

3D atomární struktura bílkoviny za 24 hodin

Andrea Durčáková¹, Lukrécia Zemanová², Lukáš Frk³
Přírodovědné GYMNÁZIUM PRIGO, Ostrava¹
CÍRKEVNÍ GYMNÁZIUM NĚMECKÉHO ŘÁDU, Olomouc²
Gymnázium Nad Alejí, Praha³
lukrecia.zemanova@gmail.com

Abstrakt:

Naším cílem bylo určit strukturu proteinu lysozymu pomocí difrakčních metod makromolekulární krystalografie a poté experimentem ověřit fázový diagram. Ze zpracovaných difrakčních dat se podařilo stanovit atomární model lysozymu. Fázový diagram vyšel s drobnými odchylkami.

1 Úvod

Proteiny jsou jednou ze základních stavebních jednotek lidského těla, které se bez těchto komplexních molekul, složených z aminokyselin, neobejde. Proteiny se však nenachází jen v lidském těle, ale u všech živých organismů. Náš zkoumaný protein lysozym je jedním z nich.

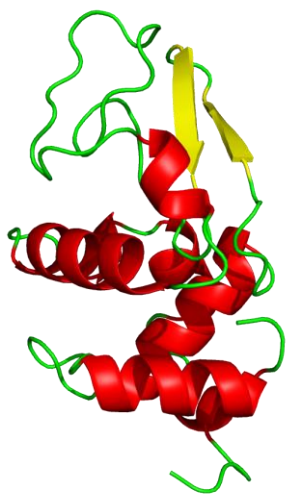
Lysozym má antibakteriální účinky [1] a schopnost narušovat bakteriální stěnu. Nachází se například v lidských hlenech, slzách, v mateřském mléce živočichů, ale i ve vaječném bílku, kde chrání zárodek před bakteriemi. Právě lysozym z vaječného bílku byl předmětem našeho zkoumání.

Tento protein jsme zkoumali několika způsoby: Měřením v difraktometru a experimentálním určováním fázového diagramu.

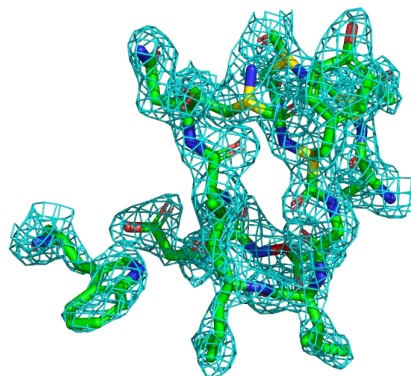
2 Tělo příspěvku

První ze způsobů zkoumání je měření krystalizační *in situ* difraktometrem, kdy jsme si připravili vzorky sedících kapek na krystalizační destičku pomocí přístroje Gryphon (Art Robins). Následně jsme ji vložili do krystalizačního hotelu RI1000 (Formulatrix), kde probíhalo focení vzorků a pozorování růstu krystalů. Následně byla destička vložena do difraktometru D8 Venture (Bruker), kde jsme pomocí paprsku rentgenového záření měřili difrakční záznamy s difrakčními stopami. Pomocí těchto stop jsme sestrojili atomární model lysozymu. Některé snímky byly obtížné na provedení, protože při otočení destičky pro měření v některých případech krystaly spadly dolů. Data se měřila z 23 krystalů, z nichž použito bylo 9, kdy ostatní data nebyla dost kvalitní. Fázový problém jsme vyřešili metodou molekulárního nahrazení, jako model byla použita struktura lysozymu z koňského mléka (PDB 2EQL). Pomocí Fourierovy transformace se vypočítala elektronová hustota a pomocí té se určila poloha jednotlivých atomů a samotný atomární model. Model bylo třeba manuálně upravit.

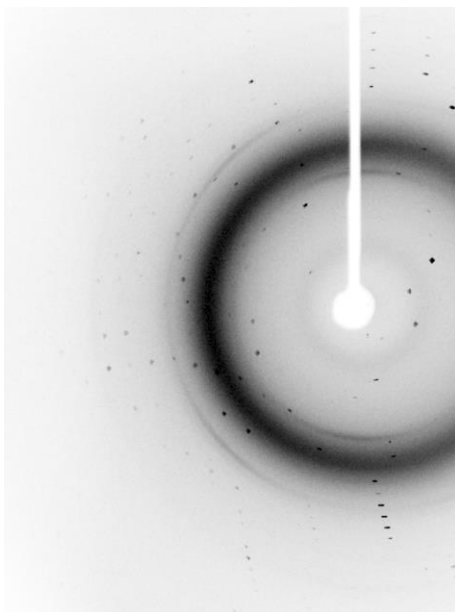
Podářilo se nám urřit atomární model lysozymu (Obr. 1, 2) pomocí difrakčních snímku (Obr. 3).



Obr. 1 – Atomární model lysozymu – sekundární struktura



Obr. 2 – Atomární model lysozymu (detail aktivního místa) – tyčkový model v mapě elektronové hustoty



Obr. 3 – Difrakční snímek krystalu lysozymu

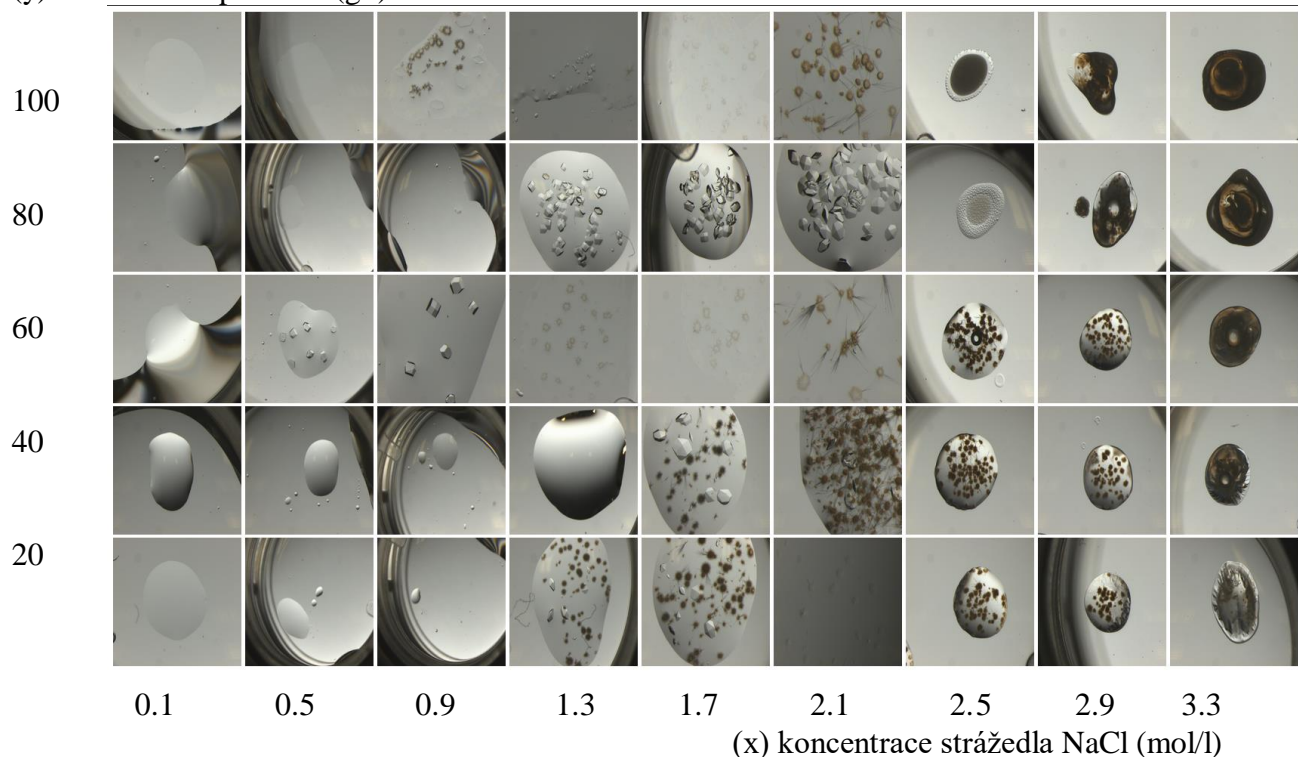
Jako druhý způsob jsme zvolili krystalizaci pomocí difuze par s uspořádním visící kapky. V tomto experimentu jsme si namíchali různé koncentrace lysozymu konkrétně 80, 60, 40 a 20 mg/ml. Jako pátý jsme používali roztok lysozymu o koncentraci 100 mg/ml, ze kterého jsme míchali již zmíněné koncentrace. Dále jsme připravili srážedlo složeného z octanu sodného pH 4,6, chloridu sodného (NaCl) a vody, o různých koncentracích (viz tabulka 1), které jsme později využili na přípravu visících kapek (celkem 90). Celkem se ho v rezervoáru nacházelo 500 μ l. Visící kapky jsme připravovali pomocí pipet, kdy jsme nanесли na sklíčko 1 μ l roztoku proteinu a 1 μ l připraveného srážedla. Vzorky jsme nechali přes noc krystalizovat (cca 17 hodin) a následně zkoumali a porovnávali s fázovým diagramem.

Náš experiment s fázovým diagramem vyšel podle očekávání s pár odchylkami. V tabulce 1 jsou znázorněny výsledky experimentu.

Někde se nám stanovené podmínky nepovedlo zachovat, některé kapky se slily do jedné a výsledek byl lehce odlišný od očekávání.

Byly pozorovány prázdné kapky – ty s nejnižší koncentrací roztoků; krystaly a jehlicovité krystaly – vyšší koncentrace roztoků; sferolity a sraženiny – nejvyšší koncentrace roztoků.

Tabulka 1
(y) koncentrace proteinu (g/l)



3 Shrnutí

Během naší dvoudenní práce se nám podařilo stanovit strukturu proteinu lysozym z vaječného bílku pomocí difrakčních metod. Také se nám povedlo ověřit fázový diagram použitím metody difuze par s uspořádáním visící kapky s drobnými odchylkami.

Poděkování

Chtěli bychom poděkovat našim úžasným vedoucím projektu Janovi Stránskému a Martinovi Malému. Dále také Vojtěchovi Svobodovi a Kateřině Jirákové za organizaci Týdne vědy na Jaderce, bez kterých bychom tady nebyli. A jako poslední bychom chtěli poděkovat naší největší zahraniční podpoře Joelovi L. Sussmanovi.

Reference:

- [1] HUGHEY, V. L. – JOHNSON, E. A.: *Antimicrobial activity of lysozyme against bacteria involved in food spoilage and food-borne disease* Applied and environmental microbiology vol. 53, 1987, pp. 2165-70.