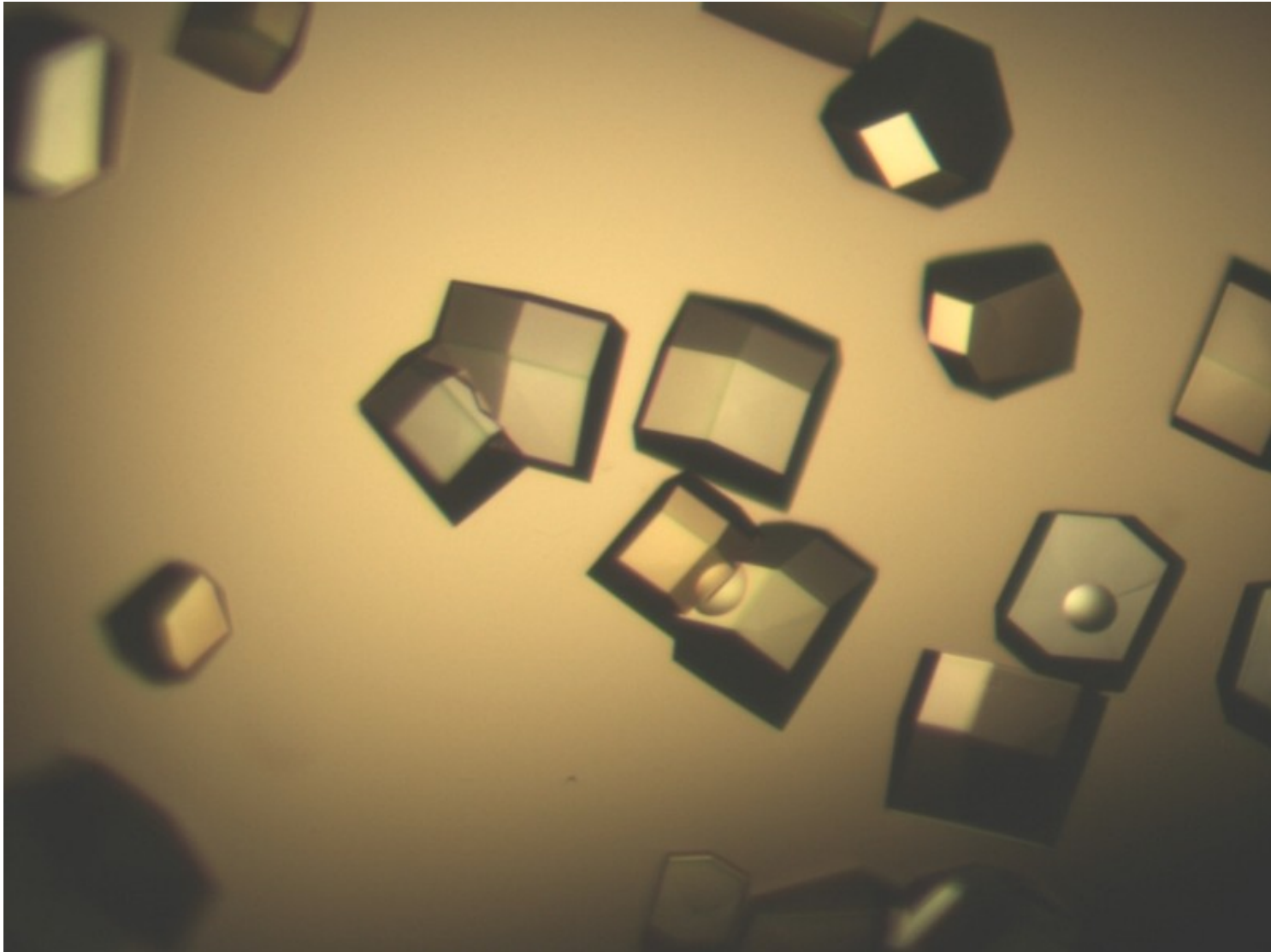
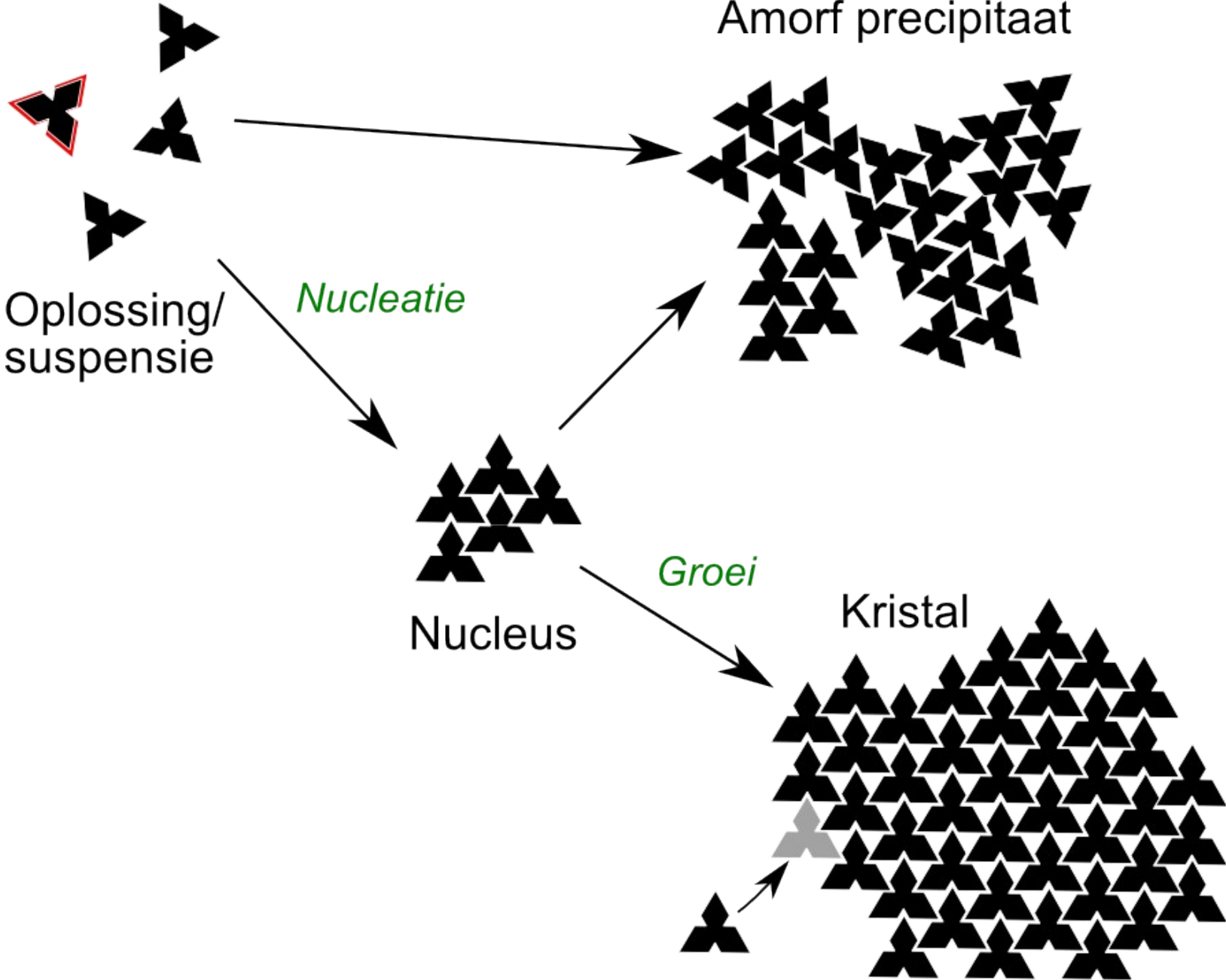


Kristallisatie van Lysozyme

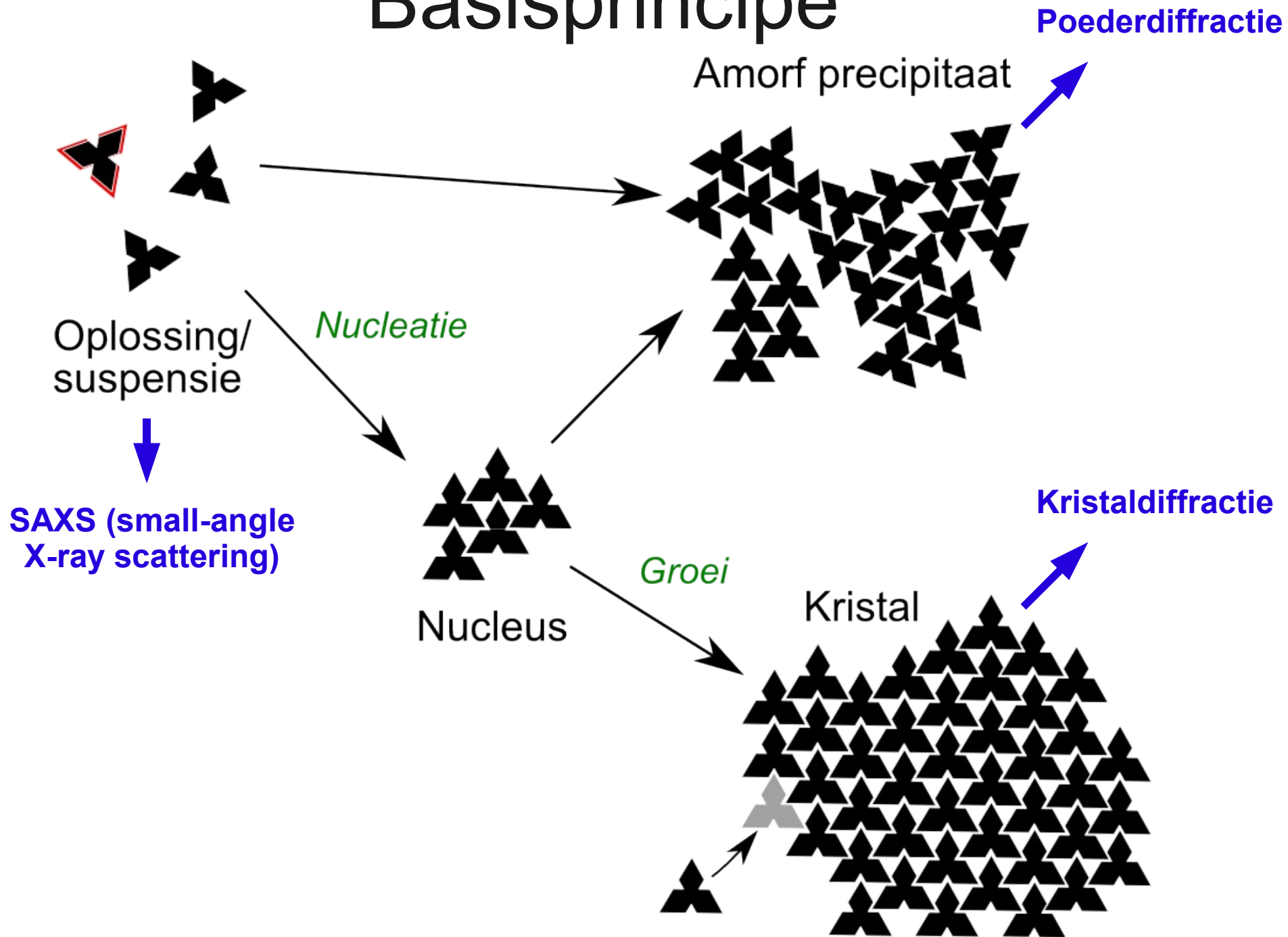


Bron: <http://lysozyme.co.uk/>

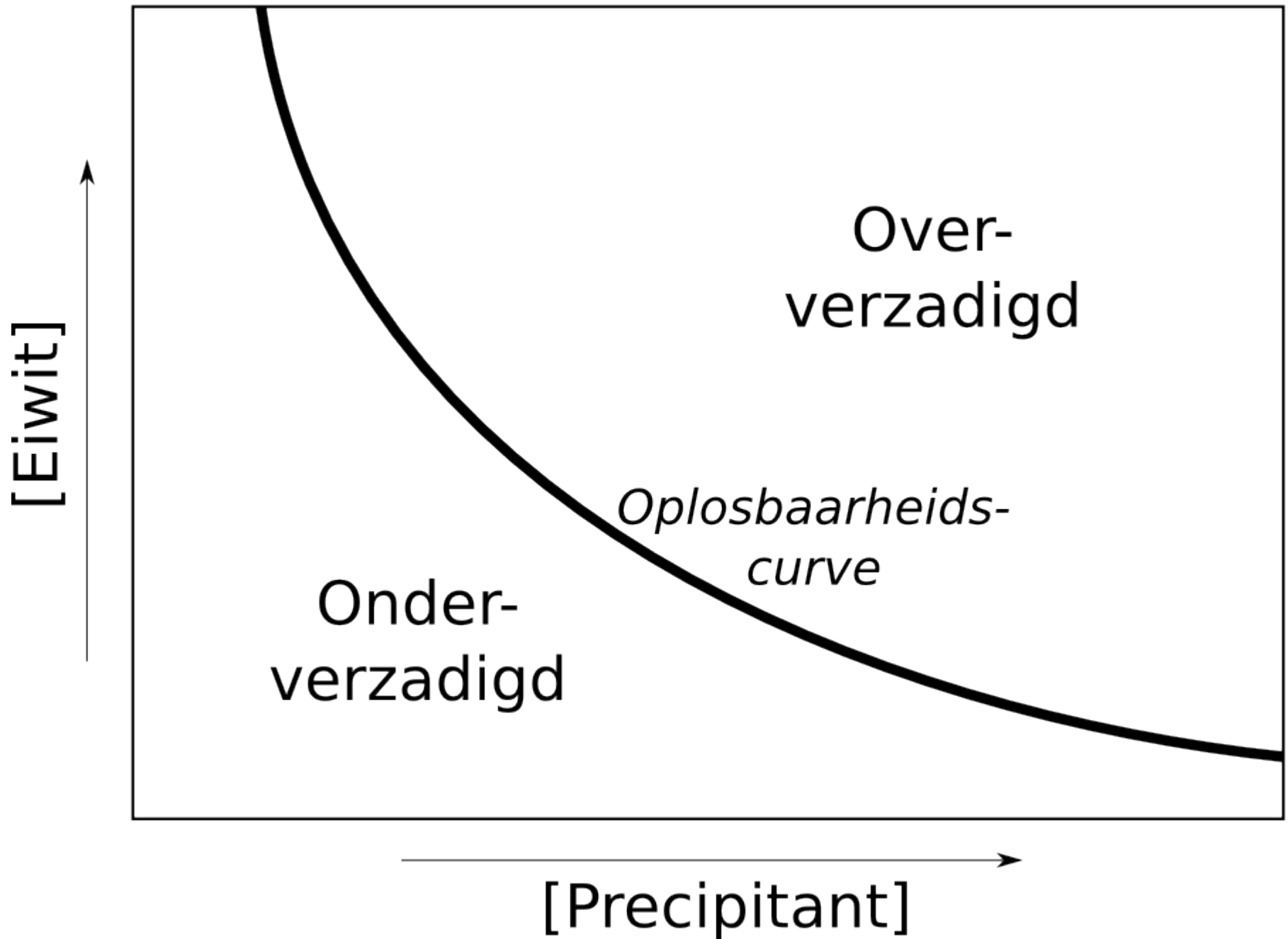
Basisprincipe



Basisprincipe



Het Fasediagram



Courante Precipitanten

- Zouten

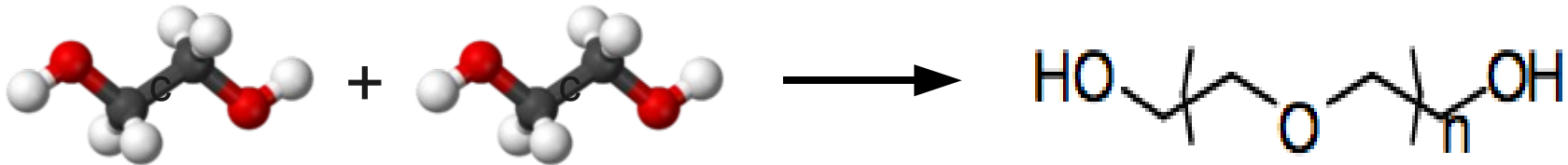
- Natriumchloride
- Ammoniumsulfaat
- Natriummalaat

Hofmeister-reeks:



- Organische polymeren

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

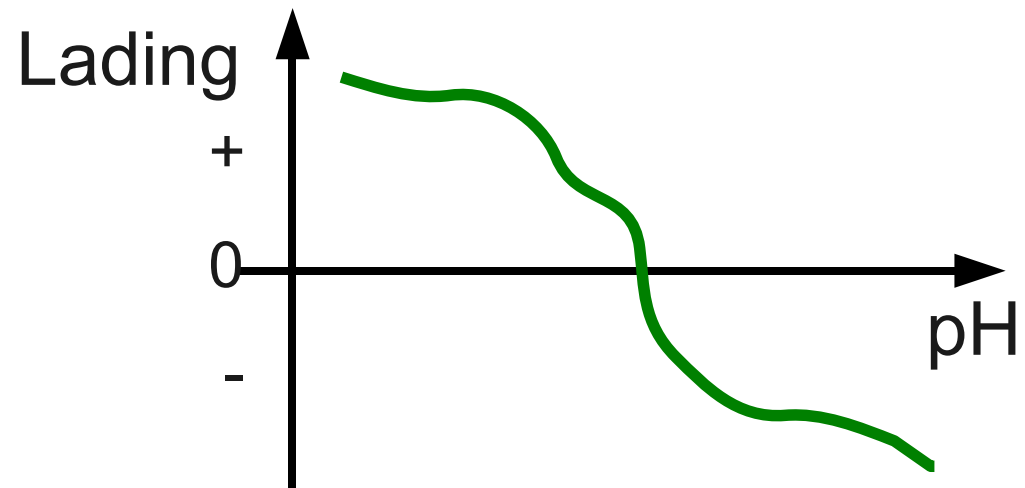


- Kleine organische moleculen

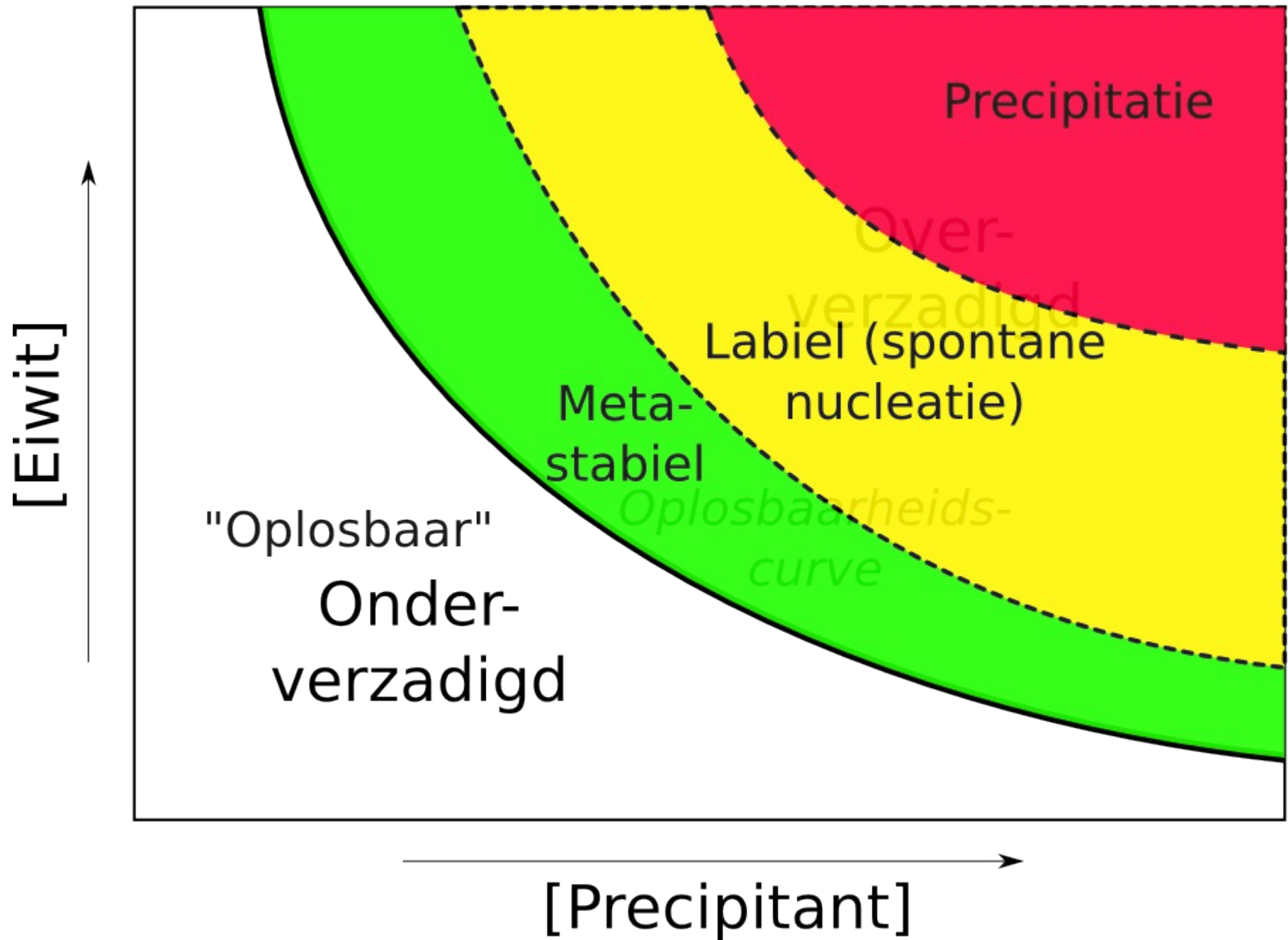
- Glycerol
- Ethanol, isopropanol

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



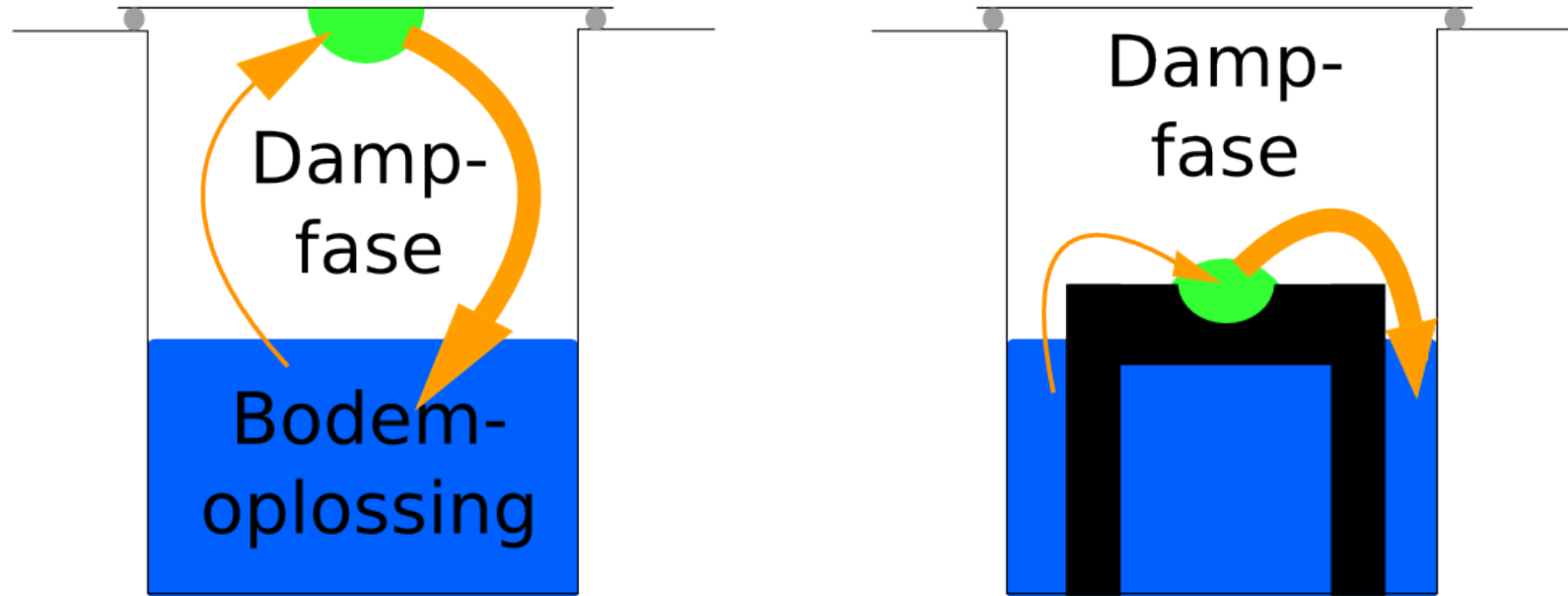
Kinetische Factoren en Nucleatie



Praktische Opstellingen

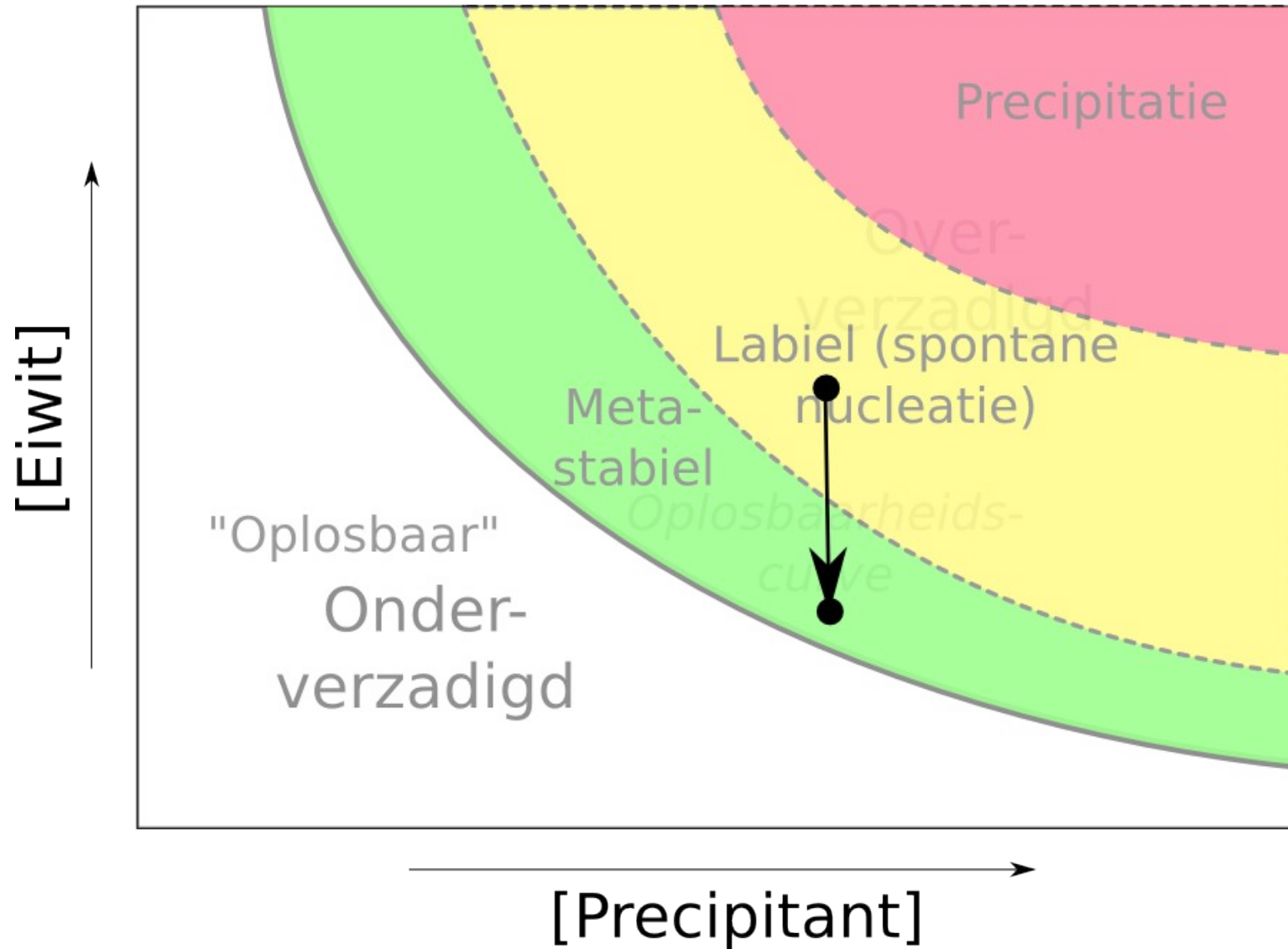
- Batch
 - In epjes, in 96-well-platen, onder olie, ...
- Dampdiffusie (*vapour diffusion*)
 - *Hanging drop versus sitting drop*

Druppel (50/50 eiwitoplossing + bodemoplossing)



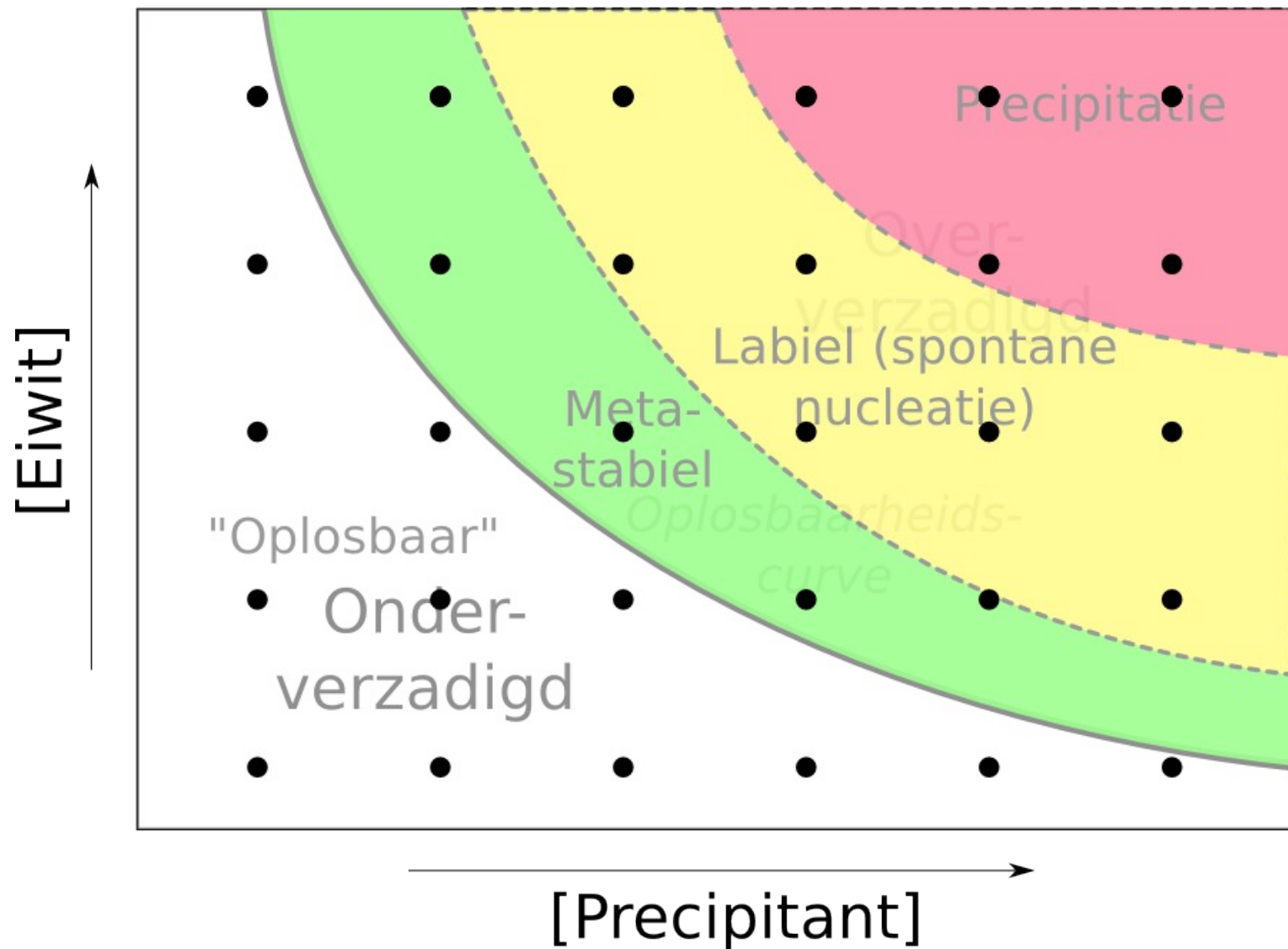
- Andere opstellingen (geldiffusie, dialyse, ...)

Batchkristallisatie



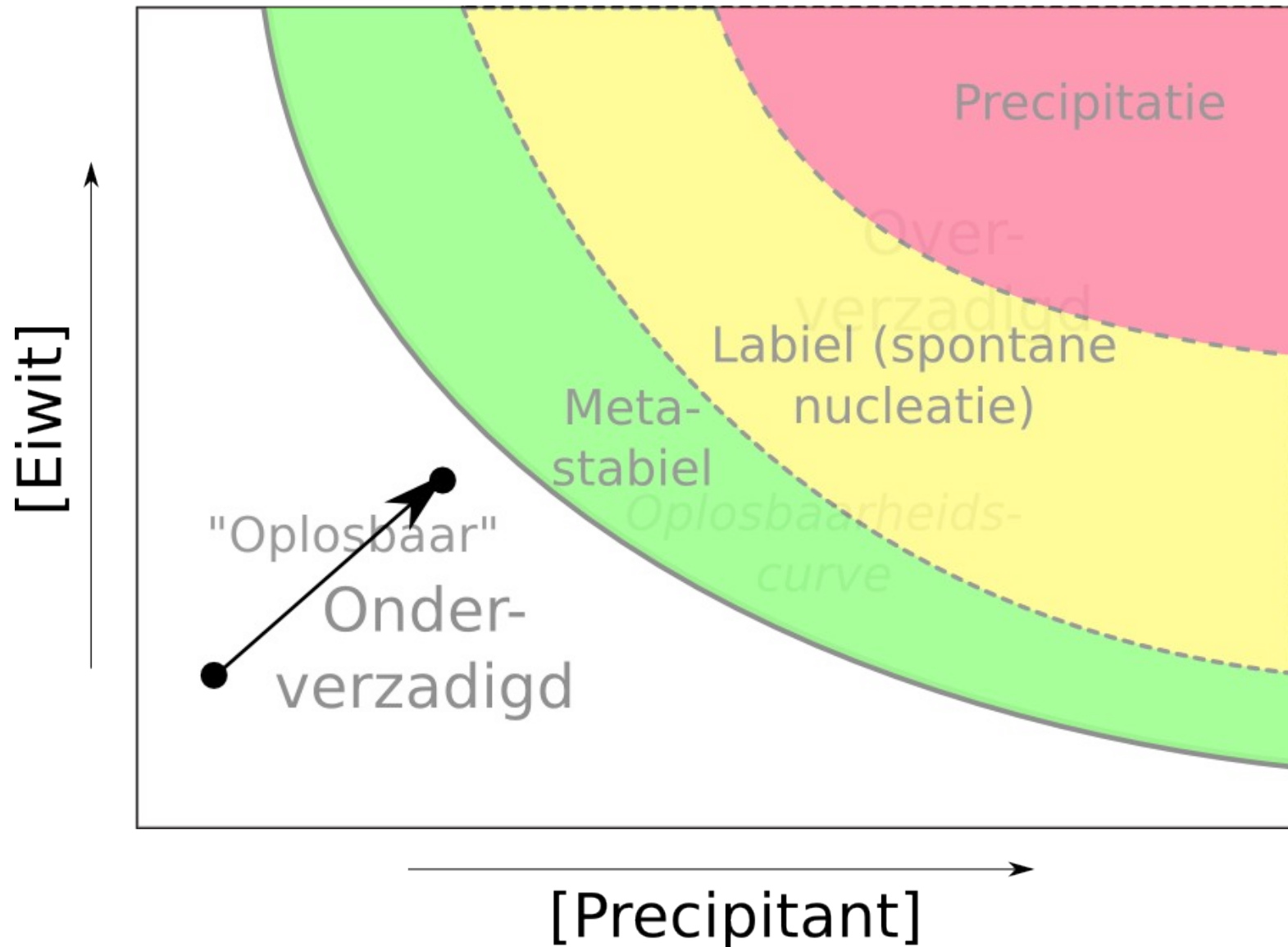
Elke opstelling "test" één punt in de ruimte van het fasediagram

Systematische Screening



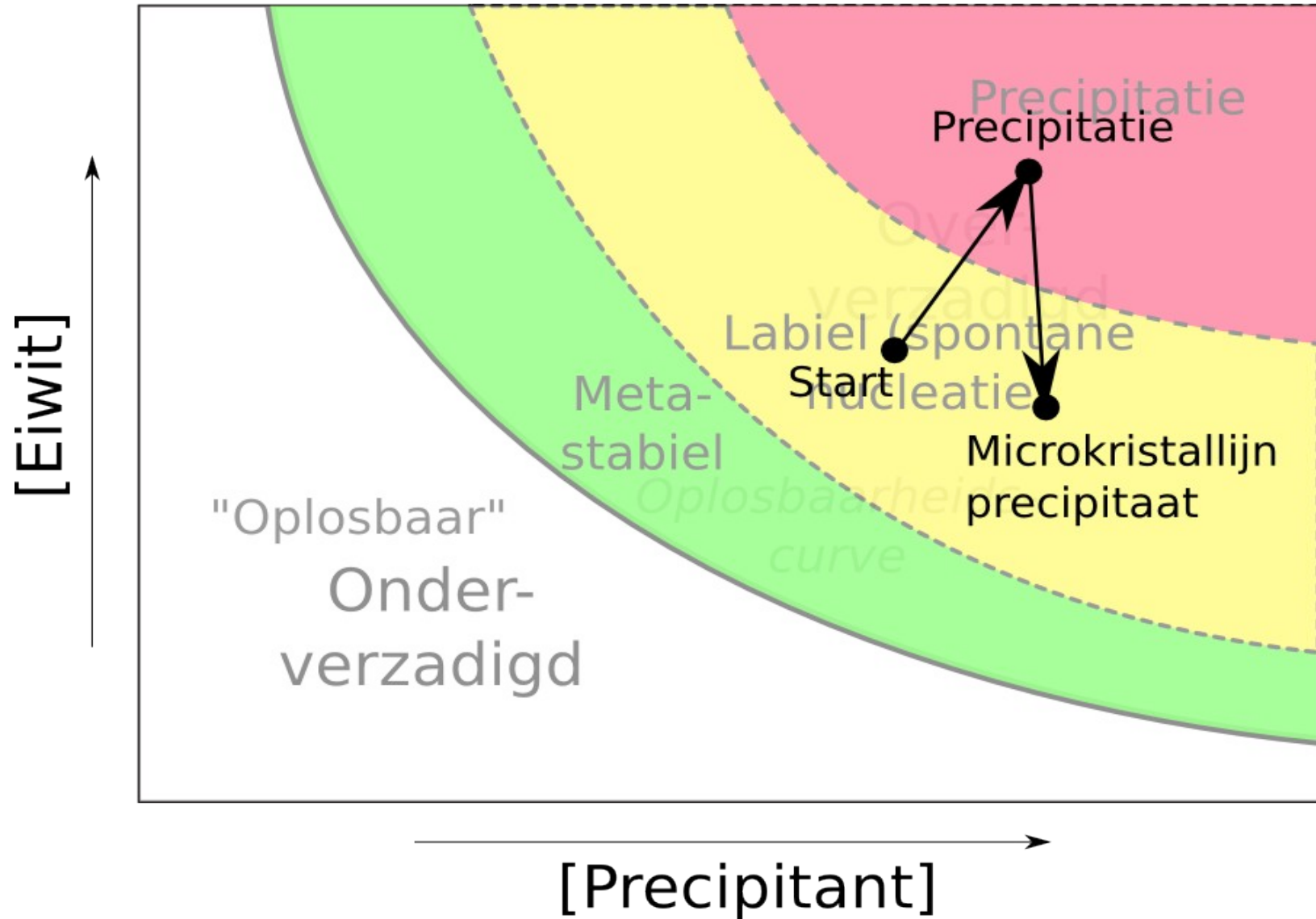
Bij het combineren van meerdere factoren neemt het aantal te testen combinaties zeer snel toe

Dampdiffusie



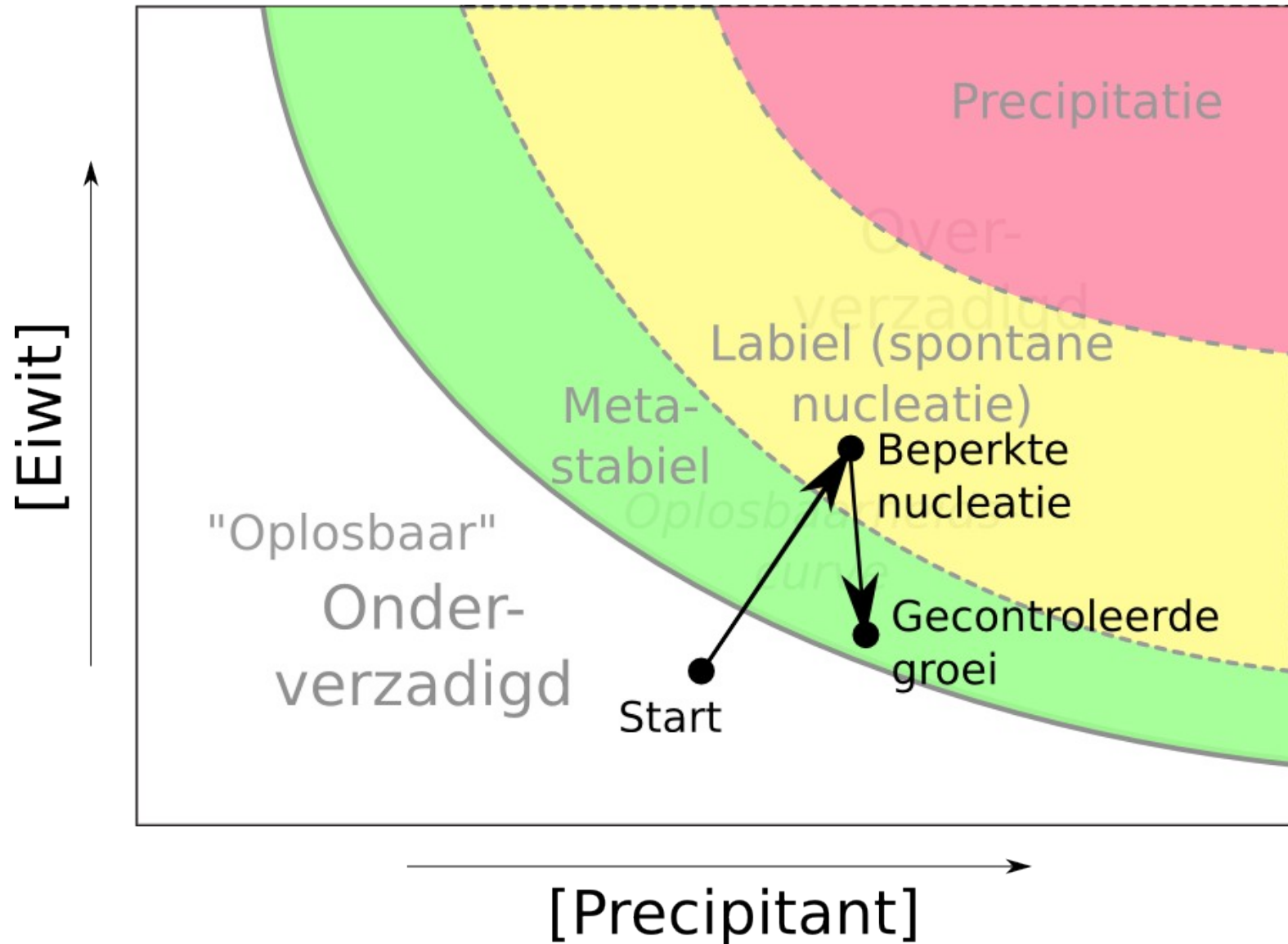
Elke opstelling doorloopt een reeks condities langsheen een lijn in het fasediagram

Dampdiffusie



Elke opstelling doorloopt een reeks condities langsheen een lijn in het fase-diagram

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)
- Bereiding van het eiwitstaal
 - Startconcentratie: 100 mg/ml
- Mengen van de bodemoplossingen in de 24-well-platen
 - Variatie van de zoutconcentratie bij constante pH en EG-concentratie
- Maken van de kristallisatiedruppels
 - Variatie van de eiwitconcentratie

Experimenteel Ontwerp

Alle wells bevatten 0.1 M NaAc-buffer bij pH 4.8 en 10% EG.
De concentraties van NaCl en lysozyme (P) worden gevarieerd.

