

3D atomární struktura bílkovin za 24 hodin

M. Jiskrová¹, K. Pražáková², V. Srb¹, A. Svobodová³
Karlínské gymnázium. Praha¹

První soukromé jazykové gymnázium, Hradec Králové²
Gymnázium Velké Meziříčí, Velké Meziříčí³
v.srb@email.cz

Abstrakt:

Bílkoviny jsou důležité biopolymerní makromolekuly, které nalezneme v každém živém organismu. K jejich pochopení je nezbytné znát jejich stavbu. V našem miniprojektu jsme se zaměřili na krystalizaci lysozymu, dále na difrakční experiment a výsledné určení struktury tohoto proteinu.

1 Úvod

Bílkoviny jsou základním stavebním prvkem živé hmoty. Jedná se o makromolekulární látky tvořené z dlouhých řetězců aminokyselin, které jsou spojeny peptidovými vazbami. V těle organismů plní stavební, zásobní, katalytické nebo ochranné funkce. Pro pochopení těchto funkcí a následné využití je potřeba znát jejich strukturu [1]. Hlavním cílem našeho projektu bylo seznámit se s metodami používanými při určování struktury proteinů a určit strukturu lysozymu – enzymu, který se vyskytuje ve vaječném bílku, slzách, hlenu a krvi [2].

2 Materiály a metody

Nejprve jsme se zabývali krystalizací lysozymu. Využili jsme metodu difúze par, konkrétně v uspořádání visící kapky. Do rezervoáru jsme napipetovali různé objemy roztoků solí (NaCl, octan sodný), které jsme demineralizovanou vodou doplnili na celkový objem 1 ml. Na očištěné víčko rezervoáru jsme nanесли 1 μ l vzorku lysozymu o různých koncentracích, ke kterému jsme přidali vždy 1 μ l odpovídajícího precipitantu z rezervoáru. Cílem bylo zjistit ideální podmínku pro vypěstování krystalů, aby byly dostatečně velké.



Obr. 1 – Příprava vzorků ke krystalizaci

Poté jsme krystaly pozorovali pod mikroskopem a zkusili jsme je vylovit pomocí smyčky o průměru 300 μ l, aby mohly být připraveny k difrakčnímu experimentu.

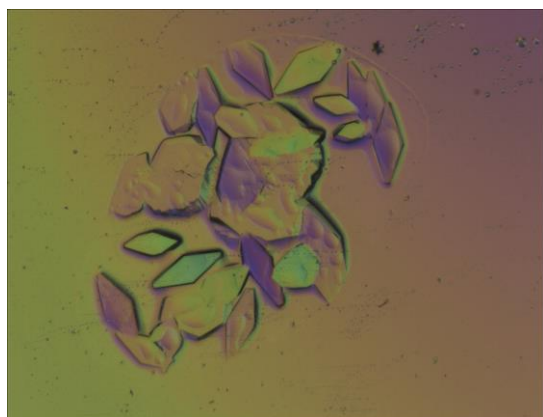
Zmražený krystalek byl umístěn na goniometr v difraktometru a byla změřena difrakční data. Krystalek byl ozařován rentgenovým zářením ze zdroje s tekutou anodou (MetalJet) o vlnové délce 1,3418 Å. Vzdálenost krystalu od detektoru byla 80 mm, použit byl plošný detektor Photon II. Byly naměřeny 4 soubory difrakčních dat, celkově jsme získali 2880 snímků.

Reflexe se poté indexovaly, jejich intenzity byly integrovány a seškálovány pomocí programu XDS a XDSKappa. Fázový problém byl vyřešen metodou molekulárního nahrazení s již existujícím modelem struktury lysozymu dostupného z Protein Data Bank (PDB 2AXR), použili jsme program Phaser.

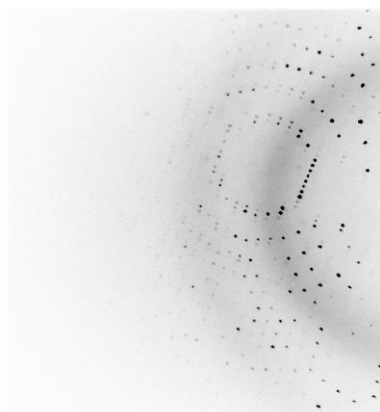
Struktura bílkoviny byla upřesněna v programu Refmac5.

3 Výsledky a diskuze

Při krystalizaci lysozymu nám vyrostly vhodné krystalky pouze v jednom případě a to, když jsme použili precipitant obsahující 0,6M NaCl a 0,1M NaAcet, koncentrace vzorku lysozymu byla 80 mg/ml (viz Obr. 2). V jiných případech ke krystalizaci nedošlo, případně byly krystaly moc malé. Vylovení krystalů pomocí smyčky proběhlo úspěšně.

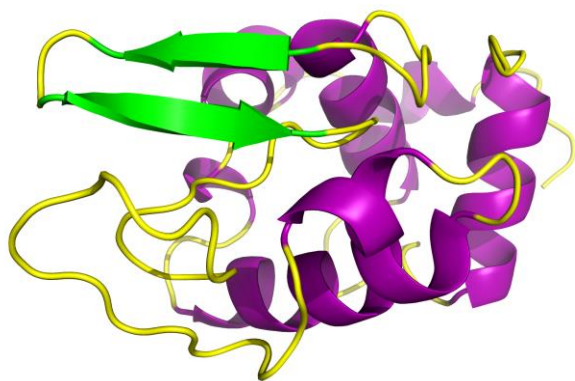


Obr. 2 – Krystaly v polarizovaném světle

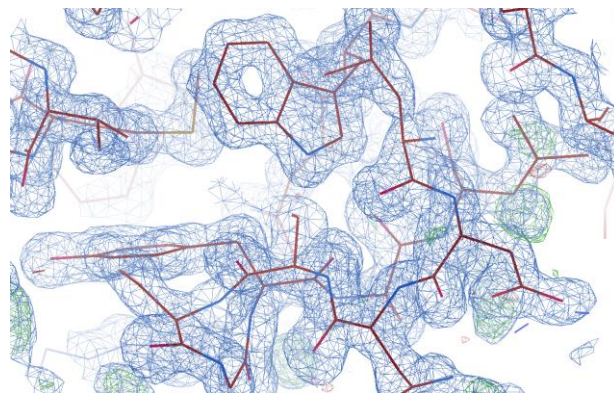


Obr. 3 – Difrakční snímek

Při difrakčním experimentu jsme získali 4 soubory dat po 720 snímcích (viz Obr. 3). S využitím programu XDS se reflexe podařilo oindexovat. Bylo zjištěno, že základní buňka krystalu je primitivní tetragonální, její parametry jsou 76,89 x 76,89 x 37,30 Å. Všechny úhly jsou pravé. Zpracování difrakčních dat a vyřešení fázového problému proběhlo bez problému. Struktura bílkoviny byla upřesněna v programu Refmac5. Pozorovaná elektronová hustota odpovídala použitému modelu a upřesnění zkonvergovalo, takže jsme strukturu určili úspěšně. Na Obr. 4 je znázorněna sekundární struktura lysozymu. Na Obr. 5 lze vidět detail struktury lysozymu se znázorněnou elektronovou hustotou na hladině 1σ .



Obr. 4 – sekundární struktura lysozymu (program PyMOL)



Obr. 5 – detail struktury lysozymu se znázorněnou elektronovou hustotou na hladině 1σ (program Coot)

4 Shrnutí

Podařilo se nám splnit cíl našeho miniprojektu. Během našeho projektu jsme vypěstovali krystaly lysosomu, určili jsme nejvhodnější podmínku. Vyzkoušeli jsme si vylovení krystalů pomocí smyčky a měli jsme možnost provést difrakční experiment. Také se nám podařilo pomocí počítačových programů vyřešit strukturu lysozymu.

Poděkování

Chtěli bychom poděkovat našemu supervisorovi projektu Ing. Martinovi Malému za vedení naší práce a za cenné rady. Děkujeme také ostatním pracovníkům BIOCEVu a rovněž organizátorům Týdne vědy za pořádání této akce a za možnost zúčastnit se.

Reference:

- [1] Bílkoviny. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2018-06-19]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Bílkoviny>
- [2] Lysozym. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2018-06-19]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Lysozym>