

1. Viri Roentgenskih žarkov

$$\lambda = 1 \text{ \AA}$$

viri so:

- generatorji – zaprta tuba (katodna cev) ali rotirajoča anoda. Tarče so Cu in Mo anode
 - sinhrotronsko žarčenje
2. Primerjava X-ray katodne cevi, rotirajoče anode in sinhrotronskega žarčenja.
- Katodna cev
Sistem je v vakuumu, delovni tok je 50 mA, napetost je 60 kV. Pri večjih močeh in intenzitetah se tarča – anoda lahko stopi, ker je ni mogoče kvalitetno hladiti
 - Rotirajoča anoda
Tarča (anoda) se vrti, kar omogoča boljše hlajenje. Možnost dela pri večjih močeh (12-18kW). Večja intenziteta x-žarkov. Cu anoda se uporablja za difrakcijo pri bioloških makromolekulah.
 - Sinhrotronsko žarčenje
Elektroni krožijo z 99,9% hitrosti svetlobe po krožnici veliki od 10 – 100m. V področju magnetnega polja elektroni emitirajo elektromagnetno valovanje tangento na smer gibanja. Tip valovanja je odvisen od magneta. Visoka intenziteta žarkov, možnost izbire valovne dolžine, časovna struktura žarka omogoča časovno reševanje problema.
3. Značilnosti sinhrotronskega žarčenja in prednosti za strukturno biologijo.
- visoki fluksi (veliko fotonov) – pomembno ker makromolekule slabo sipajo
 - visoko kolimiran (zbran na optično os) in majhen žarek – primeren za majhne kristale
 - možna izbira valovne dolžine – pomoč pri reševanju faznega problema
 - polarizirano elektromagnetno valovanje
 - časovna struktura žarka omogoča časovno razločene eksperimente (študij encimskih reakciji)

4. Potrebna kvaliteta in kvantiteta proteinskega vzorca za kristalizacijo.

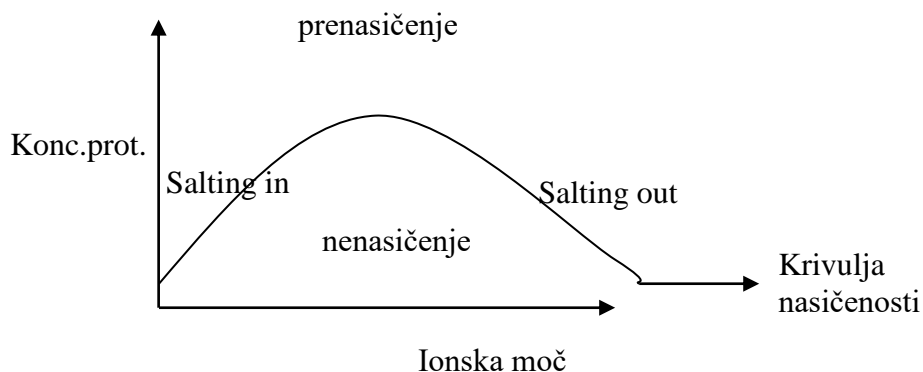
$$m > 10\text{mg}$$

$$c = 10\text{mg/ml}$$

kemijska in konformacijska čistot/homogenost, pravilen pH, ionska moč, kofaktorji

5. Tipičen fazni diagram proteina v odvisnosti od ionske moči

Topnost proteina do neke ionske moči (max) narašča, nato z večanjem ionske moči topnost proteina pada.



6. Pogosto uporabljena obarjalna sredstva in njihov način delovanja
- anorganske soli ((NH₄)₂SO₄, Na-citrat, tartrati). Sol in protein tekmujeta za hidratacijski ovoj tako se poveča koncentracija proteina v raztopini.
 - Organska topila (etanol, 2-metil-2,4-pentadiol). Tekmujejo za hidratacijski ovoj, prav tako pa pride do spremembe dielektrične konstante.
 - Linearni polimeri (polietilen glikol). Ima velik solvatacijski volumen, molekule ki imajo zelo različen solvatacijski volumen se ločijo v različne faze

7. načini (pristopi) k screeningu kristalizacijskih pogojev

Full factorial – preiščemo ves prostor, kakšni pogoji ustrezajo, tako tudi najdemo pogoj za naš protein. Dolga procedura.

Incomplete factorial – pokrijemo matriko z enakimi razmaki. Ni nujno da zadenemo pogoj, ki je ustrezen za naš protein, mu pa pridemo vsaj blizu. To kasneje popravimo z poljenjem.

Random – naključna izbira pogojev pokrivanja matrike

Sparse matrix – mešanica pogojev, ki so prej že delovali (iz baze podatkov).

8. Tehnike kristalizacije

- Parna difuzija – viseča kapljica

V rezervoar damo raztopino z obarjalnim reagentom. Na krovno stekelce damo 2 µL proteina in 2 µL koktejla. Sistem neprodušno zapremo. V kapljici se koncentracija reagenta zmanjša za ½. Sistem se hoče vzpostaviti, zato izhaja voda iz kapljice v rezervoar. Pri tem prihaja do prenasičenja proteina.

- o sedeča kapljica – vse je enako, razen tega da ni nevarnosti padca kapljice
- Batch – damo 1 µL proteina in 1 µL obarjalnega reagenta, pokrijemo z oljem. Olje preprečuje izsušitev, voda se počasi absorbira v olju, prehaja olje in izhlapi. Tako pride do koncentriranja kapljice.
- Dializa – dializni gumbek v katerega damo 5 – 350 µL proteina, zapremo z semipermeabilno membrano. Damo v rezervoar. Pride do težnje po ravnotežju. Pri dializi lahko spreminjamo koncentracijo perციiata, pH,...

9. Načini sejanja

- Streak seeding

Pripravimo preravnotežne kapljice, skozi katere potem z zanko (las, brka) vnesemo nukleacijska jedra

- Mikrosejanje

Opreremo kristal, da odstranimo amorfne perციiate. Kristal zdrobimo v steklenem homogenizerju. To »semensko« raztopino lahko shranimo na konstantni temperaturi za kasnejšo uporabo. Pripravimo si serijo redčenj te raztopine da dobimo končno raztopino 1/1000 do 1/10000000. Damo kapljico semen iz različnih raztopin v preravnotežno raztopino.

- Makrosejanje

Pripravimo nasičeno kapljico pod mejo spontane nukleacije. Izberemo kristal, ki je brez napak. Ga prenesemo preko različnih raztopin, ki imajo nižjo koncentracijo (zato da ga malo raztopimo, ker se ponavadi na površini pojavijo napake in zato kristali nehajo rasti). Nato ta kristal prenesemo v kapljico.

10. Simetrijski elementi točkovnih grup

Refleksija – preko zrcalne ravnine (m)

Rotacija – Okoli osi C_n

Inverzija – Preko izhodišča (i)

Nepravilna rotacija – Rotacija za $360^\circ/n$, potem sledi refleksija skozi ravnino ki je pravokotna na os rotacije (S_n)

11. Simetrijski elementi prostorskih grup

Translacija – vzorec se v prostoru ponavlja v določeni smeri na enakih intervalih.

12. Razlika med točkovnimi in prostorskimi skupinami

Poznamo 32 točkovnih skupin s pomočjo kombinacije točkovnih simetrijskih operacij. Pri upoštevanju translacije in Bravaisovih mrež pa poznamo 230 možnosti imenovanih geometrijskih ali prostorskih skupin.

13. Kristalni sistemi

TRIKLINSKI – ni omejitev

MONOKLINSKI – $\alpha = \gamma = 90^\circ$

ORTOROMSKI – $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$

TETRAGONALNI – $a = b$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$

HEKSAGONALNI – $a = b$ $\alpha = \beta = 90^\circ$ $\gamma = 120^\circ$

ROMBOEDRIČNI – $a = b = c$ $\alpha = \beta = \gamma$

KUBIČNI – $a = b = c$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$

14. Bravais-ejeve mreže

So celotno število tipov kristalnih mrež, ki so možne iz šestih različnih kristalnih sistemov. Jih je 14 (6 sistemov (romboedrični in heksagonalni se štejeta za en sistem) in 4 možni tipi kristalnih mrež).

15. Tipi kristalnih mrež

P – primitivna

C – centrirana (samo osnovni ploskvi imata še po eno točko)

F – f-centrirana (face – ploskovno centrirana – vse ploskve imajo še na sredini eno točko)

I – telesno centrirana (na sredini telesa še eno točko)

16. Zakaj proteini ne kristalizirajo v prostorskih skupinah, ki imajo center inverzije?

Ker so proteini kiralne molekule ne morejo kristalizirati v prostorskih skupinah, ki bi imele center inverzije (spremenila bi se kiralnost molekule).

Dodatek:

Screw axes: 2_1 – rotacija 180° , translacija $\frac{1}{2}$.

Glide mirror plane: reflection in a plane + translation parallel to the glide plane

17. Enantiomorfne prostorske skupine

So skupine, ki opisujejo iste simetrijske operacije, le elementi so na različnih mestih. Jih je 65, kristalizirajo pa lahko samo v podskupinah.

18. Zakaj ne moremo gledati molekul z mikroskopom?

Mikroskop loči detajle, ki so reda velikosti uporabljene valovne dolžine (vidna svetloba 400 – 800nm). $1\text{nm} = 10\text{Å}$. Da bi videli molekule pod mikroskopom, potem bi potrebovali lečo ki bi bila zbrušena na polovico vezi natančno.

19. Primerna valovanja za difrakcijo na molekulah / kristalih.

X-ray – difrakcija

Neutroni – difrakcija

Elektroni – difrakcija, mikroskopija

20. Interakcija elektromagnetnega valovanja s snovjo

X – ray (fotoni) reagirajo z elektroni, še posebej z valenčnimi elektroni – koherentno sipanje

Neutroni – reagirajo z jedri in nesparjenimi elektroni (veliko vzorca in potreba po reaktorju)

Elektroni – reagirajo z električnim poljem jeder in elektronov, velika absorpcija v vzorcu, tanek vzorec.

Elektromagnetno valovanje interagira z materijo preko svojega električnega polja. Intenziteta je sorazmerna z $(z/m)^2$. Elektroni imajo to razmerje visoko (za razliko od jeder). Končni rezultat kristalografije ni slika, pač pa porazdelitev elektronov v molekuli (elektronska gostota).

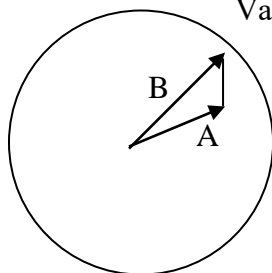
21. Zakaj kristal?

Sipanje X-žarkov na eni sami molekuli bi bilo prešibko, da bi ga lahko zaznali nad šumom. V kristalu so molekule orientirane v enaki smeri, tako da kristali delujejo kot ojačevalec. Sipani žarki se seštevajo.

Dodatek:

Valovi in faze – fazni zamik ne moremo izmerit, ker ne moremo zmerit časa na $1,5 \cdot 10^{-19}$ s natančno (polovica vala). Po dogovoru popravimo fazo tako da imajo valovi ki sipajo iz koordinatnega izhodišča fazo 0. Glede na ostale točke je valovanje fazno zamaknjeno (dvignjeno) glede na razliko v poziciji.

22. Vektorski opis valov:

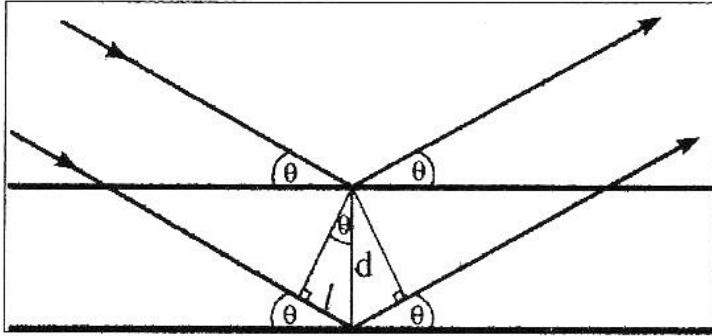


Valovanje opišemo z vektorjem. Amplituda je opisana z dolžino vektorja, faza pa z kotom med absciso in vektorjem. Če je startna točka nekaj drugega kot nič, potem ima faza dvig za φ . Če seštejemo valove, ki imajo enako valovno dolžino, ampak različno amplitudo in faze, potem dobimo valovanje ki ima enako valovno dolžino, samo faza in amplituda pa sta različni $A\cos(\alpha + \varphi_1) + B\cos(\alpha + \varphi_2)$.

23. Definicija faze pri difrakcijskem eksperimentu.

Če žarek sipa v središče koordinatnega sistema (izhodišče) ima fazo 0. Ostali pa imajo fazo zamaknjeno glede na razliko v položaju.

24. Braggov zakon



Žarek pade pod kotom φ in se pod tem kotom tudi odbije. Razlika v poti, ki jo opravita žarek 1 in 2 je $2d\sin\varphi = n\lambda$. (ali $2l$). Žarka se seštejeta, ko je razlika v poti $2l = n\lambda$. Objekti na Braggovi ravnini sipajo v fazi, tisti vmes pa iz faze. Fazna razlika je premo sorazmerna z oddaljenostjo od ravnine, pod katero se je žarek odbijal. Večji φ

manjši d .

25. Braggov zakon: difrakcija atomov na Braggovi ravnini in iz nje.

Če atomi ležijo na ravnini, sipajo v fazi tisti izven ravnine pa iz faze. Če delec leži pol na ravnini in pol iz nje, potem nima difrakcije.

26. Informacija, ki jo dobimo iz enega difrakcijskega eksperimenta

Dobimo informacijo, ki pove v kakšnem obsegu so objekti skoncentrirani na ujemajočih se Braggovih ravninah.

(informacijo ki pove povprečno pozicijo objektov v pravokotni smeri glede na ravnine in ne o njihovi poziciji v vzporedni smeri.)

27. Kdaj imamo difrakcijo na kristalu?

Difrakcijo imamo, ko delci sipajo v fazi. Da je tako, morajo Braggove ravnine sekati iste točke v osnovnih celicah kristala. Če je kot $\varphi = 0^\circ$, potem ni difrakcije. Če je kot 90° , potem je razlika v dolžini poti dvakrat večja kot je razdalja med ravninami ($2d = \lambda$).

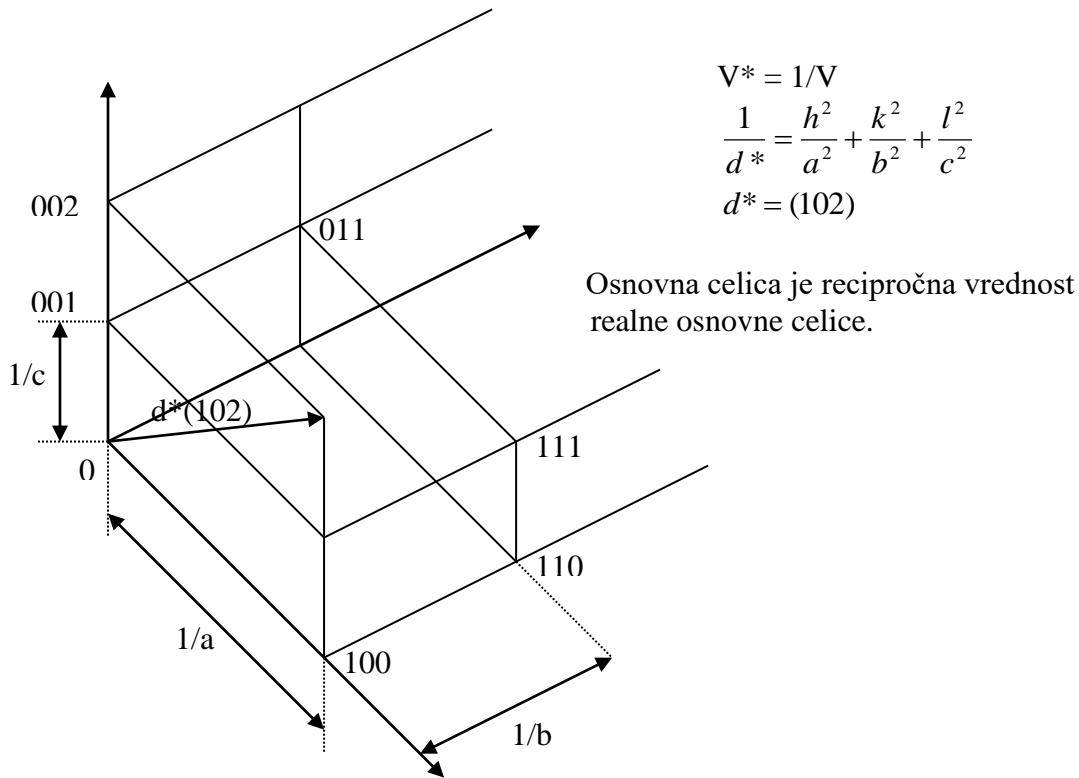
28. Definicija indeksov Braggovih ravnin.

Da bi videli difrakcijo na kristalu, morajo Braggove ravnine sekati vse tri robove osnovne celice celoštevilčnokrat. Kolikokrat sekajo robove, povedo indeksi h , k in l . To so Millerjevi indeksi.

29. Recipročni prostor: definicija osi v ortogonalni osnovni celici.

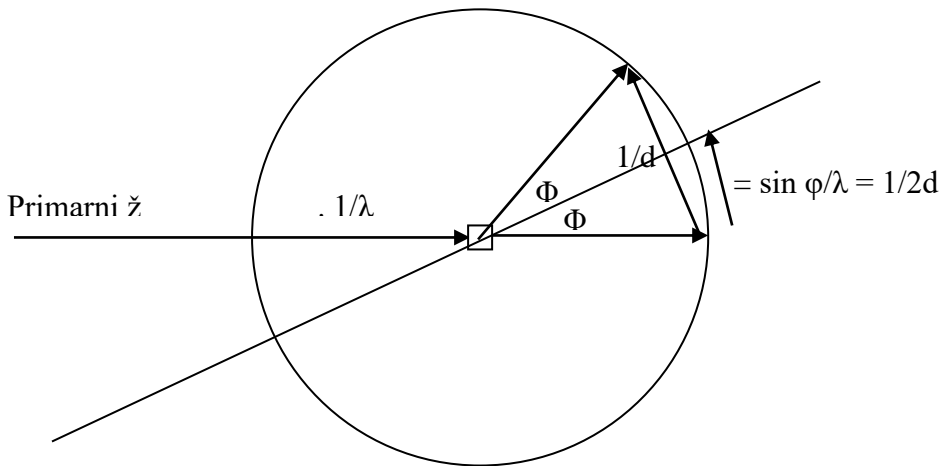
Večje indekse imajo Braggove ravnine, bolj gosto so posejane po osnovni celici (manjši d , večja ločljivost, večji φ ($3\ 0\ 0$ ravnina seka celico na $1/3$ glede na $1\ 0\ 0$ ravnino)). Družino Braggovih ravnin opišemo z vektorjem, ki je pravokoten najo in se imenuje NORMALA. Dolg je $1/d$ (opišemo smer in razdaljo med ravninami). Oddaljenost objekta od Braggove ravnine opišemo s skalarnim produktom med normalo in vektorjem pozicije. Če narišemo točke, kjer se taki vektorji končajo, dobimo recipročno mrežo.

Ortorombski sistem:



30. Ewaldova sfera

Je geometrijski pripomoček, ki pomaga prikazati katere Braggove ravnine so v pravilni orientaciji za difrakcijo.



Odbiti žarek gre lahko kamorkoli $0 < \varphi < 180$.

Samo ko točke recipročne mreže padejo na obod Ewaldove sfere – krogle je Braggov pogoj zadovoljen ($2d \sin\varphi = n\lambda$). Braggov pogoj zadovoljimo z vrtenjem vira žarka okoli kristal, ali z fiksacijo žarka in vrtenjem kristala.

31. Kot med primarnim in sekundarnim žarkom.

Je 2φ in je lahko $0 < \varphi < 180$ (ker se žarek odbije od veliko Braggovih ravnin).

32. Indeksi točk v recipročni mreži.

Večji kot so, bolj gosto so Braggove ravnine posejane po osnovni celici. Večja je ločljivost, manjši je d . Indeksi povejo, na koliko delov razdelimo osnovno celico oz njen rob. Indeksi morajo biti celoštevilčni. Izvorna točka(izhodišče koor.sys) recipročne mreže je tam, kjer direktni žarek zapušča Ewaldovo sfero.

33. Strukturni faktor (F(hkl)).

je definiran kot Fourierjeva transformacija ene osnovne celice. Intenziteta sipanega žarka je sorazmerna z kvadratom strukturnega faktorja sorazmerna z amplitudo.

34. Dokaži Friedlov zakon $I(hkl)=I(-h-k-l)$

$$I(hkl) = I(-h-k-l)$$

$$|F(hkl)| = |F(-h-k-l)|$$

$$|F(hkl)| = |A^2 + B^2|^{1/2}$$

$$A(hkl) = \sum f_i \cos[2\pi(hx_i + ky_i + lz_i)]$$

$$A(-h-k-l) = \sum f_i \cos[2\pi(-hx_i - ky_i - lz_i)]$$

$$\cos(x) = \cos(-x)$$

$$A(hkl) = A(-h-k-l)$$

$$B(hkl) = \sum f_i \sin[2\pi(hx_i + ky_i + lz_i)]$$

$$B(-h-k-l) = \sum f_i \sin[2\pi(-hx_i - ky_i - lz_i)]$$

$$\sin(x) = -\sin(-x)$$

$$B(hkl) = -B(-h-k-l)$$

$$|F(hkl)| = \sqrt{A^2 + B^2} = |F(-h-k-l)|$$

centrosimetrični refleksi ki se odbijajo od ravnine hkl ali $-h-k-l$ so enaki po intenziteti, razen pri anomalnem sipanju.

35. Dokaz da so faze centrosimetričnih refleksov 0 ali Π .

$x, y, z \xrightarrow{c_i} -x, -y, -z$ vsak atom, ki je x,y,z center inverzije preslika v $-x, -y, -z$

$$F(hkl) = A + iB$$

$$A(hkl) = \sum f_i \cos[2\pi(hx_i + ky_i + lz_i)] + \sum f_i \cos[2\pi(-hx_i - ky_i - lz_i)]$$

$$\cos(x) = \cos(-x)$$

$$B(hkl) = \sum f_i \sin[2\pi(hx_i + ky_i + lz_i)] + \sum f_i \sin[2\pi(-hx_i - ky_i - lz_i)]$$

$$\sin(x) = -\sin(-x)$$

$$B = 0$$

$$\text{tg } \alpha = B/A = 0; \alpha = 0, \pi$$

36. Algebrajski opis valov

Valovanje opišemo z dvema enačbama:

$$X1 = c1 \cos(\varphi + \alpha1)$$

$$X2 = c2 \cos(\varphi + \alpha2)$$

$C1, c2$ Amplitude

φ ... frekvenca (ωt), monokromatski žarek, tako da je enaka

$\alpha1, \alpha2$... fazi glede na izhodišče

Vsak sipan žarek je vsota prispevkov žarkov, ki se sipajo na posameznem atomu.

Algebrajski način seštevanja valov:

$$x_r = x_1 + x_2 =$$

$$= c_1 \cos(\varphi + \alpha_1) + c_2 \cos(\varphi + \alpha_2) =$$

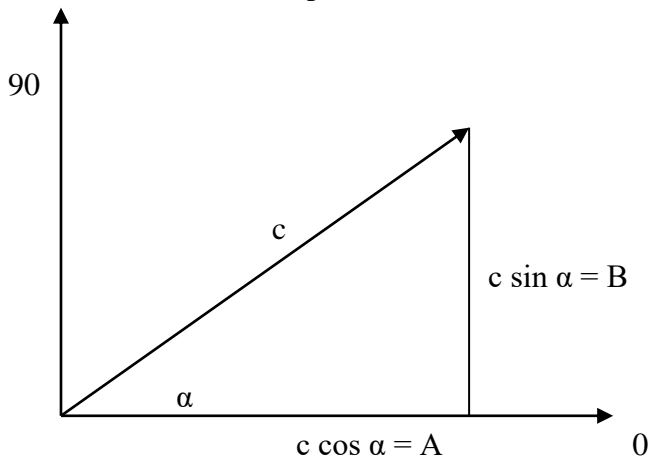
$$= c_1 \cos \varphi \cos \alpha_1 - c_1 \sin \varphi \sin \alpha_1 + c_2 \cos \varphi \cos \alpha_2 - c_2 \sin \varphi \sin \alpha_2 =$$

$$=(c_1 \cos \alpha_1 + c_2 \cos \alpha_2) \cos \varphi - (c_1 \sin \alpha_1 + c_2 \sin \alpha_2) \sin \varphi$$

V splošnem pa:

$$x_r = \left(\sum c_i \cos \alpha_i \right) \cdot \cos \varphi - \left(\sum c_i \cdot \sin \alpha_i \right) \sin \varphi$$

37. Vektorski opis valov.

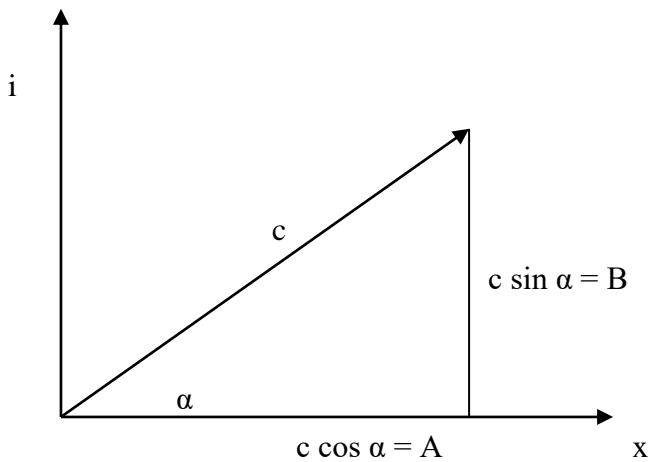


$$\operatorname{arctg} \alpha = \frac{\sin \alpha}{\cos \alpha} = \text{faza } F$$

α ... fazni kot, ne moremo ga merit

c ... dolžina vektorja c je amplituda žarka – lahko merimo.

V kompleksni ravnini



$$x_r = \left(\sum c_i \cos \alpha_i \right) \cdot \cos \varphi - \left(\sum c_i \cdot \sin \alpha_i \right) \sin \varphi$$

$$C_r = A + Bi$$

$$A = C_r \cos \alpha_r$$

$$B = C_r \sin \alpha_r$$

Amplituda je sorazmerna intenziteti sipanega žarka.

$$|C| = \sqrt{A^2 + B^2}$$

$$[(A + Bi)(A - Bi)]^{1/2}$$

38. Eksponentni opis valov

$$\exp(i \alpha) = \cos \alpha + i \sin \alpha$$

$$A + iB = C_r \cos \alpha_r + i C_r \sin \alpha_r = C_r \exp(i \alpha)$$

C_r ... amplituda sipanega žarka

α_r ... faza sipanega žarka

39. Amplituda vektorja

je sorazmerna intenziteti in je enaka dolžini vektorja c .

$$|c| = \sqrt{[(A + iB)(A - iB)]} = \sqrt{[(A^2 - iAB + iAB - i^2 B^2)]}$$

$$I \alpha |c| = \sqrt{A^2 + B^2}$$

40. Sipni vektor – Vektor recipročne mreže

Družino Braggovih ravnin opišemo z vektorjem ki je pravokoten nanjo in se imenuje normala. Dolg je $1/d$.

41. Strukturni faktor za en elektron

Strukturni faktor predstavlja valovanje, ki je rezultat difrakcije. Difrakcija iz enega samega elektrona ima definirano amplitudo $1e$.

$$F(s) = 1e \cdot \exp(2\pi i s \cdot r)$$

42. Strukturni faktor v celici izražen z elektronsko gostoto.

Sipanje si predstavljamo kot vsoto prispevkov posameznih e^- , ker je atom sestavljen iz več e^- :

$$F(s) = \sum_j \exp(2\pi i s \cdot r_j)$$

Lahko pa namesto seštevanja po posameznem e^- vzamemo funkcijo, ki opisuje porazdelitev elektronske gostote v prostoru in dodamo eksponent, ki vsebuje informacijo o fazi:

$$F(s) = \int_{\text{prostor}} \rho(r) \cdot \exp(2\pi i s \cdot r)$$

Operacija, ki transformira elektronsko gostoto v strukturni faktor se imenuje Fourierjeva transformacija. (strukturni faktor je fourierjeva transformacija ene osnovne celice)

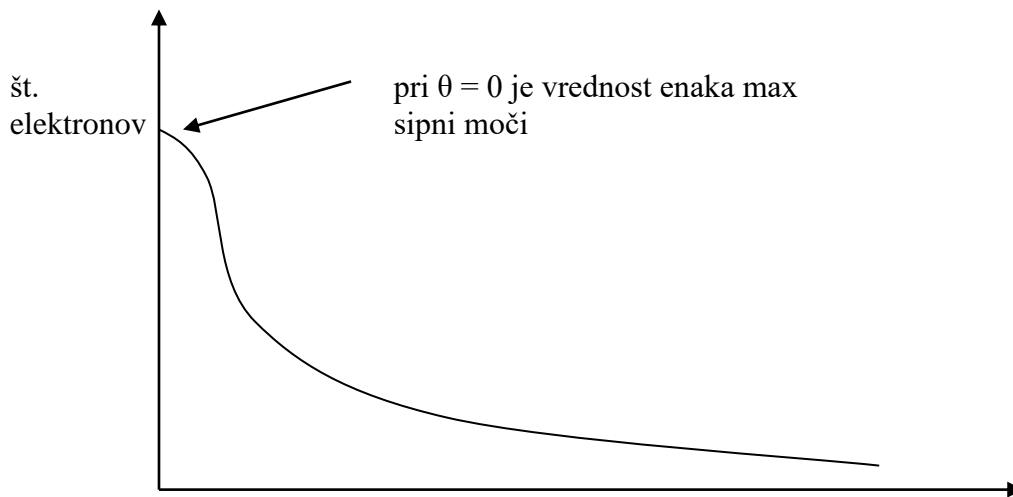
43. Strukturni faktor izražen z atomskim sipnim faktorjem.

$$F(h) = \sum_{i=1} f_i \exp(2\pi i s \cdot r)$$

Za nas je pomembna lega atomov ne pa lega elektronov ali porazdelitev elektronske gostote. Skušamo opisati vsoto prispevkov elektronov oz porazdelitev okoli enega atoma. Atomski sipni faktorji so tabelirani.

Atomski sipni faktor določa koliko sipa posamezen atom. Proporcionalen je številu elektronov, ki jih ima atom in obratno sorazmeren kotu φ , pod katerim se žarek sipa.

44. Atomski sipni faktor: odvisnost od $\sin \theta/\lambda$



Žarki ki se sipajo na različnih točkah okrog atoma, med seboj interagirajo. Pri majhnih kotih sipanja (veliki d) sipajo elektroni atoma v fazi in celotni sipni prispevek je približno enak številu elektronov:

$2\theta = 0$ vsi elektroni sipajo v fazi.

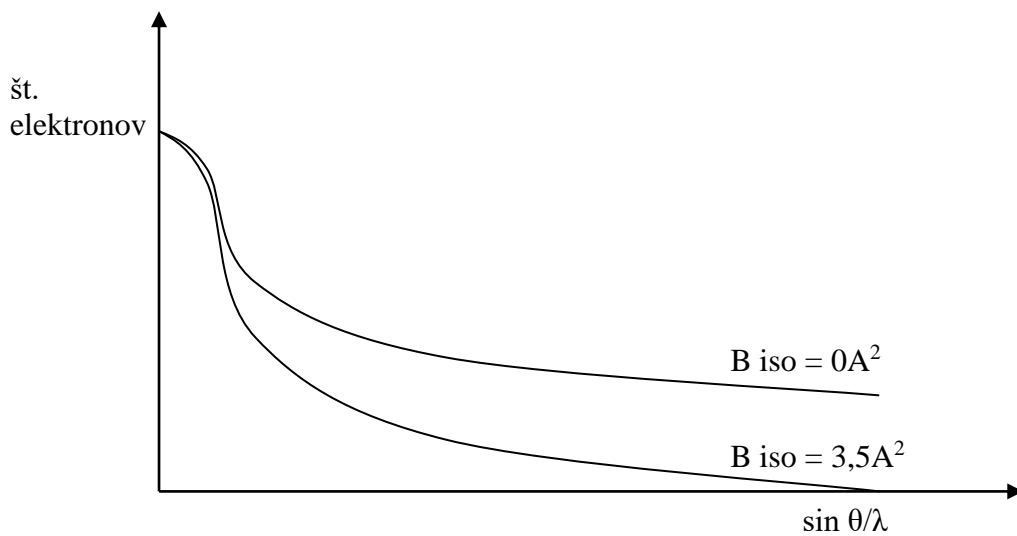
Pri velikih kotih sipanja začnejo različni deli razporejene elektronske gostote delno sipati izven faze → celotni sipni prispevek se zmanjša s povečanjem ločljivosti. $2\theta > 0 \rightarrow f$ -ja je manjša (manj elektronov sipa v fazi).

45. Atomski sipni faktor: odvisnost od termičnega nihanja atomov.

Ker vsi atomi vibrirajo, je njihov efektivni volumen večji. Zato moramo pri opisu atomskih sipnih faktorjev upoštevati tudi termično gibanje atomov. Uvedemo faktor B, ki opisuje termično gibanje atomov. Predstavljamo si, da atom vibrira v vseh smereh enakomerno (izotropni termični faktor = B iso), vendar v resnici temu ni tako (anizotropni termični faktor ($B_{iso} = 8\pi^2 u^2$))

U...povprečna amplituda odmuka od ekv. lege.

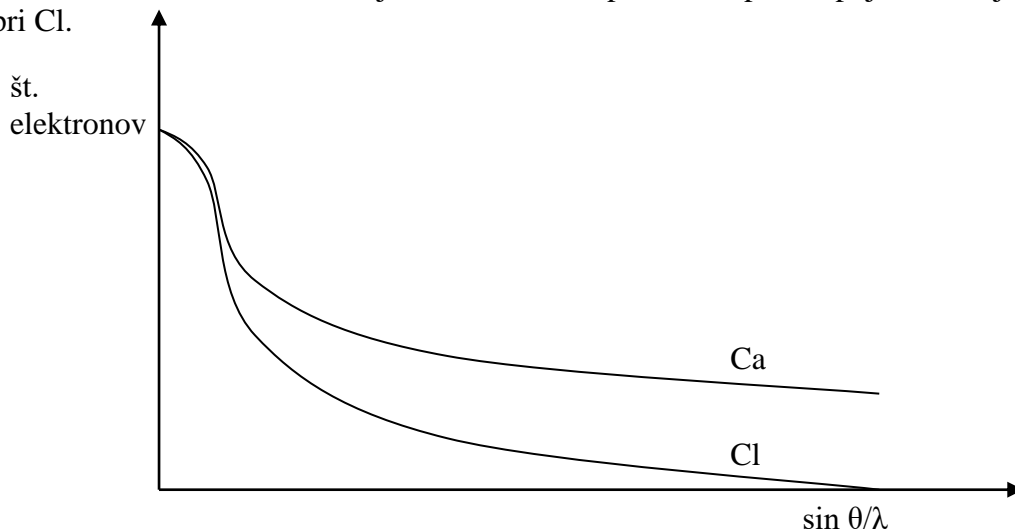
Informacija o anizotropnem gibanju atomov dobimo le pri zelo veliki ločljivosti (majhen d – okrog 1 Å). Pri večjem termičnem gibanju je efektivni volumen večji in sipna moč intenzivneje pojema.



46. Atomski sipni faktor: odvisnost od okupance (zasedenosti) atoma (Ca/Cl)

Če so elektroni skoncentrirani tesneje okoli jedra, bo faktor padal hitreje.

Primer: Ca in Cl imata enako število elektronov. Pri Ca so elektroni v manjšem volumnu kot pri Cl. Ker so pri Ca elektroni v manjšem prostoru, žarki, ki na njih sipajo nimajo nikoli velike fазne razlike med seboj. Zato atomski sipni faktor pri Ca pojema manj intenzivno kot pri Cl.



47. Elektronska gostota – izraz:

Elektronska gostota je fourierjeva transformacija strukturnega faktorja, velja pa tudi obratno. V splošnem bi se F. transformacija izražala z integrali, vendar ker imamo kristal (simetričen), lahko integral zamenjamo z vsoto po vseh celicah, ki ga sestavljajo. Signali se ojačijo samo v smereh, ki ustrezajo odboju od Braggovih ravnin in so določeni z Millerjevimi indeksi. Če poznamo porazdelitev elektronske gostote in informacijo o fazi, lahko izračunamo strukturni faktor za vsak izbran millerjev indeks:

$$F = |F| \exp(\alpha) = A + iB$$

$$A = \sum f_i \cos \alpha_i$$

$$B = \sum f_i \sin \alpha_i$$

$$F(h) = \int_{\text{poosnovnidelic}} \rho(x) \exp(2\pi i h x) dv$$

$$\alpha = hx$$

Če poznamo strukturne faktorje, lahko izračunamo porazdelitev elektronske gostote. Če poznamo elektronsko gostoto, pa vemo kje so atomi.

Vsi izrazi elektronske gostote so normalizirani na volumen osnovne celice. Elektronsko gostoto definiramo kot funkcijo, ki je lahko samo pozitivna ali pa enako 0. Elektronska gostota je realna funkcija:

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V_c} \sum \sum \sum (A + iB) \cdot \exp[-2\pi i(hx + ky + lz)]$$

Pri eksperimentu merimo le amplitude, faz pa ne. Faze izračunamo iz leg koordinat atomov. Za določitev elektronske gostote je pomembno da imamo dobro pridobljene faze kot pa dobro izmerjene amplitude.

48. Tipi koeficientov za izračun elektronskih gostot: diferenca,...

Diferenčna elektronska gostota: če poznamo koordinate atomov, lahko izračunamo strukturne faktorje. Ker ni popoln model bo razlika med opaženim in izračunanim faktorjem vodilo, kako dobiti čim manjšo razliko $\Delta\rho(x, y, z) \rightarrow$ da nam informacijo o napakah v modelu in je merilo za izboljšanje modela

$$\rho_{\Delta f(x, y, z)} = \frac{1}{V_c} \sum \sum \sum [|F_{obs}| - |F_{calc}|] \exp[-2\pi i(hx + ky + lz)]$$

ko je manjše od nič pomeni da imamo atome v modelu tam kjer jih v resnici ni

ko je enako nič, je tam model pravilen

ko je večje od nič, tam atomi v modelu manjkajo

49. R-faktor – definicija

R faktor uporabljamo za ugotavljanje pravilnosti modela, ki ga zgradimo. R faktor nam pove relativno napako med izmerjeno in izračunano amplitudo

$$R = \frac{\sum |F_{obs} - F_{calc}|}{\sum |F_{obs}|} \quad \text{idealno je } 0,0$$

Amplitude strukturnih faktorjev ($|F|$) lahko izmerimo, ker so premosorazmerne intenziteti sipanega žarka oz jih izračunamo: $|F| = \sqrt{A^2 + B^2}$

R=0,83 za naključno razporejene atome v centrosimetrični prostorski skupini

R=0,59 za naključno porazdeljene atome v acentrični prostorski skupini

R=0,15-0,25 za proteine (slabi sipniki, šibki signali, manjša natančnost).

50. Pattersonova funkcija – matematična definicija

Predpostavke:

- elektronske gostote ne moremo izmeriti, ker nimamo faz
- vsi koeficienti bodo enaki amplitudi na kvadrat
- faze so enake 0

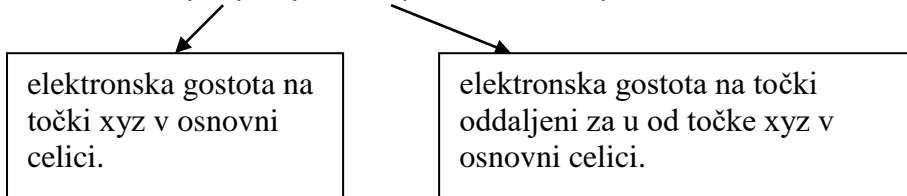
$$P(u, v, w) = \frac{1}{V_c} \sum \sum \sum |F(hkl)|^2 \exp[-2\pi i(hu + kv + lw)]$$

$$P(u, v, w) = \frac{1}{V_c} \sum \sum \sum |F(hkl)|^2 \cos[2\pi i(hu + kv + lw)]$$

(u,v,w so točke, ki so za u oddaljene od x, y, z)

Pattersonova f-ja je konvolucija elektronske gostote:

$$P(u, v, w) = \rho(xyz) \cdot \rho(x+u, y+v, z+w) dx dy dz$$



Tam kjer so atomi, bo imela konvolucija visoko vrednost. Tam kjer jih ni pa 0 ali nizko vrednost.

51. Pattersonova funkcija: opis z besedami

Poleg zgornjih besed: Pattersonova funkcija pomaga pri določevanju lege atomov (odd max od izhodišča je enaka dolžini interatomskega radija. Vsak maksimum je na legi, ki odgovarja razdalji med točkama, intenziteta pa ustreza številu elektronov na atomih. težki atomi imajo zelo velik prispevek k Pattersonovi funkciji.

52. Pattersonova funkcija: število maksimumov in centrosimetričnost

- Pattersonova funkcija ima značilnost, da ima maksimum v izhodišču zelo velik. Vsak maksimum je na legi, ki odgovarja razdalji med točkama.
- Pattersonova funkcija vsebuje N²-N maksimumov poleg maksimuma v izhodišču. Oddaljenost max od izhodišča je enaka dolžini interatomskega vektorja. Intenziteta maksimuma je sorazmerna produktu atomskih števil obeh atomov.
- Pattersonova funkcija je centrosimetrična, ker je vrednost AB enaka BA. Možnih je samo 24 prostorskih skupin, ker izgubimo informacijo pri prehodu od F(hkl) do |F(hkl)| brez uporabe faz.

53. Pattersonova funkcija – izračun koordinat maksimumov v pattersonovi funkciji iz koordinat atomov in obratno.

npr: P2₁ (dvoštevna simetrijska os + translacija za 1/2y)

x,y,z ----- > -x, y+0,5, -z

lega max v P.f-iji:

$$u = x - (-x) = 2x$$

$$v = y - (y + 0,5) = -0,5$$

$$w = z - (-z) = 2z$$

Dobimo max. To so: u=0,25, v=0,5, w=0,44

Iz njih izračunamo koordinate atoma:

$$x = u/2 = 0,125$$
$$y = \text{kjerkoli}$$
$$z = w/2 = 0,22$$

Najpogostejša prostorska skupina za makromolekule je $P2_1/n$ (zrcalno drsna ravnina s translacijo $a/2$ in $b/2$).

- 1: x, y, z
- 2: $-x, -y, -z$
- 3: $\frac{1}{2} + x, \frac{1}{2} - y, \frac{1}{2} + z$
- 4: $\frac{1}{2} - x, \frac{1}{2} + y, \frac{1}{2} - z$

max pričakujemo na legah:

- 1-2: $2x, 2y, 2z$
- 1-3 $\frac{1}{2}, \frac{1}{2} + y, \frac{1}{2} \rightarrow$ Harlerjeva sekcija
- 1-4 $\frac{1}{2} + 2x, \frac{1}{2}, \frac{1}{2} + 2z \rightarrow$ Harlerjeva ravnina

lega težkega atoma:

$$\frac{1}{2} + 2x = 0,72 \rightarrow x = 0,11$$
$$\frac{1}{2} + 2y = 0,66 \rightarrow y = 0,08$$
$$\frac{1}{2} + 2z = 0,58 \rightarrow z = 0,04$$

$$\text{max 1-3 } 0,5, 0,66, 0,5$$

$$\text{max 1-4 } 0,72, 0,5, 0,58$$

Končno lego preverimo z max ki leži na $2x, 2y, 2z$

54. Pattersonova funkcija: Harkerjeve sekcije, linije

To so območja, kjer se najpogosteje nahajajo maksimumi Pattersonove funkcije.

55. MIR – opis z besedami

MIR (multiple isomorphous replacement) je zelo pogosta ab initio metoda za določevanje faz makromolekul v kristalografiji. Osnovni princip: vezava težkega atoma (Hg, Pt, U, Pb, ...) na makromolekulo, tako da se struktura makromolekule ne spremeni. Tako dobimo razliko med nativno in težko obliko, ki je samo v prisotnosti enega ali več težkih atomov.

56. MIR – pogoji za uspešnost

- Ko vezemo težak atom na molekulo, mora biti vezava takšna, da se struktura makromolekule ne spremeni
- Za pravilno določitev faze potrebujemo vsaj dva derivata (proteini so kiralne molekule)
- Idealni izomorfni derivat (edina razlika med nativno in derivatizirano obliko je prisotnost enega ali več težkih atomov).

57. MIR – zakaj uporaba težkih atomov

prisotnost težkega atoma vpelje v difrakcijski vzorec razlike glede na nativni kristal (razlike so v intenziteti sipanega žarka).

58. MIR kateri težki atomi?

Pt, Au, Hg, Pb, Th, U, Re, Os, Ir, Xe

Pd, Ag za majhne proteine, I za jodiranje tirozinov, Lantanoidi zamenjajo Mg ali Ca.

59. MIR – zakaj je potreben več kot en derivat – matematično:
 $F_{ph}^2 = F_p^2 + F_h^2 + 2F_pF_h \cos(\alpha_p - \alpha_h)$ F amplitude, α – faze

F_{ph} ... strukturni faktor derivatiziranega proteina

F_p ... prispevek nativnega proteina

te dve izmerimo

F_h ... prispevek težkega atoma – to amplitudo lahko izračunamo če poznamo lego težkega atoma (izračunamo lahko tudi fazo α_h)

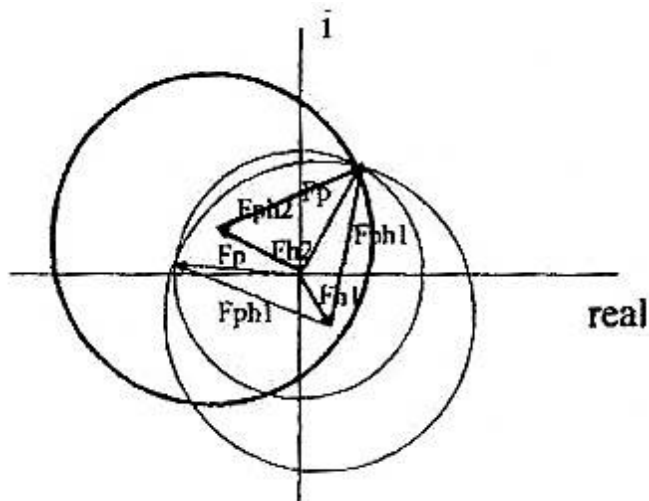
Rabimo fazo α_p

$$\alpha_p = \alpha_h + \arccos [(F_{ph}^2 - F_p^2 - F_h^2)/2F_pF_h]$$

imamo dve rešitve. Pravilna je samo ena, ker je protein kiralna molekula. Z enim derivatom ne moremo enolično določiti faz

$\alpha_p = \alpha_h + \alpha'$ → ne moremo enolično določiti faz.

60. MIR – zakaj je potreben več kot en derivat – grafično:



Prava faza je tam, kjer se vse tri krožnice sekajo.

Pripravimo še en derivat, s tem da uporabimo drugačen težek atom, ki se po možnosti veže drugam kot prvi težki atom.

Predstavljajmo si, da smo izmerili amplitudo F_p . Ne vemo kota α_p , zato je lahko konec vektorja F_p kjerkoli na krožnici. F_h lahko določimo. Pri F_{ph} poznamo le amplitudo zato je lahko kjerkoli na krožnici. F_{ph} je rezultanta F_p in F_h tam, kjer se sekata F_p in F_{ph} . Z

enim samim derivatom ne moremo enolično določiti faz.

61. MIR – Kako lahko določimo lego težkih atomov?

Do koordinat težkih atomov pridemo s pomočjo Pattersonove mape. P mapo izračunamo iz kvadrata amplitud. Pattersonove mape so polne maksimumov. V diferenčni pattersonovi mapi namesto koeficientov F^2 uporabimo koeficiente $(|F_p| - |F_{ph}|)^2$ (razlika je le med vektorji težkih atomov). → ZATO → Maksimumi v diferenčni pattersonovi mapi odgovarjajo le medatomskim vektorjem med težkimi atomi.

62. Parametri kvalitete faz (MIR statistika)

- figure of merit (m) povprečna vrednost \cos napake v faznem kotu ($m=1$ → napaka v faznem kotu je 0.0)
- Cullis R-faktor (R_c) indeks zanesljivosti, izračunan samo s centričnimi ukloni (idealno 0 → 0,3 – 0,65)

$$R_c = \frac{\sum |R_{ph} \pm R_p| - F_h}{\sum |F_{ph} - F_p|}$$

- Lack of closure – napaka pri zaključitvi faznega trikotnika
 $E^2 = [F_{ph\ obs} - F_{ph\ calc}]^2 / N$ $N \dots$ število uklonov
- Fazna moč – koliko faze da posemezen derivat (>1)
 $\frac{rms(Fh)}{rms(E)}$ $Fh \dots$ amplituda $E \dots$ lack of closure

63. MAD – kdaj nastopi pojav anomalnega sipanja

Če je valovna dolžina blizu ene od naravnih frekvenc oscilacije elektrona, se val spremeni. Pojavijo se resonančne vibracije in to imenujemo anomalno sipanje.

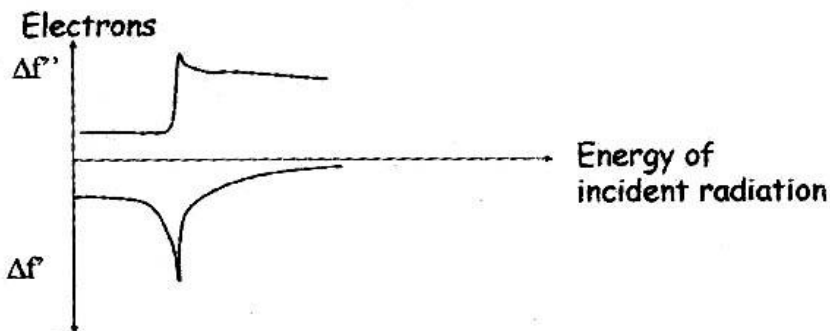
64. Atomski sipni faktor pod pogoji anomalnega sipanja

Elektroni pridejo v resonančne vibracije in rentgenski žarki, ki se sipajo na teh elektronih nimajo več realnega atomskega sipnega faktorja, ampak je seštevek iz dveh komponent:

$\Delta f'$... disperzijska komponenta

$i\Delta f''$... Bijovetova komponenta

65. Odvisnost $\Delta f'$ in $i\Delta f''$ od energije vpadnega valovanja



$$f_{anom} = f_0 + \Delta f' + i\Delta f'' = f' + i\Delta f''$$

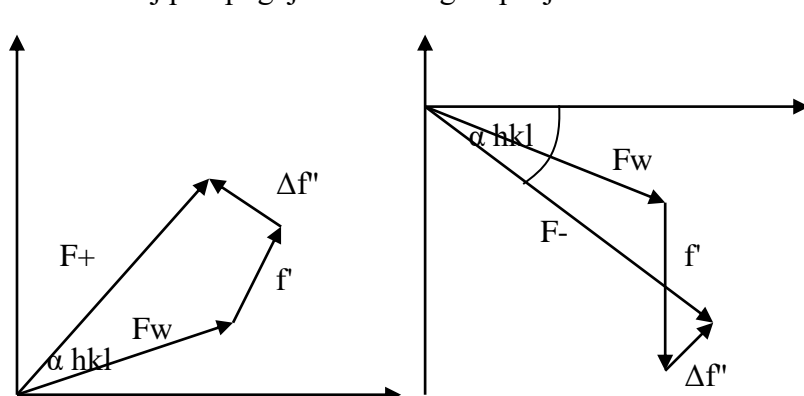
$f_0 \dots$ normalna realna vrednost

f_0 je neodvisen od energije vpadne valovne dolžine. $\Delta f'$ in $i\Delta f''$ pa sta odvisna od energije vpadne valovne dolžine. Zato imamo samo v določenih režimih anomalno sipanje. Tako $\Delta f'$ kot $i\Delta f''$ imata zelo ozko energetska območje, kjer se njuni vrednosti močno spremenita. To območje se imenuje ABSORPCIJSKI ROB. Kjer je maksimum $i\Delta f''$, tam je minimum $\Delta f'$.

66. Zakaj pod pogoji anomalnega sipanja ne drži več Friedlov zakon – z besedami

F_+ in F_- bi bila enaka v magnitudi, če nebi imela prispevka $\Delta f''$. Kljub temu, da je velikost $\Delta f'$ za Friedlov par enaka, je faza $\Delta f''$ vedno za $\pi/2$ pred ostalimi difrakcijskimi vektroji. Zato ne velja več Friedlov zakon.

67. Zakaj pod pogoji anomalnega sipanja ne drži več Friedlov zakon – grafično



Spremeni se tako faza kot amplituda obeh centrosimetričnih faktorjev, zato ne velja več Friedlov zakon.

68. Bijovet-ov signal

Bijovetov signal lahko dobimo iz merjenja razlik v intenziteti Friedlovih parov, zbranih pri ustrezno izbrani valovni dolžini. Izračunamo lahko iz razlik med F^+ in F^- .

69. Disperzijski signal

Če primerjamo identične uklone pri 2 različnih primernih valovnih dolžinah, bodo amplitude različne. Delamo meritve intenzite pri identičnem ukloni in pri različnih valovnih dolžinah. Razlike med meritvami nam dajo disperzijski signal.

70. MAD: izbor valovnih dolžin vpadnega valovanja za difrakcijski eksperiment

Valovno dolžino izberemo na treh točkah:

- λ kjer je največji Bijovetov signal \rightarrow kjer je $\Delta f''$ največji
- λ na prevoju f'
- λ daleč stran od absorpcijskega roba

71. MAD: izračun faz po pristopu »poseben primer MIR-a«

Smiselno moramo izbrati λ pri katerih bomo merili difrakcijske podatke (λ pri max biojovetovem signalu, λ pri prevoju f' in λ daleč stran od absorpcijskega roba). Za vsako valovno dolžino lahko pridelamo disperzijski signal, ki izvira iz razlike med $\Delta f'$ pri prvi in drugi λ . Če primerjamo difrakcijske podatke, ki so posneti pri PK dobimo bijovetove razlike med $F(hkl)$ in $F(-h-k-l)$.

72. MAD: izbor anomalnih sipnikov – teoretične možnosti in praktične omejitve

Razlike med intenzitetami pri različnih pogojih morajo biti pri sipnikih velike. Lahki atomi imajo majhne razlike.

73. MAD: pogosto uporabljeni anomalni sipniki

Večinoma so to kovine – kristale namakamo v raztopini, ki vsebuje težak atom: Br, I, Xe, Kr ali jih derivatiziramo s Se-Met

74. MAD: označevanje proteinskega vzorca Se-Met

Pridelamo protein, pri katerem je namesto žveplovega Met v gojišču prisoten selenov Met. Na razpolago moramo imeti bakterijski ekspresijski sistem (avksotrofni sevi E.coli)

75. MAD: feasibility of experiment: vpliv števila in vrste anomalnih sipnikov glede na velikost proteina

Več kot imamo anomalnih sipnikov in čim večji je $\Delta f''$, večji je Bijvoetov signal.

$$\text{To opišemo z: } \frac{|\Delta F \pm h|}{|Fh|} = \sqrt{\frac{1}{2}} \cdot \sqrt{\frac{Na}{Np}} \cdot 2 \frac{f''}{Z_{eff}}$$

Z_{eff} ... povprečno število elektronov v proteinu

f'' anomalni prispevek

$\frac{|\Delta F \pm h|}{|Fh|}$... pričakovani Bijvoetov signal

Np ... število atomov proteina

76. MAD: eksperimentalne zahteve

- ubran vir rentgenskih žarkov
- ustrezna energijska resolucija $<10^{-4}$

- majhne razlike v intenzitetah sipanih žarkov (pozorno je potrebno meriti in zastaviti difrakcijski eksperiment)
- potrebno je izmeriti f' in $\Delta f'$ za vsak posamezen atom, za katerega želimo delati eksperiment anomalnega sipanja
- posneti moramo vse difrakcijske podatke, ki so znotraj limitne sfere
- posneti moramo vsak refleks večkrat → podatki morajo biti redundantni

77. Molekularna zamenjava: kdaj se uporablja – primeri

- enaka ali podobna molekula v drugačni kristalni obliki
- kokristalizacija znanega proteina s kofaktorjem, I in drugim proteinom
- strukture mutantov
- kompleksi z ligandi
- makromolekularni kompleksi
- znana delna struktura proteina sestavljena iz več domen

78. MR: Omejitve

- razlike med ligandi atomov modela in kristalne strukture $< 1\text{Å}$
- če je aminokislinska identiteta $< 40\%$ je lahko zvitje enako, relativna orientacija sekundarnih strukturnih elementov in domen pa različna

79. MR: pristop

Primerjava dveh objektov: modela in tarče/naše kristalne strukture

Če želimo en objekt postaviti na drugega, je treba ta objekt zavrteti in prestaviti → za to potrebujemo 6 parametrov (3 rotacije in 3 translacije). Vseh 6 parametrov ne določamo naenkrat, ampak sprva le rotacije, nato pa še translacije. Iz osnovne celice si izračunamo Pattersonovo mapo. Vsaka od teh točk odgovarja enemu atomu med dvema atomoma. Pattersonova mapa je značilna za določeno proteinsko strukturo.

80. MR: intramolekularni vektorji

To so vektorji med atomi znotraj ene same molekule. Izhajajo iz izhodišča osnovne celice. Struktura in orientacija tega seta vektorjev je odvisna od strukture in orientacije molekule. Vektorji ležijo znotraj največje intramolekulske razdalje $r(\max)$.

81. MR: Intermolekularni vektorji

Vektorji med atomoma, ki pripadata vsak drugi molekuli in od načina, kako so molekule razporejene v osnovni celici. V povprečju so daljši od $r(\max)$. Uporabni so za določevanje translacije, ko je rotacija že znana.

82. MR določitev orientacije:

Imamo dve Pattersonovi funkciji:

- iz modela
- iz difrakcijskih podatkov

V vsaki od njiju izločimo set intramolekulskih vektorjev in pogledamo korelacijo med setom intramolekularnih vektorjev, ki odgovarja modelu. Preko te korelacije lahko določimo orientacijo. Ko vrtimo molekulo se skupaj z njo vrtijo tudi intramolekularni vektorji.

83. MR: Rotacijska funkcija

Molekulo zavrtimo in s tem se zavrtijo tudi vsi intramolekularni vektorji, ki ji pripadajo. Vrtimo toliko časa, dokler se ta motiv ne pokrije z opaženim motivom, ki usreza naši strukturi.

84. MR definicija orientacije

Definiramo rotacijsko funkcijo z rotacijsko matriko, ki je definirana s 3 koti, vrtimo model. Ko se funkciji kristala in modela pokrivata, ima ta rotacijska funkcija veliko vrednost če se ne pokrivata, pa je vrednost majhna:

$$Rot(o) = \int_U Px(r) \cdot Pm(Or) \cdot dV$$

Rot(O) ... rotacijska matrika ja ta (o)

Px(r) ... Pattersonova funkcija kristala

Pm(or) ... Pattersonova funkcija modela

Rotacijska os se začne vzporedno z z se zavrti okoli y za PSI langitude (dolžine) potem se zavrti okoli z za φ latitude(višine) potem se objekt zavrti še okoli rotacijske osi za kot KAPA

Euler: koordinatni sistem se zavrti za kot α okoli z osi, nato za kot β okoli nove y osi in za kot γ okoli z osi.

85. MR: izračun rotacijske funkcije (Patterson, FFT, algebrski pristop).

Sprva so računali s primerjavo porazdelitve intramolekulskih vektorjev v Pattersonovi mapi. To je zelo počasno, zato je Tony Croether razvil hitro rotacijsko funkcijo in v račun uvedel Fourierjevo transformacijo. Navaza je opazil, da ti načini niso dovolj natančni in numerično instabilni, zato je izboljšal numerično analizo s pomočjo programa AMORE.

86. MR – translacijska funkcija

Klasične translacijske funkcije primerjajo sete intramolekularnih vektorjev, ki so odvisni od strukture in lege molekul v osnovni celici s Pattersonom. Porazdelitev intermolekularnih vektorjev je odvisna od simetrije osnovne celice. Samo v prostorski skupini P1 ni simetrije in lahko molekulo postavimo kamorkoli.

87. MR translacija – vpliv simerije

Pattersonova mapa je avtokorelacijska funkcija:

- je korelacija elektronske gostote same s seboj
- konvolucije elektronske gostote

Set intramolekulskih vektorjev je korelacijska funkcija elektronske gostote ene molekule z drugo molekulo. Zato je odvisna od simetrije (porazdelitev molekule v prostoru). Ko dosežemo pravo lego, sta molekuli na prvem mestu in povezani s simetrijskim elementom.

88. MR translacija – določitev globalnega maksimuma

Za določitev prave vrednosti za translacijsko funkcijo je potrebno najti metode za to, kako izločiti pravo funkcijo. Pomagamo si z:

- Pattersonovo funkcijo (vrednostjo translacijske funkcije, če vanjo vnesemo set intramolekularnih vektorjev
- izračunamo korelacijske koeficiente med F_0 in F_c
- pogledamo R faktor med izračunanimi in opaženimi strukturnimi faktorji

89. MR – uspešnost metode

Odkvisna je od:

- kvalitete in popolnosti difrakcijskih podatkov
- homologije med modelom in tarčo (atomi ne smejo biti oddaljeni za več kot 1 Å)
- velikost modela (Mr) glede na tarčo
- skriterijev, ki jih uporabljamo za izločitev prave rešitve

90. MR – postopek

- Izbor modela – ak prileganje
- določitev orientacije – rotacijska matrika R
- določitev translacije – translacijski vektor T
- naša struktura – iz koordinat naše strukture nato izračunamo strukturne faktorje in nato elektronsko gostoto.

91. Piljenje atomskega modela: minimizirano, zakaj minimiziramo in kako?

Piljenje strukture je pomembna minimalizacija razlik med vsoto kvadratov izmerjenih in izračunanih strukturnih faktorjev.

$$E = \sum_h w_h (|F_{obs_h}| - |F_{calc_h}|)^2$$

92. Minimizacija je dosežena s pomočjo interaktivnih grafik (programi kot so O, Coot and Quanta,..), v kombinaciji z avtomatičnim izboljšanjem modela (programi kot so REFMAC, CNS,..) Avtomatično piljenje modela ne more popraviti velikih napak niti ne more zgraditi nove strukture.

93. Vm (Matthews volume): izraz in izračun primera

Vm je razmerje med volumnom osnovne celice in molekulske mase.

$$Vm = \frac{V_{osnovne\ celice}}{Mr \cdot Z} \quad Z \dots \text{število molekul v celotni osnovni celici}$$

$$C=2, Z=4; 8; \dots$$

$$V_{OC}=319000 \text{ \AA}^3$$

$$Mr=32100 \text{ Da}$$

$Vm=2,5 \text{ \AA}^3/\text{Da}$ ker je vrednost med tipičnimi vrednostmi, je velika verjetnost da je z pravilen in da imamo v osnovni celici 4 molekule.

94. Vm: tipične vrednosti

Vrednosti od 1,7 do 35 $\text{ \AA}^3/\text{Da}$ → večinoma vrednosti med 2,15 – 2,4 $\text{ \AA}^3/\text{Da}$

95. Delež topila v kristalu – izračun preko specifičnega volumna proteina in Vm

$$V_{proteina} = \frac{V_{proteina\ v\ kristalu}}{V_{osnovne\ celice}} = \frac{\text{specifične volumen prot. molekule (g/cm}^3)}{Vm \cdot Na}$$

$$V_{topila} = \frac{1 - V_{proteina}}{Vm} \rightarrow \text{delež topila} = 100\% V_{topila}$$

96. Cryo-cooling: prednosti

- reducirane termične vibracije
- povečano razmerje signal šum
- manjši konformacijski nered
- večja končna resolucija
- supresija poškodb, ki jih povzroča sevanje

97. Cryo-cooling: cryo protektanti – zakaj in kateri

S pomočjo zanke iz rajona ujamo kristal in ga na hitro ohladimo v tekočem dušiku pri 100K. Na ta način upočasnimo difuzijo radikalov preko vodnih kanalov v kristalih. Da pa je voda v obliki stekla in ne ledu pa moramo dodati cryo coolin protektante. To so:

- glicerol, nizkomolekularni PEG, etilen glikol
- saharoza

98. Radiation damage

Voda v proteinih je v kanalih. Če ga izpostavimo rentgenskim žarkom, pride do poškodb kristala, saj se pod vplivom teh žarkov začnejo tvoriti prosti radikali, ki potujejo po vodi v kanalih proteinov in poškodujejo proteinske molekule. Voda ne sme biti v obliki ledu, ker je volumen ledu večji od volumna vode in bi kristal proteina razpadel.

99. Experimental set-up

100. Detektorji: kaj lahko merimo

- štejemo fotone
- merimo energijo, ki je deponirala v določenem času

101. Detektorji: značilnosti detektorjev, ki delujejo na principu štetja elektronov poznamo dva tipa:

- scintilacijski števci (merjenje vsakega sipanega žarka posebej)
- 2D detektor (deluje na principu ionizacije plina v prostoru. V njem so anode in katode. Oboje udarjajo ionizirani delci in večja kot je ionizacija, večja je detekcija).

102. Detektorji: značilnosti detektorjev, ki delujejo na principu deponirane energije So 2D detektorji:

- filmi (neobčutljivi, nelinearni odziv, ozko dinamično območje)
- image plate (IP)
- charge coupled devides (CCD)

103. Princip delovanja IP

Na površini imamo fosfor, ki je dopiran z barijevim fluoridom, bromidom, europijem. Ko na detektor padejo rentgenski žarki se europij vzbudi v metastabilno stanje in tam ostane. če uporabimo lasersko svetlobo in osvetlimo vzbujen europijev atom, bo ta emitiral vidno svetlobo in se vrnil v osnovno stanje. Količina emitirane svetlobe nam pove intenziteto sipanega žarka.

104. Princip delovanja CCD

Proces poteka v dveh korakih.

- Tvorba naboja. X žarki padajo na fosfor, ki emitira vidno svetlobo
- Le ta generira elektrone praznine v Si, ki je za fosforjem (elektropraznine na Si plošči v ozadju). V napravi se pojavijo termalni elektroni. V vsakem Si je nekaj elektronov v prevodnem pasu, zato Si držimo na temperaturi od -40 do -70 °C.

105. Izbor detektorja glede na experiment in izvor žarkov x

- razlika v velikosti detektorja – CCD so manjši
- hitrost branja – IP več 10 sec, CCD nekaj sekund ali manj
- IP na rotirajoči anodi je čas ekspozicije 10-20 min. Toliko rabimo, da zavrtimo kristal za 1 °.
- CCD na sinhrotronih, kjer se uporablja rentgenski žarek in traja ekspozicija le nekaj sekund
- Cena IP 120 000€, CCD od 250 000€ do 1 000 000€ odvisno od velikosti