

Κρυσταλλογραφία

Μέρος 1ο

Μια μη μαθηματική εισαγωγή
στις κρυσταλλογραφικές μεθόδους.

Δομική βιολογία: ορισμός

Ο κλάδος της βιολογίας ο οποίος ασχολείται με τον προσδιορισμό και την ανάλυση των δομών βιολογικών μακρομορίων και των συμπλόκων τους.

Δομή μορίου: ορισμοί

Αυστηρός ορισμός :

Δομή ενός μορίου είναι η σχετική διευθέτηση στον τρισδιάστατο χώρο των ατόμων από τα οποία αποτελείται το μόριο.

Με άλλα λόγια, γνώση της δομής ενός μορίου σημαίνει ότι γνωρίζουμε που βρίσκεται κάθε άτομο του μορίου σε σχέση με όλα τα άλλα άτομα.

Δομή μορίου: ορισμοί

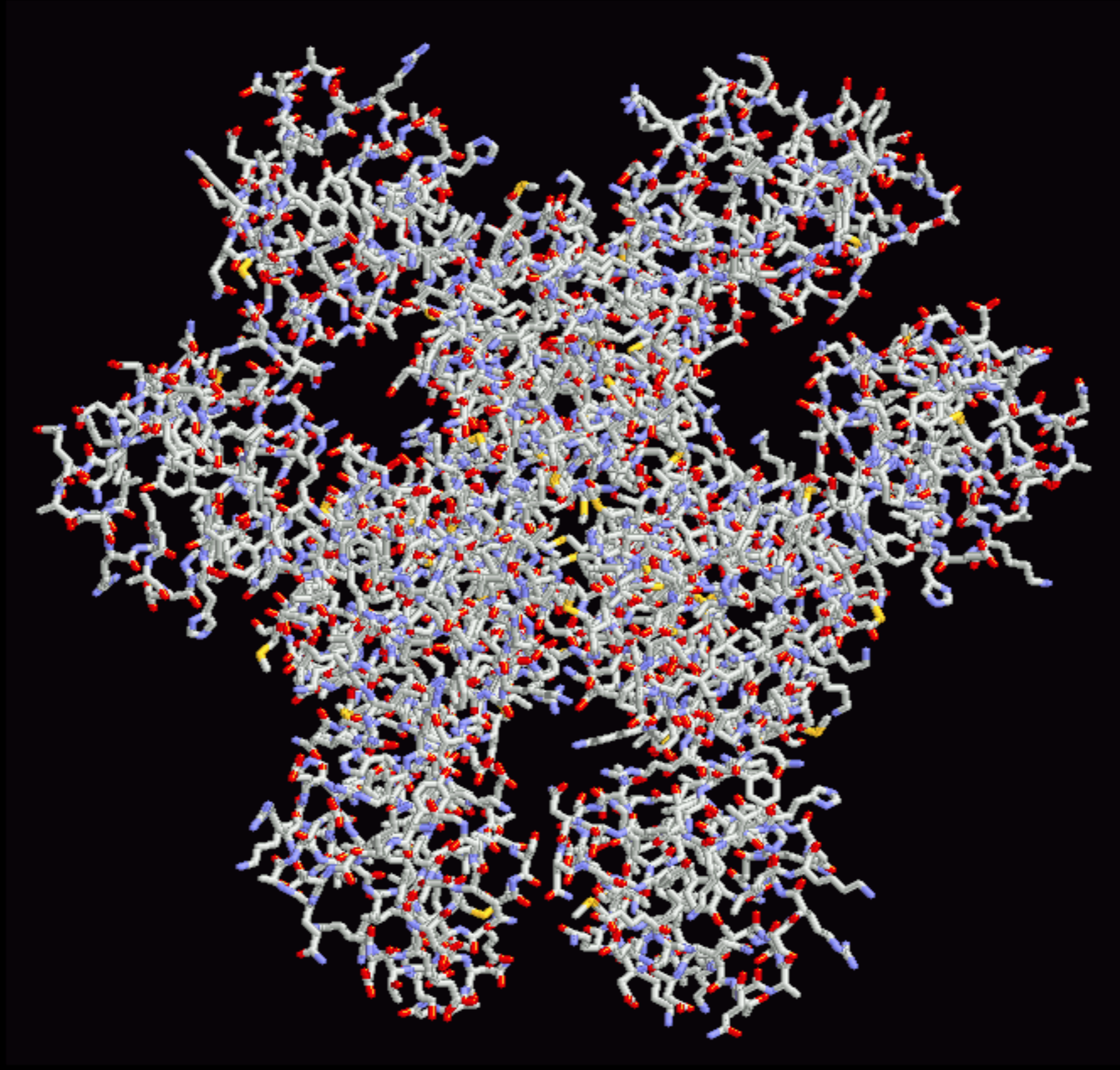
Ο προηγούμενος ορισμός είναι "αυστηρός" γιατί απαιτεί μια περιγραφή του μορίου άτομο-προς-άτομο.

Μια τέτοιου τύπου περιγραφή δεν είναι πάντα εφικτή, και για μερικές τεχνικές (π.χ. ηλεκτρονική μικροσκοπία αρνητικής χρώσης) είναι αδύνατη.

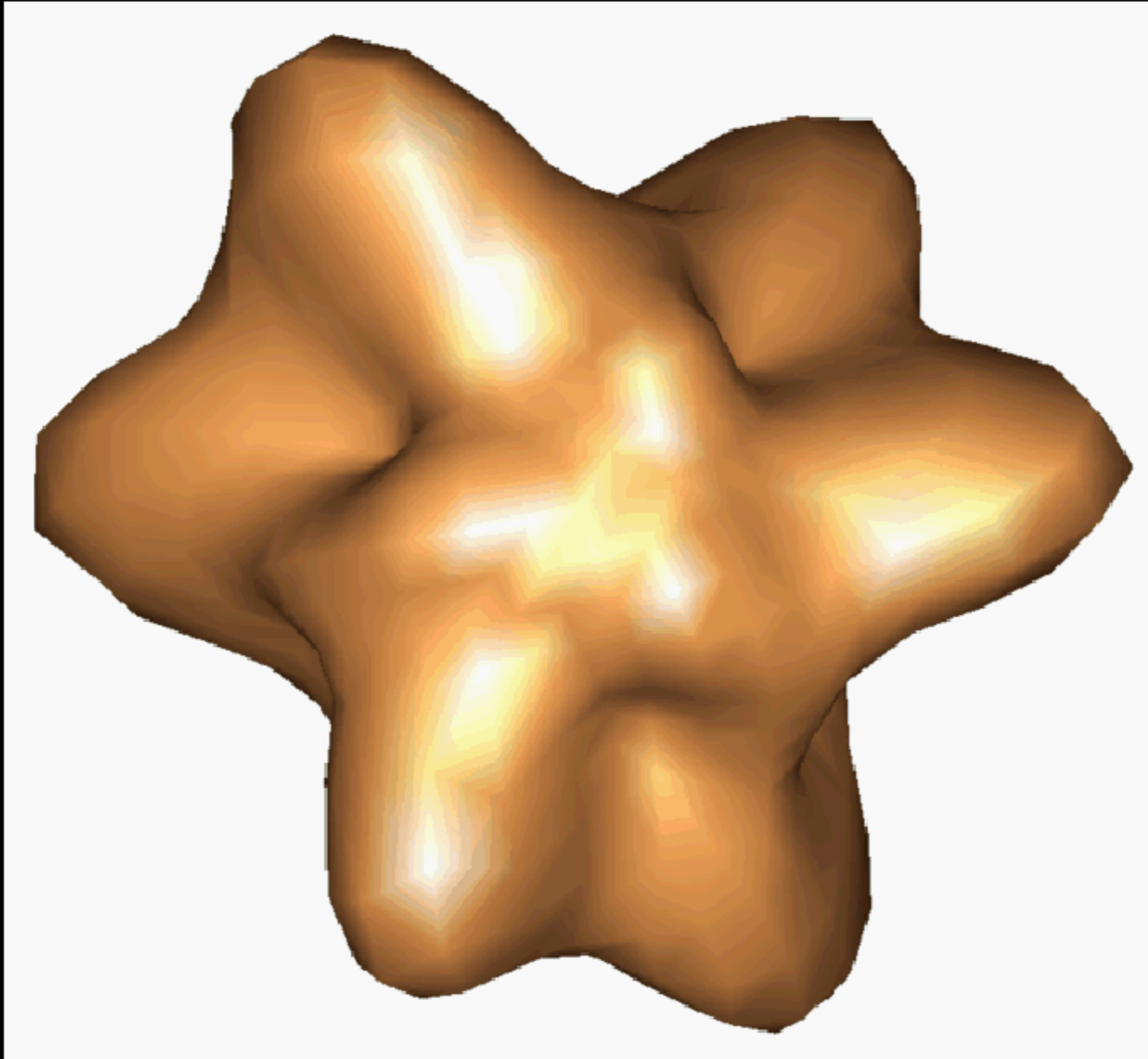
Δομή μορίου: ορισμοί

Σε τέτοιες περιπτώσεις αυτό που αναφέρεται στην βιβλιογραφία ως "δομή", δεν είναι η σχετική διεύθυνση στον τρισδιάστατο χώρο των ατόμων από τα οποία αποτελείται το μόριο, αλλά μια συνάρτηση (π.χ. ηλεκτρονική πυκνότητα) που προκύπτει από τη δομή, και συνήθως αντιστοιχεί σε μια χαμηλής διακριτικότητας αναπαράσταση του μορίου (σχήμα, μορφή επιφάνειας).

Διακριτικότητα (ευκρίνεια ?)



Διακριτικότητα (ευκρίνεια ?)



Διακριτικότητα (ευκρίνεια ?)

Είναι ένα μέτρο της "λεπτομέρειας" που υπάρχει σε ένα είδωλο ενός αντικειμένου.

Ακριβέστερα, είναι η ελάχιστη απόσταση προσέγγισης δύο ορατών σημείων ενός ειδώλου πριν αυτά (φαινομενικά) ενωθούν σε ένα.

Η διακριτικότητα έχει μονάδα μήκους. Στην δομική βιολογία η καθολικά χρησιμοποιούμενη μονάδα μήκους είναι το Angstrom : $1\text{A} = 0.1\text{nm} = 0.0001\mu\text{m} = 10^{(-10)}\text{m}$ το οποίο είναι περίπου ίσο με την διάμετρο του ατόμου του υδρογόνου.

Διακριτικότητα (ευκρίνεια ?)

Διακριτικότητα (A)

Είδωλο

< 0.8

Υπερ-ατομική διακριτικότητα.
Τροχιακά ίσως ορατά.

< 1.4

Ατομική διακριτικότητα.
Άτομα μεταξύ τους διακριτά.

< 2.0

Υψηλή διακριτικότητα.
Ακριβή ατομικά μοντέλα.

< 3.5

Χαμηλή και μέση διακριτικότητα
Ατομικά μοντέλα εφικτά.

< 9.0

Χαμηλή διακριτικότητα.
Ατομικά μοντέλα ανέφικτα.
α-έλικες ορατές ως κύλινδροι.

> 9.0

Πολύ χαμηλή διακριτικότητα.
Μορφή μορίου.

Φυσική => Δομική => Κυτταρική

Από άποψη διακριτικότητας, η δομική βιολογία ξεκινά από εκεί που τελειώνει η ατομική φυσική, και τελειώνει εκεί που αρχίζει (σχεδόν) η κυτταρική βιολογία. Υπάρχουν περιπτώσεις αλληλοεπικάλυψης, π.χ. δομές βιομακρομορίων σε διακριτικότητα 0.6Å (ορατά δεσμικά ηλεκτρόνια) ή κυτταρικά οργανίδια (ή ιοί) με δομή γνωστή σε ατομικό επίπεδο.

Μοριακή δυναμική

Η στατική αναπαράσταση δομών βιολογικών μακρομορίων είναι λάθος όχι μόνο τυπικά (λόγω της θερμικής κίνησης των ατόμων), αλλά και για ουσιαστικούς λόγους : η βιολογική δράση των μακρομοριακών δομών είναι συνήθως αποτέλεσμα της δυναμικής τους (και όχι της απουσίας της).

Μοριακή δυναμική

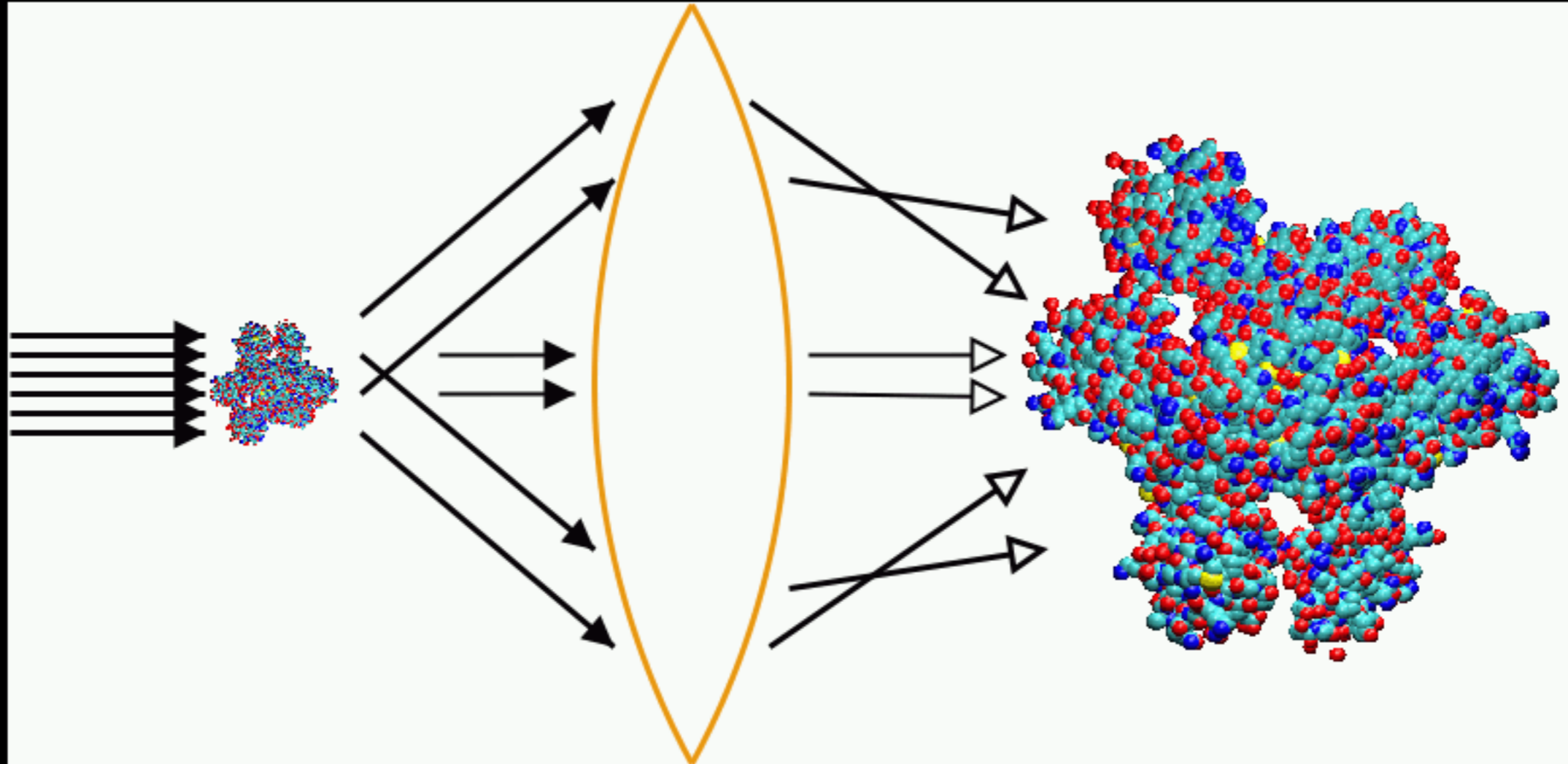
Από αυτή τη σκοπιά, οι καλύτερες δομές (αυτές με την περισσότερη πληροφορία για την δυναμική του μορίου) είναι αυτές που προκύπτουν από τη μέθοδο του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR), αν και οι προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής θεωρούνται πλέον αρκούντως αξιόπιστες για την εξαγωγή συμπερασμάτων (ξεκινώντας από κρυσταλλογραφικά προσδιορισμένες δομές).

Το κρυσταλλογραφικό ζητούμενο

Αυτό που επιδιώκουμε είναι να μπορούμε να δούμε κάποιο βιομακρομόριο σε ατομική διακρίτικότητα.

Το "δούμε" χρησιμοποιείται με την σημασία της οπτικής, δηλαδή αυτό που επιδιώκουμε να επιτύχουμε είναι την δημιουργία ενός ειδώλου του μορίου στο οποίο (είδωλο) να είναι διακριτά τα άτομα που αποτελούν το μόριο.

Το ιδεατό πείραμα



έχει προβλήματα ...

Προβλήματα ...

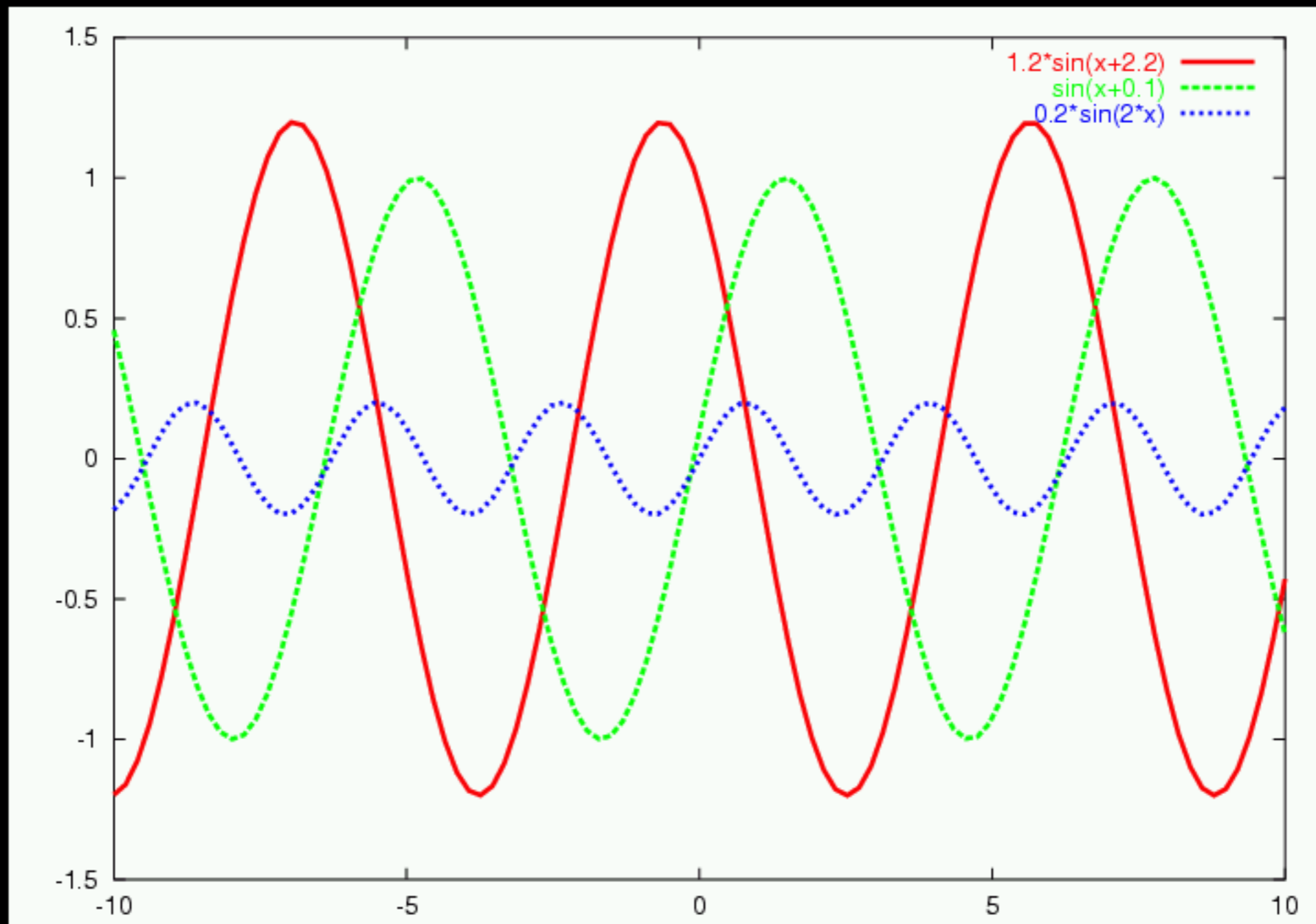
- Τι ακτινοβολία πρέπει να χρησιμοποιήσουμε ώστε να είναι εφικτή η ζητούμενη ατομική διακριτικότητα ;
- Πως θα απομονώσουμε ένα και μόνο ένα μόριο και πως θα το σταθεροποιήσουμε σε μια καλά καθορισμένη θέση ;
- Πως θα μπορέσουμε να περιστρέφουμε το μόριο κατά βούληση ώστε να είμαστε σε θέση (από τις διαφορετικές προβολές) να συμπεράνουμε τη δομή του στον τρισδιάστατο χώρο ;
- Θα είναι αρκετά ισχυρό το σήμα από ένα μόνο μόριο ώστε να μπορέσουμε να το "δούμε" ;
- Τι φακούς θα πρέπει να χρησιμοποιήσουμε ;

Μήκος κύματος

- Στο ιδεατό πείραμα, το είδωλο του αντικειμένου προκύπτει από την υπέρθεση (συνδυασμό) των ακτίνων που σκεδάζονται από το αντικείμενο.
- Ο (ιδανικός) φακός δεν τροποποιεί το μήκος κύματος.
- Εάν η ακτινοβολία που χρησιμοποιούμε στο πείραμα είναι μονοχρωματική (δηλ. υπάρχει ένα και μόνο ένα μήκος κύματος), τότε το ερώτημα είναι :
Ποιά είναι η σχέση ανάμεσα στο μήκος κύματος αυτής της ακτινοβολίας και τη μέγιστη δυνατή διακριτικότητα του ειδώλου ;

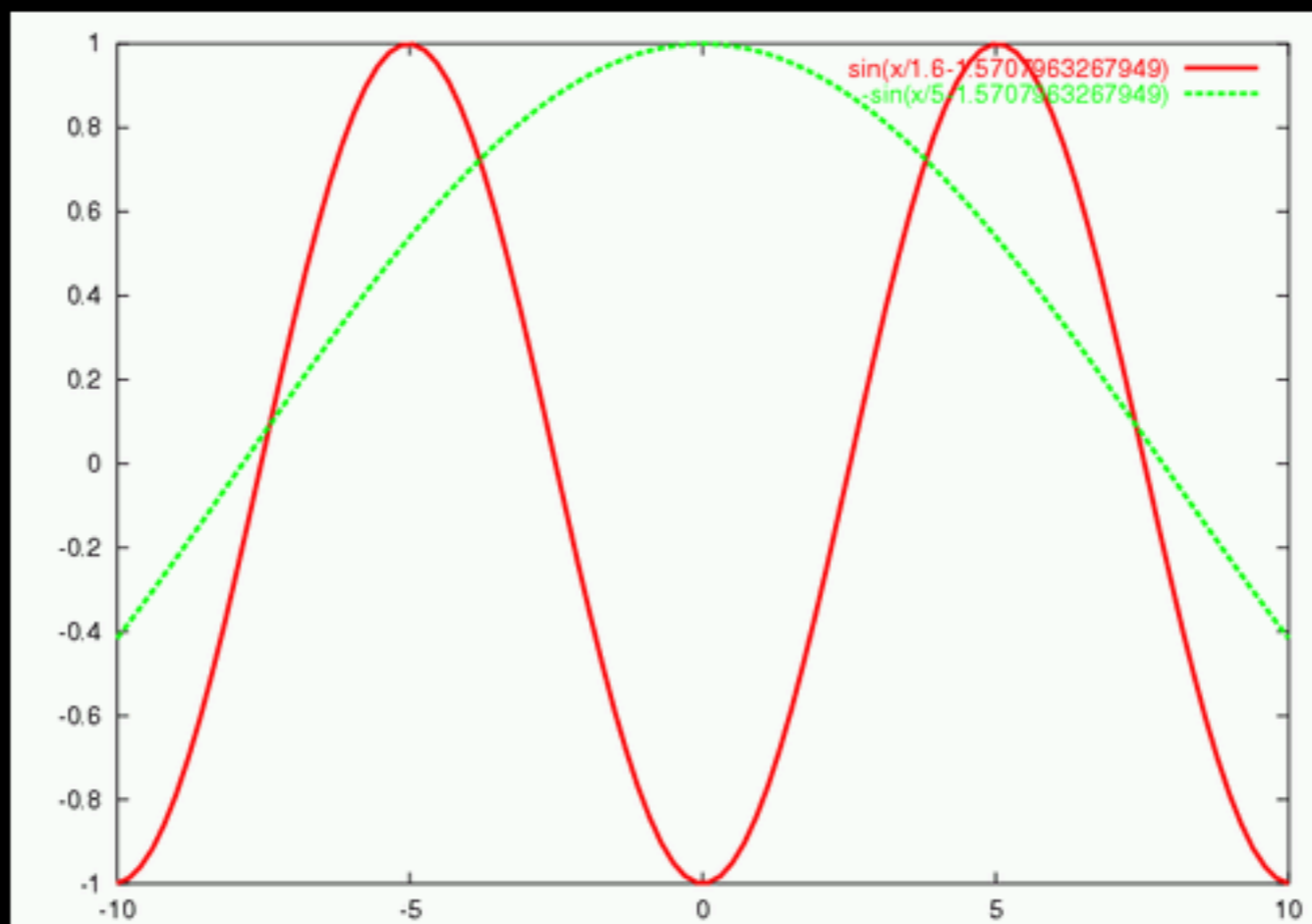
Κύματα και μήκος κύματος

Ένα κύμα περιγράφεται πλήρως από : πλάτος, φάση, μήκος κύματος ($v=c/\lambda$) και διεύθυνση διάδοσης.



Κύματα και μήκος κύματος

Η μέση απόσταση μεταξύ ομοιοπολικά συνδεδεμένων ατόμων στα βιομακρομόρια είναι περίπου 1.4Å. Για να επιτύχουμε ατομική διακριτικότητα λοιπόν, χρειαζόμαστε ένα μήκος κύματος περίπου ίσο με τέτοιου μήκους αποστάσεις, δηλ. ~1Å.



Μήκος κύματος

Ένα μήκος κύματος $\sim 1\text{\AA}$ αντιστοιχεί με την περιοχή του φάσματος που είναι γνωστή ως "ακτίνες X". Κατάλληλα (ισοδύναμα) μήκη κύματος έχουν επίσης ταχέως κινούμενα ηλεκτρόνια και θερμικά νετρόνια.

Ερμηνεία του "ακτίνων-X" ή "νετρονίων" ή "ηλεκτρονίων".

Προβλήματα [2] ...

- Πως θα απομονώσουμε ένα μόνο μόριο και πως θα το σταθεροποιήσουμε σε μια καλά καθορισμένη θέση ;
- Πως θα μπορέσουμε να περιστρέφουμε το μόριο κατά βούληση ώστε να είμαστε σε θέση (από τις διαφορετικές προβολές) να συμπεράνουμε τη δομή του στον τρισδιάστατο χώρο ;
- Θα είναι αρκετά ισχυρό το σήμα από ένα μόνο μόριο ώστε να μπορέσουμε να το "δούμε" ;

Και τα τρία αυτά προβλήματα λύνονται με την βοήθεια των κρυστάλλων (εξ ου "κρυσταλλογραφία").

Κρύσταλλοι

Είναι μια φάση της στερεάς κατάστασης στην οποία τα μόρια (ή άτομα) που αποτελούν τον κρύσταλλο είναι περιοδικά διευθετημένα στον τρισδιάστατο χώρο.

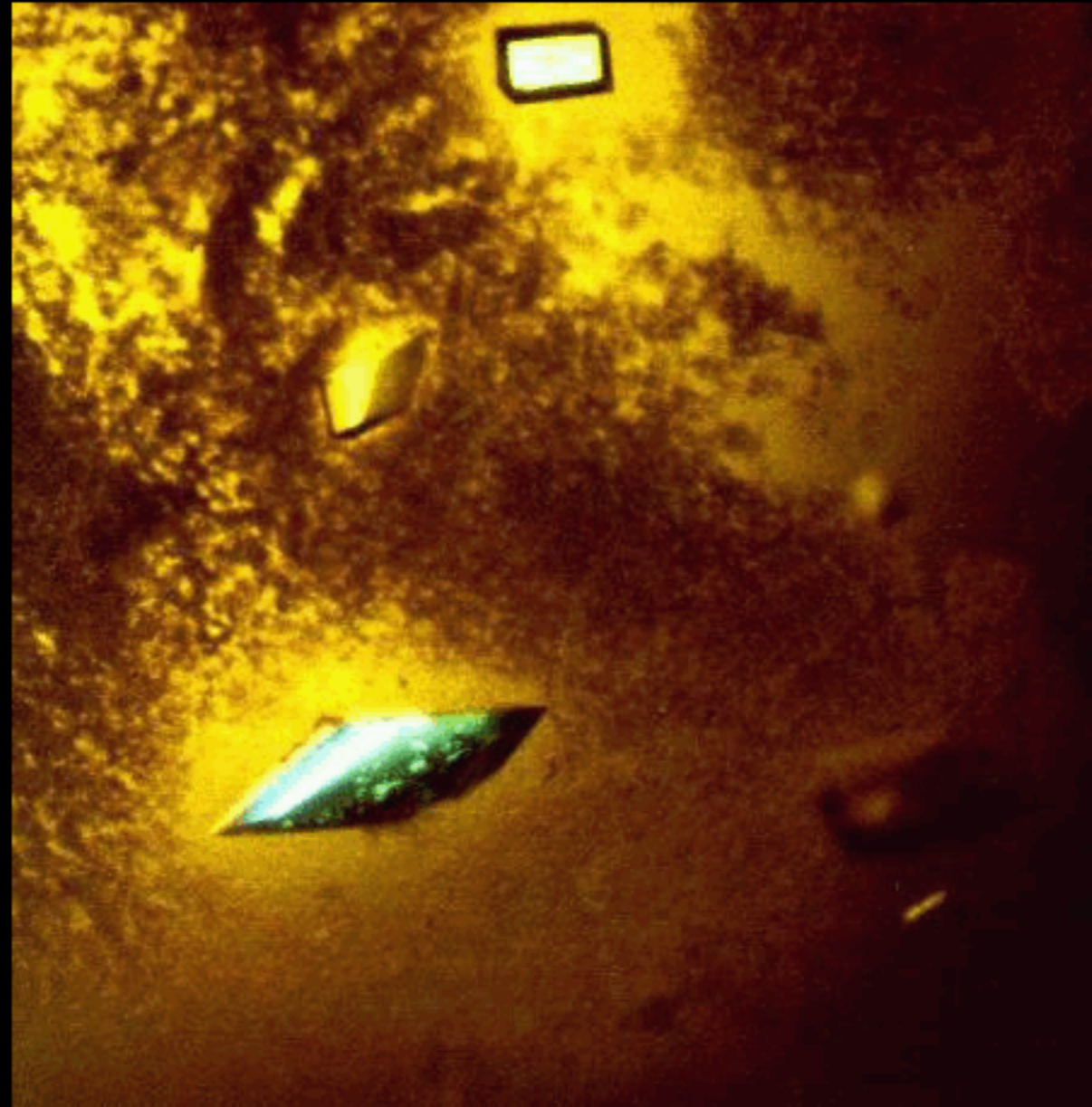
Η περιοδική αυτή επανάληψη επιτυγχάνεται μέσω της απλής μετάθεσης (δηλαδή απλή μετακίνηση χωρίς περιστροφή) ενός επαναλαμβανόμενου μοτίβου.

Κάθε περιοδική διευθέτηση δεν είναι κρύσταλλος (π.χ. υγροί κρύσταλλοι, δομή του DNA).

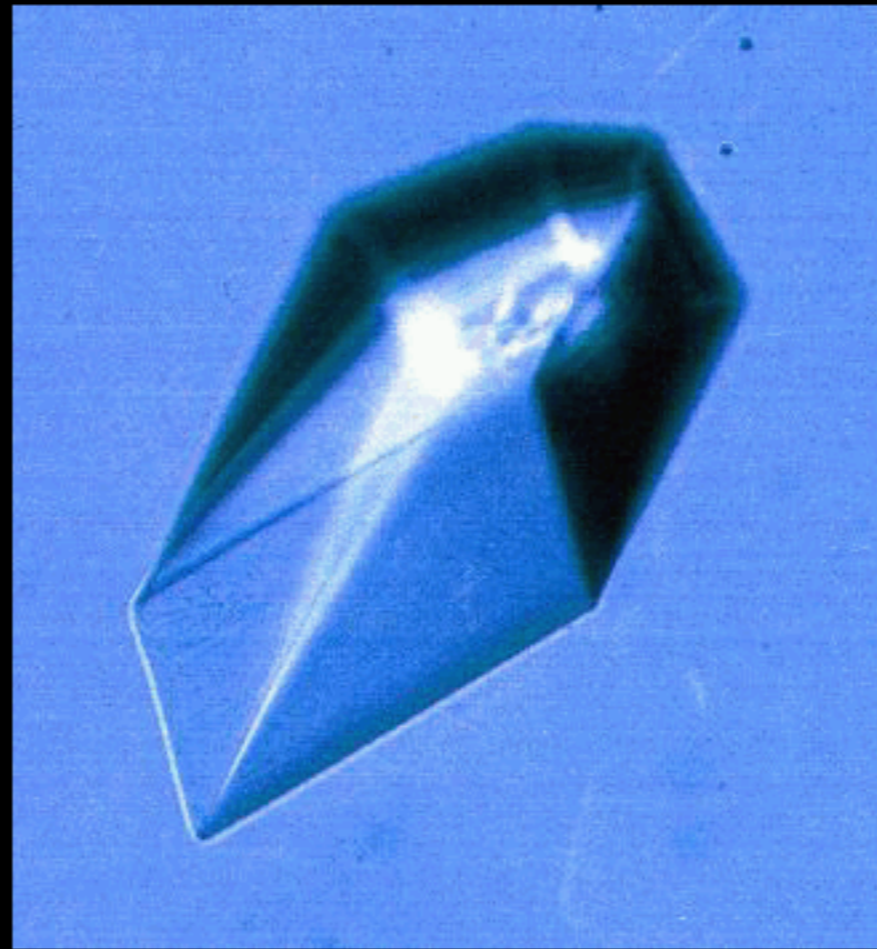
Κρύσταλλοι

Η κρυσταλλική κατάσταση δεν είναι προνόμιο του μαγειρικού άλατος. Παρ'ότι τεχνικά είναι πιο εύκολο να δημιουργηθούν κρύσταλλοι αλάτων παρά κρύσταλλοι του ριβοσώματος, θεμελιωδώς πρόκειται για αντίστοιχες διαδικασίες. Το μοναδικό που αλλάζει (μικροσκοπικά) είναι το ποιόν της επαναλαμβανόμενης μονάδας.

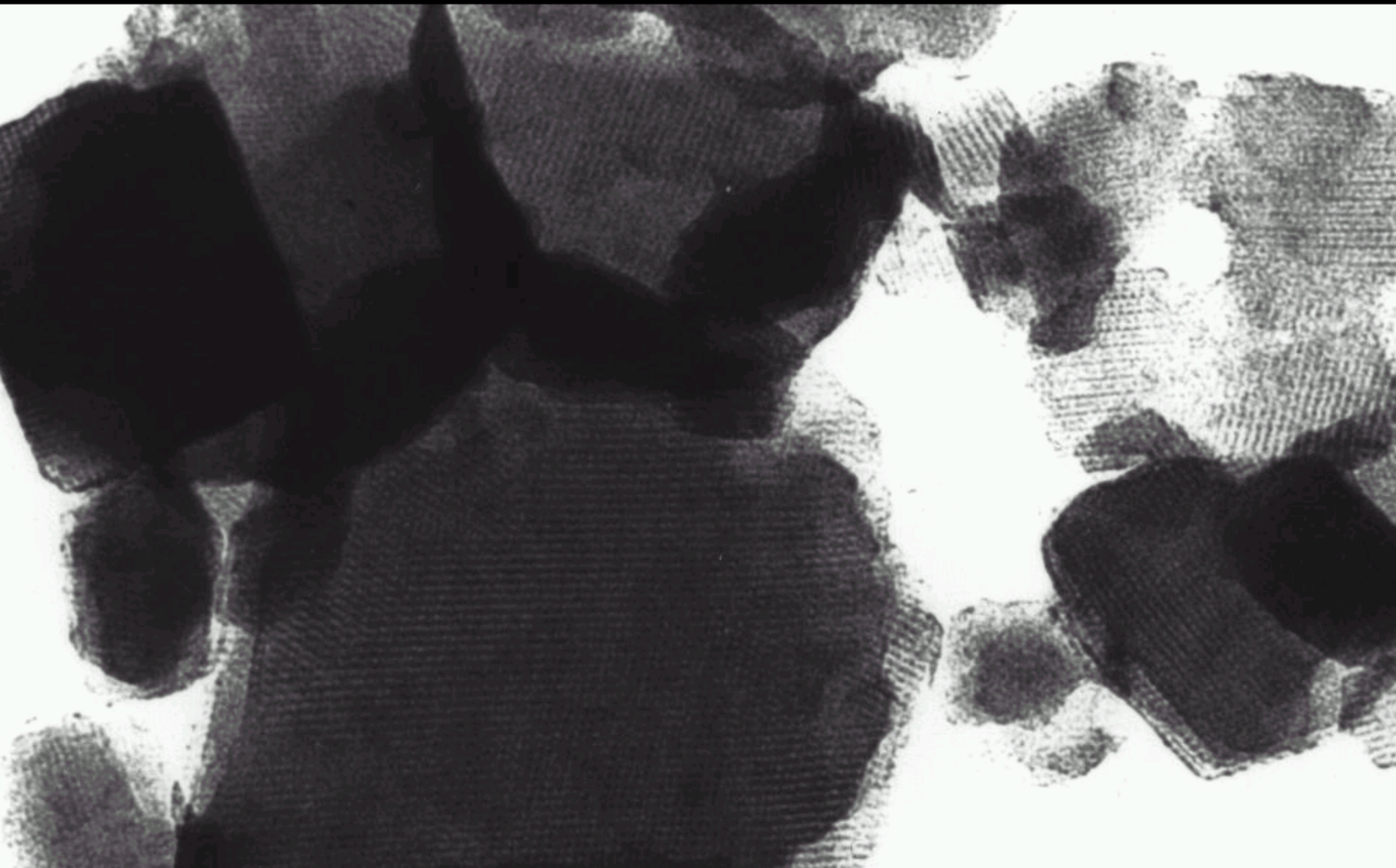
Κρύσταλλοι βιομακρομολών



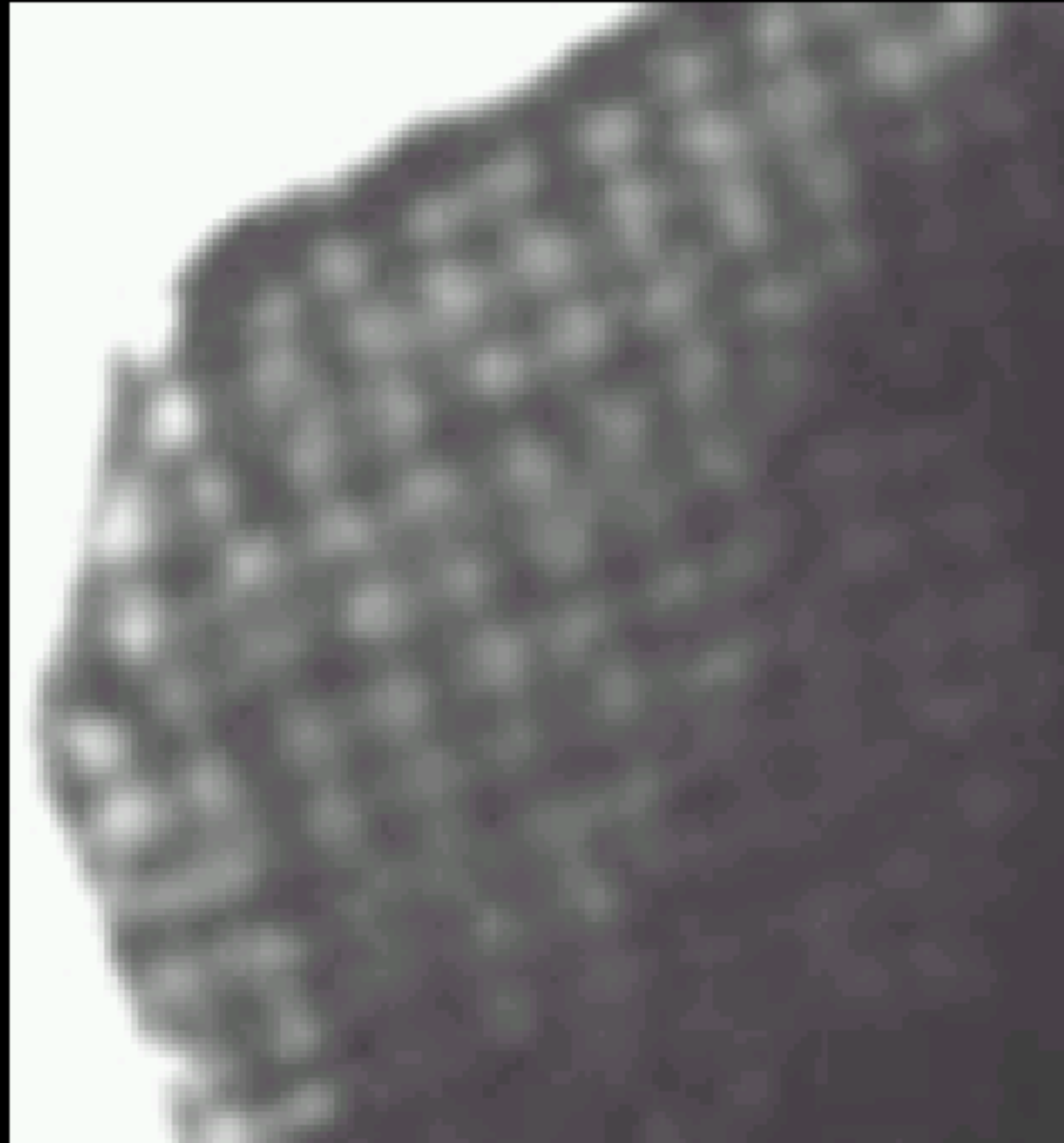
Κρύσταλλοι βιομακρομορίων



Κρύσταλλοι βιομακρομορίων



Κρύσταλλοι βιομακρομορίων



Προβλήματα (συνέχεια)

- Πως θα απομονώσουμε ένα μόνο μόριο και πως θα το σταθεροποιήσουμε σε μια καλά καθορισμένη θέση ;

Εάν αντί ενός μορίου έχουμε πολλά επαναλαμβανόμενα αντίγραφα του ίδιου μορίου όλα με τον ίδιο προσανατολισμό (δηλ. έναν κρύσταλλο) τότε

1. δεν απαιτείται πλέον να απομονώσουμε ένα μόνο μόριο, και,

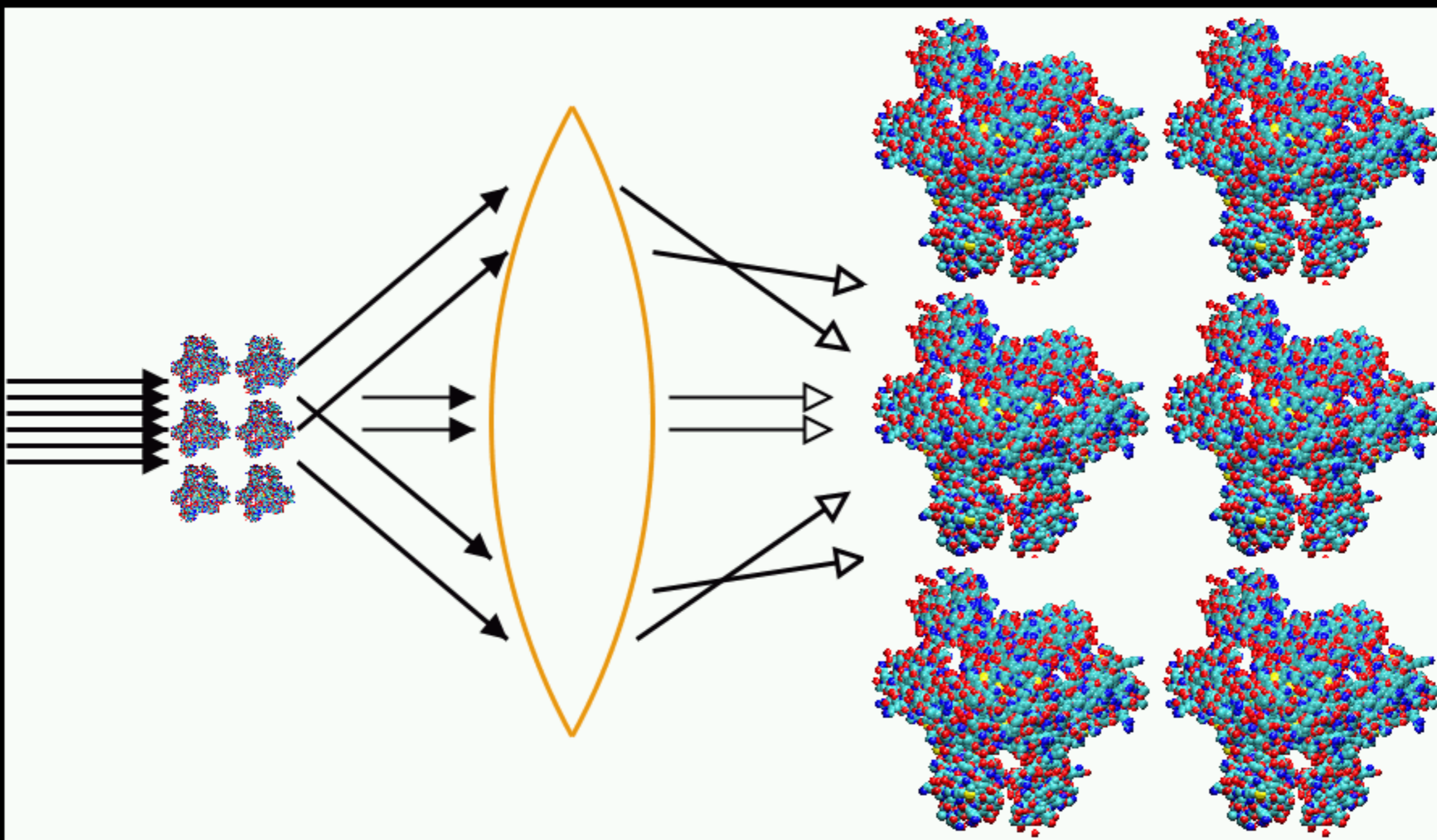
2. μπορούμε να σταθεροποιήσουμε με μεγάλη ακρίβεια αυτήν την συνάθροιση γιατί πρόκειται πλέον για ένα μακροσκοπικό αντικείμενο (συνήθως ορατό με γυμνό μάτι).

Προβλήματα (συνέχεια)

- Πως θα μπορέσουμε να περιστρέψουμε το μόριο κατά βούληση ώστε να είμαστε σε θέση (από τις διαφορετικές προβολές) να συμπεράνουμε τη δομή του στον τρισδιάστατο χώρο ;

Εάν αντί ενός μορίου έχουμε πολλά επαναλαμβανόμενα αντίγραφα του ίδιου μορίου όλα με τον ίδιο προσανατολισμό (δηλ. έναν κρύσταλλο) τότε μπορούμε να περιστρέψουμε με μεγάλη ακρίβεια αυτήν την συνάθροιση γιατί πρόκειται πλέον για ένα μακροσκοπικό αντικείμενο (συνήθως ορατό με γυμνό μάτι).

Το ιδεατό πείραμα (2)



Με ένα σμπάρο, τρία τρυγόνια

- Θα είναι αρκετά ισχυρό το σήμα από ένα μόνο μόριο ώστε να μπορέσουμε να το "δούμε" ;

Εάν έχουμε πολλά επαναλαμβανόμενα αντίγραφα του ιδίου μορίου, και εάν υποθέσουμε ότι οι μεταξύ τους διαφορές οφείλονται σε τυχαίο θόρυβο, τότε μπορούμε να βελτιώσουμε την ποιότητα του ειδώλου του μορίου με το να κάνουμε averaging (να υπολογίσουμε το "μέσο είδωλο"). Η αναμενόμενη βελτίωση του λόγου σήμα/θόρυβος είναι ίση με την τετραγωνική ρίζα του N , όπου N είναι ο αριθμός των αντιγράφων του μορίου.

Με ένα σμπάρο, τρία τρυγόνια, αλλά δε φτάνουν ...

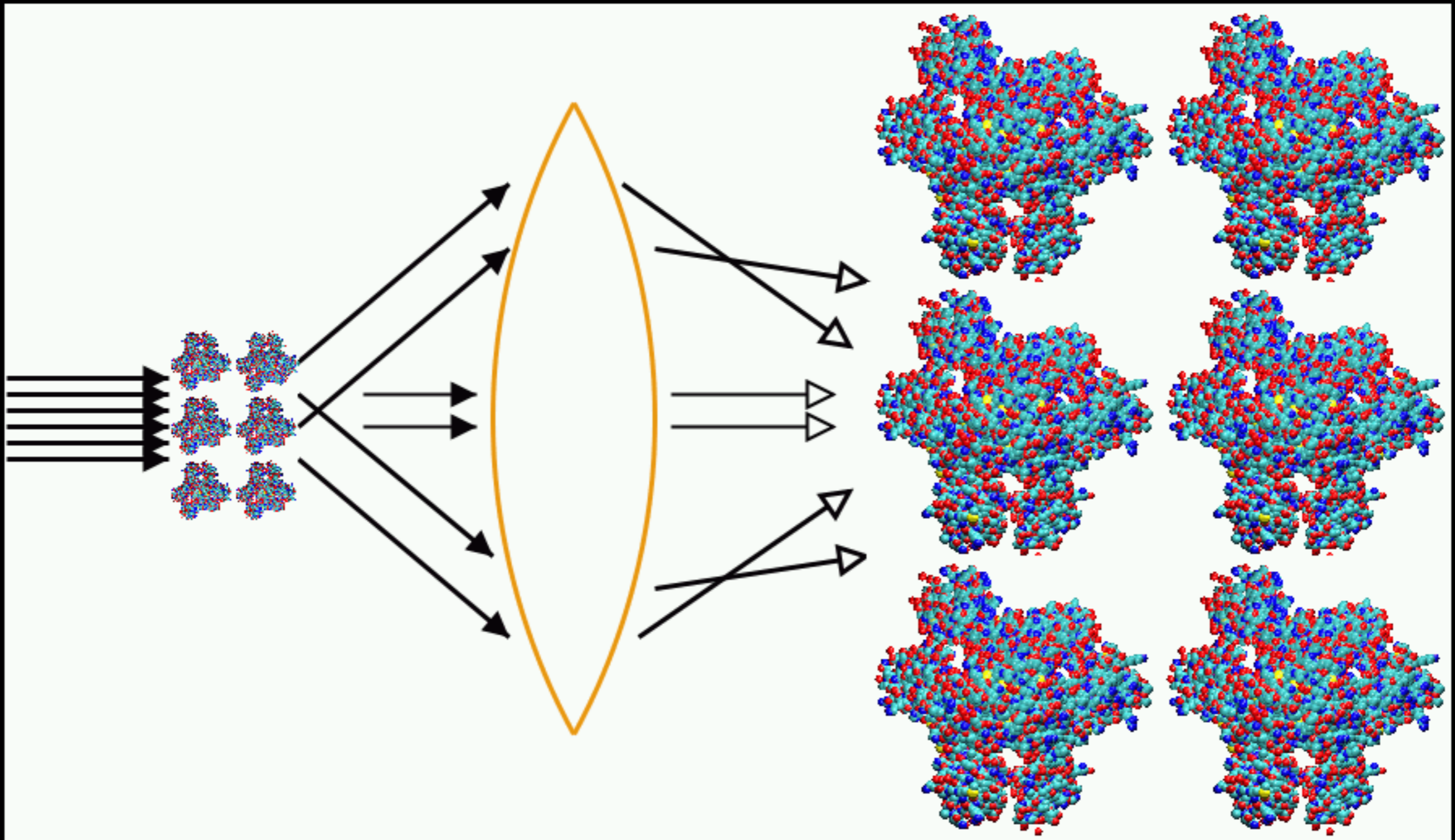
- Τι φακούς θα πρέπει να χρησιμοποιήσουμε ;

Δεν θα χρησιμοποιήσουμε.

Δεν υπάρχει υλικό το οποίο να έχει συντελεστή διάθλασης για τις ακτίνες X (ή τα θερμικά νετρόνια) τέτοιο ώστε να μπορεί να κατασκευαστεί ένας πρακτικά υλοποιήσιμος φακός ακτίνων X που να επιτρέπει υψηλή διακριτικότητα.

Άρα, την πατήσαμε ;

Όχι ακόμα. Στο ιδεατό πείραμα [αριθμός 2] ...

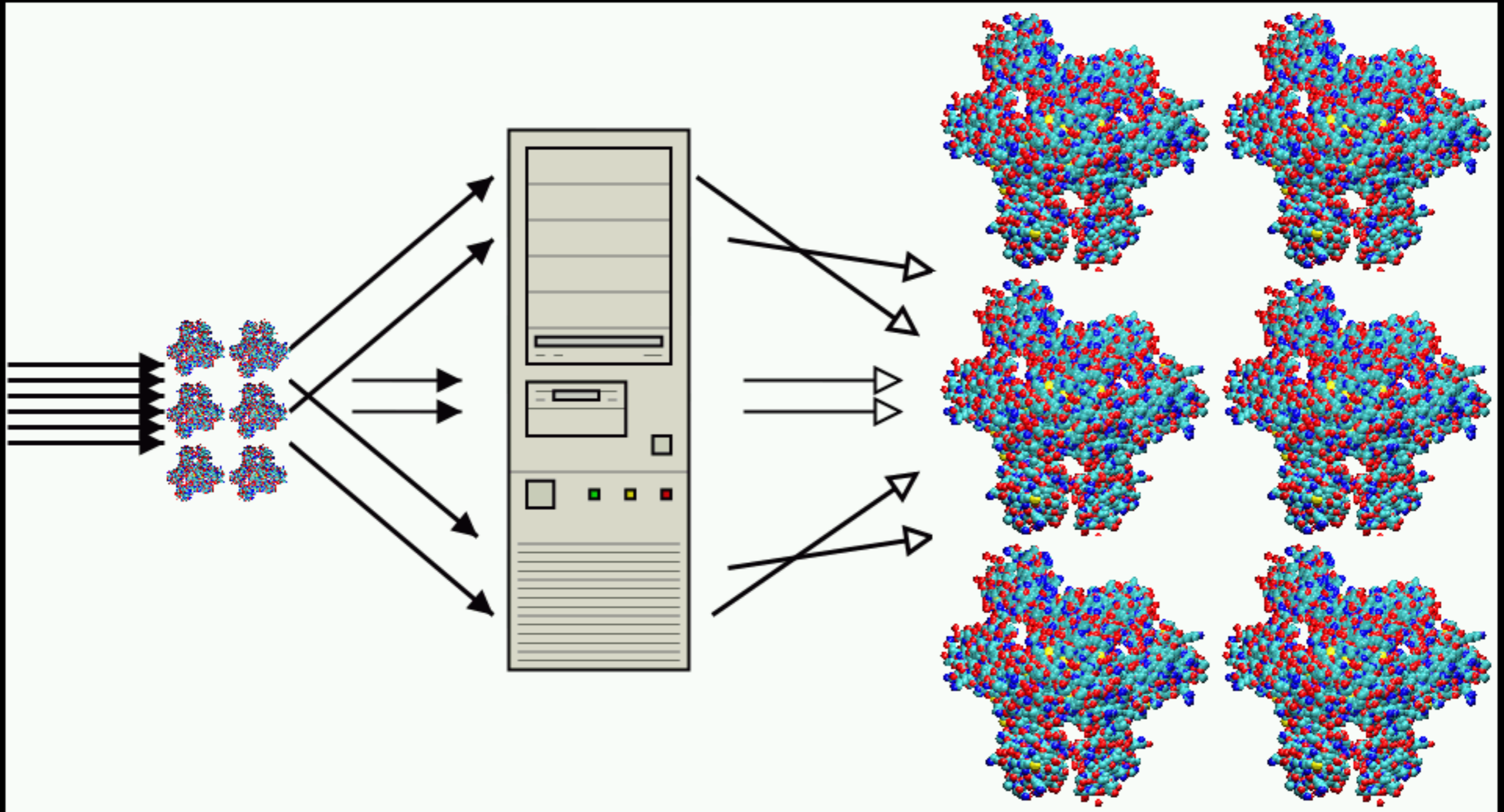


Άρα, την πατήσαμε ;

... το μόνο που κάνει ο φακός (και όπως θα έπρεπε να κάνουν όλοι οι φακοί) είναι να αλλάζει με τρόπο προβλέσιμο την διεύθυνση διάδοσης των κυμάτων που σκεδάστηκαν από το αντικείμενο (τον κρύσταλλο) εστιάζοντας αυτές τις ακτίνες. Άρα, η δράση του φακού είναι αναλυτικά (αλγεβρικά) προσομοιώσιμη, **δηλαδή,**

εάν μπορούμε να περιγράψουμε με ακρίβεια το τι συμβαίνει πριν από το φακό, τότε μπορούμε να περιγράψουμε με την ίδια ακρίβεια το τι συμβαίνει μετά το φακό, και συνεπώς μπορούμε να ανακτήσουμε (υπολογιστικά) το είδωλο του αντικειμένου

Το ιδεατό πείραμα (3)



Το ιδεατό πείραμα (3) ...

... το μόνο που απαιτεί είναι να τοποθετήσουμε στη θέση του φακού έναν ανιχνευτή που θα μας επιτρέψει να προσδιορίσουμε το πλάτος, την φάση, και τη διεύθυνση διάδοσης των κυμάτων που σκεδάζονται από το αντικείμενο. Γνωρίζοντας αυτά, μπορούμε να υπολογίσουμε το είδωλο του αντικειμένου.

Μόνο που αυτό δε γίνεται ...

Πάλι ;

Το τελευταίο πρόβλημα :

Για τους λόγους που αναφέραμε, το μήκος κύματος που απαιτείται είναι $\sim 1\text{\AA}$. Η συχνότητα ενός κύματος διαδιδόμενου με την ταχύτητα του φωτός και με μήκος κύματος 1\AA είναι :

$$\begin{aligned} \nu &= c / \lambda = 300.000.000 / 1 \cdot 10^{-10} = \\ &= 3 \cdot 10^{18} \text{ sec}^{-1} \end{aligned}$$

δηλαδή το κύμα αλλάζει φάση 3 πεντάκις εκατομμύρια (τρία δισεκατομμύρια δισεκατομμυρίων) φορές το δευτερόλεπτο.

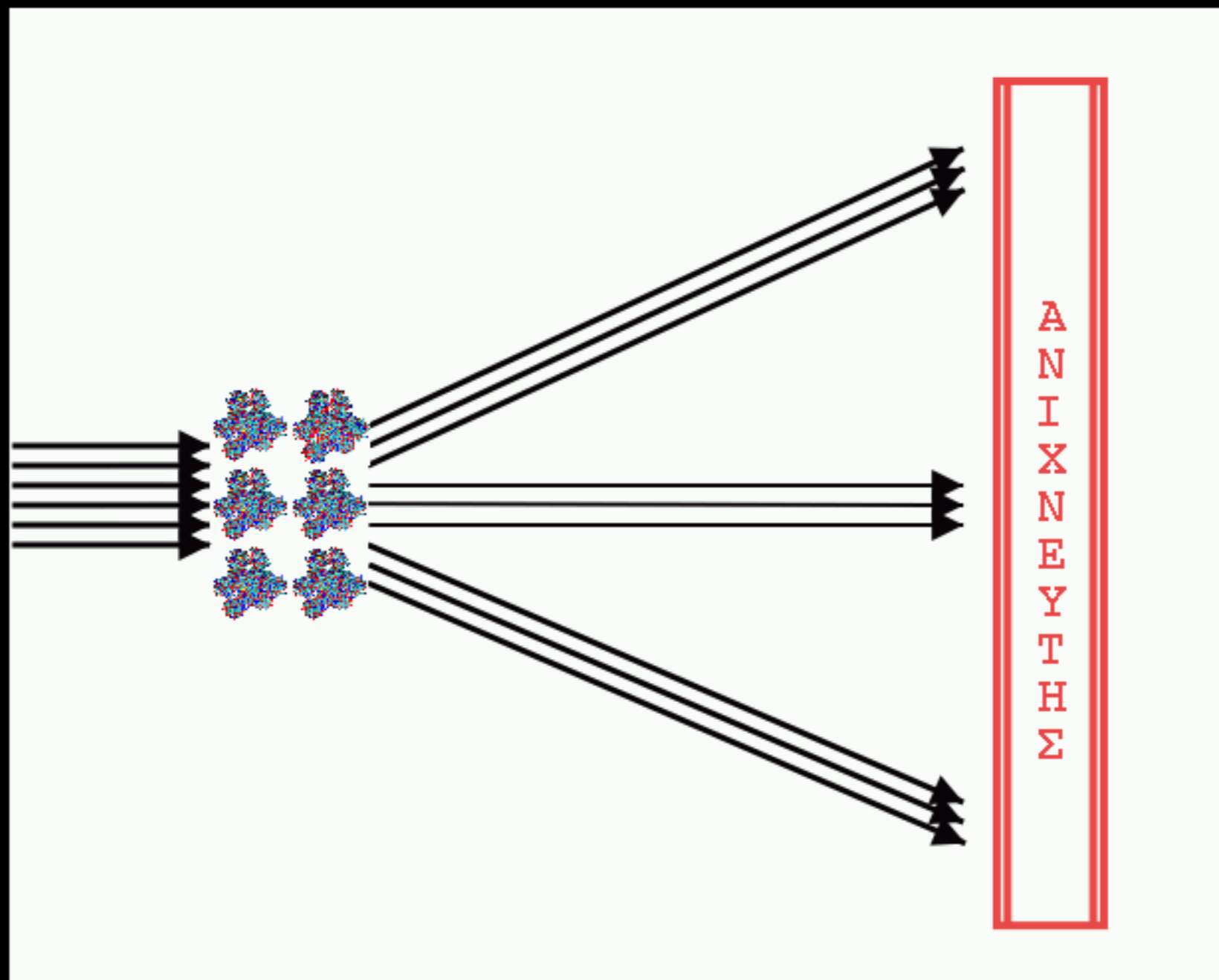
Δυστυχώς, είναι αδύνατο να προσδιοριστεί η φάση ενός κύματος με τόση υψηλή συχνότητα.

Άρα, την πατήσαμε ;

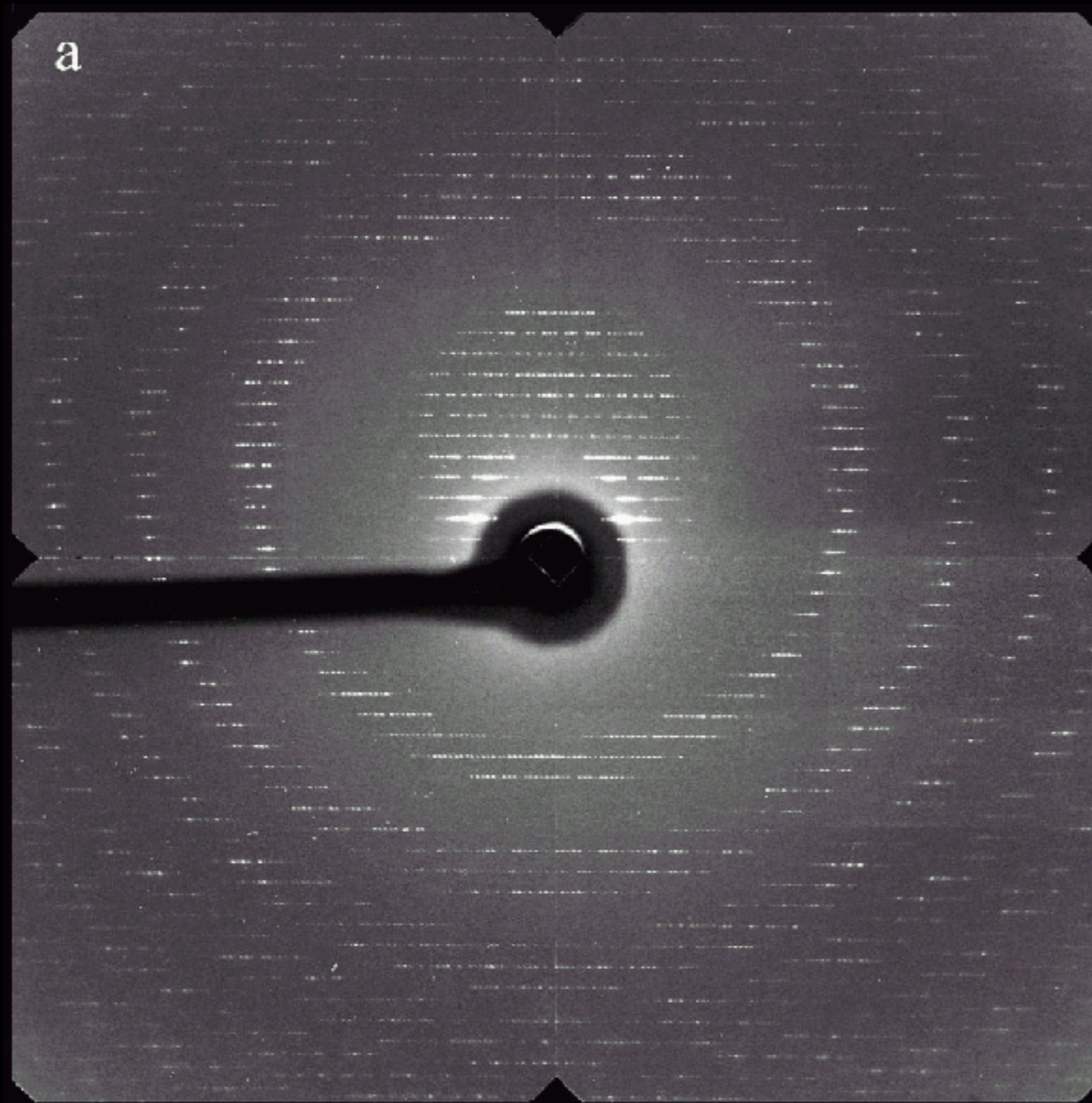
Μάλιστα. Και τόσο άσχημα, που έχει όνομα. Είναι το "πρόβλημα φάσεων" της κρυσταλλογραφίας.

Αυτό έγκειται στο ότι ενώ το πλάτος και η διεύθυνση των σκεδαζόμενων (περιθλώμενων) από τον κρύσταλλο κυμάτων μπορεί να προσδιοριστεί πειραματικά, η φάση (ή έστω η σχετική φάση) αυτών των κυμάτων δεν μπορεί να προσδιοριστεί άμεσα. Οι έμμεσοι τρόποι προσδιορισμού αυτών των φάσεων συνιστούν τον πυρήνα της κρυσταλλογραφίας και -μαζί με τη δημιουργία κρυστάλλων- είναι τα περιοριστικά βήματα της διαδικασίας προσδιορισμού δομών μέσω κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ.

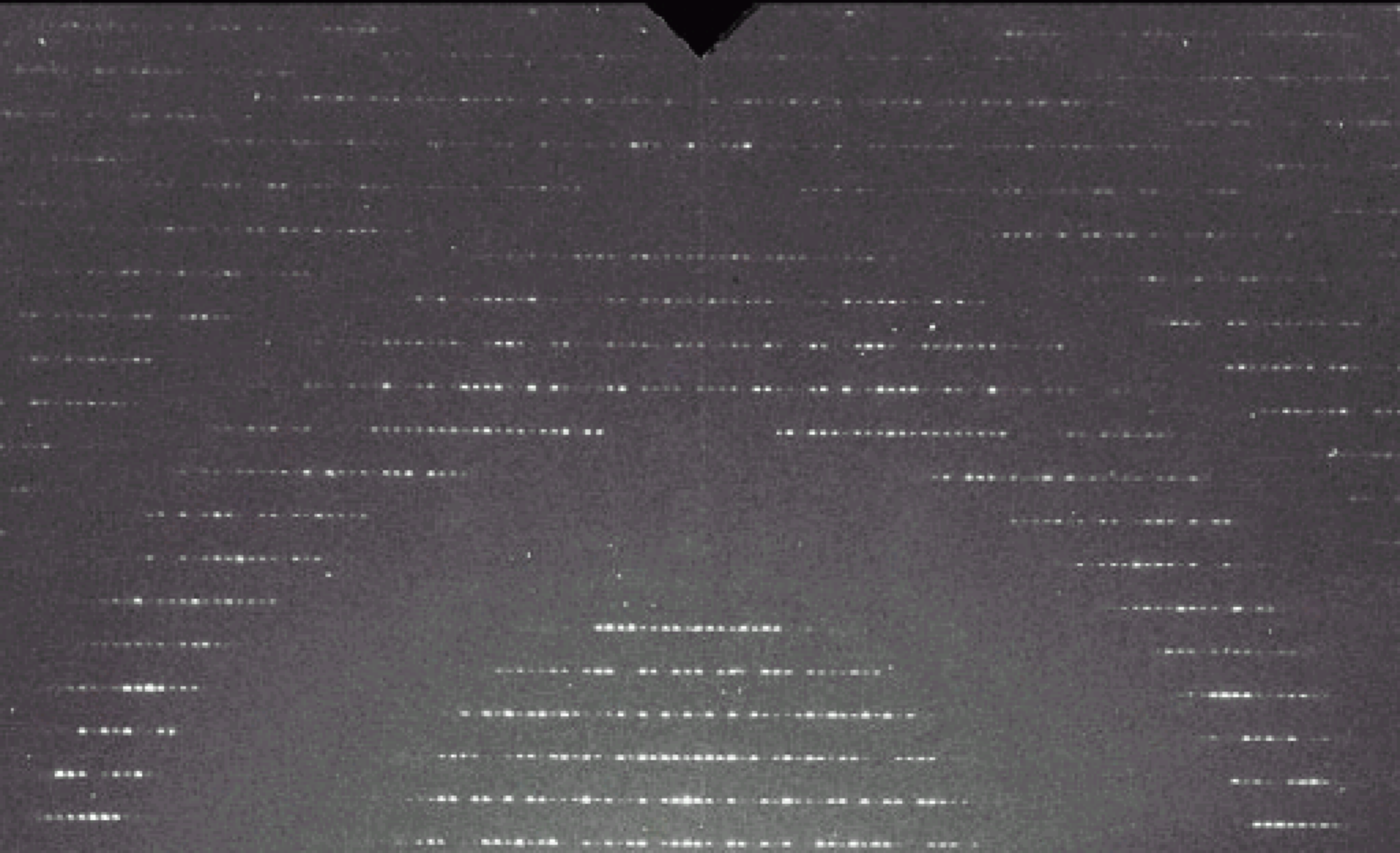
Το υλοποιήσιμο πείραμα



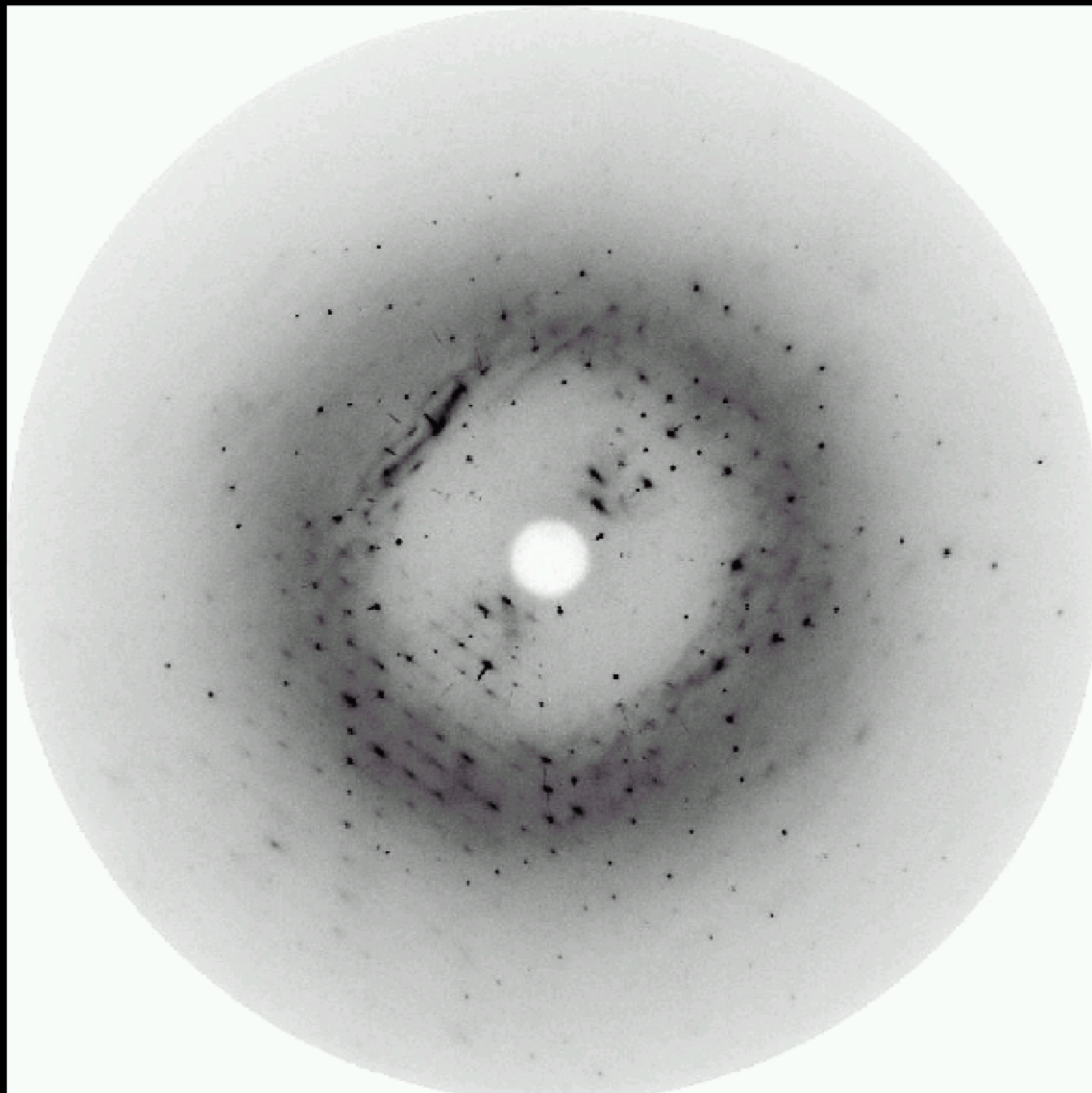
Εικόνες περίθλασης



Εικόνες περίθλασης



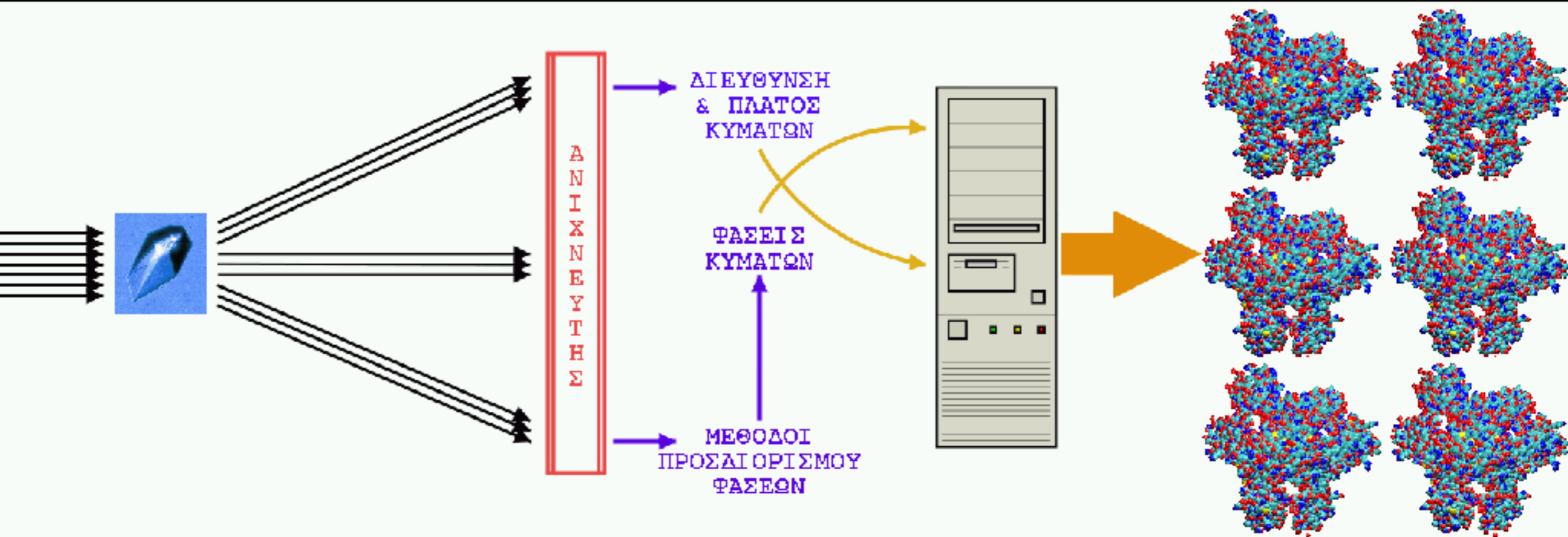
Εικόνες περίθλασης



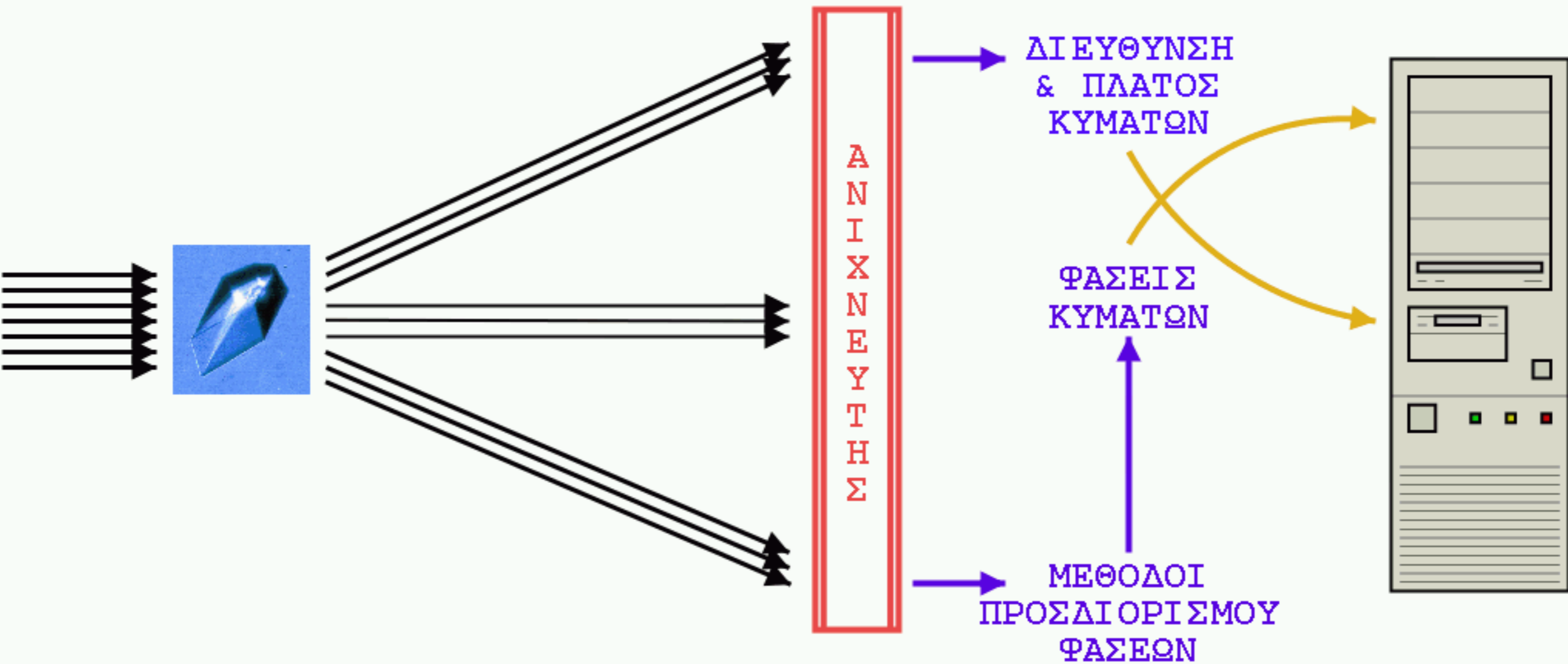
Εικόνες περίθλασης

- Από τη θέση πρόσπτωσης των περιθλώμενων κυμάτων στον ανιχνευτή και τη γνωστή σχετική θέση κρυστάλλου-ανιχνευτή προσδιορίζεται η διεύθυνση διάδοσης των κυμάτων.
- Από την ένταση ("λαμπρότητα") των κυμάτων, προσδιορίζεται το πλάτος τους.
- Εάν (με τη βοήθεια των διαφόρων μεθόδων προσδιορισμού φάσεων) γνωρίζουμε και τις φάσεις τους, μπορούμε να υπολογίσουμε το είδωλο του κρυστάλλου και συνεπώς, τη δομή του μορίου.

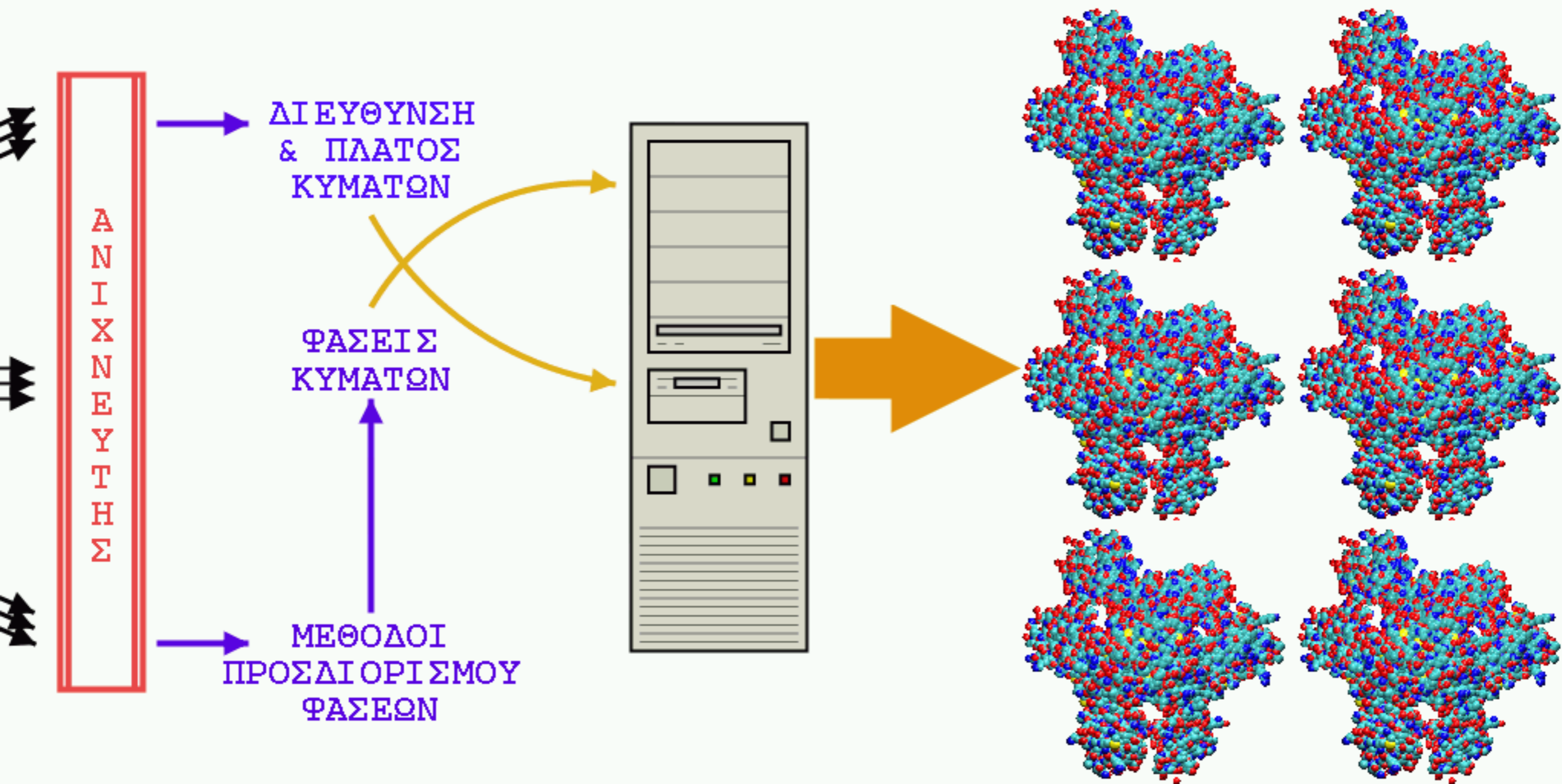
Το κρυσταλλογραφικό πείραμα



Το κρυσταλλογραφικό πείραμα



Το κρυσταλλογραφικό πείραμα



Κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ

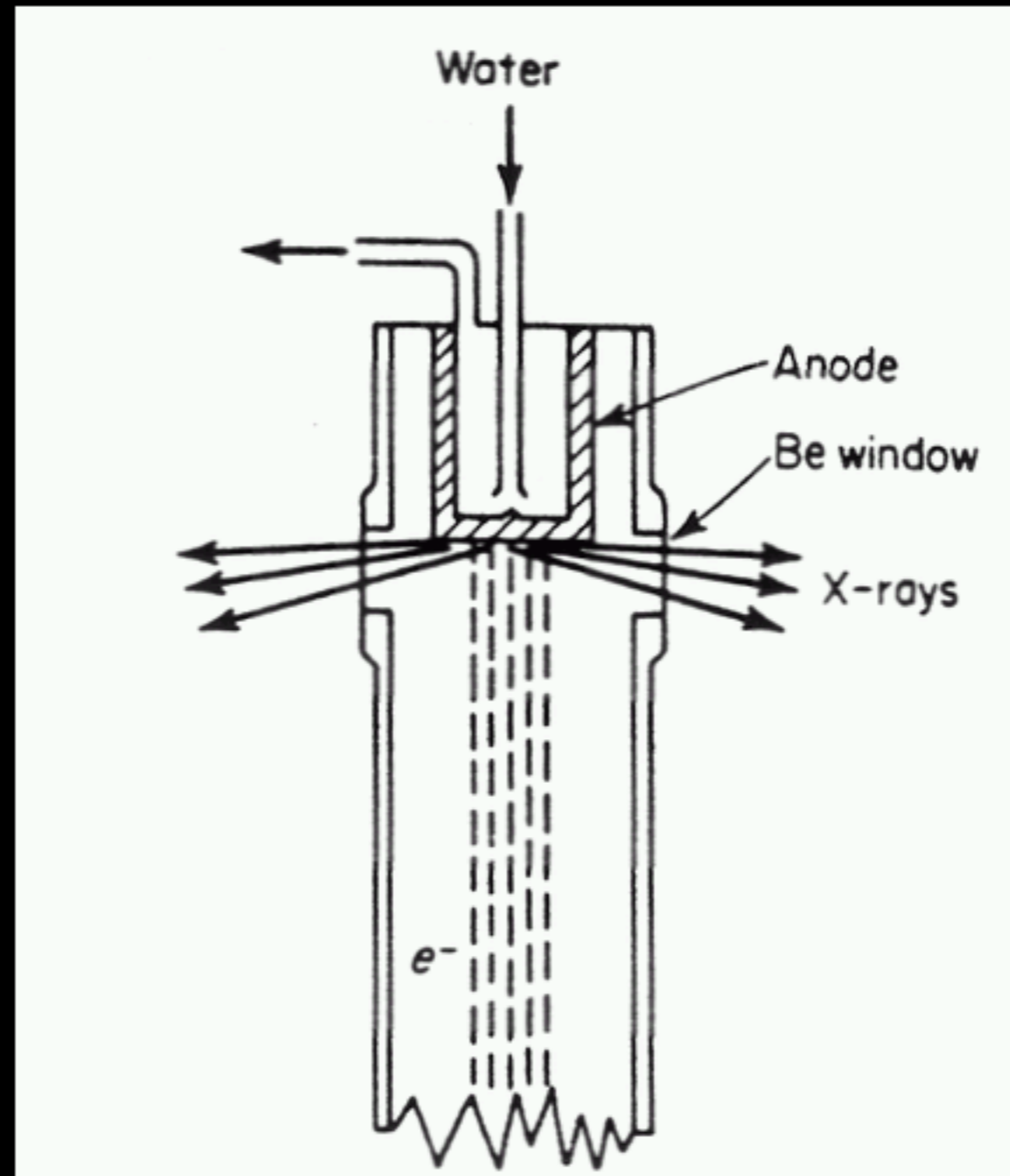
1. Παραγωγή ακτίνων-Χ

Το ζητούμενο είναι μια όσο το δυνατό ισχυρή, παράλληλη, μονοχρωματική και ομοιογενής δέσμη ακτίνων-Χ.

Οι εργαστηριακές πηγές ακτίνων-Χ χρησιμοποιούν την ακτινοβολία που παράγεται όταν ηλεκτρόνια κατάλληλης ενέργειας προσκρούουν σε ένα στόχο (μέταλλο κατάλληλου ατομικού αριθμού, συνηθέστατα χαλκός ή μολυβδαίνιο).

Κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ

1. Παραγωγή ακτίνων-Χ



Κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ

1. Παραγωγή ακτίνων-Χ

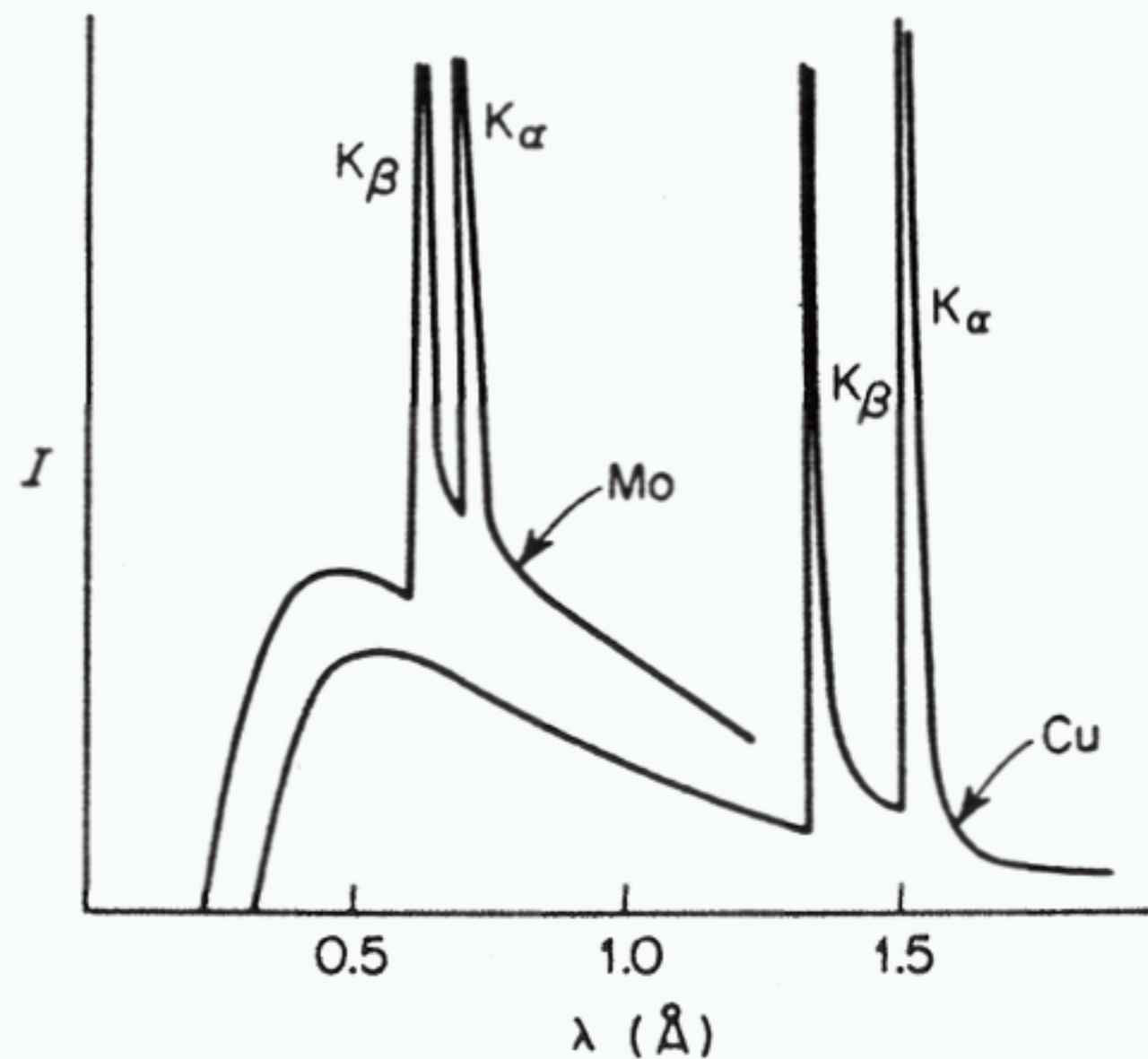
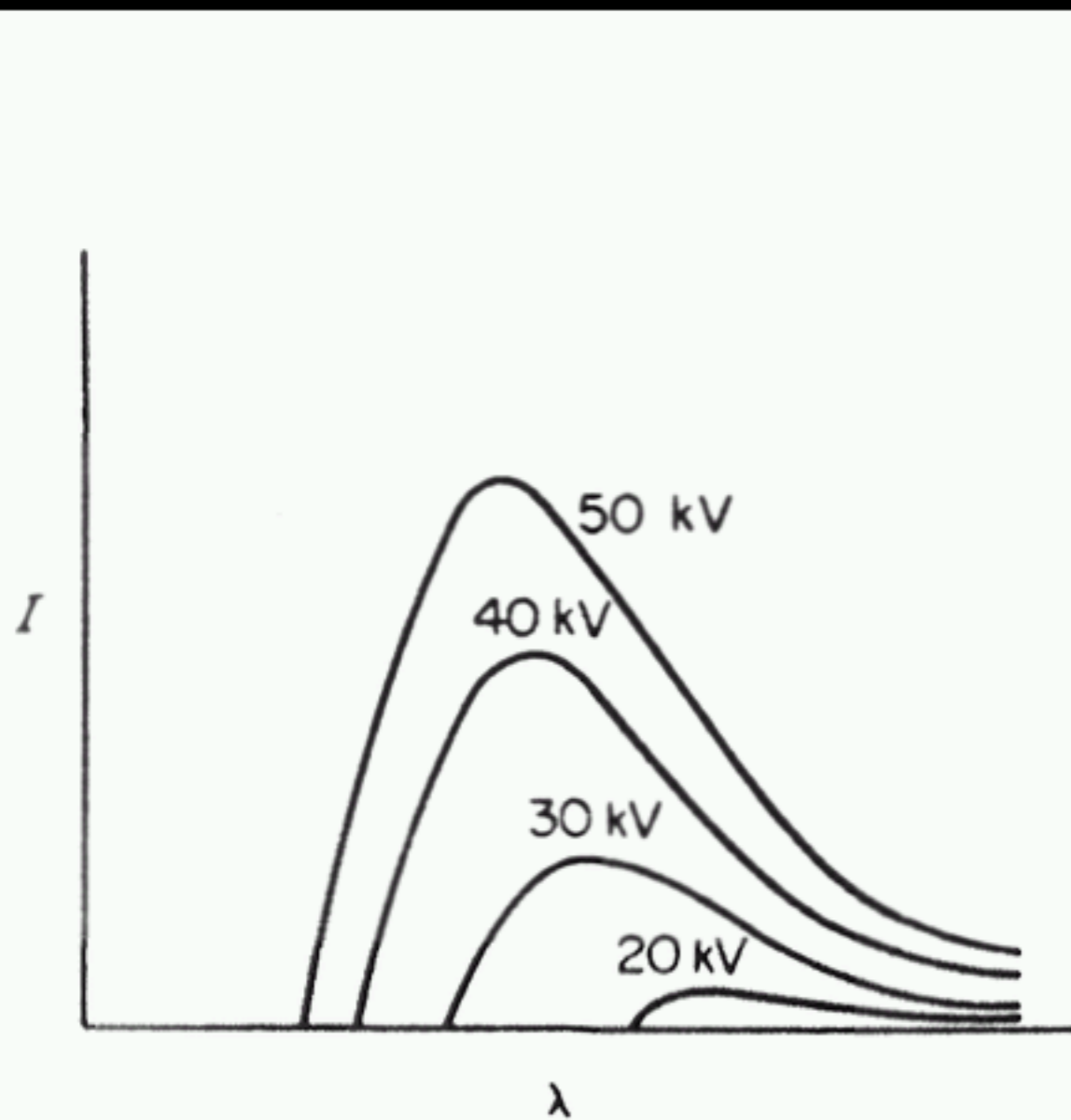
Η αποτάχυνση των ηλεκτρονίων λόγω των τυχαίων συγκρούσεων τους με τα άτομα του στόχου δημιουργεί ένα συνεχές πολυχρωματικό φάσμα (white radiation).

Όταν η ενέργεια των ηλεκτρονίων είναι κατάλληλη, προκαλούνται μεταπτώσεις ηλεκτρονίων εσωτερικών στοιβάδων του μετάλλου-στόχου (π.χ. $K \Rightarrow L$).

Η αποδιέγερση αυτών των ατόμων (π.χ. $L \Rightarrow K$), γίνεται με εκπομπή μονοχρωματικής ακτινοβολίας η συχνότητα (και συνεπώς, μήκος κύματος) της οποίας εξαρτάται από την ενεργειακή διαφορά μεταξύ των στοιβάδων και είναι χαρακτηριστική των ατόμων του στόχου (φασματικές γραμμές).

Κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ

1. Παραγωγή ακτίνων-Χ



Κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ

1. Παραγωγή ακτίνων-Χ

Το συνεχές πολυχρωματικό φάσμα (λόγω της μη μονοχρωματικότητας του) δεν είναι κατάλληλο για εργαστηριακά κρυσταλλογραφικά πειράματα και αφαιρείται μέσω της χρήσης φίλτρων, κρυστάλλων μονοχρωματισμού, ...

Οι χαρακτηριστικές φασματικές γραμμές είναι αυτές που χρησιμοποιούνται στα πειράματα.

Κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ

2. Αλληλεπίδραση ύλης/ακτίνων-Χ

Η ηλεκτρική συνιστώσα του ηλεκτρομαγνητικού κύματος δημιουργεί ένα μεταβαλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο. Επειδή η συχνότητα των ακτίνων-Χ είναι τόσο υψηλή, τα ηλεκτρόνια των ατόμων μπορούν σε καλή προσέγγιση να θεωρηθούν ελεύθερα σε αυτό το πεδίο και να θεωρηθεί συνεπώς ότι εκτελούν εξαναγκασμένη ταλάντωση με συχνότητα ίση με αυτή της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Λόγω αυτής της εξαναγκασμένης ταλάντωσης εκπέμπουν δευτερογενώς ακτινοβολία ιδίου μήκους κύματος με την προσπίπτουσα.

Κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ

2. Αλληλεπίδραση ύλης/ακτίνων-Χ

Η ολική σκέδαση από το αντικείμενο σε κάποια διεύθυνση είναι το αποτέλεσμα της συμβολής των δευτερογενώς παραγόμενων κυμάτων από κάθε ηλεκτρόνιο του αντικειμένου.

Επειδή οι πυρήνες των ατόμων είναι κατά πολύ βαρύτεροι των ηλεκτρονίων, η συνεισφορά τους στην ολική σκέδαση είναι αμελητέα.

Άρα, η σκέδαση των ακτίνων-Χ από ένα αντικείμενο εξαρτάται μόνο από την κατανομή των ηλεκτρονίων σε αυτό, και μάλιστα από μια συνάρτηση αυτής της κατανομής, τη συνάρτηση ηλεκτρονικής πυκνότητας $\rho(x,y,z)$.

Κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ

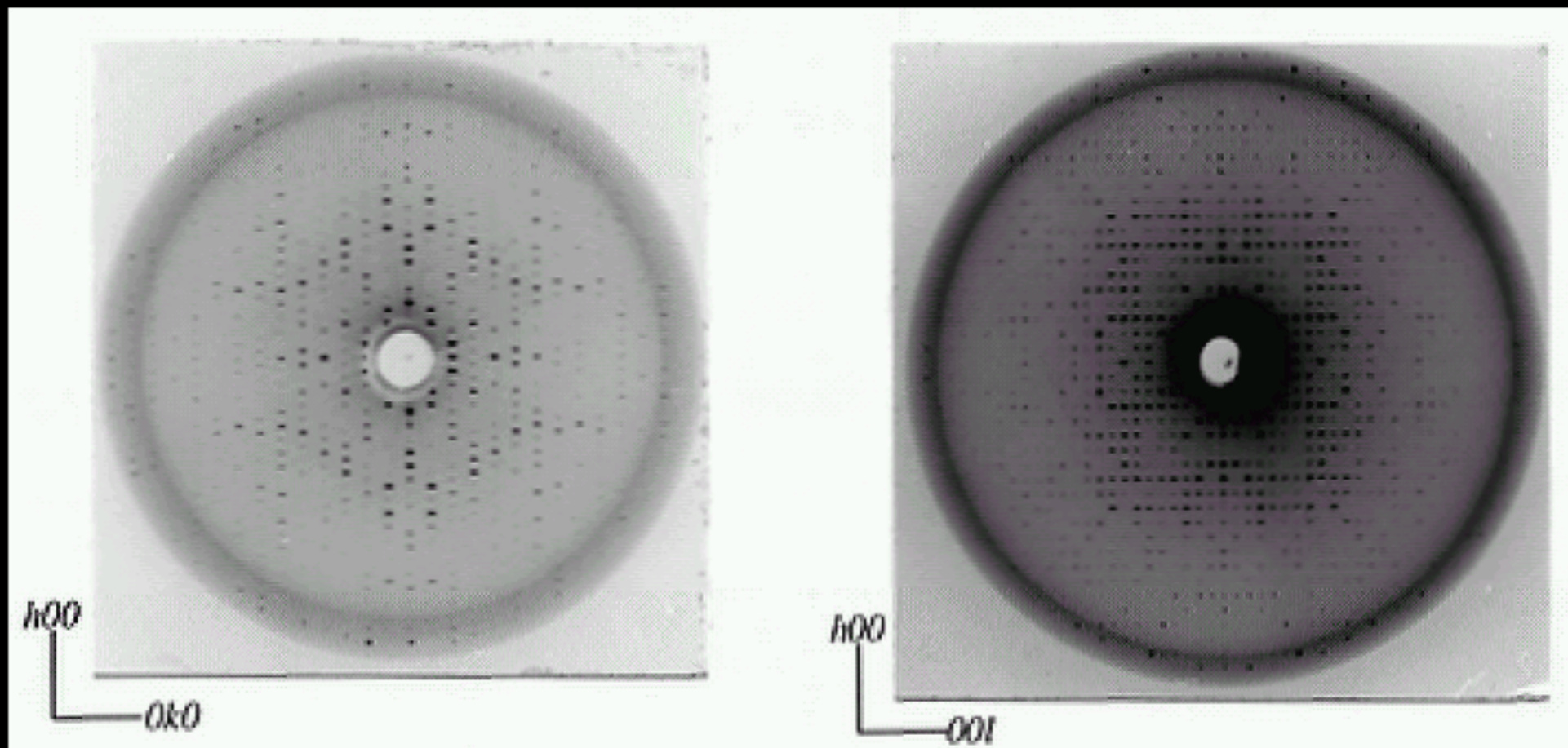
3. Αλληλεπίδραση κρυστάλλων/ακτίνων-Χ

Το μακροσκοπικό αποτέλεσμα της σκέδασης ακτίνων-Χ από κρυστάλλους ονομάζεται περίθλαση.

Η βασικότερη διαφορά ανάμεσα στην περίθλαση (από κρυστάλλους) και τη σκέδαση (από μη περιοδικά αντικείμενα) είναι ότι τα φάσματα περίθλασης είναι ασυνεχή (έχουν διακριτά μέγιστα) και συμμετρικά (ως συνέπεια της εσωτερικής συμμετρίας των κρυστάλλων).

Κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ

3. Αλληλεπίδραση κρυστάλλων/ακτίνων-Χ



Κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ

3. Ανίχνευση ακτίνων-Χ

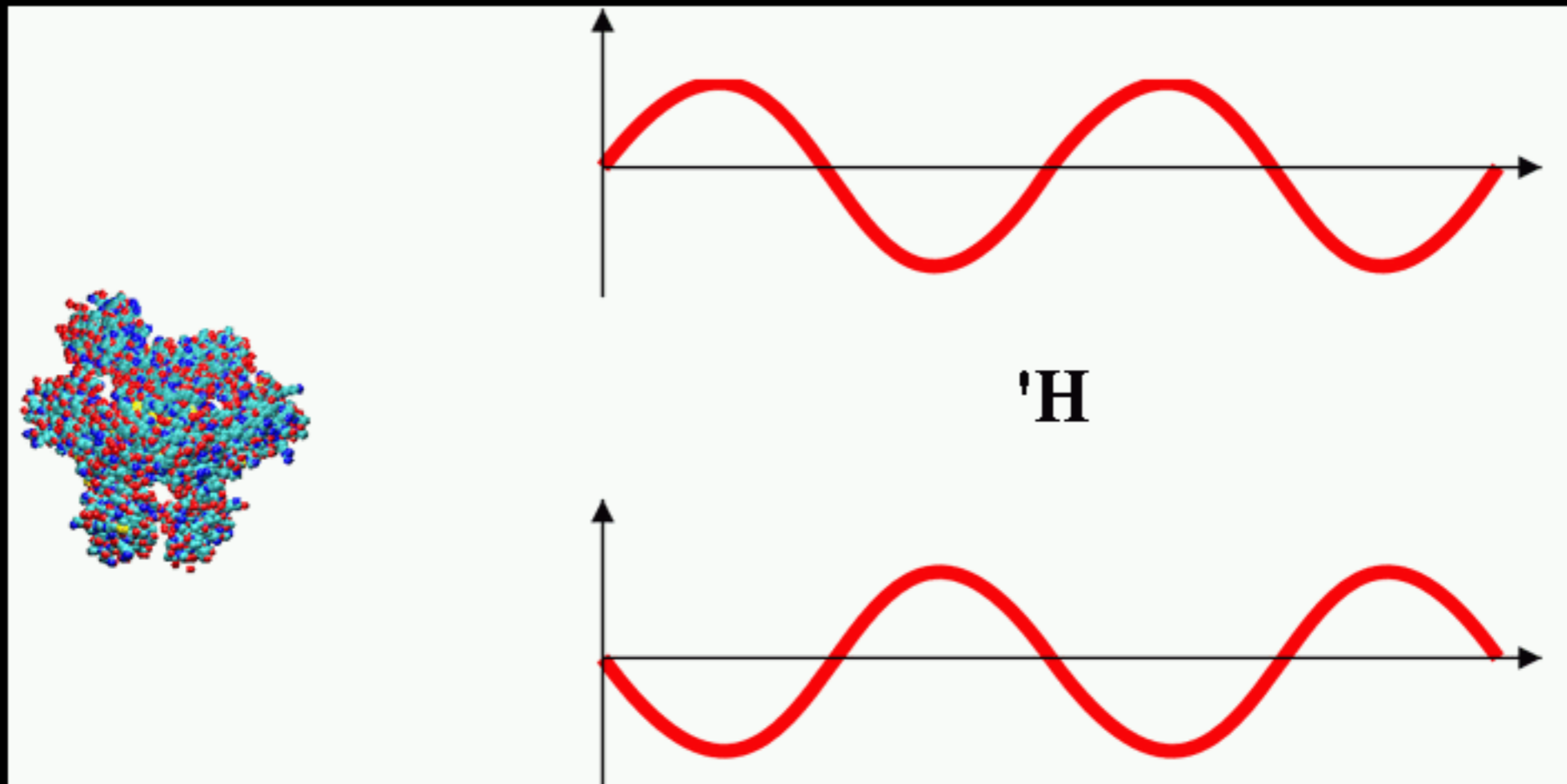
Σε χρονολογική σειρά, έχουν χρησιμοποιηθεί

- Φωτογραφικό φιλμ.
- Θάλαμοι ιονισμού (Geiger).
- Φωτοπολλαπλασιαστές (counting devices, περιθλασίμετρα).
- Ανιχνευτές επιφανείας (multiwire area detectors, imaging plates).
- CCD.

Ανάλογα με την μέθοδο ανίχνευσης, αλλάζει και ο τρόπος προσδιορισμού των πλατών των περιθλώμενων κυμάτων.

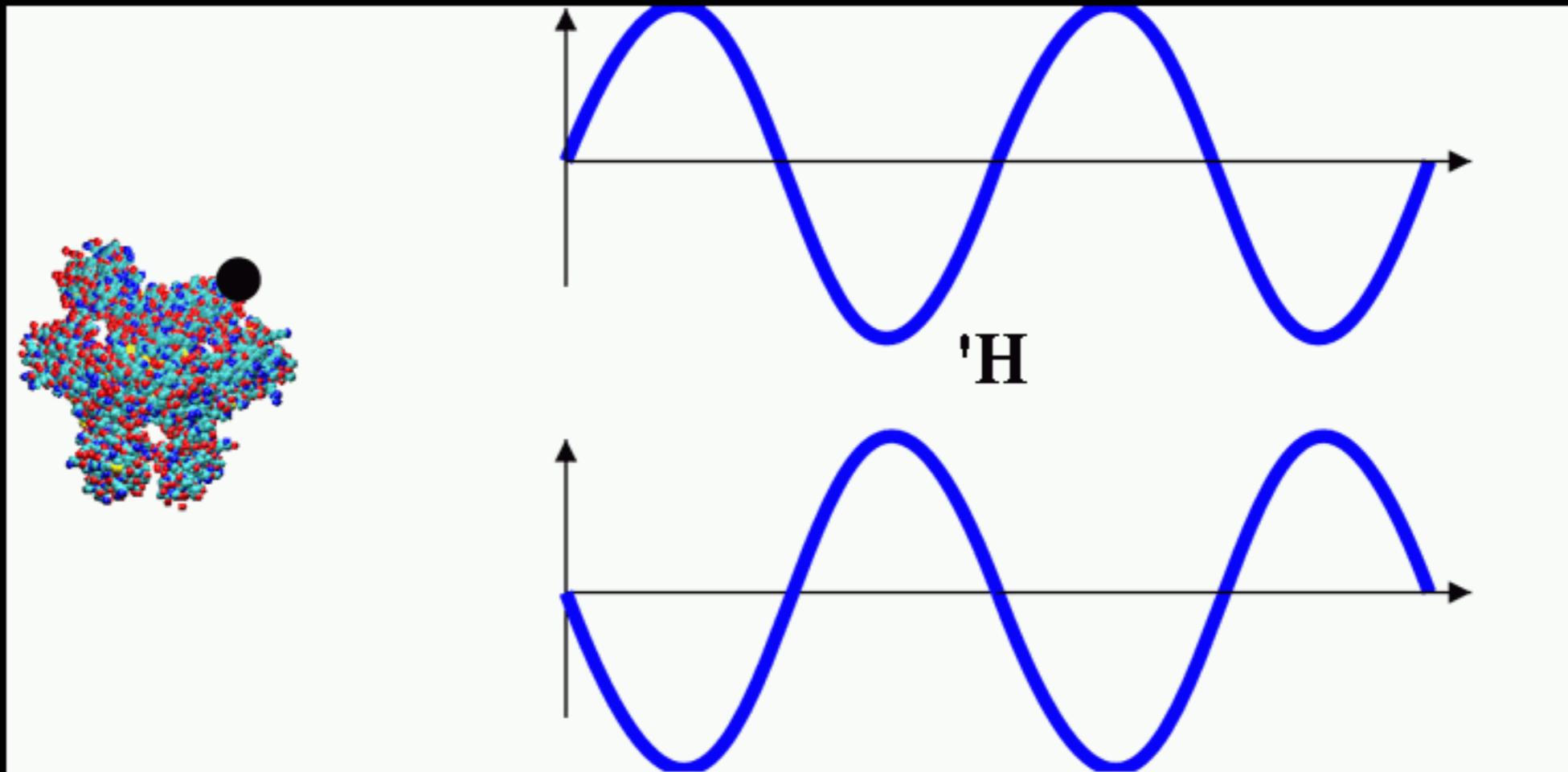
Κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ

4. Προσδιορισμός φάσεων, ένα παράδειγμα.



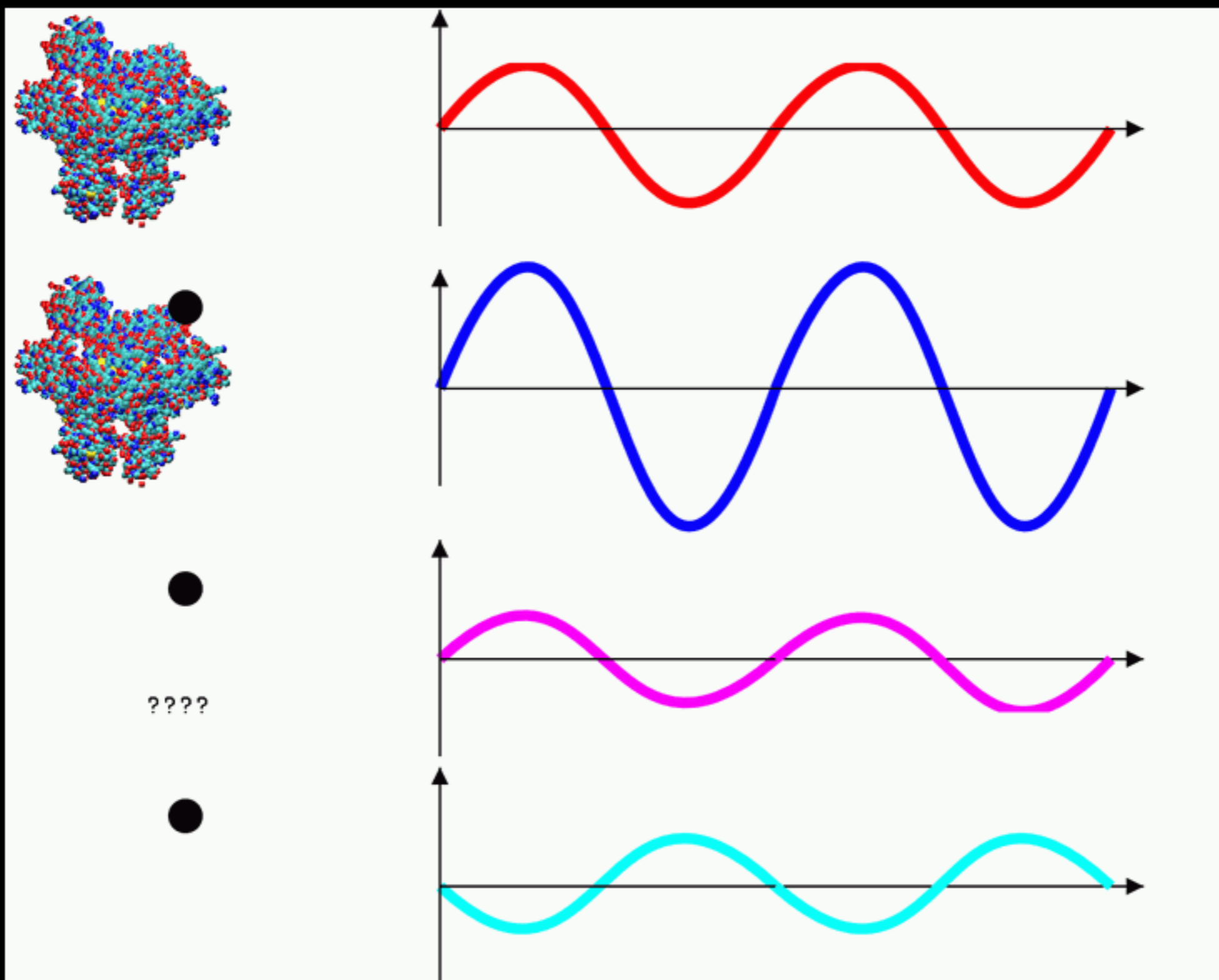
Κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ

4. Προσδιορισμός φάσεων, ένα παράδειγμα.



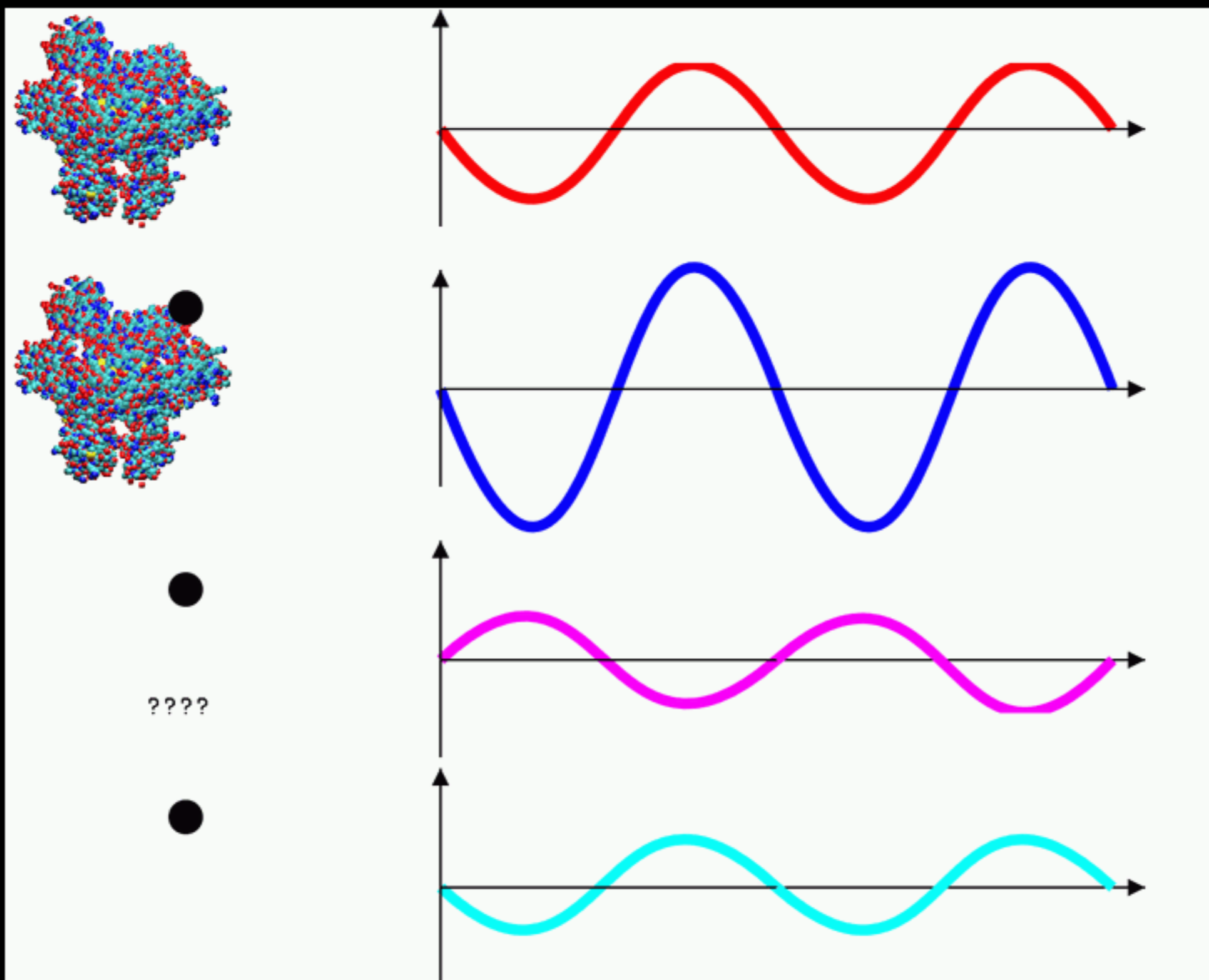
Κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ

4. Προσδιορισμός φάσεων, ένα παράδειγμα.



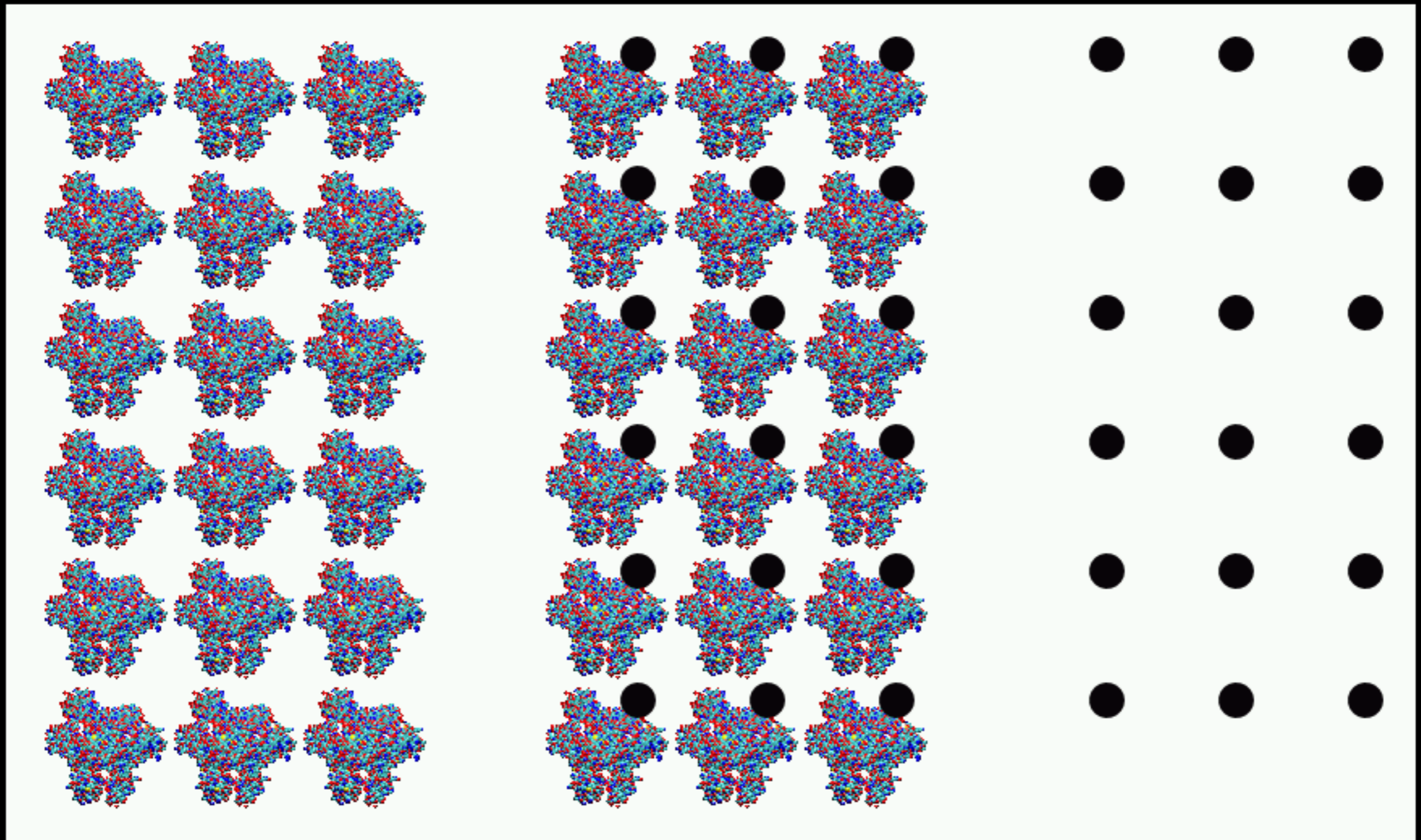
Κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ

4. Προσδιορισμός φάσεων, ένα παράδειγμα.



Κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ

4. Προσδιορισμός φάσεων, ένα παράδειγμα.



Κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ

4. Προσδιορισμός φάσεων, ένα παράδειγμα.

Αυτό που επιτύχαμε μέσω της χρήσης των επιπλέον ατόμων, είναι να υποκαταστήσουμε το πρόβλημα του προσδιορισμού της μακρομοριακής δομής (χιλιάδες άτομα), με το πρόβλημα του προσδιορισμού της δομής των βαρέων ατόμων (μερικά άτομα).

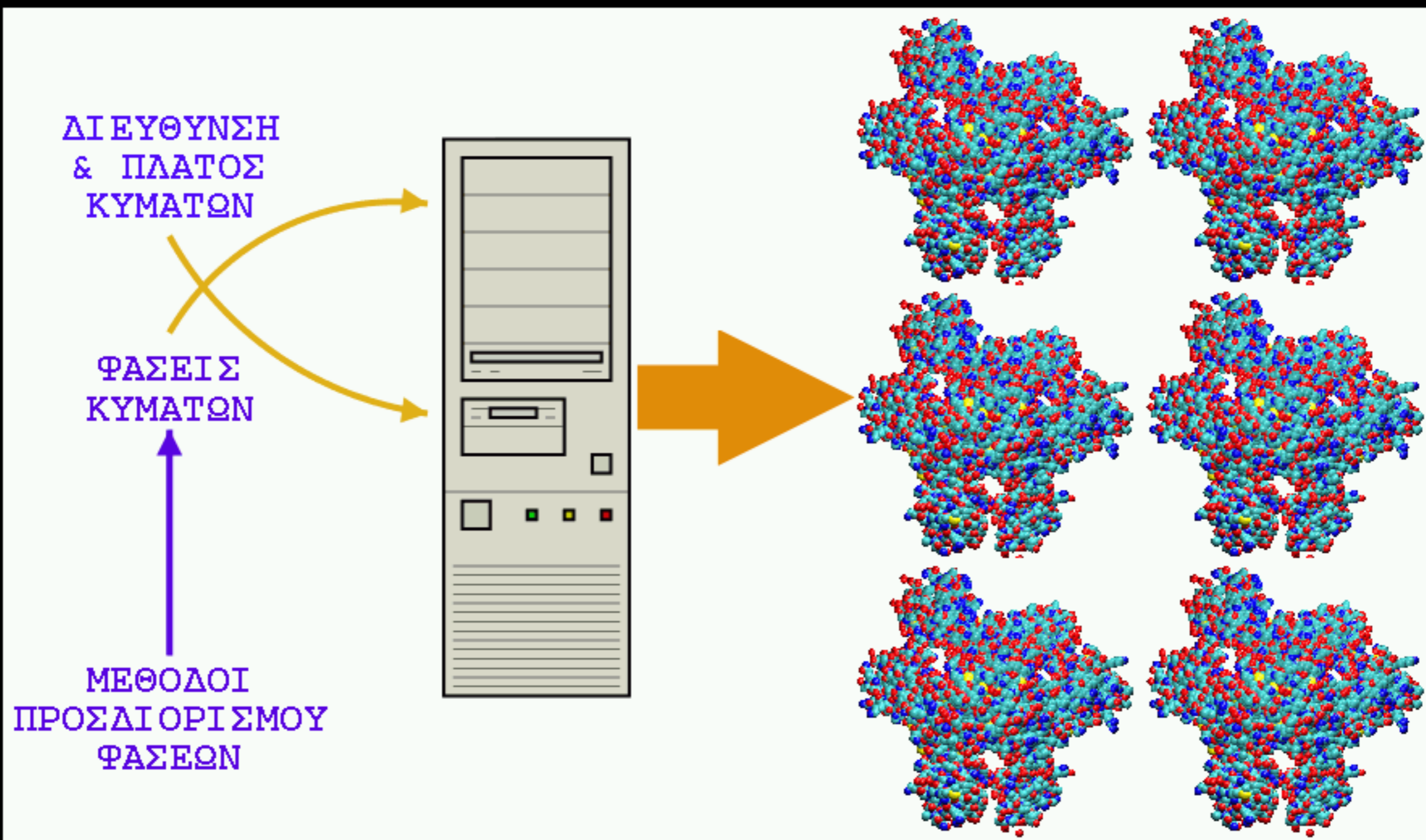
Ο προσδιορισμός της δομής των βαρέων ατόμων μπορεί να γίνει με τις λεγόμενες "άμεσες μεθόδους" (direct methods), μέσω της χρήσης της συνάρτησης Patterson, ...

Κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ

4. Προσδιορισμός φάσεων.

Η μέθοδος που προαναφέρθηκε είναι γνωστή ως η μέθοδος της "ισόμορφης αντικατάστασης". Άλλες μέθοδοι είναι : η μοριακή αντικατάσταση, μέθοδοι του στηρίζονται στην ανώμαλη σκέδαση, άμεσες μέθοδοι, κοκ.

Κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ



Κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ

5. Χάρτες ηλεκτρονικής πυκνότητας

Το πειραματικά προσδιοριζόμενο προϊόν μίας κρυσταλλογραφικής μελέτης είναι ένας λεγόμενος "χάρτης ηλεκτρονικής πυκνότητας". Πρόκειται για μια συνάρτηση που περιγράφει τον μέσο αριθμό ηλεκτρονίων (ανά μονάδα όγκου) σε κάθε σημείο (x,y,z) του κρυστάλλου [λόγω της περιοδικότητας των κρυστάλλων, αρκεί να γνωρίζουμε τις τιμές της συνάρτησης $\rho(xyz)$ σε κάθε σημείο του επαναλαμβανόμενου μοτίβου]. Η κρυσταλλογραφική μελέτη ολοκληρώνεται με την ΕΡΜΗΝΕΙΑ αυτής της συνάρτησης με τη μορφή ενός ατομικού μοντέλου.

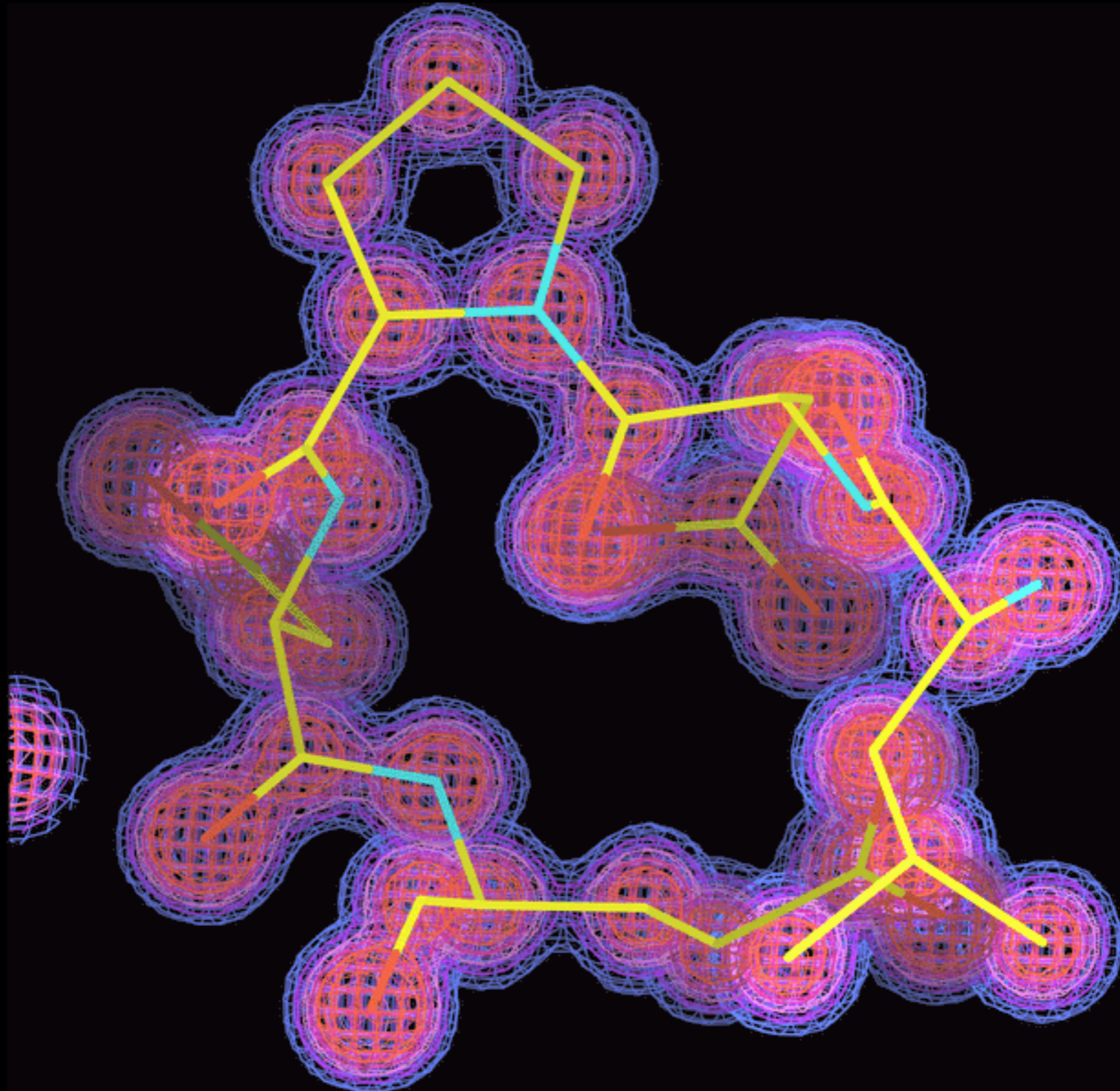
Κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ

5. Χάρτες ηλεκτρονικής πυκνότητας

Το πόσο υποκειμενική είναι η ερμηνεία ενός χάρτη ηλεκτρονικής πυκνότητας (δηλ. το κατά πόσο ένας άλλος ερευνητής θα κατασκεύαζε από τον ίδιο χάρτη ένα διαφορετικό ατομικό μοντέλο) είναι συνάρτηση της ποιότητας του χάρτη ηλεκτρονικής πυκνότητας. Η βασικότερη παράμετρος είναι η διακριτικότητα, αλλά και μια πληθώρα άλλων παραμέτρων είναι καθοριστικής σημασίας, όπως για παράδειγμα : πειραματικά σφάλματα στα πλάτη, αλλά κυρίως στις φάσεις των περιθλώμενων κυμάτων, υψηλή κινητικότητα των ατόμων του μορίου, εμπειρία του ερευνητή, ...

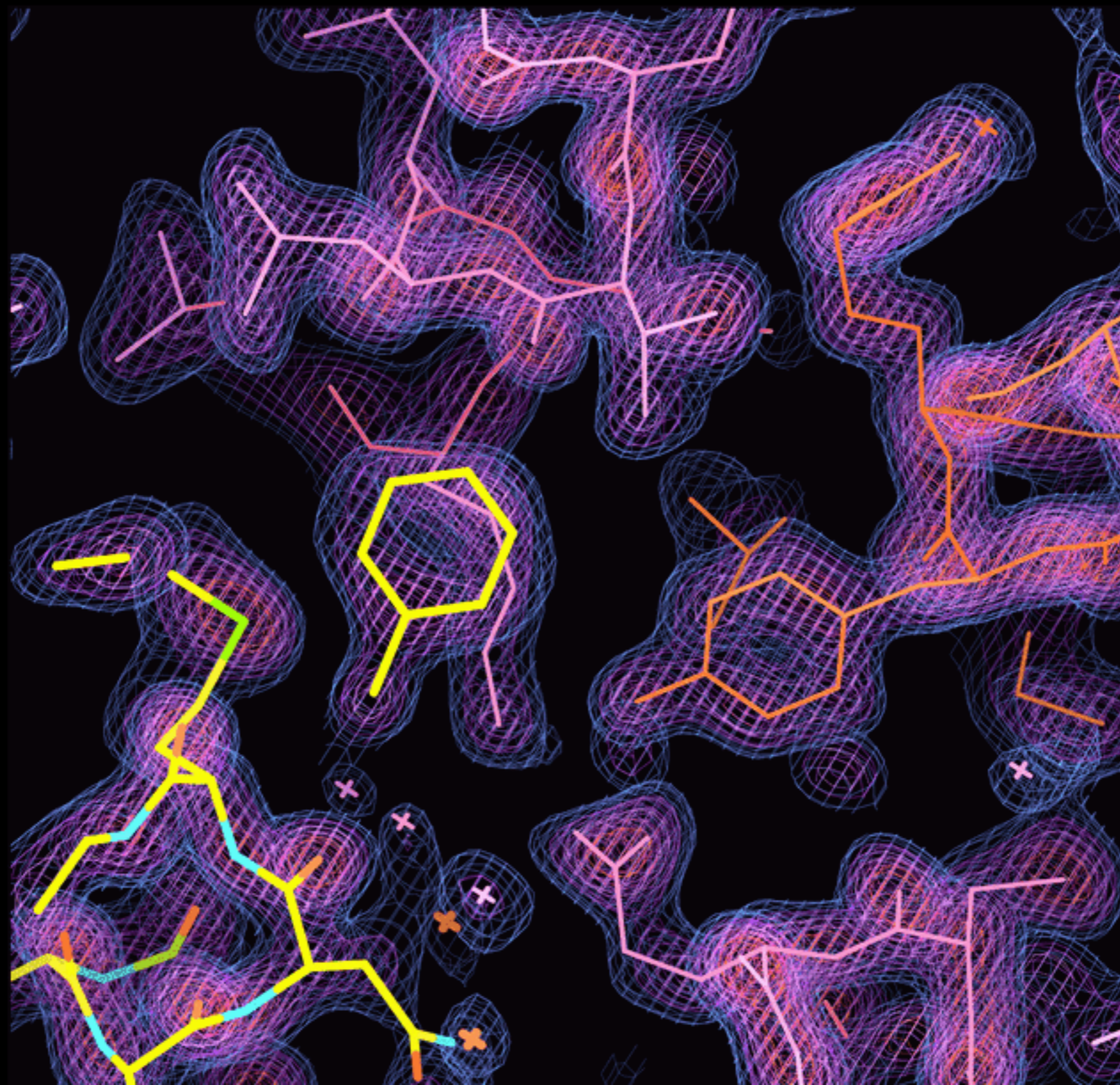
Κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ

5. Χάρτες ηλεκτρονικής πυκνότητας, παραδείγματα



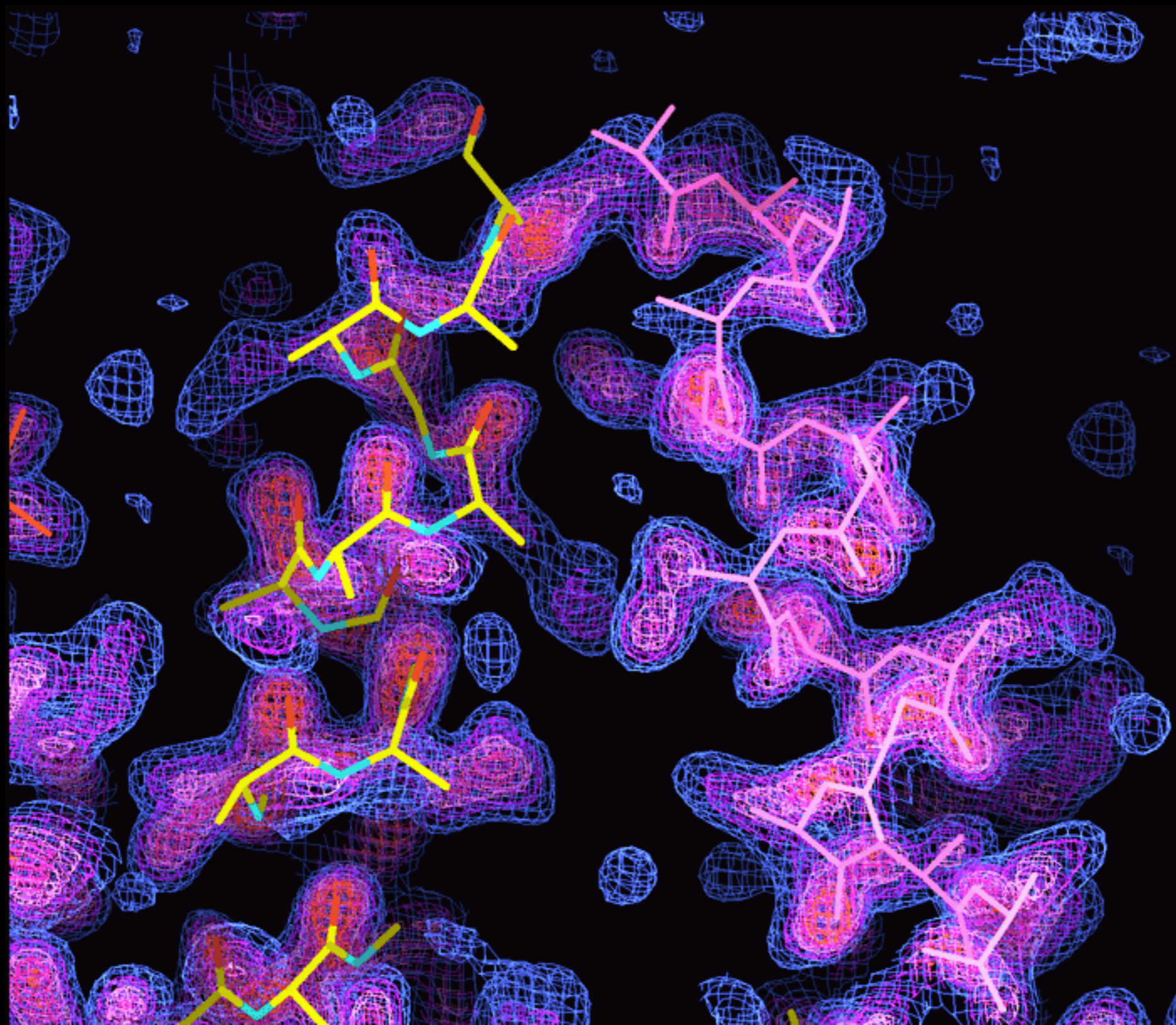
Κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ

5. Χάρτες ηλεκτρονικής πυκνότητας, παραδείγματα



Κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ

5. Χάρτες ηλεκτρονικής πυκνότητας, παραδείγματα



Κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ

5. Χάρτες ηλεκτρονικής πυκνότητας

Συνηθέστατα, οι κρύσταλλοι βιομακρομορίων είναι ακατάλληλοι για μελέτες σε ατομική διακριτικότητα. Για το λόγο αυτό, προκειμένου να ερμηνευθούν οι χάρτες ηλεκτρονικής πυκνότητας απαιτείται (και εκτενώς χρησιμοποιείται) έξωθεν πληροφορία όπως η χημική σύσταση του μορίου, μήκη και γωνίες δεσμών, συνήθεις διαμορφώσεις του σκελετού του μορίου (π.χ. α-έλικα), συνήθεις διαμορφώσεις πλευρικών ομάδων, ...

Κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ

6. Το προϊόν

ATOM	1	N	MET	A	1	-27.205	33.051	50.562	1.00	64.16
ATOM	2	CA	MET	A	1	-26.715	32.066	49.556	1.00	49.95
ATOM	3	C	MET	A	1	-25.221	31.819	49.718	1.00	47.86
ATOM	4	O	MET	A	1	-24.430	32.758	49.767	1.00	60.90
ATOM	5	CB	MET	A	1	-26.996	32.574	48.139	1.00	67.77
ATOM	6	CG	MET	A	1	-26.663	31.576	47.042	1.00	67.37
ATOM	7	SD	MET	A	1	-27.271	32.080	45.416	1.00	81.10
ATOM	8	CE	MET	A	1	-26.801	33.812	45.390	1.00	83.44
ATOM	9	N	THR	A	2	-24.839	30.550	49.793	1.00	31.28
ATOM	10	CA	THR	A	2	-23.436	30.184	49.949	1.00	31.78
ATOM	11	C	THR	A	2	-22.705	30.260	48.608	1.00	43.24
ATOM	12	O	THR	A	2	-23.334	30.322	47.553	1.00	36.34
ATOM	13	CB	THR	A	2	-23.300	28.755	50.514	1.00	35.21

.....

Κρυσταλλογραφία

Μέρος 2ο

Σκέδαση ακτινοβολίας από
αυθαίρετα (μη περιοδικά αντικείμενα).
Εισαγωγή στους μετασχηματισμούς Fourier.

Κρυσταλλογραφία

Με μια μικρή μόνο δόση υπερβολής, η κρυσταλλογραφία είναι 'συμμετρία + μετασχηματισμοί Fourier'.

Το σύνολο σχεδόν της κρυσταλλογραφικής θεωρίας ανάγεται ή μπορεί να αναχθεί σε αυτά τα βασικά κεφάλαια.

Αποτέλεσμα της ισχυρής αναλυτικής θεμελίωσης της κρυσταλλογραφίας είναι ότι για την παρουσίαση των περισσότερων κρυσταλλογραφικών μεθόδων αρκεί μια εξίσωση, η εξίσωση του παράγοντα δομής (η οποία από μόνη της αποτελεί το θεμέλιο λίθο του συνόλου της υπολογιστικής κρυσταλλογραφίας).

Παράγοντας δομής

Είναι η μαθηματική περιγραφή ενός περιθλώμενου (από έναν κρύσταλλο) κύματος ως συνάρτηση της κατανομής των ηλεκτρονίων του κρυστάλλου. Η εξίσωση του παράγοντα δομής είναι μια ειδική περίπτωση της εξίσωσης που περιγράφει τη σκέδαση ακτινοβολίας από ένα αυθαίρετο (περιοδικό ή μη περιοδικό) αντικείμενο. Το φυσικό ανάλογο της εξίσωσης του παράγοντα δομής είναι ο φακός : Μέσω αυτής της εξίσωσης μπορούμε γνωρίζοντας το φάσμα περίθλασης να προσδιορίσουμε το αντικείμενο, και αντίστροφα, γνωρίζοντας το αντικείμενο να προβλέψουμε το φάσμα περίθλασης. Μερικές από τις εκφάνσεις της εξίσωσης του παράγοντα δομής είναι :

Υπολογιστική κρυσταλλογραφία

$$\vec{F}_{hkl} = \int_x \int_y \int_z \rho(xyz) e^{2\pi i(hx+ky+lz)} dV$$

$$\vec{F}_{hkl} = \sum_i f_{i,h} e^{2\pi i(hx+ky+lz)}$$

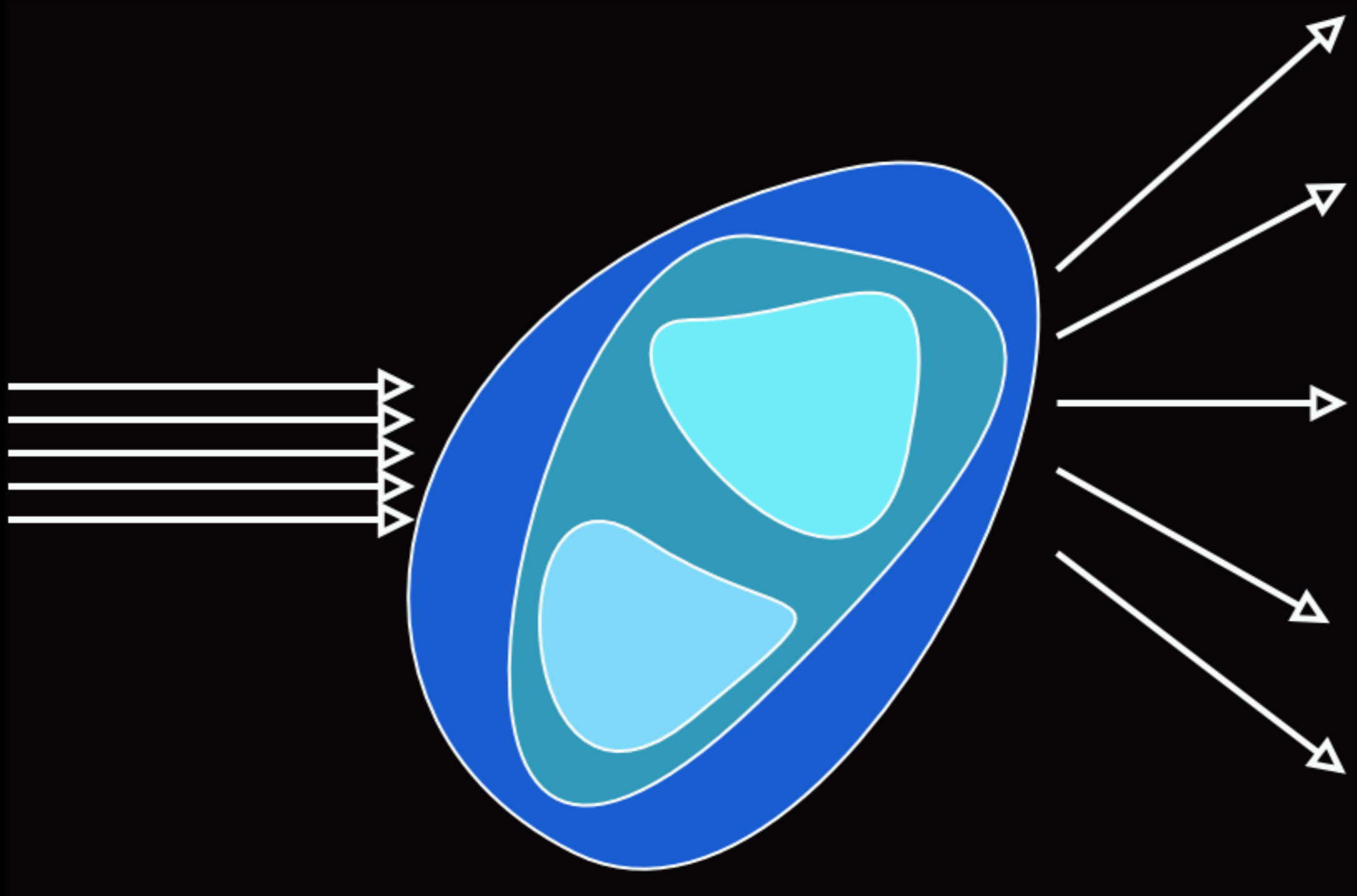
$$\rho(xyz) = \sum_{hkl} \vec{F}_{hkl} e^{-2\pi i(hx+ky+lz)}$$

Σκέδαση ακτινοβολίας

Οι εξισώσεις Fourier, ο παράγοντας δομής, κλπ, όχι μόνο δεν απαιτούνται για την ανάλυση του πως ένα αντικείμενο σκεδάζει προσπίπτουσα ακτινοβολία, αλλά αντίθετα προκύπτουν ως προϊόντα της ανάλυσης.

Η ανάλυση του φαινομένου της σκέδασης ακτινοβολίας από ένα αυθαίρετο (περιοδικό ή μη περιοδικό) αντικείμενο το μόνο που απαιτεί είναι στοιχειώδεις γνώσεις άλγεβρας. Στόχος των διαφανειών που ακολουθούν είναι η απόδειξη της εξίσωσης που περιγράφει τη σχέση ανάμεσα σε ένα αυθαίρετο αντικείμενο και τη σκέδαση από αυτό.

Το πείραμα



Το ζητούμενο

- Εάν γνωρίζουμε τη δομή ενός αντικειμένου, πως μπορούμε να υπολογίσουμε το φάσμα περίθλασης από το αντικείμενο ; (δηλαδή τις διευθύνσεις, πλάτη και φάσεις των περιθλώμενων κυμάτων).
- Εάν γνωρίζουμε το φάσμα περίθλασης ενός αντικειμένου, πως μπορούμε να υπολογίσουμε τη δομή του ;

Σκέδαση ακτινοβολίας

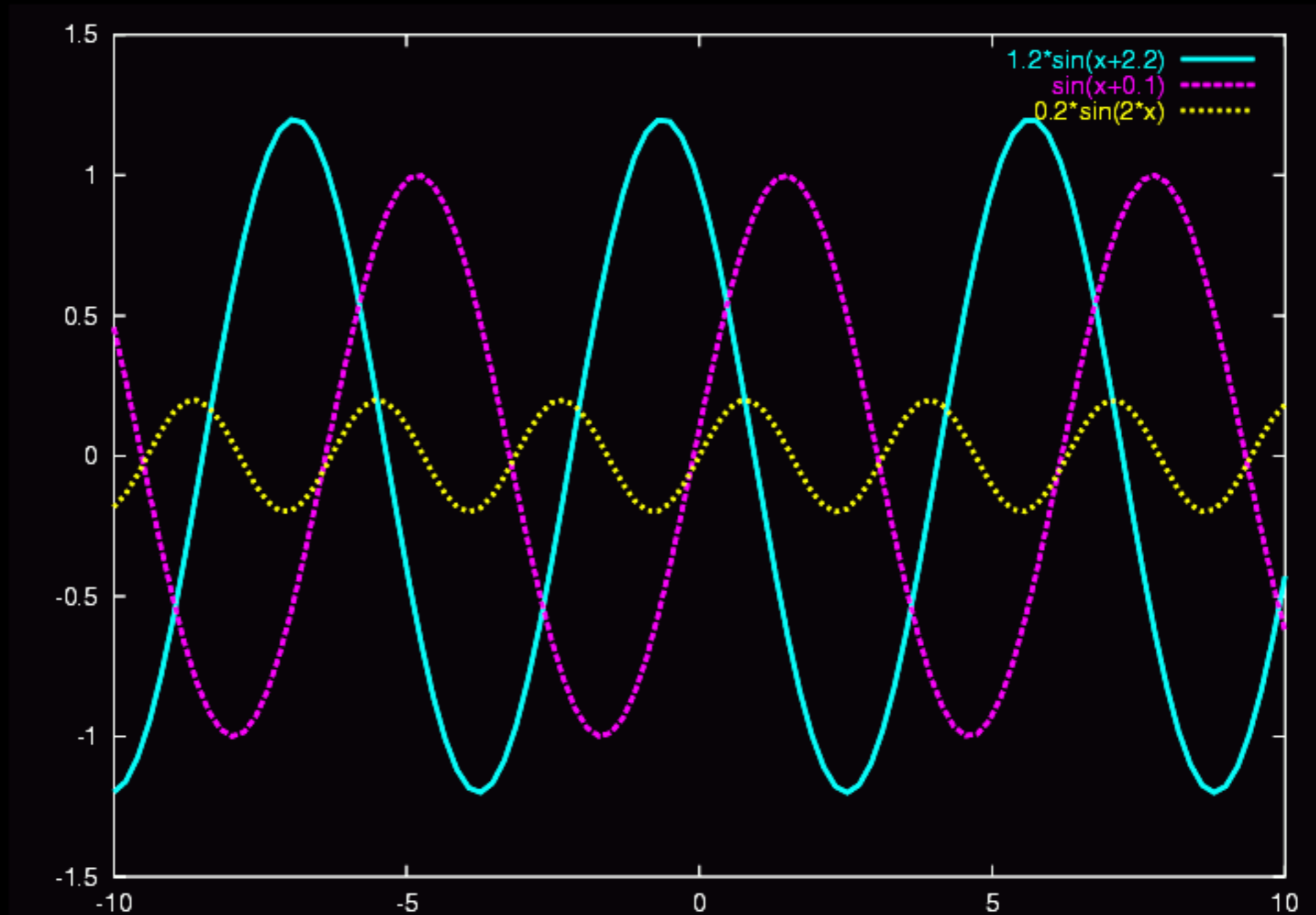
Μιας και αυτό που κυρίως μας ενδιαφέρει είναι η σκέδαση ακτίνων X , από εδώ και πέρα θα περιγράψουμε τα αντικείμενα ως συνάρτηση της κατανομής ηλεκτρονίων σε αυτά (για την ακρίβεια, ως συνάρτηση της ηλεκτρονικής τους πυκνότητας $\rho(r)$).

Η προς απόδειξη και ερμηνεία εξίσωση είναι :

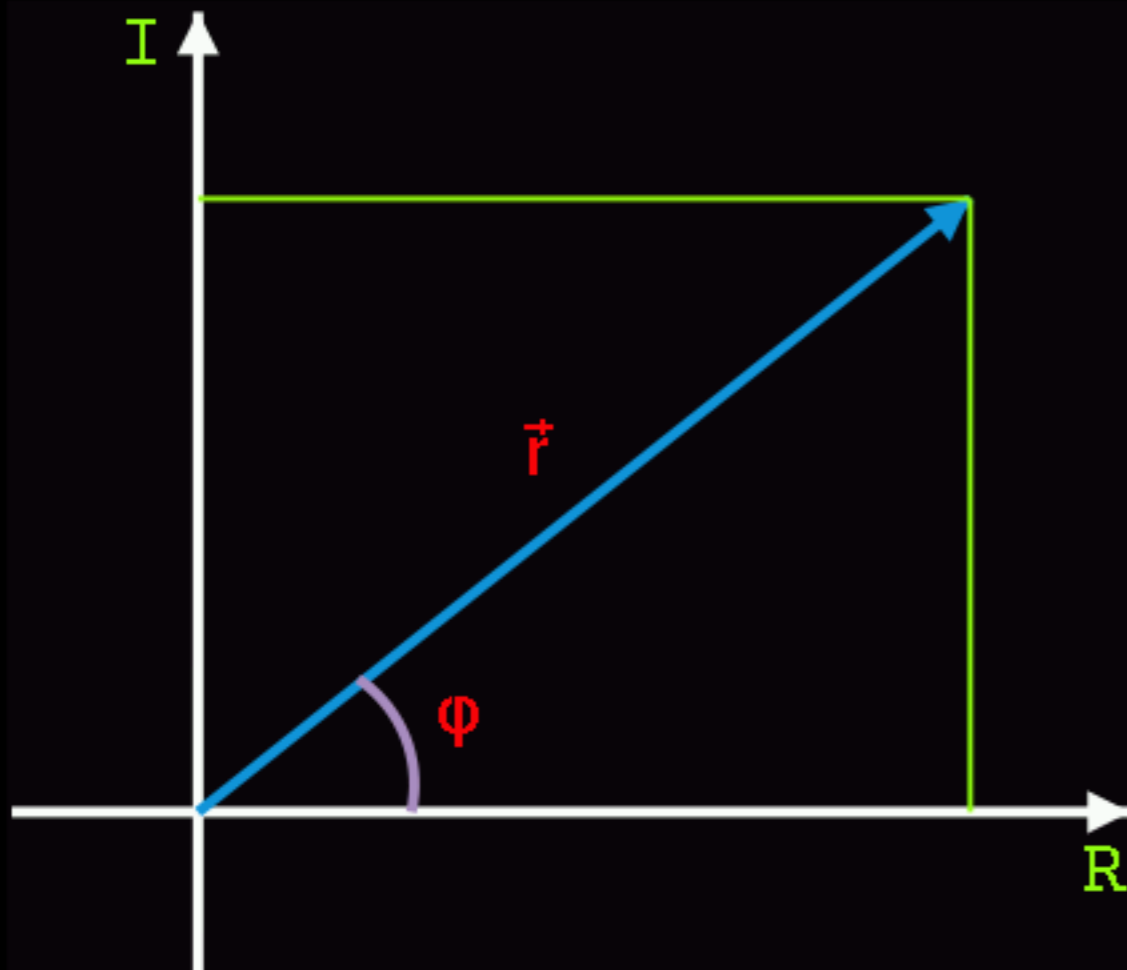
$$\vec{F}_{\vec{h}} = \int_V \rho(\vec{r}) e^{2\pi i \vec{r} \cdot \vec{h}} dV$$

Κύματα

Ένα κύμα περιγράφεται πλήρως από : πλάτος, φάση, μήκος κύματος ($v=c/\lambda$) και διεύθυνση διάδοσης.



Μιγαδική περιγραφή κυμάτων



$$\mathcal{R}_{\vec{r}} = |\vec{r}| \cos \phi$$

$$\mathcal{I}_{\vec{r}} = i|\vec{r}| \sin \phi$$

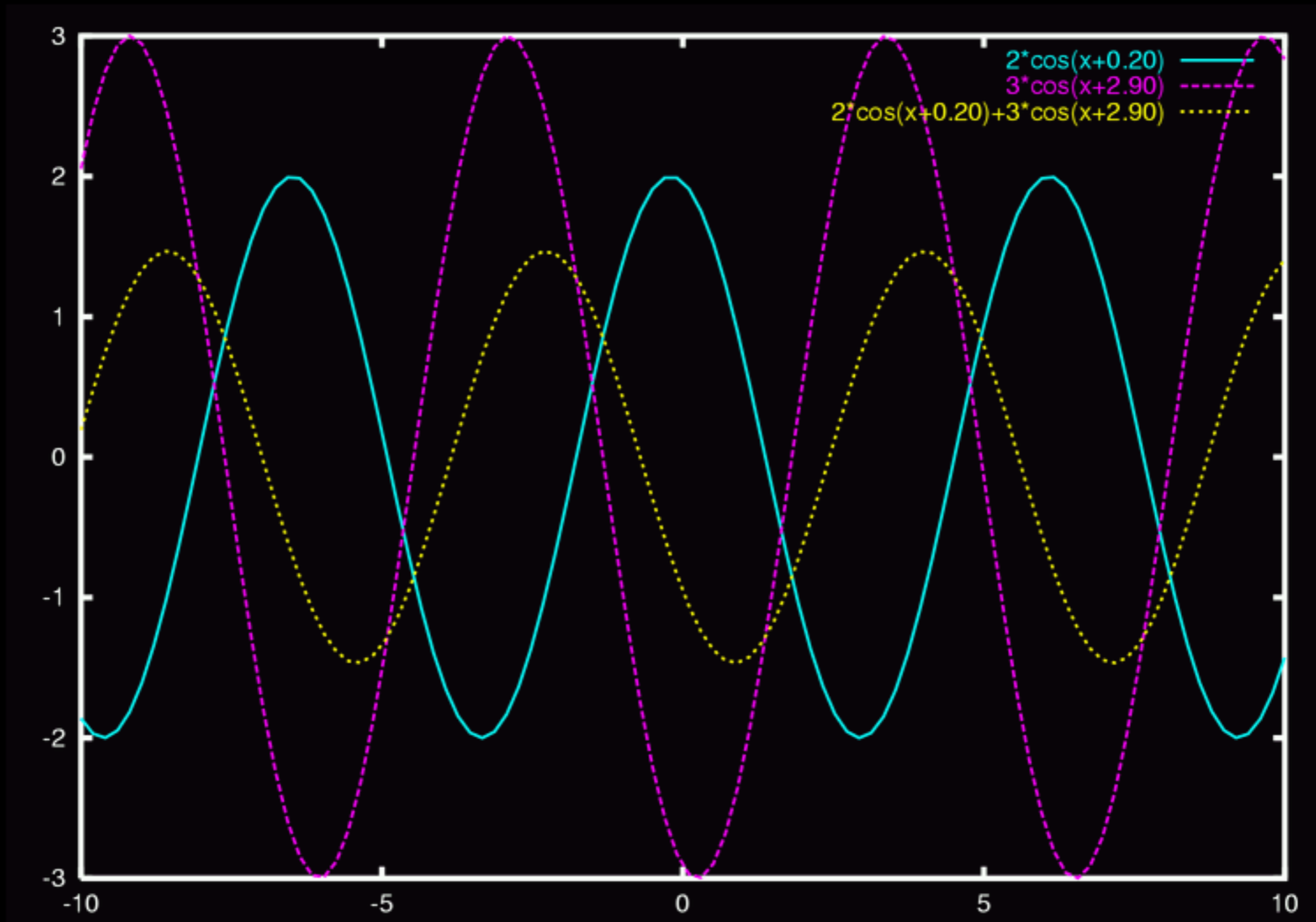
$$\begin{aligned}\vec{r} &= |\vec{r}| \cos \phi + i|\vec{r}| \sin \phi \\ &= |\vec{r}| (\cos \phi + i \sin \phi) \\ &= |\vec{r}| e^{i\phi}\end{aligned}$$

$$e^x = 1 + x + x^2/2! + x^3/3! + \dots$$

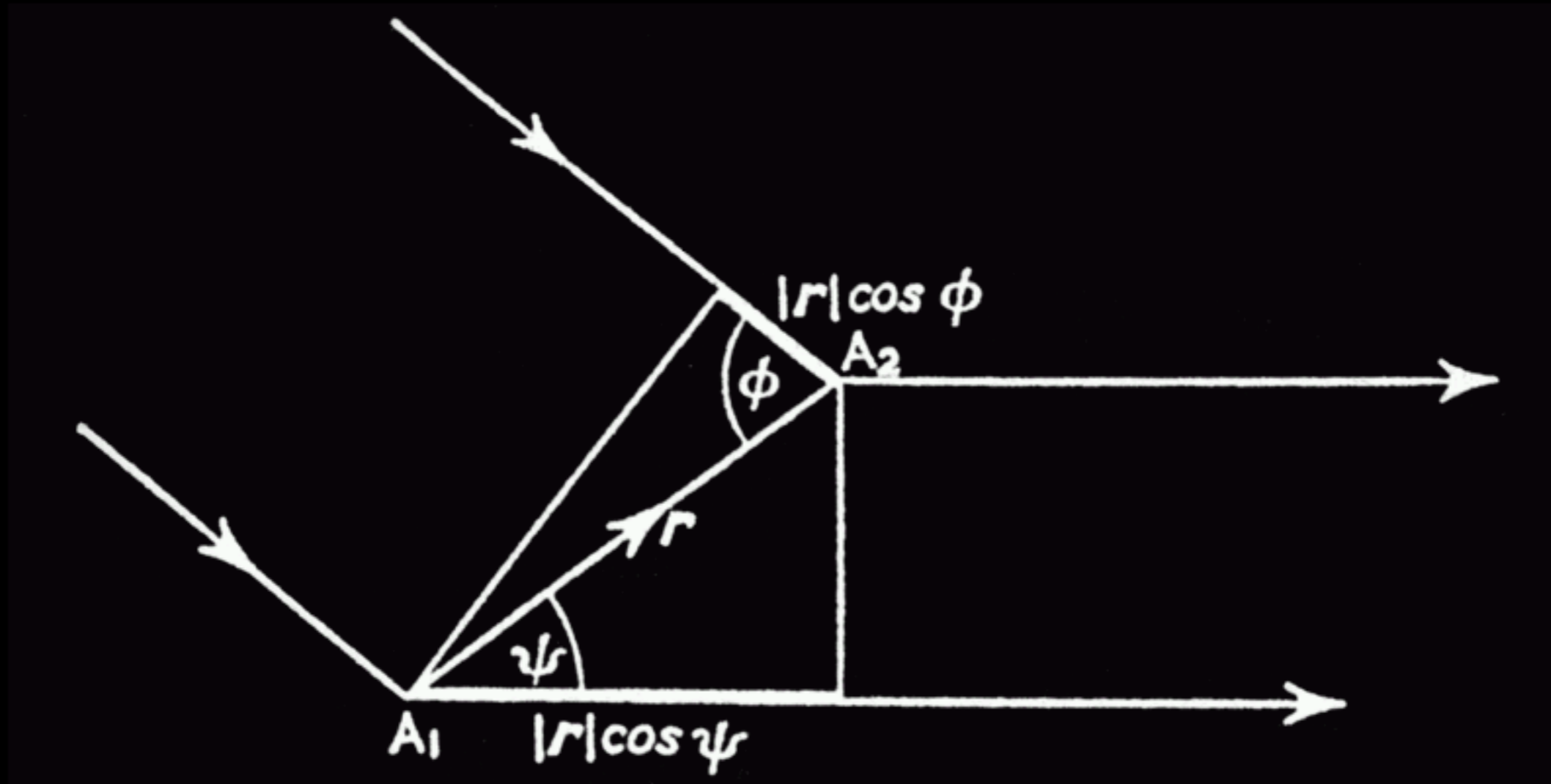
$$\cos x = 1 - x^2/2! + x^4/4! - \dots$$

$$\sin x = x - x^3/3! + x^5/5! - \dots$$

Διαφορά φάσεων κυμάτων



Διαφορά φάσεων κυμάτων



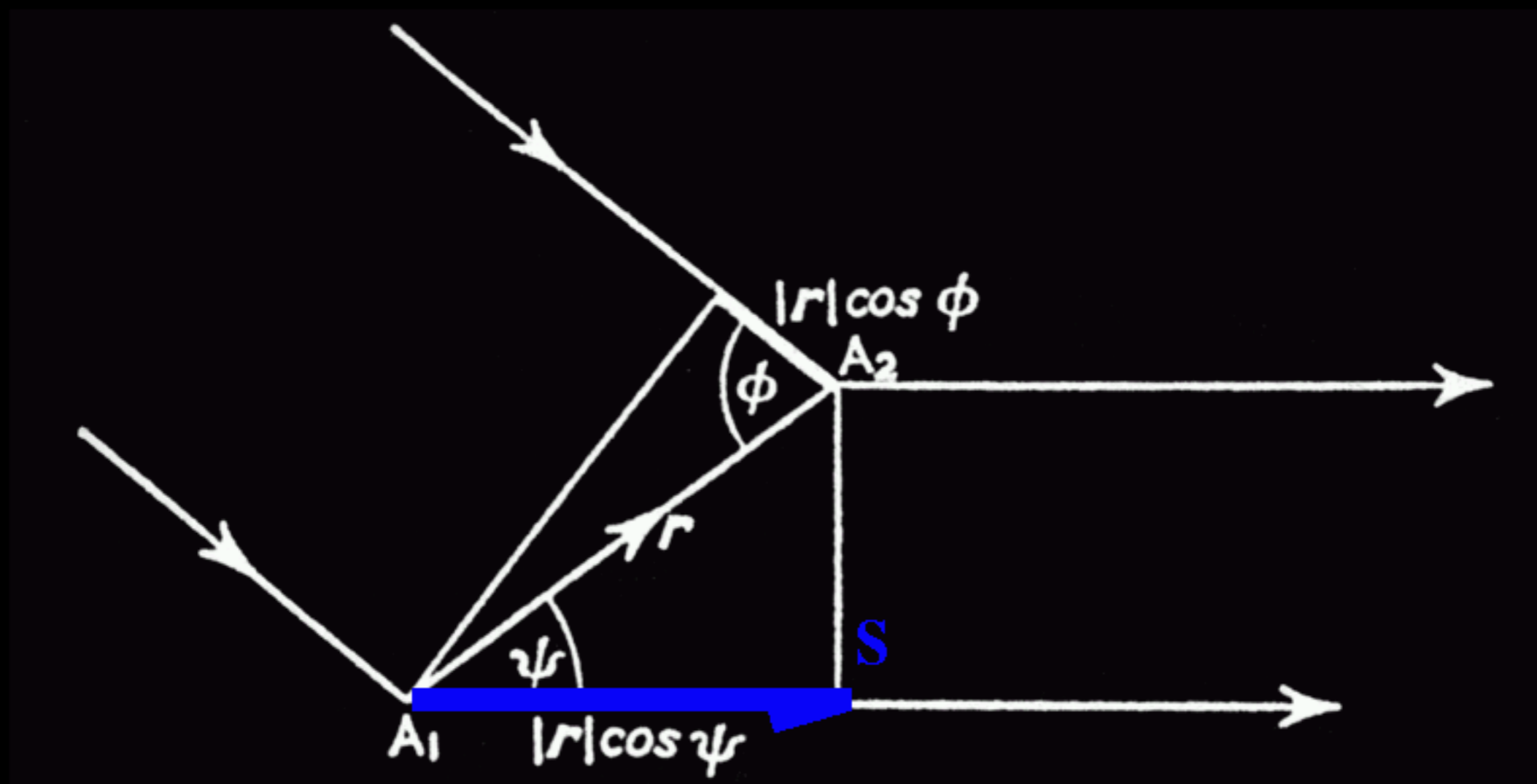
$$\Delta = \frac{2\pi |\vec{r}|}{\lambda} (\cos \psi - \cos \phi)$$

Διαφορά φάσεων κυμάτων

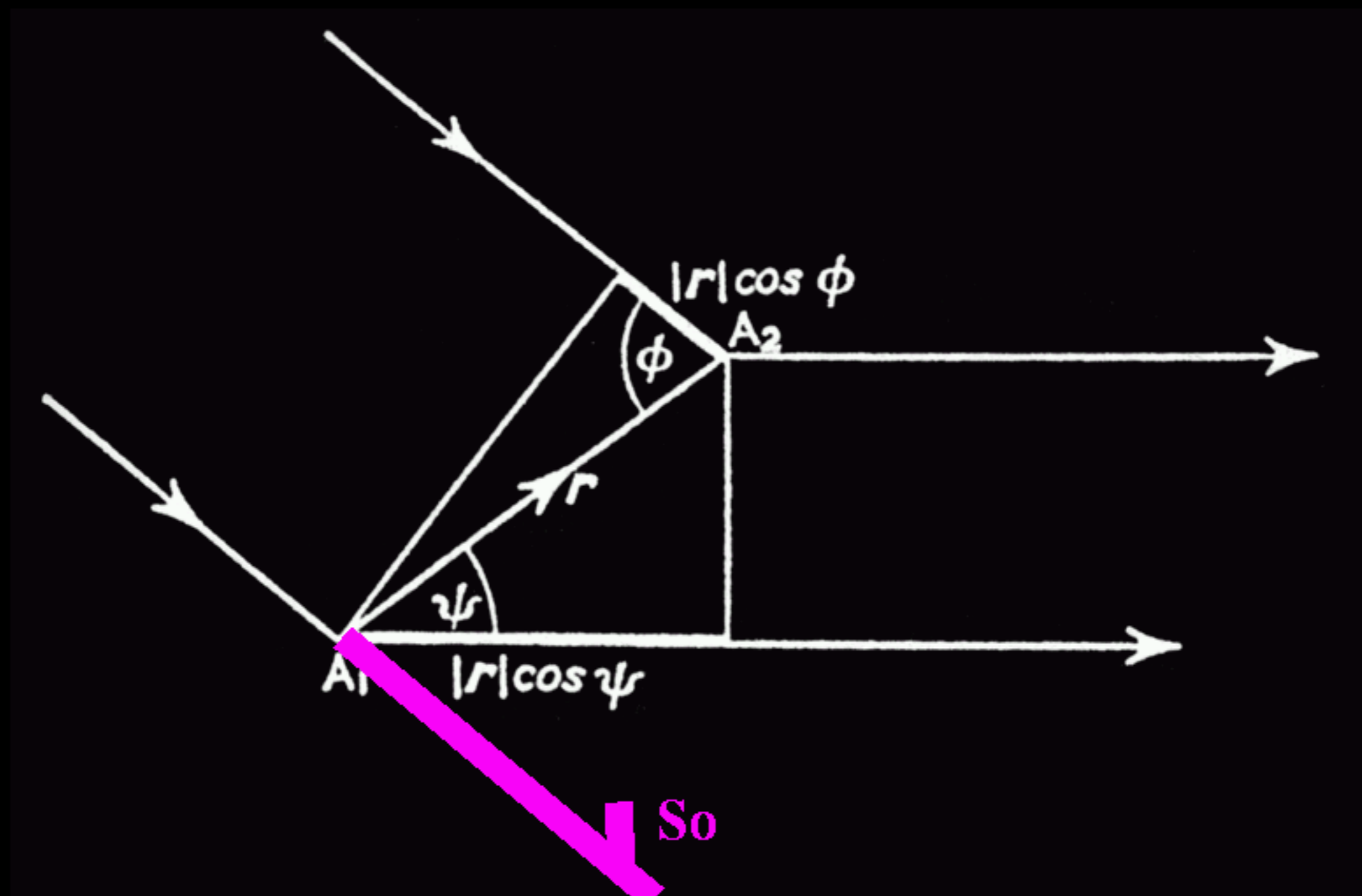
$$\vec{F} = \rho(\vec{r}) dV e^{i\Delta}$$

$$\begin{aligned} i\Delta &= \frac{2\pi i |\vec{r}|}{\lambda} (\cos \psi - \cos \phi) \\ &= 2\pi i \left(\frac{|\vec{r}| \cos \psi}{\lambda} - \frac{|\vec{r}| \cos \phi}{\lambda} \right) \end{aligned}$$

Διεύθυνση σκέδασης



Προσπίπτουσα ακτινοβολία

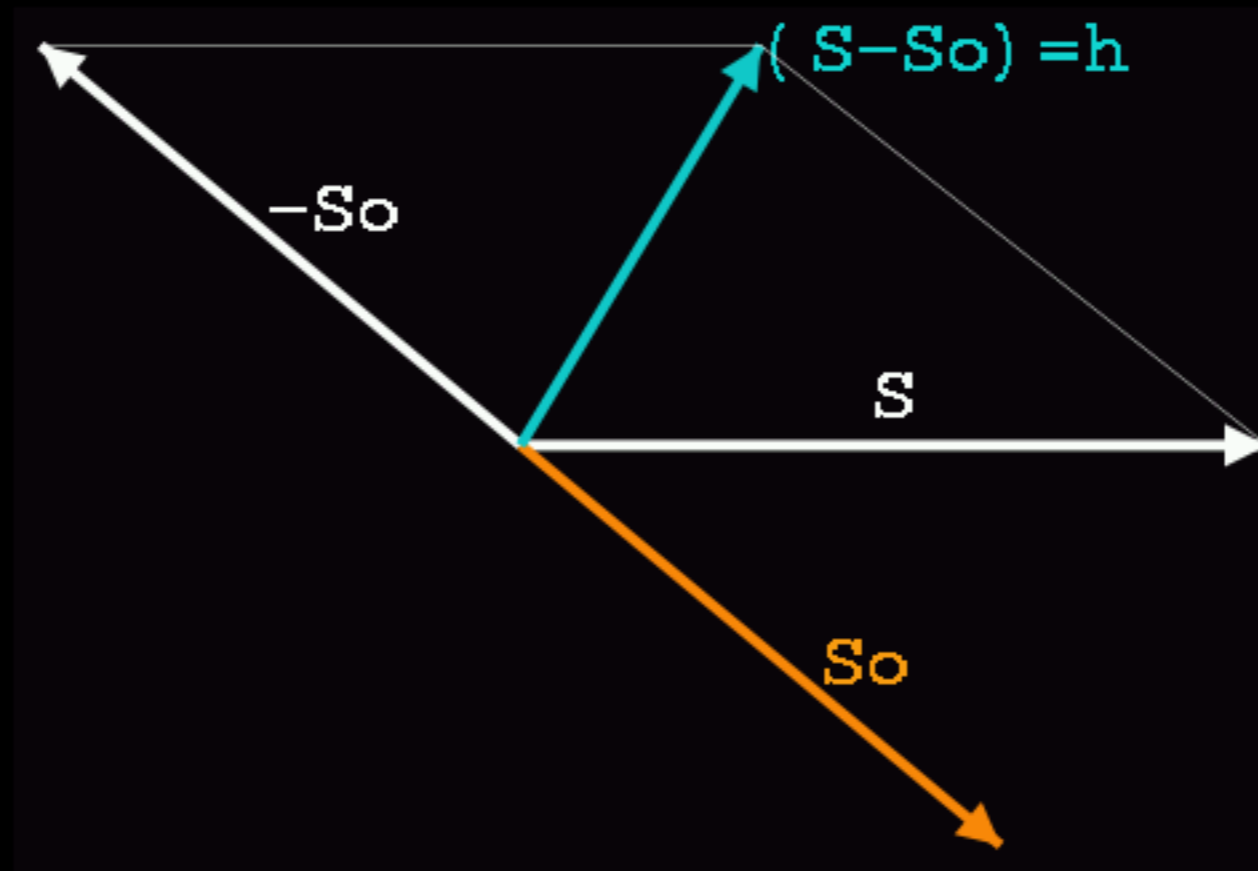


Παράγοντας δομής

$$\vec{F} = \rho(\vec{r}) dV e^{i\Delta}$$

$$\begin{aligned} i\Delta &= \frac{2\pi i |\vec{r}|}{\lambda} (\cos \psi - \cos \phi) \\ &= 2\pi i \left(\frac{|\vec{r}| \cos \psi}{\lambda} - \frac{|\vec{r}| \cos \phi}{\lambda} \right) \\ &= 2\pi i (\vec{r} \cdot \vec{S} - \vec{r} \cdot \vec{S}_0) \\ &= 2\pi i \vec{r} \cdot (\vec{S} - \vec{S}_0) \\ &= 2\pi i \vec{r} \cdot \vec{h} \end{aligned}$$

Άνυσμα σκέδασης



Παράγοντας δομής

$$\vec{F}_{\vec{h}} = \int_V \rho(\vec{r}) e^{2\pi i \vec{r} \cdot \vec{h}} dV$$

Αυτή η εξίσωση είναι μέλος μιας πολύ γνωστής οικογένειας εξισώσεων, των εξισώσεων των μετασχηματισμών Fourier.

Αυτό που μόλις αποδείξαμε είναι ότι το φάσμα σκέδασης από ένα αντικείμενο είναι ο μετασχηματισμός Fourier του αντικειμένου.

Παράγοντας δομής

Μια από τις πλέον αξιοσημείωτες ιδιότητες των μετασχηματισμών Fourier (η οποία θα αναφερθεί πιο αναλυτικά στη συνέχεια) είναι η απλότητα της αντιστροφής τους :

$$\vec{\mathbf{F}}_{\vec{h}} = \int_V \rho(\vec{r}) e^{2\pi i \vec{r} \cdot \vec{h}} dV$$

$$\rho(\vec{r}) = \int_{\vec{h}} \vec{\mathbf{F}}_{\vec{h}} e^{-2\pi i \vec{r} \cdot \vec{h}} d\vec{h}$$

Το θεώρημα Fourier

Οποιαδήποτε 'ομαλή' περιοδική συνάρτηση $f(x)$ μπορεί να γραφτεί ως άθροισμα (σειρά) απλών αρμονικών συναρτήσεων (ημιτόνων και συνημιτόνων). Μπορεί ναδειχτεί ότι η σειρά αυτή συγκλίνει στην $f(x)$, δηλαδή, καθώς ο αριθμός των όρων της σειράς τείνει στο άπειρο, η σειρά τείνει στην $f(x)$.

Το θεώρημα Fourier

Φυσική σημασία και προεκτάσεις.

- Οποιαδήποτε (πολύπλοκη) περιοδική συνάρτηση (π.χ. η κατανομή ηλεκτρονικής πυκνότητας σε κρυστάλλους του ριβοσώματος) μπορεί να αναλυθεί σε ένα άθροισμα πολλών απλών (ημιτονοειδών και συνημιτονοειδών) κυμάτων.
- Η αρχική (πολύπλοκη) περιοδική συνάρτηση μπορεί ανακτηθεί μέσω άθροισης (σύνθεσης) των απλών κυμάτων.

Το θεώρημα Fourier

Φυσική σημασία και προεκτάσεις.

- Η ανάλυση κατά Fourier μιας περιοδικής συνάρτησης είναι ισοδύναμη με την περιγραφή της ίδιας συνάρτησης σε ένα διαφορετικό domain. Εάν π.χ. η αρχική συνάρτηση είναι συνάρτηση του χρόνου, η ανάλυση της κατά Fourier περιγράφει την ίδια συνάρτηση ως συνάρτηση της συχνότητας. Ισοδύναμα και αντίστοιχα, η σύνθεση Fourier θα μας επέτρεπε να επιστρέψουμε από το frequency domain πίσω στο time domain.

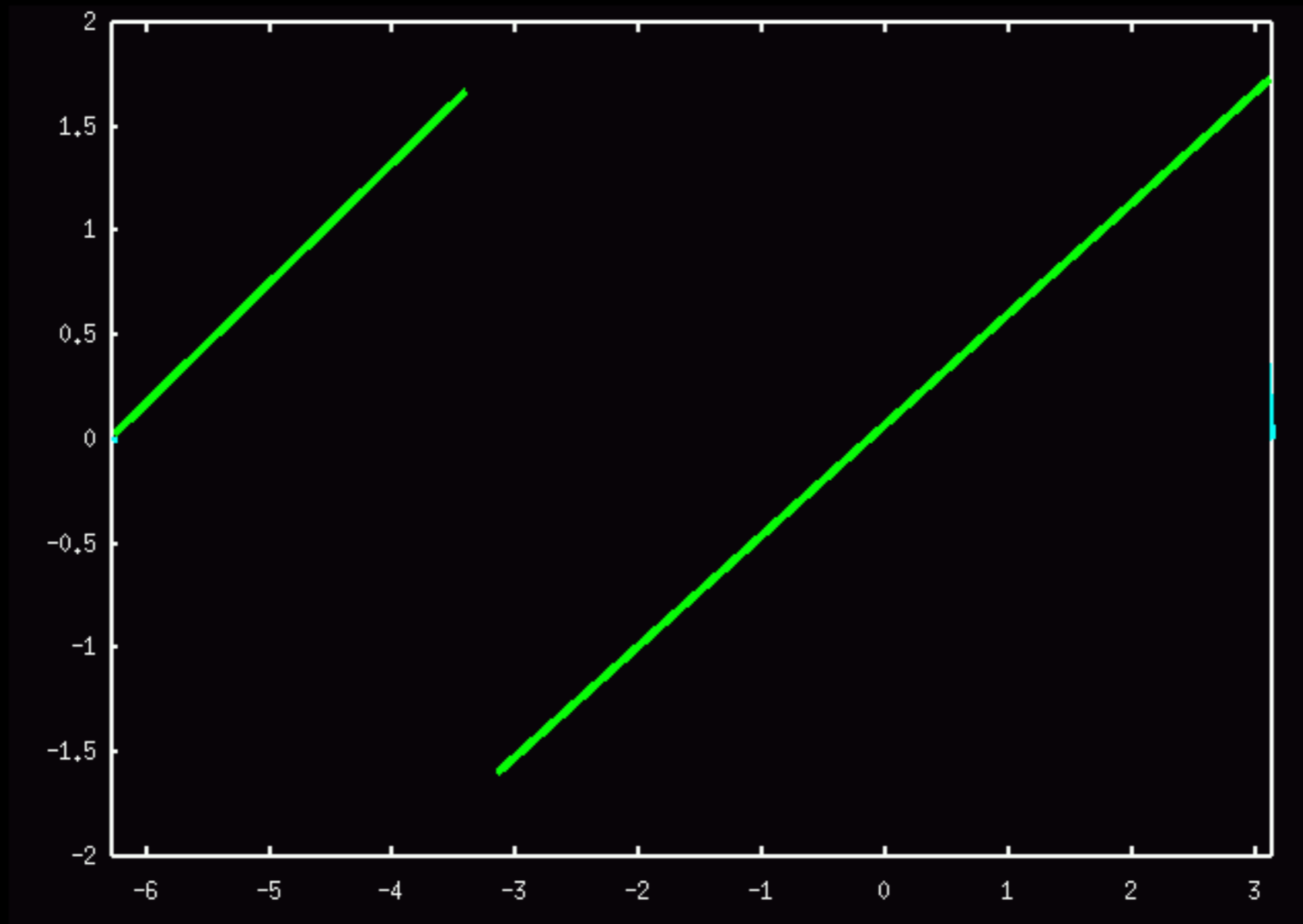
Το θεώρημα Fourier

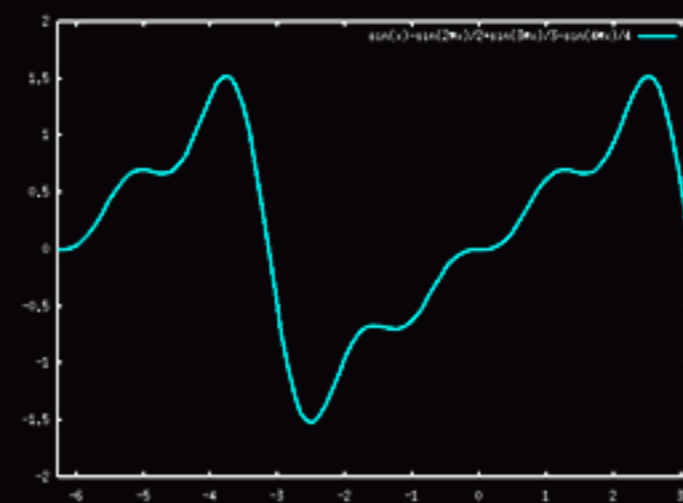
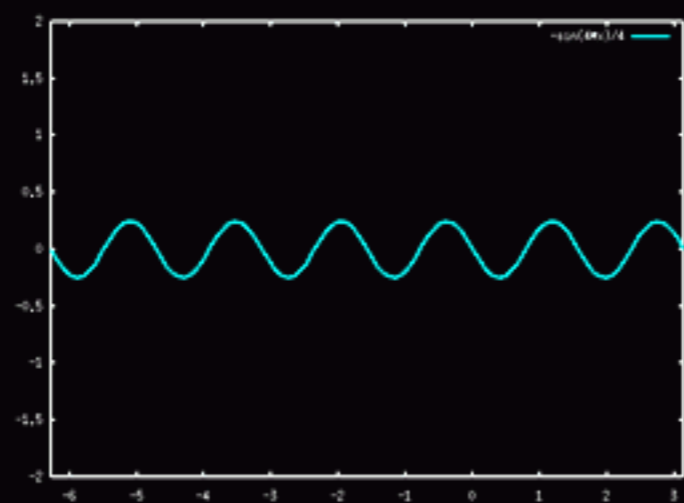
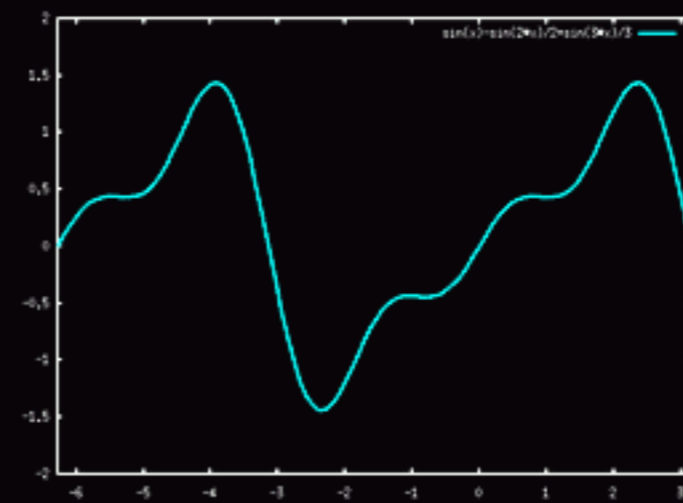
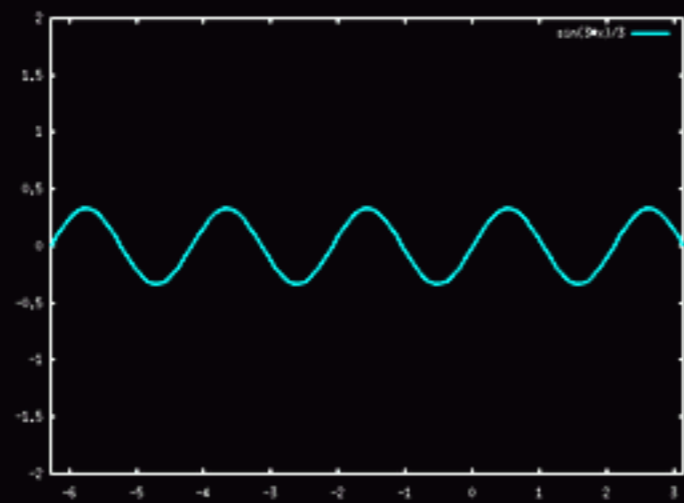
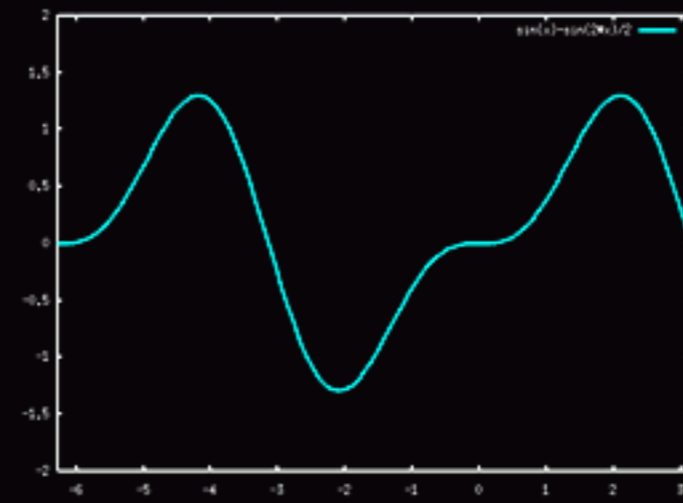
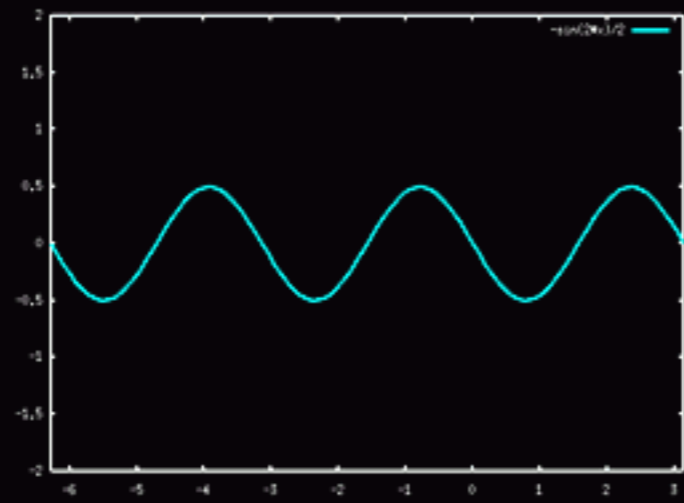
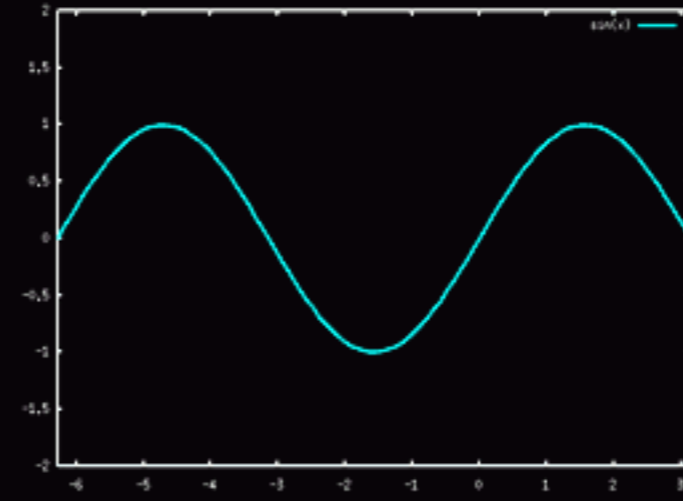
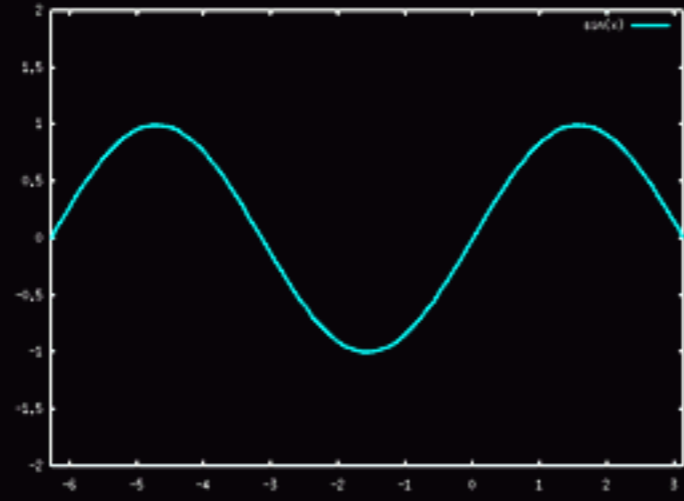
Φυσική σημασία και προεκτάσεις.

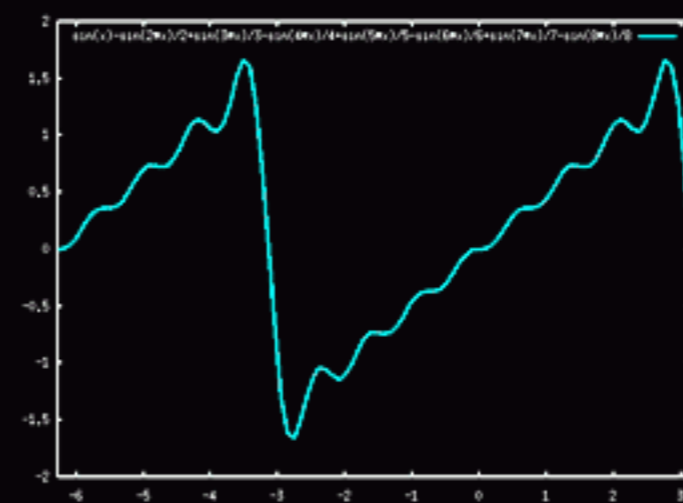
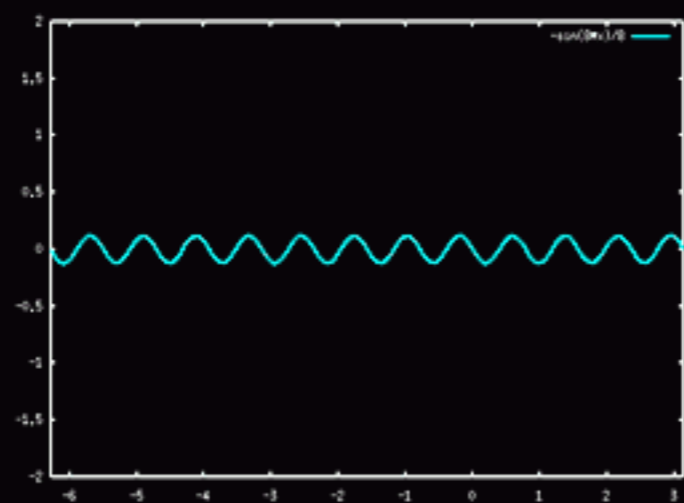
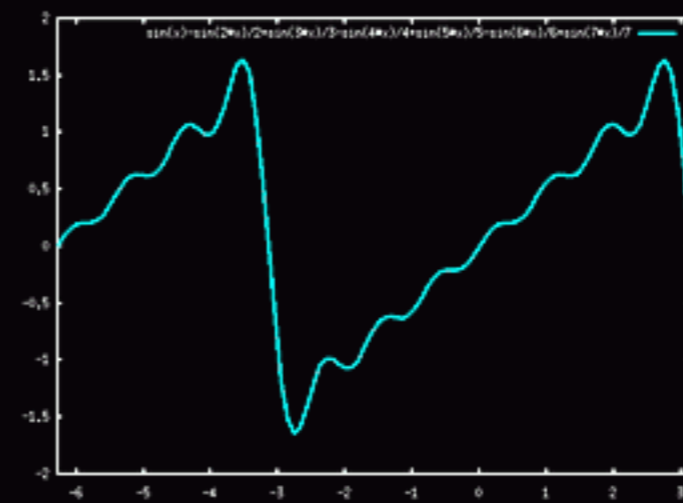
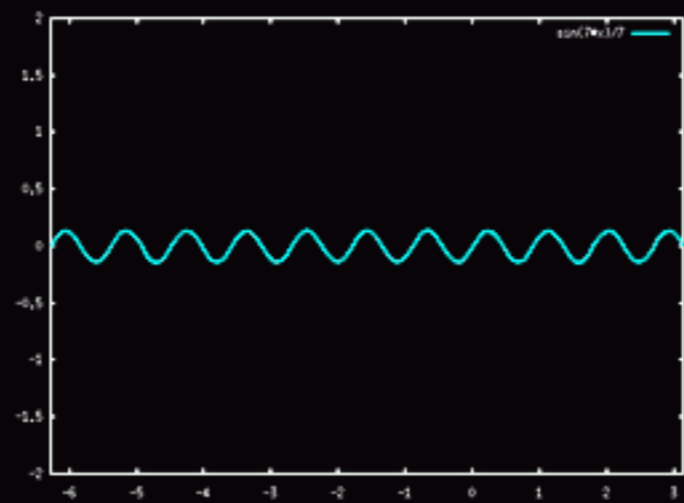
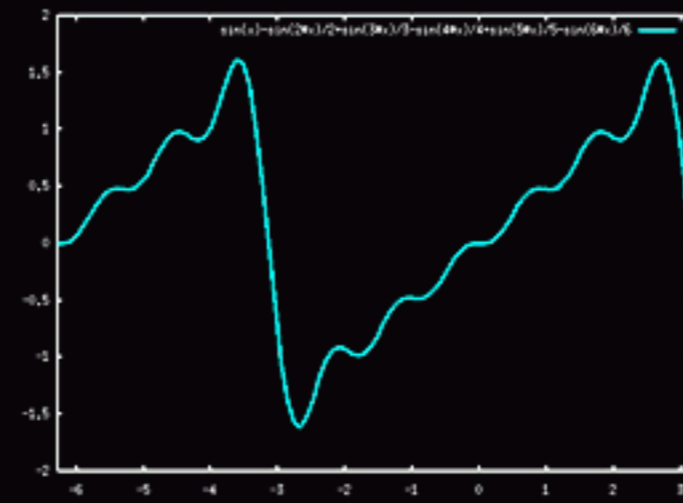
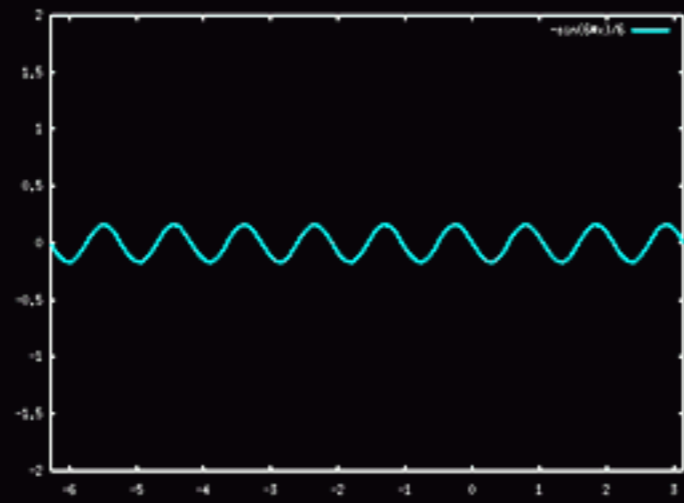
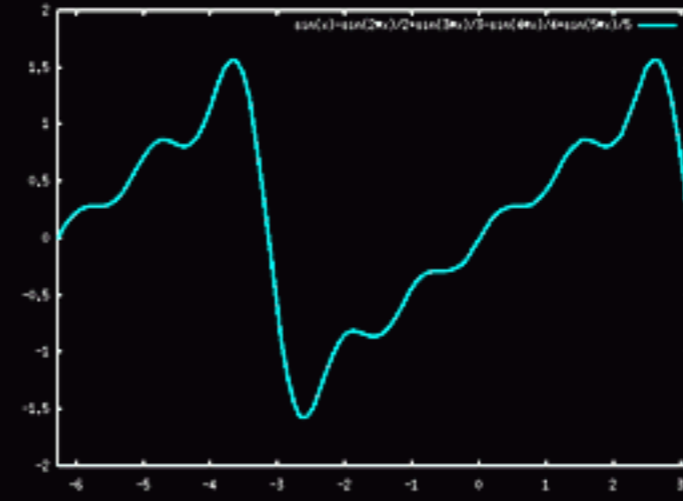
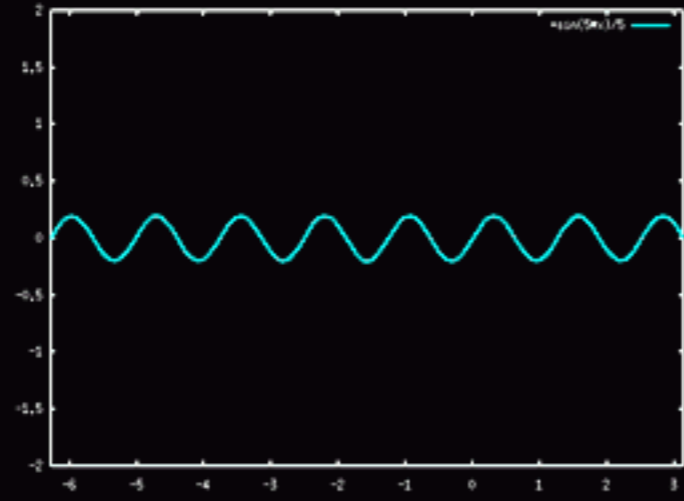
- Όπως δείξαμε, η σκέδαση ακτινοβολίας από ένα αυθαίρετο αντικείμενο είναι ο μετασχηματισμός Fourier του αντικειμένου. Άρα, το πείραμα μας είναι (από μαθηματική άποψη) το ισοδύναμο της ανάλυσης Fourier του αντικειμένου (σε απλά κύματα). Εάν γνωρίζουμε τα χαρακτηριστικά αυτών των κυμάτων (διεύθυνση, πλάτος, φάση, μήκος κύματος), η αρχική συνάρτηση (δηλαδή το αντικείμενο) μπορεί να ανακτηθεί μέσω της σύνθεσης Fourier.

Το θεώρημα Fourier

Παράδειγμα : η συνάρτηση $f(x)=x/2$, $-\pi < x < \pi$







Μετασχηματισμοί Fourier

Το πρόβλημα που ανακύπτει είναι : δεδομένης μιας συνάρτησης $f(x)$, πως θα υπολογίσουμε τα πλάτη και τις φάσεις των κυμάτων που αντιστοιχούν στη σειρά Fourier της συγκεκριμένης συνάρτησης ;
Και αντίστοιχα : εάν γνωρίζουμε τους όρους της σειράς Fourier που αντιστοιχούν σε μια συνάρτηση, πως θα ανακτήσουμε την αρχική συνάρτηση ;

$$\vec{F}_{\vec{h}} = \int_V \rho(\vec{r}) e^{2\pi i \vec{r} \cdot \vec{h}} dV$$

Κρυσταλλογραφία

Μέρος 3ο

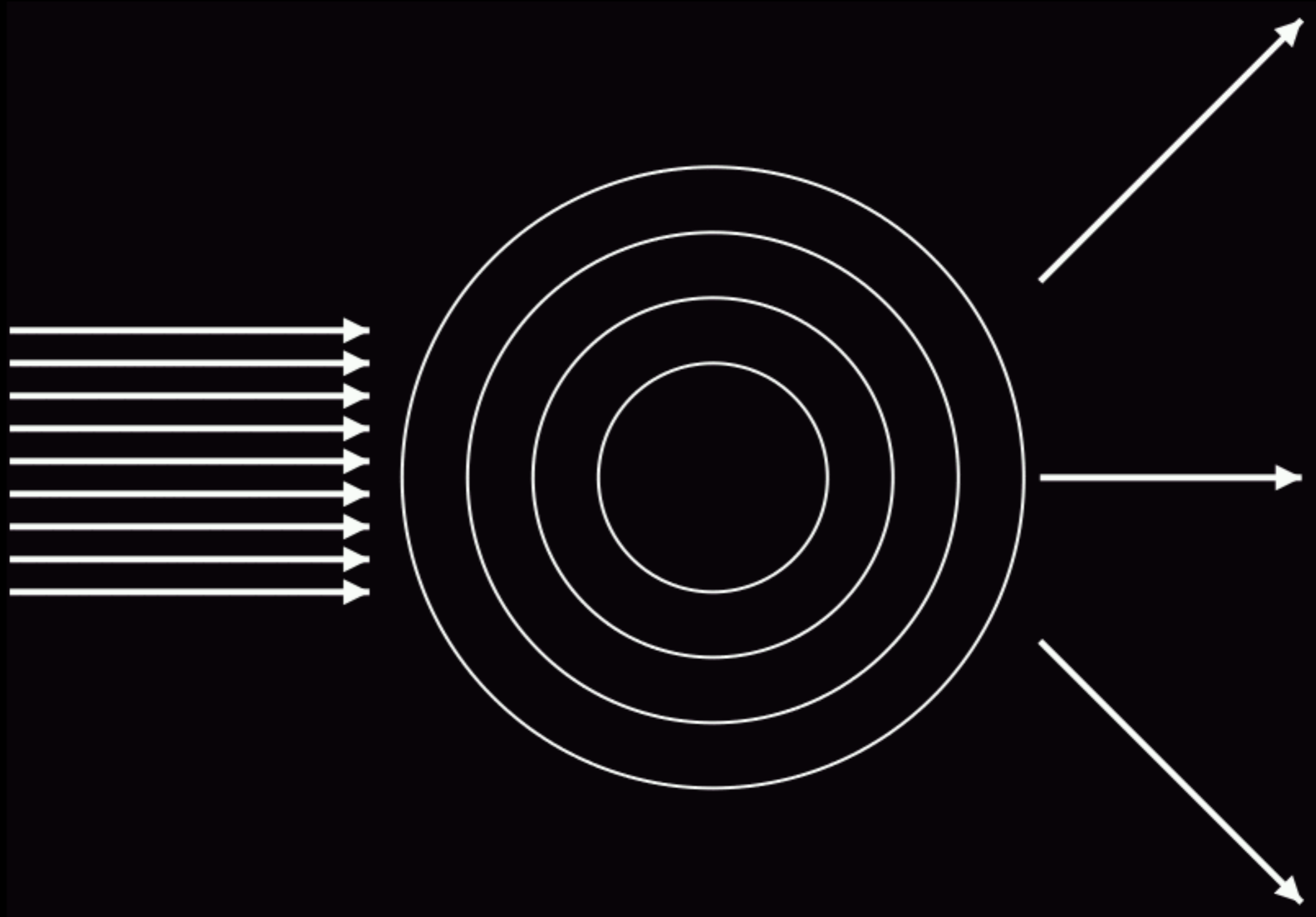
Ατομικοί παράγοντες σκέδασης.
Σκέδαση ακτινοβολίας από περιοδικά
αντικείμενα : περίθλαση.

Παράγοντας δομής

$$\vec{F}_{\vec{h}} = \int_V \rho(\vec{r}) e^{2\pi i \vec{r} \cdot \vec{h}} dV$$

Επειδή η ύλη είναι συνήθως οργανωμένη σε άτομα, μπορούμε να αντικαταστήσουμε το ολοκλήρωμα (στον όγκο του αντικειμένου) με ένα άθροισμα (για κάθε άτομο του αντικειμένου). Το μόνο που χρειαζόμαστε για αυτό είναι να γνωρίζουμε το πως σκεδάζουν τα άτομα (υποθέτοντας για απλότητα ότι έχουν σφαιρική συμμετρία).

Ατομικοί παράγοντες σκέδασης



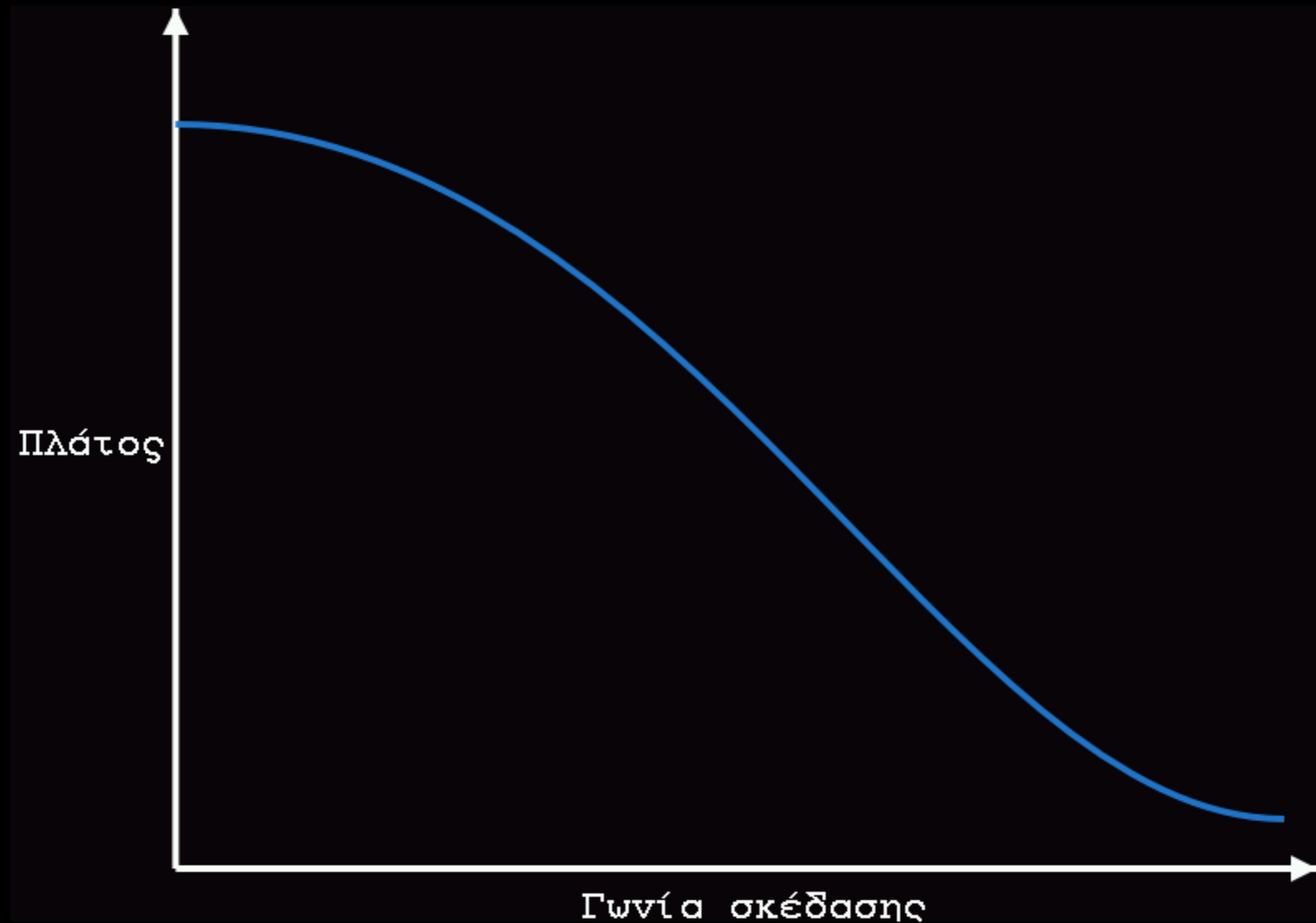
Ατομικοί παράγοντες σκέδασης

Επειδή τα άτομα θεωρούνται ότι έχουν σφαιρική συμμετρία, η σκέδαση από αυτά θα έχει επίσης σφαιρική συμμετρία. Άρα, η σκέδαση από ένα μεμονωμένο άτομο μπορεί να περιγραφεί ως συνάρτηση μιας μόνο παραμέτρου : της γωνίας σκέδασης.

Οι ατομικοί παράγοντες σκέδασης είναι οι συναρτήσεις εκείνες οι οποίες περιγράφουν το πλάτος της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας (ως συνάρτηση της γωνίας σκέδασης) για κάθε ατομικό τύπο.

Οι ατομικοί παράγοντες σκέδασης έχουν όλοι την ίδια μορφή :

Ατομικοί παράγοντες σκέδασης

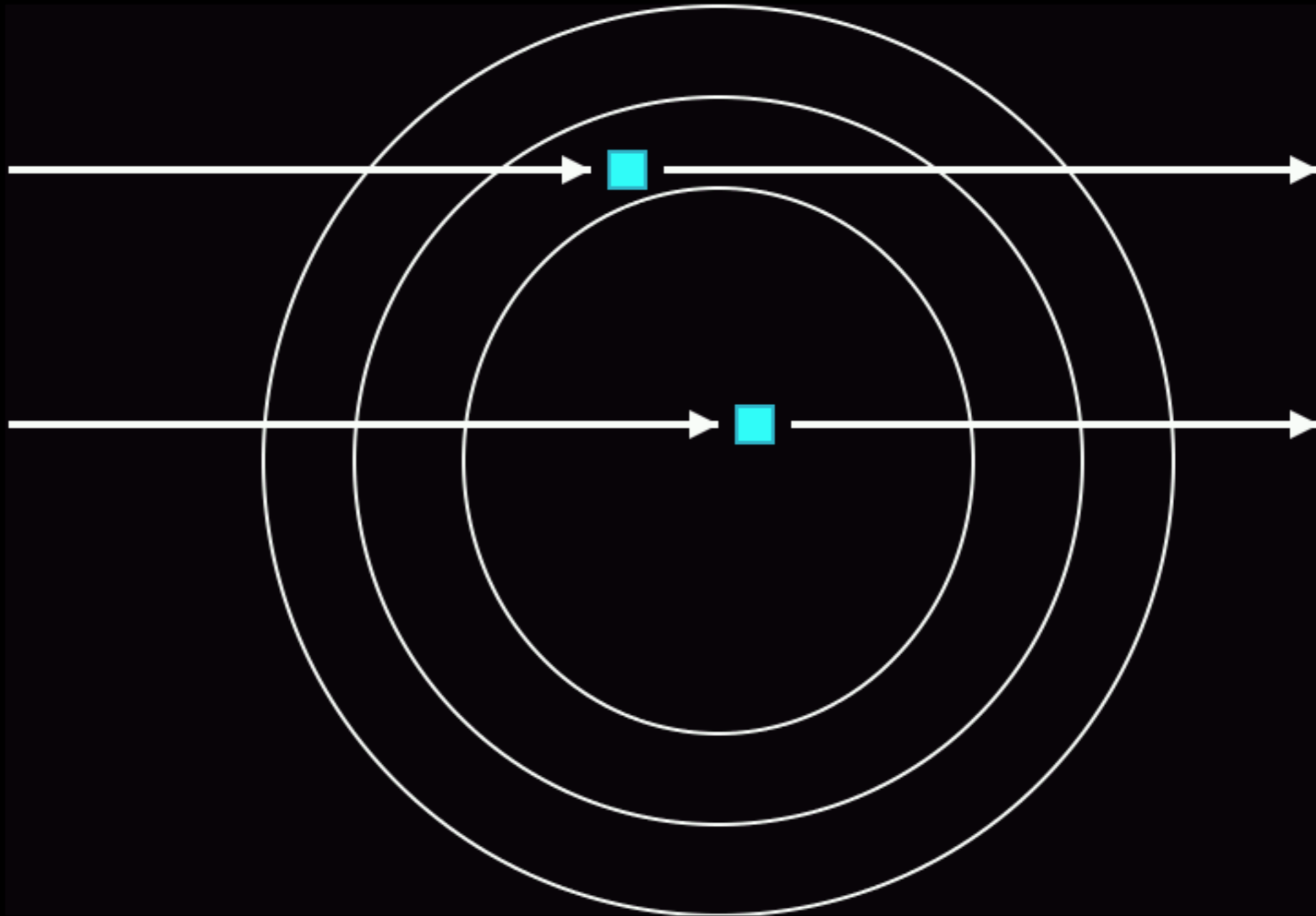


Ατομικοί παράγοντες σκέδασης

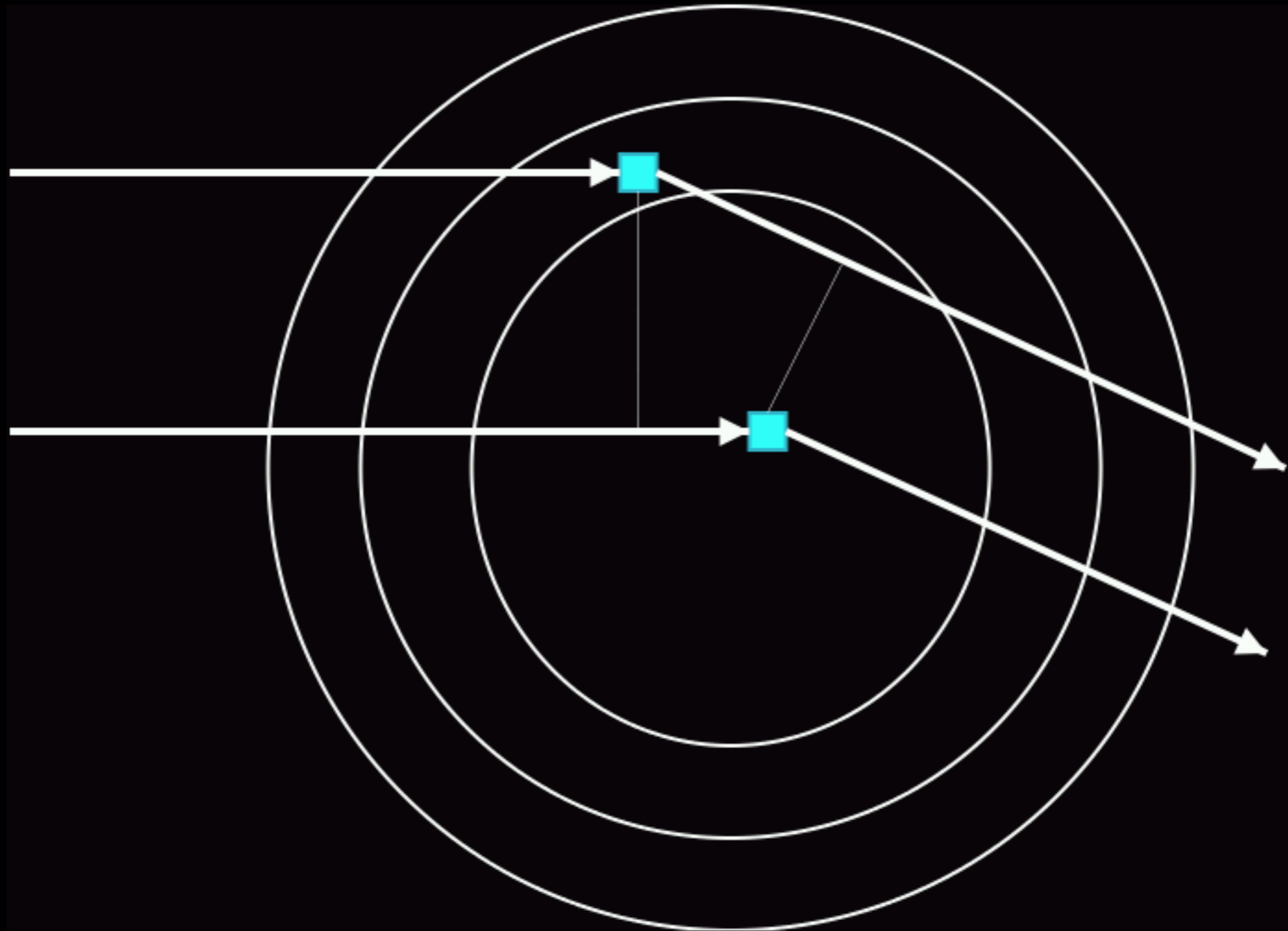
Η αναλυτική απόδειξη της μορφής αυτών των συναρτήσεων είναι έξω από τα πλαίσια του μαθήματος.

Μια ποιοτική όμως ερμηνεία η οποία στηρίζεται στην αύξηση της διαφοράς δρόμων μεταξύ των σκεδαζόμενων κυμάτων καθώς η γωνία σκέδασης αυξάνει, είναι ευνόητη :

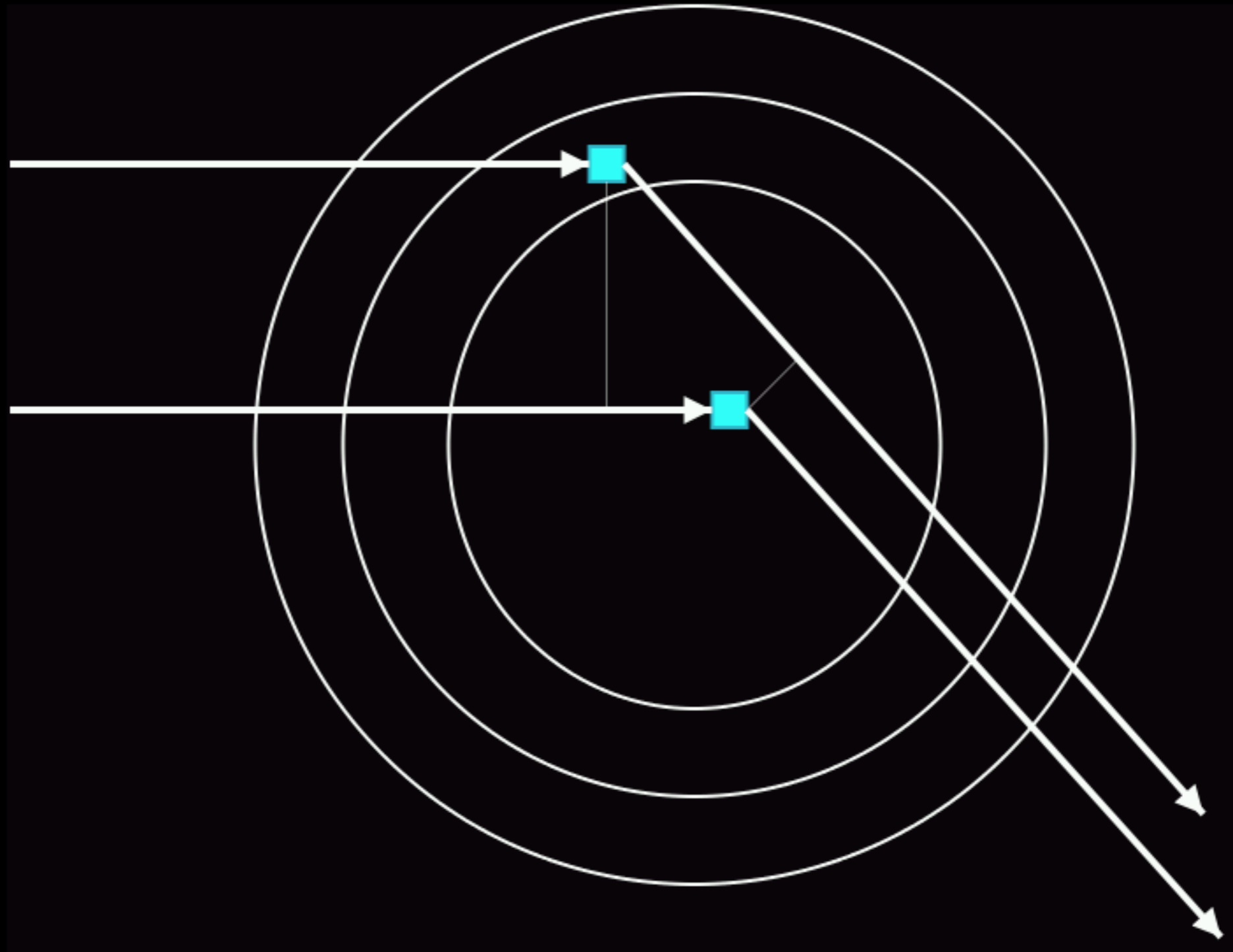
Ατομικοί παράγοντες σκέδασης



Ατομικοί παράγοντες σκέδασης



Ατομικοί παράγοντες σκέδασης



Παράγοντας δομής

Εάν, λοιπόν, το αντικείμενο αποτελείται από j άτομα στις θέσεις $r(j)$, και με $f(j,h)$ συμβολίσουμε την τιμή του ατομικού παράγοντα σκέδασης για το (j) άτομο και για την γωνία σκέδασης που αντιστοιχεί στο συγκεκριμένο (h), τότε :

$$\vec{F}_{\vec{h}} = \sum_{j=1}^N f_{j,\vec{h}} e^{2\pi i \vec{r}_j \cdot \vec{h}}$$

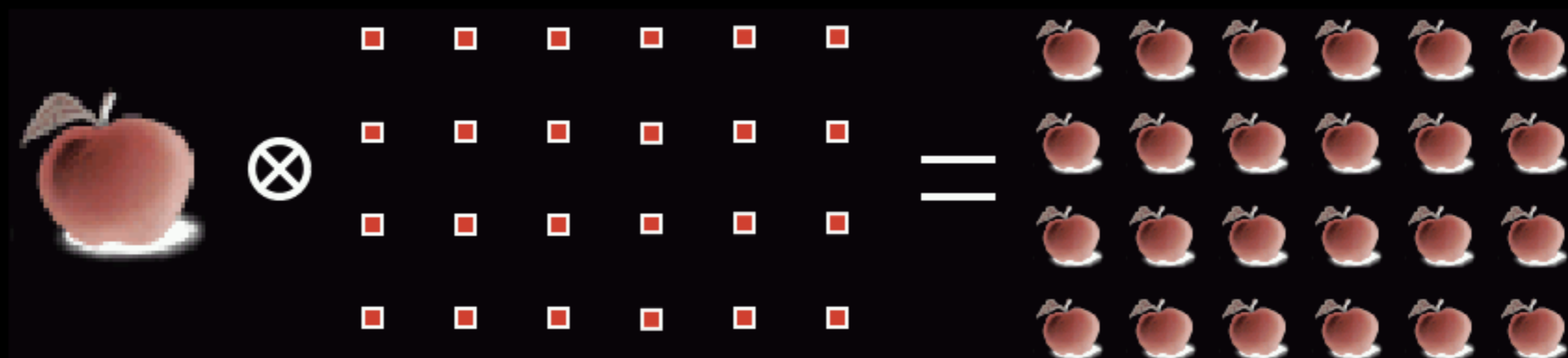
Κρύσταλλοι

Η μέχρι τώρα συζήτηση έχει παντελώς αγνοήσει το ενδεχόμενο του να είναι το υπό μελέτη αντικείμενο ένας κρύσταλλος.

Το ζητούμενο είναι να βρεθεί η εξίσωση που περιγράφει τη σκέδαση (περίθλαση) από κρυστάλλους ως συνάρτηση της δομής τους. Ισοδύναμα, θέλουμε να προσδιορίσουμε την μορφή της εξίσωσης του μετασχηματισμού Fourier στην ειδική περίπτωση που το αντικείμενο είναι κρύσταλλος.

Η εισαγωγή της μεταθετικής συμμετρίας στις εξισώσεις που συνάγαμε προηγουμένως, θα γίνει μέσω του θεωρήματος της συνέλιξης (convolution theorem).

Συνέλιξη



$$\begin{aligned} conv(u) &= f(x) \otimes g(x) \\ &= \int_x f(x)g(u - x)dx \end{aligned}$$

Συνέλιξη

Συνέλιξη και συναρτήσεις δ

Η συνάρτηση $\delta(x-x_0)$ είναι μια συνάρτηση τέτοια ώστε

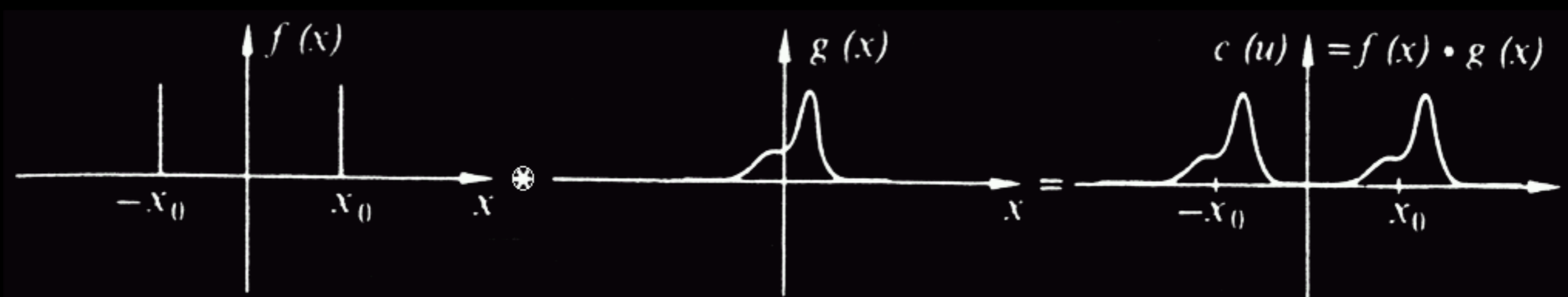
$$\delta(x - x_0) = 0, x \neq x_0$$

$$\int \delta(x - x_0) = 1, x = x_0$$

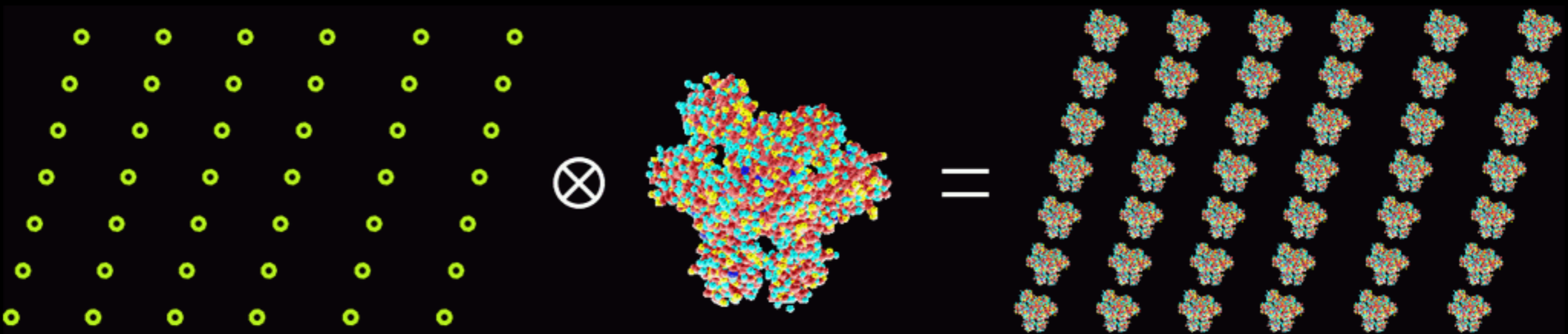
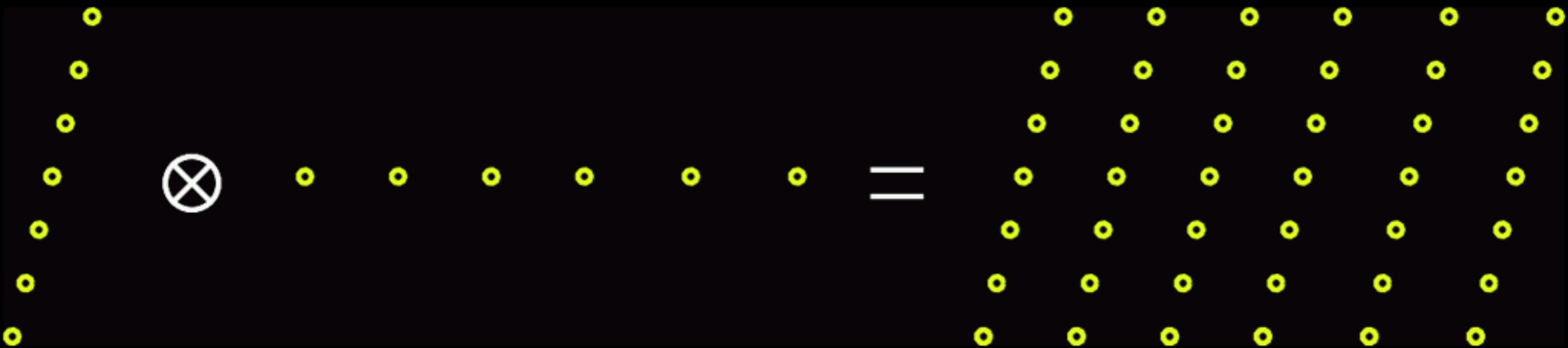
Συνέλιξη

Συνέλιξη και συναρτήσεις δ

Η εφαρμογή της στην κρυσταλλογραφία (σε συνδυασμό με την πράξη της συνέλιξης) είναι προφανής :



Συνέλιξη



Το θεώρημα της συνέλιξης

Ο μετασχηματισμός Fourier της συνέλιξης δυο συναρτήσεων είναι ίσος (ταυτίζεται) με το γινόμενο των μετασχηματισμών Fourier των επιμέρους συναρτήσεων. Δηλ.

$$\mathcal{FT}(f \otimes g) = \mathcal{FT}(f) \cdot \mathcal{FT}(g)$$

Το θεώρημα της συνέλιξης

Αλλά, ο κρύσταλλος είναι η συνέλιξη του πλέγματος με την ηλεκτρονική πυκνότητα του περιεχομένου της στοιχειώδους κυψελίδας :



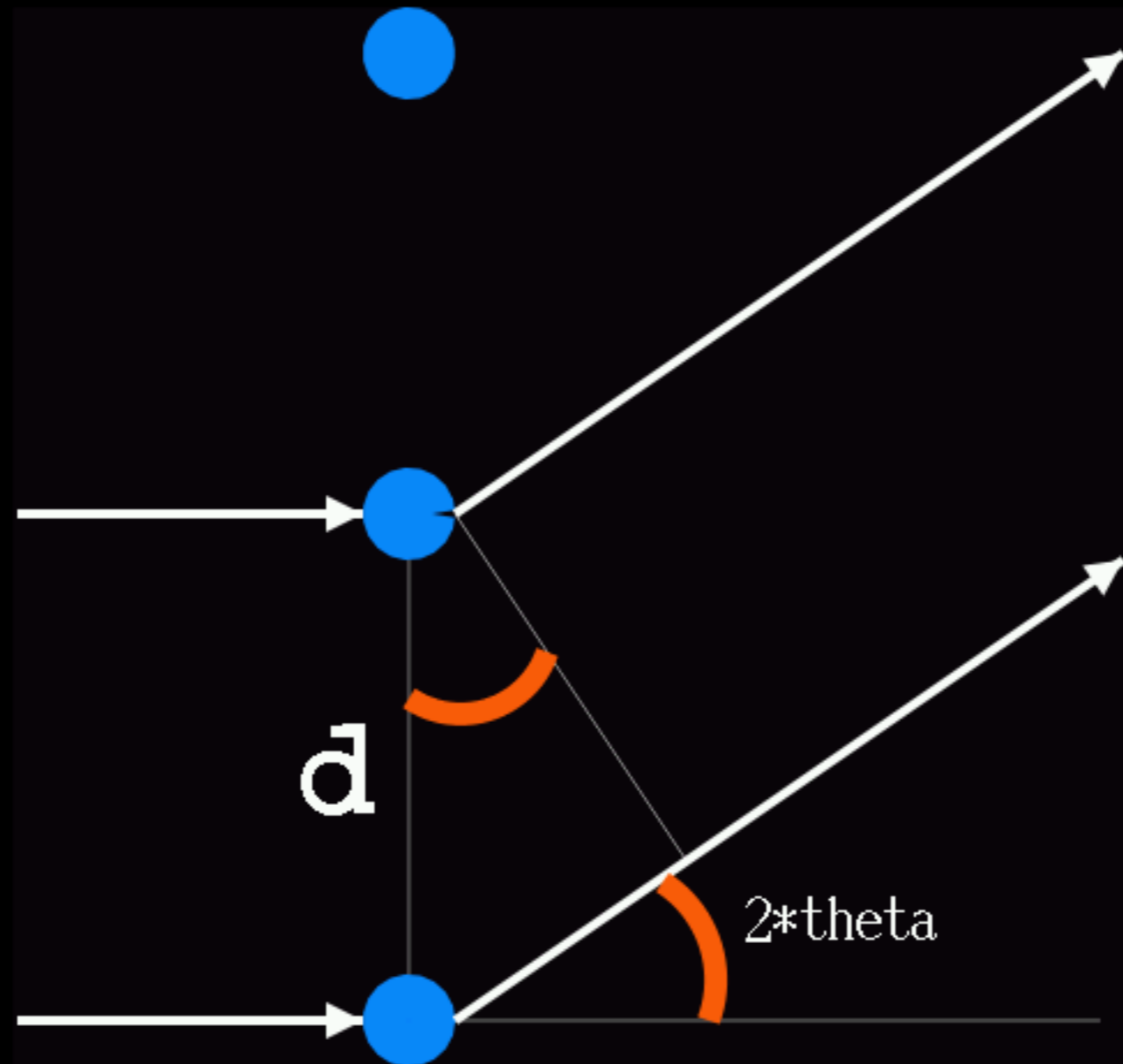
Άρα, $FT(\text{κρυστάλλου}) = FT(\text{πλέγματος}) \cdot FT(\text{μορίου})$

Το αντίστροφο πλέγμα

Ο μετασχηματισμός Fourier ενός πλέγματος είναι επίσης ένα πλέγμα, το λεγόμενο αντίστροφο πλέγμα. Η απόδειξη αυτού του αποτελέσματος είναι γίνεται σχετικά εύκολα μέσω του θεωρήματος της συνέλιξης ξεκινώντας από ένα μονοδιάστατο πλέγμα :



Το αντίστροφο πλέγμα



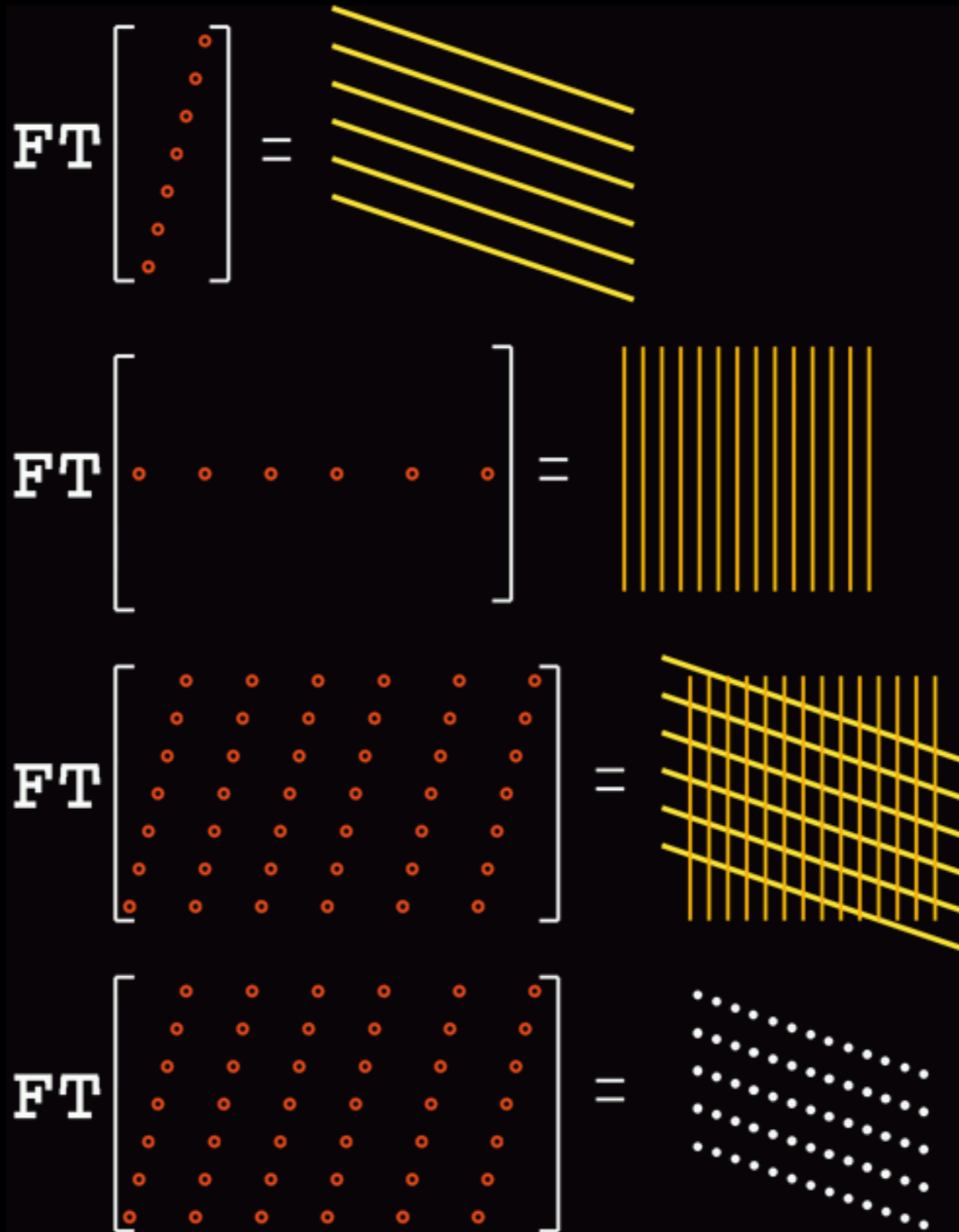
$$d \sin(2\theta) = n\lambda$$

Το αντίστροφο πλέγμα

Άρα, ο μετασχηματισμός Fourier ενός μονοδιάστατου πλέγματος είναι ένα σύνολο από ισαπέχοντα παράλληλα επίπεδα τα οποία είναι κάθετα στον άξονα του μονοδιάστατου πλέγματος. Η απόσταση μεταξύ των επιπέδων είναι αντιστρόφως ανάλογη της απόστασης μεταξύ των σημείων του μονοδιάστατου πλέγματος.

Με βάση αυτό, εύκολα συνάγονται τα υπόλοιπα :

Το αντίστροφο πλέγμα



Περίθλαση από κρυστάλλους

$$FT(\text{κρυστάλλου}) = FT(\text{πλέγματος}) \cdot FT(\text{μορίου})$$

Ο μετασχηματισμός Fourier ενός κρυστάλλου είναι παντού μηδέν εκτός από τα σημεία εκείνα που αντιστοιχούν στο αντίστροφο πλέγμα.

Στα σημεία αυτά, η τιμή του μετασχηματισμού Fourier του κρυστάλλου ταυτίζεται με την τιμή του μετασχηματισμού Fourier της συνάρτησης ηλεκτρονικής πυκνότητας της στοιχειώδους κυψελίδας .

Περίθλαση από κρυστάλλους

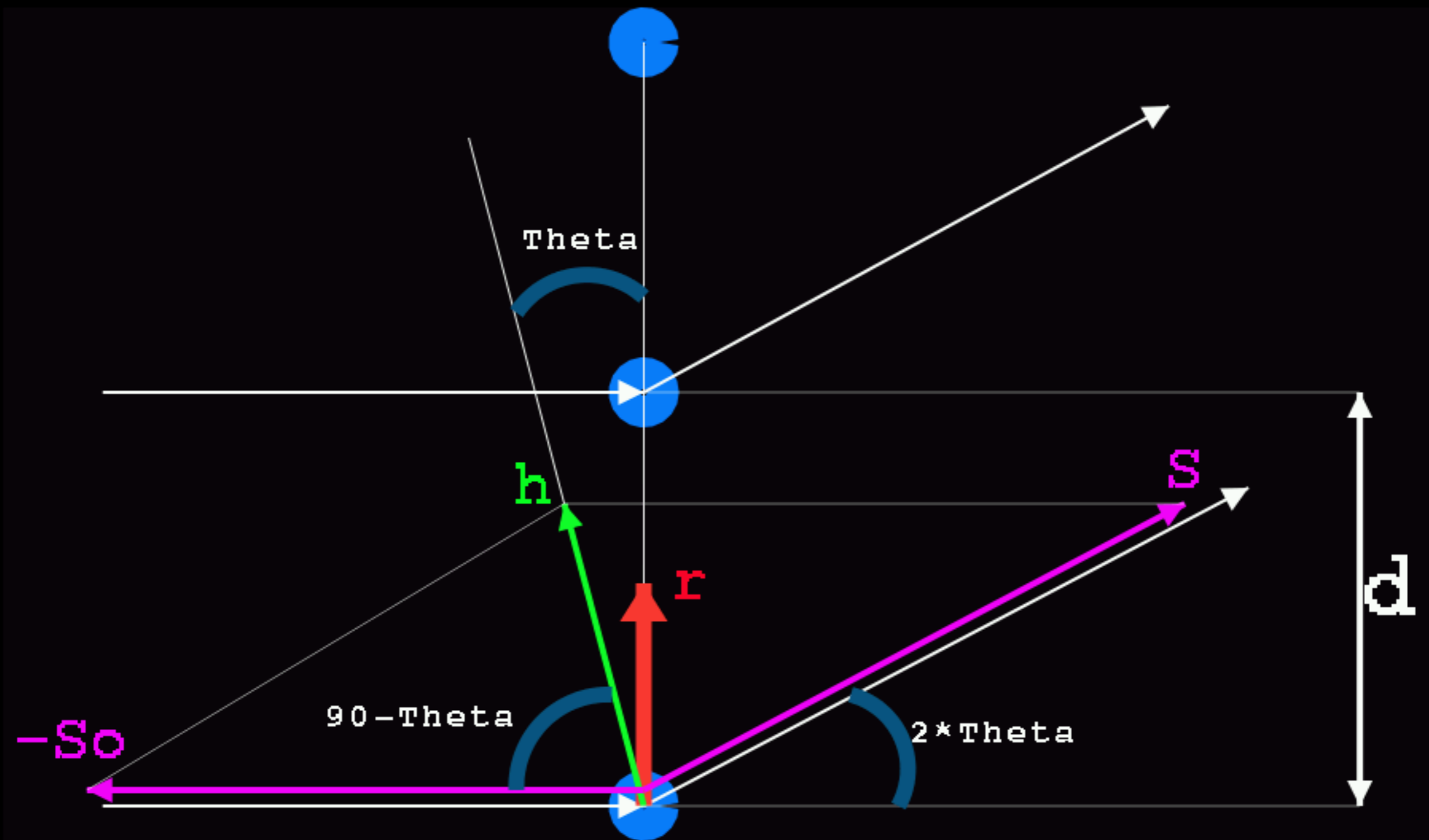
$$\vec{\mathbf{F}}_{\vec{h}} = \int_V \rho(\vec{r}) e^{2\pi i \vec{r} \cdot \vec{h}} dV$$

$$\vec{\mathbf{F}}_{\vec{h}} = \sum_{j=1}^N f_{j,\vec{h}} e^{2\pi i \vec{r}_j \cdot \vec{h}}$$

Περίθλαση από κρυστάλλους

Λόγω του ότι ο μετασχηματισμός Fourier ενός κρυστάλλου παίρνει μη μηδενικές τιμές μόνο στα σημεία του αντίστροφου πλέγματος, η εξίσωση του παράγοντα δομής απλοποιείται ακόμα περισσότερο. Η απλοποίηση θα δειχτεί στη μια διάσταση, αλλά μεταφέρεται αυτούσια στις δύο και τρεις διαστάσεις.

Περίθλαση από κρυστάλλους



$$\begin{aligned}\vec{r} \cdot \vec{h} &= (xd\vec{d}) \cdot \vec{h} \\ &= x(\vec{d} \cdot \vec{h}) \\ &= x(|\vec{d}||\vec{h}|\cos(\theta)) \\ &= x|\vec{d}|\cos(\theta)|\vec{h}| \\ &= xd\cos(\theta)[2\cos(90 - \theta)/\lambda] \\ &= xd\cos(\theta)[2\sin(\theta)/\lambda] \\ &= xd[2\sin(\theta)\cos(\theta)/\lambda] \\ &= xd[\sin(2\theta)/\lambda] \\ &= xn\end{aligned}$$

Παράγοντας δομής

$$\vec{\mathbf{F}}_{hkl} = \sum_i f_{i,\mathbf{h}} e^{2\pi i(hx+ky+lz)}$$

$$\rho(xyz) = \sum_{hkl} \vec{\mathbf{F}}_{hkl} e^{-2\pi i(hx+ky+lz)}$$

Κρυσταλλογραφία

Μέρος 4ο

Ο παράγοντας δομής.

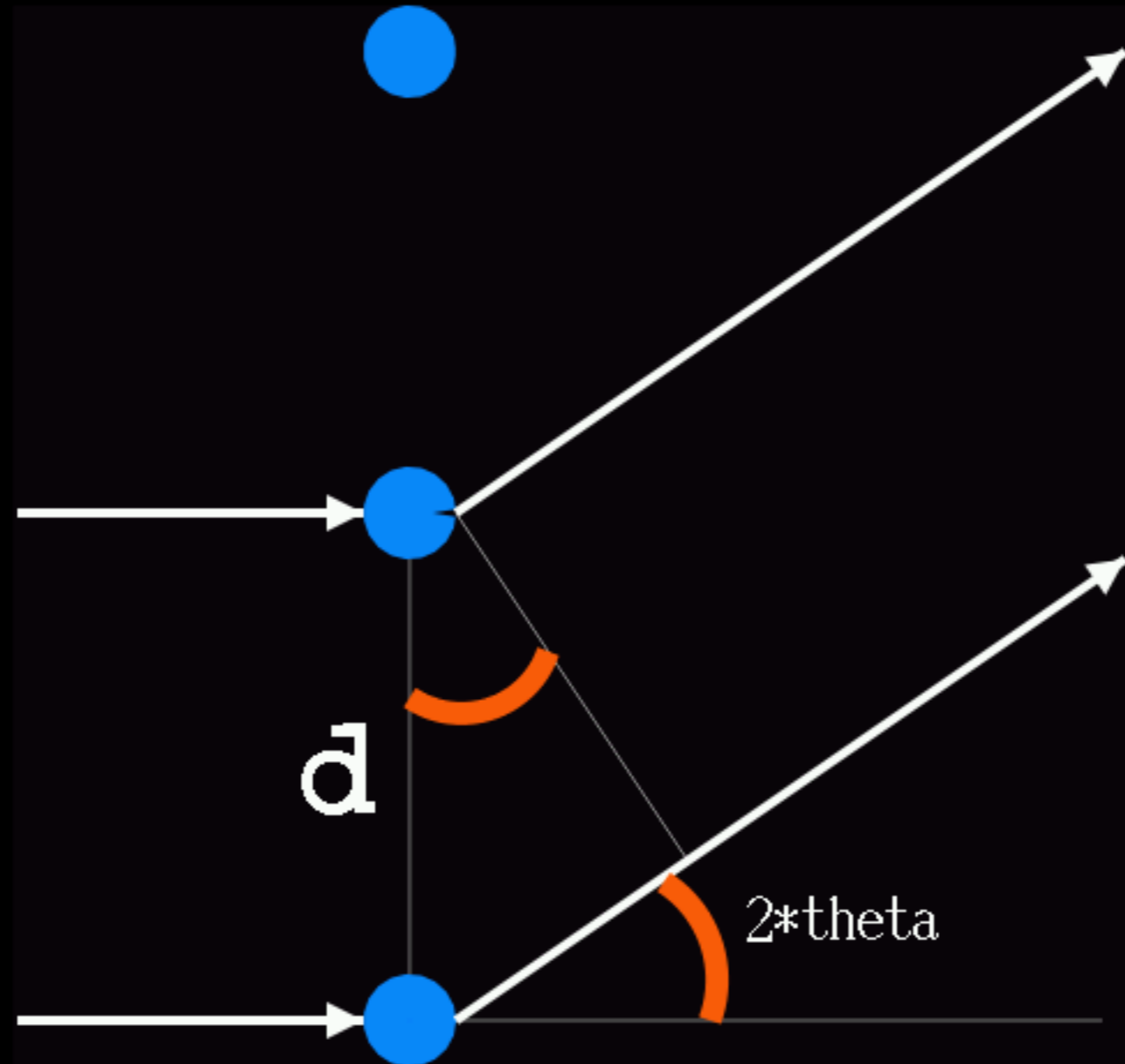
Παράγοντας δομής

Το νόημα των δεικτών h,k,l .

Οι ακέραιοι αριθμοί (h,k,l) είναι δείκτες οι οποίοι προσδιορίζουν τη θέση ενός σημείου στο αντίστροφο πλέγμα. Επειδή κάθε σημείο του αντίστροφου πλέγματος αντιστοιχεί σε ένα περιθλώμενο (από τον κρύσταλλο κύμα), τα (hkl) προσδιορίζουν το σε ποιο από τα περιθλώμενα κύματα αναφερόμαστε.

Το ότι αυτοί οι ακέραιοι είναι δείκτες του αντίστροφου πλέγματος αποδεικνύεται εύκολα για το μονοδιάστατο παράδειγμα της προηγούμενης διάλεξης στο οποίο ο ακέραιος (n) προέκυψε από την εφαρμογή της εξίσωσης $d \cdot \sin(2\theta) = n \cdot \lambda$

Το νόημα των (h,k,l) .



$$d \sin(2\theta) = n\lambda$$

Το νόημα των (h,k,l) .

Άρα, αυτό το (n) "μετράει" τη διαφορά (σε μήκη κύματος) μεταξύ κυμάτων που έχουν σκεδαστεί από διαδοχικές κυψελίδες. Εάν $n=0$, τότε δεν υπάρχει διαφορά δρόμου (και άρα πρόκειται για το κύμα που σκεδάζεται παράλληλα με την προσπίπτουσα ακτινοβολία). Καθώς το n αυξάνει (ή μειώνεται αρνητικά), αυξάνει σε διαδοχικά βήματα και η γωνία περίθλασης :

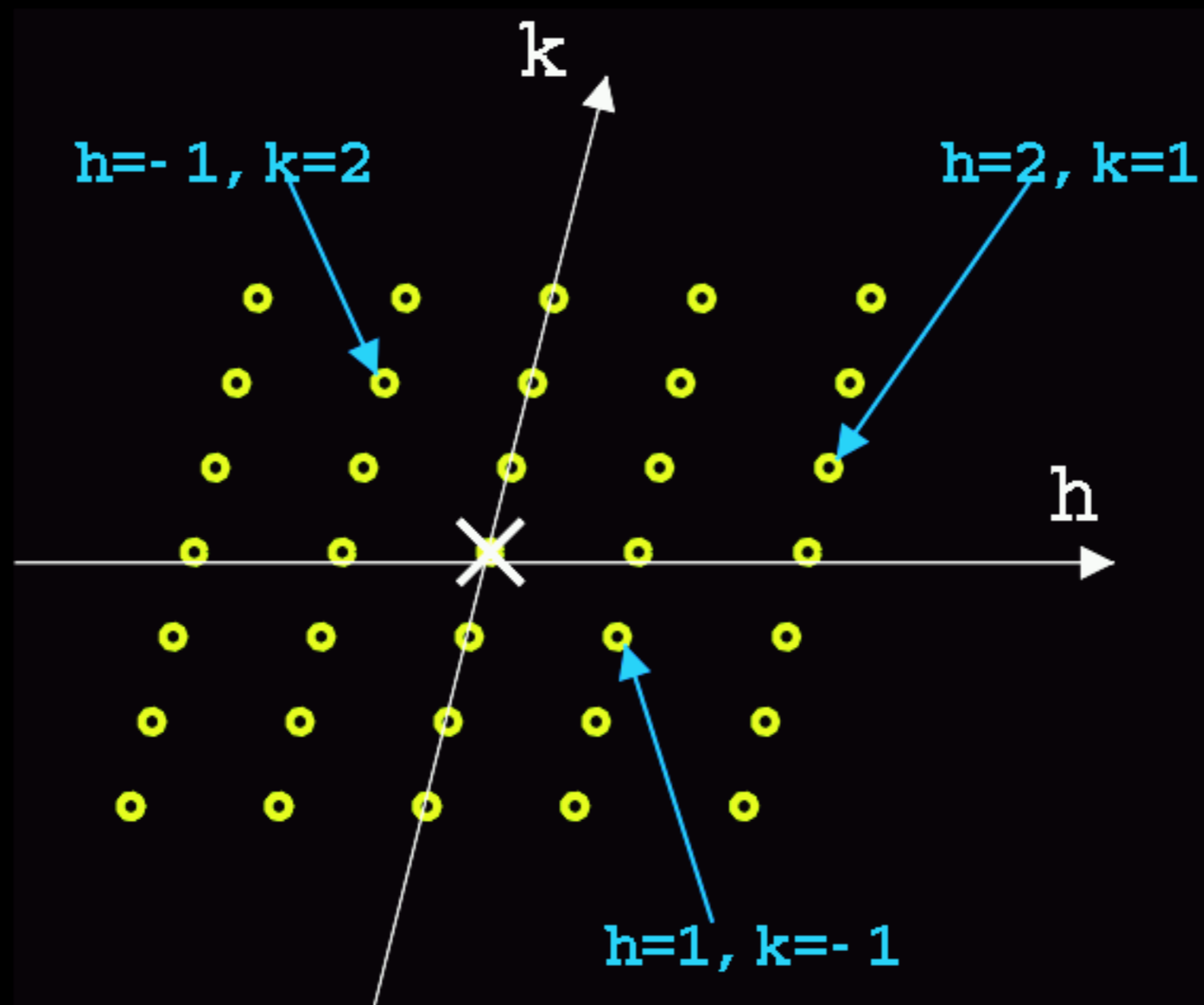
$$\text{Για } n=1 \rightarrow \sin(2\cdot\theta_1) = 1 \cdot (\lambda/d)$$

$$\text{Για } n=2 \rightarrow \sin(2\cdot\theta_2) = 2 \cdot (\lambda/d)$$

$$\text{Για } n=3 \rightarrow \sin(2\cdot\theta_3) = 3 \cdot (\lambda/d)$$

$$\text{Για } n=-3 \rightarrow \sin(2\cdot\theta_{3'}) = -3 \cdot (\lambda/d) = \sin(2\cdot(-\theta_3))$$

Το νόημα των (h,k,l) .



Παράγοντας δομής (1D)

$$\vec{\mathbf{F}}_h = \int_x \rho(x) e^{2\pi i h x} dV$$

$$\vec{\mathbf{F}}_h = \sum_{j=1}^{N_{at}} f_{\theta,j} e^{2\pi i h x_j}$$

$$\rho(x) = \sum_h \vec{\mathbf{F}}_h e^{-2\pi i h x}$$

Παράγοντας δομής (2D)

$$\vec{\mathbf{F}}_{hk} = \int_x \int_y \rho(xy) e^{2\pi i(hx+ky)} dV$$

$$\vec{\mathbf{F}}_{hk} = \sum_{j=1}^{N_{at}} f_{\theta,j} e^{2\pi i(hx_j+ky_j)}$$

$$\rho(xy) = \sum_{hk} \vec{\mathbf{F}}_{hk} e^{-2\pi i(hx+ky)}$$

Παράγοντας δομής (3D)

$$\vec{\mathbf{F}}_{hkl} = \int_x \int_y \int_z \rho(xyz) e^{2\pi i(hx+ky+lz)} dV$$

$$\vec{\mathbf{F}}_{hkl} = \sum_{j=1}^{N_{at}} f_{\theta,j} e^{2\pi i(hx_j+ky_j+lz_j)}$$

$$\rho(xyz) = \sum_{hkl} \vec{\mathbf{F}}_{hkl} e^{-2\pi i(hx+ky+lz)}$$

Παράγοντας δομής

Νόμος του Friendel.

Οι παράγοντες δομής που αντιστοιχούν στα ζεύγη δεικτών (h,k,l) και $(-h,-k,-l)$ έχουν το ίδιο πλάτος και φάσεις τέτοιες ώστε $\varphi(h,k,l) = -\varphi(-h,-k,-l)$. Η απόδειξη αυτού του νόμου γίνεται εύκολα μέσω της εξίσωσης του παράγοντα δομής. Αποτέλεσμα του νόμου του Friendel είναι ότι ο αριθμός των μετρήσεων που πρέπει να γίνουν περιορίζεται στο μισό (ή και πολύ λιγότερο του μισού εάν υπάρχει υψηλή συμμετρία).

Παραδείγματα : 1D

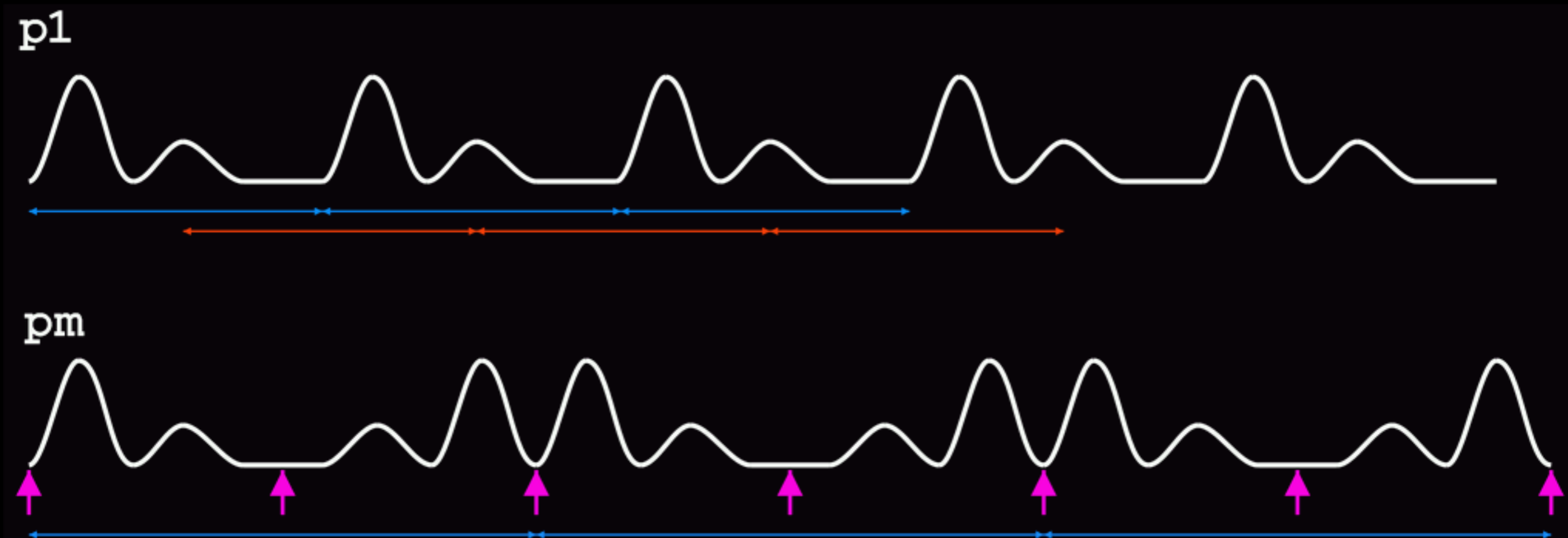
Παρένθεση : συμμετρία.

Στην περίπτωση των μονοδιάστατων 'κρυστάλλων' υπάρχουν μόνο δυο εφικτές συμμετρίες, οι οποίες συμβολίζονται με $p1$ και pm . Στην περίπτωση της $p1$, δεν υπάρχει συμμετρία άλλη από την απλή μετάθεση (που, κυριολεκτώντας, δεν είναι συμμετρία). Στην περίπτωση της pm , υπάρχει ένα κέντρο συμμετρίας (σε κλασματικές συντεταγμένες 0.0, 0.5, 1.0, 1.5, ...).

Παραδείγματα των $p1$ και pm είναι :

Παραδείγματα : 1D

Παρένθεση : συμμετρία.



Παραδείγματα : 1D

Παρένθεση : συμμετρία.

Στην περίπτωση του p_1 , οι παράγοντες δομής είναι γενικοί δηλ. οι φάσεις τους μπορούν να έχουν οποιαδήποτε τιμή. Στην περίπτωση όμως του p_m (και όπως έχουμε ήδη δείξει) οι εξισώσεις απλοποιούνται λόγω της ύπαρξης του κέντρου συμμετρίας, και οι παράγοντες δομής είναι απλοί πραγματικοί αριθμοί (με φάσεις 0 ή 180 μοίρες).

Παραδείγματα : 1D

Παρένθεση : συμμετρία, pm.

$$\begin{aligned}\vec{F}_h &= \sum_{j=1}^{N_{at}} f_{\theta,j} e^{2\pi i h x_j} \\ &= \sum_{j=1}^{N_{at}/2} f_{\theta,j} e^{2\pi i h x_j} + f_{\theta,j} e^{-2\pi i h x_j} \\ &= \sum_{j=1}^{N_{at}/2} f_{\theta,j} [e^{2\pi i h x_j} + e^{-2\pi i h x_j}] \\ &= \sum_{j=1}^{N_{at}/2} f_{\theta,j} [2 \cos(2\pi h x_j)] \\ &= 2 \sum_{j=1}^{N_{at}/2} f_{\theta,j} \cos(2\pi h x_j)\end{aligned}$$

δηλ. ένας πραγματικός αριθμός.

Παραδείγματα : 1D

Παρένθεση : συμμετρία, pm.

$$\begin{aligned}\rho(x) &= \sum_h \vec{F}_h e^{-2\pi i h x} \\ &= \sum_h F_h e^{-2\pi i h x} \\ &= \sum_{h \geq 0} F_h [e^{-2\pi i h x} + e^{-2\pi i (-h)x}] \\ &= \sum_{h \geq 0} F_h [e^{-2\pi i h x} + e^{2\pi i h x}] \\ &= 2 \sum_{h \geq 0} F_h \cos(2\pi h x)\end{aligned}$$

Παραδείγματα : 1D

Ένας μονοδιάστατος κρύσταλλος έδωσε τα εξής δεδομένα περίθλασης :

h	F
1	150
2	-50
3	120
4	100

Ποιά είναι η συνάρτηση ηλεκτρονικής πυκνότητας της στοιχειώδους κυψελίδας ;

Παραδείγματα : 1D

Όπως προκύπτει από τα δεδομένα, οι παράγοντες δομής είναι πραγματικοί αριθμοί. Άρα, η συμμετρία είναι ρ^m και η συνάρτηση ηλεκτρονικής πυκνότητας (αγνοώντας τις σταθερές) δίδεται από :

$$\rho(x) = \sum_{h \geq 0} F_h \cos(2\pi hx)$$

Παραδείγματα : 1D

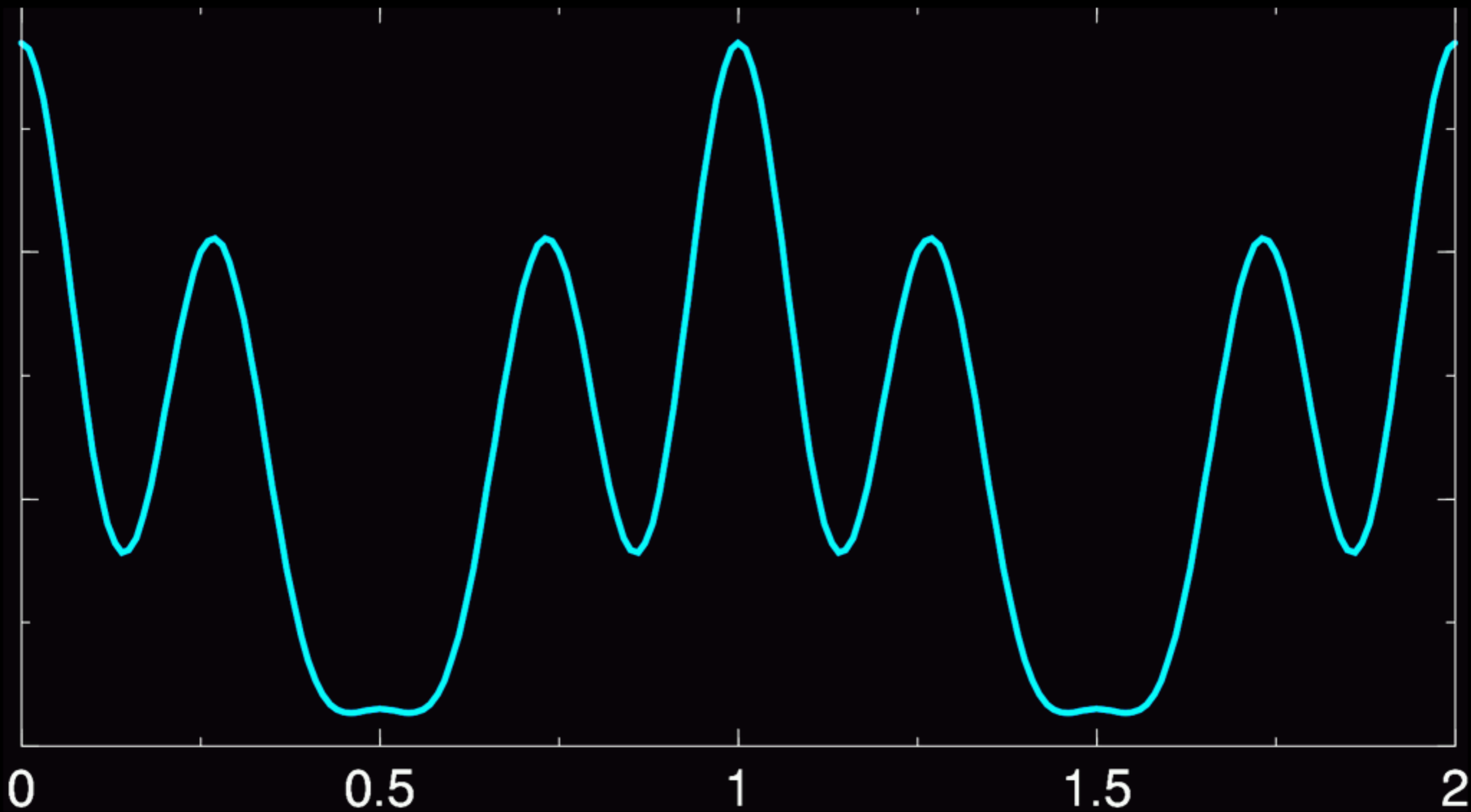
$$\begin{aligned} \rho(0.1) = & 150 * \cos(2\pi \cdot 1 \cdot 0.1) + \\ & -50 * \cos(2\pi \cdot 2 \cdot 0.1) + \\ & 120 * \cos(2\pi \cdot 3 \cdot 0.1) + \\ & 100 * \cos(2\pi \cdot 4 \cdot 0.1) \end{aligned}$$

.....

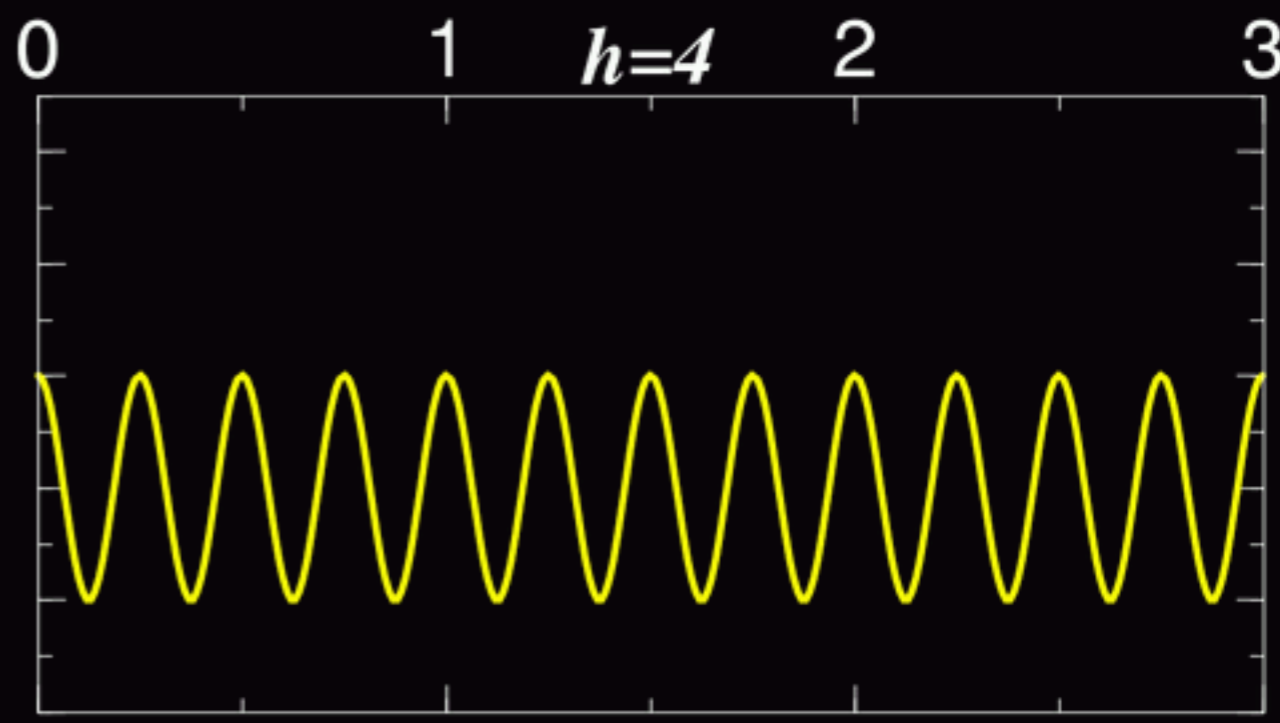
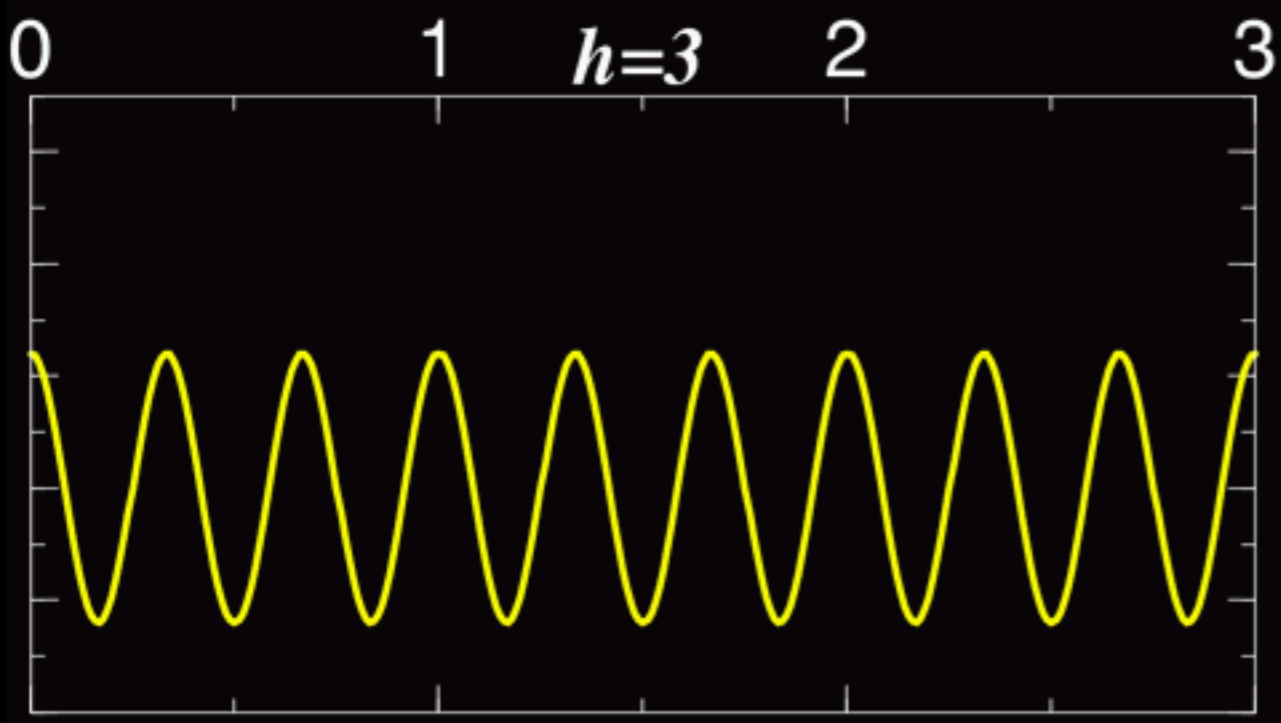
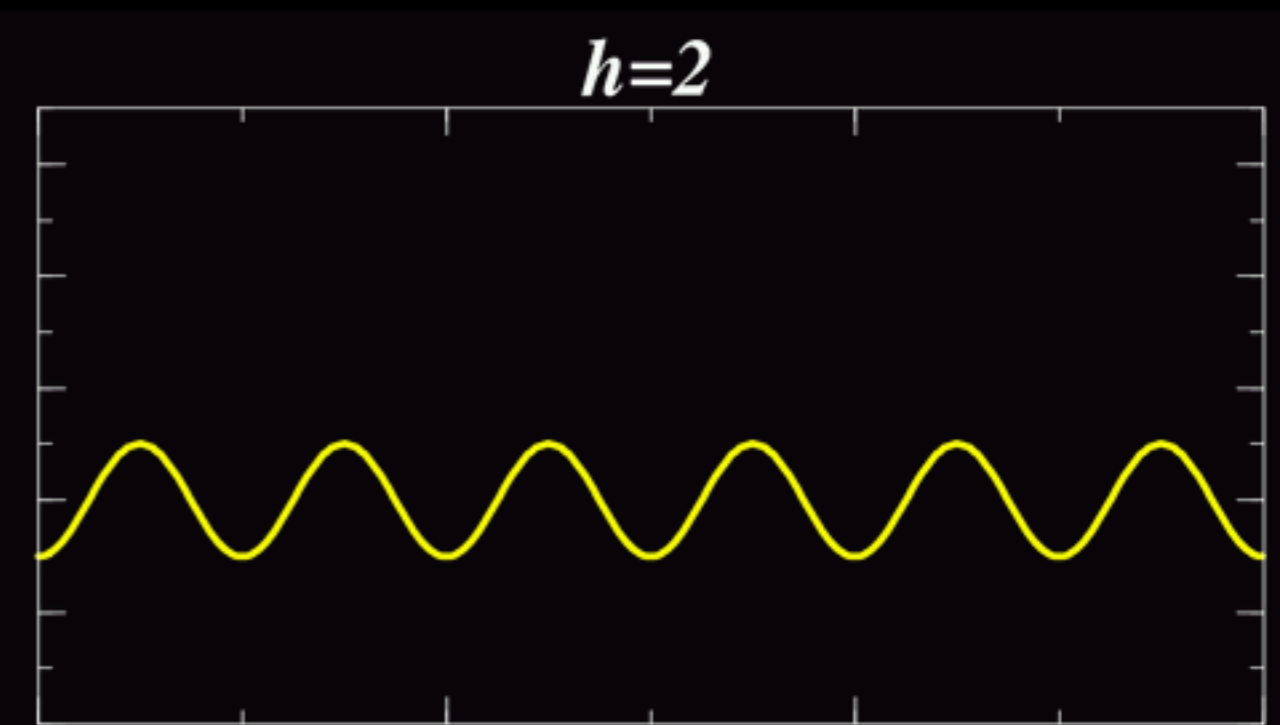
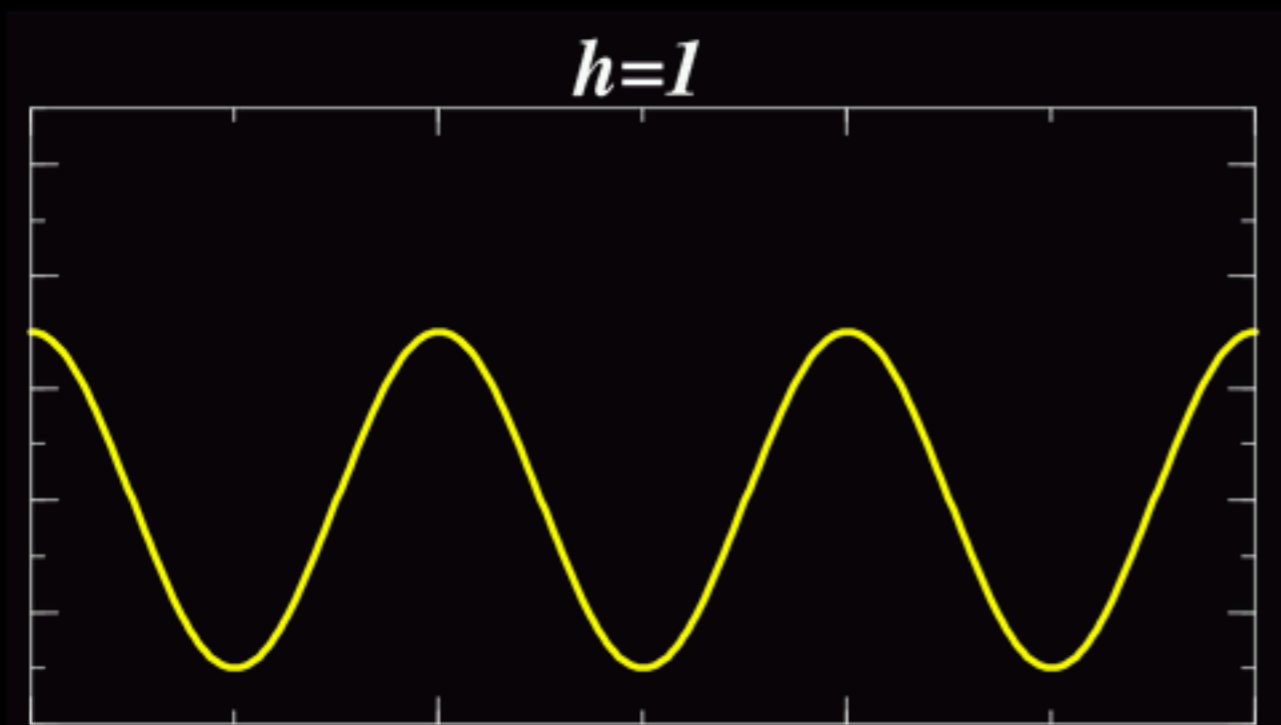
$$\begin{aligned} \rho(0.3) = & 150 * \cos(2\pi \cdot 1 \cdot 0.3) + \\ & -50 * \cos(2\pi \cdot 2 \cdot 0.3) + \\ & 120 * \cos(2\pi \cdot 3 \cdot 0.3) + \\ & 100 * \cos(2\pi \cdot 4 \cdot 0.3) \end{aligned}$$

.....

Παραδείγματα : 1D



Το νόημα των (h,k,l) .



Κρυσταλλογραφία

Μέρος 5ο

Μέθοδοι επίλυσης του προβλήματος των φάσεων.

Παράγοντας δομής

$$\rho(xyz) = \sum_{hkl} \vec{\mathbf{F}}_{hkl} e^{-2\pi i(hx+ky+lz)}$$

$$\rho(xyz) = \sum_{hkl} |\vec{\mathbf{F}}_{hkl}| e^{i\phi_{hkl}} e^{-2\pi i(hx+ky+lz)}$$

Το πρόβλημα των φάσεων

Από το πείραμα γνωρίζουμε τις διευθύνσεις των περιθλώμενων κυμάτων (h, k, l) και τα πλάτη τους $|F_{hkl}|$. Εάν προσδιοριστούν και οι φάσεις τους $\varphi(hkl)$, τότε μπορούμε να υπολογίσουμε την συνάρτηση ηλεκτρονικής πυκνότητας και από αυτή, να προσδιορίσουμε την δομή.

Για τους λόγους που έχουν ήδη αναφερθεί, οι φάσεις των περιθλώμενων κυμάτων δεν μπορούν να μετρηθούν άμεσα. Οι έμμεσες μέθοδοι προσδιορισμού των φάσεων είναι ο πυρήνας της πρακτικής εφαρμογής των κρυσταλλογραφικών μεθόδων στον προσδιορισμό μακρομοριακών δομών.

Το πρόβλημα των φάσεων

Για τα πλαίσια αυτής της διάλεξης θα αναφερθούν σε απλουστευμένη μορφή μόνο δύο από τις υπάρχουσες μεθόδους προσδιορισμού φάσεων. Αυτές είναι :

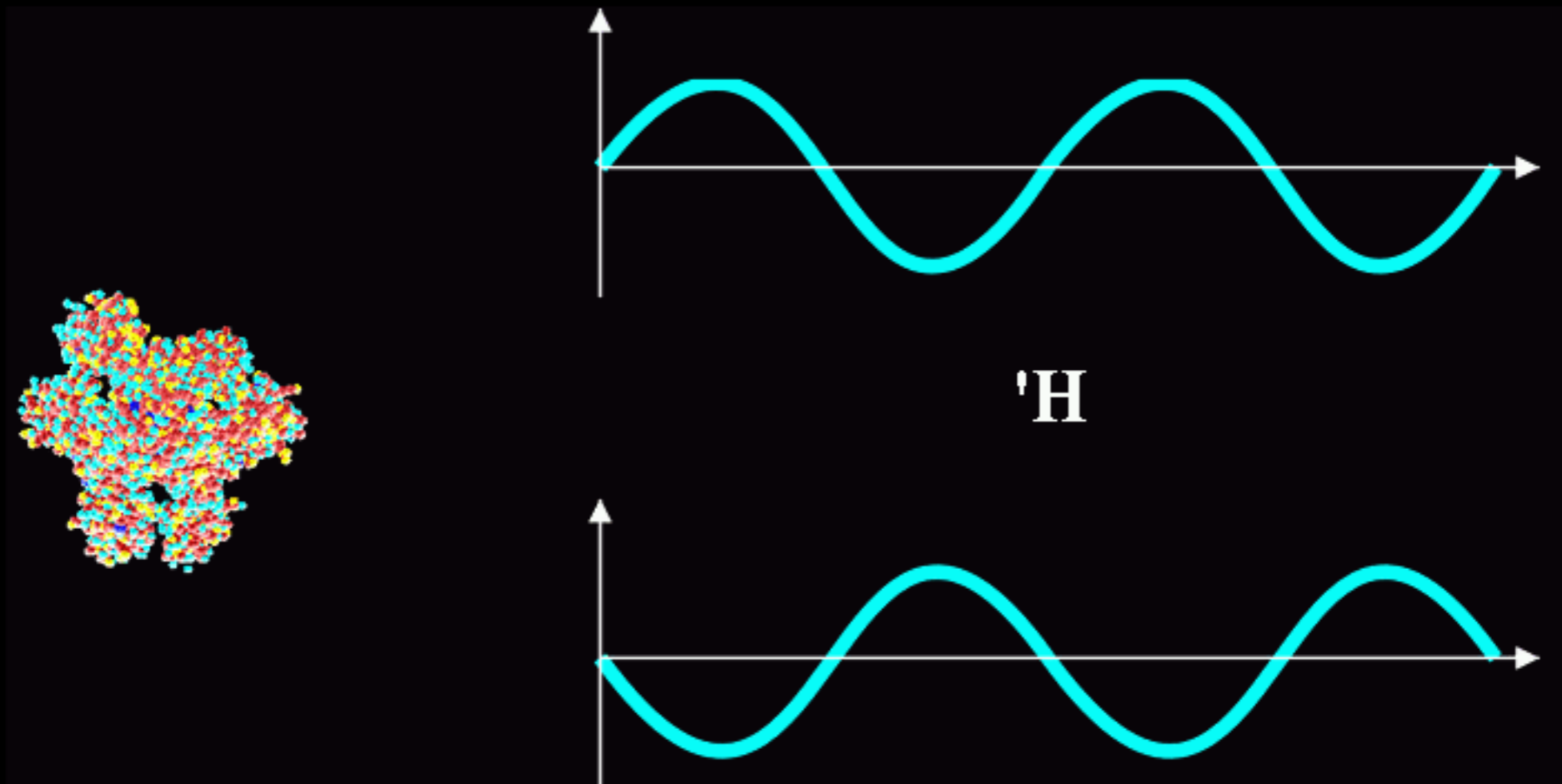
- Η μέθοδος πολλαπλής ισόμορφης αντικατάστασης (MIR για multiple isomorphous replacement) η οποία καλύπτει και τις βασικές αρχές άλλων μεθόδων (όπως MIRAS, SIR, SIRAS, MAD, SAD).
- Η μέθοδος της μοριακής αντικατάστασης (molecular replacement) η οποία είναι χρήσιμη για τις περιπτώσεις εκείνες που για το υπό μελέτη μόριο υπάρχει κάποιο ομόλογό του γνωστής δομής.

MIR

Η βασική ιδέα της μεθόδου έχει ήδη αναφερθεί : εάν μπορούμε να προσθέσουμε κάποιο ή κάποια (συνήθως βαριά) άτομα σε συγκεκριμένες και σταθερές θέσεις κάθε μορίου του κρυστάλλου, και μετρήσουμε δεδομένα τόσο από τους φυσικούς κρυστάλλους, όσο και τους τροποποιημένους, τότε το πρόβλημα του προσδιορισμού των φάσεων απλοποιείται : εάν μπορούμε να προσδιορίσουμε τη δομή (δηλαδή τις θέσεις στη στοιχειώδη κυψελίδα) των βαρέων ατόμων μόνο, μπορούμε να υπολογίσουμε τις φάσεις των κυμάτων που περιθλώνται από τους φυσικούς κρυστάλλους.

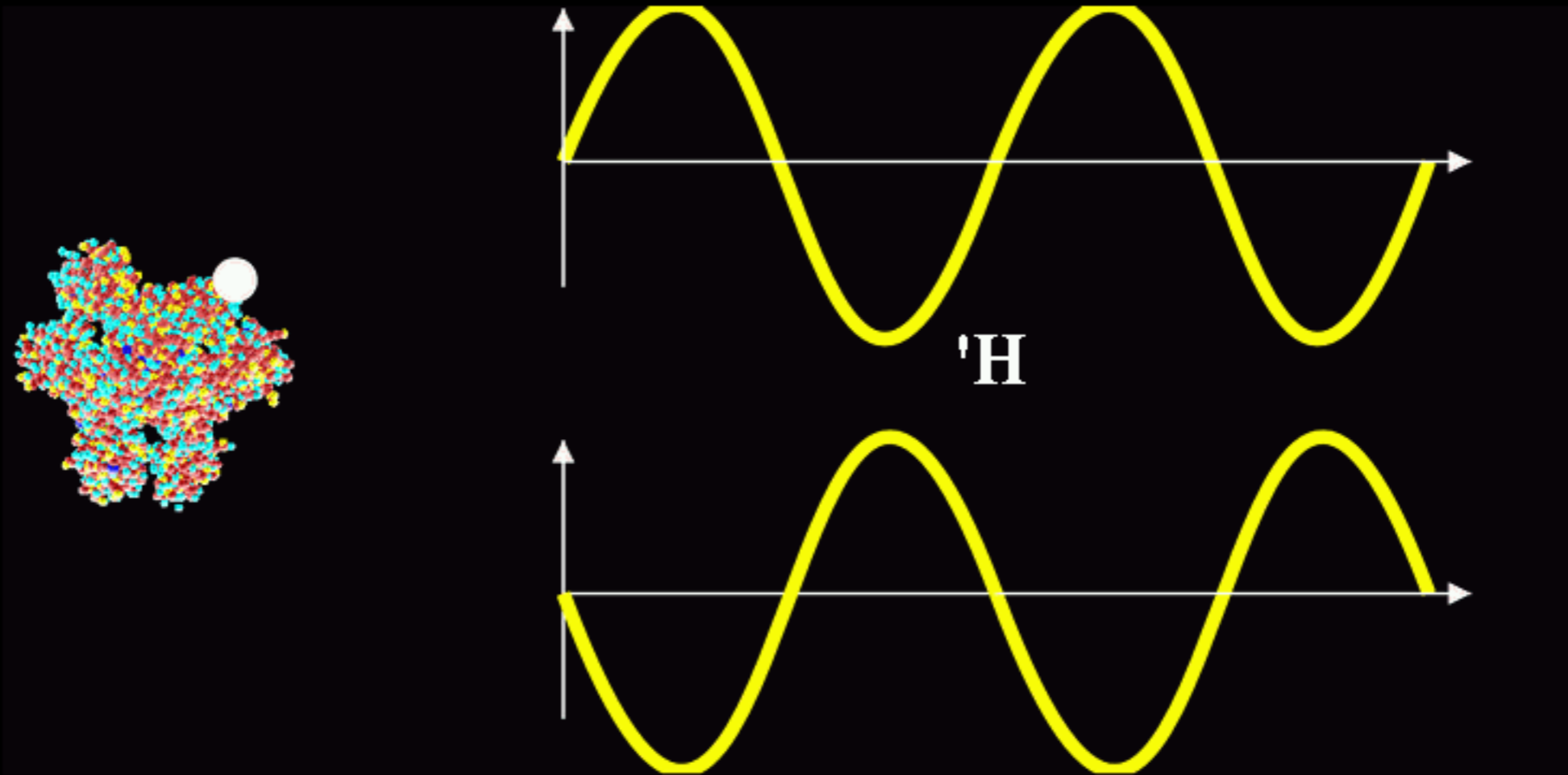
Επανάληψη

Προσδιορισμός φάσεων, ένα παράδειγμα.



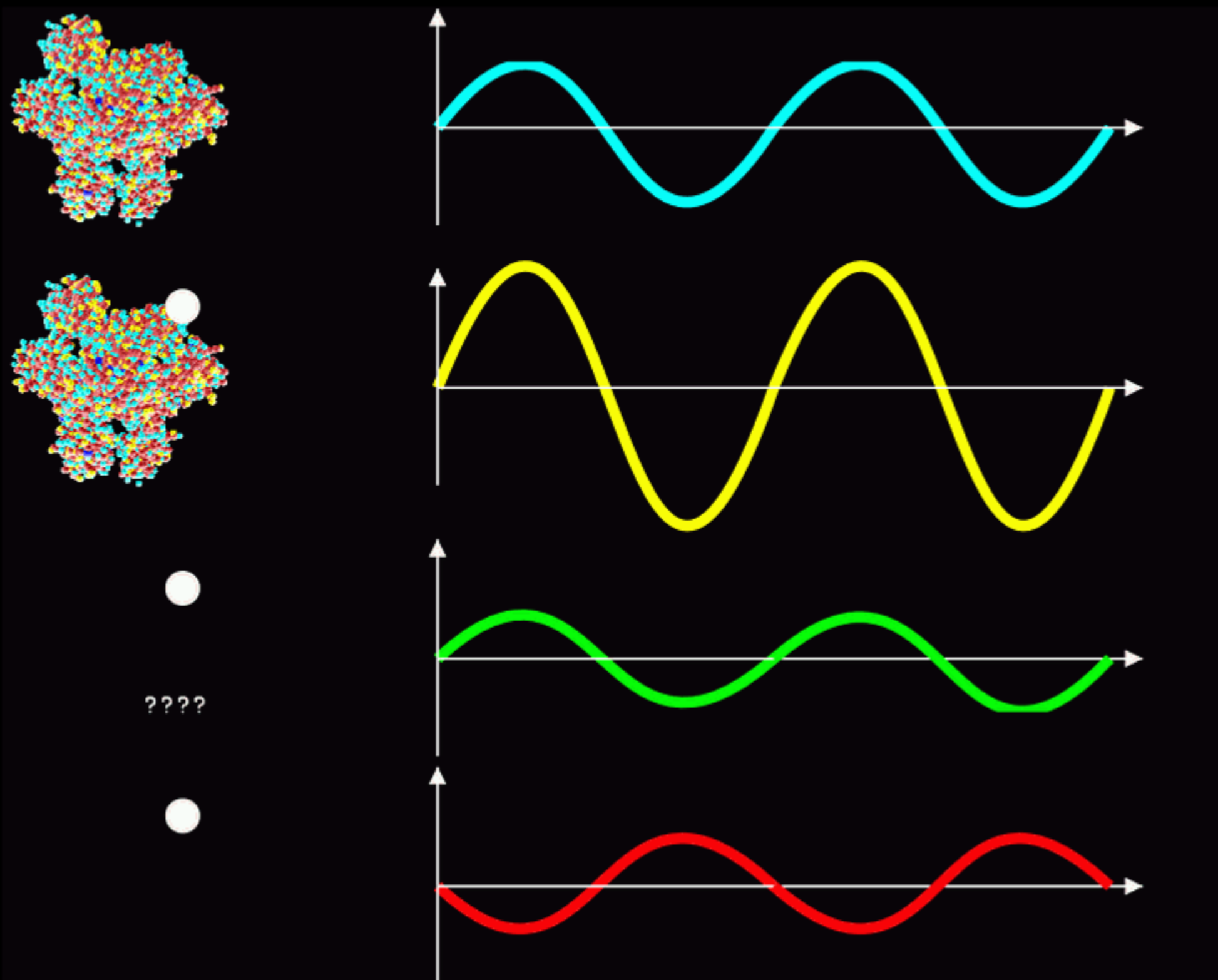
Επανάληψη

Προσδιορισμός φάσεων, ένα παράδειγμα.



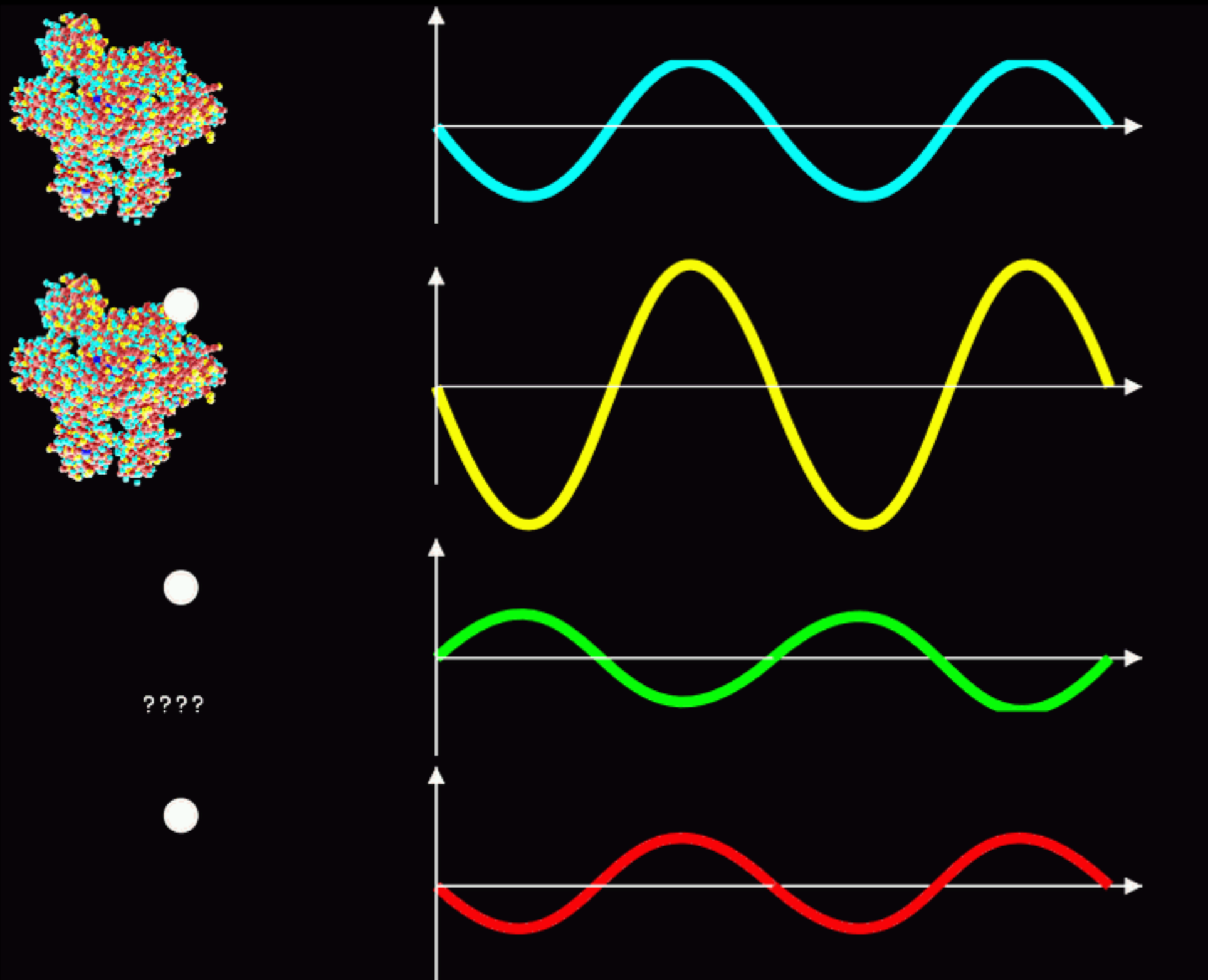
Επανάληψη

Προσδιορισμός φάσεων, ένα παράδειγμα.



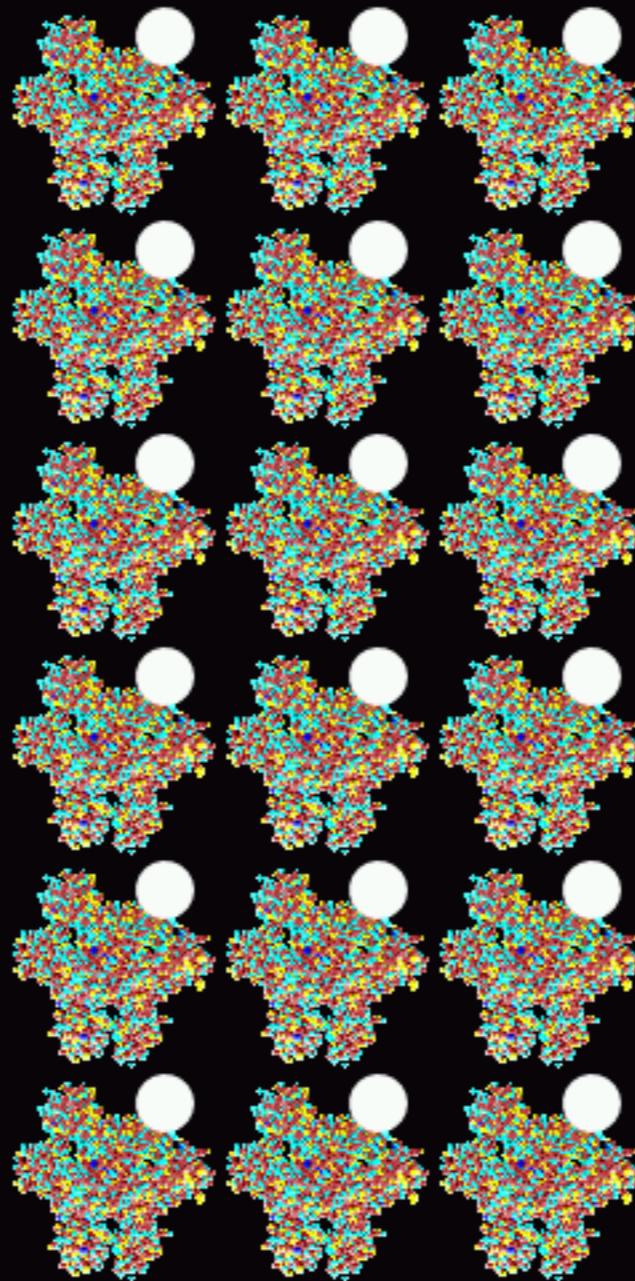
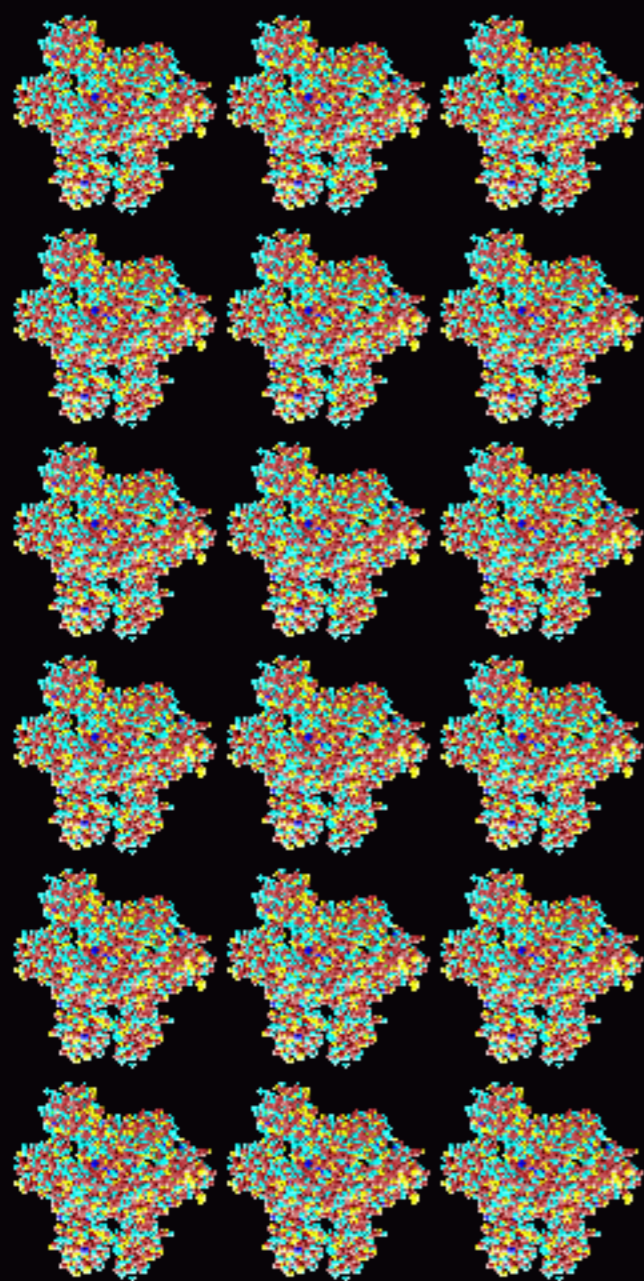
Επανάληψη

Προσδιορισμός φάσεων, ένα παράδειγμα.



Επανάληψη

Προσδιορισμός φάσεων, ένα παράδειγμα.



MIR

Αυτό είναι ένα ρεαλιστικό παράδειγμα της μεθόδου προσδιορισμού φάσεων με το MIR μόνο όταν οι παράγοντες δομής είναι πραγματικοί αριθμοί (λόγω της ύπαρξης ενός κέντρου συμμετρίας). Στη γενική περίπτωση που οι παράγοντες δομής έχουν αυθαίρετες φάσεις, τότε μια μόνο τροποποίηση των φυσικών κρυστάλλων (δηλ. ένα μόνο παράγωγο βαρέων μετάλλων) δεν αρκεί : χρειάζονται κατ'ελάχιστον δύο ή περισσότερα παράγωγα (εξ ου και το "multiple" στο MIR). Η πλέον εύκολη μέθοδος για την κατανόηση της μεθόδου προσδιορισμού των φάσεων είναι γραφική, μέσω του λεγόμενου διαγράμματος Argand.

MIR

Διάγραμμα Argand

Εάν

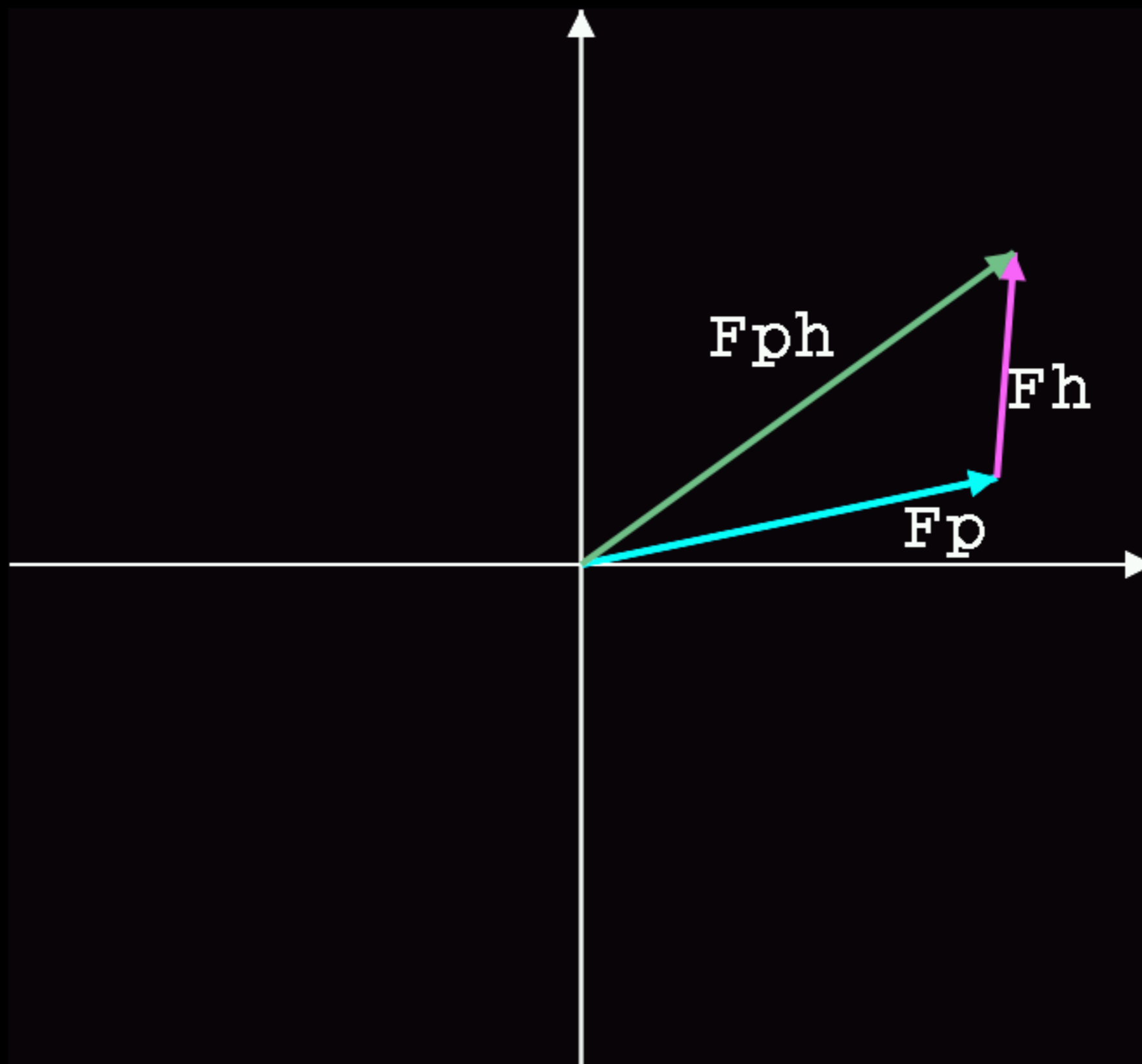
- F_p είναι ο παράγοντας δομής των φυσικών κρυστάλλων,
- F_h ο παράγοντας δομής των βαρέων ατόμων, και
- F_{ph} ο παράγοντας δομής των παραγώγων (τροποποιημένων κρυστάλλων),

τότε, για κάθε ένα από τα περιθλώμενα κύματα ισχύει

$$F_{ph} = F_p + F_h \text{ (ανυσματικό άθροισμα)}$$

MIR

Διάγραμμα Argand



MIR

Διάγραμμα Argand

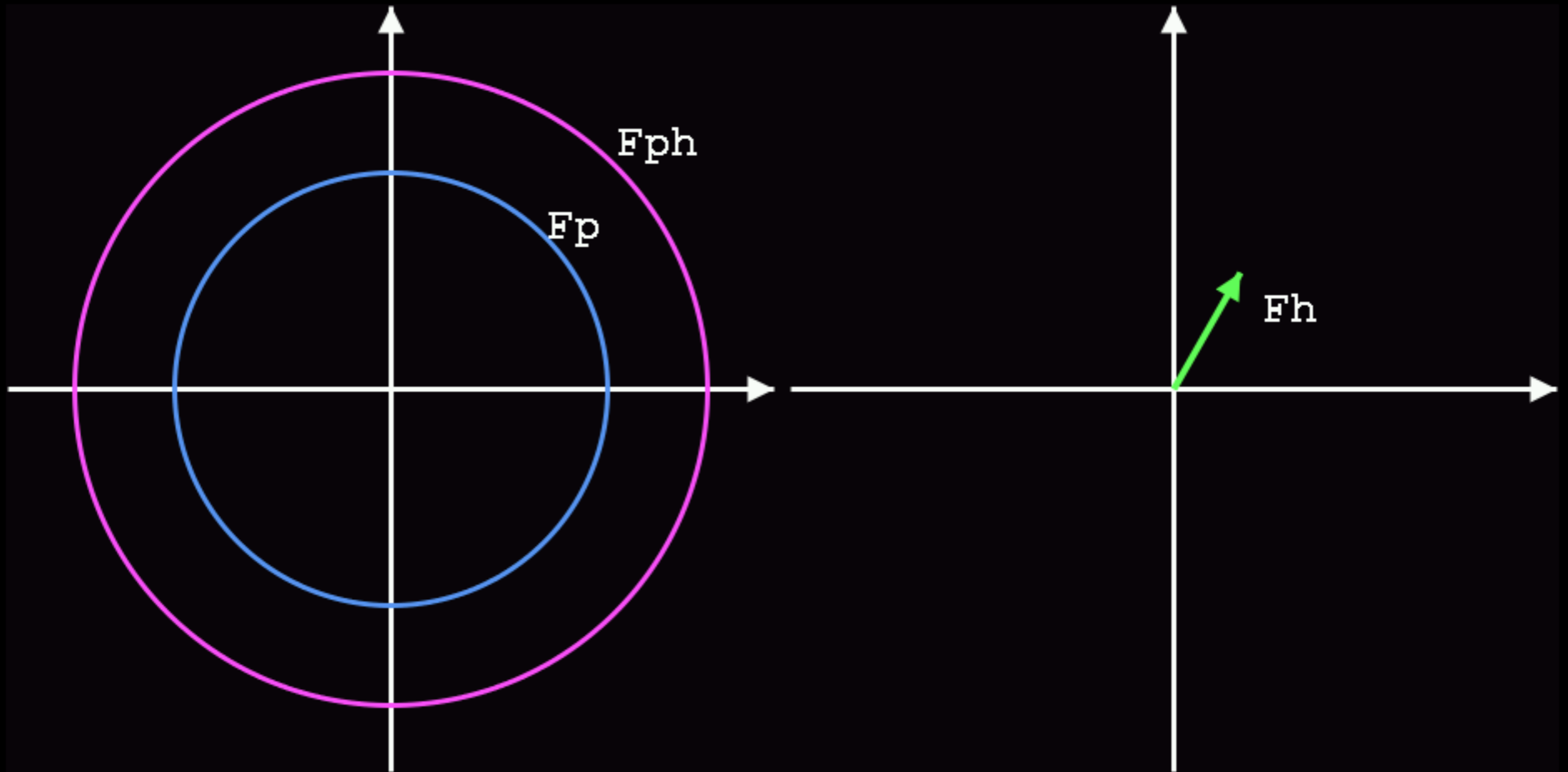
Αλλά από το πείραμα γνωρίζουμε μόνο τα πλάτη των F_r και F_{rh} και (εάν μπορούμε να προσδιορίσουμε τις θέσεις των βαρέων ατόμων) το F_h (πλάτος και φάση).

Άρα, το πρόβλημα γίνεται : με δεδομένα τα $|F_r|$, $|F_{rh}|$ και τον παράγοντα δομής των βαρέων ατόμων F_h , μπορούμε να προσδιορίσουμε την φάση του F_r ;

Η γραφική αναπαράσταση των δεδομένων του προβλήματος και η γεωμετρική του λύση είναι :

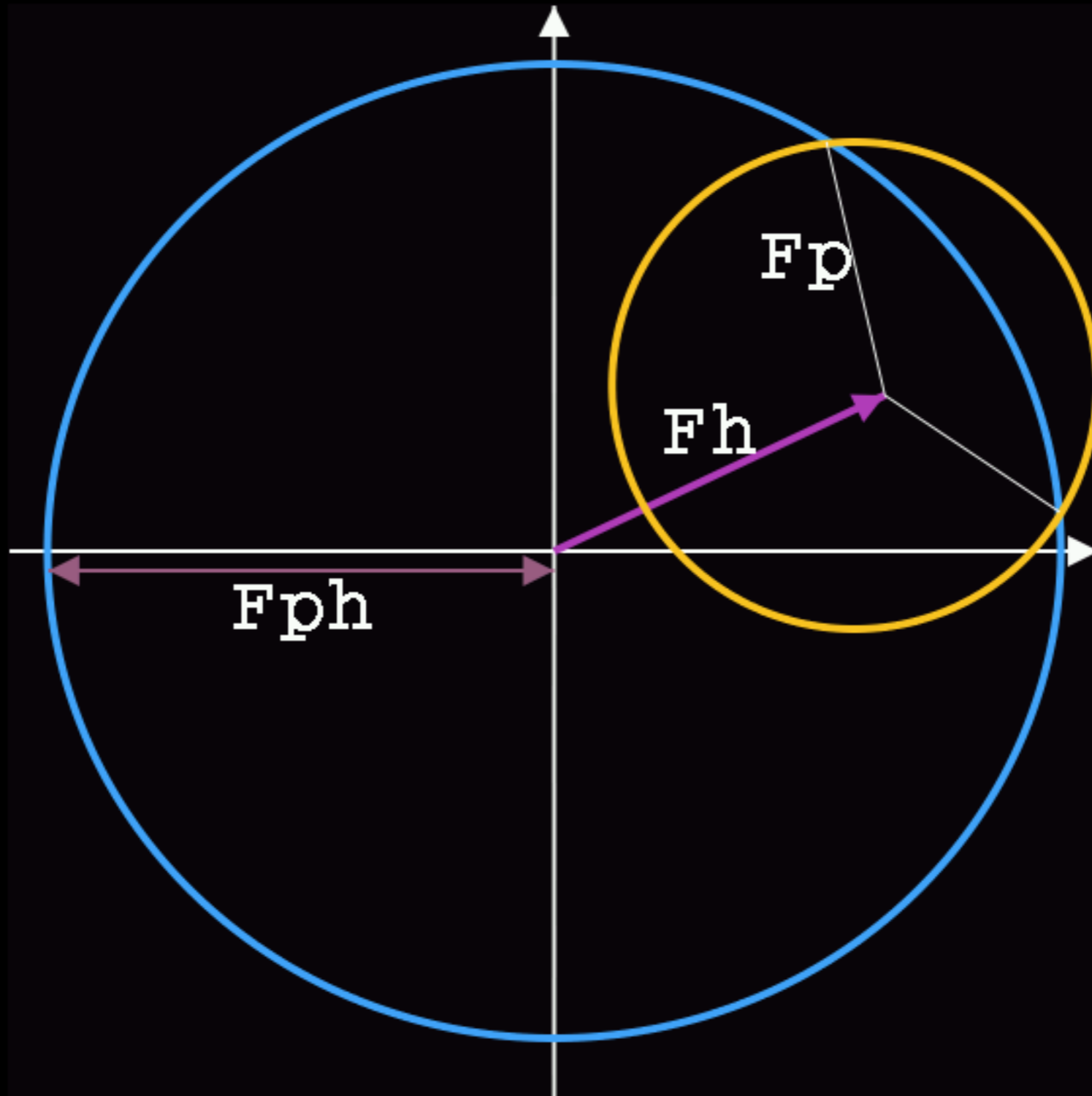
MIR

Διάγραμμα Argand



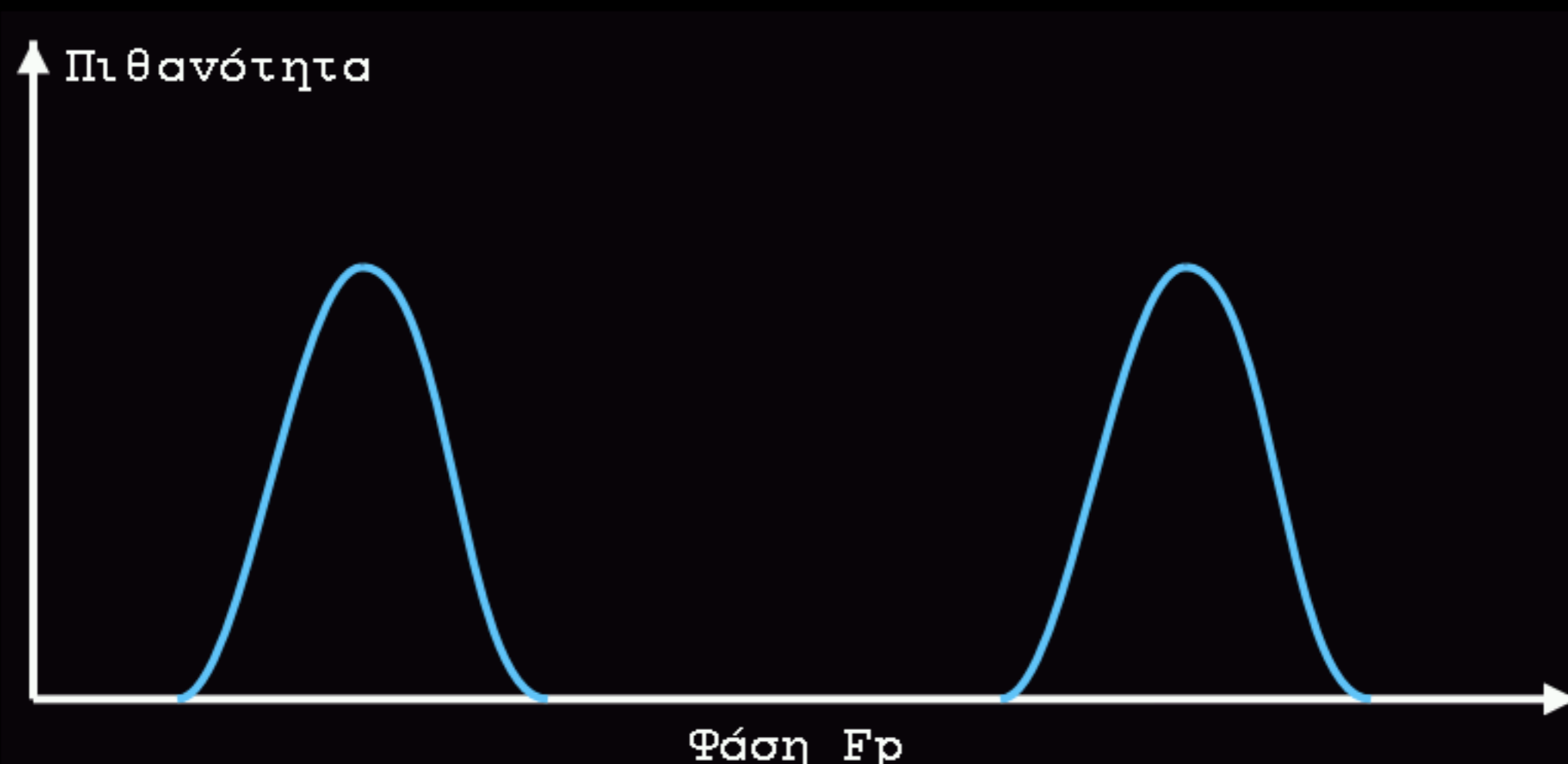
MIR

Διάγραμμα Argand



MIR

Η κατανομή των πιθανών φάσεων του F_p από ένα μόνο παράγωγο βαρέως μετάλλου είναι λοιπόν :



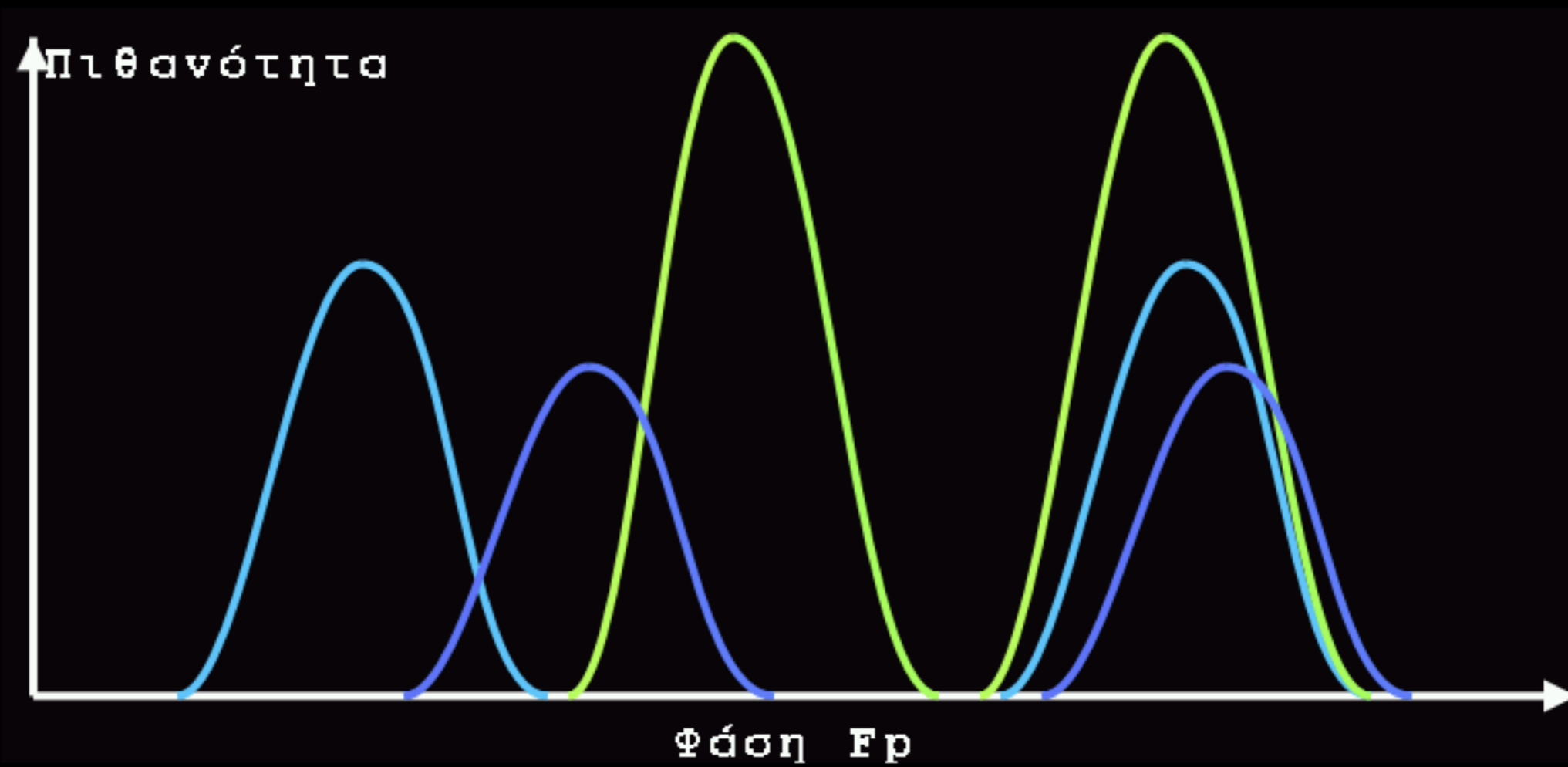
με τις δύο αποδεκτές λύσεις να έχουν την ίδια μεταξύ τους πιθανότητα.

MIR

Η αμφισημία λύνεται με την συλλογή δεδομένων από κρυστάλλους τροποποιημένους με ένα άλλο βαρύ άτομο.

Εάν οι θέσεις των βαρέων ατόμων σε αυτό το δεύτερο παράγωγο διαφέρουν, τότε τα δύο ζεύγη πιθανών φάσεων για το F_r θα συμπίπτουν μόνο σε μια τιμή, την σωστή. Αρκετά συχνά απαιτείται η μέτρηση δεδομένων από περισσότερα των δύο παραγώγων βαρέων μετάλλων. Γραφικά :

MIR



Ανώμαλη σκέδαση

Τα ηλεκτρόνια των εσωτερικών στοιβάδων των ατόμων λόγω της ισχυρής αλληλεπίδρασης τους με τους πυρήνες δε συμπεριφέρονται ως ελεύθερα ηλεκτρόνια όπως υποθέταμε έως τώρα. Για συγκεκριμένα (και χαρακτηριστικά για κάθε τύπο ατόμου) μήκη κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, τα εσωτερικά αυτά ηλεκτρόνια σκεδάζουν με διαφορά φάσης σε σχέση με τα υπόλοιπα (ελεύθερα) ηλεκτρόνια. Χωρίς να υπεισέλθουμε σε λεπτομέρειες, αρκεί να πούμε πως με την επιλογή κατάλληλων ατόμων και μήκους κύματος, η ανώμαλη σκέδαση μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν ένα επιπλέον παράγωγο (με τα εσωτερικά ηλεκτρόνια να παίζουν το ρόλο των βαρέων ατόμων).

Ανώμαλη σκέδαση

MAD, SAD, κλπ.

Το αντίστοιχο του MIR για την περίπτωση της ανώμαλης σκέδασης είναι το MAD (για Multiwavelength Anomalous Dispersion). Ο συνδυασμός του MIR με την ανώμαλη σκέδαση (από τα βαριά άτομα) δίνει την μέθοδο MIRAS (... with Anomalous Scattering).

Άλλες εκδοχές αντίστοιχων πειραματικών προσεγγίσεων είναι τα

- SIR : Single Isomorphous Replacement, και
- SAD : Single-wavelength Anomalous Dispersion

Η συνάρτηση Patterson

Το μόνο που μένει να διευκρινιστεί είναι το πως μπορεί να λυθεί το μηδενικό πρόβλημα : Πως δηλαδή γνωρίζοντας μόνο τα πλάτη $|F_p|$ και $|F_{ph}|$ (των φυσικών και παραγώγων κρυστάλλων αντίστοιχα) μπορούν να προσδιοριστούν οι θέσεις των βαρέων ατόμων στην στοιχειώδη κυψελίδα. Αυτό θα είναι το αντικείμενο της επόμενης διάλεξης.

Μοριακή αντικατάσταση

Η μέθοδος της μοριακής αντικατάστασης (MR για Molecular Replacement) μπορεί να χρησιμοποιηθεί όταν υπάρχει υπάρχει μια γνωστή μακρομοριακή δομή (π.χ. από την PDB) η οποία να έχουμε λόγους να πιστεύουμε ότι είναι παρόμοια με τη δομή του μακρομορίου από το οποίο αποτελούνται οι υπό μελέτη κρύσταλλοι. Η πλέον συνηθισμένη περίπτωση είναι να μελετάμε μια πρωτεΐνη για την οποία υπάρχει κάποια ομόλογη γνωστής δομής.

Μοριακή αντικατάσταση

Η βασική υπόθεση του MR είναι ότι η γνωστή δομή είναι τόσο όμοια με την άγνωστη (υπό μελέτη) δομή, ώστε εάν βάζαμε στην θέση της άγνωστης δομής την γνωστή, οι φάσεις που θα υπολογίζαμε θα είναι τόσο κοντά στις πραγματικές ώστε να έχουμε λύσει το πρόβλημα των φάσεων.

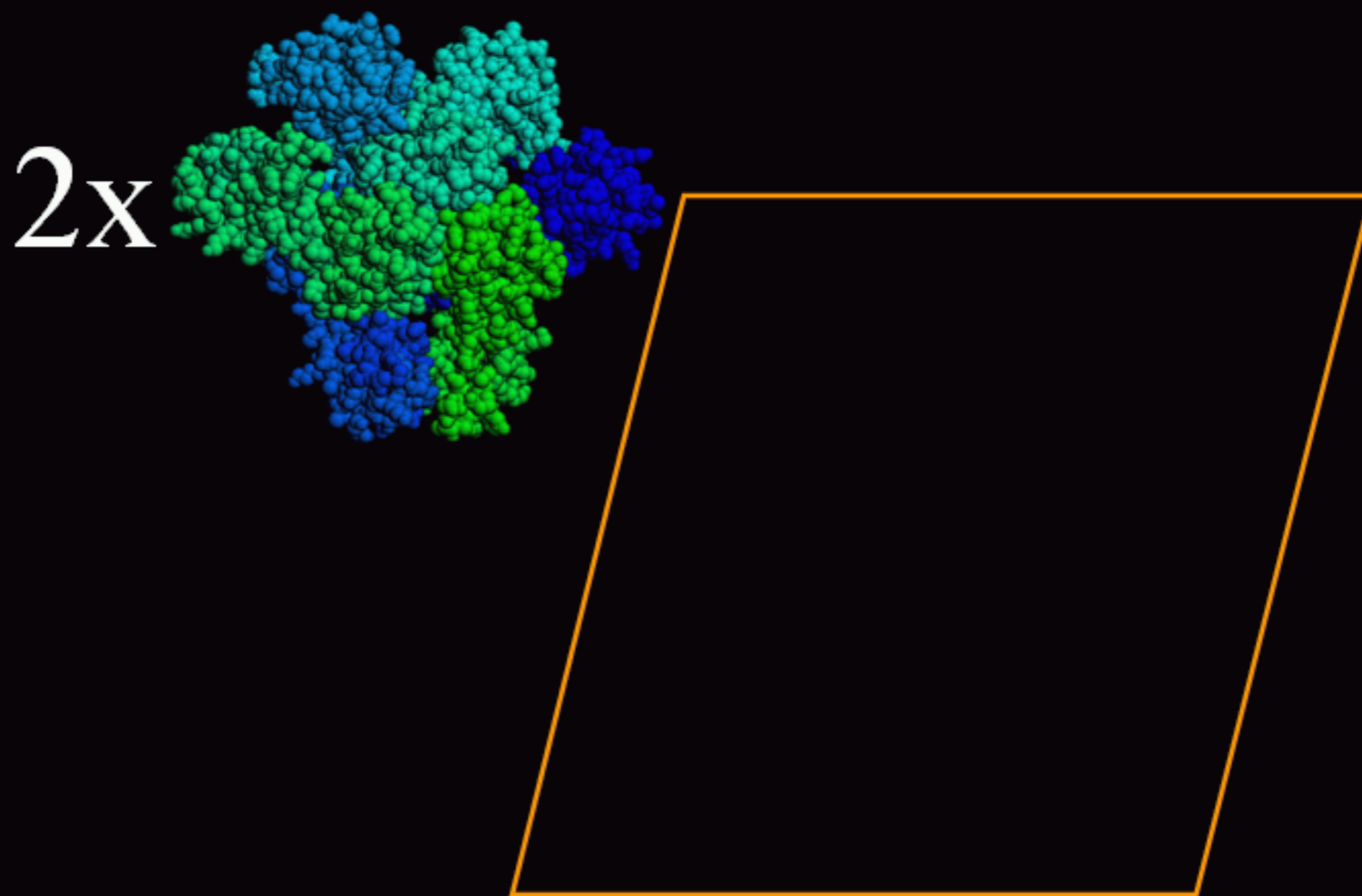
Στην περίπτωση του MR δεν απαιτείται τροποποίηση των φυσικών κρυστάλλων : το μόνο που χρειάζεται είναι τα πλάτη των φυσικών κρυστάλλων $|F_p|$ και οι συντεταγμένες (π.χ. από την PDB) της γνωστής δομής.

Μοριακή αντικατάσταση

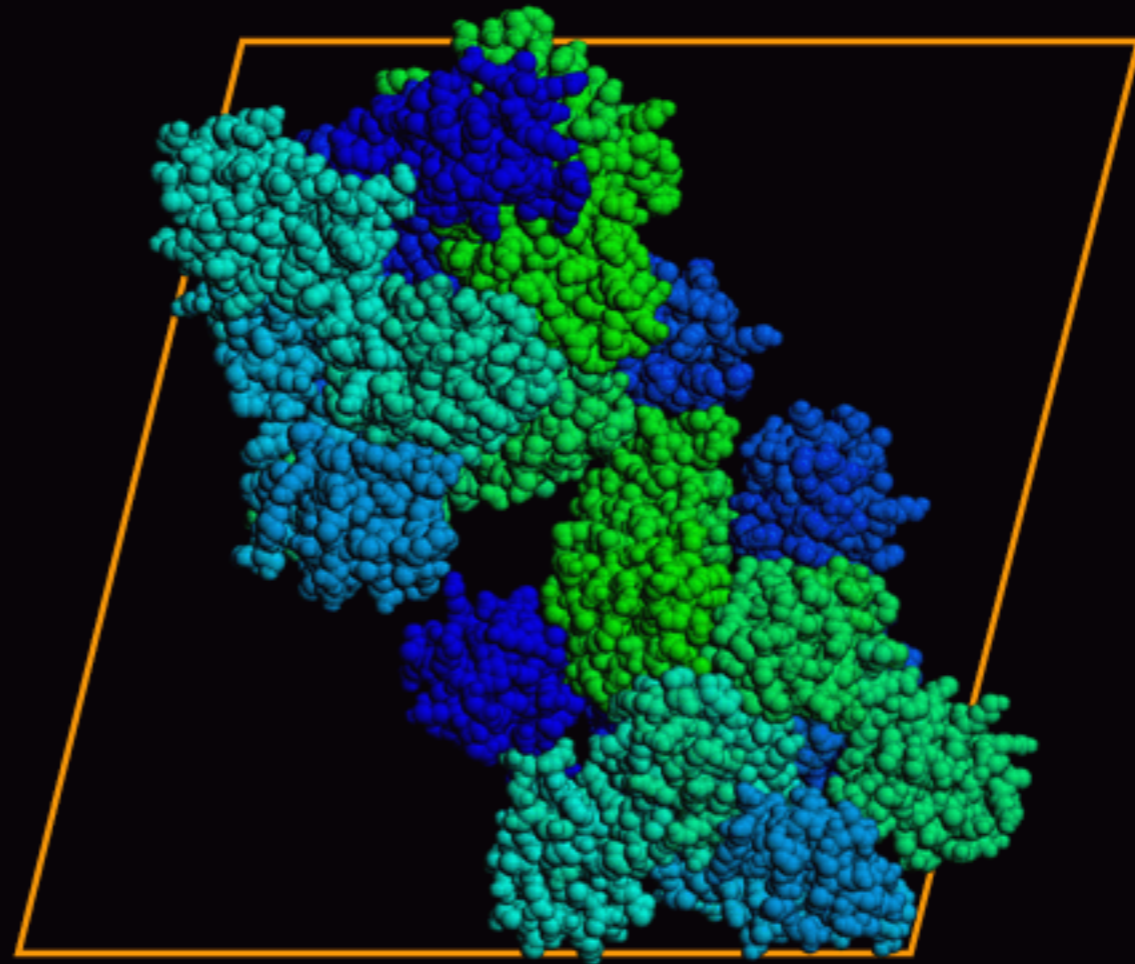
Το θεμελιώδες πρόβλημα του MR είναι το εξής :
Με βάση τα $|F_p|$ και την γνωστή δομή, πως μπορούμε να υπολογίσουμε τη θέση και τον προσανατολισμό του που έχουν τα μόρια στη στοιχειώδη κυψελίδα των υπό μελέτη κρυστάλλων ;

Γραφικά :

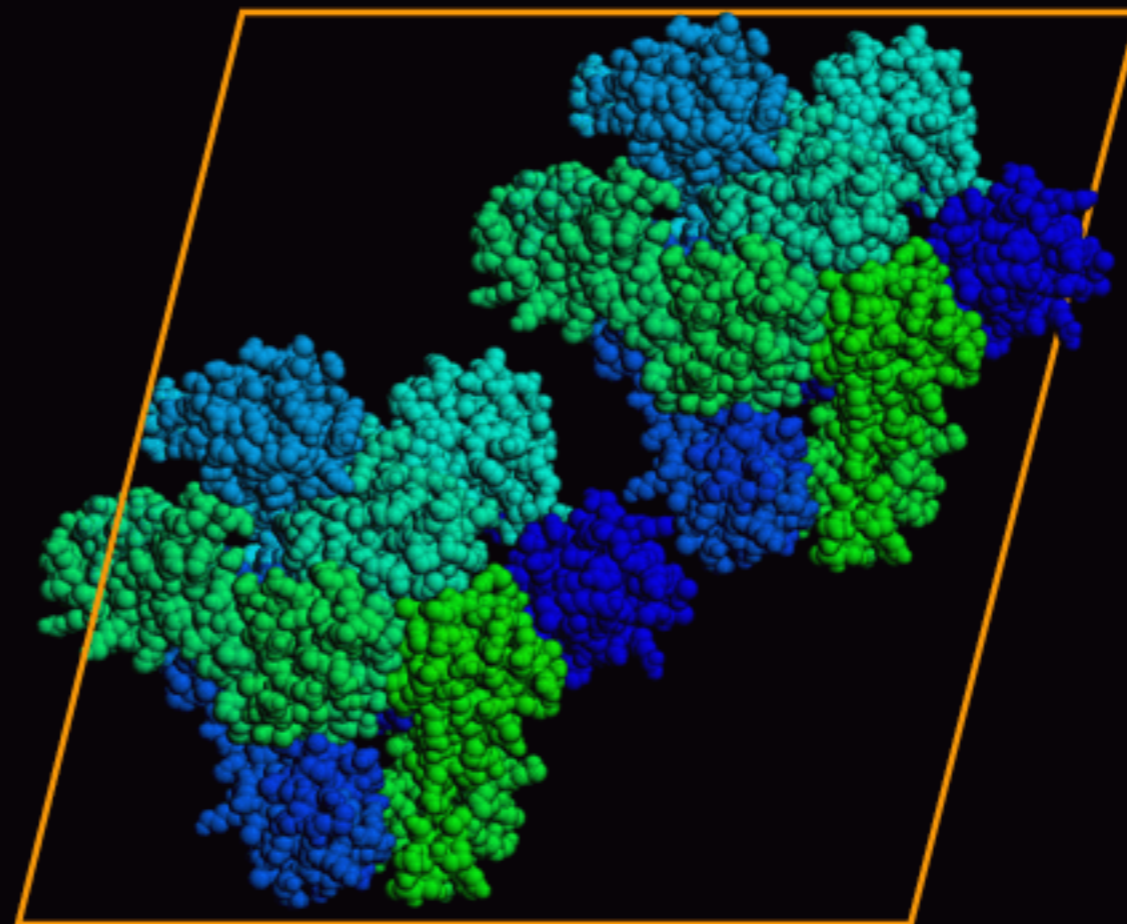
Μοριακή αντικατάσταση



Μοριακή αντικατάσταση



Μοριακή αντικατάσταση



Μοριακή αντικατάσταση

Οι μέθοδοι με τις οποίες μπορούν να προσδιοριστούν οι θέσεις και οι προσανατολισμοί των γνωστών δομών στη στοιχειώδη κυψελίδα των υπό μελέτη κρυστάλλων ξεφεύγουν από τα πλαίσια του μαθήματος. Μερικά στοιχεία θα δωθούν στην επόμενη διάλεξη (μετά τον ορισμό και τις ιδιότητες της συνάρτησης Patterson). Για τα πλαίσια αυτής της διάλεξης μπορεί να αναφερθεί μια διαισθητικά προφανής μέθοδος η οποία στηρίζεται στη συστηματική έρευνα όλων των πιθανών θέσεων και προσανατολισμών της γνωστής δομής στην στοιχειώδη κυψελίδα των κρυστάλλων άγνωστης δομής.

Μοριακή αντικατάσταση

Συστηματική πολυδιάστατη έρευνα

Ο προσανατολισμός ενός αντικειμένου (ως προς ένα σταθερό σύστημα αναφοράς) μπορεί να περιγραφεί με τον ορισμό τριών γωνιών. Σημειώστε ότι υπάρχουν αρκετοί εναλλακτικοί τρόποι ορισμού αυτών των γωνιών όπως π.χ. Eulerian angles, polar angles, κλπ. Η θέση του αντικειμένου μπορεί να περιγραφεί με τον ορισμό τριών συντεταγμένων (π.χ. του κέντρου μάζας του μορίου) στο δεδομένο σύστημα αναφοράς. Έτσι, η θέση και ο προσανατολισμός ενός μορίου μπορεί να περιγραφεί με 6 μεταβλητές, τρεις γωνιακές (α, β, γ) και τρεις θέσεως (x, y, z).

Μοριακή αντικατάσταση

Συστηματική πολυδιάστατη έρευνα

Με δεδομένες κάποιες τιμές για τα $\alpha, \beta, \gamma, \chi, \psi, \zeta$ μπορούμε να υπολογίσουμε τις συντεταγμένες όλων των ατόμων της γνωστής δομής στην κυψελίδα των αγνώστων κρυστάλλων. Για αυτή (την υποθετική) δομή μπορούμε λοιπόν να υπολογίσουμε τα πλάτη των παραγόντων δομής που θα παρατηρούσαμε εάν το μόριο όντως ήταν στη θέση που αντιστοιχεί στα $\alpha, \beta, \gamma, \chi, \psi, \zeta$, και να τα συγκρίνουμε (τα υπολογιζόμενα πλάτη) με τα πειραματικά προσδιορισμένα.

Η βασική υπόθεση της μεθόδου είναι ότι η συμφωνία ανάμεσα στα παρατηρούμενα και υπολογιζόμενα πλάτη θα μεγιστοποιείται όταν τα $\alpha, \beta, \gamma, \chi, \psi, \zeta$ είναι τα σωστά.

Μοριακή αντικατάσταση

Συστηματική πολυδιάστατη έρευνα

Ο αλγόριθμος είναι :

- Θέτουμε $\alpha=\beta=\gamma=\chi=y=z=0$
- Υπολογίζουμε τις συντεταγμένες των ατόμων της γνωστής δομής για τα $(\alpha,\beta,\gamma,\chi,y,z)$.
 - Από τις ατομικές συντεταγμένες υπολογίζουμε τα πλάτη $|F_p,calc|$ και τα συγκρίνουμε με τα πειραματικά $|F_p,obs|$ (χρησιμοποιώντας για παράδειγμα το γραμμικό συντελεστή συσχέτισης).
 - Αυξάνουμε το α κατά π.χ. 5 μοίρες και επαναλαμβάνουμε τη διαδικασία μέχρι το α να γίνει ίσο με 360 μοίρες.

Μοριακή αντικατάσταση

Συστηματική πολυδιάστατη έρευνα

- Όταν το α γίνει 360 μοίρες, θέτουμε $\alpha=0$, αυξάνουμε το β κατά 5 μοίρες και επαναλαμβάνουμε.
- Το ίδιο διαδοχικά για το γ .
- Αφού εξετάσουμε όλους τους συνδυασμούς των α, β, γ για $x=y=z=0.0$, αυξάνουμε διαδοχικά τα x, y, z και επαναλαμβάνουμε.

Η λύση της μεθόδου είναι εκείνος ο συνδυασμός των $(\alpha, \beta, \gamma, x, y, z)$ για τον οποίο ο π.χ. συντελεστής συσχέτισης παίρνει τη μέγιστη τιμή του.

Κρυσταλλογραφία

Μέρος 6ο

Μέθοδοι επίλυσης του προβλήματος των φάσεων [2] :
Η συνάρτηση Patterson.

Το μηδενικό πρόβλημα

Απουσία κάποιου γνωστού μοντέλου για την υπό μελέτη δομή (ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί η μέθοδος της μοριακής αντικατάστασης), είναι αναγκαία η χρήση μεθόδων όπως το MIR και το MAD. Η επίλυση του προβλήματος των φάσεων με αυτές τις μεθόδους, απαιτεί τον προσδιορισμό της δομής των βαρέων ατόμων (ή των ανώμαλων σκεδαστών) με μοναδικά δεδομένα τα πλάτη $|F_p|$ και $|F_{ph}|$. Υποθέτοντας ότι η απόλυτη τιμή της διαφοράς ($|F_{ph}| - |F_p|$) είναι μια ικανοποιητική προσέγγιση για το $|F_h|$, το πρόβλημα στη γενική του μορφή γίνεται : με δεδομένα τα $h, k, l, |F|$, και τη συμμετρία των κρυστάλλων, ποιά είναι η δομή ;

Το μηδενικό πρόβλημα

Ο προσδιορισμός των κλασματικών συντεταγμένων (x,y,z) των ατόμων που περιέχονται στη στοιχειώδη κυψελίδα με μοναδικό δεδομένο τα h,k,l και $|F|$ είναι το πραγματικό πρόβλημα των φάσεων.

Στη γενική του περίπτωση το πρόβλημα είναι θεμελιωδώς μη επιλύσιμο : Υπάρχουν άπειρες συναρτήσεις ηλεκτρονικής πυκνότητας οι οποίες είναι συμβατές με τα δεδομένα :

$$\rho(xyz) = \sum_{hkl} |\vec{F}_{hkl}| e^{i\phi_{hkl}} e^{-2\pi i(hx+ky+lz)}$$

Προϋπάρχουσα πληροφορία

Η εξαγωγή δομικής πληροφορίας από τα $h, k, l, |F|$ είναι εφικτή μόνο όταν μπορούμε να θέσουμε επιπλέον περιορισμούς λόγω των ιδιοτήτων που αναμένουμε να έχουν οι συναρτήσεις ηλεκτρονικής πυκνότητας.

Τέτοιες ιδιότητες είναι :

- Η συνάρτηση ηλεκτρονικής πυκνότητας είναι παντού θετική ή μηδέν.
- Η συνάρτηση ηλεκτρονικής πυκνότητας αποτελείται από μη επικαλυπτόμενα άτομα (με γνωστή δομή για κάθε ατομικό τύπο).

Άμεσες μέθοδοι (direct methods)

Οι πλέον ισχυρές μέθοδοι προσδιορισμού φάσεων που στηρίζονται σε αυτές τις ιδιότητες της συνάρτησης ηλεκτρονικής πυκνότητας είναι οι λεγόμενες άμεσες μέθοδοι (direct methods). Η εξαγωγή πληροφορίας για τις φάσεις των παραγόντων δομής στηρίζεται στην ανάλυση αλγεβρικών σχέσεων μεταξύ αυτών (των παραγόντων δομής). Οι αλγεβρικές αυτές σχέσεις προκύπτουν ως συνέπεια των ιδιοτήτων της συνάρτησης ηλεκτρονικής πυκνότητας που αναφέρθηκαν. Ακόμα και έτσι, το πρόβλημα των φάσεων είναι επιλύσιμο μόνο για δομές που περιέχουν μέχρι μερικές εκατοντάδες άτομα στην ασύμμετρη μονάδα τους.

Συνάρτηση Patterson

Οι άμεσες μέθοδοι είναι το πλέον πλούσιο σε μαθηματικά τμήμα της κρυσταλλογραφίας και για τα πλαίσια αυτού του μαθήματος κάθε περαιτέρω ανάλυση θα αποφευχθεί. Μια άλλη οικογένεια (συγγενών) μεθόδων όμως που θα αναφερθεί σε μεγαλύτερο βάθος είναι αυτή που στηρίζεται στις ιδιότητες της συνάρτησης Patterson. Ο ορισμός της συνάρτησης Patterson θα εξαχθεί ως απάντηση του ερωτήματος : υπάρχει δομική πληροφορία που να περιέχεται στα πλάτη μόνο των παραγόντων δομής (χωρίς καμία πληροφορία για τις φάσεις τους) ;

Συνάρτηση Patterson

Μια ισοδύναμη ερώτηση είναι : ποιο είναι το φυσικό νόημα (εάν υπάρχει) των συνθέσεων του τύπου :

$$\mathcal{T}(uvw) = \sum_{hkl} |\vec{\mathbf{F}}_{hkl}| e^{-2\pi i(hu+kv+lw)}$$

$$\mathcal{P}(uvw) = \sum_{hkl} |\vec{\mathbf{F}}_{hkl}|^2 e^{-2\pi i(hu+kv+lw)}$$

$$\mathcal{V}(uvw) = \sum_{hkl} |\vec{\mathbf{F}}_{hkl}|^3 e^{-2\pi i(hu+kv+lw)}$$

...

οι οποίες μπορούν να υπολογιστούν με μόνο εφόδιο τα $h, k, l, |F|$;

Συνάρτηση Patterson

Από αυτές, η δεύτερη συνάρτηση [$P(uvw)$, γνωστή ως συνάρτηση Patterson] η οποία χρησιμοποιεί όχι τα πλάτη αυτά καθ'αυτά, αλλά το τετράγωνο τους, έχει φυσική σημασία. Για την απόδειξη αυτής της φυσικής σημασίας απαιτείται ο ορισμός του complex conjugate : Εάν F είναι ένας παράγοντας δομής, με πλάτος $|F|$ και φάση (φ), τότε το complex conjugate αυτού συμβολίζεται με F^* και ορίζεται ως ο παράγοντας δομής με πλάτος $|F|$ και φάση ($-\varphi$).

Εάν με A και B συμβολίσουμε το πραγματικό και φανταστικό (αντίστοιχα) μέρος του F , τότε η τιμή του γινομένου των (ανυσμάτων) F και F^* είναι :

Συνάρτηση Patterson

$$\begin{aligned}\vec{F}\vec{F}^* &= (A + iB)(A - iB) \\ &= A^2 + B^2 + iBA - AiB \\ &= A^2 + B^2 \\ &= |\vec{F}|^2\end{aligned}$$

Άρα η συνάρτηση $P(uv)$ είναι ο μετασχηματισμός Fourier του γινομένου των παραγόντων δομής με τα complex conjugates τους.

Το φυσικό νόημα αυτού του μετασχηματισμού Fourier μπορεί να βρεθεί μέσω του θεωρήματος της συνέλιξης :

Το θεώρημα της συνέλιξης ...

Ο μετασχηματισμός Fourier της συνέλιξης δυο συναρτήσεων είναι ίσος (ταυτίζεται) με το γινόμενο των μετασχηματισμών Fourier των επιμέρους συναρτήσεων. Δηλ.

$$\mathcal{FT}(f \otimes g) = \mathcal{FT}(f) \cdot \mathcal{FT}(g)$$

... ανάποδα

Ο μετασχηματισμός Fourier του γινομένου δυο συναρτήσεων είναι ίσος (ταυτίζεται) με τη συνέλιξη των μετασχηματισμών Fourier των επιμέρους συναρτήσεων. Δηλ.

$$\mathcal{FT}(f \cdot g) = \mathcal{FT}(f) \otimes \mathcal{FT}(g)$$

Patterson & συνέλιξη

Άρα, το αποτέλεσμα μιας σύνθεσης Fourier των τετραγώνων των πλατών παραγόντων δομής (με όλες τις φάσεις ίσες με το μηδέν) είναι ίση (ταυτίζεται) με τη συνέλιξη του μετασχηματισμού Fourier των παραγόντων δομής με το μετασχηματισμού Fourier των complex conjugate τους.

Αλλά, ο μετασχηματισμός Fourier των παραγόντων δομής είναι η συνάρτηση ηλεκτρονικής πυκνότητας $\rho(xyz)$. Το μόνο που μένει είναι να προσδιορίσουμε το φυσικό νόημα του μετασχηματισμού Fourier των complex conjugates των παραγόντων δομής.

Αλγεβρικά :

Patterson & συνέλιξη

$$\vec{\mathbf{F}}_{hkl} = |\vec{\mathbf{F}}_{hkl}| e^{i\phi} = \sum_{j=1}^{N_{at}} f_{\theta,j} e^{2\pi i(hx_j + ky_j + lz_j)}$$

$$\vec{\mathbf{F}}_{hkl}^* = |\vec{\mathbf{F}}_{hkl}| e^{-i\phi} = \sum_{j=1}^{N_{at}} f_{\theta,j} e^{2\pi i[h(-x_j) + k(-y_j) + l(-z_j)]}$$

Άρα, ο μετασχηματισμός Fourier των complex conjugates των παραγόντων δομής είναι το $\rho(-x, -y, -z)$ δηλ. το κεντροσυμμετρικό είδωλο της συνάρτησης ηλεκτρονικής πυκνότητας.

Η συνάρτηση Patterson

Άρα, το αποτέλεσμα μιας σύνθεσης Fourier των τετραγώνων των πλατών παραγόντων δομής (με όλες τις φάσεις ίσες με το μηδέν) είναι ίση (ταυτίζεται) με τη συνέλιξη της συνάρτησης ηλεκτρονικής πυκνότητας του κρυστάλλου $[\rho(xyz)]$ με ένα κεντροσυμμετρικό είδωλο της $[\rho(-x,-y,-z)]$. Επειδή η πράξη της συνέλιξης είχε οριστεί ως

Η συνάρτηση Patterson

$$\begin{aligned} conv(u) &= f(x) \otimes g(x) \\ &= \int_x f(x)g(u-x)dx \end{aligned}$$

η συνάρτηση Patterson είναι :

$$\begin{aligned} \mathcal{P}(u) &= \rho(x) \otimes \rho(-x) \\ &= \int_u \rho(x)\rho(x+u)du \end{aligned}$$

Patterson : το φυσικό νόημα

Το φυσικό νόημα της προηγούμενης εξίσωσης είναι : η συνάρτηση Patterson [$P(u)$] αντιπροσωπεύει ένα χάρτη όλων των δια-ατομικών ανυσμάτων (όλων των ανυσμάτων μεταξύ όλων των ατόμων της στοιχειώδους κυψελίδας). Ο λόγος είναι ότι το ολοκλήρωμα $|\rho(x)\rho(x+u)|du$ θα παίρνει μη μηδενικές τιμές μόνο όταν το u είναι τέτοιο ώστε τα $\rho(x)$ και $\rho(x+u)$ να έχουν μη μηδενικές τιμές, δηλαδή όταν στις θέσεις (x) και $(x+u)$ υπάρχουν άτομα. Εάν στις θέσεις (x) και $(x+u)$ υπάρχουν άτομα, τότε το (u) αντιστοιχεί σε ένα άνυσμα που συνδέει τα άτομα αυτά.

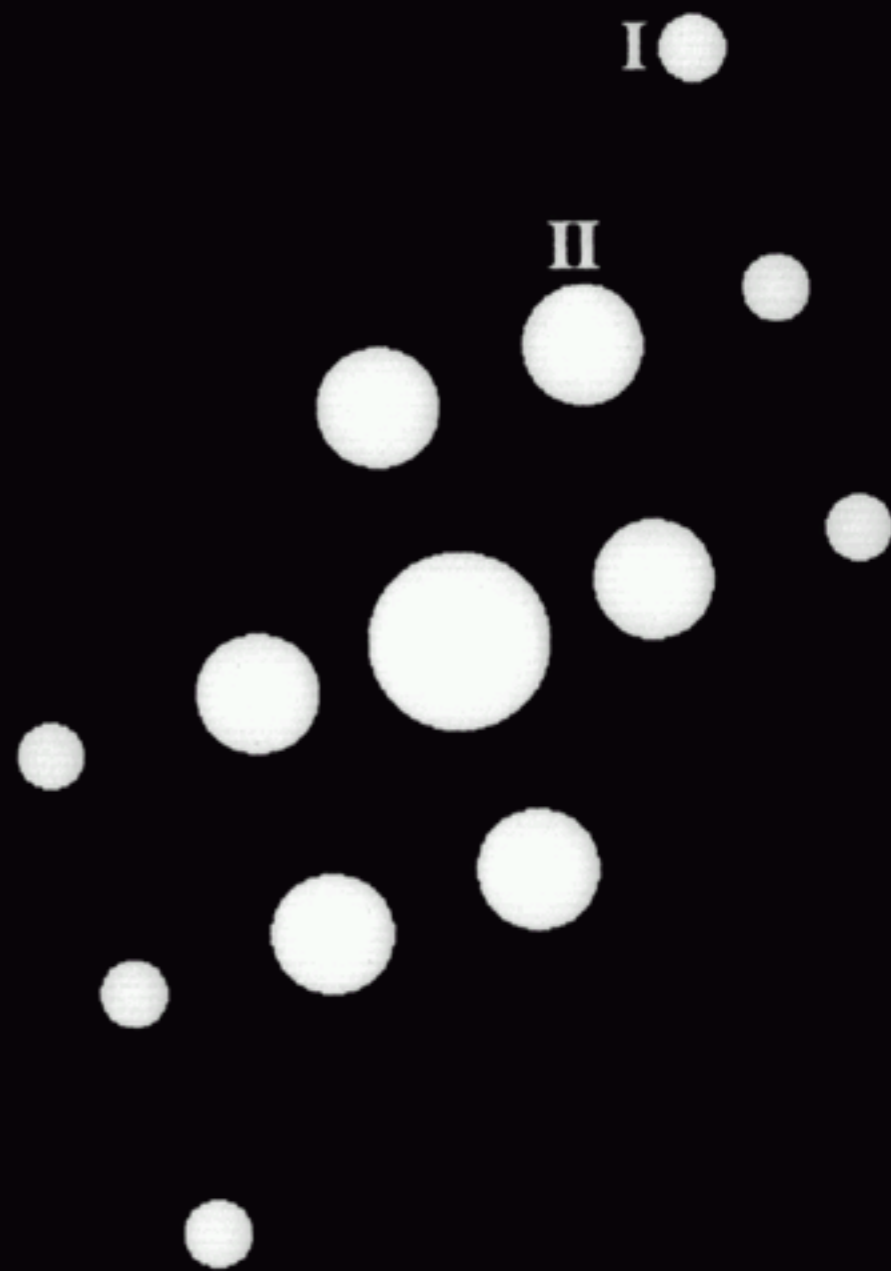
Patterson : ιδιότητες

- Εάν το (u) αντιστοιχεί σε ένα δια-ατομικό άνυσμα, τότε στην θέση (u) της συνάρτησης Patterson θα υπάρχει ένα τοπικό μέγιστο (μια κορυφή (peak)). Το ύψος αυτής της κορυφής θα είναι ανάλογο με το γινόμενο των ατομικών αριθμών των ατόμων που συνδέονται από το (u) .
- Επειδή για $u=0$ κάθε άτομο συμπίπτει με τον εαυτό του (μηδενικό άνυσμα), οι συναρτήσεις Patterson έχουν μια πολύ υψηλή κορυφή [ανάλογη του $\Sigma(Z^2)$] στην αρχή των αξόνων.
- Επειδή εάν το (u) αντιστοιχεί σε ένα δια-ατομικό άνυσμα, το $(-u)$ επίσης είναι ένα δια-ατομικό άνυσμα, η συνάρτηση Patterson είναι κεντροσυμμετρική.

Patterson : παραδείγματα



(A)

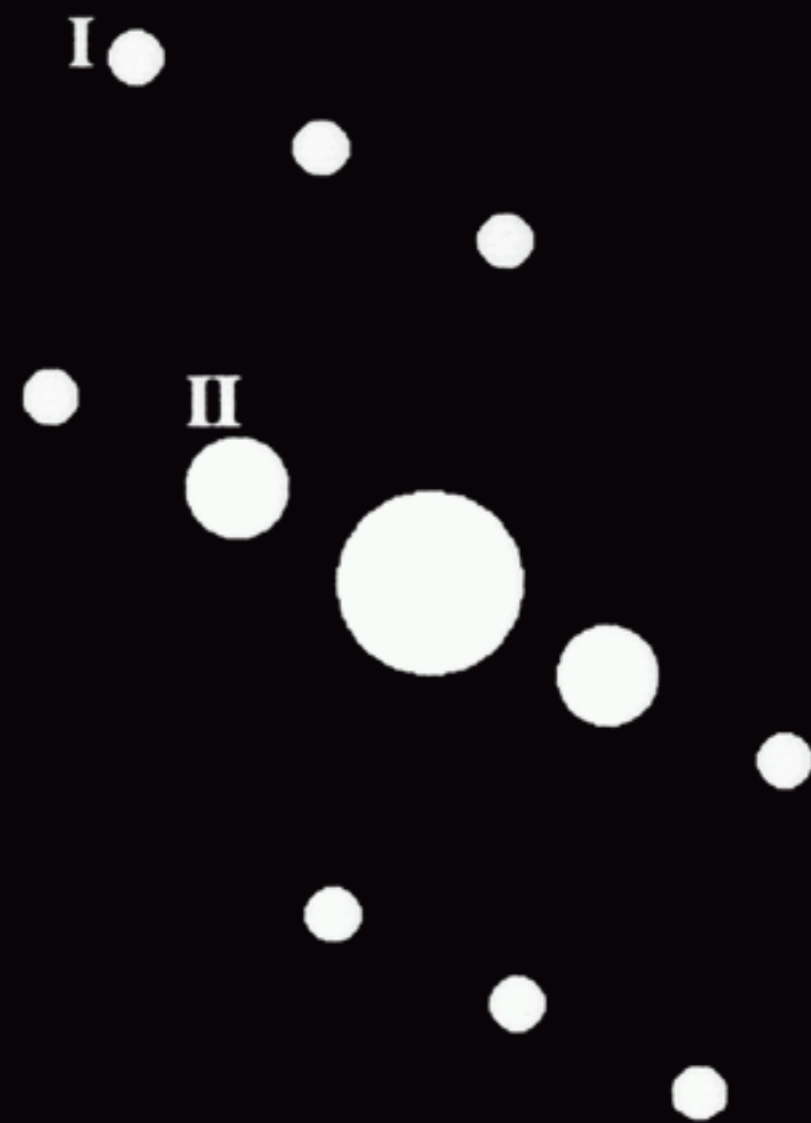


(B)

Patterson : παραδείγματα

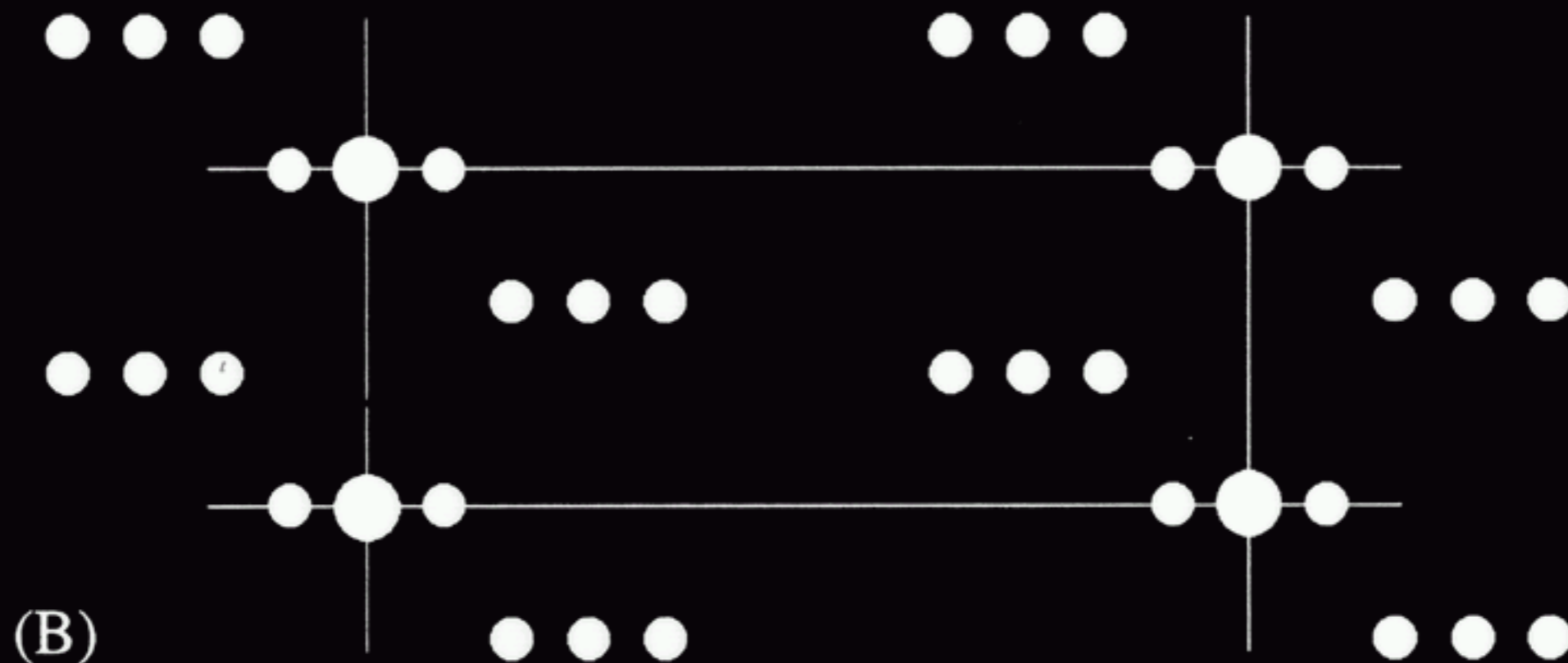
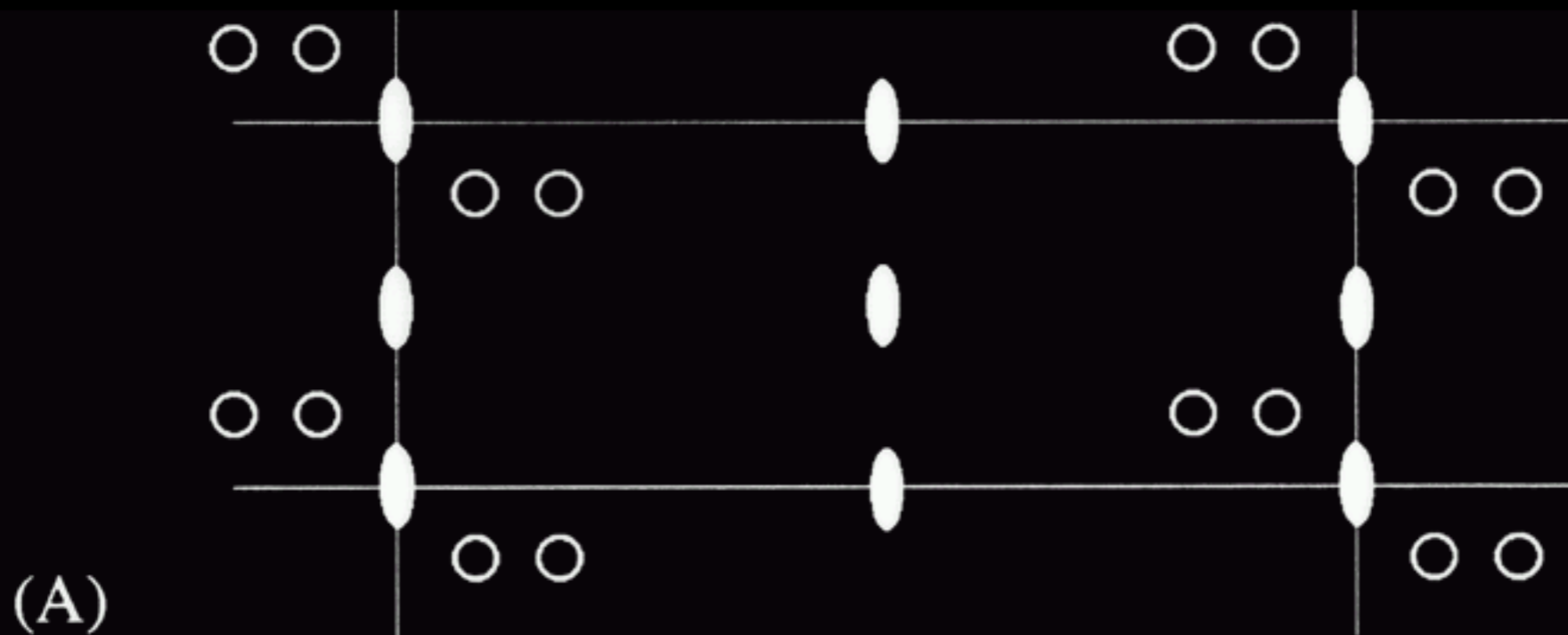


(A)



(B)

Patterson : παραδείγματα



Patterson : υπολογισμός (1D)

$$\begin{aligned}\mathcal{P}(u) &= \sum_h |\vec{\mathbf{F}}_h|^2 e^{-2\pi i h u} \\ &= \sum_h F_h^2 e^{-2\pi i h u} \\ &= \sum_{h \geq 0} F_h^2 [e^{-2\pi i h u} + e^{-2\pi i (-h) u}] \\ &= \sum_{h \geq 0} F_h^2 [e^{-2\pi i h u} + e^{2\pi i h u}] \\ &= 2 \sum_{h \geq 0} F_h^2 \cos(2\pi h u)\end{aligned}$$

Patterson : εφαρμογές

MIR, MIRAS, SIR, SIRAS, MAD, SAD, ...

Η βασική προσέγγιση είναι ότι η διαφορά των πλατών ($|F_{rh}| - |F_r|$) μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μέτρο του $|F_h|$. Εάν αυτό ισχύει, υπολογίζουμε τη συνάρτηση Patterson που αντιστοιχεί στα $||F_{rh}| - |F_r||^2$, και από αυτή (και με βάση τη γνωστή συμμετρία) προσπαθούμε να συνάγουμε τις συντεταγμένες των βαρέων ατόμων. Άπαξ και βρούμε αυτές, μπορούμε να υπολογίσουμε τη συνεισφορά των βαρέων ατόμων (πλάτος και φάση) και στη συνέχεια τις φάσεις των $|F_r|$ (όπως έχει ήδη αναλυθεί).

Patterson : εφαρμογές

Μοριακή αντικατάσταση (molecular replacement)

Η αρχή της χρήσης της συνάρτησης Patterson για την εύρεση του προσανατολισμού και της θέσης της γνωστής δομής στον υπό μελέτη κρύσταλλο είναι : Το μοτίβο των ανυσμάτων κοντά στην αρχή των αξόνων της Patterson εξαρτάται μόνο από τον προσανατολισμό των μορίων και όχι τη θέση τους. Έτσι μπορούμε (με το να βρούμε τον προσανατολισμό εκείνο της γνωστής δομής για τον οποίο τα προβλεπόμενα και παρατηρούμενα ανύσματα 'ταιριάζουν' καλύτερα) να προσδιορίσουμε τα α, β, γ χωρίς γνώση της θέσης του μορίου. Στη συνέχεια, κρατάμε τα α, β, γ σταθερά και ερευνούμε για τα βέλτιστα x, y, z (θέσεις).

Κρυσταλλογραφία επίλογος

Η ομάδα αυτή των διαλέξεων άγγιξε την επιφάνεια μόνο των κρυσταλλογραφικών μεθόδων.

Για του λόγου το αληθές, οι παρουσιάσεις αυτές θα κλείσουν με μια τέτοιου τύπου ιστορική ανασκόπηση που λίγοι άλλοι κλάδοι θα μπορούσαν να καυχηθούν ότι μπορούν να πραγματοποιήσουν.

Physics 1901

RONTGEN, WILHELM CONRAD , Germany, Munich University, b. 1845, d. 1923:

"in recognition of the extraordinary services he has rendered by the discovery of the remarkable rays subsequently named after him"

Physics 1914

VON LAUE, MAX, Germany, Frankfurt-on-the Main University, b. 1879, d. 1960:

"for his discovery of the diffraction of X-rays by crystals"

Physics 1915

The prize was awarded jointly to:

BRAGG, Sir WILLIAM HENRY, Great Britain, London University, b. 1862, d. 1942; and his son

BRAGG, Sir WILLIAM LAWRENCE, Great Britain, Victoria University, Manchester, b. 1890 (in Adelaide, Australia), d. 1971:

"for their services in the analysis of crystal structure by means of X-rays"

Physics 1917

BARKLA, CHARLES GLOVER, Great Britain, Edinburgh University, b. 1877, d. 1944:

"for his discovery of the characteristic Rontgen radiation of the elements"

Chemistry 1936

DEBYE, PETRUS (PETER) JOSEPHUS WILHELMUS, the Netherlands, Berlin University, and Kaiser-Wilhelm- Institut (now Max-Planck-Institut) für Physik, Berlin- Dahlem, Germany, b. 1884, d. 1966:

"for his contributions to our knowledge of molecular structure through his investigations on dipole moments and on the diffraction of X-rays and electrons in gases"

Physics 1937

The prize was awarded jointly to:

DAVISSON, CLINTON JOSEPH, U.S.A., Bell Telephone Laboratories, New York, NY, b. 1881, d. 1958; and

THOMSON, Sir GEORGE PAGET, Great Britain, London University, b. 1892, d. 1975:

"for their experimental discovery of the diffraction of electrons by crystals"

Chemistry 1946

The prize was divided, one half being awarded to:
SUMNER, JAMES BATCHELLER, U.S.A., Cornell
University, Ithaca, NY, b. 1887, d. 1955:

"for his discovery that enzymes can be crystallized"
the other half jointly to:

NORTHROP, JOHN HOWARD, U.S.A., Rockefeller
Institute for Medical Research, Princeton, NJ, b.
1891, d. 1987; and

STANLEY, WENDELL MEREDITH, U.S.A., Rockefeller
Institute for Medical Research, Princeton, NJ, b.
1904, d. 1971:

"for their preparation of enzymes and virus proteins
in a pure form"

Chemistry 1954

PAULING, LINUS CARL, U.S.A., California Institute of Technology, Pasadena, CA, b. 1901, d. 1994:

"for his research into the nature of the chemical bond and its application to the elucidation of the structure of complex substances"

Chemistry 1962

The prize was divided equally between:

PERUTZ, MAX FERDINAND, Great Britain, Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, b. 1914 (in Vienna, Austria); and

KENDREW, Sir JOHN COWDERY, Great Britain, Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, b. 1917, d. 1997:

"for their studies of the structures of globular proteins"

Physiology or Medicine 1962

The prize was awarded jointly to:

CRICK, FRANCIS HARRY COMPTON, Great Britain, Institute of Molecular Biology, Cambridge, b. 1916;

WATSON, JAMES DEWEY, U.S.A., Harvard University, Cambridge, MA, b. 1928; and

WILKINS, MAURICE HUGH FREDERICK, Great Britain, University of London, b. 1916:

"for their discoveries concerning the molecular structure of nuclear acids and its significance for information transfer in living material"

Chemistry 1964

HODGKIN, DOROTHY CROWFOOT, Great Britain, Royal Society, Oxford University, Oxford, b. 1910, d. 1994:

"for her determinations by X-ray techniques of the structures of important biochemical substances"

Chemistry 1976

LIPSCOMB, WILLIAM N., U.S.A., Harvard University, Cambridge, MA, b. 1919:

"for his studies on the structure of boranes illuminating problems of chemical bonding"

Chemistry 1982

KLUG, Sir AARON, Great Britain, MRC
Laboratory of Molecular Biology, Cambridge,
b. 1926 (in Lithuania):

"for his development of crystallographic electron
microscopy and his structural elucidation of
biologically important nuclei acid-protein
complexes"

Chemistry 1985

The prize was awarded jointly to:

HAUPTMAN, HERBERT A., U.S.A., The Medical Foundation of Buffalo, Buffalo, NY, b. 1917; and

KARLE, JEROME, U.S.A., US Naval Research Laboratory, Washington, DC, b. 1918:

"for their outstanding achievements in the development of direct methods for the determination of crystal structures"

Chemistry 1988

The prize was awarded jointly to:

DEISENHOFER, JOHANN, Federal Republic of Germany, b. 1943;

HUBER, ROBERT, Federal Republic of Germany, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, b. 1937; and

MICHEL, HARTMUT, Federal Republic of Germany, Max-Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt/Main, b. 1948:

"for the determination of the three-dimensional structure of a photosynthetic reaction centre"

Physics 1994

The prize was awarded

"for pioneering contributions to the development of neutron scattering techniques for studies of condensed matter"

by one half to: BROCKHOUSE, BERTRAM N., Canada, McMaster University, Hamilton, Ontario, b. 1918:

"for the development of neutron spectroscopy"

and by the other half to: SHULL, CLIFFORD G., U.S.A., Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA, b. 1915:

"for the development of the neutron diffraction technique"

Κρυσταλλογραφία

Μέρος 7ο

Ηλεκτρονική μικροσκοπία : τρισδιάστατη επανασύσταση.

Ηλεκτρονική μικροσκοπία : Αρχή λειτουργίας

Η αρχή της λειτουργίας του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου βρίσκεται στην θεωρία de Broglie για την κυματική φύση ταχέως κινουμένων σωματιδίων :

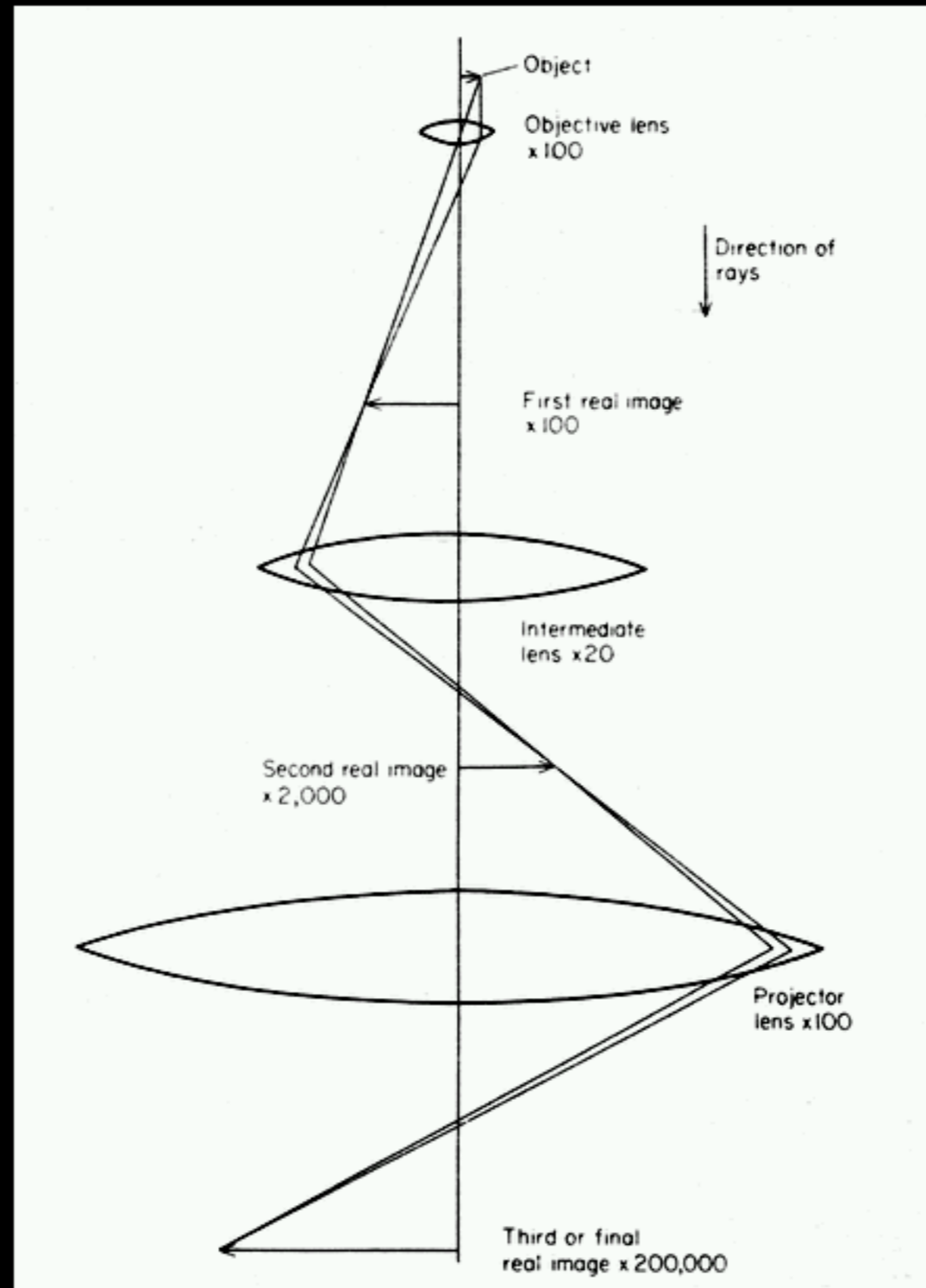
$$\lambda = h / (m \cdot u)$$

όπου λ είναι το ισοδύναμο μήκος κύματος των σωματιδίων, h είναι η σταθερά του Planck, m είναι η μάζα ηρεμίας των σωματιδίων και u η ταχύτητα τους. Για τα συνηθισμένα ηλεκτρονικά μικροσκόπια (100 KV) το ισοδύναμο μήκος κύματος των ταχέως κινουμένων ηλεκτρονίων είναι 0.037Å.

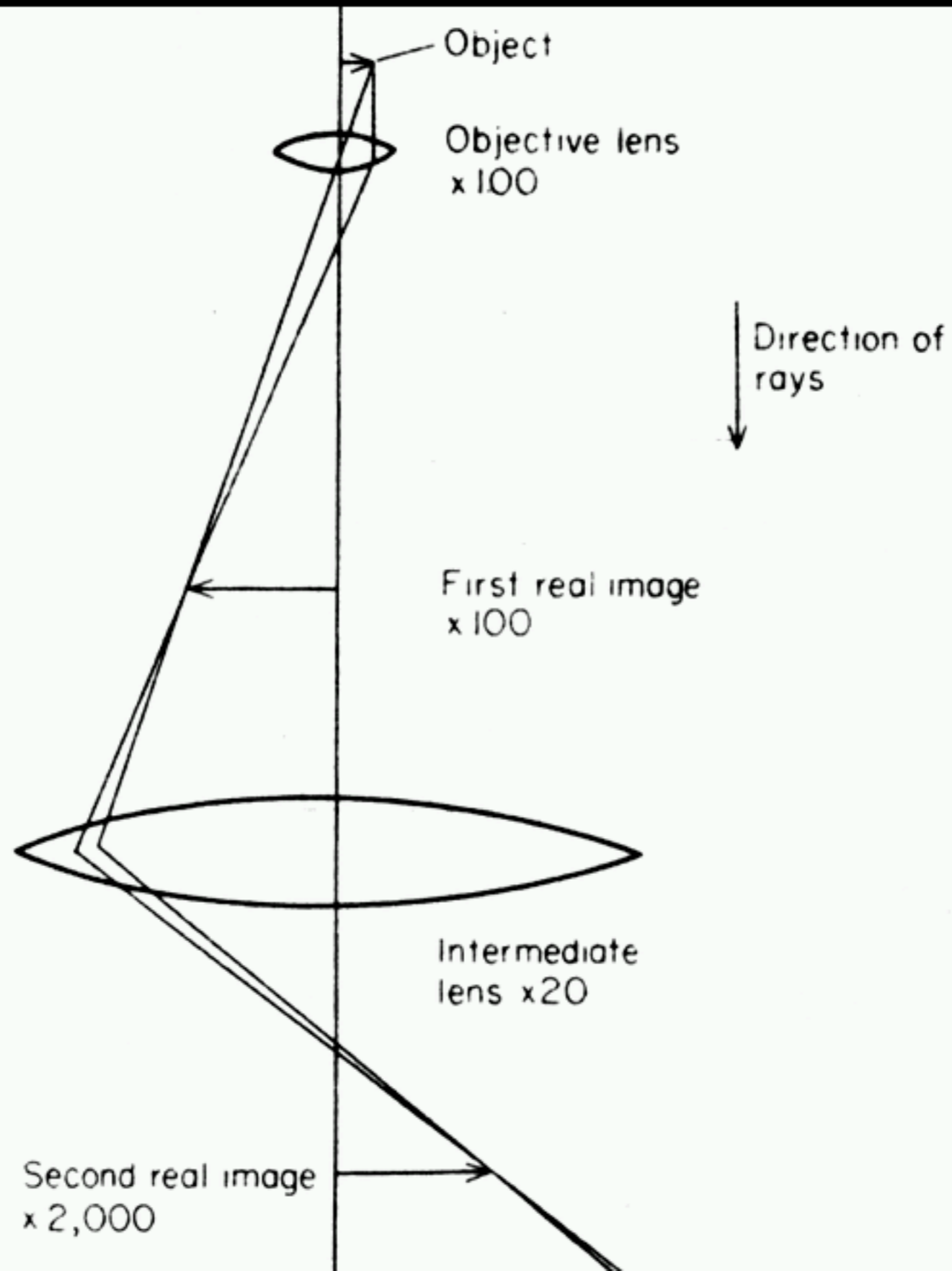
Δομή ΗΜ

Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο είναι δομικά ανάλογο με ένα οπτικό μικροσκόπιο με τη διαφορά ότι αντί για ορατή ακτινοβολία χρησιμοποιούνται ταχέως κινούμενα ηλεκτρόνια, οι φακοί είναι στην πραγματικότητα μαγνητικά πεδία παραγόμενα από ηλεκτρομαγνήτες, και ότι ολόκληρο το σύστημα βρίσκεται σε υψηλό κενό (της τάξης των 10^{-7} Torr).

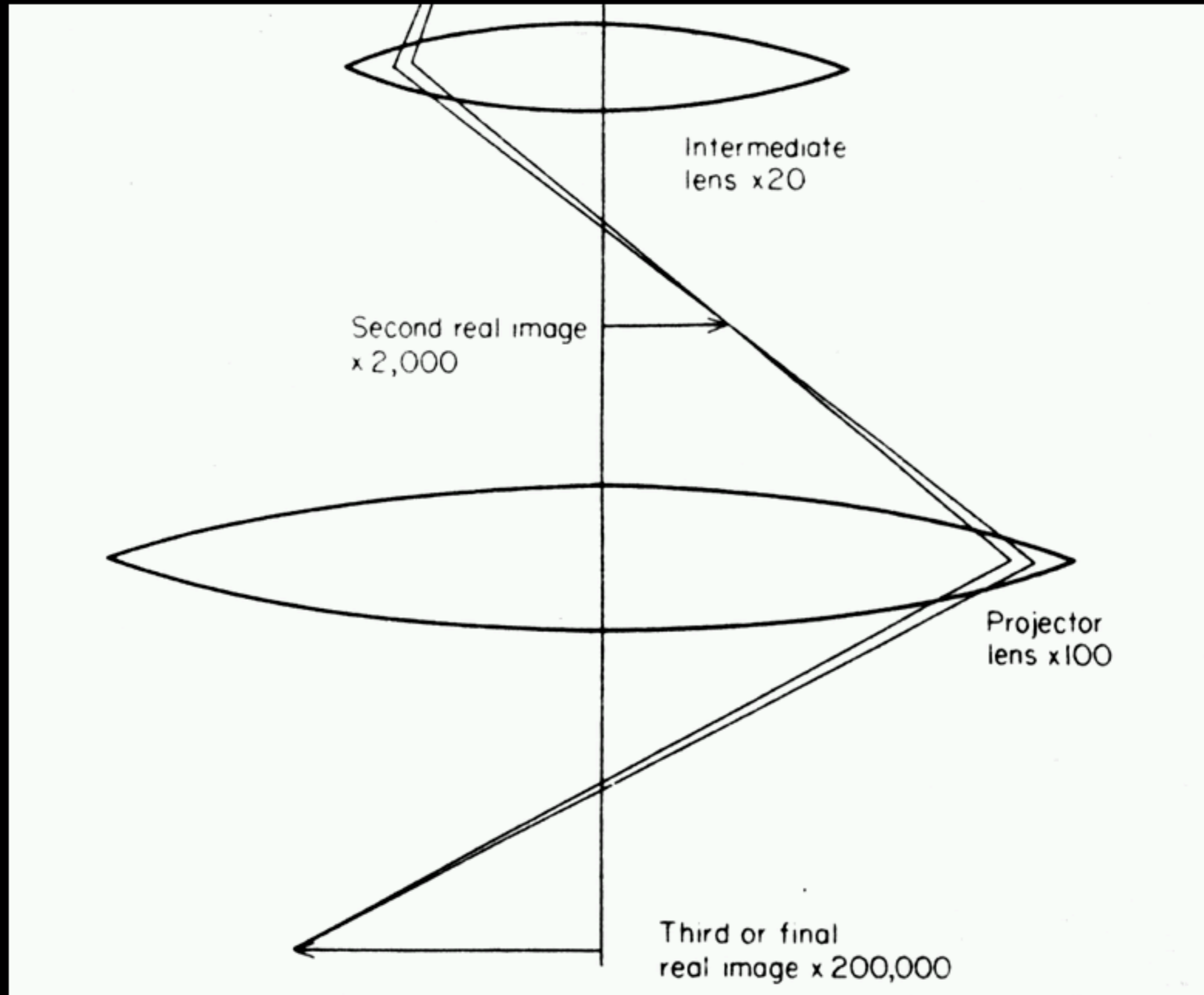
HM : Αναλογία με ΟΠΤΙΚΟ



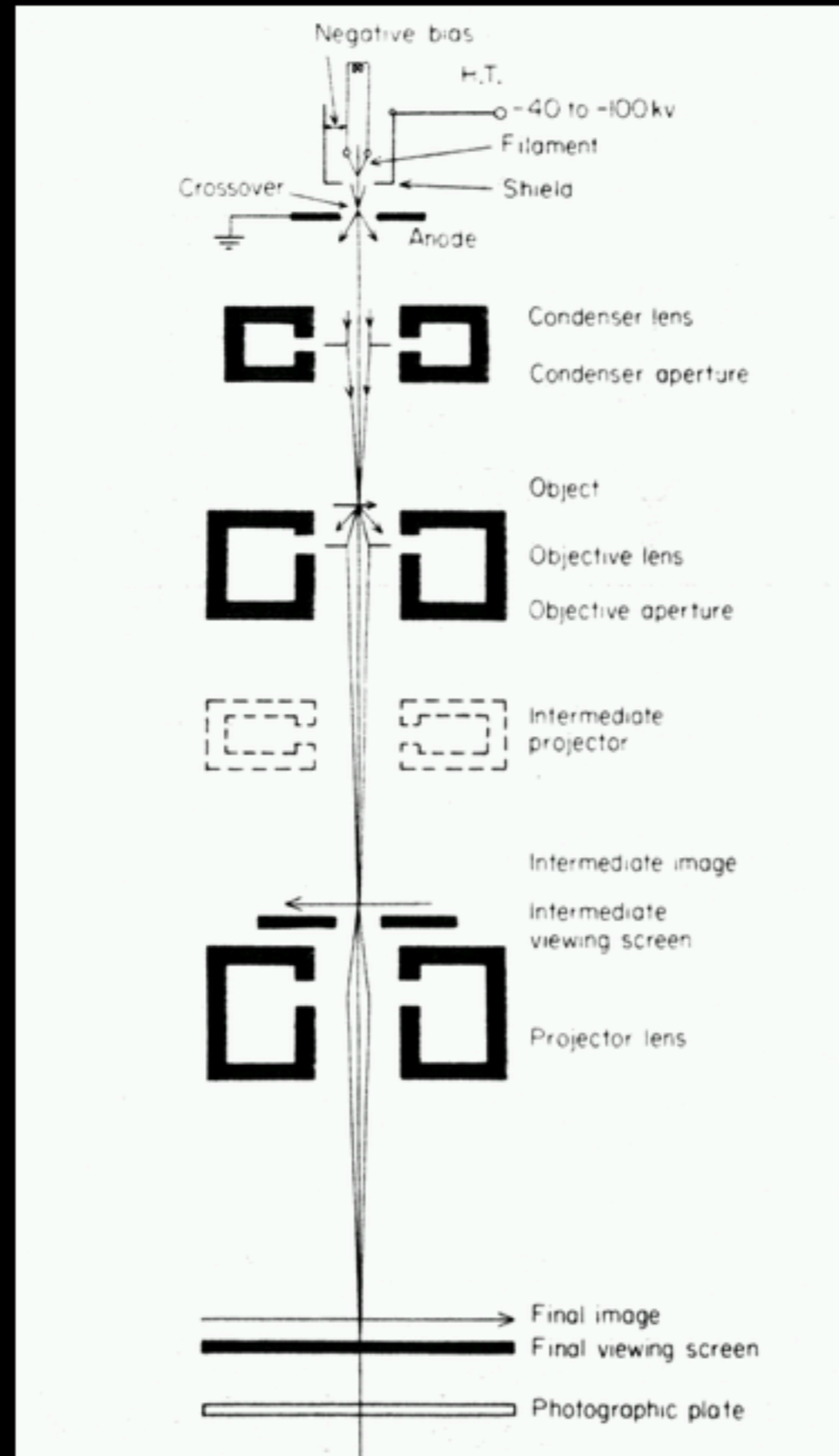
HM : Αναλογία με ΟΠΤΙΚΟ



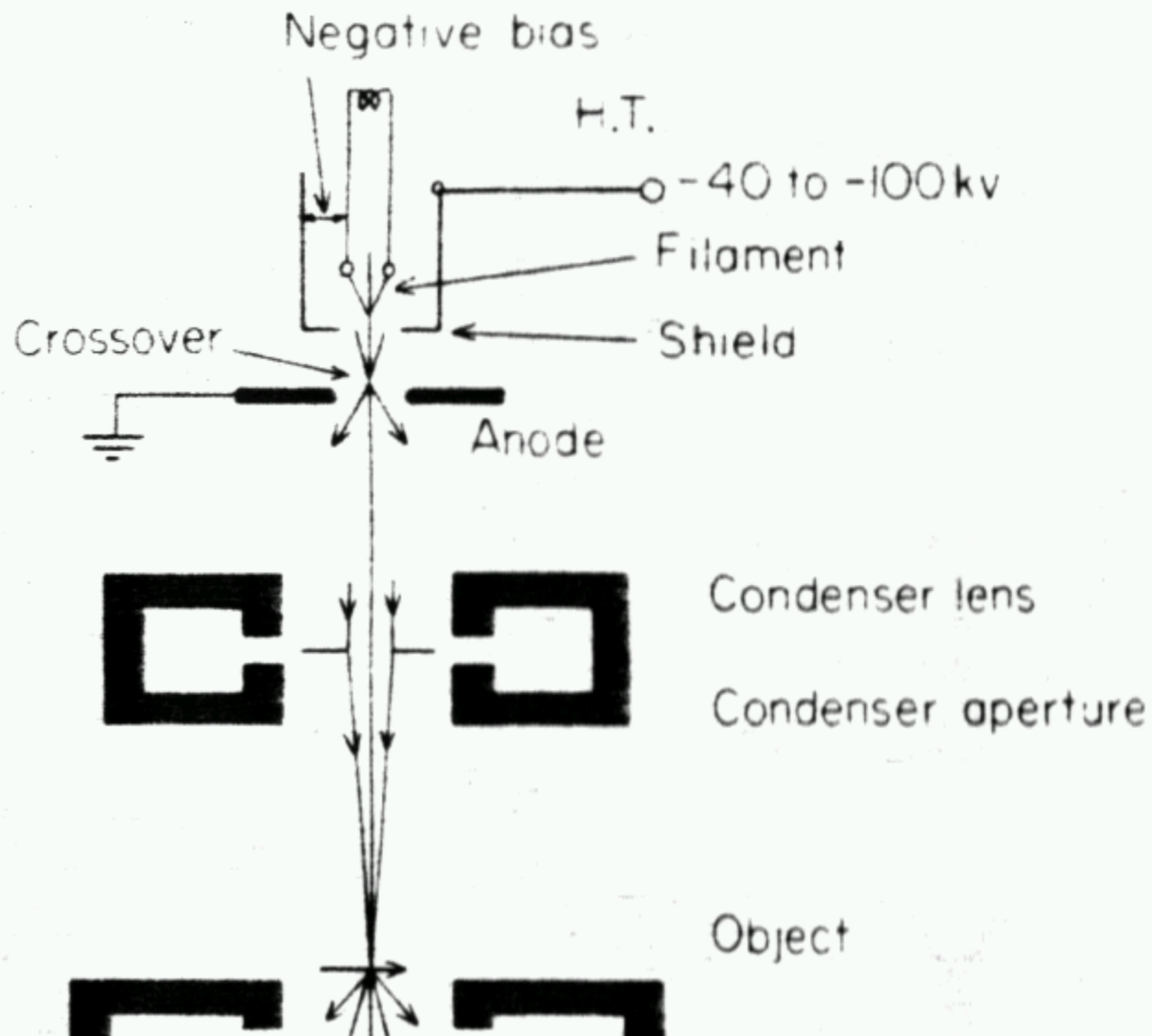
HM : Αναλογία με ΟΠΤΙΚΟ



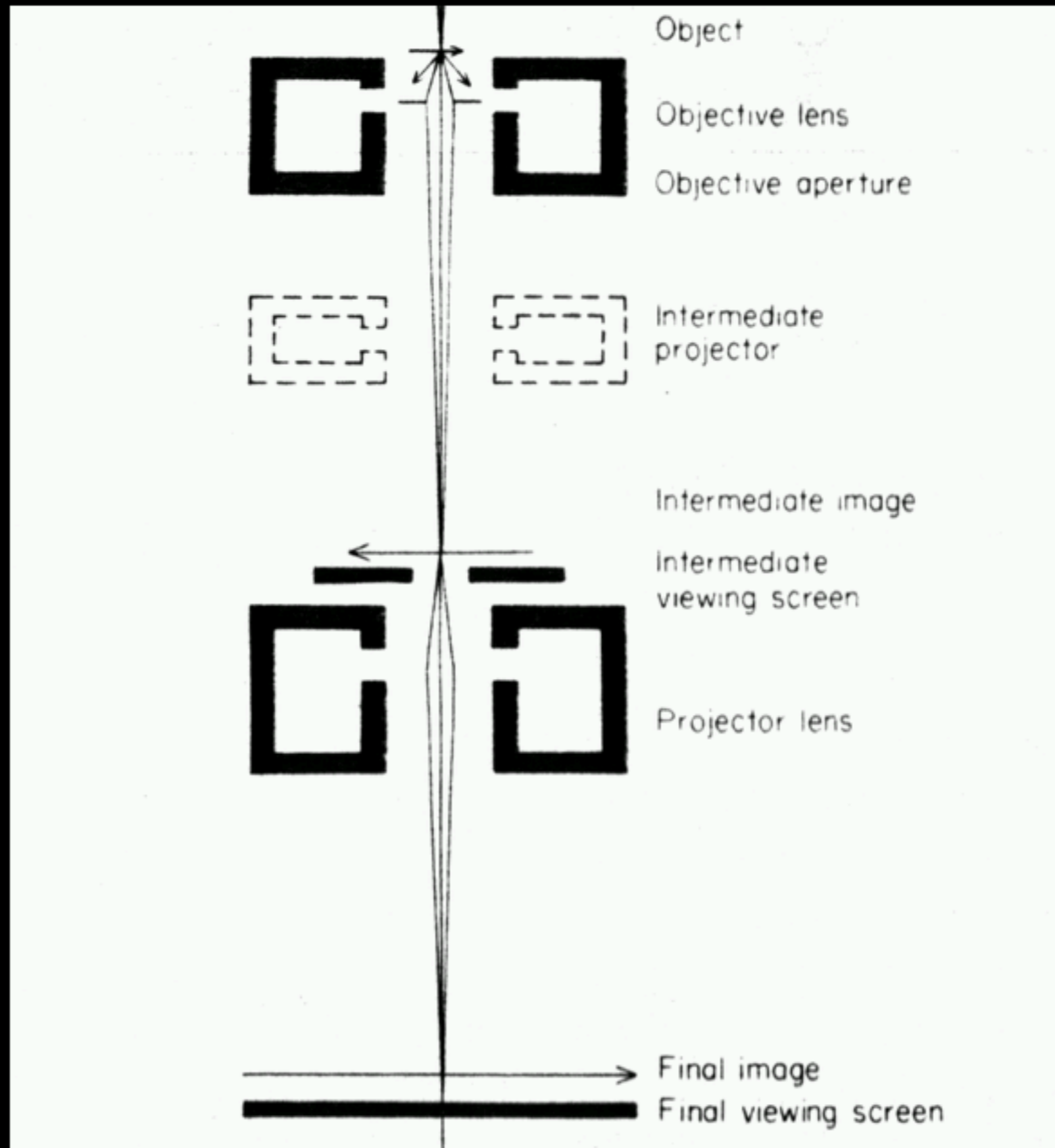
Δομή ΗΜ



Παραγωγή ηλεκτρονίων



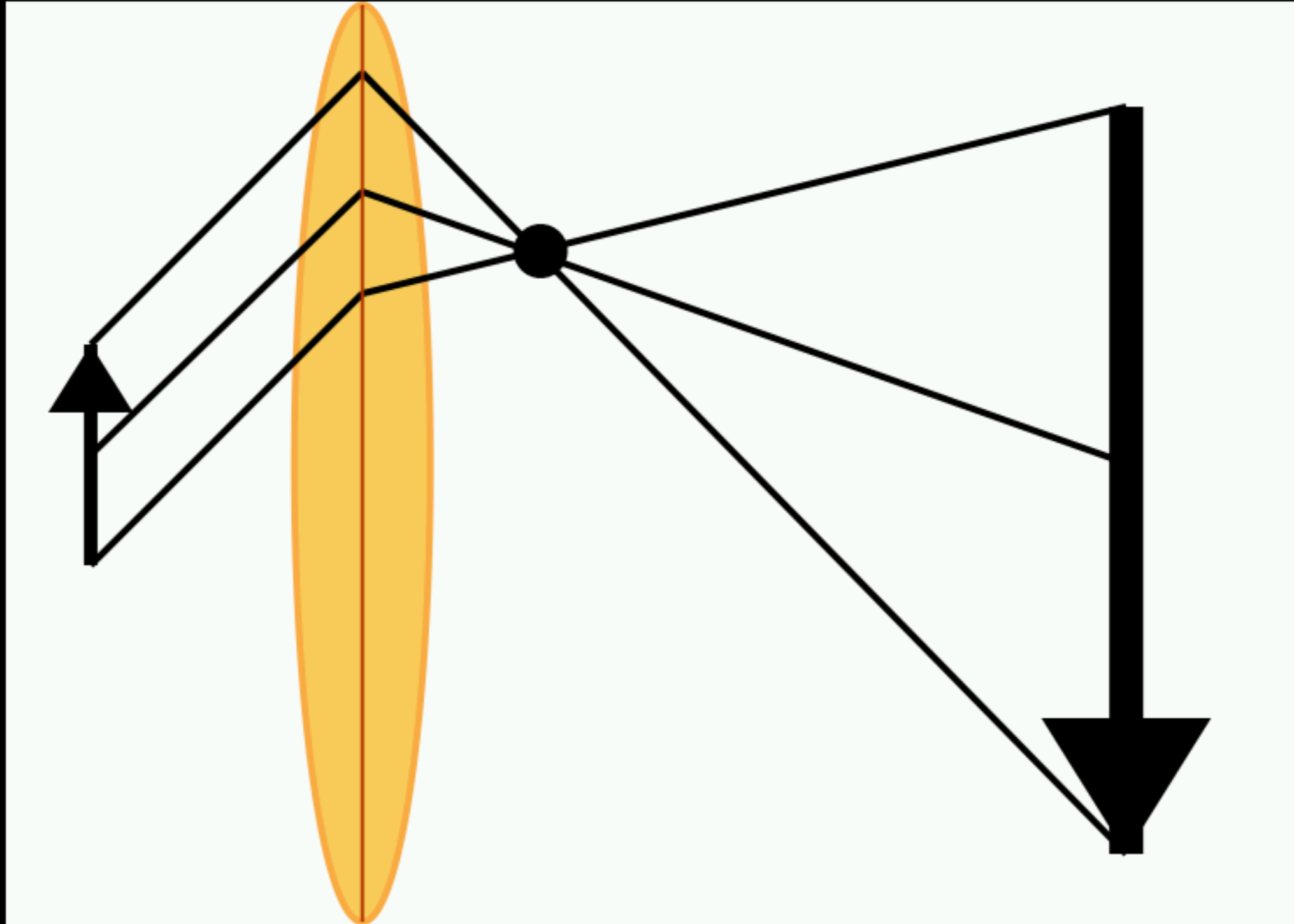
Δημιουργία ειδώλου



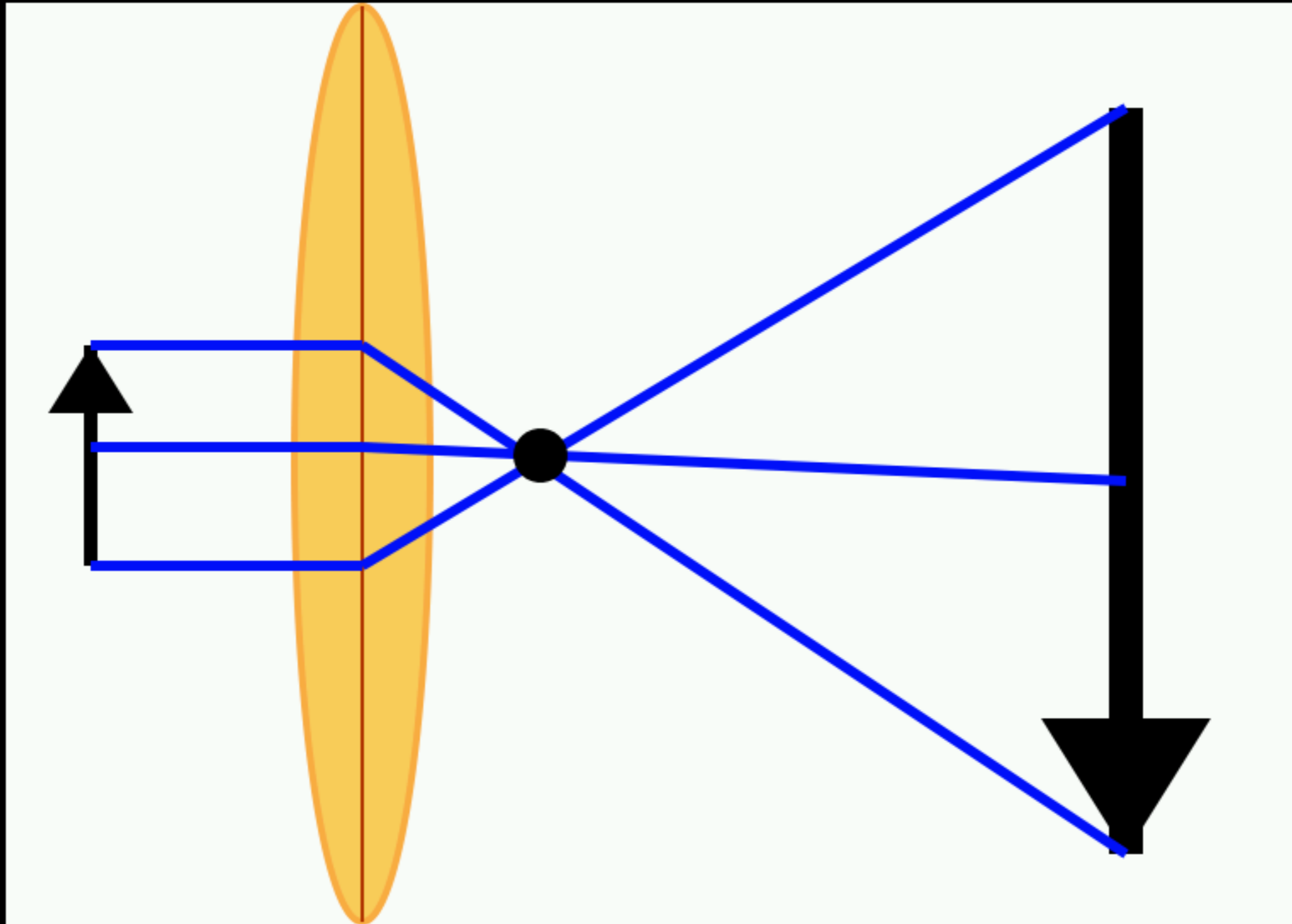
Φάσμα περίθλασης

Το φάσμα περίθλασης (ηλεκτρονίων) του αντικειμένου μπορεί να ανακτηθεί με αυτούσιο τον εξοπλισμό που παρέχει το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Ο λόγος είναι ότι το φάσμα περίθλασης ενός αντικειμένου είναι ένα εγγενές τμήμα της διαδικασίας σχηματισμού του ειδώλου του αντικειμένου και αντιστοιχεί στο επίπεδο εκείνο του οπτικού άξονα στο οποίο συγκλίνουν όσες ακτίνες είχαν σκεδαστεί παράλληλα από το αντικείμενο. Προκειμένου να ανακτηθεί το φάσμα περίθλασης αρκεί ο φακός που ακολουθεί τον αντικειμενικό (ο ενδιαμέσος) να εστιαστεί όχι στο επίπεδο του ειδώλου (του αντικειμενικού) αλλά στο επίπεδο περίθλασης.

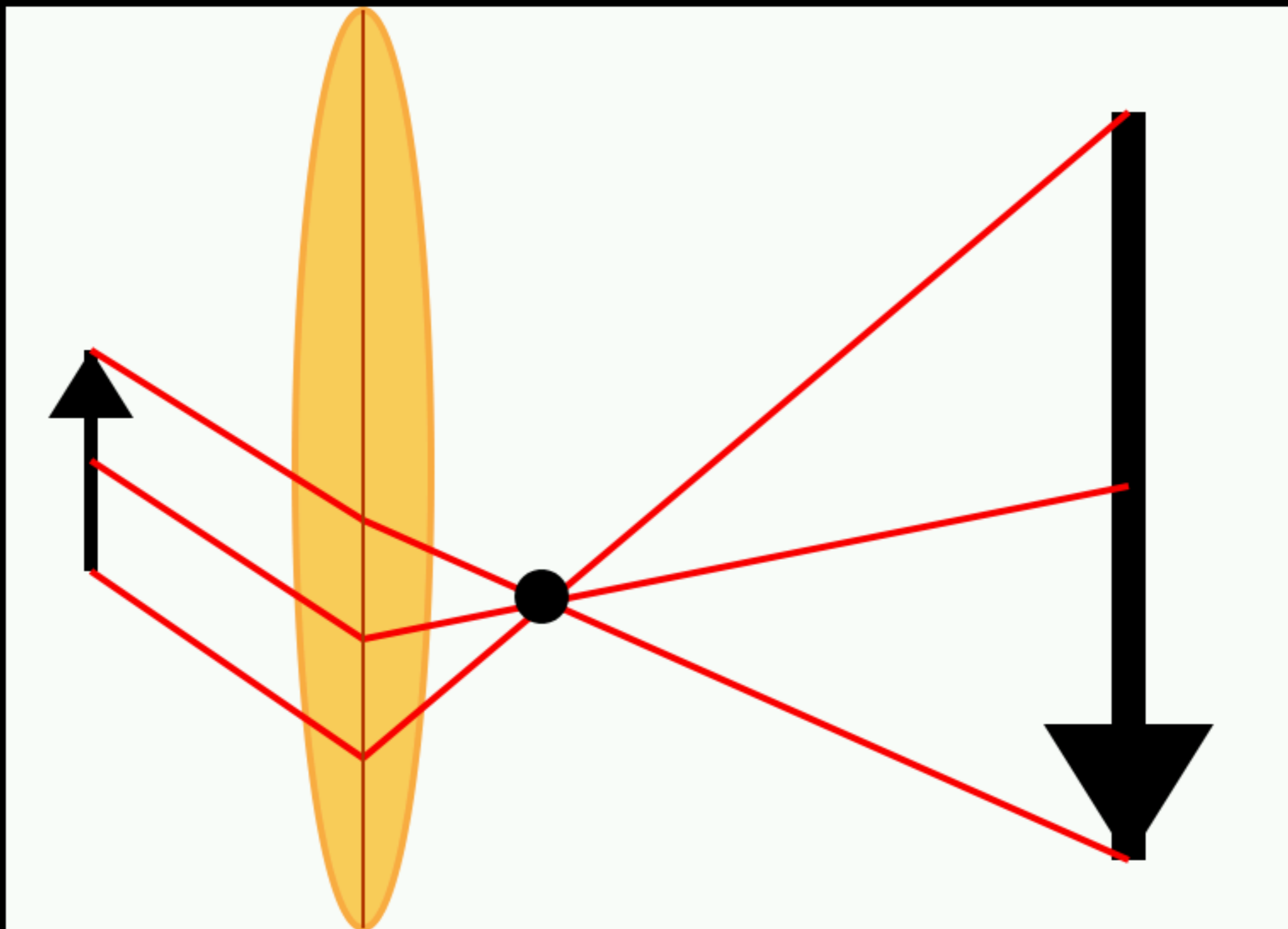
Φάσμα περίθλασης



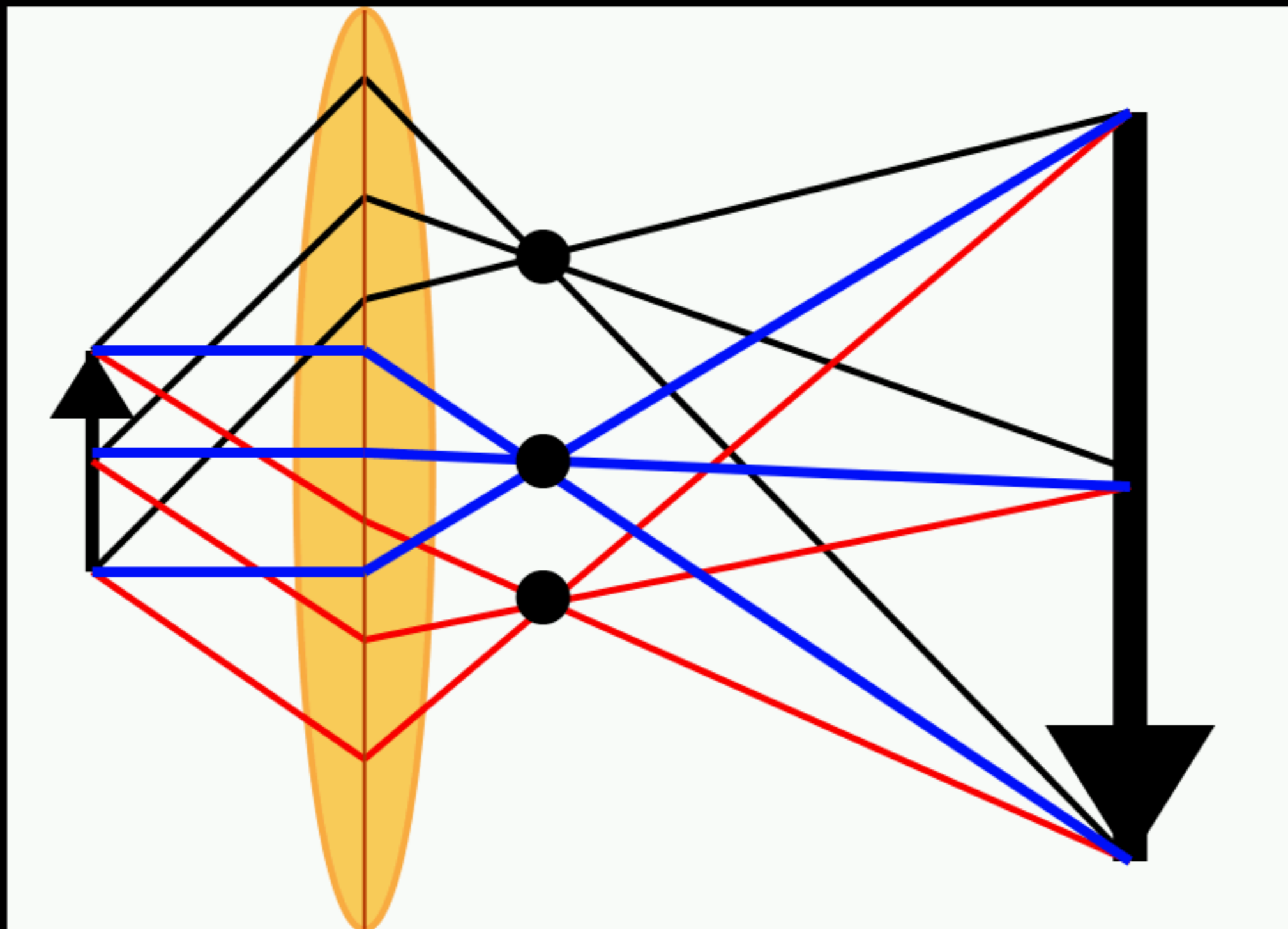
Φάσμα περίθλασης



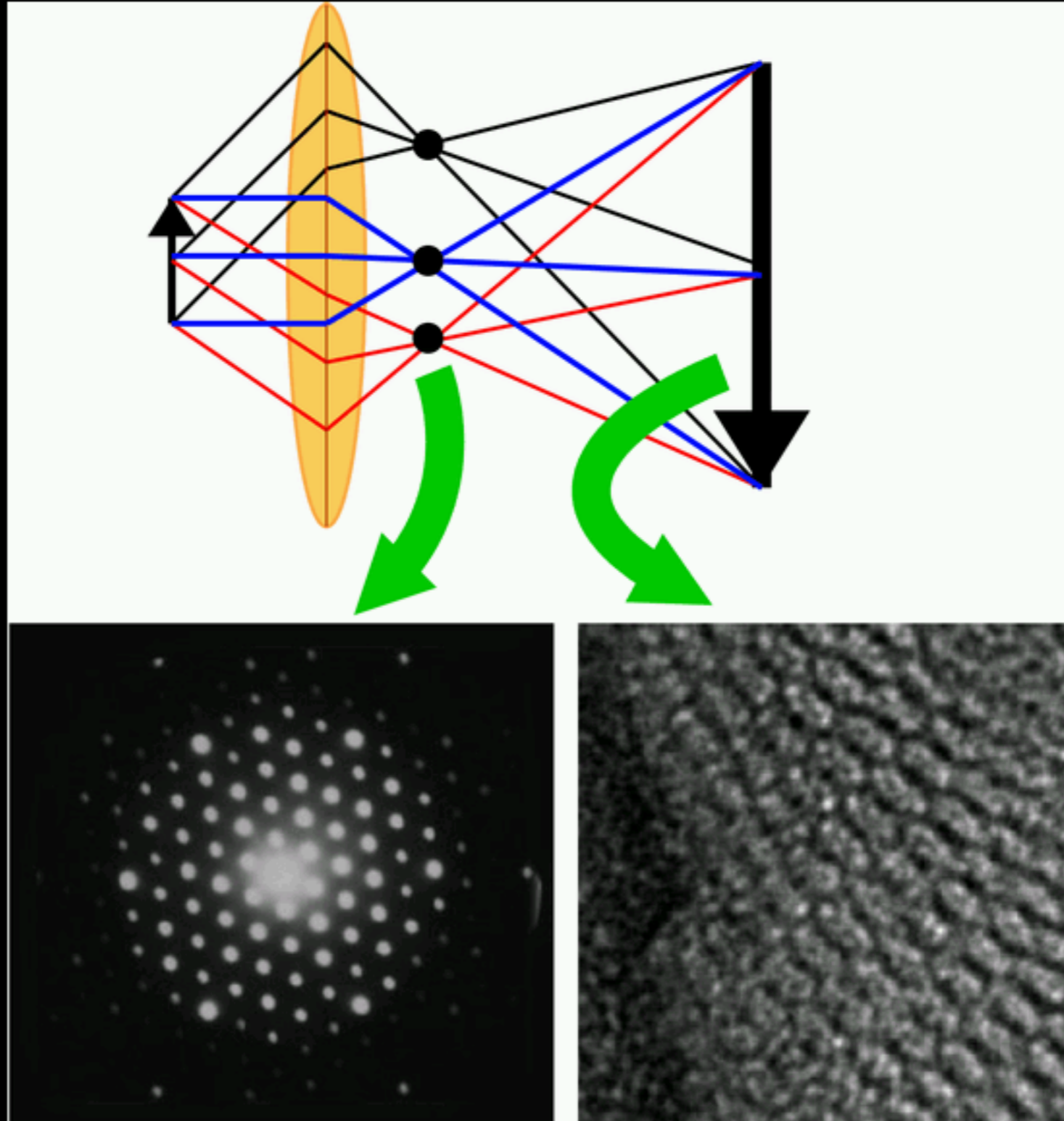
Φάσμα περίθλασης



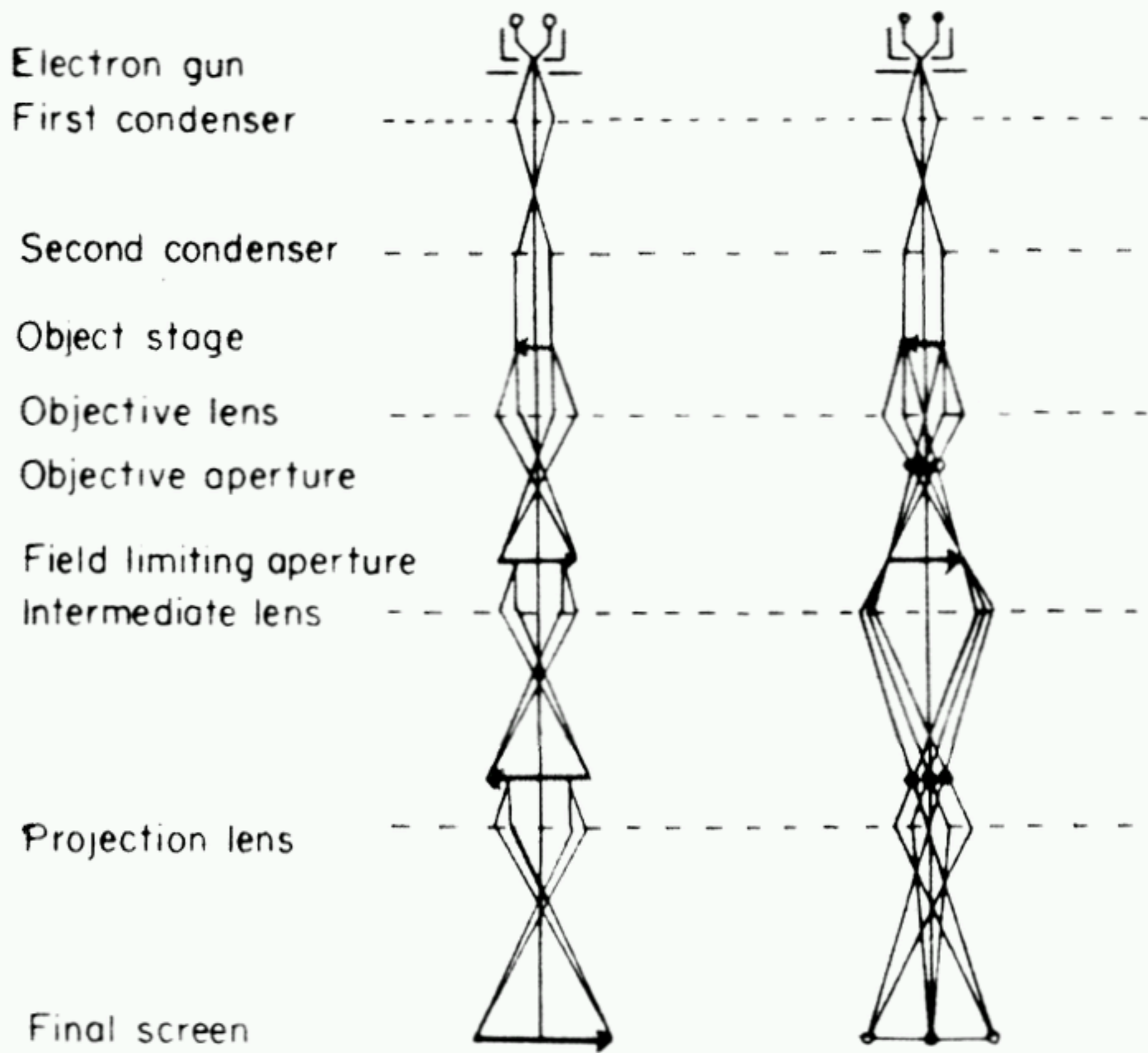
Φάσμα περίθλασης



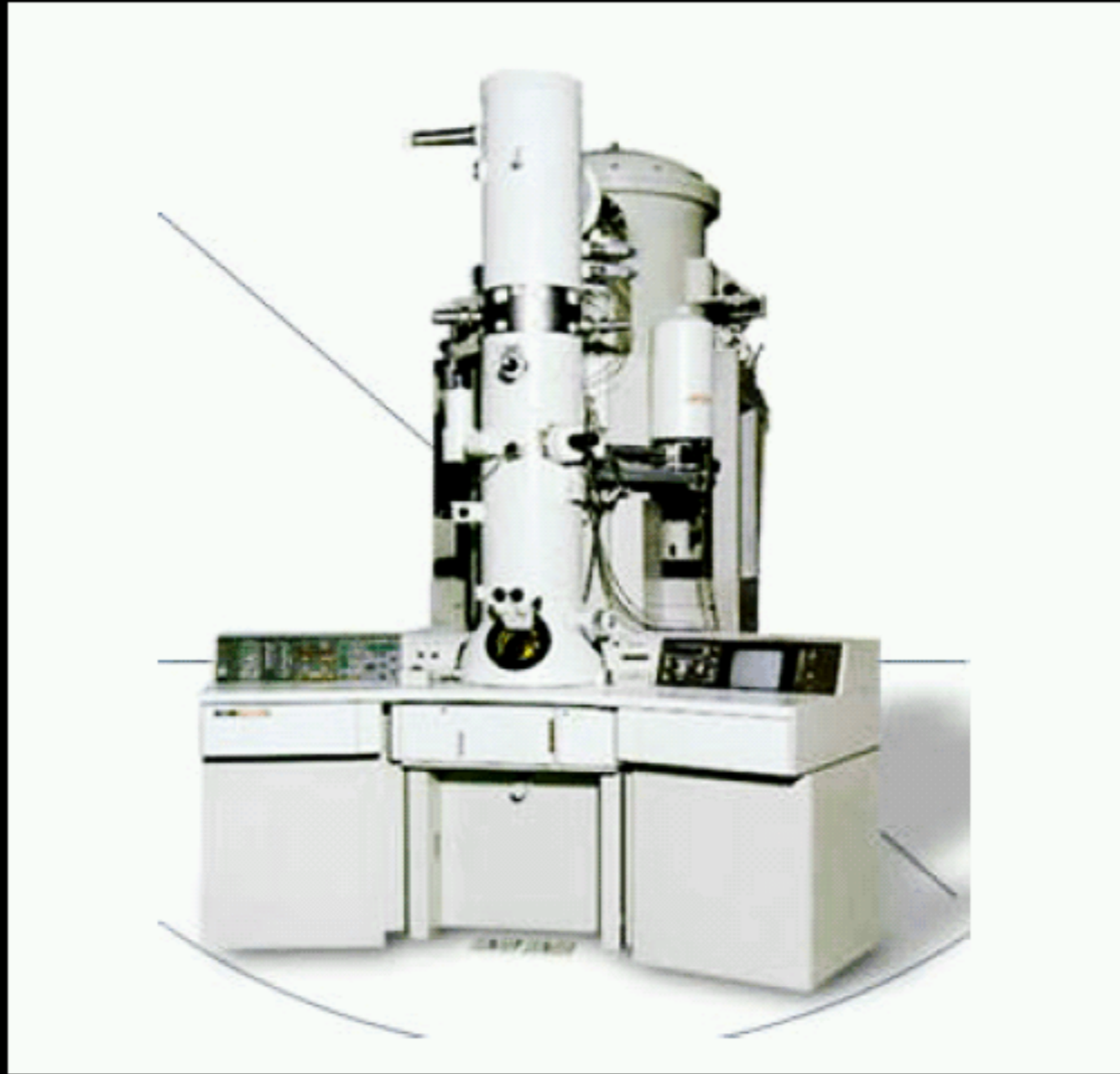
Φάσμα περίθλασης



Φάσμα περίθλασης



Εξοπλισμός ΗΜ.



Αλληλεπίδραση με την ύλη

Τα ηλεκτρόνια αλληλεπιδρούν ισχυρά με την ύλη και κυρίως με τους πυρήνες των ατόμων (για την ακρίβεια με το ηλεκτροστατικό δυναμικό τους).

Λόγω της ισχυρής αλληλεπίδρασης, μόνο πολύ λεπτά δείγματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν, κάνοντας την μέθοδο ιδανική για 'δισδιάστατους' κρυστάλλους (για παράδειγμα κρύσταλλοι διαμεμβρανικών πρωτεϊνών ενσωματωμένων σε λιπιδική διπλοστοιβάδα),

αλλά ...

Εστιακό μήκος & προβολές

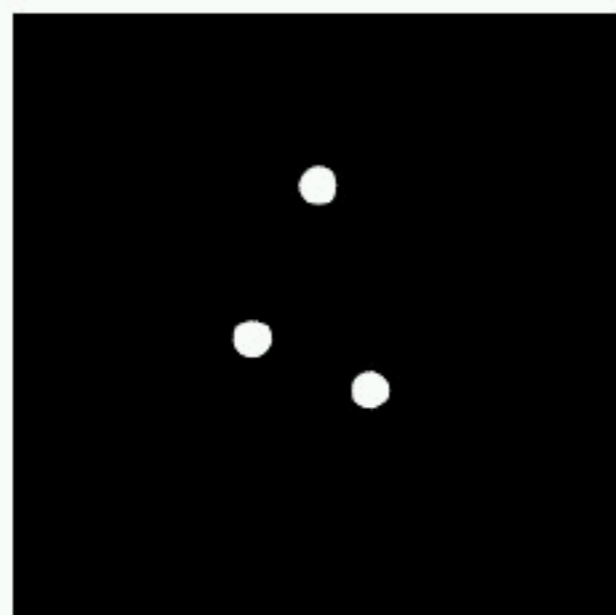
- Επειδή τα δείγματα είναι πολύ λεπτά σε σχέση με το εστιακό βάθος των φακών, είναι αδύνατο να εστιάσουμε σε διαφορετικά επίπεδα του αντικειμένου.
- Το αποτέλεσμα είναι ότι το είδωλο του αντικειμένου είναι η προβολή του αντικειμένου σε ένα επίπεδο κάθετο στον οπτικό άξονα του μικροσκοπίου.
- Αυτό σημαίνει ότι στο είδωλο του αντικειμένου η πληροφορία για την κατανομή της ύλης συμπιέζεται από τις τρεις διαστάσεις, σε δύο (η πληροφορία για το βάθος χάνεται).

Εστιακό μήκος & προβολές

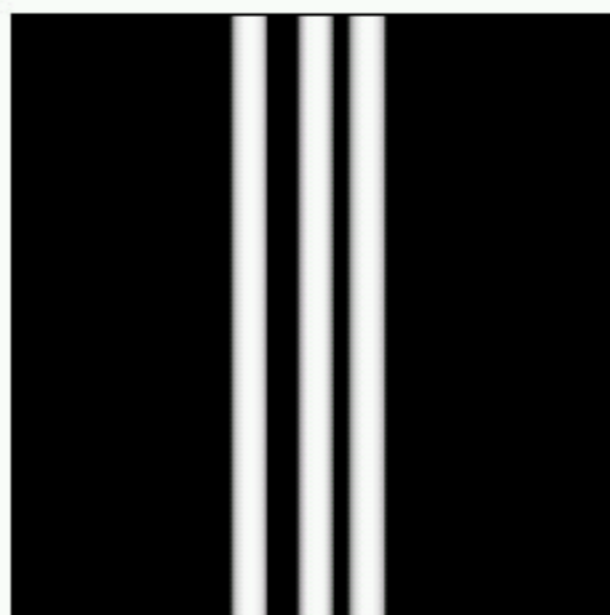
Ένα από τα βασικά προβλήματα του προσδιορισμού δομών βιολογικών μακρομορίων με τη χρήση ΗΜ είναι λοιπόν η επανάκτηση της τρισδιάστατης δομής από τις δισδιάστατες προβολές της. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται τρισδιάστατη επανασύσταση.

Η αρχή στην οποία στηρίζεται η διαδικασία είναι το θεώρημα των προβολών (projection theorem), το οποίο προκύπτει άμεσα από τη θεωρία των μετασχηματισμών Fourier. Μια εικονογραφημένη επεξήγηση της μεθόδου είναι :

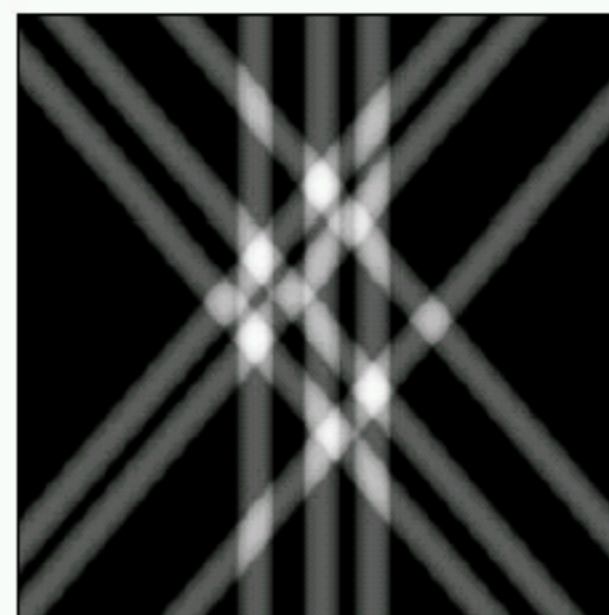
Θεώρημα προβολών



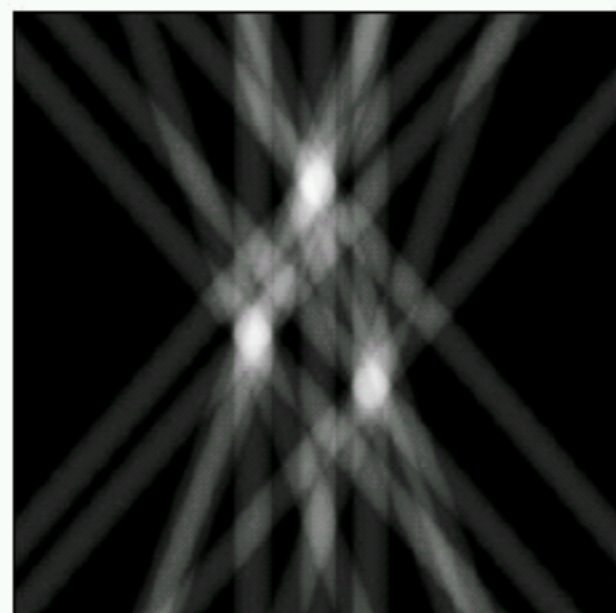
Object



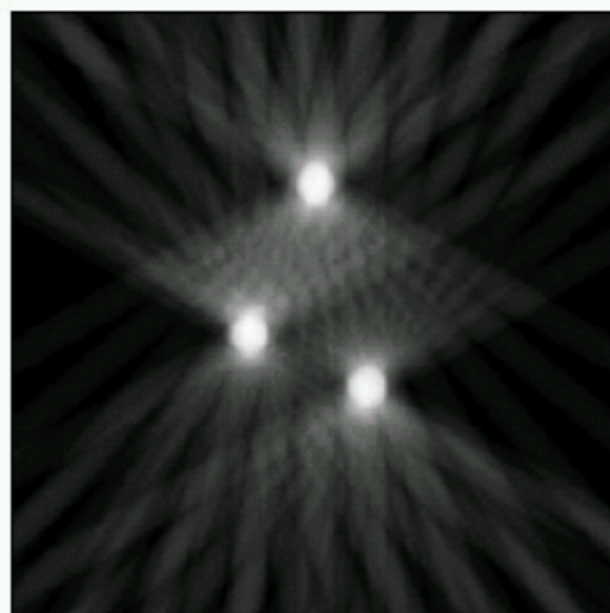
1 Proj.



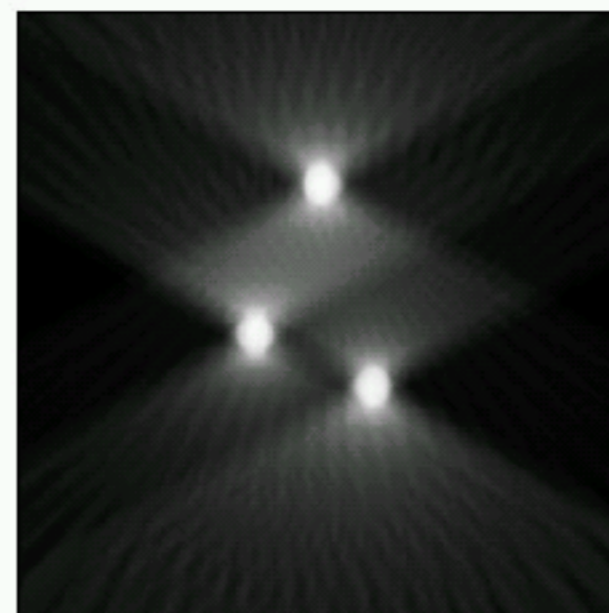
3 Proj./40 deg.



5 Proj./20 deg.



13 Proj./10 deg.



25 Proj./5 deg.

Τρισδιάστατη επανασύσταση

Ανάλογα με τον τύπο του δείγματος που χρησιμοποιείται για την ανάλυση, διακρίνονται τρεις περιπτώσεις :

- Επανασύσταση από μεμονωμένα σωμάτια (single particle averaging).
- Επανασύσταση από ινίδια και σωληνίσκους με ελικοειδή συμμετρία.
- Επανασύσταση από δισδιάστατους κρυστάλλους (για την ακρίβεια, κρυστάλλους με πάχος μίας μόνο στοιχειώδους κυψελίδας).

Επανασύσταση: απλά σωμάτια.

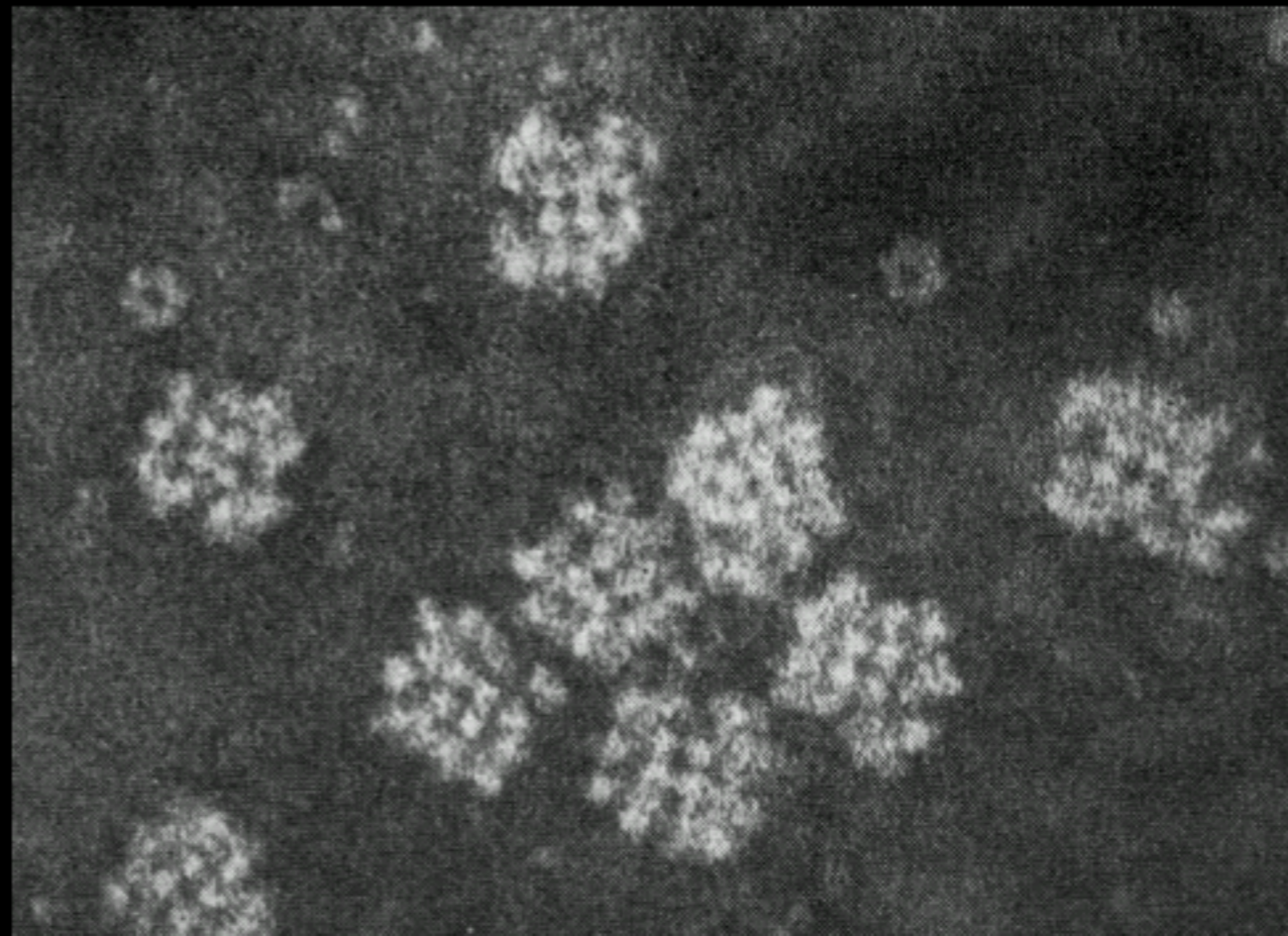
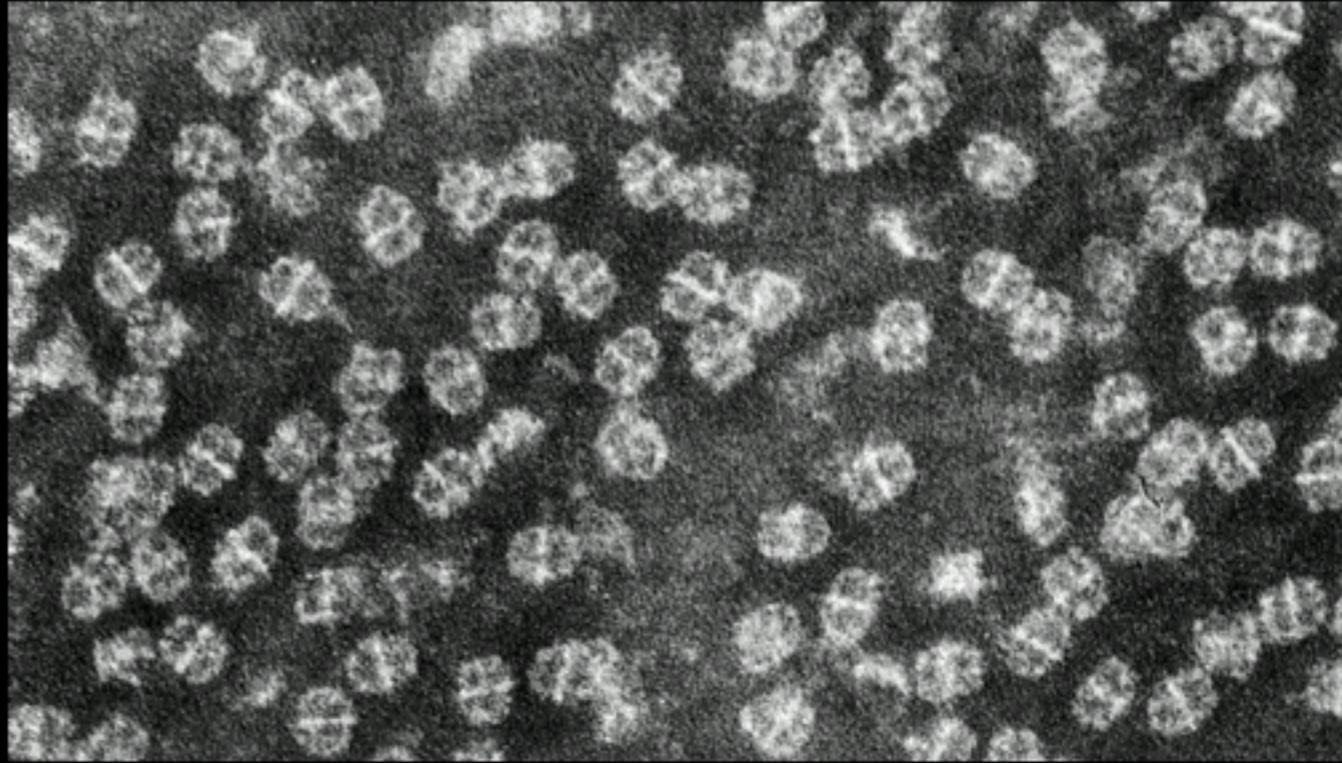
Από την άποψη προετοιμασίας του δείγματος, αυτή είναι η πλέον απλή μέθοδος (που στην περίπτωση της κρύο-ηλεκτρονικής μικροσκοπίας το μόνο που απαιτεί είναι ένα διάλυμα του μορίου ή συμπλόκου). Η μέθοδος στηρίζεται στο ότι σε ένα είδωλο του αντικειμένου (δηλ. μεμονωμένων μορίων) διαφορετικά μόρια θα έχουν τυχαίους (και συνεπώς διαφορετικούς) προσανατολισμούς. Από τους διαφορετικούς προσανατολισμούς προσδιορίζονται διαφορετικές προβολές του μορίου, οι οποίες συνδυάζονται μεταξύ τους προκειμένου να επανασυσταθεί η τρισδιάστατη δομή.

Επανάσταση: απλά σωμάτια.

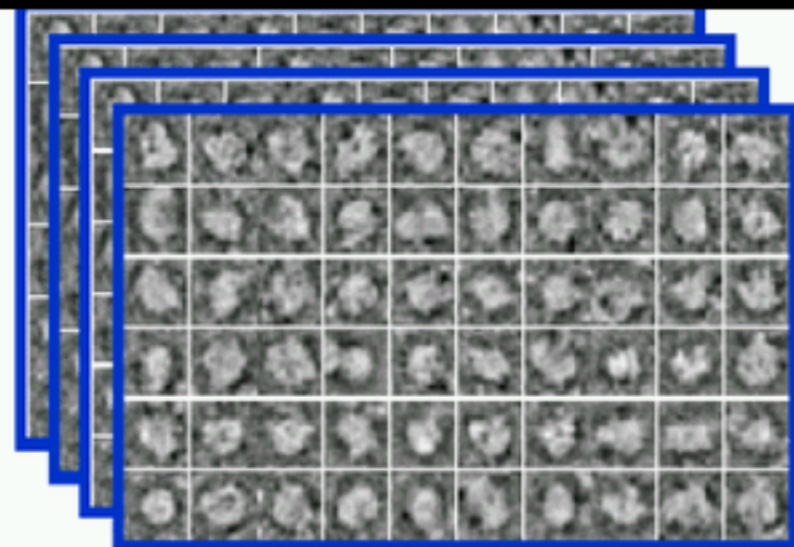
Η ευκολία προετοιμασίας του δείγματος αντισταθμίζεται από τα προβλήματα επεξεργασίας των δεδομένων και τη σχετικά χαμηλή διακριτικότητα (7A) που είναι εφικτή με αυτή τη μέθοδο. Τα βασικότερα προβλήματα είναι :

- Ο μεγάλος αριθμός σωματιδίων που πρέπει να αναλυθούν.
- Χαμηλή αντίθεση (και συνεπώς αυξημένος θόρυβος) στην περίπτωση της κρύο-ηλεκτρονικής μικροσκοπίας.
- Επειδή δεν επιλέγεται (μέσω κρυστάλλωσης) ένας μόνο πληθυσμός μορίων, η μέθοδος είναι στο έλεος τυχόν φαινομένων ανομοιογένειας, πολυμορφισμού και συσσωμάτωσης των μορίων του δείγματος.

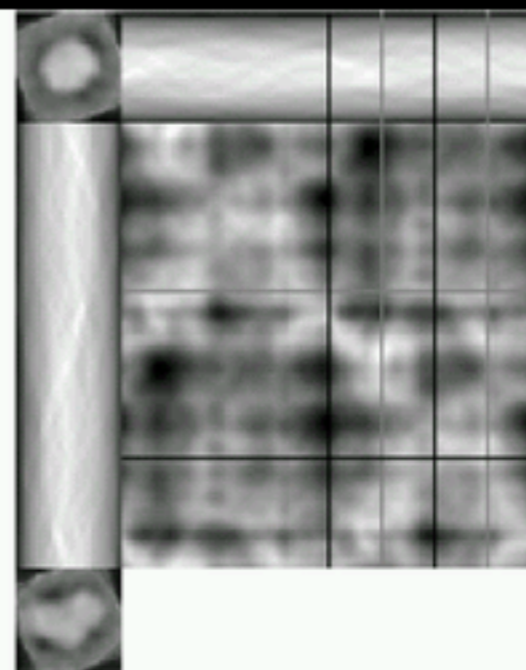
Επανάσταση: απλά σωμάτια.



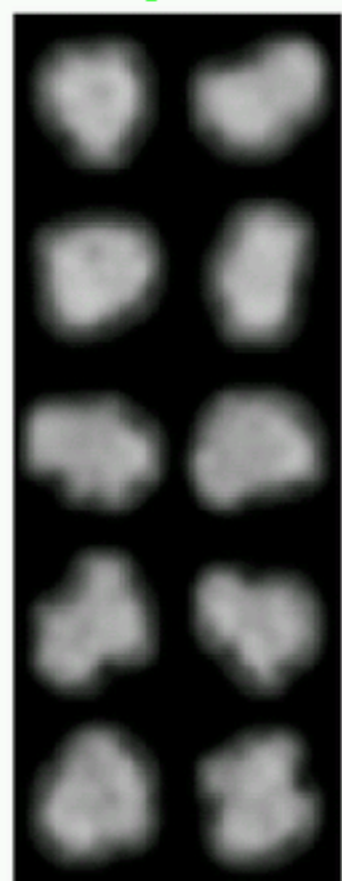
Επανασύσταση: απλά σωμάτια.



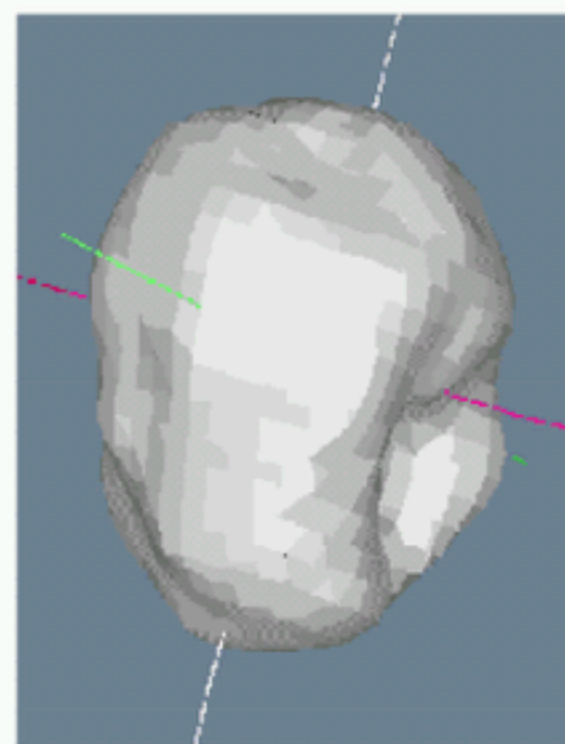
Ομαδοποίηση



Εύρεση γωνίας προβολής



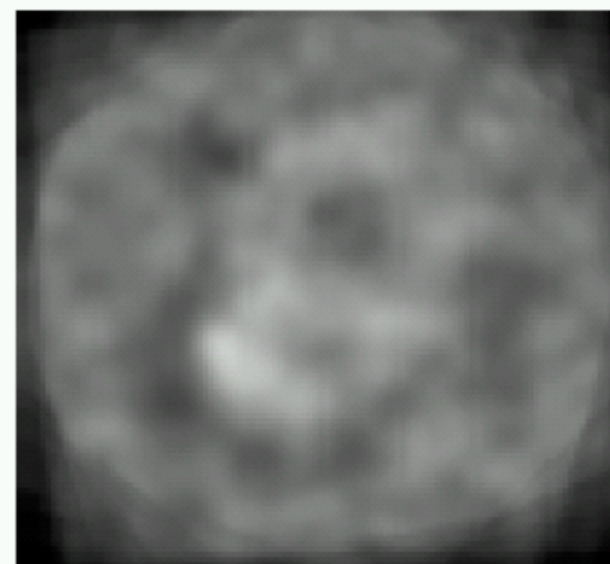
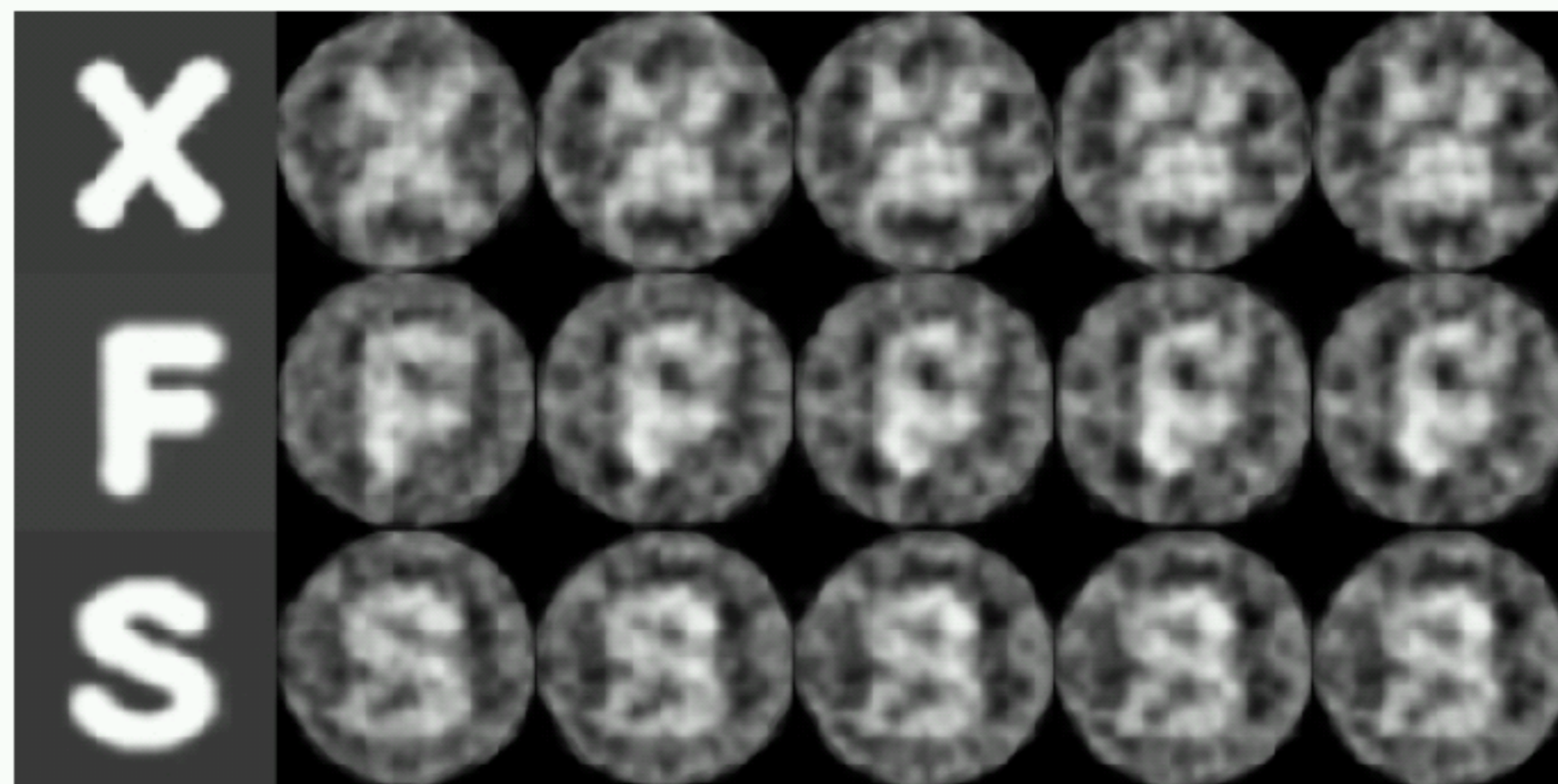
Επανασύσταση



Επανάσταση: απλά σωμάτια.

Σωματίδια αναφοράς και προβλήματα.

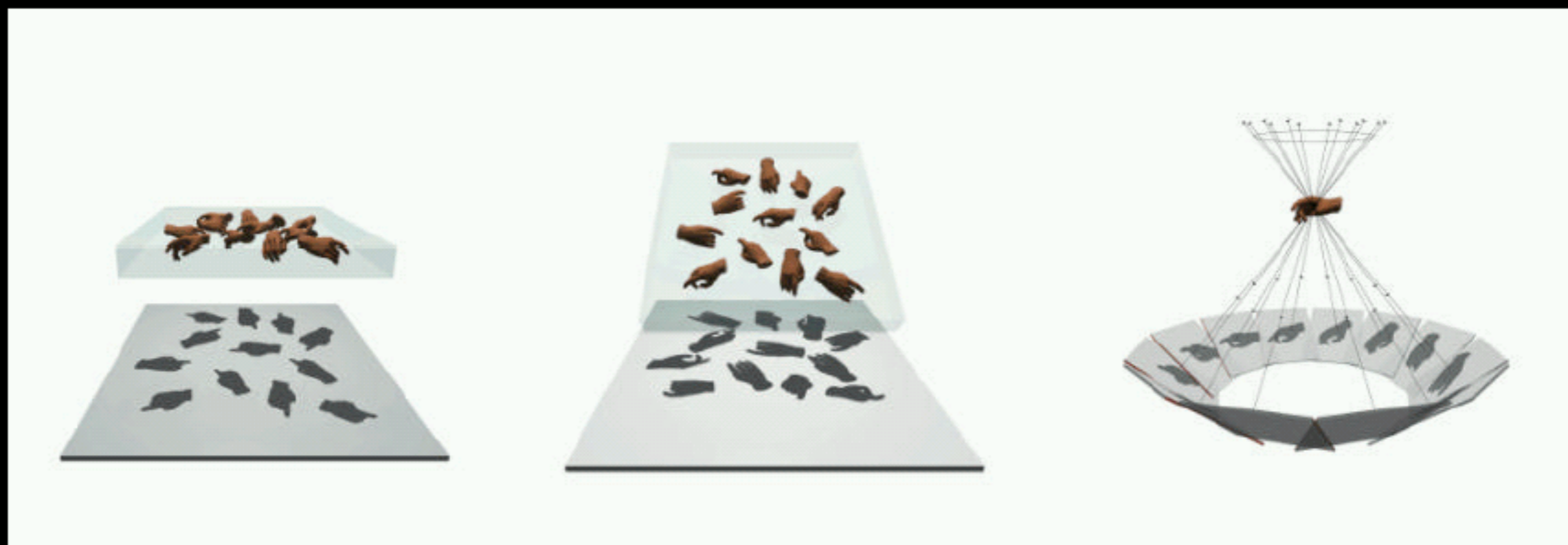
Προκειμένου να γίνει η ομαδοποίηση των διάφορων προβολών, πολλοί αλγόριθμοι απαιτούν την ύπαρξη ενός σωματιδίου αναφοράς. Η επιλογή του σωματιδίου αναφοράς μπορεί να εισαγάγει συστηματικά σφάλματα στην επανάσταση.



Επανάσταση: απλά σωμάτια.

Η μέθοδος των τυχαίων κωνικών περιστροφών.

Εάν τα σωμάτια λόγω της δομής τους έχουν έναν προτιμώμενο προσανατολισμό, η μέθοδος των τυχαίων κωνικών περιστροφών (random conical tilts) επιτρέπει τον προσδιορισμό και άλλων προβολών της δομής.



Ελικοειδής επανασύσταση

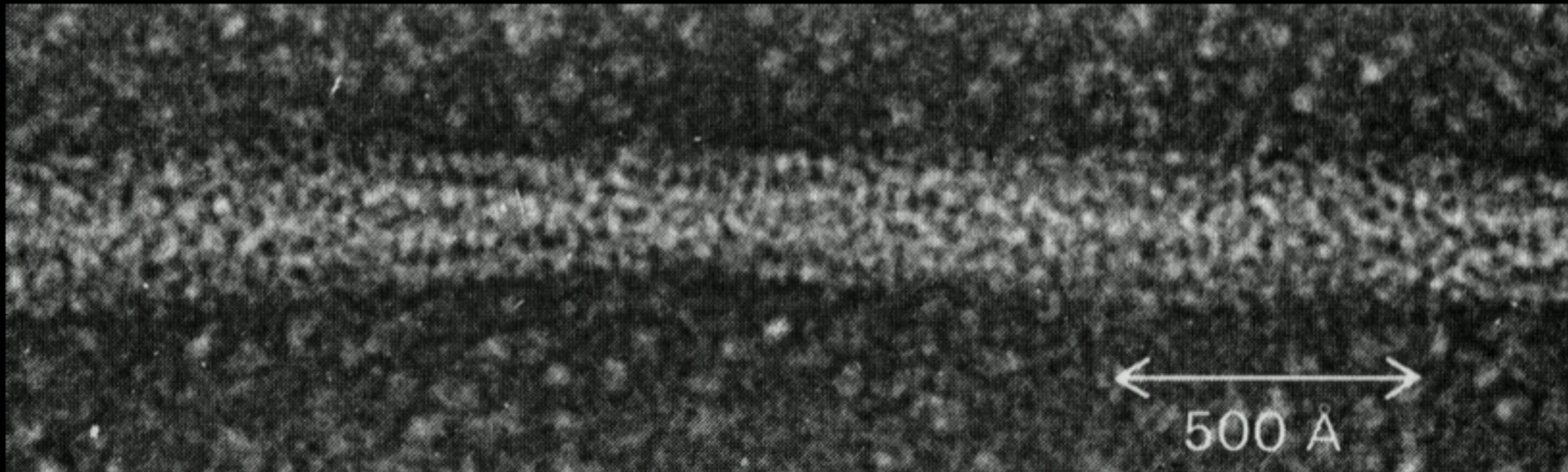
Η ελικοειδής συμμετρία είναι από τις συνηθέστερες στη βιολογία. Το γεγονός μπορεί να αποδοθεί στην αρχή της φειδωλότητας : το προϊόν ενός μόνο γονιδίου αρκεί (μέσω της απλής επανάληψης του) για την δημιουργία μίας υπερδομής. Στην περίπτωση της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας, δεν είναι μόνο οι εγγενώς ελικοειδείς δομές που μελετούνται : σε πολλές περιπτώσεις απόπειρες για τη δημιουργία δισδιάστατων κρυστάλλων οδηγούν (απρόσμενα συνήθως) σε ελικοειδείς δομές.

Ελικοειδής επανασύσταση

Για επανασύσταση από ηλεκτρονιοφωτογραφίες συνήθως χρησιμοποιούνται δυο κατηγορίες ελικοειδών δομών : ινίδια και σωληνίσκοι. Η διαφορά τους είναι ότι στην περίπτωση των σωληνίσκων τα μακρομόρια διευθετούνται στην επιφάνεια ενός εσωτερικά κενού κυλίνδρου (ο χώρος που δημιουργείται στο εσωτερικό του κυλίνδρου μπορεί κάλλιστα να έχει βιολογική σημασία, π.χ. ελικοειδείς ιοί).

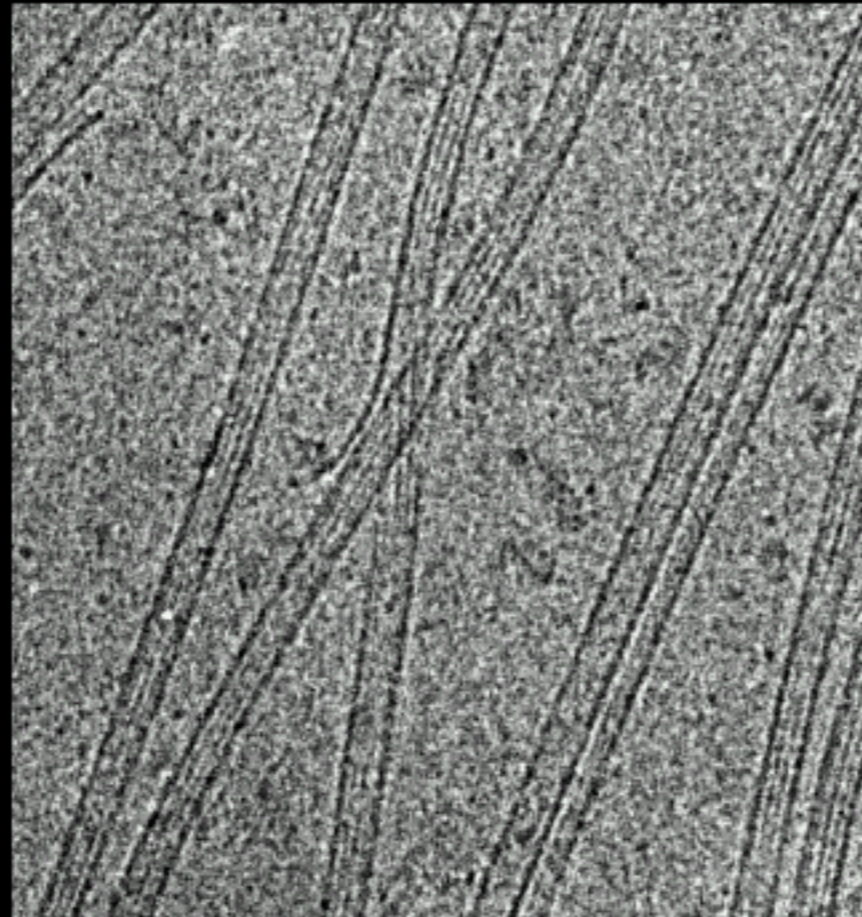
Ελικοειδής επανασύσταση

Ινίδια



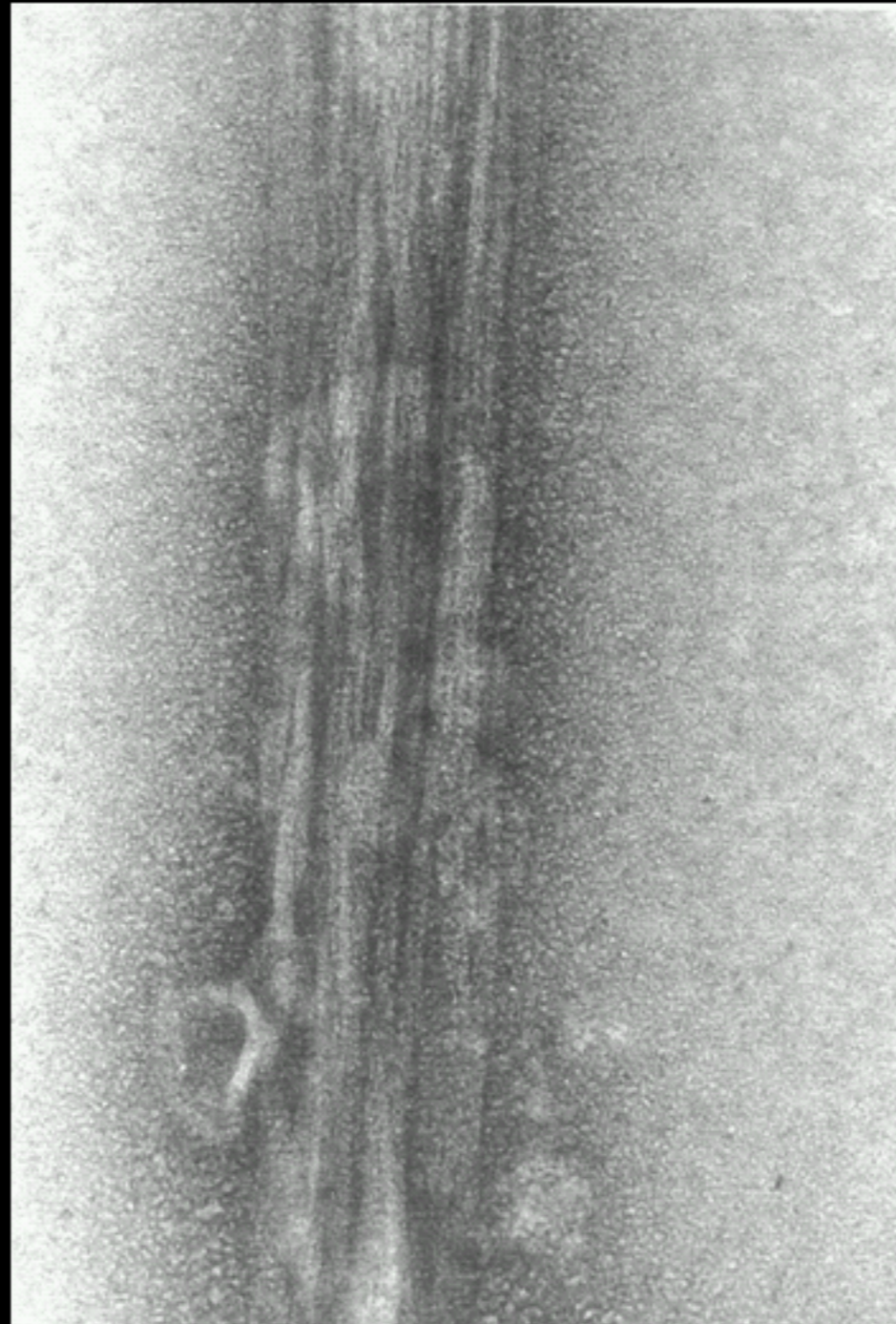
Ελικοειδής επανασύσταση

Ινίδια



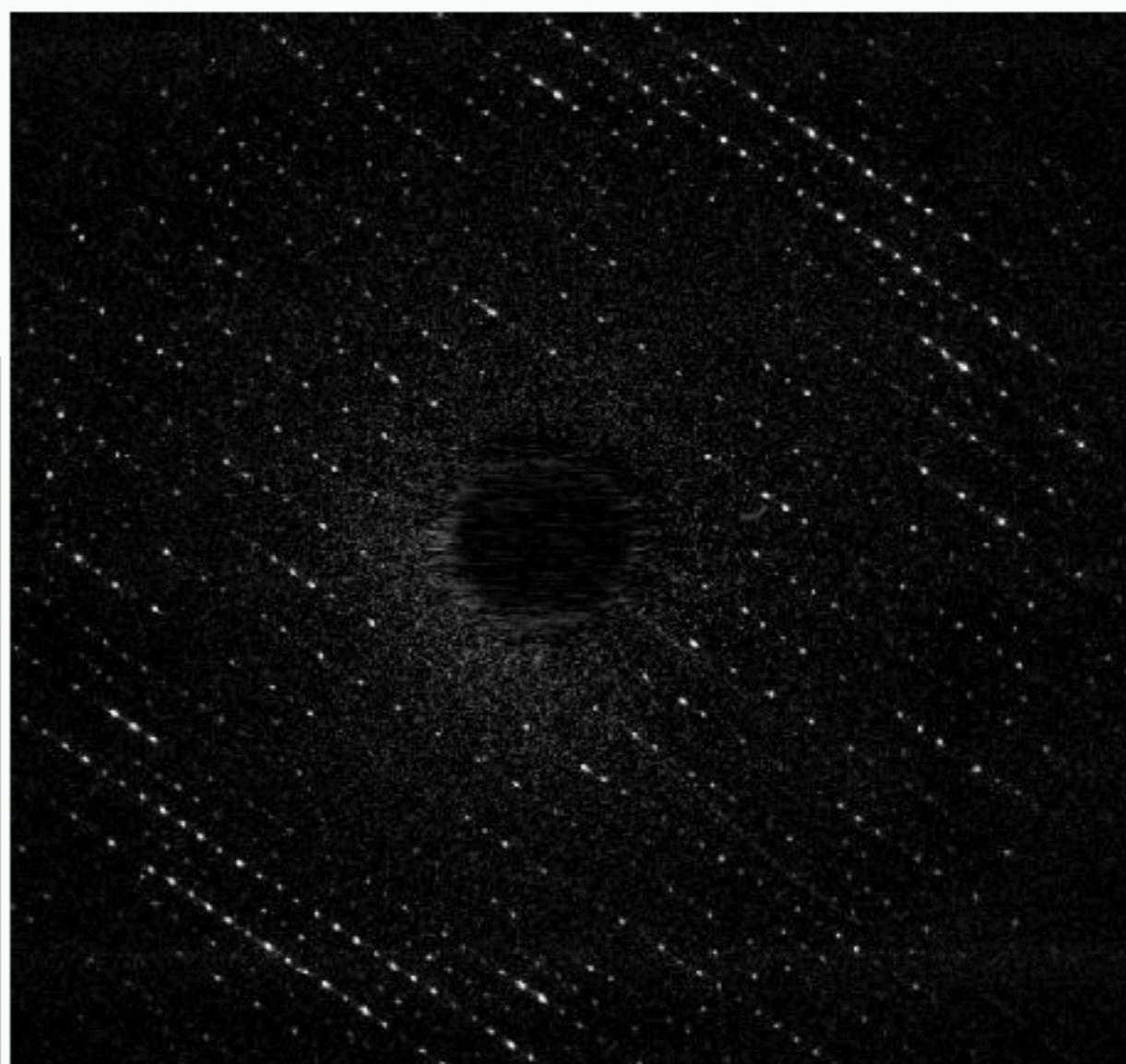
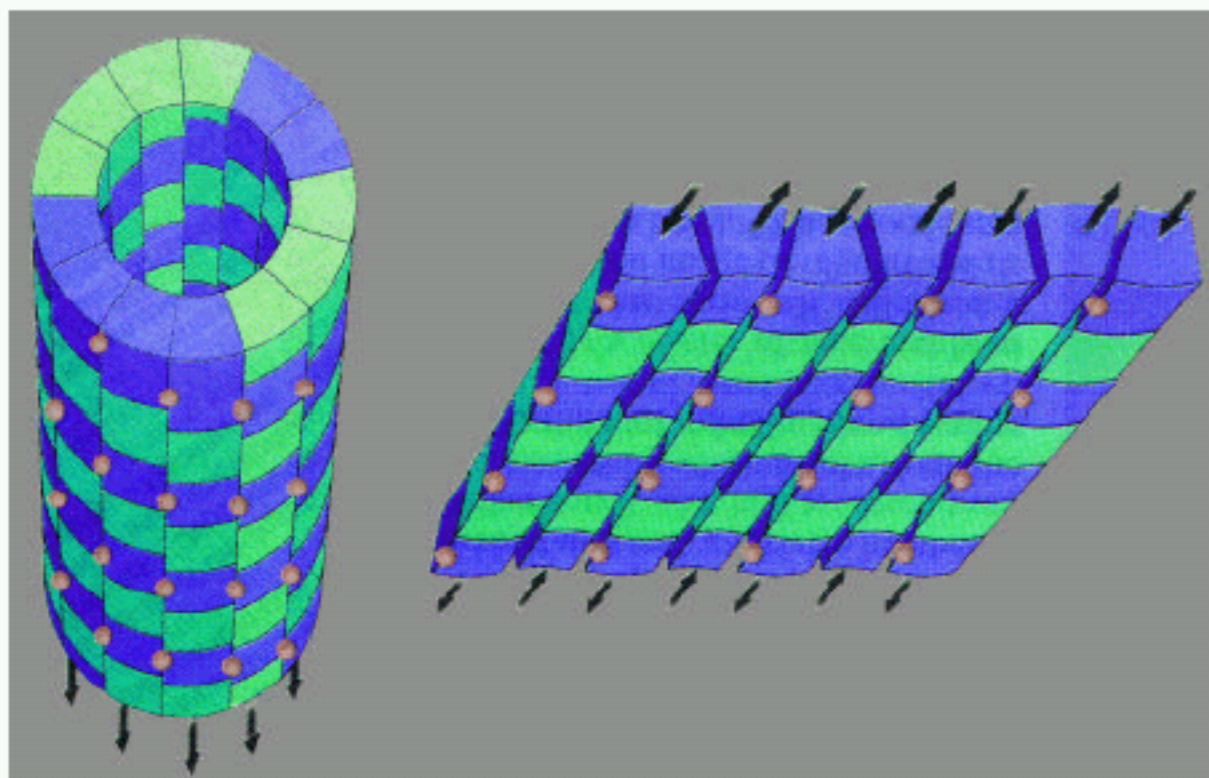
Ελικοειδής επανασύσταση

Ινίδια



Ελικοειδής επανασύσταση

Σωληνίσκοι και μετατροπή τους σε 2D κρυστάλλους



Ελικοειδής επανασύσταση

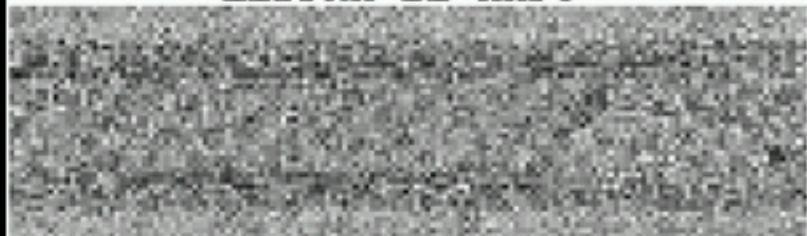
Η διαδικασία της επανασύστασης από ελικοειδείς δομές γίνεται μέσω του φάσματος περίθλασης τους. Η θεωρία της περίθλασης από ελικοειδείς δομές αναπτύχθηκε από τον F.H.C.Crick (και ήταν αυτή που του επέτρεψε να προσδιορίσει την δομή του DNA).

Η ανάπτυξη της θεωρίας προϋποθέτει μια οικειότητα με τους μετασχηματισμούς Fourier και συνεπώς η παρουσίαση της ανήκει στα πλαίσια των ειδικών κεφαλαίων της δομικής.

Ελικοειδής επανασύσταση

Σωληνίσκοι και διάγραμμα περίθλασης

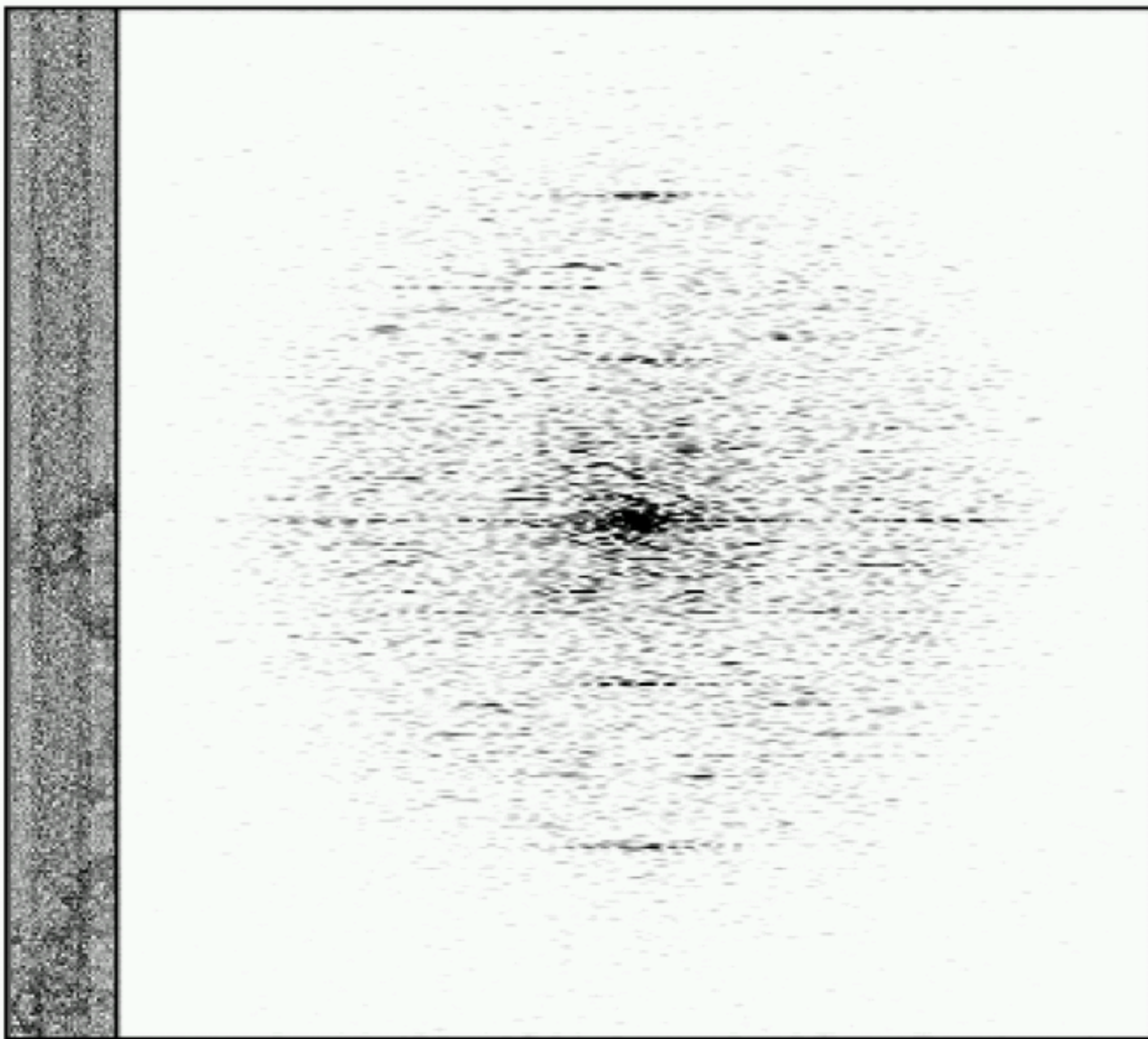
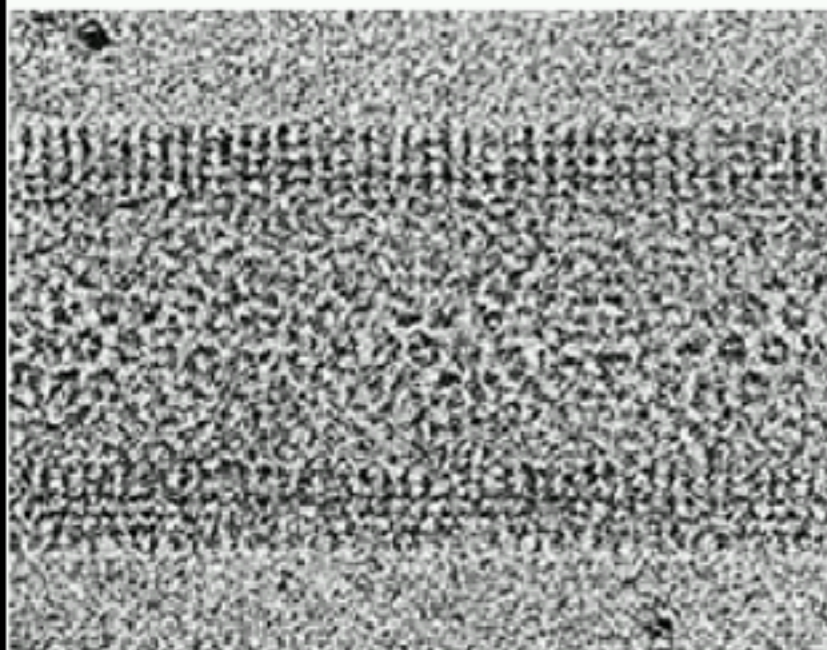
ΔΕΙΓΜΑ ΣΕ ΠΑΓΟ



ΑΡΝΗΤΙΚΗ ΧΡΩΣΗ



ΣΚΙΑΣΗ



Ελικοειδής επανασύσταση

Τα κυρίως πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι δίδει ισότροπα δεδομένα (σε αντίθεση με την επανασύσταση από κρυστάλλους). Αυτό σημαίνει ότι τα δεδομένα (ηλεκτρονιοφωτογραφίες) περιέχουν πληροφορία για όλες τις προβολές του μορίου.

Μειονεκτήματα :

- Λόγω των αδύναμων δεδομένων, της αλληλοεπικάλυψης των μορίων και των διορθώσεων που απαιτούνται για τυχόν παραμορφώσεις των σωληνίσκων, η διακριτικότητα είναι σχετικά χαμηλή (~8Å).

Επανασύσταση: κρύσταλλοι

Καλά οργανωμένοι δισδιάστατοι κρύσταλλοι είναι το ιδανικό δείγμα για τον προσδιορισμό δομών με ηλεκτρονική μικροσκοπία. Η επανασύσταση βασίζεται στην περίθλαση από περιοδικές δομές (τους δισδιάστατους κρυστάλλους) για την ανάκτηση του ειδώλου των διαφόρων προβολών, και στην χρήση του θεωρήματος των προβολών για την ανάκτηση της τρισδιάστατης δομής από τις προβολές της.

Υπάρχουν δύο βασικές διαδικασίες επανασύστασης ανάλογα με το εάν χρησιμοποιείται αρνητική χρώση (πειράματα χαμηλής διακριτικότητας) ή κρύο-ηλεκτρονική μικροσκοπία (υψηλή διακριτικότητα).

Επανάσταση: κρύσταλλοι

Κρύο-ηλεκτρονική μικροσκοπία

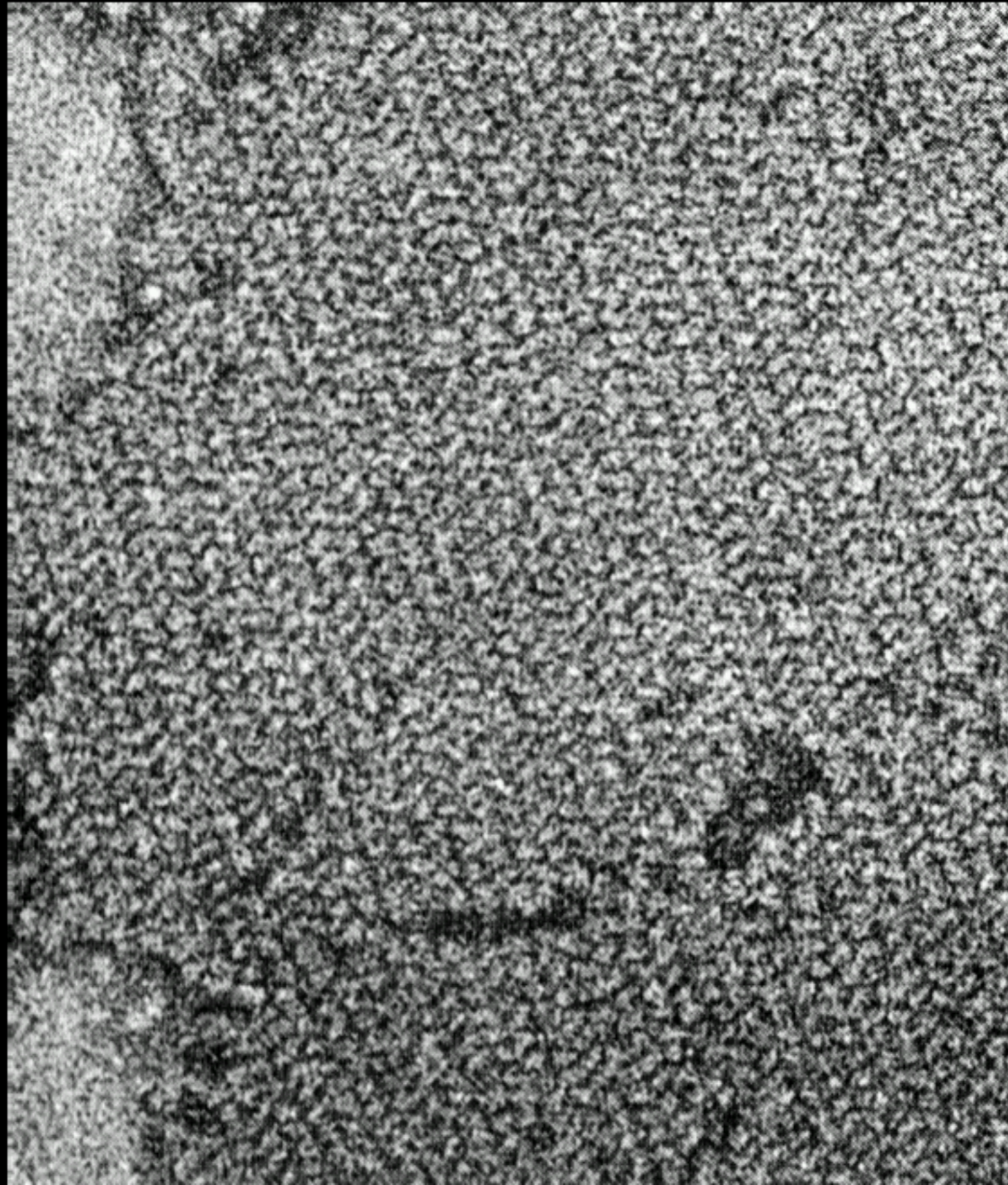
Σε αυτή την περίπτωση ο προσδιορισμός των πλατών των περιθλώμενων κυμάτων γίνεται μέσω ενός πειράματος περίθλασης ηλεκτρονίων ακριβώς όπως παρουσιάστηκε στην προηγούμενη διάλεξη. Για τον προσδιορισμό των φάσεων, καταγράφεται ένα είδωλο των κρυστάλλων, από αυτό το είδωλο προσδιορίζονται (υπολογιστικά) οι φάσεις των περιθλώμενων κυμάτων, και τέλος, τα πλάτη (από το πείραμα περίθλασης) και οι φάσεις (από το είδωλο) συνδυάζονται για την ανάκτηση ενός ειδώλου υψηλότερης ποιότητας απ'ότι θα ήταν εφικτό από το είδωλο μόνο του.

Επανασύσταση: κρύσταλλοι

Αρνητική χρώση

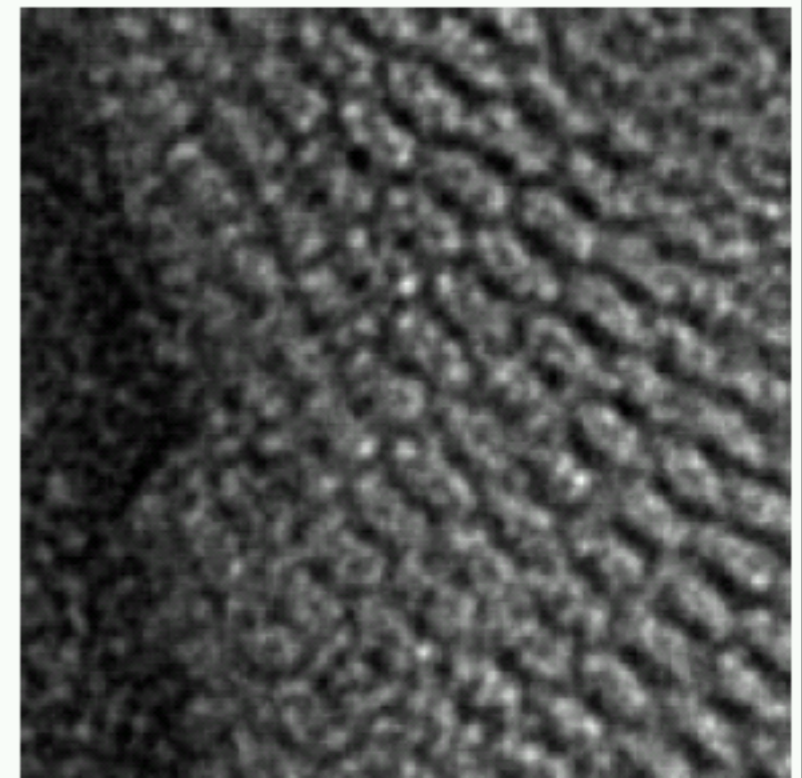
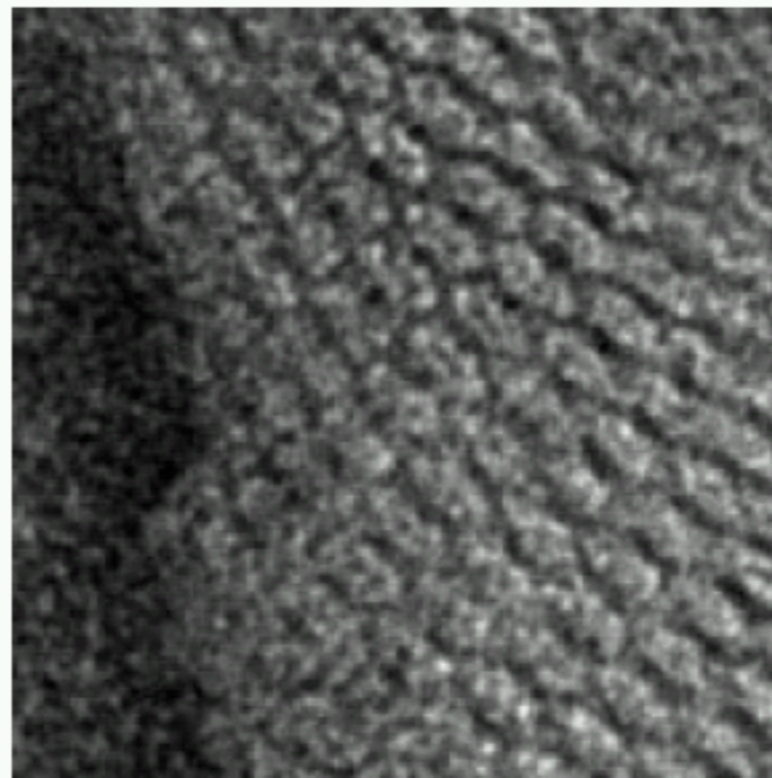
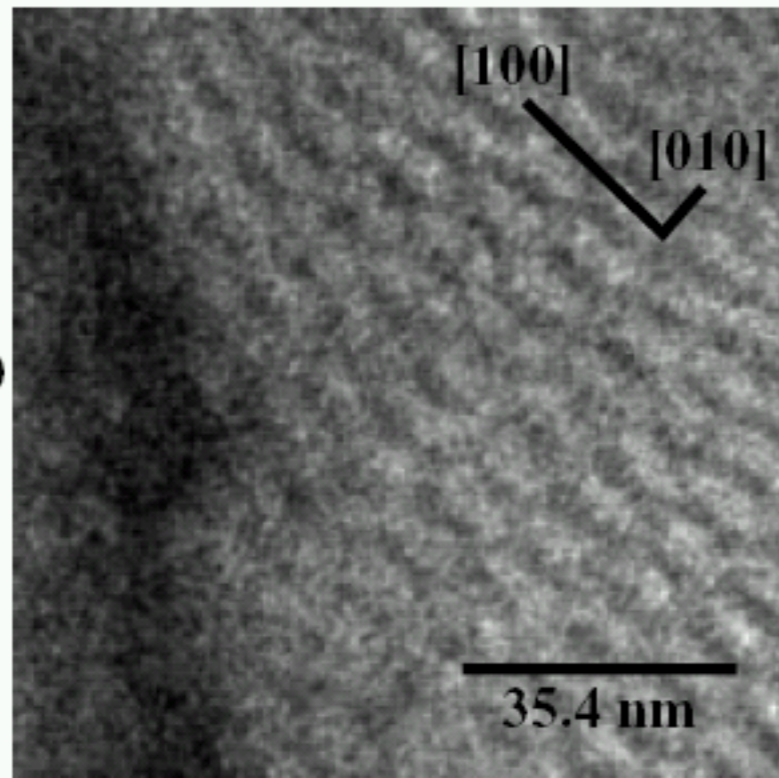
Σε αυτή την περίπτωση η περίθλαση χρησιμοποιείται ως μέσο ενίσχυσης του σήματος. Η βασική αρχή είναι ότι ο τυχαίος θόρυβος είναι (ταυτολογικά) μη περιοδικός, και συνεπώς σε ένα φάσμα περίθλασης συνεισφέρει ομοιόμορφα σε όλη την έκταση του φάσματος. Αντίθετα, το περιοδικό σήμα συνεισφέρει μόνο σε συγκεκριμένα σημεία του φάσματος. Επιλέγοντας μόνο την πληροφορία που περιέχεται στο περιοδικό τμήμα του φάσματος αυξάνει σημαντικά το λόγο σήματος/θορύβου στο τελικό είδωλο.

Επανάσταση: κρύσταλλοι

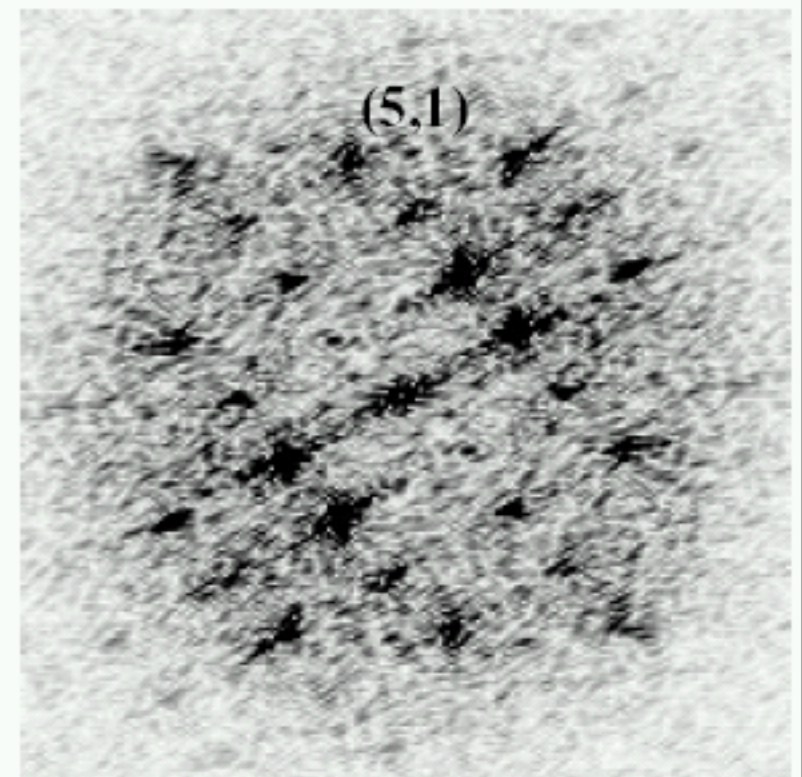
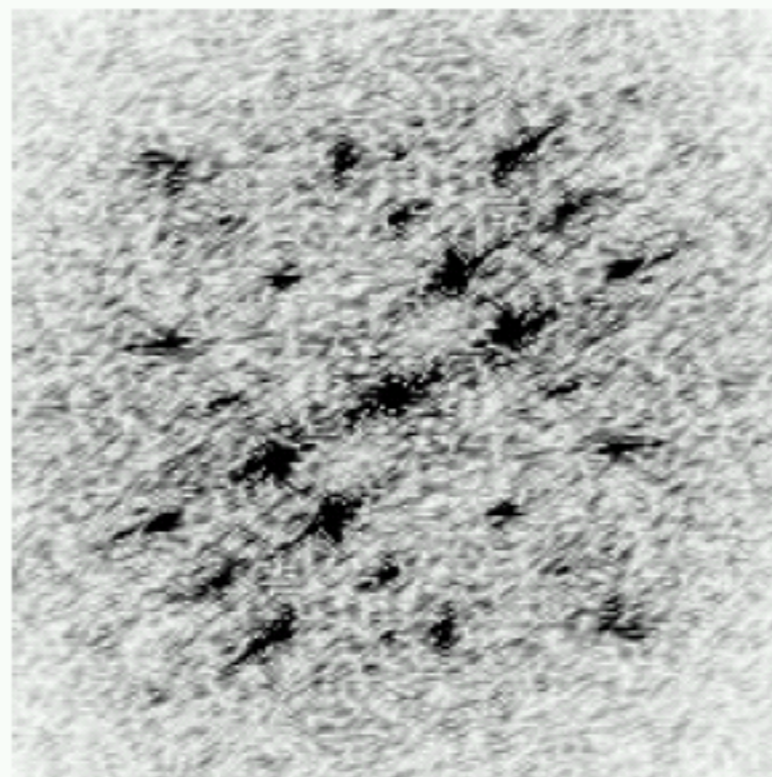
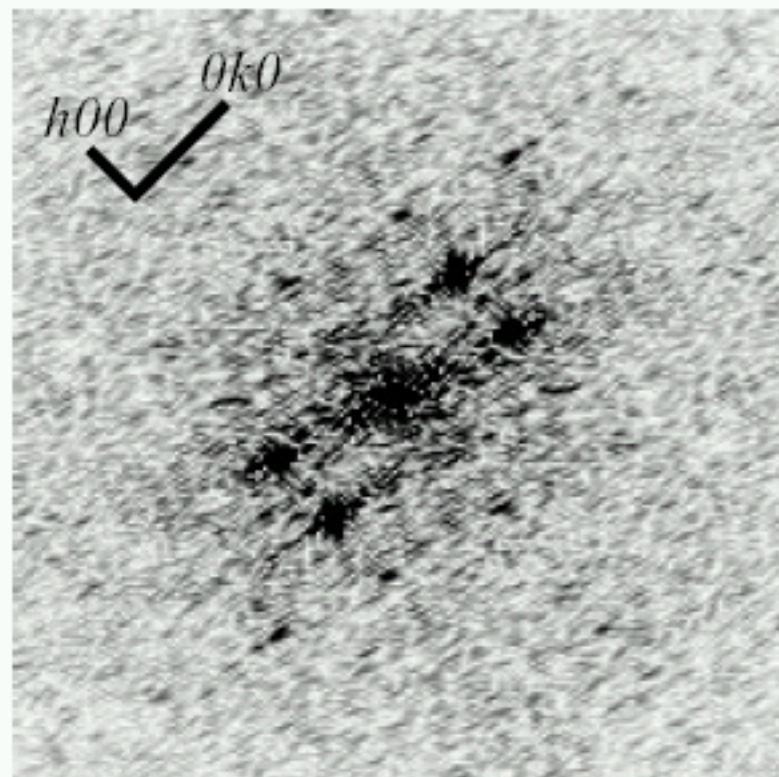


Επανάσταση: κρύσταλλοι

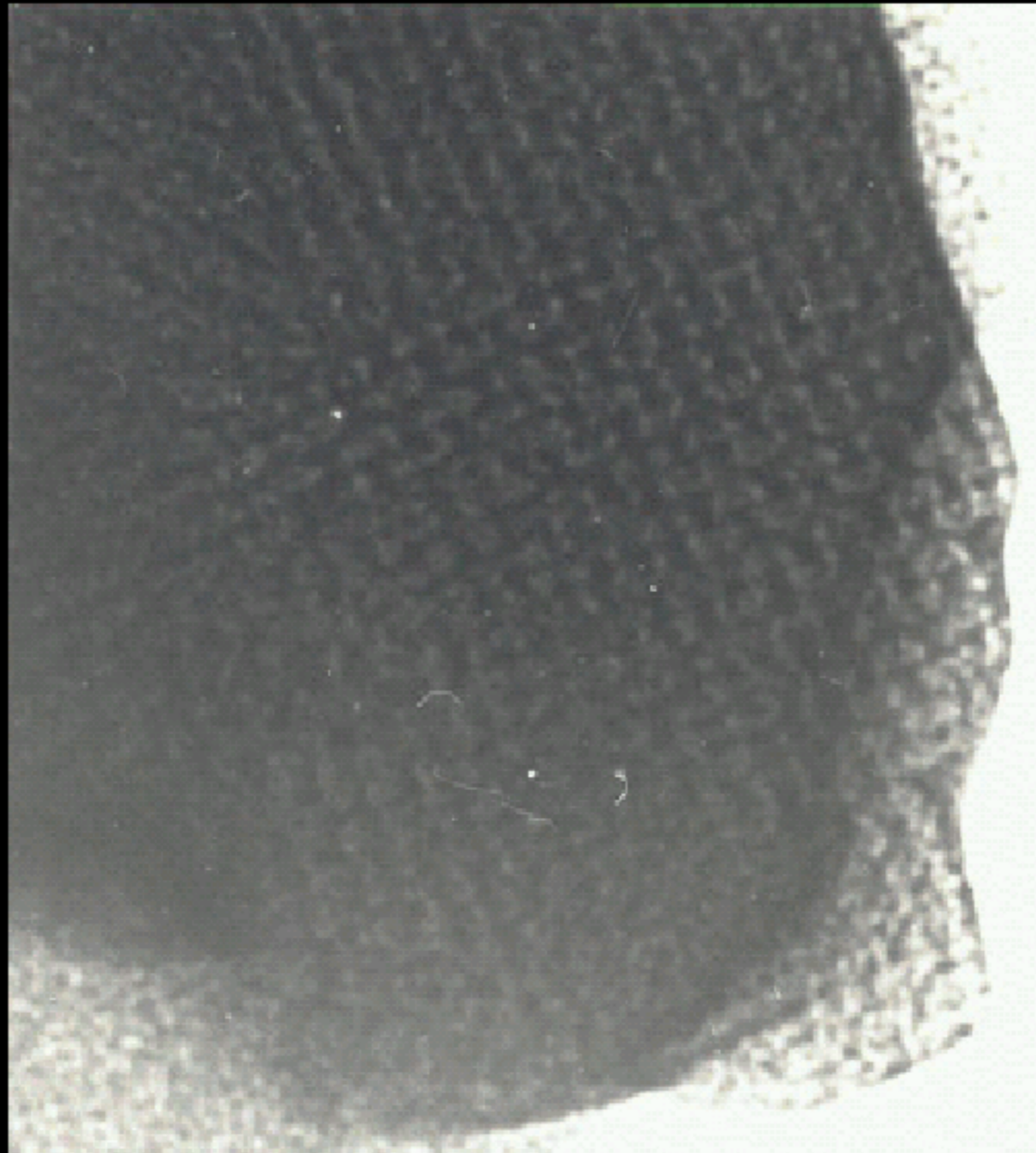
Images



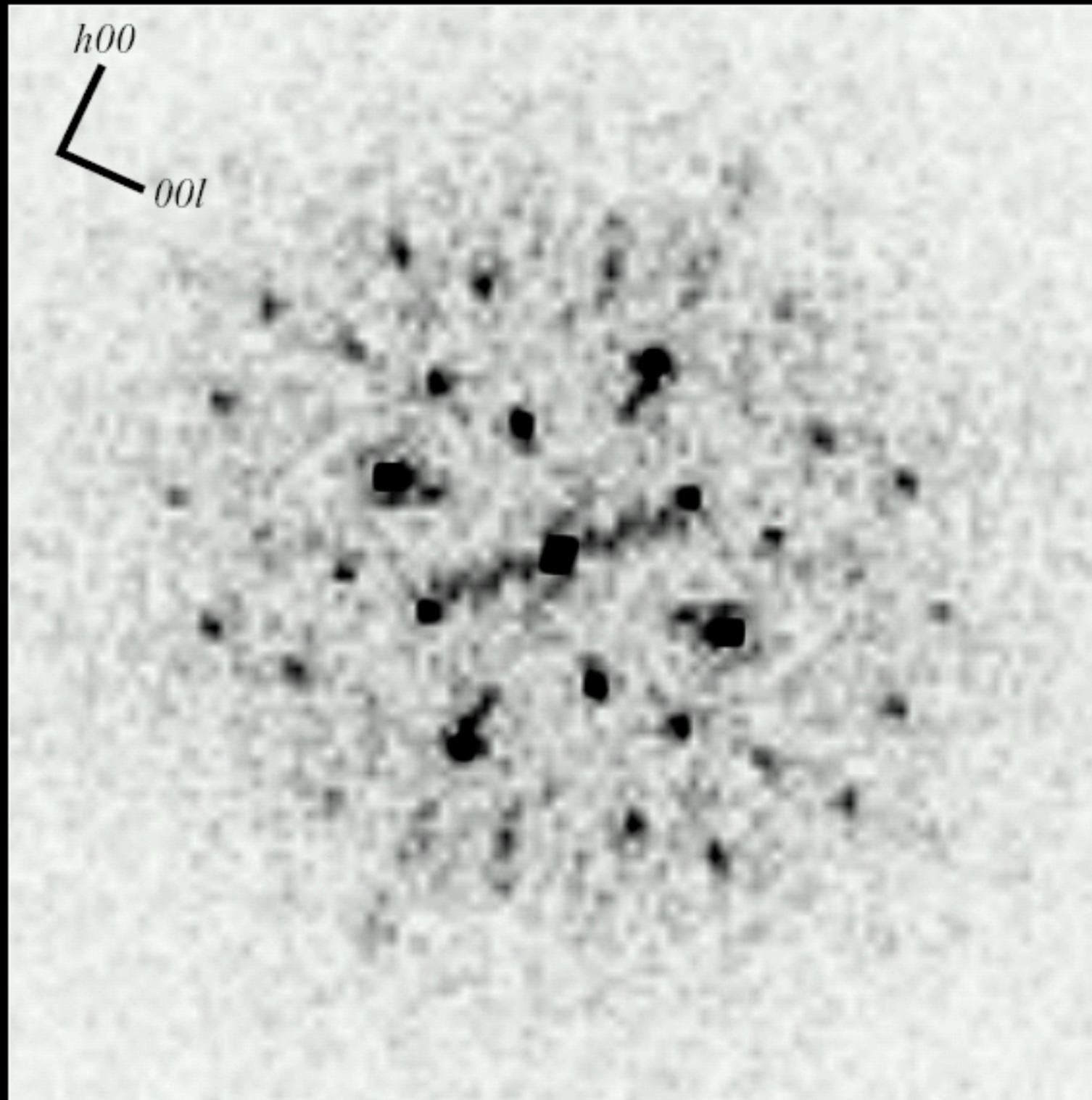
Fourier transforms



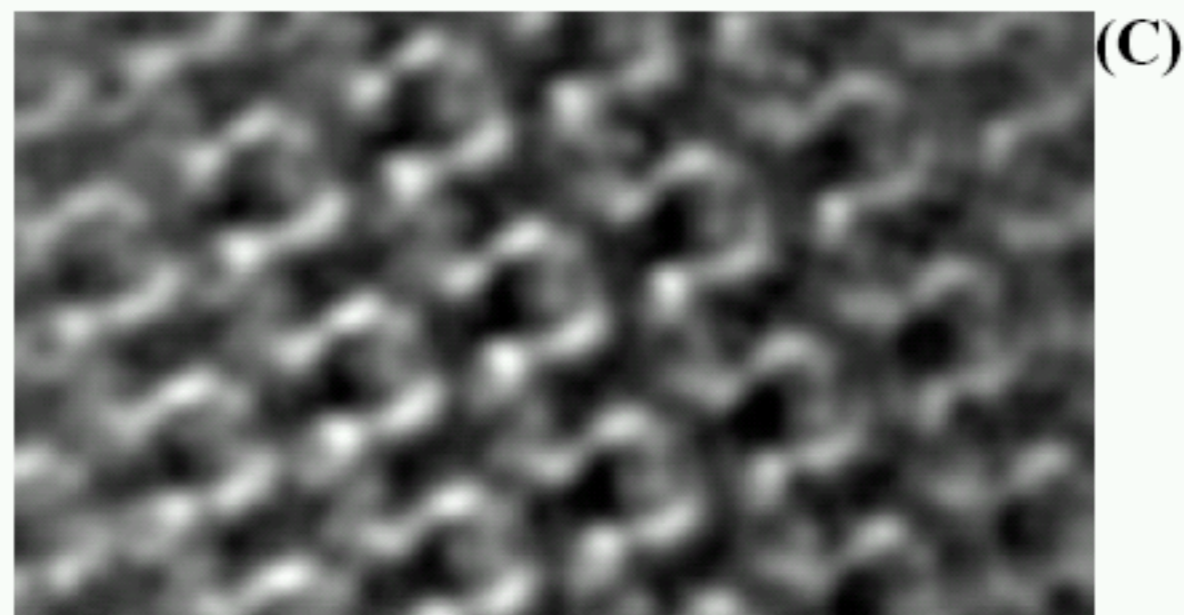
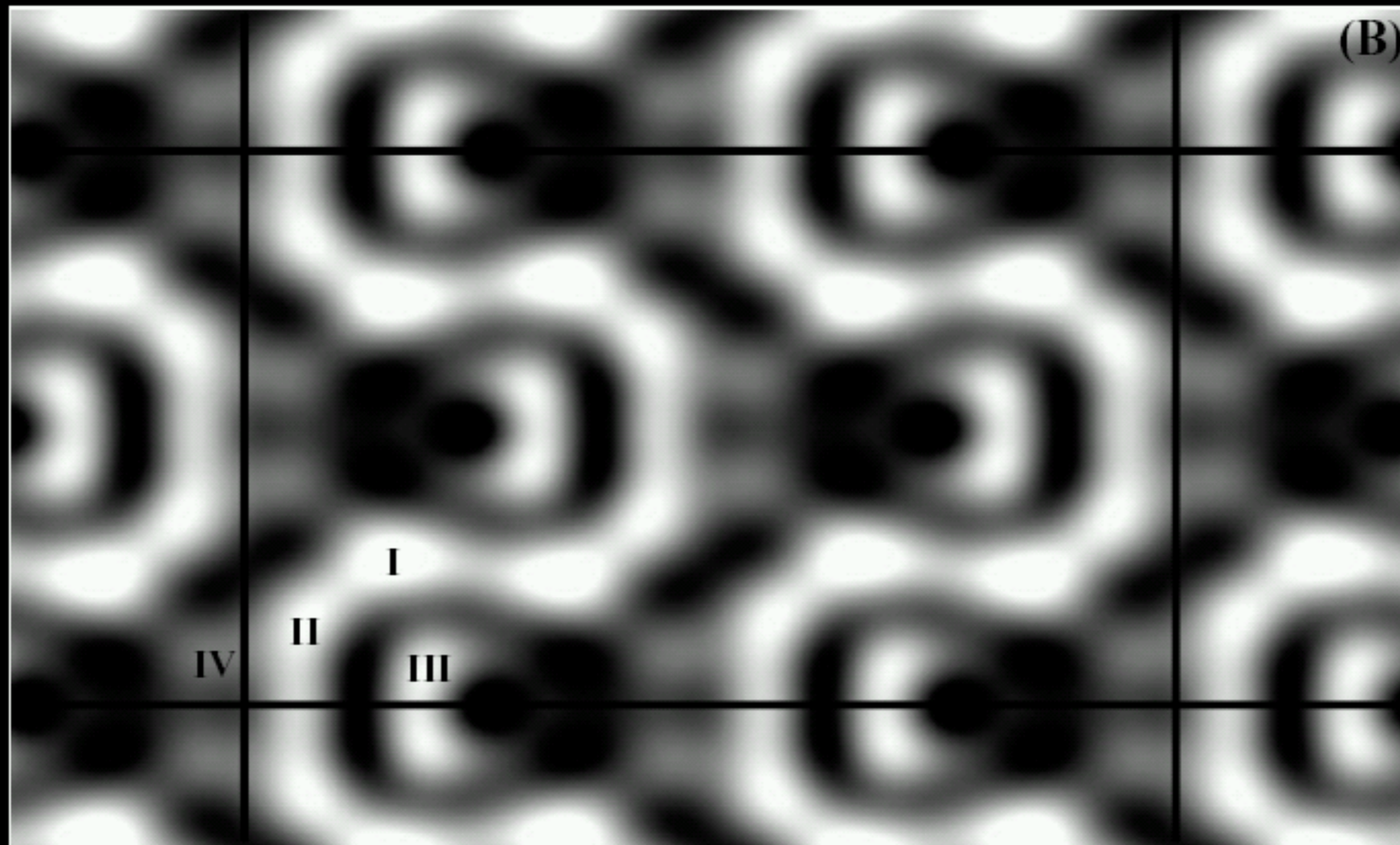
Επανάσταση: κρύσταλλοι



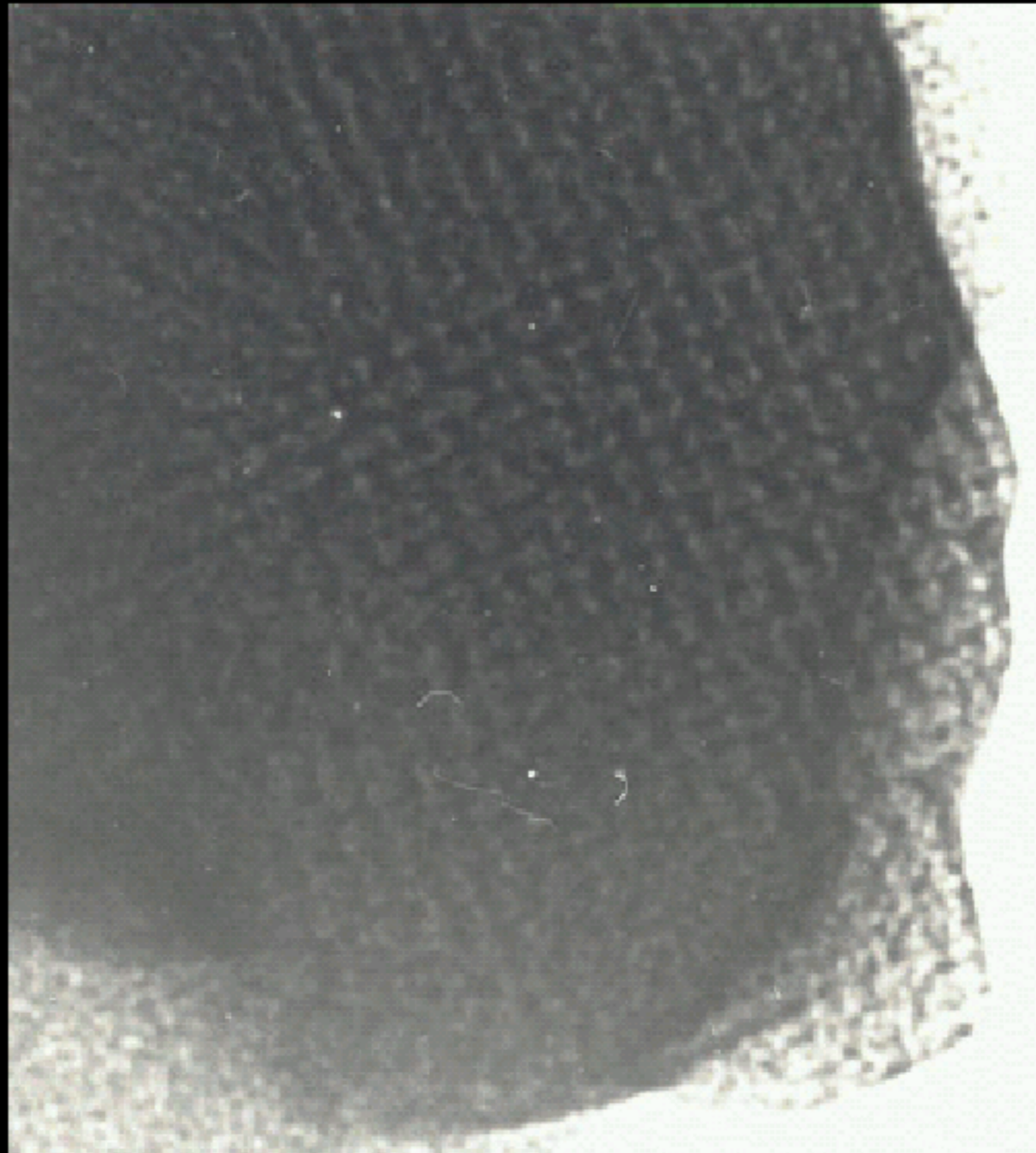
Επανάσταση: κρύσταλλοι



Επανάσταση: κρύσταλλοι



Επανάσταση: κρύσταλλοι



Επανάσταση: κρύσταλλοι

Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η δυνητικά υψηλότερη διακριτικότητα που προσφέρει σε σχέση με τις άλλες μεθόδους (μέχρι $\sim 3A$). Αυτό είναι συνέπεια της ύπαρξης ισχυρότερων και ακριβέστερων δεδομένων (λόγω περίθλασης).

Τα βασικά μειονεκτήματα είναι :

- Η απαίτηση για καλά οργανωμένους δισδιάστατους κρυστάλλους.
- Η ανισοτροπία των δεδομένων λόγω του 'τυφλού' κώνου δεδομένων.