

PRACOWNIA PODSTAW BIOFIZYKI

Ćwiczenia laboratoryjne dla studentów III roku kierunku

„Zastosowania fizyki w biologii i medycynie”

Biofizyka molekularna

KRYSTALIZACJA BIAŁKA

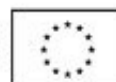
PB9 w2



KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY



Zdolność białek do krystalizacji jest odwrotnie proporcjonalna do ich istotności z biologicznego punktu widzenia.
Krystalizacyjne prawo Murphy'ego

1. Wstęp

Białka pełnią większość istotnych funkcji w naszych organizmach. Znajomość struktury przestrzennej pozwala zrozumieć procesy biologiczne, na najbardziej podstawowym, atomowym poziomie. W jaki sposób przebiegają reakcje katalizowane przez enzymy? W jaki sposób białka oddziałują z innymi białkami i małymi cząsteczkami? Znajomość struktury miejsc aktywnych lub wiążących w białkach, pozwala na zrozumienie ich specyficzności substratowej i zaprojektowanie cząsteczek lepiej z nimi oddziałujących, np. potencjalnych leków.

Podstawowa zasada w optyce, mówi, że najmniejszy obiekt jaki można zobaczyć ma wymiary porównywalne z długością fali przy pomocy której ten obiekt jest obserwowany. Średnie odległości między atomami w cząsteczkach białek wynoszą 0,16-0,35nm, zatem żeby „zobaczyć” białko z rozdzielczością atomową należy je „obserwować” przy pomocy promieniowania rentgenowskiego. Nie da się niestety zbudować mikroskopu rentgenowskiego, ale można zmierzyć dyfrakcję promieniowania X na badanej cząsteczce i wyznaczyć kształt obiektu na którym to promieniowanie się rozproszyło. Promieniowanie rentgenowskie rozprasza się przede wszystkim na elektronach. Elektrony poruszają się bardzo szybko, zatem pomiar dyfrakcji prowadzi do wyznaczenia gęstości elektronowej, czyli uśrednionego w czasie rozkładu elektronów w cząsteczce. Gęstość elektronowa zlokalizowana jest wokół jąder atomowych i wiązań, więc pomiar ten z dobrą dokładnością wyznacza kształt badanej cząsteczki. Ponieważ gęstość elektronowa wokół jądra atomu wodoru, jest relatywnie niska, w porównaniu z atomami węgla, lub tlenu, atomy wodoru zwykle nie są widoczne na obrazach dyfrakcyjnych cząsteczek białka.

Poza promieniowaniem elektromagnetycznym, badany obiekt może być „oglądany” również przy pomocy fal materii. Odpowiednio przyspieszone neutrony i elektrony tworzą fale o długości porównywalnej z odległościami międzyatomowymi w kryształach białka: $\lambda = h/p$, gdzie λ – długość fali, h – stała Plancka, p – pęd.

Dyfrakcja neutralnych elektrycznie neutronów jest metodologicznie dość podobna do dyfrakcji promieni X. Główną różnicą jest to, że neutrony ulegają rozproszeniu na jądrach atomowych, zatem doskonale widoczne są jądra atomów wodoru. Naładowane ujemnie elektrony dają się skupiać przy pomocy soczewek magnetycznych, zatem skonstruowane zostały mikroskopy elektronowe (EM). Problemem jest niszczenie próbki przez uderzające w nią cząstki o dużej energii. Dlatego stosowana wiązka elektronów musi być słaba, co powoduje niski stosunek sygnału do szumu na uzyskiwanych obrazach, zatem wymaga wykonaniu wielu obrazów, które następnie są uśredniane. Podobnie jak w krystalografii rentgenowskiej, aby przedłużyć życie próbki w wiązce stosuje się mrożenie – kriogeniczna mikroskopia elektronowa (Cryo-EM). Dokładność najlepszych mikroskopów elektronowych zbliża się do rozdzielczości atomowej. Metoda ta sprawdza się dobrze przy niższych rozdzielczościach (rzędu kilku, kilkunastu Å) i pozwala badać duże kompleksy (rybosom, kapsyd wirusa), czyli tam, gdzie niezbyt dobrze radzi sobie krystalografia. Tak więc krystalografia rentgenowska i mikroskopia elektronowa uzupełniają się nawzajem.

Kolejną techniką pozwalającą wyznaczyć strukturę białka z rozdzielczością atomową jest spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR). NMR wykorzystuje kwantowo-mechaniczną cechę atomów budujących cząsteczkę białka, ich spin. Przy pomocy odpowiednich impulsów promieniowania

elektromagnetycznego z zakresu radiowego ($\lambda \sim 1\text{m}$) spiny atomów zostają wychylone ze stanu równowagi. Obserwuje się zanik sygnału związany z powrotem spinu do położenia równowagi. Otoczenie chemiczne atomów wpływa na sposób w jaki reagują one na przyłożone pole magnetyczne. Pomiar pozwala na odtworzenie bezpośredniego otoczenia chemicznego poszczególnych atomów, wyznaczane są odległości międzyatomowe i kąty torsyjne.

Główną zaletą badań NMR jest wodne środowisko, w którym znajduje się badany obiekt. Możemy przynajmniej próbować odtworzyć warunki fizjologiczne w jakich białko znajduje się w komórce i badać je w stanie natywnym. Pozwala też badać w czasie rzeczywistym zmiany struktury pod wpływem bodźca, np. miareczkowania ligandem, zmiany temperatury czy pH, tworzenia kompleksów białkowych. Wadą jest ograniczenie wielkości badanych cząsteczek i konieczność ich znakowania. Standardowe, jednowymiarowe widmo protonowe pozwala na rozwiązanie struktury białka o maksymalnej masie około 10kDa. Zastosowanie technik dwu i trójwymiarowych oraz znakowania izotopami ^{13}C i ^{15}N pozwala przesunąć tę granicę do ok 35kDa. Całkowite zdeuterowanie (wymiana protonu na deuter) tak wyznakowanego białka pozwala rozszerzyć zakres mas badanych białek do około 50kDa. Wykorzystanie jeszcze bardziej skomplikowanych technik pozwala przekroczyć 100kDa[1].

Ze względu na ograniczenia dwóch opisanych powyżej technik, wciąż jeszcze królową badań strukturalnych białek jest krystalografia rentgenowska.

W Protein Data Bank (PDB) zdeponowanych jest już ponad sto tysięcy struktur białkowych, z czego prawie 90% to struktury wyznaczone przy pomocy dyfrakcji promieniowania rentgenowskiego na kryształach białek.

technika eksperymentalna	liczba struktur zdeponowanych w PDB (stan z dnia 12.09.2014)
PX	91 554
NMR	10 629
EM	841

Krystalografia rentgenowska ma również poważne ograniczenia. Wąskim gardłem tej techniki jest pierwszy etap na drodze do uzyskania struktury, czyli otrzymanie dobrze rozpraszającego kryształu białka.

2. Mechanizmy krystalizacji

Tworzenie kryształów białkowych nie jest procesem spontanicznym, z termodynamicznego punktu widzenia prawie wszystkie procesy zachodzące podczas powstawania kryształów są energetycznie niekorzystne ponieważ prowadzą do obniżenia entropii.

$$\Delta G_{krys} = \Delta H_{prot} - T\Delta S_{prot} - T\Delta S_{rozp}$$

Gdzie ΔG_{krys} - zmiana potencjału Gibbsa związana z krystalizacją,

ΔH_{prot} - zmiana entalpii związana z tworzeniem dodatkowych wiązań między cząsteczkami białka w kryształach, jest to proces korzystny energetycznie, zwykle jednak mały w porównaniu ze zmianami entropii,

$T\Delta S_{prot}$ - zmiana entropii cząsteczek białka, związana ze zmniejszeniem liczby stopni swobody

molekuł układających się w regularną, stosunkowo sztywną strukturę, stabilizacją giętkich pętli i grup bocznych aminokwasów znajdujących się na powierzchniach cząsteczek białka, które oddziałują ze sobą w strukturze krystalicznej,

$T\Delta S_{rozp}$ - zmiana entropii rozpuszczalnika. Uwolnienie cząsteczek wody z powierzchni białka na skutek przejścia białka do fazy krystalicznej powoduje wzrost entropii.

Aby możliwe było powstanie kryształów białkowych, trzeba zmodyfikować oddziaływanie cząsteczek białka z wodą.

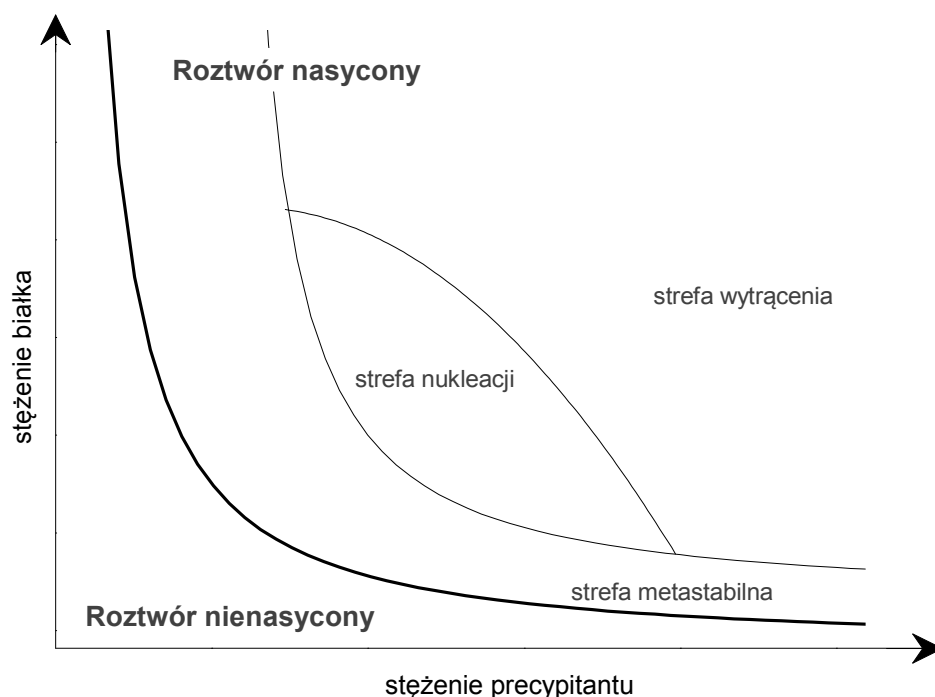
Do roztworu białka dodaje się substancje nazywane precypitantami (ang *to precipitate* – wytrącać) . Mechanizm ich działania nie jest dokładnie poznany, ale przyjmuje się, że konkurują one z białkiem o cząsteczki wody. Dobierając odpowiedni rodzaj i stężenie precypitantu można doprowadzić do sytuacji, w której oddziaływanie cząsteczek precypitantu z cząsteczkami wody, spowoduje zmniejszenie liczby cząsteczek wody mogących oddziaływać z cząsteczkami białka, doprowadzając cząsteczki białka do oddziaływania ze sobą nawzajem, co **może** zainicjować powstanie kryształu.

Nukleacja jest procesem stochastycznym. Zaczyna się od kilku- kilkunasto-cząsteczkowego agregatu, na początku chaotycznego, lecz jeśli cząsteczki tworzące taki agregat stworzą uporządkowaną strukturę, powstanie jądro krystalizacji. Jeżeli na jądrze krystalizacji zaczną się osadzać kolejne cząsteczki białka w uporządkowany sposób, niejako kontynuując zaczęty wzorec, to powstanie kryształ makroskopowych rozmiarów.

Diagram fazowy rozpuszczalności białka w obecności precypitantu jest pokazany na rysunku 1. Przy niewielkim, całkowitym iloczynie stężeń białka i precypitantu białko jest rozpuszczalne, roztwór jest nienasycony. Zwiększenie stężenia białka, precypitantu lub obu, doprowadza do powstania roztworu nasyconego. Przechodząc z fazy roztworu nienasyconego do nasyconego, układ najpierw przechodzi przez strefę metastabilną. W fazie tej następuje wzrost kryształów, natomiast nie pojawiają się nowe jądra krystalizacji. Przy dalszym zwiększaniu iloczynu stężeń układ może wejść do strefy nukleacji, gdzie powstają jądra krystalizacji i zaczyna się wzrost kryształów. Im dłużej próbka przebywa w strefie nukleacji, tym więcej jąder krystalizacji powstaje. Jeżeli roztwór, w którym powstało bardzo dużo jąder krystalizacji przejdzie do strefy metastabilnej dojdzie do tak zwanego wysypu kryształów lub powstania drobnokrystalicznego wytrącenia. Dla jeszcze większych stężeń białka i precypitantu roztwór przechodzi do strefy wytrącenia, gdzie dochodzi do gwałtownego wypadania białka z roztworu w postaci amorficznego precypitatu.

Opisany powyżej proces nazywa się **wysalaniem** białka. Diagram fazowy rozpuszczalności białka w zależności od stężenia białka i precypitantu pokazano na rysunku 1.

W przypadku precypitantów jonowych można doprowadzić do wytrącania się białka z roztworu również poprzez zmniejszanie stężenia soli, proces ten nazywa się **wsalaniem**. Na diagramie fazowym pojawia się wtedy dodatkowy obszar, a krzywa rozdziału faz posiada maksimum.



Rysunek 1. Diagram rozpuszczalności białka, w dwuskładnikowym roztworze zawierającym białko i precipitant, w obszarze wysalania.

Idealna dla krystalografa byłaby sytuacja, w której próbka przebywałaby na tyle krótko w strefie nukleacji, że powstałoby tylko kilka jąder krystalizacji, na których następnie osadzałyby się kolejne cząsteczki białka, obniżając w ten sposób stężenie białka w roztworze i przeprowadzając układ strefy metastabilnej, gdzie kryształy wzrosłyby do rozmiarów makroskopowych.

W jaki sposób można spowodować by roztwór białka i precipitantu przemieszczał się na diagramie fazowym po optymalnej ścieżce? Poniżej opisano najczęściej stosowane techniki krystalizacji.

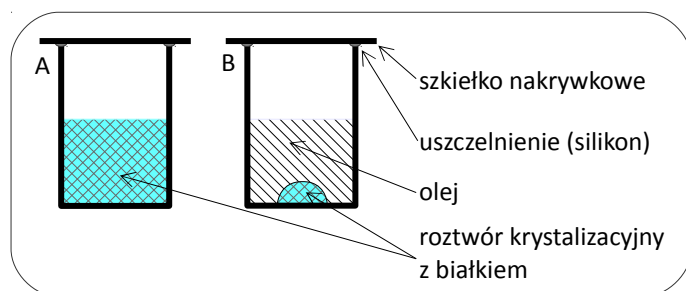
2.1. Techniki krystalizacji białek

2.1.1. Krystalizacja z roztworu

Krystalizacja z roztworu (ang. *batch crystallization*) jest historycznie pierwszą metodą uzyskiwania kryształów, nie tylko białkowych.

Roztwór białka miesza się delikatnie z pozostałymi składnikami potrzebnymi do krystalizacji tworząc roztwór nasycony, umieszcza się go w niewielkim, szczelnie zamkniętym naczynku, by ograniczyć parowanie, i pozostawia w spokoju. Jeżeli stężenia zostały dobrze dobrane, roztwór może znajdować się w strefie nukleacji, lub przejść do niej na skutek odparowania niewielkich ilości rozpuszczalnika (po zamknięciu naczynka, rozpuszczalniki zawarte w roztworze krystalizacyjnym, będą parować, aż ciśnienie par osiągnie ciśnienie pary nasyconej, to znaczy procesy parowania i skraplania będą w równowadze. Wadą omawianej techniki jest duże zużycie białka, zaletą natomiast – możliwość otrzymania bardzo dużych kryształów.

Odmianą krystalizacji z roztworu pozwalającą na znaczne ograniczenie ilości zużywanego białka jest krystalizacja pod warstwą oleju (ang. *microbatch crystallization*). Roztwór białka i czynników krystalizacyjnych przygotowany jest jak powyżej, następnie niewielka kropla umieszczana jest pod warstwą oleju, który uniemożliwia całkowite odparowanie. W technice tej wykorzystuje się oleje mineralne lub olej parafinowy.



Rysunek 2. Układ eksperymentalny do krystalizacji z roztworu (A) i do krystalizacji pod warstwą oleju (B)

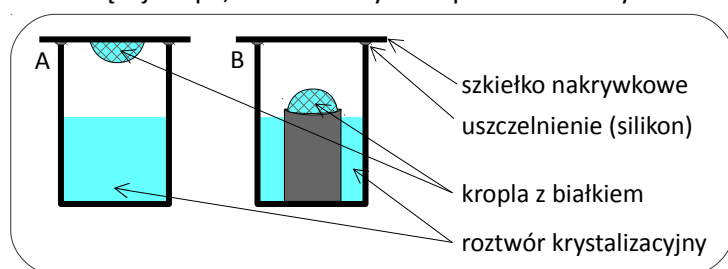
2.1.2. Parowanie

Niewielką objętość roztworu białka (kilkna mikrolitrów) miesza się z taką samą, lub mniejszą objętością roztworu krystalizacyjnego tworząc niewielką kroplę i umieszcza w szczelnie zamkniętym naczynku, zawierającym większą objętość cieczy krystalizacyjnej (kilkaset mikrolitrów). Kropla zawierająca białko i rezerwar roztworu krystalizacyjnego nie stykają się ze sobą, wymieniają tylko składniki lotne. Parowanie początkowo zachodzi szybciej, następnie coraz wolniej, aż do momentu ustalenia się stanu równowagi. Białko i pozostałe substancje chemiczne obecne w kropli ulegają zatężeniu, a proces ten zachodzi w sposób stosunkowo łagodny. Można spowolnić tempo parowania poprzez obniżenie temperatury krystalizacji. Końcowe stężenie składników kropli jest zwykle zbliżone do stężenia substancji w rezerwarze, co oznacza, że stawiając kroplę w proporcji objętościowej 1:1 roztwór białka ulega około dwukrotnemu zatężeniu. Stawiając kroplę z przewagą roztworu białka można doprowadzić do większego zatężenia wyjściowego roztworu białka.

Jeżeli udało się dobrze dobrać stężenia wyjściowe, kropla z białkiem może znaleźć się w strefie nukleacji. Jeżeli powstaną jądra krystalizacji i białko zacznie się na nich osadzać, jego stężenie w roztworze będzie maleć i kropla przemieści się do strefy metastabilnej, gdzie kryształy będą mogły rosnąć.

Przemieszczanie się roztworu białka i precipitantu, podczas krystalizacji metodą parowania, wykreślono na diagramie fazowym (rysunek 5), pokazano tylko optymalną wędrówkę uwieńczoną powstaniem kryształu.

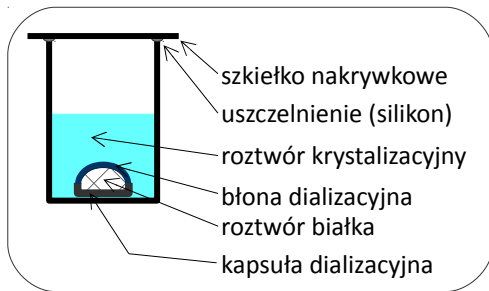
Krystalizacja przez parowanie realizowana jest w dwóch układach eksperymentalnych, tzw wiszącej kropli i siedzącej kropli, co schematycznie pokazano na rysunku 3.



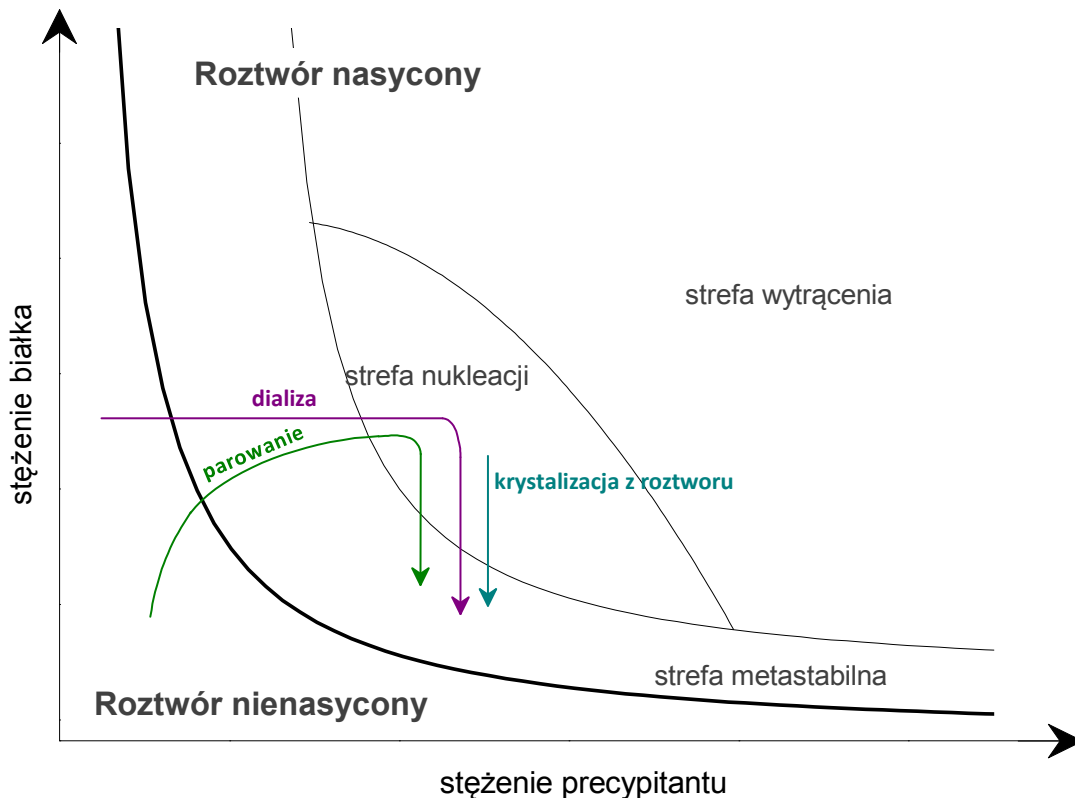
Rysunek 3. Układ eksperymentalny do krystalizacji przez parowanie w układzie wiszącej kropli (A) i siedzącej kropli (B).

2.1.3. Dializa

Roztwór białka jest w kontakcie z roztworem krystalizacyjnym poprzez błonę dializacyjną, możliwy zatem jest przepływ jonów i związków drobnocząsteczkowych, ale stężenie białka jest stałe. Przy pomocy dializy można krystalizować białka zarówno w obszarze wśalania jak i wysalania.



Rysunek 4. Układ eksperymentalny do krystalizacji metodą dializy



Rysunek 5. Diagram fazowy, zaznaczone tylko "ścieżki" prowadzące do sukcesu

2.1.4. Posiew

Jeżeli którakolwiek w powyższych metod daje bardzo drobne, albo nieładne kryształy, można spróbować wykorzystać te kryształy, jako zaczątki nowych kryształów. Drobne kryształy należy pobrać, większe najpierw rozkruszyć i umieścić w takich samych, lub bardzo podobnych warunkach krystalizacyjnych, wykorzystując dowolną, z opisanych powyżej technik.

Ogólna idea krystalizacji jest prosta: należy doprowadzić roztwór białka i precypitantu do fazy roztworu nasyconego, następnie doprowadzić do powstania niewielkiej liczby jąder krystalizacji, na których wzrosną makroskopowe kryształy.

A jak to wygląda w praktyce?

3. Jak uzyskać dobrze rozpraszający kryształ białka?

Kluczowym problemem w krystalizacji białek jest niemożność przewidzenia jakie czynniki mogą skłonić cząsteczki białek do tworzenia kryształów. Podobieństwo struktury czy sekwencji badanego białka do białek wcześniej wykrytych, nie musi się przekładać na podobieństwo warunków, w których białko będzie chciało tworzyć kryształy. Ponadto na proces krystalizacji wpływa ogromna liczba czynników fizycznych, chemicznych, na ogół, nad wszystkimi krystalograf nie jest w stanie zapanować.

W tabeli poniżej zamieszczono, zapewne niekompletną, listę czynników, które wpływają na proces krystalizacji:

Czynniki fizyczne	Czynniki chemiczne	Czynniki biochemiczne
<ul style="list-style-type: none"> • temperatura • ciśnienie • lepkość • pole elektryczne i magnetyczne • dźwięki i wibracje • czas • wartość stałej równowagi • kinetyka dochodzenia układu do równowagi • zanieczyszczenia, które mogą się stać jądrami krystalizacji • rodzaj powierzchni płytki krystalizacyjnej 	<ul style="list-style-type: none"> • stężenie białka • rodzaj i stężenie precypitantu • pH • rodzaj i stężenie buforu • siła jonowa • obecność jonów metali • obecność detergentów • 	<ul style="list-style-type: none"> • czystość i jednorodność próbek • modyfikacje sekwencji białka • modyfikacje potranslacyjne białka • agregacja białka • proteoliza • obecność ligandów

Tabela 1. Czynniki wpływające na krystalizację. [2]

Kolejnym istotnym aspektem jest homogeniczność próbki białka. Białko do krystalizacji musi być czyste, poprawnie zwinięte, stabilne. Próbkę musi być tak bardzo jednorodna jak tylko uda się ją uzyskać.

Białko musi być czyste, każde zanieczyszczenie może posłużyć jako jądro krystalizacji, a z drugiej strony obecność innych cząsteczek w próbce będzie przeszkadzać jednorodnemu wzrostowi kryształów. Białko musi być poprawnie zwinięte i aktywne, bo tylko wtedy uzyskana struktura krystaliczna może odzwierciedlać strukturę natywną białka, a tylko taka struktura będzie biologicznie istotna. Wszystkie inne konformacje białka powinny być usunięte, ponieważ mogą przeszkadzać w tworzeniu periodycznej struktury przestrzennej. Białko musi być stabilne, bo białka tracące z czasem konformację natywną mają tendencję do agregowania, a eksperymenty krystalizacyjne często trwają miesiącami. Białka posiadające elastyczne fragmenty, ruchome pętle, domeny natywnie nieustrukturyzowane bardzo trudno krystalizują. Takie pętle i domeny trzeba ustabilizować, np. przez utworzenie kompleksu białko-ligand lub białko-białko i krystalizować kompleks, albo usunąć metodami biochemicznymi lub inżynierii genetycznej, mając jednocześnie nadzieję, że tak brutalny zabieg nie uszkodzi struktury stabilnej części białka.

Istotny jest również skład buforu w którym rozpuszczone jest białko. Wysokie stężenie buforu lub soli po zmieszaniu z roztworem krystalizacyjnym może prowadzić do powstawania kryształów soli (np fosforanu magnezu lub wapnia). Wysokie stężenie buforu będzie wpływać na końcowe pH kropli krystalizacyjnej. Z drugiej strony białko powinno być przygotowane w buforze, w którym jest stabilne i aktywne. Kompromisowe rozwiązanie jest takie, że białko przygotowuje się w najniższym stężeniu buforu, soli, innych substancji, przy których białko jeszcze jest stabilne.

Krystalizacja zwykle wymaga wysokich stężeń białka, przynajmniej 10mg/ml. Dla białek niestabilnych,

skłonnych do agregacji takie stężenia mogą być nieosiągalne.

3.1. Poszukiwanie warunków krystalizacji badanego białka

Przy tak dużej liczbie czynników wpływających na proces krystalizacji niemożliwe jest systematyczne przetestowanie wszystkich warunków, wobec tego stosuje się inne podejście. Używa się tak zwanych screen'ów¹. Wykonując zestawienia warunków, w których różne białka były krystalizowane na przestrzeni lat zauważono, że pewne substancje i grupy substancji sprzyjają krystalizacji białek bardziej niż inne. Na przykład najpopularniejszymi precypitantami są glikole polietylenowe (PEGi) i siarczan amonu[3].

Roztwór krystalizacyjny zwykle zawiera bufor, precypitant i ewentualnie dodatkowe substancje sprzyjające krystalizacji oraz substancje wpływające korzystnie na białko. Na przykład obecność detergentów może ograniczać skłonność białka do agregacji, obecność soli zapewnia wysoką siłę jonową, której białko może wymagać, żeby być stabilne. Niektóre białka krystalizują tylko w obecności określonych jonów metali. Dodanie glicerolu, który zwiększa lepkość roztworu i wobec tego ogranicza nukleację, może pozwolić uzyskać mniejszą liczbę, większych kryształów.

Badania przesiewowe zaczyna się zwykle od screen'ów niezbyt gęsto próbkujących najlepsze warunki wyselekcjonowane przez lata badań krystalizacyjnych (tzw. *sparse matrix screens*[4]), są to tak zwane screeny podstawowe, kilka tego typu screenów jest dostępnych komercyjnie. Jeżeli, dzięki eksperymentom w takich screenach uda się wstępnie określić jaka grupa substancji lub warunków sprzyja krystalizacji białka, przechodzi się do screenów bardziej specjalistycznych, gęściej próbkujących wytypowany obszar.

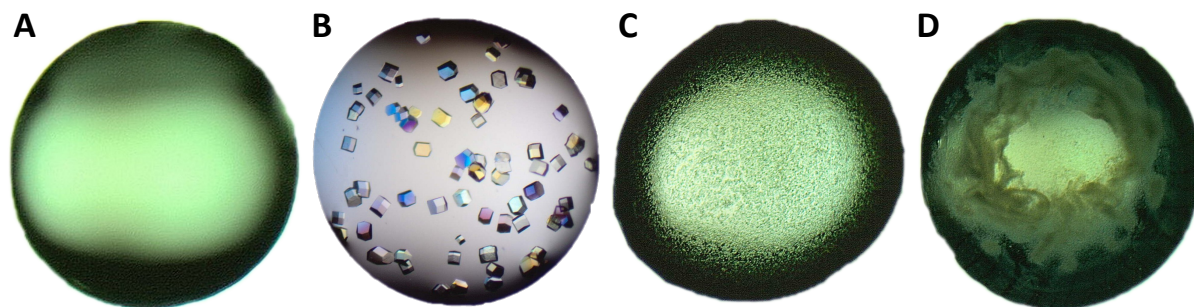
Typowy screen składa się z 96 warunków, eksperymenty wykonuje się w 96-dołkowych płytkach, co oznacza, że jednocześnie prowadzi się 96 niezależnych eksperymentów krystalizacyjnych. Tak dużych płytek krystalizacyjnych nie stawia się ręcznie, stosowane są systemy zrobotyzowane. Poza czasem, pozwalają one oszczędzić białko, ponieważ stawianie przez roboty krople są kilka-kilkadziesiąt razy mniejsze, od tych stawianych ręcznie. Również przeglądanie i dokumentowanie płytek może odbywać się przy pomocy zautomatyzowanych systemów.

Krystalizacja w screenach pozwala ustalić wstępnie warunki, w których białko może krystalizować, nawet jeśli kryształów nie udało się uzyskać, oszacować pH, rodzaj precypitantu, oraz stężenie białka i precypitantu.

Wynikiem prób krystalizacji białka mogą być:

- czyste krople (rys. 6A) – co oznacza, że nie udało się osiągnąć stanu roztworu nasyconego.
- kryształy (rys. 6B) – czyli ideał! Przy wyjątkowym szczęściu kryształ otrzymany w maleńkiej kropelce stawianej przy pomocy robota może być dostatecznie duży, by nadawał się do pomiarów dyfrakcyjnych. Najczęściej jednak, uzyskanie dostatecznie dużego kryształu do pomiarów, wymaga dalszej optymalizacji.
- wytrącenie drobnokrystaliczne (rys. 6C) – oznacza, że stężenie białka, precypitantu, lub obu jest za wysokie, ale też to dobry znak, bo powstały struktury krystaliczne. Zdarza się, że z takiego precypitantu wyrastają kryształy, ale jest to proces bardzo wolny. Zwykle warunki wymagają dalszej optymalizacji.
- wytrącenie amorficzne (rys. 6D) – zwykle ma postać beżowego lub jasnobrązowego osadu. Oznacza, że białko i precypitant znalazły się w strefie wytrącenia. Często oznacza również, że białko jest zdenaturowane.

1 ang. *to screen* przesiewać



Rysunek 6. Możliwe wyniki krystalizacji: A: czysta kropla, B: sytuacja "idealna", duże, dobrze rozdzielone kryształy, C: wytrącenie drobnokrystaliczne, D: wytrącenie amorficzne.

3.2. Optymalizacja warunków krystalizacji

Optymalizację przeprowadza się przesiewając warunki wokół warunków wyznaczonych przy pomocy krystalizacji w screenach. Parametrami, które najczęściej się zmienia są

- stężenie precypitantu – wyniki krystalizacji w screenie zwykle sugerują czy należy testować stężenia wyższe czy niższe,
- stężenie białka – j.w.
- pH buforu – czasami zmiana pH nawet o 0,1 może drastycznie zmienić warunki krystalizacji,
- temperatura – w niższych temperaturach tworzy się mniej jąder krystalizacji a kryształy rosną wolniej, zatem mogą być lepszej jakości,
- rozmiar kropli – większa kropla pozwala na wzrost większych kryształów, po prostu dlatego, że jest w niej więcej cząsteczek białka.

Na tym etapie można też wypróbować dodatki takie jak glicerol, detergenty, jony metali...

Gdy warunki w jakich białko krystalizuje są dość dobrze określone, zwykle stawia się ręcznie duże krople 4-6 μ l a czasem nawet 10 czy 20 μ l. Wykorzystuje się wtedy na ogół dwudziestocztero-dołkowe płytki, o na tyle dużych rozmiarach dołków, by swobodnie dało się z nimi pracować.

Wyniki krystalizacji ocenia się, oglądając krople przy pomocy optycznego mikroskopu stereoskopowego. Wizualnie można ocenić rozmiar i kształt kryształów, ocenić czy widać w nich jakieś spękania, czy mają wyraźne krawędzie. Niestety nawet najładniejsze, najregularniejsze, zaobserwowane pod mikroskopem kryształy mogą nie rozpraszać promieniowania rentgenowskiego, co sugeruje, że obserwowany obiekt jest naprawdę polikryształem i nie rozprasza promieniowania w uporządkowany sposób; a brzydkie, nieregularne kryształy o poszarpanych krawędziach mogą rozpraszać bardzo dobrze. Może się również zdarzyć, że wyłowiony z kropli kryształ okaże się kryształem soli.

Tak więc ostatecznym testem jakości uzyskanego kryształu jest obraz rozproszenia promieniowania rentgenowskiego.

4. Bibliografia

- [1] M. Salzmann, K. Pervushin, G.Wider, H. Senn, K. Wutrich: NMR Assignment and Secondary Structure Determination of an Octameric 110 kDa Protein Using TROSY in Triple Resonance Experiments., J. Am. Chem. Soc. 2000 (122)7543-7548
- [2] I.R. Krauss et. all.: An Overview of Biological Macromolecule Crystallization, Int. J. Mol. Sci. 2013 (14)11643-11691
- [3] M.S. Kimber et. all.: Data mining crystallization databases: knowledge-based approaches to optimize protein crystal

screens., *Proteins* 2003 (51)562-568

[4] J. Jancarik, S.H. Kim : Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. , *J. Appl. Cryst.* 1991 (23)409-411

[5] C.N. Nanev: Kinetics and intimate mechanism of protein crystal nucleation. *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials* 2013 (59)133–169

[6] Terese Bergfors: *Protein Crystallization: Second Edition*. 2009. International University Line, La Jolla, California

[7] Bernhard Rupp's Interactive Crystallography Course. <http://www.ruppweb.org/Xray/101index.html>

5. Literatura uzupełniająca

1. M. Benvenuti, S. Mangani *Crystallization of soluble proteins in vapor diffusion for x-ray crystallography* Nature Protocols (2007) Vol.2 No.7 1633-1651

2. I.R. Krauss et. all *An Overview of Biological Macromolecule Crystallization*, 2013, International Journal of Molecular Sciences 14, 11643-11691

3. Terese Bergfors: Protein Crystallization/Crystallization Tutorial: <http://xray.bmc.uu.se/~terese/tutorials.html> - strona w bardzo dobry sposób wyjaśniająca jaki interpretować wyniki eksperymentów krystalizacyjnych.

6. Zagadnienia do kolokwium wstępnego

1. Techniki badawcze wykorzystywane do wyznaczania trójwymiarowych struktur białek. Ich najważniejsze wady i zalety.
2. Dlaczego krystalizuje się białka?
3. Dlaczego białko może „nie chcieć” krystalizować?
4. Diagram fazowy dla dwuskładnikowego układu białko-precypitant.
5. Techniki krystalizacji białek, interpretacja w powiązaniu z diagramem fazowym.
6. Mechanizmy krystalizacji.
7. Warunki krystalizacji białek, skład roztworów krystalizacyjnych, typowe substancje wykorzystywane w krystalizacji.
8. Co to są screeny, dlaczego się z nich korzysta.

7. Wykonanie ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest uzyskanie kryształów lizozymu, następnie wizualna ocena, które z uzyskanych kryształów są najlepsze i ewentualna dyskusja, które parametry krystalizacji należałoby zmienić, aby uzyskać lepsze kryształy.

Jako załączniki do niniejszej instrukcji otrzymali Państwo publikację, w której opisane są warunki krystalizacji lizozymu. Opierając się na wynikach autorów tej publikacji zaplanują Państwo i przeprowadzą własny eksperyment krystalizacyjny.

Do dyspozycji jest

- 24-dołkowa płytka krystalizacyjna,
- roztwór lizozymu w wodzie o stężeniu 100mg/ml
- 30% roztwór NaCl w wodzie
- 0,2M bufor octanowy
- komputer z zainstalowanym pakietem biurowym LibreOffice w celu wykonania niezbędnych

obliczeń.

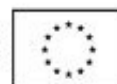
Po nastawieniu płytki należy wykonać pierwszą kontrolę wyników swojej pracy przy pomocy mikroskopu optycznego. Umieścić płytkę w inkubatorze zapewniającym stałą temperaturę. Kolejne inspekcje wyników krystalizacji należy wykonać po 1,2 i 5 dniach od nastawienia płytki.



KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY



Projekt Fizyka wobec wyzwań XXI wieku współfinansowany ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego