

## **Preparazione per le esercitazioni del Corso di Biocristallografia e Microscopia Elettronica**

**Anno accademico 2019/2020**

Le esercitazioni prevederanno una parte di analisi di dati cristallografici, dall'indicizzazione all'affinamento della struttura e alla sua validazione, seguendo tutte le tappe di cui abbiamo parlato a lezione. Una seconda parte delle esercitazioni ci consentirà di fare un po' di pratica con uno dei software per la visualizzazione delle molecole e per la preparazione di immagini utili a mostrare i diversi aspetti delle strutture (e utili alla preparazione della presentazione per l'esame).

- (1) Iniziamo scaricando i dati di diffrazione raccolti su un cristallo di lisozima.
- (2) Per l'analisi dei dati cristallografici utilizzeremo diversi programmi dalla suite di software CCP4 (Mosflm, MolRep o analogo software per il Molecular Replacement, Refmac, Coot ed eventualmente qualche strumento per la validazione). CCP4 e i suoi software sono gratuiti.
- (3) Per le esercitazioni sulla visualizzazione/preparazione di immagini utilizzeremo il software Pymol nella sua versione gratuita.

### **Dati di diffrazione raccolti su un cristallo di lisozima presso la beamline XRD1 di Elettra**

Potete scaricare le immagini di diffrazione dalla mia cartella di Google Drive, al seguente link:

[https://drive.google.com/open?id=1GF7TWwMYFEv\\_x1tYnvtJ1YJMxqw-FooV](https://drive.google.com/open?id=1GF7TWwMYFEv_x1tYnvtJ1YJMxqw-FooV)

Per comodità il link sarà disponibile anche su Moodle in forma "clickabile".

La raccolta dati è composta da 360 immagini di diffrazione. Ciascun file ha una dimensione di circa 2.4 MB.

### **Installazione di CCP4**

Per scaricare il software, andate sul sito <http://www.ccp4.ac.uk/> (il link è anche presente in versione "clickabile" su Moodle). Gli sviluppatori hanno appena rilasciato una nuova versione (7.1). Suggesto di scaricare quella.

Per scaricare la versione, sarà sufficiente andare sulla pagina di download. Il sito dovrebbe riconoscere direttamente il vostro sistema operativo e da qui potete iniziare a scaricare il file di setup. Nel caso il sistema operativo non sia corretto, selezionatelo manualmente.

## CCP4 Download pages

Mac OS X GNU/Linux MS Windows Source code

Here you can download the latest version of the CCP4 Software Suite, version 7.1, code name Skipton. See the [announcement](#) for further information. See also the [installation instructions](#) and [known issues](#).

### Binary downloads for MS Windows

The binary packages for Microsoft Windows are available below. These include [SHELX](#) and [WinCoot](#) (version 0.8.9.2) as optional components. If you are planning to install SHELX, please register and confirm your agreement to conditions of use at the SHELX web site. Note that the conditions are different for [academic](#) and [for-profit](#) users.



Click [here](#) for the MD5 checksums of all files.

To try the latest version of the CCP4 Suite while still keeping the previous one, unpack the installer using 7z and run ccp4i2.bat or ccp4i.bat.

[Let us know](#) if anything does not work as expected.



Science and Technology Facilities Council



Biotechnology and Biological Sciences Research Council



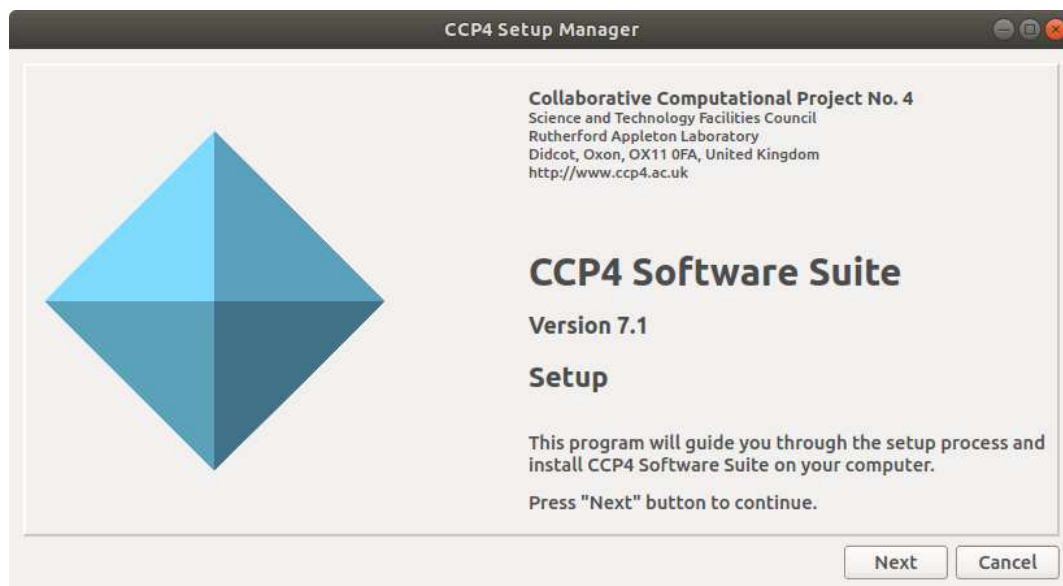
CCP4



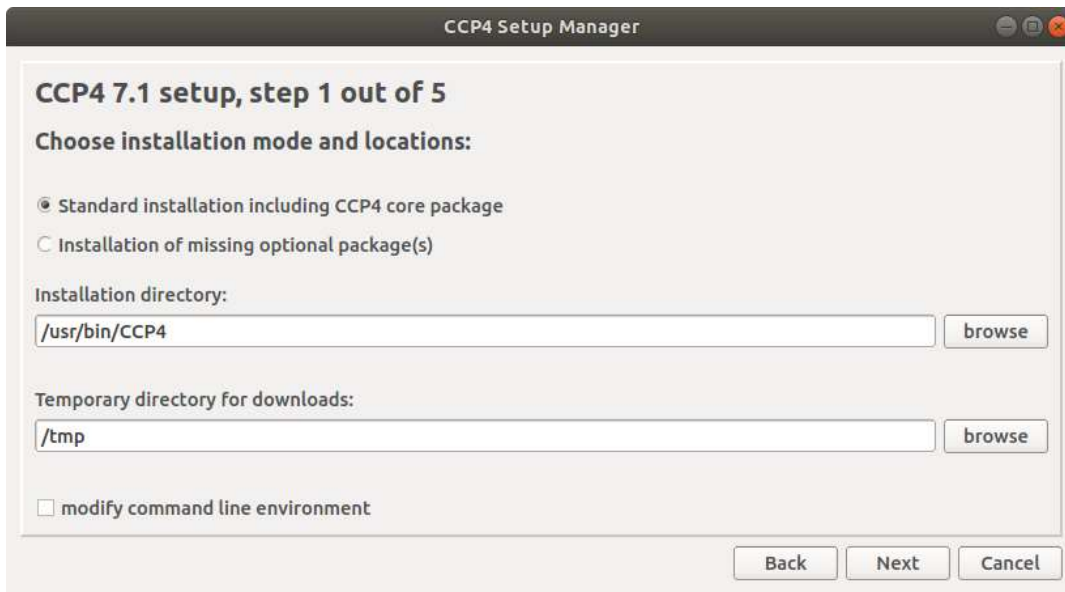
EBSR

Una volta che il file è stato scaricato completamente, potete avviarlo. Su Windows basta il doppio click sul file, che è un eseguibile. Su Linux (e forse anche su Mac) è necessario estrarlo (il file scaricato è un tar.gz) e poi renderlo eseguibile (da terminale: `chmod 777 <nome del file>`). Attenzione: questo è un file di setup che permetterà il download degli eseguibili; perchè l'installazione venga completata sarà necessaria la connessione internet attiva fino al termine del download.

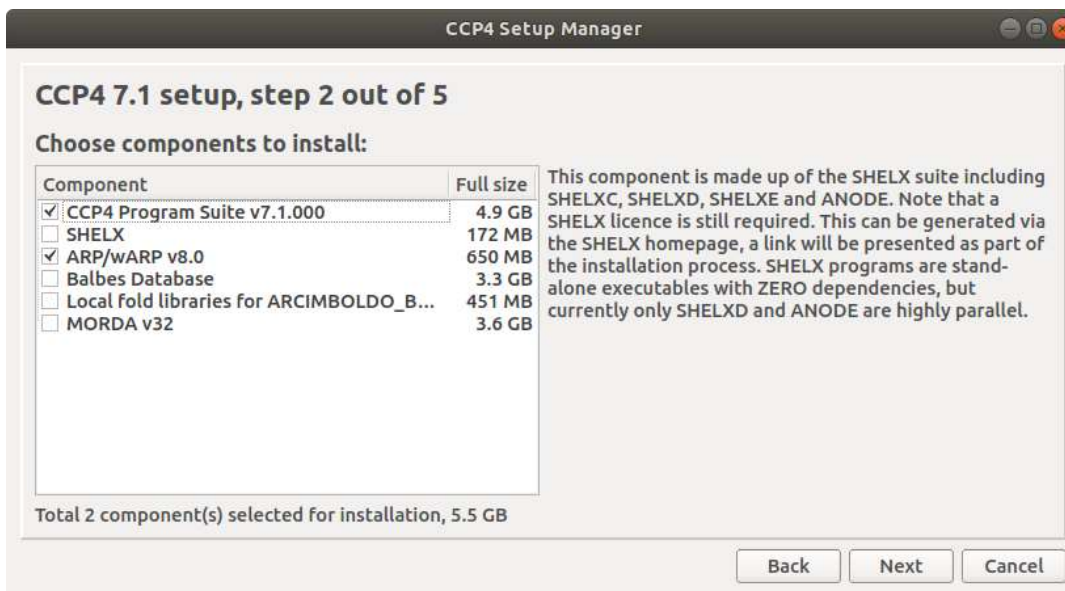
Quando il file si avvia, vi appare la seguente finestra (questo nell'installazione su Linux, ma quella in Windows dovrebbe essere molto simile):



Potete selezionare Next.

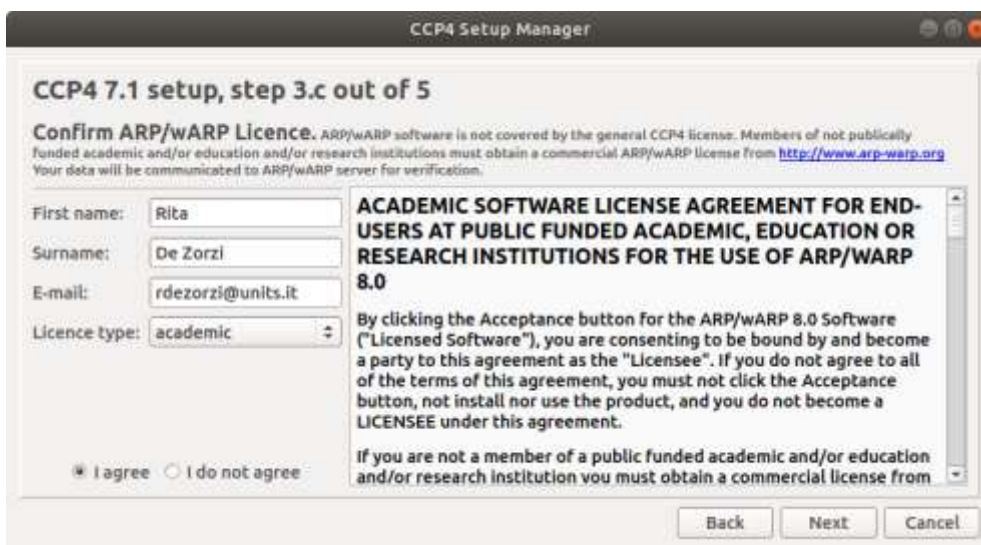
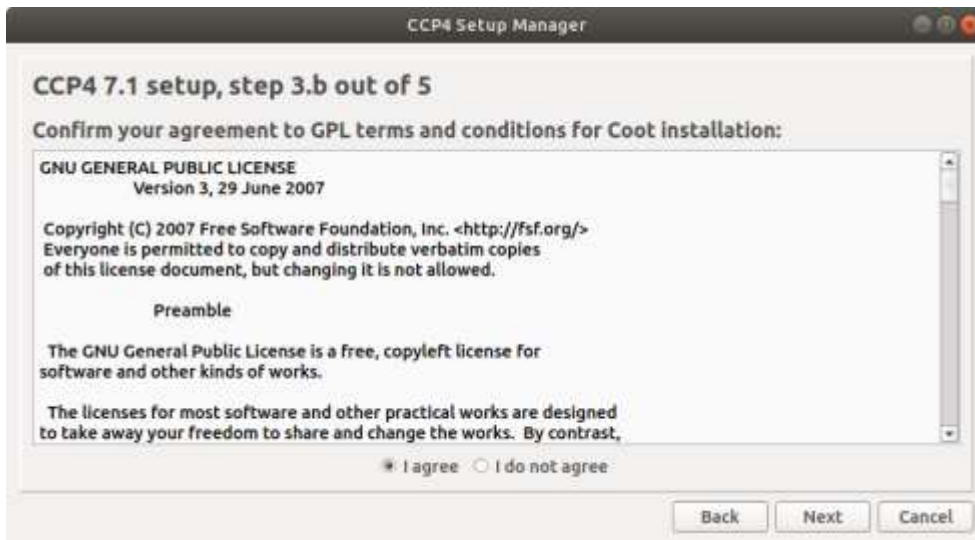


A questo punto potete selezionare l'installazione standard e mettere il file nella cartella che preferite.

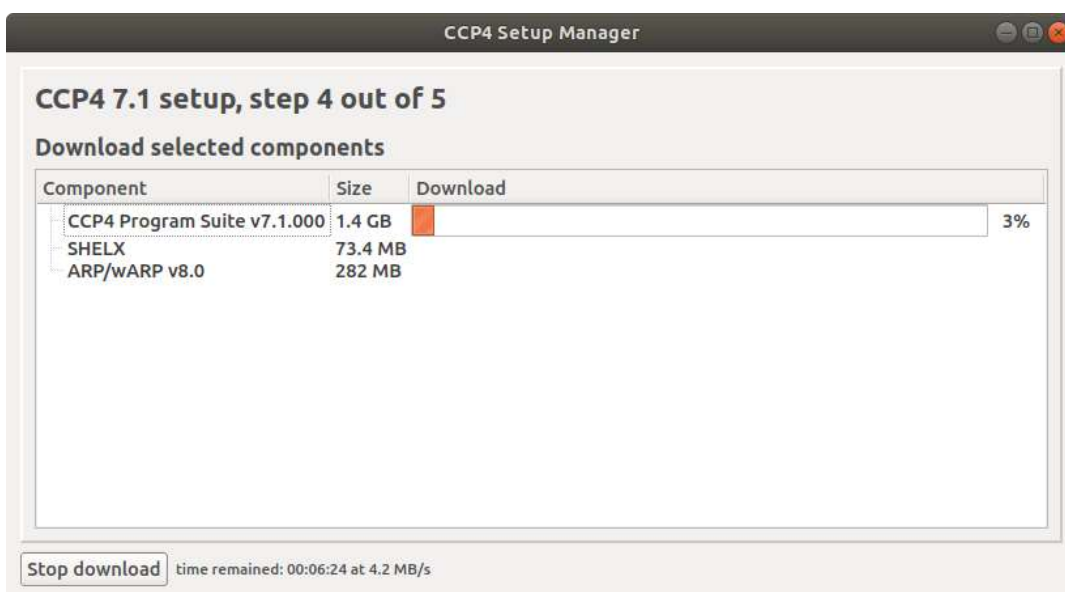


In questa schermata selezionate i software che vi interessa scaricare. Quando vi appare la schermata dovrebbe essere selezionato anche Shelx, ma a noi non interessa. Dopo aver selezionato CCP4 Program Suite v7.1.000 e ARP/wARPv8.0, proseguite con Next.

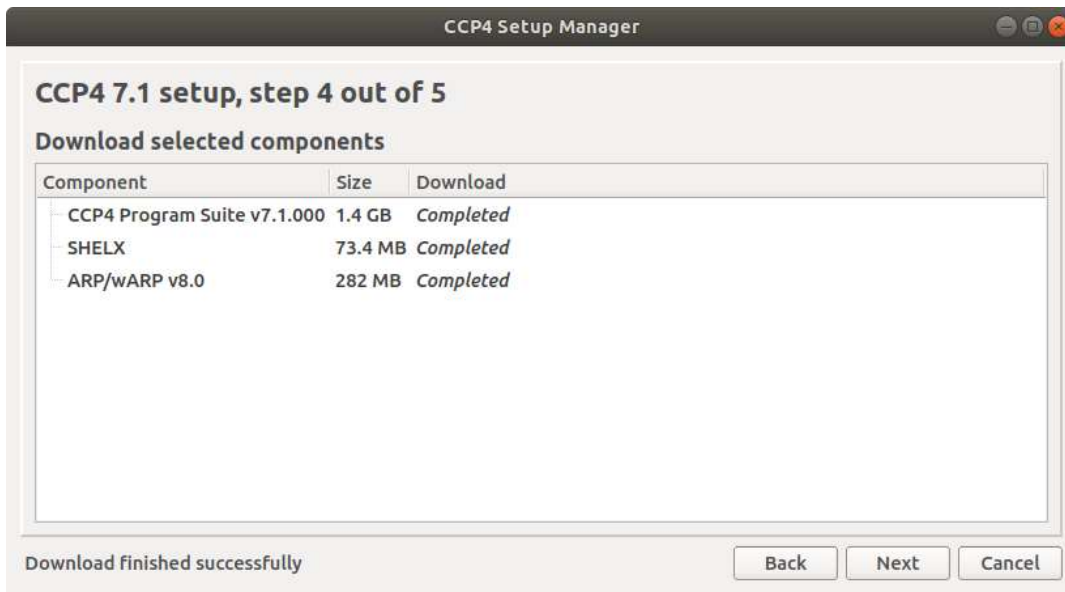
Da qui in poi ci sono le licenze dei diversi software. Accettate sempre e proseguite. Per la licenza di ARP/wARP potete mettere la vostra mail istituzionale.



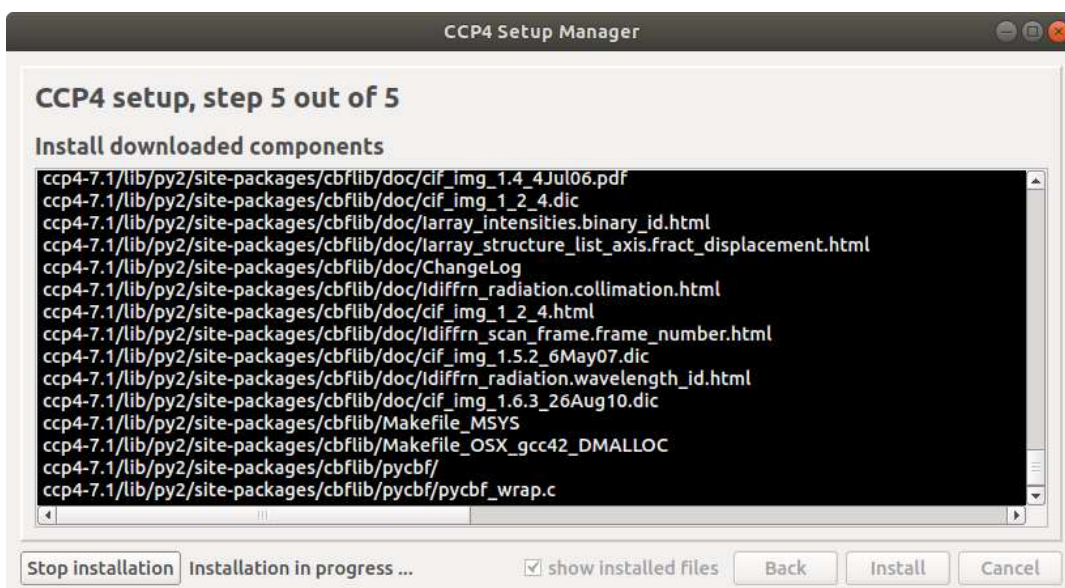
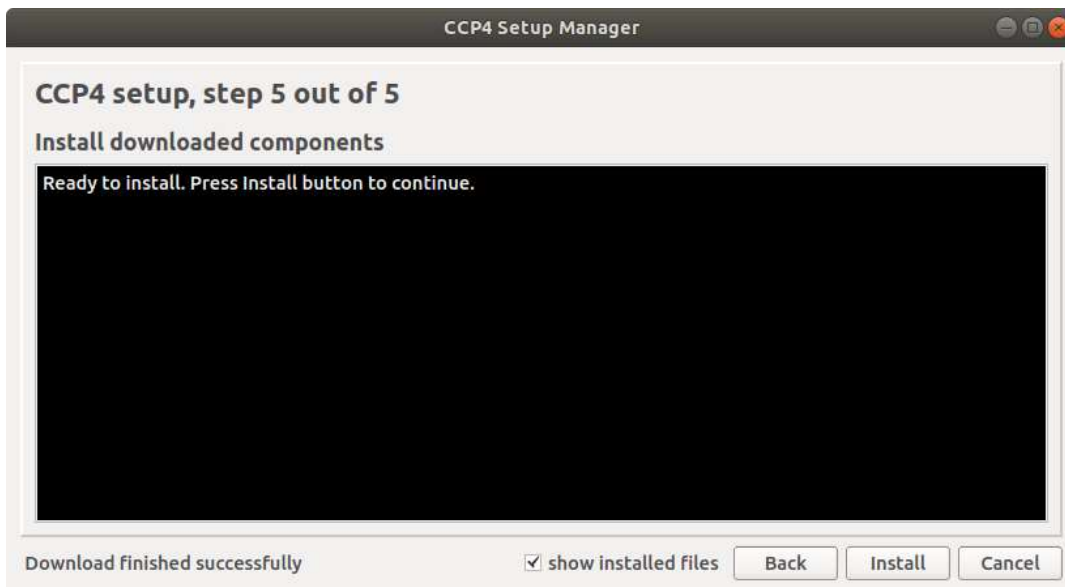
A questo punto il programma di setup esegue il download dei file necessari all'installazione:



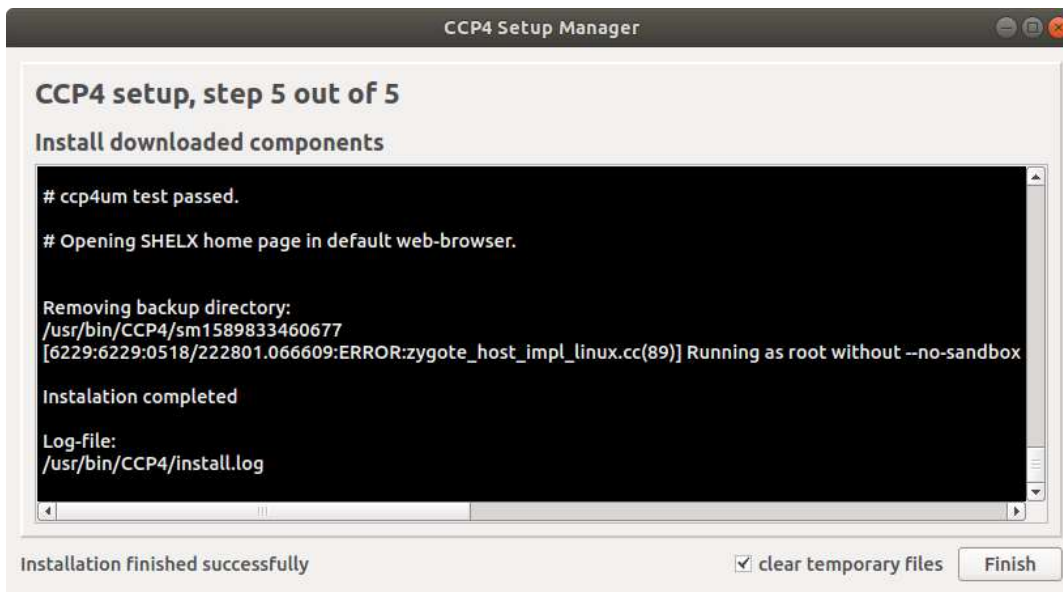
(Sulla vostra schermata non apparirà SHELX).



Siete pronti per iniziare l'installazione! Proseguite sulla finestra successiva con Install:



L'installazione dura un po'... A me ci sono voluti circa 20 minuti per Windows, ma solo 5 minuti per Linux. Ma immagino che questo dipenda dalla specifica macchina.



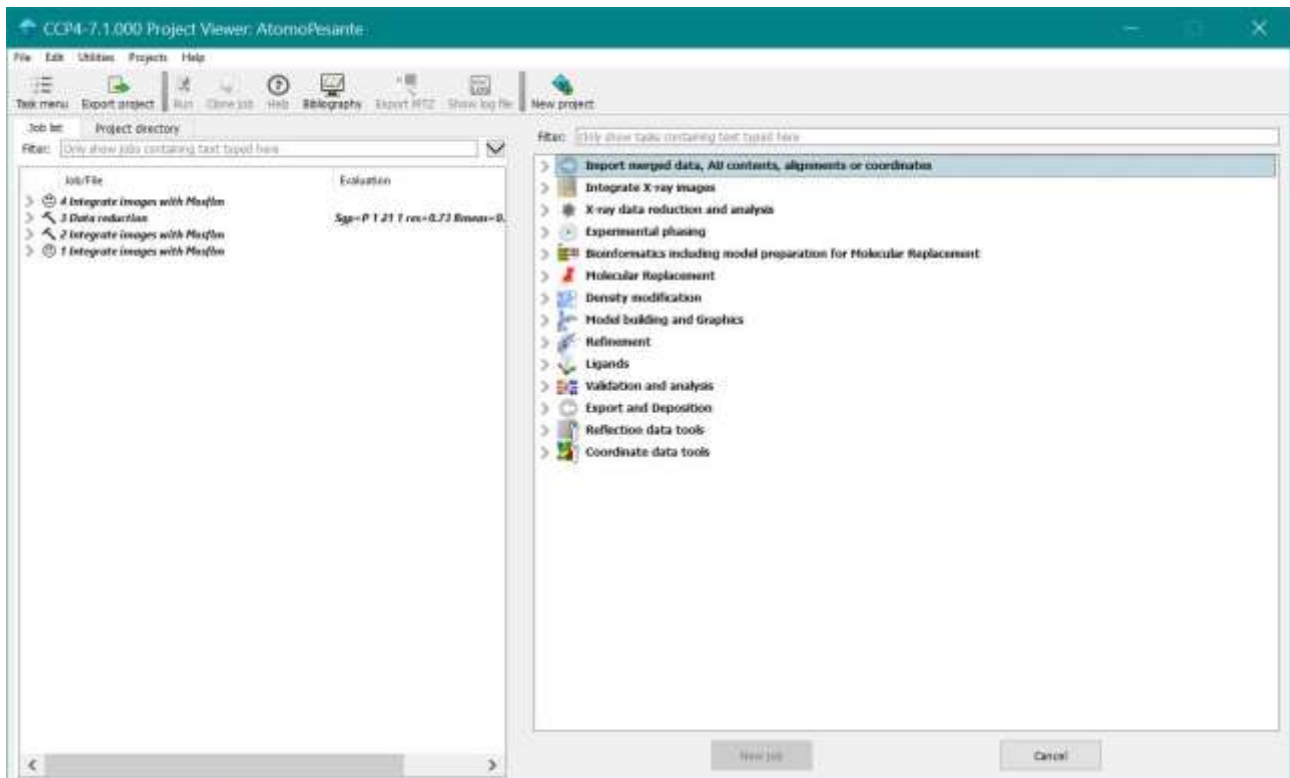
Una volta terminata l'installazione potete chiudere il programma di setup con il pulsante Finish.

Il programma dovrebbe aver creato sul vostro Desktop le icone di CCP4i, CCP4i2 e Coot:

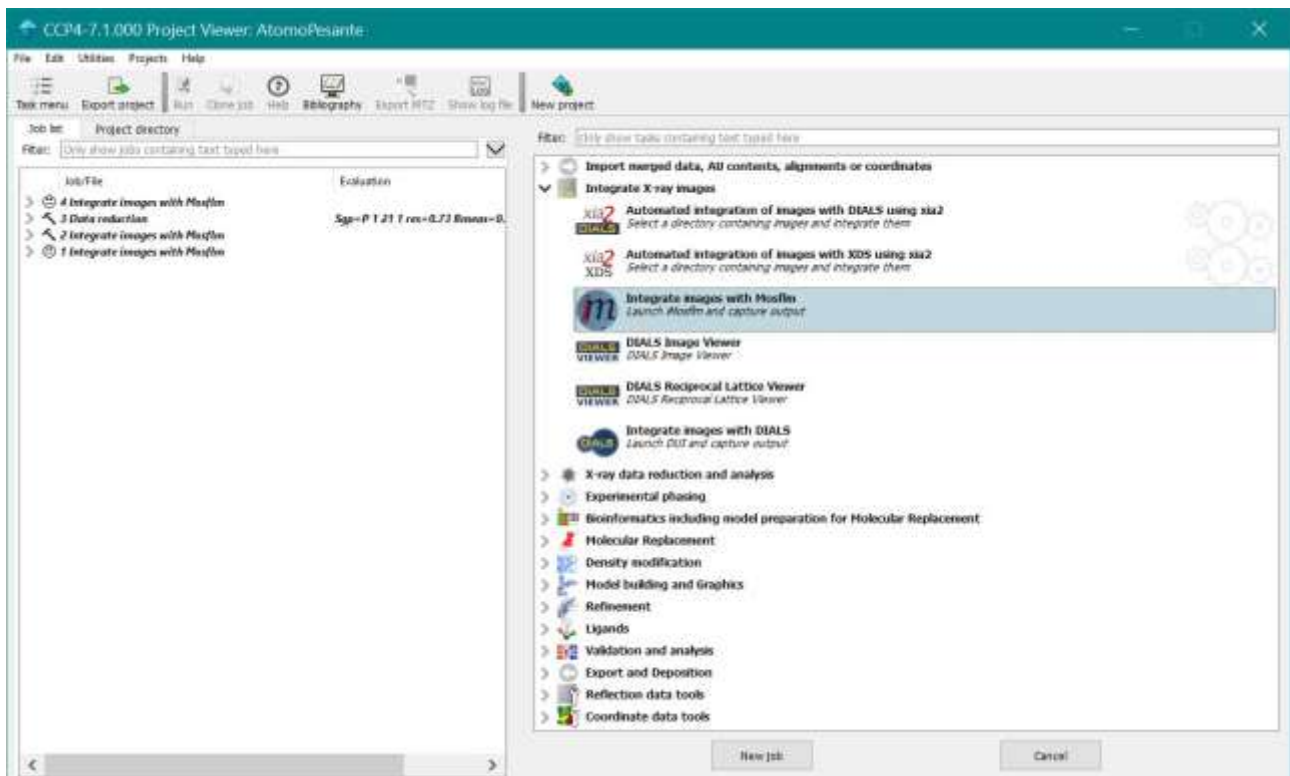


Al termine dell'installazione è opportuno riavviare il computer.

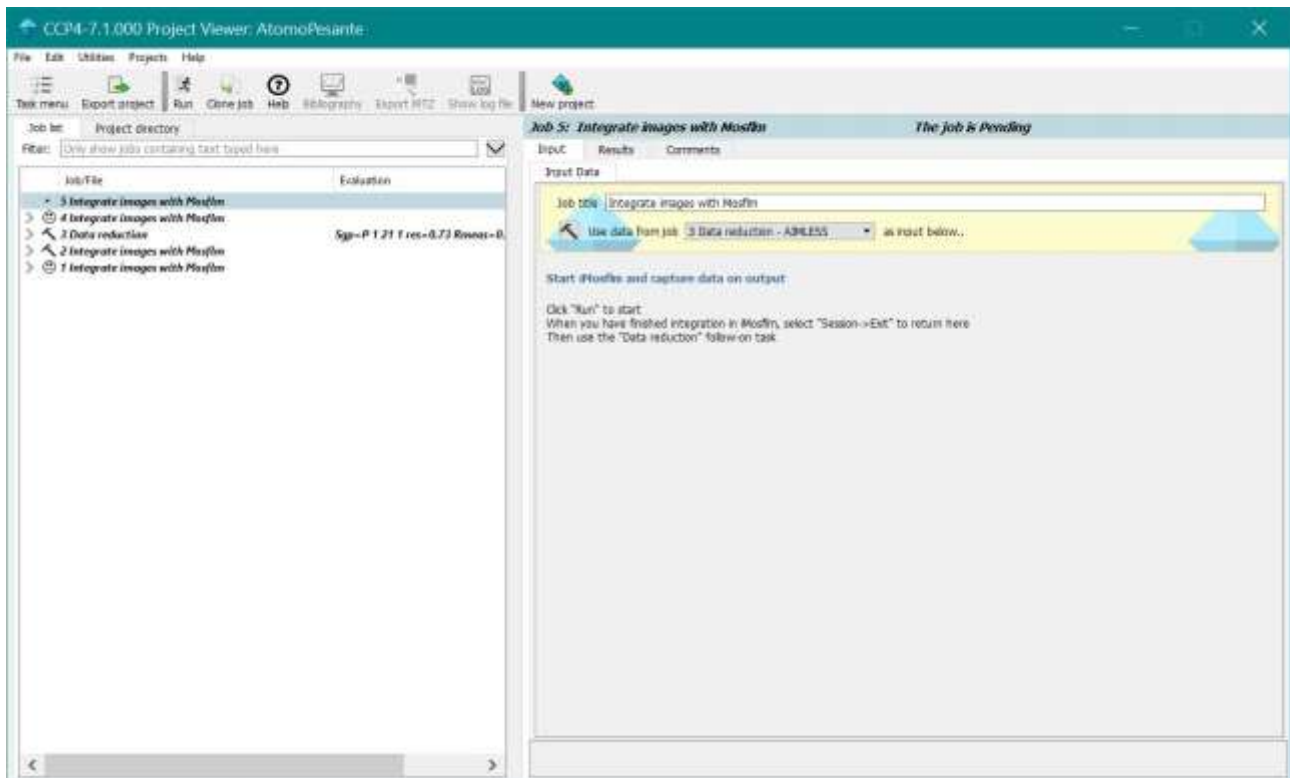
Qualche ulteriore step vi permetterà di verificare che i programmi che ci servono funzionino nel modo corretto. Cominciamo verificando CCP4i2. Quando aprite il programma dovrete visualizzare questa finestra:



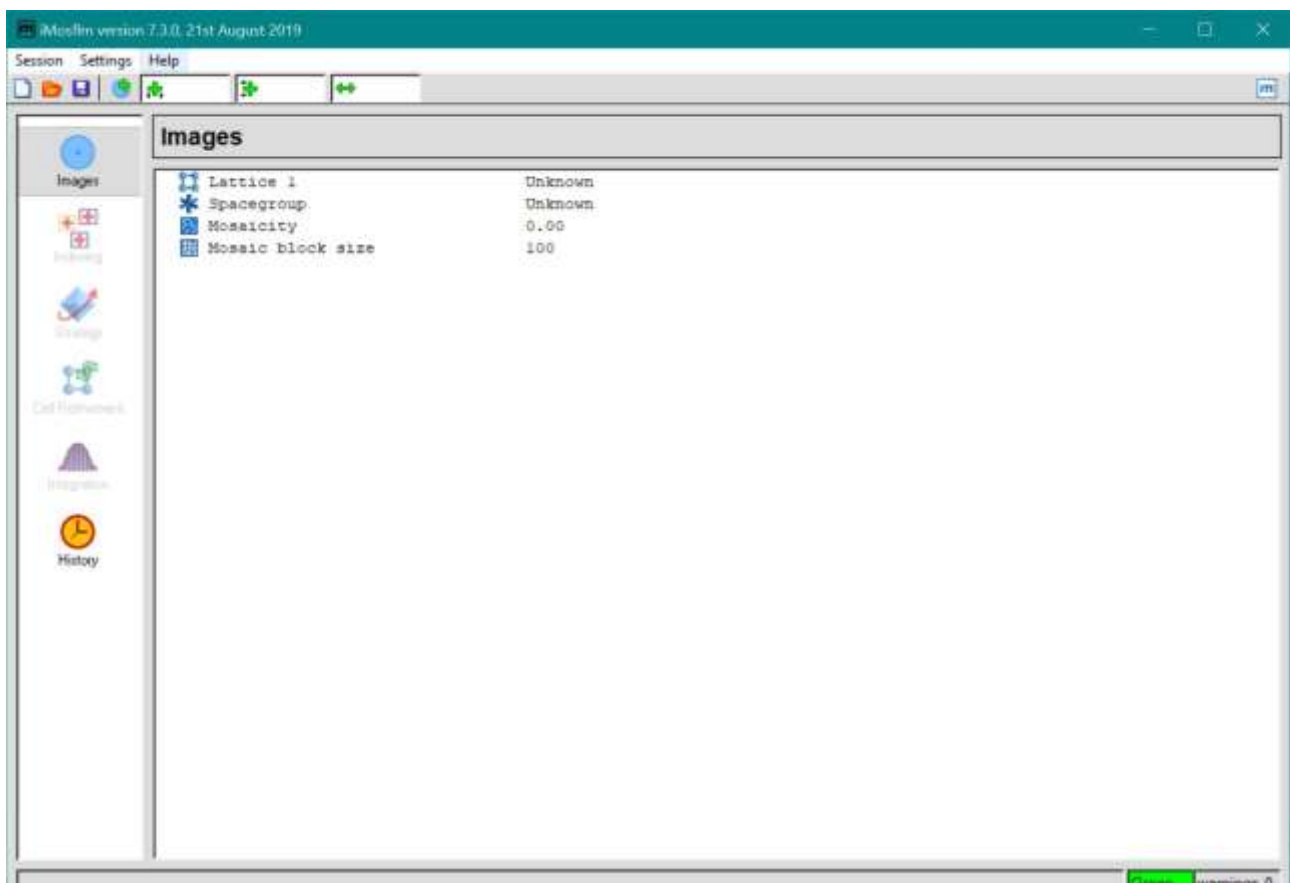
Da qui scegliete “Integrate X-ray images” (seconda voce sulla destra).



Nel menù che si apre, selezionate “Integrate images with Mosflm” (doppio click).

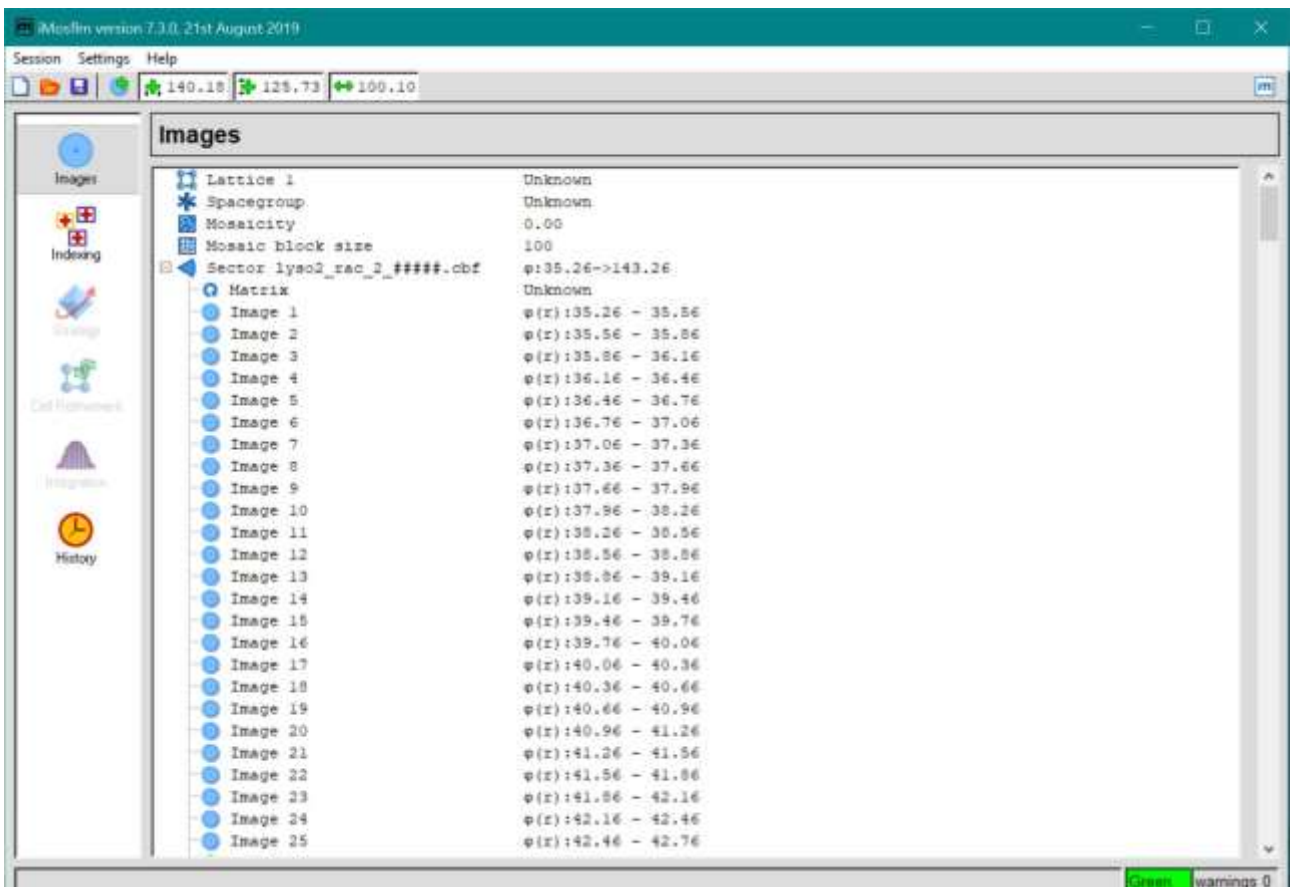


Premete il pulsante Run (terzo pulsante in alto, con l'omino che corre). Dovrebbe aprirsi un'altra finestra, quella del software Mosflm che ci servirà per indicizzazione e integrazione delle immagini di diffrazione.

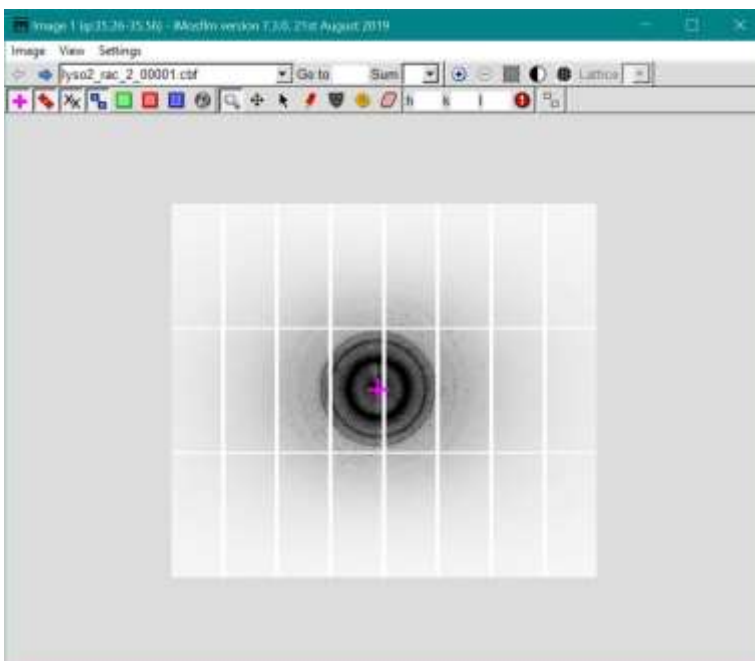




Selezionate il pulsante per l'aggiunta delle immagini (terzo pulsante in alto, con un diffrattogramma con il segno +) e caricate le immagini di lisozima che avete scaricato. Vi basterà selezionare un'immagine qualsiasi della raccolta dati che il software automaticamente caricherà tutte le 360 immagini presenti nella cartella.

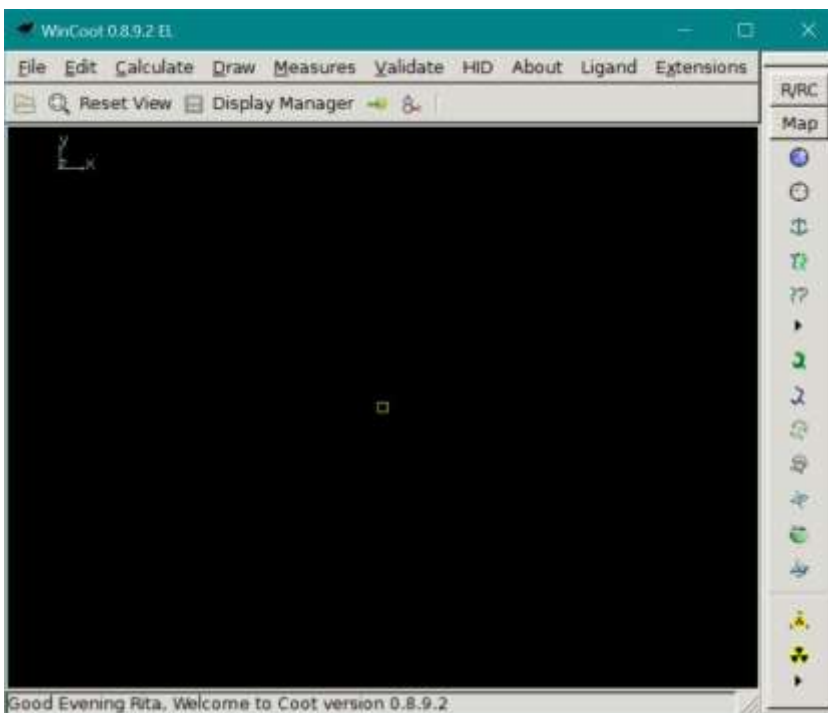


Allo stesso tempo si apre una finestra con l'immagine di diffrazione:



Se siete arrivati qui, Mosflm dovrebbe essere stato installato con successo.

Controlliamo anche l'installazione di Coot. Fate doppio click sulla relativa icona. Dovrebbe aprirsi la finestra del programma, dopo una prima immagine di una folaga (coot in inglese ). Ci mette un po', abbiate pazienza.



Se siete arrivati qui anche Coot dovrebbe essere a posto.

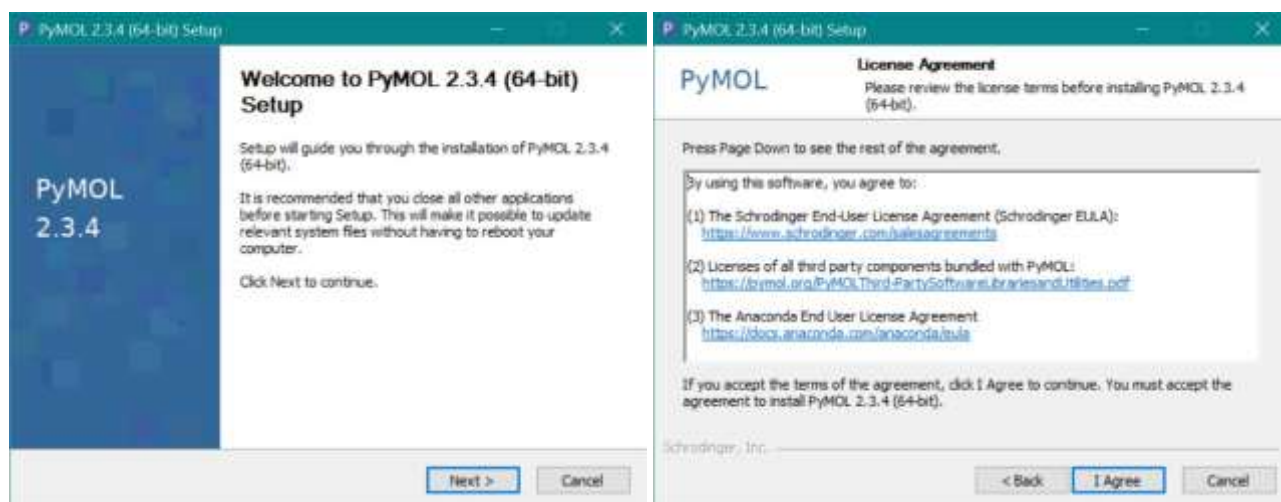
### Installazione di Pymol

Pymol è un software per la visualizzazione di molecole, specialmente proteine, che è piuttosto semplice, ma permette di realizzare immagini di buona qualità. Esiste in 2 versioni, una gratuita con meno funzionalità e una a pagamento. Naturalmente noi utilizzeremo quella gratuita.

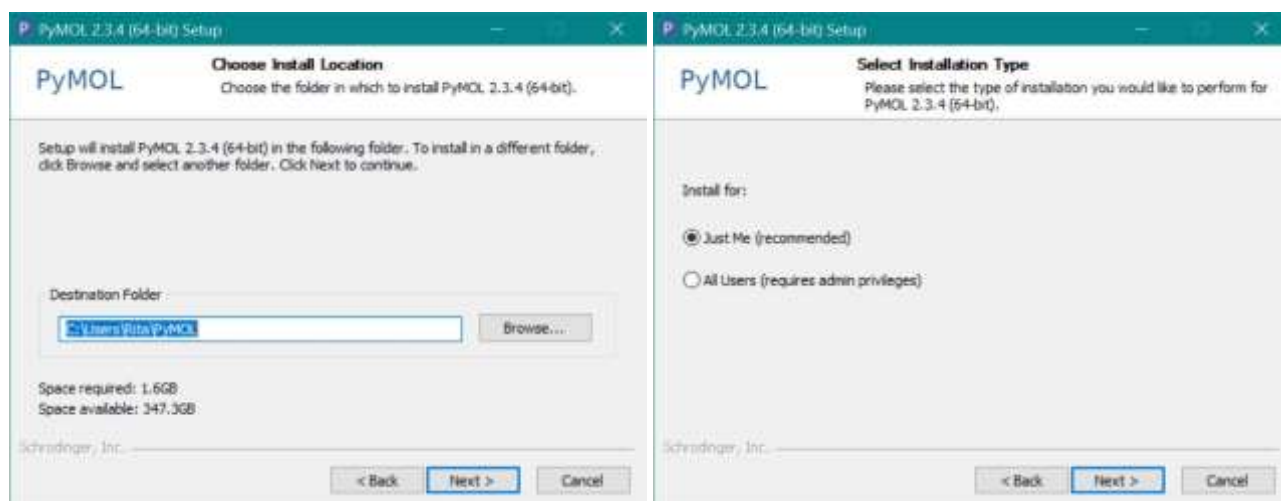
Per il download, andate sul sito di PyMOL: <https://pymol.org/2/> (La versione clickabile di questo link è presente nell'introduzione al corso.) Dalla pagina di download, selezionate la versione gratuita per il vostro sistema operativo.



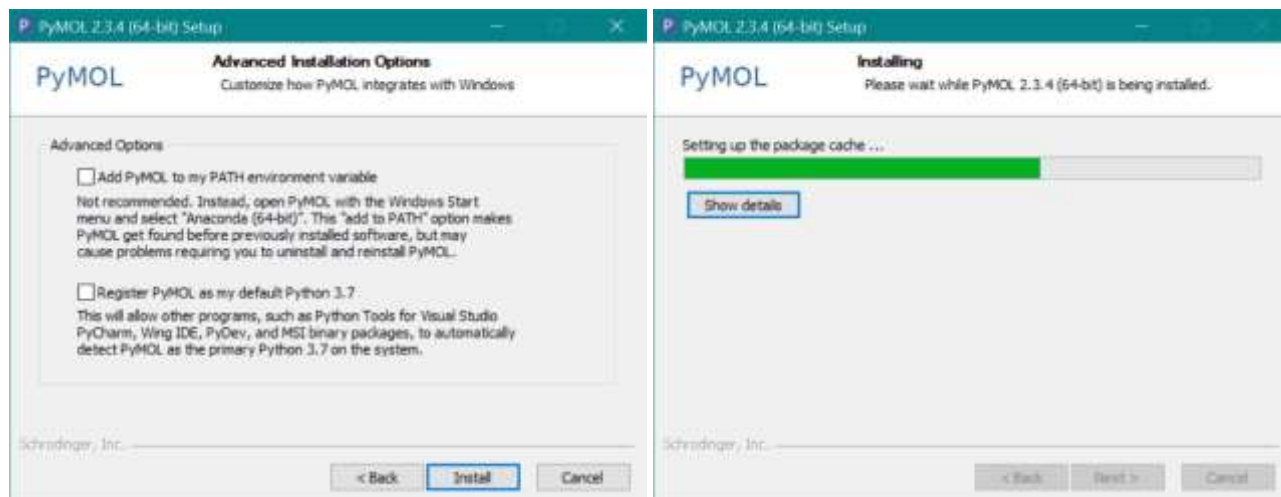
Una volta scaricato il file di setup, avviatelo con il doppio click (per Windows). Proseguite con la schermata delle licenze, accettando l'agreement.



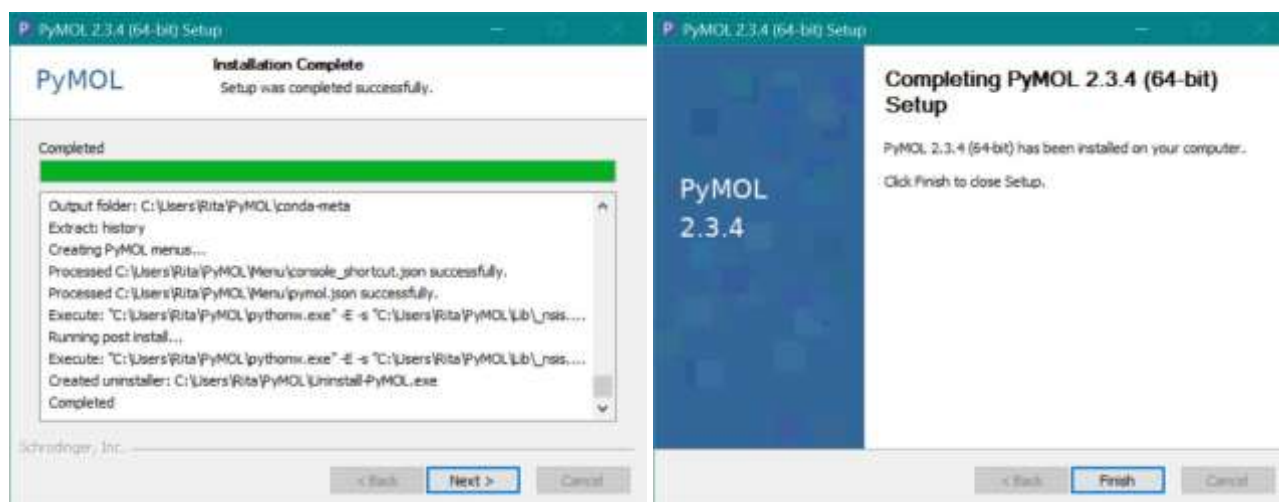
Nelle successive schermate vi chiede di selezionare la cartella dove effettuare l'installazione e di indicare i permessi. Generalmente i parametri di default sono quelli più sensati. Proseguite.



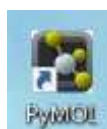
Ancora una domanda su opzioni avanzate (anche qui il default dovrebbe andare bene) e passiamo all'installazione:



Anche in questo caso l'installazione richiede un po' di tempo. Sul mio portatile Windows circa 20 minuti.

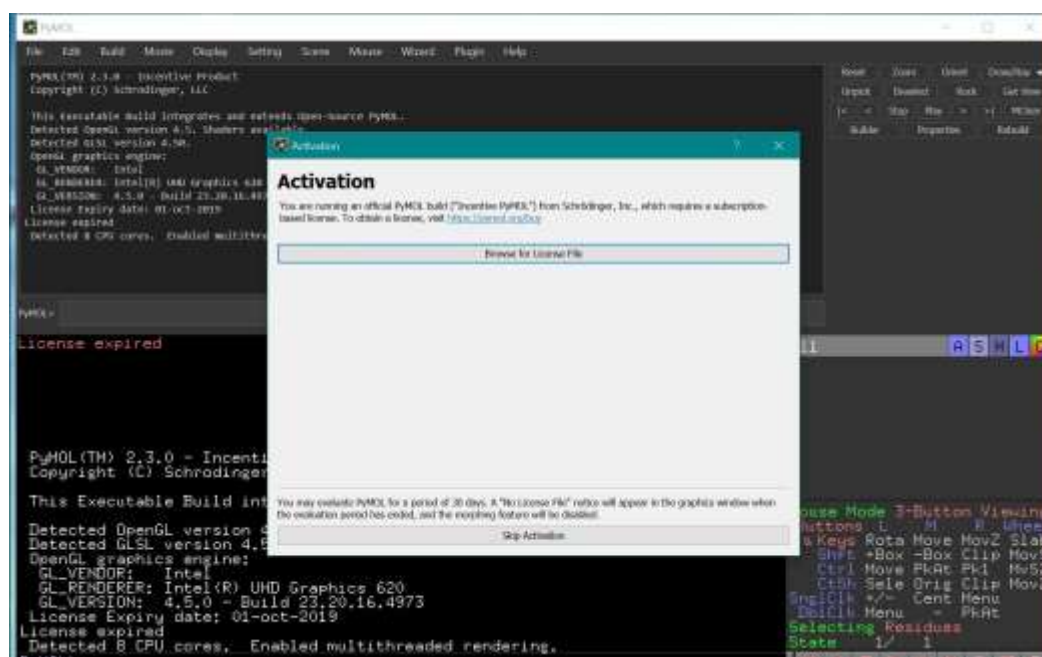


Il software dovrebbe aver creato sul desktop la propria icona:



Anche in questo caso il consiglio è di riavviare il computer al termine dell'installazione, prima di verificare il funzionamento del programma.

Con un doppio click aprite il programma. Dovrebbero apparire 2 finestre, una delle quali vi avvisa che la versione che state utilizzando ha una scadenza. Non vi preoccupate: la versione continuerà a funzionare, ma nelle immagini che ottenete ci sarà una scritta che indica che il periodo di prova è terminato. (C'è un modo anche per evitare che la scritta rovini la vostra immagine...)



Se siete arrivati qui tutto ha funzionato! In caso contrario, mandatemi una mail: rdezorzi@units.it