

# Kryształizacja kwasów nukleinowych

Dorota A. Adamiak  
Instytut Chemii Bioorganicznej PAN  
Poznań

## 1. Wstęp

Mimo bardzo szybkiego postępu w dziedzinie badań strukturalnych w roztworze, najdokładniejsze dane o budowie makrocząstek (kwasów nukleinowych, białek oraz ich kompleksów) uzyskujemy dzięki rentgenograficznym badaniom strukturalnym ich monokryształów. Jeszcze niedawno rozwiązanie struktury makrocząsteczki (np. białka) wymagało szeregu lat, obecnie w wielu wypadkach tylko tygodni. Jest to możliwe dzięki zastosowaniu nowoczesnej aparatury rentgenowskiej (*Imaging Plate Detector*, *Area Detector* — detektor w postaci płyty odwzorowującej oraz detektor powierzchniowy), przeprowadzaniu obliczeń w oparciu o komputery nowej generacji oraz wprowadzeniu zaawansowanych metod modelowania graficznego. Istotnym elementem tego procesu pozostaje wciąż jednak pozyskanie kwasu nukleinowego, białka czy ich kompleksu w formie monokryształu. Monokryształy muszą spełniać szereg warunków aby stanowić odpowiedni obiekt do dalszej analizy rentgenowskiej. Otrzymanie takich kryształów jest więc często trudnym zadaniem limitującym przebieg całego procesu rozwiązywania struktury, rys. 1 (1).

Makrocząsteczki biologiczne są wysoce złożonymi układami, których właściwości fizykochemiczne są zależne od wielu czynników m.in. temperatury, pH, siły jonowej, składu buforu, obecności dodatków oraz rozpuszczalników. Dlatego też w procesie powstawania i wzrostu monokryształów tych związków należy uwzględnić wszystkie te i inne parametry oraz skorelować je we właściwy sposób. Kryształy makrocząsteczek zawierają średnio około 50% wody chociaż wartość ta zależy od rodzaju dodatkowo używanych rozpuszczalników i może się wahać od 25 – 90%. W porównaniu z kryształami małych cząsteczek kryształy makrocząsteczek są zazwyczaj bardzo delikatne, łatwo się kruszą, tracą wodę i wykazują słabą dyfrakcję promieni rentgenowskich, a podczas procesu napromieniowywania często ulegają zniszczeniu. Dlatego znajomość dokładnych warunków kryształizacji pozwala na otrzymanie odpowiedniej ilości dobrych kryształów do badań.



Rys.1. Od strątu do idealnych kryształów makrocząstek związków biologicznych (wg Ducruix i Giegé, poz. lit. 1): a) strątu lizozymu HEW; b) mikrokryształy syntetazy asparginowego tRNA z drożdży; c) sferolity kompleksu syntetazy asparginowego tRNA i tRNA<sup>ASP</sup>; d) krótkie igły białka inhibitorowego tkankowego dla metaloproteazy; e) długie igły — podobne do kryształów — syntetazy asparginowego tRNA; f) cienkie płytki z defektami wzrostowymi inicjatorowego tRNA z drożdży; g) kryształy w kształcie płytek kolagenazy *Hypoderma lineatum*; h) kryształy tetragonalne z defektami wzrostu syntetazy asparginowego tRNA oraz skupiska igieł podobnych do szczotki; i) przykład „skóry” zdenaturowanego białka wokół kryształów lizozymu HEW; j) kryształy melittyny z wydrążonym końcem; k,l) zbliżnione kryształy kolagenazy i lizozymu HEW; m,n,o,p) idealne trójwymiarowe kryształy: m) polimorfizm kompleksu syntetazy asparginowego tRNA i tRNA<sup>ASP</sup> w tej samej kropli krystalizacyjnej; kryształy regularne i romboidalne; n) kryształy tRNA<sup>ASP</sup> ze szczelinami spowodowanymi efektem starzenia się kryształu; o) kryształy lizozymu HEW z symetrią osi czterokrotnej; p) kryształy kolagenazy *H. lineatum*.

## 2. Czynniki wpływające na wzrost kryształów

Otrzymanie dobrych monokryształów makrocząsteczek zależy od wielu czynników, które zostały zestawione w tab. 1. Do najważniejszych należą: stężenie związku, stężenie czynnika strącającego, pH, temperatura oraz w przypadku kwasów nukleinowych także czynniki stabilizujące, takie jak jony metali i poliaminy.

TABELA 1  
CZYNNIKI, KTÓRE WPŁYWAJĄ ORAZ MOGĄ WPŁYWAĆ NA PROCES KRYSZTALIZACJI MAKROCZĄSTECZEK

Lp.	Czynnik
1	stężenie makrocząsteczki
2	stężenie i natura czynnika strącającego
3	temperatura i jej zmiany
4	pH; bufor
5	siła jonowa
6	czystość związku krystalizowanego (heterogenność i mikroheterogenność)
7	rodzaj materiału z którego został wyizolowany związek
8	jony metali i inne specyficzne jony
9	lepkość roztworu macierzystego
10	objętość próby krystalicznej
11	powierzchnia naczynek krystalizacyjnych
12	środowisko utleniające lub redukcyjne
13	substraty, koenzymy, inhibitory
14	środki powierzchniowo czynne i detergenty
15	efektory i ligandy
16	protoliza
17	zakażenie mikroorganizmami
18	czas
19	ciśnienie
20	wibracje i dźwięki
21	pole magnetyczne i elektryczne
22	grawitacja, konwekcja i sedymentacja

### Stężenie związku krystalizowanego

Stężenie kwasów rybonukleinowych stosowane podczas ich krystalizacji zawiera się w zakresie od 5 – 20 mg/ml, tj. 0,2 – 0,8 mM. Natomiast stężenie molowe oligonukleotydów w większości eksperymentów krystalizacyjnych jest znacznie wyższe, tab. 2 (1).

TABELA 2  
WARUNKI KRYSZTALIZACJI DLA WYBRANYCH OLIGONUKLEOTYDÓW

Sekwencja	Czynnik strącający	Temp. °C	Stężenie				Kryształy	
			oligo <sup>a)</sup>	bufor	spermina	Mg <sup>2+</sup> b)		
<b>Forma-Z:</b>								
CGCGCG	izopropanol 5%	18 lub 37	2,0 mM	30 mM pH 7,0	10mM	15,0 mM	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 0,9 Å	
m <sup>5</sup> CGTAm <sup>5</sup> CG	MPD 8% vs. 50%		4,0 mM	30 mM pH 7,0	7,0 mM	10,0 mM	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 1,2 Å	
( <sup>5</sup> BrCG) <sub>3</sub>	MPD 10% vs. 60%		0,5 mM	20 mM pH 6,5		200 mM NaCl	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 1,4 Å	
<b>Forma-B:</b>								
CGCATATATGCG	MPD 10% vs. 40%	4	0,5 mM	-	0,4 mM	22,0 mM Mg(Ac) <sub>2</sub>	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2,2 Å	
5'-CGCAAAAAGCG GCGTTTTTCGC-5'	MPD 5% vs. 30% - 45%		0,2 mM	-	0,5 mM	10,0 mM Mg(Ac) <sub>2</sub>	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2,5 Å	
CCAAGATTGG (G.A mismatch)	MPD 45%		3,0 mM	-	-	0,7 M	C2	
5'-ACCGGCGCCACA TGGCCGCGGTGT-5'	MPD 40%	4	1,0 mM	50 mM pH 6,0	1,2 mM	18,0 mM Mg(Ac) <sub>2</sub>	R3 2,8 Å	
<b>Forma-A:</b>								
GGCCGGCC	MPD 30%	4	1,2 mM	25 mM pH 7,0	0,6 mM	3,0 mM	P4 <sub>3</sub> 2 <sub>1</sub> 2 2,25 Å	
GGGGCTCC (G.T mismatch)	wolne odparowanie		3,0 mM	50 mM pH 6,5	-	28,0 mM	P6 <sub>1</sub>	
CTCTAGAG	MPD 7% vs. 50%		1,2 mM	60 mM pH 6,8	1,0 mM	25,0 mM	P4 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 2,15 Å	
<b>Hybryd RNA-DNA:</b>								
r(GCG)d(TATACGC)	MPD 40%	35	1,5 mM	30 mM pH 6,0	8,0 mM	15,0 mM	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 1,9 Å	
<b>RNA</b>								
rU(UA) <sub>6</sub> A	MPD 35%		4,0 mM	40 mM pH 6,5	-	0,4 M	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2,25 Å	

a) buforem jest kakodylan sodu,

b) najczęściej MgCl<sub>2</sub>, w innych przypadkach rodzaj soli jest podany.

### Czynniki strącające

Czynniki te możemy podzielić na trzy grupy: sole, rozpuszczalniki organiczne oraz polimery, tab. 3 (2).

Najczęściej używaną solą podczas krystalizacji makrocząteczek jest siarczan amonu. Stosując siarczan amonu jako czynnik strącający, otrzymano dobre kryształy tRNA<sup>Met</sup> (3) i tRNA<sup>Asp</sup> (4) z drożdży.

Natomiast izopropanol dał dobre wyniki w przypadku tRNA<sup>Phe</sup> (5) z drożdży.

Do krystalizacji kwasów nukleinowych i oligonukleotydów szerokie zastosowanie mają alkohole; szczególnie nielotny MPD (2-metylo-2,4-pentanodiol),

stosowany w stężeniu  $\cong 10\%$  (w/v) w przypadku różnych tRNA i  $\cong 30\%$  w przypadku oligonukleotydów. Także PEG 4000 – 8000 (polietylenoglikol) o stężeniu kilkuprocentowym okazał się skuteczny podczas krystalizacji tRNA-<sup>ASP</sup> z drożdży (6). Natomiast kryształki heksamery Z-DNA d(CG)<sub>6</sub> zostały otrzymane z zastosowaniem PEG 600 (7). Dobrymi czynnikami strącającymi mogą być również mieszaniny soli z MPD czy z PEG.

TABELA 3  
CZYNNIKI STRĄCAJĄCE STOSOWANE DO KRYSZTAŁIZACJI MAKROZĄSTECZEK

Sole	Rozpuszczalniki organiczne	Polimery
siarczan sodu lub amonu	etanol	glikole polietylenowe: 1000,
siarczan litu	izopropanol	3350, 6000, 20000
chlorek litu	1,3-propanodiol	jefamina T
cytrynian sodu lub amonu	2-metylo-2,4-pentanodiol	poliaminy
fosforan sodu lub potasu	(MPD)	
chlorek sodu, potasu	dioxan	
lub amonu		
octan sodu lub amonu	aceton	
siarczan magnezu lub wapnia	butanol	
sole amonowe cetylotrimetylu	acetonitryl	
chlorek wapnia	dimetylosulfotlenek	
azotan amonu	2,4-hexanodiol	
mrówczan sodu	metanol	
	1,3-butyryloaceton	
	glikol polietylenowy 4000	

### Roztwór buforu i pH

Przy ustalaniu, udokładnianiu wartości pH odpowiedniej dla optymalnego wzrostu kryształu, trzeba sobie uświadomić, że często różnica w pH < 0,5 decyduje o powstaniu amorficznego strątu, mikrokryształicznego osadu czy też pożądanego dużego monokryształu. pH ma wpływ na formę (morfologię) kryształów i ich ewentualne tendencje do zbliżniania, dlatego powinno się wypróbować możliwie największy rozsądny zakres pH.

W przypadku RNA ze względu na problem degradacji nie należy stosować roztworów o podwyższonym pH. W roztworze o zbyt niskim pH obserwuje się lokalne zaburzenia strukturalne. Dlatego często stosuje się jako bufor roztwór kakodylanu sodu o pH w zakresie 6,0 – 7,0; który jednocześnie zapobiega rozwojowi bakterii oraz utrzymuje stałe pH w dużym zakresie temperatur. Przy krystalizacji oligonukleotydów zakres pH może być trochę szerszy, (4,0 – 7,0).

### Temperatura

Znaczna stabilność kwasów nukleinowych i ich komponentów w dużym przedziale temperatur pozwala na prowadzenie krystalizacji w zakresie od 4°

do 35°C. Dlatego w praktyce często nastawia się próby krystalizacyjne równoległe w temp. 4° i 25°C.

### Jony metali i poliaminy

Ponieważ kwasy nukleinowe są polianionami, dodatek kationów takich jak jony metali i poliaminy korzystnie wpływa na stabilizację struktury związków krystalizowanych. Do krystalizacji najczęściej stosuje się kationy dwuwartościowe, głównie  $Mg^{2+}$ ; oraz sperminę:  $NH_2 - (CH_2)_3 - NH - (CH_2)_4 - NH - (CH_2)_3 - NH_2$ . Do krystalizacji oligonukleotydów stosuje się także dodatek czynników stabilizujących (np.  $Mg^{2+}$ , spermina). Ważne jest wzajemne stężenie jonów  $Mg^{2+}$  i sperminy oraz stosunek stężenia  $Mg^{2+}$  i sperminy względem związku krystalizowanego.

W pierwszych próbach krystalizacyjnych stosuje się stechiometrię 0,5 – 1,0 gramjonu Mg na jedną grupę fosforanową oraz jedną cząsteczkę sperminy na 10 – 12 tych grup.

Można także spróbować krystalizować oligonukleotydy w obecności jedynie jonów magnezu tab. 2 (1) lub kationów sperminy (8).

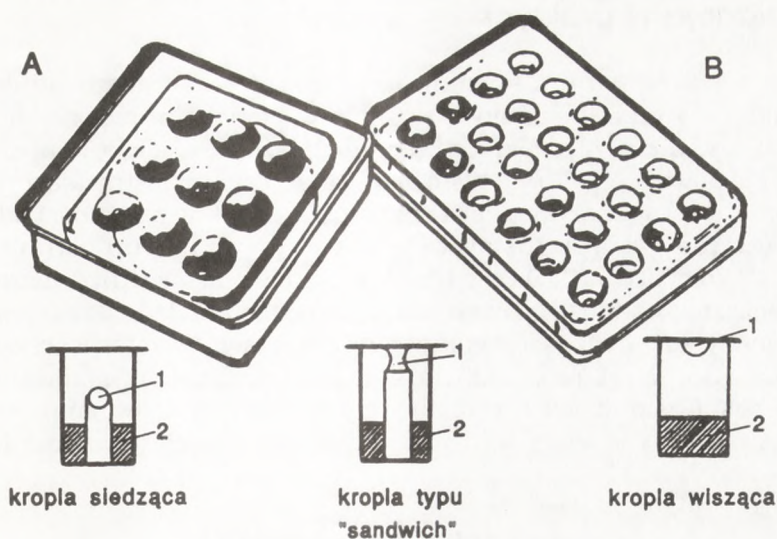
## 3. Metody krystalizacji

Najczęściej stosowanymi metodami krystalizacyjnymi makrocząsteczek są: metoda dyfuzji par i mikrodializa.

### Metoda dyfuzji par

Po raz pierwszy została ona zastosowana do krystalizacji tRNA (1). Zasada działania tej metody została pokazana na rys. 2. Kropla zawiera krystalizowany związek rozpuszczony w roztworze buforu, czynnik strącający i czynniki stabilizujące; natomiast zbiornik zawiera roztwór czynnika strącającego (krystalizacyjnego) o stężeniu wyższym niż jego stężenie w kropli. Proces równoważenia drogą dyfuzji lotnego związku (wody lub rozpuszczalnika organicznego) zachodzi do momentu kiedy prężność par w kropli zrówna się z prężnością par w zbiorniku. W przypadku czynników strącających takich jak sole, nielotne rozpuszczalniki organiczne (np. MPD) oraz polietylenoglikol proces równoważenia zachodzi w wyniku dyfuzji wody z kropli do zbiornika. Natomiast gdy czynnikiem strącającym jest związek lotny (prężność jego par jest większa od prężności par wody) proces ten zachodzi w odwrotnym kierunku (ze zbiornika do kropli). Zasada działania metody dyfuzji par jest taka sama w przypadku metody „kropli wiszącej”, „kropli siedzącej”, czy też kropli typu „sandwich”.

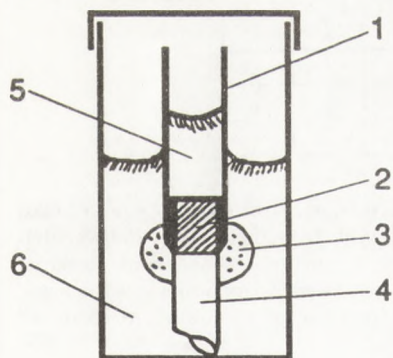
Metoda ta jest bardzo korzystna, gdyż pozwala na przeprowadzenie wielu prób krystalizacyjnych z małej ilości materiału, na optymalizację warunków krystalizacji oraz na otrzymanie dużych monokryształów.



Rys. 2. Schemat metody dyfuzji par: 1) – roztwór związku krystalizowanego (makrocząsteczki), 2) – roztwór czynnika strącającego (krystalizacyjnego), A) – pudełko krystalizacyjne stosowane w technice „kropli siedzącej”, B) – pudełko krystalizacyjne typu Linbro stosowane w technice „kropli wiszącej”.

### Metoda mikrodializy

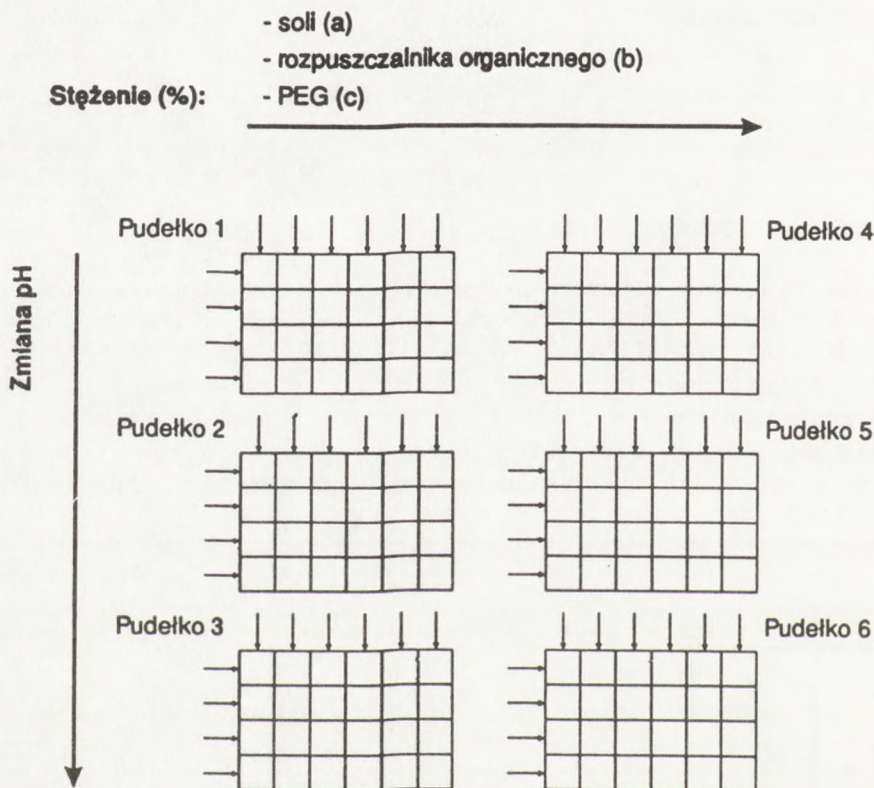
Zasada tej metody opisanej po raz pierwszy przez Zeppenauera (9) jest następująca: roztwór makrocząsteczki znajdujący się w szklanej kapilarze (10  $\mu$ l lub mniej) jest oddzielony od dużej objętości rozpuszczalnika półprzepuszczalną błoną, przez którą dyfundują małe cząsteczki (jony buforu, czynnika strącającego). Jest ona jednak nieprzepuszczalna dla makrocząsteczki, rys. 3. Dyfuzja poprzez błonę jest wolna i kontrolowana. Dużą zaletą tej metody jest to, że skład roztworu makrocząsteczki może być optymalizowany dla uzyskania kryształu i jego wzrostu drogą wymiany jedynie roztworów zewnętrznych.



Rys. 3. Schematyczne przedstawienie metody mikrodializy: 1 – szklana rurka, 2 – półprzepuszczalna błona, 3 – klej, 4 – rurka silikonowa, 5 – roztwór związku do krystalizacji (makrocząsteczki), 6 – roztwór czynnika strącającego (krystalizacyjnego).

## 4. Krystalizacja w praktyce

Pierwszymi parametrami krystalizacyjnymi, które przystępując do krystalizacji makrocząsteczki powinno się ustalić w pierwszym rzędzie są: stężenie używanych czynników strącających, optymalne pH oraz efekt temperaturowy. Na początek powinny być przetestowane takie czynniki strącające jak: siarczan amonu, izopropanol, MPD oraz PEG (400 – 4000 w zależności od związku krystalizowanego) jako przedstawiciele poszczególnych grup czynników strącających. Zakres pH 3,5 – 9,0; gdzie  $\Delta\text{pH} = 0,5$  powinien być uwzględniony dla makrocząstek biologicznych, szczególnie białek. Jednak zakres ten musi ulegać modyfikacji w poszczególnych przypadkach, w zależności od rodzaju makrocząsteczki. Wystarczy jeśli na początek zostaną przygotowane równolegle dwa zestawy pudełek z próbami krystalizacyjnymi w temp. 4° i 25°C, rys. 4. Jeśli już w pierwszej serii prób krystalizacyjnych powstaną kryształy,



Rys. 4. Metoda dyfuzji par w praktyce. Ustalanie wstępnych warunków krystalizacji technika „kropki wiszącej”, tj. wpływu stężenia czynnika strącającego (krystalizacyjnego) i pH (najważniejszych parametrów) na postęp procesu krystalizacji czy też wytrącania. Stosowane stężenia: (a) w zakresie 15 + 80% (roztworu nasyconego), (b) 5 + 60% i (c) 3 + 24% (roztworu nasyconego). Taki sam zestaw pudełek krystalizacyjnych typu Linbro powinien być przygotowany w temp. 4° i 22°C w celu uchwycenia efektu temperaturowego.



to po uściśleniu warunków krystalizacji są szanse na otrzymanie lepszych kryształów. Jeżeli natomiast w pierwszym etapie nie powstaną kryształy, musimy się zastanowić nad dodatkiem innych efektorów do następnej serii prób krystalizacyjnych. Zmiana metody krystalizacji np. z techniki „kropli wiszącej” na technikę „kropli siedzącej” może dać bardzo dobre rezultaty, mimo że wstępne warunki krystalizacyjne były takie same.

TABELA 4  
STRUKTURY OLIGONUKLEOTYDÓW ROZWIĄZANYCH DO KOŃCA 1991 ROKU

Nr	Forma	Z <sup>a</sup>	Sekwencja	Rozdzielczość (Å)	R (%) <sup>b</sup>
1	A	2	C <sup>5J</sup> CCGG	2,0	16,5
2	A	1	ACCGGCCGGT	2,0	18,0
3	A	2	GGGATCCC	2,5	16,6
4	A	1	GTACGTAC	2,25	18,4
5	A	1	GCCCCGGC	1,8	17,1
6	B	2	CGCGAATTCGCG	1,9	17,8
7	B	2	CGCATATATGCG	2,2'	18,7
8	B	2	CGCGAATTCGCG	2,7	15,1
9	B	2	CGCGAATT <sup>C5Br</sup> CGCG	3,0	17,3
10	B	2	CGCGAATT <sup>C5Br</sup> CGCG	2,3	21,6
11	B	1	CCAAGATTGG	1,3	18,5
12	B	2	CGCGA <sup>N6Me</sup> ATTCGCG	2,0	16,9
13	B	1	CCAGGCCTGG	1,6	16,0
14	B	2	CGTGAATTCACG	2,7	17,0
15	Z	2	CGCGCG	1,0	13,5
16	Z	2	C <sup>5Br</sup> <sub>CG</sub> C <sup>5Br</sup> <sub>CG</sub> C <sup>5Br</sup> <sub>CG</sub>	1,6	13,3
17	Z	2	C <sup>5Br</sup> <sub>CG</sub> C <sup>5Br</sup> <sub>CG</sub> C <sup>5Br</sup> <sub>CG</sub>	1,4	12,5
18	Z	2	CGCG <sup>C5F</sup> UG	1,5	17,2
19	Z	2	CGCG	1,5	21,0
20	Z	2	CGCGCG	0,9	14,0
21	Z	2	C <sup>C2NH2</sup> ACGTG	1,3	21,7
22	Z	2	CG	0,85	13,6
23	Z	2	CGC <sup>O6Me</sup> GCG	1,9	19,0
24	U	1	CGCGCGTTTTCGCGCG	2,1	20,0
25	U	1	ATAT	1,04	15,3
26	U	1	CG	0,91	6,0
27	U	2	CG	0,86	4,1
28	U	1	TT	1,14	13,1

a) Z — ilość cząsteczek w niezależnej części komórki elementarnej.

b) R — wskaźnik rozbieżności struktury określający zgodność między strukturą rzeczywistą a strukturą przypuszczalną.

Tabela 4 (10) zawiera sekwencje 28 dezoksynukleotydów, dla których otrzymano dobre kryształy, nadające się do dalszych badań strukturalnych, tj.

rozwiązania struktury metodą rentgenograficzną, dane do końca 1991 r. W tym czasie rozwiązano tylko jedną strukturę hybrydu RNA-DNA o sekwencji: r(GCG)d(TATACGC) (11) oraz dwie struktury rybonukleotydów, [rU(UA)<sub>6</sub>A]<sub>2</sub> (12) i [GGACUUCGGUCC]<sub>2</sub> (13), ponieważ tego typu związki są trudne w syntezie oraz bardzo trudno krystalizują w postaci kryształów nadających się do dalszych badań rentgenograficznych.

## Literatura

1. Ducruix A., Giegé R., (1992), *Crystallization of Nucleic Acids and Proteins*, Oxford University Press; Oxford, New York, Tokyo.
2. McPherson A., (1990), *Eur. J. Biochem.*, 189, 1-23.
3. Johnson C. D., Adolph K., Rosa J. J., Hall M. D., and Sigler P. B., (1970), *Nature*, 226, 1246 - 1247.
4. Giegé R., Moras D., and Thierry J. C., (1977), *J. Mol. Biol.*, 115, 91 - 96.
5. Kim S. H., Quigley G., Suddath F. L., McPherson A., Sneden D., Kim J. J., Weinzierl J., and Rich A., (1973), *J. Mol. Biol.*, 75, 421 - 428.
6. Dock A. C., Lorber B., Moras D., Pixa G., Thierry J. C., and Giegé R., (1984), *Biochemie*, 66, 179 - 201.
7. Wang A. H. J., Hakoshima T., van der Marel G. van Boom J. H., and Rich A., (1984), *Cell*, 37, 321 - 331.
8. Egli M., Williams L. D., Gao Q., and Rich A., (1991), *Biochemistry*, 30, 11388 - 11402.
9. Zeppenauer M., (1971), *Methods in Enzymology*, 22, 253.
10. Schneider B., Cohen, D., Berman H. M., (1992), *Biopolymers*, 32, 725 - 750.
11. Wang A. H. J., Fujii S., van Boom J. H., van der Marel G., van Boeckel S. A. A., and Rich A., (1982), *Nature*, 299, 601 - 604.
12. Dock-Bregeon A. C., Chevrier B., Podjarny A., Johnson J., de Bear J. S., Gough G. R., Gilham P. T., and Moras D., (1989), *J. Mol. Biol.*, 209, 459 - 474.
13. Holbrook S. R., Cheong Ch., Tinoco J., Kim S. H., *Nature*, 353, 579 - 581.

## Crystallization of nucleic acids

### Summary

Crystallization is the most important and challenging step in the determination of the structure of biomolecules and macromolecules by diffraction methods.

Macromolecules are extremely complex physical-chemical system whose properties vary as a function of many environmental influences such as temperature, pH, ionic strength and solvent composition. Therefore, a number of factors influencing macromolecule crystal growth ought to be considered. Despite of considerable interest in the approaches allowing for continuous monitoring and setting of crystal growth conditions, in practice, numerous trials ought to be performed in order to obtain appropriate crystals characterized by their optimal geometrical parameters, crystallographic symmetry, unit cell and, most importantly, their high resolution.

The vapour diffusion and the microdialysis methods are discussed as the most widely used crystallization methods of macromolecules.

### Key words:

crystallization, nucleic acids.

### Adres dla korespondencji:

Dorota A. Adamiak, Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, ul. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań.