

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**

Krystalizačně-strukturní studie bakteriofágového lysinu ECD7

Bakalářská práce

Žaneta Reindlová

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

Konzultant: Mgr. Tatyana Prudnikova, Ph.D.

České Budějovice 2020

Reindlová Ž., 2020: Krystalizačně-strukturní studie bakteriofágového lysinu ECD7. [Crystallization-structural study of bacteriophage lysin ECD7. Bc. Thesis, in Czech.] – 54 p. Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation

This bachelor thesis is focused on the crystallization of newly acquired bacteriophage lysine ECD7. Bacteriophage lysine ECD7 could be one of a new alternative class of antibacterial agents possibly used against infectious diseases. The main goal of this work was to manage the basic crystallization methods, then apply them for crystallization of ECD7 lysine and produce a suitable crystals for X-ray diffraction analysis. Data from X-ray diffraction analysis will help clarify the structure and function of ECD7 lysine.

Prohlášení

Prohlašuji, že svojí 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 20. 5. 2020

.....

Žaneta Reindlová

Poděkování

Děkuji své školitelce prof. Mgr. Ivaně Kuté Smatanové, Ph.D. za příkladné vedení bakalářské práce, odborné a cenné rady a připomínky. Také bych chtěla poděkovat konzultantce Mgr. Tatyňce Prudnikové, Ph.D. za ochotné a trpělivé vedení celé praktické části.

Obsah

| | | |
|-------------|---|-----------|
| 1 | Úvod | 1 |
| 2 | Cíl práce | 2 |
| 3 | Literární přehled | 3 |
| 3.1 | Krystalizace – obecný úvod | 3 |
| 3.2 | Struktura proteinů | 3 |
| 3.3 | Makromolekulární databáze | 4 |
| 3.4 | Proces krystalizace | 5 |
| 3.5 | Fázový diagram | 6 |
| 3.6 | Faktory ovlivňující růst krystalů | 7 |
| 3.6.1 | Teplota | 8 |
| 3.6.2 | pH | 8 |
| 3.6.3 | Čas | 8 |
| 3.6.4 | Koncentrace | 8 |
| 3.6.5 | Krystalizační činidlo | 8 |
| 3.7 | Pre-krystalizační test | 9 |
| 3.8 | Krystalizační metody | 9 |
| 3.8.1 | Metody založené na difúzi par | 9 |
| 3.8.2 | Mikrokrystalizace pod olejem | 11 |
| 3.8.3 | Metody založené na dialýze | 12 |
| 3.8.4 | Metoda volné difúze | 13 |
| 3.8.5 | Dávková krystalizace | 14 |
| 3.9 | Očkovací techniky | 14 |
| 3.9.1 | Mikroočkování | 14 |
| 3.9.2 | Makroočkování | 15 |
| 3.10 | Výsledky krystalizačních experimentů | 15 |

| | |
|--|----|
| 3.11 Testování krystalů | 16 |
| 3.11.1 Test drcením | 16 |
| 3.11.2 Dehydratační test | 16 |
| 3.11.3 Barvicí test | 17 |
| 3.11.4 Gelová elektroforéza | 17 |
| 3.11.5 Rentgenová difrakční analýza | 17 |
| 3.12 Modelový protein | 18 |
| 3.13 Bakteriofágové lysiny | 18 |
| 4 Materiál a metody | 21 |
| 4.1 Krystalizace lysozymu | 21 |
| 4.1.1 Vlastní krystalizace | 21 |
| 4.2 Krystalizace ECD7 | 25 |
| 4.2.1 Získání ECD7 | 25 |
| 4.2.2 Vzorek ECD7 | 26 |
| 4.2.3 Vlastní krystalizace | 26 |
| 4.2.4 Testování krystalů | 30 |
| 4.2.5 Difrakční data | 30 |
| 5 Výsledky | 32 |
| 5.1 Výsledky krystalizace lysozymu | 32 |
| 5.1.1 Výsledky metody sedící kapky | 32 |
| 5.1.2 Výsledky metody visící kapky | 33 |
| 5.1.3 Výsledky mikrokrystalizace pod olejem | 33 |
| 5.1.4 Výsledky volné difúze v kapiláře | 34 |
| 5.2 Výsledky krystalizace ECD7 | 34 |
| 5.2.1 Výsledky metody sedící kapky, 96 jamek | 35 |
| 5.2.2 Výsledky metody sedící kapky, 24 jamek | 40 |
| 5.2.3 Výsledky testování krystalů | 41 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 5.2.4 | Výsledky rentgenové difrakční analýzy | 42 |
| 6 | Diskuse | 43 |
| 7 | Závěr | 45 |
| 8 | Seznam literatury | 46 |
| 9 | Přílohy | 49 |

1 Úvod

Proteiny jsou makromolekuly nebo také biomolekuly, skládající se z 22 základních aminokyselin. Proteiny plní nejen v organismu celou řadu důležitých funkcí a jsou tak pro život nezbytné.

Jedním z nejlepších a nejspolehlivějších způsobů, jak určit trojrozměrnou strukturu studovaného proteinu, a získat tak o něm důležité informace, je rentgenová difrakční analýza. Aby vůbec mohla být tato metoda použita, je důležité vytvořit kvalitní krystal. K vytvoření kvalitního krystalu vede dlouhá a náročná cesta, která je ovlivněna mnoha faktory. Pokud se podaří kvalitní krystal vytvořit, může to vést k objasnění struktury a také funkce daného proteinu. Poznání struktury a funkce proteinu má význam v mnoha oborech, zejména v medicíně, průmyslu a zemědělství, dále nachází uplatnění v molekulární biologii, enzymologii, farmakologii a dalších oborech.

Teoretická část bakalářské práce popisuje obecně proteiny a principy a postupy krystalizace. Dále pojednává o faktorech ovlivňujících krystalizaci makromolekul, široké škále krystalizačních metod, očkovacích technikách a testování získaných krystalů s důrazem kladeným na rentgenovou difrakční analýzu. Rentgenová difrakční analýza poskytuje informace o strukturách látek. Struktury proteinů jsou získávány díky difrakci světla na jejich krystalové mřížce a výsledkem analýzy je difrakční záznam. Práce dále krátce pojednává o modelovém proteinu, lysozymu, vhodnému pro osvojení si krystalizačních metod. Nakonec popisuje důležitost bakteriofágových lysinů jako možné náhrady antibiotik, v době, kdy dochází k šíření rezistence vůči antibiotikům. Protein ECD7 je nově izolovaný lysin s těmito vlastnostmi a jeho krystalizace a následné řešení struktury pomocí rentgenové difrakční analýzy je důležité pro další výzkum, zda je jako náhrada za antibiotika vhodný. Díky znalosti jeho struktury je možné určit jeho funkci a chování.

V praktické části bakalářské práce je popsán postup krystalizace modelového proteinu lysozymu, na kterém byly zkoušeny různé metody krystalizace. Dále je popsána krystalizace lysinu ECD7 v širokém rozsahu podmínek a následně optimalizace vybraných podmínek, nejlepších pro krystalizaci tohoto proteinu. V poslední řadě jsou zde uvedeny výsledky rentgenové difrakční analýzy.

2 Cíl práce

Cílem 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 ECD7 v difrakční kvalitě
- Otestovat připravené krystaly a pokusit se získat difrakční data

3 Literární přehled

3.1 Krystalizace – obecný úvod

Biomolekulární krystalografie je věda zabývající se zjišťováním struktur biologických molekul (proteiny, nukleové kyseliny, polysacharidy a lipidy)^{1,2}. Biomolekulární krystalografie započala kolem poloviny třicátých let v anglickém Cambridge a Oxfordu. Vzhledem k praktickým a teoretickým výzvám, jen málokdo v té době mohl předpovídat obrovský dopad biomolekulární krystalografie na oblast strukturální biologie. V dnešní době je rentgenová krystalografie prováděna rutinně a poskytuje detailní rozlišení struktury na téměř atomové úrovni¹.

Získání stabilního monokrystalu je první krok nezbytný pro rentgenovou strukturní analýzu proteinu. Krystalizace proteinu je především proces pokus-omyl, ve kterém je protein pomalu srážen z jeho roztoku. Výskyt nečistot, krystalizační jádra a další neznámé faktory hrají významnou roli v tomto procesu. Obecným pravidlem krystalizace je, čím čistší protein, tím větší šance vzniku a růstu krystalů. Požadavky na čistotu proteinu krystalografa jsou odlišné, a hlavně přísnější než například požadavky biochemika³.

Tvorba krystalů závisí na mnoha faktorech: termodynamických, kam řadíme např. rozpustnost látky a kinetických, kterými jsou nukleace a následný růst krystalů. Růst krystalů je v podstatě fázová přeměna, kdy se z kapaliny stává pevná látka. Abychom dosáhli růstu krystalů, musíme vytvořit přesycený roztok, který je klíčem k precipitaci nebo vytvoření stabilních krystalických jader².

3.2 Struktura proteinů

První modely struktur proteinů získané z krystalografických dat byly odvozeny v padesátých letech dvacátého století průkopníky jako Max Perutz, John Kendrew a dalšími krystalografy z výzkumné laboratoře Cavendish Laboratory v Cambridge a Oxford¹.

Proteiny jsou velmi rozmanité, co se jejich struktury a funkce týče. Proteiny vykonávají základní a velmi rozdílné funkce v živé buňce. Regulují transkripci DNA, udržují integritu genomické informace, zajišťují enzymatické reakce v metabolických drahách, syntetizují a degradují další proteiny a metabolizují xenobiotika. Membránové proteinové receptory poskytují mechanismy pro přenos informací mezi buňkami a jejich prostředím v komplexu signálních drah. Další proteiny se aktivně účastní molekulárního transportu a jiné také tvoří

strukturu buňky. Toto široké spektrum funkcí je možné díky strukturálnímu uspořádání proteinů v různých, funkčně-specifických, trojrozměrných strukturách¹.

Proteiny jsou složeny z polypeptidových řetězců skládajících se z 22 různých proteinogenních L- α -aminokyselin. Dvacet z těchto aminokyselin jsou běžnými stavebními kameny na rozdíl od selenocysteinu a pyrrolysin, které jsou vzácné¹. Aminokyseliny jsou organické sloučeniny obsahující dvě funkční skupiny, amin (-NH₂) a karboxyl (-COOH) a postranní řetězec⁴. Každá aminokyselina se liší svým postranním řetězcem. Právě odlišnost postranních řetězců vede k mimořádné rozmanitosti ve funkcích proteinů¹. Proteinové struktury mají velikost od desítek do několika tisíc aminokyselin⁵.

Sekvence různých aminokyselin v peptidovém řetězci, začínající na N-konci, se nazývá primární struktura proteinu. Ve většině případů sekvence kompletně určuje způsob, jakým bude protein složen do trojrozměrné struktury. Během procesu skládání, prvky specifické sekundární struktury obecně tvoří buď α -helix nebo β -skládaný list. Prostorové uspořádání prvků sekundární struktury definuje strukturu terciární neboli trojrozměrnou. Uvnitř konformačního prostoru trojrozměrné struktury lze rozeznat odlišné strukturální motivy a domény společné mezi strukturami. Nakonec, biologicky aktivní jednotka je v mnoha případech větší homo-oligomer stejného proteinu nebo hetero-oligomer, resp. komplex odlišných proteinů. Uspořádání podjednotek definuje kvartérní strukturu¹.

3.3 Makromolekulární databáze

Modely proteinových struktur získané experimentální rentgenovou krystalografií nebo NMR (nukleární magnetickou rezonancí) jsou uloženy ve formě datových souborů. Autoritativní veřejné úložiště a archiv pro tyto experimentálně získané datové soubory se nazývá PDB (the Protein Data Bank). Archivy PDB obsahují atomové souřadnice, bibliografické citace, informace o primárních a sekundárních strukturách, stejně jako krystalografické struktury a NMR experimentální data. Kromě sběru dat, poskytuje PDB ověřovací služby, odkazy na další databáze a také řadu analytických nástrojů a prohlížečů struktur. Ale PDB není zodpovědná za správnost uložených dat. Tato zodpovědnost je na krystalografovi, který data vkládá¹.

PDB byla založena jako první digitální datový zdroj s otevřeným přístupem. Dnes je předním globálním zdrojem pro experimentální data, která jsou ústřední pro vědecké objevy. Prostřednictvím internetového informačního portálu a archivu dat ke stažení poskytuje PDB přístup k 3D strukturálním datům pro velké biologické molekuly (proteiny, DNA a RNA).

Znalost 3D struktury biologických makromolekul je nezbytná pro pochopení jejich úlohy v oblasti zdraví a nemoci lidí a zvířat a jejich funkce v rostlinách⁶.

3.4 Proces krystalizace

Postup, který vede k tvorbě krystalů, je složen ze tří fází, a to z nukleace, růstu a ukončení růstu krystalů.

Pokud koncentrace proteinu překročí limit rozpustnosti, roztok se přesycuje. V tomto bodě protein začíná agregovat. Agregace probíhá ve dvou fázích - nukleace a růst. Během nukleace se proteinové molekuly spojí do stabilního komplexu jako amorfní sraženina nebo jako mikrokristaly. K tomuto spojení ale dochází pouze při vhodné orientaci molekul. Amorfní sraženiny mají tendenci převládat, když je koncentrace proteinu značně nad saturací^{2,7}.

Po fázi nukleace následuje růst krystalů. Vhodně orientované molekuly začínají interagovat s povrchem zárodku, tento proces je tedy dynamický. Rychlost fáze růstu krystalů závisí na rychlosti uspořádání molekul na povrchu a také jejich přesunu z objemu roztoku do zóny růstu krystalů. Pomalý přesun často nevede ke vzniku krystalů a roztok zůstává čirý. Rychlý přesun vede ke vzniku drobných krystalických jader, která rostou příliš rychle a výsledkem jsou drobné a poruchové krystaly. K získání ideálních krystalů potřebujeme, aby z malého množství stabilních krystalických jader docházelo k jejich růstu volnou rychlostí. Mimo to mohou růst krystalů také ovlivnit změny fyzikálně-chemických podmínek².

Následující a poslední fází je zastavení růstu krystalů. Za nepříznivých podmínek může dojít k vytvoření nekystalického gelu, amorfního precipitátu nebo roztok zůstane čirý. V opačném případě dojde k vytvoření krystalů, které mohou mít různou podobu. Také může dojít ke vzniku velkého množství drobných krystalků nebo ke vzniku velkých multikrystalických agregátů jako jsou například drobné větvičkové útvary připomínající sněhové vločky nazývané dendrity nebo tenké jehličkovité útvary zvané sferulity. Malé krystaly mohou svým pomalým růstem a následným zvětšováním objemu poskytnout přijatelné vzorky pro rentgenovou difrakční analýzu².

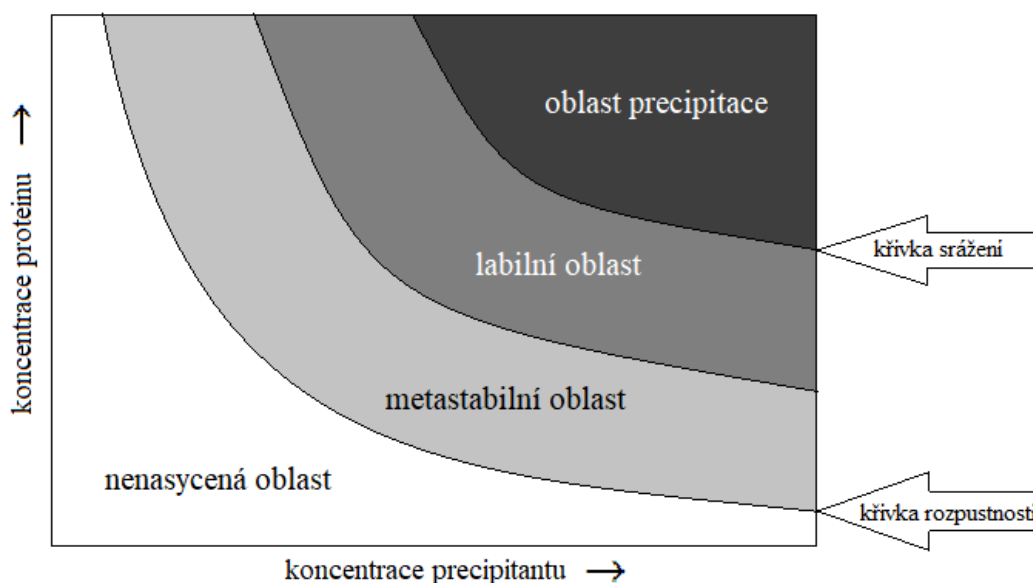
Velikost a kvalita krystalu závisí na vzniku prvních jader a následně na mechanismu jejich růstu⁸.

3.5 Fázový diagram

Fázový diagram je graf reprezentující stav látek, např. pevné látky a kapaliny, v závislosti na podmínkách, např. teplotě a koncentraci⁹.

Pochopení sledu událostí jako je nukleace v průběhu krystalizace je jednodušší, pokud do termodynamického diagramu rozpustnosti proteinu přidáme informace kinetické. Porušení čisté podstaty termodynamické rovnováhy fázového diagramu přidáním poněkud orientačních informací o nukleaci zvýší naše povědomí o situaci během krystalizačního experimentu. Abychom rozlišili přidané modifikace od klasického termodynamického diagramu, nazveme tento diagram jednoduše fázový diagram krystalizace. Tyto diagramy nám pomáhají lépe pochopit proces, ke kterému v průběhu krystalizace dochází¹.

Na Obr. 1, inspirovaném Hampton Research, 2015 a samostatně vytvořeném pomocí programu malování od © 2019 Microsoft Corporation, je znázorněn obecný fázový diagram krystalizace. V roztoku proteinu nalezneme náhodně orientované molekuly obklopené rozpouštědlem (voda a molekuly precipitantu). Interakce mezi proteinem a rozpouštědlem jsou silnější než mezi molekulami proteinu navzájem. V nenasycené oblasti je roztok jednofázový a stabilní. Po překročení křivky rozpustnosti se roztok stává přesyceným a tato oblast se nazývá metastabilní¹⁰. V metastabilní fázi nemůže docházet k formování krystalizačních jader, ale krystaly mohou růst. Další oblast se nazývá labilní. V této oblasti je roztok také přesycený, může docházet k formování krystalizačních jader a růstu krystalů. Po překročení křivky srážení se dostáváme do oblasti precipitace. V této oblasti nedochází ani k formování jader ani růstu krystalů⁸.



Obrázek 1: Fázový diagram krystalizace proteinů, (vytvořeno autorkou)

3.6 Faktory ovlivňující růst krystalů

V Tab. I, inspirované McPherson, 1999 a samostatně vytvořené pomocí programu MS Excel, jsou prezentovány fyzikální, chemické a biochemické faktory, které více či méně ovlivňují krystalizaci makromolekul. Každá makromolekula má jiné vlastnosti, a to platí, i když se neliší o více než jen jednu aminokyselinu. Je mnoho případů, kdy identický protein připravený odlišným způsobem nebo v jiný čas vykazoval odlišné výsledky. Faktory se tedy mohou pro jednotlivé proteiny významně lišit¹⁰.

Protože je každý protein unikátní, je skoro nemožné předpovědět konkrétní postup nebo určit nejvýhodnější podmínky pro jeho krystalizaci. Variace parametrů ovlivňujících krystalizaci nejsou na sobě nezávislé a jejich vzájemné vztahy mohou být složité a těžko rozeznatelné. Není tedy snadné zjistit vhodné podmínky pro fyzikální faktory nebo složení matečného roztoku pro zvýšení pravděpodobnosti vykrytalizování konkrétního proteinu. Specifické složky a podmínky proto musí být pečlivě zjištěny a definovány pro každý protein individuálně¹⁰.

Tabulka I: Faktory ovlivňující krystalizaci⁶

| Fyzikální | Chemické | Biochemické |
|---------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|
| Teplota | pH | Čistota makromolekul |
| Postup k rovnováze | Typ rozpouštědla | Ligandy, inhibitory |
| Gravitace | Koncentrace rozpouštědla | Stádium agregace makromolekul |
| Tlak | Iontová síla | Posttranslační modifikace |
| Čas | Iontový charakter | Zdroj makromolekul |
| Vibrace/zvuk/mechanické poruchy | Stupeň přesycení | Proteolýza/hydrolýza |
| Elektrické/magnetické pole | Reduktivní/oxidativní prostředí | Chemické modifikace |
| Nevodivé vlastnosti média | Koncentrace makromolekul | Genetické modifikace |
| Viskozita média | Nečistoty | Stabilita makromolekul |

Dále jsou popsány vybrané konkrétní faktory, které je snadné kontrolovat a upravovat dle potřeby.

3.6.1 Teplota

Rozpustnost proteinu s teplotou klesá nebo stoupá. Statistiky ukázaly, že mnoho proteinů krystalizuje při pokojové teplotě nebo při 4°C. Důvod výběru specifické teploty je historický. V současné době není prokázána žádná celková výhoda pro jednu specifickou teplotu krystalizace. Avšak, individuální proteiny krystalizují při určité teplotě a nižší teplota je výhodnější pro pomalý růst krystalů¹.

3.6.2 pH

S výjimkou koncentrace srážedla, jednou z nejdůležitějších proměnných, která má být zkoumána při hledání krystalizačních podmínek je pH. Vliv pH se zvyšuje se snížením iontové síly. Sledování podmínek by mělo být prováděno v takovém rozsahu, aby nebyla porušena integrita nebo aktivita makromolekul, ale také aby bylo rozmezí co nejširší¹⁰.

3.6.3 Čas

Čas potřebný k vytvoření velkých monokrystalů se může velice lišit od několika hodin po několik měsíců a jsou známé případy, kdy byly krystaly pozorovány až po roce i více. Pokud krystalizace probíhá z koncentrovaného solného roztoku, požadovaný čas pro objevení viditelných krystalů je relativně krátký, několik dnů, týdnů¹⁰.

3.6.4 Koncentrace

Jedním z nejméně pochopených parametrů, který je zvažován při růstu makromolekulárních krystalů, je vhodná koncentrace proteinu. V tomto ohledu existují dva důležité cíle při získávání vhodných krystalů pro rentgenovou difrakční analýzu. Prvním je nejprve identifikovat podmínky, které poskytnou krystaly, bez ohledu na jejich kvalitu a za druhé, získání krystalů ve vynikající kvalitě vhodné pro sběr dat s vysokým rozlišením. Pro tyto dva cíle se výběr parametru může lišit a koncentrace proteinu je jedním z nich¹⁰.

3.6.5 Krystalizační činidlo

Volba vhodného krystalizačního činidla je dalším důležitým parametrem. Krystalizační činidlo narušuje vazby v proteinu a umožňuje tak vytvoření uspořádaných krystalů¹¹. Krystalizační činidla mohou být podle způsobu působení rozděleny do 4 skupin. První skupinou jsou soli (NaCl, MgCl₂), druhou organická rozpouštědla (ethanol, methanol, aceton,

glukosa atd.), dále organická rozpouštědla tvořící polymery (polyethylenglykol) a poslední jsou povrchově aktivní látky¹².

3.7 Pre-krystalizační test

Významnou proměnnou krystalizace je koncentrace vzorku proteinu. Vzorek s vysokou koncentrací může způsobit vznik amorfni sraženiny, a naopak příliš zředěný vzorek nevede ke vzniku krystalů a kapka zůstává čirá. Pro výběr a optimalizaci vhodné koncentrace proteinu se proto před samotnou krystalizací provádí pre-krystalizační test¹³.

Pro pre-krystalizační test je využívána PCT sada poskytovaná společností Hampton Research (USA). PCT sada obsahuje 4 unikátní činidla pro určení vhodných podmínek pro daný protein. Protein je nejprve smíchán s prvními dvěma činidly, která určí, zda je protein ve vhodné koncentraci pro krystalizační účely. Pokud je protein citlivý na koncentraci soli a polymeru na základě výsledků z prvních dvou činidel, použijí se pro vyhodnocení druhá dvě činidla⁸.

3.8 Krystalizační metody

Po seznámení s faktory ovlivňujícími krystalizaci je důležité prozkoumat praktické provádění experimentu a vybrat nejvíce efektivní metodu pro krystalizaci. Při všech metodách je proteinový roztok kombinován, nejčastěji v poměru 1:1, s krystalizačním srážedlem a umístěn v uzavřeném systému. Bylo vyvinuto mnoho různých krystalizačních technik, kde každá má své výhody i nevýhody v závislosti na konkrétním provedení a typu prostředí¹.

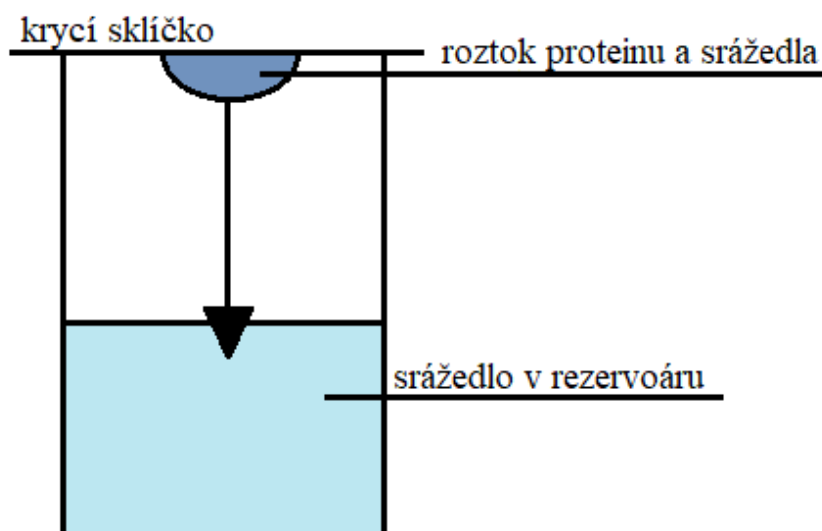
3.8.1 Metody založené na difúzi par

Nejběžnější krystalizační technikou v laboratoři je metoda založená na difúzi par. Jak název napovídá, metoda difúze par využívá pomalého šíření vodní páry, a dalších těkavých složek, z kapky proteinového roztoku do zásobního rezervoáru se srážedlem o vyšší koncentraci, čímž se roztok dostane do stavu přesycení a tím je umožněna krystalizace. U této metody se využívá např. formát 24 jamkových destiček Linbro potažených silikonovanými krycími sklíčky¹. Metoda difúze par může být provedena následujícími způsoby:

- Metoda visící kapky

Při metodě visící kapky je kapka proteinového roztoku nanášena na krycí sklíčko a smíchána s přibližně stejným množstvím krystalizačního roztoku z rezervoáru. Kolem

okraje rezervoáru je nanosen silikon. Krycí sklíčko s nanesenou kapkou se převrácením přenesse nad rezervoár a pomocí silikonu dojde k utěsnění. Vznikne uzavřený systém, ve kterém dochází k vodní difúzi par z visící kapky do rezervoáru. Tato metoda je standartní v mnoha malých laboratořích a její aplikace je jednoduchá¹. Schéma metody visící kapky, inspirované Rupp a samostatně vypracované pomocí programu malování od © 2019 Microsoft Corporation, je znázorněno na Obr. 2.

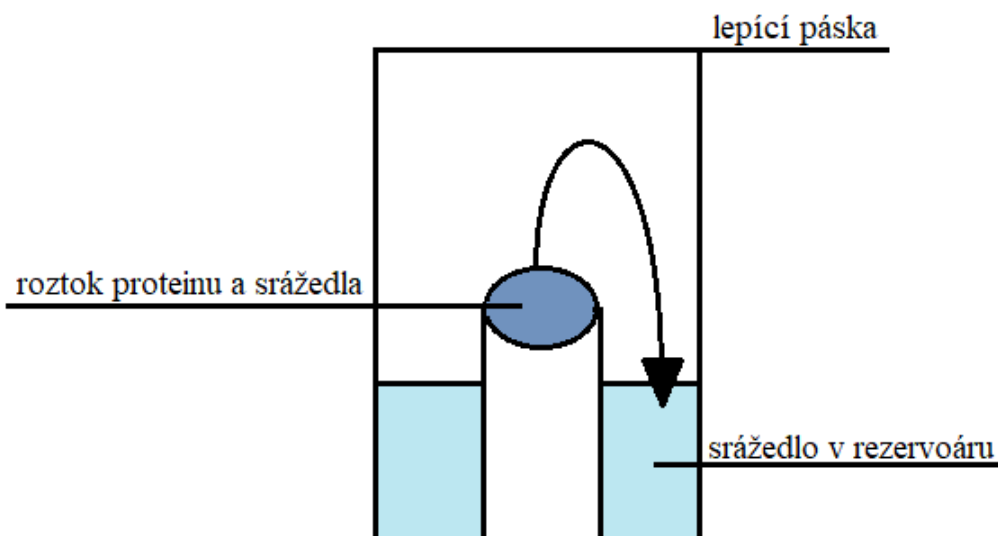


Obrázek 2: Schéma metody visící kapky, (vytvoreno autorkou)

Jednou z nevýhod této metody je vysoká cena silikonovaných krycích sklíček. Další nevýhodou je možnost, že se snížením povrchového napětí dojde k rozšíření nebo dokonce sklouznutí kapky po jejím otočení. Mezi nevýhody také patří nutnost mazání okrajů k utěsnění jamek a velká, nestandardní velikost destiček. K výhodám patří snadná manipulace s krystaly nebo po přidání např. ligandu do kapky její znovu uzavření nad stejný rezervoár¹.

- Metoda sedící kapky

Metoda sedící kapky je založena na stejném principu jako metoda kapky visící s tím rozdílem, že u této metody je kapka usazena do vyvýšené jamky umístěné nejčastěji uprostřed rezervoáru s precipitantem. U této metody tedy není potřeba nanosení silikonu k utěsnění a ani jednotlivých krycích sklíček k uzavření jednotlivých soustav¹. K izolaci destičky se využívá lepicí páska. Schéma metody sedící kapky, inspirované Rupp a samostatně vypracované pomocí programu malování od © 2019 Microsoft Corporation, je znázorněno na Obr. 3.

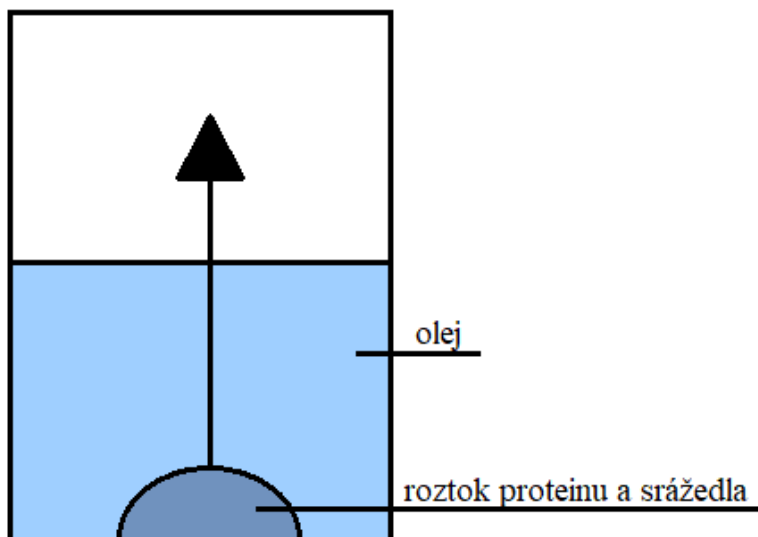


Obrázek 3: Schéma metody sedící kapky, (vytvořeno autorkou)

Technika sedící kapky je populární metodou pro krystalizaci makromolekul. Kapka složená ze směsi vzorku a srážedla je umístěna do rovnováhy s kapalným zásobníkem srážedla. Kapka má zpravidla nižší koncentraci než srážedlo v rezervoáru. Vodní pára se vypařuje z kapky do rezervoáru, a jak k tomuto dochází, vzorek se stává relativně přesyceným. Rovnováhy je dosaženo v momentě, kdy je koncentrace srážedla v kapce stejná jako koncentrace srážedla v rezervoáru⁴. Výhodou této metody oproti metodě předchozí je, že je kapka umístěna ve stabilní poloze, ale nevýhodou může být obtížnější přístup ke krystalům^{1,8}.

3.8.2 Mikrokrystalizace pod olejem

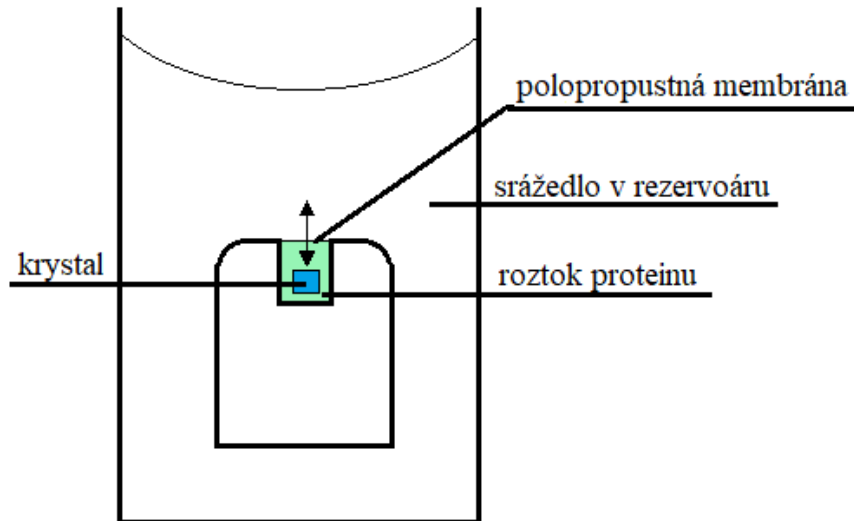
U mikrokrystalizace pod olejem je malá kapka proteinového roztoku smíchána s částí krystalizačního koktejlu a pipetována pod povrch krystalizační destičky pokryté olejem. Kapka poté klesá na dno a je tak izolována od prostředí¹. Běžně jsou využívány minerální oleje rozvětvených parafinů v rozsahu C_{20}^+ , které umožňují pouze malou až žádnou difúzi vody pod olejem. Při srážecích nebo mikrosrážecích experimentech, všechna činidla podílející se na krystalizaci jsou přítomna ve specifické koncentraci⁸. Schéma metody mikrokrystalizace pod olejem, inspirované Rupp a samostatně vypracované pomocí programu malování od © 2019 Microsoft Corporation, je znázorněno na Obr. 4.



Obrázek 4: Schéma mikrokrystalizace pod olejem, (vytvořeno autorkou)

3.8.3 Metody založené na dialýze

Jiný způsob snížení nebo zvýšení koncentrace činidel je založený na dialýze. Dialýza je vhodná pro pěstování velkých krystalů¹. Při dialýze je vzorek oddělen od srážedla pomocí polopropustné membrány. Tato membrána povoluje průchod malým molekulám (soli, přísady a další krystalizační činidla), ale biologickým makromolekulám v průchodu brání. Dochází k difúzi srážedla do vzorku, ale ne ze vzorku, a tím se koncentrace vzorku nemění. Pro dialýzu se využívá dialyzační knoflík. Vzorek proteinu se nanáší do dialyzačního knoflíku, ten je umístěn do roztoku srážecího činidla a díky polopropustné membráně dochází k průniku krystalizačního činidla nebo jiných látek s malou molekulovou hmotností dovnitř⁸. Schéma dialyzační metody, inspirované Rupp a samostatně vypracované pomocí programu malování od © 2019 Microsoft Corporation, je znázorněno na Obr. 5.

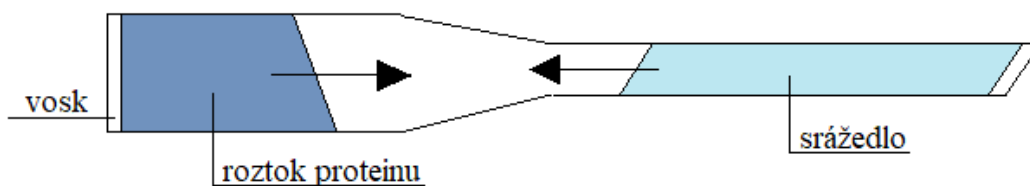


Obrázek 5: Schéma metody založené na dialýze, (vytvořeno autorkou)

3.8.4 Metoda volné difúze

Základem volné difúze je přivést roztok proteinu a srážedla do kontaktu v úzké nádobě bez předchozího smíchání a ponechat vyrovnání komponent pouze na difúzi. Největším rozdílem oproti předchozím metodám je, že se koncentrační profily proteinu a srážedla mění různým způsobem napříč různými místy v systému a v rozdílných časech. V zásadě je pokrytí fázového prostoru u volné difúze komplexnější než v prostorově homogenním systému. Například, při prvním kontaktu roztoku proteinu s roztokem srážedla s vysokými koncentracemi vznikne vysoce přesycený roztok, což je výhodné pro započítí nukleace. Během experimentu dochází k vyrovnání difúzních profilů a ke snížení přesycení, což je dobré pro kontrolovaný růst¹.

K realizaci volné difúze se využívá kapilára, kdy se jeden konec kapiláry naplní srážedlem, do druhého se nanese vzorek roztoku proteinu a oba konce se uzavřou voskem, aby nedocházelo k úniku roztoku a vytvořila se uzavřená soustava. Schéma metody volné difúze, inspirované Rupp a samostatně vypracované pomocí programu malování od © 2019 Microsoft Corporation, je znázorněno na Obr. 6.



Obrázek 6: Schéma metody volné difúze, (vytvořeno autorkou)

3.8.5 Dávková krystalizace

Dávková krystalizace je jednou z nejstarších a nejjednodušších metod proteinové krystalizace². Při dávkové krystalizaci jsou roztok proteinu a srážedla v relativně vysoké koncentraci smíchány přímo, aby vytvořily přesycený roztok, ten je izolován a ponechán v klidu, zatímco pozvolna dochází k rovnováze¹. S trochou štěstí poté rostou krystaly přímo z přesyceného roztoku bez dalších procesů³.

3.9 Očkovací techniky

Nejběžněji používané techniky používané pro optimalizaci a zvýšení kvality krystalů jsou očkovací techniky. Lze je použít v případě heterogenní nukleace při nízkém přesycení, kde pomalý růst je optimální pro formování difrakčních krystalů, ale spontánní nukleace je nepravděpodobná. Existují dvě obecné metody očkování, mikroočkování a makroočkování¹.

3.9.1 Mikroočkování

Mikroočkování spočívá v tom, že pár malých fragmentů krystalů, ne nutně dobře zformovaných, ale často z původně získaných anizotropních jehel, krystalických klastrů nebo sfeluritů, je zavedeno do krystalického roztoku s nižším přesycením, než je nutné pro spontánní nukleaci. Přítomnost heterogenních nukleacních zárodků v krystalizačním roztoku s nízkým přesycením, kde spontánní nebo homogenní nukleace nenastala, je přijatelným prostředím pro úspěch očkovacích technik. Dalším mechanismem může být epitaxiální růst na povrchu již existujícího krystalu, ale také odlišné materiály, jako kousky nebo broušené sklo, mohou být použity pro očkování a snížit tak důležitost epitaxe v mikroočkování. Denaturovaný protein a jiné cizí látky mohou vyvolat nadměrnou nukleaci, a to je důvodem odstředování proteinového roztoku před zahájením krystalizačních pokusů¹.

Při mikroočkování se zředěná série rozdrčených krystalických fragmentů nebo jiných částic, jako mleté sklo, zavede do nové krystalizační kapky se sníženým přesycením, obsahuje méně srážedla nebo méně proteinu. Populární je technika nazývaná vlasové očkování, kde tenký vlásek nebo vlákno přejíždí skrz krystalizační zárodek nebo zárodečný krystalizační roztok a poté je přeneseno do nové kapky. Nové krystaly pak často rostou ve směru vlákna obsahujícího jádra. Mikroočkování může být také využito při automatickém rozkopávání na robotu, kdy se nastaví čas přidání zředěného roztoku rozdrčených krystalů do kapek. Výsledky jsou slibné, ve srovnání s neočkovacími kontrolovanými technikami se objevilo více krystalů¹.

3.9.2 Makroočkování

Při makroočkování se na rozdíl od mikroočkování přenáší pouze jeden, ale už dobře tvarovaný krystal, který je pouze moc malý. Tento krystal je přenesen do nového krystalizačního roztoku identického srážedla ve snaze ho "vykrmit" do difrakční velikosti. Provádí se to z důvodu, kdy se růst krystalu zastaví z nedostatku materiálu, umístění krystalu do nového čerstvého roztoku pak jeho další růst umožní. Makroočkování na rozdíl od mikroočkování vyžaduje podstatně více dovedností a automatizace nemůže být tak snadno provedena¹.

3.10 Výsledky krystalizačních experimentů

Krystaly jsou pozorovány pod stereomikroskopem vybaveným digitálním fotoaparátem. Důležité je správné osvětlení krystalizačních jamek, nejčastěji bývají osvětlovány z boku. Pro frekvenci pozorování platí obecné pravidlo, že čím jsou kapky menší, tím častěji musí být kontrolovány¹. Během prvního týdne je vhodné pozorovat kapky každý den, po dobu dalších třech týdnů jednou za týden a poté jednou měsíčně do té doby, než budou kapky obsahovat krystaly nebo nevyschnou⁸.

V destičce můžeme pozorovat několik případů, a to čirou kapku, amorfni materiál, precipitát, „kůži“, separaci fáze nebo krystaly⁸.

Čirá kapka neobsahuje krystaly, sraženiny, separaci fáze ani jiný nerozpustný výsledek. Číré kapky svědčí o tom, že přesycení nedosáhlo bodu přesycení a nemohlo tedy dojít k nukleaci a následnému růstu krystalů⁸.

Amorfni materiál zahrnuje vlákna, sklo, prach a kousky, které byly přítomny v destičce, vzorku nebo srážedle při přípravě experimentu a před jeho utěsněním. To by mělo být zaznamenáno ihned po dokončení experimentu, aby později nedošlo k záměně se sraženinou nebo mikrokrystaly⁸.

Precipitace se objevuje v mnoha formách a odstínech barev, ale nikdy nemá okraj. Žlutá nebo hnědá sraženina, často hustá a shluknutá značí denaturovaný protein, který nebude krystalizovat. Bílá sraženina, která je často amorfni, jemná a spíše slabá může svědčit o srážedle nebo rozloženém proteinu, který stále může vykristalizovat⁸.

„Kůže“ v kapce může svědčit o oxidovaném nebo denaturovaném proteinu vytvořeném na rozhraní vzduch/olej/kapka a krystaly se v takových kapkách často neobjevují. Kůži je možné odstranit sondou a experiment může pokračovat⁸.

Separace fáze se jeví jako několik velkých nebo mnoho malých kapiček. Pokud je tato fáze založena na proteinu, krystaly se mohou objevit uvnitř nebo na okraji kapiček. Pokud separace fáze není založena na proteinu, může se jednat o polymer, polyol nebo netěkavou organickou látku. Přítomnost nebo zmizení separace fáze může být závislé na teplotě⁸.

Krystaly se mohou objevit jako mikrokrystaly nebo mikrokrystalické sraženiny, jako jednodimenzionální jehly, dvourozměrné desky, trojrozměrné objekty nebo klastry, jehly, sferulity nebo různé geometrické tvary. Krystaly mají vždy hrany na rozdíl od sraženiny. Větší kapky mohou produkovat větší krystaly než menší kapky⁸.

3.11 Testování krystalů

Ke krystalizaci proteinu jsou využívány různá srážedla většinou s nižší koncentrací, aby nedocházelo k jejich krystalizaci namísto proteinu. I přes to jsou známé soli, které se používají ve vyšších koncentracích a mohou tedy vykrystalizovat místo požadovaného proteinu, jsou to např. síran amonný nebo fosforečnan draselný. K jejich krystalizaci dochází především, pokud jsou tyto soli smíchány s precipitačními iontovými pufrů, tedy pufrů s Ca^{2+} nebo s organickými molekulami, jelikož mohou změnit rozpustnost jednotlivých komponent roztoku, který je určen ke krystalizaci. Na rozdíl od krystalů proteinů, krystaly solí vznikají a rostou rychleji. Pro rozeznání krystalů proteinů od krystalů solí existuje několik metod. Některé z těchto metod jsou spolehlivější než jiné a některé z nich lze použít pouze jednou, protože jsou destruktivní. Dále jsou prezentovány konkrétní metody, a to v pořadí podle jejich vzrůstající spolehlivosti².

3.11.1 Test drcením

Tento test je prováděn pod stereomikroskopem následujícím způsobem. Krycí sklíčko s krystalem je umístěno pod stereomikroskop a poté je krystal rozbit pomocí skleněné kapiláry. Pokud se jedná o krystal proteinu, už při slabém nárazu se rozpadne na mnoho malých krystalků. Krystaly solí se drtí obtížněji a rozpadají se na větší kusy².

3.11.2 Dehydratační test

Při tomto testu je krystal vyjmut z kapky pomocí kapiláry a ponechán na vzduchu. Krystaly proteinu se po krátké době na vzduchu rozpadnou. Naproti tomu krystaly solí zůstávají neporušené².

3.11.3 Barvicí test

Barvicí test je prováděn pomocí barviva zvaného IZIT. IZIT lze koupit od společnosti Hampton Research (USA) a je přidáván přímo do kapky. Po přidání barviva se krystaly proteinu zbarví modře a krystaly soli ne².

3.11.4 Gelová elektroforéza

Zde musí nejprve dojít k rozpuštění krystalů a poté se provádí jejich analýza pomocí SDS-PAGE elektroforézy. V případě, že se jedná o krystaly proteinu, na gelu se objeví proužky a je možné pozorovat i kvalitu proteinu. U krystalů soli k zachycení nedojde a roztok celým gelem pouze projde^{2,8}.

3.11.5 Rentgenová difrakční analýza

Hlavními složkami potřebnými pro sběr rentgenových difrakčních dat jsou zdroj rentgenového záření a rentgenový detektor. Rentgenové paprsky jsou elektromagnetické záření o vlnových délkách $10^{-7} - 10^{-11}$ m (1000 – 0,1 Å). Rentgenové záření bylo objeveno 8. listopadu 1895 Wilhelmem Conradem Roentgenem v německém Würzburgu. Povaha záření, ale nebyla plně pochopena a Roentgen ho nazval rentgenové paprsky. Kolem roku 1910 Max von Laue vyvinul teorii rentgenové difrakce, trojrozměrná mříž. Laueova difrakční teorie inspirovala jeho pomocníky, Friedricha a Knippinga k použití krystalu jako difrakční mřížky. Své výsledky publikovaly v roce 1912 a byly přímým důkazem existence mřížky v krystalu a vlnové povahy rentgenových paprsků³.

Rentgenová difrakční analýza poskytuje data pro řadu různých analýz, které umožňují kvantifikaci relativní kvality vypěstovaných krystalů za různých podmínek. Největší pozornost, pokud jde o stanovení struktury, je kladena na limit rozlišení a rozsah difrakčního obrazu. Výsledek může také záviset na kvalitě a čistotě vzorku použitého pro pěstování krystalů¹⁰.

Přístroj používaný ke sběru rentgenových dat se nazývá difraktometr. Difraktometr měří pozici (úhlové rozdělení) a intenzitu difrakčních rentgenových paprsků. Základními komponentami difraktometru jsou: Intenzivní zdroj silných rentgenových paprsků v rozsahu 5 – 25 keV, optika pro výběr monochromatických rentgenových paprsků a pro zaostření nebo kolimaci rentgenových paprsků, mechanické zařízení, nazývané goniostat, sloužící k orientaci krystalu v primárním rentgenovém záření a detektor difrakčních rentgenových paprsků. Dalšími komponentami, které podporují a zlepšují funkci difraktometru vhodného pro

proteinovou krystalografii, jsou: krzogenní zařízení, které udržuje krystaly nepřetržitě v proudu studeného plynného dusíku pro snížení radiačního poškození, zvětšovací jednotka zaměřená na střed difraktometru pro vyrovnaní krystalu v rentgenovém paprsku, dále fluorescenční detektor pro zaznamenávání rentgenového excitačního spektra pro optimální výběr vlnových délek (tato komponenta je využívána pouze u anomálních experimentů) a software pro sběr dat, který řídí goniostat a provádí primární zpracování prvotních dat z detektoru¹.

Nejběžnější metodou sběru dat v makromolekulární krystalografii je rotační metoda. Jedná se o jednoduchou rotaci krystalu kolem jedné osy o malé přírůstky, obvykle 0,1° až přibližně 1,5°, zatímco je krystal vystaven rentgenovým paprskům a odrazy jsou zaznamenávány detektorem. Dobrá difrakce znamená jednotlivé, dobře identifikované a silné skvrny rozprostírající se daleko v difrakčním úhlu s vysokým rozlišením. První snímek difrakce odhalí, do jaké míry krystal difraktuje, a to vede k rozhodnutí, zda krystal na difraktometru ponechat nebo ne. Obecné pravidlo, data s nízkým rozlišením, tedy > 4,0 Å, mohou být stále užitečná pro experimenty, ale často jsou nedostatečná k upřesnění kvalitního modelu. Pokud by se jednalo o krystal soli, bude detekováno jen několik, ale ostrých bodů v rozlišení větším než asi 10 Å z důvodu jejich mnohem menších buněk¹.

3.12 Modelový protein

Lysozym je antimikrobiální enzym, který produkují zvířata a je součástí jejich přirozeného imunitního systému¹⁴. Lysozym se hojně vyskytuje v sekretech, včetně slz, slin, mateřském mléce a hlenu. Velké množství lysozymu lze také nalézt ve vaječném bílku¹⁵.

Nejvhodnějším proteinem pro první krystalizační experiment je lysozym ze slepičího vaječného bílku. Lze jej získat komerčně v čisté formě, je levný a je možné ho okamžitě použít pro krystalizační experiment. Krystaly lysozymu mohou vyrůst už za jeden den³.

3.13 Bakteriofágové lysiny

Bakteriofágové lysiny jsou nové mureinové (peptidoglykanové) hydrolázy kódované dsDNA fágy v pozdní fázi infekčního cyklu pro uvolnění virionů. Tyto enzymy jsou obvykle druhově specifické a vysoce aktivní proti bakteriálním peptidoglykanům a jsou schopné narušovat buněčné stěny citlivých bakterií včetně Gram-pozitivních patogenů rezistentních vůči více lékům¹⁶.

S rostoucím celosvětovým rozšířením bakterií rezistentních vůči antibiotikům představují bakteriofágové endolysiny (lysiny) velmi slibnou alternativní třídu antibakteriálních látek v boji proti infekčním chorobám. Řada studií prokázala silný potenciál těchto enzymů v lidské a veterinární medicíně pro kontrolu a léčbu patogenů na sliznicích a při infekcích. Také mají potenciál v diagnostice a detekci, bio-obraně, eliminaci potravinových patogenů a kontrole fytopatogenů¹⁷.

Bakteriofágy (fágy) jsou považovány za všudypřítomné a odhaduje se, že jsou nejhojnějšími biologickými entitami na Zemi. Fágy jsou viry, které specificky infikují bakterie. Byly jako první objeveny v pre-antibiotické éře d'Herellem roku 1917, avšak jejich antibakteriální chování bylo popsáno již roku 1896 Hankinem a roku 1915 Twortem¹⁷.

Lysiny jsou fágové enzymy, které hydrolyzují bakteriální peptidoglykany¹⁸. Pokud mají tyto rekombinantní enzymy naplnit svůj potenciál jako antibakteriální látky, je důležité prozkoumat mnoho faktorů jako je jejich toxicita, imunogenita, účinnost, rezistence a synergie. Dosud bylo provedeno několik pokusů in vitro a in vivo s použitím různých lysinů a byly vyhodnoceny uvedené parametry. Toxicita: Bakteriofágy jsou nejhojnější formy života na planetě a vyvinuly se společně s bakteriemi před milionem let. Jelikož neinfikují savčí buňky, lysiny by neměly představovat potenciální toxickou hrozbu pro lidi a zvířata. Imunogenita: Jelikož jsou lysiny proteiny, jsou schopné stimulace imunitní reakce při podání. Rezistence: Výskyt bakterií rezistentních vůči lysinům je nepravděpodobný, protože fágy a bakterie se vyvinuli společně. Synergie: Studie prokázaly, že některé lysiny mohou pracovat v synergii s ostatními nebo s určitými antibiotiky¹⁷.

Bakteriofágové lysiny ve srovnání s antibiotiky vykazují několik vysoce žádoucích vlastností, které zahrnují nové antimikrobiální mechanismy, vysokou specifickou aktivitu vůči vícesložkovým rezistentním patogenům, stejně jako nízkou možnost vzniku rezistence. Modulární struktura lysinů poskytuje vysokou šanci pro vytvoření umělých lysinů s požadovanými vlastnostmi, které mohou obsahovat rozšířené „zabíjení“, vylepšenou „zabíjecí“ aktivitu a zlepšenou rozpustnost¹³. Bakteriofágové lysiny a příbuzné bakteriolytické enzymy jsou nyní považovány za kvalitní antibiotické alternativy při řešení problému rezistence na ATB¹⁹.

V době, kdy se rezistence vůči antibiotikům extrémně rychle rozšiřuje, se bakteriofágové lysiny stávají důležitou alternativou k ATB. Avšak je o nich zatím známo jen málo. Léky založené na bakteriofágových enzymech, jako jsou lysiny, spíše než samotné viry, mohou mít předvídatelnější výsledky. Bakteriofágové lysiny jsou enzymy kódované bakteriofágy, které štěpí peptidoglykany v buněčných stěnách bakterií. Během svého životního cyklu

bakteriofágy vylučují lysiny, aby dodávaly fágovou DNA do buněk během bakteriální infekce a uvolňovaly nové viriony z buněk. Mezi výhody lysinů patří jejich vysoká míra lytického působení, schopnost působit na bakteriální kmeny rezistentní vůči antibiotikům a degradace bakteriálních biofilmů a nízká pravděpodobnost vývoje bakteriální rezistence vůči lysinům. Široké spektrum aktivit endolysinů v porovnání s moderními antibiotiky by mohlo vyřešit jeden z primárních problémů spojených s užíváním bakteriofágů. Mohlo by to umožnit kompatibilitu terapií se stavem pacienta s akutními infekcemi a výsledek by byl předvídatelný i za podmínek, kdy není dostatek času na předběžné testování in vitro na rozdíl od léčiv na bázi bakteriofágů, kdy je jejich účinek nepředvídatelný a je nutné provedení testu in vitro před léčbou.

Pro studii aktivity lysinů proti širokému spektru gramnegativních bakterií proběhlo klonování třech endolysinů z rodiny bakteriofágů Myoviridae, LysAm24, LysECD7 a LysSi3. Vybrané enzymy představují lysiny s různou organizací domén, jedna doména vs. dvě domény a různým předpokládaným mechanismy působení²⁰.

4 Materiál a metody

Cílem této bakalářské práce bylo osvojit si krystalizační metody na modelovém proteinu lysozymu. Po zvládnutí základních i pokročilých krystalizačních metod bylo mým úkolem nalézt a optimalizovat krystalizační podmínky pro vykrystalizování bakteriofágového lysinu ECD7 a připravit krystaly v difrakční kvalitě, aby bylo možné tento protein otestovat pomocí rentgenové difrakční analýzy a získat difrakční data.

4.1 Krystalizace lysozymu

Pro krystalizaci lysozymu mi byly poskytnuty srážecí činidla chloridu sodného a roztoky lysozymu. Pro krystalizace lysozymu byly použity čtyři různé metody, a to metoda sedící kapky, metoda visící kapky, mikrokrystalizace pod olejem a metoda volné difúze.

Srážecí činidla chloridu sodného byla ve čtyřech různých koncentracích, 6 %, 8 %, 10 %, 12 % a 14 %. Příprava roztoku chloridu sodného probíhá rozpuštěním chloridu sodného v 0,1M roztoku octanu sodného o pH 4,7 a následným ředěním destilovanou vodou podle potřeby.

Roztok lysozymu byl použit v šesti různých koncentracích, 20 mg/ml, 25 mg/ml, 40 mg/ml, 60 mg/ml, 80 mg/ml a 100 mg/ml. Ředění koncentrovanějšího roztoku lysozymu na požadované hodnoty se provádí octanovým pufrem o pH 4,7.

4.1.1 Vlastní krystalizace

Pro provedení experimentu bylo použito: srážecí činidlo NaCl, naředěné roztoky lysozymu, krystalizační destičky pro metody sedící a visící kapky a mikrokrystalizaci pod olejem a kapiláry s voskem pro metodu volné difúze, automatické pipety, krycí sklička pro metodu visící kapky a krystalizační izolepu pro metodu sedící kapky.

- Metoda sedící kapky

Pro metodu sedící kapky byla použita krystalizační destička obsahující 24 jamek s rezervoárem, kde je v každém rezervoáru vyvýšenina pro usazení kapky. Rezervoáry byly naplněny 200 μ l srážecího roztoku NaCl pomocí automatické pipety a do jamek byly napipetovány 2 μ l lysozymu, ke kterým byly přidány 2 μ l srážecího roztoku NaCl z rezervoáru. Pro tuto krystalizaci byly použity čtyři vybrané koncentrace srážecího činidla NaCl, a to 6 %, 8 %, 10 % a 14 % a čtyři vybrané koncentrace roztoku lysozymu, 20 mg/ml,

40 mg/ml, 80 mg/ml a 100 mg/ml. Schéma krystalizační destičky je znázorněno v Tab. II. Po naplnění všech jamek byla krystalizační destička zakryta krystalizační izolepou a víčkem pro zamezení přístupu vzduchu. Krystalizační destička byla ponechána v laboratoři a experiment tedy probíhal při 20°C.

Tabulka II: Krystalizační destička metody sedící kapky pro lysozym

| Srážecí roztok NaCl | Lysozym [mg/ml] | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---------------------|-----------------|---|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| 6 % | 40 | A | 2 µl NaCl + 2 µl Lys. | 2 µl NaCl + 2 µl Lys. | 2 µl NaCl + 2 µl Lys. | 2 µl NaCl + 2 µl Lys. | 2 µl NaCl + 2 µl Lys. | 2 µl NaCl + 2 µl Lys. |
| 14 % | 80 | B | 2 µl NaCl + 2 µl Lys. | 2 µl NaCl + 2 µl Lys. | 2 µl NaCl + 2 µl Lys. | 2 µl NaCl + 2 µl Lys. | 2 µl NaCl + 2 µl Lys. | 2 µl NaCl + 2 µl Lys. |
| 10 % | 20 | C | 2 µl NaCl + 2 µl Lys. | 2 µl NaCl + 2 µl Lys. | 2 µl NaCl + 2 µl Lys. | 2 µl NaCl + 2 µl Lys. | 2 µl NaCl + 2 µl Lys. | 2 µl NaCl + 2 µl Lys. |
| 8 % | 100 | D | 2 µl NaCl + 2 µl Lys. | 2 µl NaCl + 2 µl Lys. | 2 µl NaCl + 2 µl Lys. | 2 µl NaCl + 2 µl Lys. | 2 µl NaCl + 2 µl Lys. | 2 µl NaCl + 2 µl Lys. |

- Metoda visící kapky

Krystalizační destička pro metodu visící kapky obsahuje 24 jamek s rezervoárem. Do každého rezervoáru bylo napipetováno 200 µl srážecího roztoku NaCl. Ke každé jamce je přiřazeno jedno krycí sklíčko. Na každé sklíčko byly nanесeny 2 µl roztoku lysozymu a přidány 2 µl srážecího roztoku NaCl z rezervoáru. Krycí sklíčko bylo umístěno nad rezervoár a upevněno pomocí silikonového tuku. Pro tento experiment byly vybrány čtyři koncentrace srážecího roztoku NaCl, a to 6 %, 8 %, 12 % a 14 % a šest koncentrací roztoku lysozymu, 20 mg/ml, 25 mg/ml, 40 mg/ml, 60 mg/ml, 80 mg/ml a 100 mg/ml. Schéma krystalizační destičky je znázorněno v Tab. III. Po dokončení přípravy krystalizační destičky byla zakryta víčkem a ponechána v laboratoři. Vlastní krystalizace probíhala při teplotě 20°C.

Tabulka III: Krystalizační destička metody visící kapky pro lysozym

| | | Lysozym [mg/ml] | | | | | |
|---------------------|---|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| | | 100 | 80 | 60 | 40 | 20 | 25 |
| Srážecí roztok NaCl | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| 14 | A | 2 μ l NaCl + 2 μ l Lys. | 2 μ l NaCl + 2 μ l Lys. | 2 μ l NaCl + 2 μ l Lys. | 2 μ l NaCl + 2 μ l Lys. | 2 μ l NaCl + 2 μ l Lys. | 2 μ l NaCl + 2 μ l Lys. |
| 6 | B | 2 μ l NaCl + 2 μ l Lys. | 2 μ l NaCl + 2 μ l Lys. | 2 μ l NaCl + 2 μ l Lys. | 2 μ l NaCl + 2 μ l Lys. | 2 μ l NaCl + 2 μ l Lys. | 2 μ l NaCl + 2 μ l Lys. |
| 12 | C | 2 μ l NaCl + 2 μ l Lys. | 2 μ l NaCl + 2 μ l Lys. | 2 μ l NaCl + 2 μ l Lys. | 2 μ l NaCl + 2 μ l Lys. | 2 μ l NaCl + 2 μ l Lys. | 2 μ l NaCl + 2 μ l Lys. |
| 8 | D | 2 μ l NaCl + 2 μ l Lys. | 2 μ l NaCl + 2 μ l Lys. | 2 μ l NaCl + 2 μ l Lys. | 2 μ l NaCl + 2 μ l Lys. | 2 μ l NaCl + 2 μ l Lys. | 2 μ l NaCl + 2 μ l Lys. |

- Mikrokrytalizace pod olejem

Pro mikrokrytalizaci pod olejem byla použita destička s 96 jamkami. Před nanesením roztoku lysozymu do jednotlivých jamek byla destička zalita parafinovým olejem. Naplněny byly pouze jamky v prvních třech sloupcích. Do jamek A - D byly napipetovány 3 μ l roztoku lysozymu a 3 μ l srážecího roztoku NaCl. Do jamek E - H byly napipetovány 2 μ l roztoku lysozymu a 2 μ l srážecího roztoku NaCl. Pro tuto metodu byly použity koncentrace srážecího roztoku NaCl, 12 % a 10 % a koncentrace roztoku lysozymu, 100 mg/ml, 60 mg/ml a 40 mg/ml. Schéma vybrané části krystalizační destičky je znázorněno v Tab. IV. Po naplnění vybraných jamek byla destička zakryta víčkem a pro vlastní krystalizaci ponechána v laboratoři při 20°C.

Tabulka IV: Krystalizační destička mikrokrytalizace pod olejem pro lysozym

| Srážecí roztok NaCl | | Lysozym [mg/ml] | | |
|---------------------|---|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | | 100 | 60 | 40 |
| | | 1 | 2 | 3 |
| 12 % | A | 3 µl NaCl + 3 µl Lys. | 3 µl NaCl + 3 µl Lys. | 3 µl NaCl + 3 µl Lys. |
| | B | 3 µl NaCl + 3 µl Lys. | 3 µl NaCl + 3 µl Lys. | 3 µl NaCl + 3 µl Lys. |
| | C | 3 µl NaCl + 3 µl Lys. | 3 µl NaCl + 3 µl Lys. | 3 µl NaCl + 3 µl Lys. |
| | D | 3 µl NaCl + 3 µl Lys. | 3 µl NaCl + 3 µl Lys. | 3 µl NaCl + 3 µl Lys. |
| 10 % | E | 2 µl NaCl + 2 µl Lys. | 2 µl NaCl + 2 µl Lys. | 2 µl NaCl + 2 µl Lys. |
| | F | 2 µl NaCl + 2 µl Lys. | 2 µl NaCl + 2 µl Lys. | 2 µl NaCl + 2 µl Lys. |
| | G | 2 µl NaCl + 2 µl Lys. | 2 µl NaCl + 2 µl Lys. | 2 µl NaCl + 2 µl Lys. |
| | H | 2 µl NaCl + 2 µl Lys. | 2 µl NaCl + 2 µl Lys. | 2 µl NaCl + 2 µl Lys. |

- Volná difúze

U volné difúze byly použity tři kapiláry s různými průměry, 0,2 mm, 0,3 mm a 0,8 mm. Do kapilár o průměru 0,2 mm a 0,8 mm bylo napipetováno 30 µl roztoku lysozymu o koncentraci 100 µg/ml a 30 µl 12 % srážecího roztoku NaCl. Do kapiláry o průměru 0,3 mm bylo napipetováno 30 µl roztoku lysozymu o koncentraci 60 µg/ml a 30 µl 8 % srážecího roztoku NaCl, jak je znázorněno v Tab. V. Před naplněním byl voskem uzavřen tenčí konec kapiláry a po naplnění byl voskem uzavřen i druhý konec, aby se zamezilo přístupu vzduchu. Kapiláry byly poté vloženy do Petriho misky a ponechány v laboratoři. Vlastní krystalizace probíhala při 20°C.

Tabulka V: Metoda volné difúze v kapilárách pro lysozym

| Průměr kapiláry [mm] | | |
|-------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|
| 0,2 | 0,3 | 0,8 |
| 30 µl 100 µg/ml lysozym + 12 % NaCl | 30 µl 60 µg/ml lysozym + 8 % NaCl | 30 µl 100 µg/ml lysozym + 12 % NaCl |

4.2 Krystalizace ECD7

4.2.1 Získání ECD7

Protein ECD7 využitý v experimentech této bakalářské práce byl připraven v laboratoři N.F Gamaleya Federal Center for Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation ve spolupráci s Lomonosov Moscow State University a Center for Strategic Planning of the Ministry of Health of the Russian Federation. Protein ECD7 byl transportován do Laboratoře strukturní chemie PřF JU společně s lysiny Am24 a Si3. Žádný z těchto endolysinů nebyl dříve klonován nebo charakterizován. Kódující sekvence pro vybrané endolysiny byly PCR rozvinuty z inaktivovaných fágových lyzátů, poskytnutých Dr. Eugenie O. Rubalskii, a následně byly klonovány do expresního vektoru pET42b(+) a zkontrolovány na chyby pomocí Sangerova sekvenování. Všechny proteiny obsahovaly C-terminální 8-His značku pro afinitní čištění. Expresní vektory byly zavedeny do kompetentních buněk *E. coli*, kmen BL21(DE3) pLysS pomocí protokolu transformace tepelného šoku.

Buňky *E. coli* byly kultivovány v LB médiu při 37°C a 240 rpm na OD₆₀₀ hodnotu 0,55-0,65 a poté indukovány β-D-1-thiogalactopyranoside (1 mM IPTG) při 37°C po dobu 3 hodin. Buňky byly odděleny v centrifuze, 6000× g po dobu 10 minut při 4°C, resuspendovány v lytickém pufru o složení 20 mM Tris HCL, 250 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, pH 8,0, inkubovány s 100 μg/mL lysozymem při pokojové teplotě po dobu 30 minut a přerušeno sonikací. Buněčný odpad byl odstraněn odstředováním, 10 000× g po dobu 30 minut při teplotě 4°C, a supernatant byl filtrován přes 0,2 μm filtr. Proteiny byly přečištěny na NGC Discovery™ 10 FPLC systém (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) s 5 mL HisTrap FF kolonou (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) s nabitými Ni²⁺ ionty, Zfiltrovaný lyzát byl smíchán s 30 mM imidazolem a 1 mM MgCl₂ a nanesen na kolonu, která byla předem ekvilibrována puftrem o složení 20 mM Tris HCl, 250 mM NaCl a 30 mM imidazol, pH 8,0. Frakce byly eluovány za použití lineárního gradientu do 100 % elučního pufru o složení 20 mM Tris HCl, 250 mM NaCl a 500 mM imidazol pH 8,0. Shromážděné proteinové frakce byly dialyzovány proti 20 mM Tris HCl (pH 7,5). Čistota proteinů byla stanovena pomocí 16 % SDS-PAGE elektroforézy. Koncentrace proteinů byly měřeny na spektrofotometru (Implen NanoPhotometer, IMPLEN, Munich, Germany) při 280 nm a vypočteny pomocí molárního extinkčního koeficientu $E^{0,1\%}_{280\text{ nm}}$.

Zdrojem enzymu LysECD7 byl *Escherichia* fág ECD7 a fágovým hostitelem byla *E.coli*²⁰.

4.2.2 Vzorek ECD7

Protein ECD7 mi byl poskytnut v pevné formě. ECD7 byl rozpuštěn v 50 mM Tris o pH 7.5. Přesná koncentrace proteinu ECD7 po rozpuštění byla 4,998 mg/ml.

4.2.3 Vlastní krystalizace

Pro krystalizaci bakteriofágového proteinu ECD7 byla použita pouze metoda sedící kapky. Metoda sedící kapky byla aplikována ve dvou různých typech destiček. Jako první byly použity destičky s 96 jamkami a pro optimalizování podmínek byla dále použita destička s 24 jamkami.

Pro krystalizaci proteinu ECD7 byl použit roztok ECD7 o koncentraci 4,998 mg/ml, sady třech komerčně dostupných srážecích činidel, PEG/Ion, poskytovaný firmou Hampton Research (USA) a PGA a MORPHEUS II HT-96, poskytované firmou Molecular Dimensions (USA). Seznamy použitých srážecích činidel jsou uvedeny v příloze. Dále byly k přípravě experimentu využity automatické pipety a pro automatické rozkapávání byl použit robot Douglas Instrument OryxNano.

Všechny destičky byly skladovány v lednici při teplotě 4°C.

- Metoda sedící kapky, 96 jamek

Jako první byla použita sada srážecího činidla PEG/Ion a destička s 96 jamkami. Destička i roztok proteinu ECD7 spolu se srážecími činidly byly připraveny a samotné rozkapávání proběhlo na automatickém robotu. U každého rezervoáru se nacházejí dvě jamky pro kapku proteinu se srážecím činidlem, celkem tedy bylo vyzkoušeno 192 krystalizačních podmínek. Pro naplnění rezervoáru bylo na robotu nastaveno 50 µl srážecího činidla, do horní jamky bylo napipetováno vždy po 1 µl roztoku proteinu ECD7 plus 1 µl srážecího činidla z rezervoáru a do spodní jamky bylo napipetováno po 1 µl roztoku proteinu ECD7 spolu s 0,5 µl srážecího činidla z rezervoáru. Schéma první poloviny destičky (1 – 6) je znázorněno v Tab. VI, druhá polovina destičky (7 – 12) pokračovala identicky jako první.

Tabulka VI: Metoda sedící kapky se srážecím činidlem PEG/Ion pro ECD7

| | 1 | | 2 | | 3 | | 4 | | 5 | | 6 | |
|---|------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|
| A | 50μl | 1:1 | 50μl | 1:1 | 50μl | 1:1 | 50μl | 1:1 | 50μl | 1:1 | 50μl | 1:1 |
| | PEG | 1:0,5 | PEG | 1:0,5 | PEG | 1:0,5 | PEG | 1:0,5 | PEG | 1:0,5 | PEG | 1:0,5 |
| B | 50μl | 1:1 | 50μl | 1:1 | 50μl | 1:1 | 50μl | 1:1 | 50μl | 1:1 | 50μl | 1:1 |
| | PEG | 1:0,5 | PEG | 1:0,5 | PEG | 1:0,5 | PEG | 1:0,5 | PEG | 1:0,5 | PEG | 1:0,5 |
| C | 50μl | 1:1 | 50μl | 1:1 | 50μl | 1:1 | 50μl | 1:1 | 50μl | 1:1 | 50μl | 1:1 |
| | PEG | 1:0,5 | PEG | 1:0,5 | PEG | 1:0,5 | PEG | 1:0,5 | PEG | 1:0,5 | PEG | 1:0,5 |
| D | 50μl | 1:1 | 50μl | 1:1 | 50μl | 1:1 | 50μl | 1:1 | 50μl | 1:1 | 50μl | 1:1 |
| | PEG | 1:0,5 | PEG | 1:0,5 | PEG | 1:0,5 | PEG | 1:0,5 | PEG | 1:0,5 | PEG | 1:0,5 |
| E | 50μl | 1:1 | 50μl | 1:1 | 50μl | 1:1 | 50μl | 1:1 | 50μl | 1:1 | 50μl | 1:1 |
| | PEG | 1:0,5 | PEG | 1:0,5 | PEG | 1:0,5 | PEG | 1:0,5 | PEG | 1:0,5 | PEG | 1:0,5 |
| F | 50μl | 1:1 | 50μl | 1:1 | 50μl | 1:1 | 50μl | 1:1 | 50μl | 1:1 | 50μl | 1:1 |
| | PEG | 1:0,5 | PEG | 1:0,5 | PEG | 1:0,5 | PEG | 1:0,5 | PEG | 1:0,5 | PEG | 1:0,5 |
| G | 50μl | 1:1 | 50μl | 1:1 | 50μl | 1:1 | 50μl | 1:1 | 50μl | 1:1 | 50μl | 1:1 |
| | PEG | 1:0,5 | PEG | 1:0,5 | PEG | 1:0,5 | PEG | 1:0,5 | PEG | 1:0,5 | PEG | 1:0,5 |
| H | 50μl | 1:1 | 50μl | 1:1 | 50μl | 1:1 | 50μl | 1:1 | 50μl | 1:1 | 50μl | 1:1 |
| | PEG | 1:0,5 | PEG | 1:0,5 | PEG | 1:0,5 | PEG | 1:0,5 | PEG | 1:0,5 | PEG | 1:0,5 |

Stejným způsobem jako v prvním případě proběhla příprava krystalizace proteinu ECD7 se sadou srážecích činidel PGA. Do rezervoáru bylo opět naneseno 50 μl srážecího činidla PGA, do horní jamky 1 μl roztoku proteinu ECD7 spolu s 1 μl srážecího činidla z rezervoáru a do spodní jamky 1 μl roztoku proteinu ECD7 plus 0,5 μl srážecího činidla z rezervoáru. Schéma první části krystalizační destičky (1 – 6) je uvedeno v Tab. VII, druhá část destičky (7 – 12) byla připravena totožně.

Tabulka VII: Metoda sedící kapky se srážecím činidlem PGA pro ECD7

| | 1 | | 2 | | 3 | | 4 | | 5 | | 6 | |
|---|------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|
| A | 50μl | 1:1 | 50μl | 1:1 | 50μl | 1:1 | 50μl | 1:1 | 50μl | 1:1 | 50μl | 1:1 |
| | PGA | 1:0,5 | PGA | 1:0,5 | PGA | 1:0,5 | PGA | 1:0,5 | PGA | 1:0,5 | PGA | 1:0,5 |
| B | 50μl | 1:1 | 50μl | 1:1 | 50μl | 1:1 | 50μl | 1:1 | 50μl | 1:1 | 50μl | 1:1 |
| | PGA | 1:0,5 | PGA | 1:0,5 | PGA | 1:0,5 | PGA | 1:0,5 | PGA | 1:0,5 | PGA | 1:0,5 |
| C | 50μl | 1:1 | 50μl | 1:1 | 50μl | 1:1 | 50μl | 1:1 | 50μl | 1:1 | 50μl | 1:1 |
| | PGA | 1:0,5 | PGA | 1:0,5 | PGA | 1:0,5 | PGA | 1:0,5 | PGA | 1:0,5 | PGA | 1:0,5 |
| D | 50μl | 1:1 | 50μl | 1:1 | 50μl | 1:1 | 50μl | 1:1 | 50μl | 1:1 | 50μl | 1:1 |
| | PGA | 1:0,5 | PGA | 1:0,5 | PGA | 1:0,5 | PGA | 1:0,5 | PGA | 1:0,5 | PGA | 1:0,5 |
| E | 50μl | 1:1 | 50μl | 1:1 | 50μl | 1:1 | 50μl | 1:1 | 50μl | 1:1 | 50μl | 1:1 |
| | PGA | 1:0,5 | PGA | 1:0,5 | PGA | 1:0,5 | PGA | 1:0,5 | PGA | 1:0,5 | PGA | 1:0,5 |
| F | 50μl | 1:1 | 50μl | 1:1 | 50μl | 1:1 | 50μl | 1:1 | 50μl | 1:1 | 50μl | 1:1 |
| | PGA | 1:0,5 | PGA | 1:0,5 | PGA | 1:0,5 | PGA | 1:0,5 | PGA | 1:0,5 | PGA | 1:0,5 |
| G | 50μl | 1:1 | 50μl | 1:1 | 50μl | 1:1 | 50μl | 1:1 | 50μl | 1:1 | 50μl | 1:1 |
| | PGA | 1:0,5 | PGA | 1:0,5 | PGA | 1:0,5 | PGA | 1:0,5 | PGA | 1:0,5 | PGA | 1:0,5 |
| H | 50μl | 1:1 | 50μl | 1:1 | 50μl | 1:1 | 50μl | 1:1 | 50μl | 1:1 | 50μl | 1:1 |
| | PGA | 1:0,5 | PGA | 1:0,5 | PGA | 1:0,5 | PGA | 1:0,5 | PGA | 1:0,5 | PGA | 1:0,5 |

Příprava třetí destičky probíhala identicky jako v předchozích případech, s rozdílem srážecího činidla, kde byla použita sada MORPHEUS II HT-96. Schéma první poloviny (1 – 6) krystalizační destičky je vyobrazeno v Tab. VIII, druhá část (7 – 12) byla připravena identicky. Do každého z rezervoárů bylo napipetováno 50 μl srážecího činidla, do horní jamky bylo nanášeno 1 μl roztoku proteinu ECD7 s 1 μl srážecího činidla z rezervoáru a do dolní jamky bylo nanášeno 1 μl roztoku proteinu ECD7 plus 0,5 μl srážecího činidla z rezervoáru.

Tabulka VIII: Metoda sedící kapky se srážecím činidlem MORPHEUS II pro ECD7

| | 1 | | 2 | | 3 | | 4 | | 5 | | 6 | |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| A | 50µl | 1:1 | 50µl | 1:1 | 50µl | 1:1 | 50µl | 1:1 | 50µl | 1:1 | 50µl | 1:1 |
| | MORP. | 1:0,5 | MORP. | 1:0,5 | MORP. | 1:0,5 | MORP. | 1:0,5 | MORP. | 1:0,5 | MORP. | 1:0,5 |
| B | 50µl | 1:1 | 50µl | 1:1 | 50µl | 1:1 | 50µl | 1:1 | 50µl | 1:1 | 50µl | 1:1 |
| | MORP. | 1:0,5 | MORP. | 1:0,5 | MORP. | 1:0,5 | MORP. | 1:0,5 | MORP. | 1:0,5 | MORP. | 1:0,5 |
| C | 50µl | 1:1 | 50µl | 1:1 | 50µl | 1:1 | 50µl | 1:1 | 50µl | 1:1 | 50µl | 1:1 |
| | MORP. | 1:0,5 | MORP. | 1:0,5 | MORP. | 1:0,5 | MORP. | 1:0,5 | MORP. | 1:0,5 | MORP. | 1:0,5 |
| D | 50µl | 1:1 | 50µl | 1:1 | 50µl | 1:1 | 50µl | 1:1 | 50µl | 1:1 | 50µl | 1:1 |
| | MORP. | 1:0,5 | MORP. | 1:0,5 | MORP. | 1:0,5 | MORP. | 1:0,5 | MORP. | 1:0,5 | MORP. | 1:0,5 |
| E | 50µl | 1:1 | 50µl | 1:1 | 50µl | 1:1 | 50µl | 1:1 | 50µl | 1:1 | 50µl | 1:1 |
| | MORP. | 1:0,5 | MORP. | 1:0,5 | MORP. | 1:0,5 | MORP. | 1:0,5 | MORP. | 1:0,5 | MORP. | 1:0,5 |
| F | 50µl | 1:1 | 50µl | 1:1 | 50µl | 1:1 | 50µl | 1:1 | 50µl | 1:1 | 50µl | 1:1 |
| | MORP. | 1:0,5 | MORP. | 1:0,5 | MORP. | 1:0,5 | MORP. | 1:0,5 | MORP. | 1:0,5 | MORP. | 1:0,5 |
| G | 50µl | 1:1 | 50µl | 1:1 | 50µl | 1:1 | 50µl | 1:1 | 50µl | 1:1 | 50µl | 1:1 |
| | MORP. | 1:0,5 | MORP. | 1:0,5 | MORP. | 1:0,5 | MORP. | 1:0,5 | MORP. | 1:0,5 | MORP. | 1:0,5 |
| H | 50µl | 1:1 | 50µl | 1:1 | 50µl | 1:1 | 50µl | 1:1 | 50µl | 1:1 | 50µl | 1:1 |
| | MORP. | 1:0,5 | MORP. | 1:0,5 | MORP. | 1:0,5 | MORP. | 1:0,5 | MORP. | 1:0,5 | MORP. | 1:0,5 |

Po vykrystalování některých podmínek z výše uvedených destiček byly vybrány čtyři podmínky ze sady PEG/Ion ve kterých protein ECD7 nejlépe krystalizoval a ty byly zopakovány opět metodou sedící kapky, ale v jiném typu destičky.

- Metoda sedící kapky, 24 jamek

Pro další destičku s 24 jamkami byly vybrány nejlepší podmínky ze sady PEG/Ion. Do prvního řádku byla vybrána podmínka z jamky C7, v pořadí 31, tedy precipitační činidlo o složení 0,2 M Lithium sulfate monohydrate, 20 % w/v Polyethylene glycol 3,350. Precipitační činidlo pro druhou řadu bylo z jamky G12, v pořadí 84, o složení (0,07 M Citric acid, 0,03 M BIS-TRIS propane) / pH 3,4, 16 % w/v Polyethylene glycol 3,350. Třetí řada byla naplněna precipitačním činidlem z jamky H8, v pořadí 92, o složení 0,02 M Zinc chloride, 20 % w/v Polyethylene glycol 3,350. Do posledního řádku bylo napipetováno srážecí činidlo z jamky H9, v pořadí 93, o složení 0,15 M Cesium chloride, 15 % w/v Polyethylene glycol 3,350. Všechna činidla byla pipetována do rezervoárů v šesti různých objemech, 50 µl, 100 µl, 150 µl, 200 µl, 250 µl a 300 µl, ve vzestupném pořadí. Kolem každého rezervoáru se nacházejí čtyři jamky pro sedící kapku, roztok proteinu ECD7:srážecímu činidlu z rezervoáru byly do těchto jamek pipetovány ve čtyřech různých poměrech, 1:1, 3:2, 2:1 a 3:1. S výjimkou jamky A2, kde došlo k chybě a poměr je zde 3:3. Popsaná krystalizační destička je schematicky znázorněna v Tab. IX.

Tabulka IX: Metoda sedící kapky se srážecím činidlem PEG/Ion pro ECD7

| | PEG/Ion [μ l] | | | | | | | | | | | |
|---|--------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 50 | | 100 | | 150 | | 200 | | 250 | | 300 | |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| | PEG/Ion 31 | | | | | | | | | | | |
| A | 1:1 | 3:3 | 1:1 | 3:2 | 1:1 | 3:2 | 1:1 | 3:2 | 1:1 | 3:2 | 1:1 | 3:2 |
| B | 2:1 | 3:1 | 2:1 | 3:1 | 2:1 | 3:1 | 2:1 | 3:1 | 2:1 | 3:1 | 2:1 | 3:1 |
| | PEG/Ion 84 | | | | | | | | | | | |
| C | 1:1 | 3:2 | 1:1 | 3:2 | 1:1 | 3:2 | 1:1 | 3:2 | 1:1 | 3:2 | 1:1 | 3:2 |
| D | 2:1 | 3:1 | 2:1 | 3:1 | 2:1 | 3:1 | 2:1 | 3:1 | 2:1 | 3:1 | 2:1 | 3:1 |
| | PEG/Ion 92 | | | | | | | | | | | |
| E | 1:1 | 3:2 | 1:1 | 3:2 | 1:1 | 3:2 | 1:1 | 3:2 | 1:1 | 3:2 | 1:1 | 3:2 |
| F | 2:1 | 3:1 | 2:1 | 3:1 | 2:1 | 3:1 | 2:1 | 3:1 | 2:1 | 3:1 | 2:1 | 3:1 |
| | PEG/Ion 93 | | | | | | | | | | | |
| G | 1:1 | 3:2 | 1:1 | 3:2 | 1:1 | 3:2 | 1:1 | 3:2 | 1:1 | 3:2 | 1:1 | 3:2 |
| H | 2:1 | 3:1 | 2:1 | 3:1 | 2:1 | 3:1 | 2:1 | 3:1 | 2:1 | 3:1 | 2:1 | 3:1 |

V Tab. X je obecně a blíže popsána jedna jamka z výše použité krystalizační destičky pro lepší představu.

Tabulka X: Schéma jedné jamky metody sedící kapky pro ECD7

| | |
|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 1 μ l ECD7 + 1 μ l PEG | 3 μ l ECD7 + 2 μ l PEG |
| PEG/Ion | |
| 2 μ l ECD7 + 1 μ l PEG | 3 μ l ECD7 + 1 μ l PEG |

4.2.4 Testování krystalů

Z destičky s optimalizovanými podmínkami byly po vykrystalování vybrány dvě podmínky pro barvicí test. Otestovány byly krystaly z jamky A8 a D7 pomocí komerčně dostupného modrého barviva Izit Crystal Dye HR4-710 poskytovaného firmou Hampton Research (USA). Do jamky A8 byl automatickou pipetou přidán 1 μ l tohoto barviva a do jamky D7 bylo přidáno 0,5 μ l barviva.

4.2.5 Difrakční data

Vybrané krystaly z destičky s optimalizovanými podmínkami byly testovány na synchrotronu BESSY – II provozovaném The Joint Berlin MX-Laboratory (Berlin-Adlershof,

Německo) pomocí rentgenové difrakční analýzy. Testování na synchrotronu může být provedeno pouze kvalifikovaným pracovníkem a z tohoto důvodu jsem testování nemohla provést osobně.

The Joint Berlin MX-Laboratory byla založena pěti partnery, aby podpořila výzkum strukturální biologie a byla slavnostně otevřena 1. března 2010²¹.

5 Výsledky

V této kapitole praktické části bakalářské práce jsou uvedeny výsledky všech provedených experimentů, a to jak z krystalizace modelového proteinu, lysozymu, tak z krystalizace zkoumaného proteinu ECD7. Výsledky pokusů jsou znázorněny pomocí tabulek a vybrané krystaly jsou zdokumentovány.

5.1 Výsledky krystalizace lysozymu

Výsledky krystalizace modelového proteinu lysozymu pro každou z provedených metod jsou uvedeny pomocí tabulek vytvořených v programu MS Excel. Všechny destičky byly pozorovány pod mikroskopem SZX9 při zvětšení 450x.

5.1.1 Výsledky metody sedící kapky

Krystalizace metodou sedící kapky modelového proteinu, lysozymu byla úspěšná, téměř ve všech jamkách se objevily krystaly. Výjimkou byla kombinace 14 % srážecího činidla NaCl s koncentrací 80 mg/ml roztoku lysozymu, kde se ve čtyřech ze šesti jamek objevily pouze sraženiny. Tyto sraženiny mohou být důsledkem přesyceného roztoku. Ve dvou ze šesti jamek se ale objevily krystaly, což je pravděpodobně dopad lidského faktoru. I u ostatních kombinací, kde se krystaly objevily ve všech jamkách, neměly všechny stejnou velikost a tvar. Dá se zde tedy pozorovat, jak moc může lidský faktor ovlivnit experiment. Za největší chybu by se dalo považovat samotné pipetování.

Výsledky jsou znázorněny v Tab. XI, kde jamky s krystaly jsou označeny žlutě a velkým písmenem K a jamky se sraženinami jsou označeny modře a velkým písmenem P.

Tabulka XI: Výsledky krystalizace metodou sedící kapky pro lysozym

| Srážecí roztok NaCl | Lysozym [mg/ml] | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---------------------|-----------------|---|---|---|---|---|---|---|
| 6 % | 40 | A | K | K | K | K | K | K |
| 14 % | 80 | B | P | P | P | K | K | P |
| 10 % | 20 | C | K | K | K | K | K | K |
| 8 % | 100 | D | K | K | K | K | K | K |

5.1.2 Výsledky metody visící kapky

U metody visící kapky ke krystalizaci nevedly čtyři kombinace. U kombinací 14 % srážecího roztoku NaCl s koncentrací 100 mg/ml roztoku lysozymu a s koncentrací 80 mg/ml roztoku lysozymu se objevily sraženiny. Sraženiny svědčí o přesyceném roztoku. V jamkách s kombinací 6 % srážecího roztoku s koncentrací 20 mg/ml a s koncentrací 25 mg/ml roztoku lysozymu zůstala pouze čirá kapka. Z toho lze vyvodit, že použití nejkoncentrovanějších roztoků společně vede ke sraženině a musí být tedy použity zvlášť s méně koncentrovanějšími roztoky. Naopak u čirých kapek se jednalo o nejméně koncentrované roztoky a ke krystalizaci vede pouze jejich použití společně s více koncentrovanými roztoky.

Výsledky metody visící kapky jsou uvedeny v Tab. XII, kde jamky s krystaly jsou označeny žlutě a velkým písmenem K, jamky se sraženinami jsou označeny modře a velkým písmenem P a čirá kapka je označena bíle a velkým písmenem X.

Tabulka XII: Výsledky krystalizace metodou visící kapky pro lysozym

| | | Lysozym [mg/ml] | | | | | |
|---------------------|---|-----------------|----|----|----|----|----|
| | | 100 | 80 | 60 | 40 | 20 | 25 |
| Srážecí roztok NaCl | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| 14 % | A | P | P | K | K | K | K |
| 6 % | B | K | K | K | K | X | X |
| 12 % | C | K | K | K | K | K | K |
| 8 % | D | K | K | K | K | K | K |

5.1.3 Výsledky mikrokystalizace pod olejem

Mikrokystalizace pod olejem byla úspěšná pro všechny vybrané kombinace. Větší krystaly a jejich menší množství bylo pozorováno u koncentrovanějších kombinací a u kombinací méně koncentrovaných roztoků byly viděny menší krystaly a ve větším množství.

Výsledky mikrokystalizace pod olejem jsou vyznačeny v Tab. XIII, jamky s krystaly jsou označeny žlutě a velkým písmenem K.

Tabulka XIII: Výsledky krystalizace mikrokrystalizace pod olejem pro lysozym

| Srážecí roztok NaCl | | Lysozym [mg/ml] | | |
|------------------------|---|-----------------|----|----|
| | | 100 | 60 | 40 |
| | | 1 | 2 | 3 |
| 12 % | A | K | K | K |
| | B | K | K | K |
| | C | K | K | K |
| | D | K | K | K |
| 10 % | E | K | K | K |
| | F | K | K | K |
| | G | K | K | K |
| | H | K | K | K |

5.1.4 Výsledky volné difúze v kapiláře

Experiment volné difúze vedl ke krystalizaci ve všech třech kapilárách. V kapiláře o průměru 0,8 mm bylo možné spatřit krystaly pouhým okem, tyto krystaly byly největší. Nejmenší krystaly byly pozorovány v kapiláře o průměru 0,2 mm a musely být pozorovány pod mikroskopem.

V Tab. XIV jsou uvedeny výsledky experimentu volné difúze, kde žlutě a velkým písmenem K jsou vyznačeny krystaly.

Tabulka XIV: Výsledky krystalizace volné difúze v kapilárách pro lysozym

| Průměr kapiláry [mm] | | |
|----------------------|-----|-----|
| 0,2 | 0,3 | 0,8 |
| K | K | K |

5.2 Výsledky krystalizace ECD7

Všechny destičky byly prohlíženy pod mikroskopem SZX9 při zvětšení 450x a vybrané jamky s krystaly byly vyfoceny pomocí fotoaparátu Olympus připevněnému k tomuto mikroskopu.

Krystalizace proteinu ECD7 probíhala metodou sedící kapky. Byly použity tři destičky, kde každá obsahovala 96 jamek. Pro každou destičku byla využita jiná sada krystalizačních

činidel, PEG/Ion, PGA a MORPHEUS II HT-96. Bylo tedy otestováno 288 podmínek, kde ještě u jednotlivých jamek byly zvoleny dva různé poměry proteinu ke srážecímu roztoku. V části podmínek vznikly krystaly, v jiných jamkách byla objevena precipitace a ve větší části jamek zůstala kapka čirá. Výsledky všech destiček jsou zdokumentovány pomocí tabulek vytvořených v programu MS Excel, kde žlutá barva s velkým písmenem K značí krystaly, modrá barva s velkým písmenem P a čirá kapka je označena bíle a velkým písmenem X.

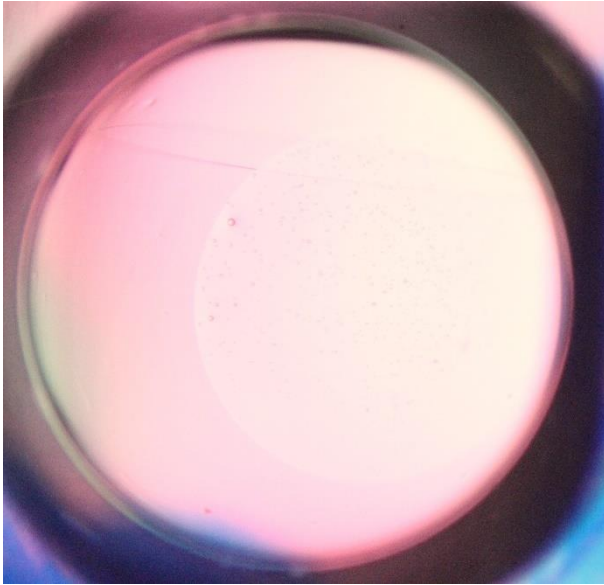
5.2.1 Výsledky metody sedící kapky, 96 jamek

V destičce se srážecím činidlem PEG/Ion zůstalo 73 jamek čistých, v 5 jamkách se objevila precipitace a podmínky v 18 jamkách vedly k úspěšnému experimentu, jak je vyznačeno v Tab. XV.

Tabulka XV: Výsledky krystalizace se srážecím činidlem PEG/Ion pro ECD7

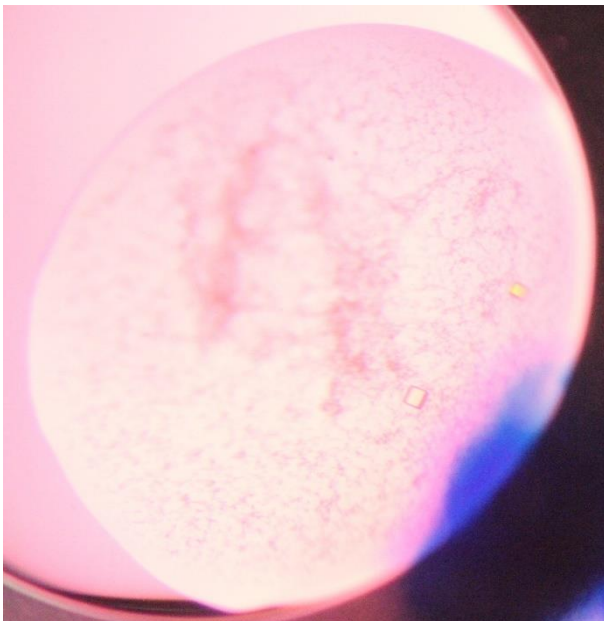
| poměr [μl] | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| 1:1 | A | K | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 1:0,5 | | X | P | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 1:1 | B | X | K | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 1:0,5 | | X | K | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 1:1 | C | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 1:0,5 | | X | P | X | K | X | X | K | X | X | X | X | X |
| 1:1 | D | K | X | X | X | X | K | X | X | K | X | X | X |
| 1:0,5 | | X | X | X | X | X | X | X | X | K | X | X | X |
| 1:1 | E | X | X | X | X | X | X | X | X | K | X | X | X |
| 1:0,5 | | X | X | X | X | X | X | X | X | K | K | X | X |
| 1:1 | F | X | X | X | X | X | X | X | K | X | X | X | X |
| 1:0,5 | | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 1:1 | G | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | K |
| 1:0,5 | | X | X | P | X | X | X | X | X | X | X | X | K |
| 1:1 | H | X | X | X | X | X | X | X | X | K | X | X | X |
| 1:0,5 | | X | X | X | X | X | P | P | K | K | X | X | X |

Krystaly v jamkách A1, C7, E9, E10, G12, H8 a H9 byly vyfotografovány a následně změřeny. Jamka A1 je vidět na Obr. 7 a největší krystal má rozměr 28 μm.



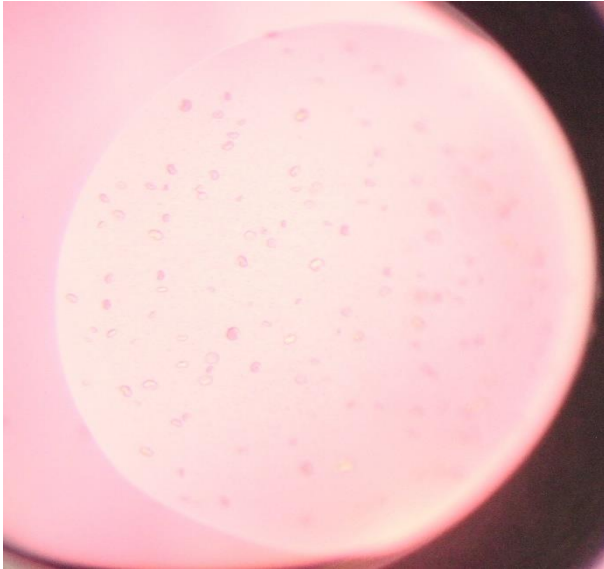
Obrázek 7: Krystaly ECD7, horní jamka A1

Na Obr. 8 je vidět sraženina společně se dvěma krystaly, velikost krystalu níže je 61 μm na 52 μm



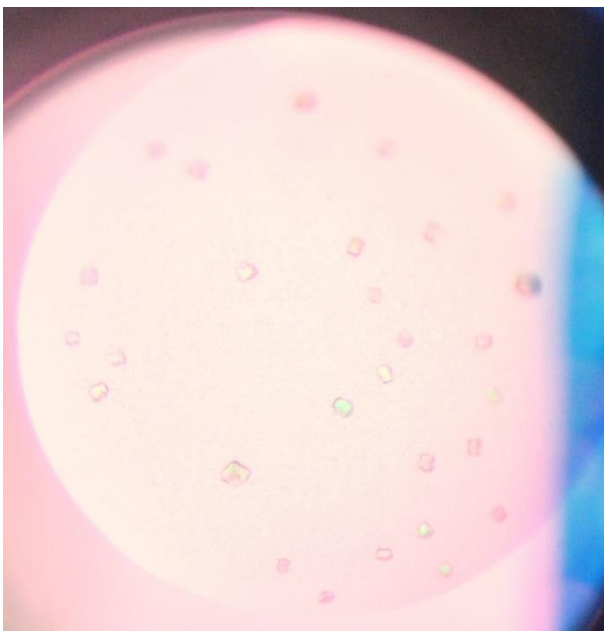
Obrázek 8: Sraženina s krystaly ECD7, dolní jamka C7

Z jamky E10 byly změřeny dva mikrokrystaly a jejich velikost je 49 μm na 37 μm a 32 μm ; jsou na Obr 9.



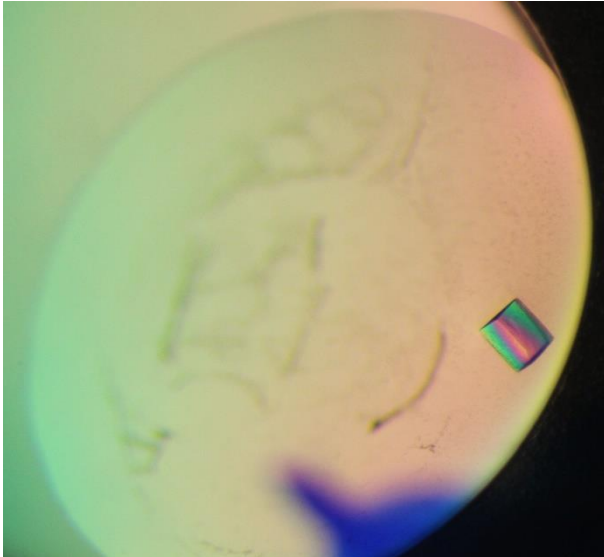
Obrázek 9: Krystaly ECD7, dolní jamka E10

V jamce G12 byl změřen jeden z krystalů a jeho velikost je 54 μm na 34 μm . Jamka G12 je na Obr. 10.



Obrázek 10: Krystaly ECD7, dolní jamka G12

Obr. 10 ukazuje sraženinu spolu s krystalem o rozměrech 159 μm na 191 μm , jedná se tedy o největší vzniklý krystal v této destičce z jamky H8.



Obrázek 11: Sraženina s krystalem ECD7, dolní jamka H8

V jamce H9 vykrytalizoval jediný krystal s tvarem trojúhelníku s délkami 24 μm na 25 μm na 27 μm a je zdokumentován na Obr. 12.



Obrázek 12: Krystal ECD7, horní jamka H9

Pro sadu PGA bylo v destičce objeveno 26 jamek obsahujících krystaly, žádná jamka s precipitací a 70 jamek s čirou kapkou, jak je uvedeno v Tab. XVI.

Tabulka XVI: Výsledky krystalizace se srážecím činidlem PGA pro ECD7

| poměr [μl] | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| 1:1 | A | X | X | X | X | X | K | X | K | X | X | X | X |
| 1:0,5 | | X | X | X | X | X | X | X | K | X | X | K | X |
| 1:1 | B | X | X | X | X | X | X | X | K | X | X | X | X |
| 1:0,5 | | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 1:1 | C | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 1:0,5 | | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 1:1 | D | X | X | X | K | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 1:0,5 | | X | X | X | K | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 1:1 | E | X | K | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 1:0,5 | | X | K | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 1:1 | F | X | X | X | X | K | X | K | K | X | K | K | K |
| 1:0,5 | | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | K |
| 1:1 | G | K | X | X | X | K | X | X | K | K | K | X | X |
| 1:0,5 | | K | X | X | X | X | X | X | K | K | K | X | X |
| 1:1 | H | X | X | K | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 1:0,5 | | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |

Sada srážecích činidel Morpheus II přinesla 35 jamek s krystaly a 61 jamek obsahujících pouze čirou kapku. Výsledky poslední destičky jsou uvedeny v Tab. XVII.

Tabulka XVII: Výsledky krystalizace se srážecím činidlem Morpheus II. pro ECD7

| poměr [μl] | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| 1:1 | A | X | K | X | X | X | K | K | K | K | K | K | X |
| 1:0,5 | | X | X | X | X | X | X | K | K | X | X | X | K |
| 1:1 | B | X | X | K | X | X | X | X | K | K | X | X | K |
| 1:0,5 | | K | K | X | X | K | K | X | X | X | X | X | K |
| 1:1 | C | X | X | X | X | X | K | K | K | X | K | X | X |
| 1:0,5 | | X | K | K | X | K | X | X | K | X | X | X | X |
| 1:1 | D | X | X | X | X | X | X | X | K | K | K | X | X |
| 1:0,5 | | X | X | X | X | X | X | X | K | X | X | X | X |
| 1:1 | E | X | X | X | X | X | X | X | K | X | X | X | X |
| 1:0,5 | | X | X | X | X | X | X | X | K | X | X | X | X |
| 1:1 | F | X | X | X | X | X | X | X | K | X | X | X | X |
| 1:0,5 | | X | X | X | X | X | X | X | K | X | X | X | X |
| 1:1 | G | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 1:0,5 | | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 1:1 | H | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 1:0,5 | | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |

Po vyhodnocení všech tří destiček byly vybrány jamky s nejkvalitnějšími krystaly a proběhlo zopakování jejich podmínek. Jednalo se pouze o podmínky ze sady PEG/Ion, konkrétně o jamky C7, G12, H8 a H9, tedy podmínky 31, 84, 92 a 93.

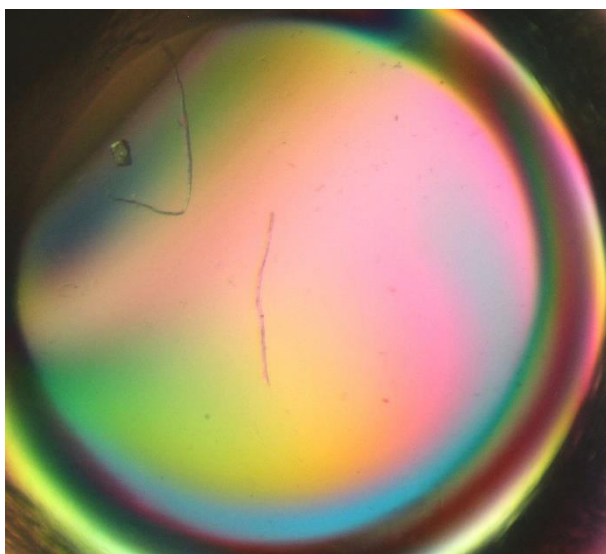
5.2.2 Výsledky metody sedící kapky, 24 jamek

Nejúspěšnější zopakovanou podmínkou byla podmínka 84, kde došlo ke krystalizaci více jak poloviny jamek. Podmínka 92 vedla k tvorbě precipitací a bylo by tedy nutné změnit použité poměry. Celkově se krystaly objevily v 17 jamkách, precipitace v 9 jamkách a zbylé jamky zůstaly čiré, jak je uvedeno v Tab. XVIII.

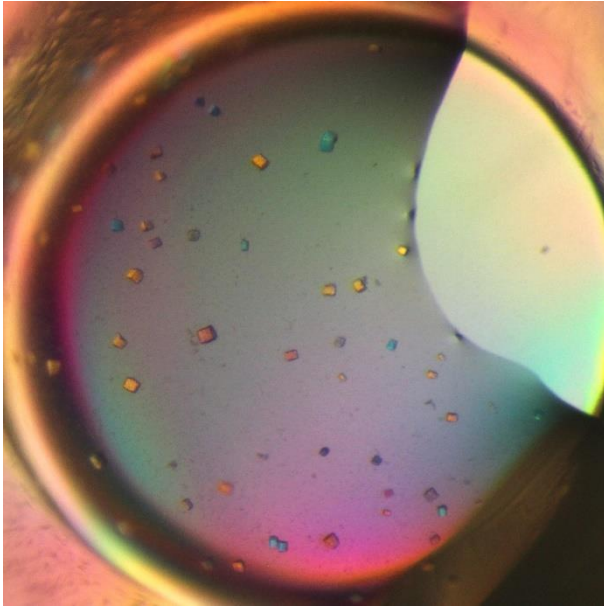
Tabulka XVIII: Výsledky krystalizace optimalizovaných podmínek srážecího činidla PEG/Ion pro ECD7

| | 50 μ l | | 100 μ l | | 150 μ l | | 200 μ l | | 250 μ l | | 300 μ l | |
|---|------------|---|-------------|---|-------------|---|-------------|---|-------------|----|-------------|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| A | X | X | X | X | X | X | X | K | X | X | X | X |
| B | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| C | X | K | X | K | X | K | X | K | X | K | X | X |
| D | X | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K |
| E | X | P | X | P | X | P | X | X | X | X | X | P |
| F | P | P | X | P | X | P | X | X | X | P | X | X |
| G | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| H | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |

Z jamek A8 a D7 byly pořízeny fotografie a jsou vidět na Obr. 13 a Obr. 14.



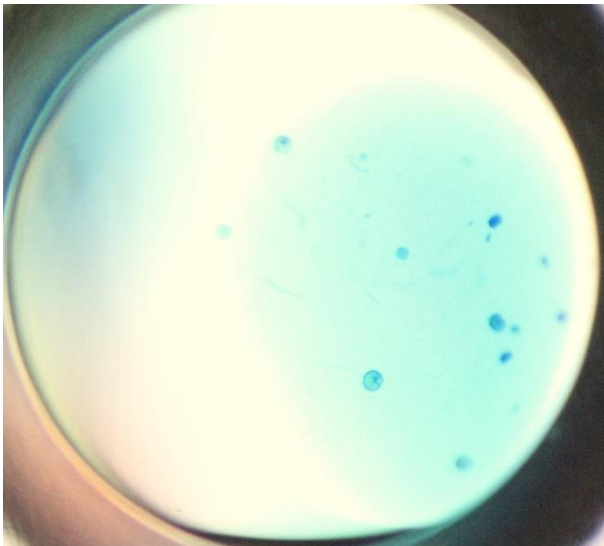
Obrázek 13: Krystal ECD7, jamka A8



Obrázek 14: Krystaly ECD7, jamka D7

5.2.3 Výsledky testování krystalů

Z destičky s 96 jamkami se srážecím činidlem PEG/Ion byly vybrány krystaly z jamky E9 pro otestování pomocí modrého barviva Izit. Po uplynutí hodiny do sebe krystaly nasály modrou barvu a potvrdilo se tak, že se opravdu jedná o krystaly proteinu ECD7, a ne pouze o krystaly srážedla. Modré krystaly jsou zdokumentovány na Obr. 15.

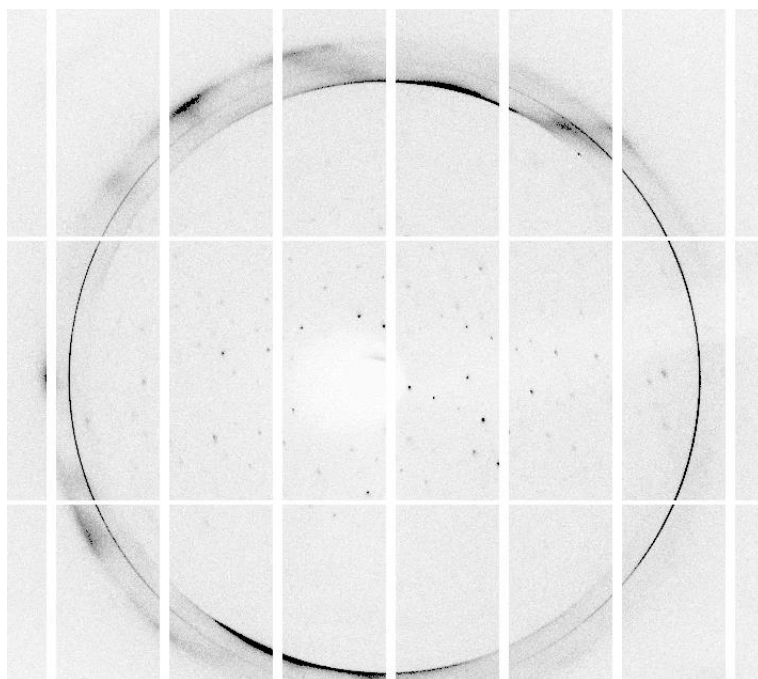


Obrázek 15: Krystaly ECD7 obarvené Izitem, dolní jamka E9

Z destičky s 24 jamkami pak byly vybrány dvě jamky, A8 a D7, s krystaly pro otestování pomocí barviva Izit. V obou jamkách bylo potvrzeno, že se jedná o krystaly proteinu ECD7.

5.2.4 Výsledky rentgenové difrakční analýzy

Získané difrakční snímky proteinu ECD7 pořízené pomocí rentgenové difrakční analýzy dosáhly rozlišení pouze 3,5 Å. Difrakce je anizotropní, difrakční snímek obsahuje málo teček a jejich rozložení není ve všech směrech snímku rovnoměrné, jak je vidět na Obr. 16. Obdržené difrakční obrázky tedy není možné použít pro získání struktury proteinu ECD7 a je nutné podmínky opakovat pro získání kvalitnějších krystalů a poté difrakčních snímků v lepším rozlišení.



Obrázek 16: Difrakční snímek proteinu ECD7

6 Diskuse

Vhodný způsob řešení trojrozměrné struktury začíná provedením sběru difrakčních dat pomocí rentgenové difrakční analýzy. Aby mohlo ke sběru dat dojít, je nutné připravit kvalitní monokrystaly. Příprava kvalitního monokrystalu závisí na čistotě proteinu, na molekulové hmotnosti proteinu, typu proteinu a v neposlední řadě na způsobu růstu krystalu²².

Protein ECD7 patří mezi bakteriofágové lysiny. Bakteriofágové lysiny se v době, kdy se blížíme do takzvané post-antibiotikové éry stávají slibnou náhradou antibiotik²⁰. Lysiny, jak už přírodně se vyskytující nebo uměle vytvořené, mají potenciál se vyvinout v rychle působící, specifické, antimikrobiální látky narušující buněčné stěny, které působí synergicky se standardními antibiotiky²³.

Proteinu ECD7 byl vybrán pro tuto práci jako jeden z potenciálních kandidátů jako možná náhrada za antibiotika. Jako první bylo nutné stanovit podmínky, v kterých bude tento protein ochotně krystalizovat. Byla testována široká škála podmínek, celkem 288, k čemuž byly použity tři komerčně dostupné krystalizační sady, PEG/Ion, PGA a Morpheus II, které se liší ve složení solí a pufrů o různém pH. Také byly zvoleny dva různé poměry proteinu ke srážecímu roztoku, a tím bylo množství podmínek zdvojnásobeno. Pro všechny experimenty byla zvolena metoda sedící kapky. Z důvodu úspory času došlo k rozkapávání třech destiček, vždy s jednou sadou, na automatickém robotu OryxNano. Ke krystalizaci proteinu ECD7 došlo v každé destičce, ale nejvhodnější krystaly byly nalezeny pouze u sady PEG/Ion, kde byly vybrány čtyři podmínky pro zopakování experimentu za účelem získání kvalitnějších krystalů. Nové rozkapávání proběhlo ručně pomocí automatických pipet a každá vybraná podmínka byla zopakována ve 24 kombinacích, 6 různých objemů srážecího činidla v rezervoáru a 4 různé poměry proteinu ke srážecímu činidlu.

Z optimalizovaných podmínek byl vybrán krystal pro měření pomocí rentgenové difrakční analýzy. Výsledný snímek byl ale získán v nízké kvalitě s rozlišením pouze 3,5 Å. Pro řešení struktury je nutné získat difrakční záznam v kvalitě < 3,0 Å.

Antonova a kolektiv²⁰ zkoumaly baktericidní aktivitu, vliv EDTA na baktericidní aktivitu při různých hodnotách pH pro tři enzymy, LysAm24, LysECD7 a LysSi3. Baktericidní aktivita endolysinů se výrazně liší v závislosti na požadovaném proteinu a použitém bakteriálním druhu a kmenu. Pro zhodnocení baktericidní aktivity LysECD7 byl použit kmen *E. coli* M15. Baktericidní aktivita LysECD7 proti exponenciálně rostoucím bakteriálním buňkám ukázala závislost na koncentraci. Koncentrace lysinu ECD7 větší než 5 µg/mL zcela eliminovala bakteriální růst, což naznačuje, že rekombinantní LysECD7 může

mít baktericidní účinek bez další permeabilizace membrán. Zhodnoceny byly také účinky přítomnosti solí, NaCl a KCl na aktivitu endolysinů. Obě soli měly inhibiční účinek na aktivitu lysinů. U LysECD7 100 mM každé soli baktericidní aktivitu významně snížilo²⁰.

Nejvyšší baktericidní aktivita LysECD7 v Tris HCl pufru byla pozorována za mírně kyselých podmínek, pH = 5,0 – 6,0. Při zvýšení pH na 6,5 až 7,0 se aktivita LysECD7 snížila a při vyšších hodnotách pH, 7,5 – 8,0 byla aktivita enzymu regenerována. Synergie mezi EDTA a LysECD7 byla pozorována za neutrálních a alkalických podmínek, pH 6,5 – 8,5²⁰.

McGowan a kolektiv²⁴ se zabývaly rentgenovou krystalovou strukturou streptokokového specifického fágového lysinu PlyC. PlyC je ke dni 22. 6. 2012 nejúčinnějším lysinem. Jedná se o enzym sestavený ze dvou částí, PlyCA a PlyCB, které jsou specifické pro streptokokové druhy. Podařilo se jim vypěstovat vhodný krystal PlyC pro rentgenovou difrakční analýzu a struktura PlyC byla určena a zaevidována v PDB. Ve všech případech byly krystaly pěstovány metodou visící kapky v poměru proteinu ke precipitantu 1:1²⁴. Jedná se o jedinou strukturu lysinu, která byla prozatím získána, ale z grampozitivních bakterií na rozdíl od lysinu ECD7, který je z gramnegativních bakterií.

S rostoucí antimikrobiální rezistencí je zkoumáno čím dál více lysinů. Ghose a Euler²³ zkoumaly lysiny účinné proti kmeni *A. baumannii*, například LysAB2 z gramnegativních lysinů nebo PlyF307, který má významnou *in vitro* baktericidní aktivitu proti klinicky relevantním kmenům *A. baumannii*²³.

7 Závěr

Teoretická část bakalářské práce je zaměřena na biomolekulární krystalografii. Nejprve jsou zde uvedeny základní informace o proteinech a jejich struktuře společně s informacemi o RCSB PDB databáze, kde jsou vkládány všechny známe struktury proteinů, zjištěné pomocí rentgenové krystalografie nebo NMR. Dále práce pojednává o procesu krystalizace, fázovém diagramu, faktorech ovlivňujících růst krystalů, pre-krystalizačním testu, krystalizačních metodách a následujících očkovacích technikách, o možných výsledcích krystalizačních experimentů a testování vzniklých krystalů, zda se opravdu jedná o krystaly proteinů. Nejspolehlivějším testem, který také dokáže určit strukturu proteinu, pokud máme k dispozici kvalitní monokrystal, je rentgenová difrakční analýza. V závěru je zmínka o modelovém proteinu, lysozymu. Nakonec je popsána skupina bakteriofágových lysinů, tedy skupina látek důležitá jako alternativní náhrada za antibiotika.

První část praktické části se zabývá zvládnutím vybraných metod na modelovém proteinu lysozymu. Lysozym byl vybrán pro svou snadnou krystalizaci. Jeho krystalizace proběhla metodou sedící a visící kapky, mikrokrytalizací pod olejem a volnou difúzí v kapiláře. Krystalizace byla úspěšná téměř ve všech podmínkách.

Druhá část je zaměřena na krystalizaci nového bakteriofágového lysinu ECD7. Jako první bylo potřeba stanovit podmínky, ve kterých bude tento protein krystalizovat. Za tímto účelem byly vybrány tři komerčně dostupné sady, PEG/Ion, PGA a Morpheus II. Celkem bylo otestováno 288 podmínek za použití metody sedící kapky. Z toho byly vybrány 4 podmínky ze sady PEG/Ion, a to 31, 84, 92 a 93 pro opětovnou krystalizaci pomocí metody sedící kapky. Krystalizace byla neúspěšnější ve srážecím činidle PEG/Ion 84. Po vykrystalizování byl krystal proteinu ECD7 otestován pomocí rentgenové difrakční analýzy na synchrotronu BESSY-II v Berlíně. Rozlišení difrakčního snímku bylo 3,5 Å. Tato data nejsou dostatečná k určení struktury ECD7. Je tedy nutné pokračovat v optimalizování podmínek s cílem získání kvalitnějšího monokrystalu, který bude opětovně měřen na zdrojích synchrotronového záření za účelem získání kvalitních difrakčních dat.

8 Seznam literatury

- [1] Rupp, B. (2010). *Biomolecular crystallography: principles, practice, and application to structural biology*. Garland Science, Taylor & Francis Group. ISBN 978-0-8153-4081-2
- [2] Kutá Smatanová, I. (2003). *Krystalizace biologických makromolekul od teorie k praxi* [online]. In: Krystalografická společnost. Dostupné z WWW: <<https://www.xray.cz/kryst/difrakce/iva/krystalizace.htm>>.
- [3] Drenth J. (1999). *Principles of Protein X-ray Crystallography*. 2. New York: Springer-Verlag New York. ISBN 0-387-98587-5.
- [4] Nelson, David L.; Cox, Michael M. (2005), *Principles of Biochemistry* (4th ed.), New York: W. H. Freeman, ISBN 0-7167-4339-6
- [5] Brocchieri, L., & Karlin, S. (2005). Protein length in eukaryotic and prokaryotic proteomes. *Nucleic acids research*, 33(10), 3390-3400.
- [6] RCSB PDB: Protein Data Bank [online]. Dostupné z WWW: <<http://www.rcsb.org>>, HM Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, TN Bhat, H. Weissig, IN Shindyalov, PE Bourne, 2000. The Protein Data Bank *Nucleic Acids Research*, 28: 235-242.
- [7] Kutá Smatanová, I. (2002). Crystallization of biological macromolecules. *Materials Structure*, 9(1), 14-15.
- [8] Hampton Research. *Crystallization: Research Tools*. Aliso Viejo, USA: Hampton Research Corp, 2015.
- [9] Asherie, N. (2004). *Protein crystallization and phase diagrams*. *Methods*, 34 (3). 266-272
- [10] McPherson, A. (1999). *Crystallization of biological macromolecules*. New York, Laboratory Press, Cold Spring Harbor. ISBN 0-87969-527-7
- [11] Bergfors, T. (1999). *Protein crystallization: techniques, strategies, and tips*. International University Line, La Jolla California USA. ISBN 0-9636817-5-3

- [12] Grilliand, G.L., Tung, M., Blakeslee, D. M., Lander, J. (1994). The biological macromole crystallization databeze, 3.0: new features, data nad the NASA archive for protein crystal growth data. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 50. 408-413.
- [13] A. A. Watson and C. A. O'Callaghan. (2005). Crystallization and X-ray diffraction analysis of human CLEC-2. *Acta. Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.*, 61(Pt 12): 1094-1096.
- [14] Manchenko GP (1994). "Lysozyme". *Handbook of Detection of Enzymes on Electrophoretic Gels*. Boca Raton, Fla.: CRC Press. p. 223. ISBN 978-0-8493-8935-1
- [15] Williams S, Vocadlo D. "Glycoside hydrolase family 22". *Cazypedia*. Retrieved 11 April 2017.
- [16] Yang, H., Yu, J., & Wei, H. (2014). Engineered bacteriophage lysins as novel anti-infectives. *Frontiers in microbiology*, 5, 542.
- [17] Fenton, M., McAuliffe, O., O'Mahony, J., & Coffey, A. (2010). Recombinant bacteriophage lysins as antibacterials. *Bioengineered bugs*, 1(1), 9-16.
- [18] Larpin, Y., Oechslin, F., Moreillon, P., Resch, G., Entenza, J. M., & Mancini, S. (2018). In vitro characterization of PlyE146, a novel phage lysin that targets Gram-negative bacteria. *PLoS One*, 13(2).
- [19] Fischetti, V. A. (2018). Development of phage lysins as novel therapeutics: a historical perspective. *Viruses*, 10(6), 310.
- [20] Antonova, N. P., Vasina, D. V., Lendel, A. M., Usachev, E. V., Makarov, V. V., Gintsburg, A. L., ... & Gushchin, V. A. (2019). Broad Bactericidal Activity of the Myoviridae Bacteriophage Lysins LysAm24, LysECD7, and LysSi3 against Gram-Negative ESKAPE Pathogens. *Viruses*, 11(3), 284.
- [21] *Macromolecular Crystallography. Helmholtz Zentrum Berlin* [online]. Berlin, 2009 [cit. 2020-05-07]. Dostupné z: https://www.helmholtz-berlin.de/forschung/oe/np/gmx/joint-mx-lab/index_en.html

- [22] Gutiérrez-Quezada, A. E., Arreguín-Espinosa, R., & Moreno, A. (2010). Protein Crystal Growth Methods. In *Springer Handbook of Crystal Growth* (pp. 1583-1605). Springer, Berlin, Heidelberg.
- [23] Ghose, C., & Euler, C. W. (2020). Gram-Negative Bacterial Lysins. *Antibiotics*, 9(2), 74.
- [24] 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.

9 Přílohy

Seznam krystalizačních činidel ze sady The PGA Screen

| Tube # | Conc. | Salt 1 | Conc. | Salt 2 | Conc. | Buffer | pH | Conc. | Precipitant | Conc. | Precipitant2 |
|--------|-------|-------------------------------------|-------|-----------------------|-------|-------------------|-----|---------|----------------------|----------|--------------|
| 1-1 | 0.3 M | Potassium bromide | | | 0.1 M | Sodium acetate | 5.0 | 8 % w/v | γ-PGA (Na+ form, LM) | | |
| 1-2 | 0.2 M | Magnesium chloride | | | 0.1 M | Sodium acetate | 5.0 | 8 % w/v | γ-PGA (Na+ form, LM) | | |
| 1-3 | 0.3 M | Sodium malonate dibasic monohydrate | | | 0.1 M | Sodium acetate | 5.0 | 8 % w/v | γ-PGA (Na+ form, LM) | | |
| 1-4 | 0.6 M | Sodium formate | | | 0.1 M | Sodium acetate | 5.0 | 8 % w/v | γ-PGA (Na+ form, LM) | | |
| 1-5 | 1 M | Ammonium formate | | | 0.1 M | Sodium acetate | 5.0 | 8 % w/v | γ-PGA (Na+ form, LM) | | |
| 1-6 | 0.2 M | Potassium thiocyanate | | | 0.1 M | Sodium acetate | 5.0 | 8 % w/v | γ-PGA (Na+ form, LM) | | |
| 1-7 | 0.2 M | L-Proline | | | 0.1 M | Sodium acetate | 5.0 | 8 % w/v | γ-PGA (Na+ form, LM) | | |
| 1-8 | 0.2 M | L-Arginine | | | 0.1 M | Sodium acetate | 5.0 | 8 % w/v | γ-PGA (Na+ form, LM) | | |
| 1-9 | | | | | 0.1 M | Sodium acetate | 5.0 | 5 % w/v | γ-PGA (Na+ form, LM) | 30 % v/v | PEG 400 |
| 1-10 | | | | | 0.1 M | Sodium acetate | 5.0 | 5 % w/v | γ-PGA (Na+ form, LM) | 30 % v/v | PEG 500 MME |
| 1-11 | | | | | 0.1 M | Sodium acetate | 5.0 | 5 % w/v | γ-PGA (Na+ form, LM) | 30 % v/v | MPD |
| 1-12 | | | | | 0.1 M | Sodium acetate | 5.0 | 5 % w/v | γ-PGA (Na+ form, LM) | 20 % w/v | PEG 2000 MME |
| 1-13 | | | | | 0.1 M | Sodium acetate | 5.0 | 5 % w/v | γ-PGA (Na+ form, LM) | 20 % w/v | PEG 3350 |
| 1-14 | | | | | 0.1 M | Sodium acetate | 5.0 | 5 % w/v | γ-PGA (Na+ form, LM) | 15 % w/v | PEG 4000 |
| 1-15 | | | | | 0.1 M | Sodium acetate | 5.0 | 5 % w/v | γ-PGA (Na+ form, LM) | 12 % w/v | PEG 8000 |
| 1-16 | | | | | 0.1 M | Sodium acetate | 5.0 | 5 % w/v | γ-PGA (Na+ form, LM) | 8 % w/v | PEG 20000 |
| 1-17 | 0.2 M | Potassium bromide | 0.2 M | Potassium thiocyanate | 0.1 M | Sodium acetate | 5.0 | 3 % w/v | γ-PGA (Na+ form, LM) | 30 % v/v | PEG 400 |
| 1-18 | 0.2 M | Potassium bromide | 0.2 M | Potassium thiocyanate | 0.1 M | Sodium acetate | 5.0 | 3 % w/v | γ-PGA (Na+ form, LM) | 20 % v/v | PEG 500 MME |
| 1-19 | 0.2 M | Potassium bromide | 0.2 M | Potassium thiocyanate | 0.1 M | Sodium acetate | 5.0 | 3 % w/v | γ-PGA (Na+ form, LM) | 20 % v/v | MPD |
| 1-20 | 0.2 M | Potassium bromide | 0.2 M | Potassium thiocyanate | 0.1 M | Sodium acetate | 5.0 | 3 % w/v | γ-PGA (Na+ form, LM) | 10 % w/v | PEG 2000 MME |
| 1-21 | 0.2 M | Potassium bromide | 0.2 M | Potassium thiocyanate | 0.1 M | Sodium acetate | 5.0 | 3 % w/v | γ-PGA (Na+ form, LM) | 5 % w/v | PEG 3350 |
| 1-22 | 0.2 M | Potassium bromide | 0.2 M | Potassium thiocyanate | 0.1 M | Sodium acetate | 5.0 | 3 % w/v | γ-PGA (Na+ form, LM) | 5 % w/v | PEG 4000 |
| 1-23 | 0.2 M | Potassium bromide | 0.2 M | Potassium thiocyanate | 0.1 M | Sodium acetate | 5.0 | 3 % w/v | γ-PGA (Na+ form, LM) | 5 % w/v | PEG 8000 |
| 1-24 | 0.2 M | Potassium bromide | 0.2 M | Potassium thiocyanate | 0.1 M | Sodium acetate | 5.0 | 3 % w/v | γ-PGA (Na+ form, LM) | 3 % w/v | PEG 20000 |
| 1-25 | 0.1 M | Ammonium sulfate | 0.3 M | Sodium formate | 0.1 M | Sodium acetate | 5.0 | 3 % w/v | γ-PGA (Na+ form, LM) | 30 % v/v | PEG 400 |
| 1-26 | 0.1 M | Ammonium sulfate | 0.3 M | Sodium formate | 0.1 M | Sodium acetate | 5.0 | 3 % w/v | γ-PGA (Na+ form, LM) | 20 % v/v | PEG 500 MME |
| 1-27 | 0.1 M | Ammonium sulfate | 0.3 M | Sodium formate | 0.1 M | Sodium acetate | 5.0 | 3 % w/v | γ-PGA (Na+ form, LM) | 20 % v/v | MPD |
| 1-28 | 0.1 M | Ammonium sulfate | 0.3 M | Sodium formate | 0.1 M | Sodium acetate | 5.0 | 3 % w/v | γ-PGA (Na+ form, LM) | 10 % w/v | PEG 2000 MME |
| 1-29 | 0.1 M | Ammonium sulfate | 0.3 M | Sodium formate | 0.1 M | Sodium acetate | 5.0 | 3 % w/v | γ-PGA (Na+ form, LM) | 5 % w/v | PEG 3350 |
| 1-30 | 0.1 M | Ammonium sulfate | 0.3 M | Sodium formate | 0.1 M | Sodium acetate | 5.0 | 3 % w/v | γ-PGA (Na+ form, LM) | 5 % w/v | PEG 4000 |
| 1-31 | 0.1 M | Ammonium sulfate | 0.3 M | Sodium formate | 0.1 M | Sodium acetate | 5.0 | 3 % w/v | γ-PGA (Na+ form, LM) | 5 % w/v | PEG 8000 |
| 1-32 | 0.1 M | Ammonium sulfate | 0.3 M | Sodium formate | 0.1 M | Sodium acetate | 5.0 | 3 % w/v | γ-PGA (Na+ form, LM) | 3 % w/v | PEG 20000 |
| 1-33 | 0.3 M | Potassium Bromide | | | 0.1 M | Sodium cacodylate | 6.5 | 8 % w/v | γ-PGA (Na+ form, LM) | | |
| 1-34 | 0.2 M | Magnesium chloride | | | 0.1 M | Sodium cacodylate | 6.5 | 8 % w/v | γ-PGA (Na+ form, LM) | | |
| 1-35 | 0.3 M | Sodium malonate dibasic monohydrate | | | 0.1 M | Sodium cacodylate | 6.5 | 8 % w/v | γ-PGA (Na+ form, LM) | | |
| 1-36 | 0.6 M | Sodium formate | | | 0.1 M | Sodium cacodylate | 6.5 | 8 % w/v | γ-PGA (Na+ form, LM) | | |
| 1-37 | 1 M | Ammonium formate | | | 0.1 M | Sodium cacodylate | 6.5 | 8 % w/v | γ-PGA (Na+ form, LM) | | |
| 1-38 | 0.2 M | Potassium thiocyanate | | | 0.1 M | Sodium cacodylate | 6.5 | 8 % w/v | γ-PGA (Na+ form, LM) | | |
| 1-39 | 0.2 M | L-Proline | | | 0.1 M | Sodium cacodylate | 6.5 | 8 % w/v | γ-PGA (Na+ form, LM) | | |
| 1-40 | 0.2 M | L-Arginine | | | 0.1 M | Sodium cacodylate | 6.5 | 8 % w/v | γ-PGA (Na+ form, LM) | | |
| 1-41 | | | | | 0.1 M | Sodium cacodylate | 6.5 | 5 % w/v | γ-PGA (Na+ form, LM) | 30 % v/v | PEG 400 |
| 1-42 | | | | | 0.1 M | Sodium cacodylate | 6.5 | 5 % w/v | γ-PGA (Na+ form, LM) | 30 % v/v | PEG 500 MME |
| 1-43 | | | | | 0.1 M | Sodium cacodylate | 6.5 | 5 % w/v | γ-PGA (Na+ form, LM) | 30 % v/v | MPD |
| 1-44 | | | | | 0.1 M | Sodium cacodylate | 6.5 | 5 % w/v | γ-PGA (Na+ form, LM) | 20 % w/v | PEG 2000 MME |
| 1-45 | | | | | 0.1 M | Sodium cacodylate | 6.5 | 5 % w/v | γ-PGA (Na+ form, LM) | 20 % w/v | PEG 3350 |
| 1-46 | | | | | 0.1 M | Sodium cacodylate | 6.5 | 5 % w/v | γ-PGA (Na+ form, LM) | 15 % w/v | PEG 4000 |
| 1-47 | | | | | 0.1 M | Sodium cacodylate | 6.5 | 5 % w/v | γ-PGA (Na+ form, LM) | 12 % w/v | PEG 8000 |
| 1-48 | | | | | 0.1 M | Sodium cacodylate | 6.5 | 5 % w/v | γ-PGA (Na+ form, LM) | 8 % w/v | PEG 20000 |

| Tube # | Conc. | Salt 1 | Conc. | Salt 2 | Conc. | Buffer | pH | Conc. | Precipitant | Conc. | Precipitant2 |
|--------|-------|-------------------------------------|-------|-----------------------|-------|-------------------|-----|---------|------------------------------|----------|--------------|
| 2-1 | 0.2 M | Potassium bromide | 0.2 M | Potassium thiocyanate | 0.1 M | Sodium cacodylate | 6.5 | 3 % w/v | γ -PGA (Na+ form, LM) | 30 % v/v | PEG 400 |
| 2-2 | 0.2 M | Potassium bromide | 0.2 M | Potassium thiocyanate | 0.1 M | Sodium cacodylate | 6.5 | 3 % w/v | γ -PGA (Na+ form, LM) | 20 % v/v | PEG 500 MME |
| 2-3 | 0.2 M | Potassium bromide | 0.2 M | Potassium thiocyanate | 0.1 M | Sodium cacodylate | 6.5 | 3 % w/v | γ -PGA (Na+ form, LM) | 20 % v/v | MPD |
| 2-4 | 0.2 M | Potassium bromide | 0.2 M | Potassium thiocyanate | 0.1 M | Sodium cacodylate | 6.5 | 3 % w/v | γ -PGA (Na+ form, LM) | 10 % w/v | PEG 2000 MME |
| 2-5 | 0.2 M | Potassium bromide | 0.2 M | Potassium thiocyanate | 0.1 M | Sodium cacodylate | 6.5 | 3 % w/v | γ -PGA (Na+ form, LM) | 5 % w/v | PEG 3350 |
| 2-6 | 0.2 M | Potassium bromide | 0.2 M | Potassium thiocyanate | 0.1 M | Sodium cacodylate | 6.5 | 3 % w/v | γ -PGA (Na+ form, LM) | 5 % w/v | PEG 4000 |
| 2-7 | 0.2 M | Potassium bromide | 0.2 M | Potassium thiocyanate | 0.1 M | Sodium cacodylate | 6.5 | 3 % w/v | γ -PGA (Na+ form, LM) | 5 % w/v | PEG 8000 |
| 2-8 | 0.2 M | Potassium bromide | 0.2 M | Potassium thiocyanate | 0.1 M | Sodium cacodylate | 6.5 | 3 % w/v | γ -PGA (Na+ form, LM) | 3 % w/v | PEG 20000 |
| 2-9 | 0.1 M | Ammonium sulfate | 0.3 M | Sodium formate | 0.1 M | Sodium cacodylate | 6.5 | 3 % w/v | γ -PGA (Na+ form, LM) | 30 % v/v | PEG 400 |
| 2-10 | 0.1 M | Ammonium sulfate | 0.3 M | Sodium formate | 0.1 M | Sodium cacodylate | 6.5 | 3 % w/v | γ -PGA (Na+ form, LM) | 20 % v/v | PEG 500 MME |
| 2-11 | 0.1 M | Ammonium sulfate | 0.3 M | Sodium formate | 0.1 M | Sodium cacodylate | 6.5 | 3 % w/v | γ -PGA (Na+ form, LM) | 20 % v/v | MPD |
| 2-12 | 0.1 M | Ammonium sulfate | 0.3 M | Sodium formate | 0.1 M | Sodium cacodylate | 6.5 | 3 % w/v | γ -PGA (Na+ form, LM) | 10 % w/v | PEG 2000 MME |
| 2-13 | 0.1 M | Ammonium sulfate | 0.3 M | Sodium formate | 0.1 M | Sodium cacodylate | 6.5 | 3 % w/v | γ -PGA (Na+ form, LM) | 5 % w/v | PEG 3350 |
| 2-14 | 0.1 M | Ammonium sulfate | 0.3 M | Sodium formate | 0.1 M | Sodium cacodylate | 6.5 | 3 % w/v | γ -PGA (Na+ form, LM) | 5 % w/v | PEG 4000 |
| 2-15 | 0.1 M | Ammonium sulfate | 0.3 M | Sodium formate | 0.1 M | Sodium cacodylate | 6.5 | 3 % w/v | γ -PGA (Na+ form, LM) | 5 % w/v | PEG 8000 |
| 2-16 | 0.1 M | Ammonium sulfate | 0.3 M | Sodium formate | 0.1 M | Sodium cacodylate | 6.5 | 3 % w/v | γ -PGA (Na+ form, LM) | 3 % w/v | PEG 20000 |
| 2-17 | 0.3 M | Potassium bromide | | | 0.1 M | Tris | 7.8 | 8 % w/v | γ -PGA (Na+ form, LM) | | |
| 2-18 | 0.2 M | Magnesium chloride | | | 0.1 M | Tris | 7.8 | 8 % w/v | γ -PGA (Na+ form, LM) | | |
| 2-19 | 0.3 M | Sodium malonate dibasic monohydrate | | | 0.1 M | Tris | 7.8 | 8 % w/v | γ -PGA (Na+ form, LM) | | |
| 2-20 | 0.6 M | Sodium formate | | | 0.1 M | Tris | 7.8 | 8 % w/v | γ -PGA (Na+ form, LM) | | |
| 2-21 | 1 M | Ammonium formate | | | 0.1 M | Tris | 7.8 | 8 % w/v | γ -PGA (Na+ form, LM) | | |
| 2-22 | 0.2 M | Potassium thiocyanate | | | 0.1 M | Tris | 7.8 | 8 % w/v | γ -PGA (Na+ form, LM) | | |
| 2-23 | 0.2 M | L-Proline | | | 0.1 M | Tris | 7.8 | 8 % w/v | γ -PGA (Na+ form, LM) | | |
| 2-24 | 0.2 M | L-Arginine | | | 0.1 M | Tris | 7.8 | 8 % w/v | γ -PGA (Na+ form, LM) | | |
| 2-25 | | | | | 0.1 M | Tris | 7.8 | 5 % w/v | γ -PGA (Na+ form, LM) | 30 % v/v | PEG 400 |
| 2-26 | | | | | 0.1 M | Tris | 7.8 | 5 % w/v | γ -PGA (Na+ form, LM) | 30 % v/v | PEG 500 MME |
| 2-27 | | | | | 0.1 M | Tris | 7.8 | 5 % w/v | γ -PGA (Na+ form, LM) | 30 % v/v | MPD |
| 2-28 | | | | | 0.1 M | Tris | 7.8 | 5 % w/v | γ -PGA (Na+ form, LM) | 20 % w/v | PEG 2000 MME |
| 2-29 | | | | | 0.1 M | Tris | 7.8 | 5 % w/v | γ -PGA (Na+ form, LM) | 20 % w/v | PEG 3350 |
| 2-30 | | | | | 0.1 M | Tris | 7.8 | 5 % w/v | γ -PGA (Na+ form, LM) | 15 % w/v | PEG 4000 |
| 2-31 | | | | | 0.1 M | Tris | 7.8 | 5 % w/v | γ -PGA (Na+ form, LM) | 12 % w/v | PEG 8000 |
| 2-32 | | | | | 0.1 M | Tris | 7.8 | 5 % w/v | γ -PGA (Na+ form, LM) | 8 % w/v | PEG 20000 |
| 2-33 | 0.2 M | Potassium bromide | 0.2 M | Potassium thiocyanate | 0.1 M | Tris | 7.8 | 3 % w/v | γ -PGA (Na+ form, LM) | 30 % v/v | PEG 400 |
| 2-34 | 0.2 M | Potassium bromide | 0.2 M | Potassium thiocyanate | 0.1 M | Tris | 7.8 | 3 % w/v | γ -PGA (Na+ form, LM) | 20 % v/v | PEG 500 MME |
| 2-35 | 0.2 M | Potassium bromide | 0.2 M | Potassium thiocyanate | 0.1 M | Tris | 7.8 | 3 % w/v | γ -PGA (Na+ form, LM) | 20 % v/v | MPD |
| 2-36 | 0.2 M | Potassium bromide | 0.2 M | Potassium thiocyanate | 0.1 M | Tris | 7.8 | 3 % w/v | γ -PGA (Na+ form, LM) | 10 % w/v | PEG 2000 MME |
| 2-37 | 0.2 M | Potassium bromide | 0.2 M | Potassium thiocyanate | 0.1 M | Tris | 7.8 | 3 % w/v | γ -PGA (Na+ form, LM) | 5 % w/v | PEG 3350 |
| 2-38 | 0.2 M | Potassium bromide | 0.2 M | Potassium thiocyanate | 0.1 M | Tris | 7.8 | 3 % w/v | γ -PGA (Na+ form, LM) | 5 % w/v | PEG 4000 |
| 2-39 | 0.2 M | Potassium bromide | 0.2 M | Potassium thiocyanate | 0.1 M | Tris | 7.8 | 3 % w/v | γ -PGA (Na+ form, LM) | 5 % w/v | PEG 8000 |
| 2-40 | 0.2 M | Potassium bromide | 0.2 M | Potassium thiocyanate | 0.1 M | Tris | 7.8 | 3 % w/v | γ -PGA (Na+ form, LM) | 3 % w/v | PEG 20000 |
| 2-41 | 0.1 M | Ammonium sulfate | 0.3 M | Sodium formate | 0.1 M | Tris | 7.8 | 3 % w/v | γ -PGA (Na+ form, LM) | 30 % v/v | PEG 400 |
| 2-42 | 0.1 M | Ammonium sulfate | 0.3 M | Sodium formate | 0.1 M | Tris | 7.8 | 3 % w/v | γ -PGA (Na+ form, LM) | 20 % v/v | PEG 500 MME |
| 2-43 | 0.1 M | Ammonium sulfate | 0.3 M | Sodium formate | 0.1 M | Tris | 7.8 | 3 % w/v | γ -PGA (Na+ form, LM) | 20 % v/v | MPD |
| 2-44 | 0.1 M | Ammonium sulfate | 0.3 M | Sodium formate | 0.1 M | Tris | 7.8 | 3 % w/v | γ -PGA (Na+ form, LM) | 10 % w/v | PEG 2000 MME |
| 2-45 | 0.1 M | Ammonium sulfate | 0.3 M | Sodium formate | 0.1 M | Tris | 7.8 | 3 % w/v | γ -PGA (Na+ form, LM) | 5 % w/v | PEG 3350 |
| 2-46 | 0.1 M | Ammonium sulfate | 0.3 M | Sodium formate | 0.1 M | Tris | 7.8 | 3 % w/v | γ -PGA (Na+ form, LM) | 5 % w/v | PEG 4000 |
| 2-47 | 0.1 M | Ammonium sulfate | 0.3 M | Sodium formate | 0.1 M | Tris | 7.8 | 3 % w/v | γ -PGA (Na+ form, LM) | 5 % w/v | PEG 8000 |
| 2-48 | 0.1 M | Ammonium sulfate | 0.3 M | Sodium formate | 0.1 M | Tris | 7.8 | 3 % w/v | γ -PGA (Na+ form, LM) | 3 % w/v | PEG 20000 |

Seznam krystalizačních činidel ze sady PEG/Ion HT™

| Well # | Salt | Well # | Polymer | Well # | pH ₀ |
|-----------|--|-----------|-----------------------------------|-----------|-----------------|
| 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 |

| 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 |

Seznam krystalizačních činidel ze sady Morpheus® II HT-96

| Well No. | Conc. | Units | Additives (PDB ligands) | Conc. | Units | Buffer | pH | Conc. | Units | Precipitant |
|----------|-------|-------|-------------------------|-------|-------|-----------------|-----|----------|-------|-------------------|
| A1 | 90 mM | | LiNaK | 0.1 M | | Buffer System 4 | 6.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 5 |
| A2 | 90 mM | | LiNaK | 0.1 M | | Buffer System 4 | 6.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 6 |
| A3 | 90 mM | | LiNaK | 0.1 M | | Buffer System 4 | 6.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 7 |
| A4 | 90 mM | | LiNaK | 0.1 M | | Buffer System 4 | 6.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 8 |
| A5 | 90 mM | | LiNaK | 0.1 M | | Buffer System 5 | 7.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 5 |
| A6 | 90 mM | | LiNaK | 0.1 M | | Buffer System 5 | 7.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 6 |
| A7 | 90 mM | | LiNaK | 0.1 M | | Buffer System 5 | 7.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 7 |
| A8 | 90 mM | | LiNaK | 0.1 M | | Buffer System 5 | 7.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 8 |
| A9 | 90 mM | | LiNaK | 0.1 M | | Buffer System 6 | 8.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 5 |
| A10 | 90 mM | | LiNaK | 0.1 M | | Buffer System 6 | 8.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 6 |
| A11 | 90 mM | | LiNaK | 0.1 M | | Buffer System 6 | 8.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 7 |
| A12 | 90 mM | | LiNaK | 0.1 M | | Buffer System 6 | 8.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 8 |
| B1 | 2 mM | | Divalents II | 0.1 M | | Buffer System 4 | 6.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 5 |
| B2 | 2 mM | | Divalents II | 0.1 M | | Buffer System 4 | 6.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 6 |
| B3 | 2 mM | | Divalents II | 0.1 M | | Buffer System 4 | 6.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 7 |
| B4 | 2 mM | | Divalents II | 0.1 M | | Buffer System 4 | 6.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 8 |
| B5 | 2 mM | | Divalents II | | | none | | 50 % v/v | | Precipitant Mix 5 |
| B6 | 2 mM | | Divalents II | | | none | | 50 % v/v | | Precipitant Mix 6 |
| B7 | 2 mM | | Divalents II | | | none | | 50 % v/v | | Precipitant Mix 7 |
| B8 | 2 mM | | Divalents II | | | none | | 50 % v/v | | Precipitant Mix 8 |
| B9 | 2 mM | | Divalents II | 0.1 M | | Buffer System 6 | 8.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 5 |
| B10 | 2 mM | | Divalents II | 0.1 M | | Buffer System 6 | 8.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 6 |
| B11 | 2 mM | | Divalents II | 0.1 M | | Buffer System 6 | 8.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 7 |
| B12 | 2 mM | | Divalents II | 0.1 M | | Buffer System 6 | 8.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 8 |
| C1 | 4 mM | | Alkalis | 0.1 M | | Buffer System 4 | 6.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 5 |
| C2 | 4 mM | | Alkalis | 0.1 M | | Buffer System 4 | 6.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 6 |
| C3 | 4 mM | | Alkalis | 0.1 M | | Buffer System 4 | 6.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 7 |
| C4 | 4 mM | | Alkalis | 0.1 M | | Buffer System 4 | 6.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 8 |
| C5 | 4 mM | | Alkalis | 0.1 M | | Buffer System 5 | 7.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 5 |
| C6 | 4 mM | | Alkalis | 0.1 M | | Buffer System 5 | 7.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 6 |
| C7 | 4 mM | | Alkalis | 0.1 M | | Buffer System 5 | 7.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 7 |
| C8 | 4 mM | | Alkalis | 0.1 M | | Buffer System 5 | 7.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 8 |
| C9 | 4 mM | | Alkalis | 0.1 M | | Buffer System 6 | 8.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 5 |
| C10 | 4 mM | | Alkalis | 0.1 M | | Buffer System 6 | 8.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 6 |
| C11 | 4 mM | | Alkalis | 0.1 M | | Buffer System 6 | 8.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 7 |
| C12 | 4 mM | | Alkalis | 0.1 M | | Buffer System 6 | 8.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 8 |
| D1 | 2 mM | | Oxometalates | 0.1 M | | Buffer System 4 | 6.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 5 |
| D2 | 2 mM | | Oxometalates | 0.1 M | | Buffer System 4 | 6.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 6 |
| D3 | 2 mM | | Oxometalates | 0.1 M | | Buffer System 4 | 6.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 7 |
| D4 | 2 mM | | Oxometalates | 0.1 M | | Buffer System 4 | 6.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 8 |
| D5 | 2 mM | | Oxometalates | 0.1 M | | Buffer System 5 | 7.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 5 |
| D6 | 2 mM | | Oxometalates | 0.1 M | | Buffer System 5 | 7.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 6 |
| D7 | 2 mM | | Oxometalates | 0.1 M | | Buffer System 5 | 7.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 7 |
| D8 | 2 mM | | Oxometalates | 0.1 M | | Buffer System 5 | 7.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 8 |
| D9 | 2 mM | | Oxometalates | 0.1 M | | Buffer System 6 | 8.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 5 |
| D10 | 2 mM | | Oxometalates | 0.1 M | | Buffer System 6 | 8.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 6 |
| D11 | 2 mM | | Oxometalates | 0.1 M | | Buffer System 6 | 8.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 7 |
| D12 | 2 mM | | Oxometalates | 0.1 M | | Buffer System 6 | 8.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 8 |

| Well No. | Conc. | Units | Additives (PDB ligands) | Conc. | Units | Buffer | pH | Conc. | Units | Precipitant |
|----------|--------|-------|-------------------------|-------|-------|-----------------|-----|----------|-------|-------------------|
| E1 | 2 mM | | Lanthanides | 0.1 M | | Buffer System 4 | 6.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 5 |
| E2 | 2 mM | | Lanthanides | 0.1 M | | Buffer System 4 | 6.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 6 |
| E3 | 2 mM | | Lanthanides | 0.1 M | | Buffer System 4 | 6.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 7 |
| E4 | 2 mM | | Lanthanides | 0.1 M | | Buffer System 4 | 6.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 8 |
| E5 | 2 mM | | Lanthanides | 0.1 M | | Buffer System 5 | 7.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 5 |
| E6 | 2 mM | | Lanthanides | 0.1 M | | Buffer System 5 | 7.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 6 |
| E7 | 2 mM | | Lanthanides | 0.1 M | | Buffer System 5 | 7.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 7 |
| E8 | 2 mM | | Lanthanides | 0.1 M | | Buffer System 5 | 7.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 8 |
| E9 | 2 mM | | Lanthanides | 0.1 M | | Buffer System 6 | 8.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 5 |
| E10 | 2 mM | | Lanthanides | 0.1 M | | Buffer System 6 | 8.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 6 |
| E11 | 2 mM | | Lanthanides | 0.1 M | | Buffer System 6 | 8.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 7 |
| E12 | 2 mM | | Lanthanides | 0.1 M | | Buffer System 6 | 8.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 8 |
| F1 | 100 mM | | Monosaccharides II | 0.1 M | | Buffer System 4 | 6.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 5 |
| F2 | 100 mM | | Monosaccharides II | 0.1 M | | Buffer System 4 | 6.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 6 |
| F3 | 100 mM | | Monosaccharides II | 0.1 M | | Buffer System 4 | 6.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 7 |
| F4 | 100 mM | | Monosaccharides II | 0.1 M | | Buffer System 4 | 6.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 8 |
| F5 | 100 mM | | Monosaccharides II | 0.1 M | | Buffer System 5 | 7.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 5 |
| F6 | 100 mM | | Monosaccharides II | 0.1 M | | Buffer System 5 | 7.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 6 |
| F7 | 100 mM | | Monosaccharides II | 0.1 M | | Buffer System 5 | 7.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 7 |
| F8 | 100 mM | | Monosaccharides II | 0.1 M | | Buffer System 5 | 7.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 8 |
| F9 | 100 mM | | Monosaccharides II | 0.1 M | | Buffer System 6 | 8.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 5 |
| F10 | 100 mM | | Monosaccharides II | 0.1 M | | Buffer System 6 | 8.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 6 |
| F11 | 100 mM | | Monosaccharides II | 0.1 M | | Buffer System 6 | 8.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 7 |
| F12 | 100 mM | | Monosaccharides II | 0.1 M | | Buffer System 6 | 8.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 8 |
| G1 | 100 mM | | Amino acids II | 0.1 M | | Buffer System 4 | 6.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 5 |
| G2 | 100 mM | | Amino acids II | 0.1 M | | Buffer System 4 | 6.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 6 |
| G3 | 100 mM | | Amino acids II | 0.1 M | | Buffer System 4 | 6.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 7 |
| G4 | 100 mM | | Amino acids II | 0.1 M | | Buffer System 4 | 6.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 8 |
| G5 | 100 mM | | Amino acids II | 0.1 M | | Buffer System 5 | 7.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 5 |
| G6 | 100 mM | | Amino acids II | 0.1 M | | Buffer System 5 | 7.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 6 |
| G7 | 100 mM | | Amino acids II | 0.1 M | | Buffer System 5 | 7.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 7 |
| G8 | 100 mM | | Amino acids II | 0.1 M | | Buffer System 5 | 7.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 8 |
| G9 | 100 mM | | Amino acids II | 0.1 M | | Buffer System 6 | 8.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 5 |
| G10 | 100 mM | | Amino acids II | 0.1 M | | Buffer System 6 | 8.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 6 |
| G11 | 100 mM | | Amino acids II | 0.1 M | | Buffer System 6 | 8.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 7 |
| G12 | 100 mM | | Amino acids II | 0.1 M | | Buffer System 6 | 8.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 8 |
| H1 | 40 mM | | Polyamines | 0.1 M | | Buffer System 4 | 6.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 5 |
| H2 | 40 mM | | Polyamines | 0.1 M | | Buffer System 4 | 6.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 6 |
| H3 | 40 mM | | Polyamines | 0.1 M | | Buffer System 4 | 6.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 7 |
| H4 | 40 mM | | Polyamines | 0.1 M | | Buffer System 4 | 6.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 8 |
| H5 | 40 mM | | Polyamines | 0.1 M | | Buffer System 5 | 7.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 5 |
| H6 | 40 mM | | Polyamines | 0.1 M | | Buffer System 5 | 7.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 6 |
| H7 | 40 mM | | Polyamines | 0.1 M | | Buffer System 5 | 7.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 7 |
| H8 | 40 mM | | Polyamines | 0.1 M | | Buffer System 5 | 7.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 8 |
| H9 | 40 mM | | Polyamines | 0.1 M | | Buffer System 6 | 8.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 5 |
| H10 | 40 mM | | Polyamines | 0.1 M | | Buffer System 6 | 8.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 6 |
| H11 | 40 mM | | Polyamines | 0.1 M | | Buffer System 6 | 8.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 7 |
| H12 | 40 mM | | Polyamines | 0.1 M | | Buffer System 6 | 8.5 | 50 % v/v | | Precipitant Mix 8 |