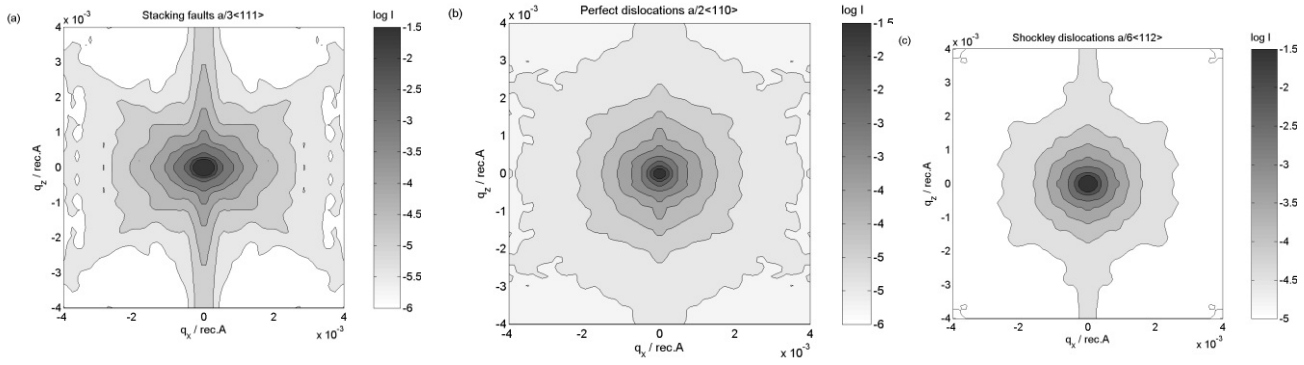


Figure 3. Simulated reciprocal space intensity maps from (a) stacking faults, (b) perfect dislocations and (c) Shockley dislocations with radius 7000 Å.

[1] M. A. Krivoglaz, Diffraction of X-rays and Neutron in Nonideal Crystals, Springer, Berlin 1996.

[2] B. C. Larson and W. Schmatz, *Phys. stat. sol (b)* **99** (1980) 267.

S9

NANOTEST™ NT 600 - A DEVICE FOR ANALYSES OF MECHANICAL PROPERTIES OF MATERIALS

R. Čtvrtlík, M. Stranyánek, P. Boháč, L. Jastrabík

Institute of Physics of Academy of Sciences of the Czech Republic, Na Slovance 2, 182 21 Prague

Thin films and coatings technology have become the crucial aspect in a wide range of production processes. It is used with success for instance in electro technical industry, electronics, optics, mechanical engineering, energetics and medicine. On this account the mechanical properties metrology of thin films and coatings has become very important due to their optimization as well as high-quality production. There are numbers of devices available for the measurement of these properties, either specialized for certain test or universal which are available to carry out the entire analysis of mechanical properties of thin films and surfaces. The special rank belongs to the modular measuring system NanoTest™ (Micro Materials Ltd.) significant by its unique construction, which enables horizontally loading of the specimen.

Full paper will be published in next issue.

S10

MĚŘENÍ ELASTICKÝCH KONSTANT TENKÝCH VRSTEV METODOU LAW

R. Picek, P. Boháč

Fyzikální ústav AV ČR, Na Slovance 2, 182 21 Praha 8

One of possible applications of thin films is coating of contact loading components and tools for improving their surface properties. Mechanical features of films are crucial for their applicability in practice. They are partially characterized by elastic constants (Young modulus, Poisson ratio). Determination of these quantities through classical methods which are known from measurement of bulk materials is not possible. Therefore new ways of identifications of elastic constants has been developed. One of them is method LAW (laser acoustic waves) which elicits the constants from acoustic wave propagation. In this article principle of LAW is explained in simplified form. Conditions for applications and comparison with other methods are presented. The measurement of thin Si and SiC films deposited on silicon wafer by magnetron sputtering was carried out. Some problems and disadvantages of this method were discussed. Their feasible solution is outlined at the end of the article.

Full paper will be published in next issue.

S11

RENTGENOVÁ PRÁŠKOVÁ MIKRODIFRAKCE A LIMITY JEJÍHO POUŽITÍ

Eva Kotulanová[1], Petr Bezdička[1], V. Grünwaldová Šímová[1], Tomáš Grygar[1], Michal Kolega[2]

[1]Akademická laboratoř materiálového průzkumu malířských děl společné pracoviště Akademie výtvarných umění v Praze a Ústavu anorganické chemie AV ČR v Řeži

[2]Výzkumné centrum „Nové technologie", Západočeská univerzita, Plzeň

Termín mikrodifrakce se v odborné literatuře nejprve objevoval ve spojení s využitím vysoce intenzivních monochromatických zdrojů záření – synchrotronů [1]. Vysoká intenzita primárního svazku v tomto případě umožnila sběr dat z malé plochy v přijatelném čase. Nevýhodou synchrotronů je však jejich obtížnější dostupnost a relativně vysoká cena měření. Laboratorní difraktometr PANalytical X´pert PRO sestávající se z klasické rentgenky, skleněné fokusační monokapiláry a detektoru X´Celerator je vhodný pro rutinní fázovou analýzu plochy o přibližném průměru 0,1mm.

Monokapilára je dutá skleněná trubice, ve které dochází k totální reflexi paprsků. Rentgenový svazek je za jejím ústí kvaziparalelní a jeho průměr je cca 100ěm. Velikost plochy vzorku ozářené primárním svazkem však záleží i na vzdálenosti ústí monokapiláry od středu goniometru a na úhlu pod kterým záření na analyzovanou plochu dopadá [2].

X´Celerator je velmi rychlý pozičně citlivý detektor pracující na principu RTMS (Real Time Multiple Strip). Jeho práci je možné si zjednodušeně představit tak, jako práci více než 1000 paralelně pracujících běžných detektorů. S jeho použitím k analýze klasickou práškovou difrakcí je tedy možné značně uspořit měřicí čas ve srovnáním např. s bodovým detektorem [2].

Minerální pigmenty, které bývají obsaženy v barevné vrstvě, jsou obvykle jemnozrnné ale dobře krystalické látky splňující prakticky beze zbytku fyzikální podmínky difrakce. A to i z velmi malé ozářené plochy, která je typická pro mikrodifrakci. Jestliže však potřebujeme analyzovat například podkladové vrstvy fresek, což jsou typicky polyminerální směsi maltovin, mohou nastat problémy. Maltovinové směsi vedle jemnozrnných fází pojiv obsahují i hrubá zrna minerálů – ostřiv, například křemene, vápence, živců a podobně (*viz.* Obrázek 1). Velikost takových zrn může být až srovnatelná s velikostí stopy primárního svazku u mikrodifrakčních experimentů. Tento fakt komplikuje kvalitativní fázovou analýzu, nebo není dodržena podmínka dostatečného počtu náhodně orientovaných částic v ozářeném objemu vzorku.

Úkolem této práce bylo zjistit mez identifikace takových krystalů. K tomu jsme použili jako modelové vzorky technické diamanty se známou velikostí zrn v rozmezí 1 - 100 µm. Obdobné experimenty jsme provedli i se vzorky kovů, které byly termicky zpracovány tak, aby měly určitou distribuci velikostí zrn v oboru jednotek až stovek mikrometrů.

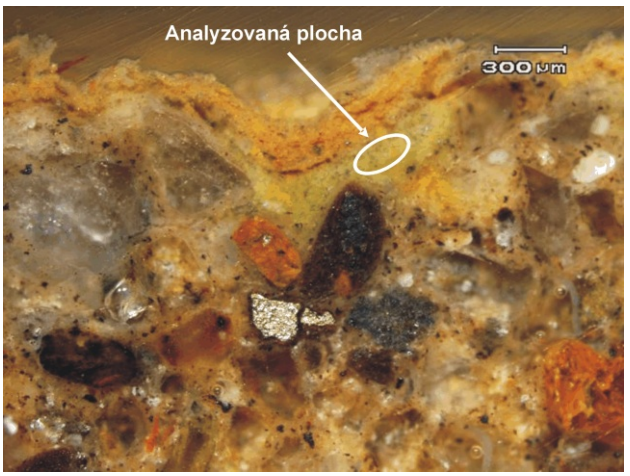
Měření na přístroji PANalytical X´PertPRO s monokapilárou o průměru 0,1 mm a detektorem X´Celerator [3] byla porovnávána s měřeními na přístroji Bruker D8 Advance vybaveném polykapilárou s výstupním průměrem 0,3 mm a plošným detektorem GADDS.

Při rostoucí velikosti zrn dochází zcela v souladu s teorií až do velikosti cca 10 µm k normální difrakci, kdy intenzity difrakčních linií odpovídají teoretickým. Též úhlová závislost intenzity Debyeových kroužků v záznamu detektorem GADDS je zhruba konstantní. V rozmezí velikostí zrn 10 – 40 µm dochází postupně ke změnám v intenzitách difrakčních linií v závislosti na tom jak roste velikost částic a klesá jejich počet v ozářeném objemu. Intenzita též značně závisí na orientaci povrchových ploch jednotlivých krystalů. Na záznamech z plošného detektoru je taktéž patrná rostoucí výrazná modulace angulárních intenzit Debyeových kroužků

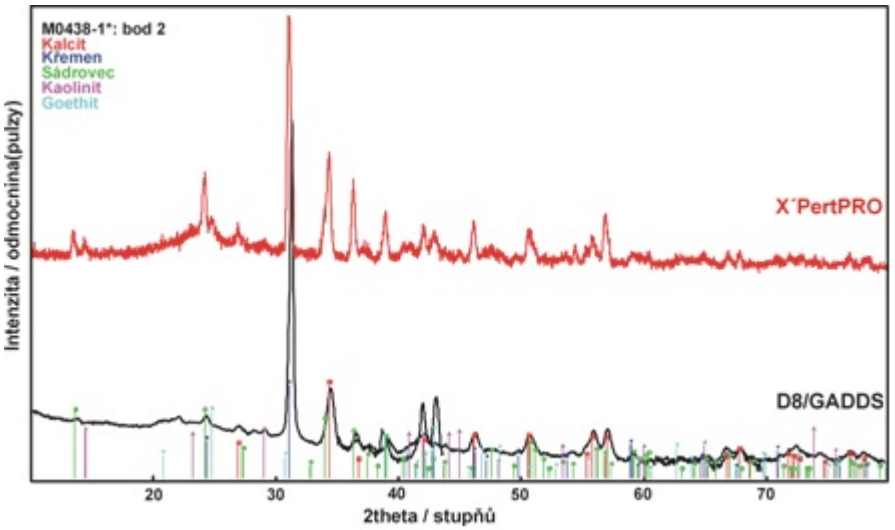
Pro velikost zrn nad 50 µm se částice začínají vzhledem k velikosti stopy primárního svazku chovat jako monokrystalické. Intenzita difrakčních linií proto zcela závisí na tom, zda je příslušný ozářený krystal orientován ve směru monokapilára – vzorek – detektor tak, aby difraktovaný signál dopadl do detektoru. V záznamu detektorem GADDS se vyskytují pouze náhodné tečky.

Tento fakt umožňuje spolehlivou identifikaci příslušné fáze do velikosti krystalů do cca 40 µm, kdy jsou patrny prakticky všechny difrakční linie příslušné fáze by se změněnými intenzitami. Odhad poměrného zastoupení fáze je možný pouze v případě, že velikost zrn všech fází ve vzorku nepřesáhne 10 µm.

Jestliže se ve vzorku vyskytnou krystaly s velikostí větší než 40 µm, je detekce takové fáze značně obtížná a to nejen při použití kombinace monokapilára – X´Celerator, ale i při použití mono či polykapiláry spolu s plošným detektorem GADDS.



Obrázek 1. Příčný řez freskou.



Obrázek 2. Kvalitativní fázová analýza fresky, srovnání přístrojů PANalytical X´PertPRO a Bruker D8/GADDS.

Na obou přístrojích byly získány srovnatelné výsledky. Byla proto prokázána praktická použitelnost přístroje X´PertPRO v mikrodifrakčním uspořádání jak k analýzám vzorků barevné vrstvy, tak i k analýzám podkladových vrstev fresek až do velikosti zrn cca 40 μm. Obrázek 2 znázorňuje srovnání difraktogramů získaných z analyzované plochy fresky pomocí obou výše uvedených přístrojů.

Autoři by rádi vyjádřili svůj dík za finanční podporu Grantové agenuře AV ČR, projektu číslo ***B1032401.***

1. P.C. Wang, G.S. Cargill, I.C. Noyan, C.K. Hu, Electromigration-induced stress in aluminium conductor lines measured by X-ray microdiffraction, *Appl. Phys Letters,* **72** (1998) 1296-1298.
2. X'Pert PRO User's Guide. PANalytical, Almelo, The Netherlands, 3rd Edition, (2002).
3. V. Šímová, P. Bezdička, J. Hradilová, D. Hradil, T. Grygar, X-ray powder microdiffraction to routine analysis of paintings, *Powder Diffraction* (v tisku).

S12

PRÁŠKOVÁ RTG MIKRODIFRAKCE V ANALÝZE MALÍŘSKÝCH DĚL

V. Grünwaldová Šímová, Petr Bezdička, Eva Kotulanová, David Hradil

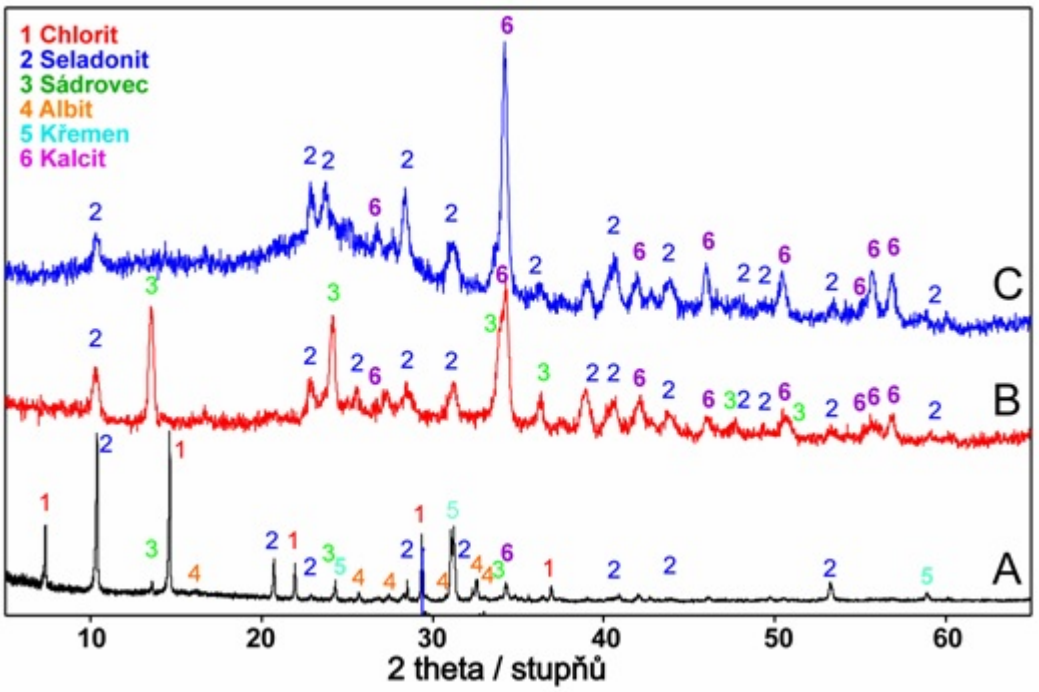
Akademická laboratoř materiálového průzkumu malířských děl, společné pracoviště Akademie výtvarných umění v Praze a Ústavu anorganické chemie AV ČR v Řeži

Materiálový průzkum uměleckých děl se stal nepostradatelným prostředkem pro získání podrobných znalostí o technologickém stylu rozličných autorů a historických období. Zároveň může přispět k posouzení autentičnosti díla a také může v některých případech upřesnit jeho dataci.

Tyto znalosti o uměleckém díle získáme studiem statigrafie a pigmentového složení barevných vrstev.

Pro stanovení stratigrafie jsou stěžejními metodami optická a elektronová mikroskopie [1]. Optická mikroskopie umožňuje rozlišení vrstev především na základě jejich odlišné barevnosti v bílém světle a jejich luminiscence vyvolaná v UV záření. Elektronová mikroskopie rozlišuje vrstvy především díky jejich různému chemickému kontrastu. Elektronová mikroskopie také umožňuje studovat granularitu a morfologii zrn.

Pigmenty, které jsou v barevných vrstvách obsaženy především ve směsích, se identifikují na základě prvkového a fázového složení vrstev. Ke stanovení prvkového složení se nejčastěji používá elektronová mikroskopie ve spojení s RTG mikroanalýzou (SEM/ EDX). Mineralogické složení se obvykle stanovuje RTG práškovou difrakcí [2, 3]. Tato metoda má však vzhledem ke studiu uměleckých děl dvě zásadní nevýhody. První nevýhodou je její destruktivnost, nutnost rozdrcení mnohdy umělecky cenného vzorku na prášek. Druhou nevýhodou je relativně veliká spotřeba vzorku. Množství vzorku potřebné pro konvenční RTG práškovou analýzu v Bragg-Brentanově



Obrázek 1.

uspořádání často není možné z uměleckého předmětu ani odebrat. Řešení těchto dvou nevýhod umožnila prášková RTG mikrodifrakce.

Vzorky byly měřeny na laboratorním difraktometru PANalytical X´Pert PRO. Tento difraktometr je vybaven běžnou rentgenkou, monokapilárou fokusující rentgenový svazek a velmi rychlým pozičně citlivým detektorem X´Celerator. Přístroj umožňuje rutinně analyzovat plochu o průměru přibližně 0.1mm v časovém horizontu několika hodin. Je tedy vhodný např. pro analýzy heterogenit v barevných vrstvách nebo na povrchu fragmentů uměleckých děl. Dále je možné analyzovat vybranou oblast barevné vrstvy odpovídající tlouš ky přímo na nábrusu. Přesná velikost ozářené plochy vzorku však záleží na vnitřním průměru monokapiláry, vzdálenosti jejího ústí od středu goniometru a úhlu omega [4].

Na obrázku 1 je ukázáno srovnání různých způsobů měření, které bylo provedeno na vzorku nástěnné malby z cisterciáckého kláštera v Plasech. Úkolem bylo zjistit, který zelený pigment byl použit v zelené vrstvě. Mechanicky separovaný vzorek byl nejprve analyzován konvenční práškovou RTG difrakcí. Byly nalezeny dva minerály – chlorit a seladonit. Obě fáze mohou být použity jako pigmenty. Proto jsme použili práškovou RTG mikrodifrakci k analýze svrchní zelené vrstvy fragmentu nástěnné malby a k analýze této vrstvy přímo na příčném řezu vzorkem (analýza nábrusu). Mikrodifrakčním měřením na povrchu fragmentu i v příčném řezu vzorkem byl identifikován pouze seladonit. Z těchto výsledků můžeme tedy vyvodit, že v tomto případě chlorit nebyl použit jako zelený pigment, ale že je pravděpodobně součástí omítky a do separované zelené vrstvy se dostal při jejím odběru (obrázek. 1).

Různé způsoby mikrodifrakčních měření umožnily odhalit i další zajímavost- různé zdroje sádrovce. Separovaná barevná vrstva, nábrus a fragment se lišily jeho obsahem velmi výrazně. V separované vrstvě, byl nalezen pouze malý podíl sádrovce, který pravděpodobně stejně jako chlorit pochází z omítky a který kontaminoval barevnou vrstvu při separaci. V nábrusu nebyl nalezen sádrovec žádný, naproti tomu na povrchu fragmentu byl zastoupen hojně, což lze nejpravděpodobněji vysvětlit tím, že se jedná o solný výkvět, který vznikl vlivem vlhkosti a atmosférického znečištění na povrchu nástěnné malby.

Poděkování:
Autoři by rádi vyjádřili svůj dík za finanční podporu Grantové agenuře AV ČR, projektu číslo ***B1032401****.*

1. D. Hradil, J. Hradilová, B. Hřebíčková, Clay minerals in pigments of mediaeval and Baroque paintings, *Geologica Carpathica*, **53** (2001) 123-126.
2. M. Ortega, J.A. Ascencio, C.M. San-German, M.E. Fernandez, L. Lopez, M. Jose-Yacaman Analysis of prehispanic pigments from “Templo Mayor” of Mexico city, *J. Mater. Sci*., **36** (2001) 751-756.
3. L. Rampazzi, F. Cariati, G. Tanda, M.P. Colombini, Characterisation of wall painting in the Sos Furrighesos necropolis (Anela, Italy), J. *Cultural Heritage*, **3** (2002) 237-240.
4. V. Šímová, P. Bezdička, J. Hradilova, D. Hradil, T. Grygar, X-ray powder microdiffraction to routine analysis of paintings, *Powder Diffraction* (v tisku).

S13

PŘÍPRAVA A POPIS VLASTNOSTÍ PRÁšKOVÉHO MATERIÁLU NA BÁZI Fe-ZrO_2

P. Roupcová[1,2], O. Schneeweiss[1] a P. Bezdička[3]

[1]Ústav fyziky materiálů AV ČR, Žižkova 22, 616 62 Brno, Česká Republika
[2]Ústav materiálového inženýrství, FSI, VUT v Brně, Technická 2, 616 69 Brno
[3]Ústav anorganické chemie AV ČR, 250 68 Řež u Prahy

Práškový materiál na bázi Fe-ZrO_2 byl připraven redukcí oxidu železa v matrici kubického ZrO_2 stabilizovaného Y_2O_3. Takto připravený materiál se skládá z částic á-Fe nebo Fe_3O_4 a matrice tvořené jednou z fází monoklinického, tetragonálního nebo kubického ZrO_2 nebo jejich směsí.

Důvodem přípravy a sledování vlastností tohoto materiálu jsou předchozí dobré zkušenosti s materiálem syntetizovaným pomocí elektrojiskrové eroze. Kromě příznivé velikosti a tvaru částic, jsme u takto připraveného prášku pozorovali schopnost ukládat vodík a ochránit železo uložené v matrici ZrO_2 proti oxidaci.

Pro studium fázového složení tohoto materiálu bylo použito rentgenové práškové difrakce a Mössbauerovy spektroskopie v transmisním uspořádání. Magnetické vlastnosti a izotermická krystalizace byly měřeny pomocí vibračního magnetometru. To bylo prováděno za teplot 293÷1093K ve vakuu (~10^{-1} Pa) a v čistém vodíku (5N). Měření izotermické transformace bylo provedeno u homogenizovaného vzorku ve vodíku za teplot blízkých Curiově teplotě Fe_3O_4 (580 °C). Důvodem sledování izotermické transformace je snaha určit její aktivační energii a posoudit existenci Hedvallova jevu (Tj. anomální chování teplotně aktivovaných procesů v magnetickém poli v blízkosti tranzitní teploty).

Připravený vzorek po homogenizaci je složen ze 75 % kubického ZrO_2 a 25 % oxidů železa (Fe_3O_4 a Fe_2O_3). Termomagnetická křivka homogenizace vzorku ukazuje při chladnutí magnetickou transformaci fáze Fe_3O_4. Z termomagnetických křivek vzorků žíhaných ve vodíku je patrná transformace všech typů oxidů železa na -Fe. Na Mössbauerových spektrech vzorků žíhaných ve vodíku je obsah á-Fe průměrně ~ 93 %. Zbytek tvoří paramagnetické složky obsahující Fe^{3+} (IS = 0,35 a 0,47 mm/s, QS = 0,3-0,6 mm/s) a Fe^{2+} (IS = 1,2 mm/s) rozpuštěné v matrici kubického nebo tetragonálního ZrO_2. Přítomnost -Fe, kubického a tetragonálního ZrO_2 byla potvrzena práškovou difrakcí. Transformace stabilizovaného kubického ZrO_2 na tetragonální a monoklinický je úměrná teplotě, době žíhání a množství stabilizátoru. Nárůst a velikost nově vzniklých fází koherentních oblastí během opakovaného ohřevu do 800°C v různých atmosférách, určených pomocí RTG, byl pozorován z 30 nm na 70÷160 nm.

Pro izotermickou transformaci byly zvoleny teploty nad a pod teplotou magnetické transformace (580, 600 a 620 °C) a (500, 520 a 540 °C). Křivky nad transformační teplotou mají hladký S-tvar typický pro difúzní děje. Lze z nich snadno určit okamžik počátku i konce transformace a celkovou dobu trvání i rychlost transformace. Oproti tomu se do tvaru S-křivky pod Curiovou teplotou promítají dva další faktory: redukce Fe_3O_4 a Fe_2O_3 na paramagnetický FeO a prudký pokles magnetického momentu v důsledku vyrovnávání teplot v celém objemu vzorku způsobený regulací topného tělesa magnetometru. Z těchto křivek je možné pouze přibližně odhadnout začátek a konec transformace a její celkovou dobu.

Tato práce vznikla za podpory výzkumného záměru AV0Z20410507.

S14

ANALÝZA DIFRAKČNÍCH PROFILŮ ZLATÝCH NANOČÁSTIC

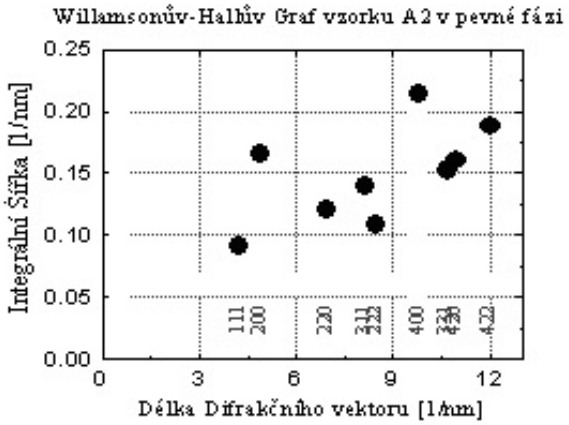
Zdeněk Matěj[1], Radomír Kužel[1] a Miroslav Šlouf[2]

[1] Katedra fyziky elektronových struktur, Matematicko-fyzikální fakulta, Univerzita Karlova v Praze, 121 16 Praha 2, Ke Karlovu 5
[2] Ústav makromolekulární chemie, Akademie věd České Republiky, Heyrovského nám. 2, 162 06 Praha 6

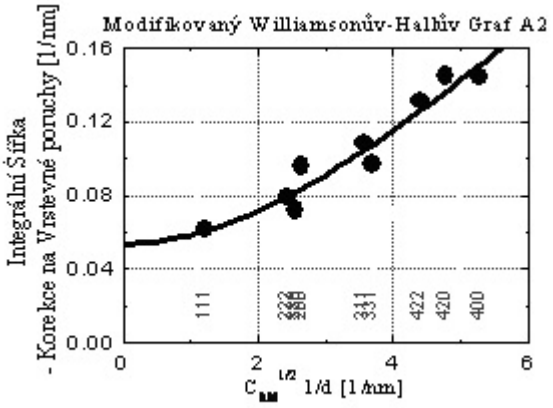
Rentgenovou práškovou difrakcí byly studovány velmi malé částice zlata připravené chemickou reakcí ve formě koloidních roztoků, které byly pro difrakční měření naneseny v tenkých vrstvách na skleněné podložky [1]. Částice byly připraveny se záměrem je využít jako kalibrační částice pro měření dynamického rozptylu světla, byly zkoumány i dalšími metodami (TEM, UV/vis) a byla známa jejich velikost a tvar [1-2].

Malé množství materiálu v tenkých vrstvách vyžaduje použití geometrie paralelního svazku s malým úhlem dopadu. Popis fyzikálního rozšíření difrakčních profilů je v této geometrii stejný jako v případě klasického Braggova-Brentanova symetrického uspořádání, nevýhodou je ale velké vlastní přístrojové rozšíření difrakcí (FWHM=0.27°) a nelineární pozadí způsobené rozptylem na skleněné podložce, které ovšem bylo proměřeno a odečteno od difrakčních záznamů.

Naměřené profily jednotlivých linií difrakčního záznamu byly fitovány analytickými funkcemi a z jejich parametrů (po odečtení přístrojového rozšíření metodami numerické dekonvoluce) byly určeny profilové parametry difrakcí (FWHM, integrální šířka, Lorentzov-



Obrázek 1. Williamsonův-Hallův Graf vzorku A2 (D_{teor} = 11 nm).

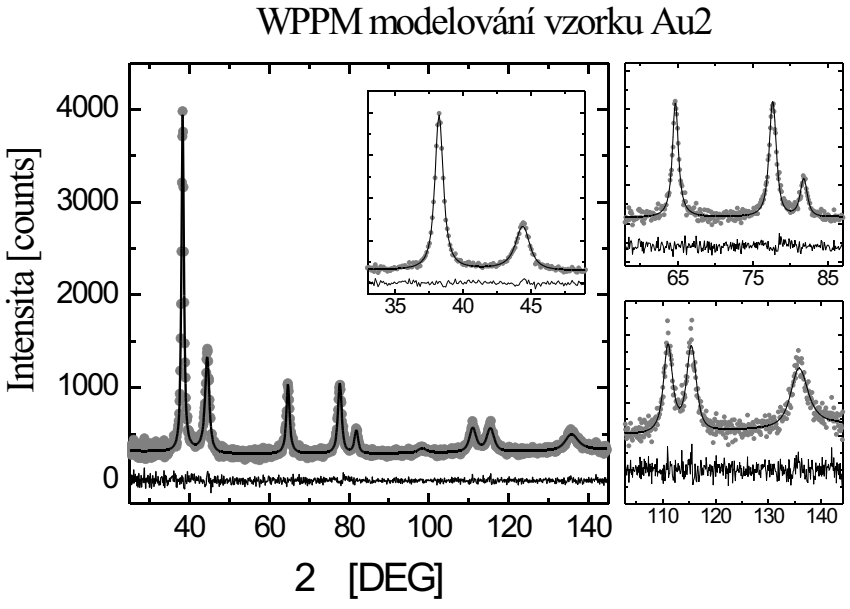


Obrázek 2. Modifikovaný Williamsonův-Hallův Graf [8] vzorku A2 (D_{teor} = 11 nm). Rozšíření píků způsobené vrstevnými poruchami bylo odečteno od integrálních šířek.

ská/Gaussovská povaha píku). Zkoumáním těchto parametrů (známá metoda Williamsonova-Hallova grafu) lze určit velikost krystalitů, povahu a množství poruch v krystalu [3-5]. Pomocí programu PM2000 byly modelovány celé difrakční záznamy (metoda WPPM) [6-7].

Malá velikost krystalitů se projevuje rozšířením píků, které nezávisí na velikosti difrakčního vektoru (sin) a šířka linií v reciprokých jednotkách (1/Å) je (v případě kulových zrn) pro všechny difrakce (hkl) stejná. Z obrázku 1 je ale naopak zřejmá velká anizotropie rozšíření profilů a zvětšování šířky píků s délkou difrakčního vektoru. Takové chování je příznačné pro rozptyl na deformačním poli poruch krystalové mříže (anizotropní kontrast dislokací - podobně jako např. v TEM a vrstevných poruch) [3-5, 8-10]. Některé poruchy (vrstevné chyby) navíc způsobují asymetrii a posun píků [3-5, 10]. Anizotropní rozšíření profilů v nanokrystalických materiálech připravených z roztoku, které se podařilo vysvětlit přítomností dislokací, už bylo pozorováno např. v [8]. Až uvážením vlivu dislokací (obrázek 2: metoda modifikovaného WH grafu - x-ová osa přenásobena orientačními kontrastními koeficienty, které byly spočítány pomocí programu ANIZC[9]) a vrstevných poruch bylo možné chování rozšíření profilů vysvětlit. Zahrnutím těchto defektů při modelování profilů (WPPM) [6-7, 10] bylo dosaženo výrazně lepší shody výpočtu a naměřených dat (obrázek 3).

Důležité výsledky profilové analýzy 4 vzorků s různou velikostí částic jsou uvedeny v tabulce 1. Velikost krystalitů určená rtg. práškovou difrakční analýzou je v dobré shodě s velikostí částic určených jinými metodami. Malá difraktovaná intenzita ale zapříčiňuje velkou nepřesnost určení velikosti krystalitů zvolenými metodami profilové analýzy, protože jednotlivé profily není možné naměřit dostatečně přesně, aby se daly zcela oddělit různé příčiny



Obrázek 3. Modelování celého difrakčního záznamu vzorku A2 (D_{teor} = 11 nm) programem PM2000 [6-7].

rozšíření píků a určit jednoznačně rozdělení velikosti krystalitů. Překvapivá je přítomnost velké mikrodeformace uvnitř krystalitů (velká hustota dislokací - asi $6x10^{15}$ m^{-2}) a výskyt růstových vrstevných poruch (až 8% ve vzorku s nejmenšími částicemi).

[1] M. Šlouf, R. Kužel, Z. Matěj, *Materials Structure*, **11** (2004) 166-168.

[2] M. Šlouf, přednáška na tomto kolokviu.

[3] B. E. Warren: *X-ray diffraction*. 1969. Addison-Wesley.

[4] V. Valvoda a kolektiv: *Základy strukturní analýzy*. Praha 1992. Karolinum.

[5] M. A. Krivoglaz: *X-ray and Neutron Diffraction in Nonideal Crystals*. Berlin 1996. Springer-Verlag.

[6] P. Scardi, M. Leoni, *Acta Cryst. A*, **58** (2002) 190-200.

[7] P. Scardi, M. Leoni, Y. H. Dong, *Eur. Phys. J. B*, **18** (2000) 23-30.

[8] T. Ungár, I. Dragomir-Cernatescu, D. Louer, N. Audebrand, *J. Phys. Chem. Sol.*, **62** (2001) 1935-1941.

Tabulka 1. Teoretická velikost zrn (d_{theor}), velikos krystalitů určená z rozšíření profilů (d_{diff}), hustota dislokací ($_{diff}$) a pravděpodobnost výskytu růstových vrstevných chyb ($_{twin}$) určené z rtg. difrakčních profilů.

	d_{theor} (nm)	d_{diff} (nm)	$_{diff}$ (10 m	b_{twin}
Au1	4.5	10±6	5±2	0.08±0.03
Au2	11.1	15±5	6±1	0.07±0.02
Au3	33.4	31±5	6.6±0.5	0.05±0.01
Au4	101.5	92±20	9±2	0.012 ±0.005

[9] A. Borbély, J. Dragomir-Cernatescu, G. Ribárik, T. Ungár, *J. Appl. Cryst.*, **36** (2003) 160-162.

[10] P. Scardi, M. Leoni, R. Delhez, *J. Appl. Cryst.*, **37** (2004) 381-390.

S15

STRUCTURE OF FC-FRAGMENT OF THE MOUSE IMMUNOGLOBULIN

Petr Kolenko[1,3], Jan Dohnálek[1], Renata Štouračová[2], Tereza Skálová[1], Galina Tiščenko[1], Jarmila Dušková[1], Jindřich Hašek[1], hasek@imc.cas.cz

[1]Institute of Macromolecular Chemistry, Academy of Sciences of CR,
[2]Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences of CR
[3]Faculty of Nuclear Sciences and Physical Eng., Czech Technical University of Prague

Immunoglobulines play an irreplaceable role in the immunity system in all higher organisms. Because of its role in activation of immunological reaction against infected cells, immunoglobulines are routinely used in medical applications. There is a very reliable way of IgG purification based on its affinity to the B fragment of the protein A from *Staphylococcus Aureus*. However, the costs of production of protein A are significant and thus a new method of rapid and cheap production of purified immunoglobulines in non-denaturating conditions is worth of our special interest. Any highly selective separation process should be based on molecular recognition between a specially designed ligand and the immunoglobulin surface.

In spite of an immense diversity of Fab fragments containing the hypervariable regions (responsible for molecular recognition of antibody) at the antigen binding sites, the immunoglobulines of the same type (e.g. IgG2b) share very similar aminoacid sequences of Fc fragment. The object of our interest is Fc-fragment, because of its invariant structure. Explication of structure of this fragment and its interaction with other molecules can help in design of polymer sorbents for affinity chromatography.

Structure determination

Monoclonal antibody, class IGg2b was cleaved by papain and purified in 4C on BioLOGIC LP System(BIORAD) using protein A Sepharose column (Biorad). The measured crystal was grown under the following conditions:

Reservoir: HEPES pH 7.5, PEG 2000 20 % (w/v).
Drop: 1 l of reseivoir solution plus 1 l of protein 8 mg/ml, PBS (phosphate buffer saline) pH 7.5.
Cryoprotectant: 20 % glycerol.

The diffracted intensities (total 34029 independent reflections) was collected at the ID-29 beamline at the synchrotron ESRF in Grenoble with the diffraction limit 2.2 Å. The measured crystal (a triangle platelet 0.3 0.02 mm) was flash cooled to 100 K. Space group is C2, the unit cell a = 135,73 Å, b = 62,75 Å, c = 69,81 Å, = 103,35°. Data reduction was performed by program package HKL (Denzo, Scalepack, Xdisp) [1]. The phase problem was solved by molecular replacement (program AMORE [2]) using the structure model 1IGT taken from PDB [7] (sequence similarity 79 %). The other data processing was done mostly using the program package CCP4 [3]. The structure refinement was done by program REFMAC [4]. Manual corrections were done by program XtalView [5], the solvent water molecules determined with help of ARP/wARP [6]. The methods used were similar as described in [9]. The final R factors are R = 0.19, R_{free} = 0.25. The refined structure satisfies all criteria set by program Procheck [7].

Both protein chains of the Fc fragment IgG2b (residues from Gly125A to Arg331A and Gly125B to Arg331B) were uniquely identified in the maps of electron density (except of conformational alternatives evident at side chains of several residues.