

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Přírodovědecká fakulta

# **Krystalizační studie bakteriofágového lysinu Ap22**

Bakalářská práce

**Zuzana Dvorníková**

Školitel: Mgr. Tatyana Prudnikova, Ph.D.

Konzultant: prof. Mgr. Ivana Kutá Smatanová, Ph.D.

České Budějovice 2020

Dvorníková, Z., 2020: Krystalizační studie bakteriofágového lysinu Ap22. [Crystallization study of bacteriophage lysin Ap22. Bc. Thesis, in Czech] – 61 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

### **Anotace**

Bakalářská práce je zaměřena na studii zatím necharakterizovaného bakteriofágového lysinu Ap22. Bakteriofágový lysin Ap22 může být vhodným kandidátem při hledání alternativních antibiotik, která mohou sloužit k léčbě infekčních nemocí. Hlavním cílem práce bylo osvojit si metody krystalizace a připravit vhodný monokrystal lysAp22, a tím získat difrakční data, která budou sloužit k následnému určování struktury lysAp22 v dalších výzkumech.

### **Annotation**

This bachelor thesis is focused on the study of the as yet uncharacterized bacteriophage lysin Ap22. Bacteriophage lysin Ap22 may be a suitable candidate in the search for alternative antibiotics that can be used to treat infectious diseases. The main goal of this work was to master the methods of crystallization and prepare a suitable single crystal lysAp22 and thus obtain diffraction data which will be used for the subsequent determination of the structure of lysAp22 in further research.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 3. 12. 2020

.....  
Zuzana Dvorníková

## **Poděkování**

Děkuji své školitelce Mgr. Tatyňě Prudnikové, Ph.D. za ochotu, trpělivost, cenné rady a vedení celým praktickým experimentem. Dále bych ráda poděkovala své konzultantce prof. Mgr. Ivaně Kuté Smatanové, Ph.D. za odborné vedení, povzbuzení a cenné rady.

Poděkování také patří celé mé rodině, příteli a přátelům za podporu během celého studia.

# OBSAH

1	Úvod .....	1
2	Cíl práce .....	2
3	Literární přehled .....	3
3.1	Charakteristika proteinů .....	3
3.1.1	Lysozym .....	4
3.1.2	Bakteriofágové lysiny .....	4
3.2	Proteinové krystaly .....	5
3.3	Stručný vývoj a úvod do proteinové krystalografie .....	6
3.4	Proces krystalizace .....	7
3.4.1	Nukleace .....	7
3.4.2	Růst krystalů .....	9
3.4.3	Ukončení růstu krystalů .....	10
3.5	Fázový diagram .....	10
3.6	Pre-krystalizační test .....	11
3.7	Krystalizační metody .....	12
3.7.1	Základní krystalizační metody .....	12
3.7.1.1	Dávková krystalizace ( <i>Batch Crystallization</i> ) .....	12
3.7.1.2	Mikrokrystalizace pod olejem ( <i>Microbatch Under Oil</i> ) .....	12
3.7.1.3	Dialýza ( <i>Dialysis</i> ) .....	13
3.7.1.4	Metody založené na difúzi par .....	14
3.7.2	Pokročilé krystalizační metody .....	17
3.7.2.1	Metoda volné difúze ( <i>Counter Diffusion</i> ) .....	17
3.7.2.2	Krystalizace v gelech ( <i>Crystallization In Gels</i> ) .....	17
3.7.3	Alternativní krystalizační metody .....	17
3.7.3.1	Mikroočkování ( <i>Microseeding</i> ) .....	18
3.7.3.2	Makroočkování ( <i>Macroseeding</i> ) .....	18

3.8	Testy proteinových krystalů .....	19
3.9	Makromolekulární databáze .....	20
4	Materiál a Metody .....	21
4.1	Krystalizace lysozymu .....	21
4.1.1	Vlastní krystalizace lysozymu.....	21
4.2	Krystalizace lysAp22 .....	24
4.2.1	Získání lysAp22 .....	24
4.2.2	Vzorek lysAp22.....	25
4.2.3	Srážecí roztoky .....	25
4.2.4	Vlastní krystalizace lysAp22.....	25
4.2.5	Testy krystalů .....	28
4.2.6	Získání difrakčních dat.....	28
5	Výsledky.....	29
5.1	Výsledky vlastní krystalizace lysozymu .....	29
5.1.1	Výsledky metody sedící kapky .....	29
5.1.2	Výsledky metody visící kapky .....	30
5.1.3	Výsledky metody mikrokystalizace pod olejem .....	31
5.1.4	Výsledky volné difúze v kapilárách .....	32
5.2	Výsledky vlastní krystalizace lysAp22 .....	32
5.2.1	Výsledky metody sedící kapky, 96 jamek.....	33
5.2.2	Výsledky metody sedící kapky, 24 jamek – optimalizace podmínek .....	37
5.2.3	Výsledky krystalizačních testů.....	40
5.2.4	Difrakční záznam .....	40
6	Diskuze .....	42
6.1	Lysozym .....	42
6.2	LysAp22 .....	42
7	Závěr.....	45

8	Seznam literatury.....	47
9	Přílohy .....	53
10	Seznam zkratek.....	61

# 1 Úvod

Pro pochopení buněčných procesů je nezbytná znalost trojrozměrné struktury proteinů a dalších makromolekul. Významnou biofyzikální metodu, pro stanovení struktury je rentgenová difrakční analýza, která stanovuje strukturu na základě jejich atomárního složení. K tomu, aby se metoda dala využít je nezbytnou a nutnou podmínkou vypěstovat kvalitní monokrystal. Získání vhodných krystalů je nejobtížnějším a časově nejnáročnějším krokem v procesu zjišťování struktury makromolekul.

Proteinová krystalografie se zabývá hledáním vhodných podmínek pro růst krystalů, které mají dostatečnou kvalitu a velikost pro následnou analýzu.

Teoretická část bakalářské práce stručně popisuje proteiny, lysozym a bakteriofágové lysiny, které mohou sloužit jako alternativní náhrada antibiotik. Dále se zabývá tím, co je to krystal a rozdíly mezi krystaly proteinů a krystaly solí. Poté stručně popisuje historický vývoj a proces krystalizace, fázový diagram a základní krystalizační metody, které jsou nezbytné k vypěstování krystalů. V neposlední řadě pojednává o testování krystalů, a jejich ověření na proteinový původ. Na závěr je zmíněna makromolekulární databáze.

Praktická část je zaměřena na osvojení základních krystalizačních metod na modelovém proteinu lysozymu. Tyto metody pak byly využity při krystalizaci bakteriofágového lysinu Ap22 v širokém rozsahu podmínek. Vybrané podmínky pak byly nadále optimalizovány. Na závěr jsou uvedeny výsledky z rentgenové difrakční analýzy zkoumaného proteinu.



## 2 Cíl práce

Cílem bakalářské práce bylo:

- Zvládnout základní a pokročilé krystalizační metody na modelovém proteinu
- Charakterizovat studovaný protein a nalézt krystalizační podmínky pro přípravu proteinových krystalů
- Optimalizovat krystalizační podmínky a připravit krystaly proteinu Ap22 v difrakční kvalitě
- Otestovat připravené krystaly a pokusit se získat difrakční data.

## 3 Literární přehled

### 3.1 Charakteristika proteinů

Proteiny jsou nejuniverzálnější makromolekuly nacházející se v živých systémech a zastupující různé funkce téměř ve všech biologických procesech. Fungují jako katalyzátory metabolických reakcí, replikují DNA, transportují a ukládají další molekuly např. kyslík, poskytují stavbu a podporu buňkám a ve větším měřítku generují pohyb, přenášejí nervové impulsy a poskytují imunitní ochranu<sup>1</sup>.

Základním stavebním prvkem proteinů jsou aminokyseliny. Konkrétně je protein tvořen jedním nebo více lineárními řetězci aminokyselin, z nich každý se nazývá polypeptid. Na struktuře proteinů se podílí 20 základních aminokyselin. Aminokyseliny sdílejí základní strukturu, která se skládá z centrálního atomu uhlíku, také nazývaný jako alfa ( $\alpha$ ) uhlík, na který se váže aminoskupina ( $-\text{NH}_2$ ), karboxylová skupina ( $-\text{COOH}$ ) a atom vodíku. Každá aminokyselina má další atom nebo skupinu atomů, známou jako skupina „R“, která určuje identitu aminokyseliny. Vlastnosti postranního řetězce aminokyselin určují jejich chemické chování, tj. zda je aminokyselina považována za hydrofobní, hydrofilní, polární či nepolární, pozitivně nebo záporně nabitá. Například aminokyseliny jako je valin a leucin jsou nepolární a hydrofobní, zatímco serin a glutamin jsou polární a hydrofilní. Lysin a arginin jsou považovány za pozitivně nabitě, aspartát a glutamát jsou naopak považovány za záporně nabitě<sup>2</sup>.

Proteiny jsou biopolymery s velkou relativní molekulovou hmotností, složené z aminokyselin, které se k sobě vážou kovalentní vazbou známa jako peptidová vazba. Během syntézy proteinů se karboxylová skupina naváže na aminoskupinu jiné aminokyseliny za uvolnění vody a tvoří peptidovou vazbu ( $-\text{NH}-\text{CO}-$ ). Polypeptidový řetězec má dva konce, které jsou od sebe chemicky odlišné. Na jednom konci, kde má polypeptid volnou aminoskupinu se nazývá amino-konec (N-konec, *N-terminus*), na druhém konci řetězce je volná karboxylová skupina a je známý pod názvem karboxy-konec (C-konec, *C-terminus*)<sup>2</sup>.

Proteinová struktura má čtyři základní stupně: primární, sekundární a terciární a kvartérní. Primární strukturu tvoří sekvence aminokyselin v polypeptidovém řetězci. Skládání polypeptidu v některých oblastech vede k sekundární struktuře, kde nejběžnější struktury jsou  $\alpha$ -helix ( $\alpha$ -šroubovice) a  $\beta$ -sheet ( $\beta$ -skládaný list). Interakce mezi „R“ skupinami vytvářejí terciální a trojrozměrnou strukturu proteinů. Všechny interakce, jak slabé tak silné, určují terciální strukturu proteinů, pokud protein ztratí svůj trojrozměrný tvar, nemusí již být nadále

funkční. Některé proteiny jsou tvořeny z několika polypeptidů, také známy jako podjednotky, a interakce těchto podjednotek tvoří kvartérní strukturu proteinů<sup>2</sup>.

### 3.1.1 Lysozym

Lysozym (EC 3.2.1.17) je hydroláza, antimikrobiální enzym, produkováný zvířaty a je součástí přirozeného imunitního systému. Enzym funguje tak, že útočí, hydrolyzuje a rozbíjí glykosidické vazby v peptidoglykanech, které se nacházejí v buněčných stěnách bakterií, zejména grampozitivních<sup>3,4</sup>.

Lysozym extrahovaný ze slepičích vaječných bílků je tvořen jedním řetězcem složeného ze 129 aminokyselin a jeho molekulová velikost činí 14,3 kDa. Lysozym extrahovaný z husích vaječných bílků je taktéž tvořen jedním řetězcem, avšak obsahuje 185 aminokyselin a jeho molekulová velikost je 20,3 kDa<sup>5</sup>.

U lysozymu jsou velmi dobře známé jeho krystalizační podmínky. Zároveň jeho schopnost tvořit krystaly, ho činí oblíbeným modelovým proteinem.

### 3.1.2 Bakteriofágové lysiny

Bakteriofágové lysiny jsou peptidoglykanové hydrolázy kódované v dsDNA bakteriofágů (dále již jen jako fágů), které jako purifikované rekombinantní proteiny při vnějším použití na grampozitivní bakterie způsobují rychlý rozklad buněčných stěn a následnou smrt bakteriální buňky. Řada studií nedávno prokázala slibný potenciál těchto enzymů v humánní a veterinární medicíně, v bio obraně zahrnující detekci, diagnostiku a následnou léčbu patogenů na sliznicích a v eliminaci patogenů v potravinách a kontrolu fytopatogenů. S rostoucí celosvětovou převahou bakterií, které jsou rezistentní na antibiotika, představují fágové lysiny novou, slibnou a alternativní skupinu antibakteriálních látek v boji proti infekčním chorobám<sup>6</sup>.

Fágy jsou viry, které specificky infikují bakterie. Během svého životního cyklu fágové přenášejí svoji DNA do buněk během bakteriální infekce a buňka následně vylučuje nové viriony<sup>7</sup>. Poprvé byly objeveny v „před-antibiotické“ éře v roce 1917 d'Herellem, avšak jejich antibakteriální chování bylo popsáno již dříve v roce 1896 Hankinem a později v roce 1915 Twortem<sup>8</sup>.

Bakteriofágové (někdy taky nazývané bakteriální viry) jsou nejhojnějším mikrobiálním zástupcem na Zemi s odhadem  $10^{31}$  částic, což je desetkrát více než mají bakterie. Fágové pro své velké množství prostupují celou biosférou, přes půdu do mořského prostředí, přes atmosféru až do lidského těla<sup>9</sup>. Fágové prostřednictvím svého neustálého lytického cyklu udržují rovnováhu všech ekosystému na planetě (i těch v lidském těle) tím, že

mění složení původních bakteriálních komunit. Z toho důvodu a nedostatku predátorů, není pochyb o tom, že fágové řídí biosféru, protože sedí na vrcholu biologického potravního řetězce<sup>10</sup>.

Podle Fischettiho<sup>11</sup> jsou lysiny, díky několika jedinečným vlastnostem, atraktivnější enzymotika než antibiotika s malými molekulami. Mezi ně patří: 1. jejich specifčnost pro patogeny bez narušení běžné mikroflóry, 2. nízká šance na vývoj bakteriální rezistence, 3. jejich schopnost „zabít“ kolonizující patogeny na povrchu sliznic. Jedním z možných problémů lysinu může být jejich imunogenicita, tj. schopnost vyvolávat buněčnou imunitní odpověď, jakožto proteinové molekuly<sup>11</sup>. Dosavadní studie však dokazují, že lysin-specifické protilátky nejsou neutralizující jak *in vivo*, tak *in vitro*<sup>12,13,14</sup>, což znamená, že lysiny lze použít opakovaně při léčbě infekcí způsobené adaptujícími se patogeny<sup>15</sup>.

Bakteriofág Ap22 lytický pro *Acinetobacter baumannii* byl klasifikován jako člen rodiny *Myoviridae*. Fág má ikosahedrickou hlavu o průměru 64 nm a stažitelný ocas o délce 85 – 90 nm, nadále má bakteriofág dvouřetězovou DNA o velikosti 46kb. Bylo prokázáno, že bakteriofág specificky infikuje 68 % (89 ze 130) genotypově odlišných kmenů *A. baumannii*, které jsou rezistentní na antibiotika. Bakteriofág Ap22 by tedy mohl být použit jako potenciální kandidát při léčbě infekcí spojených s *A. baumannii*<sup>16</sup>.

### 3.2 Proteinové krystaly

Krystal nebo krystalicky pevná látka je pevný materiál, jehož složky (jako jsou atomy, molekuly nebo ionty) jsou uspořádány v mikroskopické struktuře a tvoří krystalovou mřížku, která se rozprostírá všemi směry<sup>17</sup>. Podle krystalografického slovníku, dostupného online zní přesná definice krystalu takto: „*Krystal je jakákoliv pevná látka, jejíž difrakční obrazec je bodový*“<sup>18</sup>.

Slovo „krystal“ pochází ze slova řeckého původu „*krystallos*“, což v překladu znamená „čistý led“. Krystaly proteinů, stejně jako led jsou velmi dobře chemicky definovány. Velmi často tvoří přesné a pravidelné geometrické útvary, které jsou čiré a lehce lesklé. Ne nadarmo je proces krystalizace brán jako symbol čistoty a dokonalosti<sup>19</sup>.

Makromolekulární krystaly jsou složeny přibližně z 50 % rozpouštědla (což se může lišit v rozmezí 25 – 90 % s ohledem na to, o jakou konkrétní makromolekulu se jedná). Zbývající prostor zabírá protein nebo nukleová kyselina, tudíž celý krystal je v mnoha ohledech uspořádaným systémem, který je prostoupený mnoha intersticiálními prostory, přes které volně difunduje rozpouštědlo a další malé molekuly<sup>20</sup>. Počet vazeb (např. solné můstky, vodíkové vazby nebo hydrofobní interakce) poskytují mřížkové interakce, které jsou nezbytné

k udržení krystalů. Makromolekulární krystaly daleko převyšují počtem těchto vazeb, než anorganické krystaly solí a to do značné míry vysvětluje rozdíl v jejich vlastnostech<sup>21,22</sup>.

Krystaly makromolekul a krystaly nízkomolekulárních sloučenin jsou si velmi podobné ve své morfologii a vzhledu, existují však u nich značné praktické rozdíly. Krystaly nízkomolekulárních sloučenin se vyznačují pevnými mřížovými silami, jsou vysoce uspořádané, obecně jsou fyzicky tvrdé a křehké, je s nimi snadná manipulace, lze je obvykle možné vystavit je vzduchu, vykazují silné optické vlastnosti a intenzivně difraktují rentgenové záření. Makromolekulární krystaly jsou obvykle menší velikosti, jsou poměrně měkké a snadno se rozpadají, pokud se nechají dehydratovat, tak se rozpadají, vykazují slabé optické vlastnosti a poměrně hůře difraktují rentgenové záření. Dalšími rozdíly jsou, že makromolekuly mohou tvořit několik druhů pevných stavů, jako jsou amorfní sraženiny, gely nebo oleje, tak i krystaly<sup>20</sup>. Dále makromolekulární krystaly nukleují při vysokých úrovních přesycení, často o dva až tři řády větší, než je nutné k udržení jejich růstu a kinetika nukleace je o dva až tři řády pomalejší než u nízkomolekulárních krystalů<sup>23</sup>.

### 3.3 Stručný vývoj a úvod do proteinové krystalografie

Krása krystalizace sahá až do starověku, v té době šlo však o krystaly solí. Krystalizace proteinů je novější záležitost. První zmínky o krystalech proteinů jsou datovány více jak 150 let zpátky. Jednalo se o krystaly pozorované v krevních sérech, což ve skutečnosti byly krystaly hemoglobinu pozorované Hünefeldem roku 1840. Jednalo se o krevní sérum získané z žížaly, kdy krev byla zmačknuta mezi dvě sklíčka a pomalu se nechala vyschnout. Později byly takto získány krystaly i z krve prasete a muže. Tím vznikla nová myšlenka, že proteinové krystaly mohou vznikat pomalou dehydratací. Pomalá dehydratace je metoda, kterou ve většině metod krystalizace používáme do dnes<sup>24,25,26</sup>.

Dalším důležitým milníkem byla krystalizace proteinů zvané globuliny. Při krystalizaci těchto proteinů byly vyvinuty nové metody, které zahrnovaly extrakci proteinů v solných roztocích, dialýzu solného roztoku extraktu proti destilované vodě a následné zpracování výsledných roztoků s acetonem, alkoholem nebo etherem<sup>26</sup>.

Začátkem 20. století se J. B. Sumnerovi podařilo získat krystal enzymu, ureázy. V téže době byl také vykrytalizován hormon insulin, což je první známý případ, kdy byl získán krystal přidáním dvojmocného kovu. Roku 1935 se podařilo získat krystal viru, konkrétně virus tabákové mosaiky. Tento objev je považován za velký milník ve virologii<sup>26</sup>.

Koncem 30. let 20. století začaly proteinové krystaly zaujímat novou a důležitou roli díky využití rentgenové difrakční analýzy k charakterizaci třídímenzionálních krystalů

proteinů<sup>27</sup>. Vylepšování v postupech při získávání krystalů vhodných pro stanovení struktury, propojení oborů jako je biochemie, molekulární biologie, chemie, fyzika a technika vedlo k utvoření krystalografie proteinů jako samotného vědního oboru, tak jak ho známe dnes<sup>24</sup>.

Krystalizace makromolekulárních látek, které zahrnují proteiny, nukleové kyseliny, polysacharidy a lipidy, stejně jako další makromolekulární skupiny (viry a ribozomy) je založena na komplikované sadě principů, zkušeností a nápadů<sup>20</sup>. Jedná se o proces hledání vhodných fyzikálně-chemických podmínek pro konkrétní protein<sup>28</sup>. Neexistuje žádná jednotná teorie, která by dávala přesný návod, jak získat stabilní a kvalitní krystal. Z toho hlediska je proces získávání krystalů do značné míry empirický, vyžaduje trpělivost, zkušenosti a intuici<sup>20</sup>. V dnešní době však představuje jeden z nejefektivnějších způsobů pro získávání materiálů v oborech jako se strukturální biologie nebo fyzikální biochemie. Získání krystalu je předpoklad pro objasnění strukturálních a funkčních vztahů<sup>28</sup>.

Krystalizace proteinů je metoda pokus-omyl, kdy dochází ke srážení proteinu z jeho roztoku. Platí obecné pravidlo, čím čistší protein, tím je větší pravděpodobnost získání krystalů<sup>29</sup>. Utváření krystalů je ovlivňováno mnoha faktory, jak termodynamickými, kam řadíme rozpustnost látky, tak kinetickými jako je nukleace a růst krystalů<sup>28</sup>. Úspěšnost krystalizace záleží na mnoha podmínkách, avšak musí být splněna jedna základní podmínka, stav přesycení (supersaturace). Přesycení je nerovnovážný stav charakterizovaný jeho tendencí tvořit pevné skupenství, do té doby než je ustálena rovnováha<sup>30</sup>. Vyhovující velikost krystalu pro rentgenovou difrakční analýzu by neměla být menší, než  $10 \mu\text{m}^3$ . Obecně platí, že čím větší krystal, tím lepší výsledky a tím menší riziko jeho rozpadu během měření<sup>31</sup>.

### **3.4 Proces krystalizace**

Důležitým krokem před samotným procesem krystalizace je zajištění dostatečné čistoty proteinu, a charakterizovat jej<sup>32</sup>. Některé proteiny se sráží při relativně nízké koncentraci solí, některé zase naopak, při vysoké koncentraci solí. V ojedinělých případech se vytvoří jen při odebrání solí z roztoku<sup>26</sup>.

Krystalizace je proces, který zahrnuje tři základní kroky: nukleace, růst krystalů a zastavení růstu krystalů.

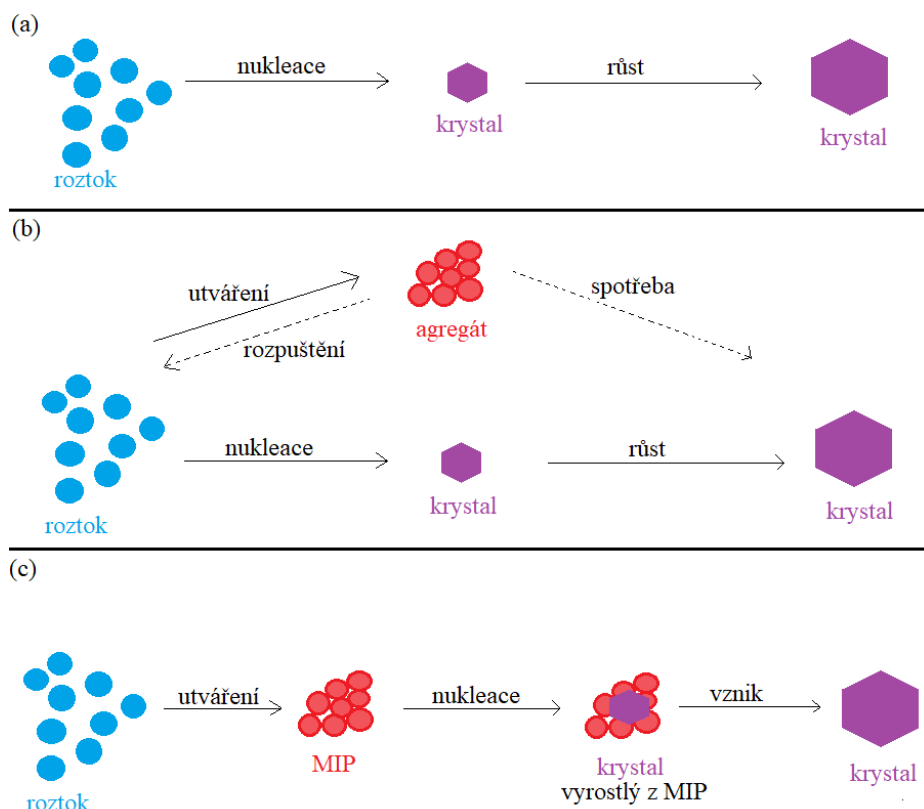
#### **3.4.1 Nukleace**

Nukleace je prvním krokem k získání krystalů, zároveň je to však nejsložitější proces. Během nukleace dochází ke vzájemnému kontaktu vhodně orientovaných molekul. Po dosažení limitu přesycení, kterého můžeme dosáhnout např. vypařováním, se začnou tvořit stabilní agregáty, ideálně jádra krystalů<sup>28</sup>. Molekuly musí překonat energetickou bariéru, aby

vytvořily dostatečně velké agregáty, které mohou přežít z termodynamického hlediska<sup>30</sup>. Počet, velikost a kvalita krystalů záleží na vytvoření prvního jádra a následném mechanismu jeho růstu. Manipulace s chemickými a fyzikálními aspekty může výrazně ovlivnit vytváření krystalů a jejich následný růst<sup>24</sup>.

Studie raného stádia nukleace v různých systémech odhalily nové rysy, které nelze vysvětlit pomocí klasické teorie nukleace. Množství experimentálních výsledků prokazuje, že existuje metastabilní přechodná fáze (*metastable intermediate phase* – MIP), která se vytvoří ještě před vytvořením konečné krystalické struktury. Rozpuštěné látky ve formě přesyceného roztoku v prvním kroku vytvářejí malé shluky nebo makroskopicky hustou kapalinou fázi. Ve druhém kroku pak dochází k nukleaci v rámci MIP<sup>33</sup>. Dvoustupňový nukleační mechanismus lze považovat za příklad Ostwaldova krokového pravidla, tj. nejméně stabilní modifikace vzniká jako první<sup>34</sup>. Sauter a kolektiv<sup>33</sup> ve své práci uvádějí, že dvoustupňovou (two-step) nukleaci od jednostupňové (one-step) lze rozlišit sledováním celkové kinetiky krystalizace. Pokud existuje MIP je zapotřebí věnovat zvláštní pozornost rozlišování paralelních a postupných cest. Postupná dráha odpovídá skutečné dvoustupňové nukleaci, ve které krystaly nukleují z MIP. Paralelní dráha se skládá z paralelní tvorby MIP a krystalů ve dvou jednostupňových událostech<sup>33</sup>. Různé dráhy nukleace jsou schematicky znázorněny na Obr. 1.

Klasická jednostupňová teorie zahrnuje nukleaci jádra z roztoku. Paralelní tvorba není tak obvyklý proces, ale předpokládá se v něm, že kromě jednostupňového procesu nukleace vzniká navíc v roztoku reverzibilní meziprodukt. Ve skutečné dvoustupňové nukleaci následuje po vytvoření meziproduktu nukleace krystalů uvnitř meziproduktu. Poté co následný růst krystalů spotřebuje všechny meziprodukt, krystaly se objeví ve zbylém roztoku a následně rostou<sup>33</sup>.



Obrázek 1: Ilustrace různých cest pro nukleaci a růst krystalů. (a) Klasická jednostupňová nukleace. (b) Paralelní tvorba agregátů a nukleace krystalů. (c) Vícestupňový proces, kde prekurzorem je MIP pro nukleaci<sup>33</sup> (vytvořeno autorkou podle podkladů v programu MS Paint).

### 3.4.2 Růst krystalů

Jakmile je zformováno stabilní jádro, začíná proces růstu krystalů do viditelné velikosti<sup>35</sup>. Kutá Smatanová<sup>28</sup> přikládá růstu krystalů dva základní stupně: difúzní, který udává rychlost difúze v okolí růstu krystalů a depoziční, který popisuje rychlost utváření pevné fáze z roztoku. Jestliže je depoziční stupeň nízký, nedochází v oblasti růstu k vytváření zárodků, vzorek tedy zůstává čirý. Pokud je naopak příliš vysoký, zárodky rostou moc rychle a vytváří poškozené krystaly, nevhodné pro další zkoumání. Obvykle platí, že ideální krystaly, vhodné pro rentgenovou difrakční analýzu vznikají z malého počtu krystalizačních jader, která rostou volnou rychlostí<sup>28</sup>.

Jak krystaly rostou, roztok ztrácí původní aspekty a úroveň přesycení upadá<sup>32</sup>. Proces nukleace vyžaduje většího přesycení, než růst a rychlost krystalizace se zvyšuje, když se zvyšuje přesycení<sup>19</sup>. Růst krystalů je ovlivněn mnoha faktory, kdy jeden faktor může změnit celý proces růstu krystalů. Všechny tyto faktory, které mohou ovlivnit růst krystalů, jak biochemické, chemické i fyzikální jsou uvedeny v Tab. I.



Tabulka I: Faktory ovlivňující průběh krystalizace<sup>19,20,26,36</sup> (podle podkladů vytvořila autorka v programu MS Excel).

Biochemické	Chemické	Fyzikální
čistota vzorku	typ srážecího roztoku	teplota
homogenita vzorku	původ činidla	tlak
post-translační modifikace	koncentrace vzorku	gravitace
zdroj makromolekul	pH	čas
chemická modifikace	typ pufru	magnetické pole
genetická modifikace	iontová síla	elektrické pole
agregátní stav makromolekul	koncentrace vzorku	dielektrické vlastnosti media
isoelektrický bod	kovové ionty	viskozita media
ligandy, inhibitory	detergenty	vibrace a zvuk
stabilita makromolekul	těžké kovy	míra rovnováhy
původ vzorku	makromolekulární nečistoty	metodika
hydrolýza	redukční/oxidační prostředí	manipulace se vzorky
stupeň denaturace	koncentrace srážecího roztoku	koncentrace srážecího roztoku

### 3.4.3 Ukončení růstu krystalů

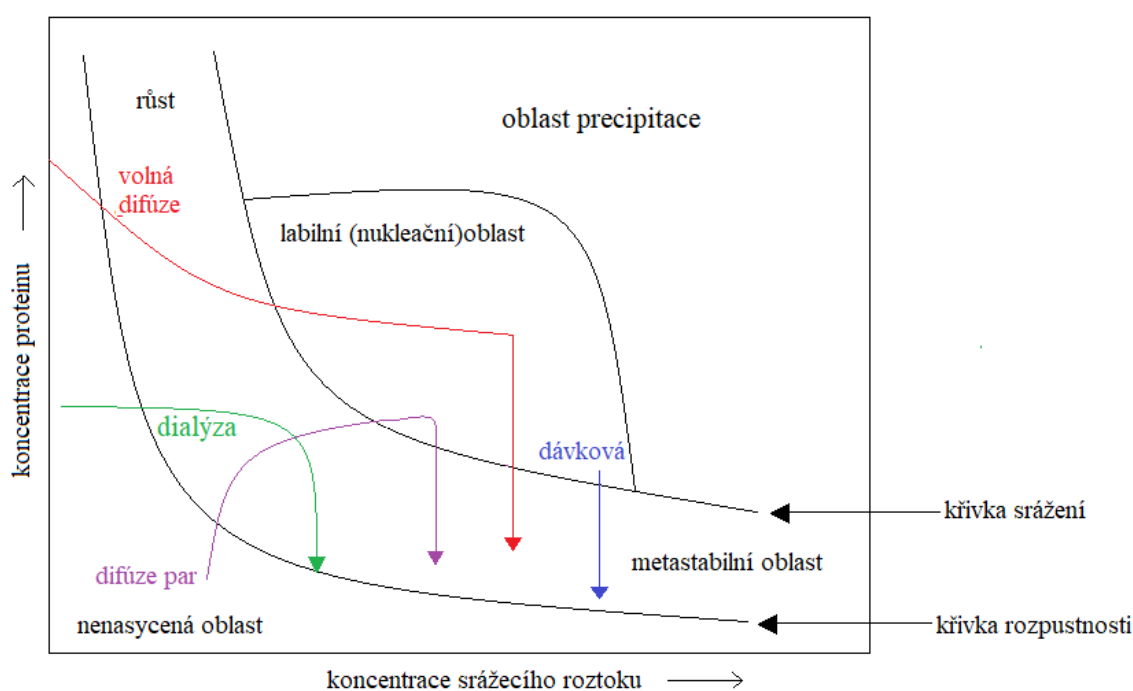
Ukončení růstu krystalů je finální fáze, kdy dochází k ustálení termodynamické rovnováhy. Růst může být ukončen i jindy, např. když nastane vyčerpání makromolekul z krystalizačního roztoku, defekt krystalů nebo nahromadění nečistot na povrchu krystalu<sup>19</sup>. V této fázi již nadále nedochází k růstu krystalů nebo k jejich zvětšování<sup>27</sup>.

## 3.5 Fázový diagram

Fázový diagram je graf charakterizující stav látek (např. pevný nebo kapalný stav), v závislosti na podmínkách, jako je např. teplota a koncentrace<sup>37</sup>.

Nejběžněji se fázový diagram zobrazuje ve dvoudimenzionální formě, znázorňující závislost rozpustnosti proteinu na jiném určitém parametru vzorku, nejčastěji na koncentraci srážecího roztoku<sup>37</sup>. Na Obr. 2 je znázorněn obecný fázový diagram krystalizace, kde jsou zároveň zobrazeny průběhy různých krystalizačních metod. Rozděluje se do dvou základních oblastí, které od sebe rozděluje křivka rozpustnosti. První část je nenasycená oblast, kde jsou proteiny rozpustné a nekrystalizují, druhá část je přesycená oblast, kde proteinové krystaly nukleují a rostou. Přesycená oblast je z termodynamického hlediska v nerovnováze a rozděluje se do tří částí, které se rozdělují z kinetického hlediska<sup>38</sup>. Každý bod na křivce rozpustnosti odpovídá koncentraci, při které je roztok v rovnováze se srážecím roztokem<sup>39</sup>.

První částí je oblast vysokého přesycení (oblast precipitace), kde se nachází přebytek proteinových molekul, které se oddělují z roztoku v pevné formě, za vytváření amorfních sraženin nebo mikrokryсталů. Druhá část je oblast mírného přesycení (labilní oblast, také zvané nukleační oblast), zde probíhá nukleace spontánně, molekuly proteinů se shlukují v krystaly. Poslední částí je oblast nízkého přesycení (metastabilní oblast), zde již neprobíhá spontánní nukleace jader, krystaly jsou stabilní a mohou nadále růst. K růstu krystalů velkých velikostí je zapotřebí růst ideálně jednoho jádra v labilní oblasti, těsně před hranicí metastabilní oblasti. Jak krystal roste, roztok se vrátí do metastabilní oblasti a nevznikají žádná další nová jádra, růst zbývajících jader se postupně zpomaluje až do ustálení rovnováhy<sup>40,41,42</sup>.



Obrázek 2: Fázový diagram růstu krystalů se zobrazením průběhu různých krystalizačních metod<sup>43</sup> (vytvořeno autorkou podle podkladů v programu MS Paint).

### 3.6 Pre-krystalizační test

Pre-krystalizační test se používá k určování vhodné koncentrace vzorku, jelikož koncentrace vzorku je podstatnou proměnnou. Příliš koncentrované vzorky mohou vyústit v amorfni sraženiny a naopak u málo koncentrovaných roztoků zůstane kapka ve většině případů čirá. Optimalizováním koncentrace vzorku se dá snížit počet sraženin a čirých kapek v pokusu, i když bývají velmi časté<sup>44</sup>.

Test před krystalizací se provádí za pomoci PCT sady dodávané např. společností Hampton Research (USA). Tato sada obsahuje čtyři unikátní činidla. Nejprve se vzorek

proteinu smísí se dvěma činidly (činidlo A1 a B1), ta slouží k určení citlivosti proteinu na soli a polymery. Pokud je na ně protein příliš citlivý, provede se test se zbylými dvěma činidly (činidlo A2 a B2). Výsledky PCT pak poukazují, zdali je příslušný protein vhodný k pokusům v té koncentraci, ve které byl testován nebo je zapotřebí dalších diagnostik, aby se prokázala homogenita vzorku vhodná pro krystalizaci<sup>44</sup>.

### 3.7 Krystalizační metody

Existuje značné množství technik, jejichž účelem je uvedení roztoku do fáze přesycení, kdy dochází ke vzniku krystalů. Obecně k tomu dochází pomalým snižováním koncentrace srážecího roztoku<sup>26</sup>. V průběhu let bylo vyvinuto mnoho krystalizačních metod, kde každá má své výhody a nevýhody závislé na jejich provedení<sup>36</sup>.

#### 3.7.1 Základní krystalizační metody

Mezi základní metody krystalizace řadíme dávkovou krystalizaci (*Batch Crystallization*), mikrokrystalizaci pod olejem (*Microbatch Under Oil*), dialýzu (*Dialysis*), a v neposlední řadě metody založené na difúzi par rozpouštědla.

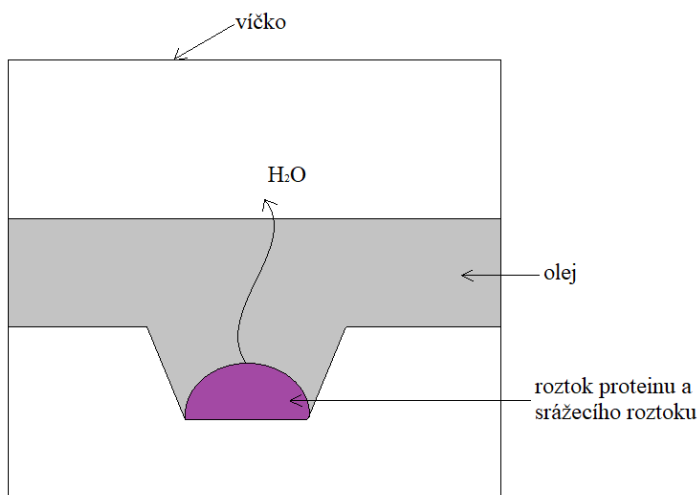
##### 3.7.1.1 Dávková krystalizace (*Batch Crystallization*)

Dávková krystalizace je jedna z nejstarších a nejjednodušších metod používaná v krystalografii. Tato metoda nevyžaduje nic jiného než smíchání proteinu a srážecího roztoku a čas, než začne spontánní nukleace<sup>26</sup>. Stav přesycení je dosaženo přímo, nikoliv na základě difúze par. Pokud jsou již známy krystalizační podmínky, může být dávková krystalizace provedena při velkých objemech (více jak 350  $\mu$ l až několik mililitrů) ve zkumavkách, popřípadě v jiném druhu rezervoáru<sup>30</sup>.

Nevýhodou dávkové krystalizace je potřeba většího množství vzorku, a zároveň se nedá použít u proteinů, které vyžadují pomalého dosáhnutí přesycení, aby mohly optimálně růst. Výhodou je její jednoduchost a rychlost<sup>26,36</sup>.

##### 3.7.1.2 Mikrokrystalizace pod olejem (*Microbatch Under Oil*)

Mikrokrystalizace pod olejem je forma dávkovací metody, která se provádí pod olejem (nejčastěji se používá silikonový nebo parafínový). Olej zabraňuje rychlému vypařování extrémně malých kapek (menší než 2  $\mu$ l). Stejně jako u dávkovací metody jde o smíchání vzorku a srážecího roztoku přímo do jedné malé kapky<sup>30</sup>. Výhodou je použití malého množství vzorku, ve většině případů poskytuje velmi stabilní krystaly, které jsou odolné vůči změnám teploty, díky vrstvě oleje. Metoda se dá provádět pomocí robotů, což dosahuje přesnějších výsledků a šetření času<sup>45</sup>. Na Obr. 3 je znázorněno schéma mikrokrystalizace pod olejem.



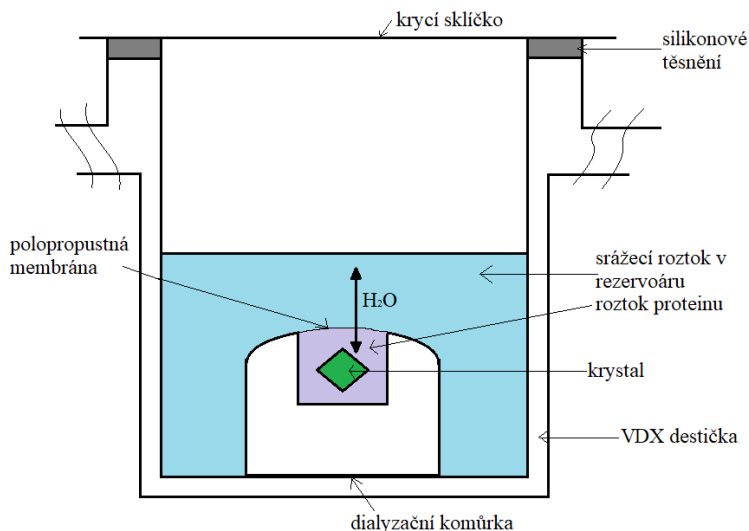
Obrázek 3: Schéma mikrokrystalizace pod olejem<sup>44</sup> (vytvoreno autorkou podle podkladů v programu MS Paint).

### 3.7.1.3 Dialýza (*Dialysis*)

Dialýza nabízí možnosti, jak manipulovat s iontovou silou, což není možné u metod založených na difúzi par<sup>19</sup>. Při dialýze je vzorek proteinu oddělen od srážecího roztoku polopropustnou (semi-permeabilní) membránou. Tato membrána umožňuje pohyb malých molekul, jako jsou soli, různá aditiva a krystalizační činidla, za to neumožňuje pohyb větších biologických molekul. Krystalizace proteinu probíhá díky difúzi srážecího roztoku dovnitř nebo ven ze vzorku, přičemž vzorek zůstává konstantní<sup>44</sup>.

Dialýza může být připravena mnoha způsoby, jako jsou dialyzační sáčky, Zeppezauerovy komůrky a dialyzační knoflíky. Dialyzační knoflíky jsou komerčně dodávány o objemech 5  $\mu$ l až 350  $\mu$ l. Vzorek proteinu je vložen dovnitř dialyzačního knoflíku a uzavřen polopropustnou membránou. Schéma dialýzy je znázorněno na Obr. 4. Dialýza je nejefektivnější metodou krystalizace, kde dochází ke snížení iontové síly. Na rozdíl od metod, které jsou založeny na difúzi par, je při dialýze koncentrace vzorku konstantní<sup>30</sup>.

Výhodou dialýzy je že srážecí roztok v rezervoáru může být vyměněn a tím i podmínky. Dá se toho docílit tak, že jednoduše přesuneme dialyzační knoflík z jednoho rezervoáru do druhého. To umožňuje kontinuální použití vzorku, dokud nejsou nalezeny vhodné podmínky. Rychlost dosažení rovnováhy se dá nadále modulovat upravením rozdílů koncentrací jak uvnitř membrány, tak vně<sup>43,46</sup>.



Obrázek 4: Schéma dialýzy<sup>44</sup> (vytvořeno autorkou podle podkladů v programu MS Paint).

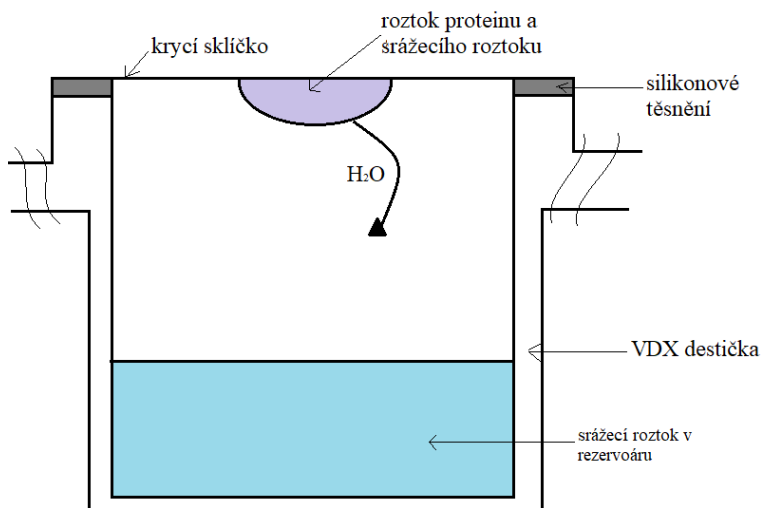
### 3.7.1.4 Metody založené na difúzi par

Tato technika je založena na vypařování a difúzi vody (a dalších těkavých látek) mezi malou kapkou (0,5 – 10  $\mu$ l), obsahující vzorek proteinu společně se srážecím roztokem o nižší koncentraci a rezervoárem, který je naplněn stejným srážecím roztokem o vyšší koncentraci. Celý systém je uzavřen krycím skličkem a silikonovým těsněním, popřípadě lepicí páskou. V kapce dochází ke zvyšování koncentrace proteinu, systém pak přechází do stavu přesycení a vznikají tak podmínky vhodné k růstu krystalů<sup>47,48,49</sup>.

#### Metoda visící kapky (*Hanging Drop Vapour Diffusion*)

Při této metodě je kapka proteinu společně se srážecím roztokem nanesena na krycí skličko, které se následně převrátí nad rezervoár, který obsahuje srážecí roztok. Celý systém je utěsněn pomocí silikonového těsnění. Vzniká tak uzavřený systém, ve kterém dochází k difúzi par z visící kapky do rezervoáru až do ustálení rovnováhy<sup>50</sup>. Schéma metody visící kapky je znázorněno na Obr. 5.

Objem kapky by neměl přesáhnout 15  $\mu$ l, aby se zabránilo jejímu pádu do rezervoáru. Pokud nejsou v kapkách pozorovány žádné krystaly nebo sraženiny, nebylo tak dosaženo dostatečného přesycení, neboť systém dospěl pouze do metastabilní fáze. V prvním případě to lze změnit zvýšením koncentrace srážecího roztoku v zásobníku. V druhém případě pak dostatečná změna teploty o pár stupňů by mohla pomoci k zahájení procesu nukleace<sup>38</sup>.



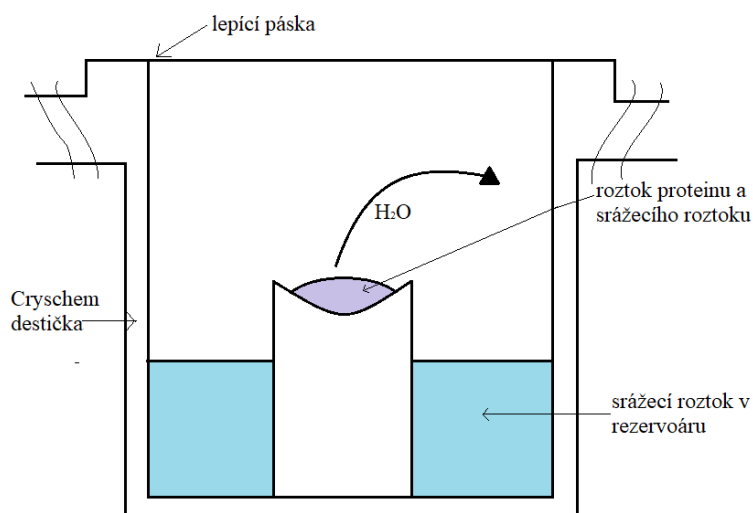
Obrázek 5: Schéma metody visící kapky<sup>44</sup> (vytvořeno autorkou podle podkladů v programu MS Paint)

Výhodou této metody je jednoduchost, následná snadná manipulace s krystaly, upravení srážecího roztoku a následné vrácení vzorku. Nevýhodou této metody je omezený objem kapky, další je možné sklouznutí kapky po sklíčku vlivem povrchového napětí. Tuto metodu nelze provádět pomocí robotů<sup>26,44</sup>.

#### **Metoda sedící kapky (*Sitting Drop Vapour Diffusion*)**

Metoda sedící kapky se v krystalizaci proteinů řadí mezi jednu z nejoblíbenějších. V této metodě je kapka proteinu společně se srážecím roztokem umístěna do vyvýšené jamky uprostřed rezervoáru, který obsahuje srážecí roztok. Celý systém je uzavřen pomocí lepicí pásky. Schéma metody je znázorněno na Obr. 6. Stejně, jako u visící kapky difúze par probíhá přímo. Tato metoda se využívá u vzorků, kde je zapotřebí většího objemu kapky, nebo v přítomnosti aditiv např. detergenty nebo organická rozpouštědla, která snižují povrchové napětí<sup>30,50</sup>.

Výhodou této metody je, že je časově nenáročná, dá se použít za pomoci robotů, není příliš nákladová, kompatibilnost s gely, umístění kapky ve stabilní poloze. Umožňuje testovat širokou škálu podmínek. Mezi nevýhody této metody patří pozdější obtížnější manipulace s krystaly<sup>26,44</sup>.

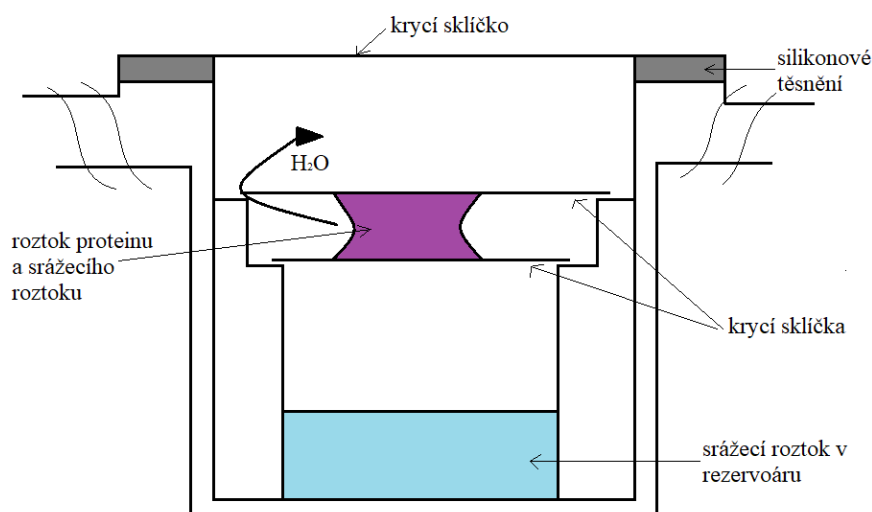


Obrázek 6: Schéma metody sedící kapky<sup>44</sup> (vytvořeno autorkou podle podkladů v programu MS Paint).

### Metoda sendvičové kapky (*Sandwich Drop Vapour Diffusion*)

Při metodě sendvičové kapky se kapka vzorku proteinu a srážecího roztoku napipetuje na spodní silikonizované sklíčko a nad to se umístí druhé silikonizované sklíčko. Mezi sklíčky vznikne malý prostor, kde je kapka sevřena<sup>44</sup>. Schéma této metody je znázorněno na Obr. 7.

Tato metoda je v dnešní době zřídka používána. Má však své výhody a to, že redukuje množství povrchu kapky, které je vystaveno vzduchu, tj. rychlost difúze par probíhá pomaleji než v předchozích dvou metodách<sup>30</sup>. Další nespornou výhodou je, že má dobré optické vlastnosti pro pozorování krystalů<sup>26</sup>. Nevýhodou se pak stává její časová náročnost.



Obrázek 7: Schéma metody sendvičové kapky<sup>44</sup> (vytvořeno autorkou podle podkladů v programu MS Paint).

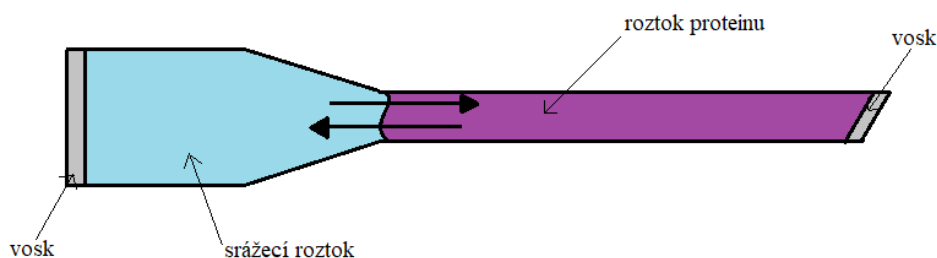
### 3.7.2 Pokročilé krystalizační metody

Mezi pokročilé krystalizační metody řadíme metodu volné difúze a krystalizaci v gelech.

#### 3.7.2.1 Metoda volné difúze (*Counter Diffusion*)

Tato technika, která je vyobrazena na Obr. 8, spočívá v pečlivém navrstvení srážecího roztoku a vzorku proteinu v kapiláře, jejíž konce jsou poté utěsněny voskem<sup>51</sup>, systém dosahuje rovnováhy přímou difúzí vzorku proteinu do srážecího roztoku. V místě rozhraní, kde roztoky dotýkaly, dochází k přesycení, které popuzuje tvorbu nukleačních jader. Po ustálení rovnováhy mohou krystaly růst<sup>52</sup>.

Nevýhodou této metody je použití značně velkého objemu vzorku k naplnění kapiláry<sup>43</sup>. Jako výhodu García-Ruiz<sup>52</sup> uvádí testování různých podmínek v jednom systému.



Obrázek 8: Schéma metody volné difúze<sup>44</sup> (vytvořeno autorkou podle podkladů v programu MS Paint).

#### 3.7.2.2 Krystalizace v gelech (*Crystallization In Gels*)

Tato technika se v dnešní době používá hlavně ke snižování defektů u krystalů a k efektivnější kontrole fáze nukleace<sup>53</sup>. Jádra jsou zachycena v pórech gelové matrice, z toho důvodu se krystaly nemohou pohybovat a ani sedimentovat<sup>54</sup>. Nejčastěji se při těchto experimentech používá agarózový gel, akrylamidový nebo silikonový. Agarózový gel je však nejhojněji používaný z toho důvodu, že je stabilní ve vysokém rozmezí pH (3,0 – 9,0), během tuhnutí neuvolňuje žádné vedlejší produkty a má nízkou teplotu gelování (přibližně 28°C. Dále vykazují vysokou pružnost a odolnost, tato vlastnost pak chrání vzniklé krystaly<sup>55</sup>.

### 3.7.3 Alternativní krystalizační metody

Za alternativní krystalizační metody můžeme považovat očkování. Očkování umožňuje pěstovat krystaly v metastabilní oblasti, kde spontánní nukleace jader neprobíhá, avšak zde může nastat růst ze zárodků ("seeds") krystalů<sup>44</sup>. V krystalizaci je problémem, že ideální podmínky pro nukleaci krystalizačních jader nejsou naopak ideální pro následný růst



krystalů. Důvodem je, že spontánní nukleace je pravděpodobnější, když je úroveň přesycení vysoká, zatímco vyžadovaný pomalý růst krystalů probíhá při nižší hodnotě přesycení. Ideální experiment proto od sebe musí rozdělovat fázi nukleace a fázi růstu, aby byly splněny tyto dva odlišné požadavky<sup>56</sup>.

Princip očkovacích metod spočívá v použití již vzniklých krystalických jader jako zárodky krystalů a jejich následné vložení do nové kapky srážecího roztoku, který má nižší hodnotu přesycení<sup>56</sup>. Očkovací metody se rozdělují na dva základní typy, dle velikosti krystalů: mikroočkování a makroočkování.

### **3.7.3.1 Mikroočkování (*Microseeding*)**

V této metodě jde o přenos malých krystalů, nebo jejich zárodků do nového roztoku s nižší hodnotou přesycení. Při této metodě hrozí, že do nového roztoku bude přeneseno příliš mnoho jader, z nichž by sice vyrostlo množství větších krystalů, ale nebyly by vhodné pro difrakční analýzu. Aby se tomuhle problému dalo předejít, roztok s mikrokrystalami se následně ředí, do různých koncentrací v širokém rozmezí. Je obvyklé, že většina naředěných roztoků obsahuje pouze jeden mikrokrystal na jeden mikrolitr. Každý vzorek ze série je pak přidán k novému rovnovážnému roztoku proteinu, u kterého se předpokládají vhodné podmínky pro růst krystalů. Tento test ideálně identifikuje vhodný vzorek, který poskytne jeden monokrystal větších rozměrů nebo více malých monokrystalů. Tento vzorek se pak použije pro očkování<sup>20</sup>.

Roztoky obsahující příliš mnoho zárodků produkují další mikrokrystalami, zatímco roztoky obsahující velmi malé množství zárodků neposkytují nic, kapka zůstává čirá. Po nalezení roztoku, který obsahuje ideální počet zárodků, je lze s relativní jistotou použít při dalších procesech očkování<sup>20</sup>.

Za výhodu mikroočkování lze považovat možnost automatického rozkapávání za použití roboty<sup>20</sup>, jako nevýhodu uvádí Bergfors<sup>56</sup> obtížnost kontroly počtu mikrokrystalů, které jsou přeneseny.

Speciální a oblíbenou technikou mikroočkování je vlasové očkování (*String Seeding*), vlas, vous nebo vlákno přejede přes roztok, kde jsou již vytvořeny krystalizační zárodky. Krystalizační zárodky se přichytí na vlákno a jsou přeneseny do nového rovnovážného proteinového roztoku, tak že se přes roztok přejede vláknem. Nové krystalami pak většinou rostou ve směru tažení vlákna<sup>26,36</sup>.

### **3.7.3.2 Makroočkování (*Macroseeding*)**

Makroočkování se provádí u krystalů, u kterých se zastavil růst, ale nejsou dostatečně velké pro rentgenovou difrakci. Tento krystal je z původního roztoku přenesen do nového

rovnovážného proteinového roztoku. V novém roztoku má krystal šanci čerpat potřebný materiál, aby mohl nadále růst<sup>26</sup>. Rupp<sup>36</sup> uvádí jako nevýhodu makroočkování jeho náročnost.

### **3.8 Testy proteinových krystalů**

Vytvoření krystalů v kapce, která byla smíchána s roztokem proteinu a se srážecím roztokem, ještě neznamená, že se jedná o krystaly proteinu. V krystalizačních experimentech se obvykle používají pufrы, které jsou málo koncentrované, nemělo by tedy docházet k jejich krystalizaci. Některé soli, jako je např. síran amonný, které se používají ve vyšších koncentracích, mohou krystalizovat namísto proteinu. V nejčastějších případech dochází ke krystalizaci solí, právě tehdy když jsou soli smíchány společně s precipitačními iontovými pufrы (pufrы obsahující vápenaté ionty) nebo organickými molekulami, které mohou pozměnit rozpustnost jednotlivých složek ve srážecím roztoku<sup>28</sup>. Existuje několik druhů testů, některé jsou více spolehlivé než jiné. Většinou jde o metody destruktivní. Nejdůvěryhodnějším testem, je rentgenová difrakční analýza. V následující Tabulce – viz Tab. II – jsou shrnuty nejpoužívanější krystalizační testy.

Tabulka II: Testy používané k rozlišení proteinových krystalů vs. krystaly nízkomolekulárních sloučenin<sup>28,44,57</sup>, (podle podkladů vytvořila autorka v programu MS Excel).

test	postup	pozorování	
		krystaly proteinů	krystaly solí
Test drcením ( <i>Crush Test</i> )	krystal se umístí pod mikroskop a je rozdrcen ostrým předmětem	snadno se rozpadají i při slabém nárazu,	také se rozpadají, je však zapotřebí větší síly, a jde slyšet "prasknutí", kvůli větší hustotě padají kousky na do jamky
Barvicí test ( <i>Dye Test</i> )	krystaly se v jamce obarví barvivem IZIT, což je methylenová modř	barvivo se v krystalech koncentruje a obarví je modře	barvivem se nezbarví
Dehydratace ( <i>Dehydration</i> )	krystal je pomocí skleněné kapiláry vyjmut z jamky a ponechán na vzduchu	krystal vysychá a rozpadá se	krystaly vysychají nepatrně a jejich vzhled se zpravidla nemění
Dvojlom světla ( <i>Birefringence</i> )	krystal se vloží pod zkřížené polarizátory	vykazují slabý dvojlom světla	vykazují silný dvojlom světla
SDS-PAGE elektroforéza ( <i>SDS-PAGE electrophoresis</i> )	analýza rozpuštěných krystalů pomocí SDS-PAGE	na gelu se objeví proužek, který odpovídá molekulové hmotnosti proteinu	solí procházejí celou délkou gelu
Rentgenová difrakční analýza ( <i>X-ray diffraction analysis</i> )	test krystalů na zdroji synchrotroního záření	difrakční snímky se vyznačují velkým počtem difrakcí v blízkých vzdálenostech	difrakční snímky se vyznačují menším počtem difrakcí ve větších vzdálenostech

### 3.9 Makromolekulární databáze

Makromolekulární databáze jsou dostupným online zdrojem informací o strukturách makromolekul, zároveň i o krystalizačních podmínkách. Jedna z nejvíce používaných je The Protein Data Bank - RCSB PDB. Všechny uložené struktury a data jsou volně a zdarma dostupné pro všechny uživatele. Údaje může vkládat kdokoliv, a proto není zajištěna bezchybnost uvedených záznamů. V roce 2003 byla založena organizace Worldwide Protein Data Bank (wwPDB), která zajišťuje chod celé online databáze, její anotaci a sleduje její vývoj<sup>58</sup>. Data se každý týden aktualizují a k datu 1. 12. 2020 obsahovala databáze 171 916 struktur biologických makromolekul<sup>59</sup>.

## 4 Materiál a Metody

Cílem bakalářské práce bylo najít vhodné krystalizační podmínky pro bakteriofágový lysin Ap22, a získat protein v dostatečné kvalitě pro následnou rentgenovou difrakční analýzu.

Práce dále zahrnuje krystalizaci modelového proteinu lysozymu, u kterého jsou krystalizační podmínky dobře známé. Základním cílem práce s lysozymem bylo osvojit si jak základní, tak i pokročilé krystalizační metody. Metody byly nadále využity pro zjištění podmínek zkoumaného proteinu. Protein bakteriofágového lysinu byl posléze podroben testům na proteinový původ. Veškeré výsledky byly zdokumentovány pro pozdější vyhodnocení.

Všechny tabulky uvedené v této kapitole byly vytvořeny pomocí programu MS Excel.

### 4.1 Krystalizace lysozymu

Pro tuto část práce byly poskytnuty srážecí roztoky chloridu sodného a roztoky lysozymu. Z krystalizačních metod byly využity metody na základě difúze par, konkrétně metoda visící a sedící kapky a mikrokrystalizace pod olejem. Z pokročilých metod byla využita difúze v kapiláře.

Srážecí roztoky chloridu sodného byla v pěti různých koncentracích: 6%, 8%, 10%, 12%, 14% (v hmotnostních procentech). Tyto roztoky byly připraveny rozpuštěním chloridu sodného v 0,1 M roztoku octanu sodného o hodnotě pH 4,7 a následným přidáním vhodného množství destilované vody.

Roztoky lysozymu byly použity v šesti různých koncentracích: 20 mg·ml<sup>-1</sup>, 25 mg·ml<sup>-1</sup>, 40 mg·ml<sup>-1</sup>, 60 mg·ml<sup>-1</sup>, 80 mg·ml<sup>-1</sup>, 100 mg·ml<sup>-1</sup>. Tyto roztoky se připravují naředěním koncentrovaného roztoku lysozymu (100 mg·ml<sup>-1</sup>) octanovým pufrům o pH 4,7.

#### 4.1.1 Vlastní krystalizace lysozymu

Pro provedení experimentu byly použity následující chemikálie a pomůcky: připravené srážecí roztoky chloridu sodného, připravené roztoky lysozymu, krystalizační destičky pro metodu sedící kapky, visící kapky a mikrokrystalizaci pod olejem, skleněné kapiláry a vosk na jejich uzavření, automatické pipety, krystalizační izolepa pro metodu sedící kapky, krycí sklička pro metodu visící kapky.

#### Metoda sedící kapky

Krystalizační destička „Cryscem Plate“ (Hampton Research, USA) pro metodu sedící kapky obsahuje 24 jamek s rezervoárem, kde v každém z nich je vyvýšenina pro kapku. Do

každého rezervoáru bylo napipetováno 100  $\mu\text{l}$  srážecího roztoku NaCl automatickou pipetou. Do každé jamky pak byly napipetovány 2  $\mu\text{l}$  srážecího roztoku z rezervoáru a 2  $\mu\text{l}$  lysozymu. Pro tuto metodu byly vybrány čtyři různé koncentrace srážecího roztoku NaCl: 6%, 8%, 10%, 14%, a šest koncentrací lysozymu 20  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , 25  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , 40  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , 60  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , 80  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , 100  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ . V Tab. III je znázorněno schéma krystalizační destičky provedené metodou sedící kapky. Po naplnění všech jamek byla krystalizační destička zaizolována krystalizační izolepou a víčkem, poté ponechána v laboratoři při 20°C.

Tabulka III: Schéma metody sedící i visící kapky pro lysozym.

kapka - 2 $\mu\text{l}$ roztoku NaCl + 2 $\mu\text{l}$ proteinového roztoku lysozymu					
A1	A2	A3	A4	A5	A6
6% NaCl + 100 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ lysozym	6% NaCl + 60 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ lysozym	6% NaCl + 40 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ lysozym	6% NaCl + 25 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ lysozym	6% NaCl + 80 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ lysozym	6% NaCl + 20 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ lysozym
B1	B2	B3	B4	B5	B6
10% NaCl + 100 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ lysozym	10% NaCl + 60 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ lysozym	10% NaCl + 40 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ lysozym	10% NaCl + 25 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ lysozym	10% NaCl + 80 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ lysozym	10% NaCl + 20 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ lysozym
C1	C2	C3	C4	C5	C6
14% NaCl + 100 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ lysozym	14% NaCl + 60 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ lysozym	14% NaCl + 40 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ lysozym	14% NaCl + 25 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ lysozym	14% NaCl + 80 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ lysozym	14% NaCl + 20 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ lysozym
D1	D2	D3	D4	D5	D6
8% NaCl + 100 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ lysozym	8% NaCl + 60 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ lysozym	8% NaCl + 40 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ lysozym	8% NaCl + 25 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ lysozym	8% NaCl + 80 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ lysozym	8% NaCl + 20 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ lysozymu

### Metoda visící kapky

Krystalizační destička „VDX Plate with sealant“ (Hampton Research, USA) pro metodu sedící kapky obsahuje 24 jamek a stejný počet krycích sklíček, na které je nanášena kapka vzorku společně se srážecím roztokem. Sklíčko s kapkou se pak překlápí nad rezervoár a je připevněno silikonovým tukem. V tomto experimentu byly vybrány čtyři srážecí roztoky NaCl: 6%, 8%, 10%, 14%, a šest koncentrací lysozymu 20  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , 25  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , 40  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , 60  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , 80  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , 100  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Rezervoár byl naplněn 200  $\mu\text{l}$  srážecího roztoku NaCl automatickou pipetou, kapka byla tvořena 2  $\mu\text{l}$  srážecího roztoku z rezervoáru a 2  $\mu\text{l}$  lysozymu. Schéma rozkapání je identické s metodou sedící kapky – viz Tab. III. Po dokončení experimentu byla destička zakryta víčkem a ponechána v laboratoři při 20°C.

## Mikrokrystalizace pod olejem

Pro mikrokrystalizaci pod olejem byla použita destička „Douglas Vapor Batch Plate“ (Douglas Instruments, Velká Británie) s 96 jamkami. Před nanesením vzorku byla celá destička zalita silikonovým olejem (silicon oil MD2–04). Naplněny byly pouze jamky v prvních třech sloupcích. Pod vrstvu silikonového oleje byly nanášeny dvě různé koncentrace srážecího roztoku NaCl: 12% a 14%, a tři koncentrace roztoku lysozymu: 25 mg·ml<sup>-1</sup>, 60 mg·ml<sup>-1</sup>, 100 mg·ml<sup>-1</sup>. kapku tvořily 2 μl, 3 μl, 4 μl nebo 5 μl srážecího roztoku NaCl a 2 μl, 3 μl, 4 μl nebo 5 μl roztoku lysozymu. Všechny objemy byly dávkované automatickými pipetami. Schéma vybrané části krystalizační destičky je znázorněno v Tab. IV. Po dokončení experimentu byla destička zakryta víčkem, a ponechána v laboratoři při 20°C.

Tabulka IV: Schéma mikrokrystalizace pod olejem pro lysozym.

základ: silicon oil MD2 - 04					
A1	A2	A3	E1	E2	E3
2 μl 14% NaCl + 2 μl 100 mg·ml <sup>-1</sup> lysozym	5 μl 12% NaCl + 5 μl 60 mg·ml <sup>-1</sup> lysozym	2 μl 14% NaCl + 2 μl 25 mg·ml <sup>-1</sup> lysozym	2 μl 12% NaCl + 3 μl 60 mg·ml <sup>-1</sup> lysozym	2 μl 12% NaCl + 2 μl 25 mg·ml <sup>-1</sup> lysozym	2 μl 14% NaCl + 3 μl 25 mg·ml <sup>-1</sup> lysozym
B1	B2	B3	F1	F2	F3
3 μl 14% NaCl + 3 μl 100 mg·ml <sup>-1</sup> lysozym	4 μl 12% NaCl + 4 μl 60 mg·ml <sup>-1</sup> lysozym	3 μl 14% NaCl + 3 μl 25 mg·ml <sup>-1</sup> lysozym	3 μl 12% NaCl + 4 μl 60 mg·ml <sup>-1</sup> lysozym	3 μl 12% NaCl + 3 μl 25 mg·ml <sup>-1</sup> lysozym	3 μl 14% NaCl + 4 μl 25 mg·ml <sup>-1</sup> lysozym
C1	C2	C3	G1	G2	G3
4 μl 14% NaCl + 4 μl 100 mg·ml <sup>-1</sup> lysozym	3 μl 12% NaCl + 3 μl 60 mg·ml <sup>-1</sup> lysozym	4 μl 14% NaCl + 4 μl 25 mg·ml <sup>-1</sup> lysozym	4 μl 12% NaCl + 5 μl 60 mg·ml <sup>-1</sup> lysozym	4 μl 12% NaCl + 4 μl 25 mg·ml <sup>-1</sup> lysozym	4 μl 14% NaCl + 5 μl 25 mg·ml <sup>-1</sup> lysozym
D1	D2	D3	H1	H2	H3
5 μl 14% NaCl + 5 μl 100 mg·ml <sup>-1</sup> lysozym	2 μl 12% NaCl + 2 μl 60 mg·ml <sup>-1</sup> lysozym	5 μl 14% NaCl + 5 μl 25 mg·ml <sup>-1</sup> lysozym	5 μl 12% NaCl + 4 μl 60 mg·ml <sup>-1</sup> lysozym	5 μl 12% NaCl + 5 μl 25 mg·ml <sup>-1</sup> lysozym	5 μl 14% NaCl + 4 μl 25 mg·ml <sup>-1</sup> lysozym

## Volná difúze v kapilárách

Jediná pokročilá metoda, která byla využita pro krystalizaci lysozymu. V našem případě byly využity čtyři kapiláry o třech různých průměrech: 0,2 mm, 0,3 mm (použita 2x), 0,8 mm. Pro tuto metodu byly vybrány dvě různé koncentrace srážecího roztoku NaCl: 8% a 12%, a dvě různé koncentrace lysozymu: 40 mg·ml<sup>-1</sup> a 100 mg·ml<sup>-1</sup>. Užší konec kapiláry byl pomocí samovolného vztlínání naplněn vzorkem lysozymu a poté zataven voskem. Širší část

kapiláry byla zaplněna 30  $\mu\text{l}$  srážecího roztoku NaCl a také utěsněna voskem. Kombinace různých koncentrací vzorku a srážecího roztoku jsou uvedeny v Tab. V. Kapiláry poté byly ponechány v laboratoři při 20°C.

Tabulka V: Metoda volné difúze v kapilárách pro lysozym.

průměr kapiláry [mm]			
0,2	0,3	0,3	0,8
30 $\mu\text{l}$ 12% NaCl + 100 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ lysozym	30 $\mu\text{l}$ 12% NaCl + 100 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ lysozym	30 $\mu\text{l}$ 8% NaCl + 40 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ lysozym	30 $\mu\text{l}$ 12% NaCl + 100 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ lysozym

## 4.2 Krystalizace lysAp22

### 4.2.1 Získání lysAp22

LysAp22 použitý pro experimenty této bakalářské práce byl připraven v laboratoři N. F. Gamaleya Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation (Moskva, Rusko) ve spolupráci s Lomonosov Moscow State University (Moskva, Rusko) a Center for Strategic Planning of the Ministry of Health of the Russian Federation (Moskva, Rusko).

Kódující sekvence pro vybraný lysin byla rozmnožena pomocí PCR z inaktivovaných fágových lyzátů, poskytnuté Dr. Eugenie O. Rubalski, následně pak klonován do expresního vektoru pET42b (+) (kontrola rezistence na kanamycin) a byly zkontrolovány na chyby pomocí Sangerova sekvenování. Protein obsahoval C-terminální 8-His značku pro afinitní čištění. Expresní vektory byly zavedeny do kompetentních buněk *E. coli*, kmen BL21 (DE3) pLysS (kontrola rezistence na chloramfenikol) pomocí protokolu transformace tepelným šokem.

Buňky *E. coli* byly pěstovány v LB médiu při 37°C a 240 otáčkách za minutu na OD<sub>600</sub> hodnotu 0,55 – 0,65 a poté indukovány  $\beta$ -D-1 thiogalaktopyranosidem (1 mM IPTG) při 37°C po dobu tří hodin. Buňky byly sklizeny centrifugací (6000x g po dobu 10 minut při 4°C) a resuspendovány v lyzačním pufu o složení 20 mM Tris HCl, 250 mM NaCl a 0,1 mM EDTA o hodnotě pH 8,0. následně inkubovány s lysozymem o koncentraci 100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  při pokojové teplotě po dobu 30 minut a následně přerušeno ultrazvukem. Buněčné zbytky byly odstraněny centrifugací při 10 000x g po dobu 30 minut při 4°C a supernatan byl přefiltrován přes 0,2  $\mu\text{m}$  filtr.

Protein byl pročištěn na systému NGC Discovery<sup>TM</sup> 10 FPLC (Bio-Rad Hercules, CA, USA) s 5 ml HisTrap FF kolonou (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) s předem nabitými Ni<sup>2+</sup>

ionty. Filtrovaný lyzát byl smíchán s 30 mM imidazolem a 1 mM MgCl<sub>2</sub> a nanesen na kolonu, která byla předem stabilizována pufrem o složení (20 mM Tris HCl, 250 mM NaCl a 30 mM imidazol o hodnotě pH 8,0. Frakce poté byly vymývány za použití lineárního gradientu do 100 % elučního pufru o složení 20 mM Tris HCl, 250 mM NaCl a 500 mM imidazol o hodnotě pH 8,0. Shromážděné proteinové frakce byly dialyzovány proti 20 mM Tris HCl o pH 7,5. Čistota proteinu byla stanovena pomocí 16% SDS-PAGE elektroforézy. Koncentrace proteinu byla změřena pomocí spektrofotometru (Implen NanoPhotometer, IMPLEN, Mnichov, Německo) při 280 nm a vypočítána pomocí molárního extinkčního koeficientu  $E^{0,1\%}_{280\text{nm}}$ .

Zdrojem enzymu lysAp22 byl acinetobacter fág Ap22 a fágovým hostitelem bylo *Acinetobacter baumannii* 1053.

#### 4.2.2 Vzorek lysAp22

Vzorek lysAp22 byl dodán v lyofilizované formě. Vzorek byl následně rozpuštěn v 50 mM Tris o pH 7,5 na koncentraci 3,5 mg·ml<sup>-1</sup> a následně ověřena pomocí NanoPhotometru a přesná koncentrace byla 3,588 mg·ml<sup>-1</sup>.

#### 4.2.3 Srážecí roztoky

Pro krystalizaci byly zvoleny tři sady komerčně dostupných srážecích roztoků:

- PGA Screen – sada 96 srážecích roztoků vyráběna společností Molecular Dimension (USA). Sada založená na polymeru kyseliny poly- $\gamma$ -glutamové (PGA).
- MORPHEUS<sup>®</sup> II HT-96 – sada 96 srážecích roztoků vyráběna společností Molecular Dimension (USA), zahrnuje řadu nízkomolekulárních ligandů.
- PEG/Ion HT<sup>™</sup> – sada 96 srážecích roztoků vyráběna společností Hampton Research (USA). V první polovině sady je 48 solí, které pokrývají kompletní řadu aniontů a kationtů, důležité proměnné jako iontový typ, iontová síla, PEG (3,350) a pH (4,5 – 9,2). Druhá polovina sady obsahuje organické kyseliny v rozmezí pH 3,7 – 8,8 také v přítomnosti PEGu 3,350.

Seznamy všech tří srážecích sad a jejich roztoků jsou uvedeny v kapitole Přílohy.

#### 4.2.4 Vlastní krystalizace lysAp22

Pro provedení experimentu byl použit roztok lysAp22 o koncentraci 3,588 mg·ml<sup>-1</sup>, tři sady srážecích roztoků uvedených výše, tři krystalizační destičky stejného typu „Swissci“ (MRC 2-Drop Plate) o 96 jamkách (Hampton Research, USA). Pro optimalizaci podmínek pak byla použita krystalizační destička o 24 jamkách CombiClover (Molecular Dimension USA). Dále byly využity automatické pipety, krystalizační izolepa a pro automatické rozkápávání byl použit robot Douglas Instrument OryxNano (Douglas Instruments, Velká Británie).



### Pre-krystalizační test

Jelikož nebylo jisté, jestli daná koncentrace lysAp22 nebude tvořit precipitáty, nebo naopak není málo koncentrovaný, byl proveden pre-krystalizační test PCT sadou dodávanou Hampton Research (USA). Test dopadl tak, že se daná koncentrace ukázala být v pořádku a vzorek již nemusel být nadále ředěn.

Složení všech čtyř činidel PCT sady jsou uvedeny v kapitole Přílohy.

### Metoda sedící kapky, 96 jamek

Pro všechny tři krystalizační sady byl proveden stejný postup. Destička s 96 byla ručně pomocí automatické pipety naplněna srážecími roztoky tak, že jamka A1 byla naplněna roztokem označeným číslem 1 v seznamu, jamka A2 srážecím roztokem číslo 2, jamka A3 pak srážecím roztokem číslo 3 atd. Roztoky šly vzestupně zleva doprava a odshora dolů, s tím že v poslední jamce H12 se nacházel srážecí roztok s číslem 96 v seznamu. U každého rezervoáru se nacházejí 2 jamky, na jedné krystalizační destičce lze tedy otestovat až 192 různých podmínek.

Rezervoáry byly naplněny 50  $\mu\text{l}$  srážecích roztoků, což bylo nastaveno i na robotovi. Do horní jamky pak byl vždy napipetován 1  $\mu\text{l}$  příslušného srážecího roztoku z rezervoáru plus 1  $\mu\text{l}$  vzorku lysAp22, do dolní jamky byl napipetováno 0,5  $\mu\text{l}$  příslušného srážecího roztoku z rezervoáru plus 1  $\mu\text{l}$  vzorku lysAp22. Pro přehlednost je v Tab. VI uvedeno schéma první krystalizační jamky s použitím prvního krystalizačního činidla, tytéž poměry se opakovaly u všech následujících jamek i všech třech destiček. Po dokončení rozkapání na robotovi, které probíhalo při 20°C byly všechny destičky zaizolovány krystalizační izolepou a ponechány v lednici při 4°C.

Tabulka VI: Schéma krystalizační jamky při krystalizaci lysAp22, metodou sedící kapky.

		1
A	50 $\mu\text{l}$ srážecí $\odot$ 1	1 $\mu\text{l}$ sráž. $\odot$ 1 + 1 $\mu\text{l}$ Ap22
		0,5 $\mu\text{l}$ sráž. $\odot$ 1 + 1 $\mu\text{l}$ Ap22

Přibližně po čtyřech týdnech, co byly destičky pravidelně kontrolovány, se začaly objevovat první krystaly, které byly následně vyfoceny a změřeny. Z těchto podmínek byly vybrány celkem tři podmínky z krystalizační sady roztoků PEG/Ion HT<sup>TM</sup>, ve kterých lysAp22 nejlépe krystalizoval. Upraven byl především poměr koncentrací srážecí roztok:lysAp22, taktéž provedeny metodou sedící kapky, v krystalizační destičce obsahující 24 jamek.

## Metoda sedící kapky, 24 jamek – optimalizace podmínek

Ze sady PEG/Ion byly vybrány tři následující podmínky:

- Do prvního řádku byla napipetována podmínka z jamky C4 v celkovém pořadí 28. Srážecí roztok č. 28 má následující složení: 0,2 M hydrát octanu vápenatého, 20% w/v PEG 3,350, pH 7,5.
- Do druhého řádku byla napipetována podmínka z jamky G10 v celkovém 82 (34 box II). Srážecí roztok č. 82 má následující složení: 2% v/v Tascimate™ pH 7,0; 0,1 M HEPES pH 7,5; 20% w/v PEG 3,350.
- Do třetího řádku byla napipetována podmínka z jamky A7 v celkovém pořadí 7. Srážecí roztok č. 7 má následující složení: 0,2 M dihydrát chloridu vápenatého, 20% w/v PEG 3,350, pH 5,1.

Poslední řádek zůstal prázdný. V tomto experimentu byla použita destička „CombiClover“ (Molecular Dimension, USA), která obsahuje 24 rezervoárů. Rezervoáry byly naplněny v šesti různých poměrech: 50  $\mu$ l, 100  $\mu$ l, 150  $\mu$ l, 200  $\mu$ l, 250  $\mu$ l a 300  $\mu$ l, vzestupně zleva doprava. Kolem každého rezervoáru se nacházejí čtyři jamky pro metodu sedící kapky, roztok srážecího proteinu z rezervoáru:lysAp22 byly pipetovány ručně automatickými pipetami ve čtyřech různých poměrech (1:1, 1:2, 1:3, 2:3), kdy jeden díl znamená 1  $\mu$ l srážecího roztoku nebo vzorku lysAp22. Popsaná krystalizační destička je schematicky znázorněna v Tab. VII a Tab. VIII.

Tabulka VII: Schéma krystalizační destičky pro optimalizaci podmínek lysAp22, metodou sedící kapky (1/2).

	1	2	3	4	5	6
	PEG/Ion roztok č. 28					
A	1:1	1:2	1:1	1:2	1:1	1:2
	50 $\mu$ l		100 $\mu$ l		150 $\mu$ l	
B	1:3	2:3	1:3	2:3	1:3	2:3
	PEG/Ion roztok č. 82					
C	1:1	1:2	1:1	1:2	1:1	1:2
	50 $\mu$ l		100 $\mu$ l		150 $\mu$ l	
D	1:3	2:3	1:3	2:3	1:3	2:3
	PEG/Ion roztok č. 7					
E	1:1	1:2	1:1	1:2	1:1	1:2
	50 $\mu$ l		100 $\mu$ l		150 $\mu$ l	
F	1:3	2:3	1:3	2:3	1:3	2:3

Tabulka VIII: Schéma krystalizační destičky pro optimalizaci podmínek lysAp22, metodou sedící kapky (2/2).

	7	8	9	10	11	12
PEG/Ion roztok č. 28						
A	1:1	1:2	1:1	1:2	1:1	1:2
	200 $\mu$ l		250 $\mu$ l		300 $\mu$ l	
B	1:3	2:3	1:3	2:3	1:3	2:3
PEG/Ion roztok č. 82						
C	1:1	1:2	1:1	1:2	1:1	1:2
	200 $\mu$ l		250 $\mu$ l		300 $\mu$ l	
D	1:3	2:3	1:3	2:3	1:3	2:3
PEG/Ion roztok č. 7						
E	1:1	1:2	1:1	1:2	1:1	1:2
	200 $\mu$ l		250 $\mu$ l		300 $\mu$ l	
F	1:3	2:3	1:3	2:3	1:3	2:3

Po dokončení experimentu, která probíhal při 20°C byly destičky zaizolovány krystalizační izolepou a ponechány v ledničce při 4°C. Poté byly průběžně kontrolovány.

#### 4.2.5 Testy krystalů

S destičky s optimalizovanými podmínkami byla vybrána pouze jedna jamka na provedení testů, z důvodu malého počtu úspěšných krystalizací. Obarveny byly mikrokristaly v jamce E12 pomocí komerčně dostupného barviva Izit Crystal Dye HR4-710 poskytované firmou Hampton Research (USA). K mikrokristalům byl přidán automatickou pipetou 0,5  $\mu$ l barviva, pokud došlo k jejich zbarvení, dokazuje to jejich proteinový původ a že se nejedná o krystaly soli.

#### 4.2.6 Získání difrakčních dat

Vypěstované krystaly lysAp22 byly otestovány pomocí rentgenové difrakční analýzy na synchrotronu BESSY – II provozovaném The Joint Berlin MX-Laboratory (Berlin-Adlershof, Německo). Z důvodu, že testování na synchrotronu může provádět pouze proškolený pracovník, jsem se měření nemohla osobně zúčastnit.

## 5 Výsledky

Tato kapitola praktické části bakalářské práce obsahuje výsledky krystalizačních experimentů a to jak lysozymu, tak i lysAp22. Taktéž zahrnuje výsledky testování krystalů a výsledek rentgenové difrakční analýzy lysAp22.

### 5.1 Výsledky vlastní krystalizace lysozymu

Výsledky krystalizace lysozymu všech metod byly zaznamenány dva týdny po provedení experimentů. Destičky byly sledovány pomocí mikroskopu SZX9 při zvětšení 450x. Tabulky byly vytvořeny pomocí programu MS Excel.

#### 5.1.1 Výsledky metody sedící kapky

Krystalizace lysozymu metodou sedící kapky byla ve většině případů úspěšná. Výjimkou byly jamky C1 a C5, kde vznikla sraženina, důvodem může být jak vysoká koncentrace srážecího činidla, tak i lysozymu, což tedy indikuje vysoké přesycení. Roli v tom může hrát i lidský faktor, ať už při pipetování nebo následný způsob manipulace. V jamce A6 zůstala kapka čirá, důvodem může být pravý opak, než byl v předchozích jamkách, tj. nízká koncentrace srážecího roztoku i lysozymu. Velikost krystalů nebo jejich počet závisel na použité koncentraci lysozymu. Největší krystaly, v menším počtu vznikaly v jamkách, které obsahovaly nižší koncentraci lysozymu ( $20 - 40 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), s rostoucí koncentrací lysozymu se velikost krystalů zmenšovala, ale jejich počet rostl.

Výsledky jsou znázorněny v Tab. IX, kde jamky s velkými krystaly v malém počtu jsou označeny červenou barvou, modrá barva pak značí malé krystaly ve velkém množství, zelená barva značí přítomnost sraženiny a bílá barva značí čirou kapku.

Tabulka IX: Výsledky krystalizace metodou sedící kapky pro lysozym.

kapka - 2 $\mu$ l roztoku NaCl + 2 $\mu$ l roztoku lysozymu					
A1	A2	A3	A4	A5	A6
6% NaCl + 100 mg·ml <sup>-1</sup> lysozym	6% NaCl + 60 mg·ml <sup>-1</sup> lysozym	6% NaCl + 40 mg·ml <sup>-1</sup> lysozym	6% NaCl + 25 mg·ml <sup>-1</sup> lysozym	6% NaCl + 80 mg·ml <sup>-1</sup> lysozym	6% NaCl + 20 mg·ml <sup>-1</sup> lysozym
B1	B2	B3	B4	B5	B6
10% NaCl + 100 mg·ml <sup>-1</sup> lysozym	10% NaCl + 60 mg·ml <sup>-1</sup> lysozym	10% NaCl + 40 mg·ml <sup>-1</sup> lysozym	10% NaCl + 25 mg·ml <sup>-1</sup> lysozym	10% NaCl + 80 mg·ml <sup>-1</sup> lysozym	10% NaCl + 20 mg·ml <sup>-1</sup> lysozym
C1	C2	C3	C4	C5	C6
14% NaCl + 100 mg·ml <sup>-1</sup> lysozym	14% NaCl + 60 mg·ml <sup>-1</sup> lysozym	14% NaCl + 40 mg·ml <sup>-1</sup> lysozym	14% NaCl + 25 mg·ml <sup>-1</sup> lysozym	14% NaCl + 80 mg·ml <sup>-1</sup> lysozym	14% NaCl + 20 mg·ml <sup>-1</sup> lysozym
D1	D2	D3	D4	D5	D6
8% NaCl + 100 mg·ml <sup>-1</sup> lysozym	8% NaCl + 60 mg·ml <sup>-1</sup> lysozym	8% NaCl + 40 mg·ml <sup>-1</sup> lysozym	8% NaCl + 25 mg·ml <sup>-1</sup> lysozym	8% NaCl + 80 mg·ml <sup>-1</sup> lysozym	8% NaCl + 20 mg·ml <sup>-1</sup> lysozym

### 5.1.2 Výsledky metody visící kapky

Krystalizace lysozymu metodou visící kapky přinesla podobné výsledky jako metoda sedící kapka až na pár výjimek. V jamkách B5, C1, C2 a C5, kde došlo ke vzniku sraženiny, jejímž důvodem je vysoké přesycení roztoku. V jamce A6 zůstala kapka čirá stejně jako u předchozí metody, důvod bude pravděpodobně stejný. Tendence velikosti krystalů a jejich počtu v závislosti na koncentraci lysozymu byly velmi podobné, jako v předchozí metodě.

Výsledky jsou znázorněny v Tab. X, kde jamky s velkými krystaly v malém počtu značí červená barva, modrá barva značí malé krystaly ve větším množství, zelená barva značí sraženinu a bílá barva značí, že kapka zůstala čirá.

Tabulka X: Výsledky krystalizace metodou visící kapky pro lysozym.

kapka - 2 $\mu\text{l}$ roztoku NaCl + 2 $\mu\text{l}$ roztoku lysozymu					
A1	A2	A3	A4	A5	A6
6% NaCl + 100 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ lysozym	6% NaCl + 60 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ lysozym	6% NaCl + 40 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ lysozym	6% NaCl + 25 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ lysozym	6% NaCl + 80 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ lysozym	6% NaCl + 20 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ lysozym
B1	B2	B3	B4	B5	B6
10% NaCl + 100 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ lysozym	10% NaCl + 60 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ lysozym	10% NaCl + 40 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ lysozym	10% NaCl + 25 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ lysozym	10% NaCl + 80 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ lysozym	10% NaCl + 20 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ lysozym
C1	C2	C3	C4	C5	C6
14% NaCl + 100 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ lysozym	14% NaCl + 60 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ lysozym	14% NaCl + 40 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ lysozym	14% NaCl + 25 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ lysozym	14% NaCl + 80 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ lysozym	14% NaCl + 20 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ lysozym
D1	D2	D3	D4	D5	D6
8% NaCl + 100 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ lysozym	8% NaCl + 60 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ lysozym	8% NaCl + 40 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ lysozym	8% NaCl + 25 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ lysozym	8% NaCl + 80 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ lysozym	8% NaCl + 20 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ lysozym

### 5.1.3 Výsledky metody mikrokystalizace pod olejem

Při mikrokystalizaci pod olejem nezůstala žádná kapka čirá. Sraženina se objevila ve třech jamkách A2, D1 u kterých je to pravděpodobně způsobené vysokou koncentrací srážecího roztoku i lysozymu a v jamce G1 u které je větší množství lysozymu než srážecího činidla, zároveň má vzorek jednu z vyšších koncentrací a u všech jamek tedy došlo k vysokému přesycení.

Výsledky experimentu jsou uvedeny v Tab. XI, kde červená barva značí výskyt velkých krystalů v malém počtu, modrá barva značí výskyt malých krystalů za to v hojném počtu a zelená barva značí sraženinu.

Tabulka XI: Výsledky mikrokrytalizace pod olejem pro lysozym.

základ: silicon oil MD2 - 04					
A1	A2	A3	E1	E2	E3
2 $\mu$ l 14% NaCl + 2 $\mu$ l 100 mg·ml <sup>-1</sup> lysozym	5 $\mu$ l 12% NaCl + 5 $\mu$ l 60 mg·ml <sup>-1</sup> lysozym	2 $\mu$ l 14% NaCl + 2 $\mu$ l 25 mg·ml <sup>-1</sup> lysozym	2 $\mu$ l 12% NaCl + 3 $\mu$ l 60 mg·ml <sup>-1</sup> lysozym	2 $\mu$ l 12% NaCl + 2 $\mu$ l 25 mg·ml <sup>-1</sup> lysozym	2 $\mu$ l 14% NaCl + 3 $\mu$ l 25 mg·ml <sup>-1</sup> lysozym
B1	B2	B3	F1	F2	F3
3 $\mu$ l 14% NaCl + 3 $\mu$ l 100 mg·ml <sup>-1</sup> lysozym	4 $\mu$ l 12% NaCl + 4 $\mu$ l 60 mg·ml <sup>-1</sup> lysozym	3 $\mu$ l 14% NaCl + 3 $\mu$ l 25 mg·ml <sup>-1</sup> lysozym	3 $\mu$ l 12% NaCl + 4 $\mu$ l 60 mg·ml <sup>-1</sup> lysozym	3 $\mu$ l 12% NaCl + 3 $\mu$ l 25 mg·ml <sup>-1</sup> lysozym	3 $\mu$ l 14% NaCl + 4 $\mu$ l 25 mg·ml <sup>-1</sup> lysozym
C1	C2	C3	G1	G2	G3
4 $\mu$ l 14% NaCl + 4 $\mu$ l 100 mg·ml <sup>-1</sup> lysozym	3 $\mu$ l 12% NaCl + 3 $\mu$ l 60 mg·ml <sup>-1</sup> lysozym	4 $\mu$ l 14% NaCl + 4 $\mu$ l 25 mg·ml <sup>-1</sup> lysozym	4 $\mu$ l 12% NaCl + 5 $\mu$ l 60 mg·ml <sup>-1</sup> lysozym	4 $\mu$ l 12% NaCl + 4 $\mu$ l 25 mg·ml <sup>-1</sup> lysozym	4 $\mu$ l 14% NaCl + 5 $\mu$ l 25 mg·ml <sup>-1</sup> lysozym
D1	D2	D3	H1	H2	H3
5 $\mu$ l 14% NaCl + 5 $\mu$ l 100 mg·ml <sup>-1</sup> lysozym	2 $\mu$ l 12% NaCl + 2 $\mu$ l 60 mg·ml <sup>-1</sup> lysozym	5 $\mu$ l 14% NaCl + 5 $\mu$ l 25 mg·ml <sup>-1</sup> lysozym	5 $\mu$ l 12% NaCl + 4 $\mu$ l 60 mg·ml <sup>-1</sup> lysozym	5 $\mu$ l 12% NaCl + 5 $\mu$ l 25 mg·ml <sup>-1</sup> lysozym	5 $\mu$ l 14% NaCl + 4 $\mu$ l 25 mg·ml <sup>-1</sup> lysozym

#### 5.1.4 Výsledky volné difúze v kapilárách

Metoda volné difúze probíhala ve čtyřech kapilárách o třech různých rozměrech. Krytalizace byla úspěšná ve všech čtyřech. Jaké krystaly vznikly v kapilárách, je znázorněno v Tab. XII, kde červená barva značí velké krystaly v malém počtu (což se stalo jen v jedné kapiláře), modrá barva pak značí menší krystaly ve velkém počtu.

Tabulka XII: Výsledky metody volné difúze v kapilárách pro lysozym.

průměr kapiláry [mm]			
0,2	0,3	0,3	0,8
30 $\mu$ l 12% NaCl + 100 mg/ml lysozym	30 $\mu$ l 12% NaCl + 100 mg/ml lysozym	30 $\mu$ l 8% NaCl + 40 mg/ml lysozym	30 $\mu$ l 12% NaCl + 100 mg/ml lysozym

## 5.2 Výsledky vlastní krytalizace lysAp22

V této části jsou uvedeny výsledky krytalizace lysAp22. Výsledky byly sledovány pomocí mikroskopu SZX9 při zvětšení 450x. Dále byly pořízeny fotografie vybraných krystalů, které byly pořízeny fotoaparátem Olympus, připevněný ke zmíněnému mikroskopu.

Při krytalizaci Ap22 byly použity tři destičky o 96 jamkách, se třemi sadami srážecích roztoků (PGA Screen, MORPHEUS® II HT-96 a PEG/Ion HT™), celkem bylo otestováno

tedy 288 podmínek. U každé rezervoáru se nacházely dvě jamky, kam byly dávkovány různé objemy, když započítáme i to, tvoří to celkově 576 podmínek. Ve většině jamek vznikla čirá kapka, v pár kapkách sraženina a ve velmi malém množství se podařilo získat krystaly. Tyto podmínky se pokusilo nadále optimalizovat. Výsledky jsou zaznamenány pomocí tabulek, které byly vytvořeny pomocí programu MS Excel.

### 5.2.1 Výsledky metody sedící kapky, 96 jamek

#### PGA Screen

Krystalizace za pomoci této sady byla nejméně úspěšná, z celkových 192 podmínek, u 187 případů zůstala kapka čirá, ve 3 kapkách se objevila sraženina a ve 2 případech obsahovala velmi malé mikrokrytaly ve velmi malém počtu. Mikrokrytaly by se však nadále mohly využít v očkovací metodě.

V Tab. XIII jsou zobrazeny výsledky, kde došlo ke změně. Žlutá barva a K2 označuje jamky, kde se objevily mikrokrytaly, velké písmeno P a zelená barva označuje sraženinu a velké písmeno X a bílá barva značí čirou kapku. Písmeno označující řádek na destičce s dolním indexem 1 např. A<sub>1</sub> značí horní jamku, kde byl poměr srážecí roztok:lysAp22 – 1 µl:1 µl. Písmeno s dolním indexem 2 např. A<sub>2</sub> značí dolní jamku, kde byl poměr srážecí roztok:lysAp22 – 0,5 µl:1 µl.

Tabulka XIII: Výsledky krystalizace lysAp22 se sadou PGA Screen, metodou sedící kapky.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A <sub>1</sub>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
A <sub>2</sub>	X	X	X	X	X	X	P	X	X	X	X	X
B <sub>1</sub>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
B <sub>2</sub>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
C <sub>1</sub>	X	X	P	X	X	X	X	X	X	X	X	X
C <sub>2</sub>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
D <sub>1</sub>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
D <sub>2</sub>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
E <sub>1</sub>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
E <sub>2</sub>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
F <sub>1</sub>	X	X	X	X	X	X	X	K3	X	X	X	X
F <sub>2</sub>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
G <sub>1</sub>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
G <sub>2</sub>	P	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
H <sub>1</sub>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
H <sub>2</sub>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	K3



## MORPHEUS® II HT-96

Krystalizace s touto sadou byla o něco málo úspěšnější, než v předchozí sadě. Nacházelo se zde více úspěšných kapek, ale ne na tolik úspěšné, aby krystaly byly vhodné pro rentgenovou difrakční analýzu. Z celkových 192 podmínek zůstala čirá kapka u 179 případů, v 5 jamkách se objevila sraženina a v 8 případech se objevily známky mikrokystalů, které stejně jako v předchozím případě, by se daly využít v očkovací technice.

V Tab. XIV jsou uvedeny výsledky s touto sadou. Velké K2 a žlutá barva značí jamky, kde se objevil náznak mikrokystalů, zelená barva a velké písmeno P pak označují sraženinu, čirou kapku označuje velké písmeno X a bílá barva. Dolní indexy u písmen označující řádky na destičce značí stejné poměry jako v předchozím případě.

Tabulka XIV: Výsledky krystalizace lysAp22 se sadou MORPHEUS® II HT-96, metodou sedící kapky.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A <sub>1</sub>	X	X	X	P	X	X	X	K3	K3	X	X	X
A <sub>2</sub>	X	X	X	X	X	X	K3	K3	X	X	X	X
B <sub>1</sub>	K3	X	K3	X	X	X	X	X	X	X	X	X
B <sub>2</sub>	X	X	K3	X	X	X	X	X	X	X	X	X
C <sub>1</sub>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
C <sub>2</sub>	X	X	X	X	X	X	K3	X	X	X	X	X
D <sub>1</sub>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
D <sub>2</sub>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
E <sub>1</sub>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
E <sub>2</sub>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	P	X	X
F <sub>1</sub>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
F <sub>2</sub>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
G <sub>1</sub>	X	X	X	P	X	X	X	X	X	X	X	X
G <sub>2</sub>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
H <sub>1</sub>	X	X	X	X	X	X	P	X	X	X	X	X
H <sub>2</sub>	X	X	X	X	X	X	P	X	X	X	X	X

## PEG/Ion HT™

V tomto případě byla sada neúspěšnější ze všech tří. Co se do počtu vzorků, kde by se objevily krystaly, nebylo moc, za to se podařilo získat první větší krystaly. Z celkových 192 podmínek kapka zůstala čirá u 185, ve 4 jamkách se objevila precipitace, v 1 jamce mikrokristaly a ve 2 jamkách se objevily krystaly.

Tab. XV ukazuje, v jakých podmínkách se podařilo získat krystaly. Červená barva a K1 značí krystaly, K2 a žlutá barva označují mikrokristaly, velké písmeno P a zelená barva

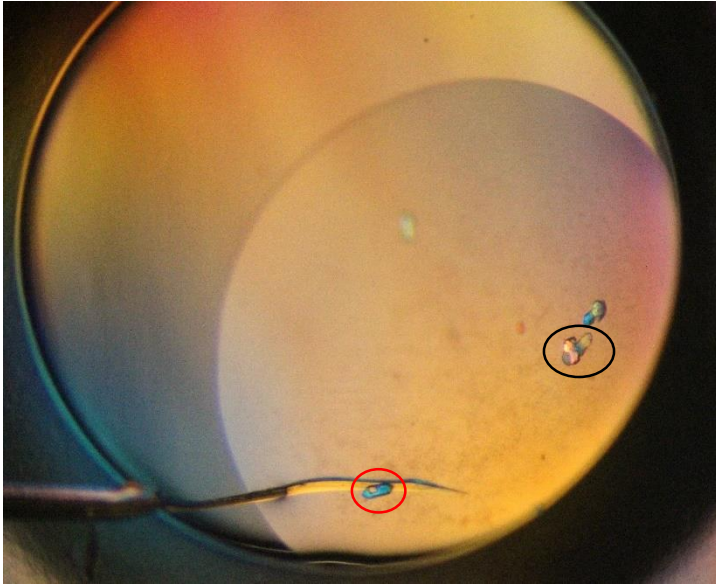
značí sraženinu a čírou kapku značí velké písmeno X a bílá barva. Dolní indexy u písmen označující řádky na destičce jsou stejné jako v předchozích případech.

Tabulka XV: Výsledky krystalizace lysAp22 se sadou PEG/Ion HT<sup>TM</sup>, metodou sedící kapky.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A <sub>1</sub>	X	X	X	X	X	X	K1	X	X	X	X	X
A <sub>2</sub>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
B <sub>1</sub>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
B <sub>2</sub>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	P	X
C <sub>1</sub>	X	X	X	K1	X	X	X	X	X	X	X	X
C <sub>2</sub>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
D <sub>1</sub>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
D <sub>2</sub>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
E <sub>1</sub>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
E <sub>2</sub>	P	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
F <sub>1</sub>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
F <sub>2</sub>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
G <sub>1</sub>	X	X	X	X	P	X	X	X	X	K3	X	X
G <sub>2</sub>	X	X	X	X	P	X	X	X	X	X	X	X
H <sub>1</sub>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
H <sub>2</sub>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

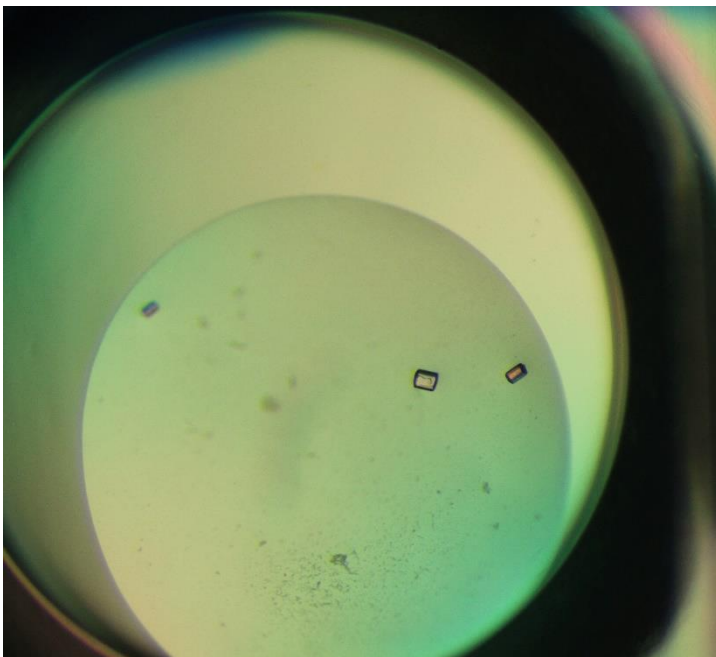
Krystaly v jamkách A<sub>17</sub> a C<sub>14</sub> byly vyfotografovány a následně změřeny. Mikrokrytaly v jamce G<sub>110</sub> byly také vyfoceny. Focení výsledků probíhalo čtyři týdny od provedení experimentu.

Na Obr. 9 se nacházejí krystaly z jamky A<sub>17</sub>. Následně byly změřeny rozměry dvou krystalů. Krystal označený na obrázku v černém kroužku měl rozměry 151 μm na 100 μm, krystal označený na obrázku v červeném kruhu měl rozměry 133 μm na 53 μm. Jedná se tedy o největší vypěstované krystaly.



Obrázek 9: Krystaly lysAp22 z A<sub>17</sub>, složení srážecího roztoku: 0,2 M dihydrát chloridu vápenatého, 20% w/v PEG 3,350, pH 5,1 (foto autorka).

Obr. 10 Ukazuje nejlépe uspořádané krystaly. Největší krystal byl změřen a jeho rozměry byly 70  $\mu\text{m}$  na 32  $\mu\text{m}$ .



Obrázek 10: Krystaly lysAp22 z C<sub>14</sub>, složení srážecího roztoku: 0,2 M hydrát octanu vápenatého, 20% w/v PEG 3,350, pH 7,5 (foto autorka).

Poslední úspěšná krystalizace je na Obr. 11, zde se nacházejí mikrokrystaly. Největší krystal z nich byl změřen na 26  $\mu\text{m}$  na 22  $\mu\text{m}$ .



Obrázek 11. Mikrokrystaly lysAp22 z G<sub>10</sub>, složení srážecího roztoku: 2% v/v Tascimate™ pH 7,0; 0,1 M HEPES pH 7,5; 20% w/v PEG 3,350 (foto autorka).

Celkově bylo otestováno 576 podmínek. V 551 případech zůstala kapka čirá (95,7 %), ve 12 případech se objevila sraženina (2 %), v 11 případech se nacházely mikrokrystaly (1,9 %), nejvhodnější krystaly pro rentgenovou difrakční analýzu poskytly jen 2 podmínky (0,4 %).

### 5.2.2 Výsledky metody sedící kapky, 24 jamek – optimalizace podmínek

Podmínky se podařilo zopakovat jen v malém množství případů, všechny tři podmínky byly podobně úspěšné. Ze 72 podmínek se krystal podařilo získat jen v jedné a to ještě s pravděpodobně se sraženinou. Ve dvou podmínkách byly získány mikrokrystaly, a ve dvou se objevila sraženina. Čirá kapka zůstala v 72 podmínkách. Vše je shrnuto v Tab. XVI, značení: K1 a červená barva – krystaly, K2 a žlutá barva – mikrokrystaly, P a zelená barva – sraženina, X a bílá barva – čirá kapka. Poměry srážecí roztok:lysAp22 vzhledem sestavení jamek okolo rezervoáru jsou následující: levá horní jamka 1:1, pravá horní jamka 1:2, levá dolní jamka 1:3 a pravá dolní jamka 2:3.

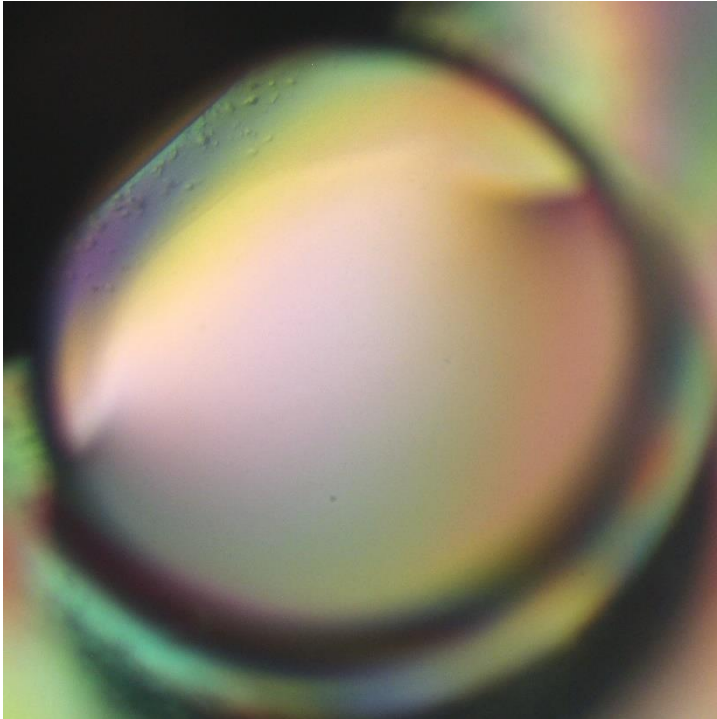
Tabulka XVI: Výsledky optimalizace podmínek pro lysAp22, metodou sedící kapky.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
PEG/Ion roztok č. 28												
A	X	X	X	K1	X	X	X	X	X	X	X	X
	50 µl		100 µl		150 µl		200 µl		250 µl		300 µl	
B	X	X	X	X	X	X	P	X	X	X	X	X
PEG/Ion roztok č. 82												
C	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	K3
	50 µl		100 µl		150 µl		200 µl		250 µl		300 µl	
D	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
PEG/Ion roztok č. 7												
E	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	K3
	50 µl		100 µl		150 µl		200 µl		250 µl		300 µl	
F	X	P	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

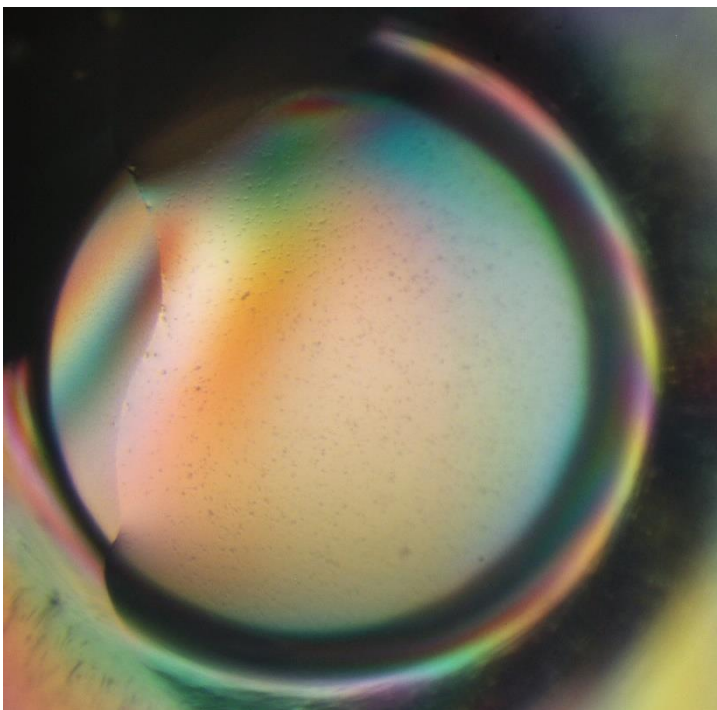
Krystal v jamce A4 – viz Obr. 12 – byl vyfotografován stejně jako mikrokrystaly v jamkách C12 – viz Obr. 13 – a E12 – viz Obr. 14. Focení výsledků probíhalo pět týdnů od provedení experimentu.



Obrázek 12: Krystal lysAp22 v jamce A4 společně se sraženinou a pravděpodobně i krystalem soli. Poměr srážecí roztok:lysAp22 – 1:2. Složení srážecího roztoku: 0,2 M hydrát octanu vápenatého, 20% w/v PEG 3,350, pH 7,5 (foto autorka).



Obrázek 13: Mikrokrystaly lysAp22 v jamce C12. Poměr srážecí roztok:lysAp22 – 1:2. Složení srážecího roztoku: : 2% v/v Tascimate™ pH 7,0; 0,1 M HEPES pH 7,5; 20% w/v PEG 3,350 (foto autorka).



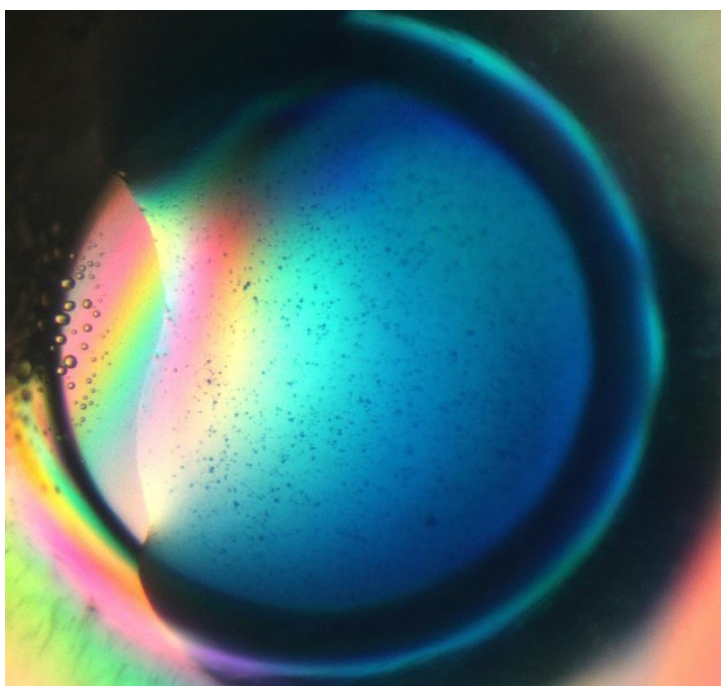
Obrázek 14: Mikrokrystaly lysAp22 v jamce E12. Poměr srážecí roztok:lysAp22 – 1:2. Složení srážecího roztoku: 0,2 M dihydrát chloridu vápenatého, 20% w/v PEG 3,350 (foto autorka).



Mikrokrystaly z jamky E12 a krystal z jamky A4 a podmínky, při kterých rostly, se budou nadále optimalizovat.

### 5.2.3 Výsledky krystalizačních testů

Z důvodu velmi malého množství vypěstovaných krystalů, které by se daly otestovat, byl vybrán jen jeden test a jedna jamka. Z destičky o 24 podmínkách byly vybrány mikrokrystaly z jamky E12, k nim bylo přidáno 0,5  $\mu$ l barviva Izit Crystal Dye HR4-710 (Hampton Research, USA). Po uplynutí jedné hodiny mikrokrystaly absorbovaly barvivo a tím byl prokázán jejich proteinový původ, jak jde vidět na Obr. 15.



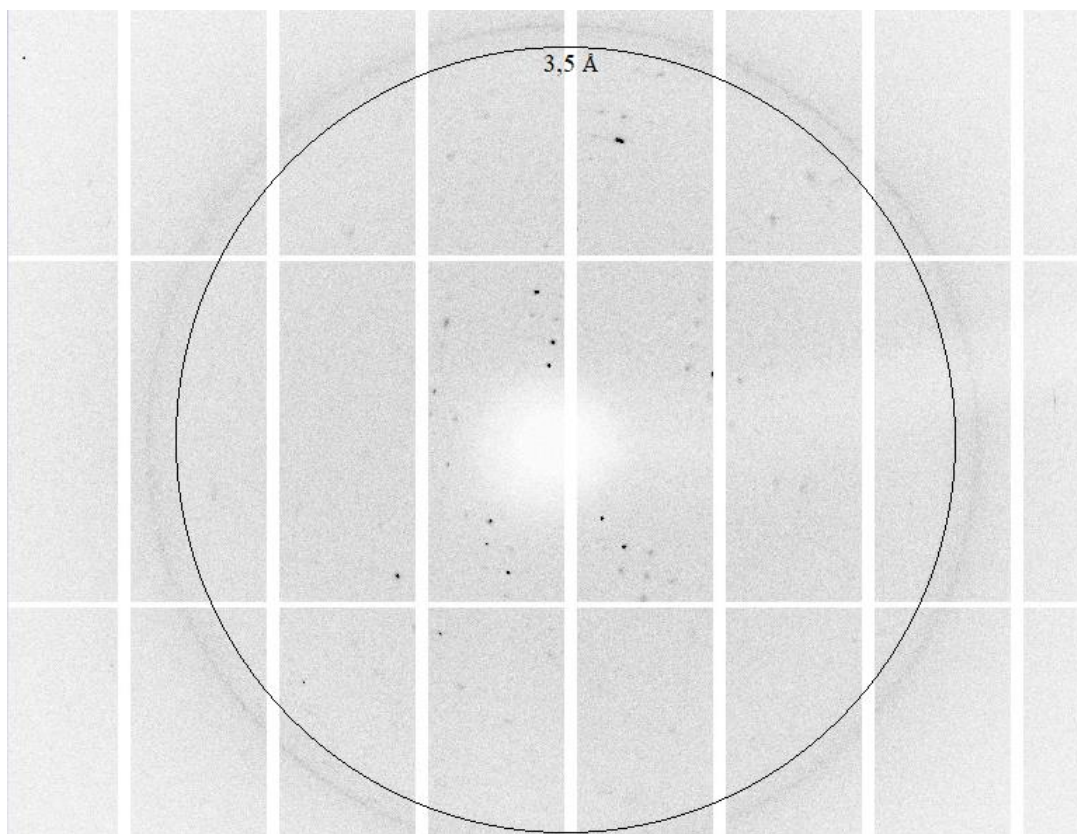
Obrázek 15: Krystaly lysAp22v jamce E12 (z optimalizovaných podmínek), po obarvení Izitem.

Větší krystaly z destičky o 96 jamkách a se sadou PEG/Ion byly ponechány na otestování pomocí rentgenové difrakční analýzy.

### 5.2.4 Difrakční záznam

Za pomoci rentgenové difrakční analýzy byly získány snímky zkoumaného lysAp22. pořízené snímky dosáhly rozlišení pouze 3,5 Å. Difrakce je anizotropní, difrakční snímky obsahují málo reflexe a jejich rozložení je nerovnoměrné – viz Obr. 16.

Tyto snímky nelze použít pro vyhodnocení struktury lysAp22, i z toho důvodu, že jich je malý počet, krystal se během měření rozpad. Je zapotřebí optimalizovat podmínky a získat krystaly v lepší kvalitě.



Obrázek 16: Difrakční snímek lysAp22.



## 6 Diskuze

Krystalizace proteinů je i v dnešní době proces, o kterém víme málo poznatků. Navzdory tomu, jak je proteinová krystalografie důležitá při určování struktury proteinů, neexistují žádné systematické metody, které by zaručily získání trojrozměrných krystalů. Tento problém však podnítil snahu vědeckých pracovníků ke zlepšování experimentů vedoucí k růstu krystalů<sup>43</sup>.

### 6.1 Lysozym

Modelový protein lysozym byl použit za účelem osvojení základních a pokročilých metod krystalizace. Při experimentech se potvrdilo obecné pravidlo při krystalizaci lysozymu, že čím menší koncentrace lysozymu, tím se získají větší krystaly o menším počtu a čím vyšší koncentrace, tím se získají menší krystaly v hojnějším počtu. Experimenty byly úspěšné ve všech metodách, v každé z nich se podařilo získat dostatečné množství krystalů, které by byly vhodné k další analýze. Hekmat<sup>60</sup> ve svém pokusu s lysozymem použil podobné koncentrace lysozymu (10 – 50 mg·ml<sup>-1</sup>, naředěny octanovým pufrům o pH 4) a podobné koncentrace NaCl (4 – 12 hm. % roztok, NaCl bylo rozpuštěno v 50mM roztoku octanového pufru o pH 4). Stejně jako v našem případě i Hekmat<sup>60</sup> pozoroval při použití vyšších koncentrací NaCl vytváření sraženiny. Na druhou stranu Hekmat<sup>60</sup> pozoroval v některých případech vytváření sraženiny i při použití nižších koncentrací NaCl, což v našem případě nebylo pozorováno.

The Biological Macromolecule Crystallization Database (BMCD) uvádí tři nejčastěji používané srážecí roztoky pro úspěšnou krystalizaci lysozymu: 1. 0,7 - 1,5 M chlorid sodný, 100 mM octan sodný, pH 4,0 - 4,8; 2. 10 % w / v chlorid sodný, 5 % v / v propanol; 3. 0,44 M dusičnan sodný, 100 mM octan sodný, pH 4,6<sup>61</sup>.

### 6.2 LysAp22

Masivní užívání antibiotik za posledních 50 let vedlo k nárůstu bakterií, které jsou tzv. multirezistentní, což znamená, že jsou rezistentní na všechny dosud známé druhy antibiotik. Tento jev je obzvláště alarmující u gramnegativních bakterií jako *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Acinetobacter baumannii*, které jsou zodpovědné za široké spektrum infekcí, které by se v budoucnu mohly stát nevléčitelnými. Vzestup těchto bakterií a nedostatek nových antibiotik vede k hledání a vývoji nových alternativních antibiotik<sup>62,63</sup>.

LysAp22 byl pro bakalářskou práci vybrán jako možný kandidát při hledání nových alternativních antibiotik. K pochopení buněčných procesů je nezbytné znát trojrozměrnou

strukturu makromolekul. Tomuto kroku předchází úspěšné získání kvalitního monokrystalu. Jelikož lysAp22 nebyl zatím charakterizován, byly pro tento experiment použity tři komerčně dostupné sady PGA Screen, MORPHEUS<sup>®</sup> II HT-96 a PEG/Ion HT<sup>™</sup>. Z celkového počtu 576 podmínek, se vybraly tři ze sady PEG/Ion HT<sup>™</sup>, konkrétně srážecí roztoky č. 7 (složení: 0,2 M dihydrát chloridu vápenatého, 20% w/v PEG 3,350, pH 5,1), č. 28 (složení: 0,2 M hydrát octanu vápenatého, 20% w/v PEG 3,350, pH 7,5) a č. 82 (složení: 2% v/v Tascimate<sup>™</sup> pH 7,0; 0,1 M HEPES pH 7,5; 20% w/v PEG 3,350), se kterými byly podmínky pro krystalizaci nadále optimalizovány. Optimalizace podmínek nebyla tak úspěšná, jak by se mohlo očekávat. Byl získán pouze jeden větší krystal zároveň se sraženinou v jedné kapce. Důvodem ne tak úspěšné optimalizace může být lidský faktor, jelikož optimalizace se prováděla ručně, zatím co původní rozkapání bylo prováděno robotem. Dále to může být i stářím vzorku, protože optimalizace proběhla více jak tři měsíce po rozpuštění vzorku. Získané krystaly z první destičky se sadou PEG/Ion HT<sup>™</sup> pak byly otestovány pomocí rentgenové difrakční analýzy. Výsledky difrakčního záznamu, který má rozlišení pouze 3,5 Å není dostatečné pro další určení struktury, což vypovídá o tom, že vypěstované krystaly nebyly dostatečně kvalitní. Během měření zároveň došlo k poškození krystalu (nebyl získán ani nutný počet snímků) tj. krystal nebyl dostatečně stabilní. Pro řešení struktury je zapotřebí získat difrakční záznam v rozlišení < 2,5 Å. Do budoucna je tedy zapotřebí již známé podmínky optimalizovat např. zkusit jiné krystalizační metody, jiné poměry v kapkách, jiné typy destiček. Popřípadě při získání mikrokrytalů je optimalizovat pomocí očkovacích technik.

K datu 1. 12. 2020 obsahovala PDB databáze 144 struktur pod názvem „endolysin“ a 2 struktury pod názvem „phage lysin“<sup>59</sup>.

Prvním proteinem ze skupiny fágových lysinů, u kterého byla vyřešena struktura je PlyC. McGowan a kolektiv<sup>64</sup> se zabývaly řešením struktury streptokokového fágu PlyC, ten ke dni 22. 6. 2012 patří k jednomu z neúčinnějších fágových lysinů. Jedná se o enzym, který se skládá ze dvou částí PlyCA a PlyCB. Za pomocí metody visící kapky (v poměru srážecího roztoku a roztoku proteinu 1:1) a srážecího roztoku o složení: 0,1 M HEPES, 12 % PEG 4000, 10 % isopropanol s hodnotou roztoku pH 7,4 a při teplotě 25°C se jim podařilo získat kvalitní krystaly a vyřešit tak strukturu PlyC za pomocí rentgenové difrakční analýzy<sup>64</sup>. V našem případě se podařilo získat mikrokrytal za pomocí srážecího roztoku č. 82 (34 boxu II) o podobném složení: 2% v/v Tascimate<sup>™</sup> pH 7,0; 0,1 M HEPES pH 7,5; 20% w/v PEG 3,350. Další srážecí roztoky, ve kterých byla úspěšná naše krystalizace, taktéž obsahovaly polyethylenglykol.

Sykilinda a kolektiv<sup>65</sup> úspěšně krystalizovali AcLys , přirozeně kódovaného v profágové oblasti genomu *Acinetobacter baumannii* AB 5075. Krystaly se podařilo získat za pomoci metod založených na difuzi par a srážecího roztoku o složení: 0,2 M Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,1 M MES pH 6,5; 25% PEG 3350 při teplotě 20°C<sup>65</sup>. V tomto případě stejně tak jako u PlyC a v úspěšných případech naší krystalizace byly krystaly získány za přítomnosti polyethylen glykolu.

PlyC je struktura získaná z grampozitivních bakterií, zatímco AcLys je struktura získaná z gramnegativních bakterií, ze kterých je i lysAp22.

## 7 Závěr

Praktická část bakalářské práce se věnuje stručné charakteristice proteinů a jejich základních vlastnostech. Součástí této kapitoly je stručný popis modelového proteinu lysozymu a zároveň zmiňuje skupinu bakteriofágových lysinů, ze které pochází zkoumaný protein. S rostoucím celosvětovým rozšířením bakterií, které jsou rezistentní vůči antibiotikům, představují bakteriofágové lysiny skupinu látek, která může sloužit jako alternativní náhrada antibiotik. Dále se zabývá rozdíly mezi krystaly makromolekulárních látek a nízkomolekulárních látek. Poté se věnuje stručnému vývoji krystalizace proteinů do podoby, tak jak ji známe dnes, zároveň se zabývá procesem krystalizace a stručně popisuje fázový diagram. Popisuje pre-krystalizační test, jako první důležitý krok před samotnou krystalizací, nadále popisuje základní, pokročilé i alternativní metody používané v dnešní době. V následující řadě se stručně věnuje testování získaných krystalů na proteinový původ. Nakonec jsou uvedeny informace o RCSB PDB databázi, kde jsou online uloženy informace o dosud známých strukturách proteinů, získaných pomocí rentgenové difrakční analýzy nebo nukleární magnetické rezonance.

První polovina praktické části bakalářské práce se věnuje krystalizaci lysozymu, proteinu, u kterého jsou velmi dobře známy podmínky pro získání krystalů. Součástí této práce bylo seznámit se a osvojit si základní a pokročilé metody krystalizace a to zejména metodu sedící a visící kapky, mikrokrystalizaci pod olejem a metodu volné difúze. Krystalizace byla úspěšná téměř ve všech podmínkách.

Druhá polovina praktické části je zaměřena na krystalizaci nového bakteriofágového lysinu Ap22, což bylo hlavním cílem této bakalářské práce. Nejprve se musely určit vhodné podmínky, ve kterých bude protein růst. Pro tento úkol byly vybrány tři komerčně dostupné krystalizační sady, PGA Screen, MORPHEUS® II HT-96 a PEG/Ion HT™. Za použití metody sedící kapky, bylo celkově otestováno 576 podmínek. Z důvodu malého počtu úspěšných podmínek, bylo nutné vybrané podmínky nadále optimalizovat. Pro optimalizaci byly vybrány tři podmínky ze sady PEG/Ion HT™, srážecí roztok č. 7 (složení: 0,2 M dihydrát chloridu vápenatého, 20% w/v PEG 3,350, pH 5,1), č. 28 (složení: 0,2 M hydrát octanu vápenatého, 20% w/v PEG 3,350, pH 7,5) a č. 82 (složení: 2% v/v Tascimate™ pH 7,0; 0,1 M HEPES pH 7,5; 20% w/v PEG 3,350). Optimalizace byla provedena metodou sedící kapky, v různých poměrech za účelem zjištění vhodného poměru. Krystalizace byla úspěšná ve všech třech roztocích velmi podobně. Celkově se podařilo získat dvě vhodné podmínky, které poskytly

dostatečně velké krystaly. Vybrané krystaly pak byly otestovány pomocí barvicího testu, s cílem prokázat jejich proteinový původ.

Finálním krokem bylo otestovat získané krystaly pomocí rentgenové difrakční analýzy, která poskytla difrakční snímky v kvalitě pouze 3,5 Å. Tyto data nejsou dostatečná k následnému určení trojrozměrné struktury lysAp22. Je tedy nutné zjištěné podmínky nadále optimalizovat a vykrystalizovat kvalitnější monokrystaly. Získané krystaly pak budou opětovně měřeny na zdroji synchrotronového záření s cílem získat kvalitnější difrakční data, která již budou vhodná k určení trojrozměrné struktury lysAp22.

## 8 Seznam literatury

- [1] Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2002). Protein structure and function. *Biochemistry*, 262, 159-173.
- [2] Avissar, Y., Choi, J., & DeSaix, J. (2013). Biology. Houston, TX, USA: Open Stax College. ISBN 978-1938168093.
- [3] Manchenko G. P. (1994). "Lysozyme". Handbook of detection of enzymes on electrophoretic gels. Boca Raton, FL, USA.: CRC Press. p. 223. ISBN 978-0-8493-8935-1
- [4] Skujiņš, J., Puķīte, A., & McLaren, A. D. (1973). Adsorption and reactions of chitinase and lysozyme on chitin. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2(2), 221-228.
- [5] Callewaert, L., & Michiels, C. W. (2010). Lysozymes in the animal kingdom. *Journal of Biosciences*, 35(1), 127-160.
- [6] Fenton, M., McAuliffe, O., O'Mahony, J., & Coffey, A. (2010). Recombinant bacteriophage lysins as antibacterials. *Bioengineered Bugs*, 1(1), 9-16.
- [7] Oliveira, H., São-José, C., & Azeredo, J. (2018). Phage-derived peptidoglycan degrading enzymes: challenges and future prospects for *in vivo* therapy. *Viruses*, 10(6), 292.
- [8] Hermoso, J. A., García, J. L., & García, P. (2007). Taking aim on bacterial pathogens: from phage therapy to enzybiotics. *Current Opinion in Microbiology*, 10(5), 461-472.
- [9] Clokie, M. R., Millard, A. D., Letarov, A. V., & Heaphy, S. (2011). Phages in nature. *Bacteriophage*, 1(1), 31-45.
- [10] Fischetti, V. A. (2018). Development of phage lysins as novel therapeutics: a historical perspective. *Viruses*, 10(6), 310.
- [11] Fischetti, V. A. (2008). Bacteriophage lysins as effective antibacterials. *Current Opinion in Microbiology*, 11(5), 393-400.
- [12] Daniel, A., Euler, C., Collin, M., Chahales, P., Gorelick, K. J., & Fischetti, V. A. (2010). Synergism between a novel chimeric lysin and oxacillin protects against infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(4), 1603-1612.

- [13] Rashel, M., Uchiyama, J., Ujihara, T., Uehara, Y., Kuramoto, S., Sugihara, S., & Honke, K. (2007). Efficient elimination of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* by cloned lysin derived from bacteriophage  $\phi$ MR11. *The Journal of Infectious Diseases*, 196(8), 1237-1247.
- [14] Yang, H., Zhang, Y., Yu, J., Huang, Y., Zhang, X. E., & Wei, H. (2014). Novel chimeric lysin with high-level antimicrobial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* *in vitro* and *in vivo*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(1), 536-542.
- [15] Yang, H., Yu, J., & Wei, H. (2014). Engineered bacteriophage lysins as novel anti-infectives. *Frontiers in Microbiology*, 5, 542.
- [16] Popova, A. V., Zhilenkov, E. L., Myakinina, V. P., Krasilnikova, V. M., & Volozhantsev, N. V. (2012). Isolation and characterization of wide host range lytic bacteriophage AP22 infecting *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiology Letters*, 332(1), 40-46.
- [17] Lower, S. (1999). Nature of crystalline solid [online]. In: Chem1 virtual textbook. [Cit. 2020-11-27]. Dostupné z WWW: <<http://www.chem1.com/acad/webtext/states/states.html#SEC4>>.
- [18] Crystal. Online dictionary of crystallography [online]. International Union of Crystallography [Cit. 2020-11-27]. Poslední změna 9. listopad. 2017. Dostupné z WWW: <<https://dictionary.iucr.org/Crystal>>.
- [19] Ducruix, A., & Giegé, R. (Eds.). (1999). Crystallization of nucleic acids and proteins: a practical approach (No. 210). Oxford: Oxford University Press. ISBN 0-19-963679-6.
- [20] McPherson, A., & Gavira, J. A. (2014). Introduction to protein crystallization. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications*, 70(1), 2-20.
- [21] Chernov, A. A. (2003). Protein crystals and their growth. *Journal of Structural Biology*, 142(1), 3-21.
- [22] Vekilov, P. G. & Chernov, A. A. (2002). The physics of protein crystallization. *Solid State Physics*. 57, 2–147.
- [23] Kuznetsov, Y. G., Malkin, A. J., Greenwood, A., & McPherson, A. (1995). Interferometric studies of growth kinetics and surface morphology in macromolecular crystal growth: canavalin, thaumatin, and turnip yellow mosaic virus. *Journal of structural biology*, 114(3), 184-196.

- [24] Giegé, R. (2013). A historical perspective on protein crystallization from 1840 to the present day. *The FEBS Journal*, 280(24), 6456-6497.
- [25] McPherson, A. (1991). A brief history of protein crystal growth. *Journal of Crystal Growth*, 110(1-2), 1-10.
- [26] McPherson, A. (1999). Crystallization of biological macromolecules. New York: Laboratory Press, Cold Spring Harbor. ISBN 0-87969-527-7.
- [27] McPherson, A. (2004). Introduction to protein crystallization. *Methods*, 34(3), 254-265.
- [28] Kutá Smatanová, I. (2003). Krystalizace biologických makromolekul od teorie k praxi [online]. In: Krystalografická společnost. [cit. 2020-10-31]. Dostupné z WWW: <<https://www.xray.cz/kryst/difrakce/iva/krystalizace.htm>>.
- [29] Drenth J. (1999). Principles of protein x-ray crystallography. 2nd. ed. New York: Springer-Verlag. ISBN 0-387-98587-5.
- [30] Bergfors, T. M. (1999). Protein crystallization: techniques, strategies and tips. La Jolla, CA, USA: International University Line. ISBN 0-9636817-5-3.
- [31] Chayen, N. E. (2005). Methods for separating nucleation and growth in protein crystallisation. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 88(3), 329-337.
- [32] Smatanová, I. K. (2002). Crystallization of biological macromolecules. *Materials Structure*, 9(1), 14-15.
- [33] Sauter, A., Roosen-Runge, F., Zhang, F., Lotze, G., Feoktystov, A., Jacobs, R. M., & Schreiber, F. (2015). On the question of two-step nucleation in protein crystallization. *Faraday Discussions*, 179, 41-58.
- [34] ten Wolde, P. R., & Frenkel, D. (1999). Homogeneous nucleation and the Ostwald step rule. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 1(9), 2191-2196.
- [35] Mullin, J. W. (2001). Crystallization. 4th. ed. Oxford: Butterworth-Heinemann. ISBN 0-7506-4833-3.
- [36] Rupp, B. (2010). Biomolecular crystallography: principles, practice, and application to structural biology. New York: Garland Science, Taylor & Francis Group. ISBN 978-0-8153-4081-2.
- [37] Asherie, N. (2004). Protein crystallization and phase diagrams. *Methods*, 34(3), 266-272.



- [38] Sauter, C., Lorber, B., McPherson, A., & Giegé, R. (2006). General methods. *International Tables for Crystallography*, 99-121.
- [39] Nemčovičová, I., & Kutá Smatanová, I. (2012). Alternative protein crystallization technique: Cross-influence procedure (CIP). In: E. Borisenko (Ed.), *Crystallization and materials science of modern artificial and natural crystals* (pp. 249-276). Rijeka, Chorvatsko: InTech. ISBN 978-953-307-608-9.
- [40] Christopher, G. K., Phipps, A. G., & Gray, R. J. (1998). Temperature-dependent solubility of selected proteins. *Journal of Crystal Growth*, 191(4), 820-826.
- [41] McPherson, A. (1990). Current approaches to macromolecular crystallization. *European Journal of Biochemistry*, 189(1). 1-23.
- [42] Stura, E. A., Nemerow, G. R., & Wilson, I. A. (1992). Strategies in the crystallization of glycoproteins and protein complexes crystallization. *Journal of Crystal Growth*, 122(1-4). 273-285.
- [43] Russo Krauss, I., Merlino, A., Vergara, A., & Sica, F. (2013). An overview of biological macromolecule crystallization. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(6), 11643-11691.
- [44] Hampton Research (2019). *Crystallization: research tools*. Aliso Viejo, USA: Hampton Research Corp.
- [45] Chayen, N. E., Stewart, P. D. S., & Blow, D. M. (1992). Microbatch crystallization under oil — a new technique allowing many small-volume crystallization trials. *Journal of Crystal Growth*, 122(1-4), 176-180.
- [46] Qin, Zunshe (2007). Protein crystallography dialysis chamber that enables off-site high throughput cocktail screen. U. S. Patent application No 11/161,227.
- [47] Benvenuti, M., & Mangani, S. (2007). Crystallization of soluble proteins in vapor diffusion for x-ray crystallography. *Nature Protocols*, 2(7), 1633-1651.
- [48] Chayen, N. E. (1998). Comparative studies of protein crystallization by vapour-diffusion and microbatch techniques. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 54(1), 8-15.

- [49] Korczyńska, J., Hu, T. C., Smith, D. K., Jenkins, J., Lewis, R., Edwards, T., & Brzozowski, A. M. (2007). Microscale vapour diffusion for protein crystallization. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 63(9), 1009-1015.
- [50] Ghosal, S., & Avasthi, A. S. (2018). Fundamentals of bioanalytical techniques and instrumentation. 2nd. ed. New Delhi: Raj Press. ISBN 978-93-87472-40-2.
- [51] Salemm, F. R. (1972). A free interface diffusion technique for the crystallization of proteins for X-ray crystallography. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 151(2), 533-539.
- [52] García-Ruiz, J. M., & Moreno, A. (1994). Investigations on protein crystal growth by the gel acupuncture method. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 50(4), 484-490
- [53] Robert, M. C., & Lefauchaux, F. (1988). Crystal growth in gels: principle and applications. *Journal of Crystal Growth*, 90(1-3), 358-367.
- [54] Sauter, C., Lorber, B., & Giegé, R. (2002). Towards atomic resolution with crystals grown in gel: the case of thaumatin seen at room temperature. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 48(2), 146-150.
- [55] Van Driessche, A. E., Otálora, F., Gavira, J. A., & Sasaki, G. (2008). Is agarose an impurity or an impurity filter? In situ observation of the joint gel/impurity effect on protein crystal growth kinetics. *Crystal Growth and Design*, 8(10), 3623-3629.
- [56] Bergfors, T. (2003). Seeds to crystals. *Journal of structural biology*, 142(1), 66-76.
- [57] Bergfors, T. (2007). Screening and optimization methods for nonautomated crystallization laboratories. In: S. Doublieé (Ed.), *Macromolecular Crystallography Protocols* (pp. 131-152). Totowa, Jew Jersey: Humana Press. ISBN 1-59745-209-2.
- [58] Berman, H., Henrick, K., & Nakamura, H. (2003). Announcing the worldwide protein data bank. *Nature Structural & Molecular Biology*, 10(12), 980-980.
- [59] RCSB PDB: Protein Data Bank [online]. Dostupné z WWW: <<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>>.
- [60] Hekmat, D., Hebel, D., Schmid, H., & Weuster-Botz, D. (2007). Crystallization of lysozyme: from vapor diffusion experiments to batch crystallization in agitated ml-scale vessels. *Process Biochemistry*, 42(12), 1649-1654.

- [61] BMCD: Biological Macromolecule Crystallization Databe [online]. Dostupné z WWW: <<http://bmcd.ibbr.umd.edu>>.
- [62] Potron, A., Poirel, L., & Nordmann, P. (2015). Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 45(6), 568-585.
- [63] Spellberg, B. (2008). Antibiotic resistance and antibiotic development. *The Lancet Infectious Diseases*, 4(8), 211-212.
- [64] McGowan, S., Buckle, A. M., Mitchell, M. S., Hoopes, J. T., Gallagher, D. T., Heselpoth, R. D., & Whisstock, J. C. (2012). X-ray crystal structure of the streptococcal specific phage lysin PlyC. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(31), 12752-12757.
- [65] Sykilinda, N. N., Nikolaeva, A. Y., Shneider, M. M., Mishkin, D. V., Patutin, A. A., Popov, V. O., & Miroshnikov, K. A. (2018). Structure of an *Acinetobacter* broad-range prophage endolysin reveals a C-terminal  $\alpha$ -helix with the proposed role in activity against live bacterial cells. *Viruses*, 10(6), 309.

## 9 Přílohy

Složení PCT sady dodávané od Hampton Research, USA.

### PCT Formulation

- Reagent A1 - 0.1 M TRIS hydrochloride pH 8.5, 2.0 M Ammonium sulfate
- Reagent B1 - 0.1 M TRIS hydrochloride pH 8.5, 1.0 M Ammonium sulfate
- Reagent A2 - 0.1 M TRIS hydrochloride pH 8.5,  
0.2 M Magnesium chloride hexahydrate,  
30% w/v Polyethylene glycol 4,000
- Reagent B2 - 0.1 M TRIS hydrochloride pH 8.5,  
0.2 M Magnesium chloride hexahydrate,  
15% w/v Polyethylene glycol 4,000

Seznam krystalizačních činidel ze sady PGA Screen (Molecular Dimension, USA).

Well	Tube #	Conc. Salt 1	Conc. Salt 2	Conc. Buffer	pH	Conc. Precipitant	Conc. Precipitant2
A1	1-1	0.3 M Potassium bromide		0.1 M Sodium acetate	5.0	8 % w/v $\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	
A2	1-2	0.2 M Magnesium chloride		0.1 M Sodium acetate	5.0	8 % w/v $\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	
A3	1-3	0.3 M Sodium malonate dibasic monohydrate		0.1 M Sodium acetate	5.0	8 % w/v $\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	
A4	1-4	0.6 M Sodium formate		0.1 M Sodium acetate	5.0	8 % w/v $\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	
A5	1-5	1 M Ammonium formate		0.1 M Sodium acetate	5.0	8 % w/v $\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	
A6	1-6	0.2 M Potassium thiocyanate		0.1 M Sodium acetate	5.0	8 % w/v $\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	
A7	1-7	0.2 M L-Proline		0.1 M Sodium acetate	5.0	8 % w/v $\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	
A8	1-8	0.2 M L-Arginine		0.1 M Sodium acetate	5.0	8 % w/v $\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	
A9	1-9			0.1 M Sodium acetate	5.0	5 % w/v $\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	30 % v/v PEG 400
A10	1-10			0.1 M Sodium acetate	5.0	5 % w/v $\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	30 % v/v PEG 500 MME
A11	1-11			0.1 M Sodium acetate	5.0	5 % w/v $\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	30 % v/v MPD
A12	1-12			0.1 M Sodium acetate	5.0	5 % w/v $\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	20 % w/v PEG 2000 MME
B1	1-13			0.1 M Sodium acetate	5.0	5 % w/v $\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	20 % w/v PEG 3350
B2	1-14			0.1 M Sodium acetate	5.0	5 % w/v $\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	15 % w/v PEG 4000
B3	1-15			0.1 M Sodium acetate	5.0	5 % w/v $\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	12 % w/v PEG 8000
B4	1-16			0.1 M Sodium acetate	5.0	5 % w/v $\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	8 % w/v PEG 20000
B5	1-17	0.2 M Potassium bromide	0.2 M Potassium thiocyanate	0.1 M Sodium acetate	5.0	3 % w/v $\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	30 % v/v PEG 400
B6	1-18	0.2 M Potassium bromide	0.2 M Potassium thiocyanate	0.1 M Sodium acetate	5.0	3 % w/v $\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	20 % v/v PEG 500 MME
B7	1-19	0.2 M Potassium bromide	0.2 M Potassium thiocyanate	0.1 M Sodium acetate	5.0	3 % w/v $\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	20 % v/v MPD
B8	1-20	0.2 M Potassium bromide	0.2 M Potassium thiocyanate	0.1 M Sodium acetate	5.0	3 % w/v $\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	10 % w/v PEG 2000 MME
B9	1-21	0.2 M Potassium bromide	0.2 M Potassium thiocyanate	0.1 M Sodium acetate	5.0	3 % w/v $\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	5 % w/v PEG 3350
B10	1-22	0.2 M Potassium bromide	0.2 M Potassium thiocyanate	0.1 M Sodium acetate	5.0	3 % w/v $\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	5 % w/v PEG 4000
B11	1-23	0.2 M Potassium bromide	0.2 M Potassium thiocyanate	0.1 M Sodium acetate	5.0	3 % w/v $\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	5 % w/v PEG 8000
B12	1-24	0.2 M Potassium bromide	0.2 M Potassium thiocyanate	0.1 M Sodium acetate	5.0	3 % w/v $\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	3 % w/v PEG 20000
C1	1-25	0.1 M Ammonium sulfate	0.3 M Sodium formate	0.1 M Sodium acetate	5.0	3 % w/v $\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	30 % v/v PEG 400
C2	1-26	0.1 M Ammonium sulfate	0.3 M Sodium formate	0.1 M Sodium acetate	5.0	3 % w/v $\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	20 % v/v PEG 500 MME
C3	1-27	0.1 M Ammonium sulfate	0.3 M Sodium formate	0.1 M Sodium acetate	5.0	3 % w/v $\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	20 % v/v MPD
C4	1-28	0.1 M Ammonium sulfate	0.3 M Sodium formate	0.1 M Sodium acetate	5.0	3 % w/v $\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	10 % w/v PEG 2000 MME
C5	1-29	0.1 M Ammonium sulfate	0.3 M Sodium formate	0.1 M Sodium acetate	5.0	3 % w/v $\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	5 % w/v PEG 3350
C6	1-30	0.1 M Ammonium sulfate	0.3 M Sodium formate	0.1 M Sodium acetate	5.0	3 % w/v $\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	5 % w/v PEG 4000
C7	1-31	0.1 M Ammonium sulfate	0.3 M Sodium formate	0.1 M Sodium acetate	5.0	3 % w/v $\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	5 % w/v PEG 8000
C8	1-32	0.1 M Ammonium sulfate	0.3 M Sodium formate	0.1 M Sodium acetate	5.0	3 % w/v $\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	3 % w/v PEG 20000
C9	1-33	0.3 M Potassium Bromide		0.1 M Sodium cacodylate	6.5	8 % w/v $\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	
C10	1-34	0.2 M Magnesium chloride		0.1 M Sodium cacodylate	6.5	8 % w/v $\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	
C11	1-35	0.3 M Sodium malonate dibasic monohydrate		0.1 M Sodium cacodylate	6.5	8 % w/v $\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	
C12	1-36	0.6 M Sodium formate		0.1 M Sodium cacodylate	6.5	8 % w/v $\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	
D1	1-37	1 M Ammonium formate		0.1 M Sodium cacodylate	6.5	8 % w/v $\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	
D2	1-38	0.2 M Potassium thiocyanate		0.1 M Sodium cacodylate	6.5	8 % w/v $\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	
D3	1-39	0.2 M L-Proline		0.1 M Sodium cacodylate	6.5	8 % w/v $\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	
D4	1-40	0.2 M L-Arginine		0.1 M Sodium cacodylate	6.5	8 % w/v $\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	
D5	1-41			0.1 M Sodium cacodylate	6.5	5 % w/v $\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	30 % v/v PEG 400
D6	1-42			0.1 M Sodium cacodylate	6.5	5 % w/v $\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	30 % v/v PEG 500 MME
D7	1-43			0.1 M Sodium cacodylate	6.5	5 % w/v $\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	30 % v/v MPD
D8	1-44			0.1 M Sodium cacodylate	6.5	5 % w/v $\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	20 % w/v PEG 2000 MME
D9	1-45			0.1 M Sodium cacodylate	6.5	5 % w/v $\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	20 % w/v PEG 3350
D10	1-46			0.1 M Sodium cacodylate	6.5	5 % w/v $\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	15 % w/v PEG 4000
D11	1-47			0.1 M Sodium cacodylate	6.5	5 % w/v $\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	12 % w/v PEG 8000
D12	1-48			0.1 M Sodium cacodylate	6.5	5 % w/v $\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	8 % w/v PEG 20000

Well	Tube #	Conc.	Salt 1	Conc.	Salt 2	Conc.	Buffer	pH	Conc.	Precipitant	Conc.	Precipitant2
E1	2-1	0.2 M	Potassium bromide	0.2 M	Potassium thiocyanate	0.1 M	Sodium cacodylate	6.5	3 % w/v	$\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	30 % v/v	PEG 400
E2	2-2	0.2 M	Potassium bromide	0.2 M	Potassium thiocyanate	0.1 M	Sodium cacodylate	6.5	3 % w/v	$\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	20 % v/v	PEG 500 MME
E3	2-3	0.2 M	Potassium bromide	0.2 M	Potassium thiocyanate	0.1 M	Sodium cacodylate	6.5	3 % w/v	$\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	20 % v/v	MPD
E4	2-4	0.2 M	Potassium bromide	0.2 M	Potassium thiocyanate	0.1 M	Sodium cacodylate	6.5	3 % w/v	$\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	10 % w/v	PEG 2000 MME
E5	2-5	0.2 M	Potassium bromide	0.2 M	Potassium thiocyanate	0.1 M	Sodium cacodylate	6.5	3 % w/v	$\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	5 % w/v	PEG 3350
E6	2-6	0.2 M	Potassium bromide	0.2 M	Potassium thiocyanate	0.1 M	Sodium cacodylate	6.5	3 % w/v	$\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	5 % w/v	PEG 4000
E7	2-7	0.2 M	Potassium bromide	0.2 M	Potassium thiocyanate	0.1 M	Sodium cacodylate	6.5	3 % w/v	$\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	5 % w/v	PEG 8000
E8	2-8	0.2 M	Potassium bromide	0.2 M	Potassium thiocyanate	0.1 M	Sodium cacodylate	6.5	3 % w/v	$\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	3 % w/v	PEG 20000
E9	2-9	0.1 M	Ammonium sulfate	0.3 M	Sodium formate	0.1 M	Sodium cacodylate	6.5	3 % w/v	$\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	30 % v/v	PEG 400
E10	2-10	0.1 M	Ammonium sulfate	0.3 M	Sodium formate	0.1 M	Sodium cacodylate	6.5	3 % w/v	$\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	20 % v/v	PEG 500 MME
E11	2-11	0.1 M	Ammonium sulfate	0.3 M	Sodium formate	0.1 M	Sodium cacodylate	6.5	3 % w/v	$\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	20 % v/v	MPD
E12	2-12	0.1 M	Ammonium sulfate	0.3 M	Sodium formate	0.1 M	Sodium cacodylate	6.5	3 % w/v	$\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	10 % w/v	PEG 2000 MME
F1	2-13	0.1 M	Ammonium sulfate	0.3 M	Sodium formate	0.1 M	Sodium cacodylate	6.5	3 % w/v	$\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	5 % w/v	PEG 3350
F2	2-14	0.1 M	Ammonium sulfate	0.3 M	Sodium formate	0.1 M	Sodium cacodylate	6.5	3 % w/v	$\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	5 % w/v	PEG 4000
F3	2-15	0.1 M	Ammonium sulfate	0.3 M	Sodium formate	0.1 M	Sodium cacodylate	6.5	3 % w/v	$\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	5 % w/v	PEG 8000
F4	2-16	0.1 M	Ammonium sulfate	0.3 M	Sodium formate	0.1 M	Sodium cacodylate	6.5	3 % w/v	$\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	3 % w/v	PEG 20000
F5	2-17	0.3 M	Potassium bromide			0.1 M	Tris	7.8	8 % w/v	$\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)		
F6	2-18	0.2 M	Magnesium chloride			0.1 M	Tris	7.8	8 % w/v	$\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)		
F7	2-19	0.3 M	Sodium malonate dibasic monohydrate			0.1 M	Tris	7.8	8 % w/v	$\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)		
F8	2-20	0.6 M	Sodium formate			0.1 M	Tris	7.8	8 % w/v	$\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)		
F9	2-21	1 M	Ammonium formate			0.1 M	Tris	7.8	8 % w/v	$\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)		
F10	2-22	0.2 M	Potassium thiocyanate			0.1 M	Tris	7.8	8 % w/v	$\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)		
F11	2-23	0.2 M	L-Proline			0.1 M	Tris	7.8	8 % w/v	$\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)		
F12	2-24	0.2 M	L-Arginine			0.1 M	Tris	7.8	8 % w/v	$\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)		
G1	2-25					0.1 M	Tris	7.8	5 % w/v	$\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	30 % v/v	PEG 400
G2	2-26					0.1 M	Tris	7.8	5 % w/v	$\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	30 % v/v	PEG 500 MME
G3	2-27					0.1 M	Tris	7.8	5 % w/v	$\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	30 % v/v	MPD
G4	2-28					0.1 M	Tris	7.8	5 % w/v	$\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	20 % w/v	PEG 2000 MME
G5	2-29					0.1 M	Tris	7.8	5 % w/v	$\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	20 % w/v	PEG 3350
G6	2-30					0.1 M	Tris	7.8	5 % w/v	$\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	15 % w/v	PEG 4000
G7	2-31					0.1 M	Tris	7.8	5 % w/v	$\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	12 % w/v	PEG 8000
G8	2-32					0.1 M	Tris	7.8	5 % w/v	$\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	8 % w/v	PEG 20000
G9	2-33	0.2 M	Potassium bromide	0.2 M	Potassium thiocyanate	0.1 M	Tris	7.8	3 % w/v	$\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	30 % v/v	PEG 400
G10	2-34	0.2 M	Potassium bromide	0.2 M	Potassium thiocyanate	0.1 M	Tris	7.8	3 % w/v	$\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	20 % v/v	PEG 500 MME
G11	2-35	0.2 M	Potassium bromide	0.2 M	Potassium thiocyanate	0.1 M	Tris	7.8	3 % w/v	$\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	20 % v/v	MPD
G12	2-36	0.2 M	Potassium bromide	0.2 M	Potassium thiocyanate	0.1 M	Tris	7.8	3 % w/v	$\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	10 % w/v	PEG 2000 MME
H1	2-37	0.2 M	Potassium bromide	0.2 M	Potassium thiocyanate	0.1 M	Tris	7.8	3 % w/v	$\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	5 % w/v	PEG 3350
H2	2-38	0.2 M	Potassium bromide	0.2 M	Potassium thiocyanate	0.1 M	Tris	7.8	3 % w/v	$\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	5 % w/v	PEG 4000
H3	2-39	0.2 M	Potassium bromide	0.2 M	Potassium thiocyanate	0.1 M	Tris	7.8	3 % w/v	$\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	5 % w/v	PEG 8000
H4	2-40	0.2 M	Potassium bromide	0.2 M	Potassium thiocyanate	0.1 M	Tris	7.8	3 % w/v	$\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	3 % w/v	PEG 20000
H5	2-41	0.1 M	Ammonium sulfate	0.3 M	Sodium formate	0.1 M	Tris	7.8	3 % w/v	$\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	30 % v/v	PEG 400
H6	2-42	0.1 M	Ammonium sulfate	0.3 M	Sodium formate	0.1 M	Tris	7.8	3 % w/v	$\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	20 % v/v	PEG 500 MME
H7	2-43	0.1 M	Ammonium sulfate	0.3 M	Sodium formate	0.1 M	Tris	7.8	3 % w/v	$\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	20 % v/v	MPD
H8	2-44	0.1 M	Ammonium sulfate	0.3 M	Sodium formate	0.1 M	Tris	7.8	3 % w/v	$\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	10 % w/v	PEG 2000 MME
H9	2-45	0.1 M	Ammonium sulfate	0.3 M	Sodium formate	0.1 M	Tris	7.8	3 % w/v	$\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	5 % w/v	PEG 3350
H10	2-46	0.1 M	Ammonium sulfate	0.3 M	Sodium formate	0.1 M	Tris	7.8	3 % w/v	$\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	5 % w/v	PEG 4000
H11	2-47	0.1 M	Ammonium sulfate	0.3 M	Sodium formate	0.1 M	Tris	7.8	3 % w/v	$\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	5 % w/v	PEG 8000
H12	2-48	0.1 M	Ammonium sulfate	0.3 M	Sodium formate	0.1 M	Tris	7.8	3 % w/v	$\gamma$ -PGA (Na+ form, LM)	3 % w/v	PEG 20000

Krystalizační činidla ze sady MORPHEUS® II HT-96 (Molecular Dimension, USA).

Screen ID	Well #	Conc.	Additives (PDB ligands)	Conc.	Buffer	pH	Conc.	Precipitant
1-1	A1	90 mM	LiNaK	0.1 M	Buffer System 4	6.5	36 % v/v	Precipitant Mix 5
1-2	A2	90 mM	LiNaK	0.1 M	Buffer System 4	6.5	32.5 % v/v	Precipitant Mix 6
1-3	A3	90 mM	LiNaK	0.1 M	Buffer System 4	6.5	30 % v/v	Precipitant Mix 7
1-4	A4	90 mM	LiNaK	0.1 M	Buffer System 4	6.5	31 % v/v	Precipitant Mix 8
1-5	A5	90 mM	LiNaK	0.1 M	Buffer System 5	7.5	36 % v/v	Precipitant Mix 5
1-6	A6	90 mM	LiNaK	0.1 M	Buffer System 5	7.5	32.5 % v/v	Precipitant Mix 6
1-7	A7	90 mM	LiNaK	0.1 M	Buffer System 5	7.5	30 % v/v	Precipitant Mix 7
1-8	A8	90 mM	LiNaK	0.1 M	Buffer System 5	7.5	31 % v/v	Precipitant Mix 8
1-9	A9	90 mM	LiNaK	0.1 M	Buffer System 6	8.5	36 % v/v	Precipitant Mix 5
1-10	A10	90 mM	LiNaK	0.1 M	Buffer System 6	8.5	32.5 % v/v	Precipitant Mix 6
1-11	A11	90 mM	LiNaK	0.1 M	Buffer System 6	8.5	30 % v/v	Precipitant Mix 7
1-12	A12	90 mM	LiNaK	0.1 M	Buffer System 6	8.5	31 % v/v	Precipitant Mix 8
1-13	B1	2 mM	Divalents II	0.1 M	Buffer System 4	6.5	36 % v/v	Precipitant Mix 5
1-14	B2	2 mM	Divalents II	0.1 M	Buffer System 4	6.5	32.5 % v/v	Precipitant Mix 6
1-15	B3	2 mM	Divalents II	0.1 M	Buffer System 4	6.5	30 % v/v	Precipitant Mix 7
1-16	B4	2 mM	Divalents II	0.1 M	Buffer System 4	6.5	31 % v/v	Precipitant Mix 8
1-17	B5	2 mM	Divalents II		none		36 % v/v	Precipitant Mix 5
1-18	B6	2 mM	Divalents II		none		32.5 % v/v	Precipitant Mix 6
1-19	B7	2 mM	Divalents II		none		30 % v/v	Precipitant Mix 7
1-20	B8	2 mM	Divalents II		none		31 % v/v	Precipitant Mix 8
1-21	B9	2 mM	Divalents II	0.1 M	Buffer System 6	8.5	36 % v/v	Precipitant Mix 5
1-22	B10	2 mM	Divalents II	0.1 M	Buffer System 6	8.5	32.5 % v/v	Precipitant Mix 6
1-23	B11	2 mM	Divalents II	0.1 M	Buffer System 6	8.5	30 % v/v	Precipitant Mix 7
1-24	B12	2 mM	Divalents II	0.1 M	Buffer System 6	8.5	31 % v/v	Precipitant Mix 8
1-25	C1	4 mM	Alkalis	0.1 M	Buffer System 4	6.5	36 % v/v	Precipitant Mix 5
1-26	C2	4 mM	Alkalis	0.1 M	Buffer System 4	6.5	32.5 % v/v	Precipitant Mix 6
1-27	C3	4 mM	Alkalis	0.1 M	Buffer System 4	6.5	30 % v/v	Precipitant Mix 7
1-28	C4	4 mM	Alkalis	0.1 M	Buffer System 4	6.5	31 % v/v	Precipitant Mix 8
1-29	C5	4 mM	Alkalis	0.1 M	Buffer System 5	7.5	36 % v/v	Precipitant Mix 5
1-30	C6	4 mM	Alkalis	0.1 M	Buffer System 5	7.5	32.5 % v/v	Precipitant Mix 6
1-31	C7	4 mM	Alkalis	0.1 M	Buffer System 5	7.5	30 % v/v	Precipitant Mix 7
1-32	C8	4 mM	Alkalis	0.1 M	Buffer System 5	7.5	31 % v/v	Precipitant Mix 8
1-33	C9	4 mM	Alkalis	0.1 M	Buffer System 6	8.5	36 % v/v	Precipitant Mix 5
1-34	C10	4 mM	Alkalis	0.1 M	Buffer System 6	8.5	32.5 % v/v	Precipitant Mix 6
1-35	C11	4 mM	Alkalis	0.1 M	Buffer System 6	8.5	30 % v/v	Precipitant Mix 7
1-36	C12	4 mM	Alkalis	0.1 M	Buffer System 6	8.5	31 % v/v	Precipitant Mix 8
1-37	D1	2 mM	Oxometalates	0.1 M	Buffer System 4	6.5	36 % v/v	Precipitant Mix 5
1-38	D2	2 mM	Oxometalates	0.1 M	Buffer System 4	6.5	32.5 % v/v	Precipitant Mix 6
1-39	D3	2 mM	Oxometalates	0.1 M	Buffer System 4	6.5	30 % v/v	Precipitant Mix 7
1-40	D4	2 mM	Oxometalates	0.1 M	Buffer System 4	6.5	31 % v/v	Precipitant Mix 8
1-41	D5	2 mM	Oxometalates	0.1 M	Buffer System 5	7.5	36 % v/v	Precipitant Mix 5
1-42	D6	2 mM	Oxometalates	0.1 M	Buffer System 5	7.5	32.5 % v/v	Precipitant Mix 6
1-43	D7	2 mM	Oxometalates	0.1 M	Buffer System 5	7.5	30 % v/v	Precipitant Mix 7
1-44	D8	2 mM	Oxometalates	0.1 M	Buffer System 5	7.5	31 % v/v	Precipitant Mix 8
1-45	D9	2 mM	Oxometalates	0.1 M	Buffer System 6	8.5	36 % v/v	Precipitant Mix 5
1-46	D10	2 mM	Oxometalates	0.1 M	Buffer System 6	8.5	32.5 % v/v	Precipitant Mix 6
1-47	D11	2 mM	Oxometalates	0.1 M	Buffer System 6	8.5	30 % v/v	Precipitant Mix 7
1-48	D12	2 mM	Oxometalates	0.1 M	Buffer System 6	8.5	31 % v/v	Precipitant Mix 8

Screen ID	Well #	Conc.	Additives (PDB ligands)	Conc.	Buffer	pH	Conc.	Precipitant
2-1	E1	2 mM	Lanthanides*	0.1 M	Buffer System 4	6.5	36 % v/v	Precipitant Mix 5
2-2	E2	2 mM	Lanthanides*	0.1 M	Buffer System 4	6.5	32.5 % v/v	Precipitant Mix 6
2-3	E3	2 mM	Lanthanides*	0.1 M	Buffer System 4	6.5	30 % v/v	Precipitant Mix 7
2-4	E4	2 mM	Lanthanides*	0.1 M	Buffer System 4	6.5	31 % v/v	Precipitant Mix 8
2-5	E5	2 mM	Lanthanides*	0.1 M	Buffer System 5	7.5	36 % v/v	Precipitant Mix 5
2-6	E6	2 mM	Lanthanides*	0.1 M	Buffer System 5	7.5	32.5 % v/v	Precipitant Mix 6
2-7	E7	2 mM	Lanthanides*	0.1 M	Buffer System 5	7.5	30 % v/v	Precipitant Mix 7
2-8	E8	2 mM	Lanthanides*	0.1 M	Buffer System 5	7.5	31 % v/v	Precipitant Mix 8
2-9	E9	2 mM	Lanthanides*	0.1 M	Buffer System 6	8.5	36 % v/v	Precipitant Mix 5
2-10	E10	2 mM	Lanthanides*	0.1 M	Buffer System 6	8.5	32.5 % v/v	Precipitant Mix 6
2-11	E11	2 mM	Lanthanides*	0.1 M	Buffer System 6	8.5	30 % v/v	Precipitant Mix 7
2-12	E12	2 mM	Lanthanides*	0.1 M	Buffer System 6	8.5	31 % v/v	Precipitant Mix 8
2-13	F1	100 mM	Monosaccharides II	0.1 M	Buffer System 4	6.5	36 % v/v	Precipitant Mix 5
2-14	F2	100 mM	Monosaccharides II	0.1 M	Buffer System 4	6.5	32.5 % v/v	Precipitant Mix 6
2-15	F3	100 mM	Monosaccharides II	0.1 M	Buffer System 4	6.5	30 % v/v	Precipitant Mix 7
2-16	F4	100 mM	Monosaccharides II	0.1 M	Buffer System 4	6.5	31 % v/v	Precipitant Mix 8
2-17	F5	100 mM	Monosaccharides II	0.1 M	Buffer System 5	7.5	36 % v/v	Precipitant Mix 5
2-18	F6	100 mM	Monosaccharides II	0.1 M	Buffer System 5	7.5	32.5 % v/v	Precipitant Mix 6
2-19	F7	100 mM	Monosaccharides II	0.1 M	Buffer System 5	7.5	30 % v/v	Precipitant Mix 7
2-20	F8	100 mM	Monosaccharides II	0.1 M	Buffer System 5	7.5	31 % v/v	Precipitant Mix 8
2-21	F9	100 mM	Monosaccharides II	0.1 M	Buffer System 6	8.5	36 % v/v	Precipitant Mix 5
2-22	F10	100 mM	Monosaccharides II	0.1 M	Buffer System 6	8.5	32.5 % v/v	Precipitant Mix 6
2-23	F11	100 mM	Monosaccharides II	0.1 M	Buffer System 6	8.5	30 % v/v	Precipitant Mix 7
2-24	F12	100 mM	Monosaccharides II	0.1 M	Buffer System 6	8.5	31 % v/v	Precipitant Mix 8
2-25	G1	100 mM	Amino acids II	0.1 M	Buffer System 4	6.5	36 % v/v	Precipitant Mix 5
2-26	G2	100 mM	Amino acids II	0.1 M	Buffer System 4	6.5	32.5 % v/v	Precipitant Mix 6
2-27	G3	100 mM	Amino acids II	0.1 M	Buffer System 4	6.5	30 % v/v	Precipitant Mix 7
2-28	G4	100 mM	Amino acids II	0.1 M	Buffer System 4	6.5	31 % v/v	Precipitant Mix 8
2-29	G5	100 mM	Amino acids II	0.1 M	Buffer System 5	7.5	36 % v/v	Precipitant Mix 5
2-30	G6	100 mM	Amino acids II	0.1 M	Buffer System 5	7.5	32.5 % v/v	Precipitant Mix 6
2-31	G7	100 mM	Amino acids II	0.1 M	Buffer System 5	7.5	30 % v/v	Precipitant Mix 7
2-32	G8	100 mM	Amino acids II	0.1 M	Buffer System 5	7.5	31 % v/v	Precipitant Mix 8
2-33	G9	100 mM	Amino acids II	0.1 M	Buffer System 6	8.5	36 % v/v	Precipitant Mix 5
2-34	G10	100 mM	Amino acids II	0.1 M	Buffer System 6	8.5	32.5 % v/v	Precipitant Mix 6
2-35	G11	100 mM	Amino acids II	0.1 M	Buffer System 6	8.5	30 % v/v	Precipitant Mix 7
2-36	G12	100 mM	Amino acids II	0.1 M	Buffer System 6	8.5	31 % v/v	Precipitant Mix 8
2-37	H1	40 mM	Polyamines†	0.1 M	Buffer System 4	6.5	36 % v/v	Precipitant Mix 5
2-38	H2	40 mM	Polyamines†	0.1 M	Buffer System 4	6.5	32.5 % v/v	Precipitant Mix 6
2-39	H3	40 mM	Polyamines†	0.1 M	Buffer System 4	6.5	30 % v/v	Precipitant Mix 7
2-40	H4	40 mM	Polyamines†	0.1 M	Buffer System 4	6.5	31 % v/v	Precipitant Mix 8
2-41	H5	40 mM	Polyamines†	0.1 M	Buffer System 5	7.5	36 % v/v	Precipitant Mix 5
2-42	H6	40 mM	Polyamines†	0.1 M	Buffer System 5	7.5	32.5 % v/v	Precipitant Mix 6
2-43	H7	40 mM	Polyamines†	0.1 M	Buffer System 5	7.5	30 % v/v	Precipitant Mix 7
2-44	H8	40 mM	Polyamines†	0.1 M	Buffer System 5	7.5	31 % v/v	Precipitant Mix 8
2-45	H9	40 mM	Polyamines†	0.1 M	Buffer System 6	8.5	36 % v/v	Precipitant Mix 5
2-46	H10	40 mM	Polyamines†	0.1 M	Buffer System 6	8.5	32.5 % v/v	Precipitant Mix 6
2-47	H11	40 mM	Polyamines†	0.1 M	Buffer System 6	8.5	30 % v/v	Precipitant Mix 7
2-48	H12	40 mM	Polyamines†	0.1 M	Buffer System 6	8.5	31 % v/v	Precipitant Mix 8

## Seznam aditiv a jejich složení využitých v sadě MORPHEUS® II HT-96.

Mix name	Composition
0.9 M LiNaK	0.3 M Lithium sulfate, 0.3 M Sodium sulfate, 0.3 M Potassium sulfate
0.02M Divalents II	0.005M Manganese(II) chloride tetrahydrate, 0.005M Cobalt(II) chloride hexahydrate, 0.005M Nickel(II) chloride hexahydrate, 0.005M Zinc acetate dihydrate
0.04 M Alkalis	0.01M Rubidium chloride, 0.01M Strontium acetate, 0.01M Cesium acetate, 0.01M Barium acetate
0.02 M Oxometalates	0.005M Sodium chromate tetrahydrate, 0.005M Sodium molybdate dihydrate, 0.005M Sodium tungstate dihydrate, 0.005M Sodium orthovanadate
0.02M Lanthanides	0.005M Yttrium(III) chloride hexahydrate, 0.005M Erbium(III) chloride hexahydrate, 0.005M Terbium(III) chloride hexahydrate, 0.005M Ytterbium(III) chloride hexahydrate
1M Monosaccharides II	0.2M Xylitol, 0.2M <i>Myo</i> -Inositol, 0.2M D-(-)-Fructose, 0.2M L-Rhamnose monohydrate, 0.2M D-Sorbitol
1M Amino acids II	0.2M DL-Arginine hydrochloride, 0.2M DL-Threonine, 0.2M DL-Histidine monohydrochloride monohydrate, 0.2M DL-5-Hydroxylysine hydrochloride, 0.2M <i>trans</i> -4-hydroxy-L-proline
0.4 M Polyamines (provided as powder for 10mL kits)*	0.1M Spermine tetrahydrochloride, 0.1M Spermidine trihydrochloride, 0.1M 1,4-Diaminobutane dihydrochloride, 0.1M DL-Ornithine monohydrochloride

## Pufry a jejich složení využití v sadě MORPHEUS® II HT-96.

Mix name	Conc.	pH @ 20°C	Composition
Buffer System 1	1.0M	6.5	Imidazole; MES monohydrate (acid)
Buffer System 2	1.0M	7.5	Sodium HEPES; MOPS (acid)
Buffer System 3	1.0M	8.5	Tris (base); BICINE

Mix name*	Conc.	pH @ 20°C	Composition
Buffer System 4	1.0M	6.5	MOPSO, Bis-Tris
Buffer System 5	1.0M	7.5	BES, Triethanolamine (TEA)
Buffer System 6	1.0M	8.5	Gly-Gly, AMPD



Precipitační mixy a jejich složení v sadě MORPHEUS® II HT-96.

Mix name	Old Mix Name	Composition
60% Precipitant Mix 1	P500MME_P20K	40% v/v PEG 500* MME; 20% w/v PEG 20000
60% Precipitant Mix 2	EDO_P8K	40% v/v Ethylene glycol; 20% w/v PEG 8000
60% Precipitant Mix 3	GOL_P4K	40% v/v Glycerol; 20% w/v PEG 4000
75% Precipitant Mix 4	MPD_P1K_P3350	25% v/v MPD; 25% PEG 1000; 25% w/v PEG 3350

Mix name*	Composition
72% Precipitant Mix 5	30% w/v PEG 3000, 40% v/v 1, 2, 4-Butanetriol, 2% w/v NDSB 256
65% Precipitant Mix 6	25% w/v PEG 4000, 40% w/v 1,2,6-Hexanetriol
60% Precipitant Mix 7	20% w/v PEG 8000, 40% v/v 1,5-Pentanediol
62% Precipitant Mix 8	10% w/v PEG 20000, 50% w/v Trimethylpropane, 2% w/v NDSB 195

Krystalizační činidla ze sady PEG/Ion HT™ (Hampton Research, USA).

Well #	Salt	Well #	Polymer	Well #	pH $\diamond$
1. (A1)	0.2 M Sodium fluoride	1. (A1)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	1. (A1)	7.3
2. (A2)	0.2 M Potassium fluoride	2. (A2)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	2. (A2)	7.3
3. (A3)	0.2 M Ammonium fluoride	3. (A3)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	3. (A3)	6.2
4. (A4)	0.2 M Lithium chloride	4. (A4)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	4. (A4)	6.8
5. (A5)	0.2 M Magnesium chloride hexahydrate	5. (A5)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	5. (A5)	5.9
6. (A6)	0.2 M Sodium chloride	6. (A6)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	6. (A6)	6.9
7. (A7)	0.2 M Calcium chloride dihydrate	7. (A7)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	7. (A7)	5.1
8. (A8)	0.2 M Potassium chloride	8. (A8)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	8. (A8)	7.0
9. (A9)	0.2 M Ammonium chloride	9. (A9)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	9. (A9)	6.3
10. (A10)	0.2 M Sodium iodide	10. (A10)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	10. (A10)	7.0
11. (A11)	0.2 M Potassium iodide	11. (A11)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	11. (A11)	7.0
12. (A12)	0.2 M Ammonium iodide	12. (A12)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	12. (A12)	6.2
13. (B1)	0.2 M Sodium thiocyanate	13. (B1)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	13. (B1)	6.9
14. (B2)	0.2 M Potassium thiocyanate	14. (B2)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	14. (B2)	7.0
15. (B3)	0.2 M Lithium nitrate	15. (B3)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	15. (B3)	7.1
16. (B4)	0.2 M Magnesium nitrate hexahydrate	16. (B4)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	16. (B4)	5.9
17. (B5)	0.2 M Sodium nitrate	17. (B5)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	17. (B5)	6.8
18. (B6)	0.2 M Potassium nitrate	18. (B6)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	18. (B6)	6.8
19. (B7)	0.2 M Ammonium nitrate	19. (B7)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	19. (B7)	6.2
20. (B8)	0.2 M Magnesium formate dihydrate	20. (B8)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	20. (B8)	7.0
21. (B9)	0.2 M Sodium formate	21. (B9)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	21. (B9)	7.2
22. (B10)	0.2 M Potassium formate	22. (B10)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	22. (B10)	7.3
23. (B11)	0.2 M Ammonium formate	23. (B11)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	23. (B11)	6.6
24. (B12)	0.2 M Lithium acetate dihydrate	24. (B12)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	24. (B12)	7.9
25. (C1)	0.2 M Magnesium acetate tetrahydrate	25. (C1)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	25. (C1)	7.9
26. (C2)	0.2 M Zinc acetate dihydrate	26. (C2)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	26. (C2)	6.4
27. (C3)	0.2 M Sodium acetate trihydrate	27. (C3)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	27. (C3)	8.0
28. (C4)	0.2 M Calcium acetate hydrate	28. (C4)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	28. (C4)	7.5
29. (C5)	0.2 M Potassium acetate	29. (C5)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	29. (C5)	8.1
30. (C6)	0.2 M Ammonium acetate	30. (C6)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	30. (C6)	7.1
31. (C7)	0.2 M Lithium sulfate monohydrate	31. (C7)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	31. (C7)	6.0
32. (C8)	0.2 M Magnesium sulfate heptahydrate	32. (C8)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	32. (C8)	6.0
33. (C9)	0.2 M Sodium sulfate decahydrate	33. (C9)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	33. (C9)	6.7
34. (C10)	0.2 M Potassium sulfate	34. (C10)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	34. (C10)	6.8
35. (C11)	0.2 M Ammonium sulfate	35. (C11)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	35. (C11)	6.0
36. (C12)	0.2 M Sodium tartrate dibasic dihydrate	36. (C12)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	36. (C12)	7.3
37. (D1)	0.2 M Potassium sodium tartrate tetrahydrate	37. (D1)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	37. (D1)	7.4
38. (D2)	0.2 M Ammonium tartrate dibasic	38. (D2)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	38. (D2)	6.6
39. (D3)	0.2 M Sodium phosphate monobasic monohydrate	39. (D3)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	39. (D3)	4.7
40. (D4)	0.2 M Sodium phosphate dibasic dihydrate	40. (D4)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	40. (D4)	9.1
41. (D5)	0.2 M Potassium phosphate monobasic	41. (D5)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	41. (D5)	4.8
42. (D6)	0.2 M Potassium phosphate dibasic	42. (D6)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	42. (D6)	9.2
43. (D7)	0.2 M Ammonium phosphate monobasic	43. (D7)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	43. (D7)	4.6
44. (D8)	0.2 M Ammonium phosphate dibasic	44. (D8)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	44. (D8)	8.0
45. (D9)	0.2 M Lithium citrate tribasic tetrahydrate	45. (D9)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	45. (D9)	8.4
46. (D10)	0.2 M Sodium citrate tribasic dihydrate	46. (D10)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	46. (D10)	8.3
47. (D11)	0.2 M Potassium citrate tribasic monohydrate	47. (D11)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	47. (D11)	8.3
48. (D12)	0.2 M Ammonium citrate dibasic	48. (D12)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	48. (D12)	5.1

$\diamond$  Measured pH at 25 °C

Well #	Salt	Well #	Buffer ◊	Well #	Polymer
49. (E1)	0.1 M Sodium malonate pH 4.0	49. (E1)	None	49. (E1)	12% w/v Polyethylene glycol 3,350
50. (E2)	0.2 M Sodium malonate pH 4.0	50. (E2)	None	50. (E2)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
51. (E3)	0.1 M Sodium malonate pH 5.0	51. (E3)	None	51. (E3)	12% w/v Polyethylene glycol 3,350
52. (E4)	0.2 M Sodium malonate pH 5.0	52. (E4)	None	52. (E4)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
53. (E5)	0.1 M Sodium malonate pH 6.0	53. (E5)	None	53. (E5)	12% w/v Polyethylene glycol 3,350
54. (E6)	0.2 M Sodium malonate pH 6.0	54. (E6)	None	54. (E6)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
55. (E7)	0.1 M Sodium malonate pH 7.0	55. (E7)	None	55. (E7)	12% w/v Polyethylene glycol 3,350
56. (E8)	0.2 M Sodium malonate pH 7.0	56. (E8)	None	56. (E8)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
57. (E9)	4% v/v Tacsimate™ pH 4.0	57. (E9)	None	57. (E9)	12% w/v Polyethylene glycol 3,350
58. (E10)	8% v/v Tacsimate™ pH 4.0	58. (E10)	None	58. (E10)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
59. (E11)	4% v/v Tacsimate™ pH 5.0	59. (E11)	None	59. (E11)	12% w/v Polyethylene glycol 3,350
60. (E12)	8% v/v Tacsimate™ pH 5.0	60. (E12)	None	60. (E12)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
61. (F1)	4% v/v Tacsimate™ pH 6.0	61. (F1)	None	61. (F1)	12% w/v Polyethylene glycol 3,350
62. (F2)	8% v/v Tacsimate™ pH 6.0	62. (F2)	None	62. (F2)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
63. (F3)	4% v/v Tacsimate™ pH 7.0	63. (F3)	None	63. (F3)	12% w/v Polyethylene glycol 3,350
64. (F4)	8% v/v Tacsimate™ pH 7.0	64. (F4)	None	64. (F4)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
65. (F5)	4% v/v Tacsimate™ pH 8.0	65. (F5)	None	65. (F5)	12% w/v Polyethylene glycol 3,350
66. (F6)	8% v/v Tacsimate™ pH 8.0	66. (F6)	None	66. (F6)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
67. (F7)	0.1 M Succinic acid pH 7.0	67. (F7)	None	67. (F7)	12% w/v Polyethylene glycol 3,350
68. (F8)	0.2 M Succinic acid pH 7.0	68. (F8)	None	68. (F8)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
69. (F9)	0.1 M Ammonium citrate tribasic pH 7.0	69. (F9)	None	69. (F9)	12% w/v Polyethylene glycol 3,350
70. (F10)	0.2 M Ammonium citrate tribasic pH 7.0	70. (F10)	None	70. (F10)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
71. (F11)	0.1 M DL-Malic acid pH 7.0	71. (F11)	None	71. (F11)	12% w/v Polyethylene glycol 3,350
72. (F12)	0.2 M DL-Malic acid pH 7.0	72. (F12)	None	72. (F12)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
73. (G1)	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 7.0	73. (G1)	None	73. (G1)	12% w/v Polyethylene glycol 3,350
74. (G2)	0.2 M Sodium acetate trihydrate pH 7.0	74. (G2)	None	74. (G2)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
75. (G3)	0.1 M Sodium formate pH 7.0	75. (G3)	None	75. (G3)	12% w/v Polyethylene glycol 3,350
76. (G4)	0.2 M Sodium formate pH 7.0	76. (G4)	None	76. (G4)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
77. (G5)	0.1 M Ammonium tartrate dibasic pH 7.0	77. (G5)	None	77. (G5)	12% w/v Polyethylene glycol 3,350
78. (G6)	0.2 M Ammonium tartrate dibasic pH 7.0	78. (G6)	None	78. (G6)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
79. (G7)	2% v/v Tacsimate™ pH 4.0	79. (G7)	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6	79. (G7)	16% w/v Polyethylene glycol 3,350
80. (G8)	2% v/v Tacsimate™ pH 5.0	80. (G8)	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.6	80. (G8)	16% w/v Polyethylene glycol 3,350
81. (G9)	2% v/v Tacsimate™ pH 6.0	81. (G9)	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	81. (G9)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
82. (G10)	2% v/v Tacsimate™ pH 7.0	82. (G10)	0.1 M HEPES pH 7.5	82. (G10)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
83. (G11)	2% v/v Tacsimate™ pH 8.0	83. (G11)	0.1 M Tris pH 8.5	83. (G11)	16% w/v Polyethylene glycol 3,350
84. (G12)	None	84. (G12)	0.07 M Citric acid, 0.03 M BIS-TRIS propane / pH 3.4	84. (G12)	16% w/v Polyethylene glycol 3,350
85. (H1)	None	85. (H1)	0.06 M Citric acid, 0.04 M BIS-TRIS propane / pH 4.1	85. (H1)	16% w/v Polyethylene glycol 3,350
86. (H2)	None	86. (H2)	0.05 M Citric acid, 0.05 M BIS-TRIS propane / pH 5.0	86. (H2)	16% w/v Polyethylene glycol 3,350
87. (H3)	None	87. (H3)	0.04 M Citric acid, 0.06 M BIS-TRIS propane / pH 6.4	87. (H3)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
88. (H4)	None	88. (H4)	0.03 M Citric acid, 0.07 M BIS-TRIS propane / pH 7.6	88. (H4)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
89. (H5)	None	89. (H5)	0.02 M Citric acid, 0.08 M BIS-TRIS propane / pH 8.8	89. (H5)	16% w/v Polyethylene glycol 3,350
90. (H6)	0.02 M Calcium chloride dihydrate, 0.02 M Cadmium chloride hydrate, 0.02 M Cobalt(II) chloride hexahydrate	90. (H6)	None	90. (H6)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
91. (H7)	0.01 M Magnesium chloride hexahydrate 0.005 M Nickel(II) chloride hexahydrate	91. (H7)	0.1 M HEPES sodium pH 7.0	91. (H7)	15% w/v Polyethylene glycol 3,350
92. (H8)	0.02 M Zinc chloride	92. (H8)	None	92. (H8)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
93. (H9)	0.15 M Cesium chloride	93. (H9)	None	93. (H9)	15% w/v Polyethylene glycol 3,350
94. (H10)	0.2 M Sodium bromide	94. (H10)	None	94. (H10)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
95. (H11)	1% w/v Tryptone, 0.001 M Sodium azide	95. (H11)	0.05 M HEPES sodium pH 7.0	95. (H11)	12% w/v Polyethylene glycol 3,350
96. (H12)	1% w/v Tryptone, 0.001 M Sodium azide	96. (H12)	0.05 M HEPES sodium pH 7.0	96. (H12)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350

◊ Buffer pH is that of a 1.0 M stock prior to dilution with other reagent components: pH with HCl or NaOH.

## 10 Seznam zkratek

BMCD – „Biological Macromolecule Crystallization Databe“

DNA – deoxyribonukleotidová kyselina

dsDNA – dvouvláknová DNA (*double-stranded DNA*)

EC – (*Enzyme Commission number*) je numerické klasifikační schéma pro enzymy založené na chemických reakcích, které katalyzují

EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová

HEPES – 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethansulfonová kyselina

IPTG – isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid

MES – 2-(N-morfolino)-ethansulfonová kyselina

MIP – metastabilní přechodná fáze (*metastable intermediate phase*)

PCR – polymerázová řetězová reakce, metoda sloužící k namnožení určitého úseku DNA

PEG – polyethylenglykol, číslo následující za zkratkou PEG udává průměrnou molární hmotnost v g/mol

PGA – polymer kyseliny poly- $\gamma$ -glutamové

RCSB PDB – „Protein Data Bank“

SDS-PAGE – elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného

TASCIMATE – směs solí organických kyseliny: 1,8305 M kyselina malonová, 0,25 M triammonium citrát, 0,12 M kyselina jantarová, 0,3 M kyselina D- $\alpha$ -jablečná, 0,4 M trihydrát octanu sodného, 0,5 M mravenčan sodný a 0,16 M diamonný vinan

Tris – tris(hydroxymethyl)aminomethan