell wurde manuell in Coot⁷ angepasst und für 10 Zyklen mit Refmac⁸ verfeinert, was zu einem $R = 15,0\%$ und einem $R_{\text{free}} = 16,2\%$ führte. Abbildung 3 zeigt das Modell und die Karten in der Nähe von R53.

Tabelle 3: Kristallparameter und Verarbeitungsstatistiken für Thaumatin mit unmerged Friedel-Paaren.

Raumgruppe	P4 ₁ 2 ₁ 2
Einheitszelle (Å)	57.8, 57.8, 149.8
Auflösung (Å) (letzte Schale)	20-1.4 (1.44-1.40)
Gesamtzahl der Reflexionen	698447
Eindeutige Anzahl von Reflexionen	95481
Vollständigkeit (%) (letzte Schale)	99.9 (100)
Multiplizität (letzte Schale)	7.3 (5.2)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$ (letzte Schale)	19.6 (1.7)
R_{merge} (%) (letzte Schale)	7.3 (88.8)
$CC_{1/2}$ (letzte Schale)	99.9 (57.7)
R / R_{free} (%)	15.0 / 16.2

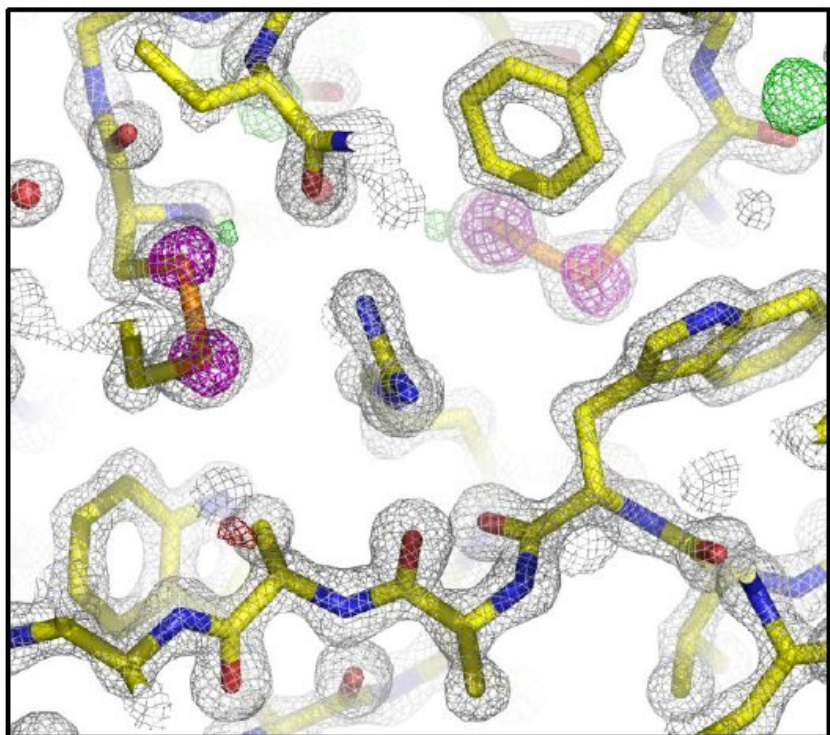


Abbildung 3: 2Fo-Fc (graues Netz @ 2 rmsd), Fo-Fc (grünes und rotes Netz @ 3 bzw. -3 rmsd) und anomale Differenz (magentafarbenes Netz @ 5 rmsd) Elektronendichtekarten. R53 befindet sich in der Mitte und wird von zwei Disulfidbindungen flankiert.

Schlussfolgerung

Die Kristallstruktur von *T. daniellii* Thaumatin wurde durch S-SAD-Phasing auf 1,4 Å gelöst, wobei ein Datensatz verwendet wurde, der innerhalb von 2 Stunden auf dem XtaLAB Synergy-S System gesammelt wurde. Diese Lösung war in so kurzer Zeit möglich, weil das System einen hohen Flux und eine hohe Brillanz aufweist und das ultraschnelle Goniometer und der HyPix-6000HE-Detektor eine hohe Geschwindigkeit, Genauigkeit und Präzision bieten.

Referenzen

1. Kabsch, W. (2010) *Acta Cryst.* **D66**, 125-132.
2. Minor W., Cymborowski, M., Otwinowski, Z., & Chruszcz, M. (2006) *Acta Cryst.* **D62**, 859-866.
3. Sheldrick, G.M. (2008) *Acta Cryst.* **D64**, 112-122.
4. Otwinowski, Z. (1991) Proceedings of the CCP4 Study Weekend.
5. Cowtan K. (1994) Gemeinsamer CCP4 und ESF-EACBM Newsletter zur Proteinkristallographie **31**, 34-38.
6. Langer G., Cohen S.X., Lamzin V.S. & Perrakis A. (2008) *Nature Protocols* **3**, 1171-1179.
7. Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W.G. & Cowtan, K. (2010) *Acta Cryst.* **D66**, 486-501.
8. Murshudov G.N., Vagin, A.A. & Dodson, E.J. (1997) *Acta Cryst.* **D53**, 240-255.

Related products



CrysAlis^{Pro}

User-inspired data collection and data processing software for small molecule and protein crystallography.



HyPix-6000HE

Extremely low noise detector based on direct X-ray detection technology.



XtaLAB Synergy-S

Our most popular diffractometer for Chemical Crystallography and Mineralogy, configured with either single or dual microfocus sealed tube X-ray sources and an extremely low noise direct X-ray detection detector.