

M. Hryc

# Krystalizacja lizozymu jaja kurzego

6 marca 2025

## Spis treści

1. Cel	1
2. Odczynniki i sprzęt	1
3. Roztwór białka	1
4. Krystalizacja	1
5. Interpretacja wyników	1

## 1. Cel

Zadaniem było otrzymanie kryształów lizozymu jaja kurzego metodą Hanging Drop Vapor Diffusion (metoda wiszącej kropli).

## 2. Odczynniki i sprzęt

- 20 % NaCl
- 250 mM Octan Sodu
- woda destylowana
- roztwór lizozymu jaja kurzego
- płytka 24-dółkowa typu VDX (z natłuszczonymi rantami)
- silikonizowanie szkiełka okrągłe szkiełka nakrywkowe

## 3. Roztwór białka

## 4. Krystalizacja

W dołkach płytki 24-dółkowej VDX zmieszano 20 % NaCl, 250 mM Octan Sodu i wodę destylowaną w zmiennych proporcjach zgodnie z rysunkiem 1, otrzymując roztwory o zakresie pH 4.0 – 5.2, i stężenia NaCl 4 % – 9 %.

Na środek szkiełka nakrywkowego podano 2  $\mu$ l roztworu białka, po czym dodano do kropli 2  $\mu$ l wodnego roztworu z odpowiedniego dołka. Szkiełko nałożono na dołek kroplą w dół i szerszym końcem żółtego tipsa docisnięto tak, żeby smar uszczelnił styk szkiełka z krawędzią dołka. Czynność powtórzono dla wszystkich dołków.

Tak przygotowaną płytkę przykryto wieczkiem i umieszczono w lodówce. Zdjęcia kryształów zostały wykonane przez soczewkę 10x po upływie ok. 48 h (krystalizację nastawiono w środę, a zdjęcia wykonano w piątek).

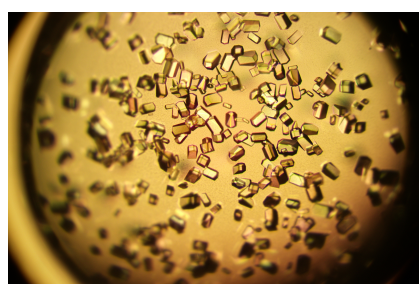
## 5. Interpretacja wyników

Aby doszło do krystalizacji białka układ musi osiągnąć metastabilny stan przesylenia, kiedy stężenie białka jest powyżej wartości rozpuszczalności. Na-

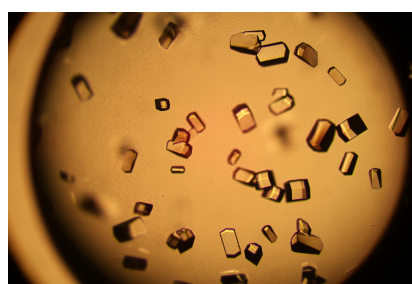
		20 % NaCl					
Final concentration		4 %	5 %	6 %	7 %	8 %	9 %
250 mM Sodium Acetate	50 mM pH 4.0	200 $\mu$ l 600 $\mu$ l 200 $\mu$ l	250 $\mu$ l 550 $\mu$ l 200 $\mu$ l	300 $\mu$ l 500 $\mu$ l 200 $\mu$ l	350 $\mu$ l 450 $\mu$ l 200 $\mu$ l	400 $\mu$ l 400 $\mu$ l 200 $\mu$ l	450 $\mu$ l 350 $\mu$ l 200 $\mu$ l
	50 mM pH 4.4	200 $\mu$ l 600 $\mu$ l 200 $\mu$ l	250 $\mu$ l 550 $\mu$ l 200 $\mu$ l	300 $\mu$ l 500 $\mu$ l 200 $\mu$ l	350 $\mu$ l 450 $\mu$ l 200 $\mu$ l	400 $\mu$ l 400 $\mu$ l 200 $\mu$ l	450 $\mu$ l 350 $\mu$ l 200 $\mu$ l
	50 mM pH 4.8	200 $\mu$ l 600 $\mu$ l 200 $\mu$ l	250 $\mu$ l 550 $\mu$ l 200 $\mu$ l	300 $\mu$ l 500 $\mu$ l 200 $\mu$ l	350 $\mu$ l 450 $\mu$ l 200 $\mu$ l	400 $\mu$ l 400 $\mu$ l 200 $\mu$ l	450 $\mu$ l 350 $\mu$ l 200 $\mu$ l
	50 mM pH 5.2	200 $\mu$ l 600 $\mu$ l 200 $\mu$ l	250 $\mu$ l 550 $\mu$ l 200 $\mu$ l	300 $\mu$ l 500 $\mu$ l 200 $\mu$ l	350 $\mu$ l 450 $\mu$ l 200 $\mu$ l	400 $\mu$ l 400 $\mu$ l 200 $\mu$ l	450 $\mu$ l 350 $\mu$ l 200 $\mu$ l

— 20 % NaCl  
— 250 mM Na-Acetate  
— distilled water

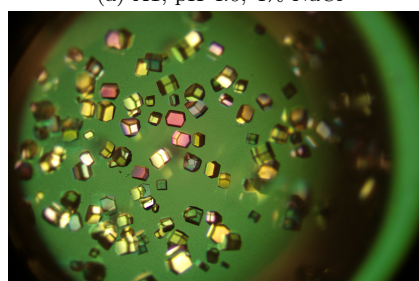
Rysunek 1: Schemat przedstawiający objętość odczynników podaną do odpowiednich dołków. Dodatkowo oznaczone zostały końcowe wartości pH i stężenia NaCl.



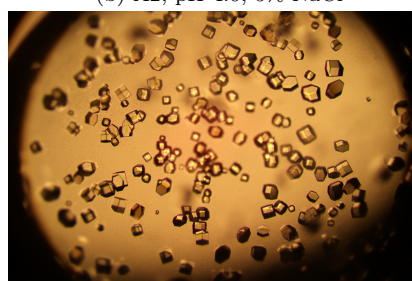
(a) A1, pH 4.0, 4% NaCl



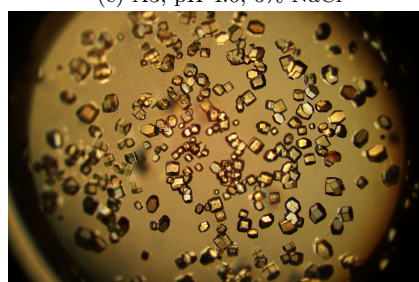
(b) A2, pH 4.0, 5% NaCl



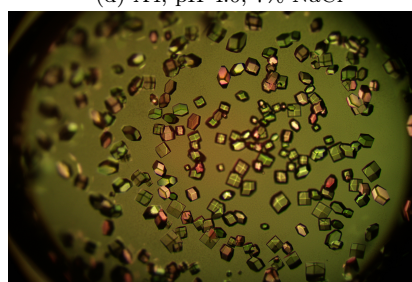
(c) A3, pH 4.0, 6% NaCl



(d) A4, pH 4.0, 7% NaCl



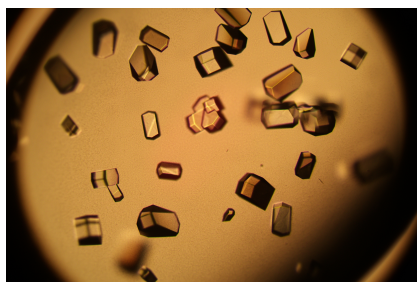
(e) A5, pH 4.0, 8% NaCl



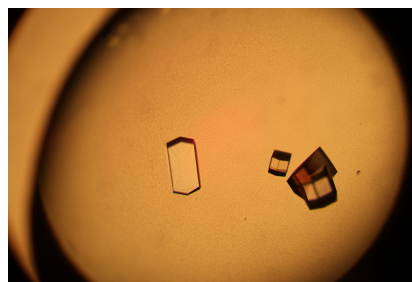
(f) A6, pH 4.0, 9% NaCl

Rysunek 2: W warunkach  $pH = 4.0$  i dla stężenia NaCl między 4 % a 9 % uzyskano liczne, małe kryształki o regularnym kształcie. W dołku A2 otrzymano zauważalnie mniej kryształków, i były one nieznacznie większe. W dołku A3 zakres rozmiaru zaobserwowanych kryształków jest węższy. Krystalizacja przeszła pomyślnie, nie zaobserwowano igieł, wytrąconego precypitatu, rozdzielania faz, sferulitów. Najlepszy wynik uzyskano w dołkach A2 i A3.

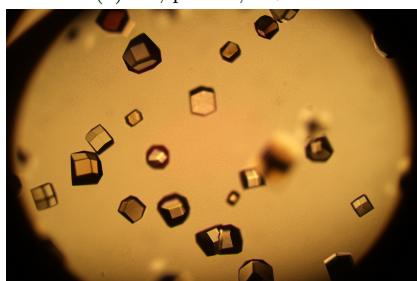




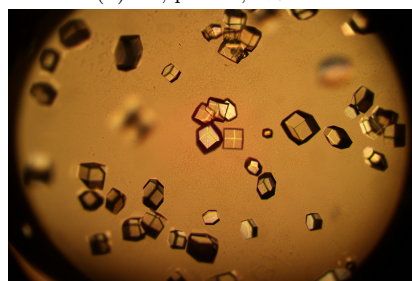
(a) B1, pH 4.4, 4% NaCl



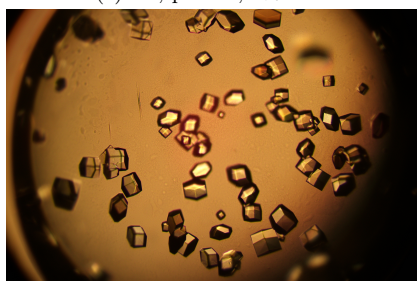
(b) B2, pH 4.4, 5% NaCl



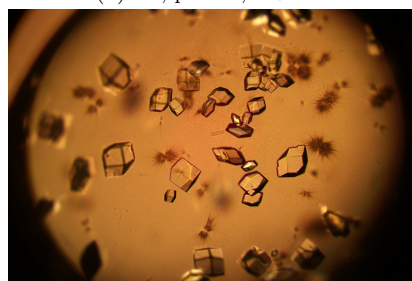
(c) B3, pH 4.4, 6% NaCl



(d) B4, pH 4.4, 7% NaCl

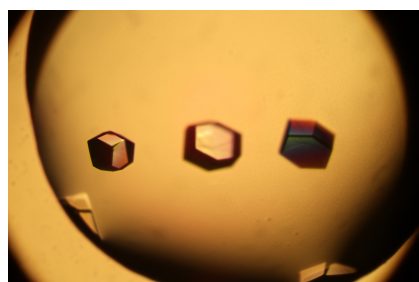


(e) B5, pH 4.4, 8% NaCl

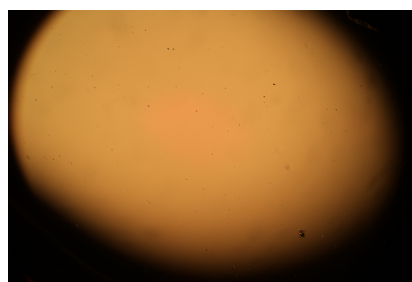


(f) B6, pH 4.4, 9% NaCl

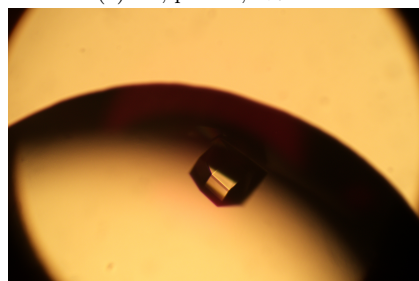
Rysunek 3: Warunki  $pH = 4.4$  i dla stężenia NaCl między 4 % a 9 %. W dołkach B1 do B4 uzyskano dobrze uformowane kryształy. W dołku B2 są mniej liczne ale zauważalnie największe. W dołku B5 zaobserwowano wiele drobniejszych kryształów oraz mały zbitek "igieł". W dołku B6 kryształy mają wyraźne skazy oraz występują liczne zbitki igiełek przypominające pary zlepionych kółczastych kulek. Krystalizacja przebiegła pomyślnie, w szczególności w dołku B2, gdzie uzyskano duże kryształy bez skaz. W porównaniu z serią A1–A6 obserwuje się więcej skaz i obecność wytrąconego białka w formie igieł.



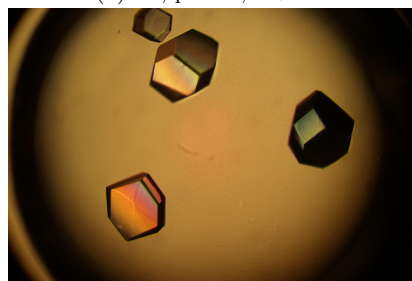
(a) C1, pH 4.8, 4% NaCl



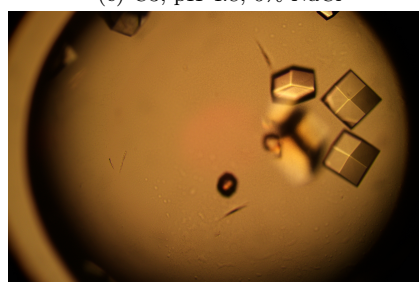
(b) C2, pH 4.8, 5% NaCl



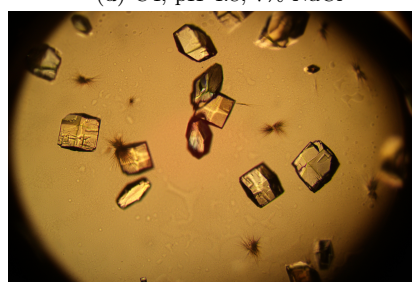
(c) C3, pH 4.8, 6% NaCl



(d) C4, pH 4.8, 7% NaCl

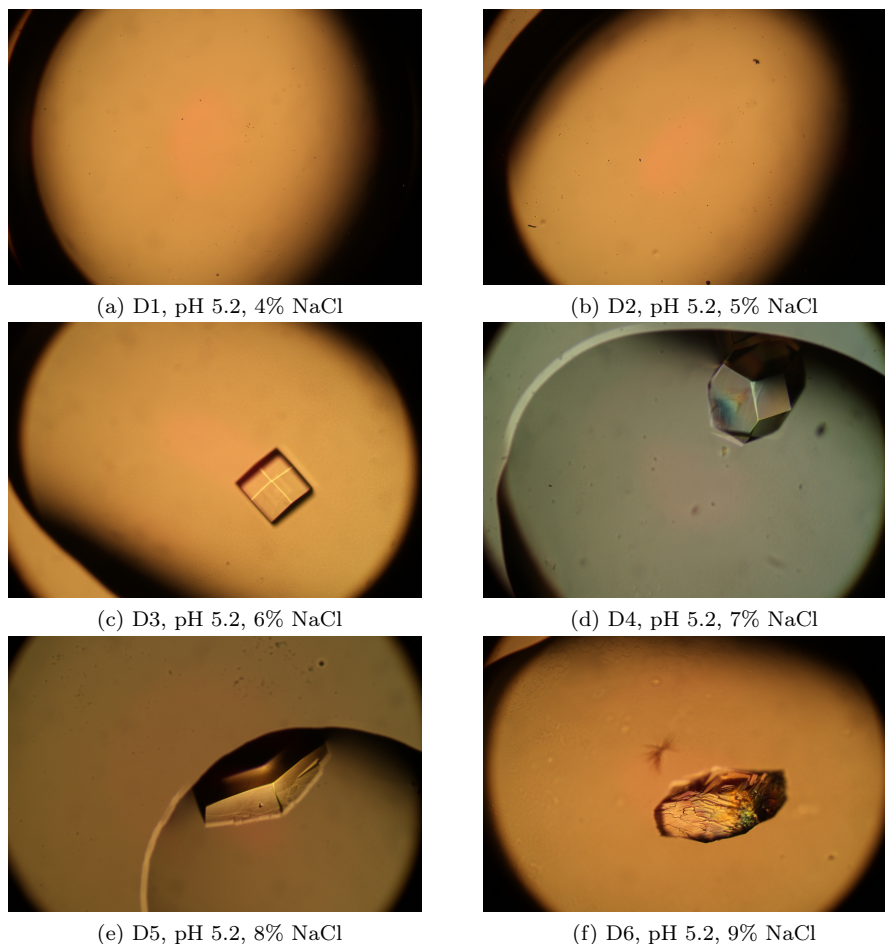


(e) C5, pH 4.8, 8% NaCl

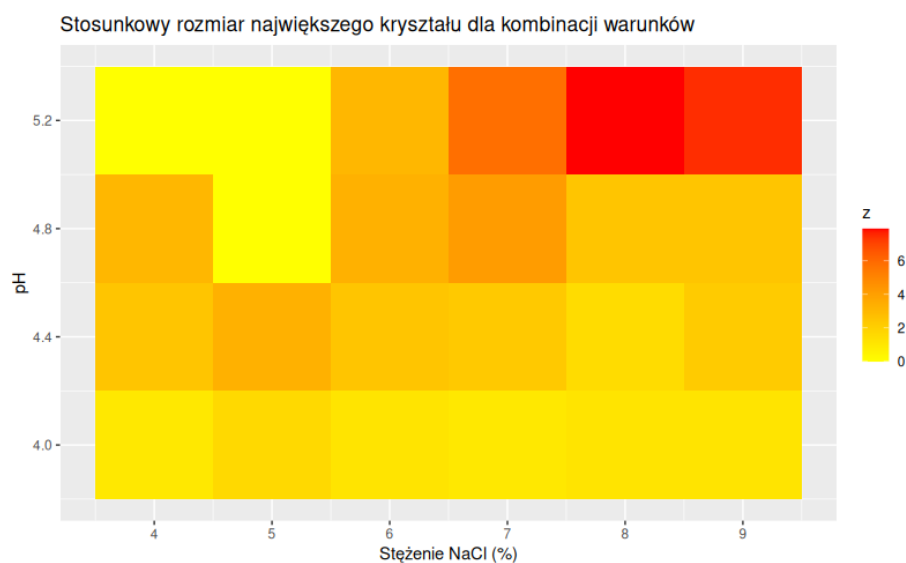


(f) C6, pH 4.8, 9% NaCl

Rysunek 4: Warunki  $pH = 4.8$  i dla stężenia NaCl między 4 % a 9 %. W dołkach C1, C3 i C4 zaobserwowano nieliczne duże dobrze uformowane kryształy (większe niż w B2). W dołku C2 nie zaobserwowano kryształów. W dołkach C5 i C6 w roztworze wydają się być obecne krople/oleiste plamy, być może jest to lekka separacja faz albo zabrudzenie obiektywu mikroskopu (podobny wzór nie jest obserwowany na innych zdjęciach wykonanych z użyciem tego samego mikroskopu, co sugeruje raczej pierwszy scenariusz). W dołku C5 widoczne są 4 igły, a w C6 są bardziej liczne i utworzyły podobne zbitki jak w dołku B6. Kryształy w C1, C3 i C4 są bardzo dobrej jakości, natomiast w C6 posiadają liczne skazy i nieregularności (ściany nie są gładkie).



Rysunek 5: Warunki  $pH = 5.2$  i dla stężenia NaCl między 4 % a 9 %. W dołkach D1 i D2 nie zaobserwowano kryształów. W pozostałych dołkach widoczne są pojedyncze duże kryształy. W dołku D3 kryształ jest dobrze uformowany, natomiast w D4, D5 i D6 kryształy posiadają skaży, dodatkowo w D6 widoczny jest pojedynczy zbitek igieł a sam kryształ ma bardzo wyraźne skaży i nieregularny kształt.



Rysunek 6: Wykres typu heat map przedstawiający stosunkowy rozmiar największego kryształu znajdującego w próbce ( $z$ ) dla kombinacji pH i stężenia NaCl,  $z = 0$  oznacza brak kryształów.

stępnie jeśli przekroczona zostanie bariera energetyczna układ może przejść w stan o niższej energii oraz do powstania zarodźców krystalizacji. Od wysokości bariery energetycznej zależy liczba otrzymanych kryształów, ponieważ niższa bariera oznacza, że powstanie zarodźca jest bardziej prawdopodobne, oraz odwrotnie, większa bariera oznacza rzadszą nukleację i powstanie mniejszej liczby kryształów. Optymalne warunki dla krystalizacji skutkowałyby rzadką nukleacją i powstaniem nielicznych (a najlepiej jednego) dużych kryształów dobrej jakości.

Między seriami A do D obserwuje się spadek liczby kryształów i wzrost ich średniego rozmiaru. Sugeruje to pozytywny wpływ wzrostu pH na rozmiar otrzymanych kryształów. W zakresie zbadanych wartości optimum znajduje się w zakresie pH 4.8 – 5.2. W obrębie serii wraz ze wzrostem stężenia NaCl obserwuje się wzrost liczby skaz, oraz są one poważniejsze. W przeciwieństwie do pH można tutaj wyraźnie wyróżnić optymalny zakres stężenia od 6 % do 7 %. Poniżej tego zakresu przy wyższym pH krystalizacja może nie przejść pomyślnie. Ponieważ we wszystkich przypadkach, gdzie nie zaobserwowano kryształów, roztwór jest czysty brak kryształów może wynikać ze zbyt krótkiego czasu krystalizacji. W takim wypadku niższe stężenie soli przy niższym pH opóźnia, a nie uniemożliwia krystalizację. Stężenie soli powyżej 6% - 7 % skutkowało licznymi, wyraźnymi skazami oraz krystalizacją w formie igieł.

Na podstawie wykonanego eksperymentu za warunki najbardziej sprzyjające krystalizacji badanego białka można uznać  $pH = 4.8$  i stężenie NaCl 7 %.