

Die Bestimmung des mittleren Elektronenabstandes \bar{a} von in Lösung befindlichen Makromolekülen aus Röntgen-Kleinwinkeldiagrammen

Von

Gregor Damaschun und Hans-Volker Pürschel

Sektion Physik der Friedrich-Schiller-Universität,
Jena, Max-Wien-Platz 1, DDR

(Eingegangen am 23. Oktober 1968)

Determination of the Mean Electron Distance \bar{a} of Macromolecules in Solution by Means of X-Ray Small Angle Scattering

From a low-angle X-ray scattering diagram of a dilute monodisperse solution the mean distance \bar{a} between two electrons within the molecules investigated is predictable.

The calculation is possible either with the help of integral transformations of the scattering curve or from the initial slope of the slight-smearred scattering curve.

For spheres and hollow spheres, for prolate and oblate spheroids of revolution and for agglomerates of spheres, the calculation of the mean electron distance \bar{a} has been carried out.

1. Einleitung

Aus der Röntgen-Kleinwinkelstreuung (RKWS) verdünnter monodisperser Lösungen von Makromolekülen kann man die Größe und Gestalt der Moleküle oder der Molekülaggregate sowie ihre Überschußelektronenzahl gegenüber dem Lösungsmittel bestimmen. Derartige Untersuchungen wurden an einer großen Zahl von biogenen Makromolekülen und Viren durchgeführt. Einen zusammenfassenden Bericht hat *Kratky*¹ gegeben. Bei der Bestimmung von Gestalt und Größe können methodisch zwei Wege beschritten werden.

¹ O. Kratky, Progr. Biophys. biophys. Chem. **13**, 105 (1963).

Beim ersten Weg wird die gemessene, von apparativen Einflüssen befreite (entschmierte)² und auf die Konzentration Null extrapolierte¹ Streukurve mit den von Modellobjekten berechneten Streukurven verglichen. Durch eine Variation der geometrischen Parameter der Modellobjekte gelingt es unter Umständen, eine berechnete Streukurve mit der gemessenen innerhalb der Meßgenauigkeit in Übereinstimmung zu bringen. Das nach diesem „trial-and-error“-Verfahren gefundene streuäquivalente System liefert dann ein Strukturmodell für die untersuchten Makromoleküle. Über Einzelheiten dieser Methode hat *Mittelbach*³ zusammenfassend berichtet.

Beim zweiten Weg werden aus der gemessenen Streukurve charakteristische Konstanten der untersuchten Moleküle ermittelt, die modellunabhängige Eigenschaften der Moleküle sind. Die am häufigsten angegebenen charakteristischen Konstanten von Molekülen sind ihr Volumen v und ihr Streumassenradius R_s . Durch den Vergleich der gemessenen mit den berechneten Konstanten möglicher Modellobjekte kann der unter Umständen langwierige Vergleich mit berechneten Streukurven abgekürzt werden, da die Kenntnis dieser Kennzahlen die Mannigfaltigkeit der in Erwägung zu ziehenden Modellobjekte einschränkt.

Bei praktischen Formbestimmungen werden meist beide Wege miteinander kombiniert oder zur wechselseitigen Kontrolle benutzt. Die Formbestimmung beim zweiten Weg kann dabei analytisch von der Größenbestimmung durch die Bildung von dimensionslosen Quotienten der verschiedenen Kennzahlen getrennt werden.

2. Die Momente der Sehnenverteilungsdichte

Durch die Kenntnis einer vergrößerten Anzahl unabhängiger charakteristischer Konstanten wird die Anzahl der möglicherweise streuäquivalenten Modellobjekte vermindert. Die numerische Berechnung solcher Konstanten ist mathematisch weit weniger aufwendig als die numerische Berechnung einer vollständigen Streukurve. Eine logisch angeordnete Reihenfolge der charakteristischen Konstanten erhält man, wenn man ihren Zusammenhang mit der Sehnenverteilungsdichte der untersuchten Moleküle betrachtet⁴.

Die *RKWS* einer verdünnten monodispersen Lösung von N im streuenden Volumen befindlichen Partikeln (Molekülen) ist durch die Gleichung

² O. Kratky, G. Porod und Z. Skala, *Acta Physica Austriaca* **13**, 76 (1960).

³ P. Mittelbach, *Acta Physica Austriaca* **19**, 53 (1964).

⁴ G. Damaschun und H.-V. Pürschel, *Acta biol. med. germ.* **21**, 410 (1968).

$$\begin{aligned}
 i(h) &= i_e N v \Delta \rho^2 \int_0^\infty dr 4 \pi^2 r^2 C_P(r) \frac{\sin hr}{hr} & (1) \\
 &= I_0 S \varphi(h) \\
 &= I_0 S v \Phi(h)
 \end{aligned}$$

gegeben. i_e ist die am Empfänger nachgewiesene gestreute Strahlungsleistung eines Elektrons, $\Delta \rho$ die Elektronendichtedifferenz zwischen den Partikeln und dem Lösungsmittel, v das Partikelvolumen, C_P die Korrelationsfunktion einer Partikel, r eine Ortskoordinate, $h = 4 \pi \lambda^{-1} \sin \Theta$ die Variable im Streudiagramm, I_0 die Strahlungsleistung des Primärstrahls und S die von Porod⁵ eingeführte Streukraft der Probe.

Die Sehnenverteilungsdichte $A(l)$ erhält man aus der Korrelationsfunktion mittels der Beziehung⁶

$$A(l) = - \left(\frac{d^2 C(r)/dr^2}{d C(O)/dr} \right)_{r=l} \quad (2)$$

$$= \bar{l} \left(\frac{d^2 C(r)}{dr^2} \right)_{r=l} \quad (3)$$

Das n -te Moment der Sehnenverteilungsdichte ist durch die Gleichung

$$A_n = \int_0^\infty dl l^n A(l) \quad (4)$$

definiert. Berechnet man die ersten sechs Momente der Sehnenverteilungsdichte, so erhält man die Beziehungen:

$$A_0 = 1, \quad A_1 = \bar{l}, \quad (5) \quad (6)$$

$$A_2 = \bar{l} l_c, \quad A_3 = 3 \pi^{-1} \bar{l} f_c, \quad (7) \quad (8)$$

$$A_4 = 3 \pi^{-1} \bar{l} v_c, \quad A_5 = 5 \pi^{-1} \bar{l} v_c \bar{a}, \quad (9) \quad (10)$$

$$A_6 = 15 \pi^{-1} \bar{l} v_c R_s^2.$$

\bar{l} ist die mittlere Durchschußlänge, l_c die Charakteristiklänge, v_c das Charakteristikvolumen, f_c die Charakteristikfläche und R_s der Streumassenradius der betrachteten Partikel. Verfahren zur Bestimmung dieser Größen aus der Streukurve sind von Porod⁵ angegeben worden. Die Konstante \bar{a} wurde bisher nicht bei der Formbestimmung benutzt.

⁵ G. Porod, Kolloid-Z. **124**, 83 (1951).

⁶ J. Mering und D. Tchoubar-Vallat, C. R. Acad. Sci. Paris **261**, 3096 (1965).

3. Der mittlere Elektronenabstand \bar{a}

Aus Gleichung (10) folgt auf Grund einer allgemeinen Relation zwischen den Momenten der Sehnverteilungsdichte und denen der Korrelationsfunktion⁴ die Beziehung

$$\bar{a} = 4\pi v_c^{-1} \int_0^{\infty} dr r^3 C(r). \quad (12)$$

Die normierte Streukurve $\Phi(h)$ steht mit der Korrelationsfunktion $C(r)$ nach Gleichung (1) in der Beziehung

$$\Phi(h) = 4\pi v_c^{-1} \int_0^L dr r^2 C(r) \frac{\sin hr}{hr}, \quad (13)$$

L ist der größte Durchmesser der untersuchten Partikeln.

Jetzt wird an Stelle der Korrelationsfunktion $C(r)$ die von *Porod*⁷ eingeführte Funktion $\psi(a)$ betrachtet. $\psi(a) \cdot da$ ist die Wahrscheinlichkeit, im Molekül zwei beliebige Elektronen im Abstandsintervall $(a, a + da)$ anzutreffen. Die Abstandsverteilungsdichte $\psi(a)$ steht mit der normierten Streufunktion $\Phi(h)$ in der Beziehung⁷

$$\Phi(h) = \int_0^L da \psi(a) \frac{\sin ha}{ha}. \quad (14)$$

Aus einem Vergleich der Beziehungen (13) und (14) folgt

$$\psi(a) = [4\pi r^2 v_c^{-1} C(r)]_{r=a} \quad (15)$$

und aus (15) und (12)

$$\bar{a} = \int_0^L da a \psi(a). \quad (16)$$

\bar{a} ist also das erste Moment der Abstandsverteilungsdichte $\psi(a)$ der Elektronen, d. h., der *mittlere Abstand zwischen zwei Elektronen* im untersuchten Molekül oder Molekülaggregat.

4. Bestimmung des mittleren Elektronenabstandes \bar{a}

Aus der entschmierten Streukurve kann der mittlere Elektronenabstand mittels der Gleichungen (13) und (12) berechnet werden. Das

⁷ G. Porod, Z. Naturforsch. 4a, 401 (1949).

gleiche kann mittels der Gleichungen (14) und (16) geschehen; in beiden Fällen müssen die Integraltransformationen, die durch die Inverstransformationen zu den Gleichungen (13) und (14) erhalten werden, numerisch berechnet werden. Deshalb soll noch ein Näherungsverfahren beschrieben werden.

Die verschmierte Streukurve $\tilde{\varphi}(h)$, die mit einem „unendlich langen“ Primärstrahl registriert wurde, steht mit der Korrelationsfunktion $C(r)$ in der Beziehung

$$\tilde{\varphi}(h) = \int_0^{\infty} dr 4\pi^2 r C(r) J_0(hr), \quad (17)$$

J_0 ist die *Bessel*-Funktion nullter Ordnung. Durch eine Reihenentwicklung der Funktion $J_0(hr)$ erhält man

$$\begin{aligned} \tilde{\varphi}(h) &= \sum_{k=0}^{\infty} (-1)^k \frac{\pi^2 h^{2k}}{2^{2k-2} (k!)^2} \int_0^{\infty} dr r^{2k+1} C(r) \\ &= 2\pi f_c \left(1 - h^2 \frac{v_c \bar{a}}{8f_c} + \dots \right). \end{aligned} \quad (18)$$

Diese Reihe stimmt in den ersten zwei Gliedern mit der Reihenentwicklung der Funktion

$$\tilde{\varphi}_N(h) = 2\pi f_c \exp\left(-h^2 \frac{v_c \bar{a}}{8f_c}\right) \quad (19)$$

überein.

Die Bestimmung von $v_c \bar{a} f_c^{-1}$ und damit die von \bar{a} erfolgt daher analog der Streumassenradiusbestimmung aus der entschmierten Streukurve durch eine *Guiniersche* Auftragung der spaltverschmierten Streukurve in einem $(\log \tilde{\varphi}, h^2)$ -Diagramm und durch die Bestimmung der Neigung des Innenteils der sich hierbei ergebenden Geraden.

5. Theoretische Berechnung des mittleren Elektronenabstandes \bar{a} für verschiedene Modellobjekte

Für homogene Kugeln vom Radius R kann der mittlere Elektronenabstand \bar{a} nach Gleichung (12) aus der von *Guinier*⁸ angegebenen Korrelationsfunktion

⁸ A. Guinier und G. Fournet, *Small-Angle Scattering of X-Rays*, John Wiley & Sons, Chapman & Hall, New York-London 1955.

$$C(r) = \begin{cases} 1 - \frac{3r}{4R} + \frac{1}{16} \left(\frac{r}{R}\right)^3 & \text{für } r \leq 2R \\ 0 & \text{für } r > 2R \end{cases} \quad (20)$$

berechnet werden. Man findet

$$\bar{a} = \frac{36}{35} R. \quad (21)$$

Da jedes Rotationsellipsoid (Halbachsen: $b, b, a = bv$), dessen Achse mit dem reziproken Gittervektor \vec{h} den Winkel ϑ einschließt, nach *Guinier*⁹ gleichwertig einer Kugel vom effektiven Radius

$$R = b(v^2 \cos^2 \vartheta + \sin^2 \vartheta)^{1/2} \quad (22)$$

streut, kann man das Ergebnis (21) auch für Rotationsellipsoide erweitern, indem man über alle gleichwahrscheinlichen Orientierungen der Ellipsoide mittelt,

$$\bar{a} = \frac{36}{35} b \int_0^{\pi/2} d\vartheta (v^2 \cos^2 \vartheta + \sin^2 \vartheta)^{1/2} \sin \vartheta. \quad (24)$$

Durch Ausführung der Integration erhält man für prolate Rotationsellipsoide mit der Rotationshalbachse $a = vb$ das Ergebnis

$$\bar{a} = \frac{36}{70} b \left(v + \frac{\text{Arsh} \sqrt{v^2 - 1}}{\sqrt{v^2 - 1}} \right) \text{ für } v > 1. \quad (25)$$

Für oblate Rotationsellipsoide erhält man

$$\bar{a} = \frac{36}{70} b \left(v + \frac{\text{arc sin} \sqrt{1 - v^2}}{\sqrt{1 - v^2}} \right) \text{ für } v < 1. \quad (26)$$

Im Grenzfall sehr gestreckter Rotationsellipsoide ($v \gg 1$) gilt die Näherungsformel

$$\bar{a} = \frac{36}{70} a \left(1 + \frac{\ln 2v}{v^2} \right) \xrightarrow{v \rightarrow \infty} \frac{18}{35} a. \quad (27)$$

Für stark abgeplattete Rotationsellipsoide ($v \ll 1$) gilt näherungsweise

$$\bar{a} = \frac{9\pi}{35} b(v^2 + 1) \xrightarrow{v \rightarrow 0} \frac{9\pi}{35} b. \quad (28)$$

⁹ A. Guinier, Ann. Phys. **12**, 161 (1939).

Für Hohlkugeln mit dem Außenradius R und dem Innenradius kR kann man den mittleren Elektronenabstand aus der geometrisch bestimm-
baren Korrelationsfunktion nach Gleichung (12) berechnen. Man erhält
das Ergebnis

$$\bar{a} = \frac{36}{35} R \left(\frac{72 - 105 k^3 - 42 k^5 + 75 k^7}{72 (1 - k^3)^2} \right). \quad (29)$$

Für den Grenzfall einer dünnen Kugelschale ($k \rightarrow 1$) erhält man

$$\bar{a} = \frac{4}{3} R. \quad (30)$$

Zum Schluß teilen wir — lediglich als Ergebnis¹⁰ — einen Ausdruck
für den mittleren Elektronenabstand \bar{a}_z eines aus n Kugeln mit beliebigem
Radius R_i zusammengesetzten Agglomerats mit:

$$\bar{a}_z = \sum_{i=1}^n \frac{z_i^2}{z_z^2} \bar{a}_i + \sum_{i=1}^n \sum_{i < j} \frac{z_i z_j}{z_z^2} \left(a_{ij} + \frac{R_i^2 + R_j^2}{5 a_{ij}} \right). \quad (31)$$

\bar{a}_i ist der mittlere Elektronenabstand der i -ten Kugel, R_i bzw. R_j ist der
Radius der i -ten bzw. j -ten Kugel, z_i bzw. z_j ist die Zahl der Überschuß-
elektronen der i -ten bzw. j -ten Kugel gegenüber dem Lösungsmittel,
 $z_z = \sum z_i$ ist die Gesamtzahl der Überschußelektronen des Agglomerats
gegenüber dem Lösungsmittel und a_{ij} ist der Abstand zwischen den
Ladungsschwerpunkten der i -ten und der j -ten Kugel. Derartige Kugel-
agglomerate können als Modelle für die Struktur von Proteinen mit
einer Quartärstruktur herangezogen werden^{11, 12}.

Der eine von uns (G. D.) möchte Herrn Prof. Dr. O. Kratky und
Herrn Prof. Dr. G. Porod für anregende Diskussionen über die Auswertung
von *RKW*-Diagrammen während eines Studienaufenthaltes am Institut
für physikalische Chemie der Universität Graz danken.

Zusammenfassung

Aus Röntgen-Kleinwinkeldiagrammen von gelösten Makromolekülen
können Kennzahlen für die Größe und Gestalt der Moleküle berechnet
werden. Diese Kennzahlen können durch die Momente der Sehnen-
verteilungsdichte der Moleküle dargestellt werden.

¹⁰ G. Damaschun und H.-V. Pürschel, in Vorbereitung.

¹¹ G. Damaschun, J. J. Müller und H.-V. Pürschel, Acta biol. med. germ.
20, 379 (1968).

¹² G. Damaschun und H.-V. Pürschel, Acta biol. med. germ. 21, 865
(1968).

Ordnet man diese charakteristischen Kennzahlen der Moleküle in einer Reihenfolge nach der Ordnung der Momente der Sehnendichteverteilung an, durch welche sie bestimmt sind, erhält man folgende Anordnung der charakteristischen Kennzahlen:

1. mittlere Durchschußlänge l
2. charakteristische Länge l_c
3. charakteristische Fläche f_c
4. Volumen v_c
5. mittlerer Elektronenabstand \bar{a}
6. Streumassenradius R_s .

Der mittlere Elektronenabstand \bar{a} ist der Mittelwert aller Abstände zwischen zwei beliebigen Elektronen des Moleküls. Der mittlere Elektronenabstand \bar{a} kann sowohl aus der Abstandsverteilungsdichte der Elektronen als auch aus der Korrelationsfunktion des Moleküls berechnet werden.

Aus spaltverschmierten Streukurven kann \bar{a} mittels einer *Guinier*-Auftragung bestimmt werden; es wird gezeigt, daß der Anstieg der *Guinier*-Geraden einer spaltverschmierten Streukurve durch die Größe $\bar{a} v_c f_c^{-1}$ bestimmt ist.

Für Kugeln und Hohlkugeln, für prolate und für oblate Rotationsellipsoide und für Agglomerate aus Kugeln mit beliebigem Durchmesser werden Formeln angegeben, mit deren Hilfe der mittlere Elektronenabstand \bar{a} aus geometrischen Parametern berechnet werden kann.