

# 3D atomární struktura bílkoviny za 24 hodin

B. Dolenská, J. Kutscherauer, M. Plachý

BIOCEV, Průmyslová 595, 252 50 Vestec

[barcadolenska@gmail.com](mailto:barcadolenska@gmail.com), [jakub.kutscherauer@gb1.cz](mailto:jakub.kutscherauer@gb1.cz),

[marek.plachy@outlook.com](mailto:marek.plachy@outlook.com)

## Abstrakt

Práce se zabývá zjišťováním 3D atomární struktury bílkoviny pomocí rentgenové krystalografie. Struktura byla měřena u bílkoviny lysozymu, krystalizované pomocí metody založené na difuzi par. Následně byla srovnána kvalita krystalů vzniklých za různých podmínek.

## 1 Úvod

Zkoumání struktury biologických makromolekul je klíčové pro vývoj účinných léků bez vedlejších účinků nebo pro výzkum fungování lidského těla. Bílkoviny jsou jedním ze základních stavebních kamenů všech živých organismů, a proto jsme se zaměřili právě na ně. Nejčastěji využívanou metodou pro zjištění struktury dané molekuly je rentgenová krystalografie, které jsme se blíže věnovali v rámci našeho miniprojektu.

Hlavním výhodou rentgenové krystalografie oproti ostatním metodám je časová efektivita – celý proces výzkumu nám netrval déle než 24 hodin. V našem experimentu jsme se zabývali konkrétně lysozymem, který je známý pro své antibakteriální účinky. Nachází se například v lidských slzách, nebo ve vaječném bílku.

## 2 Materiály a metody

Proces měření struktury lze rozdělit na tři části: krystalizaci vzorku, měření difrakce rentgenového záření a výpočet modelu molekuly. Pro účely krystalizace jsme využili metody visící kapky, využívající principu difuze vodních par.

## 2.1. Příprava krystalizačního roztoku

Nejprve jsme si připravili 10 ml krystalizačního roztoku následujícího složení:

Tabulka 1: Složení krystalizačního roztoku

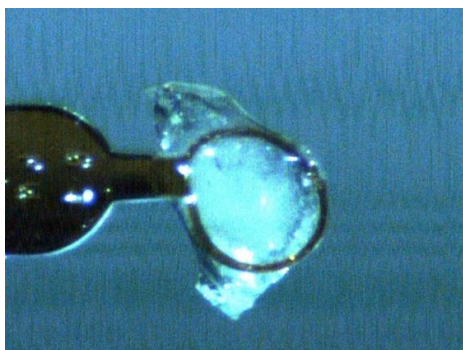
Složka	Koncentrace zásobního roztoku	Požadovaná koncentrace	Pipetovaný objem
PEG MME 3350 ( <sup>1</sup> )	50 hm. %	30 hm. %	6 ml
NaCl	$4 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$	$1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$	2.5 ml
NaOAc	$2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$	$50 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$	250 $\mu\text{l}$

## 2.2. Příprava vzorků do krystalizační aparatury

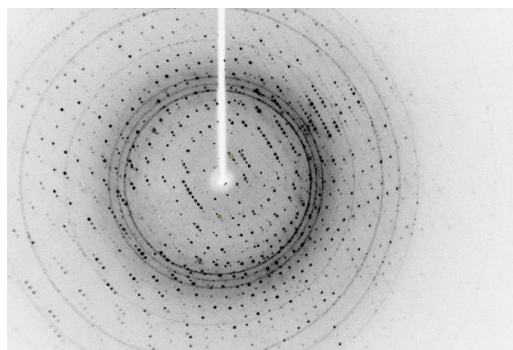
Pro přípravu jednoho vzorku jsme do krystalizační jamky odměřili 500  $\mu\text{l}$  krystalizačního roztoku. Následně bylo do středu krycího sklíčka odpipetováno 0.5  $\mu\text{l}$  lysozymu a 1  $\mu\text{l}$  *de*mi  $\text{H}_2\text{O}$ . Následně jsme víčkem přiklopili krystalizační jamku a sledovali růst krystalů přes mikroskop.

## 2.3. Měření krystalu

Posléze jsme pod mikroskopem vybrali vhodný krystal (o velikosti přibližně 100 mikronů), který jsme vylovili na smyčce. Následně jsme smyčku umístili do rentgenového difraktometru Bruker D8 Venture (SC-XRD)<sup>2</sup>. Průchodem rentgenového záření krystalem dochází k difrakci paprsků, jejichž dopady zaznamenává detektor a v počítači je z nich následně utvořen obraz.



Obrázek 1: Krystal v kaptonové smyčce



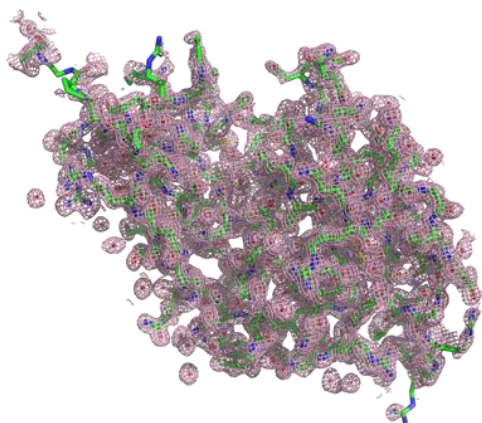
Obrázek 2: Difrakční diagram

<sup>1</sup> PEG MME 3350 = Polyethylen glykol monomethyl ether 3350 Da (průměrná molekulární hmotnost)

<sup>2</sup> SC-XRD = Single Crystal X-ray Diffraction = Monokrystalová (strukturní analýza) rentgenovou difrakcí

## 2.4. Výpočty a modelování (SW)

Z naměřených dat o dopadu záření jsme skrze počítačový program dopočítali hustotu rozložení elektronů, od kterých se rentgenové záření odráží. Díky této hustotě elektronů jsme následně odvodili umístění jednotlivých atomů a jejich vazby. Výsledkem této posloupnosti výpočtů je 3D model dané molekuly.



Obrázek 4: Molekulární kostra lysozymu vč. elektronové hustoty

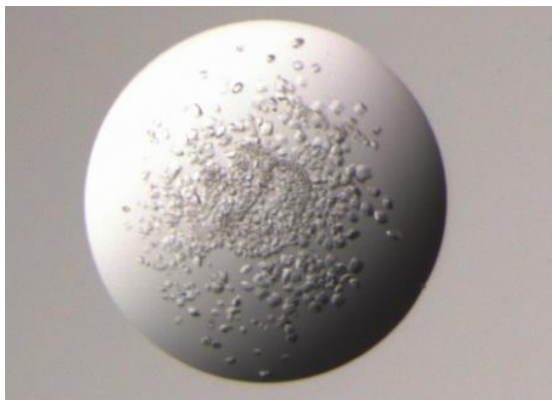
Obrázek 3: Stuhový model lysozymu (+ molekuly vody)

Tabulka 2: Porovnání difrakčních dat jednotlivých vzorků

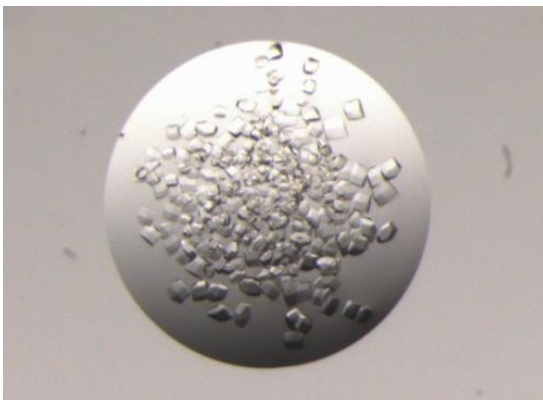
	Vzorek č. 1	Vzorek č. 2
Rozlišení	38.38-3	3.18-3
	0.144 (0.665)	0.665 (0.006)
Naměřených reflexí	33637 (5522)	5522 (48237)
Unikátních reflexí	2452 (386)	386 (32221)
I/sigma(I)	5.5 (1.1)	1.1 (43.8)
CC1/2	0.992 (0.588)	0.588 (1)
Kompletnost	99.7 (99.1)	99.1 (99.1)
Násobnost	13.7 (14.3)	14.3 (48.1)
Rwork	0.252	0.348
Rfree	0.227	0.297

### 3 Výsledky a diskuse

Při první krystalizaci jsme použili 100 mg lysozymu, nicméně v takovéto koncentraci jádra vznikala příliš rychle a vznikaly pouze drobné krystaly s defekty, se kterými nebylo možné pracovat (viz obr. vlevo). Z toho důvodu jsme zkusili snížit koncentraci lysozymu na 80 mg, díky čemuž se celý proces krystalizace zpomalil a výsledek byl výrazně lepší (viz obr. vpravo).



Obrázek 5: Krystaly vzorku č. 1



Obrázek 6: Krystaly vzorku č. 2

### 4 Shrnutí

Při práci se nám podařilo zhotovit řadu více či méně zdařilých vzorků. Díky experimentování s poměry používaných látek jsme se naučili rozpoznat správné měření a faktory ovlivňující jejich kvalitu.

### Poděkování

Děkujeme panu Ing. Janu Stránskému, Ph. D. z Biotechnologického ústavu AV ČR za uvedení do problematiky a pomoc s přípravou sborníkového příspěvku. Dále pak organizátorům Týdne vědy na Jaderce 2023 za veškerý čas a úsilí, které projektu věnovali.

CIISB, Instruct-CZ Centre of Instruct-ERIC EU consortium, funded by MEYS CR infrastructure project LM2023042 and European Regional Development Fund-Project „UP CIISB“ (No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/18\_046/0015974), is gratefully acknowledged for the financial support of the measurements at the CF [name of the unit/CF].

### Reference

- [1] I. Kutá Smatanová. *Krystalizace biologických makromolekul od teorie k praxi*. [https://csacg.fzu.cz/func/viewpdf.php?file=2006\\_1Kuta.pdf](https://csacg.fzu.cz/func/viewpdf.php?file=2006_1Kuta.pdf). 2006.