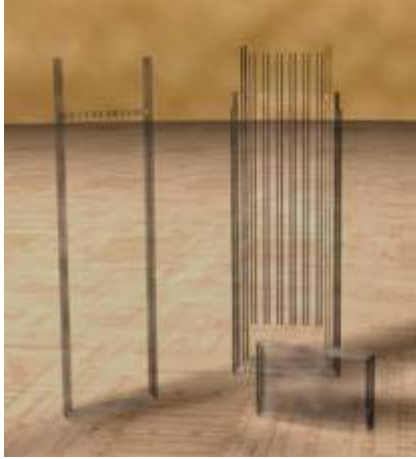


## Granada Crystallization Box

por Juan Ma. Garcia-Ruiz



Tras diversos años de estudio sobre la relación entre reacción (o cristalización) y difusión, hemos desarrollado y producido un dispositivo de cristalización muy simple que facilita esta práctica en los laboratorios. La caja se denomina Granada Crystallization Box (GCB) y consta de cuatro elementos realizados en poliestireno:

1. Un depósito en el que se añade gel.
2. Una guía sobre la que se sujetan capilares.
3. Una cubierta o tapa.
4. Un contenedor para las cajas.

**A) Crecimiento de cristales dentro de un gel mediante transporte de masa controlado por difusión.**

**B) Crecimiento de cristales de proteína dentro de capilares haciendo uso de un agente precipitante no-gelificado mediante técnicas de cristalización contradifusivas.**

**C) Crecimiento de cristales de proteína dentro de capilares haciendo uso de un agente precipitante gelificado mediante técnicas de cristalización contradifusivas.**

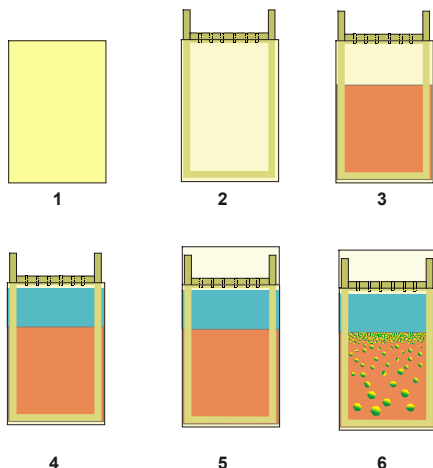
**D) Crecimiento de cristales de proteína dentro de capilares haciendo uso de técnicas de cristalización mediante batch.**

Hampton Research y Triana Science & Technology se encargan de la comercialización de la GCB.

## Como se utiliza la GCB.

**A) Crecimiento de cristales dentro de un gel mediante transporte de masa controlado por difusión.**

El crecimiento de cristales en geles es sencilla. En lo que sigue se pueden encontrar tres recetas diferentes:



A.1. La cristalización de un compuesto poco soluble haciendo uso de una reacción química provoca en la mayoría de los casos una nube de pequeños cristales o precipitado amorfo. El uso de geles resuelve el problema en la mayor parte de los casos siempre y cuando los reactivos sean solubles en agua. Un caso típico es el tartrato de calcio, el cual se puede obtener reaccionando ácido tartárico y cloruro de calcio. Para ello, se hace un gel de sílice agitando de forma continua una mezcla de alícuotas de una disolución de ácido tartárico 1M con una disolución de silicato de sodio (densidad = 1.06 g/cc). Seguidamente se vierte esta disolución en la GCB y se introduce la guía. Es

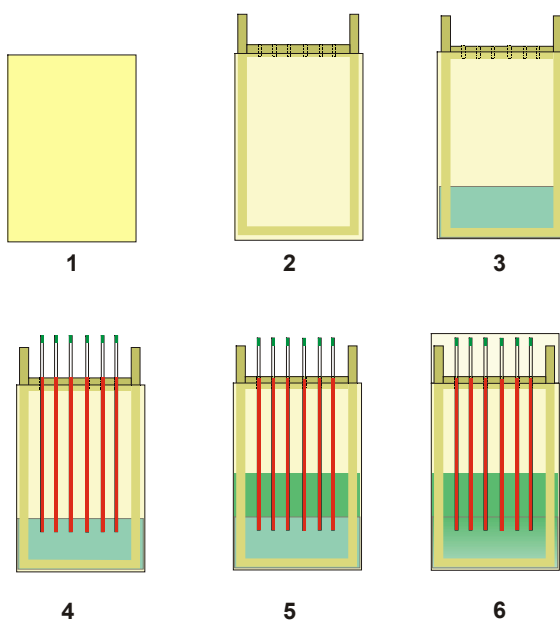
necesario esperar aproximadamente un día hasta que está preparado el gel de sílice. Entonces se vierte sobre el gel un capa de una solución de cloruro de calcio (1M). Para recoger los cristales, se extrae la guía y se elimina el gel.

A.2. Para obtener anillos de Liesegang. Se prepara una disolución de yoduro de potasio (0.05M) gelificada con un gel de agarosa preparado al 1%w/v. Mientras que la disolución está aún caliente se vierte en la GCB, donde se deja enfriar a temperatura ambiente y se espera durante unos 20 minutos. Mientras se prepara una disolución de nitrato de plomo  $Pb(NO_3)_2$  1M, que se vierte sobre el gel de KI que se había preparado con anterioridad. Y esto es todo. Es de destacar que la concentración de nitrato de plomo se selecciona de tal manera que es mayor que la concentración de yoduro de potasio de manera que las moléculas de plomo invadirán la solución gelificada de yodo. Tan pronto como se encuentran se formarán una fase amorfa de  $PbI_2$ . El proceso de precipitación continúa dando lugar a precipitaciones de forma intermitente. Según avanza el proceso y se forma una nueva banda, ésta estará formada por un menor número de cristales y de mayor tamaño. Este es el fundamento de las técnicas de cristalización de proteína contradifusivas. La diferencia se basa en el tipo de reacción que dispara la precipitación. En el caso de anillos Liesegang ambos componentes (plomo y yodo) entran a formar parte de los cristales, mientras que en el caso de cristalización de proteínas la precipitación se dispara por una reducción de la solubilidad, y por tanto, sólo la concentración de proteína decae de forma notable.

A.3. Cristalización de una proteína disminuyendo la solubilidad por fuerza iónica. Este método se diseña para preparar muchos cristales de buen tamaño y alta calidad para propósitos especiales pero normalmente consume una gran cantidad de proteína. Aquí se describe la receta para obtener cristales tetragonales de la proteína modelo denominada lisozima. Para ello se hace un gel de agarosa al 1% calentando y agitando de forma continua por encima de la temperatura de gelificación. Simultáneamente, se prepara una disolución de lisozima a 40mg/ml. Se deja enfriar la agarosa hasta una temperatura de aproximadamente 35°C. Y se mantiene a esta temperatura. Mientras que continua agitando se mezcla una parte de agarosa con cuatro partes de la disolución de proteína. Se vierte la mezcla en la GCB y se introduce la guía. Finalmente, se vierte una disolución de cloruro de sodio a 20%w/v.

## B) Crecimiento de cristales de proteína dentro de capilares haciendo uso de un agente precipitante no-gelificado mediante técnicas de cristalización contradifusivas.

El crecimiento de macromoléculas biológicas en el interior de capilares presenta diversas ventajas, entre las que destacamos:

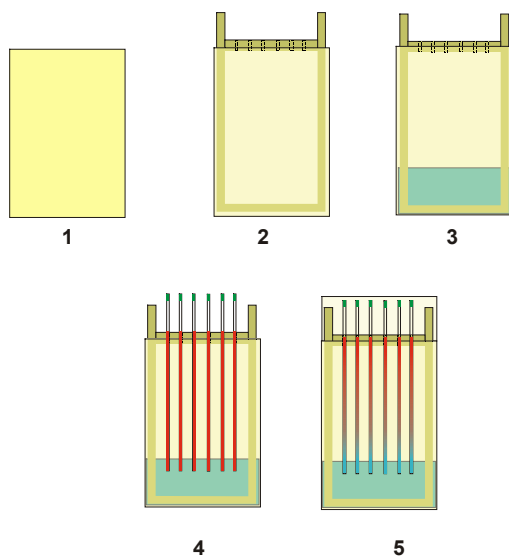


- Exploran un gran número de condiciones de cristalización en un único experimento.
- Evitan la manipulación de los cristales, de manera que se pueden utilizar en difracción de rayos X en el interior de los capilares en los que han crecido.
- Crece cristales en ambientes con transporte de masa controlado por difusión.

Llevar a cabo en experimento en la GCB es muy sencillo. El primer paso consiste en preparar el gel de agarosa. La agarosa es un polisacárido que no interacciona químicamente con la mayor parte de las proteínas (en algunos casos también es posible utilizar geles de sílice). Para obtener un gel de agarosa se mezcla agitando de forma continua un volumen apropiado de disolución buffer con el polvo de agarosa para obtener un gel de agarosa al 1.5%w/v. Se calienta la mezcla hasta que hierve para así romper los enlaces entre las fibras de agarosa. La

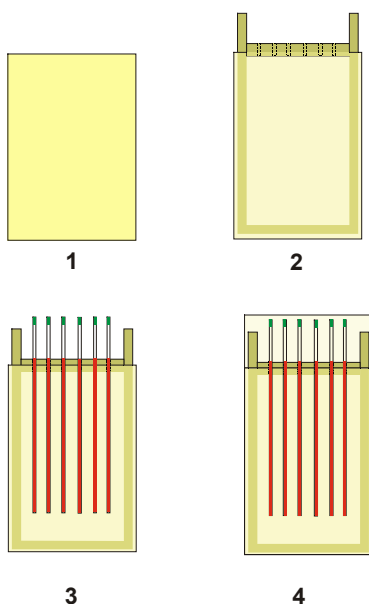
solución de agarosa se vuelve transparente. Es necesario mantener hirviendo la disolución alrededor de dos minutos agitando continuamente. Se vierte el sol de agarosa en la GCB y se deja enfriar a temperatura ambiente, hasta que se forma el gel. Una vez formado el gel, se llenan los capilares con una disolución de proteína. Para ello, se introduce el extremo del capilar en la solución de proteína. En este caso se observa como la disolución sube por capilaridad. Una vez que ésta alcanza una altura de unos cinco o seis centímetros, se extrae el capilar de la disolución de proteína. Se observa entonces que la disolución permanece en el interior del capilar. Entonces, se sella el extremo superior del capilar con un poco de plastilina o cualquier material de sellado. El siguiente paso consiste en pinchar los capilares sobre el estrato de gel (¡es importante estar seguro de que el gel se ha formado!). Para ello se introduce el capilar a través de uno de los huecos o agujeros de la guía que contiene la GCB y se empuja en el gel alrededor de unos 2-3mm (lo suficiente para mantenerlo en línea recta). Finalmente se vierte la disolución del agente precipitante tamponado sobre el estrato de gel y se coloca la tapa sobre la GCB. Se vierte un volumen igual al volumen del estrato de gel. Es importante destacar que es posible utilizar seis capilares en cada GCB. Hemos denominado este método como Método de Acupuntura en Gel.

### C) Crecimiento de cristales de proteína dentro de capilares haciendo uso de un agente precipitante gelificado mediante técnicas de cristalización contradifusivas.



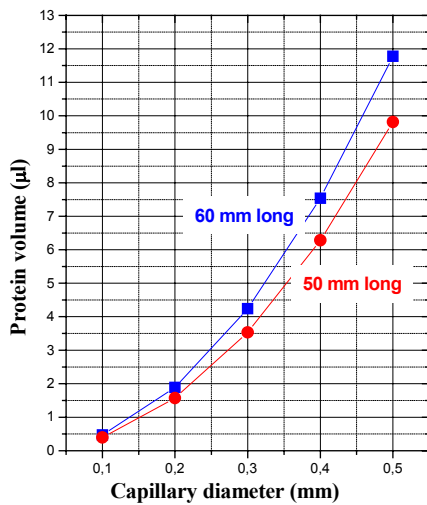
El procedimiento es básicamente el mismo que el anterior. Sin embargo, en este caso se cuenta con la ventaja que ofrece la posibilidad de gelificar algunas disoluciones tampón y agentes precipitante, como por ejemplo, sulfato de amonio, polietilenglicol, cloruro de sodio, etc. Para ello, se mezcla la agarosa con la disolución de agente precipitante tamponada, o de otra manera, se sustituye el agua utilizada en el protocolo anterior para mezclar con la agarosa por la disolución de agente precipitante. Una vez que se ha formado el gel, se pinchan los capilares que contienen la disolución de proteína. Es importante destacar que se puede utilizar proteína a cualquier valor de pH al que la misma sea estable. Como consecuencia del gran volumen de disolución gelificada comparado con el volumen de disolución proteína en el capilar, el valor de pH de la disolución de proteína se modificará según el agente precipitante tamponado viaje al interior del capilar.

### D) Crecimiento de cristales de proteína dentro de capilares haciendo uso de técnicas de cristalización mediante batch.



También es posible utilizar la GCB para crecer cristales de proteína haciendo uso de técnicas de cristalización mediante método de batch. En este caso, se pierde la ventaja de explorar condiciones de cristalización que presentan las técnicas contradifusivas. Sin embargo, también se puede utilizar este método y crecer cristales dentro de capilares, listos para difracción de rayos X. En este caso se puede utilizar la GCB para sujetar los capilares y así facilitar su observación y el transporte. Para ello, se prepara una solución de agente precipitante tamponada, y se mezcla con una solución de agarosa al 0.1%. Se hierve esta mezcla durante 1 minuto y después se enfría hasta los 35°C. Se mantiene el sol a esta temperatura. Seguidamente, se mezcla el volumen apropiado de la disolución de proteína con aquel correspondiente al sol. En otras palabras, el procedimiento es análogo al que se utiliza para preparar una gota para batch. Entonces llena el capilar por capilaridad. Se sellan ambos extremos del capilar y se colocan en la GCB.

## ¿Cuánta proteína?



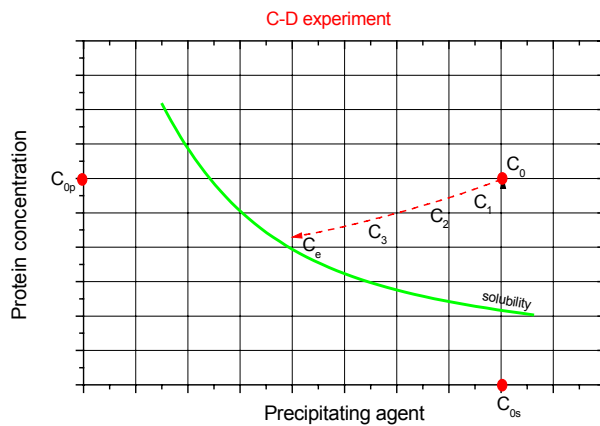
La respuesta a esta importante pregunta depende del diámetro del capilar elegido. Nosotros recomendamos el llenado de capilares una longitud por encima de 50 o 60 mm para así obtener un amplio estudio del diagrama de fase. El dibujo de la derecha muestra la cantidad necesaria de proteína para cada experimento en función del diámetro interno del capilar. Los valores se tienen en la siguiente tabla.

diametro	Longitud = 50 mm	Longitud = 60 mm
0.1 mm	0,39 µl	0,47 µl
0.2 mm	1,57 µl	1,88 µl
0.3 mm	3,53 µl	4,24 µl
0.4 mm	6,28 µl	7,53 µl
0.5 mm	9,81 µl	11,78 µl

Es importante destacar que se puede realizar la búsqueda de condiciones de cristalización con capilares de 0.1mm utilizando un volumen de proteína inferior a

500 nanolitros por experimento!!!!

## ¿Cómo trabajan las técnicas de contradifusión?



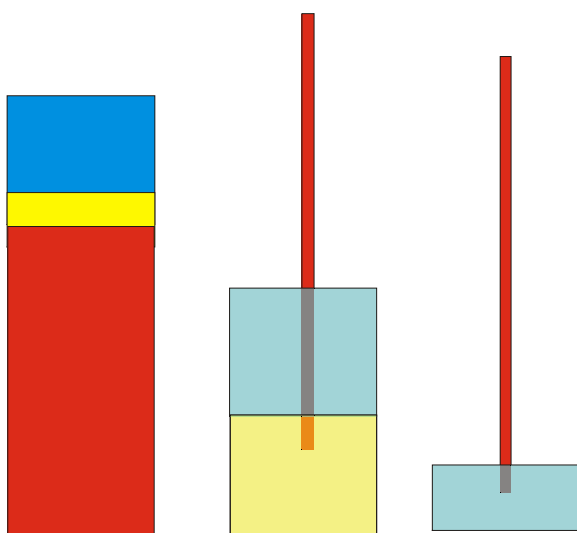
La precipitación de la proteína tiene lugar debido a que su solubilidad cambia como consecuencia de, por ejemplo, la fuerza iónica, es decir, con la concentración de sal (ver el diagrama de fase ideal en la Figura de la izquierda). Sean COP y COS las concentraciones iniciales de proteína en el capilar y de sal, respectivamente. Cuando estas disoluciones se ponen en contacto en las proximidades de un extremo del capilar, el sistema se desplaza hacia el punto CO del diagrama de fase. Es importante destacar que la sobresaturación es muy alta. Por tanto, el primer precipitado será

amorfo que se forma en el extremo más inferior del capilar. Su formación disminuye la concentración de proteína en las zonas cercanas. Mientras la sal continúa difundiendo hacia arriba en el interior del capilar, de manera que tiene lugar una nueva precipitación, en este caso a una sobresaturación más baja dando lugar a microcristales (C1 en el diagrama de fase). El proceso se repite provocando la precipitación cada vez a menor sobresaturación según avanza el frente de onda alejándose del gel y dirigiéndose hacia la parte superior del capilar (C2, C3,....., Ce). Este hecho provoca zonas de precipitación de menor número de cristales de mayor tamaño y mejor calidad. A diferencia de los métodos de cristalización más clásicos como gota y batch, las técnicas contradifusivas exploran una gran número de condiciones de cristalización en un único experimento..

Es importante destacar que el sistema según evoluciona se va aproximando al equilibrio buscando automáticamente las condiciones óptimas de cristalización. El experimento es por tanto equivalente a realizar un gran número de experimentos por gota colgante o batch a lo largo del diagrama de fase. Las técnicas contradifusivas realizan una búsqueda automática en un único experimento. Y por consiguiente

no es necesario examinar los cristales en diferentes gotas buscando aquellos cristales de mejor calidad. En experimentos contradifusivos los mejores cristales se forman siempre en la parte superior del capilar. Si utilizamos un capilar de rayos X se pueden obtener datos de difracción directamente sin necesidad de manipular los cristales.

Para comenzar se selecciona una concentración de proteína típica, por ejemplo de 10 a 20 mg/ml. Entonces se utiliza una concentración de agente precipitante muy alta de tal manera que dispara la precipitación de proteína a muy alta sobresaturación tan pronto como el agente precipitante encuentra la disolución de proteína. De manera que como veíamos anteriormente el sistema evolucionará por si mismo hacia las mejores condiciones de cristalización.



Es importante destacar que en cualquier experimento de contradifusión hay tres parámetros importantes (Ver Figura):

a) La longitud del depósito en el que ocurre precipitación (rojo). Este depósito contiene el compuesto que será cristalizado (por ejemplo la proteína) o, en el caso de cristalización por reacción química, el reactivo de menor difusividad o a menor concentración.

b) La longitud del buffer físico (amarillo). Este es un estrato de gel que no interacciona químicamente en el proceso de cristalización. Su función es retardar la mezcla de las disoluciones. Es importante destacar que este buffer se puede implementar o no. Por ejemplo, en el método de acupuntura en gel, la longitud del buffer es el

doble de la profundidad de penetración del capilar en el gel (antes de alcanzar la proteína, el agente precipitante ha de viajar la profundidad de penetración hacia abajo fuera del capilar y hacia arriba dentro del capilar). Sin embargo, en el caso del método que hace uso de agente precipitante gelificado, no existe este estrato de gel. El precipitante está en contacto directo con la proteína.

c) Los valores relativos de volumen (en azul) de agente precipitante (para el caso de proteína) o del componente con menor concentración o menor difusividad (para el caso de reacción química) respecto a los volúmenes en rojo y amarillo.

Es crítico considerar los valores de estos parámetros y la concentración inicial de los reactivos para comprender la evolución del experimento. Dependiendo de la configuración que utilicemos, el sistema evolucionará de forma diferente. Con la configuración del método de acupuntura en gel, la sal encima del gel difunde hacia abajo y después de un tiempo dado, alcanza el extremo punteado del capilar. Entonces, continua difundiéndose hacia arriba en el interior del capilar llegando con disolución de proteína, disparando la precipitación. Es importante destacar que con esta configuración, la concentración del agente precipitante al final del experimento será la mitad de la concentración inicial del mismo.

$$\text{Volumen de agente precipitante} + \text{Volumen del gel} + \text{Volumen del capilar}$$

---


$$\text{Volumen del agente precipitante}$$

Por ejemplo, si utilizamos un volumen de agente precipitante (en azul) igual al volumen del estrato de gel (amarillo), la concentración final de agente precipitante en el capilar será la mitad de la concentración inicial. Seleccionando los valores de estos volúmenes de estos volúmenes, podemos ajustar el barrido del diagrama de fase.