

Eine Röntgenkleinwinkelkamera mittleren Auflösungsvermögens ohne Spaltlängsverschmierung

A Small-Angle-Scattering Camera of Medium Resolution without Slitlongitudinal-Error

H. Wawra

Graz

(Z. Naturforsch. 31 c, 635–640 [1976]; eingegangen am 9. August 1976)

Small-Angle-X-Ray-Scattering, Bacterial Cell Walls, Fats

A small-angle-scattering camera of medium resolution without slitlongitudinal-error has been constructed and samples of biological materials as natural fats, murein and lipopolysaccharide preparations of gramnegative bacteria have been investigated.

Einleitung

Für die Messung von komplizierten Röntgenbeugungskurven im Röntgenkleinwinkelgebiet ist die Verwendung von zur Zeit handelsüblichen Apparaturen nicht zweckmäßig, da praktisch alle diese Geräte für die Messung von verdünnten wäßrigen Lösungen von Makromolekülen ausgelegt sind und aus Intensitätsgründen vorzugsweise am langen Focus der Röntgenröhre betrieben werden. Das hat zur Folge, daß der nunmehr handförmige Primärstrahl eine beträchtliche Verzerrung des theoretisch für einen punktförmigen Primärstrahlquerschnitt zu erwartenden Röntgenbeugungsbildes verursacht und die Anwendung von umfangreichen Rechenprogrammen zur Rückrechnung der gemessenen verschmierten Röntgenbeugungskurve auf den Fall des punktförmigen Primärstrahlquerschnittes notwendig macht. Diese Rückrechnung gelingt exakt höchstens dann, wenn die Beugungskurve mit praktisch unendlicher Genauigkeit gemessen worden ist. Durch die unvermeidlichen Meßfehler bei der Registrierung mit einem Zählrohr ist diese Bedingung jedoch niemals einzuhalten. Das wird besonders deutlich, wenn Substanzen untersucht werden müssen, die z.B. eine Reihe von scharfen Kristallgitterinterferenzen im Röntgenkleinwinkelbereich liefern (siehe Beispiele). Da in solchen Fällen auch Intensitätsunterschiede der einzelnen Reflexe im Verhältnis 1 : 1000 auftreten, wird es verständlich, wenn nach anderen Meßprinzipien gesucht wird. Grundsätzlich wäre die fotografische Registrierung mit einer Pinhole-Kamera und entsprechend langem Präparat-Film Abstand am kurzen Focus der Röntgen-

röhre geeignet. Sollen jedoch auch verdünnte wäßrige Lösungen gemessen werden, bei denen nach Abzug der Lösungsmittelstreucurve oft nur eine Differenz von wenigen Prozent der Gesamtstreuung verbleibt, dann ist die erforderliche Genauigkeit durch die Unsicherheit in der Bestimmung des Filmuntergrundes wegen der Filmkörnung nicht mehr gegeben. Abgesehen davon gibt es Präparate, z.B. Triglyceridkristalle in Fetten, bei denen die Inhomogenitäten der Substanz größer sind als das vom Primärstrahl einer Pinhole-Kamera bei einer Aufnahme erfaßte Volumen des Präparates. Die Meßergebnisse sind dann durch die von dem Röntgenstrahl (Primärstrahl) rein zufällig erfaßten Bereiche des Präparates bedingt und z.B. nach einem Schmelzvorgang nicht mehr reproduzierbar.

Die Apparatur

Bei Beschränkung auf ein mittleres Auflösungsvermögen – unter Auflösungsvermögen wird hier der Bragg'sche Wert des kleinsten mit der Apparatur noch ohne Spaltlängsverschmierung meßbaren

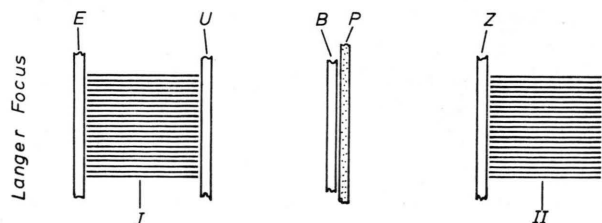


Fig. 1. Schematische Anordnung der wesentlichen Teile für die Strahlbegrenzung der Röntgenkleinwinkelkamera in der Draufsicht. Das Blendensystem besteht aus dem Eingangsspalt E, dem Schlitzsystem I und den Blenden U und B. Der Registrierteil ist um eine durch das Präparat P gedachte gehende Achse drehbar und enthält den Zählrohrspalt Z mit dem Schlitzsystem II. Unmittelbar daran anschließend ist das Zählrohr angebracht.

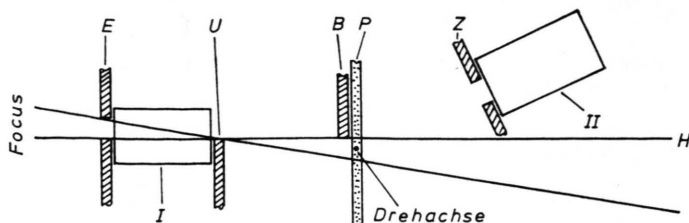


Fig. 2. Schnitt durch das Blendsystem der Kamera im Aufriß. Gegenüber der Anordnung in Fig. 1 ist jedoch der Registrierteil um die durch das Präparat gedachte gehende Achse in den Meßbereich hochgedreht. Bezeichnung wie in Fig. 1.

Beugungswinkels verstanden — kann eine Röntgenkleinwinkelkamera konstruiert werden, die auch am langen Focus der Röntgenröhre unmittelbar die unverschmierte Beugungskurve liefert. Durch die Möglichkeit, am langen Focus zu messen, reicht die Primärstrahlintensität auch für die Registrierung der Streukurven von verdünnten wäßrigen Lösungen von Makromolekülen aus. Dazu müssen sowohl Primärstrahl als auch die vom Präparat abgebeugte Röntgenstrahlung durch ein System von engen Kanälen (Schlitzen) in viele einzelne, parallel laufende Strahlen zerlegt werden. Ähnliche Ausrüstungen gibt es z. B. bei verschiedenen Weitwinkel-Diffraktometern. Die Fig. 1 zeigt schematisch den Aufbau der Kamera in der Draufsicht, Fig. 2 im Aufriß bei hochgedrehtem Registrierteil. Wie man unmittelbar sieht, wäre es vom Standpunkt der Zerlegung in Einzelstrahlen zweckmäßig, beide Lamellensysteme direkt bis an das Präparat heranzuführen. In diesem Fall würde die Streuung jedes einzelnen Teilprimärstrahles wiederum nur in einen einzigen Kanal des für die Zerlegung der abgebeugten Strahlung eingezeichneten Lamellensystems (II) gelangen. Da jedoch die Kamera nach wie vor eine Röntgenkleinwinkelkamera sein muß, gibt es nur bestimmte Stellen im Strahlengang, an denen die beiden Lamellensysteme angebracht werden können. Wie die Fig. 2 zeigt, ist beim Primärstrahl-Blendsystem, dem sogenannten Kamerakörper, der Raum zwischen Eingangsspalt E und der unteren Blende U dafür geeignet. Bei dieser Anordnung bleibt der Winkelbereich oberhalb der Ebene H (Meßbereich) ebenso frei von störender, durch das Blendsystem hervorgerufener Strahlung wie im Falle der nicht mit dem Lamellensystem ausgerüsteten Kamera. Das Lamellensystem (II) für die abgebeugte Strahlung wird zweckmäßig unmittelbar nach dem Zählrohrspalt und vor dem Zählrohr angebracht. Für die tatsächliche Ausführung der Kamera wurden folgende Abmessungen gewählt:

Abstand: Eingangsspalt E — Kante U : 100 mm
Kante U — Präparat P : 100 mm

Präparat P — Zählrohrspalt Z : 100 mm
Zählrohrspalt Z — Zählrohr : 100 mm.

Die Apparatur ist damit nicht länger als eine bisher verwendete Röntgenkleinwinkelkamera (Fa. Anton Paar, Graz), welche spaltlängsverschmierte Beugungskurven liefert. Die Zerlegungsmöglichkeit in Einzelstrahlen ist nicht nur auf das angeführte asymmetrische Blendsystem (nach O. Kratky) beschränkt, sondern könnte ebenso für eine Röntgenkleinwinkelkamera mit symmetrischer Blendenanordnung verwendet werden. Wie man aus Fig. 3

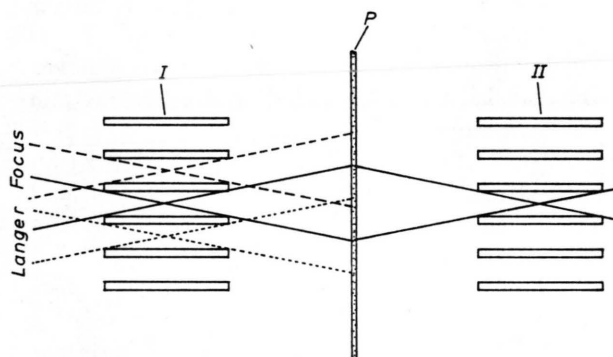


Fig. 3. Schlitzsysteme I und II in ihren Positionen in der Kamera relativ zum Präparat P (Draufsicht). Um den Strahlengang deutlich zu machen, ist die Zeichnung in der Ordinate je nach Schlitzbreite um ein bis zwei Größenordnungen gedehnt.

entnehmen kann, gelangen in einen einzigen Kanal des Lamellensystems (II) Beugungsstrahlen des Präparates, die von insgesamt drei nebeneinander liegenden Teilprimärstrahlen herrühren. Eine entsprechende Rechnung ergibt, daß rund 60% der durch einen Schlitz des Lamellensystems (II) gelangenden Intensität von demjenigen Teilprimärstrahl herrührt, welcher durch den genau gegenüber liegenden Schlitz des Lamellensystems (I) hindurchtritt, während die Beiträge der beiden benachbarten Teilstrahlen noch je 20% ausmachen. Wenn man sich die Situation an einem Debye-Scherrer-Ring

überlegt, dann muß für eine Registrierung der in Frage kommende Bereich des Debye-Scherrer-Ringes als noch gerade angesehen werden können. Die Messung liefert in diesem Fall einen symmetrischen Beugungsreflex, auch wenn keine nennenswerte Breitenverschmierung durch die Meßanordnung zustande kommt. Ist das Teilstück des Debye-Scherrer-Ringes nicht mehr gerade, dann ergibt die Messung anstelle

engeren Lamellensystems ist man sicher, daß mit der Kamera von dem Beugungswinkel an, bei dem der gemessene Reflex liegt, zu größeren Beugungswinkeln hin unverschmiert gemessen werden kann.

Anwendungen

Naturgemäß liegt der Vorteil der beschriebenen Apparatur bei der Messung von Röntgenkleinwinkelstreuung mit kompliziertem Kurvenverlauf. Zu diesen Kleinwinkelkurven gehören z.B. die Streukurven von geordneten biologischen Membranen, die wegen einer von der Schichtdicke herrührenden Periodizität im Röntgenkleinwinkelgebiet zum Teil zahlreiche scharfe Röntgenbeugungsinterferenzen liefern. Kristalle mit einem sogenannten langen Abstand, d. h., bei denen eine Gitterkonstante so groß ist, daß die dazugehörigen Gitterinterferenzen im Röntgenkleinwinkelgebiet liegen, können ebenfalls komplizierte und mit zahlreichen Beugungsmaxima versehene Röntgenkleinwinkelstreu曲ven liefern. Dazu gehören z.B. die Triglyceridkristalle in natürlichen und künstlichen Fetten. Bei einer genügenden Anzahl von Reflexen besteht somit die Möglichkeit zur Berechnung eindimensionaler Fourier-Transfor-

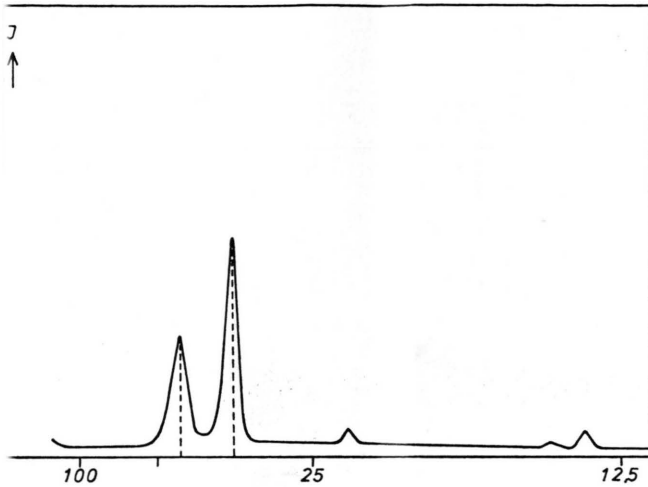


Fig. 4. Streukurve eines Fettpräparates, welche mit zu breiten Schlitzen aufgenommen wurde. Die beiden großen Reflexe zeigen bereits den charakteristischen flachen Anstieg der gegen den Primärstrahl gerichteten Flanken.

von symmetrischen Röntgenbeugungsreflexen einseitige, schiefe Reflexe, wie in Fig. 4. Damit hat man bei Verwendung eines Präparates mit geeigneten Röntgenbeugungsreflexen eine Prüfmöglichkeit, ob noch unverschmiert registriert wird, oder ob bereits ein teilweiser Verschmierungseffekt bemerkt werden kann.

Zur Bestimmung des Auflösungsvermögens einer Kamera im oben erwähnten Sinn kann man so vorgehen, daß nach Auswahl eines geeigneten Beugungsreflexes die Lamellensysteme gemeinsam schrittweise erweitert, d. h., beide Lamellensysteme durch solche mit größerer Schlitzbreite ersetzt werden. Als geeignet wird man einen Beugungsreflex dann betrachten können, wenn er von einem völlig unorientierten Präparat herrührt und wenn die Untergrundstreu曲ve, auf welcher der Reflex aufsitzt, in der Umgebung des Reflexes möglichst horizontal verläuft. Im allgemeinen findet man ab einer bestimmten Schlitzbreite die oben beschriebene Schiefe des Beugungsreflexes. Durch Verwendung des nächst

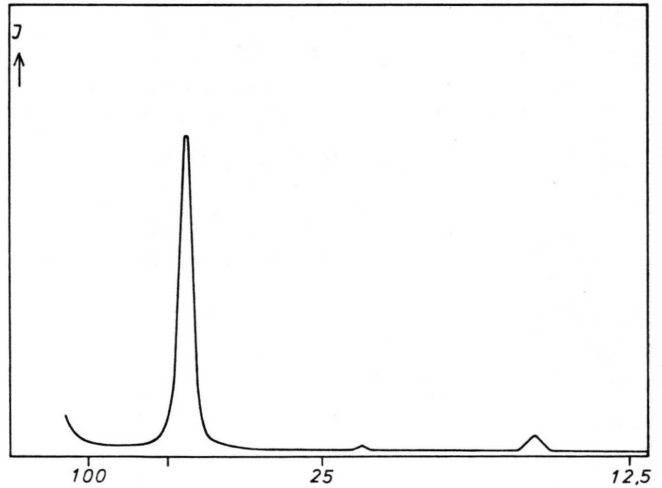


Fig. 5. Röntgenkleinwinkelstreu曲ve eines Rinderfettpräparates mit Gitterinterferenzen des kristallinen Anteiles bis zur dritten Ordnung. Gitterkonstante etwa 44 Å. Die Ordinate J ist die unverschmierte, direkt gemessene Intensität in relativen Einheiten. Als Abszissenskala dient eine dem Beugungswinkel reziproke Ångströmskala, welche aus der für den Röntgenkleinwinkelbereich gültigen vereinfachten Bragg'schen Gleichung berechnet wird: $d = \lambda \cdot a / m$. d ist der Bragg'sche Abstand (in Å), a entspricht der Präparat-Film-Distanz und m ist der Abstand der Abszissenwerte der Streukurve vom Nullpunkt (Primärstrahlmittelpunkt). λ ist die Röntgenwellenlänge.

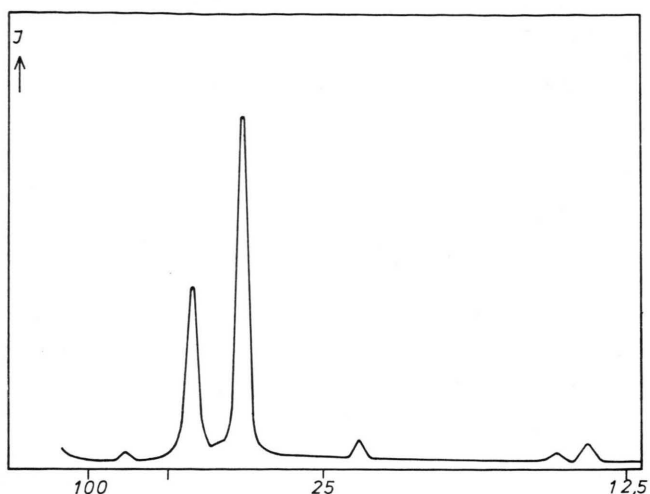


Fig. 6. Röntgenkleinwinkelstreukurve eines Schweinefettpräparates. Abszisse und Ordinate wie in Fig. 5.

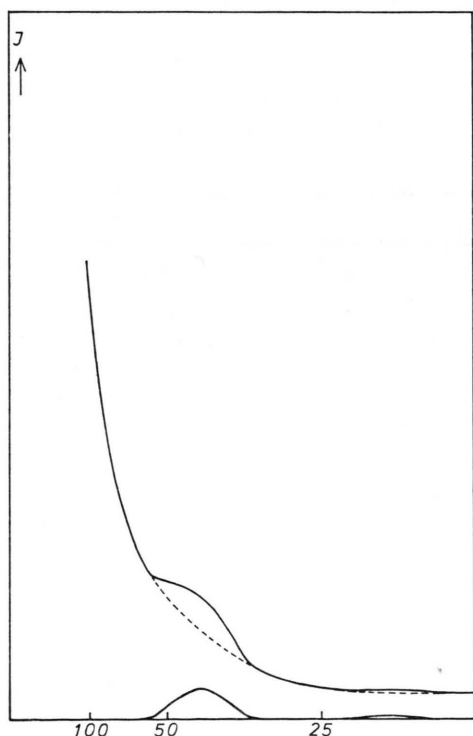


Fig. 7. Röntgenkleinwinkelstreukurve eines teilweise orientierten Mureinpräparates von *Spir. serp.* Die Gitterinterferenzen des kristallinen Anteiles wurden von der — bekannten — Streukurve des amorphen Präparates abgetrennt und im gleichen Maßstab gesondert gezeichnet. Abszisse und Ordinate wie in Fig. 5.

mationen, unabhängig von den anderen — kleinen — Gitterkonstanten. Damit ist die Berechnung der Elektronendichteverteilung quer über die Mem-

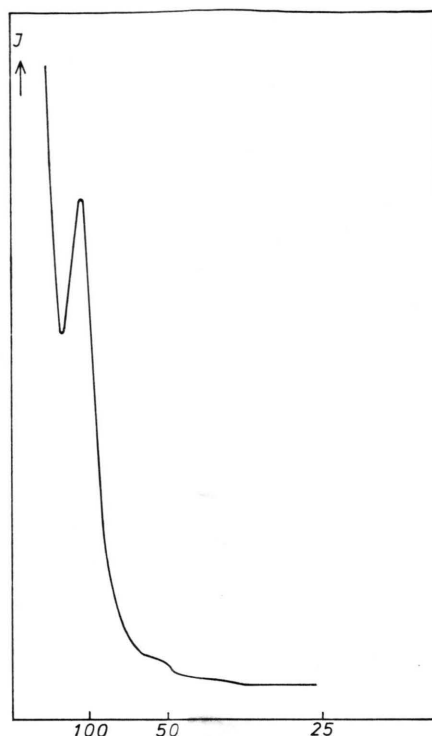


Fig. 8. Röntgenkleinwinkelstreukurve eines durch Glycerin gequollenen Mureinpräparates von *Spir. serp.* Gitterinterferenzen bis zur dritten Ordnung erkennbar. Abszisse und Ordinate wie in Fig. 5.

bran, bzw. bei Kristallen längs des großen Abstandes, möglich. Da die Bestandteile von Membranen bzw. Kristallen der chemischen Formel nach meistens bekannt sind, erhält man mit der Elektronendichteverteilung eine Information über die Anordnung der Grundbausteine in der Elementarzelle. Genauso gut bewährt sich die Apparatur bei der Messung der oft sehr breiten und flachen Beugungsmaxima bei Röntgenkleinwinkelstreukurven von verdünnten wässrigen Lösungen von Makromolekülen, wobei diese Messungen ohne weiteres an abgeschmolzenen Röntgenröhren normaler Intensität (2 kW) durchgeführt werden können.

Die nachstehend angeführten Beispiele sind Strukturuntersuchungen des Autors entnommen, welche zum Teil gemeinsam mit dem Botanischen Institut der Universität München durchgeführt werden. Hier sollen die dargestellten Streukurven jedoch nur die Leistungsfähigkeit der beschriebenen Röntgenkleinwinkelkamera veranschaulichen. Dabei wurde auf die Wiedergabe der zahlreichen Meßpunkte in jeder Kurve verzichtet, da die Schwankungen die verwendete Strichstärke der Zeichnung nicht

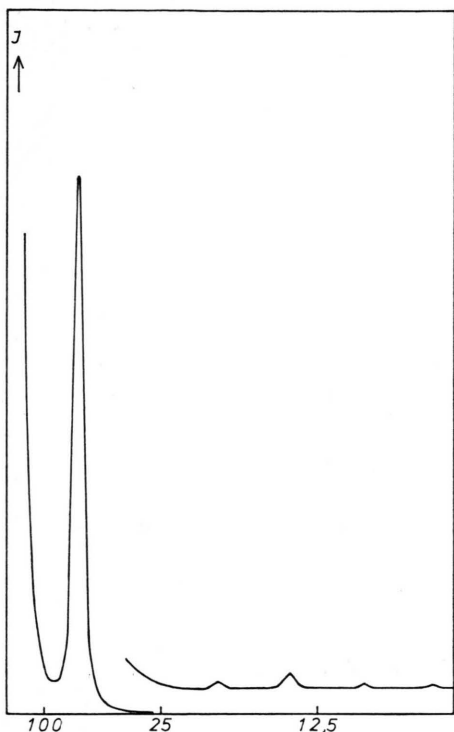


Fig. 9. Röntgenkleinwinkelstreuungskurve eines Lipopolysaccharidpräparates (R-Mutante von *Salm. minn.* 595). Abszisse und Ordinate wie in Fig. 5.

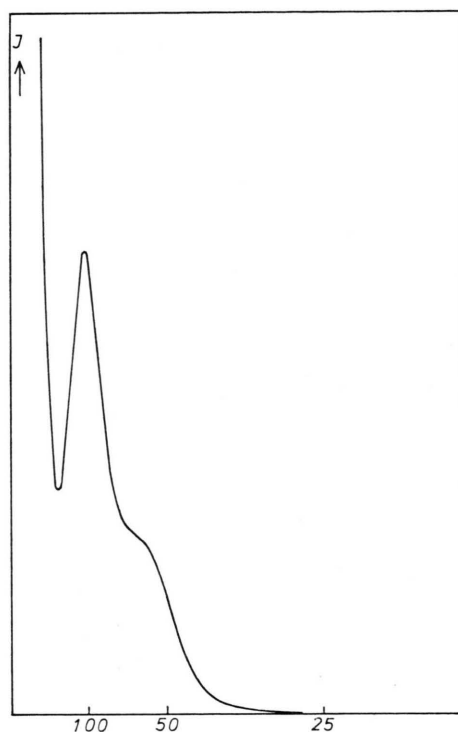


Fig. 10. Röntgenkleinwinkelstreuungskurve der S-Mutante eines Lipopolysaccharidpräparates von *Salm. minn.* Abszisse und Ordinate wie in Fig. 5.

überschreiten. Im allgemeinen handelt es sich um vollständig unorientierte Präparate, d. h. die Interferenzmaxima erscheinen auf einer mit einer Pin-hole-Kamera hergestellten fotografischen Aufnahme als gleichmäßig geschwärmte Debye-Scherrer-Ringe. Lediglich die Präparate von *Spir. serp.* und S-Mutante von *Salm. minn.* sind partiell orientiert.

1. Röntgenkleinwinkelstreuungskurven von Triglyceridmischkristallen in natürlichen Depotfetten:

Fig. 5 gib die Beugungsreflexe bis zur 3. Ordnung des langen Abstandes eines Triglyceridmischkristalles von Rinderfett wieder. Zählrohr-Aufnahme bei 10 °C.

Fig. 6 Röntgenbeugungsreflexe der Triglyceridkristalle in Schweinefett bei 10 °C. Zum Unterschied von Rinderfett erscheinen in diesem Präparat zwei Triglyceridkristallarten mit den Gitterkonstanten (langen Abständen) von etwa 43 Å und 69 Å.

2. Stützmembran (Murein) von gramnegativen Bakterien:

Fig. 7 zeigt die Röntgenbeugungskurve eines Mureinpräparates von *Spir. serp.* Das Präparat wurde aus weitgehend unzerstörten Murein-sacculi hergestellt. Die Röntgenbeugungsreflexe rühren

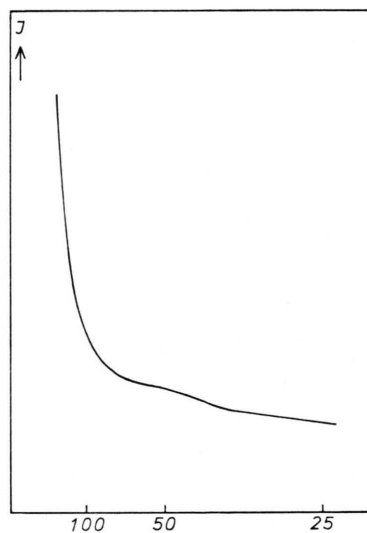


Fig. 11. Streukurve einer wässrigen Lösung von Zellwandmaterial (Murein) eines grampositiven Bakteriums: *Staphylococcus aureus*. Die Lösungsmittelstreuung wurde nicht abgezogen. Abszisse und Ordinate wie in Fig. 5.

von der Schichtdicke, d.h. von der Periodizität senkrecht zur Sacculus-Schicht her. Es handelt sich um die geringste erzielbare Schichtdicke des sehr leicht quellenden Präparates. Der Beugungsreflex 1. Ordnung entspricht einer Dicke der Murein(doppel)schicht von 43 Å.

Fig. 8 Röntgenbeugungsreflexe eines durch Glycerin stark gequollenen Präparates aus Murein-sacculi von *Spirillum serpens*. Schichtdickeninterferenz 1. Ordnung bei einem Bragg'schen Wert von etwa 110 Å.

3. Röntgenbeugungskurven von Lipopolysaccharid-Präparaten gramnegativer Bakterien:

Fig. 9 R-Mutante von *Salm. minn.* 595. Es erscheinen Röntgenbeugungsreflexe bis zur 6. Ord-

nung, wobei Intensitätsunterschiede zwischen einzelnen Reflexen im Verhältnis von etwa 1 : 1000 auftreten. Der Kurvenaußenteil ist um den Faktor 20 überhöht gezeichnet, um die höheren Ordnungen besser sichtbar zu machen. Die Gitterkonstante beträgt 54 Å.

Fig. 10 Röntgenbeugungskurve eines teilweise orientierten Lipopolysaccharid-Präparates: S-Mutante von *Salm. minn.* Es tritt lediglich der Reflex 1. Ordnung mit einer Gitterkonstante von 94 Å auf. Das Präparat enthält vermutlich auch einen nicht unwesentlichen Anteil der entsprechenden R-Mutante.

4. Außenteil der Röntgenkleinwinkelstreu-
kurve einer wäßrigen Lösung der Zellwand von *Staphylococcus aureus* (Fig. 11).