

Плоскопараллельные ячейки микрообъема для исследования структуры растворов биоорганических, сильно поглощающих и слабо рассеивающих объектов на станции «БиоМУР» Курчатовского источника синхротронного излучения*

А.Е. Суханов, В.В. Волков, М.А. Марченкова, П.В. Конарев, С.Ю. Пауль, Г.С. Петерс, Ю.В. Писаревский, С.В. Чапек, В.А. Шишков, А.В. Солдатов, М.В. Ковальчук

Разработаны и созданы ячейки микрообъема для исследования структуры растворов методом МУРР с использованием синхротронного излучения. Ячейки апробированы на станции «БиоМУР» Курчатовского источника синхротронного излучения. Проведен сравнительный анализ двумерных картин малоуглового рассеяния от стандартного капилляра и от разработанных ячеек, показавший существенное улучшение качества экспериментальных данных МУРР без необходимости усложнения процедуры обработки данных при использовании ячеек вместо капилляров. Показана возможность исследования сильно поглощающих и слабо рассеивающих образцов, а также динамики кривых рассеяния МУРР для растворов.

Ключевые слова: синхротронное излучение, малоугловое рентгеновское рассеяние (МУРР), лизоцим, дигидрофосфат калия (KDP), раствор, насыщение.

*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект №19-29-12042).



СУХАНОВ
Андрей Евгеньевич
НИЦ «Курчатовский институт»



ВОЛКОВ
Владимир Владимирович
НИЦ «Курчатовский институт»



МАРЧЕНКОВА
Маргарита Александровна
НИЦ «Курчатовский институт»



КОНАРЕВ
Петр Валерьевич
НИЦ «Курчатовский институт»



ПАУЛЬ
Станислав Юрьевич
ООО «Троицкий инженерный центр»



ПЕТЕРС
Георгий Сергеевич
НИЦ «Курчатовский институт»



ПИСАРЕВСКИЙ
Юрий Владимирович
НИЦ «Курчатовский институт»



ЧАПЕК
Сергей Валентинович
Международный исследовательский институт интеллектуальных материалов ЮФУ



ШИШКОВ
Владимир Анатольевич
НИЦ «Курчатовский институт»



СОЛДАТОВ
Александр Владимирович
профессор
Международный исследовательский институт интеллектуальных материалов ЮФУ



КОВАЛЬЧУК
Михаил Валентинович
член-корреспондент РАН, профессор, президент НИЦ «Курчатовский институт»

Введение

Изучение структуры белковых растворов методом малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР) позволяет изучить особенности взаимодействия белков друг с другом и с другими органическими и неорганическими компонентами, участвующими в биологических процессах.

Обычно для проведения измерений методом МУРР используются проточные [1] или закрытые с одного конца [2] кварцевые капилляры. При горизонтальном расположении капилляра его верхняя и нижняя стенки работают как элементы рентгеновской оптики с отрицательным показателем преломления и эффектом полного внешнего отражения рассеянного в воздухе излучения. В результате детектор концентрирует в вертикальном направлении слабый ореол рассеянного в воздухе излучения, а в горизонтальном направлении этот эффект занимает больший угловой диапазон. Таким образом, цилиндрический капилляр приводит к анизометричной картине рассеяния, измеряемой двумерным детектором. Кюветы с плоскопараллельными стенками свободны от этих нежелательных эффектов. Кроме того, использование многоразовых кювет позволяет сократить расход одноразовых материалов. Плоские ячейки позволяют работать с большими сечениями пучка, что иногда требуется для радиационно-чувствительных образцов. Кроме того, они позволяют легко контролировать толщину образца, что очень важно для сильно поглощающих объектов. На различных зарубежных синхротронах было разработано несколько типов плоских ячеек [3–6]. В случае данных ячеек [3–6] существует ограничение, связанное с тем, что они имеют одну измерительную полость.

Для изучения структуры различных объектов методами рассеяния синхротронного и нейтронного (МУРН) излучения можно применять микрофлюидные устройства –

как для изучения непосредственно взаимодействий макромолекул [7, 8] и функционально значимых движений доменов в них [9], так и для механизмов и кинетики во время генерации самособирающихся наноструктур [10–13], механизмов зародышеобразования и роста кристаллов [14] и др. Существует достаточно много работ [15, 16], обосновывающих использование микрофлюидных ячеек для МУРР-МУРН-исследований структур в растворах. Часто эти ячейки разрабатываются и оптимизируются для конкретных случаев. Например, в работе [17] показана ячейка для изучения липидного обмена между наночастицами цитрема и мицеллярными растворами этанола, а в работе [18] динамика молекул ПАВ в растворе изучается методами МУРР, микрокопии и реологии.

В настоящей работе описываются разработанные конструкции ячеек микрообъема для исследований структуры растворов методом МУРР, отличающихся типом подключения входных трубок, геометрией резервуара для образца и наличием/отсутствием смесителя компонентов раствора и ловушки для пузырьков воздуха. Установлены критически важные и опциональные элементы ячеек для обеспечения ее работы.

Рассмотрены особенности двумерных рентгенограмм и проведено сравнение уровня сигнала в данных МУРР от растворов белка лизоцима и $\text{KН}_2\text{РO}_4$ с использованием плоскопараллельных ячеек и в стандартном кварцевом капилляре. Продемонстрировано существенное улучшение качества сигнала в данных МУРР и повышение надежности результатов анализа.

Материалы и методы

Образцы

Кристаллы дигидрофосфата калия (KDP , $\text{KН}_2\text{РO}_4$) были выращены в Институте кристаллографии (Комплекс кристаллографии и фотоники НИЦ «Курчатовский институт»). Далее для определения структуры кристаллизационного раствора был приготовлен водный раствор KDP с концентрацией 501 мг/мл на основе ультрачистой воды Millipore (18 МОм·см). Температура насыщения данного раствора составляет 60°C [19]. Раствор KDP нагревался и выдерживался при 95°C до полного растворения кристаллов. Для того чтобы избежать повторной кристаллизации вследствие изменения температуры в процессе загрузки раствора в измерительный объем, исследуемый образец выдерживался в термостатируемом объеме при температуре 90°C в течение 2 ч. Затем температура образца плавно снижалась до температуры 2°C.

Также проводили испытания на кристаллизационных растворах лизоцима (в условиях роста тетрагональной сингонии). Для этого один канал ячейки заполняли раствором лизоцима, второй – осадителя, третий – натрий-ацетатного буфера. Для загрузки растворов в каналы использовали шприцевые насосы, одноразовые пластиковые шприцы и РЕЕК трубки.

Для приготовления образцов использовали очищенный лизоцим из куриного яйца (HEWL) фирмы Sigma (CAS#12650-88-3) без дополнительной очистки и в качестве осадителя – хлорид натрия с высоким классом чистоты фирмы Helicon (CAS#7647-14-5). В качестве растворителя была использована ультрачистая вода Millipore (18 МОм·см). Лизоцим и хлорид натрия растворяли в 0.2 М натрий-ацетатном буфере (далее буфер) с $pH=4.5$ фирмы Helicon (CAS#6131-90-4). Все растворы фильтровали с помощью мембранных шприцевых фильтров Millex с размером пор 0.22 мкм, а раствор белка центрифугировали в течение 10 мин с частотой 10 000 об./мин. Конечные концентрации белковых растворов и осадителя в экспериментах варьировались от 0 до 80 мг/мл и от 0 до 25 мг/мл соответственно.

Измерения МУРР

Измерения МУРР осуществляли на станции «БиоМУР» Курчатовского источника синхротронного излучения (НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия) [2]. Применяли монохроматическое излучение с длиной волны 0.144 5 нм (энергия излучения 8.58 кэВ). Расстояние образец–детектор составляло 700 мм, что соответствовало угловому диапазону вектора рассеяния $s=0.1\text{--}6.0\text{ нм}^{-1}$, где $s=4\pi\sin(\theta)/\lambda$, 2θ – угол рассеяния, λ – длина волны рентгеновского излучения.

Методика обработки данных МУРР

Первичная обработка экспериментальных малоугловых данных, радиальное усреднение проводились с помощью программы FIT2D [20]. С использованием программы PRIMUS [21] из кривых рассеяния растворов KH_2PO_4 и лизоцима вычиталось рассеяние раствора растворителя. Средний радиус инерции частиц R_g оценивался по приближению

Гинье [22] и с помощью непрямого фурье-преобразования программой GNOM [23].

Для определения объемных долей кластеров-прекурсоров растворов лизоцима и KDP использовалась программа OLIGOMER [21]. Кристаллографические модели олигомерных кластеров образцом были построены по методике, описанной в [24]. Расчет теоретических кривых олигомерных компонентов проводился с помощью программы CRY SOL [25].

Держатель ячеек

Для получения картин МУРР с использованием ячеек микрообъема на станции «БиоМУР» Курчатовского источника синхротронного излучения (НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия) был спроектирован и изготовлен универсальный держатель (рис. 1) с возможностью поддержания заданной температуры.

Держатель с габаритными размерами 150×100×22 мм состоит из трех частей: основания, системы скалок с опорными кронштейнами и теплообменного столика.

Основание (1) выполнено из алюминиевого сплава и согласовано по присоединительным размерам с X–Y

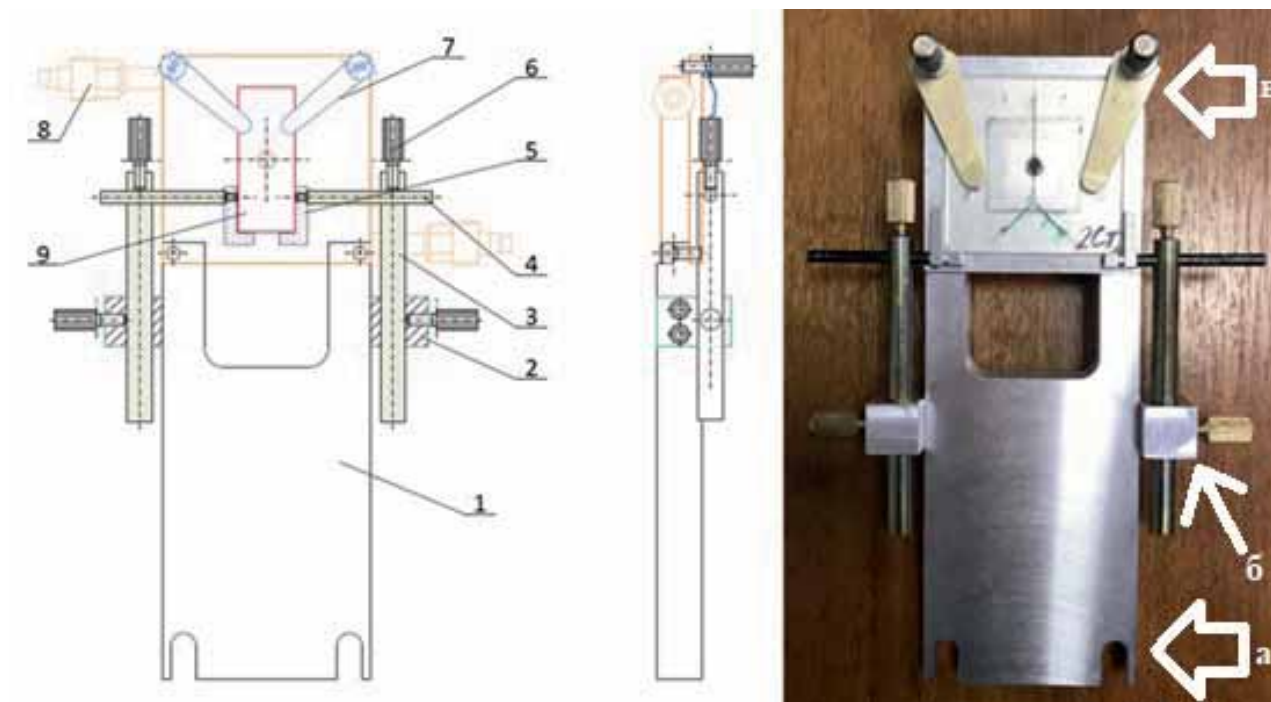


Рис. 1. Чертеж (слева и по центру) и фотография (справа) держателя микрофлюидной ячейки монолитного типа: 1 – основание; 2 – зажимы системы скалок; 3, 4 – система скалок; 5 – опорные Г-образные кронштейны; 6 – стопорные винты; 7 – теплообменный стол.

кареткой станции «БиоМУР». На боковые стороны основания закреплены хомуты (2) системы скалок, в верхней части предусмотрены отверстия для крепления теплообменного столика.

Система скалок (3, 4) предназначена для изменения и фиксации положения опорных Г-образных кронштейнов (5), на которые устанавливается ячейка при совмещении ее оптической оси с осью пучка СИ. Диапазоны регулировки: по ширине кюветы 8–50 мм, по расстоянию от нижнего торца ячейки до оси пучка: 0–40 мм. Фиксация выбранного положения системы осуществляется стопорными винтами (5) с рифлением. За счет такой системы винтов, позиционирующих ячейку, держатель можно использовать для ячеек различных размеров.

Теплообменный столик размерами 50×50 мм выполнен из меди и оборудован двумя упругими ламелями, с помощью которых осуществляется прижим кюветы к столику для установки необходимой температуры исследуемого раствора в процессе измерений. В центре столика предусмотрено сквозное отверстие диаметром 4 мм для пучка СИ. В столике имеется полость, в которой циркулирует охлаждающая жидкость, подаваемая термостатом JulaboFP-89NL, по каналам внутри латунной шайбы с обратной стороны держателя.

Изготовление ячеек

Для проведения измерений на станции «БиоМУР» Курчатовского источника синхротронного излучения (НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия) были спроектированы, изготовлены и протестированы ячейки микрообъема, различающиеся по количеству и конфигурации

входных каналов, форме резервуара, материалу ячеек и способу их изготовления.

Ячейка микрообъема с плоскопараллельными окнами

Ячейка представляет собой многослойную структуру. С внешних сторон располагаются пластины из стали с отверстиями для прохождения рентгеновского излучения (рис. 1, [26]). Между пластинами находится пленка из слюды, которая закрывает отверстия и служит рентгенопрозрачными окнами ячейки с оптимальными характеристиками (см. раздел «Выбор материала окон»). Толщина слюдяных пленок составляла 30 мкм, пластины были изготовлены по ГОСТ 13750-88, марка СОВ.

Между двумя слюдяными пленками располагается еще одна стальная пластина, высота этой пластины создает необходимую высоту резервуара образца. В резервуарах помещаются уплотнительные кольца из фторкаучука с внутренним диаметром 4 мм, внешним диаметром 6 мм, толщиной 1.4 ± 0.1 мм (004-006-14 ГОСТ 9833-73), которые позволяют герметизировать резервуар с образцом и скомпенсировать давление пластины, а также минимизировать контакт образцов с металлическими пластинами. Все части ячейки скрепляются равномерно расположенными винтами.

Ячейка состоит из двух резервуаров объемом примерно 18 мкл: один для образца, другой для растворителя образца. Такая конфигурация позволяет загрузить и исследовать за один раз и образец, и растворитель, что экономит время по сравнению с последовательной загрузкой. Это является преимуществом по сравнению с другими ячейками, используемыми в зарубежных синхротронных центрах, которые имеют только одну полость для образца [3–6].

Загрузка образца осуществляется в разобранной ячейке с помощью микропипеток. После загрузки образца и растворителя ячейка собирается и помещается в термостатируемый держатель, описанный выше.

Микрофлюидные ячейки составного типа

Ячейки изготовлены из полиметилметакрилата (ПММА), состоят из трех слоев с размерами 40×40×1.2 мм. В первом слое (рис. 2а) располагаются: сквозные отверстия, предназначенные для ввода и вывода жидкости в ячейку, а также для позиционирования ячейки в металлическом держателе; сквозное отверстие в центре, служащее резервуаром для жидкости; вокруг отверстия под резервуар сделана выборка материала на глубину 1 мм под клейку кварцевых окон.



Рис. 2. Изображение первого (а), второго (b) и третьего (с) слоев микрофлюидной ячейки составного типа.

Во втором слое (рис. 2b) располагаются: сквозное отверстие-резервуар; каналы, которые соединяют отверстия ввода и вывода жидкости с резервуаром. С обратной стороны резервуара сделана выборка под клею кварцевого окна.

В третьем слое (рис. 2c) располагается сквозное квадратное отверстие 30×30 мм. Этот слой предназначен для добора полной толщины кюветы до размера приемной щели держателя.

Формирование каналов, отверстий и углублений производилось с помощью лазерного гравера VersaLaser VLS .50. Лазерный гравер VLS 3.50 оснащен инфракрасным CO₂ лазером мощностью 50 Вт и длиной волны 10.6 мкм. После слоя ПММА складываются вместе так, чтобы исключить их взаимное смещение, и термически свариваются в единую конструкцию. Помимо ПММА, в ячейке используются окна для ввода и вывода синхротронного излучения. Окна вклеиваются в предварительно выбранные четверти при помощи специального силиконового герметика/клея повышенной текучести. Кварцевые окна (толщиной 60 мкм, также являющиеся рентгенопрозрачными, как было показано в работе [27]) монтировались в нишах путем склейки.

Были сделаны ячейки с разными вариантами форм резервуара для жидкостей: квадратная, круглая, ромбовидная (рис. 3). Размер резервуара определялся исходя из характеристик пучка на станции «БиоМУР» КИСИ: глубина резервуара (длина пути рентгеновского пучка через образец) для всех ячеек составляла 1 мм; размеры резервуара в плоскости, перпендикулярной пучку, составили 4×4 мм для квадратной и круглой форм, 6×3 мм для ромбовидной формы. Количество входных каналов варьировалось от 0 до 2 (открытые, одноканальные, двухканальные ячейки), с использованием меандра для смешивания жидкостей и без него (рис. 3). Каналы в сечении имели форму полукруга, ширина канала около 1 мм.

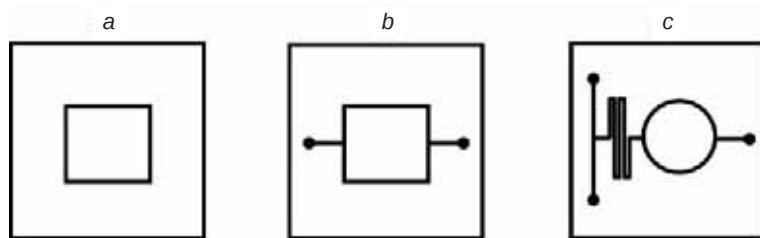


Рис. 3. Схематическое изображение открытой (a), одноканальной (b) и двухканальной (c) ячеек.

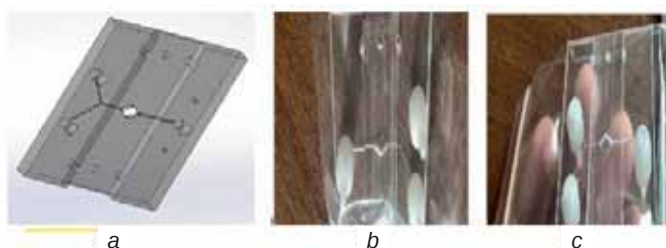


Рис. 4. 3D-модель микрофлюидной ячейки монолитного типа (a), фотография микрофлюидной ячейки монолитного типа с фитингами спереди (b) и сзади (c).

Микрофлюидные ячейки монолитного типа

В монолитных ячейках с разрезами для фитингов в корпусе ячеек (рис. 4) каналы и отверстия чипа были изготовлены методом фрезерования при помощи трехосевого фрезерного станка с числовым программным управлением («Волжанин»-1-0609, RUS-CNC, г. Пушкино, Россия). Для корпуса чипа были использованы коммерчески доступные прозрачные монолитные листы (толщиной 3 мм). Во время экспериментов были использованы и проверены монолитные листы из разных полимеров: поликарбоната (ПК, Polycarbonate Arla, Macroclear толщиной 3 мм), полиметилметакрилата (ПММА, ПММА TOCH, MACSTAR толщиной 3 мм) и полистирола (ПС, Полистирол GPPS, Novattro толщиной 3 мм). Для изготовления разъемов с фитингом был использован монолитный лист из поликарбоната (ПК, Borrex толщиной 5.65 мм).

Сборка ячейки проводилась после визуальной проверки и стерилизации. Нижняя сторона ячейки и лунка посередине чипа с верхней стороны герметизировалась при помощи прозрачной самоклеящейся пленки («ПКФ Современные технологии», Артикул Р-500).

Резервуар ячеек для жидкостей был ромбовидной формы, глубина резервуара (длина пути рентгеновского пучка через образец) для всех ячеек составляла 1 мм, размеры резервуара в плоскости, перпендикулярной пучку – 6×3 мм. Количество входных каналов равнялось 2 (двухканальные ячейки) с шириной от 100 до 400 мкм.

Микрофлюидные многоканальные устройства были напечатаны с помощью технологии Digital Light Processing 3D (DLP 3D, один из методов аддитивного производства, в котором для построения объектов применяются жидкие фотополимерные смолы, затвердевающие в результате воздействия света, излучаемого цифровыми светодиодами).

одными проекторами). Для печати использовали 3D-принтер Asiga UV MAX (Asiga, Австралия, Сидней) с длиной волны 385 нм и интенсивностью света 7.25 МВт/см².

Ячейка с габаритными размерами 30×15×6 мм представляет собой пяти-слойную структуру [28], соединенную в пакет с помощью винтов. Тело ячейки (рис. 5с) и прижимная платформа (рис. 5d) изготовлены из фотополимерной смолы методом 3D-печати. Исследовательская камера, через которую проходит рентгеновский пучок (FWHM 0.48×0.26 мм, полный Гаусс 1.7×1.2 мм), расположена в центре ячейки и образована сквозным отверстием диаметром 3 мм в теле ячейки, закрытом с двух сторон рентгенопрозрачными окнами, выполненными из оптической слюды марки COB толщиной 30 мкм (рис. 5b).

Необходимая температура раствора в диапазоне 0–40°C устанавливается с помощью внешнего термостата, с теплообменником которого соприкасается металлическое основание ячейки.

Загрузка жидкости в микрофлюидные ячейки осуществлялась с использованием шприцевых насосов (Shenchen SPLab-04, Китай). Скорость подачи жидкости варьировалась от 5 мкл/мин до 500 мкл/мин.

Обсуждения и результаты

Выбор материала окон

Для изготовления измерительных ячеек, подходящих для исследования жидких образцов методом МУРР, необходимо было подобрать окна из рентгенопрозрачных материалов. Материал для окон должен был быть некристаллическим, иметь малое рассеяние вблизи малых углов, химически нейтральным и прочным для того, чтобы выдержать внутреннее давление, создаваемое потоком жидкости в ячейке, а также тонким, чтобы избежать сильного поглощения рентгеновского излучения.

Были проведены измерения малоуглового рассеяния пленок из

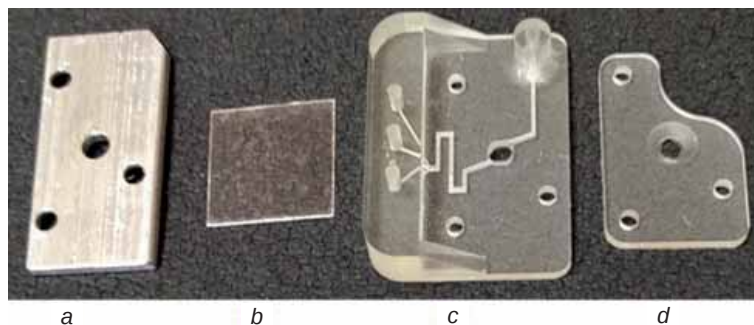


Рис. 5. Многоканальная микрофлюидная измерительная ячейка: а – основание, b – рентгенопрозрачное окно, с – тело ячейки, d – прижимная платформа.

различных материалов толщиной от 9 мкм до 1.25 мм на лабораторной установке «АМУР-К» (НИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, Москва, Россия) с однокоординатным позиционно-чувствительным детектором ОДЗМ при фиксированной длине волны излучения 0.154 2 нм (CuK_α -линия острофокусной трубки, монохроматор из пиролитического графита) и коллимационной системой Кратки. Сечение рентгеновского пучка составляло 0.2×8 мм, область углов рассеяния соответствовала диапазону значений модуля вектора рассеяния $0.1 < s < 10.0 \text{ нм}^{-1}$.

Образцы помещали в вакуумную камеру. Расстояние образец–детектор составляло 700 мм. Время измерений одного образца – 10 минут.

Экспериментальные данные МУРР различных типов пленок представлены на рис. 6.

Слишком большое рассеяние вблизи малых углов наблюдается у пленок из фторопласта, полиэтилентерефталата, каптона, майлара, полипропилена. Такие пленки не подходят для проведения малоугловых экспериментов. Пленки из циклоолефинового сополимера, а также пленки для ПЦР и покровные Hampton Research не полностью аморфные, так как имеют широкий дифракционный пик в районе $s \approx 1.0 \text{ Å}^{-1}$, при этом наблюдается и существенное рассеяние от образцов в области малых углов. Пленки из полимера толщиной 1.25 мм и Ibioli толщиной 180 мкм имеют небольшое рассеяние, но из-за большой толщины сильно поглощают. Все перечисленные пленки также не подходят под материалы для окон измерительной ячейки.

Слюда для АСМ толщиной 75 мкм и слюда толщиной 40 мкм, полистирол конденсаторный К7-14 толщиной 23 и 30 мкм имеют малое рассеяние вблизи малых углов и слабо поглощают. Данные материалы подходят для использования их в качестве окон измерительных ячеек.

Сравнение картин рассеяния, полученных для растворов лизоцима и KDP в капиллярах и плоскопараллельных ячейках

В случае использования стандартных капилляров для образцов при регистрации картин МУРР пучок СИ проходит путь до образца, рассеиваясь на воздухе. Затем, попадая на держатель, излучение частично поглощается капилляром и рассеивается им же, а также присутствующим внутри рас-

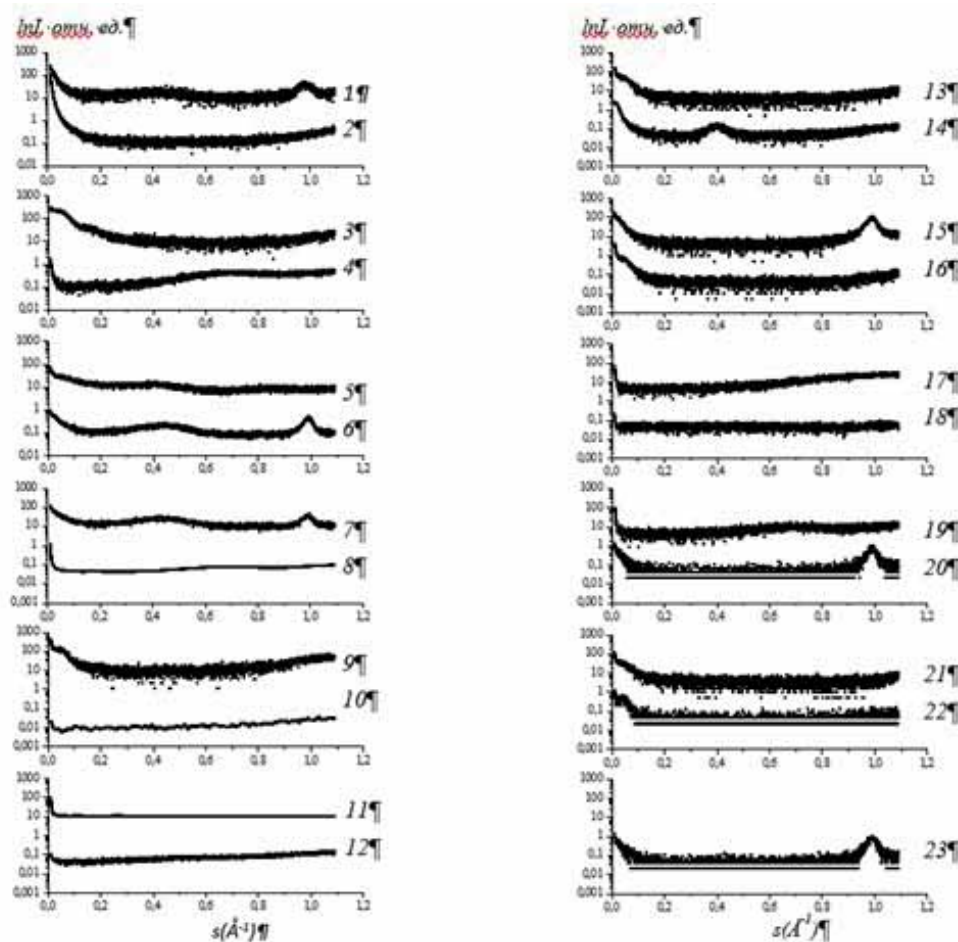


Рис. 6. Экспериментальные кривые МУРР пленок различной толщины: 1 – покровная пленка Hampton Research с клеевым слоем (50 мкм); 2 – фторопласт (9 мкм); 3 – полиэтилентерефталат Decolux (65 мкм); 4 – полистирол (220 мкм); 5 – каптон с клеевым слоем (45 мкм); 6 – циклоолефиновый сополимер с клеевым слоем (50 мкм); 7 – пленка для ПЦР (100 мкм); 8 – полистирол конденсаторный К7-14 (30 мкм); 9 – полистирол (50 мкм); 10 – Ibioli (180 мкм); 11 – слюда (40 мкм); 12 – полимер (1.25 мм); 13 – полиэтилентерефталат (13 мкм); 14 – каптон (45 мкм); 15 – полипропилен (25 мкм); 16 – майлар металлизированный (13 мкм); 17 – полилактид (90 мкм); 18 – слюда для АСМ (75 мкм); 19 – полистирол конденсаторный К71-4 (23 мкм); 20 – циклоолефиновый сополимер (50 мкм); 21 – пленка конденсаторная (8 мкм); 22 – майлар (10 мкм); 23 – покровная пленка Hampton Research (45 мкм).

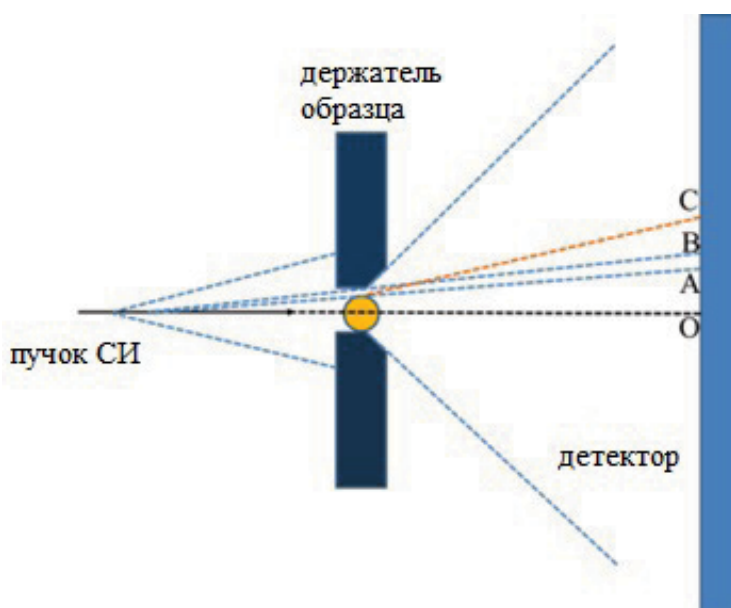


Рис. 7. Схема возникновения артефактов на детекторе при съемке в капилляре. Отрезок АВ – рассеянное до образца излучение, не поглотившееся образцом; отрезок ВС – излучение, спровоцированное эффектом полного внешнего отражения рассеянного излучения от стенок капилляра.

твором образца (что и дает полезный сигнал для дальнейшей обработки). Если диаметр капилляра оказывается чуть меньше размера отверстия в держателе, рассеянное до капилляра излучение проходит беспрепятственно дальше, рассеивается еще сильнее и в конечном счете оставляет заметную «тень» на детекторе (отрезок АВ на рис. 7). При горизонтальном расположении капилляра его верхняя и нижняя стенки работают как элементы рентгеновской оптики с отрицательным показателем преломления и эффектом полного внешнего отражения рассеянного на воздухе излучения. В результате на детекторе происходит концентрирование в вертикальном направлении слабого гало рассеянного на воздухе излучения, причем в горизонтальном направлении этот

эффект занимает большой угловой диапазон (отрезок ВС на *рис. 7*).

Подобные артефакты имеют значительную интенсивность по сравнению с полезным сигналом МУРР и плохо поддаются учету и маскированию из-за различий размеров (до 30%) и положений капилляров, используемых в эксперименте. Необходимо интегрировать рентгенограмму отдельно в областях внутри капилляра, вне капилляра, исключив из области интегрирования артефакты засветки, а затем сшивать две полученные кривые по области общих углов рассеяния.

Для сравнения качества данных МУРР, полученных в ячейке с плоскими окнами и в кварцевом капилляре, были проведены тестовые измерения. В работе [26] на *рис. 2* представлены двумерные рентгенограммы растворов лизоцима в капилляре (*a*) и в ячейке (*b*).

Наличие теневых областей на рентгенограмме при проведении экспериментов в капилляре приводит к тому, что для интегрирования без искажения конечной кривой МУРР остается доступной только область внутри капилляра, с чем можно ознакомиться в работе [26] на *рис. 3*. Попытки интегрирования в более широкой области приводят к тому, что вклад в интенсивность кривой МУРР начинают давать также эти теневые области, искажая сигнал.

При использовании ячейки с плоскопараллельными окнами удалось полностью устранить все вышеперечисленные недостатки и получить изотропную картину рассеяния. Таким образом, проводить интегрирование стало возможно по всей рабочей области детектора, на порядок и более увеличивая регистрируемую интенсивность рассеяния. Влияние нерабочих промежутков детектора в таком случае сводится к нулю, поскольку практически всем неактивным точкам (пикселям) детектора, соответствующим нулевой интенсивности в каком-то конкретном угле рассеяния, будет соответство-

вать также и полезный сигнал при другом азимуте интегрирования, причем число таких азимутов будет значительно превышать число «пустых» азимутов.

На *рис. 4* в статье [26] показаны кривые МУРР от растворов лизоцима, с использованием капилляра и ячейки.

На основе полученных данных для лизоцима с концентрацией 40 мг/мл была проведена оценка общего уровня шума полученных кривых МУРР методом наименьших квадратов. Отношение среднеквадратичных отклонений к максимуму интенсивности рассеяния в капилляре при использовании интегрирования только внутри капилляра (красная область на *рис. 8a*) составило $(1.31 \pm 0.14) \cdot 10^{-1}$, при использовании интегрированной сшивки данных – $(1.57 \pm 0.19) \cdot 10^{-2}$. При использовании ячейки с плоскопараллельными окнами отношение среднеквадратичных отклонений к максимуму интенсивности рассеяния (без интегрированной сшивки) составило $(8.45 \pm 0.55) \cdot 10^{-3}$.

Использование такой ячейки для слабо рассеивающих и сильно поглощающих образцов должно существенно повысить качество данных и результат обработки. Для оценки улучшения качества данных при использовании ячейки, по сравнению с данными при использовании капилляра, было проведено измерение насыщенных и ненасыщенных растворов KH_2PO_4 (KDP). Измерения проводились начиная с температуры 90°C, при такой температуре раствор KDP является ненасыщенным. Далее температура снижалась, и при достижении температуры 60°C раствор становился насыщенным, дальнейшее понижение температуры продолжалось до температуры 2°C.

На *рис. 5* из статьи [26] представлено сравнение экспериментальных кривых МУРР растворами KDP в капилляре и в ячейке.

Уровень шума экспериментальных данных МУРР раствора KDP, как и в случае с раствором лизоцима, также оказывается значительно ниже при использовании ячейки по сравнению со стандартным кварцевым капилляром. Таким образом, увеличение области интегрирования данных с детектора при использовании ячейки позволяет существенно улучшить качество кривых МУРР даже для слабо рассеивающих и сильно поглощающих образцов.

Конструкция ячейки с плоскопараллельными окнами была герметична на всем протяжении эксперимента при высоких и низких температурах. Тепловое расширение элементов ячейки при изменении температуры не повлияло ни на герметичность, ни на качество экспериментальных данных МУРР.

В растворе KDP при переходе из ненасыщенного состояния в пересыщенное с образованием кристаллов тетрагональной сингонии образуются кластеры-прекурсоры, как было показано в работах [24, 29]. В работе [29] был исследован раствор KDP с концентрацией 335 мг/мл, что соответствует температуре насыщения 40°C. При увеличении в растворе концентрации KDP заметно увеличивается поглощение, что ухудшает качество сигнала экспериментальных

данных МУРР. Поэтому исследование образования кластеров-прекурсоров в растворе KDP с концентрацией 501 мг/мл, формирующихся при кристаллизации, было проведено с использованием ячейки с плоскопараллельными окнами.

Малоугловые измерения проводили в диапазоне температур от 90 до 2.5°C. Экспериментальные данные и наилучшие приближения представлены в исследовании [26].

Было установлено, что значение радиуса инерции R_g увеличивается при понижении температуры, что свидетельствует об увеличении средних размеров частиц в растворе KDP.

Тестирование микрофлюидных ячеек

При тестировании ячеек, изготовленных из поликарбоната, полиметилметакрилата и полистирола, с резервуарами различной конфигурации и с разным числом входных каналов было обнаружено образование пузырей в измерительном резервуаре, что может существенно исказить данные рассеяния. Также при многократном заполнении ячейки разгерметизировались. Учитывая обнаруженные проблемы с заполнением ячеек, резервуар двухканальной ячейки изменили на ромбовидный для предотвращения появления и заставания пузырей (рис. 8а).

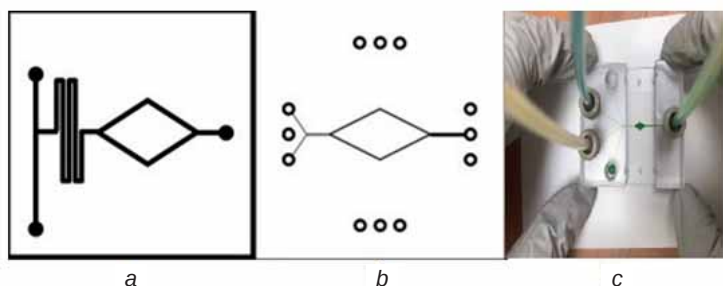


Рис. 8. Схематичное изображение двухканальной ячейки с ромбовидным резервуаром (а), схематичное изображение монолитной двухканальной ячейки с ромбовидным резервуаром (б). Микрофлюидная ячейка из полистирола с четырьмя входными и одним выходным каналом (с). Образцы загружались только через два входных канала. Для визуализации результата смешивания растворов использовались желтый и синий красители, при смешении которых в измерительном резервуаре образовывался раствор зеленого цвета.

В данном типе ячеек при загрузке жидкости также образовались пузыри в измерительном резервуаре. При многократном заполнении конструкция ячеек разрушалась и становилась негерметичной.

Отличие монолитных двухканальных ячеек с ромбовидным резервуаром (рис. 8б) от сборных ячеек состоит в соединении ячейки с трубками. В данных типах ячеек соединение осуществлялось посредством фитингов, которые вкручивались в ячейку. Также вместо окон из кварца в ячейках резервуар закрывала пленка циклоолефинового сополимера.

При подаче с каждого канала в резервуар поступала равномерно смешанная жидкость, при этом в резервуаре также образовались пузыри. Далее жидкость загружалась через герметичный канал. При снижении скорости до 5 мкл/мин пузыри отсутствовали. После продувки воздухом и многократном заполнении жидкости со скоростью 5 мкл/мин в резервуаре пузыри не образовались, жидкость смешивалась равномерно. В месте соединения фитингов ячейки были негерметичны.

В результате тестирований различных типов ячеек обнаружено, что сборные ячейки неустойчивы к давлению жидкости внутри ячейки и в данном типе образуются пузыри, которые препятствуют проведению малоугловых исследований. Монолитные типы ячеек более устойчивы к различным внутренним давлениям.

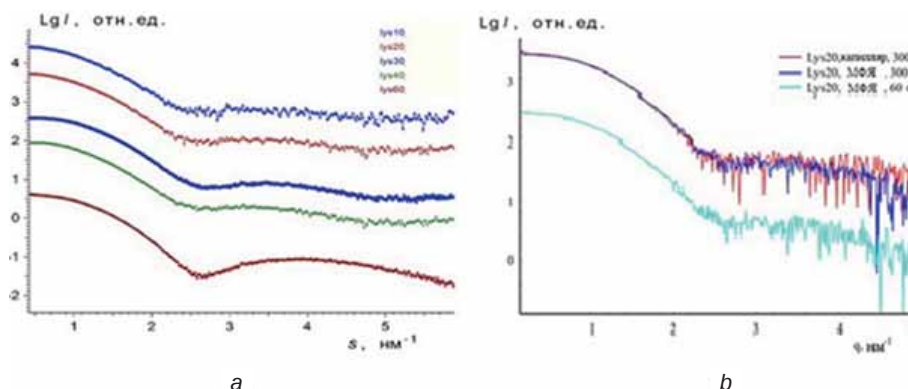


Рис. 9. Экспериментальные кривые малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР) (а) от раствора лизоцима с использованием микрофлюидной ячейки (станция «БиоМУР»). Для лучшей визуализации кривые смещены друг относительно друга по вертикальной шкале. Концентрации белка – 10, 20, 30, 40, 60 мг/мл (нумерация идет сверху вниз). Экспериментальные кривые интенсивности МУРР (б) от раствора лизоцима (20 мг/мл) с NaCl (5 мг/мл) – при экспозиции 300 с в капилляре (красным), в микрофлюидной ячейке (синим), при уменьшении экспозиции до 60 с (голубым).

Также была подобрана оптимальная скорость заполнения каналов для данного типа ячеек, исключающая образование пузырей в резервуаре.

Конструкция ячейки была доработана с возможностью многоканальной подачи компонентов образца (рис. 8с).

Экспериментальные кривые малоуглового рассеяния от лизоцима при различных концентрациях белка с использованием ячейки показаны на рис. 9а. Кривая 1 (с наименьшей концентрацией белка 10 мг/мл) хорошо согласуется с теоретической кривой от мономерной структуры лизоцима (PDB ID: 6QWW), тогда как при повышении концентрации наклон кривых в области малых углов ($s < 1.0 \text{ нм}^{-1}$) уменьшается, что обусловлено усилением эффекта отталкивающего межчастичного взаимодействия.

На рис. 9б показаны малоугловые кривые, полученные от раствора лизоцима (концентрация 20 мг/мл) и осадителя (5 мг/мл NaCl) через разное время после начала подачи раствора NaCl к чистому раствору белка. Для кривых, полученных вычитанием данных от буферного раствора из данных от раствора с лизоцимом при времени экспозиции в 300 с, отношение среднеквадратичных отклонений в интервале q от 2.5 до 3.5 нм^{-1} к среднему уровню сигнала рассеяния при использовании интегрирования только внутри капилляра составило $3.29 \cdot 10^{-1}$, что является очень высоким значением. При использовании микрофлюидной ячейки отношение среднеквадратичных отклонений к среднему уровню сигнала при том же времени экспозиции составило $2.14 \cdot 10^{-2}$. Для экспозиции в 60 с при использовании микрофлюидной ячейки отношение сигнал/шум оказалось равным $4.61 \cdot 10^{-2}$.

Уменьшение экспозиции на порядок без существенной потери качества кривых МУРР, в свою очередь, дает возможность проводить исследования динамики процессов, происходящих при заполнении ячейки. Для

испытания микрофлюидной ячейки при проведении такого рода исследований в каналы осуществлялась подача: 1) NaAc буферного раствора pH 4.5; 2) очищенного раствора лизоцима; 3) хлорида натрия. Далее давалась команда на старт заполнения ячейки только раствором 1 со скоростью 1 мкл/мин и выдерживалось время 10 мин, в течение которого, как ожидалось исходя из технических характеристик, указанных выше, микрофлюидная ячейка полностью заполнялась раствором 1. После этого запускалась серия непрерывных экспозиций длительностью 60 с детектором станции «БиоМУР» и одновременно давалась команда на старт подачи растворов лизоцима и/или осадителя. Сначала к буферному раствору добавлялся раствор лизоцима одной из трех концентраций – 10, 20, 40 мг/мл и проводилась съемка рентгенограмм в течение 10 мин (10 экспозиций). Затем к раствору лизоцима добавлялся раствор хлорида натрия (осадителя), концентрация которого ступенчато повышалась каждые 10 мин значениями 12, 18, 24 мг/мл. Таким образом, суммарное время проведения эксперимента с каждой из концентраций раствора лизоцима составило 40 мин, а всего было записано 120 экспозиций (по 40 для каждой из трех концентраций).

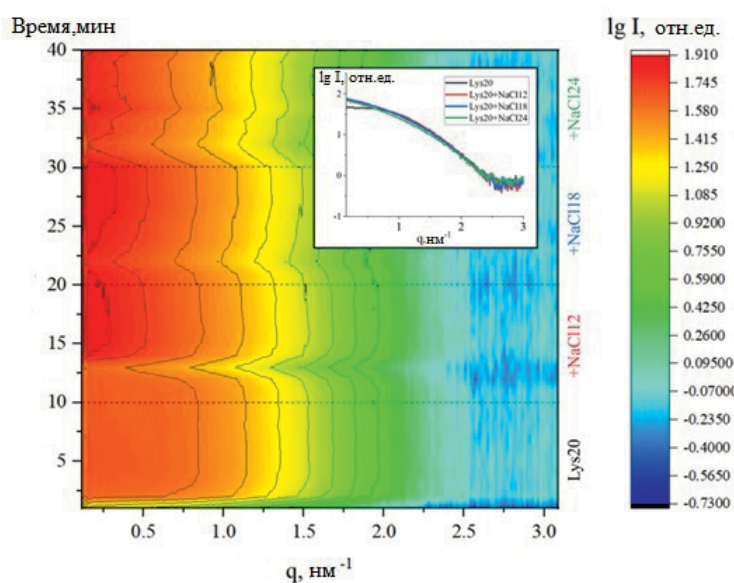


Рис. 10. Интенсивность рассеяния (цвет) в зависимости от вектора рассеяния и времени, полученная для серии растворов лизоцима концентрации 20 мг/мл с различными концентрациями осадителя (0–24 мг/мл) (интенсивности получены после вычитания соответствующих сигналов буфера). Сплошными линиями показаны уровни одинаковой интенсивности.

На рис. 10 приведены двумерные контурные графики, полученные при измерении полной партии раствора лизоцима 20 мг/мл с различными концентрациями осадителя (0–24 мг/мл), где цветом показана интенсивность рассеяния (после вычитания соответствующего сигнала буфера) в зависимости от вектора рассеяния и времени. Хорошо видно, что стабилизация растворов происходит после пятой минуты от начала. Типичные результаты экспериментальных данных рассеяния лизоцима и лизоцима с осадителем и модельные кривые представлены на рис. 11.

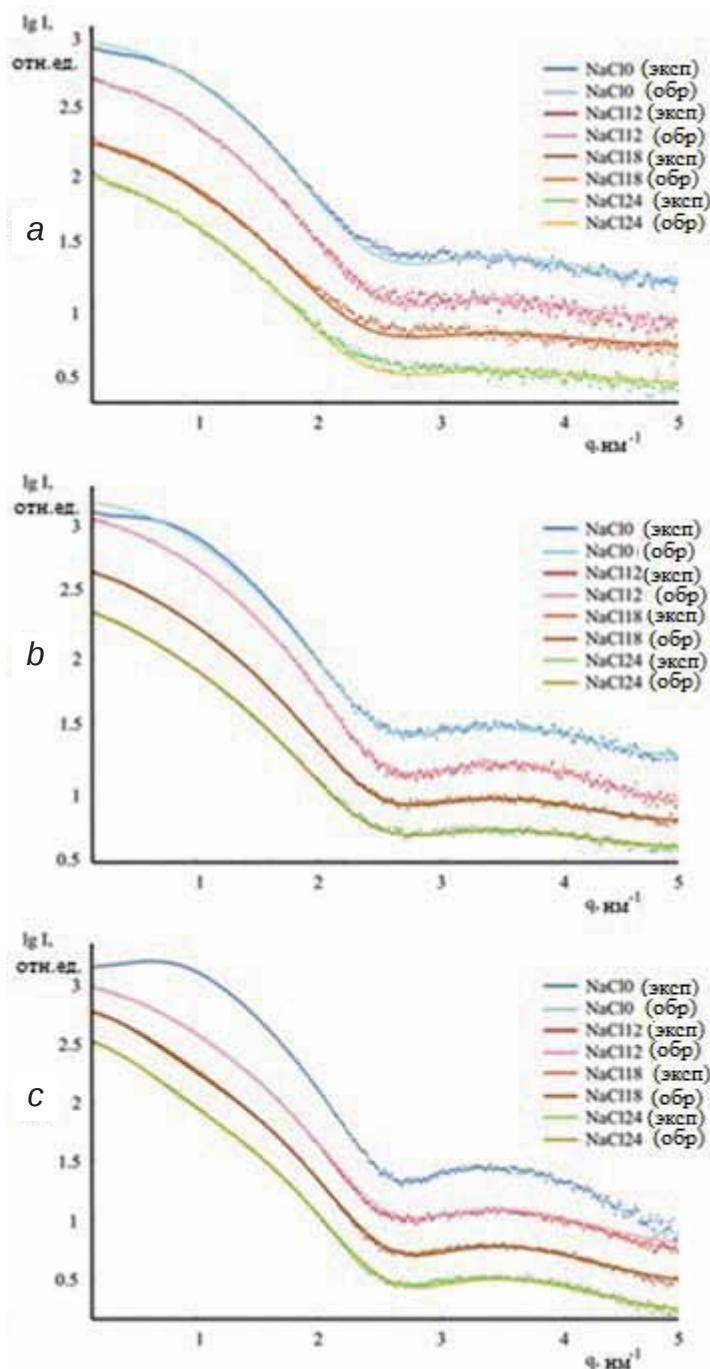


Рис. 11. Результирующие (вычитенные) экспериментальные кривые интенсивности МУРР (точки) и модельные кривые (линии), рассчитанные программой OLIGOMER, от растворов лизоцима с концентрацией 10 мг/мл (а), 20 мг/мл (б) и 40 мг/мл (с). Концентрация осадителя NaCl менялась от 12 до 24 мг/мл (с шагом 6 мг/мл). Кривые смещены по вертикали для лучшей визуализации. Измерения выполнены в проточной многоканальной микрофлюидной ячейке при температуре 20°C.

В результате обработки экспериментальных данных с использованием кристаллографических моделей олигомеров, выделенных из структуры кристалла лизоцима тетрагональной сингонии, был получен олигомерный состав растворов лизоцима и лизоцима с осадителем хлоридом натрия. Радиус инерции (R_g) частиц, присутствующих в кристаллизационных растворах лизоцима и лизоцима с хлоридом натрия, увеличивается при добавлении осадителя с $R_g = 1.41 \pm 0.03$ нм (без осадителя) до $R_g = 2.53 \pm 0.04$ нм (при добавлении 24 мг/мл осадителя

NaCl), что указывает на образование более крупных частиц в растворе лизоцима с осадителем. Использование кристаллографических моделей – димера, тетрамера, гексамера, октамера – при обработке экспериментальных данных позволило определить тип олигомеров и объемные доли каждого из типов олигомеров, содержащихся в растворах. В растворе лизоцима без осадителя обнаружено 100% мономеров, а в растворе лизоцима с осадителем обнаружены октамеры с объемными долями в диапазоне от 1.3% до 10.9%, а также были обнаружены димеры с объемными долями в диапазоне от 0.8% до 2.0%. При этом не обнаружено присутствия промежуточных олигомеров, таких как тетрамеры и гексамеры и более крупные олигомеры. Результаты анализа данных МУРР представлены в табл. 1.

Тенденция увеличения доли октамеров при увеличении концентраций белка либо осадителя находится в согласии с ранее полученными результатами на стандартных кварцевых капиллярах [30].

Выводы

Разработаны плоскопараллельные ячейки микрообъема для проведения структурных исследований растворов методом МУРР с использованием синхротронного излучения. При использовании ячеек с плоскопараллельными окнами удалось избежать образования артефактов на двумерной картине рассеяния, как в случае использования капилляра, улучшить качество экспериментальных данных МУРР без необходимости усложнения процедуры обработки данных. Конструкции ячеек позволили улучшить соотношения «сигнал–шум» более чем на порядок, появилась возможность уменьшить время экспозиции в 10 раз без существенной потери качества кривых МУРР, а также исследовать сильно поглощающие и слабо рассеивающие образцы. Сокращение времени экспозиции, в свою очередь, позволило проводить исследования

Таблица 1. Радиусы инерции и объемные доли мономеров, димеров и октамеров для кристаллизационных растворов лизоцима (10, 20 и 40 мг/мл) без осадителя и с добавлением осадителя хлорида натрия (12 мг/мл, 18 мг/мл, 24 мг/мл). Указаны конечные концентрации веществ в камере образца

Концентрация лизоцима, мг/мл	Концентрация осадителя NaCl, мг/мл	R_g , нм	Доля мономеров, %	Доля димеров, %	Доля октамеров, %
10	0	1.41±0.03	100	0	0
10	12	1.69±0.03	98.7±0.5	0	1.3±0.1
10	18	1.72±0.03	98.4±0.5	0	1.6±0.1
10	24	1.85±0.03	97.6±0.5	0	2.4±0.1
20	0	1.42±0.03	100	0	0
20	12	1.80±0.03	96.4±0.5	1.8±0.1	1.8±0.1
20	18	2.04±0.03	94.5±0.5	1.7±0.1	3.8±0.1
20	24	2.16±0.03	93.1±0.5	1.8±0.1	5.1±0.1
40	0	1.43±0.03	100	0	0
40	12	1.94±0.03	96.6±0.5	0.8±0.1	2.6±0.1
40	18	2.43±0.03	89.9±0.5	1.2±0.1	8.9±0.1
40	24	2.53±0.03	87.1±0.5	2.0±0.1	10.9±0.1

динамики процессов, происходящих при заполнении ячейки.

В перспективе для более интенсивных источников СИ третьего и четвертого поколения (размеры пучка 0.20×0.05 мм на образце) размеры камеры образца можно будет уменьшить вплоть до диаметра входных каналов. Это не только даст выигрыш в объеме используемых образцов, но

и избавит от артефактов перемешивания и замещения старого образца новым. Большая интенсивность СИ излучения позволит еще сильнее сократить время экспозиции. Наряду с вышеперечисленными выигрышами, все это даст возможность исследовать динамику химических процессов.

Благодарности. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (проект №19-29-12042) и при поддержке Министерства науки и высшего образования в рамках выполнения работ по гранту №075-15-2021-1363.

Литература

1. A. Round, F. Felisaz, L. Fodinger, A. Gobbo, J. Huet, C. Villard, C.E. Blanchet, P. Pernot, S. McSweeney, M. Roessle, D.I. Svergun, F. Cipriani *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr. International Union of Crystallography*, 2015, **71**, 67. DOI: 10.1107/S1399004714026959.
2. G.S. Peters, Yu.A. Gaponov, P.V. Konarev, M.A. Marchenkova, K.B. Ilina, V.V. Volkov, Yu.V. Pisarevsky, M.V. Kovalchuk *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. A*, 2022, **1025**, 166170. DOI: 10.1016/j.nima.2021.166170.
3. M. Hassan, S. Agrawal, M. Woolley, S.M. Clarke, A. Osundare, D. Craske, R. Lindsay, A. Smith, T. Snow, T. Zinn, N. Terrill *Rev. Sci. Instrum.*, 2023, **94**(4), 043701. DOI: 10.1063/5.0146013.
4. C.J.C. Edwards-Gayle, N. Khunti, I.W. Hamley, K. Inoue, N. Cowieson, R. Rambo *J. Synchrotron Radiat.*, 2021, **28**, 318. DOI: 10.1107/S1600577520013831.
5. N.M. Kirby, S.T. Mudie, A.M. Hawley, D.J. Cookson, H.D.T. Mertens, N. Cowieson, V. Samardzic-Boban *J. Appl. Crystallogr.*, 2013, **46**, 1670. DOI: 10.1107/S002188981302774X.
6. L.P. Cavalcanti, I.L. Torriani, T.S. Plivelic, C.L.P. Oliveira, G. Kellermann, R. Neuenschwander *Rev. Sci. Instrum.*, 2004, **75**(11), 4541. DOI: 10.1063/1.1804956.
7. J.-M. Dubuisson, T. Decamps, P. Vachette *J. Appl. Crystallogr.*, 1997, **30**, 49. DOI: 10.1107/S002188989600876X.
8. E.G. Kozyr, P.N. Njoroge, S.V. Chapek, V.V. Shapovalov, A.A. Skorynina, A.Y. Pnevskaya, A.N. Bulgakov, A.V. Soldatov, F. Pellegrino, E. Groppo, S. Bordiga, L. Mino, A.L. Bugaev *Catalysts*, 2023, **13**, 414. DOI: 10.3390/catal13020414.
9. F. Schwemmer, C.E. Blanchet, A. Spilotros, D. Kosse, S. Zehnle, H.D.T. Mertens, M.A. Graevert, M. Rossle, N. Paust, D.I. Svergun, F.v. Stetten, R. Zengerle, D. Mark *Lab on a Chip*, 2016, **16**, 1161. DOI: 10.1039/C5LC01580D.
10. S. Schewa, M.A. Schroer, T. Zickmantel, Y.-H. Song, C.E. Blanchet, A.Yu. Gruzinov, G. Katona, D.I. Svergun, M. Roessle *Rev. Sci. Instrum.*, 2020, **91**, 084101. DOI: 10.1063/5.0004706.
11. D. Garcia-Lojo, E. Modin, S. Gomez-Grana, M. Imperor-Clerc, A. Chuvilin, I. Pastoriza-Santos, J. Perez-Juste, D. Constantin, C. Hamon *Adv. Funct. Mater.*, 2021, **31**(27), 2101869. DOI: 10.1002/adfm.202101869.
12. N. Iranpour Anaraki, A. Sadeghpour, K. Iranshahi, C. Toncelli, U. Cendrowska, F. Stellacci, A. Dommann, P. Wick, A. Neels *Nanoresearch*, 2020, **13**(10), 2847. DOI: 10.1007/s12274-020-2940-4.
13. T. Lange, S. Charton, T. Bizien, F. Malloggi *Lab on a Chip*, 2020, **20**, 2990. DOI: 10.1039/D0LC00454E.
14. A.A. Guda, M.V. Kirichkov, V.V. Shapovalov, A.I. Muravlev, D.M. Pashkov, S.A. Guda, A.P. Baglii, S.A. Soldatov, S.V. Chapek, A.V. Soldatov *J. Phys. Chem. C*, 2023, **127**(2), 1097. DOI: 10.1021/acs.jpcc.2c06625.
15. D.S. Khvostichenko, E. Kondrashkina, S.L. Perry, A.S. Pawate, K. Brister, P.J.A. Kenis *Analyst*, 2013, **138**, 5384. DOI: 10.1039/C3AN01174G.
16. A. Ghazal, J.P. Lafleur, K. Mortensen, J.P. Kutter, L. Arleth, G.V. Jensen *Lab on a Chip*, 2016, **16**, 4263. DOI: 10.1039/C6LC00888G.

17. **B.F.B. Silva**
Phys. Chem. Chem. Phys., 2017, **19**, 23690.
DOI: 2017/cp/c7cp02736b.
18. **K. Khaliqi, A. Ghazal, I.D.M. Azmi, H. Amenitsch, K. Mortensen, S. Salentinig, A. Yaghmur**
Analyst, 2017, **142**, 3118. DOI: 2017/an/c7an00860k.
19. **H.P. Martin, N.J. Brooks, J.M. Seddon, P.F. Luckham, N.J. Terrill, A.J. Kowalski, J.T. Cabral**
Soft Matter, 2016, **12**, 1750. DOI: 10.1039/C5SM02689J.
20. **Y. Zhang, Y. Dai, G. Tie, H. Hu**
App. Opt., 2016, **55**(29), 8308. DOI: 10.1364/AO.55.008308.
21. **A.P. Hammersley**
J. Appl. Crystallogr., 2016., **49**(2), 646.
DOI: 10.1107/S1600576716000455.
22. **P.V. Konarev, V.V. Volkov, A.V. Sokolova, M.H.J. Koch, D.I. Svergun**
J. Appl. Crystallogr., 2003, **36**, 1277. DOI: 10.1107/S0021889803012779.
23. **A. Guinier**
Ann. Ph., 1939, **11**(12), 161. DOI: 10.1051/anphys/193911120161.
24. **A. Guinier, G. Fournet**
Small-Angle Scattering of X-rays, USA, NY, New York, Wiley: New York, 1955, 268 pp.
25. **D.I. Svergun**
J. Appl. Crystallogr., 1992, **25**(4), 495. DOI: 10.1107/S0021889892001663.
26. **M.V. Kovalchuk, O.A. Alekseeva, A.E. Blagov, G.D. Ilyushin, K.B. Ilina, P.V. Konarev, V.A. Lomonov, Yu.V. Pisarevsky, G.S. Peters**
Crystallogr. Rep., 2019, **64**(1), 6.
DOI: 10.1134/S1063774519010140.
27. **D.I. Svergun, C. Barberato, M.H.J. Koch**
J. Appl. Crystallogr., 1995, **28**(6), 768.
DOI: 10.1107/S0021889895007047.
28. **A.M. Popov, A.S. Boikova, V.V. Volkov, Yu.A. D'yakova, K.B. Ilina, P.V. Konarev, M.A. Marchenkova, G.S. Peters, Yu.V. Pisarevskii, M.V. Koval'chuk**
Crystallogr. Rep., 2018, **64**(5), 713. DOI: 10.1134/S1063774518050231.
29. **M.A. Marchenkova, S.V. Chapek, P.V. Konarev, K.B. Ilina, G.S. Peters, Yu.V. Pisarevsky, V.A. Shishkov, A.V. Soldatov, M.V. Kovalchuk**
Cryystals, 2023, **13**, 938. DOI: 10.3390/cryst13060938.
30. **A.E. Sukhanov, K.B. Ilina, P.V. Konarev, G.S. Peters, Yu.V. Pisarevsky, E.S. Smirnova, O.A. Alekseeva, M.V. Kovalchuk**
Crystals, 2023, **13**(1), 26. DOI: 10.3390/cryst13010026.
31. **M.A. Marchenkova, P.V. Konarev, A.S. Boikova, K.B. Ilina, Yu.V. Pisarevsky, M.V. Kovalchuk**
Crystallogr. Rep., 2021, **66**, 751. DOI 10.1134/S1063774521050138.

English

Plane-Parallel Microvolume Cells for Studying the Structure of Solutions of Bioorganic Strongly Absorbing and Weakly Scattering Objects at the BioSAX Beamline of Kurchatov Synchrotron Radiation Source*

Andrei E. Sukhanov

NRC "Kurchatov Institute"

59, Leninsky Ave., Moscow, 119333, Russia

sukhanov.ae15@physics.msu.ru

Vladimir V. Volkov

NRC "Kurchatov Institute"

59, Leninsky Ave., Moscow, 119333, Russia

volkicras@mail.ru

Margarita A. Marchenkova

NRC "Kurchatov Institute"

59, Leninsky Ave., Moscow, 119333, Russia

margaritkaepf@gmail.com

Peter V. Konarev

NRC "Kurchatov Institute"

59, Leninsky Ave., Moscow, 119333, Russia

peter_konarev@mail.ru

Paul S. Yuryevich

«Troitsk Research and Development Center» LLC

16, Akademik Frank Str., Moscow, Troitsk, 108840, Russia

paul@trdc.com

Georgy S. Peters

NRC "Kurchatov Institute"

59, Leninsky Ave., Moscow, 119333, Russia

georgspeters@gmail.com

Yury V. Pisarevsky

NRC "Kurchatov Institute"

59, Leninsky Ave., Moscow, 119333, Russia

yupisarev@yandex.ru

Sergei V. Chapek

International Research Institute of Intelligent Materials, SFU

178/24, Andrey Sladkov Str., Rostov-on-Don, 344090, Russia

chapek@sfsu.ru

Vladimir A. Shishkov

NRC "Kurchatov Institute"

59, Leninsky Ave., Moscow, 119333, Russia

shiva@crys.ras.ru

Alexander V. Soldatov

Professor

International Research Institute of Intelligent Materials, SFU

178/24, Andrey Sladkov Str., Rostov-on-Don, 344090, Russia

soldatov@sfsu.ru

Mikhail V. Kovalchuk

RAS Correspondent Member,

Professor,

President of NRC "Kurchatov Institute"

59, Leninsky Ave., Moscow, 119333, Russia

koval@crys.ras.ru

Abstract

Microvolume cells for studying the structure of solutions by the SAXS method using synchrotron radiation have been designed and created. The cells were tested at the BioMUR station of the Kurchatov synchrotron radiation source. A comparative analysis of two-dimensional small-angle scattering patterns from a standard capillary and from the developed cells has been carried out, which showed a significant improvement in the quality of SAXS experimental data without the need to complicate the data processing procedure when using cells instead of capillaries. The possibility of studying strongly absorbing and weakly scattering samples, as well as the dynamics of SAXS scattering curves for solutions is shown.

Keywords: synchrotron radiation, small-angle X-ray scattering (SAXS), lysozyme, potassium dihydrophosphate (KDP), solution, saturation.

**The work was financially supported by RFBR (project 19-29-12042).*

Images & Tables

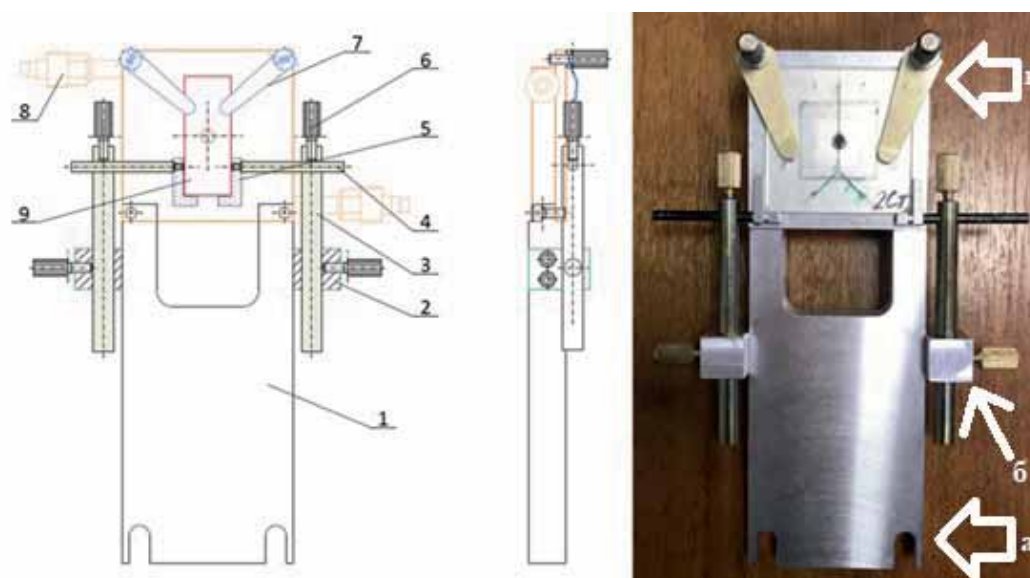


Fig. 1. Drawing (left and center) and photo (right) of the monolithic type microfluidic cell holder: 1 – base; 2 – clamps of the rolling pin system; 3, 4 – rolling pin system; 5 – supporting L-shaped brackets; 6 – locking screws; 7 – heat-exchange table.

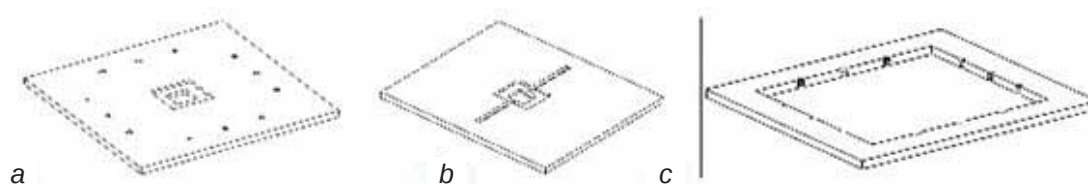


Fig. 2. Image of the first (a), second (b) and third layers of a composite-type microfluidic cell.

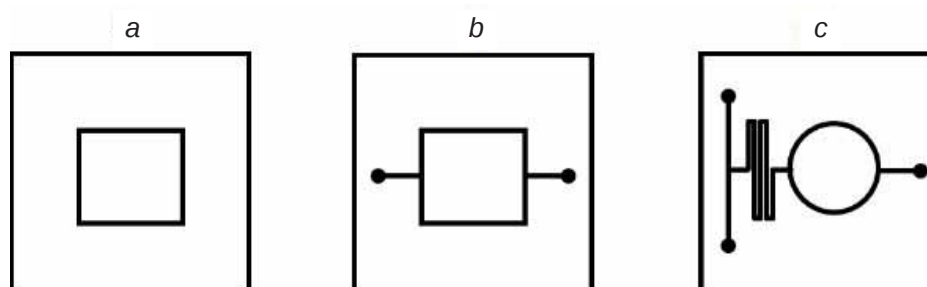


Fig. 3. Schematic representation of open (a), single channel (b) and dual channel (c) cells.

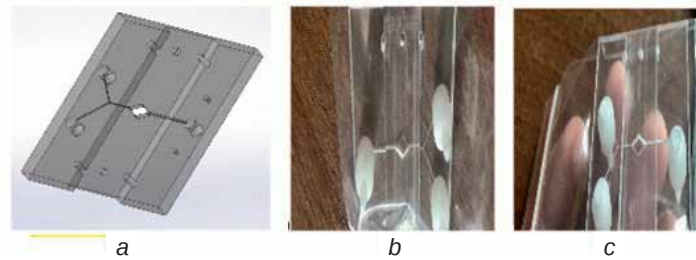


Fig. 4. 3D model of the monolithic microfluidic cell (a), photograph of the monolithic microfluidic cell with fittings from front (b) and back (c).

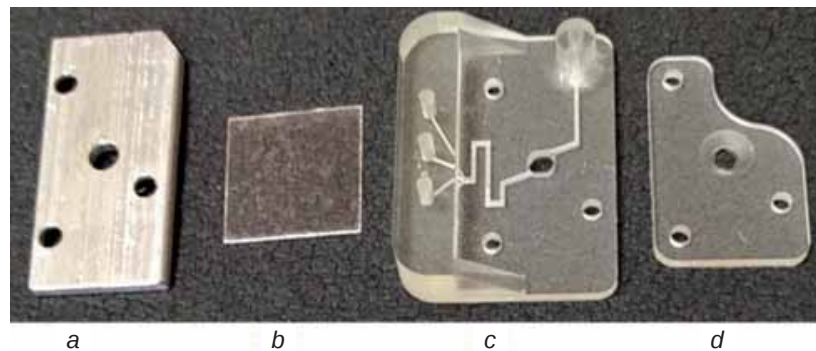


Fig. 5. Multichannel microfluidic measuring cell: a – base; b – X-ray transparent window; c – cell body; d – clamping platform.

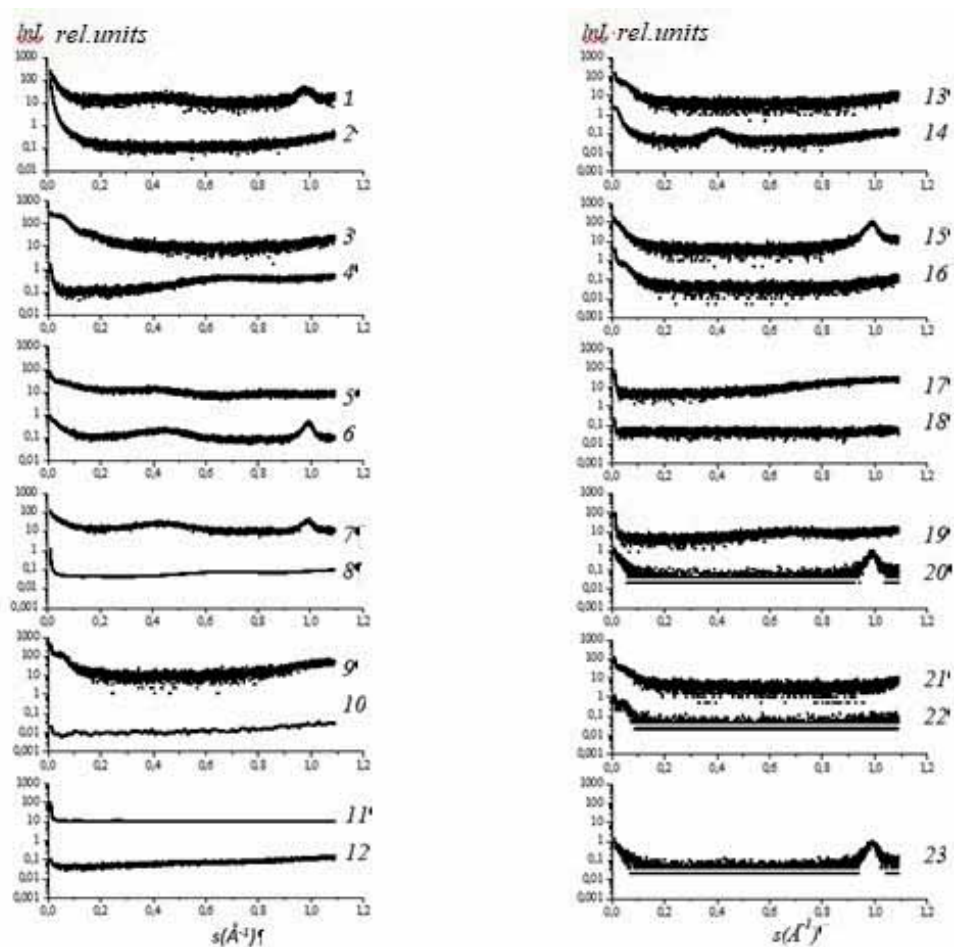


Fig. 6. Experimental SAXS curves of films of different thicknesses: 1 – Hampton Research cover film with adhesive layer (50 μm); 2 – fluoroplastic (9 μm); 3 – Decolux polyethylene terephthalate (65 μm); 4 – polystyrene (220 μm); 5 – kapton with adhesive layer (45 μm); 6 – cycloolefin copolymer with adhesive layer (50 μm); 7 – PCR film (100 μm); 8 – condenser polystyrene K7-14 (30 μm); 9 – polystyrene (50 μm); 10 – Ibioli (180 μm); 11 – mica (40 μm); 12 – polymer (1.25 mm); 13 – polyethylene terephthalate (13 μm); 14 – kapton (45 μm); 15 – polypropylene (25 μm); 16 – mylar metallized (13 μm); 17 – polylactide (90 μm); 18 – mica for AFM (75 μm); 19 – condenser polystyrene K71-4 (23 μm); 20 – cycloolefin copolymer (50 μm); 21 – condenser film (8 μm); 22 – mylar (10 μm); 23 – Hampton Research cover film (45 μm).

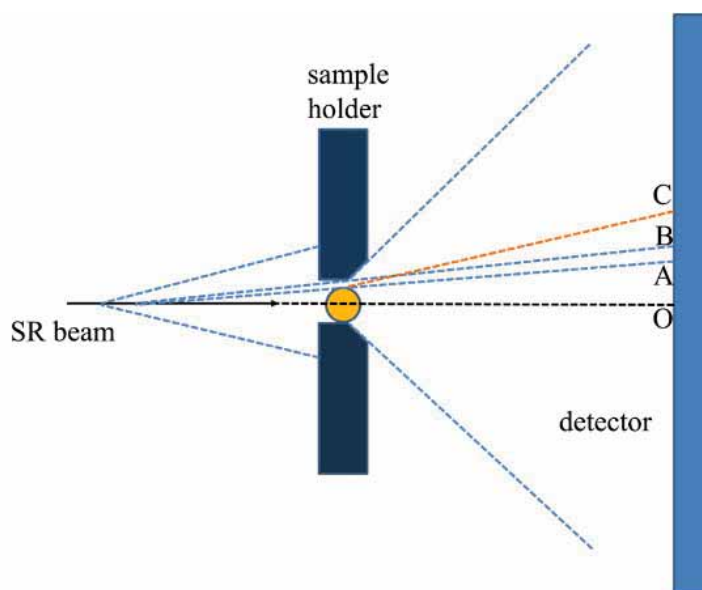


Fig. 7. Scheme of artifacts occurrence on the detector during imaging in the capillary. Section AB – radiation scattered to the sample, not absorbed by the sample; section BC – radiation provoked by the effect of total external reflection of scattered radiation from the capillary walls.

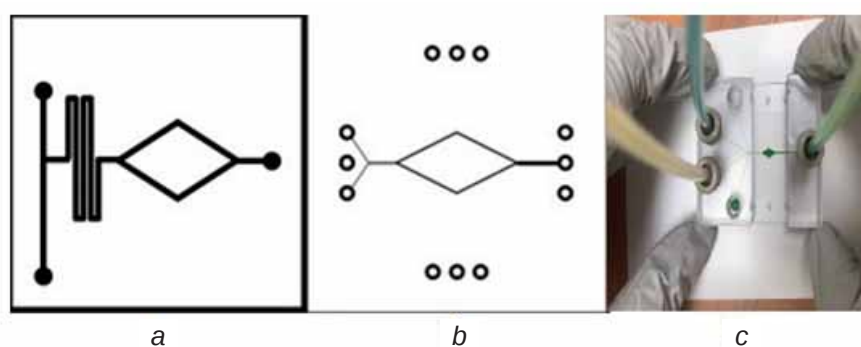


Fig. 8. Schematic representation of a two-channel cell with a diamond-shaped reservoir (a); schematic representation of a monolithic two-channel cell with a diamond-shaped reservoir (b). Polystyrene microfluidic cell with four inlet and one outlet channel (c). Samples were loaded only through the two inlet channels. To visualize the result of solution mixing, yellow and blue dyes were used, mixing of which produced a green solution in the measuring tank.

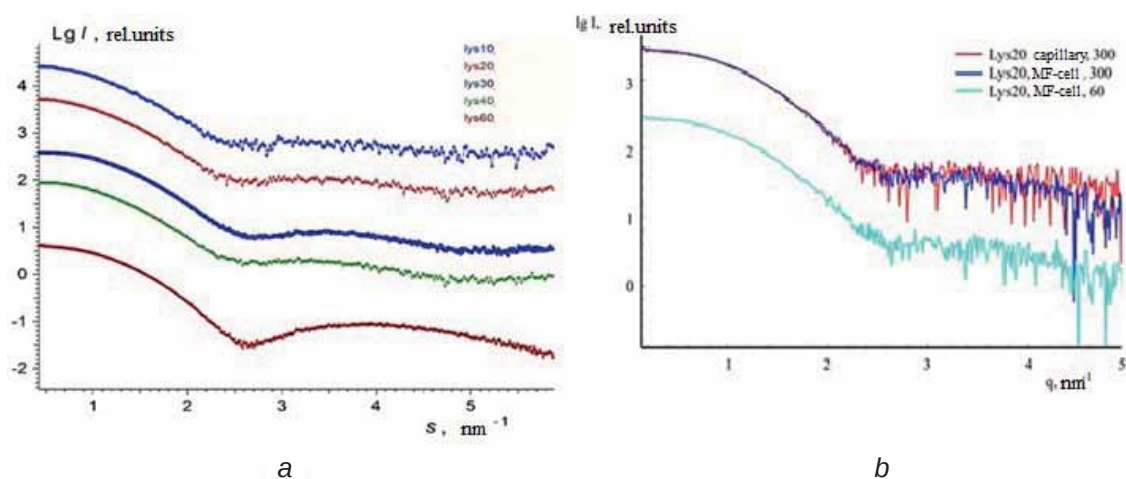


Fig. 9. Experimental small angle X-ray scattering (SAXS) curves from lysozyme solution using a microfluidic cell (BioMUR station). The curves are offset from each other on a vertical scale for better visualization. Protein concentrations: 10, 20, 30, 40, 60 mg/mL (numbering goes in the direction from top to bottom). Experimental SAXS intensity curves from a solution of lysozyme (20 mg/mL) with NaCl (5 mg/mL) – at 300 s exposure in the capillary (red), in the microfluidic cell (blue), and when the exposure was reduced to 60 s (blue).

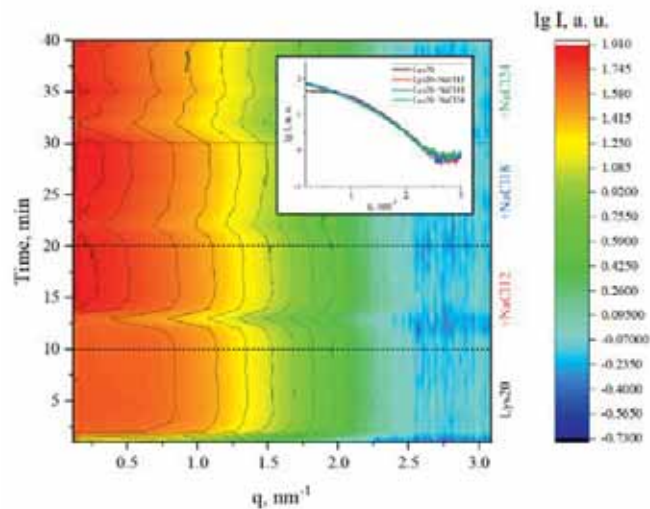


Fig. 10. Scattering intensity (color) as a function of scattering vector and time obtained for a series of solutions of lysozyme concentration 20 mg/mL with different concentrations of precipitant (0–24 mg/mL) (intensities obtained after subtracting the corresponding buffer signals). Solid lines show levels of the same intensity.

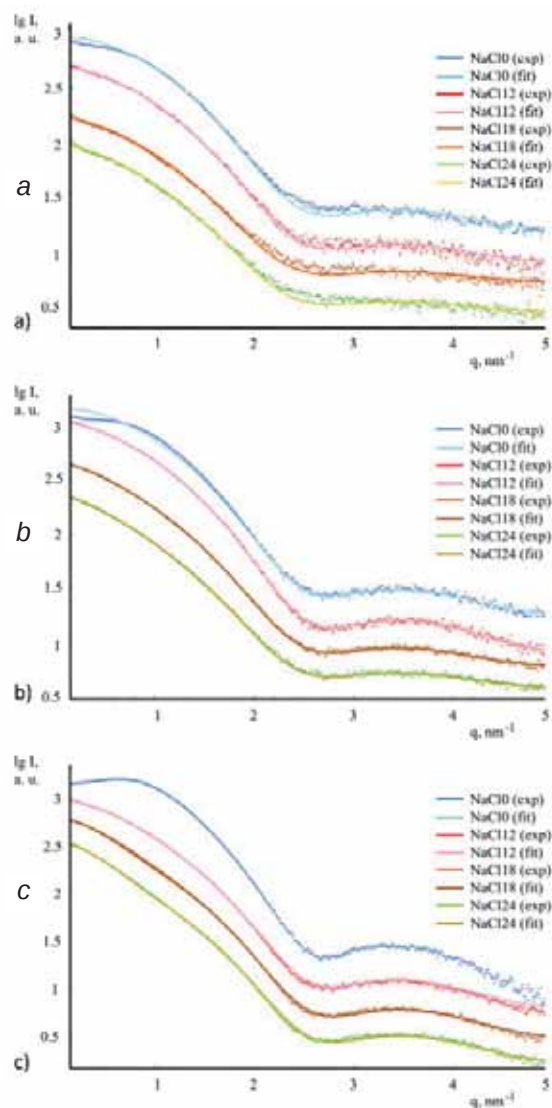


Fig. 11. Resultant (subtracted) experimental SAXS intensity curves (dots) and model curves (black lines) calculated by the OLIGOMER program from lysozyme solutions with concentrations of 10 mg/mL (a), 20 mg/mL (b), and 40 mg/mL (c). The concentration of NaCl precipitant was varied from 12 to 24 mg/mL (in steps of 6 mg/mL). The curves are vertically shifted for better visualization. Measurements were performed in a flow-through multichannel microfluidic cell at 20°C.

Table 1. Radii of gyration and volume fractions of monomers, dimers and octamers for crystallization solutions of lysozyme (10, 20 and 40 mg/ml) without precipitant and with the addition of sodium chloride precipitant (12 mg/ml, 18 mg/ml, 24 mg/ml). The final concentrations of substances in the sample chamber are indicated

Concentration of lysozyme mg/ml	Precipitant concentration NaCl, mg/ml	R_g , nm	Volume fraction of monomers, %	Volume fraction of dimers, %	Volume fraction of octamers, %
10	0	1.41±0.03	100	0	0
10	12	1.69±0.03	98.7±0.5	0	1.3±0.1
10	18	1.72±0.03	98.4±0.5	0	1.6±0.1
10	24	1.85±0.03	97.6±0.5	0	2.4±0.1
20	0	1.42±0.03	100	0	0
20	12	1.80±0.03	96.4±0.5	1.8±0.1	1.8±0.1
20	18	2.04±0.03	94.5±0.5	1.7±0.1	3.8±0.1
20	24	2.16±0.03	93.1±0.5	1.8±0.1	5.1±0.1
40	0	1.43±0.03	100	0	0
40	12	1.94±0.03	96.6±0.5	0.8±0.1	2.6±0.1
40	18	2.43±0.03	89.9±0.5	1.2±0.1	8.9±0.1
40	24	2.53±0.03	87.1±0.5	2.0±0.1	10.9±0.1

References

1. A. Round, F. Felisaz, L. Fodinger, A. Gobbo, J. Huet, C. Villard, C.E. Blanchet, P. Pernot, S. McSweeney, M. Roessle, D.I. Svergun, F. Cipriani *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr. International Union of Crystallography*, 2015, **71**, 67. DOI: 10.1107/S1399004714026959.
2. G.S. Peters, Yu.A. Gaponov, P.V. Konarev, M.A. Marchenkova, K.B. Ilina, V.V. Volkov, Yu.V. Pisarevsky, M.V. Kovalchuk *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. A*, 2022, **1025**, 166170. DOI: 10.1016/j.nima.2021.166170.
3. M. Hassan, S. Agrawal, M. Woolley, S.M. Clarke, A. Osundare, D. Craske, R. Lindsay, A. Smith, T. Snow, T. Zinn, N. Terrill *Rev. Sci. Instrum.*, 2023, **94**(4), 043701. DOI: 10.1063/5.0146013.
4. C.J.C. Edwards-Gayle, N. Khunti, I.W. Hamley, K.Inoue, N. Cowieson, R. Rambo *J. Synchrotron Radiat.*, 2021, **28**, 318. DOI: 10.1107/S1600577520013831.
5. N.M. Kirby, S.T. Mudie, A.M. Hawley, D.J. Cookson, H.D.T. Mertens, N. Cowieson, V. Samardzic-Boban *J. Appl. Crystallogr.*, 2013, **46**, 1670. DOI: 10.1107/S002188981302774X.
6. L.P. Cavalcanti, I.L. Torriani, T.S. Plivelic, C.L.P. Oliveira, G. Kellermann, R. Neuenschwander *Rev. Sci. Instrum.*, 2004, **75**(11), 4541. DOI: 10.1063/1.1804956.
7. J.-M. Dubuisson, T. Decamps, P. Vachette *J. Appl. Crystallogr.*, 1997, **30**, 49. DOI: 10.1107/S002188989600876X.
8. E.G. Kozyr, P.N. Njoroge, S.V. Chapek, V.V. Shapovalov, A.A. Skorynina, A.Y. Pnevskaya, A.N. Bulgakov, A.V. Soldatov, F. Pellegrino, E. Groppo, S. Bordiga, L. Mino, A.L. Bugaev *Catalysts*, 2023, **13**, 414. DOI: 10.3390/catal13020414.
9. F. Schwemmer, C.E. Blanchet, A. Spilotros, D. Kosse, S. Zehnle, H.D.T. Mertens, M.A. Graevert, M. Rossle, N. Paust, D.I. Svergun, F.V. Stetten, R. Zengerle, D. Mark *Lab on a Chip*, 2016, **16**, 1161. DOI: 10.1039/C5LC01580D.
10. S. Schewa, M.A. Schroer, T. Zickmantel, Y.-H. Song, C.E. Blanchet, A.Yu. Gruzinov, G. Katona, D.I. Svergun, M. Roessle *Rev. Sci. Instrum.*, 2020, **91**, 084101. DOI: 10.1063/5.0004706.
11. D. Garcia-Lojo, E. Modin, S. Gomez-Grana, M. Imperor-Clerc, A. Chuvilin, I. Pastoriza-Santos, J. Perez-Juste, D. Constantin, C. Hamon *Adv. Funct. Mater.*, 2021, **31**(27), 2101869. DOI: 10.1002/adfm.202101869.
12. N. Iranpour Anaraki, A. Sadeghpour, K. Iranshahi, C. Toncelli, U. Cendrowska, F. Stellacci, A. Dommann, P. Wick, A. Neels *Nanoresearch*, 2020, **13**(10), 2847. DOI: 10.1007/s12274-020-2940-4.
13. T. Lange, S. Charton, T. Bizien, F. Testard, F. Malloggi *Lab on a Chip*, 2020, **20**, 2990. DOI: 10.1039/D0LC00454E.
14. A.A. Guda, M.V. Kirichkov, V.V. Shapovalov, A.I. Muravlev, D.M. Pashkov, S.A. Guda, A.P. Bagliy, S.A. Soldatov, S.V. Chapek, A.V. Soldatov *J. Phys. Chem. C*, 2023, **127**(2), 1097. DOI: 10.1021/acs.jpcc.2c06625.
15. D.S. Khvostichenko, E. Kondrashkina, S.L. Perry, A.S. Pawate, K. Brister, P.J.A. Kenis *Analyst*, 2013, **138**, 5384. DOI: 10.1039/C3AN01174G.
16. A. Ghazal, J.P. Lafleur, K. Mortensen, J.P. Kutter, L. Arleth, G.V. Jensen *Lab on a Chip*, 2016, **16**, 4263. DOI: 10.1039/C6LC00888G.
17. B.F.B. Silva *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2017, **19**, 23690. DOI: 10.1039/c7cp02736b.
18. K. Khalili, A. Ghazal, I.D.M. Azmi, H. Amenitsch, K. Mortensen, S. Salentinig, A. Yagmur *Analyst*, 2017, **142**, 3118. DOI: 10.1039/c7an00860k.
19. H.P. Martin, N.J. Brooks, J.M. Seddon, P.F. Luckham, N.J. Terrill, A.J. Kowalski, J.T. Cabral *Soft Matter*, 2016, **12**, 1750. DOI: 10.1039/C5SM02689J.
20. Y. Zhang, Y. Dai, G. Tie, H. Hu *App. Opt.*, 2016, **55**(29), 8308. DOI: 10.1364/AO.55.008308.
21. A.P. Hammersley *J. Appl. Crystallogr.*, 2016, **49**(2), 646. DOI: 10.1107/S1600576716000455.
22. P.V. Konarev, V.V. Volkov, A.V. Sokolova, M.H.J. Koch, D.I. Svergun *J. Appl. Crystallogr.*, 2003, **36**, 1277. DOI: 10.1107/S0021889803012779.
23. A. Guinier *Ann. Ph.*, 1939, **11**(12), 161. DOI: 10.1051/anphys/193911120161.
24. A. Guinier, G. Fournet *Small-Angle Scattering of X-rays*, USA, NY, New York, Wiley: New York, 1955, 268 pp.
25. D.I. Svergun *J. Appl. Crystallogr.*, 1992, **25**(4), 495. DOI: 10.1107/S0021889892001663.



26. *M.V. Kovalchuk, O.A. Alekseeva, A.E. Blagov, G.D. Ilyushin, K.B. Ilina, P.V. Konarev, V.A. Lomonov, Yu.V. Pisarevsky, G.S. Peters*
Crystallogr. Rep., 2019, **64**(1), 6.
DOI: 10.1134/S1063774519010140.
27. *D.I. Svergun, C. Barberato, M.H.J. Koch*
J. Appl. Crystallogr., 1995, **28**(6), 768.
DOI: 10.1107/S0021889895007047.
28. *A.M. Popov, A.S. Boikova, V.V. Volkov, Yu.A. D'yakova, K.B. Ilina, P.V. Konarev, M.A. Marchenkova, G.S. Peters, Yu.V. Pisarevskii, M.V. Koval'chuk*
Crystallogr. Rep., 2018, **64**(5), 713.
DOI: 10.1134/S1063774518050231.
29. *M.A. Marchenkova, S.V. Chapek, P.V. Konarev, K.B. Ilina, G.S. Peters, Yu.V. Pisarevsky, V.A. Shishkov, A.V. Soldatov, M.V. Kovalchuk*
Cryastals, 2023, **13**, 938. DOI: 10.3390/cryst13060938.
30. *A.E. Sukhanov, K.B. Ilina, P.V. Konarev, G.S. Peters, Yu.V. Pisarevsky, E.S. Smirnova, O.A. Alekseeva, M.V. Kovalchuk*
Crystals, 2023, **13**(1), 26. DOI: 10.3390/cryst13010026.
31. *M.A. Marchenkova, P.V. Konarev, A.S. Boikova, K.B. Ilina, Yu.V. Pisarevsky, M.V. Kovalchuk*
Crystallogr. Rep., 2021, **66**, 751.
DOI 10.1134/S1063774521050138.