

# Biofyzikálne štúdium bielkoviny

## Od sliny ku štruktúre

D. Turčeková\*, N. Remperová\*, A. Červenka\*\*

\*Gymnázium Partizánske; \*\*Masarykovo gymnázium, Příbor  
diana.turcekova@gmail.com ; natalia.remperova@gmail.com;  
[adamcervenka000@seznam.cz](mailto:adamcervenka000@seznam.cz)

### Abstrakt:

Znalosť štruktúry proteínu je kľúčová pre pochopenie jeho funkcie. Biofyzikálnymi metódami sme overili správanie sa proteínu v roztoku. Prírodné sme vykryštalizovali a určili jeho štruktúru.

## 1 Úvod

Cieľom tejto práce bolo určiť štruktúru bielkoviny. Proteíny vznikajú usporiadaním aminokyselín v polypeptidovom reťazci, na základe predlohy - DNA. Ich štruktúra sa určuje ťažšie ako pri DNA, napriek tomu, že sú obsiahnuté aj v bežných látkach, napríklad v slinách, slzách, vaječnom bielku. V biomedicínskych, chemických a technologických odboroch je poznanie ich štruktúry nevyhnutné.

## 2 Materiály

Na biofyzikálne metódy sme použili vzorku lyzozýmu s koncentráciou 7g/l, ktorý bol rozpustený v destilovanej demineralizovanej vode. Pre charakterizáciu pomocou termoforézy a dynamického rozptylu svetla (DLS) sme pripravili roztoky pufrův: 50mM kyselina citrónová pH 3, 50mM CHES pH 9.5, 50mM HEPES pH 7.5 všetko s 250mM NaCl, a ďalej 100mM Tris pH 8.5, 50mM glycín pH 2.5 a pH 9, 50mM DL - kyselina jablčná pH 7, 100mM kyselina octová pH 4 s 50mM NaCl.

Pre optimalizáciu kryštalizačnej podmienky sme použili vzorku lyzozýmu s koncentraciami 7g/l, 20g/l, 50g/l, 80g/l a 130g/l. Ako zrážadlo bol použitý NaCl s koncentraciami 0.1M, 0.3M, 0.6M, 1M, 2M a 3M, ako pufer bol použitý 0.1M octan sodný pH 4.

### 3 Experimentálne metódy

Najskôr sme stanovili koncentráciu zásobného vzorku lyzozýmu pomocou spektrofotometrickej metódy založenej na Lambert-Beerovom zákone. Použili sme kapkový spektrofotometr DeNovix DS-11.

Pomocou DLS (Zetasizer Nano-ZS90) sme určili veľkosť molekúl lyzozýmu a jeho monodisperznosť a vyskúšali sme pôsobenie rôznych pufov na správanie sa molekuly v roztoku.

Pomocou termoforézy (Prometheus NT.48, Nanotemper) sme skúmali správanie sa proteínu v rôznych pufoch so zvyšovaním teplôt.

Na hľadanie vhodnej kryštalizačnej podmienky (počiatočný screening) sme použili predpripravenú sadu kryštalizačných roztokov Morpheus HT-96 <sup>[1]</sup>. Vzorka lyzozýmu mala koncentráciu 100 g/l. Kryštály rástli v 96 jamkových doskách v usporiadaní sediacej kvapky. Objem jamiek bol 70  $\mu$ l a objem kvapiek 0.3  $\mu$ l (v pomere roztok proteínu : kryštalizačnému roztoku: 1:2, 1:1, 2:1). Nasadenú dosku sme skladovali pri teplote 20 °C.

Pre optimalizáciu sme zvolili podmienku, ktorá obsahovala octan sodný a NaCl. Bolo nasadených 30 podmienok na vytvorenie fázového diagramu, kde sa menila koncentrácia NaCl a lyzozýmu. Výsledný fázový diagram je zobrazený na obr. 1.

Vhodne narastené kryštály sme pod mikroskopom z roztoku vylovili nylonovými slučkami a zmrazili v tekutom dusíku (77 K). Zmrazené vzorky boli otestované na zdroji röntgenového žiarenia. Zdrojom žiarenia bola rentgenová lampa s anódou s tekutého Ga (Exceillum MetalJet). Dáta zaznamenal plošný detektor (Bruker Photon 2).

### 4 Výsledky a diskusia

Pomocou spektrofotometra sme určili koncentráciu vzorky lyzozýmu, ktorá bola stanovená na 131 g/l.

Zmeraním DLS sme zistili že proteín tvorí v TRIS-u agregáty (obr. 1a). Meranie vo vode bolo nereprodukovateľné, čo znamená že voda nie je vhodným prostredím pre tento proteín (obr. 1b). Meranie v roztoku octanu sodného ukazuje, že veľkosť molekúl je cca 2 nm a molekula proteínu sa neviaže na iné molekuly proteínu (obr. 1c).

Výsledný graf z termoforézy je na obr. 2. Proteín je najstabilnejší v roztoku 50mM HEPES (pH 7.5) s 250 mM NaCl. Teplota topenia bola  $T=72$  °C. Vzorka bola najmenej stabilná v roztoku s 50 mM glycínom pH 2.5 ( $T=59.8$  °C) s 50mM NaCl a 50mM kyselinou citrónovou pH 3 s 250 mM NaCl ( $T=63.7$  °C).

Z počiatočného screeningu sme zistili, že optimálny pomer proteínu k roztoku v jednej kvapke je 2:1. Lyzozým vykryštalizoval za 24 hod v 36 podmienkach z celkových 96 (obr. 3). V prípade pomeru 1:1 vyrástlo 6 kryštálov, v pomere 1:2 len 5.

Skúšaním rôznych kombinácií koncentrácie proteínu a koncentrácie soli sme prišli na to, že vysoká koncentrácia proteínu a soli spôsobuje zrazeniny, zatiaľ čo nízke koncentrácie vedú

k čírym kvapkám. Optimálne kombinácie zabezpečujú tvorbu kryštálov. Toto správanie zodpovedá teoretickému fázovému diagramu kryštalizácie proteínu (obr. 4).

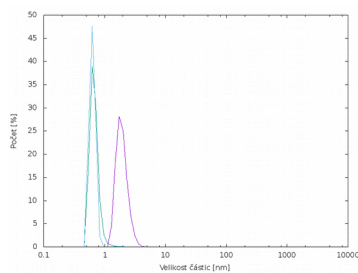
Na vybranom kryštály sme zmerali difrakčné dáta röntgenového žiarenia a vypočítali štruktúru lyzozýmu.

## 5 Zhrnutie

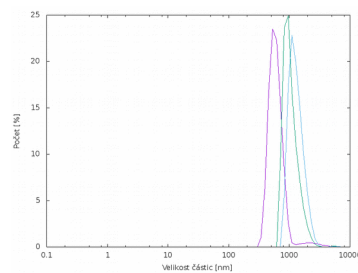
Počas nášho projektu sme biofyzikálnymi metódami zistili, že pufr octanu sodného je pre prácu s lyzozýmom najvhodnejší. Iné podmienky vedú k zrážaniu alebo nestabilite proteínu v roztoku. Našli sme vhodné podmienky pre kryštalizáciu lyzozýmu. Zvolenú podmienku sme ďalej optimalizovali a vypestované kryštály sme použili pri meraní difrakčných dát a určovaní štruktúry.

## Pod'akovanie

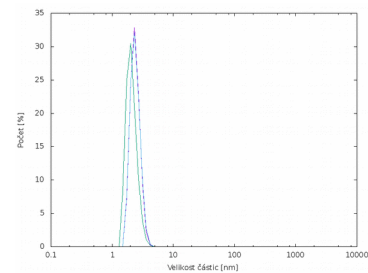
Naša vd'aka patrí najmä naším supervízorom Ing. Leone Švecovej a Ing. Janovi Stránskemu za úžasný prístup a pomoc pri vypracovaní miniprojektu, zároveň aj vedeckému centru BIOCEV za sprístupnenie laboratórii. Na záver ďakujeme tiež ostatným organizátorom Týdne vedy za usporiadanie tejto akcie a možnosť zúčastniť sa jej.



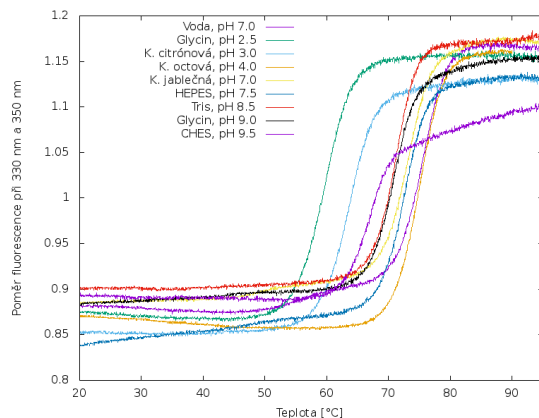
Obr.1a: DLS na roztoku proteínu vo vode



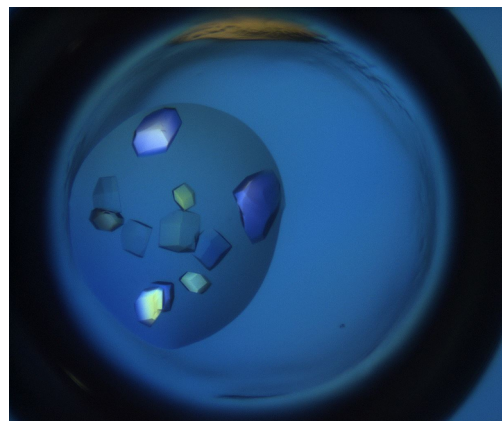
Obr.1b: DLS na roztoku proteínu v octanu sodnom



Obr.1c: DLS na roztoku proteínu v trisu



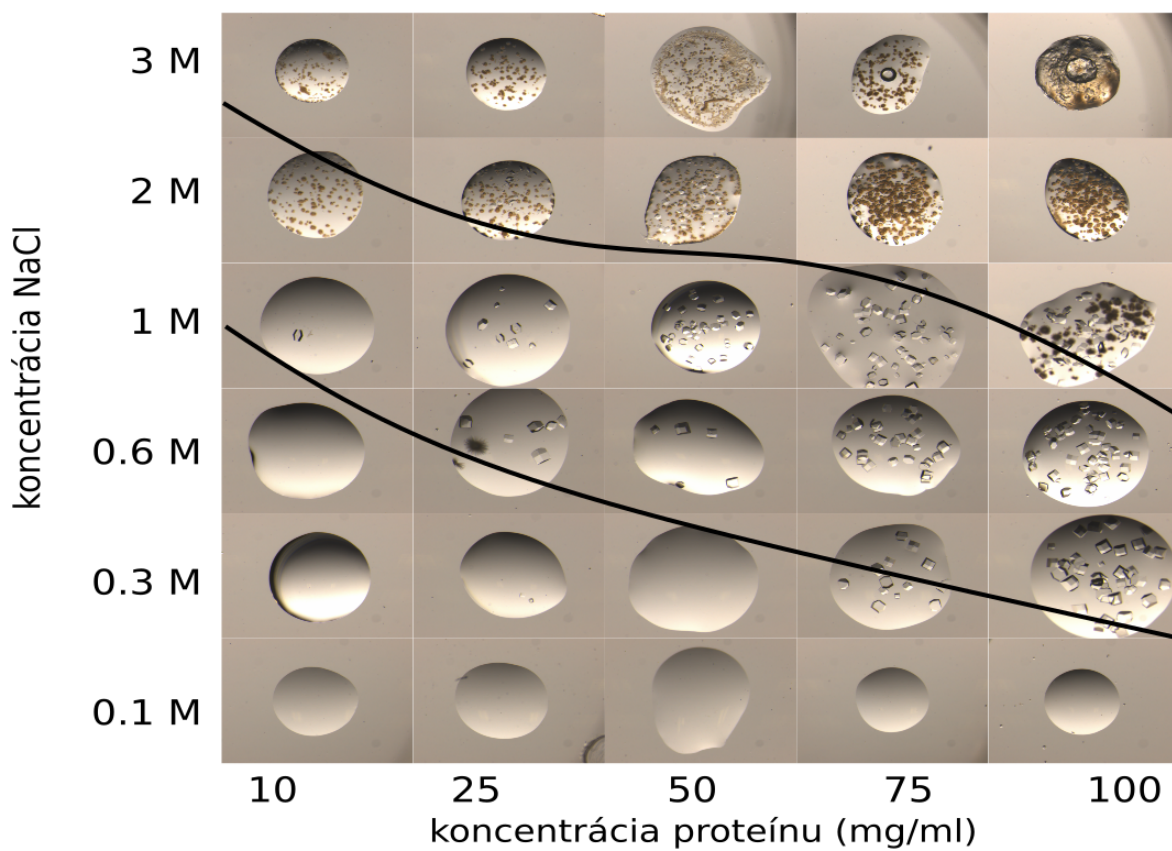
Obr.2: denaturácia proteínu v roznych pufrach



Obr.3: kryštály lyzozýmu

## Referencie:

- [1] Nanotemper, Prometheus, <http://www.nanotemper-technologies.com/products/prometheus-series/prometheus-nt48/> (online).
- [2] Malvern, Zetasizer Nano 290, <https://www.malvern.com/en/products/product-range/zetasizer-range/zetasizer-nano-range/zetasizer-nano-zs90> (online) .
- [3] Molecular Dimensions, Morpheus HT-96, <https://www.moleculardimensions.com/products/2734-Morpheus-HT-96/> (online) .



Obr.4: fázový diagram