

3D atomární struktura proteinu

Miriam Surnáková, Tomáš Suchánek,
Tomáš Velecký

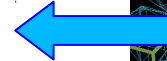
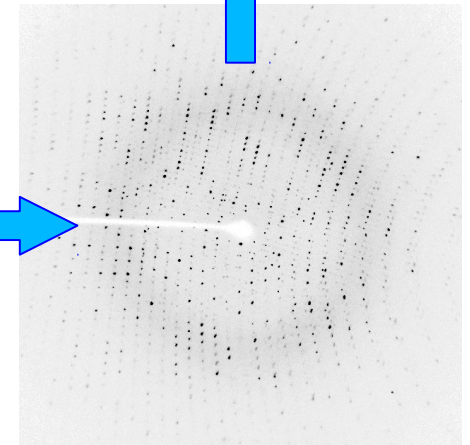
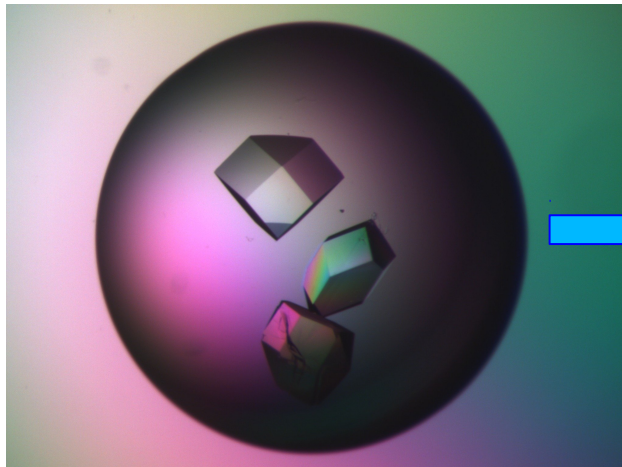
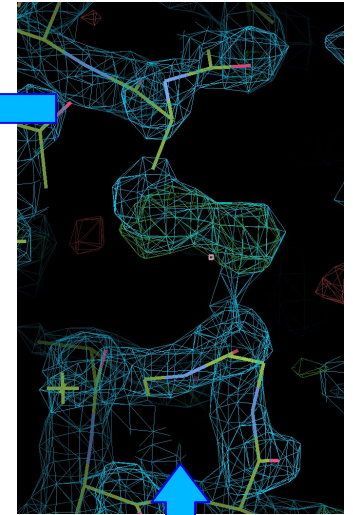
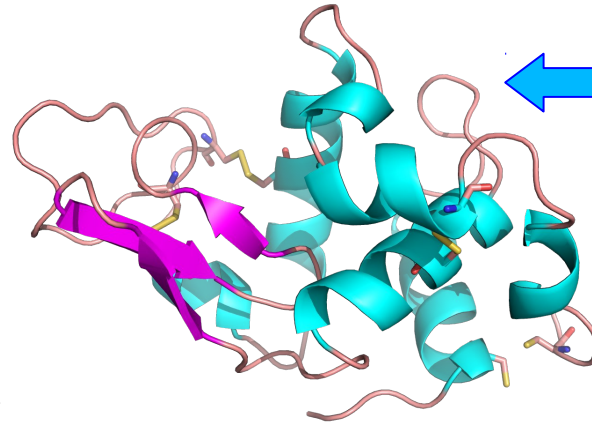
22. května 2014

Motivace

- Seznámení se s metodami užívanými při stanovení 3D struktury proteinu
 - Pěstování krystalů
 - Difrakční experiment
 - Vyřešení struktury
- Vyzkoušet si práci a postup vědce

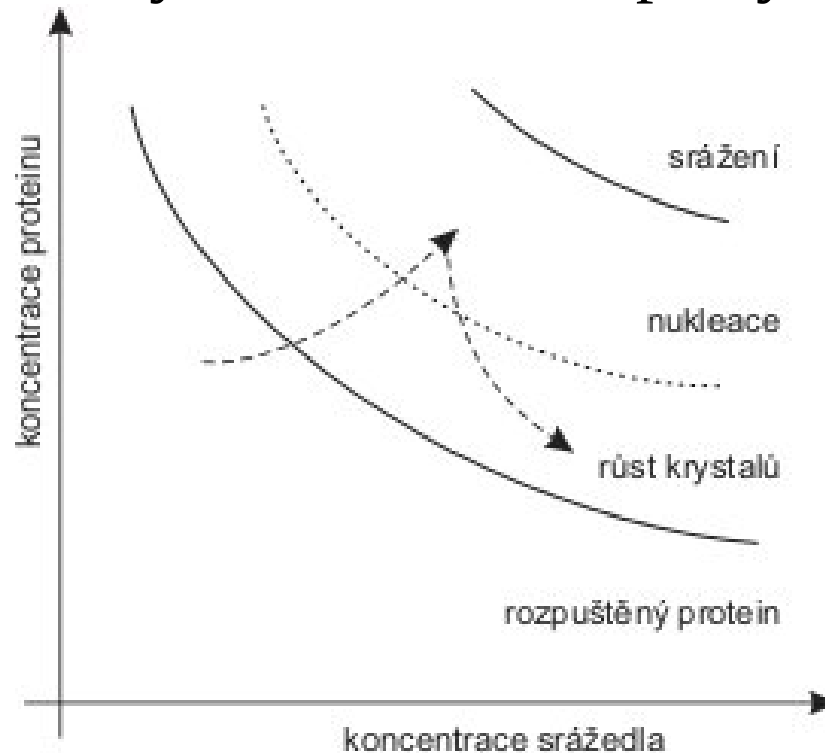
Metoda

- Krystalizace proteinu
- Kryoprotekce + mražení
- Difrakční experiment
- Řešení a analýza struktury



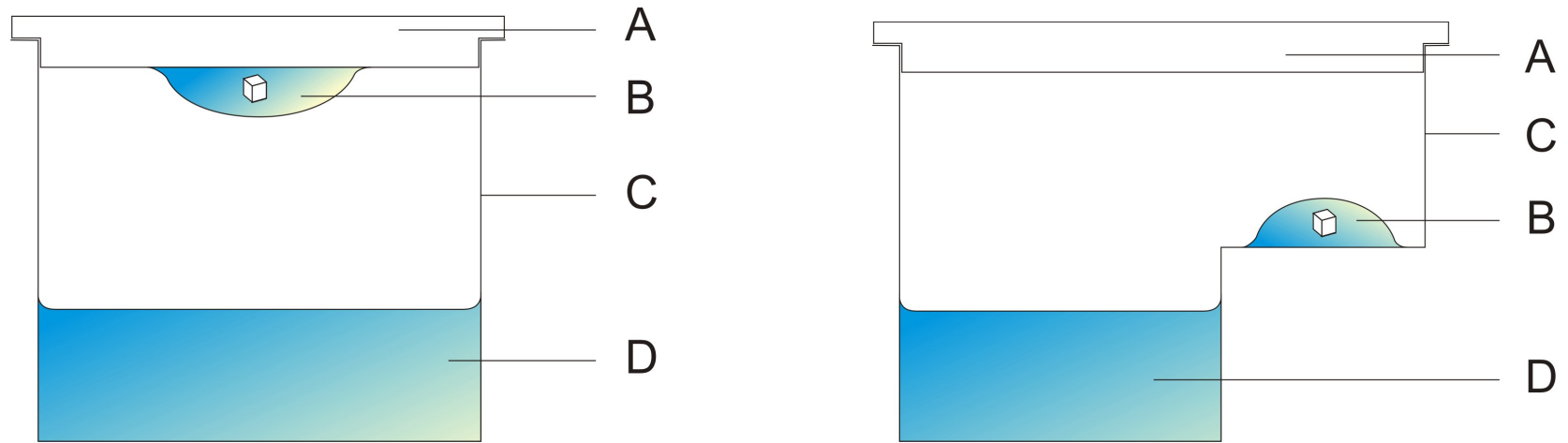
Fázový diagram

- Popisuje krystalizaci proteinů
- Základ: Přivedení systému do stavu přesycení



Krystalizace

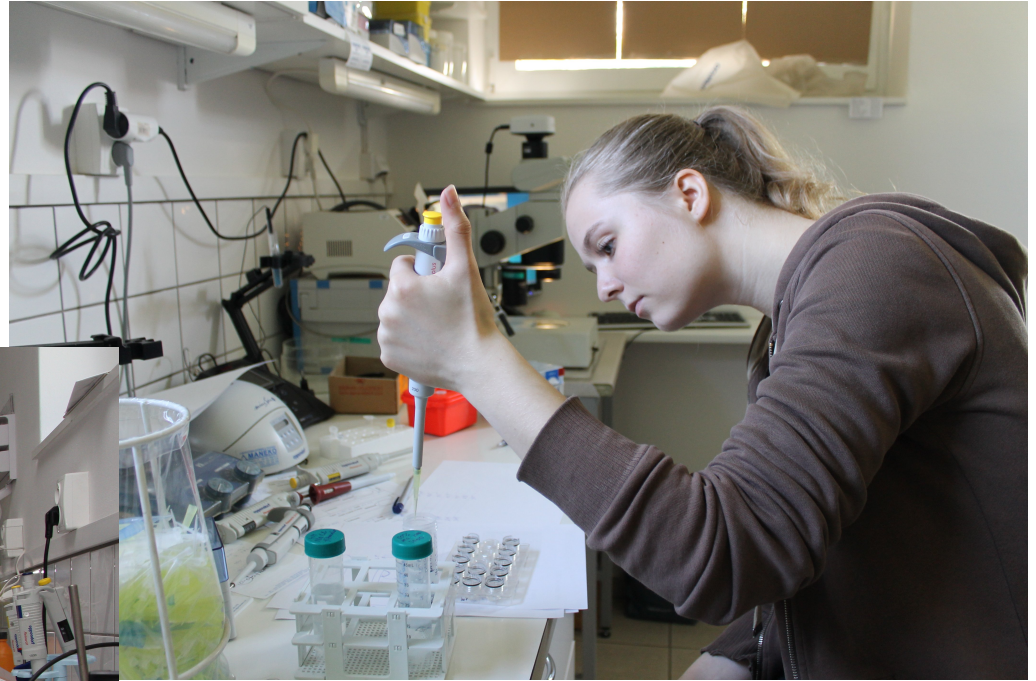
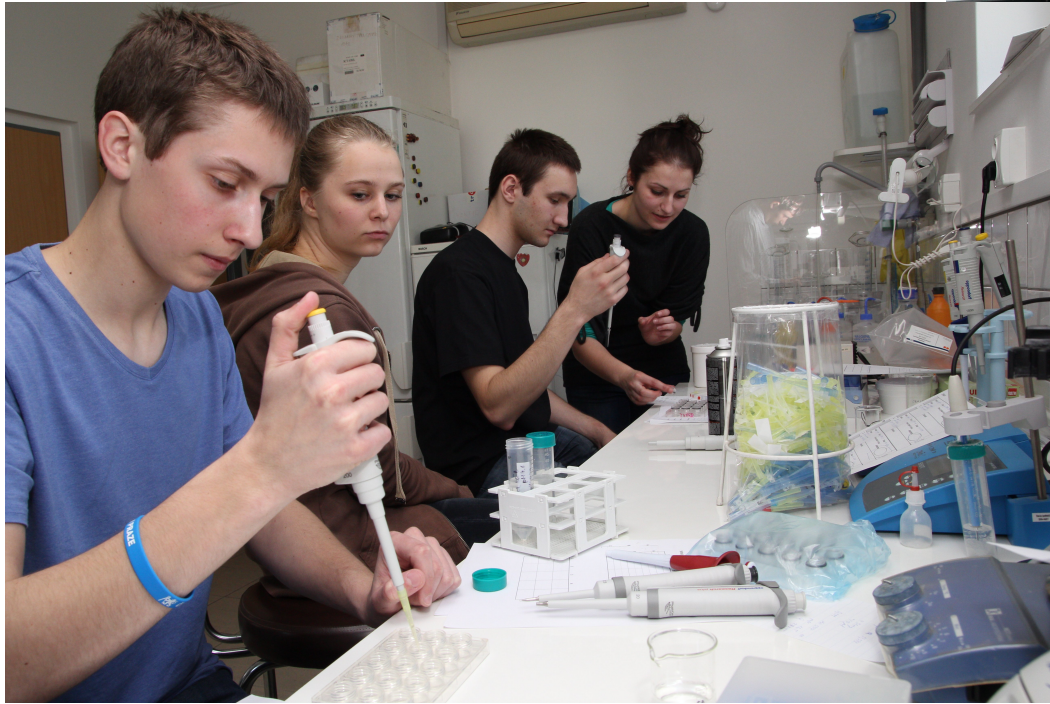
- Využití jevu difúze par z méně koncentrované kapky do rezervoáru – metoda sedící a visící kapky

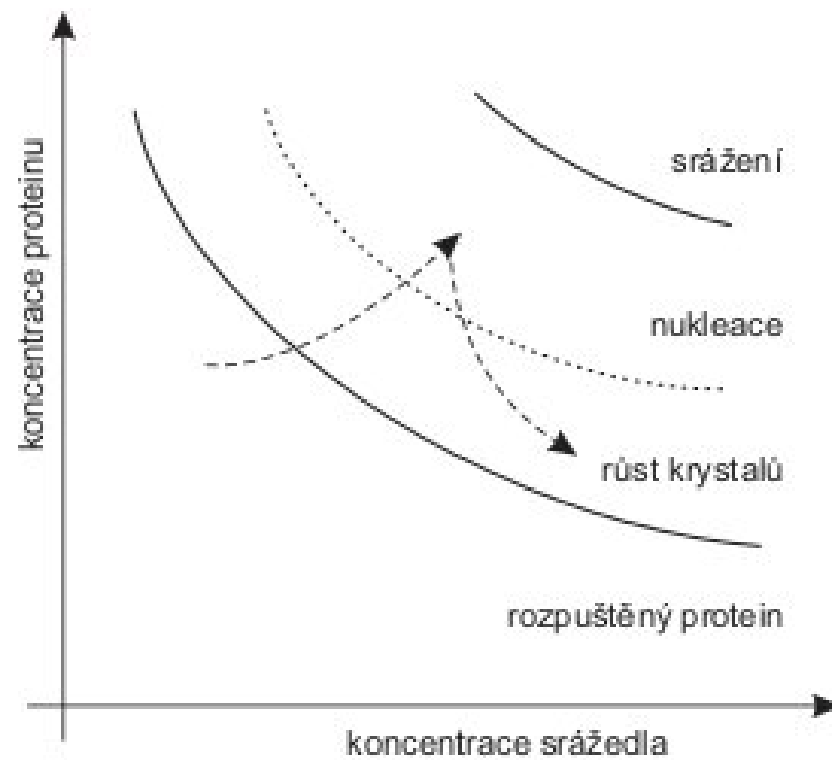


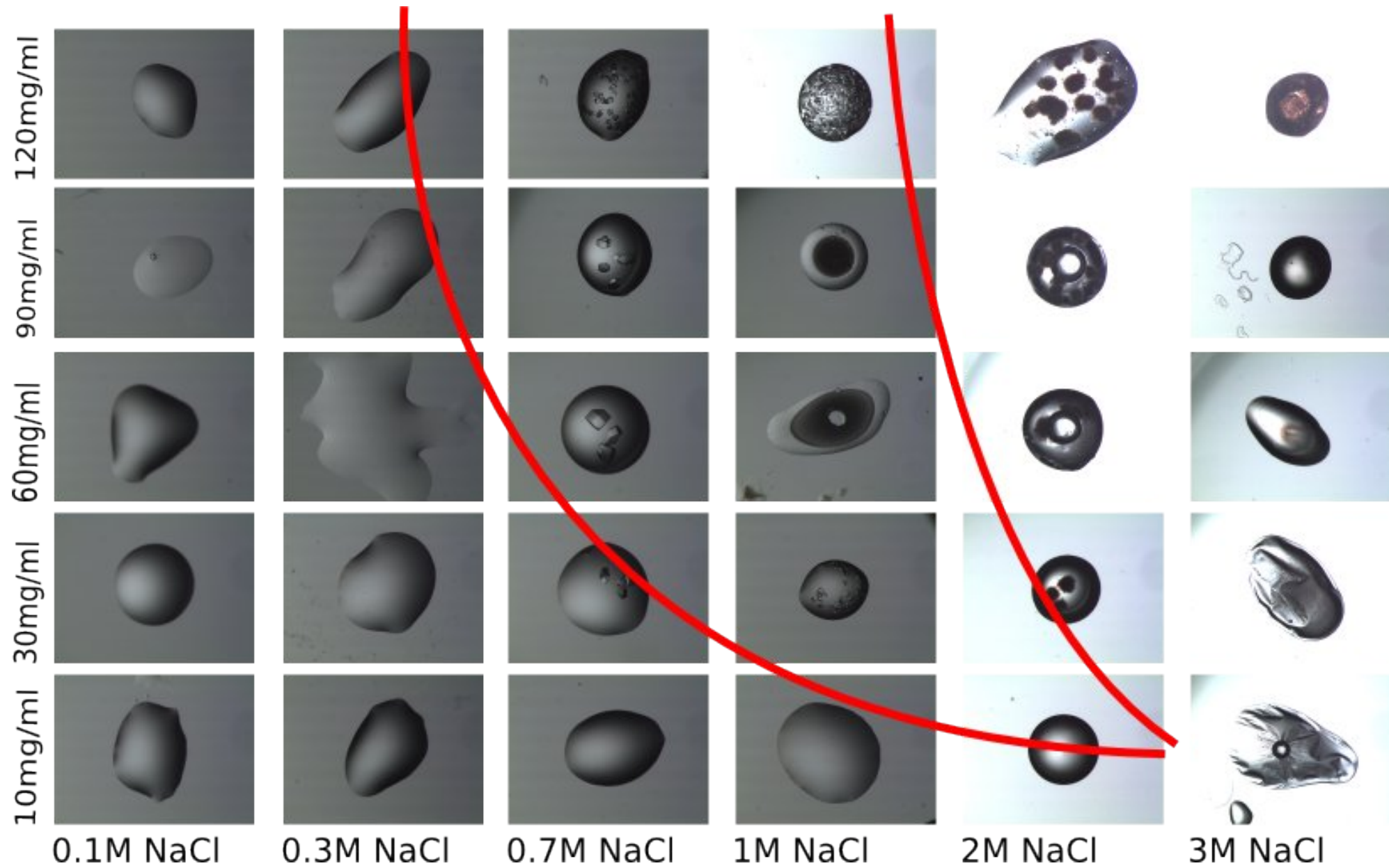
A – krycí víčko; B – kapka; C – rezervoár; D – matečný roztok

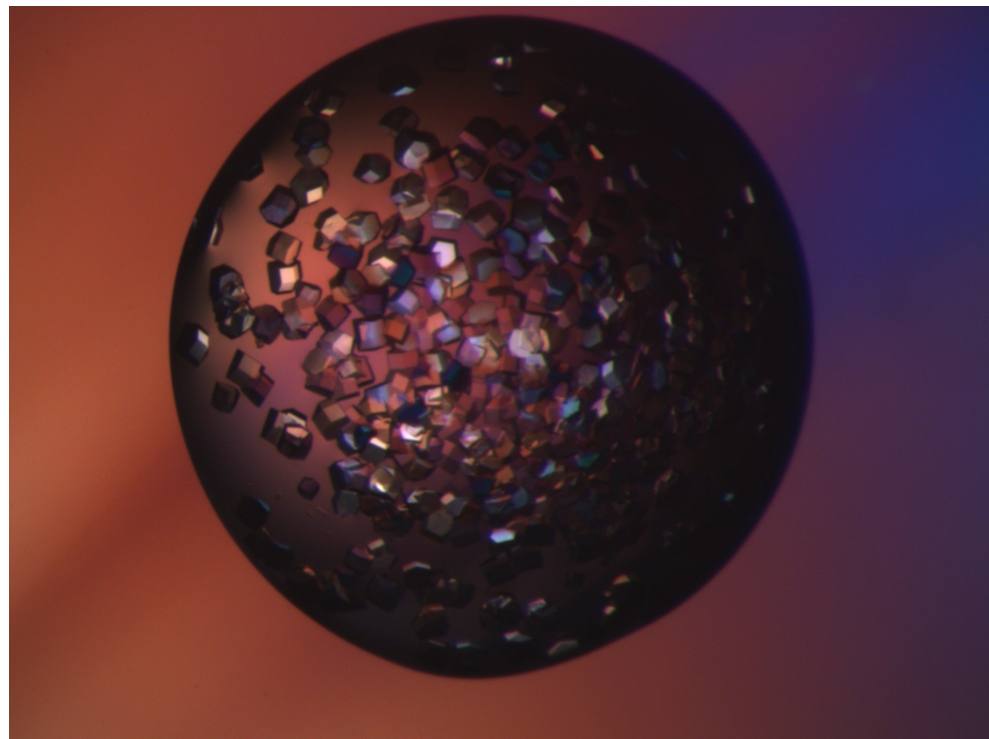
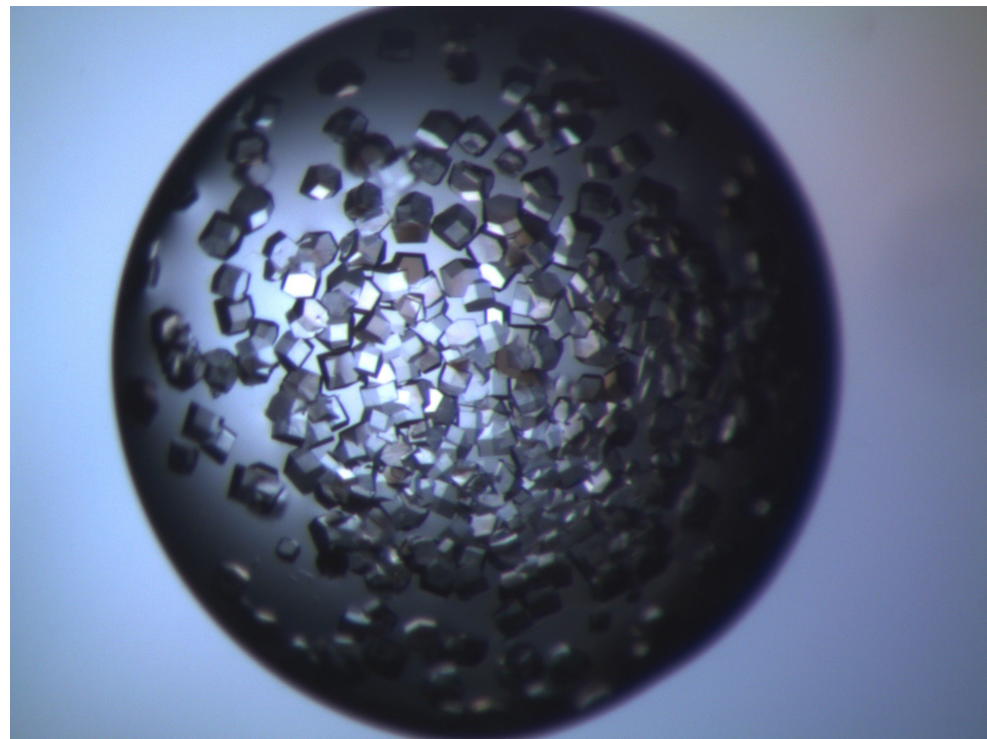
Optimalizace krystalizace

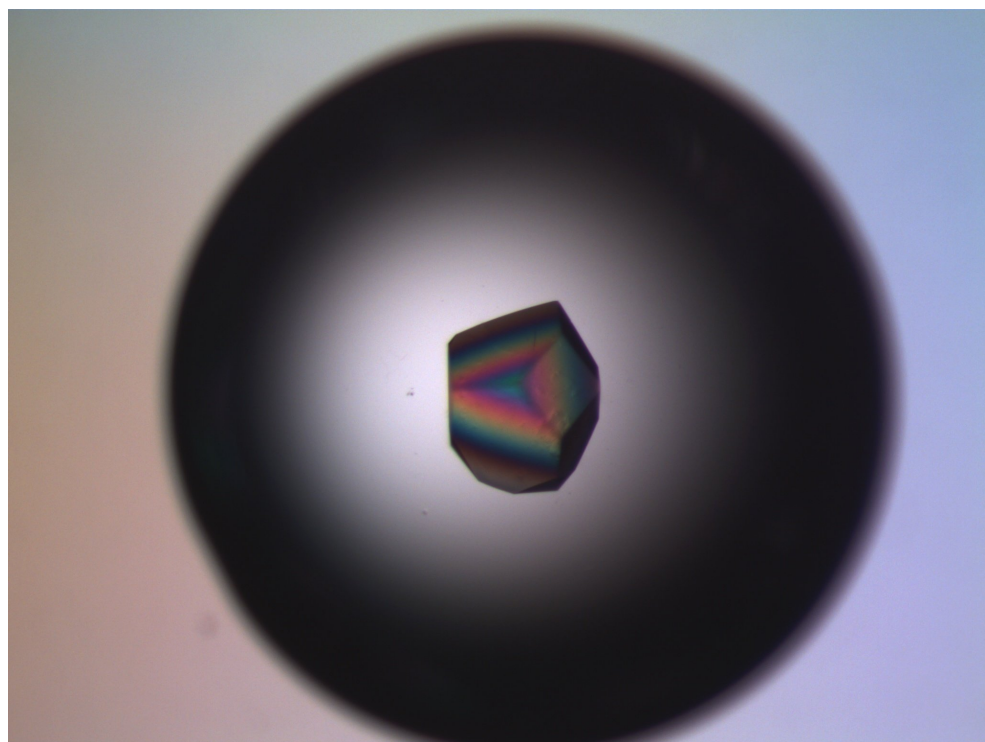
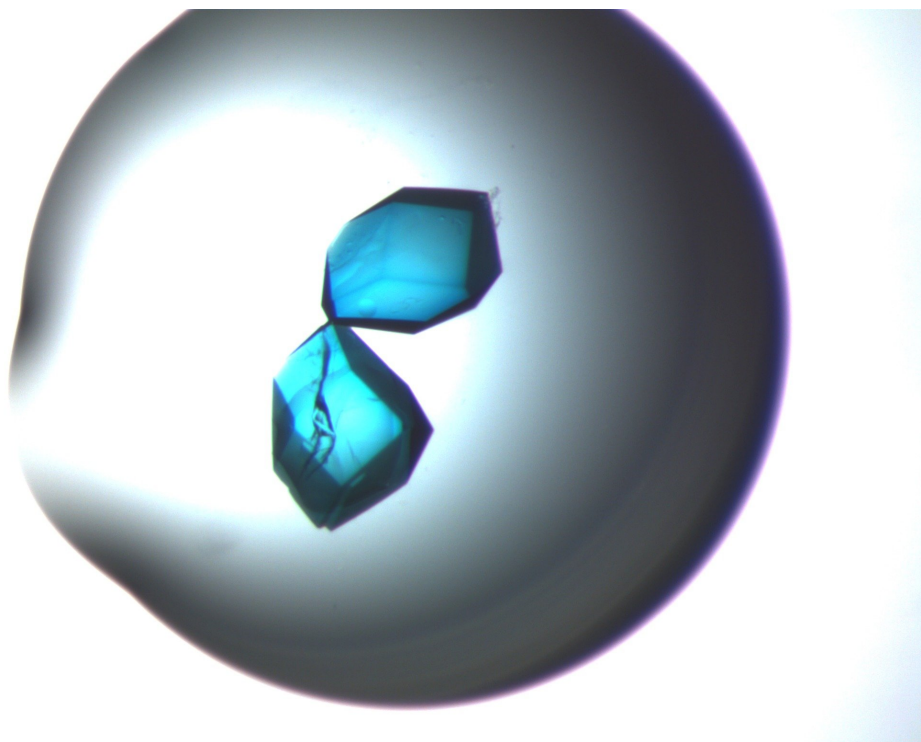
- Vytvoření 30 různých krystalizačních podmínek
- Metoda visící kapky
 - Rezervoár o objemu 0,5 ml
 - Kapka: 0,5+0,5 μ l
 - Protein: Lysozym (o koncentraci 10–120 mg/ml)
 - Srážedlo: 0,1–3M NaCl
 - Pufr: Octan sodný (pH 4,6)
- Růst v inkubátoru při teplotě 18°C









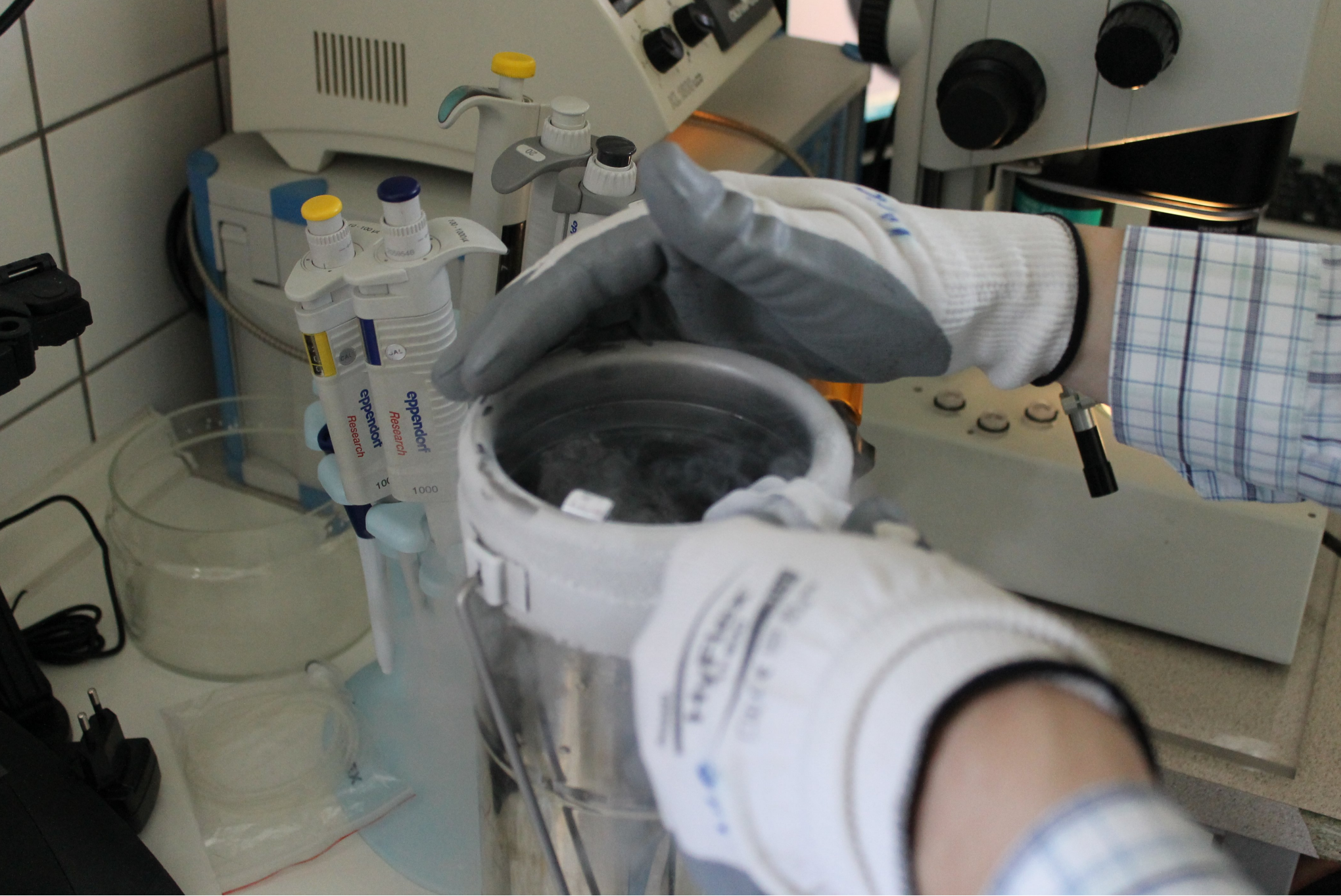


Faktory ovlivňující růst krystalů

- Použité chemikálie (pufr, srážedlo ...)
- Koncentrace chemikálií, pH
- Teplota
- Krystalizační metoda
- Stáří a kvalita chemikálií
- Nečistoty
- Lidské faktory (rychlost, přesnost, technika , nepozornost...)

Příprava krystalů pro difrakční experiment

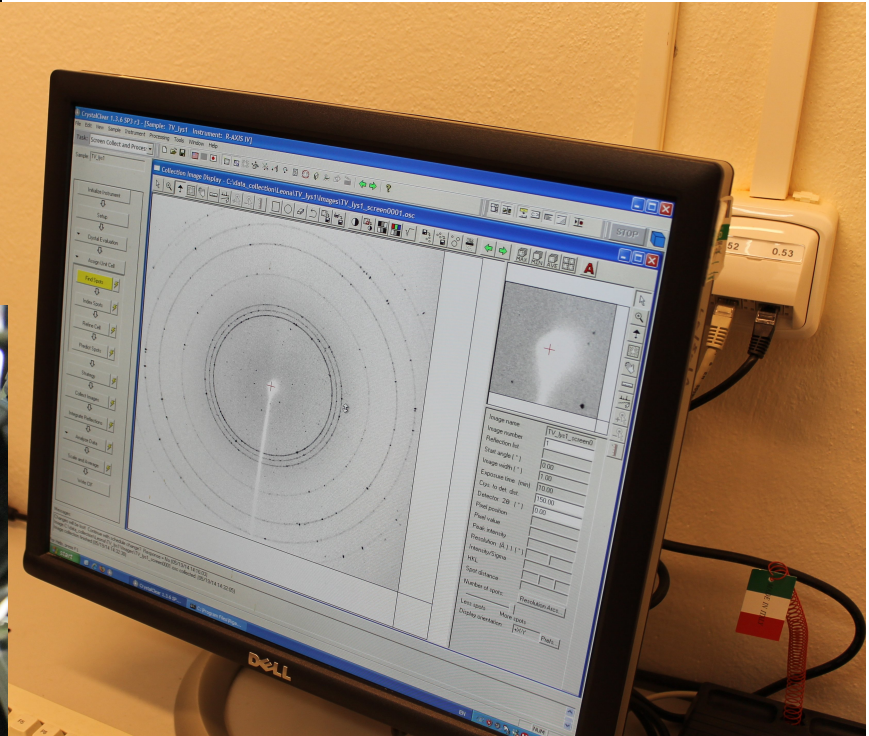
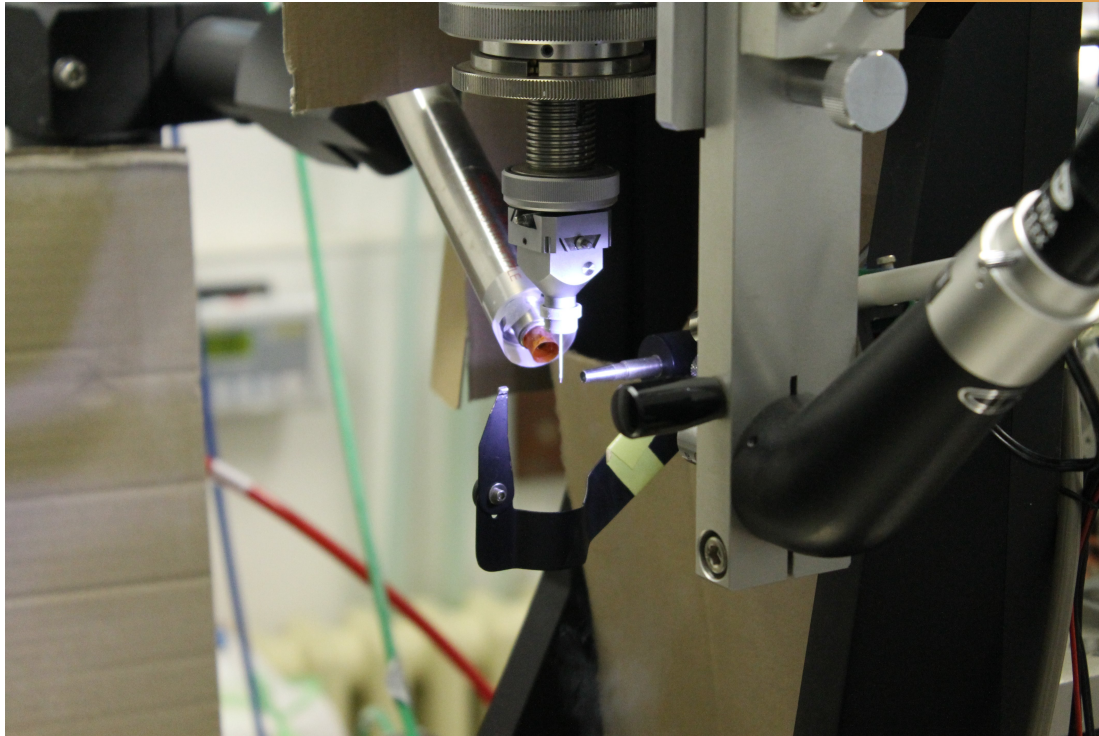
- Biologické makromolekuly podléhají radiačnímu poškození
→ je potřeba krystaly mrazit
- Před mražením máčení krystalů v roztoku s kryoprotektantem - brání růstu krystalů ledu
- Mražení v tekutém dusíku ($T=77\text{K}$)
- Kryoprotektant
 - poly(ethylenglykol)
 - glycerol
 - sacharidy
 - další



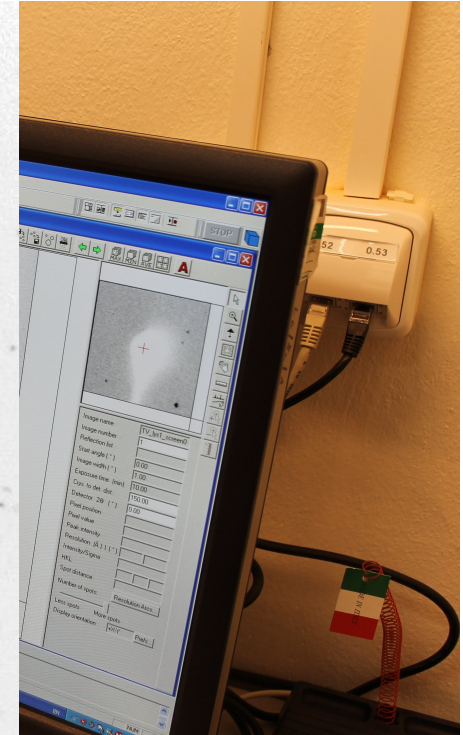
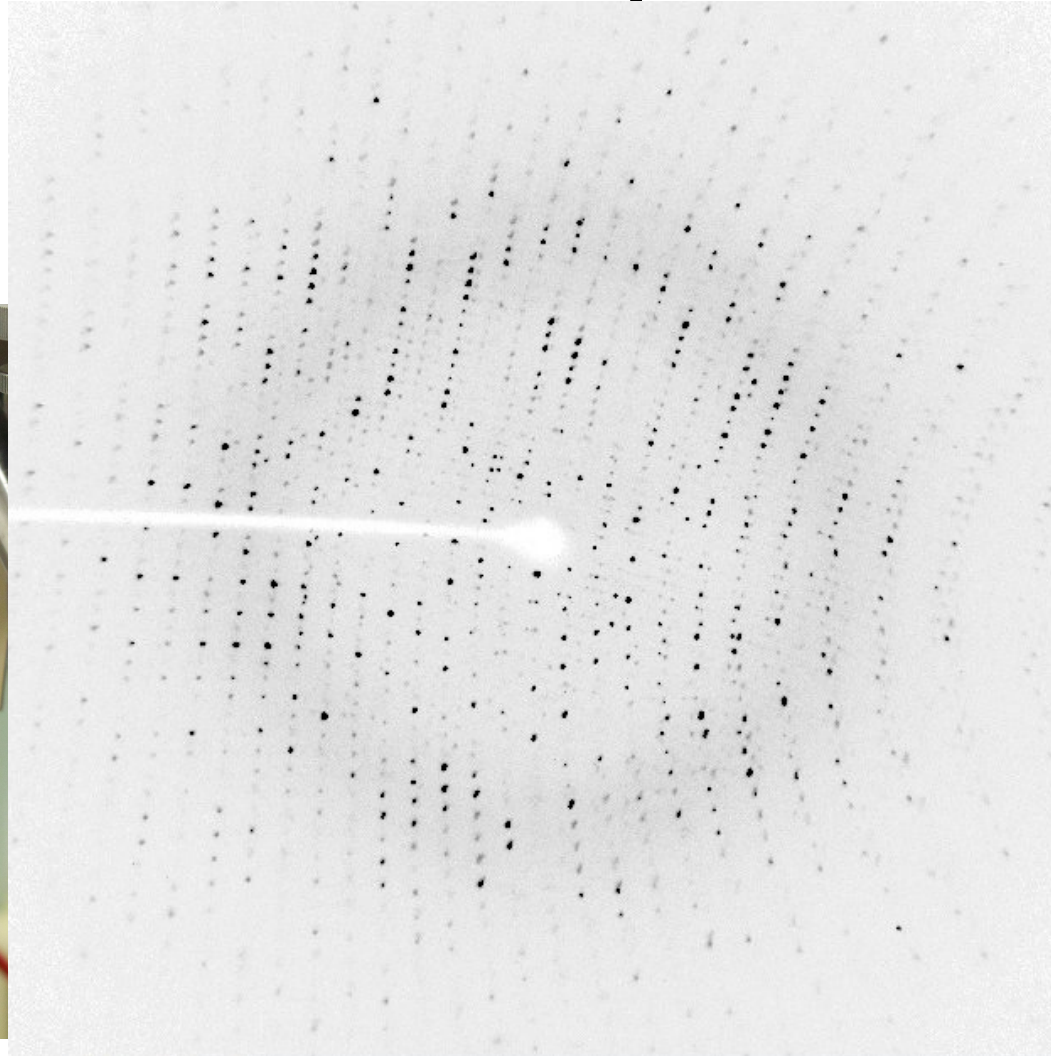
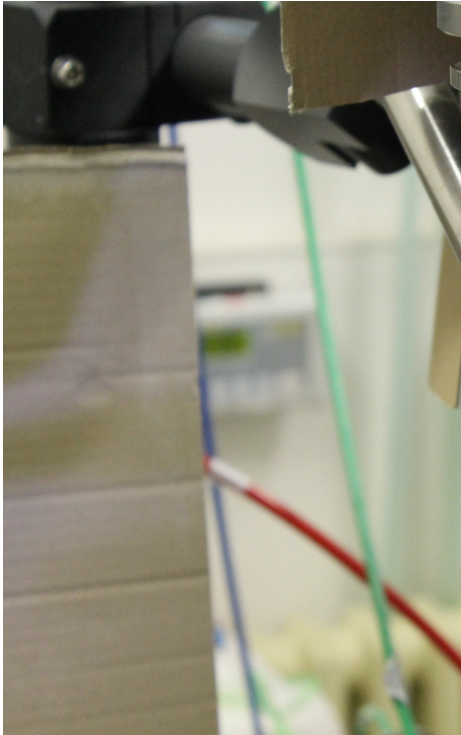
eppendorf
Research
1000
100

HYPER
EPPENDORF

Difrakční experiment

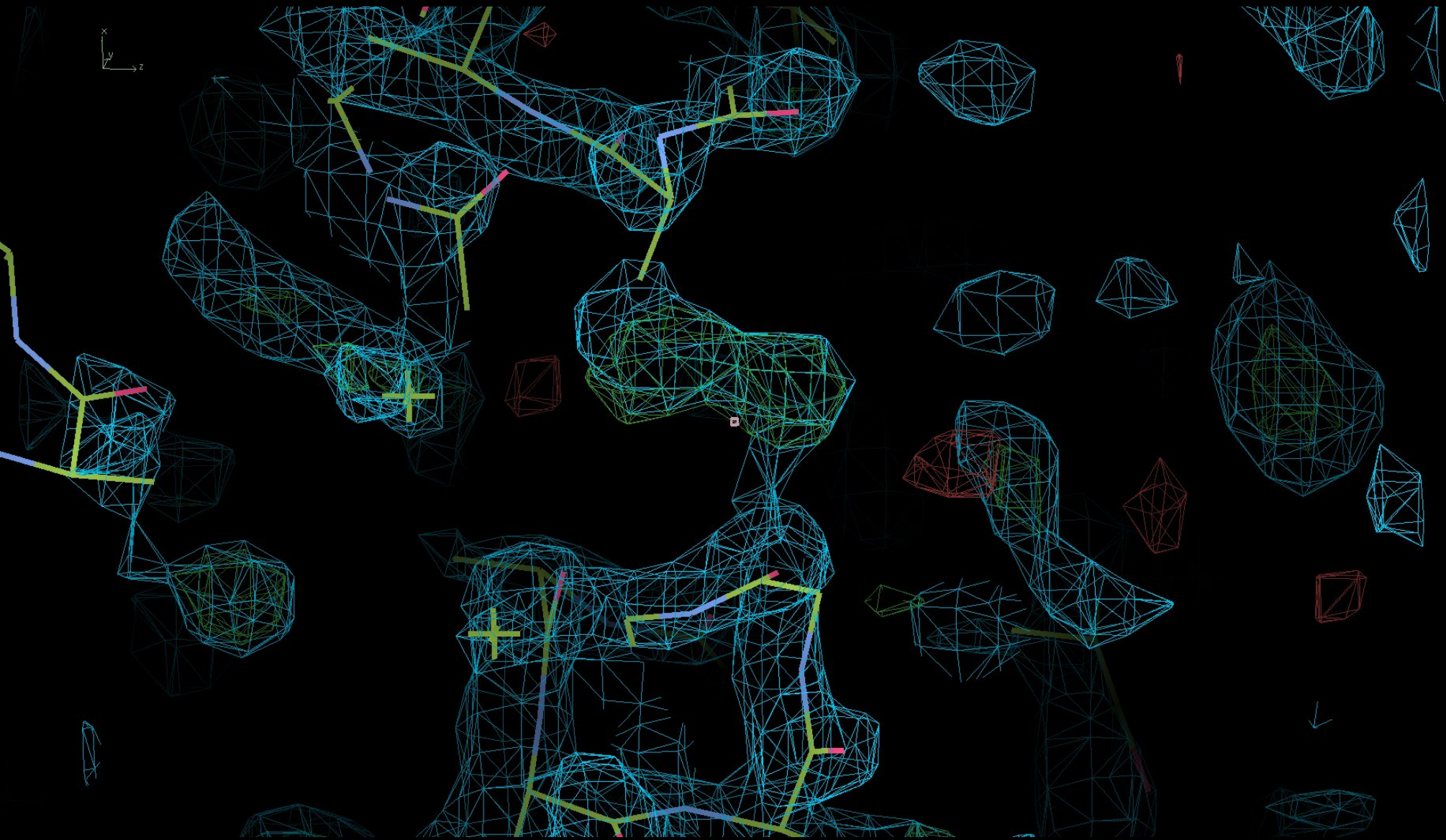


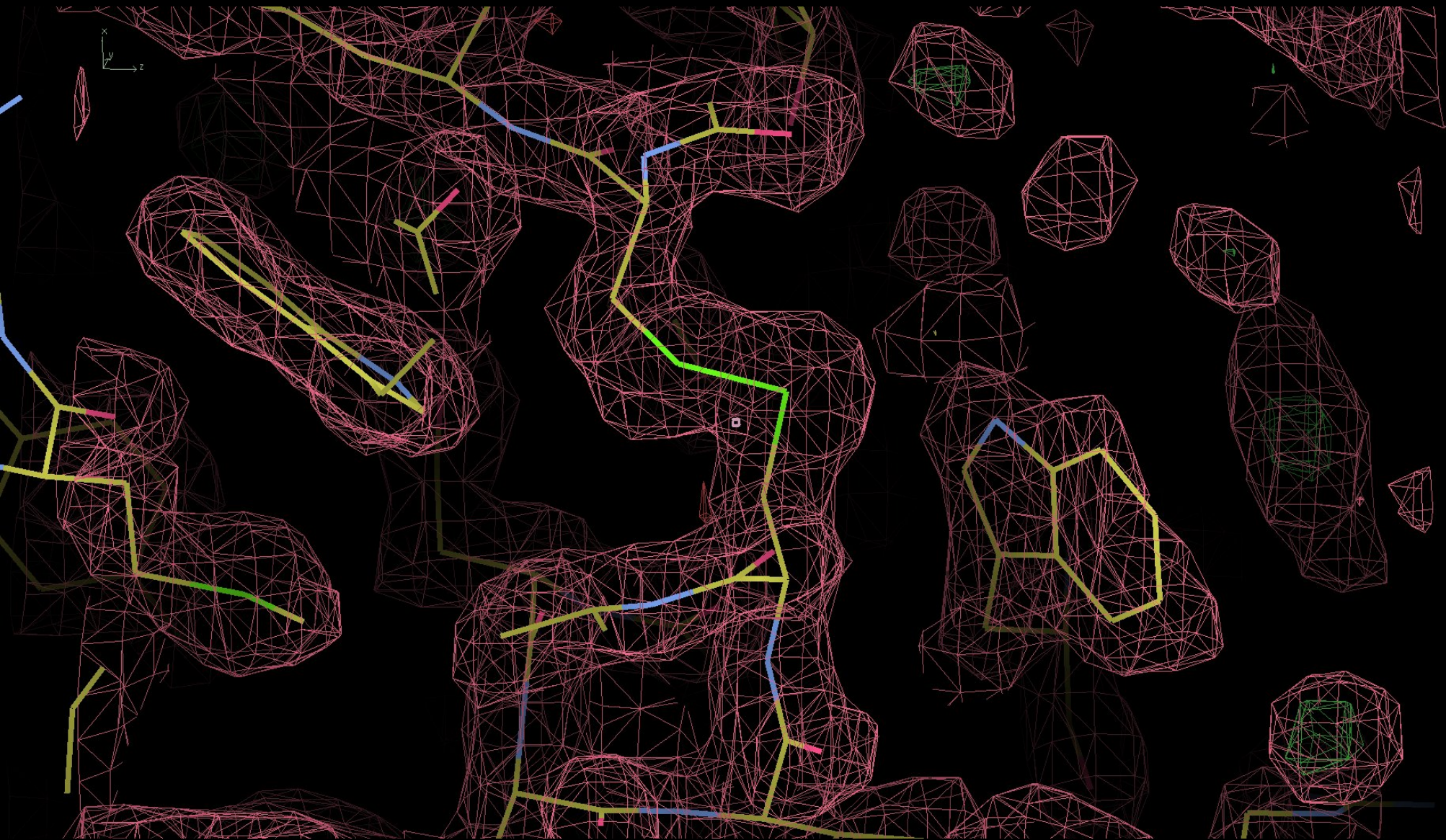
Difrakční experiment

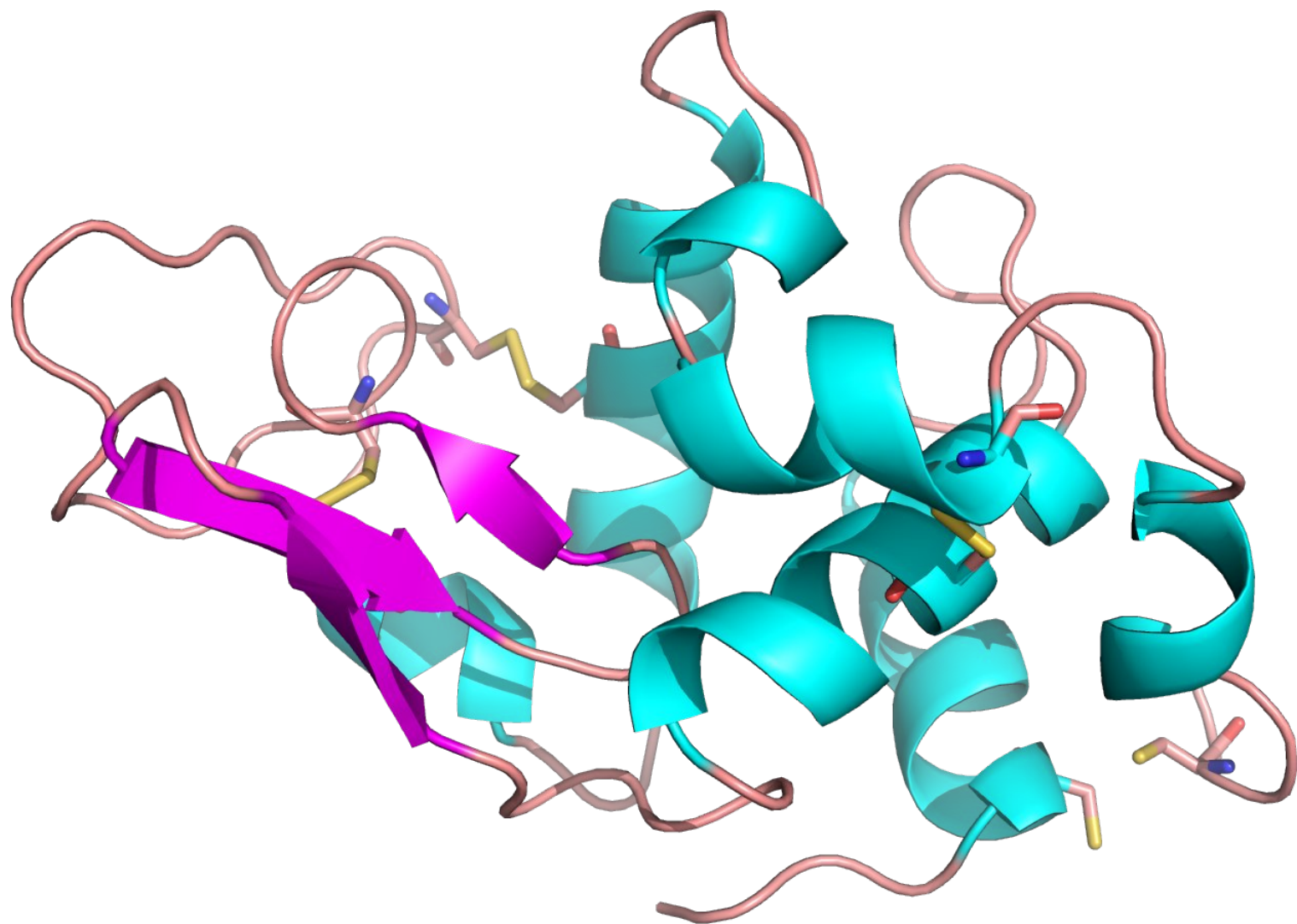


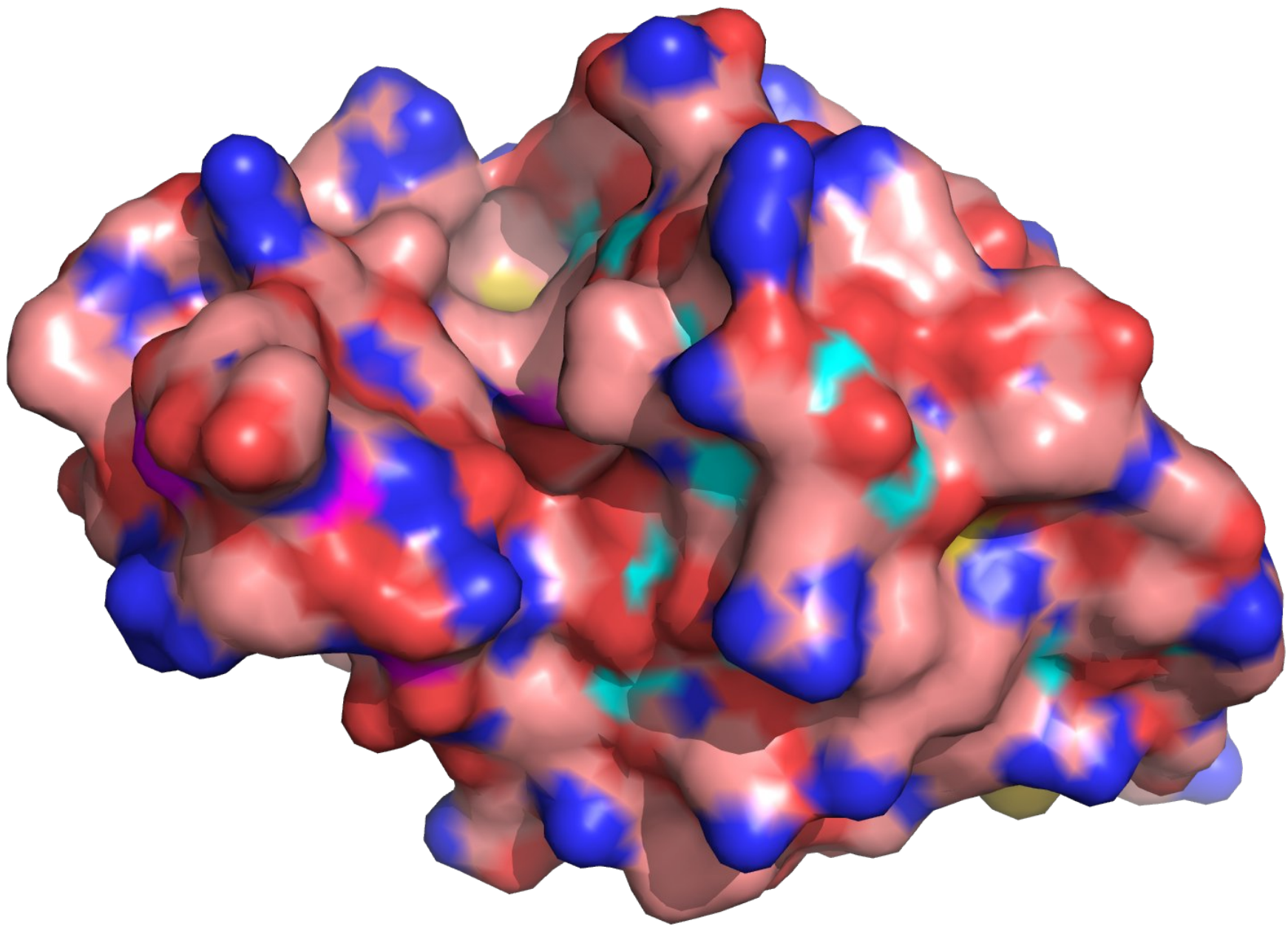
Hurá k počítači ...











Děkujeme za pozornost

