



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

Τμήμα Βιολογίας

Πτυχιακή εργασία:

Καθαρισμός, απομόνωση και κρυστάλλωση της πρωτεΐνης Rop GP, με στόχο την μελέτη σχέσεων δομής- αλληλουχίας.

Επιβλέπων καθηγητής: Κοκκινίδης Μιχαήλ
Τσέλιος Βασίλης, Ηράκλειο 2013

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου τα οποία, μηδενός εξαιρουμένου, με βοήθησαν να έρθω πρώτη φορά σε επαφή με την πρακτική πλευρά αυτής της επιστήμης και ιδιαίτερα τις κυρίες: Κωνσταντίνα Κοτσιφάκη και Μαρία Προβιδάκη , οι οποίες αφιέρωσαν τεράστιο μέρος του χρόνου τους για να με καθοδηγούν και να επιλύουν κάθε πρόβλημα που αντιμετώπιζα κατά την διάρκεια της παρουσίας μου στο εργαστήριο.

Επιπλέον, ευχαριστώ τον καθηγητή κ. Κοκκινίδη Μιχάλη ο οποίος απεδέχθη την πρότασή μου να πραγματοποιήσω την παρούσα εργαστηριακή μελέτη στο εργαστήριο του και με συμβούλευε με τον καλύτερο δυνατό τρόπο.

Περίληψη

Η γνώση της τριτοταγούς δομής αποτελεί προϋπόθεση τόσο για την σωστή κατανόηση όσο και για την τροποποίηση της λειτουργίας των πρωτεϊνών . Σήμερα, παρά την τεχνολογική πρόοδο ο πειραματικός προσδιορισμός της τριτοταγούς δομής υπολείπεται του ρυθμού συσσώρευσης δεδομένων αμινοξικής αλληλουχίας. Οπότε η επιτυχής πρόβλεψη της τριτοταγούς δομής μιας πρωτεΐνης βάσει της αμινοξικής αλληλουχίας αποτελεί ένα σημαντικό πρόβλημα που πρέπει να επιλυθεί. Η δημιουργία μεταλλαγών σε πρωτεΐνες και η μελέτη της αντίστοιχης δομής είναι δυνατόν να συνεισφέρουν σε αυτόν τον τομέα.

Η πρωτεΐνη Rop αποτελεί αντικείμενο εκτεταμένης μελέτης για την κατανόηση τέτοιων σχέσεων , δομής – αλληλουχίας. Μέχρι σήμερα έχουν μελετηθεί εκτενώς ο ρόλος της στροφής και του μοτίβου επανάληψης επτάδας του υδρόφοβου πυρήνα στην αναδίπλωση και σταθερότητα του μορίου. Πρόκειται για ένα ομοδιμερές, αντιπαράλληλο, 4-α-ελικοειδές δεμάτιο που συμμετέχει στην αντιγραφή των πλασμιδίων ColE1 της E.coli. Σε μια προσπάθεια για μελέτη της δομής επιπλέον μεταλλαγμάτων της πρωτεΐνης Rop , σχεδιάστηκε ένα μετάλλαγμα στο οποίο οι θέσεις 30 και 31 έχουν μεταλλαχθεί σε Gly/G και Pro/P αντίστοιχα. Ο στόχος είναι να μελετηθεί κρυσταλλογραφικά το μετάλλαγμα αυτό RopGP ώστε να προκύψουν σχέσεις δομής αλληλουχίας και να παρατηρηθούν τυχόν αποκλίσεις από την wt μορφή της πρωτεΐνης. Έτσι ξεκίνησε μια σειρά πειραμάτων τα οποία αποτελούν και το αντικείμενο της παρούσας πτυχιακής εργασίας

Περιεχόμενα:

Κεφάλαιο 1 **ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

1.1	Το πρόβλημα της πρωτεϊνικής αναδίπλωσης.....	6
1.2	Μοντέλα πρωτεϊνικής αναδίπλωσης.....	7-9
1.3	Ενεργειακές μεταβολές κατά την αναδίπλωση.....	10
1.4	Μέθοδοι μελέτης πρωτεϊνικής αναδίπλωσης	10-11
1.5	Η πρωτεΐνη Rop.....	11-13
1.6	Μεταλλάγματα της Rop για την μελέτη της πρωτεϊνικής αναδίπλωσης.....	13-16
1.7	Το μετάλλαγμα Rop GP.....	16

Κεφάλαιο 2 **ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

2.1	Πολλαπλασιασμός μεταλλαγμένων στελεχών E.coli.....	17
2.2	Απομόνωση κυττάρων.....	17-18
2.3	Διάρρηξη βακτηριακών κυττάρων.....	18-19
2.4	Παρασκευή διαλυμάτων για τον καθαρισμό της πρωτεΐνης.....	19-20
2.5	Απομόνωση Rop GP.....	20-21
2.6	Ηλεκτροφόρηση σε gel ακρυλαμίδης.....	21-23
2.7	Dialysis.....	23-24
2.8	Συμπύκνωση του πρωτεϊνικού διαλύματος.....	24
2.9	Κρυσταλλώσεις.....	24-50
	1 ^ο ς καθαρισμός.....	25-42
	2 ^ο ς καθαρισμός.....	43-44
	3 ^ο ς καθαρισμός.....	45-50
2.10	Πείραμα κυκλικού διχρωισμού.....	51-53

Κεφάλαιο 3 **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

3.1 Συμπεράσματα – Παρατηρήσεις.....54-56

--Βιβλιογραφία.....57

Κεφάλαιο 1^ο

1.1 Το πρόβλημα της πρωτεϊνικής αναδίπλωσης

Μια πρωτεΐνη είναι μια πολυπεπτιδική αλυσίδα αναδιπλωμένη σε μια ή περισσότερες επικράτειες, κάθε μία από τις οποίες αποτελείται από α-έλικες, β-πτυχωτές επιφάνειες και βρόχους. Η διαδικασία με την οποία αυτή η πολυπεπτιδική αλυσίδα αποκτά τη σωστή τρισδιάστατη δομή, για να επιτύχει τη βιολογικά ενεργή, φυσική κατάσταση (native state) ονομάζεται πρωτεϊνική αναδίπλωση (**protein folding**). Κατά την πορεία της πρωτεϊνικής αναδίπλωσης προκύπτει μια συγκεκριμένη τρισδιάστατη δομή. Η πρόβλεψη της οποίας, από την αμινοξική αλληλουχία είναι ένα από τα μεγαλύτερα προβλήματα της δομικής βιολογίας. Η ιδέα που κάποιος θα μπορούσε να φανταστεί, ότι κάθε πρωτεϊνικό μόριο ψάχνει όλες τις πιθανές διαμορφώσεις μέχρι να 'παγώσει' στην κατάσταση χαμηλότερης ενέργειας καταρρίφθηκε από τον Cyrus Levinthal το 1968, ο οποίος έδειξε ότι κάτι τέτοιο δεν είναι δυνατόν να συμβαίνει γιατί τότε η πρωτεΐνη θα χρειαζόταν περίπου 10^{48} χρόνια για να αποκτήσει την τελική της διαμόρφωση. Είναι γνωστό ότι ο χρόνος που χρειάζεται είναι πολύ μικρότερος. Έτσι η πορεία αναδίπλωσης πρέπει να κατευθύνεται με κάποιον τρόπο, ακολουθώντας ένα κινητικό μονοπάτι ασταθών ενδιάμεσων (**intermediates**), προκειμένου να αποφύγει το ψάξιμο ενός μεγάλου αριθμού άσχετων διαμορφώσεων. Εάν όμως οι κινητικοί παράγοντες είναι σημαντικοί στην πορεία αναδίπλωσης, τότε είναι πιθανόν η παρατηρούμενη διαμόρφωση να μην είναι αυτή με την χαμηλότερη ενέργεια αλλά η πιο σταθερή από αυτές τις διαμορφώσεις που είναι προσπελάσιμες κινητικά. Τότε η πρωτεΐνη θα μπορούσε να παγιδευτεί σε ένα τοπικό ενεργειακό ελάχιστο με ένα υψηλό ενεργειακό φραγμό, ο οποίος την εμποδίζει να φθάσει στο ολικό ενεργειακό ελάχιστο, όπου ενδεχομένως να υιοθετεί διαφορετική αναδίπλωση. Πολλές φορές τα ενδιάμεσα αυτά έχουν χαρακτηριστικά 'εύπλαστης σφαίρας' (**molten globule state**). Για την λύση του παραπάνω προβλήματος αλλά και άλλων όπως είναι οι σχέσεις μεταξύ στερεοδιάταξης της πρωτεΐνης και αλληλεπίδρασης της με άλλα βιολογικά μακρομόρια αναλύονται και μελετούνται δομές πρωτεϊνών και μεταλλαγμάτων τους. Η πρωτεΐνη Rop για παράδειγμα αποτελεί αντικείμενο εκτεταμένων μελετών για σχέσεις αλληλουχίας-δομής-λειτουργίας.

1.2 Μοντέλα πρωτεϊνικής αναδίπλωσης

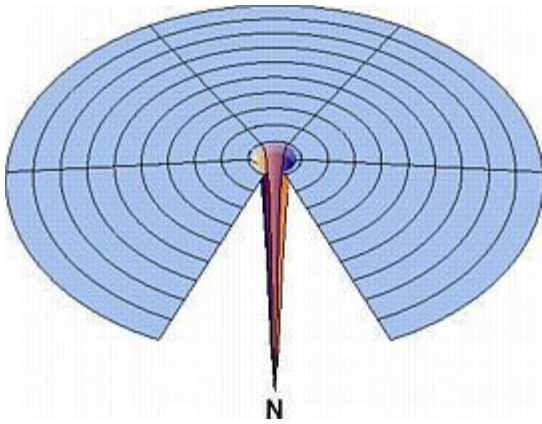
Μετά την διατύπωση του ερωτήματος του Levinthal έχουν διατυπωθεί αρκετά μοντέλα αναδίπλωσης των πρωτεϊνών, κανένα όμως δεν μπόρεσε να περιγράψει την πορεία αναδίπλωσης όλων ανεξαιρέτως των πρωτεϊνών. Κάποια εξετάζουν το θέμα από την θερμοδυναμική του πλευρά και άλλα μελετούν την δυναμική της αναδίπλωσης εξετάζοντας τον μηχανισμό αναδίπλωσης αποδιατεταγμένων πρωτεϊνών *in vitro*.

Πολλές μικρές μονομερείς πρωτεΐνες αναδιπλώνονται με την κινητική δύο σταδίων (*two state kinetics*), με μεγάλη ωστόσο χρονική διακύμανση των ρυθμών αναδίπλωσης. Αυτό δείχνει ότι η ύπαρξη ενδιάμεσων δεν είναι προαπαιτούμενη και ότι πιθανόν να υπάρχουν κινητικές παγίδες οι οποίες επιβραδύνουν την διαδικασία.

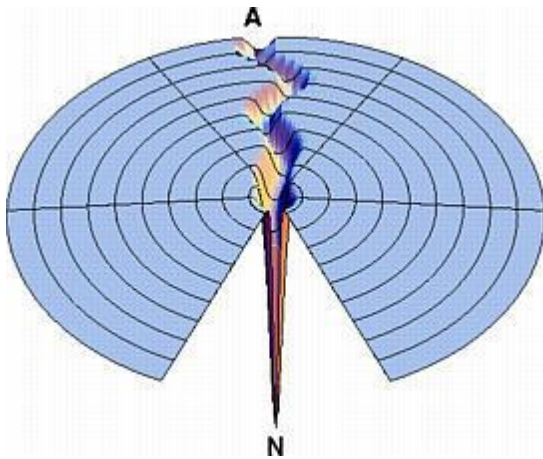
Ο τρόπος αναδίπλωσης άλλων πρωτεϊνών φαίνεται να ακολουθεί το μοντέλο 'diffusion-collision' το οποίο μελετά την αναδίπλωση από την πλευρά της κινητικής. Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό οι πρωτεΐνες αποτελούνται από μικροεπικράτειες κάθε μια από τις οποίες είναι αρκετά μικρή ώστε να μπορεί να λάβει σε σύντομο χρονικό διάστημα όλες τις πιθανές διαμορφώσεις.

Το μοντέλο 'hydrophobic collapse' περιγράφει το αρχικό, πολύ γρήγορο στάδιο της αναδίπλωσης σφαιρικών πρωτεϊνών, οφείλεται σε υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις και πολλές φορές έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό της εύπλαστης σφαίρας (*molten globule*). Η εύπλαστη σφαίρα μπορεί να χαρακτηριστεί ως το σύνολο παραπλήσιων δομών οι οποίες μετατρέπονται ταχύτατα η μια στην άλλη. Έχει επίσης σχηματιστεί το μεγαλύτερο μέρος της δευτεροταγούς δομής χωρίς ωστόσο να έχουν ολοκληρωθεί όλες εκείνες οι αλληλεπιδράσεις που χαρακτηρίζουν την φυσική κατάσταση.

Μια νέα θεωρία έχει αντικαταστήσει όλα αυτά τα μοντέλα τα τελευταία χρόνια εισάγοντας τους όρους των τοπίων ενέργειας (*energy landscapes*) και των χωνιών αναδίπλωσης (*foldng funnels*). Η θεωρία αυτή δίνει έμφαση στην ομαδοποίηση (*ensemble*) των διαμορφώσεων των ενδιάμεσων με την ταυτόχρονη παρουσία πολλαπλών μονοπατιών αναδίπλωσης. Επιπλέον με αυτή την θεωρία είναι δυνατόν να εξηγηθεί ο τρόπος αναδίπλωσης πρωτεϊνών οι οποίες μέχρι τώρα δεν υπάκουαν σε κανένα από τα μοντέλα που προαναφέρθηκαν.

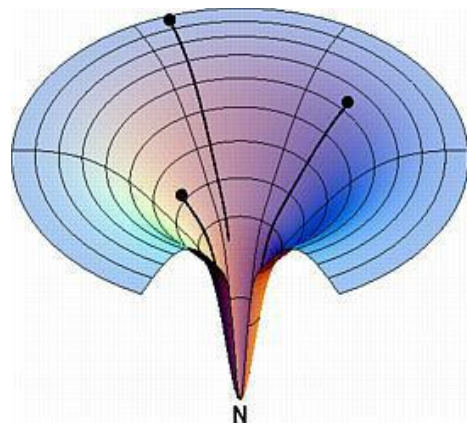


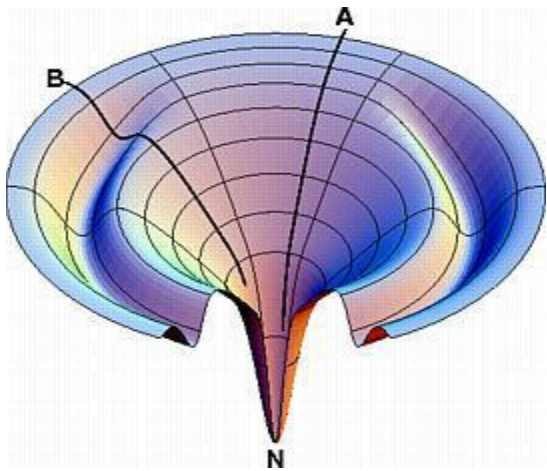
Η πολυπεπτιδική αλυσίδα αναζητά τυχαία την φυσική της διαμόρφωση. Δύσκολη η πρόβλεψη της διάρκειας αναδίπλωσης



Το μονοπάτι οδηγεί την δομή από μια τυχαία μη φυσική διαμόρφωση στην φυσική, με συνέπεια τον περιορισμό της αναζήτησης και τον περιορισμό του χρόνου της αναδίπλωσης

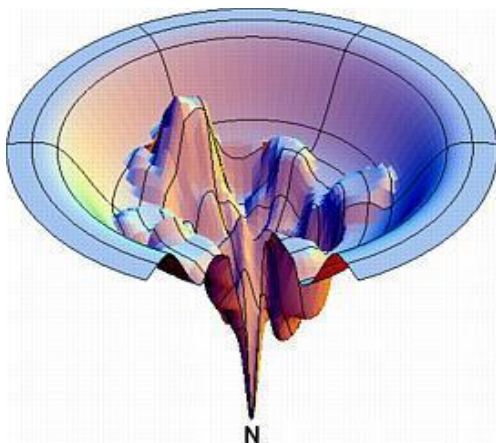
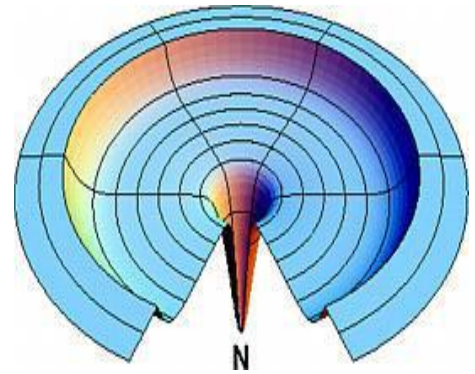
Απεικόνιση ενός ιδανικού τοπίου χωνιού. Η ομαλή μείωση της ελεύθερης ενέργειας μειώνει τον αριθμό των πιθανών διαμορφώσεων.





Απεικόνιση του τοπίου με το οποίο μια πρωτεΐνη μπορεί να αναδιπλώνεται γρήγορα μέσω του μονοπατιού Α και μιας πιο αργής Β η οποία περιλαμβάνει κινητική παγίδα.

Στην εικόνα αυτή φαίνεται πως η εντροπία της διαμόρφωσης μπορεί να προκαλέσει φράγμα στην περαιτέρω μείωση της ελεύθερης ενέργειας. Με τον τρόπο αυτό η αλυσίδα παγιδεύεται στο επίπεδο χωρίς να μπορεί να φτάσει στην φυσική της μορφή



Ένα ανώμαλο τοπίο ενέργειας με πολλές κινητικές παγίδες, ενεργειακούς φραγμούς και μερικά στενά μονοπάτια προς την διαδρομή προς την φυσική κατάσταση. Η αναδίπλωση μπορεί να ακολουθεί πολλαπλά μονοπάτια.

1.3 Ενεργειακές μεταβολές κατά την αναδίπλωση

Για να γίνει όμως κατανοητό το μοντέλο του ενεργειακού τοπίου μέσω του οποίου η πολυπεπτιδική αλυσίδα θα λάβει τελικά την λειτουργική διπλωμένη της μορφή πρέπει να γίνει μια σύντομη περιγραφή στις ενεργειακές μεταβολές κατά την διάρκεια της πρωτεϊνικής αναδίπλωσης. Με μικρές αλλαγές στο pH ση στην θερμοκρασία οι πρωτεΐνες μπορούν να μεταπέσουν από την φυσική διπλωμένη κατάσταση τους σε αδίπλωτη κατάσταση και αυτό γιατί η ενεργειακή διαφορά μεταξύ της unfolded κατάστασης και της folded είναι 5-15 kcal/mol. Αυτός ο αριθμός είναι πολύ μικρός αν σκεφτούμε ότι η συνεισφορά ενός υδρογονοδεσμού είναι 2-5 Kcal/mol. Δύο είναι οι παράγοντες που συνεισφέρουν σε αυτήν τη διαφορά.

1. Η ενθαλπία: προέρχεται από την ενέργεια των των μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των ατόμων της πολυπεπτιδικής αλυσίδας (υδρογονικοί δεσμοί , Van der Waals και ιοντικές αλληλεπιδράσεις)

2. Η εντροπία: προέρχεται από τον 2^ο νόμο της θερμοδυναμικής, σύμφωνα με τον οποίο απαιτείται ενέργεια για να δημιουργηθεί τάξη.

Σε ότι αφορά την ενθαλπία , σε αντίθεση με τους ομοιοπολικούς δεσμούς που είναι με εξαίρεση τους δισουλφιδικούς οι ίδιοι τόσο στην folded όσο και στην unfolded κατάσταση της πρωτεΐνης οι μη ομοιοπολικοί δεσμοί διαφέρουν και αυτό γιατί οι δεύτεροι είναι πιο ισχυροί στην διπλωμένη κατάσταση . Το αποτέλεσμα είναι να δημιουργείται ενεργειακή διαφορά με την μορφή της διαφοράς ενθαλπίας (ΔH).

1.4 Μέθοδοι μελέτης πρωτεϊνικής αναδίπλωσης

Στην προσπάθεια για την κατανόηση της διαδικασίας αναδίπλωσης έχει μελετηθεί μεγάλος αριθμός πρωτεϊνών με την χρήση πολλών διαφορετικών μεθόδων . Συχνά η δομή των πρωτεϊνών αυτών έχει χαρακτηριστικά molten globule state , όπως παρατηρήθηκε σε πρωτεΐνες περιλαμβανομένων της α-λακταλβουμίνης , της λυσοζύμης , της

απομυογλοβίνης ,του κυτοχρώματος c και της ριβονουκλεάσης H. Αναφορικά κάποιες από τις μεθόδους αυτές είναι:

1. Μέθοδος του κυκλικού διχρωϊσμού (Circular Dichroism) για την διερεύνηση της δευτεροταγούς δομής των πρωτεϊνών
2. Η κρυσταλλογραφία ακτίνων X η οποία εκμεταλλεύεται τα δεδομένα περίθλασης ακτίνων X που λαμβάνονται από την ακτινοβολήση πρωτεϊνικών κρυστάλλων
3. Η μέθοδος του μαγνητικού πυρηνικού συντονισμού (NMR) η οποία εφαρμόζεται σε διαλύματα πρωτεϊνών .Η μέθοδος του NMR ,εκμεταλλευόμενη την ιδιότητα του spin των πυρήνων των ατόμων, δεν παράγει το είδωλο της δομής της πρωτεΐνης αλλά παρέχει άφθονη δομική πληροφορία , όπως περιορισμούς αποστάσεων ανάμεσα στα άτομα , από την οποία καθορίζεται τελικά και η δομή της πρωτεΐνης.
4. Τέλος η χρήση υπολογιστικών μεθόδων έρχεται για να γεμίσει τα κενά των πειραμάτων και για να οικοδομήσει μοντέλα και θεωρίες οι οποίες μπορούν να κάνουν ελέγξιμη πρόβλεψη της αναδίπλωσης μακρομορίων .Ακόμη με την ανάπτυξη με την ανάπτυξη νέων μοντέλων και αλγορίθμων είναι δυνατή η υπολογιστική ανάλυση πολυσύνθετων δομών.

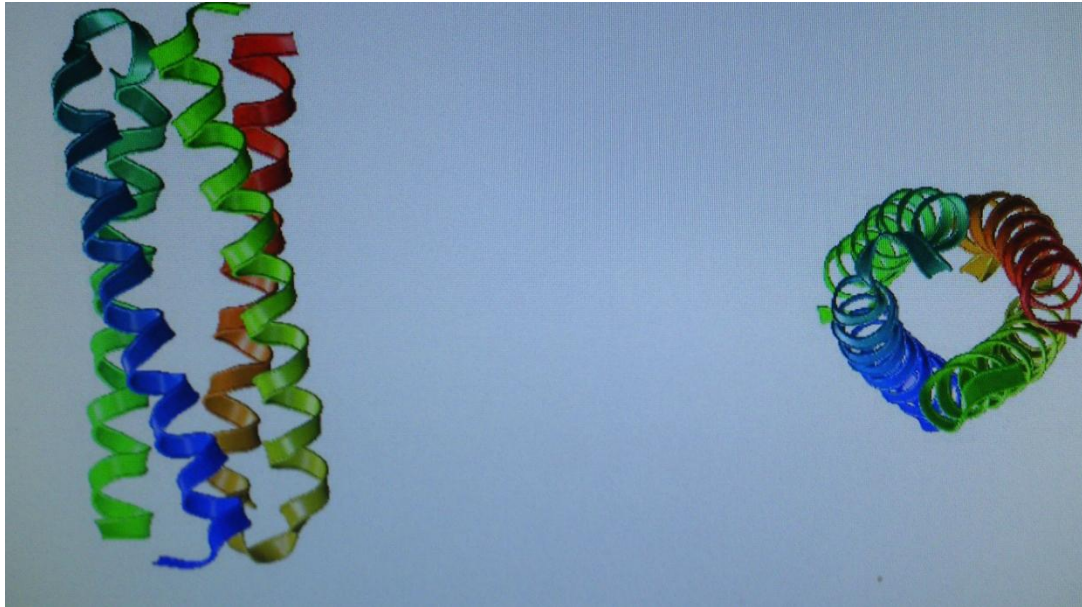
1.5 Η πρωτεΐνη Rop

Η πρωτεΐνη Rop είναι ένα παράδειγμα ομοδιμερούς, αντιπαράλληλου, 4-α-ελικοειδούς δεματίου και φυσιολογικά, συμμετέχει στο μηχανισμό ελέγχου του αριθμού των αντιγράφων των πλασμιδίων της ColE1 του E.coli. Όπως όλα τα α-ελικοειδή δεμάτια, εμφανίζει την «περιοδικότητα της επτάδας» στην αλληλουχία της, η οποία διαταράσσεται στην περιοχή της στροφής, που αποτελείται από τρία αμινοξέα. Αποτελείται από 2 πολυπεπτιδικές αλυσίδες 63 αμινοξέων (7KD) η κάθε μια .Το κάθε μονομερές έχει μοριακό βάρος 14.456 Da και σχηματίζει 2 αντιπαράλληλες α-έλικες οι οποίες συνδέονται μέσω ενός βρόχου τριών αμινοξέων στις θέσεις 30 (Asp/D) , 31 (Ala/A) , 32 (Asp/D).

Η πρωτεΐνη Rop συγκεκριμένα ελέγχει αρνητικά την έναρξη της αντιγραφής του βακτηρίου καθώς αλληλεπιδρά με τα RNA I και RNA II μόρια .Το μόριο RNA II υβριδίζεται σε συγκεκριμένη θέση στο DNA προκειμένου να αρχίσει η διαδικασία της αντιγραφής , ενώ το RNA I μόριο μέσω της αλληλεπίδρασης του με το RNAII δεν επιτρέπει την συνέχιση της. Η Rop έχει ως ρόλο να φροντίζει την σωστή τοποθέτηση

των RNA αυτών μορίων. Ωστόσο η Rop αυτή καθαυτή δεν δρα ως καταστολέας αλλά ως ενισχυτής της δράσης του RNA I και γι αυτό πολλές φορές ακούει στο όνομα Rom (RNA I Modulator).

Η δομή της Rop έχει προσδιοριστεί κρυσταλλογραφικά και παρουσιάζεται παρακάτω(εικόνα 1.5).



Εικόνα 1.5

Χαρακτηριστικό της πρωτεΐνης Rop όπως και των α -ελικοειδών δεματίων γενικότερα είναι ότι πακετάρονται με τρόπο αντιπαράλληλο και εμφανίζουν ένα συγκεκριμένο μοτίβο υδρόφοβων και υδρόφιλων αμινοξέων που επαναλαμβάνεται κάθε επτά αμινοξέα, ένα μοτίβο γνωστό ως «επανάληψη της επτάδας». Τα αμινοξέα που παίρνουν μέρος στον σχηματισμό αυτού του μοτίβου συμβολίζονται συνήθως με τα γράμματα a-g. Το πρώτο (a) και τέταρτο (d) αμινοξύ είναι υδρόφοβα και οι πλευρικές τους ομάδες πακετάρονται στο εσωτερικό της δομής ακολουθώντας να μοντέλο πακεταρίσματος που ονομάζεται «κουμπιά και τρύπες»(Baner et al., 1987) , ενώ τα κατάλοιπα στην θέση f είναι συνήθως υδρόφιλα και εκτεθειμένα .Η επανάληψη της επτάδας στο μόριο της Rop διακόπτεται στην περιοχή της στροφής όπως φαίνεται στον **πίνακα 1.5**. Αυτός ο ιδιαίτερος τρόπος πακεταρίσματος αποτελεί αντικείμενο εκτεταμένων μελετών , μέσω μεταλλαγών που τείνουν να αποκαταστήσουν την επτάδα όπου αυτή διακόπτεται. Άλλες πρωτεΐνες που πακετάρονται σύμφωνα με την επανάληψη της επτάδας είναι η μυοσίνη και τα ενδιάμεσα ινίδια. Μελέτες έχουν δείξει ότι και σε αυτές τις πρωτεΐνες η επανάληψη της επτάδας διακόπτεται.

Πινάκας 1.5

	f	g	a	b	c	d	e
1	(Met	Thr)					
3	Lys	Gln	Glu	Lys	Thr	Ala	Leu
10	Asn	Met	Ala	Arg	Phe	Ile	Arg
17	Ser	Gln	Thr	Leu	Thr	Leu	Leu
24	Glu	Lys	Leu	Asn	Glu	Leu	Asp
31	← Ala →			Asp	Glu	Gln	Ala
36	Asp	Ile	Cys	Glu	Ser	Leu	His
43	Asp	His	Ala	Asp	Glu	Leu	Tyr
50	Arg	Ser	Cys	Leu	Ala	{Arg	Phe}
57	(Gly	Asp	Asp	Gly	Glu	Asn	Leu)

1.6 Μεταλλάγματα της Rop για την μελέτη της πρωτεϊνικής αναδίπλωσης

Η γνωστή και κανονική δομή της Rop , το μικρό της μέγεθος , η υψηλή της διακριτικότητα σε πειράματα περίθλασης ακτίνων χ , την καθιστούν ένα πολύτιμο εργαλείο για την μελέτη της δομής του δεματίου. Έτσι έχουν σχηματιστεί πλήθος μεταλλάξεων μερικές από τις οποίες θα παρουσιαστούν σε αυτήν την παράγραφο.

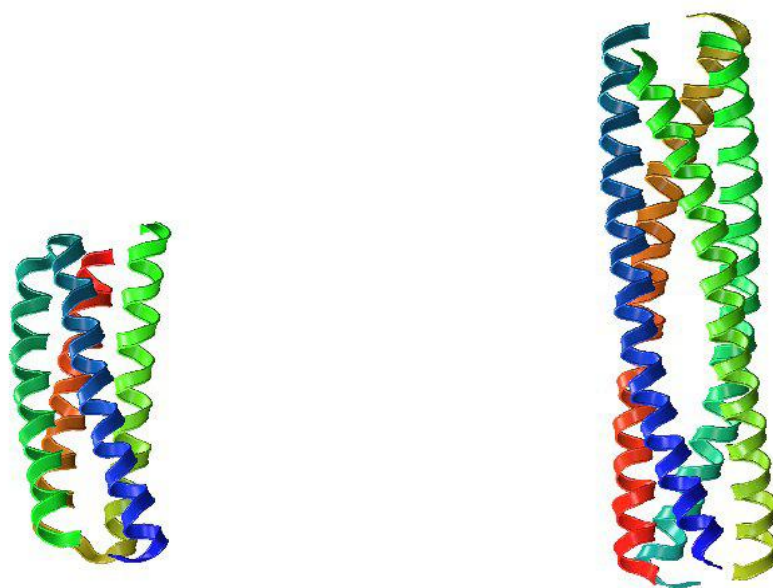
-Το μετάλλαγμα RM6

Τα κατάλοιπα Asp30-Gln34 από την περιοχή της στροφής έχουν αφαιρεθεί προκειμένου να αποκατασταθεί η επτάδα. Το προσδοκώμενο ήταν με την αποκατάσταση της επτάδας να εξαλειφθεί η στροφή και το μονομερές της πρωτεΐνης να είναι πλέον μια εκτεταμένη α-έλικα. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων επιβεβαίωσαν αυτήν την θέση :

Εικόνα 1.6.1

το μετάλλαγμα RM6

Η RM6 με την αφαίρεση των πέντε καταλοίπων παρουσίασε μια αναδιοργάνωση της δομής της φυσικής Rop. Προέκυψε ένα τετραμερές, αντιπαράλληλο, αριστερόστροφο 4-α-ελικοειδές δεμάτιο με το κάθε μονομερές της να είναι μια εκτεταμένη α-έλικα αντί του μοτίβου έλικα-στροφή-έλικα των μονομερών της διμερής Rop. Αριστερά παρουσιάζεται η strop για σύγκριση.



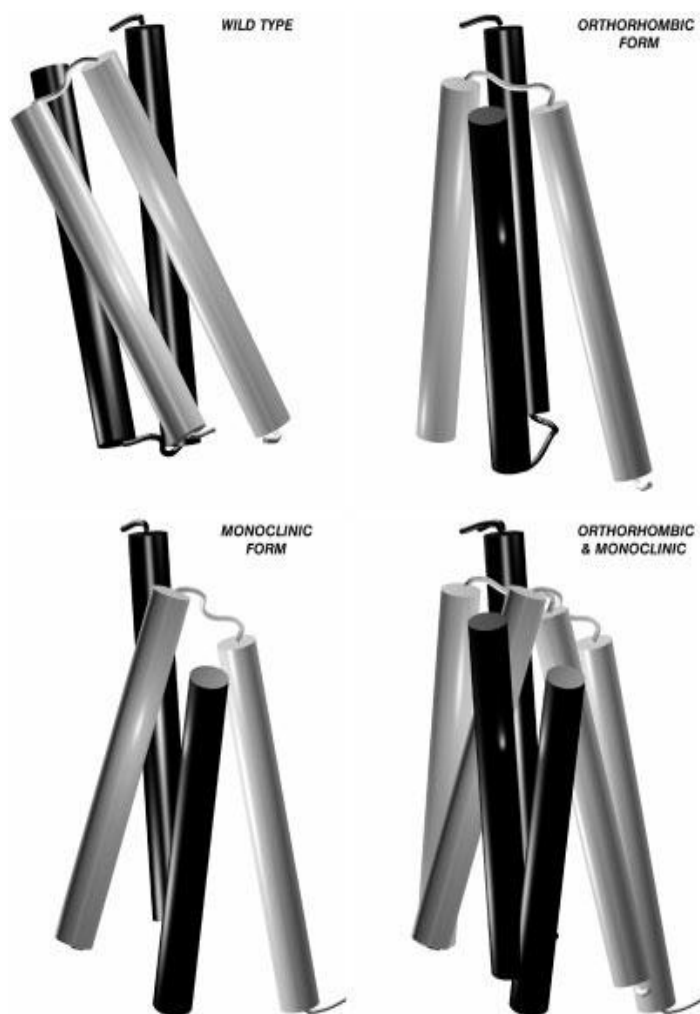
-Το μετάλλαγμα A31P

Αυτό το μετάλλαγμα σχεδιάστηκε με βάση τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της προλίνης που είναι πολύ διαφορετικά από αυτά της αλανίνης και δεν

θα επέτρεπαν στην πρωτεΐνη να αποκτήσει την ιδιαίτερη γεωμετρία της (Kokkonidis and Glykos, 2004). Το μετάλλαγμα αυτό είναι πιο ασταθές από την wt πρωτεΐνη αλλά ακόμη της επιτρέπει να δεσμεύει το RNA υπόστρωμα της. Το μόριο έχει αποκτήσει διχοτόμο U τοπολογία. Έχει επίσης μετατραπεί από αριστερόστροφο σε δεξιόστροφο αντιπαράλληλο δεμάτιο και κάθε έλικα περιβάλλεται από μια άλλη παράλληλη και μια αντιπαράλληλη. Το κατάλοιπο Pro31 δεν συμμετέχει στην στροφή η οποία πλέον έχει μετατοπιστεί από τα κατάλοιπα Asn27-Asp30. Το μετάλλαγμα έχει κρυσταλλωθεί σε 2 διαφορετικές διαμορφώσεις και φαίνεται να αποτελεί ένα παράδειγμα μορίου παγιδευμένου σε «molten globule» κατάσταση.

Εικόνα1.6.2

Το μετάλλαγμα A31P



Η πρωτεΐνη Rop (**R**epressor **O**f **P**rimer) είναι ένα αντιπαράλληλο ,αριστερόστροφο ομοδιμερές 4α ελικοειδές δεμάτιο .Μια μεταλλαγή στην θέση της στροφής και συγκεκριμένα στην θέση 31 από Αλανίνη σε προλίνη έχει σαν αποτέλεσμα αλλαγές στην τοπολογία του πρωτεϊνικού μορίου. Συγκεκριμένα η πρωτεΐνη μετατρέπεται σε ένα δεξιόστροφο μεικτά παράλληλο και αντιπαράλληλο δεμάτιο. Το πρωτεϊνικό αυτό μετάλλαγμα έχει κρυσταλλωθεί σε δύο διαφορετικές διαμορφώσεις όπως φαίνεται στην εικόνα. Είναι ένα ευέλικτο μόριο που μπορεί εύκολα να αλληλομετατρέπεται από την μια διαμόρφωση στη άλλη, βρίσκεται σε μια molten globule κατάσταση.

-Άλλα μεταλλάγματα στην στροφή

Οι θέσεις 30 (Asp/D) , 31 (Ala/A) , 32 (Asp/D) αποτελούν την περιοχή της στροφής του πρωτεϊνικού μορίου. Αυτή η περιοχή έχει γίνει αντικείμενο εκτεταμένων μελετών. Όταν και τα τρία αυτά κατάλοιπα αντικαταστάθηκαν από άλλα, προέκυψαν 380 μεταλλάγματα από τα οποία τα περισσότερα δεν επηρεάζουν την αναδίπλωση της πρωτεΐνης σε α ελικοειδές δεμάτιο. Οπότε προφανώς η δομική πληροφορία που εμπεριέχεται στην περιοχή της στροφής δεν είναι κύριας σημασίας. Όταν το αμινοξύ στην θέση 30 αντικαταστάθηκε από όλα τα υπόλοιπα 19 αμινοξέα , όλα τα μεταλλάγματα που προέκυψαν είχαν την ικανότητα να προσδένονται στο RNA κάτι που μαρτυρά ότι αυτή η θέση είναι ανεκτική σε αλλαγές αμινοξέων.

1.7 Το μετάλλαγμα Rop GP

Σε μια προσπάθεια για μελέτη της δομής επιπλέον μεταλλαγμάτων της πρωτεΐνης Rop , σχεδιάστηκε ένα μετάλλαγμα στο οποίο οι θέσεις 30 και 31 έχουν μεταλλαχθεί σε Gly/G και Pro/P αντίστοιχα. Ο στόχος είναι να μελετηθεί κρυσταλλογραφικά το μετάλλαγμα αυτό RopGP ώστε να προκύψουν σχέσεις δομής αλληλουχίας και να παρατηρηθούν τυχόν αποκλίσεις από την wt μορφή της πρωτεΐνης. Έτσι ξεκίνησε μια σειρά πειραμάτων τα οποία αποτελούν και το αντικείμενο της παρούσας πτυχιακής εργασίας. Η αναλυτική διαδικασία που ακολουθήθηκε για την περάτωση της παραπάνω θέσης θα αναλυθεί στο κεφάλαιο 2.

Κεφάλαιο 2ο

2.1 Πολλαπλασιασμός μεταλλαγμένων στελεχών *E.coli*

Σε πρώτο βήμα ,κύτταρα *E.coli* που θα εξέφραζαν αρκετή ποσότητα από την μεταλλαγμένη πρωτεΐνη έπρεπε να φθάσουν στην εκθετική φάση αύξησης τους. Οπότε παρασκευάστηκαν 100ml προκαλλιέργειας που περιείχαν θρεπτικό LB και καναμυκίνη 0,1ml. Έπειτα μικρή ποσότητα από μεταλλαγμένα στελέχη *E.coli* εισήχθη στην προκαλλιέργεια προκειμένου τα κύτταρα εκεί , έχοντας όλες τις απαραίτητες ουσίες, να πολλαπλασιαστούν .Γι' αυτό η προκαλλιέργεια που πλέον περιείχε και τα βακτήρια που θα εξέφραζαν την προς μελέτη πρωτεΐνη Rop GP μπήκαν στο shaker για περίπου 18 h. Ύστερα από αυτό το χρονικό διάστημα τα μεταλλαγμένα στελέχη βρίσκονταν στην πλέον υγιή κατάσταση. Προκειμένου τα κύτταρα να πολλαπλασιαστούν και να πάρουμε αρκετή πρωτεΐνη , παρασκευάστηκαν 2 lt LB , 1lt σε κάθε μια από τις δυο φλάσκες που περιείχε: 40 ml(αραίωση 1/25) από την προκαλλιέργεια και 1ml καναμυκίνης. Οι δύο φλάσκες μπήκαν στο shaker μέχρι η OD να φθάσει τα ικανοποιητικά επίπεδα (0,6-0,8). Πρέπει να σημειωθεί ότι η μέτρηση γίνεται στα 600 nm που είναι και το ορατό φάσμα. Η ένδειξη της OD στα ιδανικά επίπεδα μαρτυρά ότι τα κύτταρα βρίσκονται στην εκθετική φάση. Στην φάση αυτή τα κύτταρα διαιρούνται συνεχώς και επομένως είναι ιδεώδη για την μελέτη ενζύμων η άλλων κυτταρικών συστατικών. Μετά από 2 ώρες λοιπόν που μετρήθηκε η OD , ήταν 0,6 , οπότε σε κάθε φλάσκα προστέθηκε επαγωγέας IPTG (1 ml) και οι φλάσκες ξαναμπήκαν στο shaker για 4 ώρες.

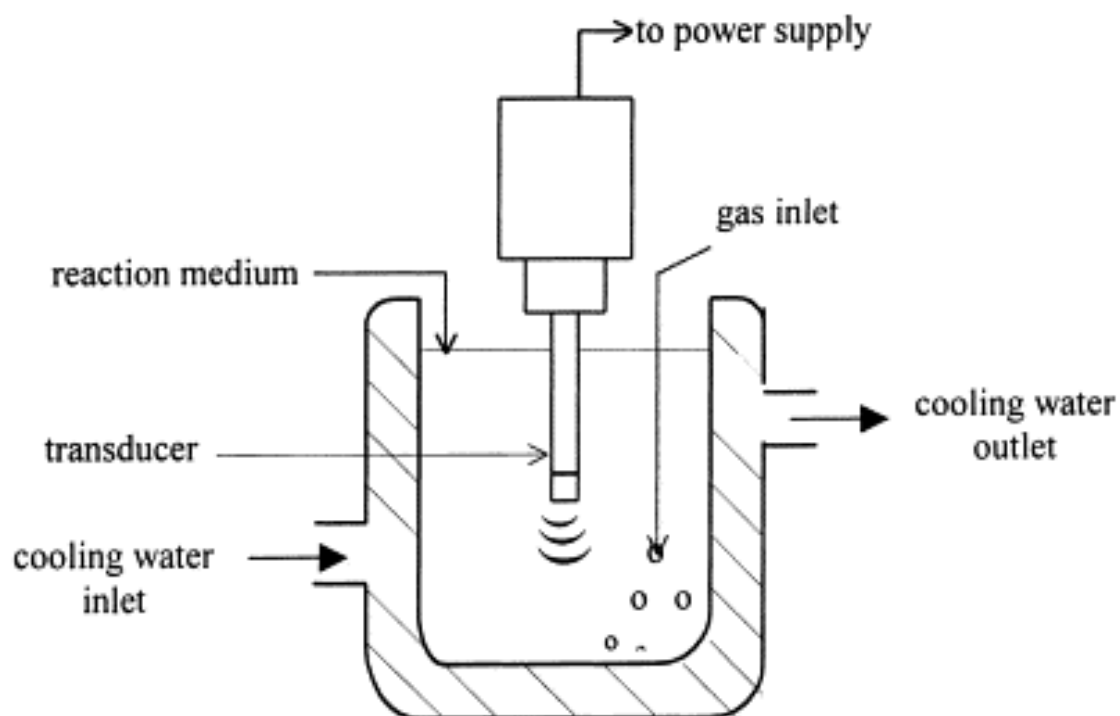
2.2 Απομόνωση κυττάρων

Προκειμένου να πάρουμε τα κύτταρα που έχουν πολλαπλασιαστεί , κάθε φλάσκα χωρίστηκε σε 3 πελέτες οι οποίες φυγοκεντρήθηκαν στις 5,5 rpm για 25 min. Το ίζημα που πάρθηκε περιείχε τα κύτταρα που μέσα τους είχαν πλέον εκφράσει την μεταλλαγμένη πρωτεΐνη , έπειτα εισήχθη στους -20°C γιατί αν τα παίρναμε αμέσως μετά την φυγοκέντρωση

πιθανόν να πάθαιναν μηχανικές βλάβες. Ύστερα από ένα μικρό χρονικό διάστημα τα κύτταρα της κάθε φλάσκας υπό την μορφή ιζήματος άρτηκαν και εισήχθησαν σε lysis buffer για να ομογενοποιηθούν. Η ομογενοποίηση γίνεται στο cold room και συνοδεύεται από ήπια ανάδευση.

2.3 Διάρρηξη βακτηριακών κυττάρων

Η τεχνική που προβλέπει τη χρήση υπερήχων για τη διάρρηξη κυττάρων εφαρμόζεται συνήθως στο εργαστήριο. Η απαιτούμενη ενέργεια παρέχεται από ηχητικά ωστικά κύματα συχνότητας περίπου 20kHz, ελευθερώνεται δε στο κυτταρικό εναιώρημα από το άκρο λεπτού μεταλλικού ραβδίου (sonicator tip ή horn) το οποίο αποτελεί τον δονητή υπερήχων. Οι γρήγορες δονήσεις του ραβδίου δημιουργούν τοπικά υποπίεση, η οποία οδηγεί στο σχηματισμό μικροφουσαλίδων στο κυτταρικό εναιώρημα. Με την αποκατάσταση της πίεσης, οι φυσαλίδες σπάνε και προκαλούν δυνάμεις ωστικού κύματος που μπορούν να διασπάσουν τα κύτταρα. Δυστυχώς η διάμετρος του ραβδίου είναι ανάλογη με το εύρος μεταφοράς της ενέργειας, αλλά αντιστρόφως ανάλογη με την ποσότητα της ενέργειας.



Εικόνα 2.2

Αυτό πρακτικά έχει ως αποτέλεσμα ότι ο χρόνος της διεργασίας διαρρήξεως με υπερήχους να είναι αντιστρόφως ανάλογος προς τον όγκο του εναιωρήματος και έτσι περιορίζεται ο όγκος του υλικού που μπορεί να επεξεργαστεί κάποιος σε σύντομο χρόνο. Άλλο ένα αρνητικό είναι ότι οι δονήσεις του ραβδίου απελευθερώνουν και σημαντική ποσότητα θερμότητας, η οποία μπορεί να καταστρέψει τα ένζυμα. Άρα η ψύξη του βιολογικού υλικού και η περιοδική διακοπή της διάρρηξης είναι απαραίτητες. Επίσης σχηματίζονται και ελεύθερες ρίζες οι οποίες μπορούν να οδηγήσουν σε αδρανοποίηση του ενζύμου, και για αυτό πρέπει να προστίθενται αντιοξειδωτικοί παράγοντες.

Η τεχνική αυτή είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική σε εργαστηριακή κλίμακα, και δοθέντος ικανού χρόνου, είναι δυνατόν να διαλυτοποιήσει πλήρως τα κύτταρα. Αυτό θα οδηγήσει στην απελευθέρωση όχι μόνο του ενζύμου-στόχου, αλλά και πρωτεϊνών του κυτταρικού τοιχώματος καθώς και πρωτεϊνών της μεμβράνης και του κυτταροπλάσματος.

Τα παραπάνω χαρακτηριστικά καθιστούν αυτήν την τεχνική μη εφαρμόσιμη σε βιομηχανική κλίμακα.

Αφού λοιπόν τα κύτταρα είχαν ομογενοποιηθεί προστέθηκε benzamidine και PMSF (αναστολείς πρωτεασών 0,5 ml από τον καθένα). Η τεχνική που περιγράφηκε έγινε για 16 min και 30 sec. σπασίματος ακολουθούταν από 30 sec διαστήματος αναμονής. Επιπλέον το βιολογικό υλικό που προορίζονταν για σπάσιμο βρισκόνταν μέσα σε πάγο για να μην χάσει την λειτουργικότητα της η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει, από την παραγόμενη θερμότητα.

2.4 Παρασκευή διαλυμάτων για τον καθαρισμό της πρωτεΐνης

Τα διαλύματα που παρασκευάστηκαν για να εισαχθούν στην κολώνα στο στάδιο της απομόνωσης της πρωτεΐνης ήταν :

ΔΙΑΛΥΜΑ	ml	[imidazole]
Lysis buffer	250	5mM
Wash 1	200	10mM
Wash 2	100	20mM
Wash 3	50	100mM
Elution 1,2	2x10ml	100mM
Elution 3	10x10ml	300mM

*Σημειώνεται ότι το stock imidazole είναι 2M

Οπότε αυτό που διαφοροποιεί τα διαλύματα μεταξύ τους είναι η αυξανόμενη συγκέντρωση ιμιδαζολίου ο ρόλος του οποίου θα γίνει κατανοητός στην επόμενη παράγραφο. Κατά τα άλλα τα παραπάνω διαλύματα περιέχουν Tris, NaCl , β-μερκαπτοαιθανόλη σε ίσες συγκεντρώσεις.

2.5 Απομόνωση Rop GP

Μετά την διαδικασία της διάρρηξης το διαρρηγμένο πλέον βιολογικό υλικό εισήχθηκε, αφού μοιράστηκε σε 2 μέρη, για φυγοκέντρηση. Αυτό γίνεται προκειμένου να καθαριστεί το βιολογικό δείγμα από τα κυτταρικά θραύσματα, καθώς αυτά είναι μεγάλου μοριακού βάρους και καθιζάνουν. Ύστερα από αυτήν την διαδικασία συλλέχθηκαν τα υπερκείμενα τα οποία αποτελούν και το βιολογικό μέσο που θα εισαχθεί στην κολώνα για καθαρισμό. Ωστόσο 20 μl από τα υπερκείμενα απομονώθηκαν σε ένα ependorf έτσι ώστε όταν τρέξουμε τα προϊόντα της κολώνας σε gel να

δούμε το πλήθος των πρωτεϊνών που υπήρχαν πριν τον καθαρισμό κάτι που θα μας βοηθήσει στην σύγκριση των δειγμάτων.

Η μέθοδος που ακολουθήθηκε για την παραλαβή της Rop προϋποθέτει προσθήκη στην υγρή φάση ιμιδαζολίου, που συναγωνίζεται τα αμινοξικά κατάλοιπα His που μετέχουν στο σύμπλοκο ενζύμου-μεταλλοκατιόντος, ελευθερώνοντας το ένζυμο. Η εν λόγω τεχνική βρίσκει εφαρμογή στον καθαρισμό γενετικά τροποποιημένων ενζύμων και γενικότερα πρωτεϊνών, που φέρουν στο άκρο της πεπτιδικής τους αλυσίδας μία ειδική μικρή αμινοξική αλληλουχία που ονομάζεται απόληξη ή ουρά αναγνωρίσεως (tag ή tail) και είναι το ολιγοαμινοξύ His₆ ή polyHis.

Μετά την έκλυση του ενζύμου-His₆ από τη στήλη και τον καθαρισμό του, η απόληξη αναγνωρίσεως His₆ είναι δυνατόν να αποκοπεί από το ενζυμικό μόριο χρησιμοποιώντας είτε χημικούς παράγοντες (πχ. κυανοβρωμίδιο CNBr το οποίο λύει πεπτιδικούς δεσμούς που μετέχει Met) είτε πρωτεολυτικά ένζυμα (πχ εντεροκινάση) που λύουν πεπτιδικούς δεσμούς εκλεκτικά στους οποίους συμμετέχουν συγκεκριμένα αμινοξικά κατάλοιπα.

Αρχικά λοιπόν στην κολώνα εισάγεται το δείγμα που περιέχει την υπό μελέτη πρωτεΐνη, ενώ ότι πέφτει από την κολώνα συλλέγεται. Για παράδειγμα όταν βάλουμε το βιολογικό δείγμα πήραμε το flowthrough, έπειτα προσθέσαμε το wash 1 και πήραμε το προϊόν που ονομάσθηκε Wash 1 GP το επόμενο ήταν το Wash 2 GP και με τον ίδιο τρόπο συνεχίστηκε η συλλογή των προϊόντων της κολώνας.

2.6 Ηλεκτροφόρηση σε gel ακρυλαμίδης

Κατόπιν συλλογής των προϊόντων από την διαδικασία καθαρισμού της πρωτεΐνης ακολουθήθηκε ηλεκτροφόρηση σε gel ακρυλαμίδης προκειμένου να δούμε σε ποιο από αυτά τα προϊόντα βρίσκονταν η πρωτεΐνη σε μεγαλύτερη ποσότητα και στην καθαρότερη μορφή της. Έτσι συνολικά εισήχθησαν στο gel 19 δείγματα :

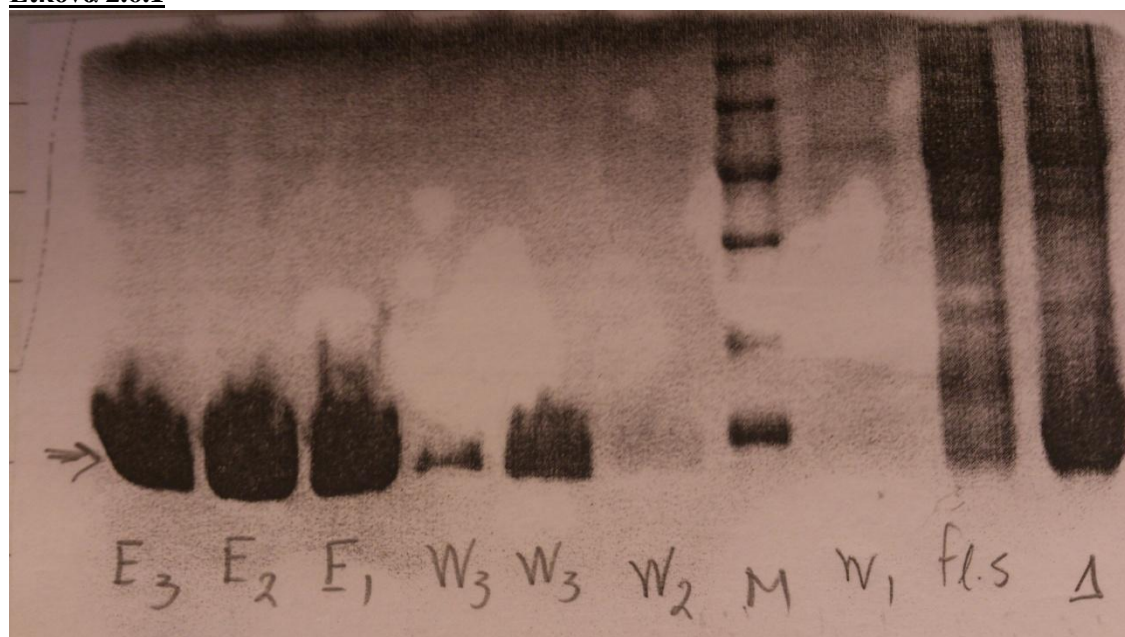
1. wash 1 GP
2. wash 2 GP
3. wash 3 GP
4. elution 1 GP
5. elution 2 GP
6. elution 3 GP

7. elution 4 GP
8. elution 5 GP
9. elution 6 GP
10. elution 7 GP
11. elution 8 GP
12. elution 9 GP
13. elution 10 GP
14. elution 11 GP
15. elution 12 GP
16. Flowthrough –προϊόν από την συλλογή των υπερκειμένων
(βιολογικού δείγματος)
17. SDS marker για το 1 gel (M)
18. SDS marker για το 2 gel (M)
19. δείγμα 20μl που κρατήθηκε από την συλλογή των υπερκειμένων του
βιολογικού δείγματος μετά την διάρρηξη (Δ).

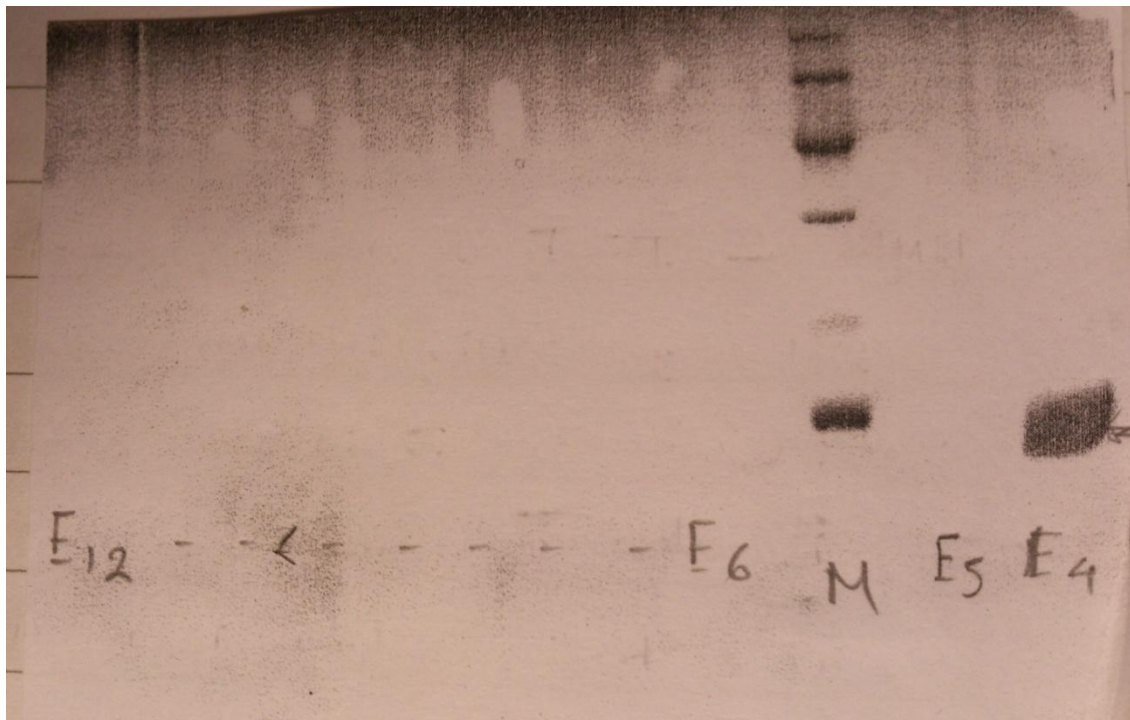
Σε αυτό το σημείο σημειώνεται ότι το μονομερές της Rop GP έχει μοριακό βάρος 8 kD. Στο gel θα παρατηρήσουμε το μονομερές της πρωτεΐνης γιατί το gel περιέχει SDS το οποίο σπα τους δισουλφιδικούς και β – μερκαπτοαιθανόλη που είναι ένα αποδιατακτικό μέσο.

Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης φαίνονται στο παρακάτω σχήμα :

Εικόνα 2.6.1



Εικόνα 2.6.2



Όπως φαίνεται από τις εικόνες 2.6.1 και 2.6.2 την καθαρότερη μορφή πρωτεΐνης έχουμε στα elutions 1-4 GP κάτι το οποίο οφείλεται στην αυξημένη συγκέντρωση ιμιδαζολίου. Ωστόσο και στο wash 3 είχαμε ικανοποιητική ποσότητα Rop GP.

2.7 Dialysis

Συνήθως είναι απαραίτητη η αλλαγή του διαλύματος μέσα στο οποίο βρίσκεται η πρωτεΐνη για την μεταβίβαση στο επόμενο στάδιο καθαρισμού. Αυτό επιτυγχάνεται με dialysis του βιολογικού υγρού της που περιέχει την πρωτεΐνη σε υγρό μεγαλύτερου όγκου που περιέχει τα επιθυμητά συστατικά. Συγκεκριμένα τα elution 1-4 που από την ηλεκτροφόρηση φαίνεται ότι περιέχουν την καθαρότερη πρωτεΐνη εισήχθησαν σε ημιπερατή μεμβράνη και έπειτα η μεμβράνη αυτή μπήκε σε 2L διαλύματος που αποτελούνταν από Tris , NaCl , β -

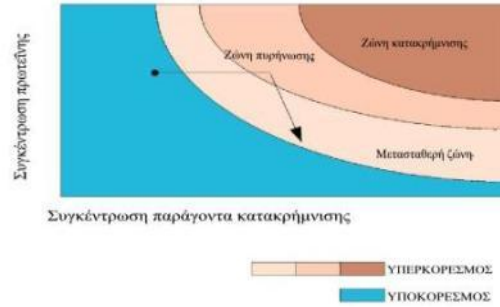
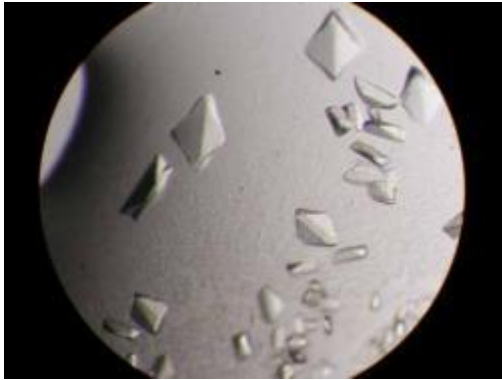
μερκαπτοαιθανόλη με τελικές συγκεντρώσεις 25mM , 100mM, 15mM αντίστοιχα. Σημειώνεται ότι το pH του Tris ήταν 8.

2.8 Συμπύκνωση του πρωτεϊνικού διαλύματος

Πλέον τα συστατικά του διαλύματος στο οποίο βρίσκεται η πρωτεΐνη έχουν αλλάξει και απαραίτητη πριν την διαδικασία της κρυστάλλωσης είναι η συμπύκνωση του πρωτεϊνικού διαλύματος σε επιθυμητές συγκεντρώσεις που θα αυξήσουν την πιθανότητα της πρωτεΐνης να κρυσταλλωθεί .Για την πραγματοποίηση αυτής της μεθόδου απαραίτητη είναι η χρήση falcon με φίλτρο (amicon ultra).Εκεί εισάγεται το διάλυμα της πρωτεΐνης και κατόπιν φυγοκεντρούμε στις 3000 rpm για 15 min στους 5⁰C.Όταν η συγκέντρωση έφτασε τα 11 mg/ml η διαδικασία της συμπύκνωσης σταμάτησε.

2.9 Κρυσταλλώσεις

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την κρυστάλλωση της Rop GP είναι η μέθοδος της κρεμαστής σταγόνας .Εκεί το διάλυμα που περιέχει το βιομόριο συγκρατείται με δυνάμεις συνάφειας με το καπάκι του κλειστού συστήματος. Σε αυτό το διάλυμα περιέχονται και οι απαιτούμενοι παράγοντες κρυστάλλωσης. Στο κάτω μέρος του συστήματος βρίσκεται το μεγαλύτερο , σε όγκο, διάλυμα της δεξαμενής που περιέχει τους παράγοντες κρυστάλλωσης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Αποτέλεσμα της εξισορρόπησης της τάσης ατμών είναι η μείωση του όγκου της σταγόνας έτσι ώστε η πρωτεΐνη να φτάσει βαθμιαία στην κατάσταση του υπερκορεσμού.



Εικόνες 2.9.1 , 2.9.2

Η κρυστάλλωση ωστόσο επιτυγχάνεται αρκετά δύσκολα και η ανάπτυξη κρυστάλλων γίνεται αργά. Ο σχηματισμός κρυστάλλων εξαρτάται από μια σειρά διαφορετικών παραμέτρων , όπως το pH , η θερμοκρασία , η πρωτεϊνική συγκέντρωση , η φύση του διαλύτη και του κατακρυσμιτιστή , ιόντων ή πρωτεϊνικών προσδεμάτων .Γι αυτό τον λόγο απαιτούνται πολλά πειράματα κρυσταλλώσεων προκειμένου να βρεθούν οι λίγοι εκείνοι συνδυασμοί που θα οδηγήσουν στον σχηματισμό κρυστάλλων κατάλληλων για πειράματα περίθλασης ακτίνων x.Έτσι με το πέρας του πρώτου καθαρισμού της υπό μελέτης πρωτεΐνης δημιουργήθηκαν 672 διαφορετικές συνθήκες.

Χρονολογικά η διαδικασία των πειραμάτων είχε ως:

1ος καθαρισμός

- 7/3: JBS classic 6
- 8/3: Structure screen 1 (1-48)
JBS classic 9
- 9/3: JBS classic 7
JBS classic 3
- 12/3: JBS classic 10
JBS classic 8
- 13/3: Structure screen 2 (1-48)
- 15/3: Macrosol (1-48)
- 16/3: Κρυστάλλωση 1
- 19/3: MebFac (1-48)

Natrix (1-48)

22/3: Nextal(1-96)

23/3: Κρυστάλλωση 2

27/3: Κρυστάλλωση 3

29/3: Κρυστάλλωση 4

Κρυστάλλωση 5

30/3: Κρυστάλλωση 6

03/4: Κρυστάλλωση 7

05/4: Κρυστάλλωση 8

09/4: Κρυστάλλωση 9

Ακολουθούν αναλυτικοί πίνακες με το τι περιέχει κάθε ένα από τα παραπάνω αντιδραστήρια:

Κρυστάλλωση JBS classic 6:

Number	Precipitant 1	Precipitant 2	Buffer	pH	Additive
A 1	500 mM Ammonium Sulfate	1.0 M Lithium Sulfate	None		100 mM Sodium Citrate
A 2	1.0 M Ammonium Sulfate	None	None		None
A 3	1.0 M Ammonium Sulfate	None	100 mM Sodium Acetate	4.6	None
A 4	1.0 M Ammonium Sulfate	2 % w/v PEG 400	100 mM HEPES Sodium Salt	7.5	None
A 5	1.0 M Ammonium Sulfate	None	100 mM Tris-HCl	8.5	None
A 6	1.2 M Ammonium Sulfate	3 % w/v 2-Propanol	None		50 mM Sodium Citrate
B 1	1.5 M Ammonium Sulfate	15 % w/v Glycerol	100 mM Tris-HCl	8.5	None
B 2	1.6 M Ammonium Sulfate	500 mM Lithium Chloride	None		None
B 3	1.6 M Ammonium Sulfate	1.0 M Lithium Sulfate	None		None
B 4	1.6 M Ammonium Sulfate	None	100 mM HEPES Sodium Salt	7.5	200 mM Sodium Chloride
B 5	1.6 M Ammonium Sulfate	2 % w/v PEG 1000	100 mM HEPES Sodium Salt	7.5	None
B 6	1.8 M Ammonium Sulfate	None	100 mM MES Sodium Salt	6.5	None
C 1	2.0 M Ammonium Sulfate	2.0 M Sodium Chloride	None		None
C 2	2.0 M Ammonium Sulfate	None	100 mM Sodium Acetate	4.6	None
C 3	2.0 M Ammonium Sulfate	5 % w/v PEG 400	100 mM MES Sodium Salt	6.5	None
C 4	2.0 M Ammonium Sulfate	None	100 mM Tris-HCl	8.5	None
C 5	2.2 M Ammonium Sulfate	None	None		None
C 6	2.2 M Ammonium Sulfate	20 % w/v Glycerol	None		None
D 1	2.4 M Ammonium Sulfate	None	None		100 mM Sodium Citrate
D 2	3.0 M Ammonium Sulfate	1 % w/v MPD	None		None
D 3	3.0 M Ammonium Sulfate	10 % w/v Glycerol	None		None
D 4	3.5 M Ammonium Sulfate	None	100 mM HEPES Sodium Salt	7.5	None
D 5	3.5 M Ammonium Sulfate	1 % w/v MPD	100 mM MES Sodium Salt	6.5	None
D 6	3.5 M Ammonium Sulfate	None	None		None

Κρυστάλλωση structure screen 1(1-48):

Tube #	Salt	Buffer	pH	Precipitant
1	0.02 M Calcium chloride dihydrate	0.1M Sodium acetate trihydrate	4.6	30% v/v 2-Methyl-2,4-pentenediol
2	0.2M Ammonium acetate	0.1M Sodium acetate trihydrate	4.6	30% w/v PEG 4000
3	0.2M Ammonium sulfate	0.1M Sodium acetate trihydrate	4.6	25% w/v PEG 4000
4	None	0.1M Sodium acetate trihydrate	4.6	2.0M Sodium formate
5	None	0.1M Sodium acetate trihydrate	4.6	2.0M Ammonium sulfate
6	None	0.1M Sodium acetate trihydrate	4.6	8% w/v PEG 4000
7	0.2M Ammonium acetate	0.1M tri-Sodium citrate dihydrate	5.6	30% w/v PEG 4000
8	0.2M Ammonium acetate	0.1M tri-Sodium citrate dihydrate	5.6	30% v/v 2-Methyl-2,4-pentenediol
9	None	0.1M tri-Sodium citrate dihydrate	5.6	20% v/v 2-Propanol, 20%w/v PEG 4000
10	None	0.1M tri-Sodium citrate dihydrate	5.6	1.0M Ammonium dihydrogen phosphate
11	0.2M Calcium chloride dihydrate	0.1M Sodium acetate trihydrate	4.6	20% v/v 2-Propanol
12	None	0.1M Sodium cacodylate	6.5	1.4M Sodium acetate trihydrate
13	0.2M tri-Sodium citrate dihydrate	0.1M Sodium cacodylate	6.5	30% v/v 2-Propanol
14	0.2M Ammonium sulfate	0.1M Sodium cacodylate	6.5	30% w/v PEG 8000
15	0.2M Magnesium acetate tetrahydrate	0.1M Sodium cacodylate	6.5	20% w/v PEG 8000
16	0.2M Magnesium acetate tetrahydrate	0.1M Sodium cacodylate	6.5	30% v/v 2-Methyl-2,4-pentenediol
17	None	0.1M Imidazole	6.5	1.0M Sodium acetate trihydrate
18	0.2M Sodium acetate trihydrate	0.1M Sodium cacodylate	6.5	30% w/v PEG 8000
19	0.2M Zinc acetate dihydrate	0.1M Sodium cacodylate	6.5	18% w/v PEG 8000
20	0.2M Calcium acetate hydrate	0.1M Sodium cacodylate	6.5	18% w/v PEG 8000
21	0.2M tri-Sodium citrate dihydrate	0.1M Na HEPES	7.5	30% v/v 2-Methyl-2,4-pentenediol
22	0.2M Magnesium chloride hexahydrate	0.1M Na HEPES	7.5	30% v/ v 2-Propanol
23	0.2M Calcium chloride dihydrate	0.1M Na HEPES	7.5	28% v/v PEG 400
24	0.2M Magnesium chloride hexahydrate	0.1M Na HEPES	7.5	30% v/v PEG 400
25	0.2M tri-Sodium citrate dihydrate	0.1M Na HEPES	7.5	20% v/v 2-Propanol
26	None	0.1M Na HEPES	7.5	0.8M K/Na tartrate tetrahydrate
27	None	0.1M Na HEPES	7.5	1.5M Lithium sulfate monohydrate
28	None	0.1M Na HEPES	7.5	0.8M Sodium dihydrogen phosphate 0.8M v. dihydrogen phosphate monohydrate
29	None	0.1M Na HEPES	7.5	1.4M tri-Sodium citrate dihydrate
30	None	0.1M Na HEPES	7.5	2% v/v PEG 400, 2.0M Ammonium sulfate
31	None	0.1M Na HEPES	7.5	10% v/v 2-Propanol, 20% w/v PEG 4000
32	None	0.1M Tris HCl	8.5	2.0M Ammonium sulfate
33	0.2M Magnesium chloride hexahydrate	0.1M Tris HCl	8.5	30% w/v PEG 4000
34	0.2M tri-Sodium citrate dihydrate	0.1M Tris HCl	8.5	30% v/v PEG 400
35	0.2M Lithium sulfate monohydrate	0.1M Tris HCl	8.5	30% w/v PEG 4000
36	0.2M Ammonium acetate	0.1M Tris HCl	8.5	30% v/v 2-Propanol
37	0.2M Sodium acetate trihydrate	0.1M Tris HCl	8.5	30% w/v PEG 4000
38	None	0.1M Tris HCl	8.5	8% w/v PEG 8000
39	None	0.1M Tris HCl	8.5	2.0M Ammonium dihydrogen phosphate
40	None	None	-	0.4M K/Na Tartrate tetrahydrate
41	None	None	-	0.4M Ammonium dihydrogen phosphate
42	0.2M Ammonium sulfate	None	-	30% w/v PEG 8000
43	0.2M Ammonium sulfate	None	-	30% w/v PEG 4000
44	None	None	-	2.0M Ammonium sulfate
45	None	None	-	4.0M Sodium formate
46	0.05M Potassium dihydrogen phosphate	None	-	20% w/v PEG 8000
47	None	None	-	30% w/v PEG 1500
48	None	None	-	0.2M Magnesium formate
49	1.0M Lithium sulfate monohydrate	None	-	2% w/v PEG 8000
50	0.5M Lithium sulfate monohydrate	None	-	15% w/v PEG 8000

Κρυστάλλωση JBS classic 9:

Number	Precipitant 1	Precipitant 2	Buffer	pH	Additive
A 1	5 % w/v 2-Propanol	None	100 mM HEPES Sodium Salt	7.5	None
A 2	10 % w/v 2-Propanol	None	100 mM Sodium Acetate	4.6	200 mM Calcium Chloride
A 3	10 % w/v 2-Propanol	None	100 mM HEPES Sodium Salt	7.5	200 mM Sodium Citrate
A 4	10 % w/v 2-Propanol	None	100 mM Tris-HCl	8.5	10 mM Magnesium Chloride
A 5	12 % w/v 2-Propanol	None	100 mM Tris-HCl	8.5	50 mM Sodium Chloride
A 6	15 % w/v 2-Propanol	None	100 mM MES Sodium Salt	6.5	200 mM Sodium Citrate
3 1	15 % w/v 2-Propanol	None	100 mM HEPES Sodium Salt	7.5	200 mM Sodium Citrate
3 2	15 % w/v 2-Propanol	None	100 mM HEPES Sodium Salt	7.5	200 mM Magnesium Chloride
3 3	15 % w/v 2-Propanol	None	100 mM Tris-HCl	8.5	200 mM Ammonium Acetate
3 4	20 % w/v 2-Propanol	None	100 mM Sodium Acetate	4.6	200 mM Calcium Chloride
3 5	20 % w/v 2-Propanol	None	100 mM HEPES Sodium Salt	7.5	200 mM Sodium Citrate
3 6	25 % w/v 2-Propanol	None	100 mM HEPES Sodium Salt	7.5	100 mM Magnesium Chloride
3 1	30 % w/v 2-Propanol	None	100 mM MES Sodium Salt	6.5	200 mM Sodium Citrate
3 2	30 % w/v 2-Propanol	None	100 mM HEPES Sodium Salt	7.5	200 mM Magnesium Chloride
3 3	30 % w/v 2-Propanol	None	100 mM Tris-HCl	8.5	200 mM Ammonium Acetate
3 4	25 % w/v tert-Butanol	None	100 mM Tris-HCl	8.5	100 mM Calcium Chloride
3 5	35 % w/v tert-Butanol	None	100 mM Sodium Citrate	5.6	None
3 6	200 mM Ammonium dihydrogen Phosphate	None	None		None
3 1	200 mM Potassium / Sodium Tartrate	None	None		None
3 2	200 mM Magnesium Acetate	None	None		None
3 3	400 mM Ammonium dihydrogen Phosphate	None	None		None
3 4	400 mM Potassium / Sodium Tartrate	None	None		None
3 5	400 mM Potassium / Sodium Tartrate	None	100 mM Tris-HCl	8.5	None
3 6	500 mM Ammonium dihydrogen Phosphate	None	None		200 mM Sodium Citrate

Κρυστάλλωση JBS classic 7:

Each **JBScreen Classic** kit contains 24 unique, sterile filtered reagents, supplied in 10 ml volumes.
Storage: 4 °C.

Number	Precipitant 1	Precipitant 2	Buffer	pH	Additive
A 1	10 % w/v MPD	None	100 mM HEPES Sodium Salt	7.5	100 mM Sodium Citrate
A 2	12 % w/v MPD	None	100 mM Tris-HCl	8.5	50 mM Magnesium Chloride
A 3	15 % w/v MPD	None	100 mM Sodium Acetate	4.6	20 mM Calcium Chloride
A 4	15 % w/v MPD	5 % w/v PEG 4000	100 mM Imlidazole-HCl	8.0	None
A 5	15 % w/v MPD	None	100 mM Sodium Citrate	5.6	200 mM Ammonium Acetate
A 6	15 % w/v MPD	None	100 mM MES Sodium Salt	6.5	200 mM Magnesium Acetate
B 1	15 % w/v MPD	None	100 mM HEPES Sodium Salt	7.5	200 mM Sodium Citrate
B 2	20 % w/v MPD	None	100 mM HEPES Sodium Salt	7.5	100 mM Sodium Citrate
B 3	20 % w/v MPD	None	100 mM Imlidazole-HCl	8.0	None
B 4	20 % w/v MPD	4 % w/v Glycerol	None		200 mM Sodium Chloride
B 5	30 % w/v MPD	None	100 mM Sodium Acetate	4.6	20 mM Calcium Chloride
B 6	30 % w/v MPD	None	100 mM Sodium Citrate	5.6	200 mM Ammonium Acetate
C 1	30 % w/v MPD	None	100 mM MES Sodium Salt	6.5	200 mM Magnesium Acetate
C 2	30 % w/v MPD	None	100 mM HEPES Sodium Salt	7.5	500 mM Ammonium Sulfate
C 3	30 % w/v MPD	None	100 mM HEPES Sodium Salt	7.5	200 mM Sodium Citrate
C 4	30 % w/v MPD	5 % w/v PEG 4000	100 mM HEPES Sodium Salt	7.5	None
C 5	30 % w/v MPD	10 % w/v PEG 4000	100 mM HEPES Sodium Salt	8.0	None
C 6	30 % w/v MPD	20 % w/v Ethanol	100 mM Imlidazole-HCl		None
D 1	35 % w/v MPD	None	None		None
D 2	35 % w/v MPD	None	100 mM Imlidazole-HCl	8.0	None
D 3	40 % w/v MPD	None	100 mM Tris-HCl	8.5	None
D 4	47 % w/v MPD	None	100 mM HEPES Sodium Salt	7.5	None
D 5	47 % w/v MPD	2 % w/v tert-Butanol	None		None
D 6	50 % w/v MPD	None	None		None

Κρυστάλλωση JBS classic 3:

Number	Precipitant 1	Precipitant 2	Buffer	pH	Additive 1	Additive 2
A 1	8 % w/v PEG 4000	800 mM Lithium Chloride	100 mM Tris-HCl	8.5	None	None
A 2	10 % w/v PEG 4000	20 % w/v 2-Propanol	None	5.6	None	None
A 3	10 % w/v PEG 4000	10 % w/v 2-Propanol	100 mM Sodium Citrate	5.6	None	None
A 4	10 % w/v PEG 4000	5 % w/v 2-Propanol	100 mM HEPES Sodium Salt	7.5	None	None
A 5	10 % w/v PEG 4000	20 % w/v 2-Propanol	100 mM HEPES Sodium Salt	7.5	None	None
A 6	12 % w/v PEG 4000	None	100 mM Sodium Acetate	4.6	200 mM Ammonium Sulfate	None
B 1	15 % w/v PEG 4000	None	None	5.6	200 mM Ammonium Sulfate	None
B 2	15 % w/v PEG 4000	None	100 mM Sodium Citrate	5.6	200 mM Ammonium Sulfate	None
B 3	16 % w/v PEG 4000	10 % w/v 2-Propanol	100 mM HEPES Sodium Salt	7.5	200 mM Ammonium Sulfate	None
B 4	20 % w/v PEG 4000	None	None	200 mM Ammonium Sulfate	None	
B 5	20 % w/v PEG 4000	10 % w/v Glycerol	None	200 mM Magnesium Sulfate	None	
B 6	20 % w/v PEG 4000	5 % w/v 2-Propanol	None	100 mM Sodium Citrate	None	
C 1	20 % w/v PEG 4000	20 % w/v 2-Propanol	None	100 mM Sodium Citrate	None	
C 2	20 % w/v PEG 4000	None	100 mM MES Sodium Salt	6.5	600 mM Sodium Chloride	None
C 3	20 % w/v PEG 4000	10 % w/v 2-Propanol	100 mM HEPES Sodium Salt	7.5	None	None
C 4	22 % w/v PEG 4000	None	None	200 mM Ammonium Sulfate	100 mM Sodium Acetate	
C 5	25 % w/v PEG 4000	None	100 mM Sodium Acetate	4.6	200 mM Ammonium Sulfate	None
C 6	25 % w/v PEG 4000	None	100 mM Sodium Citrate	5.6	200 mM Ammonium Sulfate	None
D 1	25 % w/v PEG 4000	200 mM Lithium Sulfate	100 mM HEPES Sodium Salt	7.5	100 mM Sodium Acetate	None
D 2	25 % w/v PEG 4000	8 % w/v 2-Propanol	None	100 mM Sodium Acetate	None	
D 3	30 % w/v PEG 4000	None	None	200 mM Ammonium Sulfate	None	
D 4	30 % w/v PEG 4000	None	100 mM Sodium Acetate	4.6	200 mM Ammonium Sulfate	None
D 5	30 % w/v PEG 4000	None	100 mM Sodium Citrate	5.6	100 mM Ammonium Sulfate	None
D 6	32 % w/v PEG 4000	None	100 mM Tris-HCl	8.5	800 mM Lithium Chloride	None

Κρυστάλλωση JBS classic 10:

Each **JBScreen Classic** kit contains 24 unique, sterile filtered reagents, supplied in 10 ml volumes.
Storage: 4 °C

Number	Precipitant 1	Precipitant 2	Buffer	pH	Additive
A 1	500 mM Sodium Acetate	None	100 mM Imidazole-HCl	8.0	None
A 2	700 mM Sodium Citrate	None	100 mM HEPES Sodium Salt	7.5	None
A 3	700 mM Lithium Sulfate	None	100 mM Tris-HCl	8.5	None
A 4	800 mM Potassium / Sodium Tartrate	None	100 mM HEPES Sodium Salt	7.5	None
A 5	1.0 M Ammonium dihydrogen Phosphate	None	100 mM Sodium Citrate	5.6	None
A 6	1.0 M Ammonium dihydrogen Phosphate	None	100 mM Tris-HCl	8.5	None
B 1	1.0 M Lithium Sulfate	None	100 mM Tris-HCl	8.5	10 mM Nickel (II) Chloride
B 2	1.0 M Sodium Acetate	None	100 mM Imidazole-HCl	8.0	None
B 3	1.0 M Sodium Formate	None	100 mM Sodium Acetate	4.6	None
B 4	1.4 M Sodium Acetate	None	100 mM MES Sodium Salt	6.5	None
B 5	1.4 M Sodium Citrate	None	100 mM HEPES Sodium Salt	7.5	None
B 6	1.5 M Lithium Sulfate	None	100 mM Tris-HCl	8.5	None
C 1	1.5 M Sodium Citrate	None	None	6.5	None
C 2	1.6 M Magnesium Sulfate	None	100 mM MES Sodium Salt	6.5	None
C 3	1.6 M Potassium / Sodium Tartrate	None	100 mM MES Sodium Salt	6.5	None
C 4	2.0 M Ammonium Formate	None	100 mM MES Sodium Salt	6.5	None
C 5	2.0 M Ammonium dihydrogen Phosphate	None	100 mM Tris-HCl	8.5	None
C 6	2.0 M Sodium Formate	None	None		None
D 1	2.0 M Magnesium Chloride	None	100 mM Tris-HCl	8.5	None
D 2	2.0 M Sodium Chloride	None	100 mM MES Sodium Salt	6.5	200 mM Sodium Acetate
D 3	2.0 M Sodium Formate	None	100 mM Sodium Acetate	4.6	None
D 4	1.0 M Ammonium dihydrogen Phosphate	30 % w/v Glycerol	100 mM Tris-HCl	8.5	None
D 5	4.0 M Sodium Chloride	None	100 mM HEPES Sodium Salt	7.5	None
D 6	3.0 M Sodium Formate	None	None		None

Κρυστάλλωση JBS classic 8:

Each **JBScreen Classic** kit contains 24 unique, sterile filtered reagents, supplied in 10 ml volumes.

Storage: 4 °C

Number	Precipitant 1	Precipitant 2	Buffer	pH	Additive 1	Additive 2
A 1	50 % w/v MPD	15 % w/v Ethanol	None		10 mM Sodium Acetate	None
A 2	50 % w/v MPD	20 % w/v 2-Propanol	None		50 mM Sodium Chloride	50 mM Sodium Acetate
A 3	50 % w/v MPD	None	100 mM Tris-HCl	8.5	100 mM Ammonium dihydrogen Phosphate	None
A 4	55 % w/v MPD	None	None		None	None
A 5	60 % w/v MPD	None	100 mM Sodium Acetate	4.6	10 mM Calcium Chloride	None
A 6	60 % w/v MPD	None	None		20 mM Sodium Acetate	None
B 1	70 % w/v MPD	None	100 mM MES Sodium Salt	6.5	None	None
B 2	70 % w/v MPD	None	100 mM Tris-HCl	8.5	None	None
B 3	20 % w/v Methanol	None	100 mM Tris-HCl	8.5	10 mM Calcium Chloride	None
B 4	2 % w/v Ethanol	None	100 mM Tris-HCl	8.5	None	None
B 5	5 % w/v Ethanol	5 % w/v MPD	100 mM HEPES Sodium Salt	7.5	None	None
B 6	5 % w/v Ethanol	5 % w/v MPD	100 mM Tris-HCl	8.5	200 mM Sodium Chloride	None
C 1	10 % w/v Ethanol	None	100 mM Tris-HCl	8.5	None	None
C 2	12 % w/v Ethanol	4 % w/v PEG 400	100 mM Sodium Acetate	4.6	None	None
C 3	14 % w/v Ethanol	5 % w/v Glycerol	100 mM Tris-HCl	8.5	None	None
C 4	18 % w/v Ethanol	None	100 mM Tris-HCl	8.5	None	None
C 5	20 % w/v Ethanol	None	None		None	None
C 6	20 % w/v Ethanol	10 % w/v Glycerol	None		None	None
D 1	30 % w/v Ethanol	10 % w/v PEG 6000	None		100 mM Sodium Acetate	None
D 2	45 % w/v Ethanol	None	None		None	None
D 3	50 % w/v Ethanol	None	None		10 mM Sodium Acetate	None
D 4	60 % w/v Ethanol	1.5 % w/v PEG 6000	None		50 mM Sodium Acetate	None
D 5	60 % w/v Ethanol	None	None		100 mM Sodium Chloride	None
D 6	2 % w/v 2-Propanol	None	100 mM Tris-HCl	8.5	10 mM Magnesium Sulfate	None

Κρυστάλλωση structure screen 2 (1-48):

1. 0.1M Sodium chloride	0.1M Bicine pH 9.0	30% v/v PEG monomethylether 550
2. None	0.1M Bicine pH 9.0	2.0M Magnesium chloride hexahydrate
3. 2% v/v Dioxane	0.1M Bicine pH 9.0	10% w/v PEG 20,000
4. 0.2M Magnesium chloride hexahydrate	0.1M Tris pH 8.5	3.4M 1,6-Hexanediol
5. None	0.1M Tris pH 8.5	25% v/v tert-Butanol
6. 0.01M Nickel chloride hexahydrate	0.1M Tris pH 8.5	1.0M Lithium sulphate
7. 1.5M Ammonium sulphate	0.1M Tris pH 8.5	12% v/v Glycerol
8. 0.2M Ammonium phosphate monobasic	0.1M Tris pH 8.5	50% v/v MPD
9. None	0.1M Tris pH 8.5	20% v/v Ethanol
10. 0.01M Nickel chloride hexahydrate	0.1M Tris pH 8.5	20% w/v PEG monomethylether 2000
11. 0.5M Ammonium sulphate	0.1M HEPES pH 7.5	30% w/v MPD
12. None	0.1M HEPES pH 7.5	10% w/v PEG 6000, 5% v/v MPD
13. None	0.1M HEPES pH 7.5	20% v/v Jeffamine M-600
14. 0.1M Sodium chloride	0.1M HEPES pH 7.5	1.6M Ammonium sulphate
15. None	0.1M HEPES pH 7.5	2.0M Ammonium formate
16. 0.05M Cadmium sulphate octahydrate	0.1M HEPES pH 7.5	1.0M Sodium acetate
17. None	0.1M HEPES pH 7.5	70% v/v MPD
18. None	0.1M HEPES pH 7.5	4.3M Sodium chloride
19. None	0.1M HEPES pH 7.5	10% w/v PEG 8000
		8% v/v Ethylene glycol
20. None	0.1M Mes pH 6.5	1.6M Magnesium sulphate heptahydrate
21. 0.1M Sodium phosphate monobasic	0.1M Mes pH 6.5	2.0M Sodium chloride
0.1M Potassium phosphate monobasic		
22. None	0.1M Mes pH 6.5	12% w/v PEG 20,000
23. 1.6M Ammonium sulphate	0.1M Mes pH 6.5	10% v/v Dioxane
24. 0.05M Cesium chloride	0.1M Mes pH 6.5	30% v/v Jeffamine M-600
25. 0.01M Cobalt chloride hexahydrate	0.1M Mes pH 6.5	1.8M Ammonium sulphate
26. 0.2M Ammonium sulphate	0.1M Mes pH 6.5	30% w/v PEG monomethylether 5000
27. 0.01M Zinc sulphate heptahydrate	0.1M Mes pH 6.5	25% v/v PEG monomethylether 550
28. None	0.1M HEPES pH 7.5	20% w/v PEG 10,000
29. 0.2M Potassium/Na Tartrate	0.1M tri-Sodium citrate dihydrate pH 5.6	2.0M Ammonium sulphate
30. 0.5M Ammonium sulphate	0.1M tri-Sodium citrate dihydrate pH 5.6	1.0M Lithium sulphate
31. 0.6M Sodium chloride	0.1M tri-Sodium citrate dihydrate pH 5.6	4% v/v Polyethylensimine
32. None	0.1M tri-Sodium citrate dihydrate pH 5.6	35% v/v tert-Butanol
33. 0.01M Ferric chloride hexahydrate	0.1M tri-Sodium citrate dihydrate pH 5.6	10% v/v Jeffamine M-600
34. 0.01M Manganese chloride tetrahydrate	0.1M tri-Sodium citrate dihydrate pH 5.6	2.5M 1,6-Hexanediol
35. None	0.1M Sodium acetate trihydrate pH 4.6	2.0M Sodium chloride
36. 0.2M Sodium chloride	0.1M Sodium acetate trihydrate pH 4.6	30% v/v MPD
37. 0.01M Cobalt chloride hexahydrate	0.1M Sodium acetate trihydrate pH 4.6	1.0M 1,6-Hexanediol
38. 0.1M Cadmium chloride	0.1M Sodium acetate trihydrate pH 4.6	30% v/v PEG 400
39. 0.2M Ammonium sulphate	0.1M Sodium acetate trihydrate pH 4.6	30% w/v PEG monomethylether 2000
40. 2.0M Sodium chloride	None	10% w/v PEG 6000
41. 0.01M Cetyl trimethyl ammoniumbromide	None	0.5M Sodium chloride
		0.1M Magnesium chloride hexahydrate
42. None	None	25% v/v Ethylene glycol
43. None	None	35% v/v Dioxane
44. 2.0M Ammonium sulphate	None	5% v/v Isopropanol
45. None	None	1.0M Imidazole pH 7.0
46. None	None	10% w/v PEG 1000, 10% w/v PEG 8000
47. 1.5M Sodium chloride	None	10% v/v Ethanol
48. None	None	1.6M Sodium citrate pH 6.5
49. 15% w/v Polyvinylpyrrolidone		
50. 2.0M Urea		

Κρυστάλλωση Macrosol (1-48):

Tube Set	Reagent 1	Reagent 2	Buffer	Position
1-1	10% v/v MPD	0.02M Calcium chloride	0.1M Sodium acetate pH 4.5	1A
2-1	20% v/v MPD	0.02M Calcium chloride	0.1M Sodium acetate pH 4.5	1B
3-1	30% v/v MPD	-	0.1M Sodium acetate pH 4.5	1C
4-1	30% v/v MPD	0.02M Calcium chloride	0.1M Sodium acetate pH 4.5	1D
5-1	1.0M Sodium acetate	0.1M Sodium dihydrogen phosphate	0.1M Sodium cacodylate pH 6.5	2A
6-1	1.4M Sodium acetate	0.1M Sodium dihydrogen phosphate	0.1M Sodium cacodylate pH 6.5	2B
7-1	1.7M Sodium acetate	0.1M Sodium dihydrogen phosphate	0.1M Sodium cacodylate pH 6.5	2C
8-1	1.7M Sodium acetate	-	0.1M Sodium cacodylate pH 6.5	2D
9-1	8% w/v PEG 3350	0.2M Ammonium acetate	0.1M Sodium acetate pH 4.5	3A
10-1	15% w/v PEG 3350	0.2M Ammonium acetate	0.1M Sodium acetate pH 4.5	3B
11-1	20% w/v PEG 3350	0.2M Ammonium acetate	0.1M Sodium acetate pH 4.5	3C
12-1	30% w/v PEG 3350	0.2M Ammonium acetate	0.1M Sodium acetate pH 4.5	3D
13-1	0.75M Ammonium phosphate	-	0.1M Sodium citrate pH 5.5	4A
14-1	1.0M Ammonium phosphate	-	0.1M Sodium citrate pH 5.5	4B
15-1	1.5M Ammonium phosphate	-	0.1M Sodium citrate pH 5.5	4C
16-1	2.0M Ammonium phosphate	-	0.1M Sodium citrate pH 5.5	4D
17-1	10% v/v Isopropanol	0.2M Magnesium chloride	0.1M Hepes pH 7.5	5A
18-1	15% v/v Isopropanol	0.2M Magnesium chloride	0.1M Hepes pH 7.5	5B
19-1	20% v/v Isopropanol	0.2M Magnesium chloride	0.1M Hepes pH 7.5	5C
20-1	30% v/v Isopropanol	0.2M Magnesium chloride	0.1M Hepes pH 7.5	5D
21-1	16% w/v PEG 3350	0.2M Lithium sulphate	0.1M Tris HCl pH 8.5	6A
22-1	25% w/v PEG 3350	0.2M Lithium sulphate	0.1M Tris HCl pH 8.5	6B
23-1	30% w/v PEG 3350	0.2M Lithium sulphate	0.1M Tris HCl pH 8.5	6C
24-1	25% w/v PEG 3350	0.5M Lithium sulphate	0.1M Tris HCl pH 8.5	6D
1-2	2% w/v PEG 8000	1.0M Lithium sulphate	-	1A
2-2	2% w/v PEG 8000	1.0M Lithium sulphate	0.1M Imidazole malate pH 5.5	1B
3-2	2% w/v PEG 8000	1.0M Lithium sulphate	0.1M Imidazole malate pH 6.5	1C
4-2	2% w/v PEG 8000	1.0M Lithium sulphate	0.1M Imidazole malate pH 7.5	1D
5-2	12% w/v PEG 8000	0.2M Ammonium sulphate	-	2A
6-2	18% w/v PEG 8000	0.2M Ammonium sulphate	-	2B
7-2	24% w/v PEG 8000	0.2M Ammonium sulphate	-	2C
8-2	30% w/v PEG 8000	0.2M Ammonium sulphate	-	2D
9-2	10% w/v PEG 4000	0.5M Ammonium sulphate	-	3A
10-2	20% w/v PEG 4000	0.3M Ammonium sulphate	-	3B
11-2	30% w/v PEG 4000	0.2M Ammonium sulphate	-	3C
12-2	36% w/v PEG 4000	0.2M Ammonium sulphate	-	3D
13-2	1.0M Ammonium sulphate	2% v/v PEG 400	0.1M Hepes pH 7.5	4A
14-2	1.5M Ammonium sulphate	2% v/v PEG 400	0.1M Hepes pH 7.5	4B
15-2	2.0M Ammonium sulphate	2% v/v PEG 400	0.1M Hepes pH 7.5	4C
16-2	2.0M Ammonium sulphate	5% v/v PEG 400	0.1M Hepes pH 7.5	4D
17-2	12% w/v PEG 4000	5% v/v Isopropanol	0.1M Sodium citrate pH 5.5	5A
18-2	16% w/v PEG 4000	10% v/v Isopropanol	0.1M Sodium citrate pH 5.5	5B
19-2	20% w/v PEG 4000	15% v/v Isopropanol	0.1M Sodium citrate pH 5.5	5C
20-2	20% w/v PEG 4000	20% v/v Isopropanol	0.1M Sodium citrate pH 5.5	5D
21-2	9% w/v PEG 8000	0.005M Zinc acetate	0.1M Sodium cacodylate pH 6.5	6A
22-2	12% w/v PEG 8000	0.005M Zinc acetate	0.1M Sodium cacodylate pH 6.5	6B
23-2	18% w/v PEG 8000	0.005M Zinc acetate	0.1M Sodium cacodylate pH 6.5	6C
24-2	24% w/v PEG 8000	0.005M Zinc acetate	0.1M Sodium cacodylate pH 6.5	6D

Κρυστάλλωση Membfac:

Tube #	Salt	Tube #	Buffer ϕ	Tube #	Precipitant
1.	0.1 M Sodium chloride	1.	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6	1.	12% w/v (+)-2-Methyl-2,4-pentanediol
2.	0.1 M Zinc acetate dihydrate	2.	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6	2.	12% w/v Polyethylene glycol 4,000
3.	0.2 M Ammonium sulfate	3.	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6	3.	10% w/v Polyethylene glycol 4,000
4.	0.1 M Sodium chloride	4.	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6	4.	12% w/v 2-Propanol
5.	None	5.	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6	5.	12% w/v Polyethylene glycol 4,000
6.	None	6.	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6	6.	1.0 M Ammonium sulfate
7.	None	7.	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6	7.	1.0 M Magnesium sulfate heptahydrate
8.	0.1 M Magnesium chloride hexahydrate	8.	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6	8.	18% w/v Polyethylene glycol 400
9.	0.1 M Lithium sulfate monohydrate	9.	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6	9.	1.0 M Ammonium phosphate monobasic
10.	0.1 M Sodium chloride	10.	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6	10.	12% w/v Polyethylene glycol 6,000
11.	0.1 M Magnesium chloride hexahydrate	11.	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6	11.	12% w/v Polyethylene glycol 6,000
12.	0.1 M Sodium chloride	12.	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.6	12.	18% w/v Polyethylene glycol 400
13.	0.1 M Lithium sulfate monohydrate	13.	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.6	13.	12% w/v Polyethylene glycol 4,000
14.	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate	14.	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.6	14.	10% w/v 2-Propanol
15.	0.1 M Sodium chloride	15.	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.6	15.	12% w/v (+)-2-Methyl-2,4-pentanediol
16.	None	16.	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.6	16.	1.0 M Magnesium sulfate heptahydrate
17.	0.1 M Sodium chloride	17.	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.6	17.	12% w/v Polyethylene glycol 4,000
18.	0.1 M Lithium sulfate monohydrate	18.	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.6	18.	12% w/v Polyethylene glycol 6,000
19.	0.1 M Magnesium chloride hexahydrate	19.	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.6	19.	4% w/v (+)-2-Methyl-2,4-pentanediol
20.	None	20.	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.6	20.	0.1 M Sodium chloride
21.	0.1 M Lithium sulfate monohydrate	21.	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.6	21.	4% w/v Polyethylene glycol 400
22.	None	22.	0.1 M ADA pH 6.5	22.	1.0 M Ammonium sulfate
23.	0.1 M Lithium sulfate monohydrate	23.	0.1 M ADA pH 6.5	23.	12% w/v Polyethylene glycol 4,000, 2% w/v 2-Propanol
24.	None	24.	0.1 M ADA pH 6.5	24.	1.0 M Ammonium phosphate dibasic
25.	0.1 M Magnesium chloride hexahydrate	25.	0.1 M ADA pH 6.5	25.	12% w/v Polyethylene glycol 6,000
26.	None	26.	0.1 M ADA pH 6.5	26.	12% w/v (+)-2-Methyl-2,4-pentanediol
27.	0.1 M Lithium sulfate monohydrate	27.	0.1 M ADA pH 6.5	27.	1.0 M Magnesium sulfate hydrate
28.	0.3 M Lithium sulfate monohydrate	28.	0.1 M ADA pH 6.5	28.	4% w/v Polyethylene glycol 400
29.	0.1 M Ammonium sulfate	29.	0.1 M HEPES sodium pH 7.5	29.	0.5 M Sodium phosphate dibasic dihydrate, 0.5 M Potassium phosphate dibasic
30.	0.1 M Sodium chloride	30.	0.1 M HEPES sodium pH 7.5	30.	10% w/v Polyethylene glycol 4,000
31.	0.1 M Magnesium chloride hexahydrate	31.	0.1 M HEPES sodium pH 7.5	31.	18% w/v Polyethylene glycol 400
32.	None	32.	0.1 M HEPES sodium pH 7.5	32.	1.0 M Potassium sodium tartrate tetrahydrate
33.	0.1 M Ammonium sulfate	33.	0.1 M HEPES sodium pH 7.5	33.	18% w/v Polyethylene glycol 400
34.	0.1 M Ammonium sulfate	34.	0.1 M HEPES sodium pH 7.5	34.	10% w/v Polyethylene glycol 4,000
35.	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate	35.	0.1 M HEPES sodium pH 7.5	35.	12% w/v (+)-2-Methyl-2,4-pentanediol
36.	None	36.	0.1 M HEPES sodium pH 7.5	36.	1.0 M Sodium citrate tribasic dihydrate
37.	0.6 M Magnesium sulfate hydrate	37.	0.1 M HEPES sodium pH 7.5	37.	4% w/v Polyethylene glycol 400
38.	0.6 M Magnesium sulfate hydrate	38.	0.1 M HEPES sodium pH 7.5	38.	4% w/v (+)-2-Methyl-2,4-pentanediol
39.	0.1 M Lithium sulfate monohydrate	39.	0.1 M HEPES sodium pH 7.5	39.	0.1 M Potassium sodium tartrate tetrahydrate
40.	0.1 M Lithium sulfate monohydrate	40.	0.1 M Tris hydrochloride pH 8.5	40.	12% w/v (+)-2-Methyl-2,4-pentanediol
41.	0.1 M Ammonium phosphate dibasic	41.	0.1 M Tris hydrochloride pH 8.5	41.	0.5 M Sodium phosphate dibasic dihydrate, 0.5 M Potassium phosphate dibasic
42.	None	42.	0.1 M Tris hydrochloride pH 8.5	42.	0.1 M Sodium acetate trihydrate
43.	None	43.	0.1 M Tris hydrochloride pH 8.5	43.	0.1 M Sodium chloride
44.	0.1 M Ammonium phosphate dibasic	44.	0.1 M Tris hydrochloride pH 8.5	44.	12% w/v Polyethylene glycol 6,000
45.	0.1 M Potassium sodium tartrate tetrahydrate	45.	0.1 M Tris hydrochloride pH 8.5	45.	0.4 M Magnesium sulfate hydrate
46.	None	46.	0.1 M Tris hydrochloride pH 8.5	46.	0.2 M Lithium sulfate monohydrate
47.	None	47.	0.1 M Tris hydrochloride pH 8.5	47.	0.5 M Ammonium sulfate
48.	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate	48.	0.1 M Tris hydrochloride pH 8.5	48.	5% w/v Polyethylene glycol 400

ϕ Buffer pH is that of a 1.0 M stock prior to dilution with other reagents components: pH with HCl or NaOH.

Κρυστάλλωση Natrrix (1-48):

Natrrix™ - HR2-116 Scoring Sheet	Date:	Date:	Date:
1. 0.01 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.05 M MES monohydrate pH 5.6, 2.0 M Lithium sulfate monohydrate			
2. 0.01 M Magnesium acetate tetrahydrate, 0.05 M MES monohydrate pH 5.6, 2.5 M Ammonium sulfate			
3. 0.1 M Magnesium acetate tetrahydrate, 0.05 M MES monohydrate pH 5.6, 20% w/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol			
4. 0.2 M Potassium chloride, 0.01 M Magnesium sulfate heptahydrate, 0.05 M MES monohydrate pH 5.6, 10% w/v Polyethylene glycol 400			
5. 0.2 M Potassium chloride, 0.01 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.05 M MES monohydrate pH 5.6, 5% w/v Polyethylene glycol 8,000			
6. 0.1 M Ammonium sulfate, 0.01 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.05 M MES monohydrate pH 5.6, 20% w/v Polyethylene glycol 8,000			
7. 0.02 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.05 M MES monohydrate pH 6.0, 15% w/v 2-Propanol			
8. 0.1 M Ammonium acetate, 0.005 M Magnesium sulfate heptahydrate, 0.05 M MES monohydrate pH 6.0, 0.6 M Sodium chloride			
9. 0.1 M Potassium chloride, 0.01 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.05 M MES monohydrate pH 6.0, 10% w/v Polyethylene glycol 400			
10. 0.005 M Magnesium sulfate heptahydrate, 0.05 M MES monohydrate pH 6.0, 5% w/v Polyethylene glycol 4,000			
11. 0.01 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.05 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.0, 1.0 M Lithium sulfate monohydrate			
12. 0.01 M Magnesium sulfate heptahydrate, 0.05 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.0, 1.8 M Lithium sulfate monohydrate			
13. 0.015 M Magnesium acetate tetrahydrate, 0.05 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.0, 1.7 M Ammonium sulfate			
14. 0.1 M Potassium chloride, 0.025 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.05 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.0, 15% w/v 2-Propanol			
15. 0.04 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.05 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.0, 5% w/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol			
16. 0.04 M Magnesium acetate tetrahydrate, 0.05 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.0, 30% w/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol			
17. 0.2 M Potassium chloride, 0.01 M Calcium chloride dihydrate, 0.05 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.0, 10% w/v Polyethylene glycol 4,000			
18. 0.01 M Magnesium acetate tetrahydrate, 0.05 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5, 1.3 M Lithium sulfate monohydrate			
19. 0.01 M Magnesium sulfate heptahydrate, 0.05 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5, 2.0 M Ammonium sulfate			
20. 0.1 M Ammonium acetate, 0.015 M Magnesium acetate tetrahydrate, 0.05 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5, 10% w/v 2-Propanol			
21. 0.2 M Potassium chloride, 0.005 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.05 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5, 10% w/v 1,6-Hexanediol			
22. 0.08 M Magnesium acetate tetrahydrate, 0.05 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5, 15% w/v Polyethylene glycol 400			
23. 0.2 M Potassium chloride, 0.01 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.05 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5, 10% w/v Polyethylene glycol 4,000			
24. 0.2 M Ammonium acetate, 0.01 M Calcium chloride dihydrate, 0.05 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5, 10% w/v Polyethylene glycol 4,000			
25. 0.08 M Magnesium acetate tetrahydrate, 0.05 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5, 30% w/v Polyethylene glycol 4,000			
26. 0.2 M Potassium chloride, 0.1 M Magnesium acetate tetrahydrate, 0.05 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5, 10% w/v Polyethylene glycol 8,000			
27. 0.2 M Ammonium chloride, 0.01 M Magnesium acetate tetrahydrate, 0.05 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5, 30% w/v Polyethylene glycol 8,000			
28. 0.05 M Magnesium sulfate hydrate, 0.05 M HEPES sodium pH 7.0, 1.6 M Lithium sulfate monohydrate			
29. 0.01 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.05 M HEPES sodium pH 7.0, 4.0 M Lithium chloride			
30. 0.01 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.05 M HEPES sodium pH 7.0, 1.6 M Ammonium sulfate			
31. 0.005 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.05 M HEPES sodium pH 7.0, 25% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 550			
32. 0.2 M Potassium chloride, 0.01 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.05 M HEPES sodium pH 7.0, 20% w/v 1,6-Hexanediol			
33. 0.2 M Ammonium chloride, 0.01 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.05 M HEPES sodium pH 7.0, 30% w/v 1,6-Hexanediol			
34. 0.1 M Potassium chloride, 0.005 M Magnesium sulfate hydrate, 0.05 M HEPES sodium pH 7.0, 15% w/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol			
35. 0.1 M Potassium chloride, 0.01 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.05 M HEPES sodium pH 7.0, 5% w/v Polyethylene glycol 400			
36. 0.1 M Potassium chloride, 0.01 M Calcium chloride dihydrate, 0.05 M HEPES sodium pH 7.0, 10% w/v Polyethylene glycol 400			
37. 0.2 M Potassium chloride, 0.025 M Magnesium sulfate hydrate, 0.05 M HEPES sodium pH 7.0, 20% w/v Polyethylene glycol 200			
38. 0.2 M Ammonium acetate, 0.15 M Magnesium acetate tetrahydrate, 0.05 M HEPES sodium pH 7.0, 5% w/v Polyethylene glycol 4,000			
39. 0.1 M Ammonium acetate, 0.02 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.05 M HEPES sodium pH 7.0, 5% w/v Polyethylene glycol 8,000			
40. 0.01 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.05 M Tris hydrochloride pH 7.5, 1.6 M Ammonium sulfate			
41. 0.1 M Potassium chloride, 0.015 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.05 M Tris hydrochloride pH 7.5, 10% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 550			
42. 0.01 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.05 M Tris hydrochloride pH 7.5, 5% w/v 2-Propanol			
43. 0.05 M Ammonium acetate, 0.01 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.05 M Tris hydrochloride pH 7.5, 10% w/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol			
44. 0.2 M Potassium chloride, 0.05 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.05 M Tris hydrochloride pH 7.5, 10% w/v Polyethylene glycol 4,000			
45. 0.005 M Magnesium sulfate hydrate, 0.05 M Tris hydrochloride pH 8.5, 1.8 M Ammonium sulfate			
46. 0.005 M Magnesium sulfate hydrate, 0.05 M Tris hydrochloride pH 8.5, 35% w/v 1,6-Hexanediol			
47. 0.1 M Potassium chloride, 0.01 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.05 M Tris hydrochloride pH 8.5, 30% w/v Polyethylene glycol 400			
48. 0.2 M Ammonium chloride, 0.01 M Calcium chloride dihydrate, 0.05 M Tris hydrochloride pH 8.5, 30% w/v Polyethylene glycol 4,000			

Κρυστάλλωση Nextal (1-96):

Number	Buffer	Additives	Precipitant	Cat. no
49	0.05 M HEPES pH 7.5	2.5 mM Spermine	80 mM Magnesium chloride	135849
50	0.05 M Sodium cacodylate pH 6.0	2.25 mM Spermine, 18 mM Magnesium chloride, 1 mM Copper sulfate	9 % (v/v) Isopropanol	135850
51	0.05 M Sodium cacodylate pH 6.5	0.9 mM Spermine, 18 mM Magnesium chloride, 1.8 mM Cobalt chloride	9 % (v/v) Isopropanol	135851
52	0.05 M Sodium cacodylate pH 6.5	2.25 mM Spermine, 18 mM Magnesium chloride	9 % (v/v) Isopropanol	135852
53	0.05 M Sodium cacodylate pH 7.0	2.25 mM Spermine, 18 mM Magnesium chloride, 0.9 mM Cobalt chloride	4.5 % (v/v) MPD	135853
54	0.05 M Sodium cacodylate pH 6.5	2.25 mM Spermine, 36 mM Magnesium chloride	5 % (v/v) PEG 400	135854
55	0.05 M Sodium succinate pH 5.5	2.0 mM Cobalt chloride, 10 mM Magnesium chloride	10 % (v/v) Isopropanol	135855
56	0.05 M Sodium cacodylate pH 6.0	1.0 mM Spermine, 20 mM Magnesium chloride	15 % (v/v) Ethanol	135856
57	0.05 M Sodium cacodylate pH 7.0	1.0 mM Spermine, 20 mM Magnesium chloride, 1.0 mM Cobalt chloride	15 % (v/v) Ethanol	135857
58	0.05 M Sodium cacodylate pH 7.0	1.0 mM Spermidine, 5 mM Magnesium chloride	10 % (v/v) tri-Butanol	135858
59	0.05 M Sodium cacodylate pH 7.0	2.5 mM Spermine, 30 mM Magnesium chloride	5 % (v/v) PEG 400	135859
60	0.05 M Sodium cacodylate pH 6.5	2.0 mM Cobalt chloride, 100 mM Magnesium chloride	5 % (v/v) Isopropanol	135860
61	0.05 M TRIS pH 8.0	1.0 mM Cobalt chloride, 10 mM Magnesium chloride	20 % (v/v) Ethanol	135861
62	0.05 M HEPES pH 7.5	1.0 mM Spermine, 20 mM Magnesium chloride	5 % (w/v) PEG 8000	135862
63	0.05 M Sodium cacodylate pH 6.0	2.5 mM Spermine, 20 mM Magnesium chloride	5 % (w/v) PEG 4000	135863
64	0.05 M Sodium cacodylate pH 6.0	2.5 mM Spermine, 10 mM Magnesium chloride, 5 mM Calcium chloride	10 % (v/v) Isopropanol	135864
65	0.05 M Sodium cacodylate pH 7.0	2.25 mM Spermine, 9 mM Magnesium chloride, 1.8 mM Cobalt chloride, 0.9 mM Spermidine	5 % (w/v) PEG 400	135865
66	0.05 M Sodium cacodylate pH 6.5	2.5 mM Spermine, 10 mM Magnesium chloride, 1 mM Copper sulfate	10 % (v/v) Isopropanol	135866
67	0.05 M Sodium cacodylate pH 6.0	1.0 mM Spermine, 20 mM Magnesium chloride, 2 mM Calcium chloride	10 % (v/v) 1,5-Hexanediol	135867
68	0.05 M HEPES pH 7.5	1.0 mM Spermidine, 16 mM Magnesium chloride	10 % (v/v) Dioxane	135868
69	0.05 M Sodium cacodylate pH 6.0	3.0 mM Spermine, 15 mM Magnesium chloride	10 % (v/v) PEG 400	135869
70	0.05 M Sodium cacodylate pH 6.5	18 mM Calcium chloride, 2.5 mM Spermine	9 % (v/v) 2-Propanol	135870
71	0.05 M Sodium cacodylate pH 6.5	1.0 mM Cobalt chloride, 2.0 mM Spermine	80 mM Calcium chloride	135871
72	0.05 M Sodium cacodylate pH 6.5	2.5 mM Cobalt chloride	5 mM Magnesium chloride	135872
73	0.05 M Sodium cacodylate pH 6.5	1.0 mM Spermine, 30 mM Magnesium chloride	1.3 M Lithium sulfate	135873
74	0.05 M Sodium cacodylate pH 6.0	200 mM Calcium acetate	5 % (v/v) Isopropanol	135874
75	0.05 M Sodium cacodylate pH 6.5	1.0 mM Cobalt chloride, 100 mM Magnesium chloride	10 % (v/v) Ethanol	135875
76	0.05 M Sodium cacodylate pH 6.0	2.5 mM Spermidine, 10 mM Magnesium chloride	2.5 M Sodium chloride	135876
77	0.05 M Sodium cacodylate pH 6.5	200 mM Bi-Na citrate, 10 mM Magnesium chloride	5 % (v/v) Isopropanol	135877
78	0.05 M Sodium cacodylate pH 6.5	10.0 mM Spermine, 15 mM Magnesium chloride	2.0 M Lithium sulfate	135878
79	0.05 M Sodium cacodylate pH 6.5	1.0 mM Spermine, 20 mM Magnesium chloride	2.0 M Ammonium sulfate	135879
80	0.05 M Sodium cacodylate pH 6.5	1.5 mM Spermine, 10 mM Magnesium chloride	3.0 M Ammonium sulfate	135880
81	0.05 M HEPES pH 7.5	1.0 mM Spermine, 15 mM Magnesium chloride	1.0 M Ammonium sulfate	135881
82	0.05 M Sodium cacodylate pH 6.0	200 mM Calcium acetate	2.5 M Sodium chloride	135882
83	0.05 M Sodium cacodylate pH 6.0	1.0 mM Cobalt chloride, 200 mM Calcium acetate	2.0 M Lithium chloride	135883
84	0.05 M Sodium cacodylate pH 6.5	5.0 mM Spermidine, 15 mM Magnesium chloride, 1.0 mM Cobalt chloride	2.0 M Sodium chloride	135884
85	0.05 M Sodium cacodylate pH 6.5	100 mM Sodium chloride, 200 mM Magnesium chloride	20 % (w/v) PEG 1000	135885
86	0.05 M TRIS pH 7.5	50 mM Magnesium chloride	1.0 M Sodium tartrate	135886
87	0.05 M TRIS pH 7.5	200 mM Magnesium chloride	2.5 M Sodium chloride	135887
88	0.05 M Sodium cacodylate pH 6.0	200 mM Magnesium chloride	2.5 M Potassium chloride	135888
89	0.05 M TRIS pH 8.0	200 mM Magnesium chloride	15 % (v/v) Ethanol	135889
90	0.05 M Sodium cacodylate pH 6.0	5.0 mM Spermidine, 15 mM Magnesium chloride	2.0 M Lithium sulfate	135890
91	0.05 M Sodium cacodylate pH 6.0	0.5 mM Spermine, 20 mM Magnesium acetate, 100 mM Sodium chloride	25 % (v/v) MPD	135891
92	0.05 M Sodium succinate pH 5.5	0.5 mM Spermine, 20 mM Magnesium chloride	3.0 M Ammonium sulfate	135892
93	0.05 M Sodium cacodylate pH 6.5	5 mM Cobalt chloride	2.5 M Potassium chloride	135893
94	0.05 M Sodium cacodylate pH 6.5	2.0 mM Cobalt chloride, 50 mM Magnesium chloride	1.5 M Lithium sulfate	135894
95	0.05 M Sodium cacodylate pH 6.5	2.0 mM Cobalt chloride, 1.0 mM Spermine, 30 mM Calcium chloride	2.0 M Lithium chloride	135895
96	0.05 M Sodium cacodylate pH 6.5	50 mM Spermine	10 mM Magnesium chloride	135896

Αρχικά παρατηρήθηκαν κρυσταλλικές βελόνες (ακτίνες) παρουσία αιθανόλης στο reservoir και γι αυτό φτιάχτηκε η **κρυστάλλωση 1** που περιείχε:

15% EtoH pH = 4	18% EtoH pH = 5	20% EtoH pH = 6	25% EtoH pH=7	30% EtoH pH = 8	35% EtoH pH = 9
15% EtoH pH = 4	15% EtoH pH = 5	15% EtoH pH = 6	15% EtoH pH=7	15% EtoH pH = 8	15% EtoH pH = 9
20% EtoH PH = 4	20% EtoH pH = 5	20% EtoH pH = 6	20% EtoH pH=7	20% EtoH pH = 8	20% EtoH pH = 9
25% EtoH pH = 4	25% EtoH pH = 5	25% EtoH pH = 6	25% EtoH pH=7	25% EtoH pH = 8	25% EtoH pH = 9

Για την δημιουργία του κατάλληλου pH η τελική συγκέντρωση του κάθε buffer ήταν 0,1 M.

-Επειδή παλαιότερα μεταλλάγματα της πρωτεΐνης Rop έχουν κρυσταλλώσει σε συγκεκριμένες συνθήκες πραγματοποιήθηκε το εξής πείραμα (**κρυστάλλωση 2**)

20% 2propanol pH=6	20% 2propanol pH=6,6	20% 2propanol pH=7	20% 2propanol pH=7,6	20% 2propanol pH=8	20% 2propanol pH=8,5
25% 2propanol pH=6	25% 2propanol pH=6,6	25% 2propanol pH=7	25% 2propanol pH=7,6	25% 2propanol pH=8	25% 2propanol pH=8,5
30% 2propanol pH=6	30% 2propanol pH=6,6	30% 2propanol pH=7	30% 2propanol pH=7,6	30% 2propanol pH=8	30% 2propanol pH=8,5
35% 2propanol pH=6	35% 2propanol pH=6,6	35% 2propanol pH=7	35% 2propanol pH=7,6	35% 2propanol pH=8	35% 2propanol pH=8,5

Για την δημιουργία του κατάλληλου pH η τελική συγκέντρωση του κάθε buffer ήταν 0,1 M. Ενώ σε όλα τα παραπάνω πηγάδια προστέθηκε 0,1 ml MgCl₂.

Στις 26/3 ελέγχθηκαν για πρώτη φορά όλες οι προηγούμενες κρυσταλλώσεις και παρατηρήθηκε ότι:

-Στο πηγάδι A3 του JBS classic 6 υπήρχαν μεγάλες κρυσταλλικές βελόνες , αυτό το πηγάδι περιείχε 1M ammonium sulfate και pH= 4,6

-Στο πηγάδι B5 του JBS classis 6 υπήρχαν λίγες λεπτές κρυσταλλικές βελόνες. Το πηγάδι αυτό περιείχε 1,6M Ammonium sulfate σε pH = 7,5

-Στο πηγάδι B6 του JBS classic 6 υπήρχαν λεπτές κρυσταλλικές βελόνες .Το πηγάδι αυτό περιείχε 1,8M ammonium sulfate σε pH=6,5

-Στο πηγάδι D2 με αριθμό 44 στο Structure screen 1 το οποίο περιείχε 2M ammonium sulfate παρατηρήθηκαν λεπτές κρυσταλλικές βελόνες.

Οπότε αποφασίστηκε να γίνουν οι κρυσταλλώσεις 3,4,5,6 οι οποίες θα ήταν :

Κρυστάλλωση 3:

Amm.sulf. 1M	Amm.sulf. 1,2M	Amm.sulf. 1,4M	Amm.sulf. 1,6M	Amm.sulf. 1,8M	Amm.sulf. 2M
Amm.sulf. 1M pH=4	Amm.sulf. 1,2M pH=4	Amm.sulf. 1,4M pH=4	Amm.sulf. 1,6M pH=4	Amm.sulf. 1,8M pH=4	Amm.sulf. 2M pH=4
Amm.sulf. 1M pH=4,6	Amm.sulf. 1,2M pH=4,6	Amm.sulf. 1,4M pH=4,6	Amm.sulf. 1,6M pH=4,6	Amm.sulf. 1,8M pH=4,6	Amm.sulf. 2M pH=4,6
Amm.sulf. 1M pH=5	Amm.sulf. 1,2M pH=5	Amm.sulf. 1,4M pH=5	Amm.sulf. 1,6M pH=5	Amm.sulf. 1,8M pH=5	Amm.sulf. 2M pH=5

Κρυστάλλωση 4:

Amm.sulf. 1M pH=5,5	Amm.sulf. 1,2M pH=5,5	Amm.sulf. 1,4M pH=5,5	Amm.sulf. 1,6M pH=5,5	Amm.sulf. 1,8M pH=5,5	Amm.sulf. 2M pH=5,5
Amm.sulf. 1M pH=6	Amm.sulf. 1,2M pH=6	Amm.sulf. 1,4M pH=6	Amm.sulf. 1,6M pH=6	Amm.sulf. 1,8M pH=6	Amm.sulf. 2M pH=6
Amm.sulf. 1M pH=6,5	Amm.sulf. 1,2M pH=6,5	Amm.sulf. 1,4M pH=6,5	Amm.sulf. 1,6M pH=6,5	Amm.sulf. 1,8M pH=6,5	Amm.sulf. 2M pH=6,5
Amm.sulf. 1M pH=7	Amm.sulf. 1,2M pH=7	Amm.sulf. 1,4M pH=7	Amm.sulf. 1,6M pH=7	Amm.sulf. 1,8M pH=7	Amm.sulf. 2M pH=7

Κρυστάλλωση 5:

Amm.sulf. 1M pH=7,6	Amm.sulf. 1,2M pH=7,6	Amm.sulf. 1,4M pH=7,6	Amm.sulf. 1,6M pH=7,6	Amm.sulf. 1,8M pH=7,6	Amm.sulf. 2M pH=7,6
Amm.sulf. 1M pH=8	Amm.sulf. 1,2M pH=8	Amm.sulf. 1,4M pH=8	Amm.sulf. 1,6M pH=8	Amm.sulf. 1,8M pH=8	Amm.sulf. 2M pH=8
Amm.sulf. 1M pH=8,5	Amm.sulf. 1,2M pH=8,5	Amm.sulf. 1,4M pH=8,5	Amm.sulf. 1,6M pH=8,5	Amm.sulf. 1,8M pH=8,5	Amm.sulf. 2M pH=8,5
Amm.sulf. 1M pH=9,2	Amm.sulf. 1,2M pH=9,2	Amm.sulf. 1,4M pH=9,2	Amm.sulf. 1,6M pH=9,2	Amm.sulf. 1,8M pH=9,2	Amm.sulf. 2M pH=9,2

Κρυστάλλωση 6:

Amm.sulf. 0,6M pH=4	Amm.sulf. 0,6M pH=5	Amm.sulf. 0,6M pH=6	Amm.sulf. 0,6 pH=7	Amm.sulf. 0,6M pH=8	Amm.sulf. 0,6M pH=9
Amm.sulf. 0,8M pH=4	Amm.sulf. 0,8M pH=5	Amm.sulf. 0,8M pH=6	Amm.sulf. 0,8M pH=7	Amm.sulf. 0,8M pH=8	Amm.sulf. 0,8M pH=9
Amm.sulf. 2,2M pH=4	Amm.sulf. 2,2M pH=5	Amm.sulf. 2,2M pH=6	Amm.sulf. 2,2M pH=7	Amm.sulf. 2,2M pH=8	Amm.sulf. 2,2M pH=9
Amm.sulf. 2,4M pH=4	Amm.sulf. 2,4M pH=5	Amm.sulf. 2,4M pH=6	Amm.sulf. 2,4M pH=7	Amm.sulf. 2,4M pH=8	Amm.sulf. 2,4M pH=9

Έτσι παρότι η πρωτεΐνη έδειχνε μια τάση να δημιουργήσει κρυστάλλους παρουσία θεικού αμμωνίου στο reservoir , ο συνεχής έλεγχος των παραπάνω κρυσταλλώσεων δεν επιβεβαίωσε την παραπάνω θέση. Μόνο στο πηγάδι C1 της τρίτης κρυστάλλωσης παρατηρήθηκαν πολύ λεπτές κρυσταλλικές βελόνες.

Έτσι αποφασίστηκε ότι :

1.θα πρέπει να ξανακαθαριστεί πρωτεΐνη καθώς η υπάρχουσα μπορεί να είχε υποστεί αλλοιώσεις αφού πέρασε αρκετός χρόνος από τον καθαρισμό της.

2.Οτι σε μερικές από τις επόμενες κρυσταλλώσεις στην καλυπτρίδα θα εισαχθούν 2λ πρωτεΐνης και 1λ από το reservoir.

3.Οτι την επόμενη φορά που θα καθαριστεί πρωτεΐνη θα συγκεντρωθεί στα 24 mg/ml.

2ος καθαρισμός

Έτσι τα βήματα 2.1-2.8 επαναλήφθηκαν η Rop GP καθαρίστηκε αλλά αυτή την φορά μόνο τα Elution1-4 μπήκαν για dialysis όπως υπέδειξε το πείραμα της ηλεκτροφόρησης .Η πρωτεΐνη συγκεντρώθηκε στα 24mg/ml συνολικά απομονώθηκαν 2ml πρωτεΐνης. Οι κρυσταλλώσεις συνεχίστηκαν και δημιουργήθηκε:

Κρυστάλλωση 10:

0,7 M ammonium sulf. pH=4	0,8 M ammonium sulf. pH=4	0,9 M ammonium sulf. pH=4 A3	1 M ammonium sulf. pH=4	1,1 M ammonium sulf. pH=4	1,2 M ammonium sulf. pH=4
0,7 M ammonium sulf. pH=4,2	0,8 M ammonium sulf. pH=4,2	0,9 M ammonium sulf. pH=4,2	1 M ammonium sulf. pH=4,2	1,1 M ammonium sulf. pH=4,2	1,2 M ammonium sulf. pH=4,2
0,7 M ammonium sulf. pH=4,6	0,8 M ammonium sulf. pH=4,6	0,9 M ammonium sulf. pH=4,6	1 M ammonium sulf. pH=4,6	1,1 M ammonium sulf. pH=4,6	1,2 M ammonium sulf. pH=4,6 C6
0,7 M ammonium sulf. pH=4,9	0,8 M ammonium sulf. pH=4,9	0,9 M ammonium sulf. pH=4,9	1 M ammonium sulf. pH=4,9	1,1 M ammonium sulf. pH=4,9	1,2 M ammonium sulf. pH=4,9

Μετά από 1 περίπου εβδομάδα ελέγχθηκε η κρυστάλλωση 10 και μόνο στα πηγάδια A3 και C6 υπήρχαν ενδείξεις ότι η πρωτεΐνη είναι δυνατόν να δημιουργήσει κρυσταλλικές δομές οπότε πραγματοποιήθηκε η κρυστάλλωση 11.

Κρυστάλλωση 11 :

0,9 M ammonium sulf. pH=4 A3	0,9 M ammonium sulf. pH=4 A3	0,9 M ammonium sulf. pH=4 A3	0,9 M ammonium sulf. pH=4 A3	0,9 M ammonium sulf. pH=4 A3
1,2 M ammonium sulf. pH=4,6 C6	1,2 M ammonium sulf. pH=4,6 C6	1,2 M ammonium sulf. pH=4,6 C6	1,2 M ammonium sulf. pH=4,6 C6	1,2 M ammonium sulf. pH=4,6 C6

Καθώς και :

Κρυστάλλωση 12 :

0,3M A,S pH=4	0,4M A,S pH=4	0,5M A,S pH=4	0,6M A,S pH=4	0,7M A,S pH=4	JBS 6 A3
0,3M A,S pH=4,2	0,4M A,S pH=4,2	0,5M A,S pH=4,2	0,6M A,S pH=4,2	0,7M A,S pH=4,2	JBS 10 C5
0,3M A,S pH=4	0,4M A,S pH=4	0,5M A,S pH=4	0,6M A,S pH=4	0,7M A,S pH=4	JBS 6 A3
0,3M A,S pH=4,2	0,4M A,S pH=4,2	0,5M A,S pH=4,2	0,6 M A,S pH=4,2	0,7M A,S pH=4,2	JBS 10 C5

Η μαύρη διαγράμμιση των κελιών αντιπροσωπεύει τα πηγάδια , η καλυπτρίδα των οποίων περιείχε 2λ πρωτεΐνης και 1 λ από το reservoir. Στα μπλε πηγάδια δοκιμάστηκαν συνθήκες παλαιότερων πειραμάτων στα οποία είχαν παρατηρηθεί κρυσταλλικές δομές.

3ος καθαρισμός

Πρωτεΐνη καθαρίστηκε για τρίτη φορά και συγκεντρώθηκε στα 16mg/ml. Έπειτα ακολουθήθηκαν οι παρακάτω κρυστάλλωσεις:

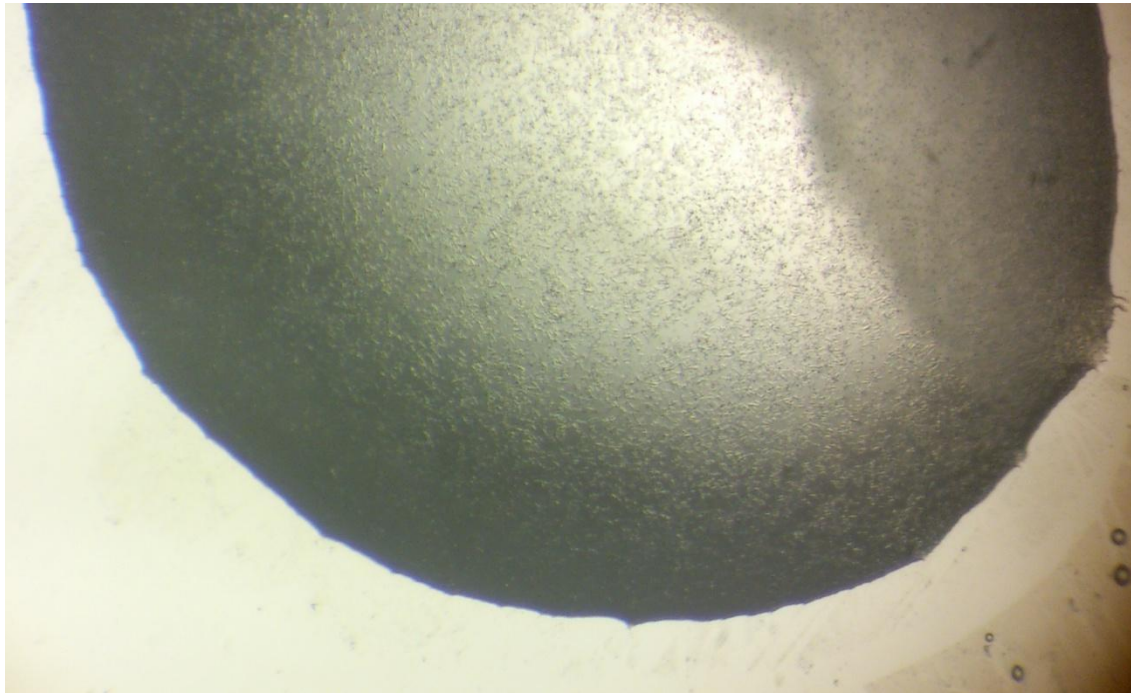
Κρυστάλλωση 10(είχε επαναληφθεί και σε προηγούμενους καθαρισμούς , επαναλαμβάνεται και τώρα 2 φορές)

0,7 M ammonium sulf. pH=4	0,8 M ammonium sulf. pH=4	0,9 M ammonium sulf. pH=4	1 M ammonium sulf. pH=4	1,1 M ammonium sulf. pH=4	1,2 M ammonium sulf. pH=4
0,7 M ammonium sulf. pH=4,2 B1	0,8 M ammonium sulf. pH=4,2 B2	0,9 M ammonium sulf. pH=4,2	1 M ammonium sulf. pH=4,2	1,1 M ammonium sulf. pH=4,2	1,2 M ammonium sulf. pH=4,2
0,7 M ammonium sulf. pH=4,6	0,8 M ammonium sulf. pH=4,6	0,9 M ammonium sulf. pH=4,6	1 M ammonium sulf. pH=4,6	1,1 M ammonium sulf. pH=4,6	1,2 M ammonium sulf. pH=4,6
0,7 M ammonium sulf. pH=4,9	0,8 M ammonium sulf. pH=4,9	0,9 M ammonium sulf. pH=4,9	1 M ammonium sulf. pH=4,9	1,1 M ammonium sulf. pH=4,9	1,2 M ammonium sulf. pH=4,9

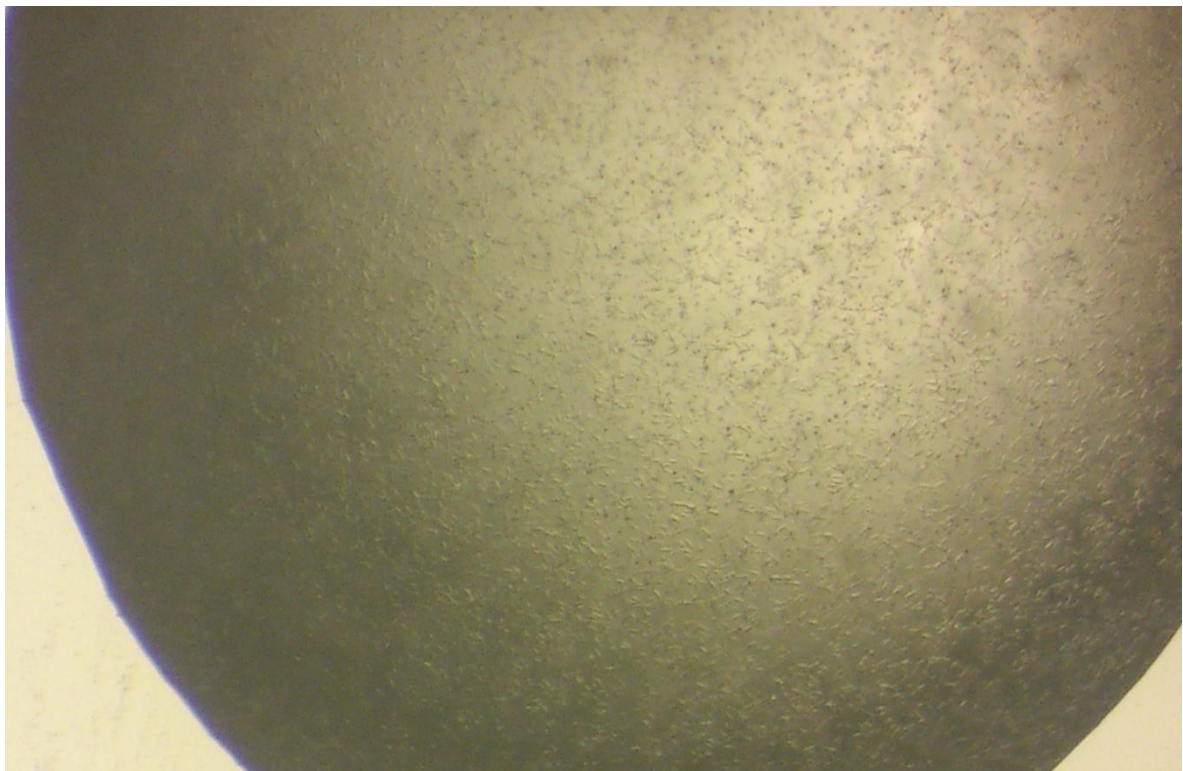
Buffer Acetate , Cτελ.=0,1M

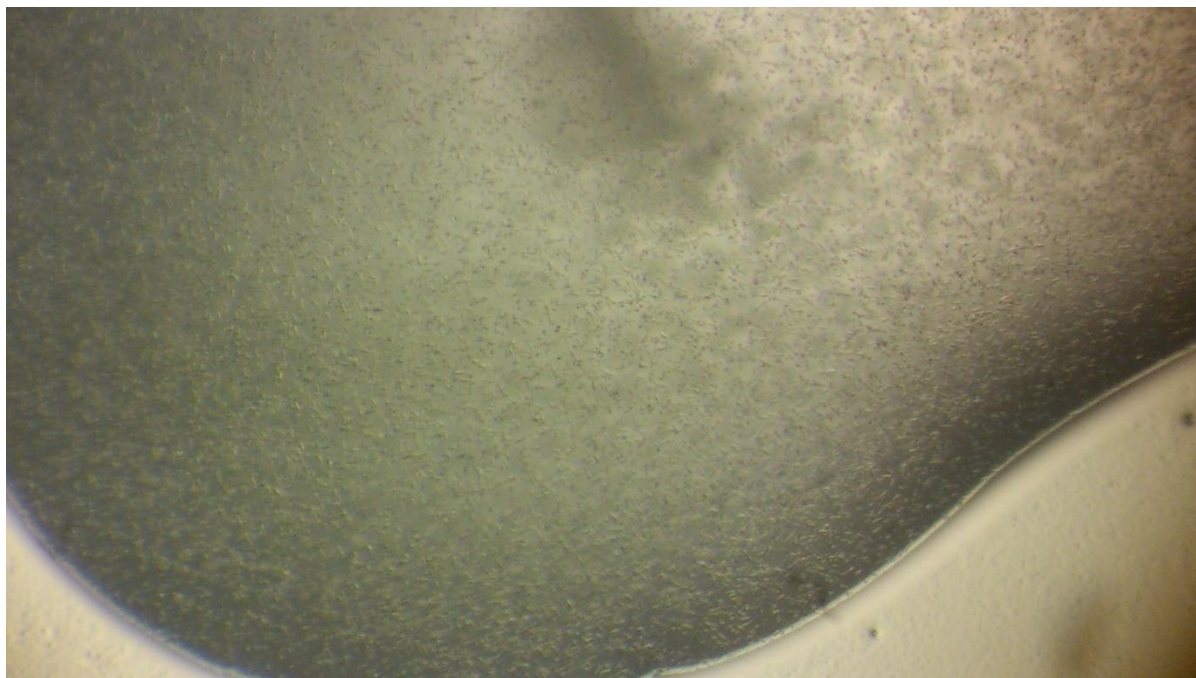
Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στα πηγάδια B1 και B2, και τις δύο φορές που επαναλήφθηκε η κρυστάλλωση, εμφανίζονταν πολλές μικρές κρυσταλλικές βελόνες , όπως δείχνουν και οι εικόνες :

πηγάδι B1 κρυστάλλωσης 10



πηγάδι B1 κρυστάλλωσης 10 –επαναληψη





πηγάδι B2 κρυστάλλωσης 10

Όταν όμως τα πηγάδια B1 και B2 της κρυστάλλωσης 10 επαναλήφθηκαν από 6 φορές έκαστο στην κρυστάλλωση 13 δεν παρατηρήθηκαν τα επιθυμητά αποτελέσματα

Κρυστάλλωση 13

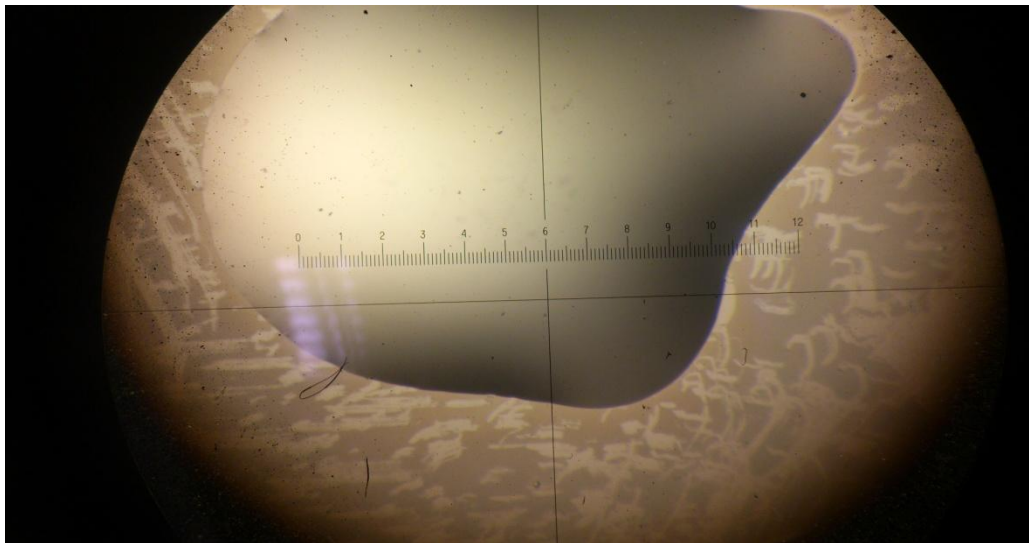
B1 0,7 M ammonium sulf. pH=4,2	B1 0,7 M ammonium sulf. pH=4,2	B1 0,7 M ammonium sulf. pH=4,2	B1 0,7 M ammonium sulf. pH=4,2	B1 0,7 M ammonium sulf. pH=4,2	B1 0,7 M ammonium sulf. pH=4,2
B2 0,8 M ammonium sulf. pH=4,2	B2 0,8 M ammonium sulf. pH=4,2	B2 0,8 M ammonium sulf. pH=4,2	B2 0,8 M ammonium sulf. pH=4,2	B2 0,8 M ammonium sulf. pH=4,2	B2 0,8 M ammonium sulf. pH=4,2
B1 0,7 M ammonium sulf. pH=4,2 *	B1 0,7 M ammonium sulf. pH=4,2 *	B1 0,7 M ammonium sulf. pH=4,2 *	B1 0,7 M ammonium sulf. pH=4,2 *	B1 0,7 M ammonium sulf. pH=4,2 *	B1 0,7 M ammonium sulf. pH=4,2 *
B2 0,8 M ammonium sulf. pH=4,2 *	B2 0,8 M ammonium sulf. pH=4,2 *	B2 0,8 M ammonium sulf. pH=4,2 *	B2 0,8 M ammonium sulf. pH=4,2 *	B2 0,8 M ammonium sulf. pH=4,2 *	B2 0,8 M ammonium sulf. pH=4,2 *

Buffer Acetate , Cτελ.=0,1M

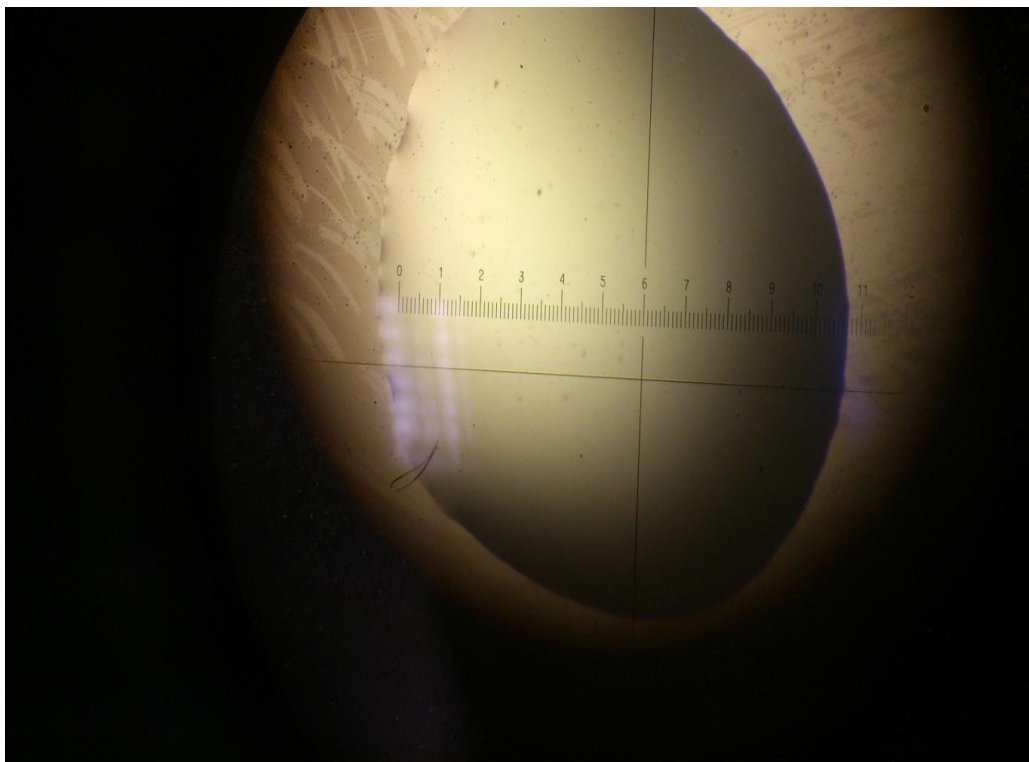
*Στα πηγάδια με τον αστερίσκο για την δημιουργία της σταγόνας χρησιμοποιήθηκαν 2λ πρωτεΐνης και 1λ από το reservoir.

Ωστόσο σε κανένα από τα πηγάδια της παραπάνω κρυστάλλωσης δεν είχαμε δημιουργία κρυσταλλικών δομών. Ενδεικτικά παρουσιάζονται τα πηγάδια A3 και B5 που αντικατοπτρίζουν την γενική εικόνα:

πηγάδι **A3**



πηγάδι **B5**



Οι κρυστάλλωσεις συνεχίστηκαν και δημιουργήθηκε η κρυστάλλωση 14 , 15 , 16. Ακλουθούν αναλυτικοί πίνακες :

Κρυστάλλωση 14:

0,7 M ammonium sulf. pH=4	0,8 M ammonium sulf. pH=4	0,9 M ammonium sulf. pH=4	1 M ammonium sulf. pH=4	1,1 M ammonium sulf. pH=4	1,2 M ammonium sulf. pH=4
0,7 M ammonium sulf. pH=4,6	0,8 M ammonium sulf. pH=4,6	0,9 M ammonium sulf. pH=4,6	1 M ammonium sulf. pH=4,6	1,1 M ammonium sulf. pH=4,6	1,2 M ammonium sulf. pH=4,6
0,7 M ammonium sulf. pH=5,2	0,8 M ammonium sulf. pH=5,2	0,9 M ammonium sulf. pH=5,2	1 M ammonium sulf. pH=5,2	1,1 M ammonium sulf. pH=5,2	1,2 M ammonium sulf. pH=5,2
0,7 M ammonium sulf. pH=5,8	0,8 M ammonium sulf. pH=5,8	0,9 M ammonium sulf. pH=5,8	1 M ammonium sulf. pH=5,8	1,1 M ammonium sulf. pH=5,8	1,2 M ammonium sulf. pH=5,8

Buffer Acetate , Cτελ.=0,1M

Κρυστάλλωση 15:

0,4 M ammonium sulf. pH=3,8	0,6 M ammonium sulf. pH=4	0,8 M ammonium sulf. pH=4,2	1M ammonium sulf. pH=4,5	1,2M ammonium sulf. pH=5	1,6M ammonium sulf. pH=5,5
0,4 M ammonium sulf. pH=3,8	0,6 M ammonium sulf. pH=4	0,8 M ammonium sulf. pH=4,2	1M ammonium sulf. pH=4,5	1,2M ammonium sulf. pH=5	1,6M ammonium sulf. pH=5,5
0,4 M ammonium sulf. pH=3,8	0,6 M ammonium sulf. pH=4	0,8 M ammonium sulf. pH=4,2	1M ammonium sulf. pH=4,5	1,2M ammonium sulf. pH=5	1,6M ammonium sulf. pH=5,5
0,4 M ammonium sulf. pH=3,8	0,6 M ammonium sulf. pH=4	0,8 M ammonium sulf. pH=4,2	1M ammonium sulf. pH=4,5	1,2M ammonium sulf. pH=5	1,6M ammonium sulf. pH=5,5

Buffer Citrate 0,5M , Cτελ=0,1M

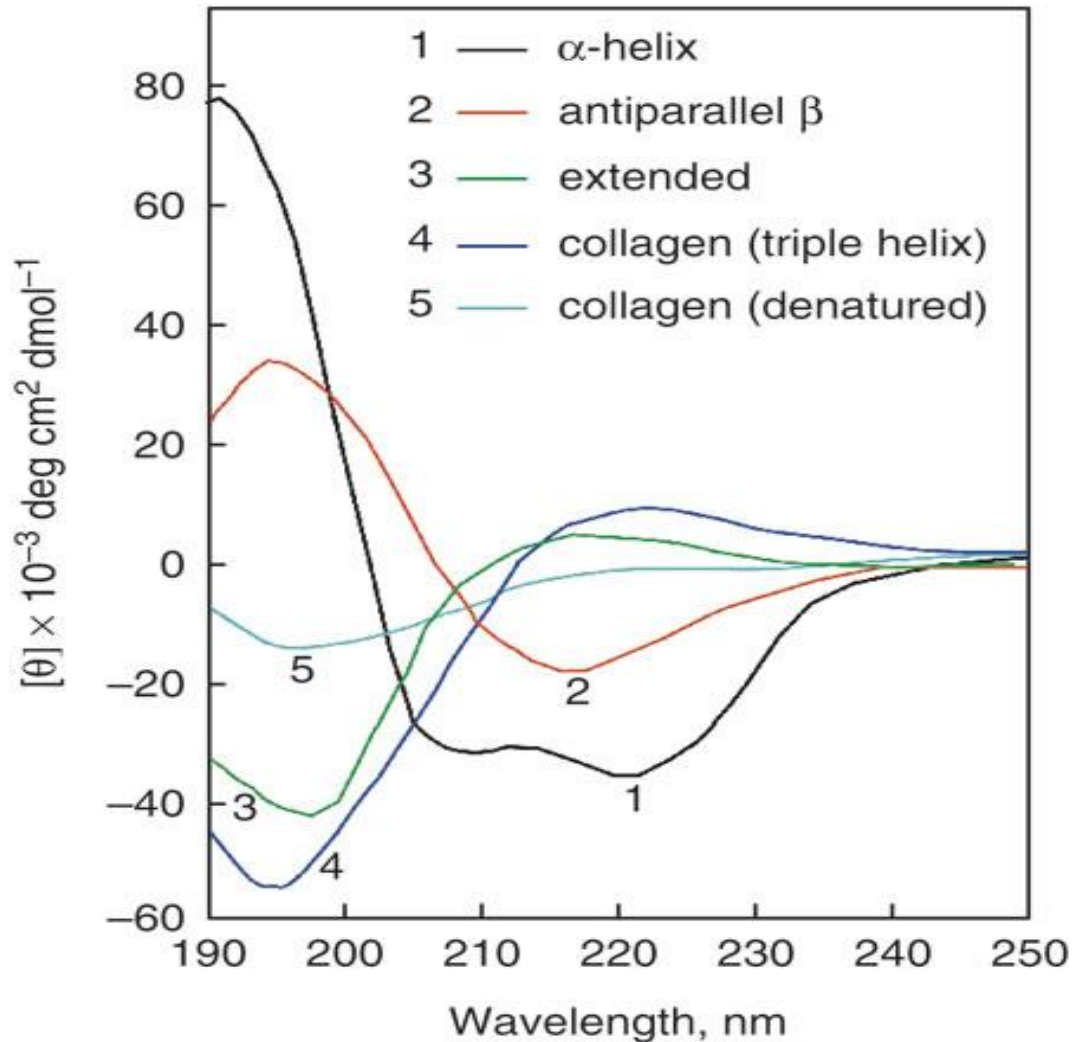
Κρυστάλλωση 16:

0,6 M ammonium sulf. pH=3,8	0,65 M ammonium sulf. pH=3,8	0,7 M ammonium sulf. pH=3,8	0,75 M ammonium sulf. pH=3,8	0,8 M ammonium sulf. pH=3,8	0,85 M ammonium sulf. pH=3,8
0,6 M ammonium sulf. pH=4	0,65 M ammonium sulf. pH=4	0,7 M ammonium sulf. pH=4	0,75 M ammonium sulf. pH=4	0,8 M ammonium sulf. pH=4	0,85 M ammonium sulf. pH=4
0,6 M ammonium sulf. pH=4,2	0,65 M ammonium sulf. pH=4,2	0,7 M ammonium sulf. pH=4,2	0,75 M ammonium sulf. pH=4,2	0,8 M ammonium sulf. pH=4,2	0,85 M ammonium sulf. pH=4,2
0,6 M ammonium sulf. pH=4,4	0,65 M ammonium sulf. pH=4,4	0,7 M ammonium sulf. pH=4,4	0,75 M ammonium sulf. pH=4,4	0,8 M ammonium sulf. pH=4,4	0,85 M ammonium sulf. pH=4,4

Buffer Acetate 0,5M , Cτελ=0,1M

Σε καμία από τις κρυσταλλώσεις 14 , 15 , 16 δεν παρατηρήθηκαν κρυσταλλικές δομές.

2.10 Πειράματα κυκλικού διχρωϊσμού



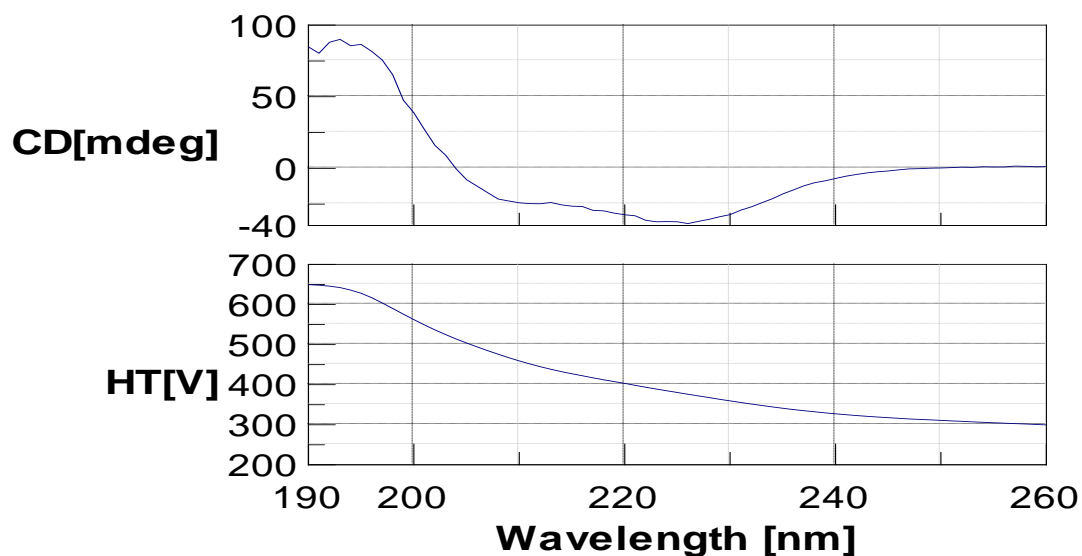
Εικόνα 2.10.1:

CD spectra of poly-L-lysine in the (1) α -helical (black) and (2) antiparallel β -sheet (red) conformations at pH 11.1, and (3) extended conformation at pH 5.7 (green), and placental collagen in its (4) native triple-helical (blue) and (5) denatured (cyan) forms. Note that the extended conformation of poly-L-lysine was originally described as a "random coil", but its spectrum is similar to the conformation of poly-L-proline II, which forms an extended left-handed helix.

Το παραπάνω σχήμα (εικόνα 2.10.1) απεικονίζει το αποτέλεσμα πειράματος κυκλικού διχρωϊσμού μερικών πολυπεπτιδίων και πρωτεϊνών με χαρακτηριστικές δευτεροταγής δομές.

Κάτω (εικόνα 2.10.2) παρατίθεται και το αποτέλεσμα του πειράματος κυκλικού διχρωϊσμού της πρωτεΐνης Rop GP όπως προέκυψε κατά τον πρώτο καθαρισμό.

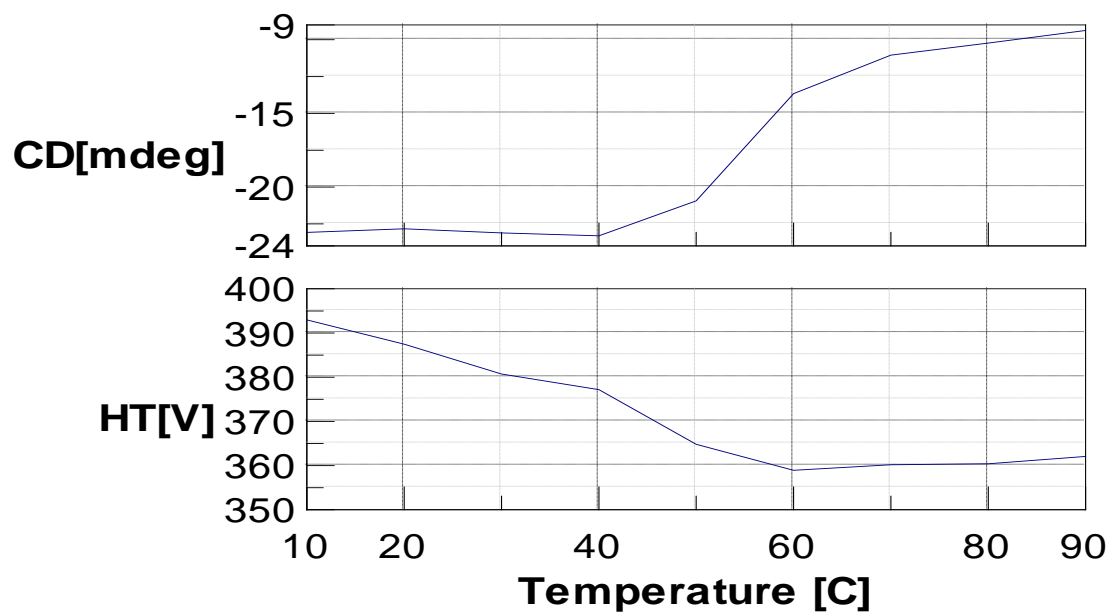
Εικόνα 2.10.2



Γίνεται επομένως εύκολα αντιληπτό ότι η δευτεροταγής δομή που υιοθετεί η πρωτεΐνη είναι αυτή της α -έλικας .

Από το ίδιο πείραμα είναι δυνατόν να αντλήσουμε πληροφορίες για το σημείο εκείνο στο οποίο η πρωτεΐνη αποδιατάσσεται. Το σημείο αυτό ($T=50$, $CD= -20$) φαίνεται στο παρακάτω σχήμα (εικόνα 2.10.3).

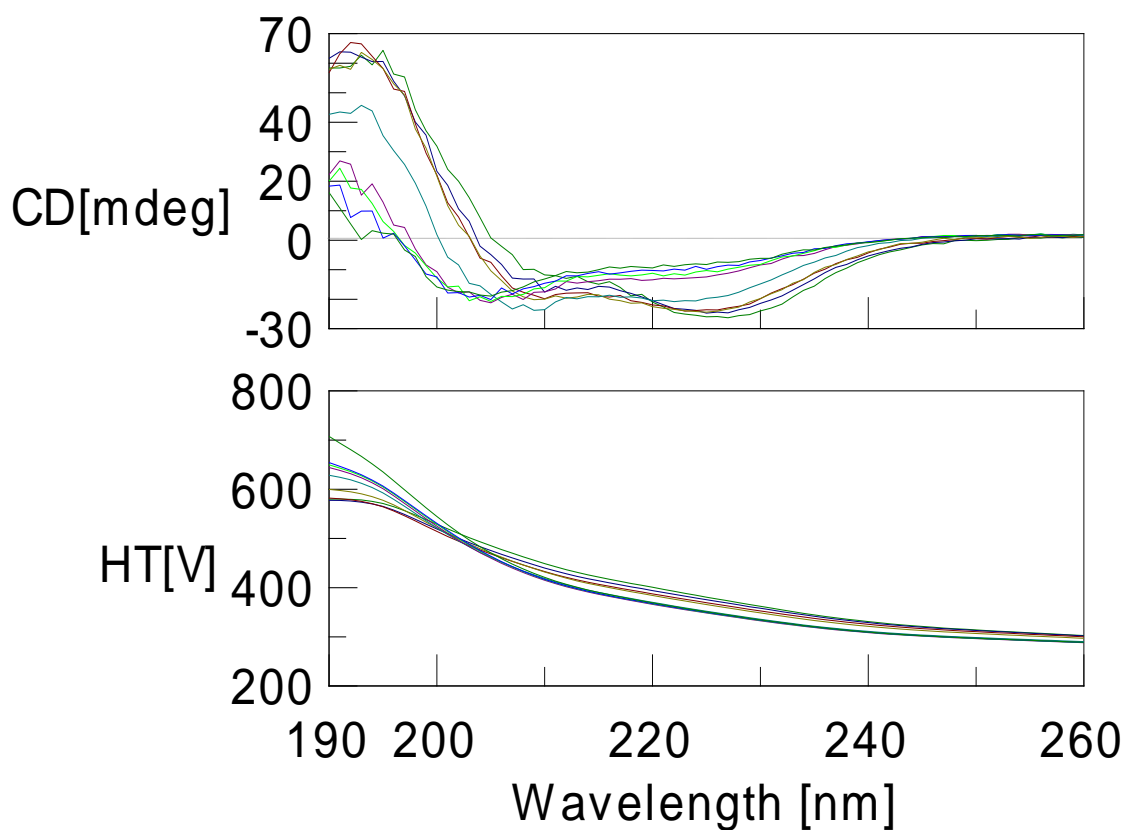
Εικόνα 2.10.3



Σε πείραμα thermal unfolding που απεικονίζει η εικόνα 2.10.4 είναι δυνατόν να πάρουμε πληροφορίες για το ισοδιχρωϊκό σημείο, εκείνο δηλαδή το σημείο όπου συναντιούνται όλες οι καμπύλες. Αν το εν λόγω σημείο υπάρχει τότε η πρωτεΐνη περνάει από την folded στην unfolded κατάσταση απότομα. Ένα τέτοιο σημείο δεν είναι ξεκάθαρο αν υπάρχει στην καμπύλη της Rop GP.

Σημειώνεται ότι οι τιμές του HTV πρέπει να είναι κάτω από 600 για να έχουμε αξιόπιστα αποτελέσματα.

Εικόνα 2.10.4



Κεφάλαιο 3^ο

3 Συμπεράσματα - Παρατηρήσεις

Παρά την αποτυχία απομόνωσης κρυστάλλων ικανών να χρησιμοποιηθούν σε πειράματα περίθλασης ακτίνων x, είναι δυνατόν να αποσπάσουμε κάποιες πληροφορίες για εκείνες τις συνθήκες που το πρωτεϊνικό μόριο έδειχνε να έχει την τάση να δημιουργεί κρυσταλλικές δομές. Ένας αναλυτικός πίνακας με όλες αυτές τις συνθήκες παρουσιάζεται παρακάτω ενώ σημειώνεται και ο αριθμός συμπύκνωσης του πρωτεϊνικού διαλύματος ο οποίος άλλαζε σε κάθε νέο καθαρισμό της πρωτεΐνης (πίνακας 3.1).

Πίνακας 3.1

1 ^{ος} καθαρισμός C=11mg/ml	2 ^{ος} καθαρισμός C=24mg/ml	3 ^{ος} καθαρισμός C=16mg/ml
JBS classic 10 A5 <i>1.0M Ammonium dihydrogen Phosphate , Buffer: 100mM sodium Citrate, pH =5.6</i>	Κρυστάλλωση 10 A3 <i>0.9M Ammonium sulfate , Buffer: Acetate 0,1M, pH=4</i>	Κρυστάλλωση 10 B1 <i>0.7M Ammonium sulfate , Buffer: Acetate 0,1M, pH=4,2</i>
JBS classic 10 C5 <i>2.0M Ammonium dihydrogen Phosphate , Buffer: 100mM Tris -HCl, pH =8,5</i>	Κρυστάλλωση 10 C6 <i>1.2M Ammonium sulfate , Buffer: Acetate 0,1M, pH=4.6</i>	Κρυστάλλωση 10 B2 <i>0.8M Ammonium sulfate , Buffer: Acetate 0,1M, pH=4,2</i>
Κρυστάλλωση 3 C1 <i>1.0M Ammonium sulfate , Buffer: 0,1M Acetate pH = 4.6</i>		

JBS classic 6 B5 <i>1.6M Ammonium sulfate , Buffer:100mM HEPES Sodium Salt, pH=7,5, Precipitant :2%w/v PEG1000</i>		
JBS classic 6 B6 <i>1.8M Ammonium sulfate , Buffer:100mM MES Sodium Salt, pH=6,5</i>		
JBS classic 6 A3 <i>1.0M Ammonium sulfate , Buffer:100mM Sodium Acetate, pH=4.6</i>		
Structure screen 1(1-24) C2 <i>0,2M Ammonium sulfate, Buffer: 0,1M sodium cacodylate, pH=6.5, precipitant=30%w/v PEG8000</i>		
Structure screen 1(25-48) D2 <i>2.0M Ammonium sulfate, Buffer: None, Precipitant=None</i>		

Παρατηρήσεις:

1. Από όλες τις παραπάνω συνθήκες που παρατηρήθηκαν κρυσταλλικές δομές , φαίνεται ότι το μετάλλαγμα της πρωτεΐνης Rop και συγκεκριμένα η Rop GP στην οποία οι θέσεις 30 και 31 έχουν μεταλλαχθεί σε Gly/G και Pro/P αντίστοιχα , τείνει να σχηματίσει κρυστάλλους παρουσία αλατιού (ammonium sulfate). Συγκεκριμένα σε τελικές συγκεντρώσεις 0.2 , 0.7 , 0.8 , 0.9 , 1.0 , 1.2 , 1.6 , 1.8 , 2.0 M Ammonium sulfate η εν λόγω πρωτεΐνη σχημάτισε τέτοιου τύπου δομές. Ενώ για τα pH είναι μπορεί να παρατηρηθεί ότι από 4-7.5 η πρωτεΐνη έδωσε κρυσταλλικές δομές με τις καλύτερες τιμές να κυμαίνονται από 4 -4.8.

2. Οι κρυσταλλικές βελόνες στα πηγάδια JBS Classic 10 A5 , C5 μπορεί να οφείλονται στην παρουσία φωσφορικών και να μην είναι πρωτεϊνικές
3. Όταν οι συνθήκες των : JBS Classic 10 A5 , C5 , JBS Classic 6 B5, B6 , Structure screen 1 C2, D2 ξαναχρησιμοποιήθηκαν για κρυστάλλωσεις, αλλά με διαφορετική συγκέντρωση του πρωτεϊνικού διαλύματος από τα 11 mg/ml που είχε χρησιμοποιηθεί την πρώτη φορά στα 16mg/ml , καμία από τις παραπάνω συνθήκες δεν ξαναέδωσε κρυσταλλικές δομές.
4. Την Τρίτη φορά που καθарίστηκε πρωτεΐνη η κρυστάλλωση 10 η οποία είχε δώσει κρυσταλλικές ακτίνες στα πηγάδια A3 και C6 με 0.9M και 1.2 M Ammonium sulfate αντίστοιχα του 2^{ου} καθαρισμού (Cπ.δ.=24mg/ml) , τώρα έδωσε (Cπ.δ=16mg/ml) σε διαφορετικά πηγάδια: B1 ,B2 με 0.7 και 0.8 M Ammonium sulfate. Όταν όμως τα πηγάδια B1 και B2 της κρυστάλλωσης 10 επαναλήφθηκαν από 6 φορές έκαστο στην κρυστάλλωση 19 δεν παρατηρήθηκαν τα επιθυμητά αποτελέσματα.

Βιβλιογραφία:

Banner, D. W., Kokkinidis, M. & Tsernoglou, D. (1987) 'Structure of the ColE1Rop protein at 1.7 Å resolution'. J. Mol. Biol. 196, 657-675.

Glykos, N. M., and Kokkinidis, M. (2004) Structural Polymorphism of a Marginally Stable 4-R-Helical Bundle. Images of a Trapped Molten Globule? Proteins 56, 420- 425.

Glykos, N. M., Y. Papanikolaou, et al. (2006) ' Loopless Rop: structure and dynamics of an engineered homotetrameric variant of the repressor of primer protein', Biochemistry 45, 10905-10919

Glykos N., Cesareni G. , Kokkinidis M. (1999). ' Protein plasticity to the extreme: changing the topology of a 4- -helical bundle with a single amino acid substitution'.

Yaakov Levy, Samuel S. Cho, Tongye Shen, Jose´ N. Onuchic, and Peter G. Wolynes .(2004). 'Symmetry and frustration in protein energy landscapes: A near degeneracy resolves the Rop dimer-folding mystery'.

Norma J Grenfield (2006) 'Using circular Dichroism collected as a function of temperature to determine the thermodynamics of protein unfolding and binding interactions'

Carl Branden & John Tooze, 'Εισαγωγή στην δομή των πρωτεϊνών' , Δευτερη έκδοση , κεφάλαια:1,2,8,17,18.