

Kristallisation von Proteinen

Georg Wille, Stand 31.01.2017¹

Julian Reitz, Stand 20.10.2020²

1 Motivation

Für das Verständnis der Funktion eines Proteins ist es außerordentlich hilfreich, seine Struktur zu kennen. Die drei wichtigen Verfahren, die die Strukturbestimmung mit atomarer Auflösung erlauben, sind NMR-Spektroskopie, cryo-Elektronenmikroskopie und die Beugung von Röntgenstrahlen an Proteinkristallen. Jedes dieser Verfahren verfügt über bestimmte Vor- und Nachteile. Kristallisationsexperimente erreichen routinemäßig die höchste Auflösung. Die Schwierigkeit dieser Methode liegt darin, dass gute Proteinkristalle gezüchtet werden müssen. Mit diesem Schritt werden Sie sich in diesem Versuch beschäftigen.

1962 erhielten Max Perutz und John Kendrew den Nobelpreis für Chemie *for their studies of the structures of globular proteins*, insbesondere die Strukturbestimmung von Myoglobin (1958). 1965 folgte die erste Struktur eines *echten* Enzyms, des Lysozyms. Heute enthält die Protein Data Base (<http://www.rcsb.org/>) ca. 150000 Proteinstrukturen, die durch Röntgenbeugung bestimmt wurden. Den Umgang mit dieser Datenbank und Möglichkeiten zur Visualisierung von Proteinstrukturen lernen Sie im Versuch *Proteindatenbanken* kennen.

Wie erwähnt, ist die Kristallisation der Proteine auch heute noch ein wichtiger Engpass bei der Strukturbestimmung, da sie immer noch zum großen Teil empirisch abläuft. Die optimalen Bedingungen, um möglichst große und wohlgeordnete Kristalle zu erhalten, müssen für jedes Protein systematisch ausprobiert werden. Im großen Maßstab wird das heute im Rahmen von Structural Genomics-Projekten (teil)automatisiert durchgeführt. Fortschritte bei der Röntgentechnik (Synchrotronstrahlung, Freie-Elektronen-Laser) kommen heute auch mit immer kleineren Kristallen aus. Im Praktikumsversuch werden Sie Lysozym aus Hühnereiweiß nach dem Verfahren des hängenden Tropfens kristallisieren.

2 Grundlagen

2.1 Allgemeines

Proteine kristallisieren aus übersättigten Lösungen. Dieser thermodynamisch instabile Zustand equilibriert sich entweder durch Ausfällung eines amorphen Präzipitats oder (seltener) durch Kristallisation. Die Lös-

¹Adaptiert nach einer Praktikumsanleitung von M. T. Stubbs und C. Parthier des Instituts für Biotechnologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

²Adaptiert nach der Vorlage von Georg Wille, Stand 31.01.2017

lichkeit eines Proteins hängt dabei von sehr vielen Variablen des Proteins und der anderen Bestandteile der Lösung ab. Hinzu kommt, dass Proteine im Vergleich mit kleineren Molekülen wesentlich flexibler sind und verschiedene Konformationen aufweisen können. Physikochemisch werden sie wegen der solventexponierten Ladungen und polaren Gruppen als große, polyvalente Ionen behandelt (Scopes, 1982).

Generell sind Proteine in Lösungen mit niedriger Ionenstärke besser löslich als in reinem Wasser (salting-in-Effekt), jedoch können sie durch hohe Salzkonzentrationen (z.B. Ammoniumsulfat) ebenfalls ausgefällt werden (salting-out-Effekt). Ein Schema des Löslichkeitsverhaltens zeigt Abb. 1.

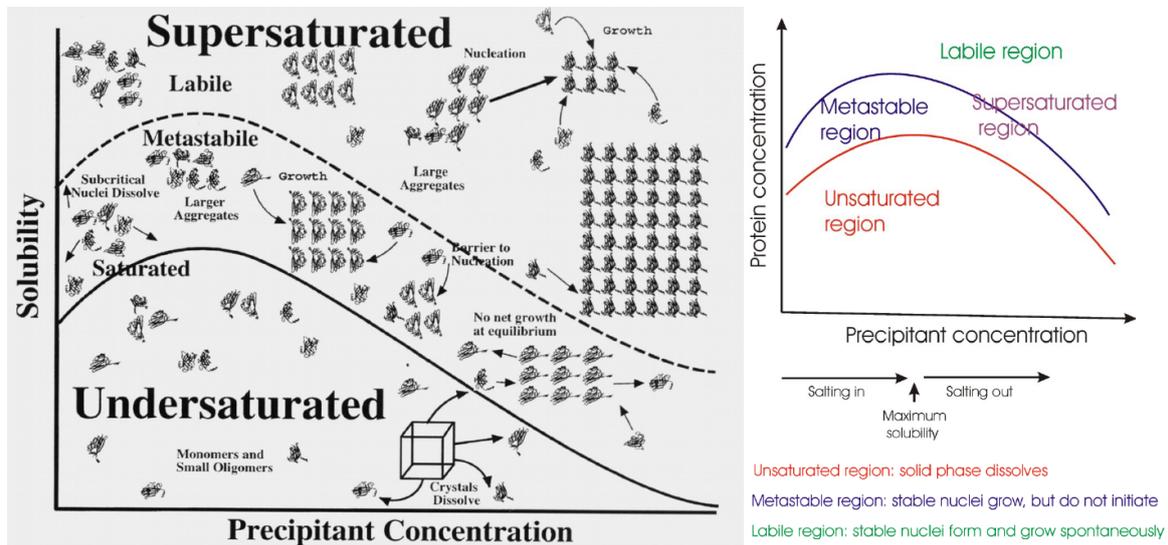


Abbildung 1: Löslichkeit von Proteinen

Durch Variation der Parameter in Tabelle 1 ist es möglich, die Proteinlösung zu übersättigen. Dieser metastabile Zustand kann durch die Kristallnucleation in einen stabilen überführt werden. Oft geschieht das spontan, jedoch ist auch ein gezieltes *Seeding* mit Kristallisationskeimen möglich. Eine stark übersättigte Lösung und/oder die Kontamination mit Staub oder denaturierten Proteinmolekülen (z.B. durch vorangegangene Lyophilisation, lange Aufbewahrung, zu hohe Temperaturen) führt zu sehr vielen Nuklei und damit vielen, kleinen Kristallen. Auch die Kontaktflächen der Lösung zu Luft oder den Behälterwänden können als Nucleationskeime dienen und sollten daher so klein wie möglich gehalten werden (möglichst sphärische Tropfen und Vermeidung von Luftblasen, saubere und glatte Oberflächen z.B. durch Silanisierung der Deckgläschen). Mechanische Vibrationen, z.B. im Kühlschrank, sollten auch vermieden werden, da sie zu Schauern von Mikrokristallen führen können. Andererseits kann leichter mechanischer Schock wie das *Streaking* auch gezielt zur Nucleation gerade übersättigter Lösungen eingesetzt werden.

2.2 Eigenschaften von Proteinkristallen

Der Proteinkristall entsteht wie jeder andere Kristall durch die periodische Wiederholung einer *Einheitszelle* genannten kleinsten Einheit in allen drei Raumrichtungen. Die Form der Einheitszelle sowie die Symmetrieeigenschaften ihres Inhalts bestimmen die sog. Raumgruppe des Kristalls. Sie ist gewöhnlich nur aus der Analyse des Röntgenbeugungsmusters abzuleiten. Die äußere Form des Kristalls, der *Habitus*, ist von der Raumgruppe nur sehr indirekt abhängig und erlaubt i.d.R. keinen Rückschluss auf diese.

Proteinmoleküle sind unregelmäßig geformte Körper. Im Kristallgitter berühren sie sich nur an bestimmten Kontaktstellen auf ihren Oberflächen. Die *Hohlräume* zwischen den Proteinmolekülen sind mit Puffer gefüllt und bilden lange, den kompletten Kristall durchziehende Flüssigkeitskanäle. Dadurch lassen sich in einen Proteinkristall auch nachträglich noch niedermolekulare Substanzen einbringen, z.B. Enzymsubstrate,

Tabelle 1: Parameter mit Einfluss auf die Proteinkristallisation

Physikochemisch	Konzentration von Protein und Präzipitant Temperatur, pH, Druck, elektrische u. magnetische Felder, Grenzflächen mit Luft oder Behälter Geschwindigkeit der Übersättigung Ionenstärke Reinheit der Chemikalien Dichte und Viskosität, Geschwindigkeit von Diffusion und Konvektion
Biochemische und biophysikalische	Oxidationszustand des Proteins, Hydrophilie und Hydrophobizität der Oberfläche Sensitivität des Proteins für Parameter wie pH, Temperatur usw. Liganden wie Inhibitoren, Substrate, Kofaktoren, Metallionen Additive wie reduzierende Agentien oder Detergentien Alter der Probe (Proteinabbau, -denaturierung, -oxidation)
Biologische	Quelle des Proteins Kontamination der Probe mit Mikroorganismen
Proteinreinheit	makromolekulare Verunreinigungen Chargenunterschiede chem. Mikroheterogenität konformelle Mikroheterogenität (flexible Domänen, Oligomerisation, Aggregation)

Inhibitoren, Farbstoffe oder Schwermetallsalze für die Lösung des sog. Phasenproblems der Kristallographie. Über die Bestimmung der Kristalldichte lässt sich der Lösungsmittelgehalt von Proteinkristallen bestimmen, er liegt normalerweise zwischen 30 % bis 70 %.

Ein und dasselbe Protein kann mitunter verschiedene Kristallgitter bilden, man spricht dann von verschiedenen Kristallformen. Häufig sind nicht alle Formen gleich gut für die Strukturbestimmung geeignet. Unterschiedliche Kristallformen entstehen gewöhnlich bei unterschiedlichen Kristallisationsbedingungen, manchmal treten aber auch verschiedene Formen nebeneinander im gleichen Ansatz auf. Kristalle mit unterschiedlichen Kristallformen unterscheiden sich gewöhnlich auch in ihrer äußeren Gestalt (z.B. Nadeln versus Plättchen), jedoch gilt das umgekehrte nicht: unterschiedlicher Habitus bedeutet nicht automatisch auch verschiedene Kristallformen.

Der nur sehr lockere Zusammenhalt der Proteine führt auch dazu, dass die Kristalle mechanisch sehr empfindlich sind, sie nehmen bei Berührung leicht Schaden. Als doppelbrechende Objekte zeigen Proteinkristalle zwischen gekreuzten Polarisationsfiltern eine Färbung, die aber i.d.R. weniger intensiv ausfällt als bei Kristallen niedermolekularer Verbindungen.

2.3 Konditionierung der Proteinlösung

Die meisten Chemikalien in einem gut ausgestatteten Labor können als Präzipitant getestet werden, die Grenze setzt die verfügbare Proteinmenge. Das Protein selbst sollte so rein wie möglich sein und in einem Silber-gefärbten SDS-Gel und auch in einer isoelektrischen Fokussierung nur eine Bande zeigen. Mit 20 mg eines reinen Proteins kann man ein erstes Screening durchführen. Da sich verschiedene Präparationschargen hinsichtlich ihrer Kristallisationseigenschaften unterscheiden können, sollte man diese nicht mischen und die im Ansatz verwendete Charge ebenfalls notieren. Größere Präparationen sollten in Portionen aufgeteilt werden, um wiederholtes Einfrieren und Auftauen einer Lösung zu vermeiden.

Für die Kristallisationsansätze sollte die ProteinstammLösung mit einer moderaten Konzentration an

Protein ($5 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ bis $20 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$) in einem geeigneten Puffer mit niedriger Ionenstärke vorliegen, z.B. 10 mM, damit ein evtl. in der Präzipitant-Lösung eingestellter abweichender pH-Wert dem Protein *aufgeprägt* werden kann. Dies wird z.B. durch Dialyse und anschließende Konzentrierung der Proteinlösung erreicht. Dabei sollten erforderliche stabilisierende Zusätze (Calcium, Reduktionsmittel, Inhibitoren, etc.) ebenfalls zugesetzt werden.

Es ist empfehlenswert, die Proteinlösung vor dem Ansetzen der Kristallisationsplatten noch einmal zu zentrifugieren (10 min bei maximaler Drehzahl einer Eppendorf-Zentrifuge) oder durch einen Spritzenvorsatz-Sterilfilter (0,2 μm Porengröße) zu filtrieren, um größere Partikel abzutrennen.

2.4 Kristallisationsansatz

Die am häufigsten verwendeten Präzipitanten sind 1 M bis 3 M Natrium- oder Kaliumphosphat, 10 % bis 30 % Polyethylenglycol (PEG) verschiedener Kettenlänge, z.B. PEG 6000, 1 M bis 4 M Ammoniumsulfat und 0,5 M bis 1,5 M Natriumcitrat (pH 4–10). Diese können z.B. für einen initialen Screen getestet werden. Die faktoriellen Screeningmethoden von Jancarik und Kim (1991) und Carter und Carter (1979) decken einen breiteren Bereich von Bedingungen ab, erfordern aber mehr Material und Aufwand.

Alle Experimente sollten bei einer kontrollierten Temperatur durchgeführt werden, z.B. bei 4 °C, 20 °C oder 30 °C in einem klimatisierten Raum oder Inkubator. Zur Kontrolle der Platten sollte ein Mikroskop bei der gleichen Temperatur verfügbar sein, z.B. im Kühlraum, um häufige Temperaturwechsel zu vermeiden. Auch die Beleuchtung des Mikroskops sollte möglichst Kaltlicht verwenden.

Die mit Abstand gebräuchlichste Methode zur Proteinkristallisation ist die Gasphasendiffusion, entweder als hängender oder sitzender Tropfen ausgeführt (Abb. 2).

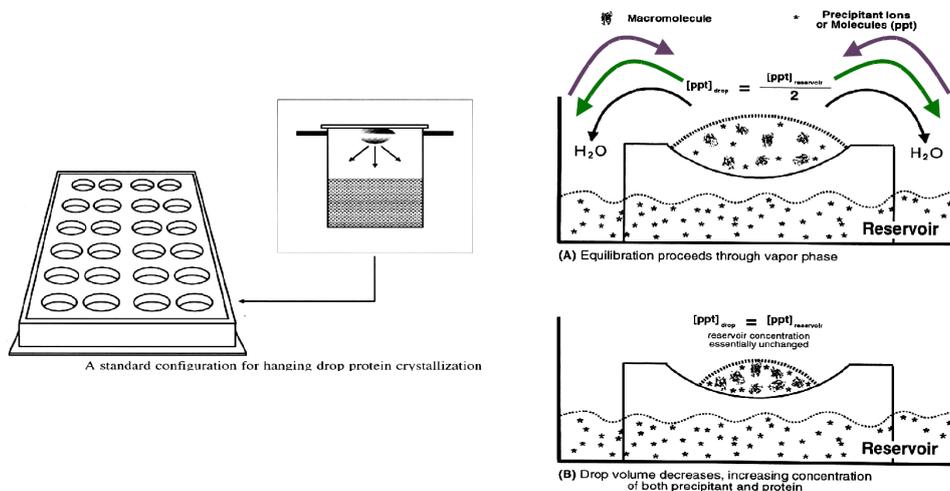


Abbildung 2: Kristallisation mittels Gasphasendiffusion, links hängender, rechts sitzender Tropfen

Ein Tropfen Proteinlösung wird mit einem Tropfen Präzipitant gemischt, so dass die entstehende Mischung noch nicht übersättigt ist. Der Tropfen des Gemischs wird dann in einem verschlossenen Behälter gegen ein Reservoir des Präzipitants äquilibriert. Der Dampfdruck des Wassers im Tropfen ist höher als in der Präzipitant-Lösung im Reservoir (wegen der Verdünnung mit der Proteinlösung), so dass langsam Wasser aus dem Tropfen in die Reservoirlösung durch die Gasphase diffundiert. Dieser Prozess dauert abhängig vom verwendeten Präzipitant Stunden bis Tage und führt langsam zu einer Übersättigung des Proteins im Tropfen. Abbildung 3 zeigt schematisch den vollständigen Ablauf eines Kristallisationsexperiments.

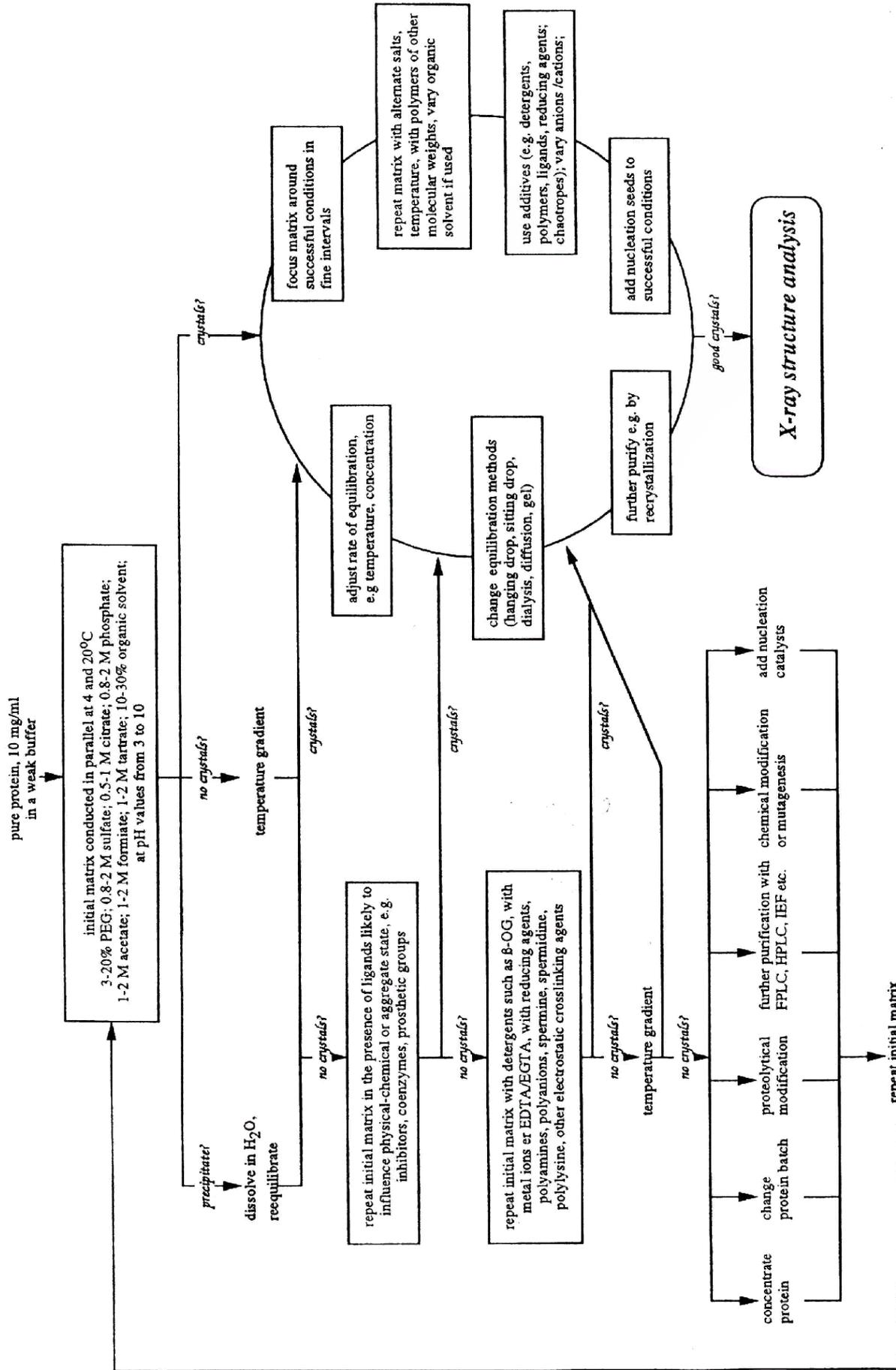


Abbildung 3: Flowchart zur Proteinkristallisation

2.5 Mögliche Resultate

Die Zeit bis zur Bildung von Kristallen kann sehr stark variieren, abhängig von Protein, Präzipitant und anderen Lösungskomponenten, sowie von der Kristallform. Manche Kristalle wachsen über Nacht, andere benötigen Monate. Manche Kristalle wachsen auch aus Präzipitat heraus. Die Equilibrierung des Dampfdrucks von Tropfen und Reservoir kann innerhalb von Stunden geschehen (z.B. Ammoniumsulfat) oder auch Tage dauern (z.B. mit PEG). Kristallisationsansätze sollten daher unmittelbar nach dem Ansetzen, am Tag danach und dann wöchentlich kontrolliert werden. Folgende Ergebnisse sind im mikroskopischen Bild möglich (für Bilder siehe die Webseite von T. Bergfors, <https://xray.teresebergfors.com/>, Abschnitt *Tutorials*):

- **Klare Lösung:** Die Präzipitant- oder Proteinkonzentration war nicht hoch genug. Für einen neuen Ansatz höhere Konzentrationen verwenden.
- **Niederschlag/Präzipitat:** Präzipitation kann verschiedene Gründe haben. Wenn sich das Präzipitat nach Zugabe von Wasser nicht auflöst, deutet das auf Denaturierung des Proteins hin. Anderenfalls waren womöglich die Konzentrationen von Protein und/oder Präzipitant zu hoch. Auch wenn sehr viele Mikrokristalle ausfallen, kann der Eindruck von Niederschlag entstehen. Amorpher und mikrokristalliner Niederschlag sind meist nicht ohne weiteres zu unterscheiden.
- **Sphärolite:** Sphärolite sind eine extreme Form von Nadelbüscheln, in denen die Nadeln sehr dünn und sehr dicht sind, sodass kugelige Formen entstehen. In der Regel treten sie auf, wenn die Kristallisation zu schnell erfolgt ist. Leichte Veränderungen in den Kristallisationsbedingungen können dann zu schönen großen Einzelkristallen führen.
- **Phasentrennung:** Gelegentlich findet im Tropfen eine Phasentrennung statt, die im Mikroskop aussieht wie eine Öl-in-Wasser-Emulsion. In einer Phase liegen hohe Protein- und niedrige Präzipitantkonzentrationen vor, in der anderen Phase sind die Verhältnisse umgekehrt. Wenn Polymere wie PEG als Präzipitant verwendet werden, kann sich auch eine Polymerphase von einer Salzphase abtrennen.
- **Salzkristalle:** Einer der enttäuschendsten Momente bei der Proteinkristallisation ist die Entdeckung, dass große, regelmäßige Kristalle im Tropfen nicht aus Protein, sondern aus Salz bestehen. Besonders anfällig hierfür sind Lösungen, die zweiwertige Kationen wie Calcium, Magnesium oder Zink und dazu Sulfat oder Phosphat enthalten. Auch andere Salze können bei hohen Konzentrationen ausfallen, insbesondere wenn die Ansätze schon lange stehen und beginnen auszutrocknen. Kristalle im Reservoir sind ein Hinweis darauf, dass auch die Kristalle im Tropfen vermutlich aus Salz bestehen. Die Unterscheidung von Salz- und Proteinkristallen ist nicht immer einfach. Salzkristalle zeigen im polarisierten Licht intensivere Farben. Sie sind normalerweise hart und brechen beim Druck mit einem Glas- oder Metallstab mit hörbarem Knacken. Proteinkristalle sind sehr viel weicher und berührungsempfindlicher. Eine elegante Möglichkeit der Unterscheidung besteht in der Anfärbung der Kristalle. Proteinkristalle lassen sich wegen der sie durchziehenden großen puffergefüllten Kanäle mit im Volumen befindlichen Farbstoffen einfärben, Salzkristalle hingegen färben nicht. Diesen Färbetest werden Sie auch im Versuch durchführen.
- **Schlechte Proteinkristalle:** Kleine Kristalle, dünne Plättchen oder Nadeln sind oft das erste Ergebnis eines sog. Screens. Sie entstehen in der Regel bei Bedingungen, die nur sehr wenig von den idealen Bedingungen abweichen. Dann lohnt sich ein verfeinerter Screen mit geringfügig variierender Zusammensetzung der Lösung, z.B. pH-Wert, Konzentrationen, Temperatur. Auch ungenügende Proteinreinheit führt zu schlechten Kristallen.

- **Gute Proteinkristalle:** Das ideale Ergebnis sind große Kristalle ($> 0,2$ mm in allen Raumrichtungen) mit regelmäßiger Form und scharfen Kanten. Diese Kristalle werden normalerweise in einer Reservoirlösung mit erhöhter Präzipitantkonzentration und mit Zusatz eines Gefrierschutzmittels (Glycerol, Glycol o.ä.) schockgefroren und für ein Beugungsexperiment verwendet.

3 Vorbereitung auf den Versuch

1. Was ist Lysozym? Woraus wird es isoliert? Was ist seine Funktion? Welche Reaktion katalysiert es? Was ist seine Molekülmasse und sein isoelektrischer Punkt?
2. Wie hoch ist die molare Konzentration von Natriumchlorid in einer 5 %igen (w/v) Lösung?
3. Für den Versuch setzen Sie und Ihr Praktikumpartner jeweils eine Kristallplatte mit 24 Tropfen an. Pro Tropfen mischen Sie 1 μ l Protein- und 1 μ l Präzipitantlösung. Sie verwenden dabei in jeder der vier Zeilen ihrer Platte verschiedene Proteinkonzentrationen (50 mg/ml; 40 mg/ml; 30 mg/ml; 20 mg/ml), sodass sie von jeder Konzentration 6 Tropfen benötigen. Wie viel Protein müssen Sie zu Beginn des Experiments in Puffer auflösen, um genug Lösung für alle Tropfen in den beiden Platten zu haben?
4. Das abgewogene Protein wird in einem Puffer mit 100 mM Natriumacetat (pH 4,6) aufgelöst. In Spalte 1 ihrer Platte verwenden sie als Präzipitant eine 8 %ige NaCl Lösung in 100 mM Natriumacetat (pH 4,6). Wie hoch sind vor bzw. nach der Äquilibrierung die konkreten Konzentrationen von a) Protein (mg/ml), b) Puffer (mM), c) Präzipitant (% w/v) in den Tropfen in Spalte 1 ihrer Kristallisationsplatte? (Für die Abschätzung, wie stark der Tropfen schrumpft, können Sie die Konzentration von Puffer und Protein in erster Näherung vernachlässigen.)
5. Im Tropfen eines Kristallansatzes (Volumen 2 μ l) mit einer Lysozymkonzentration von 25 mg/ml wächst ein Kristall, der vereinfacht als Kubus mit 0,3 mm Kantenlänge angenommen wird. Der Anteil des Lösungsmittels im Kristall betrage 40 %. Welcher Anteil der für den Tropfen eingesetzten Proteinmenge befindet sich in diesem Kristall? (Rechnen Sie mit einer Dichte des Kristalls von $1,3 \text{ g/cm}^3$.)

4 Versuchsdurchführung

4.1 Überblick

Der Versuch besteht aus mehreren Teilen, die an verschiedenen Tagen durchgeführt werden. Am ersten Tag setzen Sie die Kristallplatte an (je eine pro Praktikumssteilnehmer). Die Platten haben 4x6 sogenannte Wells. Sie variieren auf der Platte die Konzentration von Lysozym (jeweils eine Konzentration in jeder der vier Zeilen der Platte) sowie die Konzentration von Präzipitant (jeweils eine in jeder der sechs Plattenspalten). Eine erste Kontrolle der Platte erfolgt möglichst am Folgetag. Eine zweite Kontrolle der Platte erfolgt eine Woche nach dem Ansatz. Wenn Kristalle gewachsen sind, werden sie in einigen Tropfen mit Methylenblau versetzt. Wieder einen Tag später werden ungefärbte und gefärbte Kristalle protokolliert und fotografiert.

4.2 Erster Tag: Ansetzen der Platten

1. Stellen Sie zunächst eine Stammlösung von Lysozym aus dem gefriergetrockneten Präparat her. Die Konzentration beträgt zunächst 50 mg/ml, das Lösungsmittel ist ein Puffer mit 100 mM Natriumacetat (pH 4,6).

2. Zentrifugieren Sie die Lösung scharf ab (max. Drehzahl für 5 min in der Tischzentrifuge) und überführen Sie den Überstand vorsichtig in ein frisches Eppendorfgefäß.
3. Stellen Sie dann die benötigten Mengen der verdünnten Lösungen her: 40 mg/ml, 30 mg/ml, 20 mg/ml. Verwenden Sie zum Verdünnen den gleichen Puffer.
4. Sie erhalten vom Betreuer jeweils eine Kristallplatte. Beschriften Sie diese zunächst eindeutig (nicht auf dem Deckel, sondern dem Unterteil) mit Namenskürzel, Datum, „BP V12“. Sie erhalten vom Betreuer außerdem zwei Lösungen: 5 % und 8 % (w/v) NaCl in 100 mM Natriumacetat (pH 4,6). Stellen Sie in der Platte durch geeignete Mischung dieser Lösungen die Reservoirösungen so her, dass sich in Spalte 1 8 % NaCl befindet, in Spalte 6 5 % NaCl, und in den Spalten dazwischen ein linearer Übergang zwischen diesen Werten. Pro Well sollen 500 µl Lösung vorliegen. Besprechen Sie Ihren Plan vorher mit dem Betreuer!
5. Fetten Sie die Ränder der Wells mit Vaseline ein.
6. Pipettieren Sie nun die Tropfen zusammen. Legen Sie dazu zunächst sechs Deckgläschen (für eine Plattenzeile) nebeneinander auf ein Stück Papier und wischen Sie vorsichtig Staub mit einem fusselfreien Tuch ab. Setzen Sie dann auf jedes Deckgläschen 1 µl Proteinlösung (für Zeile A 50 mg/ml, später für Zeile B 40 mg/ml usw.). Geben Sie dann zu den sechs Proteintropfen jeweils 1 µl Reservoirlösung aus dem jeweils zugehörigen der sechs Reservoirs in einer Plattenzeile. Greifen Sie jedes Deckgläschen vorsichtig mit einer Pinzette, drehen Sie es um, dass der Tropfen nach unten hängt, und legen Sie es als Deckel auf das jeweilige Reservoir. Drücken Sie die Deckgläschen vorsichtig so an, dass das Fett den Rand abdichtet. Arbeiten Sie zügig, die kleinen Tropfen trocknen schnell aus. Führen Sie das für alle vier Plattenzeilen durch.
7. Füllen Sie den Kopf für das zugehörige Plattenprotokoll aus und machen Sie den ersten Eintrag für jeden Tropfen.

4.3 Nächster Tag: Plattenkontrolle

8. Protokollieren Sie den Zustand der Tropfen möglichst am Tag nach dem Ansatz der Platten.

4.4 Nach einer Woche: Plattenkontrolle und Kristallfärbung

9. Protokollieren Sie den Zustand der Tropfen.
10. Nehmen Sie ein Deckgläschen mit Kristallen vorsichtig vom Well herunter, legen Sie es ab und bringen Sie mit der Drahtöse vorsichtig einen Tropfen 50 mg/ml wässrige Methylenblaulösung in den Tropfen ein. Setzen Sie dann das Deckgläschen wieder auf das Well.

4.5 Nächster Tag: Plattenkontrolle und Kristallfotos

11. Protokollieren Sie den Zustand der Tropfen.
12. Fotografieren Sie ungefärbte und gefärbte Kristalle sowie andere Phänomene, die Sie womöglich beobachten. Handykameras sind überraschend gut geeignet, in das Okular des Mikroskops zu fotografieren. Sie können auch am Mikroskop im Raum professionellere Fotos mit polarisiertem Licht machen bzw. machen lassen, falls das Mikroskop gerade verwendet wird. Übergeben Sie dazu die Platten dem Betreuer mit einer Notiz, welche Wells fotografiert werden sollen.

5 Auswertung

Folgendes sollte das Protokoll mindestens enthalten:

- Antworten auf die Fragen aus Kapitel 3
- eine kurze Beschreibung der durchgeführten Schritte mit besonderem Augenmerk auf Abweichungen von dieser Vorschrift und mit den konkreten Angaben für Schritte, die in der Anleitung nur ungefähr genannt sind
- die Versuchsergebnisse, d.h. das ausgefüllte Plattenprotokoll sowie Bemerkungen zu besonderen Beobachtungen, Fotos
- eine Abschätzung der Kristallgröße in den *schönsten* Tropfen
- eine Aussage über die besten gefundenen Kristallisationsbedingungen
- Fehlerbetrachtung

Literaturverzeichnis

Bergfors, T. (2009). *Protein Crystallization* (2nd Edition). La Jolla: IUL-Press.

Bergfors, T. (2019). Online Crystallization Tutorials. Zugriff 7. November 2019 unter <https://xray.teresebergfors.com/>

Blake, C. C. F., Koenig, D. F., Mair, G. A., North, A. C. T., Phillips, D. C. & Sarma, V. R. (1965). Structure of Hen Egg-White Lysozyme: A Three-dimensional Fourier Synthesis at 2 Ångstrom Resolution. *Nature*, 206(4986), 757–761. doi:10.1038/206757a0

Carter, C. W., Jr. & Carter, C. W. (1979). Protein crystallization using incomplete factorial experiments. *The Journal of biological chemistry*, 254(23), 12219–12223.

Durbin, S. D. & Feher, G. (1996). Protein Crystallization. *Annual Review of Physical Chemistry*, 47(1), 171–204. doi:10.1146/annurev.physchem.47.1.171

Jancarik, J. & Kim, S. H. (1991). Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. *Journal of Applied Crystallography*, 24(4), 409–411. doi:10.1107/s0021889891004430

Johnson, L. N. & Phillips, D. C. (1965). Structure of Some Crystalline Lysozyme-Inhibitor Complexes Determined by X-Ray Analysis At 6 Ångstrom Resolution. *Nature*, 206(4986), 761–763. doi:10.1038/206761a0

Matthews, B. W. (1968). Solvent content of protein crystals. *Journal of Molecular Biology*, 33(2), 491–497. doi:10.1016/0022-2836(68)90205-2

Scopes, R. K. (1982). *Protein Purification*. New York: Springer.

Plattennr.:	Protein:	Charge:	cp, Puffer, Datum	angesetzt am:
-------------	----------	---------	-------------------	---------------

umgepuffert verdünnt, cp_{final}:

Tropfengröße: µl Protein + µl Reservoir

Bemerkungen:

A1	
A6	
D1	
D6	

	1	2	3	4	5	6
A						
B						
C						
D						

Kontrolldaten			

Schlüssel
<ul style="list-style-type: none"> 0. klare Lösung 1. Phasentrennung 2. leichter amorpher Niederschlag 3. starker amorpher Niederschlag 4. mikrokristalliner Niederschlag 5. Sphärolite 6. Nadelbüschel 7. viele kleine Einkristalle 8. wenige verwachsene Kristalle 9. große Einkristalle