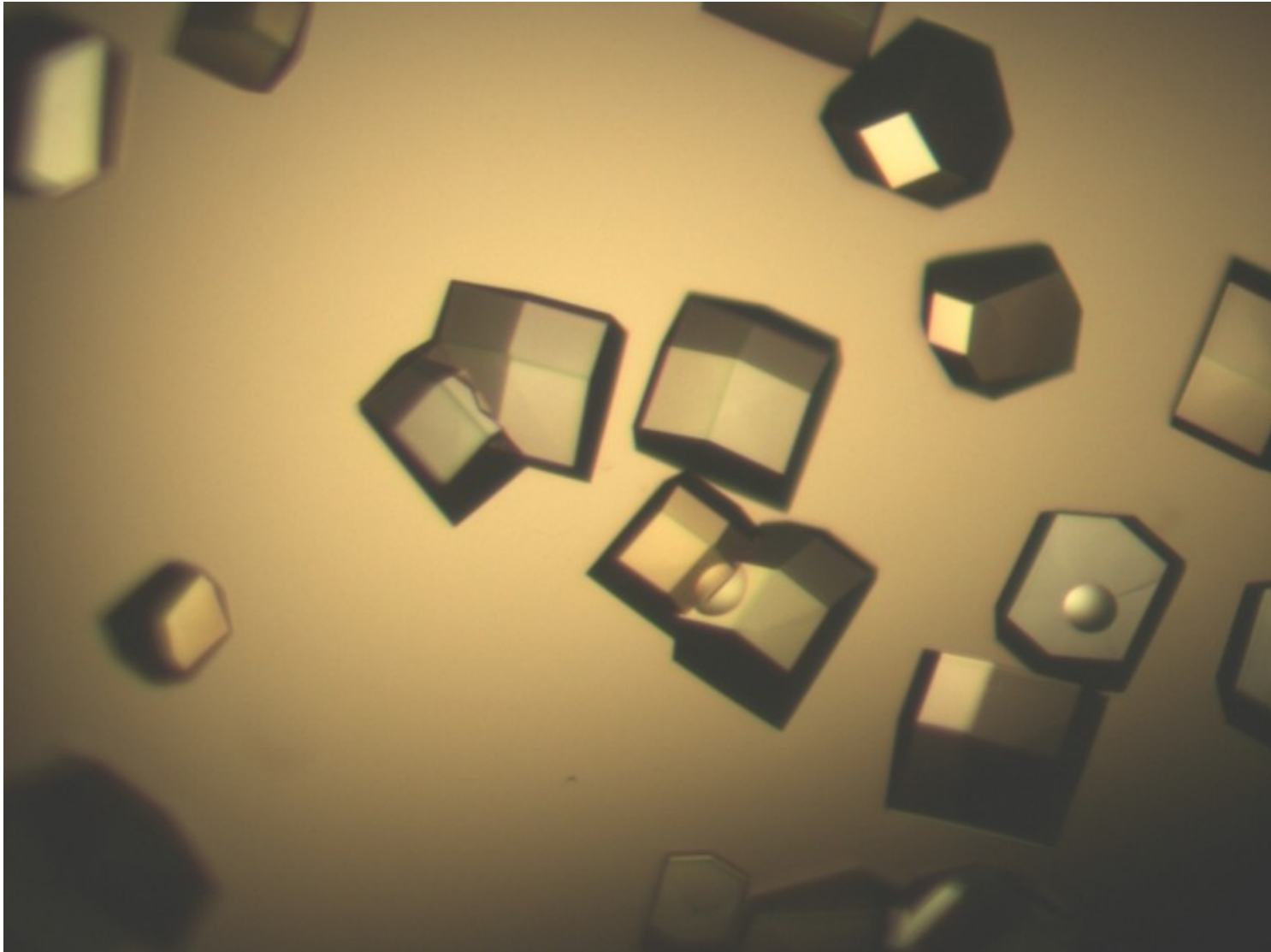
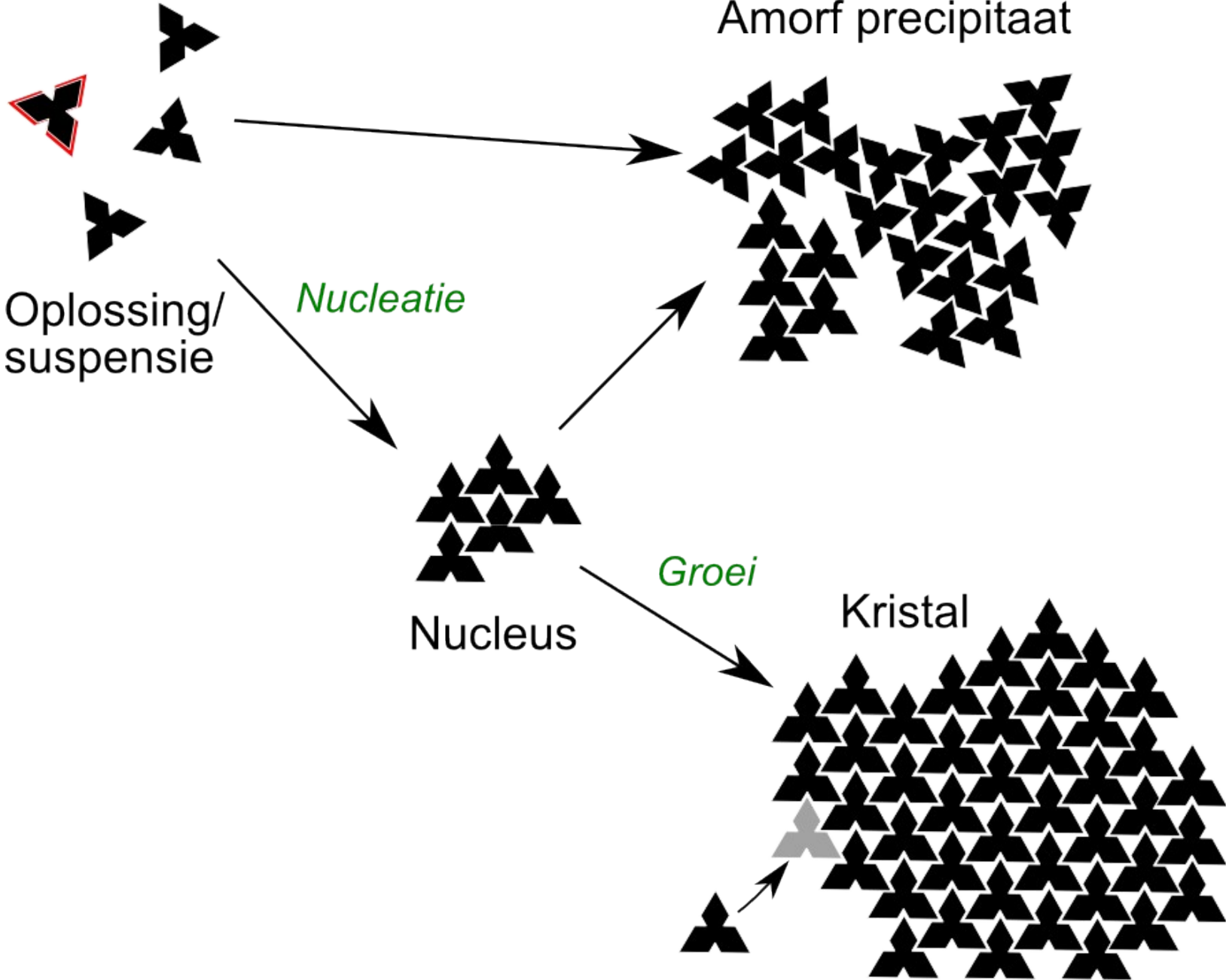


Kristallisatie van Lysozyme

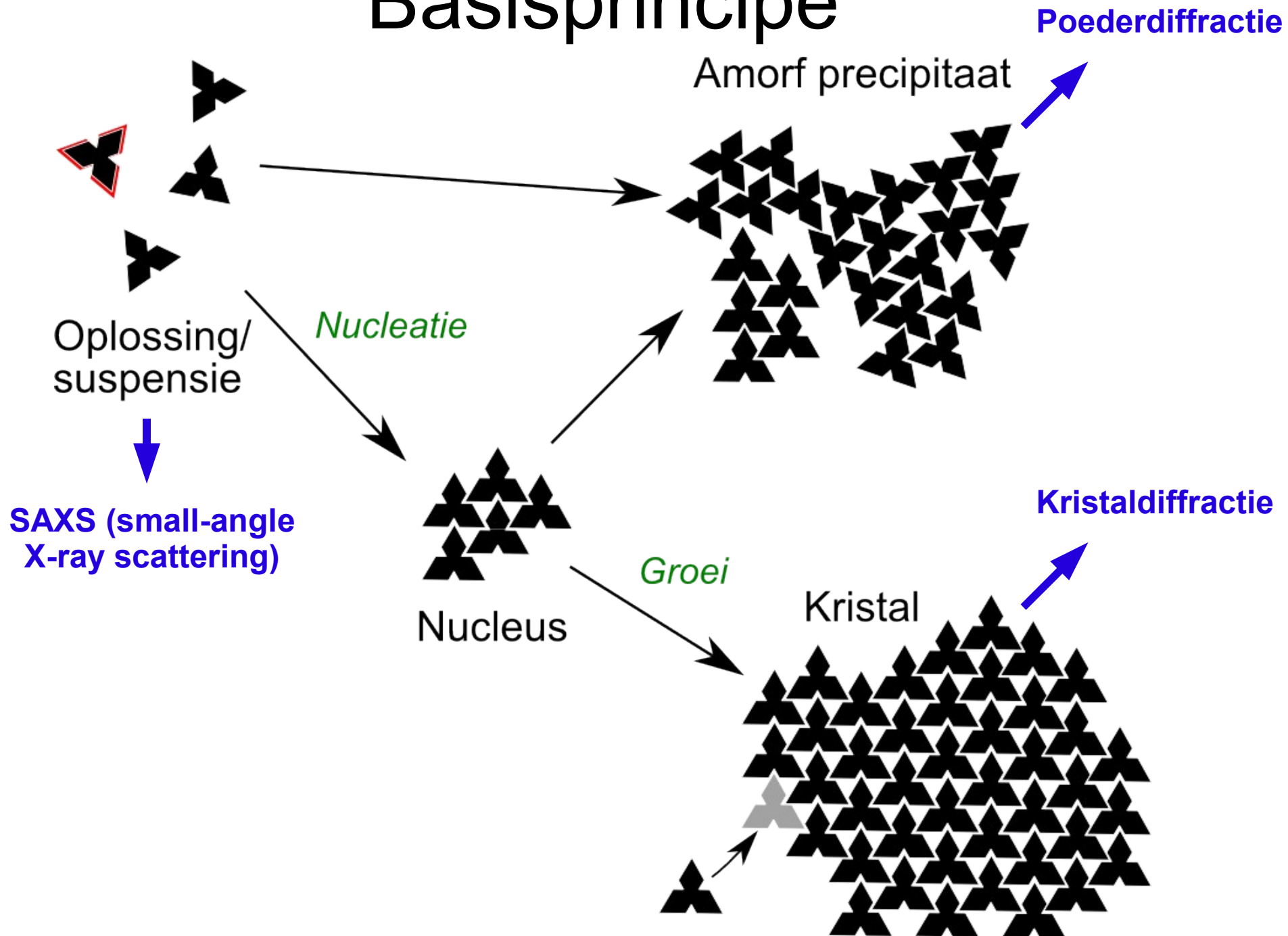


Bron: <http://lysozyme.co.uk/>

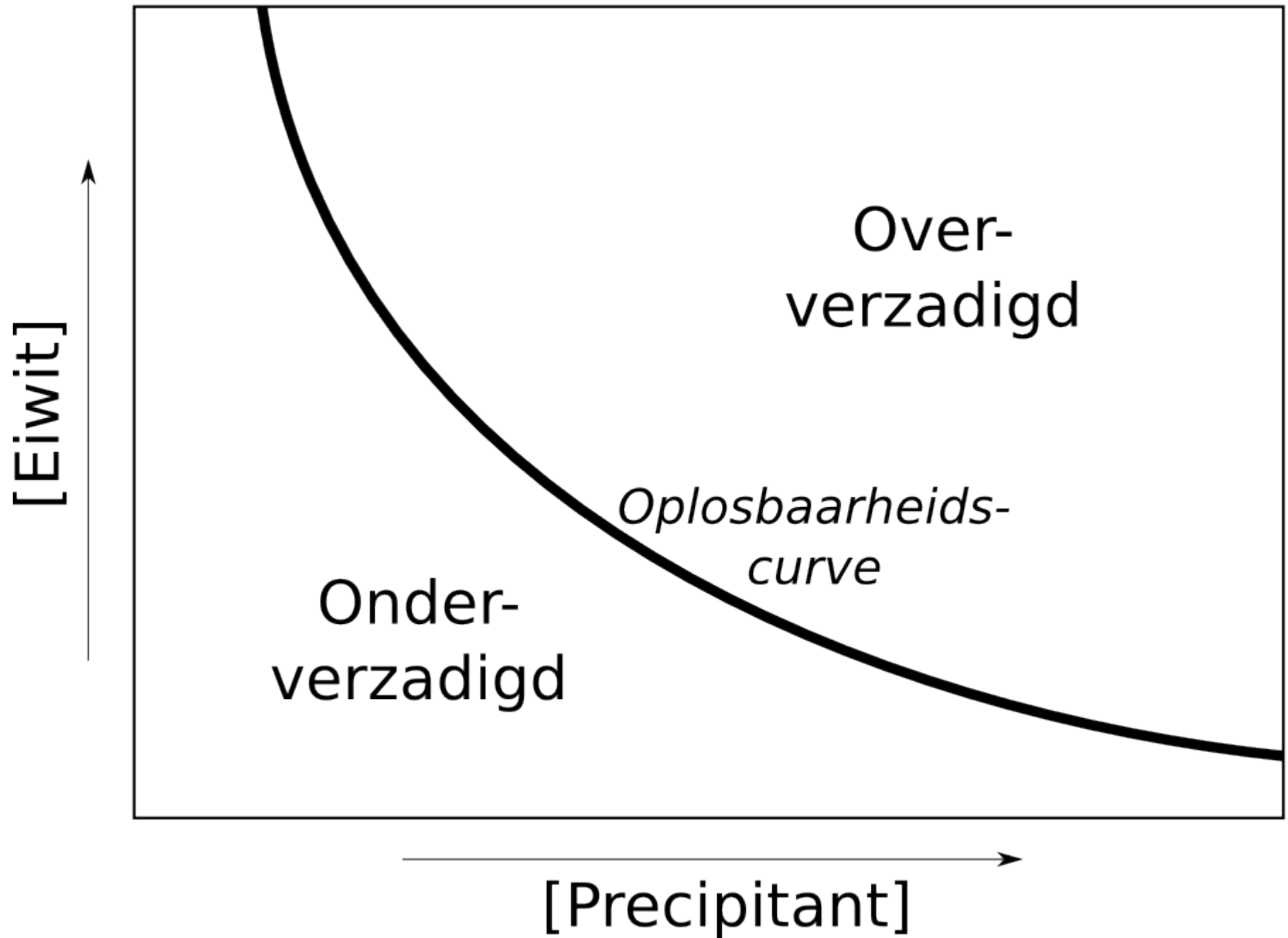
Basisprincipe



Basisprincipe



Het Fasediagram

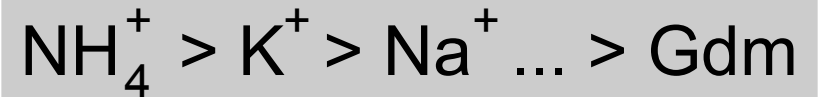


Courante Precipitanten

- Zouten

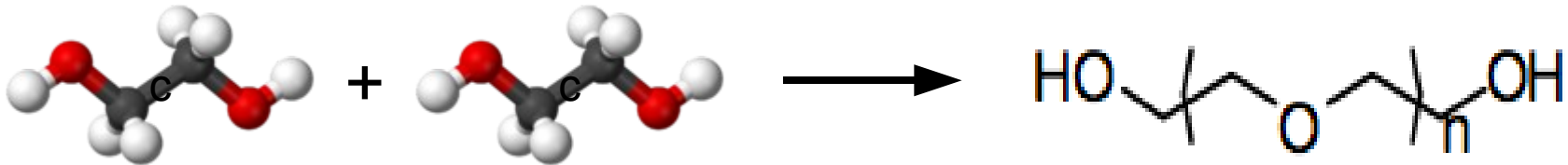
- Natriumchloride, ...
- Ammoniumsulfaat
- Natriummalaat

Hofmeister-reeks:



- Organische polymeren

- Polyethyleenglycol (PEG) met verschillende gemiddelde ketenlengtes (PEG400 – PEG20000)

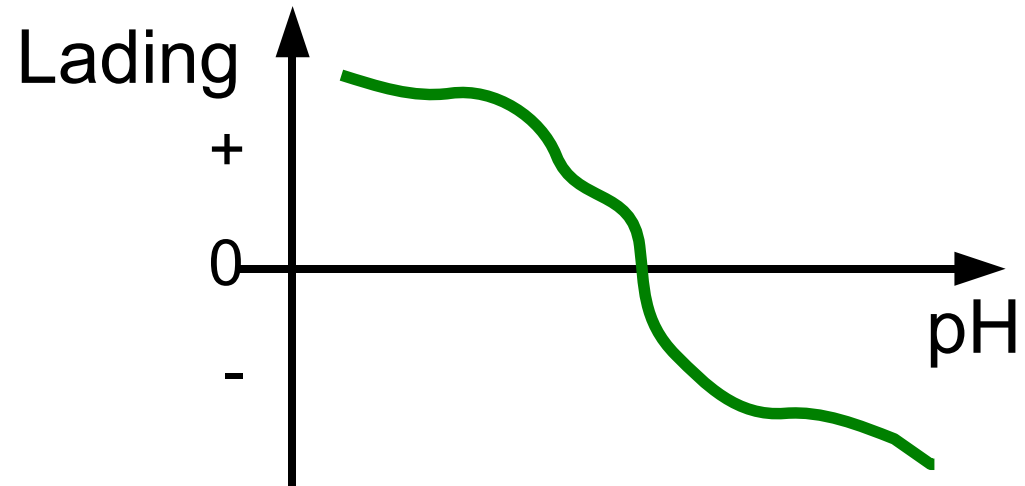


- Kleine organische moleculen

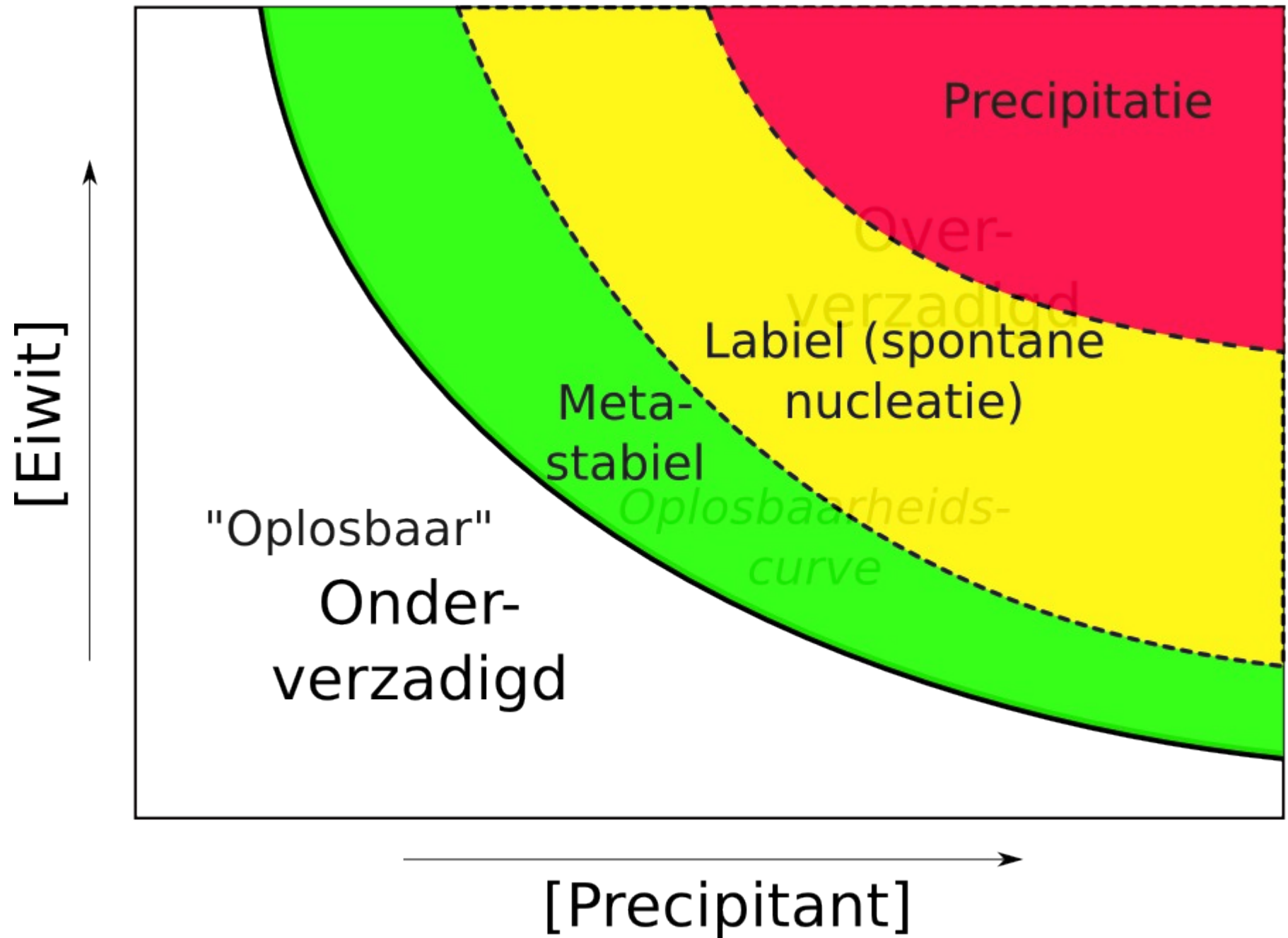
- Glycerol
- Ethanol, isopropanol

Andere Factoren

- Buffer en pH
 - pH t.o.v. pI van het eiwit
 - TRIS versus fosfaat
- Temperatuur
 - Gewijzigde oplosbaarheid van de solutes
 - Gewijzigde kinetiek van alle processen
- Geometrische factoren
 - Grootte en vorm van de kristallisatiedruppel
 - Oppervlaktespanning
 - Concentratiegradiënten en convectiepatronen



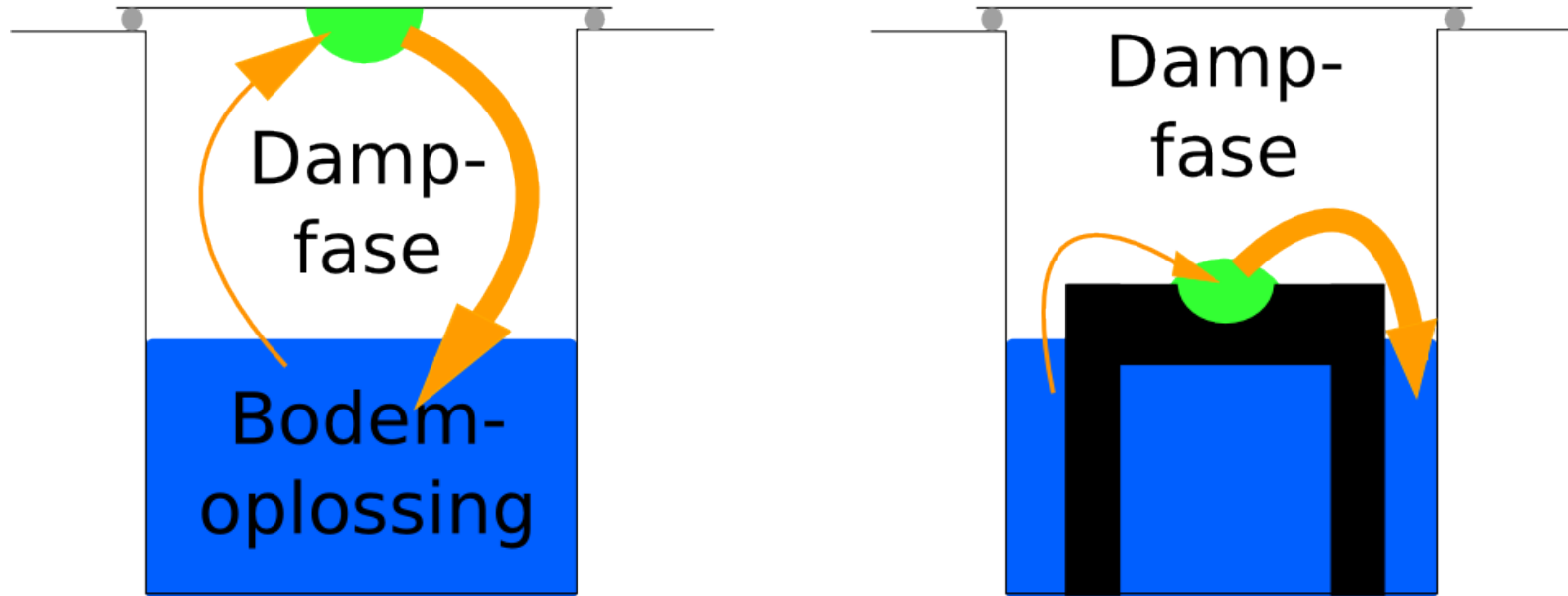
Kinetische Factoren en Nucleatie



Praktische Opstellingen

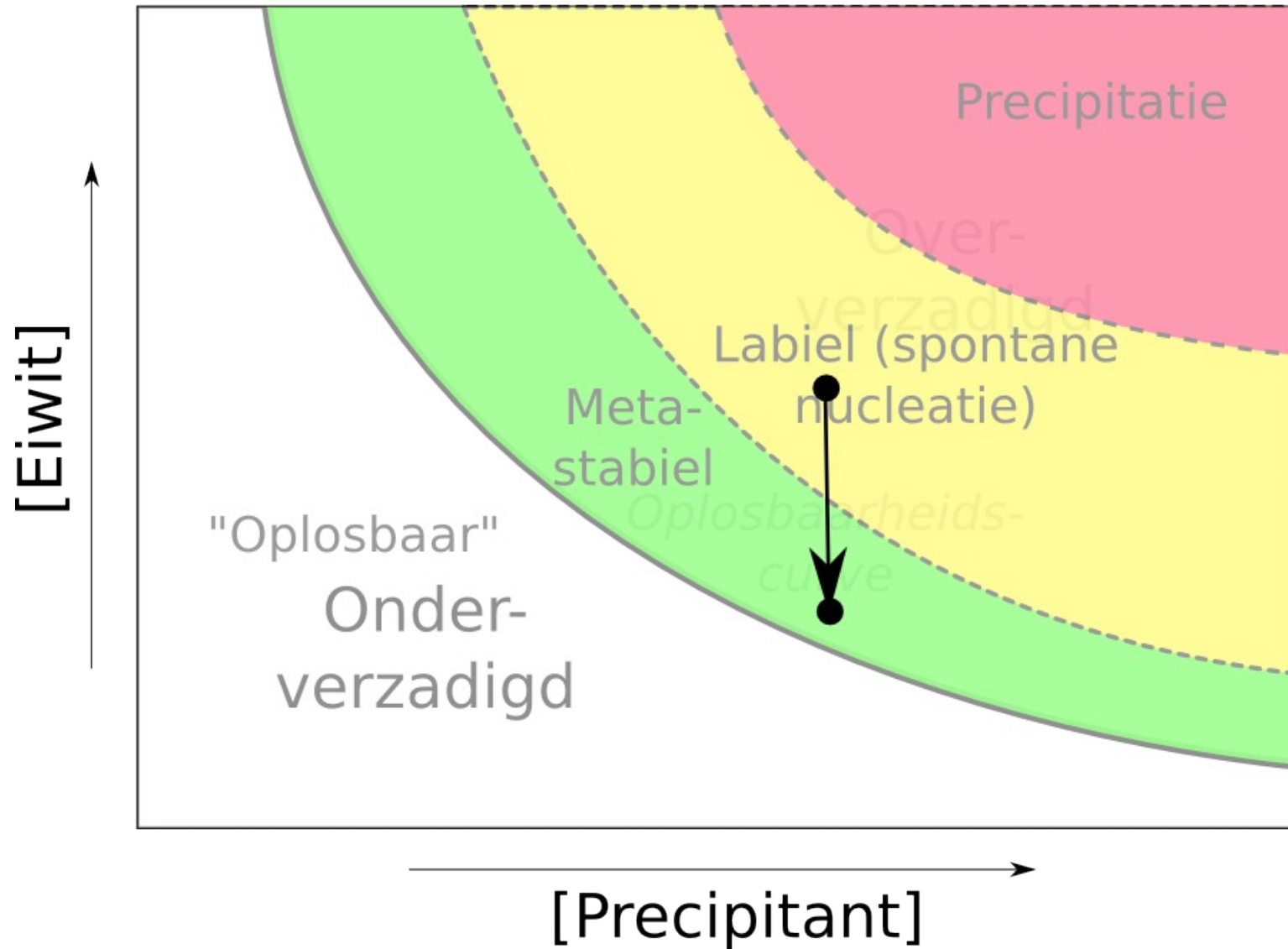
- Batch
 - In epjes, in 96-well-platen, onder olie, ...
- Dampdiffusie (*vapour diffusion*)
 - *Hanging drop versus sitting drop*

Druppel (50/50 eiwitoplossing + bodemoplossing)



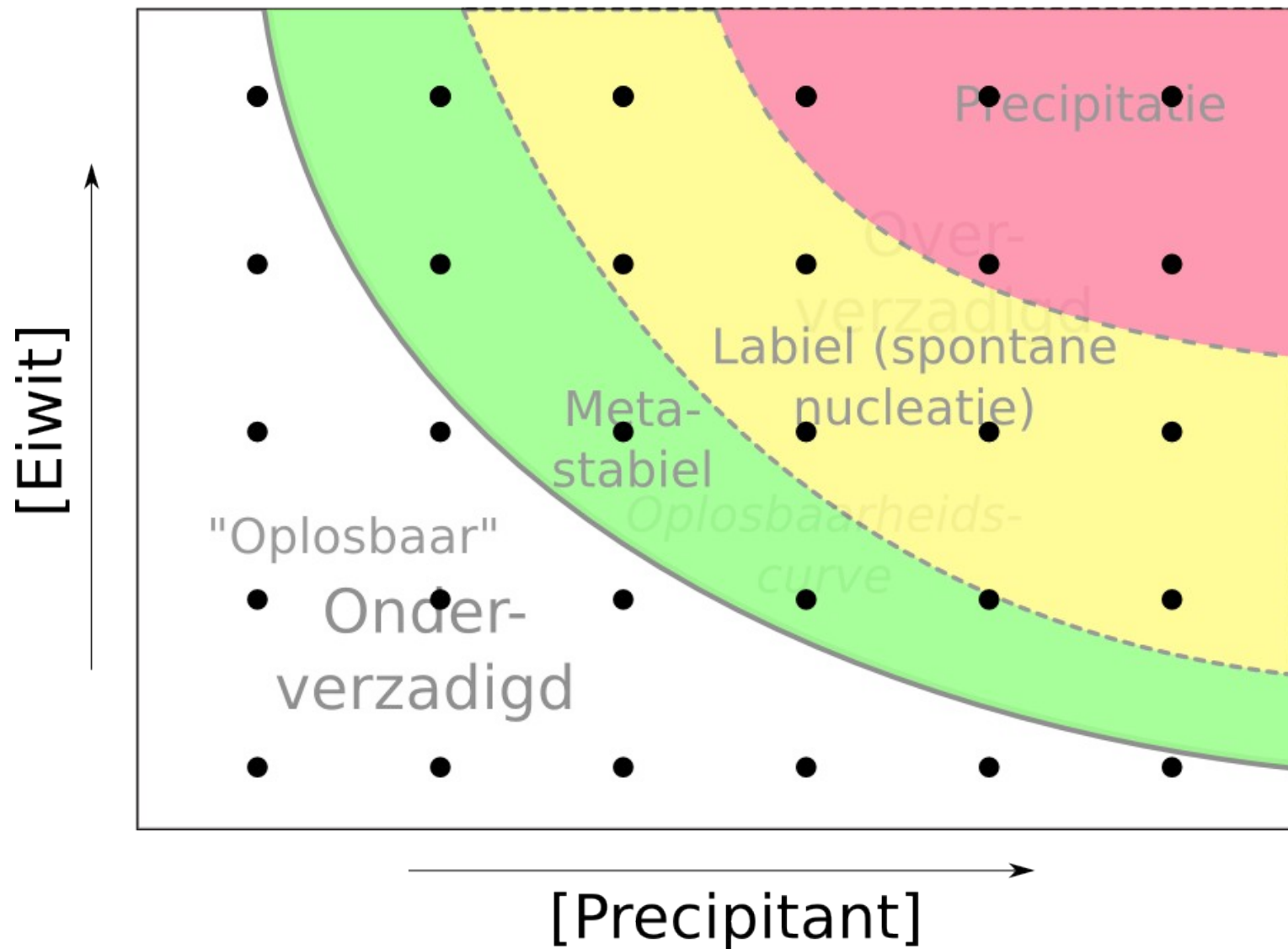
- Andere opstellingen (geldiffusie, dialyse, ...)

Batchkristallisatie



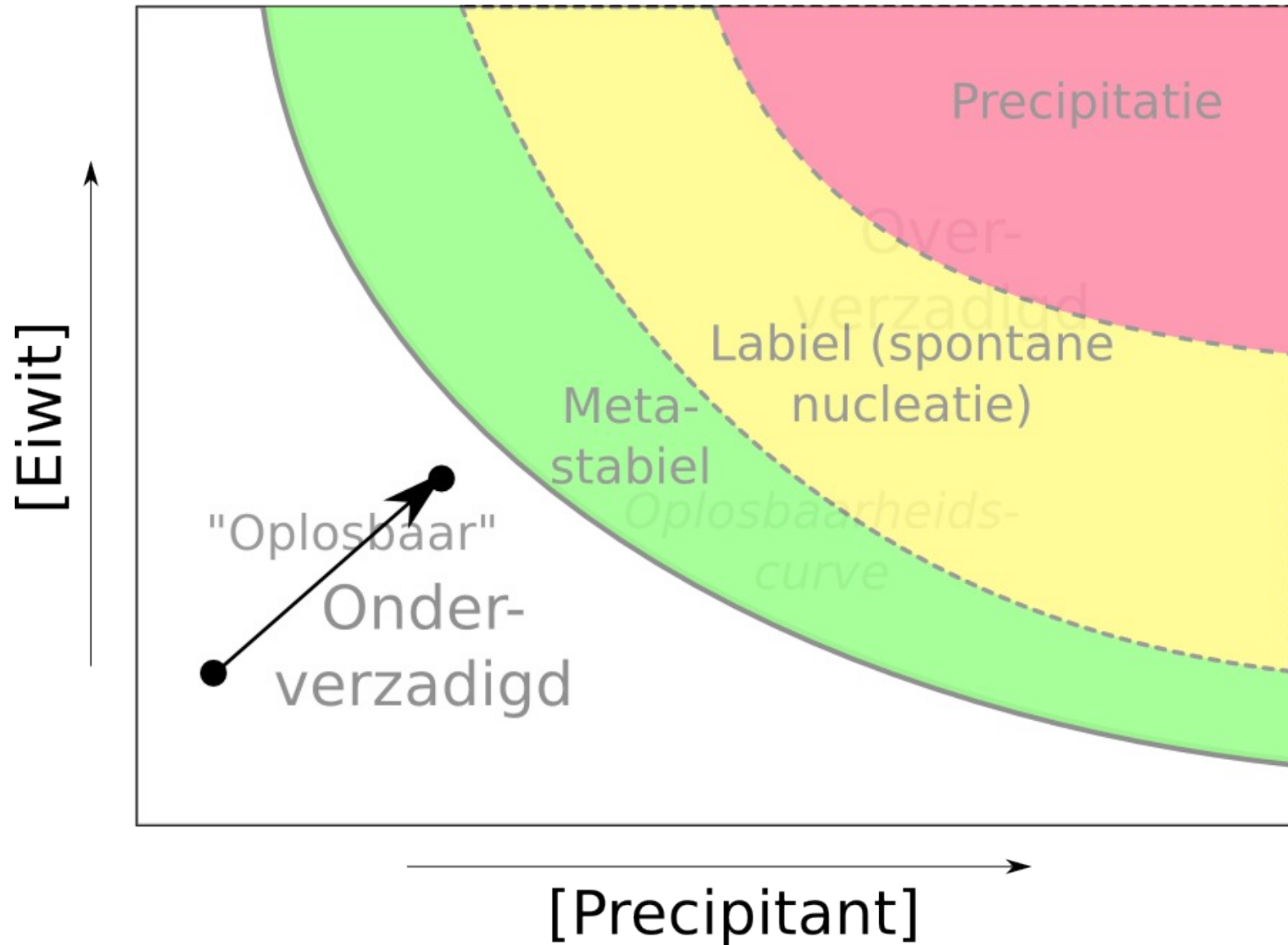
Elke opstelling "test" één punt in de ruimte van het fasediagram

Systematische Screening



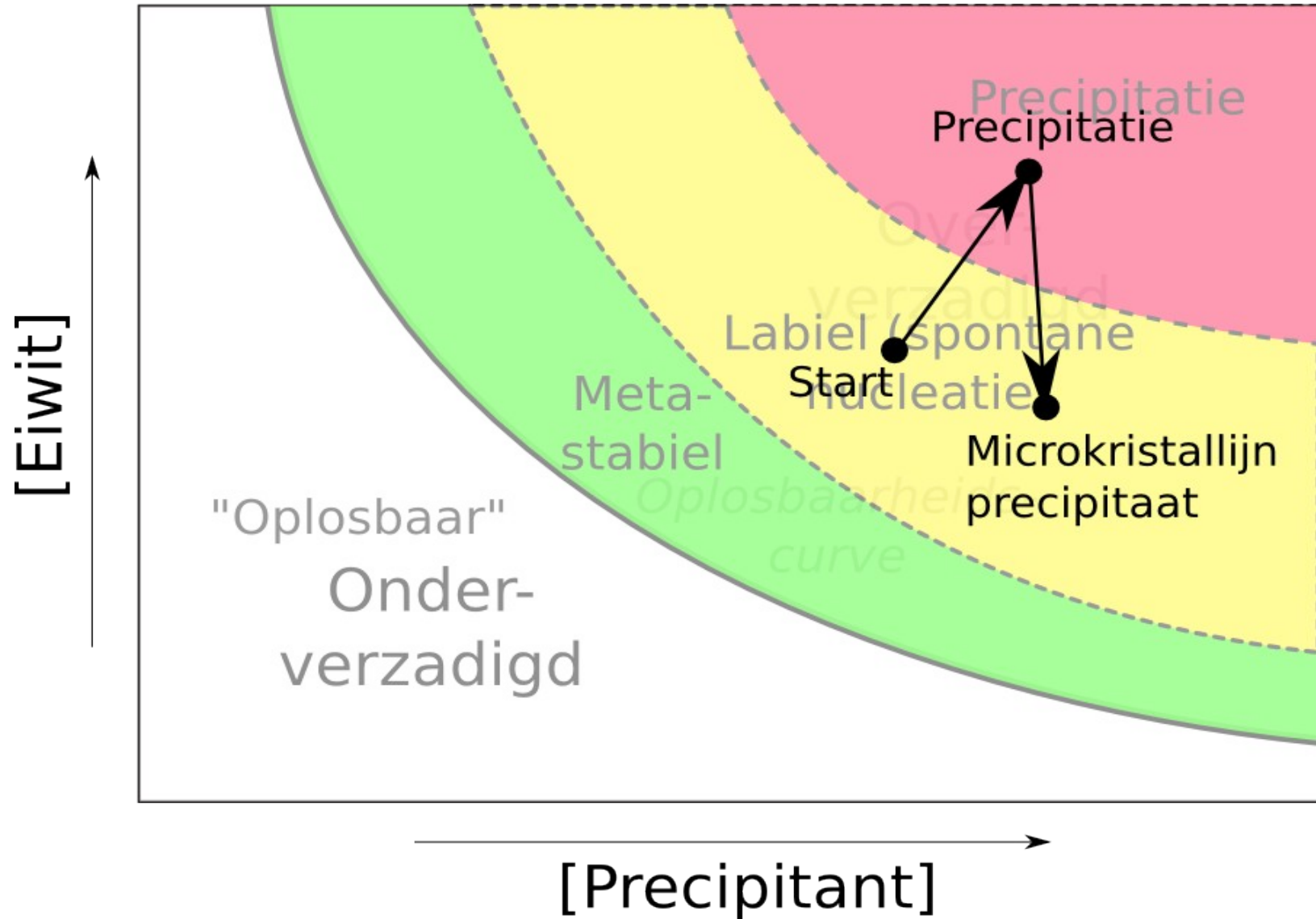
Bij het combineren van meerdere factoren neemt het aantal te testen combinaties zeer snel toe

Dampdiffusie



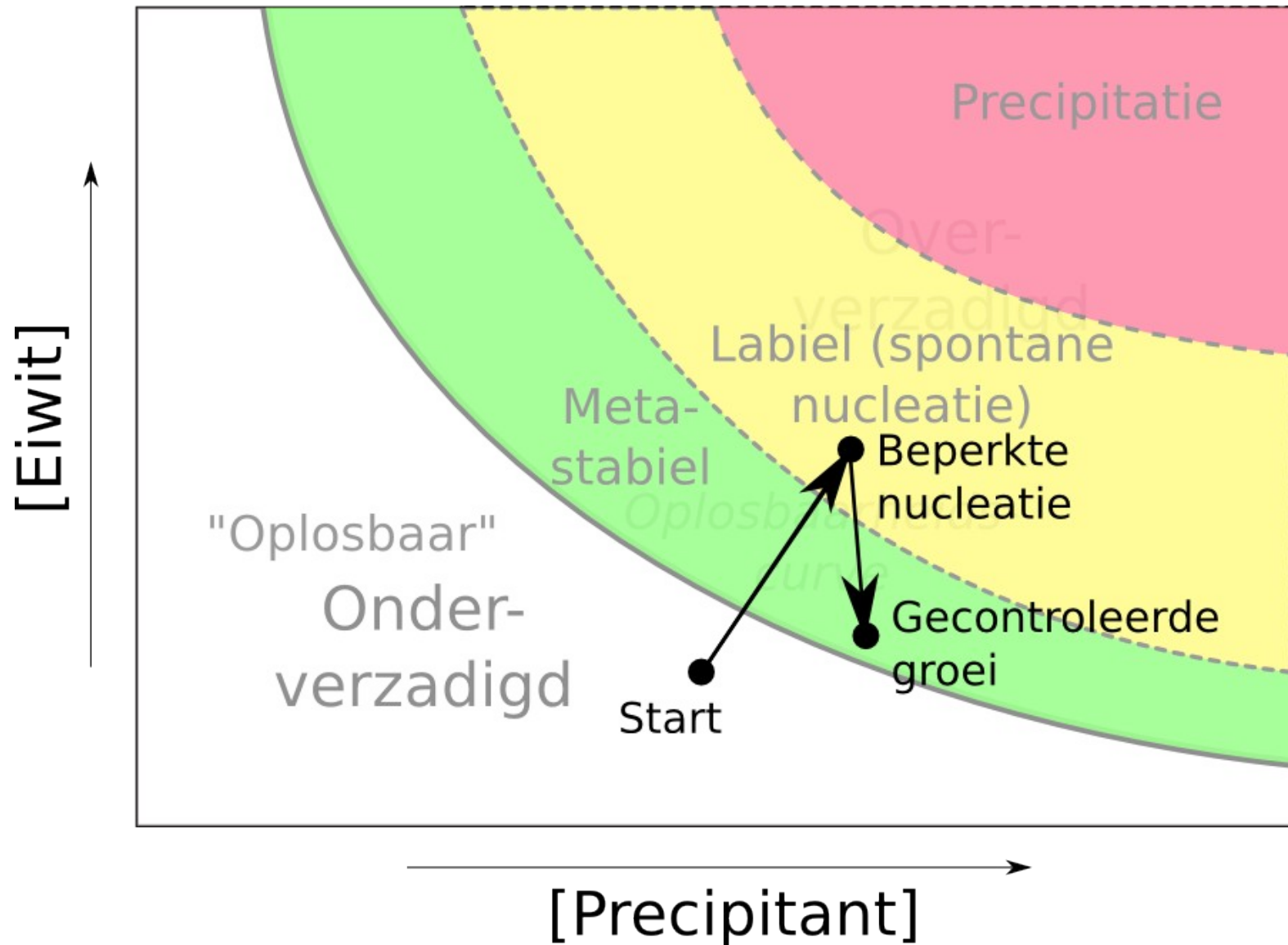
Elke opstelling doorloopt een reeks condities langsheen een lijn in het fasediagram

Dampdiffusie



Elke opstelling doorloopt een reeks condities langsheen een lijn in het fasediagram

Dampdiffusie



Elke opstelling doorloopt een reeks condities langsheen een lijn in het fasediagram

Protocol

- Bereiding van de stockoplossingen
 - 1M natriumacetaatbuffer (NaAc) bij pH 4.8
 - 4M = 233.76 g/l = 23.4%(w/v) natriumchloride (NaCl)
 - Zuiver (100%v/v) ethyleenglycol (EG) en 50%(v/v) PEGMME5000
- Bereiding van het eiwitstaal
 - Startconcentratie: 100 mg/ml
- Mengen van de bodemoplossingen in de 24-well-platen
 - Variatie van de verschillende concentraties
- Maken van de kristallisatiedruppels
 - Variatie: *hanging drop* versus *sitting drop*

Ontwerp – Groep 1

Alle wells bevatten 0.1 M NaAc-buffer bij pH 4.8.

De concentratie van NaCl en ethyleenglycol wordt gevarieerd.

Plaat A: 70 mg/ml lysozyme. Plaat B: 90 mg/ml lysozyme.

	1	2	3	4	5	6
A	4% NaCl 10% EG	6% NaCl 10% EG	8% NaCl 10% EG	10% NaCl 10% EG	12% NaCl 10% EG	14% NaCl 10% EG
B	4% NaCl 15% EG	6% NaCl 15% EG	8% NaCl 15% EG	10% NaCl 15% EG	12% NaCl 15% EG	14% NaCl 15% EG
C	4% NaCl 20% EG	6% NaCl 20% EG	8% NaCl 20% EG	10% NaCl 20% EG	12% NaCl 20% EG	14% NaCl 20% EG
D	4% NaCl 25% EG	6% NaCl 25% EG	8% NaCl 25% EG	10% NaCl 25% EG	12% NaCl 25% EG	14% NaCl 25% EG

Ontwerp – Groep 2

Alle wells bevatten 0.1 M NaAc-buffer bij pH 4.8.

Het effect van EG en PEGMME5000 (PEG) wordt vergeleken.

Plaat A: 70 mg/ml lysozyme. Plaat B: 90 mg/ml lysozyme.

	1	2	3	4	5	6
A	6% NaCl 15% EG	7% NaCl 15% EG	8% NaCl 15% EG	9% NaCl 15% EG	10% NaCl 15% EG	11% NaCl 15% EG
B	6% NaCl 20% EG	7% NaCl 20% EG	8% NaCl 20% EG	9% NaCl 20% EG	10% NaCl 20% EG	11% NaCl 20% EG
C	6% NaCl 15% PEG	7% NaCl 15% PEG	8% NaCl 15% PEG	9% NaCl 15% PEG	10% NaCl 15% PEG	11% NaCl 15% PEG
D	6% NaCl 20% PEG	7% NaCl 20% PEG	8% NaCl 20% PEG	9% NaCl 20% PEG	10% NaCl 20% PEG	11% NaCl 20% PEG

Ontwerp – Groep 3

Alle wells bevatten 0.1 M NaAc-buffer bij pH 4.8

Effect van druppelgrootte en *hanging* vs. *sitting drop*

Plaat A: 70 mg/ml lysozyme. Plaat B: 90 mg/ml lysozyme.

	1	2	3	4	5	6
A	4% NaCl 15% EG <i>hanging</i> 2µl + 2µl	6% NaCl 15% EG <i>hanging</i> 2µl + 2µl	8% NaCl 15% EG <i>hanging</i> 2µl + 2µl	10% NaCl 15% EG <i>hanging</i> 2µl + 2µl	12% NaCl 15% EG <i>hanging</i> 2µl + 2µl	14% NaCl 15% EG <i>hanging</i> 2µl + 2µl
B	4% NaCl 15% EG <i>hanging</i> 2µl + 1µl	6% NaCl 15% EG <i>hanging</i> 2µl + 1µl	8% NaCl 15% EG <i>hanging</i> 2µl + 1µl	10% NaCl 15% EG <i>hanging</i> 2µl + 1µl	12% NaCl 15% EG <i>hanging</i> 2µl + 1µl	14% NaCl 15% EG <i>hanging</i> 2µl + 1µl
C	4% NaCl 15% EG <i>sitting</i> 3µl + 3µl	6% NaCl 15% EG <i>sitting</i> 3µl + 3µl	8% NaCl 15% EG <i>sitting</i> 3µl + 3µl	10% NaCl 15% EG <i>sitting</i> 3µl + 3µl	12% NaCl 15% EG <i>sitting</i> 3µl + 3µl	14% NaCl 15% EG <i>sitting</i> 3µl + 3µl
D	4% NaCl 15% EG <i>sitting</i> 5µl + 5µl	6% NaCl 15% EG <i>sitting</i> 5µl + 5µl	8% NaCl 15% EG <i>sitting</i> 5µl + 5µl	10% NaCl 15% EG <i>sitting</i> 5µl + 5µl	12% NaCl 15% EG <i>sitting</i> 5µl + 5µl	14% NaCl 15% EG <i>sitting</i> 5µl + 5µl