

## Lezione 3

Andrea Ilari

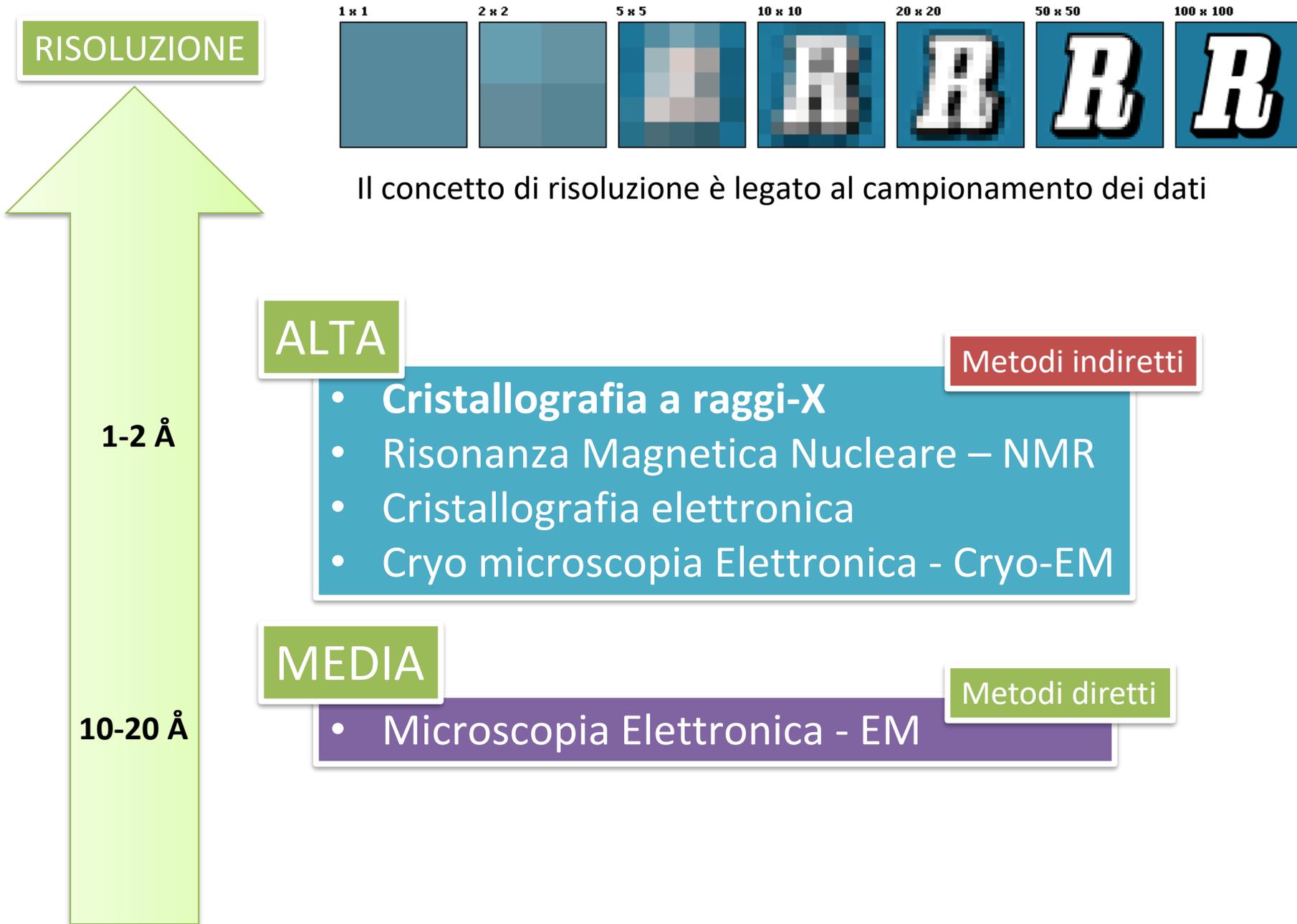
La CRISTALLOGRAFIA AI RAGGI X  
I cristalli e la cristallizzazione

# Cristallografia a raggi-X

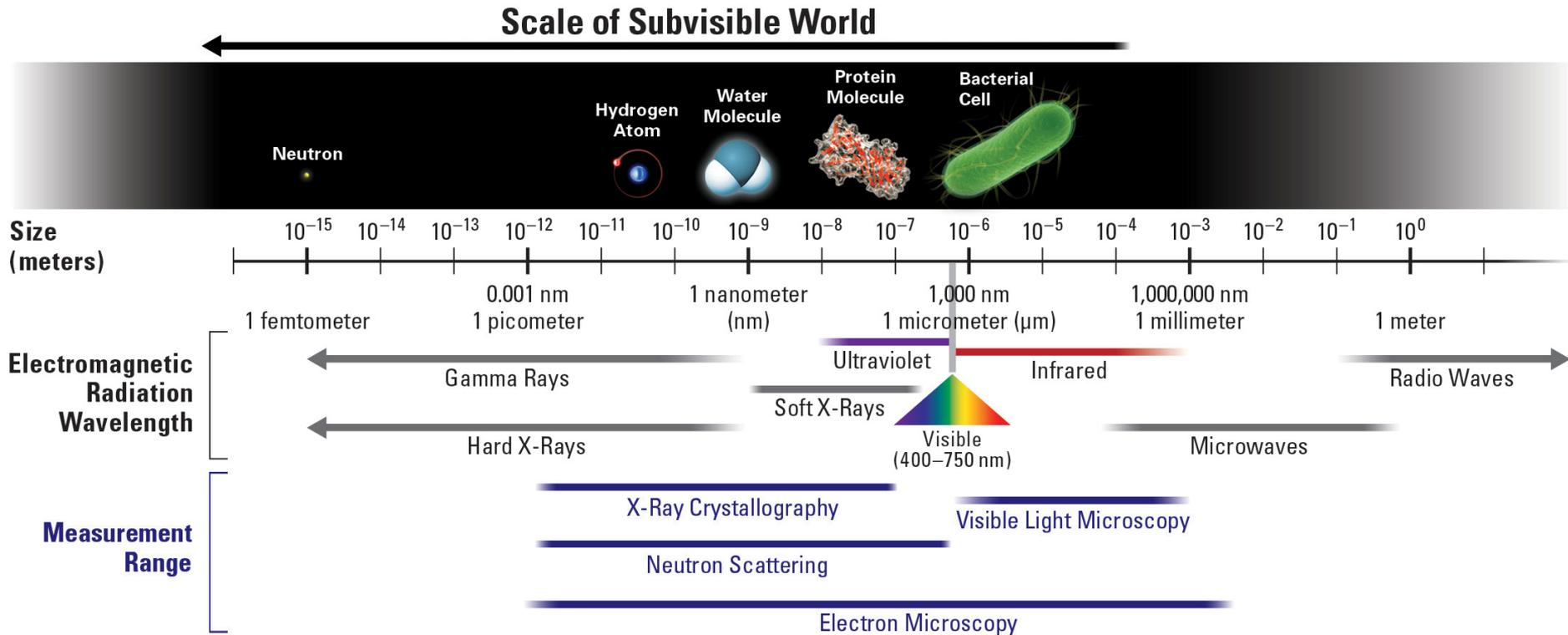
Parte 1



# Metodi sperimentali per determinare la struttura delle macromolecole



## Perché i Raggi-X ?



Per poter visualizzare due oggetti come entità separate, la lunghezza d'onda della radiazione elettromagnetica deve essere dello stesso ordine di grandezza della distanza tra gli oggetti:

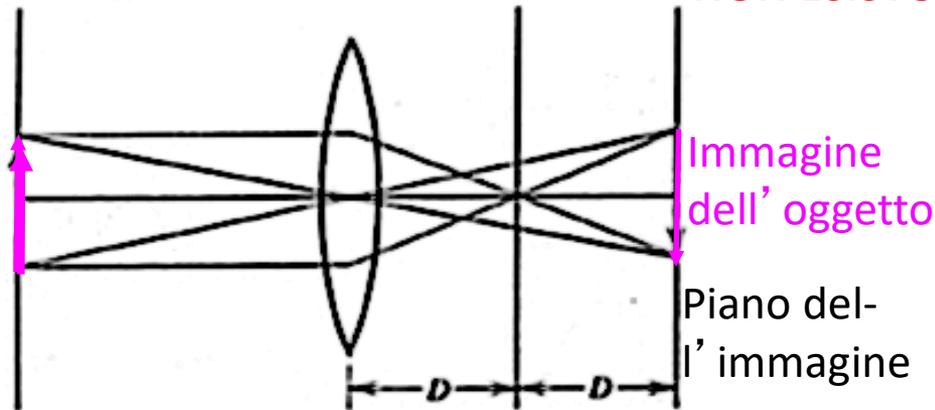
distanza interatomica  $\approx 1 \text{ \AA}$

$\lambda$  raggi-X =  $0.1 \div 2 \text{ \AA}$

⇒ con i raggi X “vedo” gli atomi

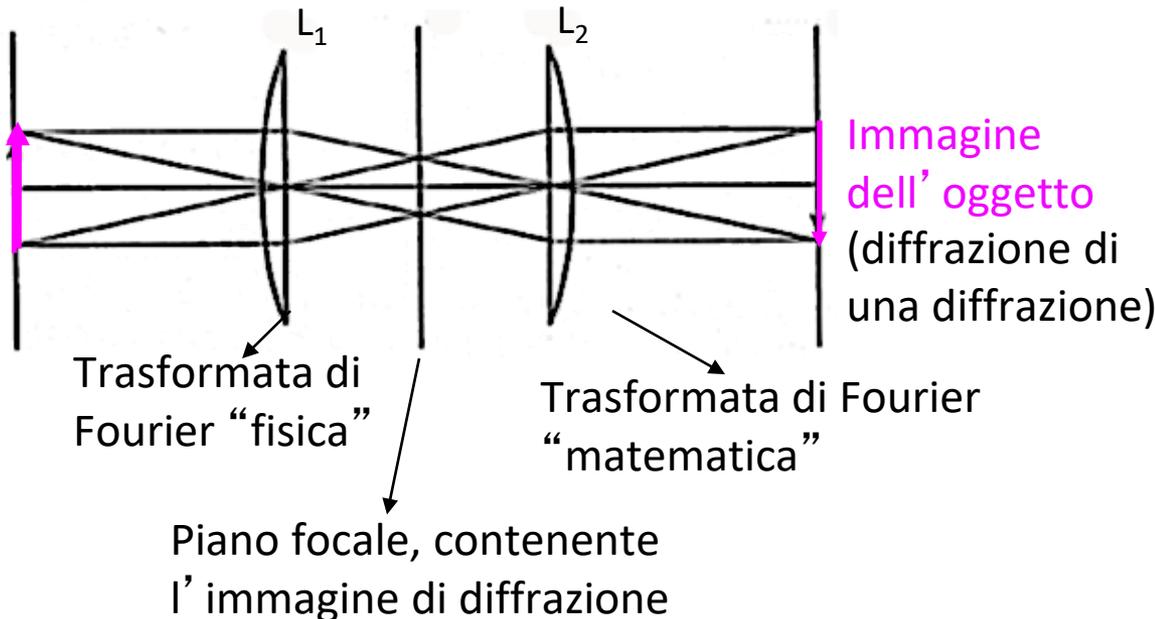
# Perchè CRISTALLOGRAFIA e non MICROSCOPIA

**NON ESISTONO LENTI PER FOCALIZZARE I RAGGI X**



L' immagine dell' **oggetto** e l' immagine di diffrazione sono in relazione tra di loro tramite una **trasformata di Fourier (TF)**

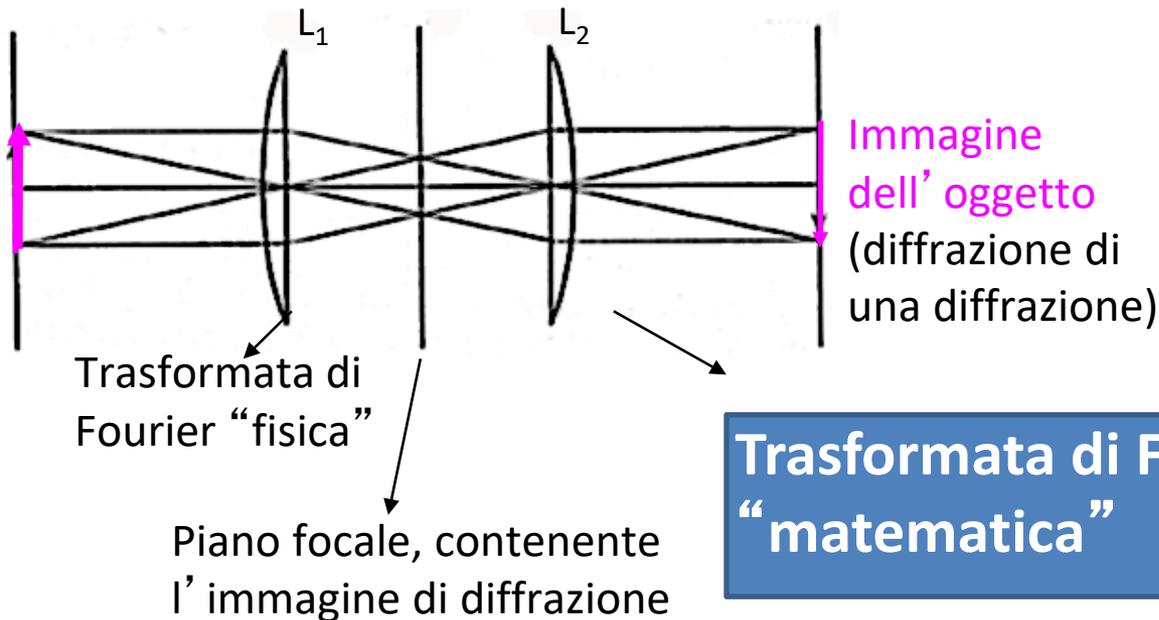
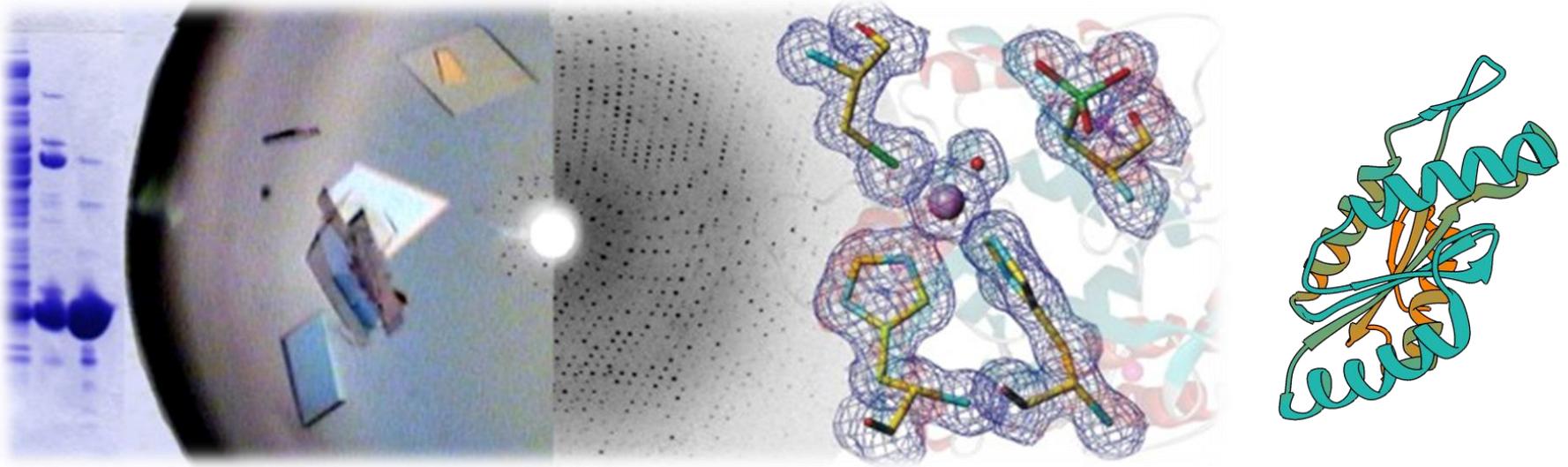
Ora, separiamo la lente in due metà:



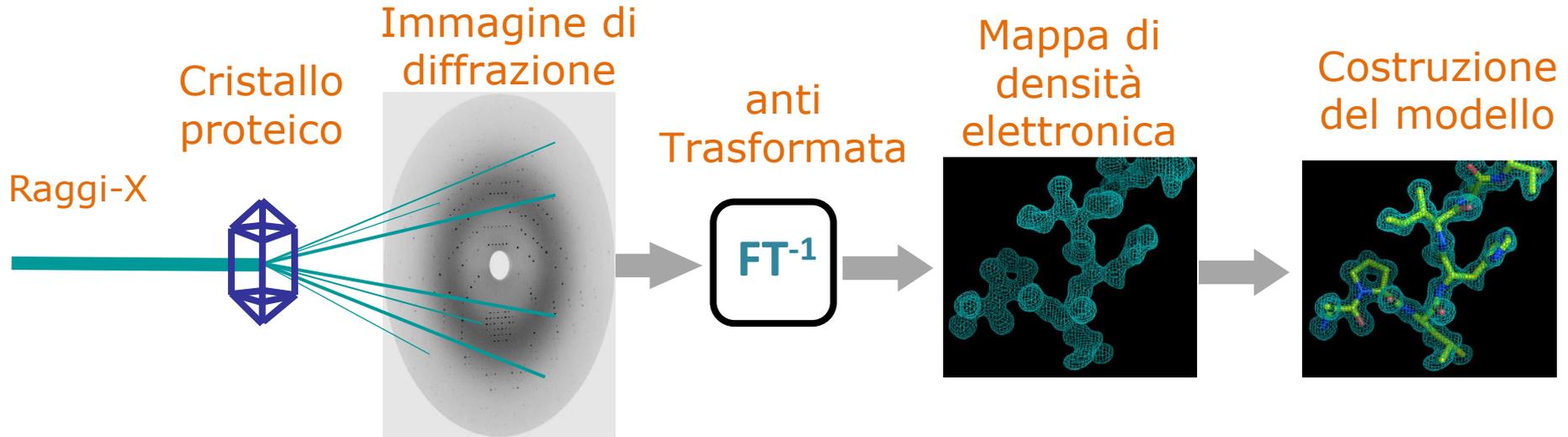
L' immagine dell' **oggetto** è una **TF** della diffrazione  
La diffrazione è una **TF** dell' **oggetto**

# Opening the box

Non esistono lenti in grado di focalizzare i raggi-X  $\Rightarrow$  la matematica ci viene in aiuto



# L'esperimento di diffrazione



Expression  
Purification  
Crystallization



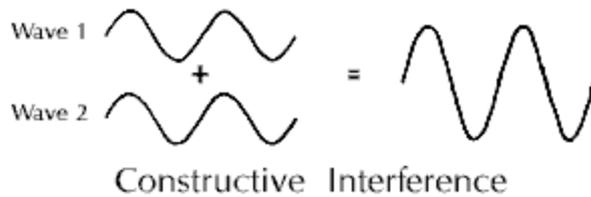
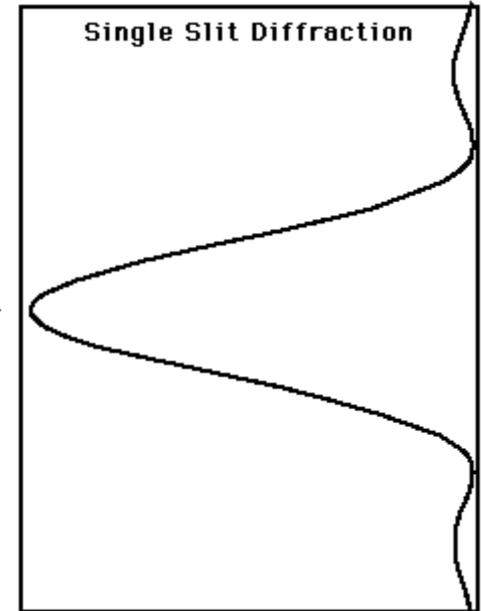
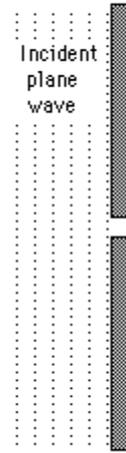
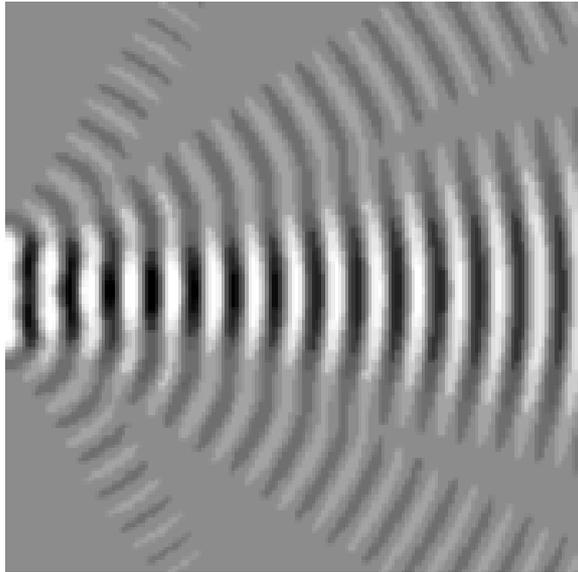
X-ray diffraction  
(data collection)



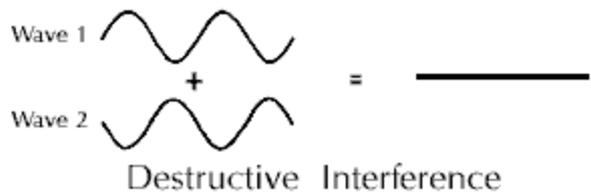
Phasing and model building



# Diffrazione di un'onda elettromagnetica



Se le onde diffratte sono in fase avremo  
Un'interferenza costruttiva (le ampiezze si sommano)



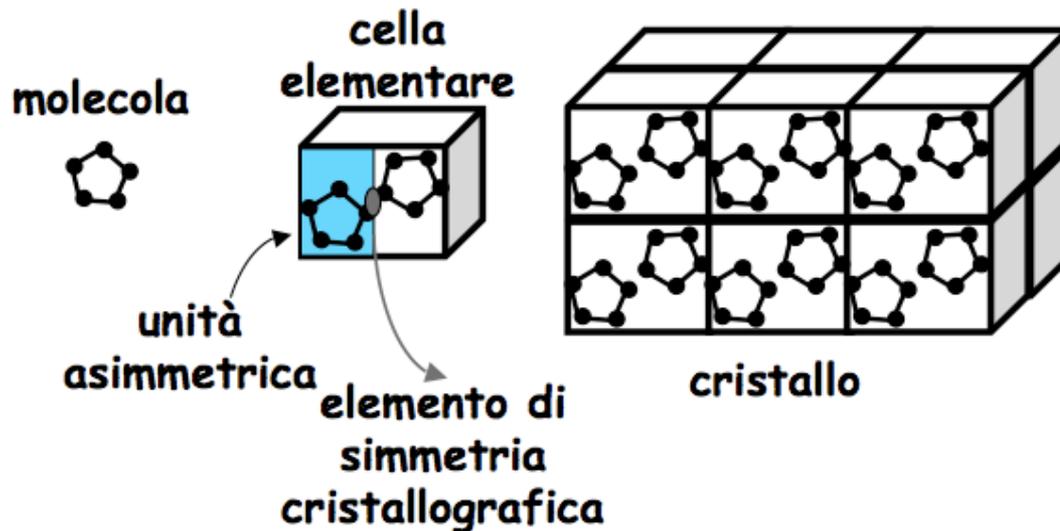
Se le onde diffratte non sono in fase avremo  
un'interferenza distruttiva (le ampiezze si sottraggono)

# Perchè un cristallo?

Un problema fondamentale è che l'intensità dell'onda diffusa da una singola molecola è troppo debole per dare informazioni utilizzabili,

⇒ impossibile ricostruire la molecola

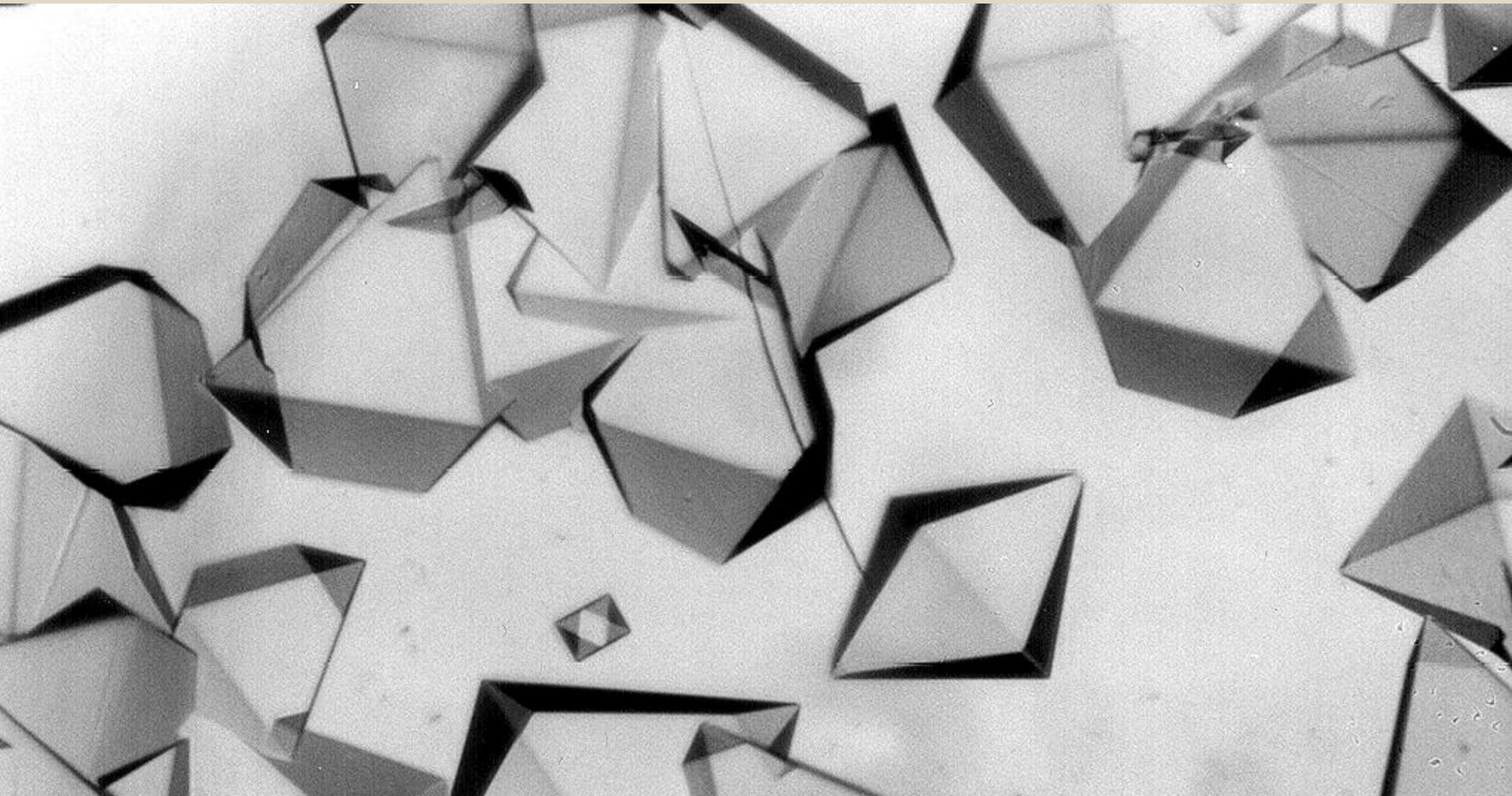
Utilizzando un cristallo il segnale viene amplificato.



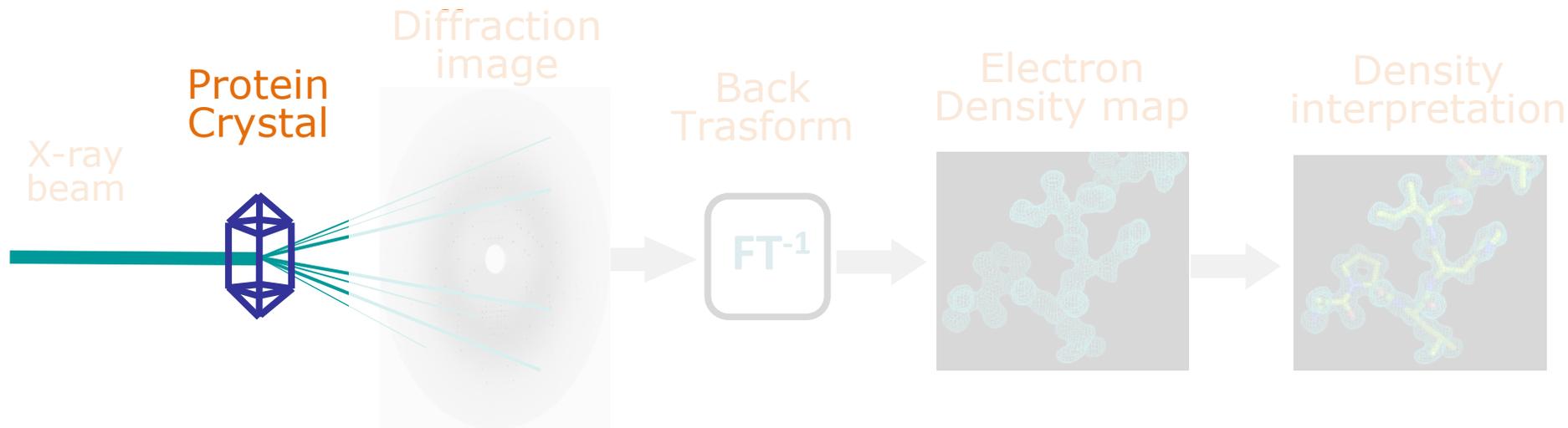
In un cristallo, miliardi di molecole sono disposte in modo ripetuto e ordinato nelle tre dimensioni dello spazio

Per cui un cristallo funziona come un **amplificatore** del segnale

# CRISTALLIZZAZIONE

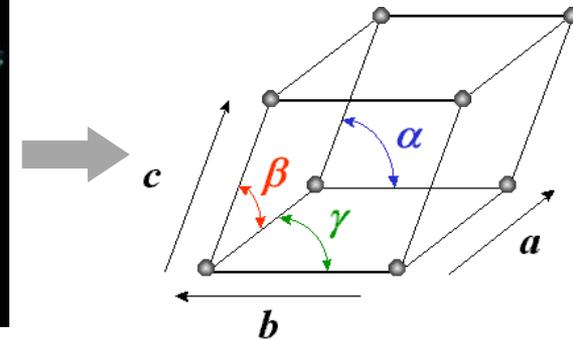
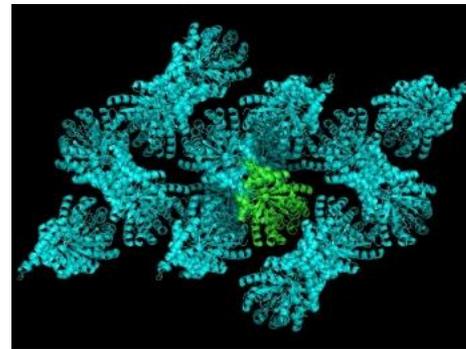


# Perché servono CRISTALLI



**CRYSTALS:** a solid material whose constituents are arranged in a **highly ordered** structure, forming a crystal lattice that extends in all directions

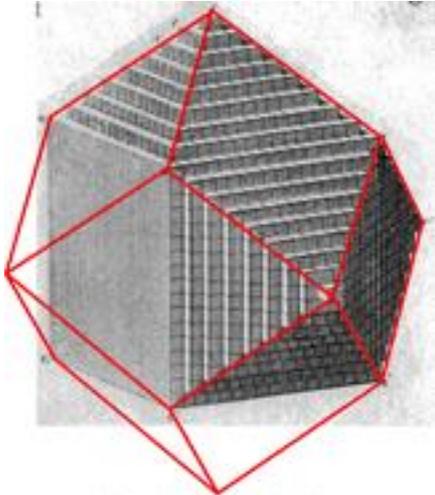
## SIGNAL AMPLIFICATION



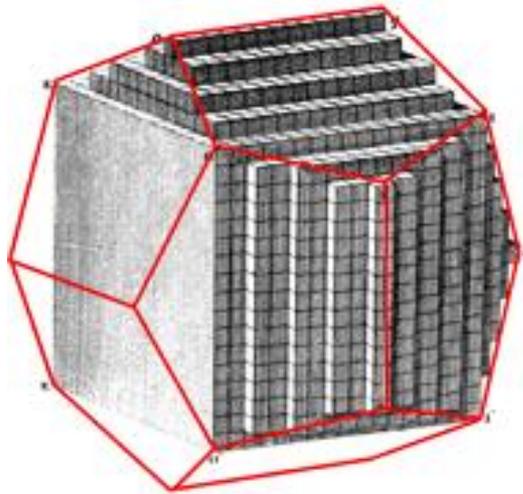
Unit Cell

Cristallo  $\Rightarrow$  amplificatore del segnale  
 $\Rightarrow$  buone immagini di diffrazione ( $\uparrow$  segnale/rumore)

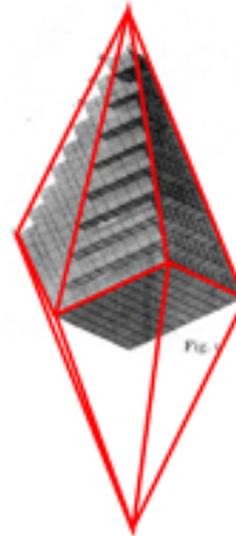
# Modello di cristallo Haüy



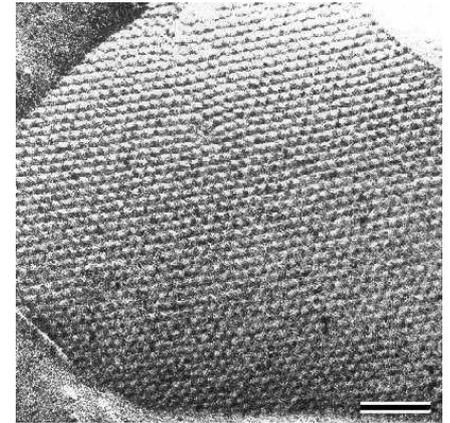
Rhomb-dodecahedron



Pentagon-dodecahedron



Scalenohedron

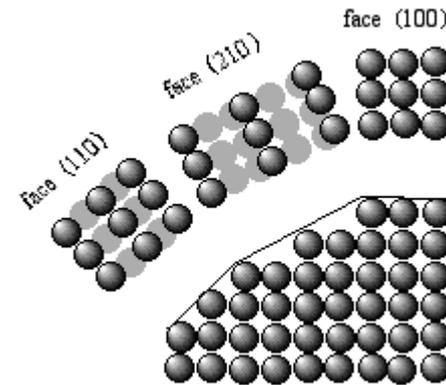


Microscopia elettronica

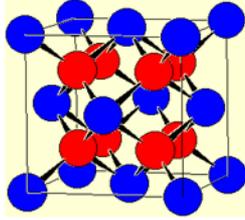
1801 *Traité de Minéralogie*

- La morfologia del cristallo deriva dalla ripetizione regolare di un parallelepipedo chiamato

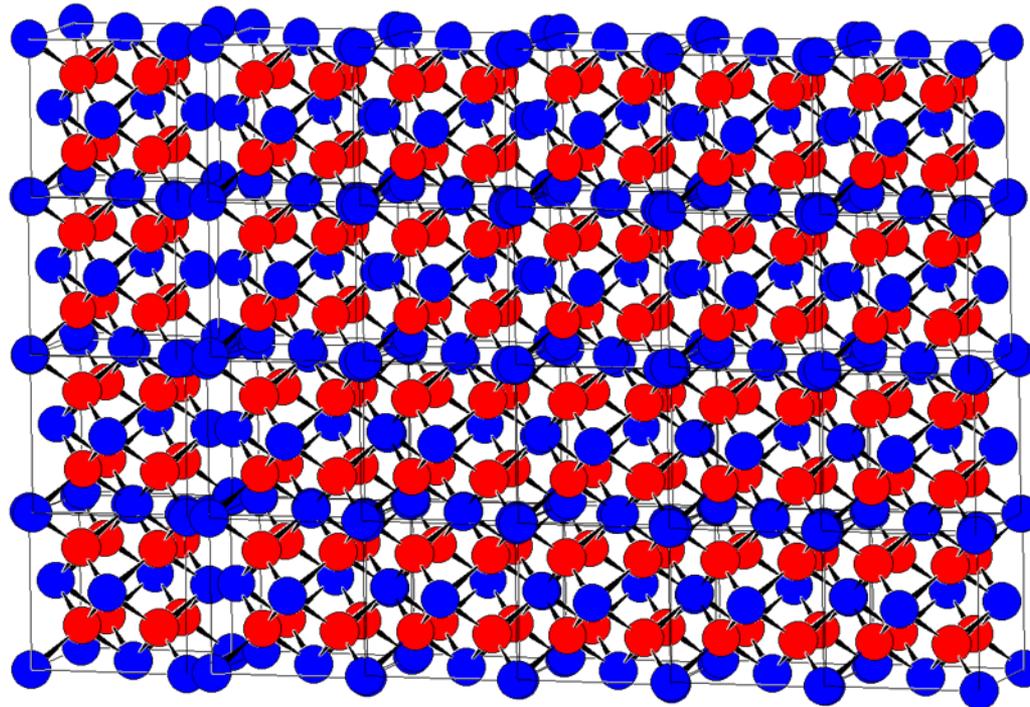
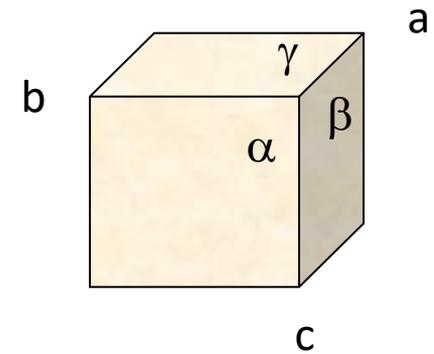
**cella elementare**



# Cristalli e Simmetria

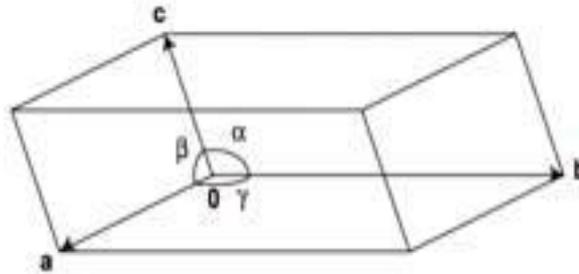
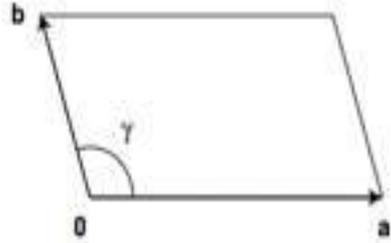


Cella elementare



**In un solido cristallino (cristallo), qualunque sia la sua natura: inorganico, organico o proteico, la materia deve soddisfare delle molto precise. La materia si dispone in modo omogeneo e periodico. In un cristallo, gli atomi, ioni o molecole, chimicamente ben definiti, si dispongono secondo simmetrie ben precise**

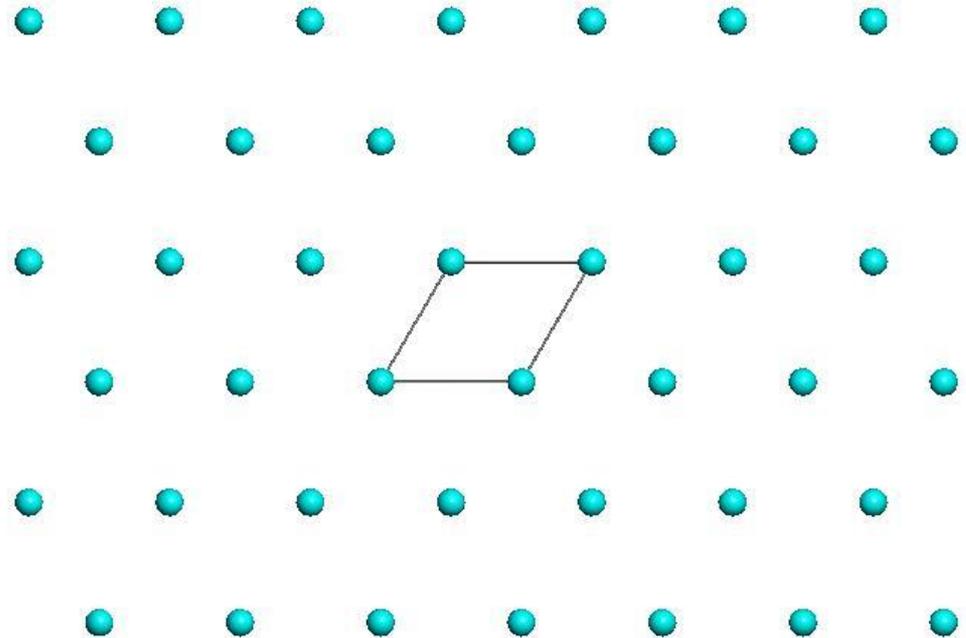
# L'unità ripetitiva **Cella elementare**



Parametri  
di cella  
 $a, b, c, \alpha, \beta, \gamma$

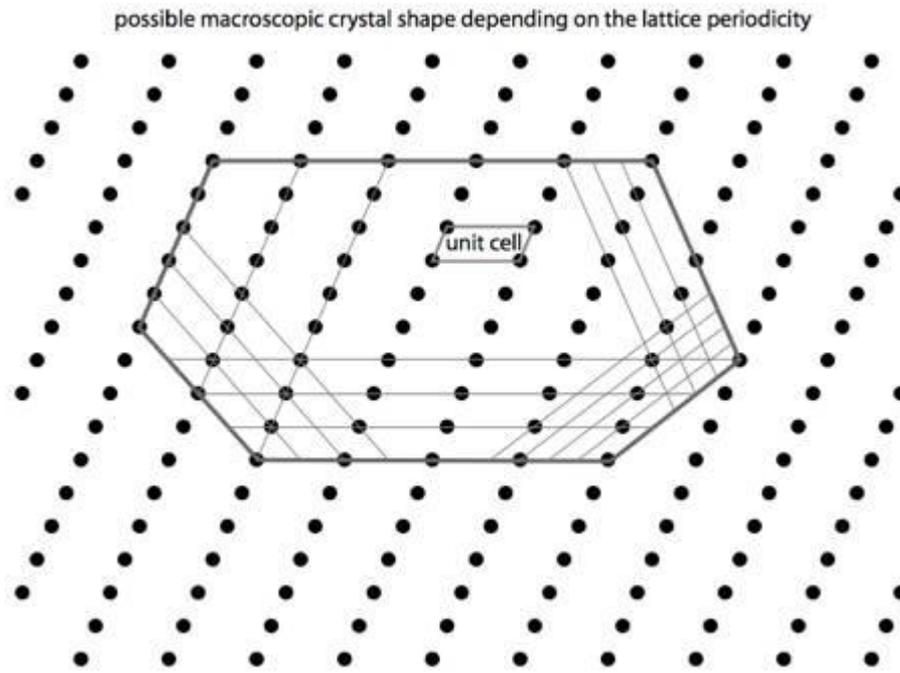
Reticolo cristallino

Nodi reticolari

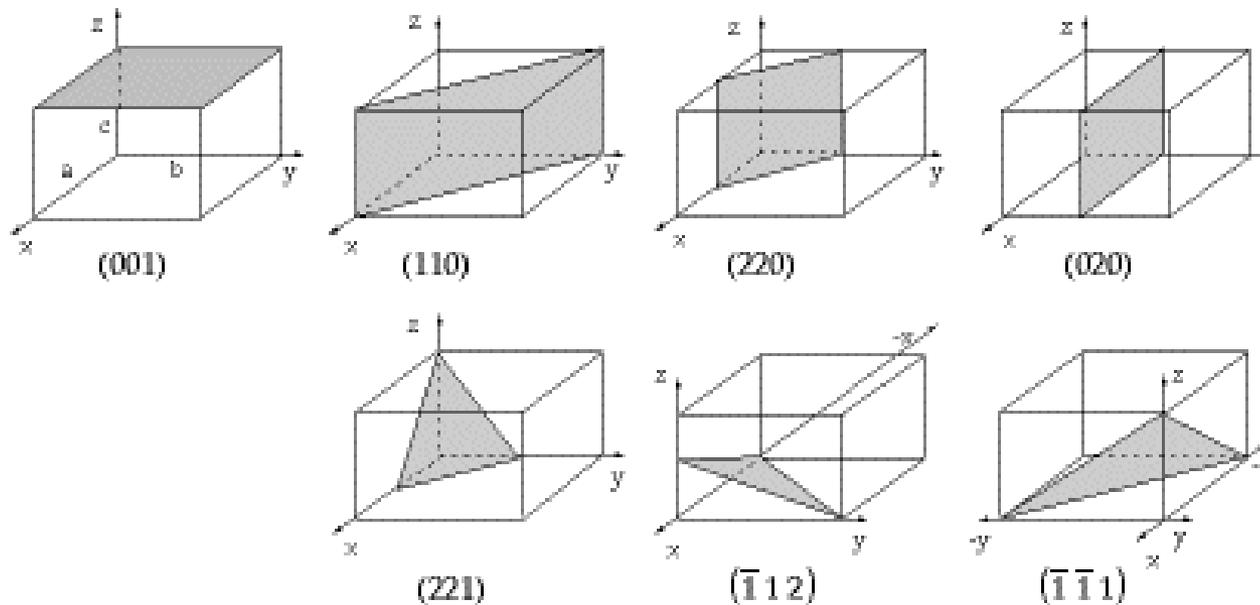


# Legge di Bravais

Le facce dei cristalli sono parallele a piani reticolari con alta densità di nodi



I piani reticolari vengono individuati da una terna di numeri interi



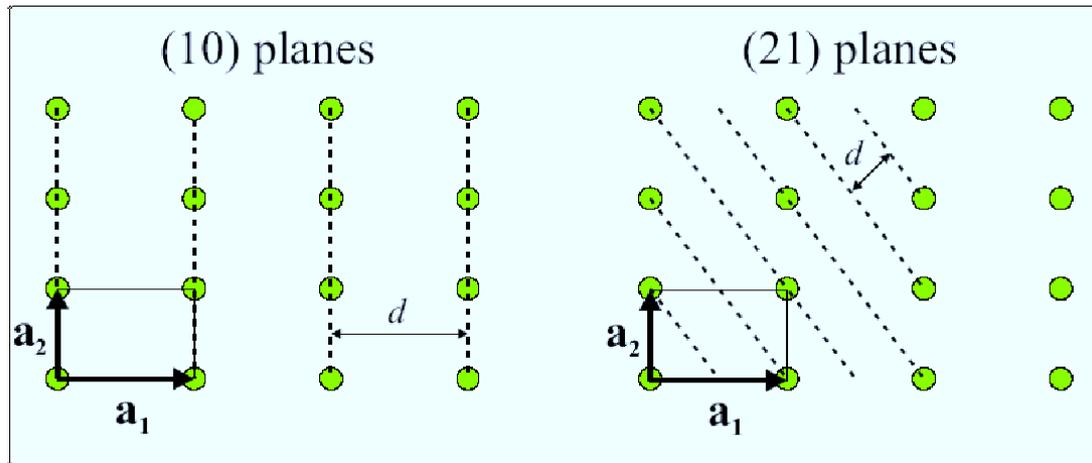
## Indici di Miller

Il piano con indici di Miller  $hkl$  intercetta gli assi nei punti:  $a/h$   $b/k$   $c/l$

## Piani reticolari

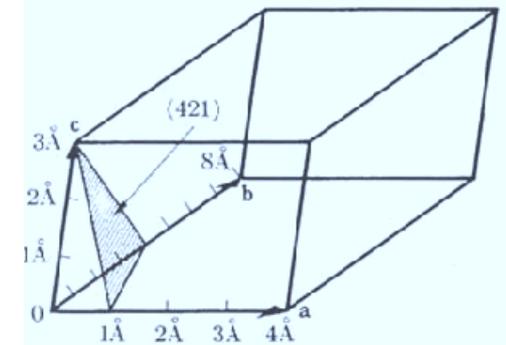
Un piano cristallografico passa almeno per tre nodi reticolari

Per ogni nodo passa un piano di una data famiglia di piani cristallografici



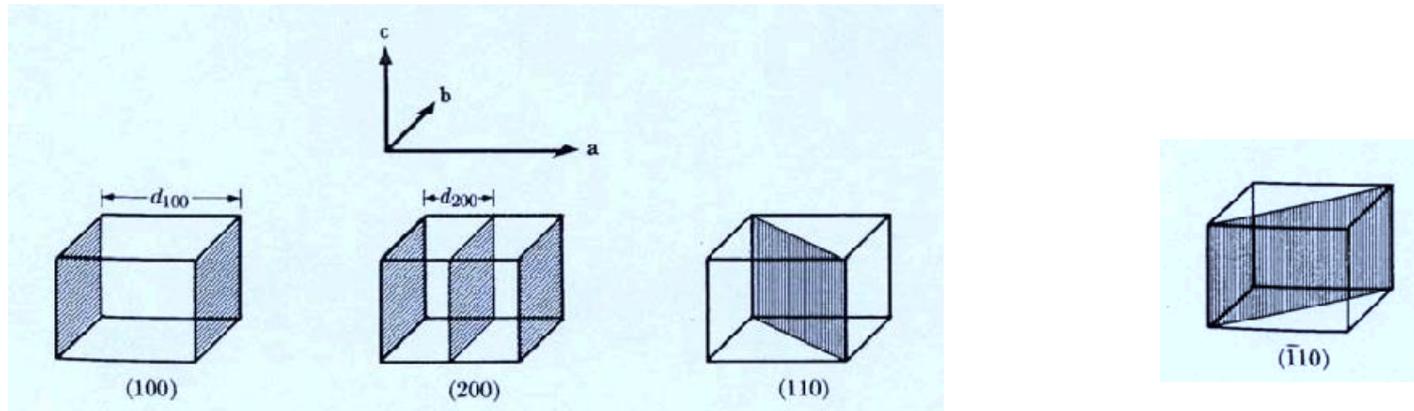
Le proprietà del reticolo implicano che in una **famiglia di piani**, i piani sono tra loro equispaziati da una grandezza costante indicata solitamente con la lettera  $d$ .

Fissata una certa origine esisterà un piano della famiglia di piani con indici di Miller  $(hkl)$  a una distanza  $d_{hkl}$  dall'origine che intersecherà gli assi della cella cristallografica nelle coordinate  $a/h$ ,  $b/k$  e  $c/l$ .



# Famiglie di piani

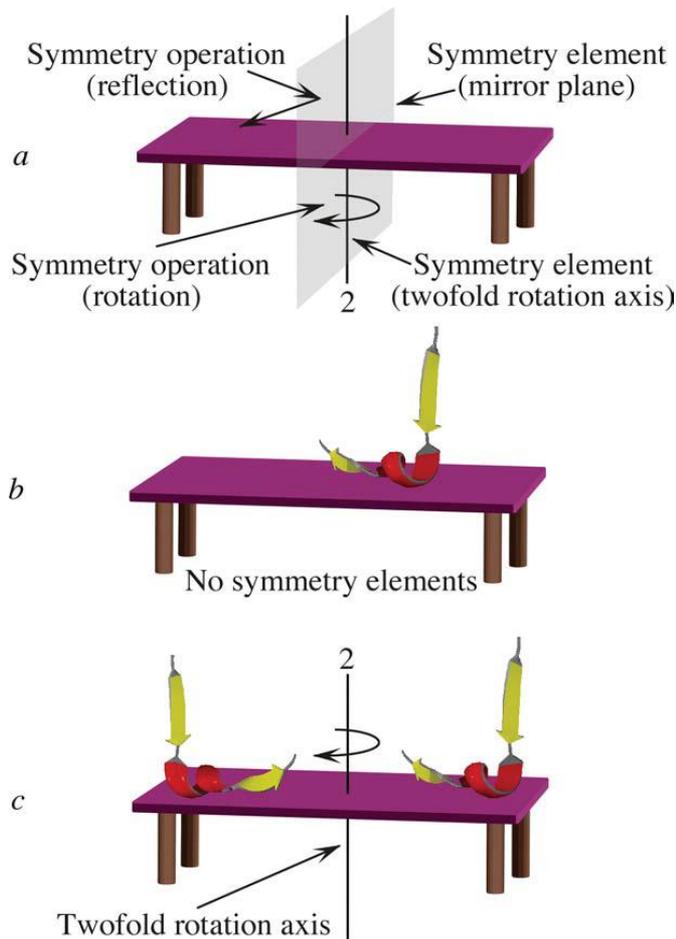
Nel caso particolare di una famiglia di piani parallela ad un asse, questo piano cristallografico avrà 0 come indice di Miller in quanto l'intercetta rispetto a questo asse è  $\infty$ .



I piani relazionati alle facce di un cristallo sono piani reticolari in senso stretto (cioè i piani che passano per i nodi reticolari) ed hanno come indici di Miller dei numeri interi più piccoli possibili tra loro

## Operazioni di simmetria

Una cella contiene più di una molecola proteica correlata con le altre molecole della cella da operazioni di simmetria. Nelle celle proteiche non ci sono «Mirror plane» perché le proteine sono oggetti chirali e asimmetrici



I principali elementi di simmetria  
Sono:

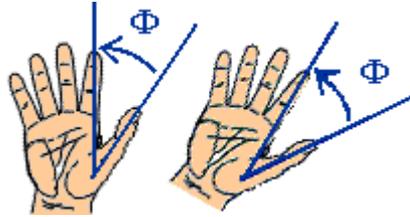
a) La traslazione: lo spostamento  
Di  $a/n$ ,  $b/n$  o  $c/n$  con  $n$  intero

b) La rotazione indicata con  $n$  con  $n$  intero  
2 indica l'asse binario  
3 indica l'asse ternario  
4 indica l'asse quaternario  
6 indica l'asse senario

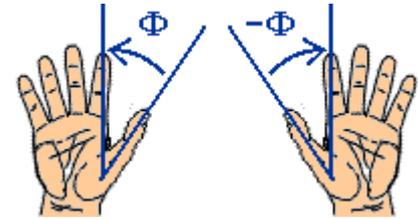
c) Rototraslazione indicata con  $n/m$  che  
indica una rotazione ennesima seguita da  
una traslazione pari a  $n/m$

# Congruenza

Diretta



Inversa



- Traslazione
- Rotazione
- Roto-traslazione

- Inversione
- Roto-inversione
- Roto-inversione-traslazione

**compatibili**

con tutte le molecole anche molecole chirali enantiopure

**incompatibili**

con molecole chirali enantiopure

**compatibili**

con miscele racemiche e molecole achirali

# Assi di rotazione compatibili con il reticolo cristallino

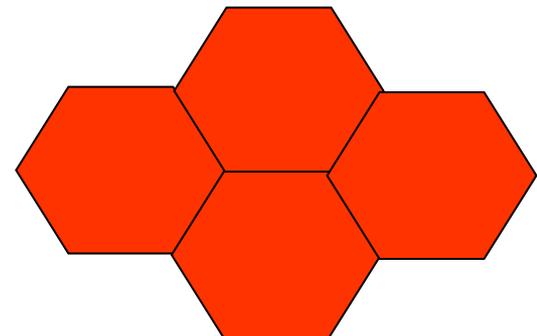
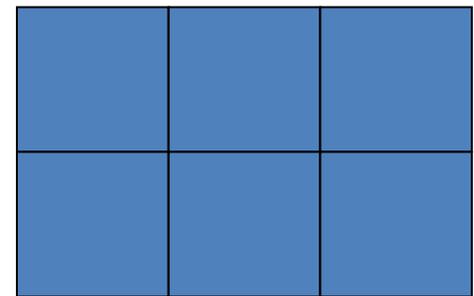
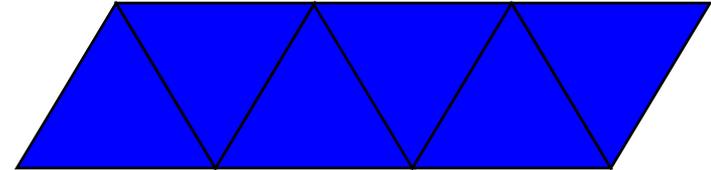
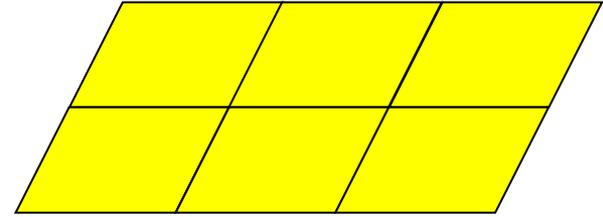
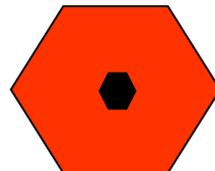
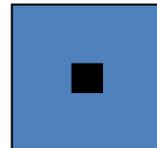
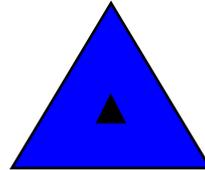
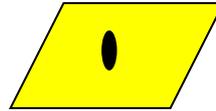
Asse di ordine 1 rotazione di  $360^\circ$  (identità)

Asse di ordine 2 ( $180^\circ$ )

Asse di ordine 3 ( $120^\circ$ )

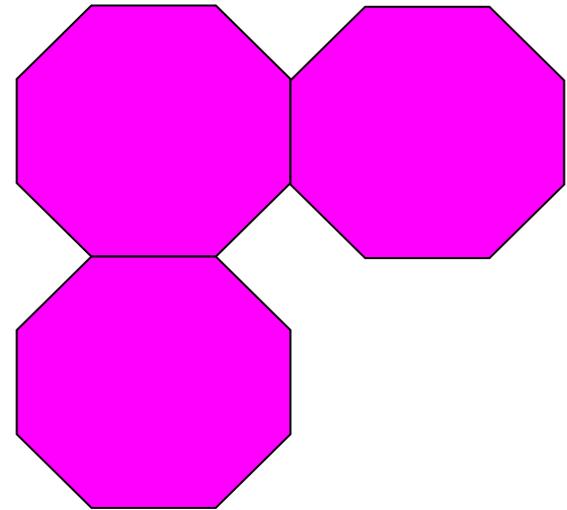
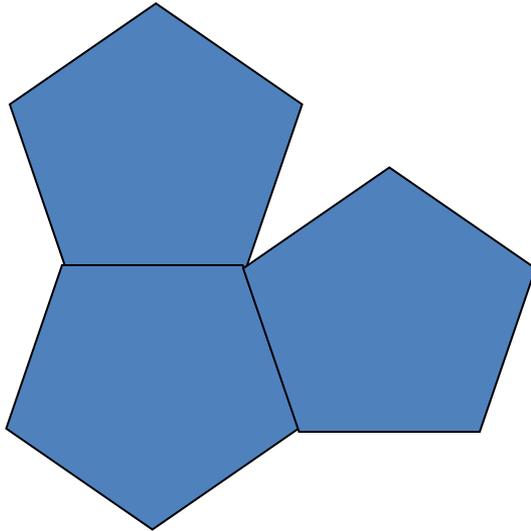
Asse di ordine 4 ( $90^\circ$ )

Asse di ordine 6 ( $60^\circ$ )



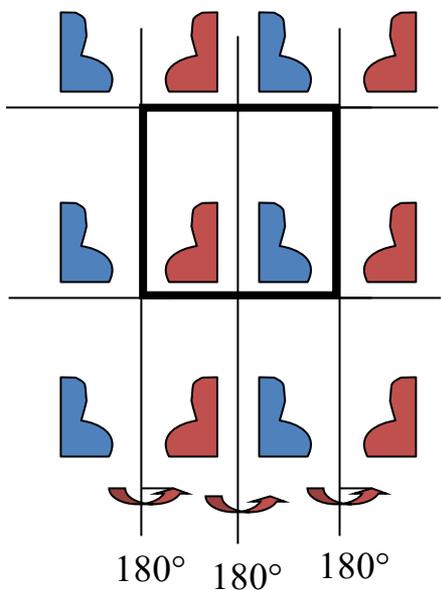
# Assi di rotazione non compatibili con il reticolo cristallino

Assi di ordine 5 di ordine 7 e superiori

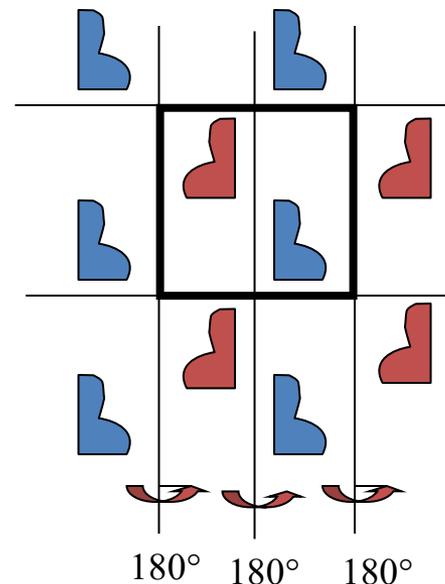


# Assi di roto-traslazione compatibili con il reticolo cristallino

Asse 2



Asse screw  $2_1$



Asse 3



Assi screw  $3_1$   $3_2$



Asse 4



Assi screw  $4_1$   $4_2$   $4_3$



Asse 6



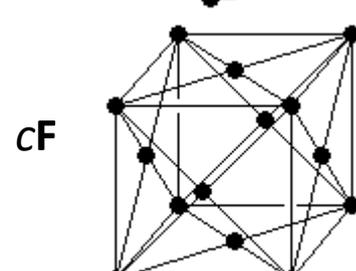
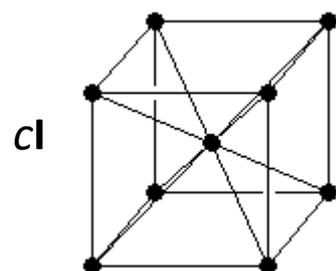
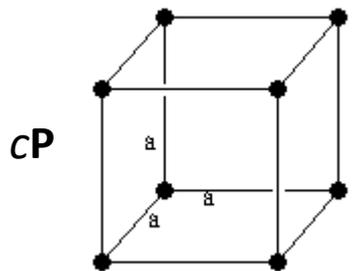
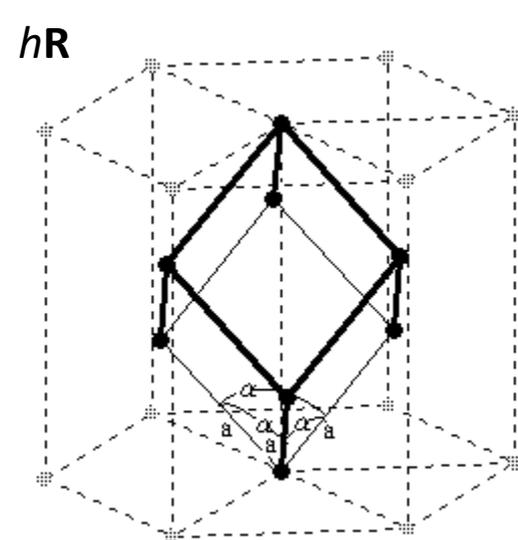
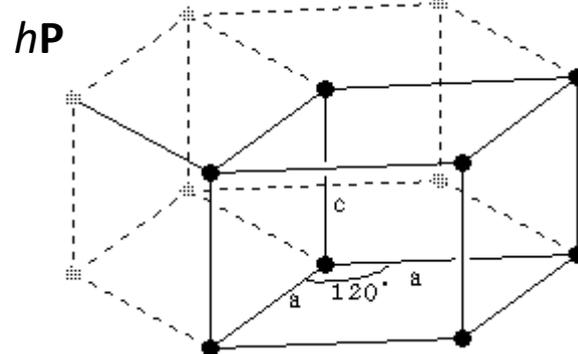
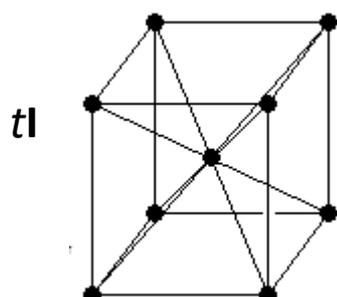
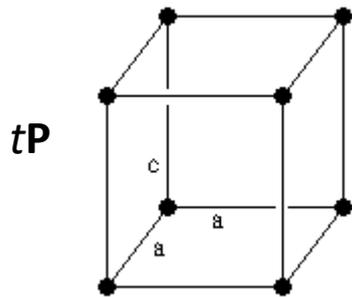
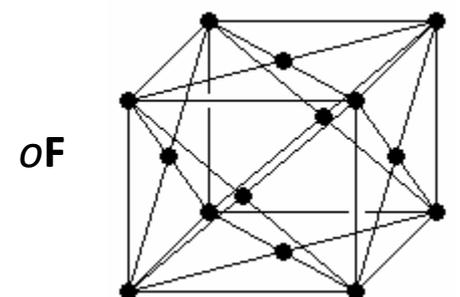
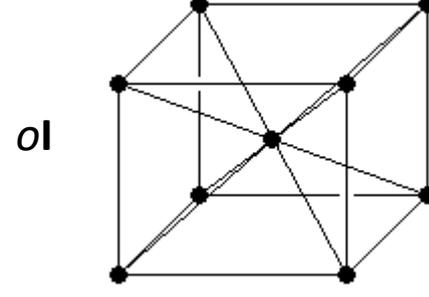
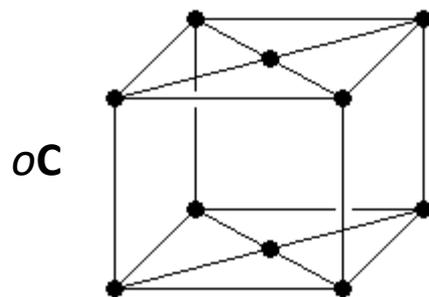
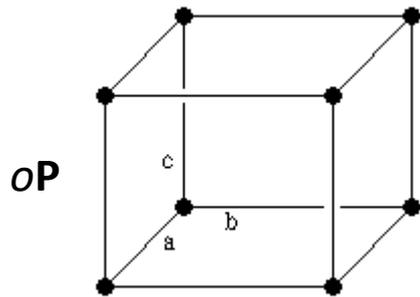
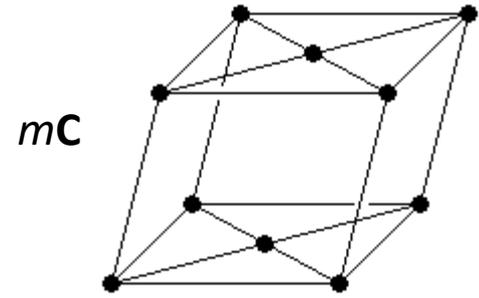
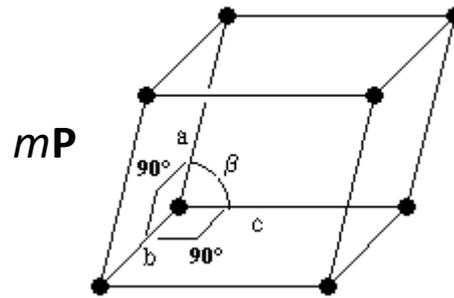
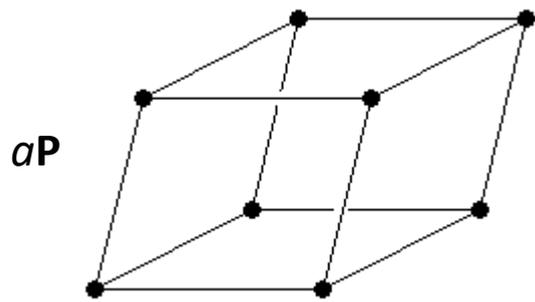
Assi screw  $6_1$   $6_2$   $6_3$   $6_4$   $6_5$



# 7 sistemi cristallini

Simmetria minima	SISTEMA	vincoli sulla cella
nessuna	Triclino	nessuno
asse di ordine 2	Monoclino	$\alpha=\gamma=90^\circ$
3 assi di ordine 2 perpendicolari	Ortorombico	$\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$
asse di ordine 4	Tetragonale	$a=b \alpha=\beta=\gamma=90^\circ$
asse di ordine 3	Esagonale Trigonale	$a=b \gamma=120^\circ \alpha=\beta=90^\circ$
asse di ordine 6	Esagonale	$a=b \gamma=120^\circ \alpha=\beta=90^\circ$
4 assi di ordine 3 lungo le diagonali	Cubico	$a=b=c \alpha=\beta=\gamma=90^\circ$

# 14 reticoli di Bravais



# 32 classi cristalline (gruppi puntuali cristallografici)

Vengono generate da tutte le possibili combinazioni dei semplici elementi di simmetria puntuale (senza traslazione) compatibili con il reticolo

## 11 Classi di simmetria Laue (gruppi puntuali centrosimmetrici)

Triclino	1, <b>1</b>	—
Monoclino	2, m, <b>2/m</b>	
Ortorombico	222, mm2, <b>mmm</b>	
Tetragonale	4, 4, <b>4/m</b> , 422, 4mm, 42m, <b>4/mmm</b>	
Trigonale	3, <b>3</b> , 32, 3m, <b>3m</b>	—
Esagonale	6, 6, <b>6/m</b> , 622, 6mm, 62m, <b>6/mmm</b>	
Cubico	23, <b>m3</b> , 432, 43m, <b>m3m</b>	—

# 230 gruppi spaziali

Generati dalla combinazione di tutti gli elementi di simmetria compatibili con il reticolo, comprese le operazioni con traslazione (screw e glide) con i 14 reticoli di Bravais

**65 gruppi spaziali compatibili con le molecole biologiche enantiomorfe in quanto non contengono elementi di rotoinversione**

# Tavole internazionali per la cristallografia

CONTINUED

No. 14

$P2_1/c$

Simbolo gruppo spaziale

Herman-Mauguin  
(corto & lungo)

Generators selected (1);  $t(1,0,0)$ ;  $t(0,1,0)$ ;  $t(0,0,1)$ ; (2); (3)

**Positions**

Multiplicity,  
Wyckoff letter,  
Site symmetry

Coordinates

Coordinate frazionarie

Reflection conditions

4  $e$  1 (1)  $x, y, z$  (2)  $\bar{x}, y+\frac{1}{2}, \bar{z}+\frac{1}{2}$  (3)  $\bar{x}, \bar{y}, \bar{z}$  (4)  $x, \bar{y}+\frac{1}{2}, z+\frac{1}{2}$

Posizioni generali equivalenti

2  $d$   $\bar{1}$   $\frac{1}{2}, 0, \frac{1}{2}$   $\frac{1}{2}, \frac{1}{2}, 0$

2  $c$   $\bar{1}$   $0, 0, \frac{1}{2}$   $0, \frac{1}{2}, 0$

2  $b$   $\bar{1}$   $\frac{1}{2}, 0, 0$   $\frac{1}{2}, \frac{1}{2}, \frac{1}{2}$

2  $a$   $\bar{1}$   $0, 0, 0$   $0, \frac{1}{2}, \frac{1}{2}$

Siti Wyckoff

General:

$h0l: l = 2n$

$0k0: k = 2n$

$00l: l = 2n$

Special: as above, plus

$hkl: k+l = 2n$

$hkl: k+l = 2n$

$hkl: k+l = 2n$

$hkl: k+l = 2n$

**Symmetry of special projections**

Along [001]  $p2gm$

$a' = a_p$   $b' = b$

Origin at  $0, 0, z$

Along [100]  $p2gg$

$a' = b$   $b' = c_p$

Origin at  $x, 0, 0$

Along [010]  $p2$

$a' = \frac{1}{2}c$   $b' = a$

Origin at  $0, y, 0$

**Maximal non-isomorphic subgroups**

I  $[2]P12_11(P2_1)$  1; 2

$[2]P\bar{1}$  1; 3

$[2]P1c1(Pc)$  1; 4

IIa none

IIb none

Subgruppi e supergruppi

**Maximal isomorphic subgroups of lowest index**

IIc  $[3]P12_1/c1(b' = 3b)(P2_1/c)$ ;  $[2]P12_1/c1(a' = 2a \text{ or } a' = 2a, c' = 2a+c)(P2_1/c)$

**Minimal non-isomorphic supergroups**

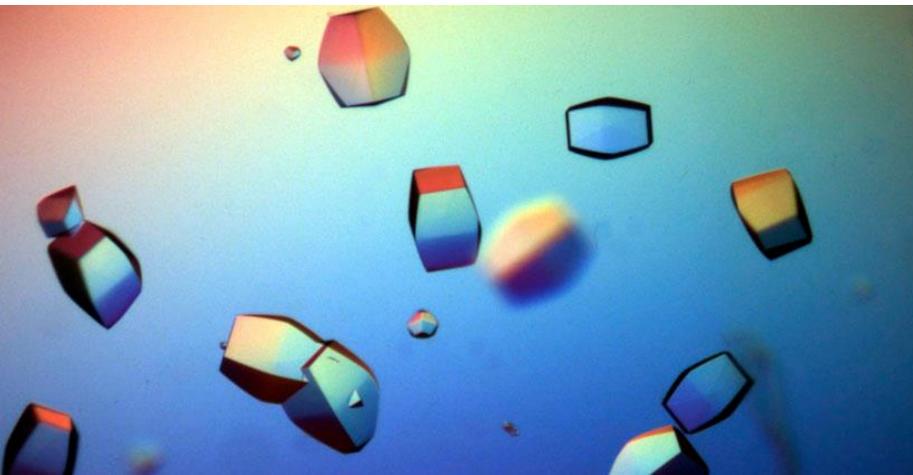
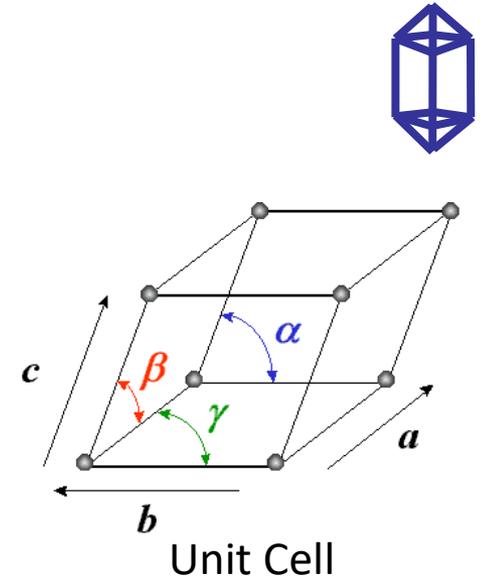
I  $[2]Pnna$ ;  $[2]Pmna$ ;  $[2]Pcca$ ;  $[2]Pbam$ ;  $[2]Pccn$ ;  $[2]Pbcm$ ;  $[2]Pnmm$ ;  $[2]Pbcn$ ;  $[2]Pbca$ ;  $[2]Pnma$ ;  
 $[2]Cmca$

II  $[2]C12/c1(C2/c)$ ;  $[2]A12/m1(C2/m)$ ;  $[2]I12/c1(C2/c)$ ;  $[2]P12_1/m1(2c' = c)(P2_1/m)$ ;  
 $[2]P12/c1(2b' = b)(P2/c)$

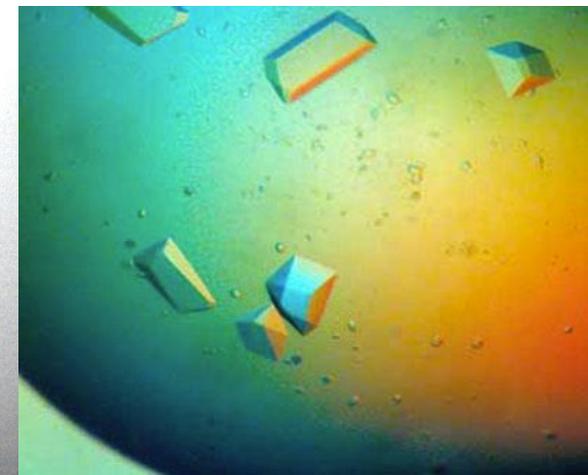


## CARATTERISTICHE DEI CRISTALLI DI PROTEINE

- **Dimensioni ridotte** ( $40\mu\text{m}$ - $500\mu\text{m}$ )
- Meccanicamente **fragili**
- Sensibili alla temperatura
- Sensibili al **danno radiologico**
- **Alto contenuto di solvente** (40%-60%)
- Si fratturano se disidratati
- Deboli proprietà ottiche (basso potere diffrangente)



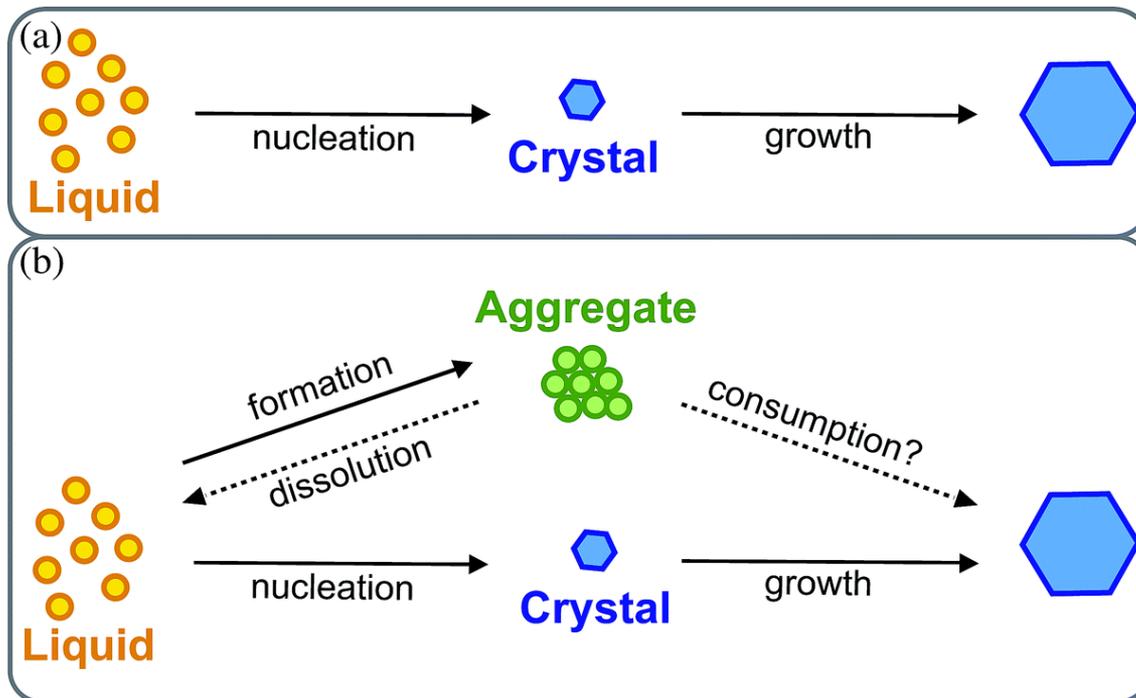
100  $\mu\text{m}$





## COME SI FORMANO I CRISTALLI

La cristallizzazione è un **passaggio di fase**



La **nucleazione** che prevede **un'aggregazione lenta e ORDINATA** delle macromolecole in un reticolo cristallino con contemporanea esclusione del solvente

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

La cristallizzazione è **un processo spontaneo**, con un **fattore entropico sfavorevole** e **interazioni molecolari altamente favorite**



## PARAMETRI CHE INFLUENZANO LA CRISTALLIZZAZIONE

- **TERMODINAMICA**
- Caratteristiche della macromolecola:
  - **Purezza** (>98%)
  - **Omogeneità** e monodispersione
  - **Folding (forma)**
  - **Distribuzione di carica**
- Parametri chimico-fisici
  - **Stabilità**
  - **pH**
- Parametri biochimici e biofisici
  - **Tag di espressione**
  - **Parti flessibili**
- Parametri biologici
  - **cofattori e/o ligandi**
  - **modificazioni post-traduzionali**

La **nucleazione** che prevede **un'aggregazione LENTA e ORDINATA** delle macromolecole in un reticolo cristallino con contemporanea esclusione del solvente

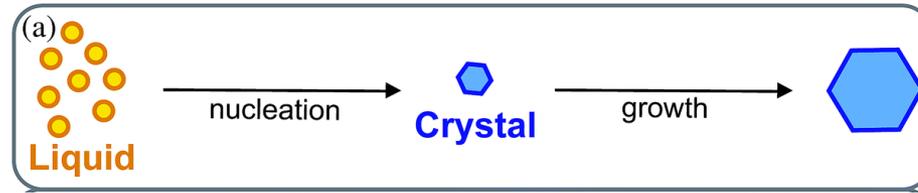
$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

La cristallizzazione è **un processo spontaneo**, con un **fattore entropico sfavorevole** e **interazioni molecolari altamente favorite**

# CRISTALLI DI PROTEINE

TERMODINAMICA

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$



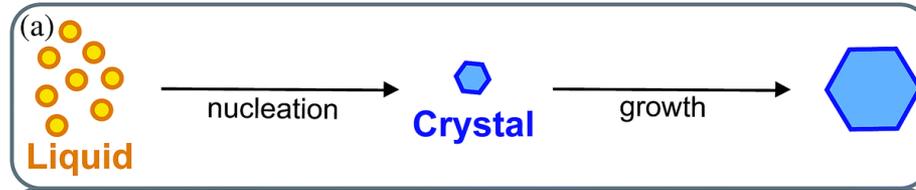
PER INDURRE LA TRANSIZIONE DI FASE  
SI USANO **AGENTI PRECIPITANTI**

- **Sali**: disidratazione per competizione con H<sub>2</sub>O
  - Es.: (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; (Li)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; NaCl; etc..
- **Polimeri organici**: segregazione entropica (esclusione di volume)
  - Es.: Poli Etilen Glicol (PEG) con MW range 400 ÷ 20000
- **Solventi organici**: riduzione delle proprietà elettriche
  - Es.: poli-alcooli; Etilenglicole; etc..

# CRISTALLI DI PROTEINE

## TERMODINAMICA

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$



## METODI DI CRISTALLIZZAZIONE

Si miscelano la:

**soluzione proteica + precipitante**

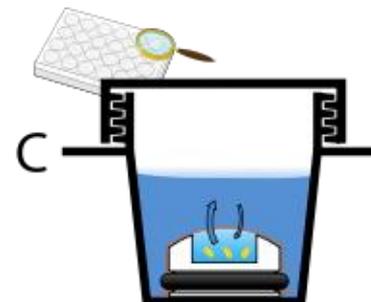
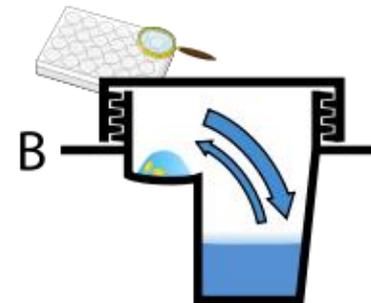
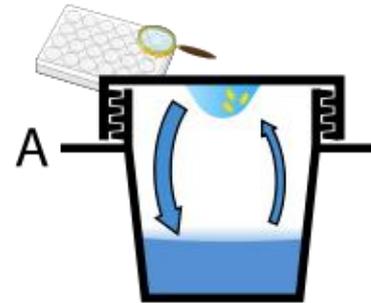
Gocce da 1-2 $\mu$ L circa

### Diffusione in fase di vapore

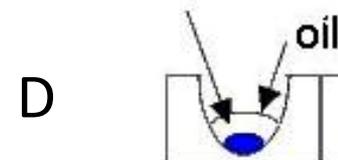
- Goccia capovolta (**hanging** drop - A)
- Goccia seduta (**sitting** drop - B)

### Altri metodi di scambio

- Micro **dialisi** (C)
- Batch (D)



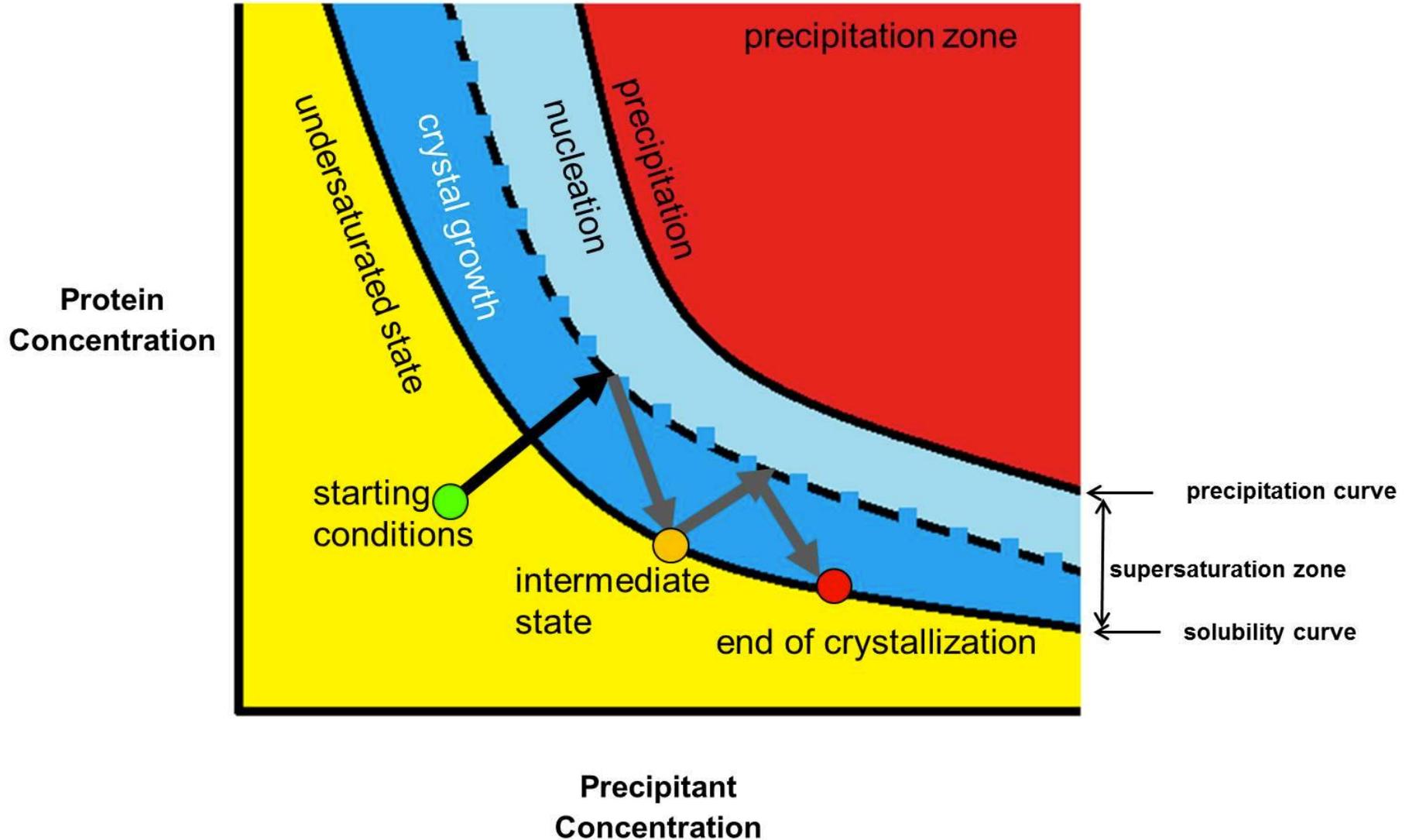
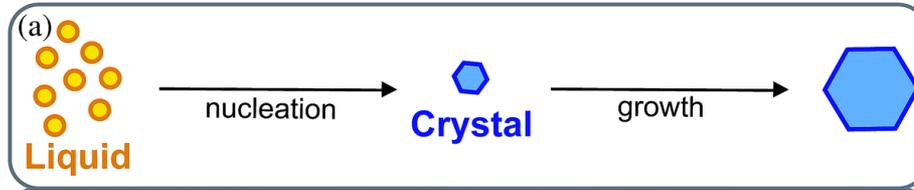
protein 1 $\mu$ L  
precipitant 1 $\mu$ L



# CRISTALLI DI PROTEINE

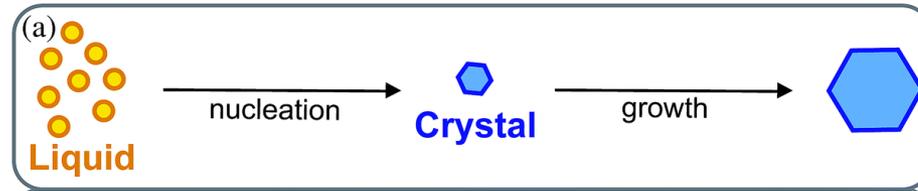
TERMODINAMICA

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$



TERMODINAMICA

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$



LA CRISTALLIZZAZIONE È UN PROCESSO  
**EMPIRICO (TRIAL & ERROR)**

Per testare **MOLTE CONDIZIONI DIVERSE**  
utilizzo gli **SCREEN** di CRISTALLIZZAZIONE

96 diverse soluzioni composte da:

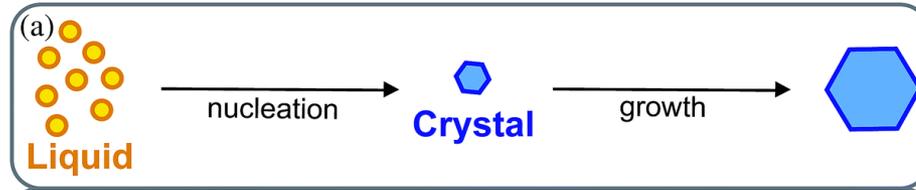
1. **Agente precipitante**
2. **Buffer (pH costante)**
3. **+/- Sale**



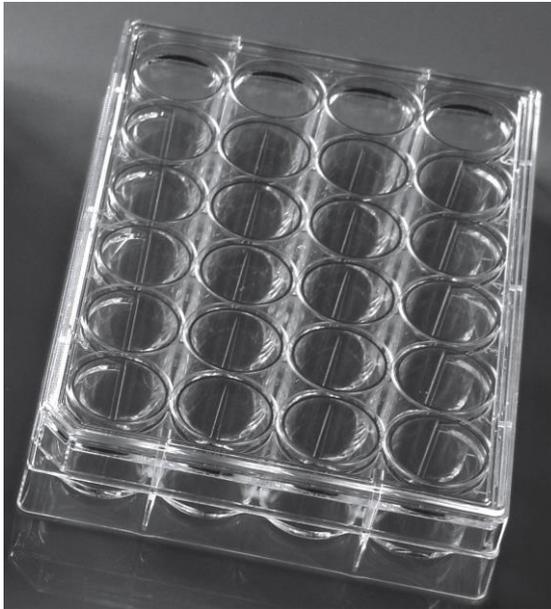
# CRISTALLI DI PROTEINE

TERMODINAMICA

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

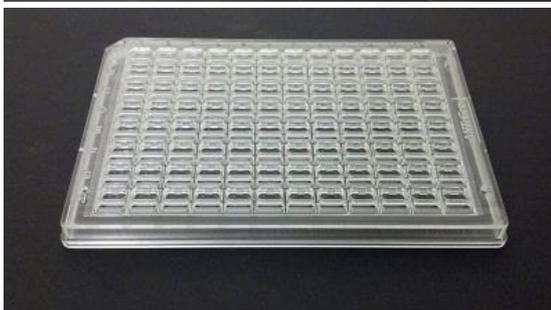


## METODI DI CRISTALLIZZAZIONE



### A MANO

24 condizioni/piastra  
Gocce 2-5  $\mu\text{L}$



### ROBOT

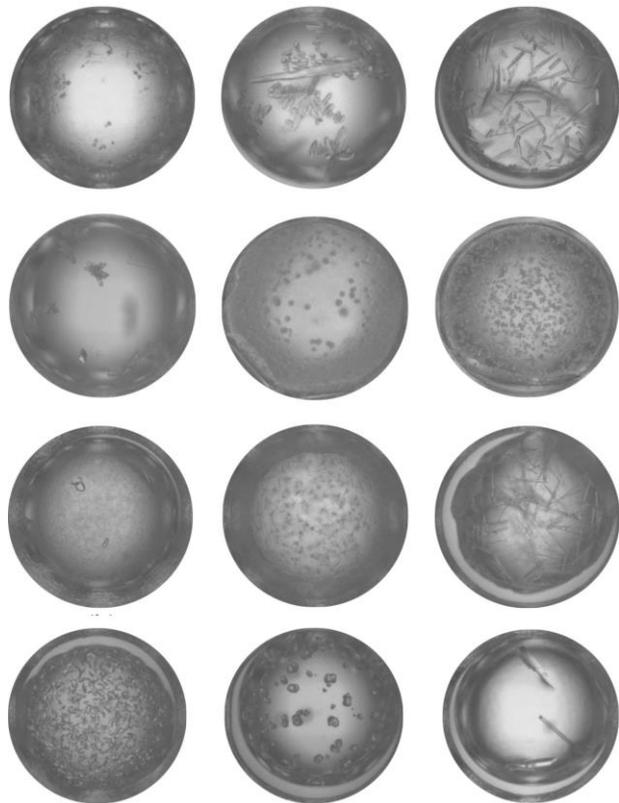
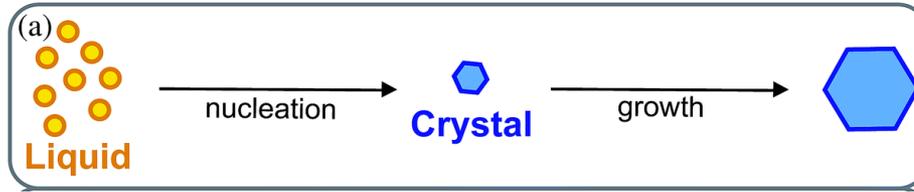
96 condizioni/piastra  
Gocce 0.2-0.8  $\mu\text{L}$



# CRISTALLI DI PROTEINE

## TERMODINAMICA

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

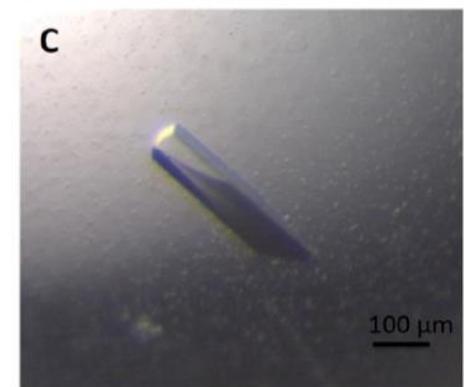
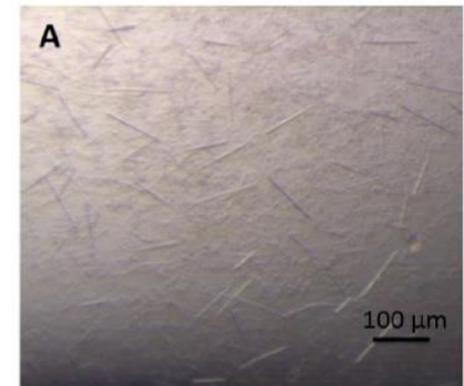


**Condizioni** di  
cristallizzazione  
**iniziali**  
dallo screen

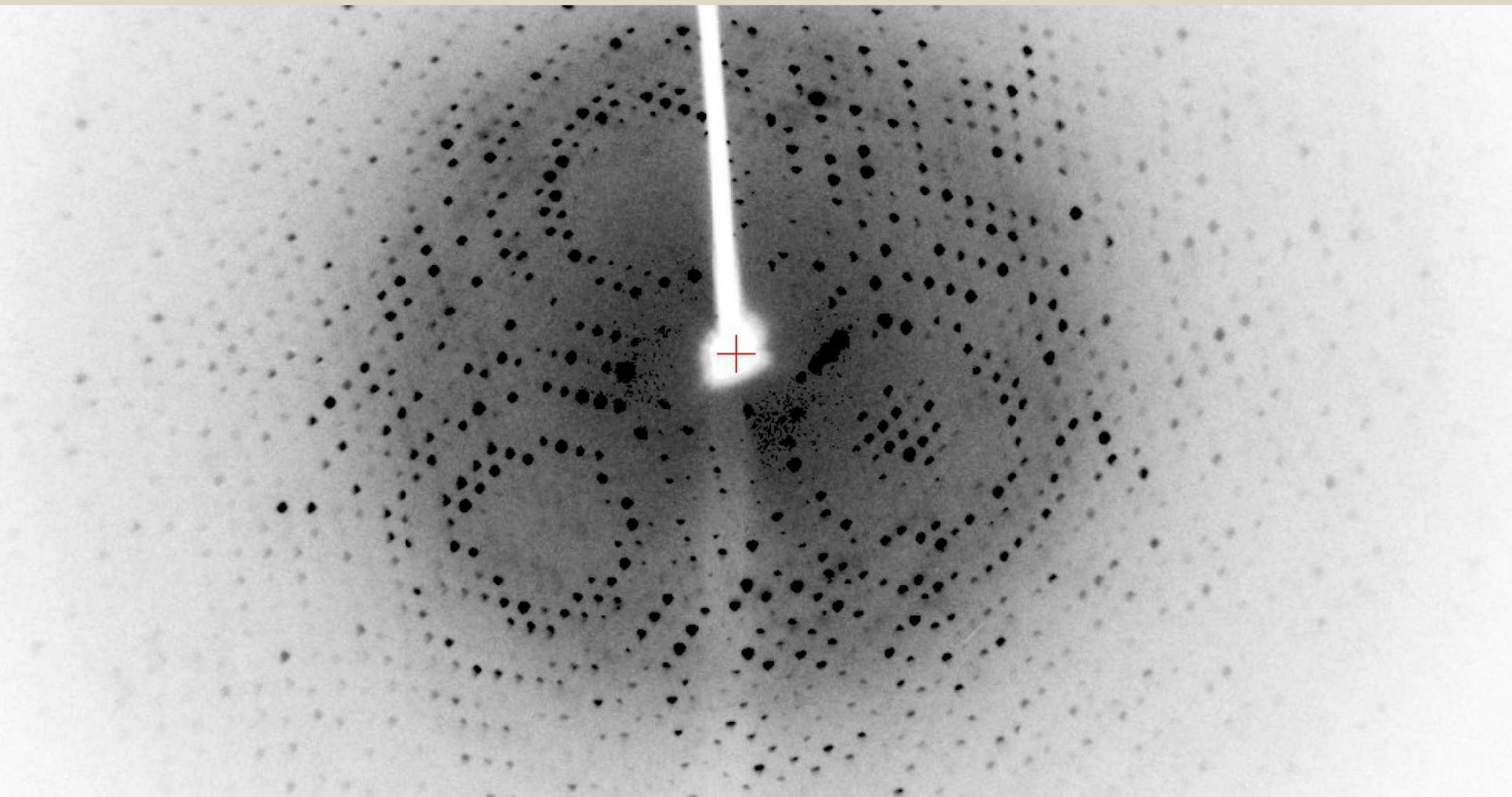


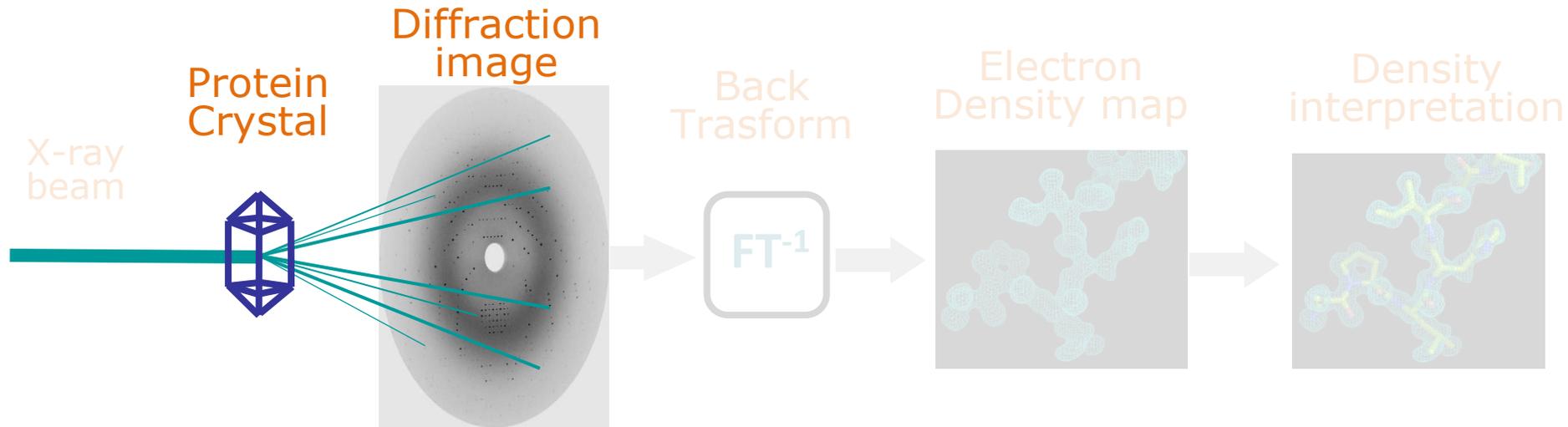
**Condizioni** di  
cristallizzazione  
**OTTIMIZZATE**  
A mano  
variando:

[precipitante]  
[proteina]  
[sali, additivi]  
pH; T



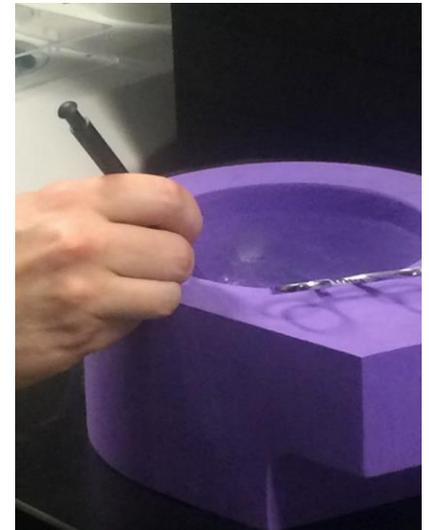
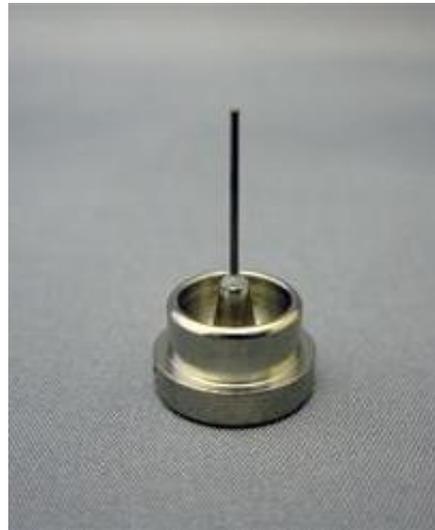
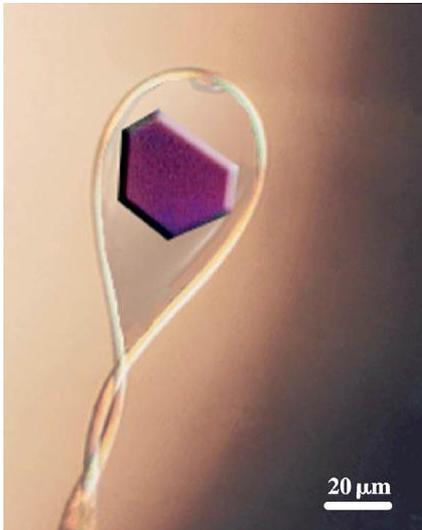
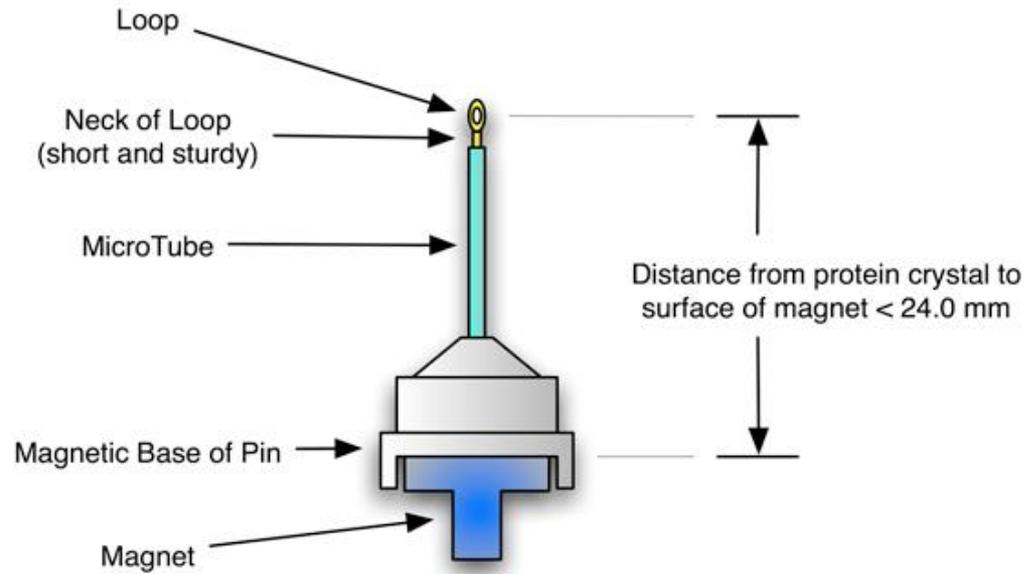
# RACCOLTA DATI DI DIFFRAZIONE





Per minimizzare il **danno radiologico** il cristallo viene **congelato in N<sub>2</sub> liquido (100K) - vitrificazione**

# RACCOLTA DATI

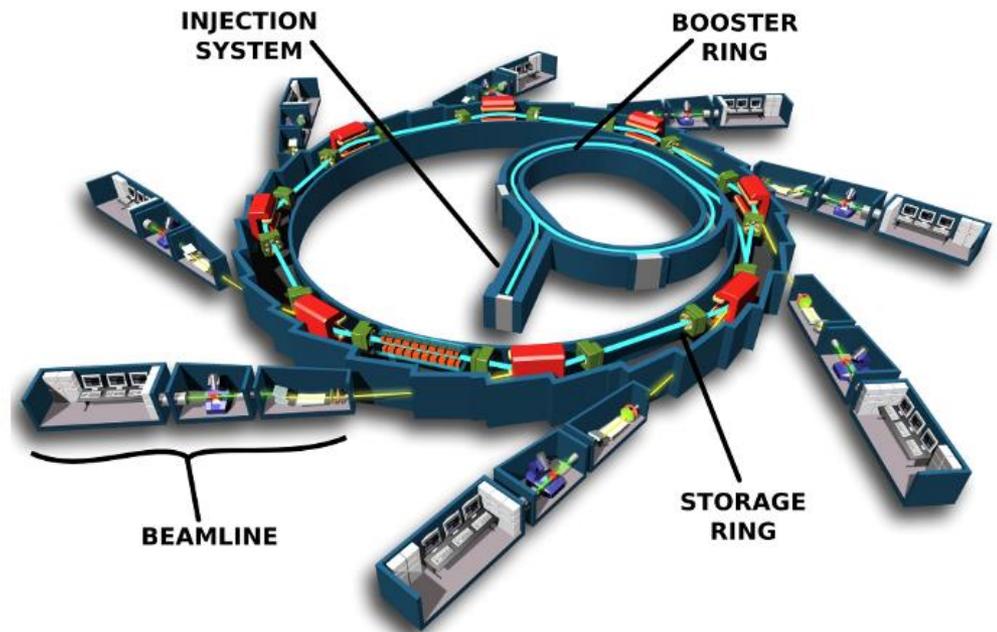


# RACCOLTA DATI



Anodo rotante

SINCROTRONE



## Lunghezza d'onda fissa

$$\lambda(\text{Cu}_{k\alpha}) = 1.5486\text{\AA}$$

- bassa del intensità raggio diretto
- tempi di esposizione lunghi
- basso danno radiologico

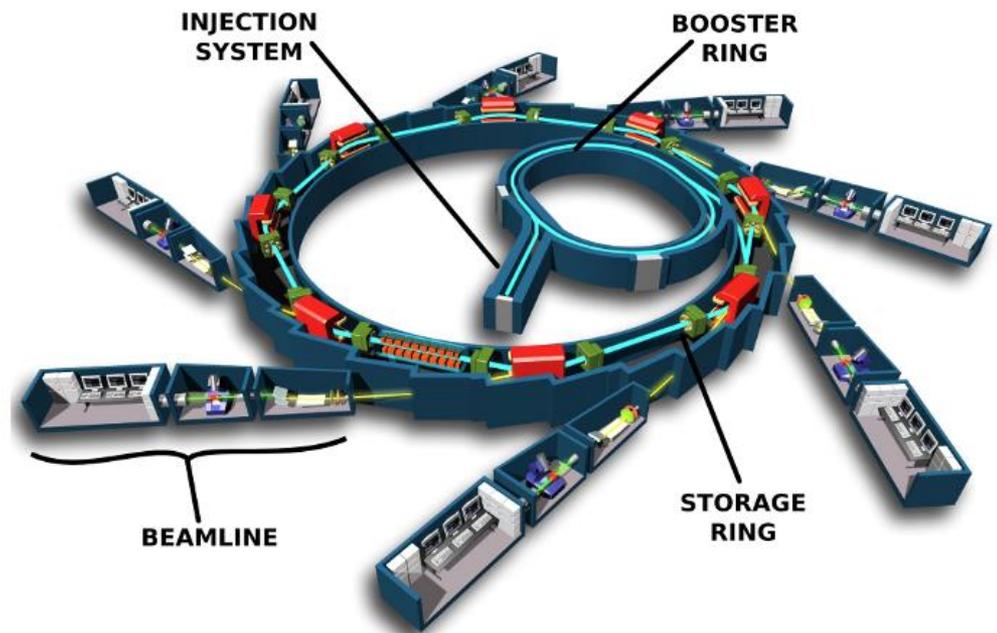
Anodo rotante



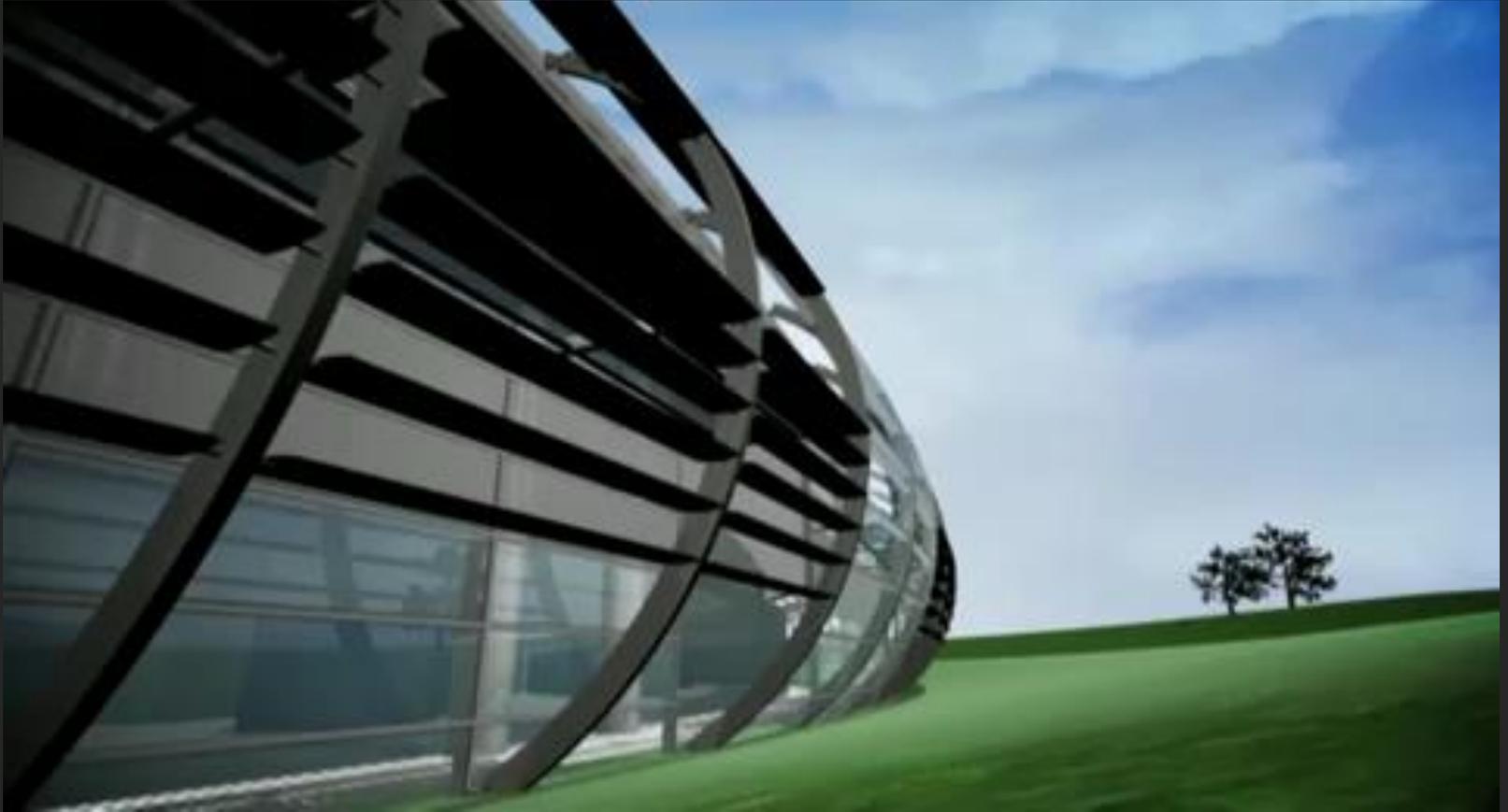
## Lunghezza d'onda fissa e/o variabile

- intensità 100-1000 maggiore
- tempi di esposizione brevi
- alto danno radiologico
- $\lambda$  modulabile

SINCROTRONE

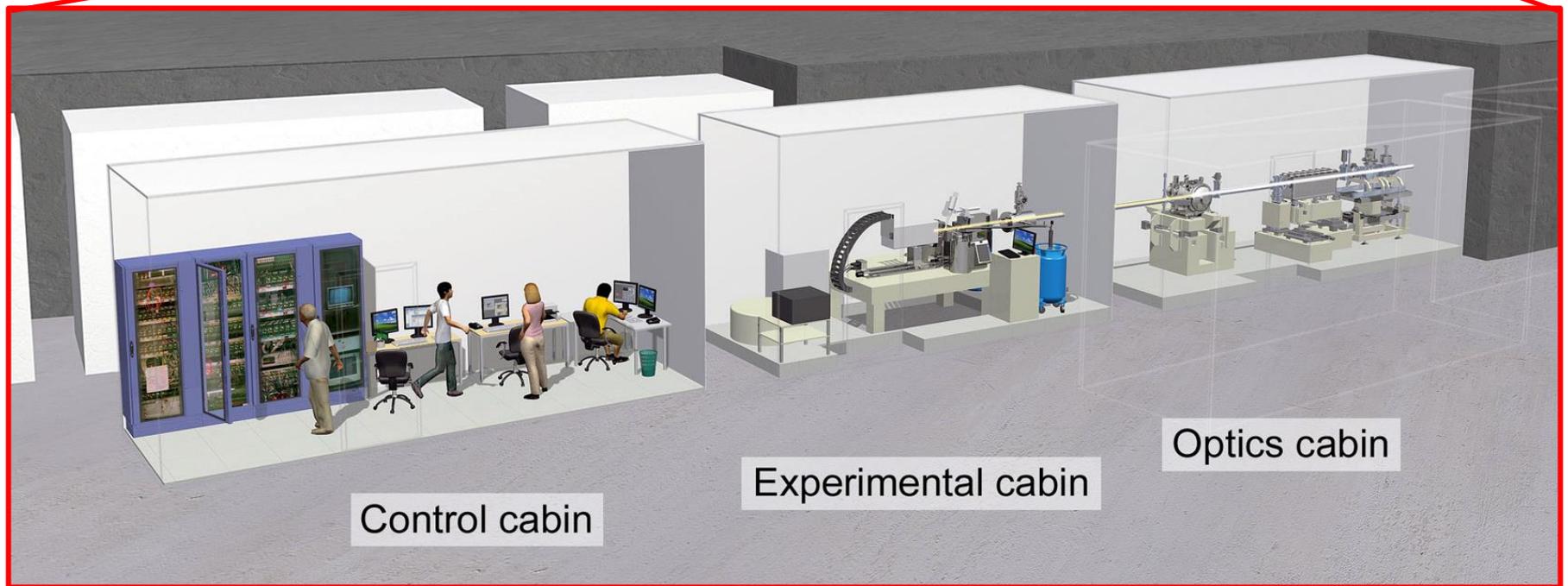
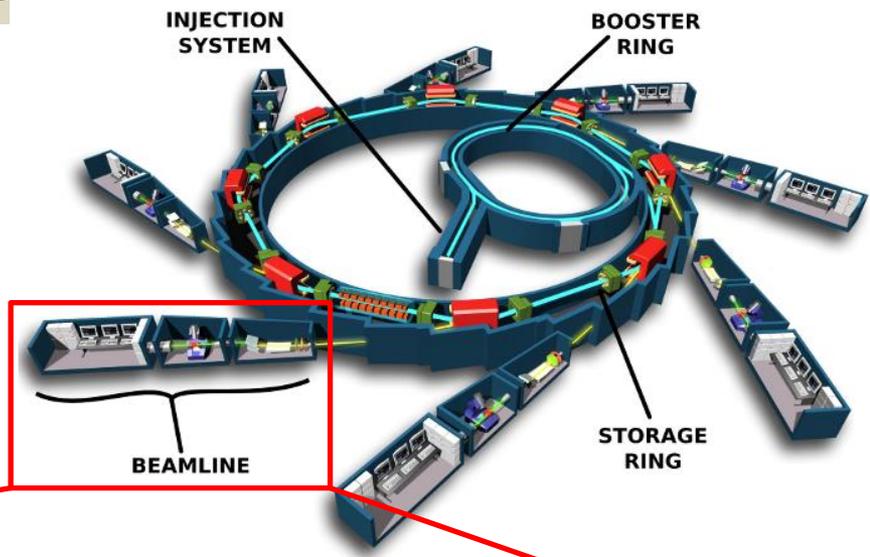


# LUCE DI SINCROTRONE



<https://www.youtube.com/watch?v=qjob1EOeM5M>

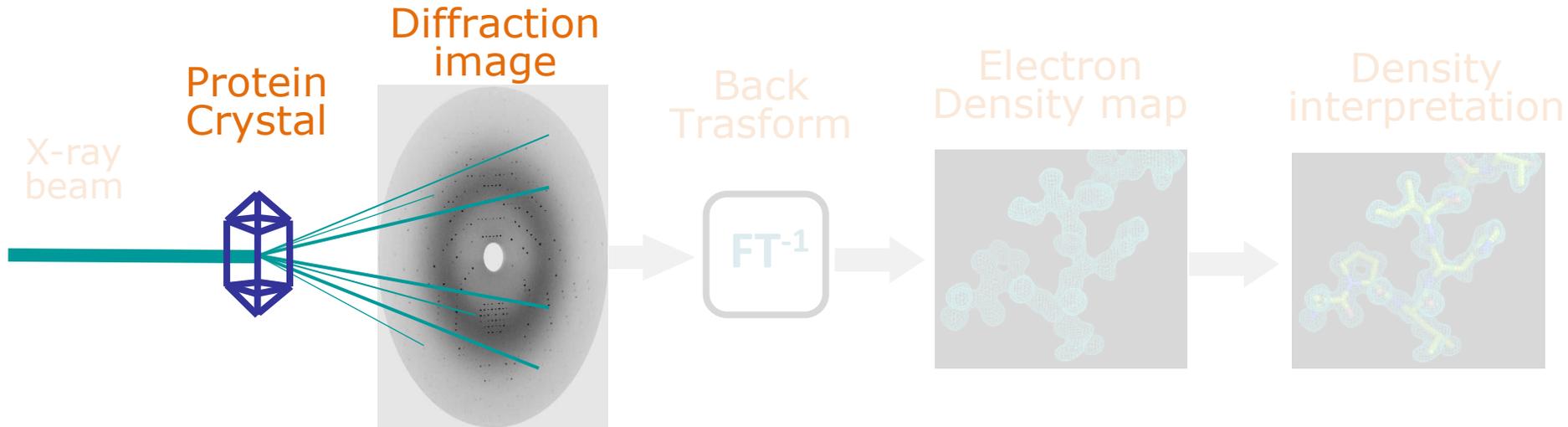
SINCROTRONE – Beamline



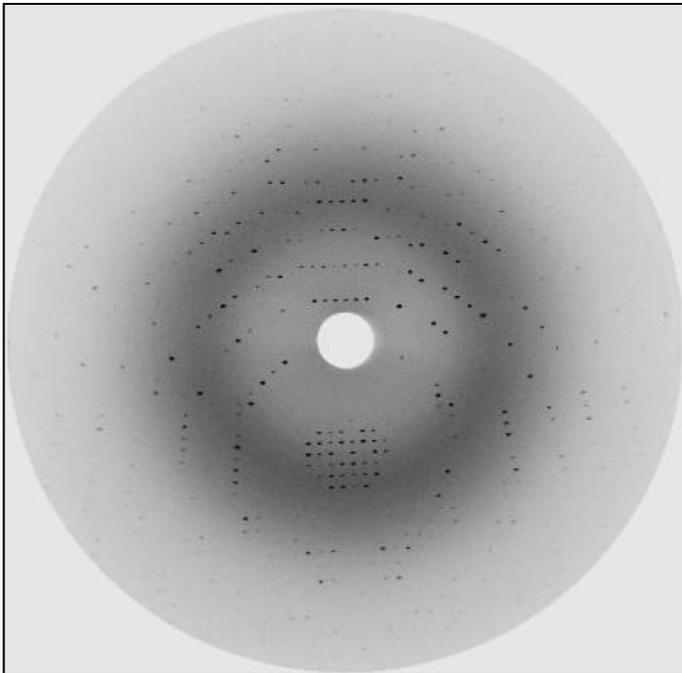
Control cabin

Experimental cabin

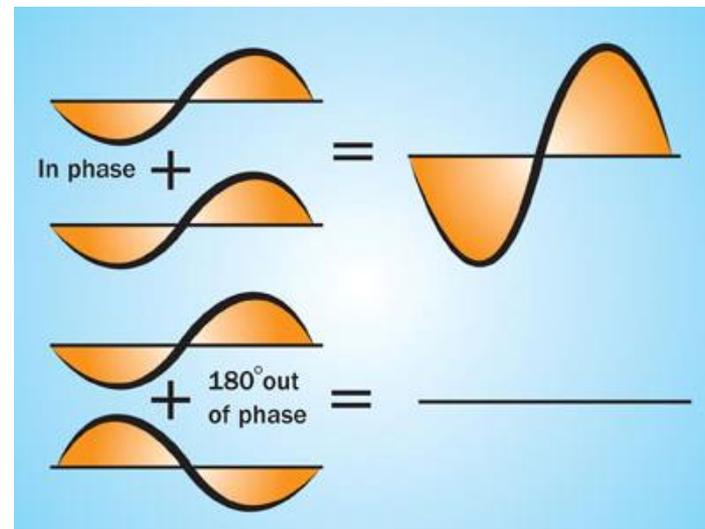
Optics cabin

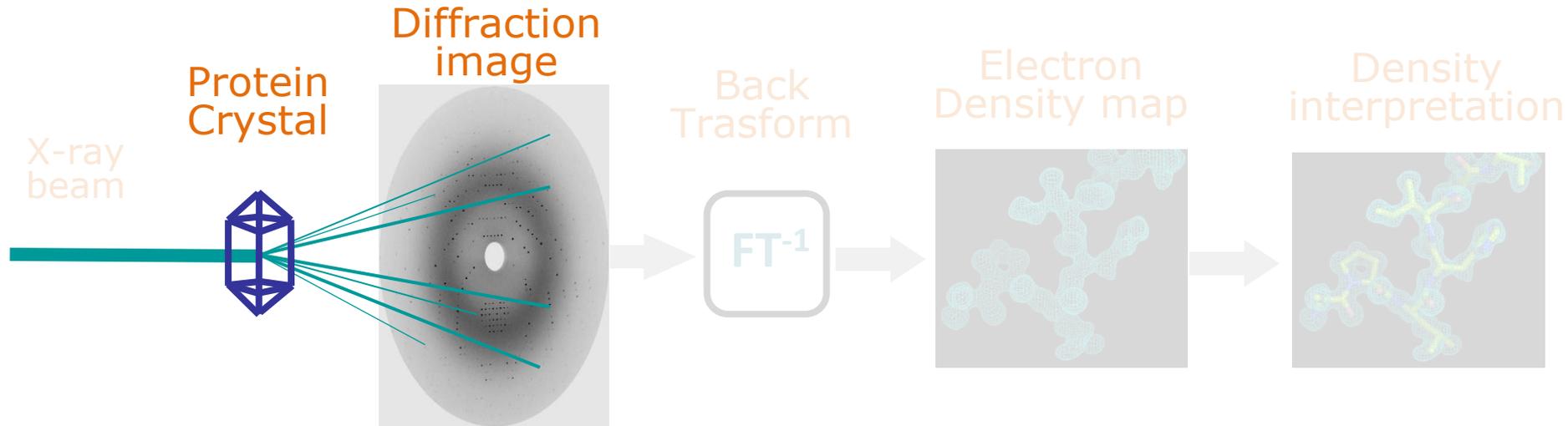


## Perché vediamo i puntini (SPOT)?

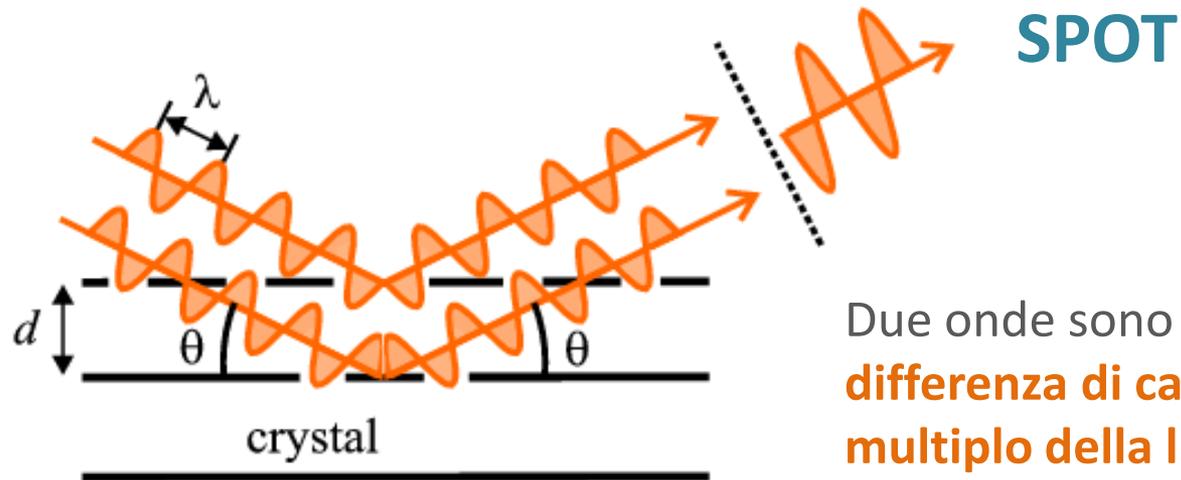


l'immagine di diffrazione è la **SOMMA DI TUTTI I FOTONI DIFFRATTI**. Solo le onde **IN FASE** si **SOMMERANNO** ed emergeranno dal cristallo



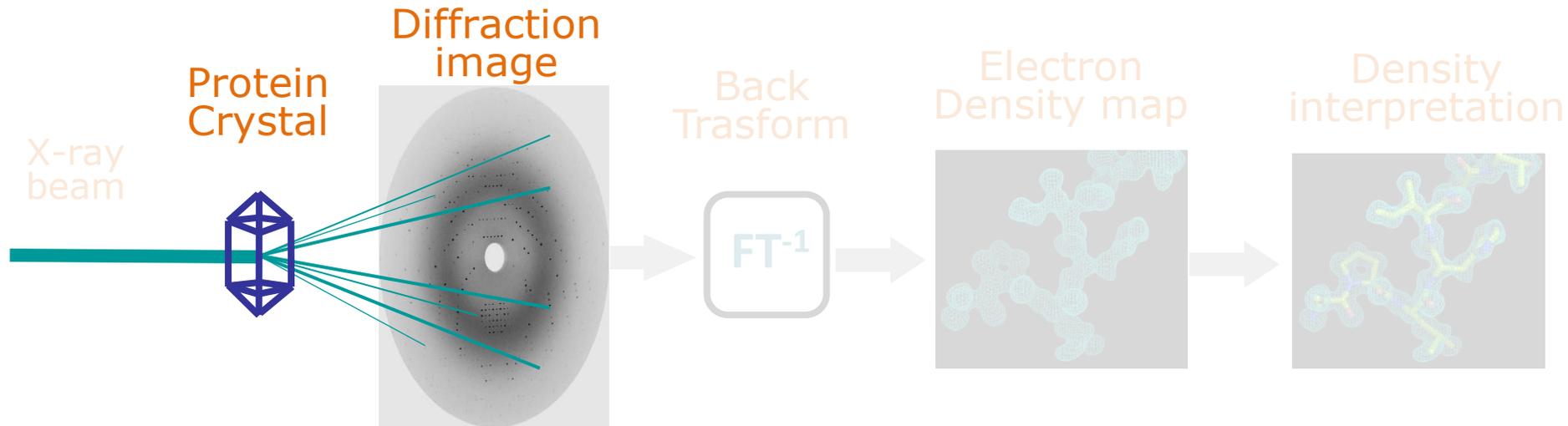


Perché vediamo i puntini (SPOT)?

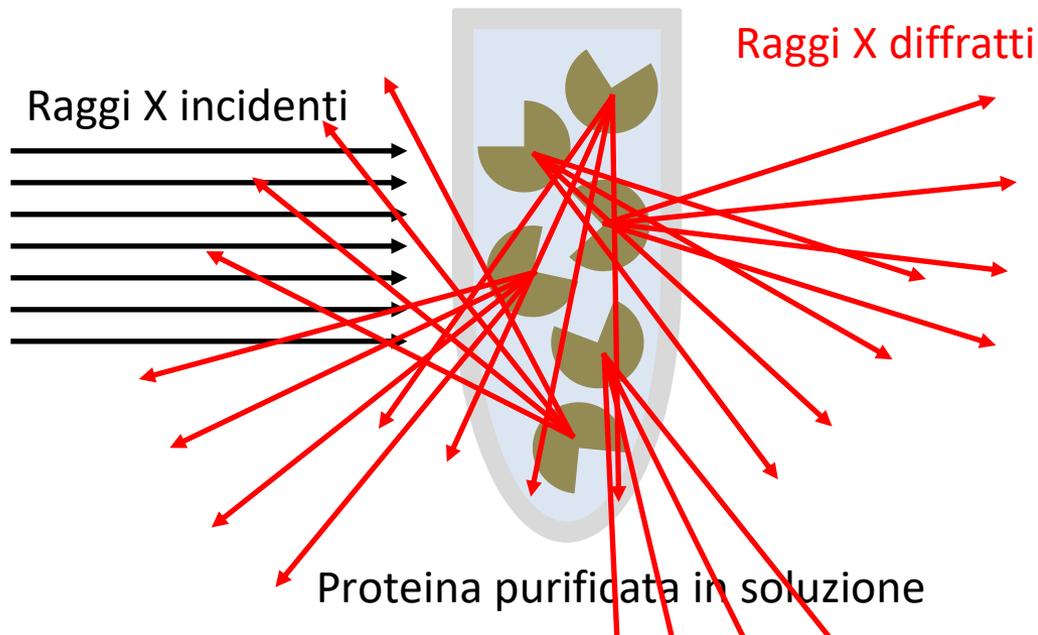


Due onde sono in fase quando **la differenza di cammino ottico è un multiplo della lunghezza d'onda**

# RACCOLTA DATI

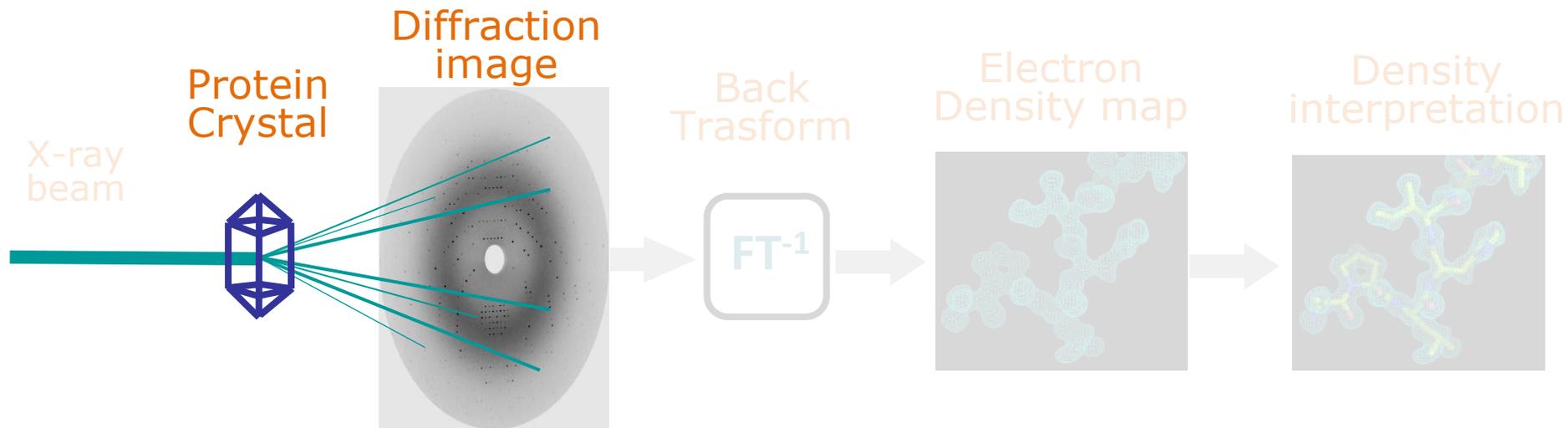


## Perché vediamo i puntini (SPOT)?

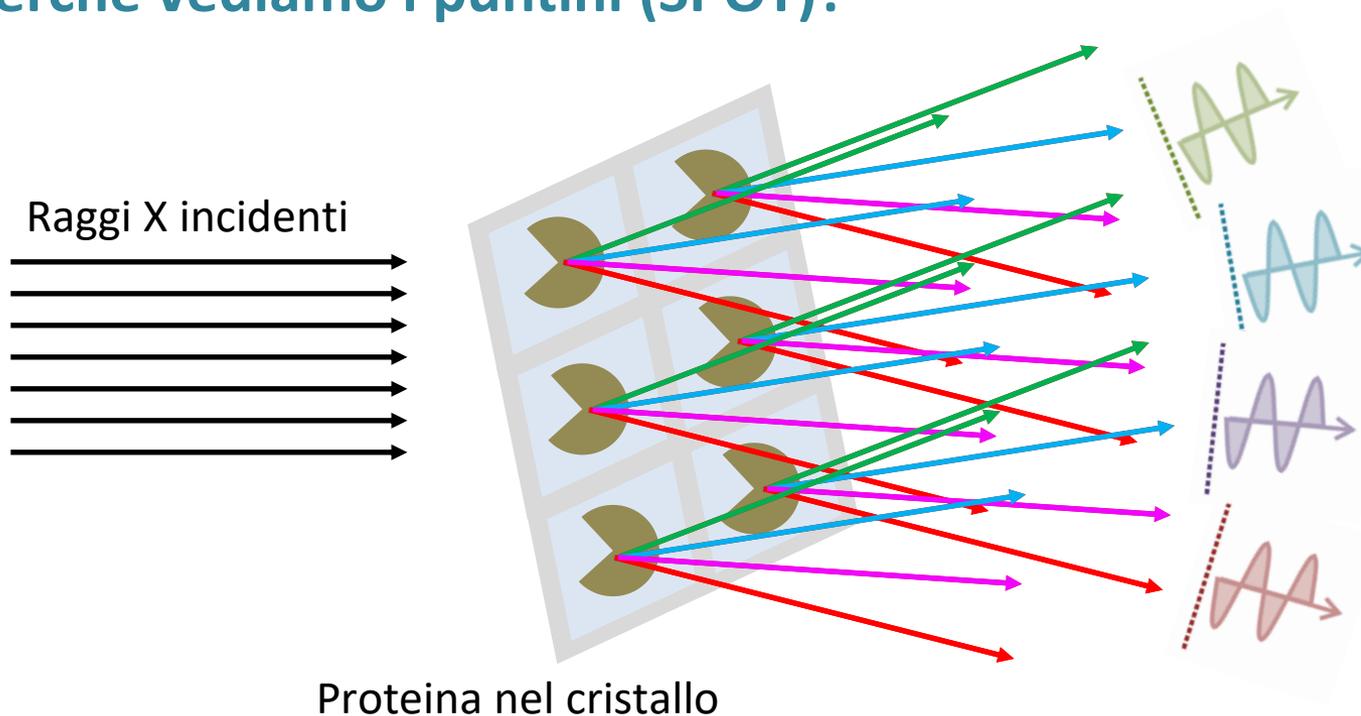


In soluzione ogni proteina diffrange i raggi X, ma **le direzioni dei raggi diffratti** sono casuali e quindi **la probabilità che un numero sufficiente di essi sia in fase per essere rilevato è praticamente nulla**

# RACCOLTA DATI



## Perché vediamo i puntini (SPOT)?

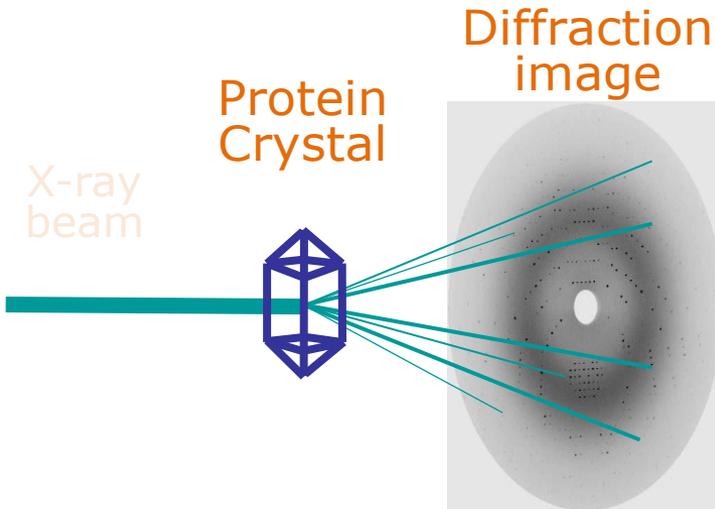


Nel cristallo le singole proteine sono disposte in maniera ordinata quindi **c'è una elevata probabilità che IN ALCUNE DIREZIONI i raggi X diffratti siano in fase e producano gli spot**

La Trasformata di Fourier di un reticolo è sempre un reticolo le cui dimensioni sono **inversamente proporzionali** a quelle del reticolo reale

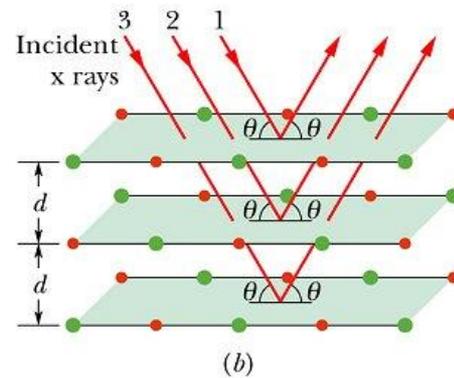
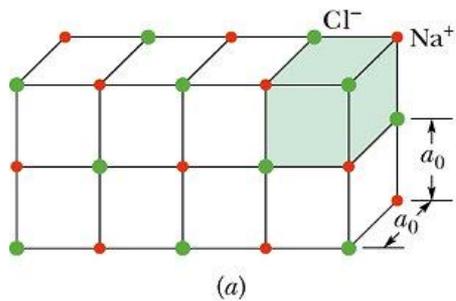
# Crystallography and the reciprocal space

# RACCOLTA DATI



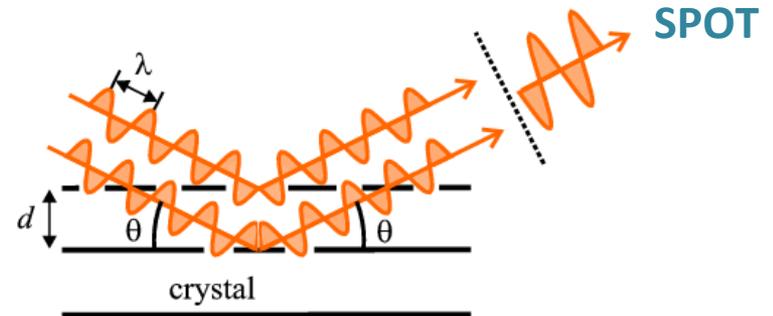
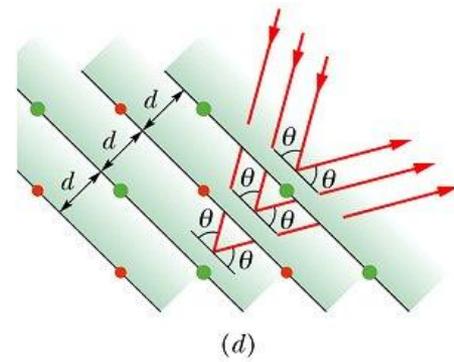
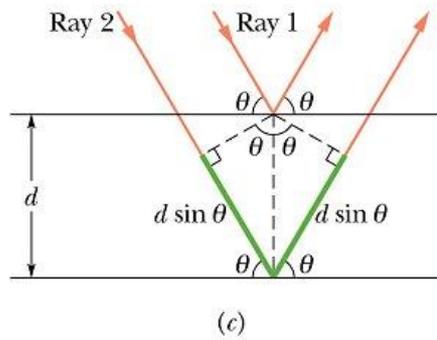
Ogni SPOT è **COME SE** fosse **RIFLESSO** da una specifica FAMIGLIA DI PIANI CRISTALLOGRAFICI

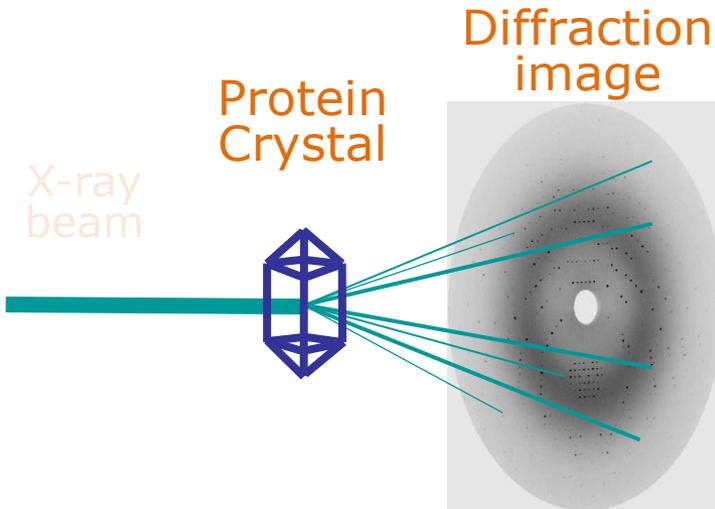
SPOT = RIFLESSIONI



Bragg's law

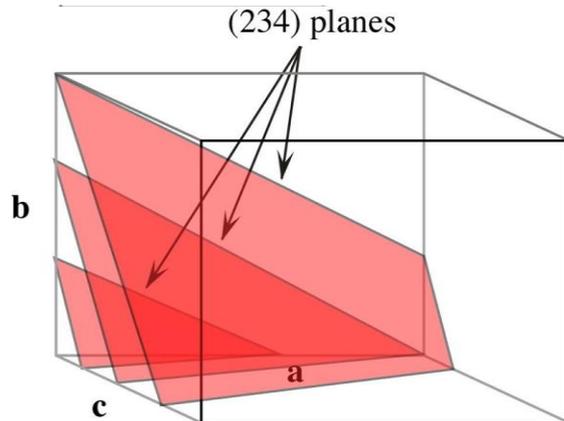
$$2d \sin\theta = n\lambda$$



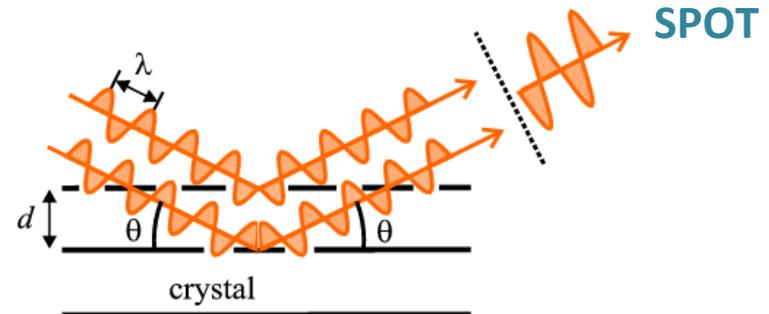
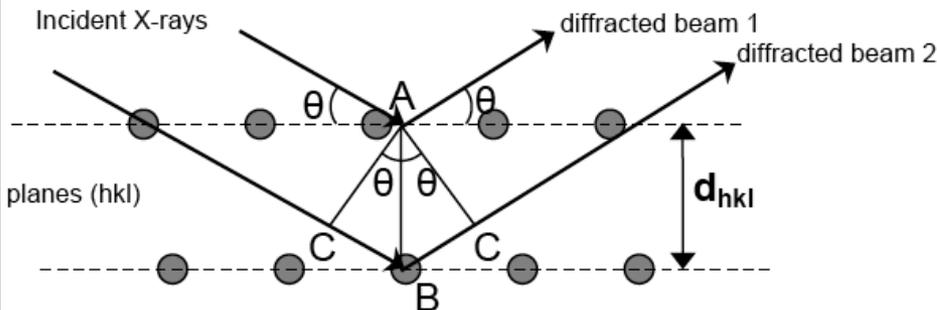


Ogni **SPOT** del reticolo reciproco è **COME SE** fosse originato dal **RIFLESSO** dei raggi-X su una specifica **FAMIGLIA DI PIANI CRISTALLOGRAFICI** Del reticolo reale

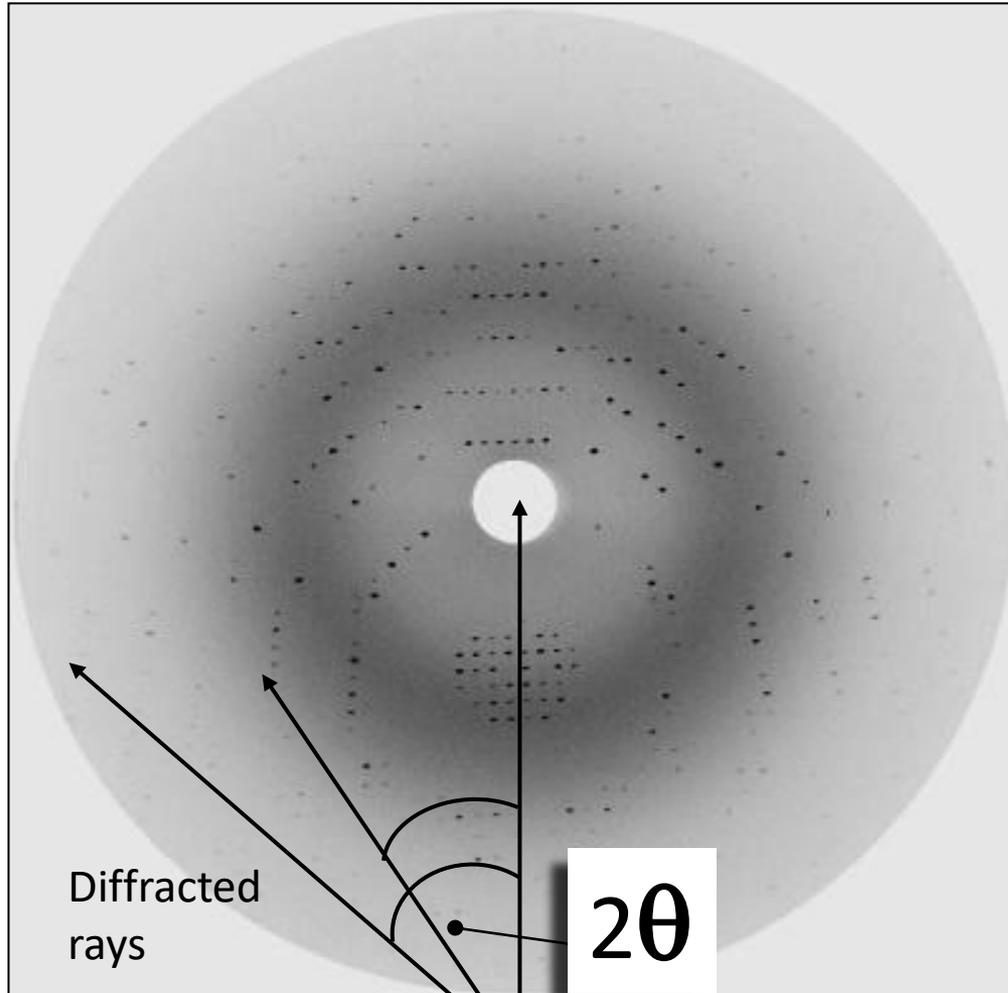
**SPOT = RIFLESSIONI**



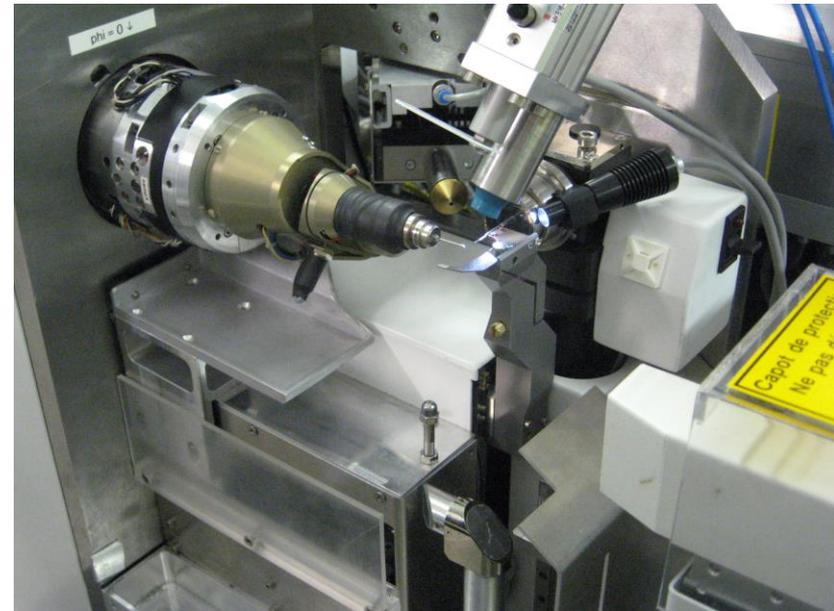
- Ad ogni riflessione corrisponde una famiglia di piani
- Ad ogni famiglia di piani assegno degli indici: ***h k l***

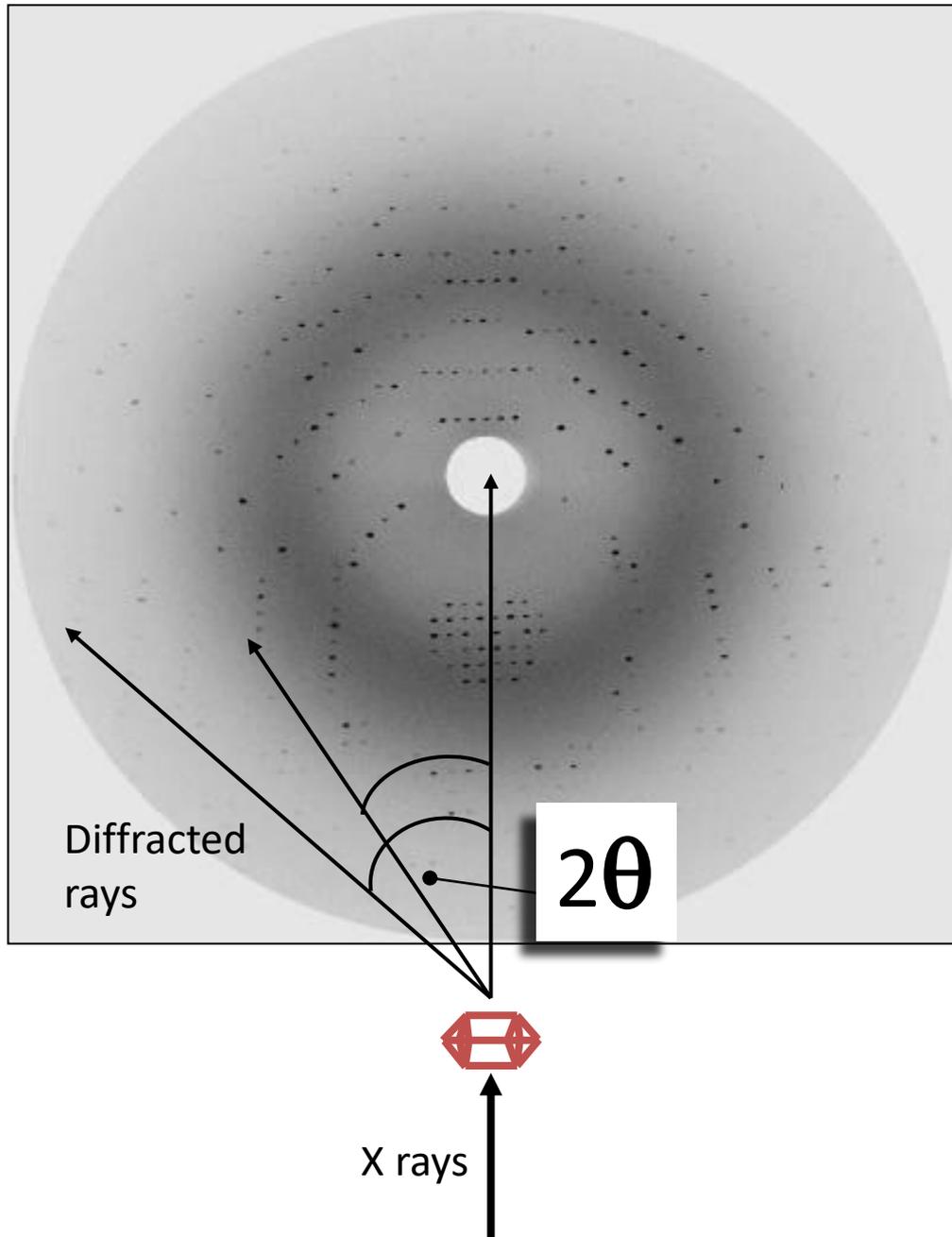


# RACCOLTA DATI



PER OTTENERE UNA  
**RACCOLTA DATI COMPLETA**  
(TUTTE LE POSSIBILI RIFLESSIONI)  
**RUOTO IL CRISTALLO**  
**E RACCOLGO PIÙ IMMAGINI**



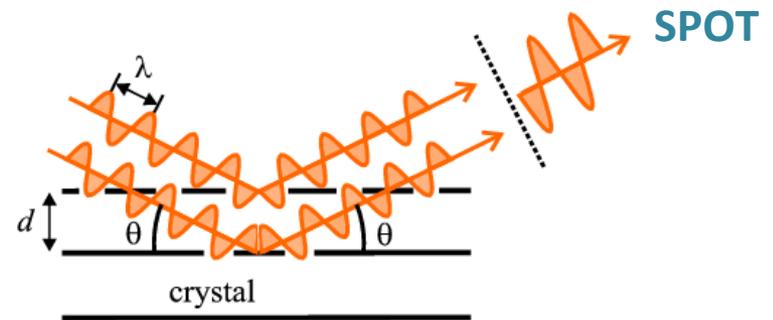


Bragg's law

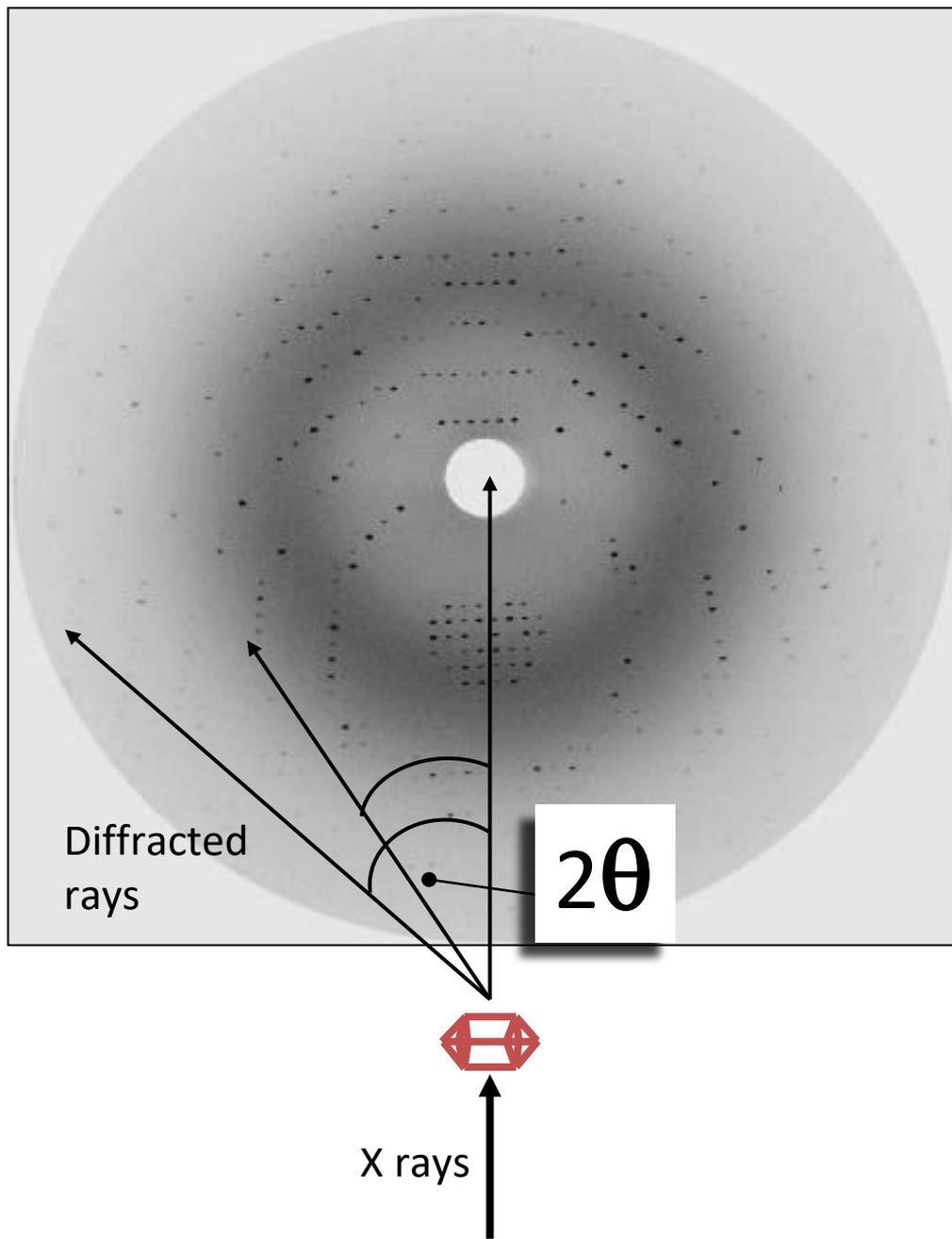
$$2d \sin\theta = n\lambda$$

$$d = n\lambda / 2\sin\theta$$

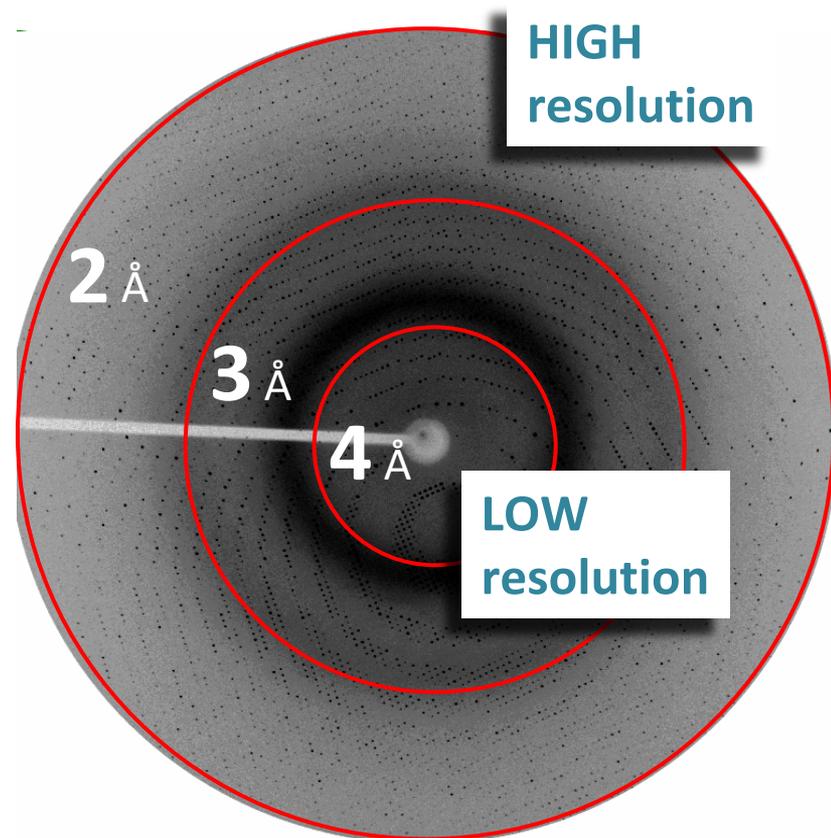
$$d_{min} = \text{RESOLUTION } [\text{\AA}]$$



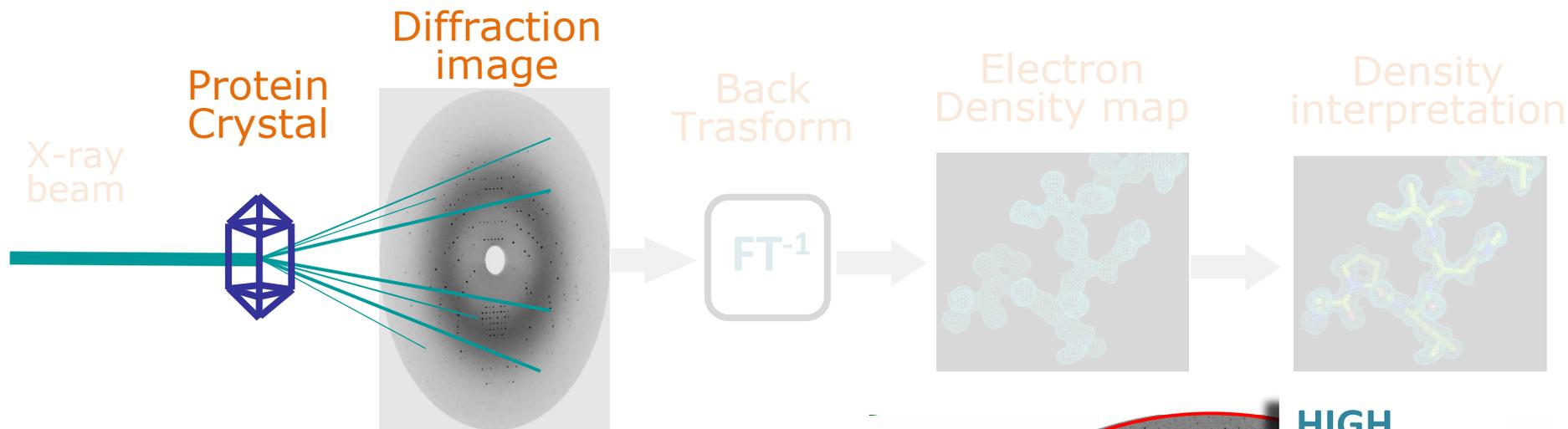
# RISOLUZIONE DEI DATI



$$d_{min} = \text{RESOLUTION } [\text{\AA}]$$

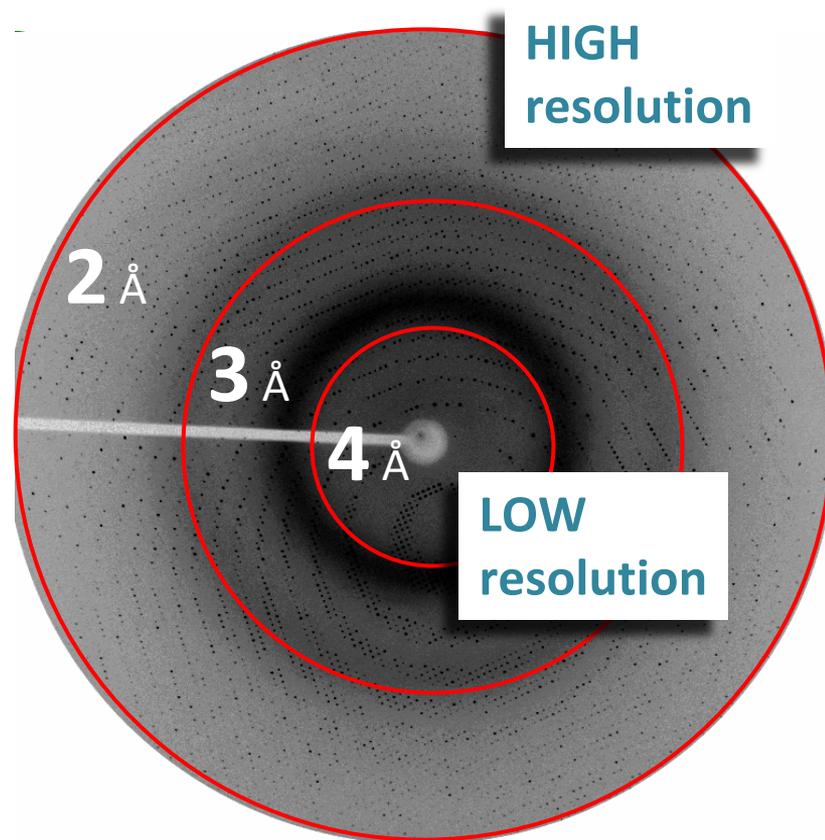
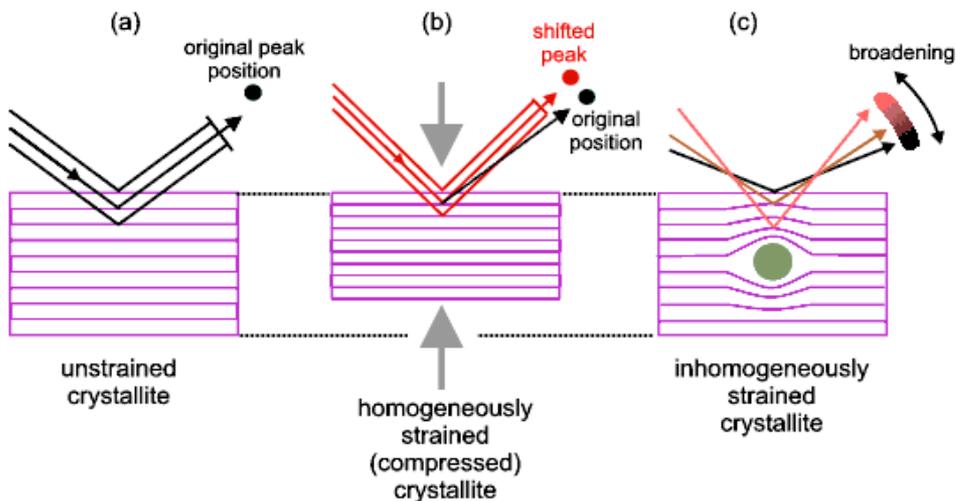


# RISOLUZIONE DEI DATI



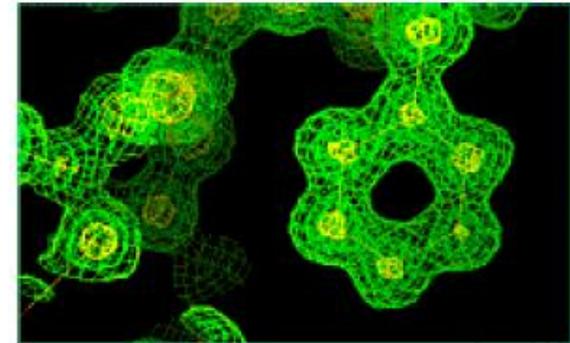
## Resolution depends on the CRYSTAL

- Quality (order)
- Dimension

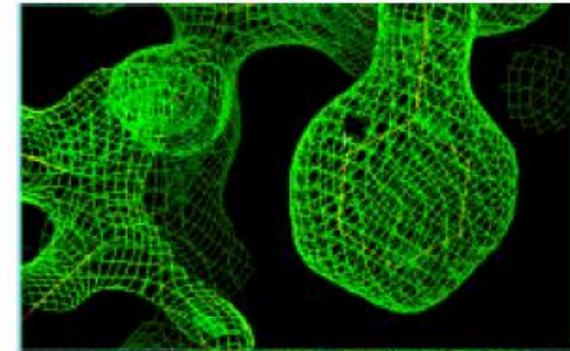


ALTA RISOLUZIONE →  
MAPPE MIGLIORI

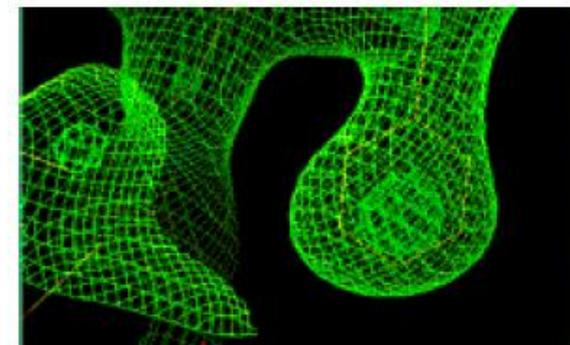
PROTEIN FEATURES	RES. (Å)
Alpha-helix	9
Beta-sheet	4
'random' main-chain	3.7
Aromatic side-chains	3.5
Interpretable conformation of side-chains	2.9
Ordered water molecules	2.7
Correct stereochemistry at Cbeta of isoleucine	2.2
Individual atoms	1.5



1.2 Å



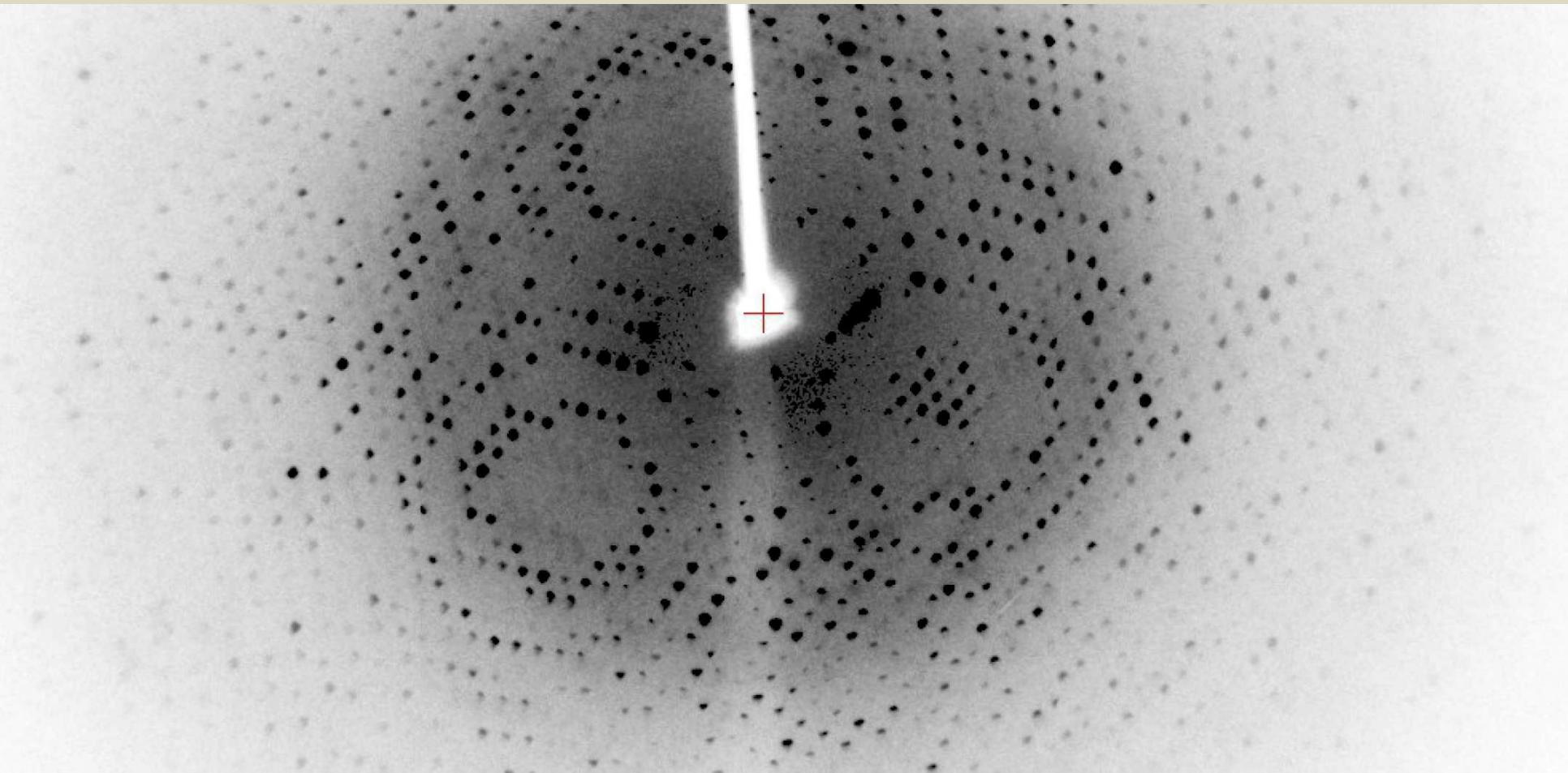
2.0 Å



3.0 Å

# ANALISI DEI DATI

Indicizzazione – Integrazione - Scalaggio



Con la **RACCOLTA DATI** i programmi di analisi **fanno 3 cose:**

## INDICIZZAZIONE

Analizzo le prime immagini di diffrazione:

- misurano **le posizioni** dei picchi



- ricavano **il gruppo spaziale**

## INTEGRAZIONE

Analizzo tutte le immagini di diffrazione:

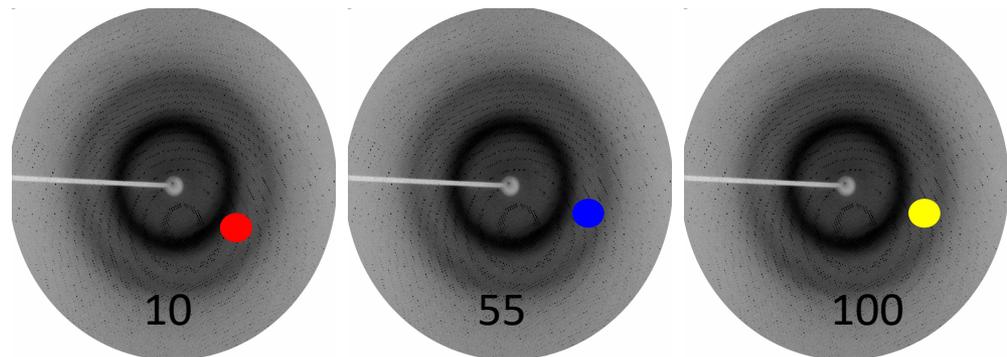
- misurano le **Intensità di ogni picco (spot)**

## SCALAGGIO

Unisco tutti i dati ottenuti:

- scrivono in un **output le Intensità relative ad ogni posizione nello spazio reciproco (spot) a cui assegnano gli indici  $h, k, l$**

- **R merge** →
- **mosaicità** (disordine intrinseco)
- **completezza**, ridondanza
- **$I/\sigma(I)$**  (segnale/rumore)



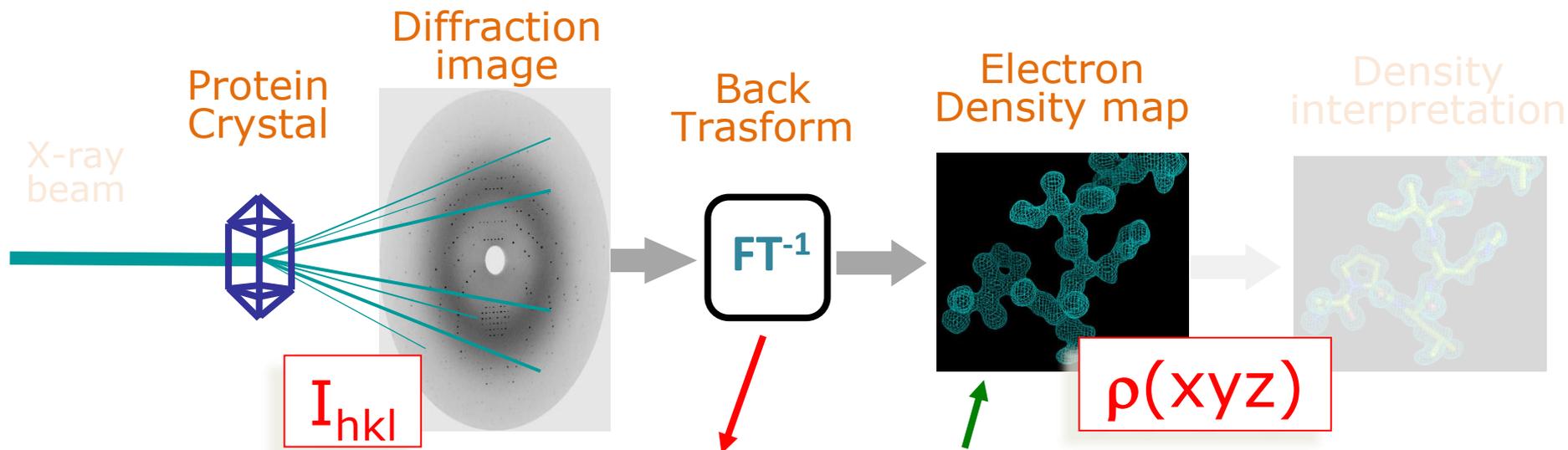
$$I_1(234) \quad I_2(234) \quad I_3(234)$$

$$R_{merge} = \frac{\sum_{hkl} \sum_{i=1}^n |I(hkl) - I_i(hkl)|}{\sum_{hkl} N \times I(hkl)}$$

STATISTICHE

( indicano la bontà del dato sperimentale)

# L'ESPERIMENTO DI DIFFRAZIONE



$$\rho(xyz) = 1/V \sum_{hkl} |F_{hkl}| \exp(i\alpha_{hkl}) \exp(-2\pi i hx + ky + lz)$$

$\alpha_{hkl}$  is lost in the experiment - the phase problem!

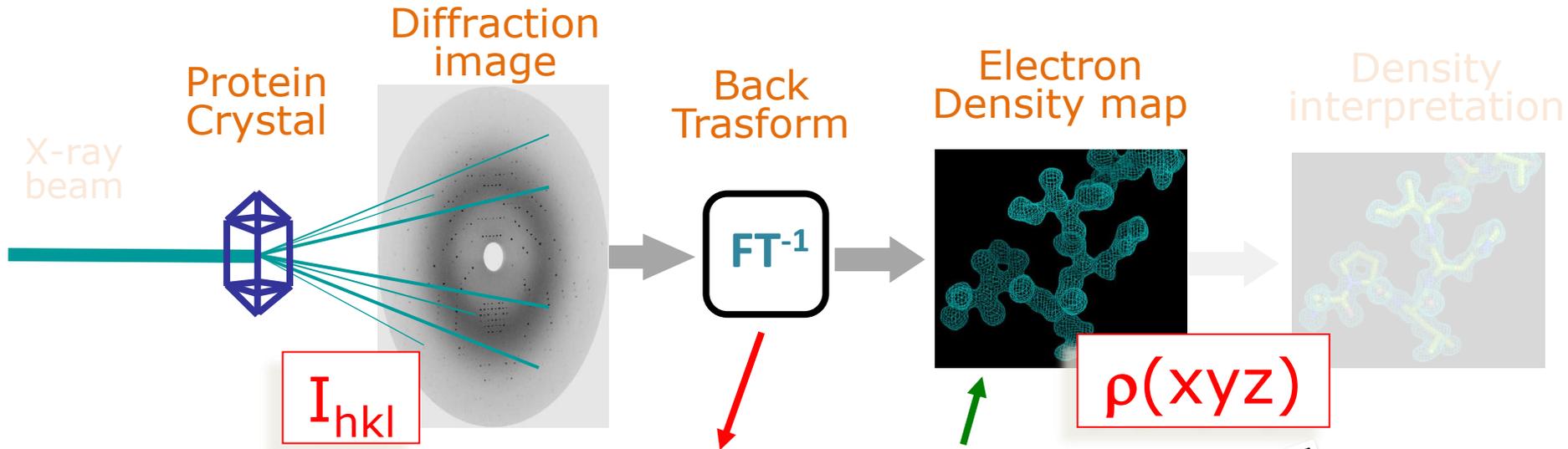
structure factor amplitude  $|F_{hkl}| \propto (I_{hkl})^{1/2}$

OTTENUTI DAI DATI DI DIFFRAZIONE

PERSA



# L'ESPERIMENTO DI DIFFRAZIONE



$$\rho(xyz) = 1/V \sum_{hkl} |F_{hkl}| \exp(i\alpha_{hkl}) \exp(i\beta_{hkl}) \exp(i\gamma_{hkl})$$

in the experiment -  
the phase problem!

str

$$|F_{hkl}| \propto (I_{hkl})^{1/2}$$

**PROBLEMA DELLA FASE**



Protein crystal diffraction:  
How the spots relate to the structure

# Celebrating Crystallography

*Bragg Centenary 1913 - 2013*



<https://www.youtube.com/watch?v=PVIOb6F-MDA>

## VANTAGGI



- **Risoluzione atomica**
- Non ci sono limitazioni nelle dimensioni delle macromolecole

## SVANTAGGI



- **Cristalli singoli**
- Altamente ordinati
- ragionevolmente grandi (30-100  $\mu\text{m}$ )