

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**

**Přírodovědecká fakulta**

**Krystalizační studie tryptofan syntasy TrpB z *Psilocybe cubensis***

Bakalářská práce

**Anna Koutská**

Školitel: Mgr. Petra Havlíčková

Konzultant: Mgr. Barbora Kašáková, prof. Mgr. Ivana Kutá Smatanová, Ph.D.

*České Budějovice 2021*

## **Bibliografické údaje**

Koutská, A., 2021: Krystalizační studie tryptofan syntasy TrpB z *Psilocybe cubensis*. [Crystallization studies of tryptophan synthase TrpB from *Psilocybe cubensis*. Bc. Thesis, in Czech] – 68 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

## **Annotation**

This bachelor thesis is aimed at crystallization of tryptophan synthase TrpB from *Psilocybe cubensis*. This enzyme can be considered as the next candidate to support the production of *Psilocybin*, that can be used in studies of drugs curing depression. The focus of this thesis is to prepare the protein for crystallization and grow protein crystals to obtain diffraction data that can be further used for the following determination of its atomic structure.

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích dne 12.4.2021

.....

Anna Koutská

## **Poděkování**

Chtěla bych tímto poděkovat především své školitelce Mgr. Petře Havlíčkové za příkladné vedení bakalářské práce, ochotu, trpělivost a cenné rady při práci v laboratoři. Vděčím také svým konzultantkám Mgr. Barboře Kašákové a prof. Mgr. Ivaně Kuté Smatanové, Ph.D. za odborné vedení, povzbuzení a pomoc s praktickými experimenty.

Velké poděkování také patří mé rodině, příteli a přátelům za podporu během celého studia.

# Obsah

1 Úvod .....	1
1.1 Cíle práce .....	1
2 Literární přehled .....	3
2.1 Příprava proteinu pro krystalizaci .....	3
2.1.1 Klonování .....	3
2.1.2 Exprese proteinu .....	4
2.1.3 Purifikace .....	4
2.1.3.1 Chromatografie .....	5
2.1.3.1.1 Afinitní chromatografie .....	5
2.1.3.1.2 Iontově-výměnná chromatografie .....	6
2.1.3.1.3 Gelová chromatografie .....	7
2.1.4 Analýza čistoty a homogenity .....	8
2.1.4.1 Elektroforéza .....	8
2.1.4.1.1 SDS-PAGE .....	8
2.1.4.1.2 Nativní elektroforéza .....	10
2.1.4.1.3 Izoelektrická fokusace .....	10
2.1.4.2 Hmotnostní spektrometrie .....	11
2.1.4.3 Nukleární magnetická rezonance .....	11
2.2 Krystalizace .....	11
2.2.1 Princip krystalizace .....	12
2.2.2 Fázový diagram .....	13
2.2.3 Pre-krystalizační test .....	14
2.2.4 Krystalizační techniky .....	14
2.2.5 Faktory ovlivňující krystalizaci .....	17

2.2.6 Test krystalů.....	17
2.3 Tryptofan syntasa TrpB .....	18
2.3.1 Popis tryptofan syntasy TrpB .....	18
2.3.2 Rod Psilocybe .....	19
3 Materiály a metody.....	21
3.1 Transformační protokol BL21 .....	21
3.2 Exprese .....	21
3.3 Purifikace.....	22
3.3.1 Příprava pufrů na purifikaci.....	22
3.3.2 Ni-NTA afinitní chromatografie.....	23
3.3.3 Gelová chromatografie .....	23
3.4 Analýza čistoty a homogenity .....	24
3.4.1 Příprava 10 % gelu.....	24
3.4.2 SDS-PAGE elektroforéza .....	24
3.5 Krystalizace tryptofan syntasy TrpB .....	25
3.5.1 Pre-krystalizační test.....	25
3.5.2 Precipitační činidla .....	26
3.5.3 Screening pomocí krystalizačního robota.....	26
3.5.4 Optimalizace krystalizačních podmínek.....	28
3.5.5 Test krystalů.....	28
4 Výsledky.....	30
4.1 Transformace a exprese proteinu.....	30
4.2 Purifikace.....	31
4.3 SDS-PAGE elektroforéza .....	32
4.4 Výsledky krystalizace tryptofan syntasy TrpB.....	34

4.4.1 Pre-krystalizační test.....	34
4.4.2 Screening pomocí krystalizačního robota.....	35
4.4.3 Výsledky optimalizace ručně.....	37
4.4.4 Rentgenová difrakční analýza.....	38
5 Diskuze.....	39
6 Závěr.....	42
7 Seznam použité literatury.....	44
8 Seznam obrázků .....	52
9 Seznam tabulek .....	54
10 Přílohy .....	55

# Seznam zkratek

DNA – deoxyribonucleic acid

HEPES – N-2-hydroxyethylpiperazine-N-ethanesulfonic acid

His – histidine

IPTG – isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid

LB – lysogeny broth

MES – 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid

MME – monomethyl ether

MPD – 2,4-methyl pentanediol

Ni-NTA chromatografie – nickel-nitrilotriacetic acid

NMR – Nuclear magnetic resonance

PDB – The Protein Data Bank

PEG – polyethylene glycol

pH – potential/power of hydrogen

pI – isoelectric point

PLP – pyridoxal phosphate

RNA – ribonucleic acid

SDS-PAGE – sodium dodecylsulphate-polyacrylamide gel electrophoresis

SOC Medium – Super Optimal broth with Catabolite repression

Tris – 2-Amino-2-(hydroxymethyl)propane-1,3- diol

## **Aminokyseliny:**

Ala (A) - alanin

Arg (R) – arginin

Asn (N) – asparagin

Asp (D) – k. asparagová

Cys (C) – cystein

Gln (Q) – glutamin

Glu (E) – k. glutamová

Gly (G) – glycin

His (H) – histidin

Ile (I) – izoleucin	Leu (L) – leucin	Lys (K) – lysin	
Met (M) – methionin	Phe (F) - fenylalanin	Pro (P) - prolin	
Pyl (O) - pyrolysin	Sec (U) – selenocystein	Ser (S) - serin	
Thr (T) – threonin	Trp (W) – tryptofan	Tyr (Y) - tyroxin 70	Val (V) - valin



# 1 Úvod

Tryptofan syntasa, která pochází z *Psilocybe cubensis*, je zajímavým a důležitým kandidátem na podporu produkce *Psilocybinu*. Několik studií již potvrdilo, že by se *Psilocybin* mohl využívat při léčbě depresí u pacientů s dlouhodobým onemocněním [1]. Z těchto důvodů je důležité zajímat se o atomární strukturu a nadále i funkci tryptofan syntasy TrpB z rodu *Psilocybe*.

V posledních letech se ke zjišťování struktury makromolekul nejvíce používá metoda rentgenové difrakční analýzy. K této metodě je potřeba vypěstovaný krystal studovaného proteinu. Právě proces krystalizace je obtížný a nejvíce časově náročný krok při strukturní analýze proteinu. Je nutné nejdříve připravit protein pro krystalizaci a následně optimalizovat podmínky pro krystalizaci tak, aby byl vypěstován krystal, který bude vhodný pro rentgenovou difrakční analýzu [2].

Teoretická část této bakalářské práce se obecně zabývá přípravou proteinu pro krystalizaci, jednotlivými metodami, jak správně a efektivně namnožit a vyčistit protein a jak čistotu proteinu posléze otestovat. Poté se zabývá obecnou krystalizační teorií, základními krystalizačními technikami a testy krystalů. Nakonec teoretická část obsahuje kapitulu o studovaném proteinu – tryptofan syntase TrpB a o rodu, ze kterého tato tryptofan syntasa pochází, *Psilocybe cubensis*.

V praktické části je popsán postup přípravy proteinu od klonování, přes expresi a purifikaci, až k analýze čistoty proteinu. Nakonec je zde uveden proces krystalizace tryptofan syntasy TrpB, postup jednotlivých krystalizačních experimentů a jejich výsledky.

## 1.1 Cíle práce

Cíle práce pro bakalářskou práci byly následující:

1. Zvládnout základní a pokročilé krystalizační metody na modelovém proteinu
2. Vypurifikovat protein TrpB za pomoci standardních chromatografických metod
3. Charakterizovat studovaný protein a nalézt krystalizační podmínky pro přípravu proteinových krystalů TrpB

4. Optimalizovat krystalizační podmínky a připravit krystaly proteinu TrpB v difrakční kvalitě
5. Otestovat připravené krystaly a pokusit se získat difrakční data

# 2 Literární přehled

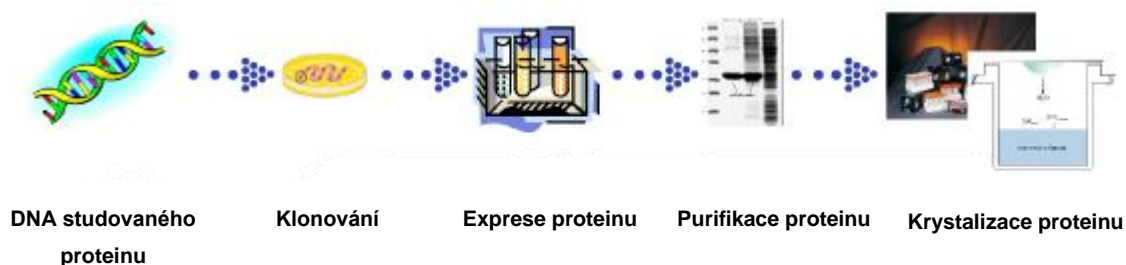
## 2.1 Příprava proteinu pro krystalizaci

Příprava proteinu je důležitým krokem před zahájením vlastní krystalizace, který může významně rozhodovat o tom, jak snadno bude následně protein krystalizovat [3]. Základní představu o chování nově studovaného proteinu poskytne odborná literatura ještě před samotnou prací v laboratoři.

V laboratoři se provádí několik základních kroků pro přípravu proteinu pro krystalizaci o co nejvhodnější kvalitě:

- 1) Čištění ze zdroje nebo klonování
- 2) Exprese
- 3) Purifikace
- 4) Hledání podmínek krystalizace

Bakalářská práce se zaměřuje na tyto kroky. Přehledné schéma jednotlivých kroků, které mohou vést k úspěšné krystalizaci, je zobrazeno na Obrázku 1.



Obrázek 1: Schéma přípravy proteinu pro krystalizaci (upraveno z [4]).

### 2.1.1 Klonování

Klonování je soubor experimentálních metod v molekulární biologii, kdy se namnoží úsek DNA do velkého množství klonů. Klon je soubor identických molekul nebo buněk odvozených z původní molekuly [5]. Klonování se používá k sestavení molekul rekombinantní DNA a k řízení jejich replikace v hostitelských organismech [6].

Proces klonování probíhá tak, že se nejdříve vloží segment DNA do klonovacího vektoru, tím vznikne rekombinantní molekula DNA, která se následně pomnoží v hostitelském organismu [5].

## 2.1.2 Exprese proteinu

Expresa proteinu slouží k získání většího množství studovaného proteinu. Rekombinantní protein se získá pomocí několika kroků, gen je v expresním vektoru transformován na hostitele a indukován. Po těchto krocích už je protein připraven k purifikaci [7].

Expresní vektor je obvykle plazmid, který podporuje expresi do něj vložených cizorodých DNA, tuto expresi umožňuje pomocí regulačních sekvencí [5].

Volba hostitelského systému je klíčem k úspěšné produkci rekombinantního proteinu. Mezi tyto hostitelské systémy patří bakterie, kvasinky, vláknité houby, savčí a hmyzí buňky. Každý hostitelský systém má svoje výhody a nevýhody a výběr systému závisí na studovaném proteinu [8; 9]. Nejčastěji používaným hostitelským systémem je *Escherichia coli*. Jeho hlavní výhodou je velmi rychlá kinetika růstu [10], velká produkce proteinu a nízké výrobní náklady. Naopak nevýhoda systému je absence eukaryotických posttranslačních modifikací a tvorba inkluzních tělísek. Inkluzní tělíška jsou obvykle špatně poskládané rekombinantní proteiny, které následně ztrácejí svoji funkci [11].

## 2.1.3 Purifikace

Purifikace je proces čištění, jehož cílem je získání vzorku proteinu, který obsahuje jen studovaný protein [12]. Protein musí být co nejvíce homogenní, čím vyšší homogenita vzorku, tím je vyšší pravděpodobnost úspěšné krystalizace. Přítomné drobné nečistoty mohou ovlivňovat nebo dokonce bránit krystalizaci [13].

Nicméně nelze k purifikaci všech proteinů použít jen jednu metodu. Proteiny se liší velikostí, nábojem, rozpustností nebo specifickou vazebnou afinitou, všechny tyto vlastnosti ovlivňují výběr metody [14]. Obvykle se neprovádí jen jedna metoda, ale série jednotlivých metod, z nichž je každá založena na jiném principu separace, vedoucí k získání čistého proteinu [12]. Nejběžnější metody pro purifikaci proteinů zahrnují chromatografii [15].

### **2.1.3.1 Chromatografie**

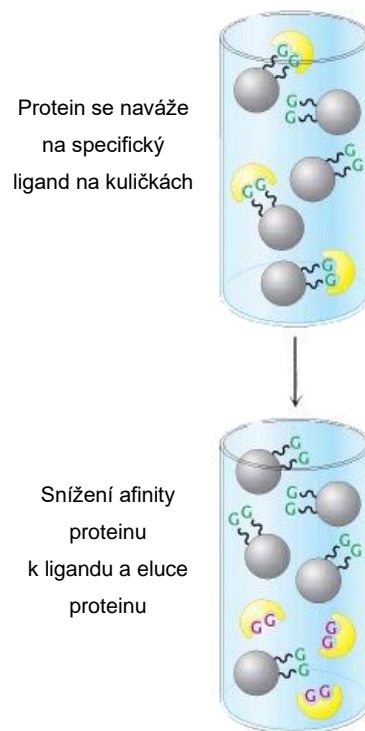
Chromatografie je biofyzikální metoda, pomocí které provádíme separaci, identifikaci a purifikaci směsi látek. Chromatografie je založena na principu dělení směsi látek mezi dvěma fázemi, stacionární fází, která je upevněna na koloně, a mobilní fází. Podle typu interakce rozdělujeme chromatografii na různé separační techniky [16]. Mezi základní techniky používané pro purifikaci proteinů je afinitní, iontově-výměnná a gelová chromatografie.

#### **2.1.3.1.1 Afinitní chromatografie**

Afinitní chromatografie využívá schopnosti proteinu, který se dokáže specificky vázat na jinou molekulu. Na kuličky v koloně jsou kovalentně navázány molekuly ligandu, které se specificky vážou na požadovaný protein. Na koloně se tedy zadrží pouze proteiny, které se navážou na ligand, ostatní proteiny protečou kolonou bez zadržení [14]. Ligandy mohou být biologické molekuly jako například peptidy, protilátky nebo nukleonové kyseliny nebo také mohou využívat nescifické interakce s lektiny, barvivy nebo hydrofobními skupinami [17].

Proteiny, které jsou navázány na ligand v koloně, se poté dostanou z kolony pomocí eluce. Eluce vede ke snížení afinity proteinu k ligandu pomocí přidání nadbytku ligandu, změnou koncentrace soli nebo změnou pH [14].

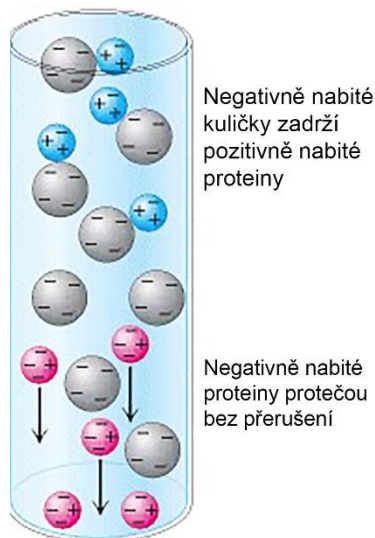
Mezi typy chromatografie, které se používají pro čištění rekombinantních proteinů, patří Ni-NTA afinitní chromatografie, která je založena na vazbě šesti po sobě jdoucích histidinových zbytků (6xHis) na imobilizovaných iontech niklu. Tato interakce je velmi selektivní a umožňuje čištění proteinů pouze v jednom kroku. Protein se poté dá velmi jemně eluovat z kolony pomocí kompetice s imidazolem [18].



Obrázek 2: Schéma afinitní chromatografie (upraveno z [12]).

### 2.1.3.1.2 Iontově-výměnná chromatografie

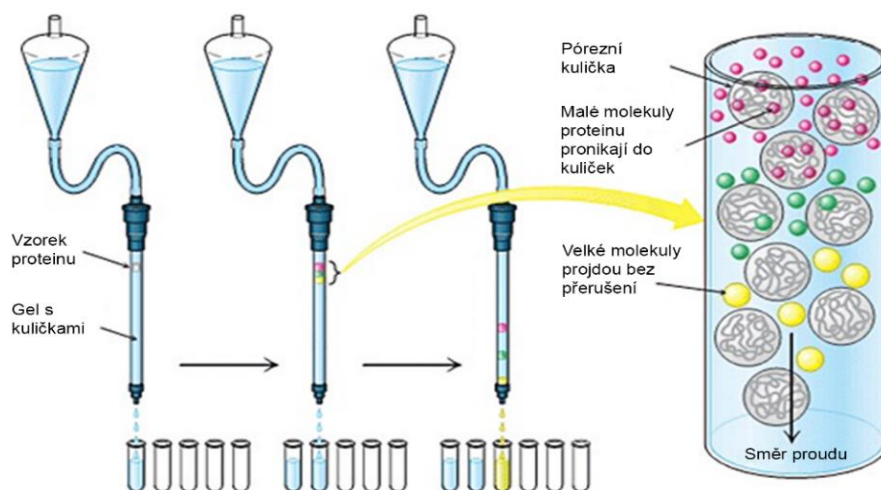
V iontově-výměnné chromatografii se proteiny oddělují na základě jejich rozdílných nábojů. Směs proteinů obsahuje různé náboje při daném pH, proto když protein protéká kolonou, která obsahuje kladně nabitě kuličky, zadrží se na koloně jen proteiny s negativním nábojem, protein s neutrálním nebo kladným nábojem proteče bez přerušení [14]. Pro použití iontově-výměnné chromatografie je nutné znát izoelektrický bod proteinu [17]. Izoelektrický bod pI proteinu určuje hodnotu pH, při kterém má protein nulový povrchový náboj [15], při této hodnotě by měla být prováděna iontově-výměnná chromatografie [17].



Obrázek 3: Schéma iontově-výměnné chromatografie (upraveno z [12]).

### 2.1.3.1.3 Gelová chromatografie

Při použití gelové chromatografie se proteiny separují jen na základě velikosti. Kolona je tvořena porézními kuličkami [12], které jsou nejčastěji vyrobeny z polyakrylamidu, dextranu nebo agarózy [14]. Do jednotlivých otvorů mohou vniknout malé molekuly proteinu, z tohoto důvodu se daleko déle zadrží na koloně než velké molekuly proteinu. Velké molekuly tedy protékají kolonou daleko rychleji, protože jsou pouze v roztoku, a vytékají z kolony jako první [12].



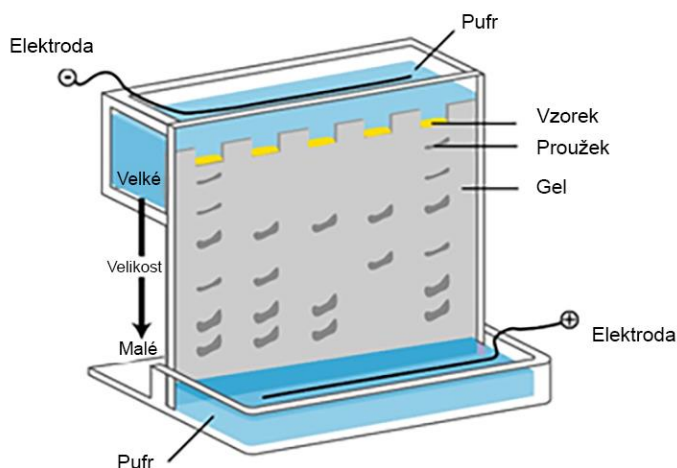
Obrázek 4: Schéma gelové chromatografie (upraveno z [12]).

## 2.1.4 Analýza čistoty a homogenity

Analýza kvality vyčištěného proteinu je konečným a zásadním bodem procesu produkce proteinu [19]. Nejčastěji používané metody pro analýzu čistoty jsou různé typy elektroforézy, hmotnostní spektrometrie nebo nukleární magnetická rezonance.

### 2.1.4.1 Elektroforéza

Jednou z nejpoužívanějších metod je elektroforéza [20], která je založena na pohybu proteinů s nábojem v elektrickém poli [12]. Elektroforéza poskytuje informace jak o velikosti proteinu, ale také zda jsou v proteinu přítomny nějaké nečistoty. Tato analýza může probíhat buď za denaturujících podmínek (např. SDS-PAGE) nebo za nendenaturujících podmínek (např. nativní elektroforéza) [20]. Denaturace proteinů znamená narušení kvartérní, terciární i sekundární struktury proteinů [21].



Obrázek 5: Schéma elektroforézy (upraveno z [22]).

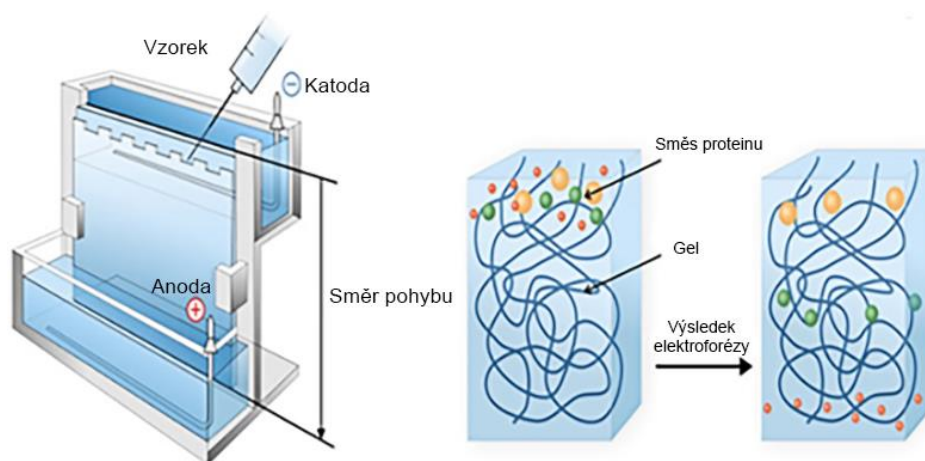
#### 2.1.4.1.1 SDS-PAGE

Nejrozšířenější denaturující metoda pro hodnocení čistoty proteinů je SDS-PAGE elektroforéza. Proteiny se nejdříve denaturují pomocí dodecylsulfátu sodného (SDS) [19], který se váže na hydrofobní části proteinu a tím narušuje proteinovou strukturu a zároveň umožňuje proteinu existovat v roztoku ve stabilní formě [17]. Navázáním SDS denaturovaný protein získá negativní náboj, který je mnohem větší než náboj nativního proteinu a je zhruba úměrný hmotnosti proteinu. Někdy se ke vzorku přidává  $\beta$ -merkaptoethanol nebo dithiotreitol, tyto látky redukují disulfidické můstky, čímž napomáhají denaturaci proteinu [12].



Při SDS-PAGE se používá polyakrylamidový gel, který se připravuje radikálovou polymerací akrylamidu se zesilovacím činidlem bisakrylamidem. Polymerace neprobíhá spontánně, probíhá pouze v přítomnosti volných radikálů a katalyzátoru. Jako iniciátor polymerace se používá persíran amonný (APS), při jehož rozkladu vznikají volné radikály. Vzniklé volné radikály jsou stabilizovány pomocí katalyzátoru tetramethylethylendiaminu (TEMED) [23].

Proteiny s nízkou molekulovou hmotností se pohybují gelem rychleji, naopak velké proteiny zůstávají poblíž místa, kde se směs aplikovala. Rychlost migrace proteinu je ovlivněna velikostí póru v gelu a silou elektrického pole [14].



Obrázek 6: Schéma SDS-PAGE elektroforézy (upraveno z [24]).

Nejběžnější způsoby vizualizace proteinů v polyakrylamidových gelech jsou pomocí Comassie blue a stříbra, které se vážou na proteiny. Barvení pomocí Comassie blue je jedna z nejvíce používaných metod, protože je to rychlý, jednoduchý a levný způsob barvení. Comassie blue se váže nespecificky na všechny proteiny. Následné odbarvení poté eliminuje pozadí a na gelu zůstávají proteinové pásy a gel je možné zdokumentovat [25]. Nevýhodou techniky je nicméně její detekční limit, který je pouze zhruba 100 ng [26] a nízká reprodukovatelnost [27].

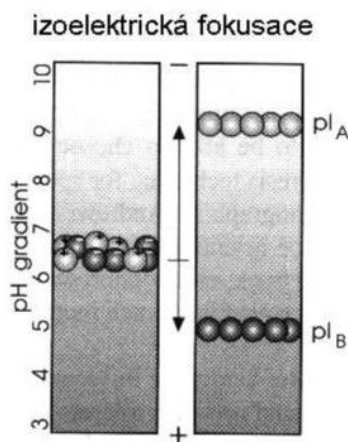
Naopak barvení pomocí stříbra je jednou z nejcitlivějších metod barvení, dokáže detekovat až 1 ng proteinu [26]. Barvení stříbrem je založeno na vazbě proteinů s ionty stříbra. Tyto ionty stříbra se ve vyvolávacím roztoku redukují na kov stříbra, který pak vytváří viditelný obraz. Barvení pomocí stříbra je ale poměrně časově i pracně náročnější proces než barvení pomocí Comassie blue, proto toto barvení není tak populární [27].

### 2.1.4.1.2 Nativní elektroforéza

Nativní gelová elektroforéza probíhá za nedenaturačních podmínek a rozděljuje proteiny podle jejich velikosti a náboje [17]. Elektrický náboj proteinu závisí na jeho aminokyselinovém složení a posttranslačních modifikacích [28]. Protein, který má větší náboj při daném pH, se pohybuje v gelu rychleji. Nejčastěji používaná hodnota pH při nedenaturačních podmínkách je 8,8, při které má většina proteinů negativní náboj. Je důležité pracovat při takovém pH, aby to nepoškodilo studovaný protein [17]. Vzhledem k tomu, že protein nedenaturuje a zachovává si svojí terciární či kvartérní strukturu, jeho velikost bude také ovlivňovat mobilitu na gelu, čím složenější struktura, tím se bude protein pohybovat na gelu rychleji. Z těchto důvodů je nativní elektroforéza citlivá na jakýkoliv proces, při kterém protein mění náboj nebo konformaci [28]. Následné barvení gelů je stejné jako u SDS-PAGE pomocí Comassie blue nebo pomocí stříbra.

### 2.1.4.1.3 Izoelektrická fokusace

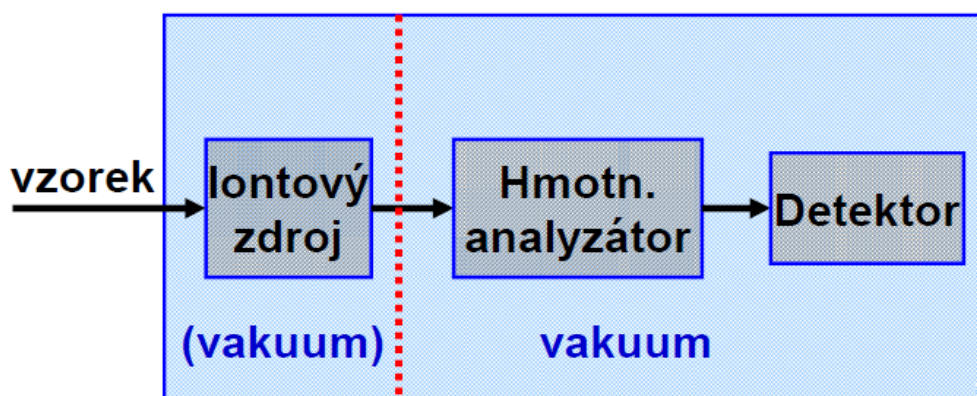
Dalším typem elektroforézy je izoelektrická fokusace, která separuje proteiny na základě jejich relativního obsahu kyselých a bazických zbytků při gradientu pH, který se vytvoří pomocí elektrického pole. Při izoelektrické fokusaci se rozlišují proteiny podle jejich izoelektrického bodu pI, při této hodnotě pH se protein v gelu nepohybuje. Každý protein se tedy bude pohybovat při gradientu pH v gelu, dokud nedosáhne polohy, ve které je pH rovná izoelektrickému bodu. Izoelektrická fokusace dokáže rozlišit i proteiny, které se liší v pI až o 0,01 [12].



Obrázek 7: Schéma izoelektrické fokusace (převzato z [29]).

## 2.1.4.2 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je analytická metoda, která rozděluje proteiny podle jejich poměru hmotnosti a náboje ( $m/z$ ). Pomocí hmotnostní spektrometrie lze stanovit molekulovou hmotnost neznámého proteinu nebo lze zjistit strukturní a chemické vlastnosti již známého proteinu. Hmotnostní spektrometr se skládá ze tří částí: iontový zdroj, hmotnostní analyzátor a detektor iontů. Iontový zdroj převádí neutrální molekuly na ionty v plynné fázi pomocí ionizace. Ihned po ionizování molekul se v hmotnostním analyzátoru rozdělí podle poměru hmotnosti a náboje. Oddělené ionty jsou poté detekovány a ze získaných informací se sestaví hmotnostní spektrum [30].



Obrázek 8: Schéma hmotnostní spektrometrie (převzato z [31]).

## 2.1.4.3 Nukleární magnetická rezonance

Nukleární magnetická rezonance (NMR) se používá ke studování vnitřních spinových vlastností atomových jader [32]. Při NMR je koncentrovaný roztok obsahující protein umístěn do magnetického pole, kde jsou měřeny účinky rozdílných rádiových frekvencí na rezonanci různých atomových jader. Tato technika se většinou používá k určování struktur malých proteinů. Velkou výhodou NMR je, že není nutné mít vypěstovaný krystal a lze měřit protein v roztoku, nicméně je tato technika omezena na proteiny, které jsou menší než přibližně 20 kDa [14].

## 2.2 Krystalizace

V dnešní době je velice důležité znát trojrozměrnou strukturu makromolekulárních látek, zjištěná struktura se používá k objasňování vnitřního fungování makromolekuly v živé buňce. Jednou z nejvyužívanějších technik k určování struktury proteinů je

rentgenová krystalografie. Pro studium proteinu za využití rentgenové krystalografie je nutné vypěstovat krystal pomocí procesu krystalizace [33].

Principem krystalizace je hledání individuálních podmínek a parametrů, které následně ovlivňují vznik makromolekulárních krystalů. Tyto podmínky se musí optimalizovat tak, aby byl získán kvalitní krystal, který se nadále použije pro difrakční experiment [34]. Krystalizace proteinu vyžaduje pomalé převedení proteinu do vysokého stupně přesycení. Použitý vzorek by tedy měl být koncentrován na nejvyšší možnou úroveň, ale zároveň nesmí docházet k jeho agregaci nebo vysrážení [33].

### 2.2.1 Princip krystalizace

Proces krystalizace je definován následujícími kroky: nukleací, růstem krystalů a zastavením růstu krystalů [35]. V průběhu nukleace se adekvátní množství proteinu sdružuje a po překročení limitu nasycení vytvoří stabilní agregát. Agregát je kritické jádro, které poskytuje povrch vhodný pro růst krystalů [35]. Nukleaci je možné podpořit zavedením vzorku do precipitačního činidla [33].

Po nukleaci nastává růstová fáze, která je řízena difúzí částic na povrch agregátu a jejich uspořádání v rostoucí krystal. Interakce, které vedou k tvorbě proteinových krystalů, jsou vysoce specifické a organizované tak, aby podpořily tvorbu trojrozměrné krystalové mřížky [35]. Krystal, vhodný pro strukturní analýzu, se tvoří z malého množství krystalických jader, které zvětšují svoje rozměry nezávislou rychlostí a ideálně bez defektů [34]. Pokud dojde k vyčerpání proteinových molekul, dochází k ukončení růstu krystalů [35].

Vypěstované krystaly proteinů se skládají v průměru ze zhruba 50% rozpouštědla, tato hodnota se liší v závislosti na konkrétním proteinu, zbytek krystalu tvoří protein. Dá se tedy říct, že krystal proteinu je uspořádaný gel, v jehož intersticiálních kanálcích volně difunduje rozpouštědlo nebo jiné malé molekuly [2].

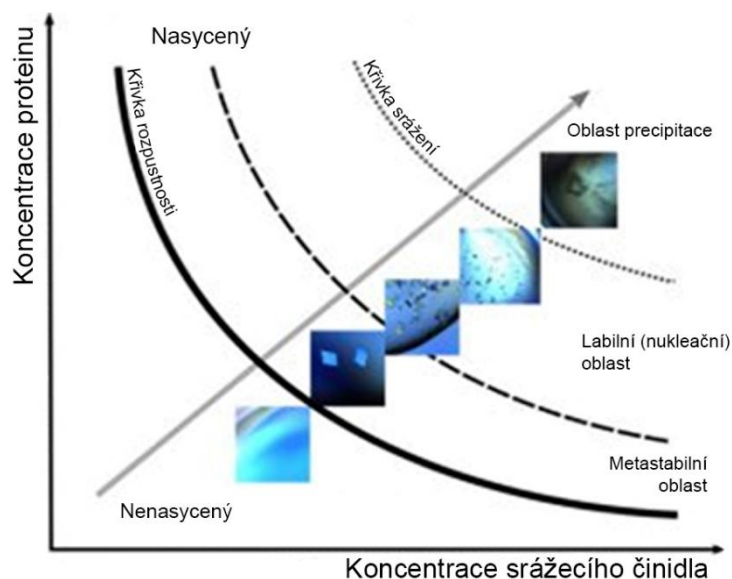
Zda protein vykrytalizuje do vhodného krystalu, určují jeho vlastnosti, hlavně čistota a homogenita. V některých případech může protein vytvořit velké množství mikrokystalů nebo naopak velké multikrystalické agregáty, většinou postačí jen nepatrná modifikace experimentálních podmínek, aby vznikl krystal vhodný ke strukturní analýze. V opačných situacích, kdy roztok zůstane čirý nebo vytvoří nekrytalické gely či amorfní precipitace, je nutná kompletní modifikace podmínek [34].

## 2.2.2 Fázový diagram

Fázový diagram je graf, který představuje stav vzorku v závislosti na okolních podmínkách. Tento graf může být funkcí všech proměnných v systému, nicméně u proteinového roztoku se jako proměnné nejvíce používají koncentrace proteinu a precipitačního činidla, teplota nebo jiné vlastnosti rozpouštědla [36].

Krystalizace makromolekul vyžaduje, aby se protein dostal do přesyceného stavu. Ve stavu přesycení je v roztoku přítomna určitá koncentrace proteinu, která přesahuje mez rozpustnosti [2]. Rozpustnost proteinu závisí na složení aminokyselin proteinu a na okolních fyzikálně-chemických podmínkách, např. pH, teplota nebo přítomnost jiného roztoku [17].

Fázový diagram růstu krystalů se rozděluje na tři oblasti podle úrovně přesycení. Nejvyšší úroveň přesycení, označována také jako oblast precipitace, je oblast, kde molekuly vytváří amorfni agregáty (precipitaci). Ve střední úrovni přesycení („labilní nebo nukleační“) dochází k růstu a nukleaci jader. V nejnižší úrovni („metastabilní“) je růst pouze podporován [35]. Pokud je roztok nenasycený, protein se nebude srážet a kapka zůstane čirá [33]. Nejlepší postup pro vznik krystalu je vyvolání nukleace v labilní oblasti, poté co se vytvoří jádra a koncentrace proteinu klesne, systém se tedy dostane do metastabilní oblasti, kde dochází k pomalému růstu [35]. Fázový diagramu a jednotlivé oblasti nasycení proteinu zobrazuje Obrázek 9.



Obrázek 9: Fázový diagram růstu krystalů (upraveno z [37]).

### 2.2.3 Pre-krystalizační test

Pro úspěšnou krystalizaci je potřebné stanovit vhodnou koncentraci proteinu tak, aby krystalizace nevedla ke sraženinám nebo naopak čistým kapkám. Ke stanovení koncentrace se používá pre-krystalizační test. Optimalizace koncentrace proteinu před krystalizací vede k efektivnějšímu využití proteinu a zvýšení šance na krystalizaci, protože dochází v menší míře k negativním výsledkům [13].

Nejčastěji se používá PCT (*Pre-Crystallization Test*) test od Hampton Research (USA), který obsahuje 4 činidla k hodnocení koncentrace proteinu. Nejdříve se vyhodnotí reakce proteinu se dvěma činidly, pokud je protein citlivý na koncentraci soli nebo polymerů, vyhodnotí se poté pomocí zbylých dvou činidel. Výsledky PCT poté naznačí, zda je koncentrace vhodná pro krystalizaci nebo by mělo být provedeno ředění, koncentrování nebo testování homogenity vzorku [13].

### 2.2.4 Krystalizační techniky

Krystalizační techniky slouží pro převedení proteinu do stavu přesycení. Těchto technik existuje v dnešní době velké množství a navzájem se liší tím, jakým způsobem je dosaženo stavu přesycení. Mezi nejvíce používané techniky patří techniky založené na difúzi par, dávková krystalizace nebo dialýza [38], tyto metody jsou více popsány v Tabulce I.


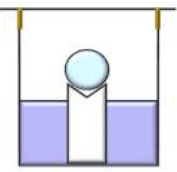
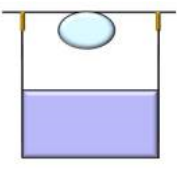
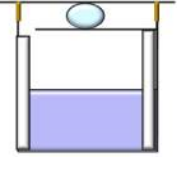
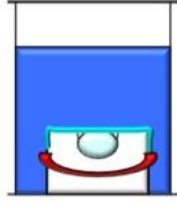
Nejstarší technika je technika dávkové krystalizace. Již na začátku pokusu je koncentrace proteinu větší než koncentrace precipitačního činidla, tím pádem je protein přesycený a nachází se v labilní oblasti fázového diagramu. Přesycení proteinu je natolik velké, aby mohla být zahájena nukleace. Růstem krystalů dochází ke snižování úrovně přesycení a systém se dostává do metastabilní oblasti. Po celou dobu pokusu se koncentrace precipitačního činidla nemění [38]. Tato technika se v dnešní době často provádí pod směsí parafinového a silikonového oleje, podle poměru jednotlivých olejů se ovlivňuje vypařování vody z kapky [39].

Na začátku krystalizace pomocí difúze par se kapka proteinu s precipitačním činidlem umístí nad rezervoár s precipitačním činidlem a izoluje od okolního prostředí [39]. V této směsi je protein nenasycený. Díky vypařování se v průběhu zmenšuje objem kapky, tudíž se zvyšuje koncentrace proteinu a precipitačního činidla. Protein se tedy

dostává do stavu přesycení a začíná nukleace. Koncentrace precipitačního činidla se zvyšuje, dokud se nedosáhne rovnováhy mezi kapkou a rezervoárem [38].

Při dialýze je protein v komoře oddělený od precipitačního činidla semipermeabilní membránou, která je propustná pouze pro sůl, a ne pro biologické makromolekuly. Činidlo se pomalu vypařuje a prostupuje přes membránu k proteinovému roztoku. Koncentrace precipitačního činidla se tedy v komoře zvyšuje [38], dokud nevytvoří koncentrační gradient (tzv. oblast lokálního přesycení). Protein se tedy zakoncentrovává a dochází k nukleaci [34]. Objem kapky proteinu zůstává po celou dobu konstantní [38].

Tabulka I: Nejpoužívanější krystalizační techniky (Obrázky převzaty z [35]).

Název techniky	Podtechnika	Umístění kapky	Obrázek	Výhody	Nevýhody
Dávková krystalizace ( <i>Batch method</i> )	Mikrokrystalizace pod olejem ( <i>Microbatch under oil</i> )	Pod tenkou vrstvou interního oleje		Rychlost, jednoduchost, ochrana krystalu před vysušením, malý objem proteinu	Rychlost ustanovení rovnováhy může ovlivnit růst a kvalitu krystalů
Difúze par ( <i>Vapor diffusion</i> )	Sedící ( <i>Sitting drop</i> )	Na podložce nad rezervoárem		Rychlost, jednoduchost, cena, stabilní poloha vsedě, kompatibilita s gely	Riziko přilnutí krystalů k povrchu a následná obtížná manipulace
	Visící ( <i>Hanging drop</i> )	Na spodní stranu krycího sklíčka nad rezervoár		Rychlost, jednoduchost, cena, snadný přístup ke krystalům, možnost více pokusů zároveň	Omezený objem kapky
	Sendvičová ( <i>Sandwich drop</i> )	Mezi dvě krycí sklíčka nad rezervoár		Menší exponovaná plocha kapky, menší rychlost ustavení rovnováhy	Časová náročnost
Dialýze ( <i>Dialysis</i> )	Mikrodialýza ( <i>Microdialysis</i> )	Do malého knoflíku pokrytého dialyzační membránou do srážecího roztoku		Snadná změna koncentrace rezervoáru, modulovat rychlost ustanovení rovnováhy	Nelze použít koncentrované roztoky PEG

V některých případech použití základních krystalizačních technik nestačí a je nutné použít pokročilé krystalizační techniky. Mezi tyto techniky patří například metoda volné difúze (*Free Interface Diffusion Method*), krystalizace v gelech (*Crystallization in Gels*) nebo „*Gel Acupuncture Method*“ (GAME). V alternativních případech se provádí technika očkování (*Seeding techniques*), při kterém se do přesyceného roztoku zavádí již vypěstovaný krystal nebo krystalizační jádra, aby se zvýšila kvalita krystalu [2].



## 2.2.5 Faktory ovlivňující krystalizaci

Proteiny jsou velice senzitivní na změnu jakéhokoliv vnějšího faktoru při krystalizaci. Jakákoliv změna může ovlivnit vznik krystalu, nukleaci a růst nebo i jeho konečnou velikost a kvalitu [2]. Z těchto důvodů je nutné při krystalizaci udržovat tyto faktory konstantní [34]. V Tabulce II jsou uvedeny základní faktory chemické, fyzikální a biochemické.

Tabulka II: Základní faktory ovlivňující krystalizaci (upraveno z [2]).

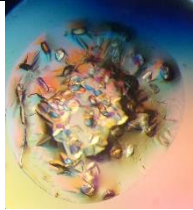

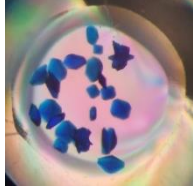
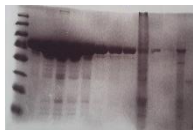
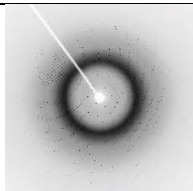
<b>Fyzikální</b>	<b>Chemické</b>	<b>Biochemické</b>
Teplota	pH	Čistota makromolekuly
Cesta k rovnováze	Iontová síla	Ligandy, inhibitory
Objem matečného louhu	Typ kationtu a koncentrace	Posttranslační modifikace
Gravitace	Typ aniontu a koncentrace	Zdroj makromolekuly
Tlak	Stupeň přesycení	Chemické modifikace
Čas	Redukční/oxidační prostředí	Genetické modifikace
Vibrace	Koncentrace makromolekuly	Stupeň denaturace
Elektrostatické a magnetické pole	Kovové ionty	Izoelektrický bod
Viskozita média	Detergenty	Tepelná stabilita

## 2.2.6 Test krystalů

V případě úspěšného vypěstování krystalu je nutné zjistit, zda se jedná o krystal proteinu nebo soli. Pokud je koncentrace soli v kapce nižší, než je její přesycení, ve většině případů sůl nekrystalizuje a jedná se tedy o krystal proteinu, ale v některých případech je koncentrace soli vysoká nebo se v průběhu pokusu zvýší a může dojít ke vzniku krystalu soli [17].

Prvním ukazatelem, zda se jedná o krystal proteinu nebo soli, může být rychlost vzniku krystalu. Krystaly soli rostou velice rychle, naopak krystal proteinu většinou roste týdny až měsíce [17]. Proteinové krystaly jsou ve srovnání s krystaly soli obvykle menší velikosti. Dalším rozdílem mezi krystaly proteinu a soli je jejich vnitřní uspořádání, proteinové krystaly obsahují spoustu intersticiálních kanálků, naopak krystaly soli mají pevnou krystalickou mřížku. Na tomto rozdílu je založeno mnoho metod testování krystalů [2], základní testy jsou uvedeny v Tabulce III.

Tabulka III: Test krystalů (Obrázek 10, 12, 13 pořízeno autorkou, Obrázek 11, 14 převzat z [13]).

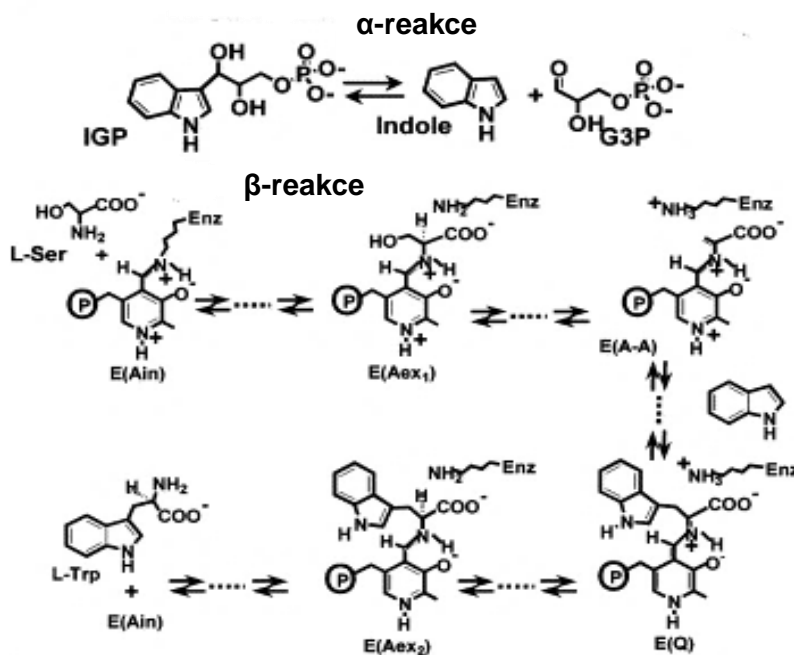
Název testu	Princip	Výsledek pro krystal proteinu	Krystal proteinu	Krystal soli
<i>Crush test</i> (Drcení)	Drcení krystalu pomocí jehly	 Obrázek 10: Crush test	Rozpad na mnoho malých kousků bez použití větší síly	Rozpad na pár kusů s vyvinutím větší síly
Dehydratace	Ponechání krystalu na vzduchu	 Obrázek 11: Dehydratace	Rozpadnutí, vyschnutí	Neporušený dehydratovaný krystal
<i>Dye test</i> (Barvení)	Přidání barviva obsahující malé molekuly ke krystalu	 Obrázek 12: Dye test	Prostoupení molekul barviva do kanálek krystalu a obarvení	Žádná absorpce barviva krystalem
SDS-PAGE elektroforéza	Analýza pomocí SDS-PAGE elektroforézy	 Obrázek 13: SDS-PAGE elektroforéza	Band v oblasti molekulové hmotnosti proteinu	Žádný band, projde bez zachycení
Rentgenová difrakční analýza	Určení krystalů na základě naměřených hodnot při RTG analýze	 Obrázek 14: Rtg. Difra. Analýza	Velký počet difrakcí v soustředných kruzích	Malý počet difrakcí

## 2.3 Tryptofan syntasa TrpB

### 2.3.1 Popis tryptofan syntasy TrpB

Tryptofan syntasa je bi-enzymový komplex, který se obvykle vyskytuje jako tetramer  $\alpha_2\beta_2$  a který katalyzuje poslední dva kroky biosyntézy tryptofanu v bakteriích, kvasinkách, plísních nebo rostlinách [40]. Uspořádání  $\alpha$  a  $\beta$  – podjednotek je vždy lineárním způsobem  $\alpha\beta\beta\alpha$ , aktivní centra každé  $\alpha$  a  $\beta$ -dimerní jednotky jsou propojeny tunelem dlouhým 25 Å [41]. Podrobné reakční schéma  $\alpha$  a  $\beta$ -reakcí je zobrazeno

na Obrázku 15.  $\alpha$ -podjednotka katalyzuje štěpení indol-glycerol-fosfátu (IGP) na indol a glyceraldehyd-3-fosfát (G3P). V  $\beta$ -podjednotce je indol kondenzován s L-serinem na L-tryptofan a vodu v reakci závislé na pyridoxal-5'-fosfátu (PLP) [42]. Běžný reaktant, indol, difunduje z  $\alpha$  do  $\beta$ -aktivního místa tunelem, čímž se zabrání jeho úniku a ztrátě absorpcí buněčnými membránami [43]. Aktivní místa tryptofan syntasy jsou navzájem regulována pomocí alosterických interakcí [44].



Obrázek 15: Reakční schéma  $\alpha$  a  $\beta$ -reakcí (upraveno z [31]).

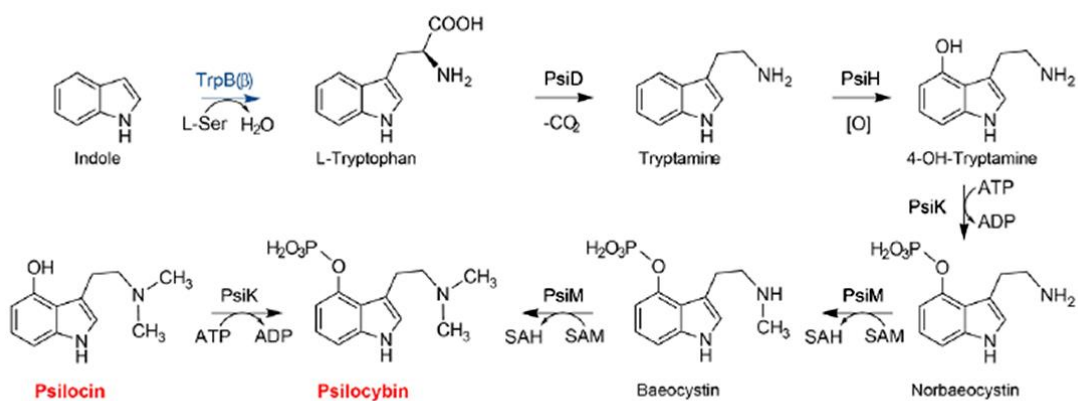
Tryptofan syntasa TrpB studovaná v této práci pochází z houby *Psilocybe cubensis* [45]. Na rozdíl od bakteriálních tryptofan syntas, které jsou heterotetramické enzymy, fungální tryptofan syntasa se skládá z jednoho peptidového řetězce. Dva fungální TrpB řetězce poté tvoří funkční homodimer TrpB  $\alpha_2\beta_2$  [46]. V současné době není v PDB databázi (The Protein Data Bank) uložena žádná struktura fungální TrpB, pro krystalizační a strukturní studie lze použít jak holoenzym TrpB, tak oddělené podjednotky genových konstruktů TrpB. Zájem o strukturu TrpB se v posledních letech zvýšil, protože byly prokázány pozitivní účinky TrpB na reakci produkce *Psilocybinu*, která je typická pro rod *Psilocybe* [45].

## 2.3.2 Rod *Psilocybe*

Rodu hub *Psilocybe* (lysohlávky) se v anglickém jazyce přezdívá jako „magic mushrooms“ z důvodu jeho halucinogenních účinků při požití. Hlavní metabolit

pro rod hub *Psilocybe* je derivát L-tryptofanu alkaloid *Psilocybin* (4-phosphoryloxy-N,N-dimethyltryptamine), který se při požití defosforyluje na *Psilocin* (4-hydroxy-N,N-dimethyltryptamine), který působí jako halucinogen. *Psilocin* interferuje s lidskou neurotransmisí tak, že se agonisticky váže na 5-hydroxy-tryptamin 5-HT<sub>2A</sub> a v menší míře na 5-HT<sub>1A</sub> receptory centrálního nervového systému [47].

Produkcí *Psilocybinu* lze zvýšit přidáním TrpB do syntézy, což podporuje enzymatickou reakci produkce [45]. Obrázek 16 zobrazuje reakční schéma produkce *Psilocybinu*. Biosyntéza prochází postupnou dekarboxylací, 4-hydroxylací, 4-O-fosforylací a methylací. β-reakce tryptofan syntasy TrpB je zvýrazněna modře.



Obrázek 16: Biosyntéza *Psilocybinu* za použití TrpB (Bernhard Rupp, osobní komunikace).

Dříve se lysohlávky užívaly jako rekreační droga, nicméně od 70. let minulého století je jejich užívání ve většině zemí zakázáno, což je mimo jiné i příčina toho, proč se o užití lysohlávek ve farmaceutickém průmyslu mluví až v poslední době [48]. Farmaceutický zájem o tento psychotropní produkt přírodního původu je za účelem budoucího využití jako léku na depresi, úzkost nebo závislosti na nikotinu [45]. Dokonce několik klinických studií ověřilo jeho farmaceutický význam při léčbě úzkostí a depresí pacientů v pokročilém stádiu rakoviny [1]. Pokud *Psilocybin* projde klinickými testy, bude zvýšení jeho produkce relevantní, protože se zvýší i jeho poptávka pro využití ve farmaceutickém průmyslu. Z těchto důvodů je TrpB z *Psilocybe cubensis* atraktivním kandidátem pro strukturální studie.

## 3 Materiály a metody

Cílem bakalářské práce bylo připravit protein TrpB pro krystalizaci a poté najít a optimalizovat krystalizační podmínky pro přípravu krystalů tryptofan syntasy TrpB z *Psilocybe cubensis*. V této studii byl použit celý konstrukt TrpB s His Tagem. Klonování a výsledný plazmid byl poskytnut prof. Dirkem Hoffmeisterem (University of Jena, Německo) ve spolupráci s prof. Bernhardem Ruppem (University of Innsbruck, Rakousko).

### 3.1 Transformační protokol BL21

Plazmid pro transformaci TrpB měl koncentraci  $45 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ . Transformace genu v expresním vektoru byla provedena transformací tepelným šokem pomocí transformačního protokolu pro kompetentní buňky BL21 (*Transformation Protocol for BL21 Competent Cells*) od firmy New England Biolabs, Inc. (USA).

Nejdříve byly na ledu ponechány kompetentní buňky BL21 o objemu  $50 \mu\text{l}$  po dobu 10 minut. Poté bylo přidáno  $2 \mu\text{l}$  roztoku plazmidu. Opatrně se směs ve zkumavce 4-5x lehce zamíchala a byla inkubována na ledu po dobu 30 minut.

Poté byla směs vystavena tepelnému šoku ve vodní lázni při  $42^\circ\text{C}$  přesně po dobu 10 vteřin. Následně byla směs inkubována po dobu 5 minut na ledu. Ke směsi bylo přidáno  $250 \mu\text{l}$  SOC Media o pokojové teplotě a směs byla vložena do třepačky, předehřáté na  $37^\circ\text{C}$ , na 60 minut při 220 rpm. Mezitím byly nahřáty kanamycinové plotny při teplotě  $37^\circ\text{C}$ . Po uplynutí 60 minut bylo na jednu plotnu rozetřeno  $50 \mu\text{l}$  směsi a na druhou plotnu zbytek obsahu. Tyto plotny byly inkubovány přes noc při teplotě  $37^\circ\text{C}$ .

Druhý den bylo do 50 ml zkumavky napipetováno 10 ml LB média a  $10 \mu\text{l}$  kanamycinu. Následně se pomocí žluté špičky odebrala jedna vypěstovaná kolonie a vložila se do zkumavky. Zkumavky byly umístěny do třepačky a přes noc ponechány při teplotě  $37^\circ\text{C}$  a rychlosti 220 rpm.

### 3.2 Expresa

Expresa byla provedena ve velkých kultivačních nádobách ve velkém množství. Do těchto nádob bylo nejdříve odměřeno 200 ml LB a přidáno  $200 \mu\text{l}$  kanamycinu. Z LB média byl odebrán 1 ml jako blank pro pozdější měření OD. Do těchto nádob se následně

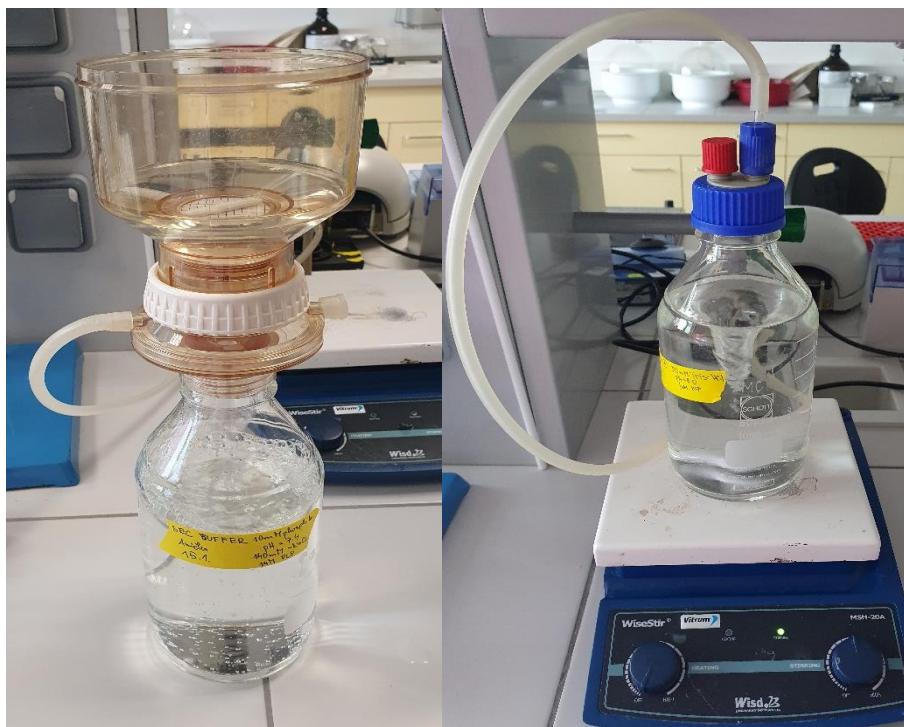
přidala kultura vypěstovaná přes noc a nádoby byly umístěny do třepačky na 1 hodinu při 37°C a 220 rpm. Po hodině bylo přidáno 600 ml LB s 600 µl kanamycinu. Poté se směs nechala třepat do té doby, dokud OD nedosáhlo hodnoty 0,6-0,8. Nádoby byly na 15-30 minut umístěny do lednice a posléze byla média indukována pomocí 1mM IPTG, kdy se do každé nádoby napipetovalo 800 µl IPTG a nechaly se třepat po dobu 16 hodin při 18°C a 220 rpm.

Následující den se obsahy nádob centrifugovaly při 4000 rpm po dobu 30 minut při teplotě 4°C. Pelety byly resuspendovány ve 20 ml LB, přelity do 50 ml zkumavek a znovu centrifugovány při 4000 rpm po dobu 30 minut při teplotě 4°C. Následně byly slity supernatany a pelety byly umístěny do mrazáku o teplotě -80°C.

### 3.3 Purifikace

#### 3.3.1 Příprava pufrů na purifikaci

Pro Ni-NTA afinitní chromatografii byly připraveny dva pufrы, konkrétně pufr A: 50 mM Tris-HCl pH 8.0 a 1µl PLP, o objemu 1 l a pufr B: 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 1µl PLP, 1 M imidazol, o objemu 0,5 l. Oba pufrы byly zfiltróvány a následně zdegasovány. Pro gelovou chromatografii se používal připravený pufr A.



Obrázek 17: Aparatura pro filtraci a degassing (pořizeno autorkou).

### 3.3.2 Ni-NTA afinitní chromatografie

Nejdříve se ve 100 ml pufru A rozpustil proteázový inhibitor, tímto způsobem se připravil lyzační pufr. Mezitím byly buňky ponechány na ledu. K buňkám se poté přidalo 15 ml lyzačního pufru, 15  $\mu$ l DNA-asy a 15  $\mu$ l RNA-asy. Poté se pomocí vortexu buňky rozpustily v roztoku a nechaly se inkubovat přibližně 30 minut na ledu.

Následně byly namnožené buňky rozbity pomocí French pressu při zvyšujícím se tlaku a následně stočeny na ultracentrifuze při 40 000 rpm po dobu 1 hodiny. Supernatan byl slit a použit k purifikaci.

K Ni-NTA afinitní chromatografii byla použita HisTrap kolona od výrobce GE Healthcare (USA) o objemu 5 ml, která se nejdříve ekvilibrovala. Chromatografická kolona je udržována v ethanolu, takže nejdříve bylo nutné kolonu promýt pěti objemy kolony destilovanou vodou a poté ji ekvilibrovat pěti objemy kolony nejdříve pufrém A, poté stejným objemem pufrém B a nakonec znovu stejným objemem pufrém A. Poté byl nanesen supernatan na kolonu. Kolona se poté promývala dvěma objemy kolony pufrém A a nakonec se pomocí zvyšující se koncentrace pufru B eluoval protein, který byl následně sbírán do jednotlivých frakcí. V průběhu byla zaznamenána koncentrace pufru B, při které se začaly sbírat jednotlivé frakce. Po eluci proteinu z kolony byla celá kolona znovu vymyta vždy pěti objemy kolony nejdříve pufrém B, poté pufrém A, vodou a nakonec ethanolem.

### 3.3.3 Gelová chromatografie

Frakce, které byly posbírány během Ni-NTA afinitní chromatografie a podle gelu odpovídaly velikosti proteinu TrpB, byly společně zakoncentrovány pomocí Amicon Ultra-4 30K Device do celkového objemu 500  $\mu$ l. Ke gelové chromatografii byla použita kolona Superdex200, která byla promyta destilovanou vodou a poté ekvilibrována jedním objemem kolony pufrém A. Po ekvilibraci byly na kolonu nanесeny zakoncentrované frakce. Průtok byl nastaven na 0,5 ml\*min<sup>-1</sup>. Když se začalo zvyšovat UV, byl protein sbírán do jednotlivých frakcí o objemu 0,5 ml. Po ukončení frakcionace byla kolona znovu promyta jedním objemem kolony pufrém A, vodou a nakonec ethanolem. Všechny frakce byly analyzovány na gelu.

## 3.4 Analýza čistoty a homogenity

### 3.4.1 Příprava 10 % gelu

Pro přípravu 10 % gelu byly zapotřebí následující chemikálie: 30% směs akrylamidu a N,N'-metylen-bis-akrylamidu, destilovaná voda, 1,5 M Tris (pH 8.8), 1 M Tris (pH 6.8), 10% SDS, 10% APS a TEMED. Nejdříve byla sestavena nalévací aparatura pro přípravu gelů, poté se připravil spodní separační gel, který byl připraven z 3,4 ml 30% směsi akrylamidu, 3,8 ml H<sub>2</sub>O, 2,5 ml 1,5 M Tris (pH 8.8) a 100 µl 10% SDS. K zahájení polymerace bylo přidáno 100 µl čerstvě připraveného 10% APS a nakonec bylo přidáno 10 µl TEMEDu. Tento roztok byl poté pomocí automatické pipety napipetován mezi sklíčka do sestavené aparatury pro přípravu gelů a převrstven propanolem. Během 45 minut separační gel zpolymeroval.

Poté byl z gelu slit propanol a separační gel byl převrstven zaostřovacím gelem, který byl připraven z 0,33 ml 30% směsi akrylamidu, 1,4 ml H<sub>2</sub>O, 0,25 ml 1 M Tris pH 6.8 a 20 µl 10 % SDS. K zahájení polymerace bylo přidáno 20 µl 10% APS a nakonec 2 µl TEMEDu. Po napipetování zaostřovacího gelu byl ihned do gelu vložen plastový hřeben, který vytváří jamky pro nanášení vzorků. Zaostřovací gel se nechal polymerovat po dobu 30 minut. Poté byl vyjmut plastový hřeben a gel byl zabalen do vlhkého ubrousku a uložen do lednice pro budoucí použití.

### 3.4.2 SDS-PAGE elektroforéza

Vzorky, které byly získány v průběhu chromatografie, byly analyzovány na gelu za účelem ověření jejich čistoty. Každý vzorek bylo nutné připravit pro SDS-PAGE elektroforézu tak, že se ke každému vzorku o objemu 30 µl přidalo 10 µl roztoku SDS s β-merkaptethanolem. Roztok byl poté ponechán v termostatu při teplotě 90°C po dobu 2 minut.

Byla sestavena elektroforetická aparatura, do aparatury byla upevněna skla s gelem a elektroforetická komora byla naplněna elektrodoým pufrem. Elektrodoý pufir byl připraven z 15,1 g Tris, 72,0 g glycinu, 5,0 g SDS a 1000 ml destilované vody. Jako první byla na gel napipetováno 5 µl standardu, *PageRuler Plus Prestained Protein Ladder*, který byl komerčně dodaný firmou Thermo Fisher Scientific (USA). Tento standard ukazuje molekulové hmotnosti proteinů od 10 do 250 kDa. Následně byly napipetovány jednotlivé



vzorky, tyto vzorky byly vždy napipetovány o objemu 5  $\mu$ l. Tabulka zobrazuje jednotlivé pořadí vzorků pro SDS-PAGE elektroforézu po Ni-NTA chromatografii.

Tabulka IV: Pořadí vzorků pro SDS-PAGE elektroforézu po Ni-NTA chromatografii.

Pořadí	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Vzorek	standard	frakce 1	f 2	f 3	f 4	f 5	f 6	f 7	f 8	FT1	FT2	FT3

Totožným způsobem probíhala i příprava vzorků a samotná SDS-PAGE elektroforéza po gelové chromatografii.

Tabulka V: Pořadí vzorků pro SDS-PAGE elektroforézu po gelové chromatografii.

Pořadí	1	2	3	4	5
Vzorek	standard	frakce 1	f 2	f 3	f 4

Po nanesení vzorků byla elektroforetická komora uzavřena a napojena na stejnosměrný elektrický proud o napětí 100 V po dobu 30 minut a následně 150 V po dobu 1 h. Nato byl gel vyjmut ze skel a opatrně přesunut do 20 ml fixačního roztoku, který obsahoval 50% ethanolu a 2% kyseliny fosforečné, a ponechán po dobu 30 minut. Poté byl gel omýván 2x po dobu 20 minut v destilované vodě a nakonec byl gel ponechán přes noc ve 20 ml roztoku barviva Coomassie blue. Druhý den byl gel odbarven v destilované vodě a zdokumentován pro pozdější vyhodnocení.

## 3.5 Krystalizace tryptofan syntasy TrpB

### 3.5.1 Pre-krystalizační test

Před započítím vlastní krystalizace tryptofan syntasy TrpB byl proveden pre-krystalizační test metodou sedící kapky, aby byla zjištěna vhodná koncentrace pro krystalizační experimenty. Pre-krystalizační test byl proveden pomocí komerčně dodávané sady *PCT Pre-Crystallization Test* od firmy Hampton Research (USA). Složení jednotlivých činidel je uvedeno v Přílohách.

Test byl proveden v destičce s 24 jamkami Greiner ComboPlate s mostem CrystalBridge od firmy Hampton Research (USA). Pomocí automatické pipety bylo do rezervoáru napipetováno 20  $\mu$ l činidla podle seznamu od výrobce. Nad rezervoár s činidlem byl napipetován vzorek tryptofan syntasy TrpB s příslušným činidlem v poměru 1:1. V Tabulce VI jsou uvedeny jednotlivé objemy činidel a proteinu v jamkách.

Experiment probíhal při teplotě 20°C, při této teplotě byla i destička ponechána a za 20 minut zkontrolována na přítomnost precipitace.

Tabulka VI: Schéma jednotlivých kapek pro TrpB pro PCT.

	1		2		3		4	
	Rezervoár	Kapka	Rezervoár	Kapka	Rezervoár	Kapka	Rezervoár	Kapka
A	20 $\mu$ l čínidla A <sub>1</sub>	1 $\mu$ l TrpB + 1 $\mu$ l čínidla A <sub>1</sub>	20 $\mu$ l čínidla A <sub>2</sub>	1 $\mu$ l TrpB + 1 $\mu$ l čínidla A <sub>2</sub>	20 $\mu$ l čínidla B <sub>1</sub>	1 $\mu$ l TrpB + 1 $\mu$ l čínidla B <sub>1</sub>	20 $\mu$ l čínidla B <sub>2</sub>	1 $\mu$ l TrpB + 1 $\mu$ l čínidla B <sub>2</sub>

### 3.5.2 Precipitační činidla

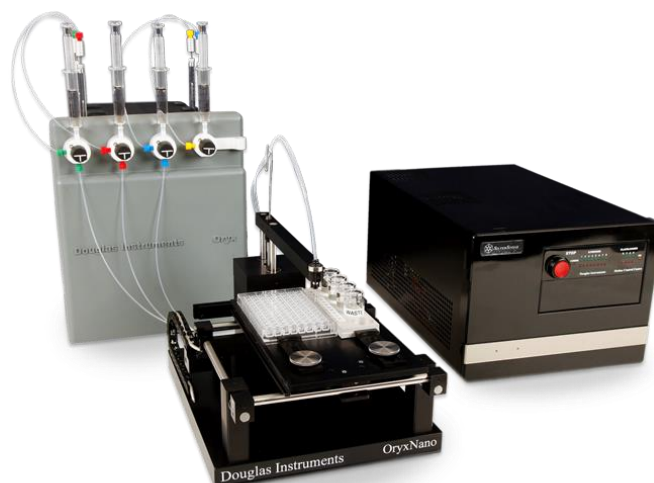
Všechna precipitační činidla použitá pro krystalizaci na robotovi i následnou optimalizaci krystalizačních podmínek ručně byla komerčně dodána. Tato činidla pocházela z následujících sad:

- Index HR – sada 96 precipitačních činidel od firmy Hampton Research (USA)
- JCSG++ - sada 96 precipitačních činidel vytvořenou výzkumníky v Joint Center for Structural Genomics (JCSG, USA) a European Genomics Consortium
- MemGold2 – sada 96 precipitačních činidel od firmy Molecular Dimension (USA)
- SG1 – sada 96 precipitačních činidel od firmy Molecular Dimension (USA)
- MorpheusII – sada 96 precipitačních činidel od firmy Molecular Dimension (USA)

Seznam precipitačních činidel jednotlivých sad je uveden v Přílohách.

### 3.5.3 Screening pomocí krystalizačního robota

Na začátku krystalizace byl proveden screening pomocí krystalizačního robota se všemi výše uvedenými sadami, aby se vyhodnotilo, při jakých podmínkách se tvoří krystaly, precipitace nebo roztok zůstává čirý. Ke screeningu byl použit robot OryxNano 4 od firmy Douglas Instruments (Velká Británie), který je zobrazen na Obrázku 18.



Obrázek 18: Robot OryxNano 4 (převzato z [49]).

Pro všechny uvedené sady precipitačních činidel probíhal experiment stejným způsobem při teplotě 20°C. Ke screeningu na robotovi byla použita vždy destička s 96 jamkami MRC 2-Drop Plate od firmy Hampton Research (USA). Pomocí multikanálové automatické pipety bylo do každé jamky napipetováno 50  $\mu$ l precipitačního činidla podle seznamu od výrobce tak, aby do jamky A1 bylo napipetováno činidlo uvedené v seznamu jako první, do jamky A2 druhé atd. V poslední jamce H12 byl tedy roztok pod číslem 96 podle seznamu od výrobce.

Nad rezervoár s precipitačním činidlem byl vždy do horní jamky napipetován vzorek tryptofan syntasy TrpB s příslušným precipitačním činidlem v poměru 1:1, tedy 1  $\mu$ l proteinu a 1  $\mu$ l precipitačního činidla. Ve spodní jamce byl poměr mezi proteinem a precipitačním činidlem 1:0,5. Pro názornost byla vytvořena Tabulka VII, kde je zobrazeno schéma první krystalizační jamky. Pro všechny další jamky a další komerčně dodané sady precipitačních činidel probíhal experiment stejným způsobem. Každá destička byla poté zaizolována lepící páskou, dána do lednice a ponechána při teplotě 4°C.

Tabulka VII: Schéma první jamky pro TrpB pro screening na robotovi.

		1
A	50 $\mu$ l precip. č.1	1 $\mu$ l TrpB + 1 $\mu$ l precip. č.1
		1 $\mu$ l TrpB + 0,5 $\mu$ l precip. č.1

Po dobu několika týdnů byly destičky pravidelně kontrolovány a byly zaznamenány změny kapek. Na základě výsledků a největším počtu kapek s pozorovanými mikrokrystaly byla vyhodnocena sada pro optimalizaci krystalizačních podmínek ručně.

### 3.5.4 Optimalizace krystalizačních podmínek

Po screeningu na robotovi byla prováděna optimalizace krystalizačních podmínek ručně pomocí sedící kapky pro precipitační činidla, která poskytla výsledky při screeningu. Optimalizace probíhala především pomocí změny poměrů mezi proteinem a precipitačním činidlem v kapce. Experiment probíhal při teplotě 20°C.

Pro optimalizaci ručně byly použity čtyři destičky s 24 jamkami CombiClover od firmy Molecular Dimension (USA). Do každého rezervoáru bylo napipetováno pomocí automatické pipety 50  $\mu$ l příslušného precipitačního činidla podle seznamu od výrobce. Do horních jamek byly napipetovány různé poměry proteinu a precipitačního činidla. Poměry v jednotlivých jamkách jsou uvedeny přehledně v Tabulce VII.

Tabulka VIII: Schéma první jamky pro TrpB pro optimalizaci ručně.

	1	Rezervoár	2
A	1 $\mu$ l TrpB + 1 $\mu$ l precip. č.1	50 $\mu$ l precip. č.1	1 $\mu$ l TrpB + 0,5 $\mu$ l precip. č.1
B	0,5 $\mu$ l TrpB + 1 $\mu$ l precip. č.1		0,5 $\mu$ l TrpB + 2 $\mu$ l precip. č.1

Každá destička byla poté zaizolována lepicí páskou a dána do lednice a ponechána při teplotě 4°C. Po dobu několika týdnů byly destičky pravidelně kontrolovány a byly zaznamenány změny v kapkách.

Nejlepší činidla byla poté optimalizována ještě pomocí metody visící kapky. Pro metodu visící kapky byly použity destičky s 24 jamkami od firmy NeXtal se šroubovacím víčkem. Do každého rezervoáru bylo napipetováno pomocí automatické pipety 50  $\mu$ l vybraného precipitačního činidla. Na vnitřní stranu víčka byly napipetovány 2  $\mu$ l proteinu a 2  $\mu$ l příslušného precipitačního činidla.

### 3.5.5 Test krystalů

Vypěstované krystaly tryptofan syntasy TrpB byly otestovány pomocí rentgenové difrakční analýzy na synchrotronu BESSY II, provozovaném The Joint Berlin

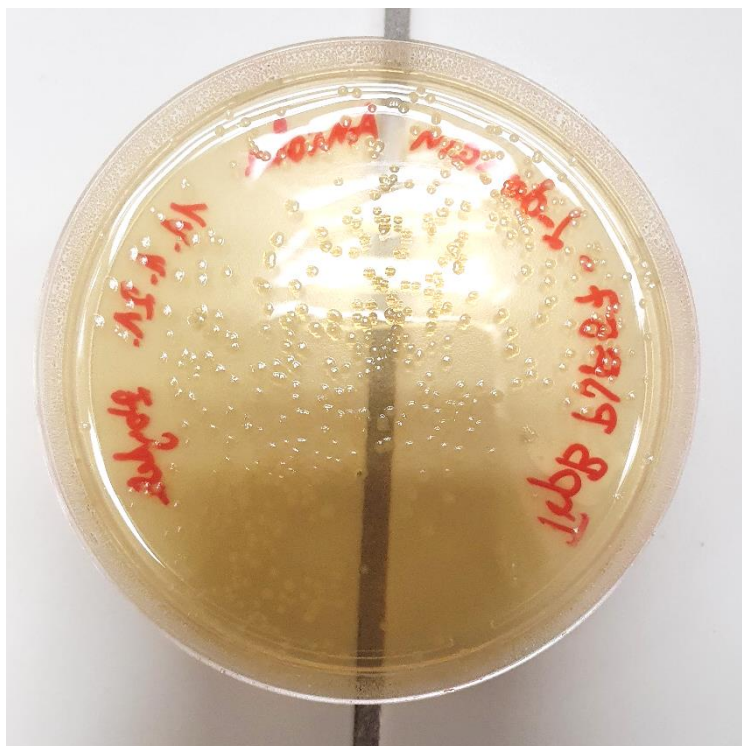
MX-Laboratory v Berlíně (Německo). Testování na synchrotronu může být prováděno pouze proškolenou osobou, z tohoto důvodu jsem se měření neúčastnila.

## 4 Výsledky

V této části bakalářské práce jsou uvedeny výsledky provedených experimentů v rámci práce s proteinem tryptofan syntasou TrpB z *Psilocybe cubensis*. Jsou zde zaznamenány kroky v průběhu přípravy proteinu tryptofan syntasy TrpB pro krystalizační experimenty, tak i samotné výsledky krystalizace tryptofan syntasy TrpB.

### 4.1 Transformace a exprese proteinu

Pomocí transformace tryptofan syntasy TrpB za použití kompetentních *Escherichia coli* buněk kmenu BL21 bylo vypěstováno několik kolonií na kanamycinových plotnách, které jsou zaznamenány na Obrázku 19.



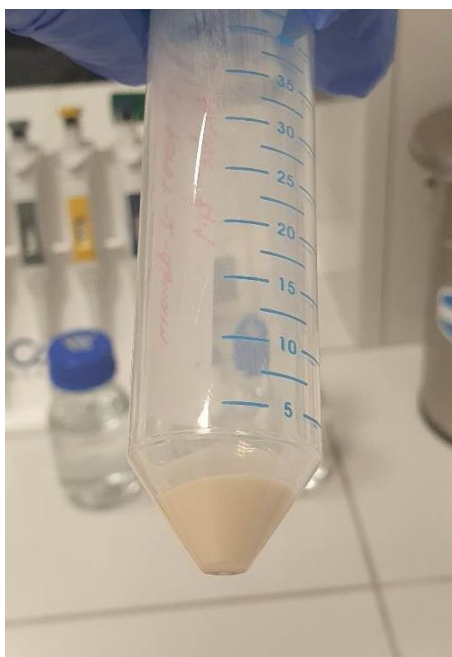
Obrázek 19: Vypěstované kolonie proteinu v buňkách *E. coli* kmenu BL21 (pořízeno autorkou).

Tyto kolonie byly odebrány pomocí žluté špičky a přes noc vypěstovány. Vypěstovaná kultura přes noc z kompetentních buněk *E. coli* kmenu BL21 je zaznamenána na Obrázku 20.



Obrázek 20: Vypěstovaná kultura kompetentních buněk *E. coli* kmenu BL21 přes noc (pořízeno autorkou).

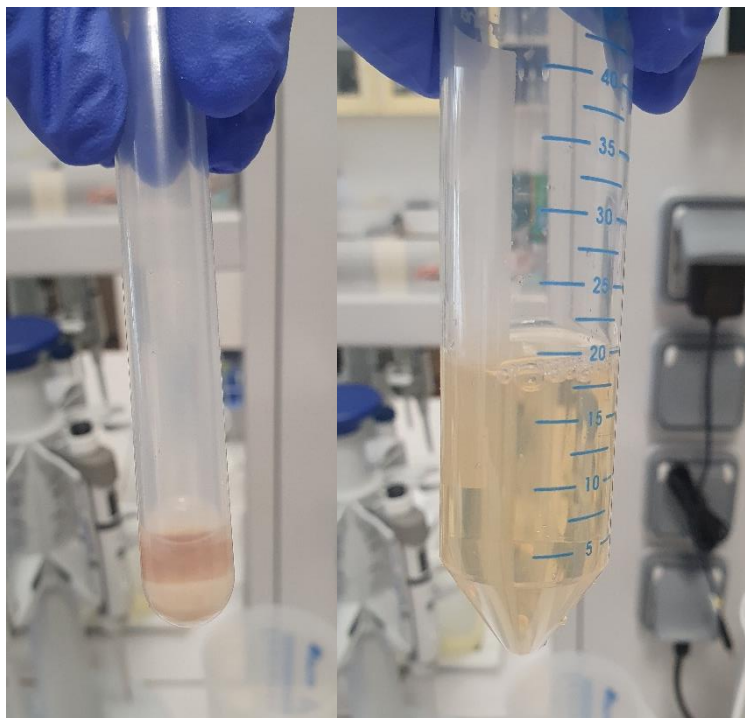
Následně byla kultura namnožena, zaindukována pomocí IPTG a následující den byly buňky stočeny po expresi na centrifuze od firmy ThermoFischer Scientific (USA) po dobu 30 minut při 4°C a 4000 rpm. Výsledný pelet obsahující buňky, je zaznamenán na Obrázku 21, byl následně uložen do mrazáku o teplotě -80°C a poté použit pro purifikaci.



Obrázek 21: Stočené buňky po expresi (pořízeno autorkou).

## 4.2 Purifikace

Před purifikací byly buňky rozbity pomocí French pressu a následně stočeny na ultracentrifuze po dobu 1 hodiny při 40 000 rpm. Po stočení se oddělil pelet a supernatant, který byl použit pro purifikaci. Obrázek 22 zobrazuje oddělený pelet a supernatant.



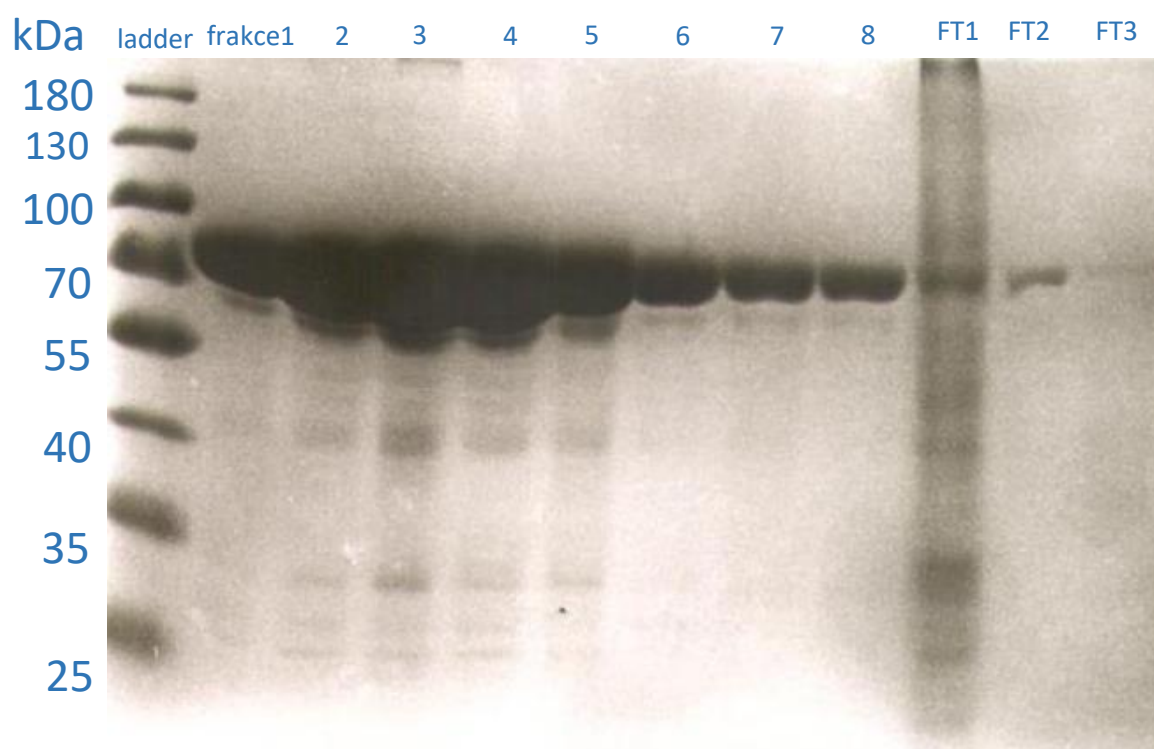
Obrázek 22: Oddělený pelet a supernatant po ultracentrifuze (pořízeno autorkou).

Jednotlivé frakce se začaly sbírat při 28 % koncentrace pufru B. V tomto bodě byla koncentrace imidazolu 280 mM.

### **4.3 SDS-PAGE elektroforéza**

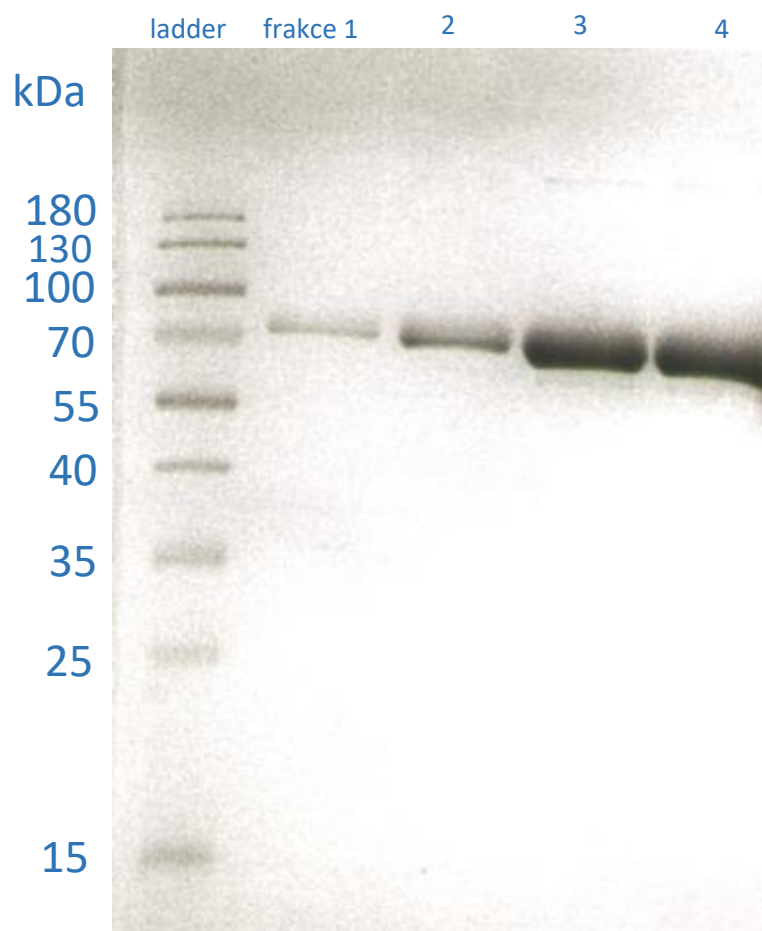
SDS-PAGE elektroforéza po Ni-NTA afinitní chromatografii prokázala přítomnost jak studovaného proteinu, tak i dalších proteinů. Ve srovnání se standardem byla určena velikost studovaného proteinu. Velikost studovaného proteinu byla dle gelu stanovena na přibližně 80 kDa. Záznam gelu je zobrazen na Obrázku 23.





Obrázek 23: Záznam gelu po afinitní chromatografii (pořízeno autorkou).

Studovaný protein byl dále přečištěn pomocí gelové chromatografie. Výsledný gel po gelové chromatografii je zaznamenán na Obrázku 24. Získaný protein byl v dostatečné čistotě pro jeho následné použití při krystalizačních experimentech.



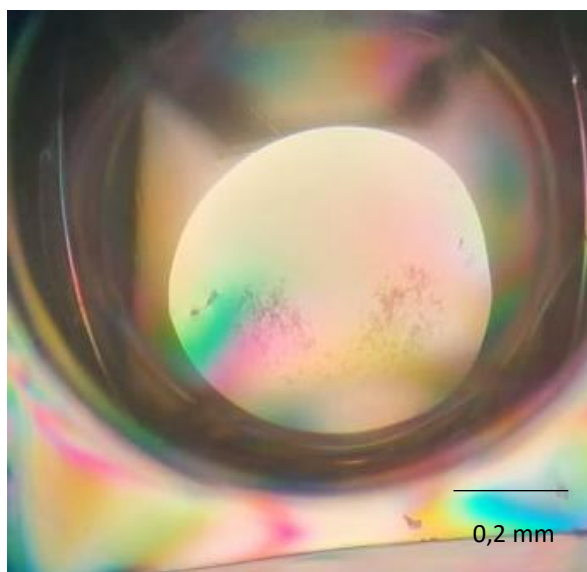
Obrázek 24: Záznam gelu po gelové chromatografii (pořízeno autorkou).

## 4.4 Výsledky krystalizace tryptofan syntasy TrpB

Po purifikaci proteinu byla změřena koncentrace proteinu ve vzorku  $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Tato koncentrace proteinu se dle výsledku PCT testu ukázala nízká pro krystalizační experimenty, proto bylo nutné protein zakoncentrovat pomocí Amicon Ultra-4 30K Device. Koncentrace proteinu tryptofan syntasy TrpB použitá pro krystalizační experimenty byla  $2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ .

### 4.4.1 Pre-krystalizační test

Pre-krystalizační test ukázal mírnou precipitaci u všech kapek. Ukázka precipitace z PTC testu je na Obrázku 25. Z pre-krystalizačního testu bylo vyvozeno, že zvolená koncentrace proteinu byla vhodná pro následný screening krystalizačních podmínek.

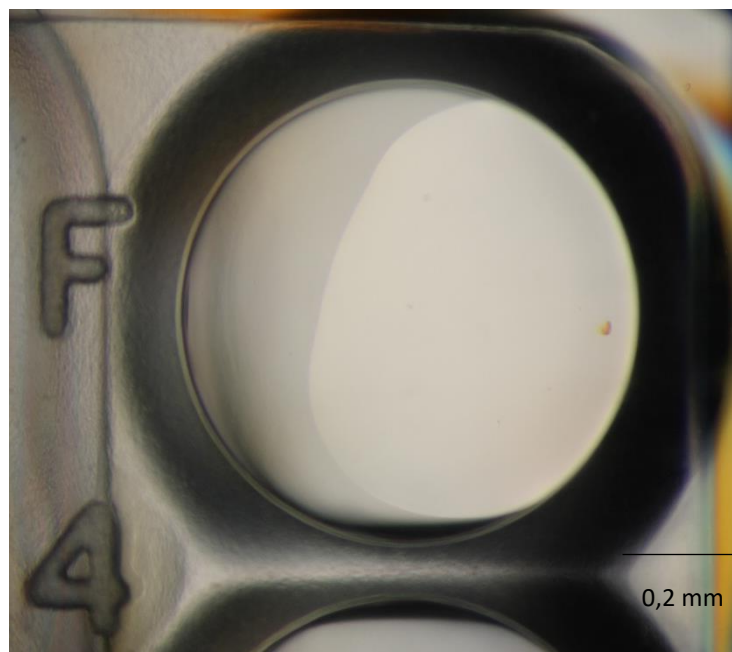


Obrázek 25: Precipitace při použití PCT testu (pořízeno autorkou).

#### 4.4.2 Screening pomocí krystalizačního robota

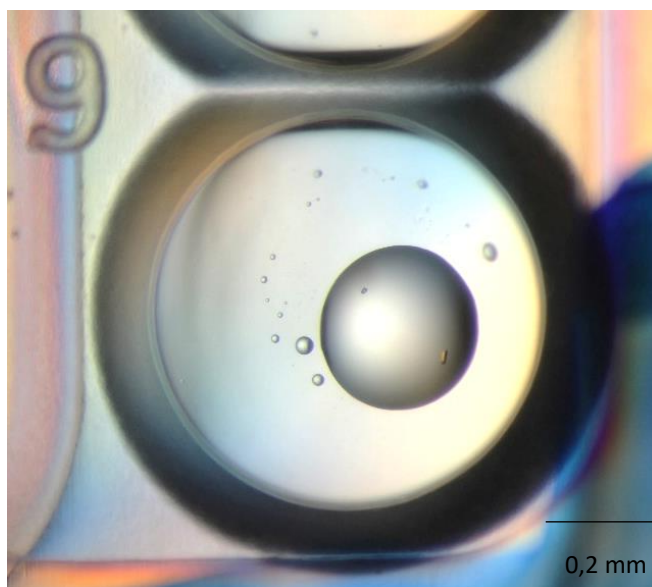
Krystalizační experimenty byly v prvním týdnu kontrolovány každý druhý den, většina kapek byla čirá nebo obsahovala lehkou precipitaci. Po třech týdnech od provedení screeningu na robotovi byla provedena opět kontrola a zaznamenány výsledky. Většina kapek zůstala čirá, některé obsahovaly precipitát a v několika podmínkách narostly malé krystaly. Krystaly byly vyfotografovány a jsou zobrazeny na Obrázcích 26, 27 a 28. Všechny krystaly mají jasně žlutou barvu, což může indikovat přítomnost kofaktoru PLP (pyridoxal fosfát), který byl přítomný v pufrech použitých pro purifikaci.

Krystal byl vypěstován v horní jamce podmínky F4 ze sady JCSG++. V této jamce byl poměr proteinu a precipitačního činidla 1:1. Podle seznamu od výrobce precipitační činidlo obsahovalo 20 % v/v Jeffamine M-600 a 100 mM HEPES, pH 7.5.



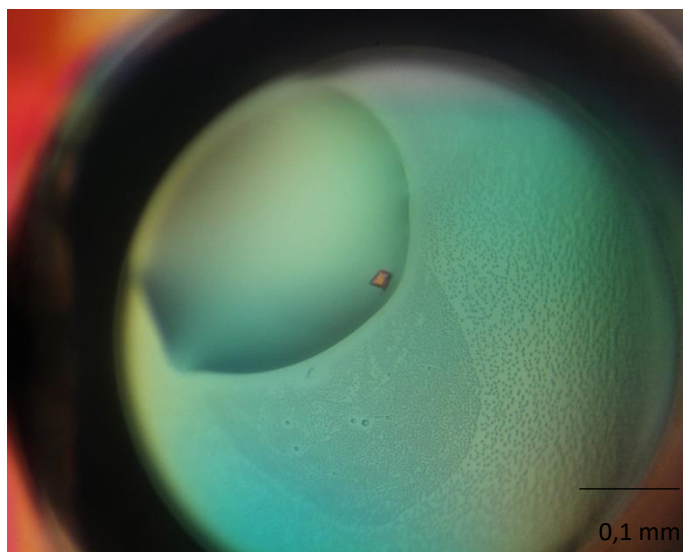
Obrázek 26: Krystal v jamce F4 v sadě JCSG++ (pořízeno autorkou).

Za použití sady MemGold2 byl vypěstován krystal v spodní jamce D9. V této jamce byl poměr proteinu a precipitačního činidla 1:0,5. Precipitační činidlo se skládalo z 0,2 M dihydrátu chloridu vápenatého, 0,1 M MES, pH 5.0 a 20% v/v PEG 350 MME.



Obrázek 27: Krystal v jamce D9 v sadě MemGold2 (pořízeno autorkou).

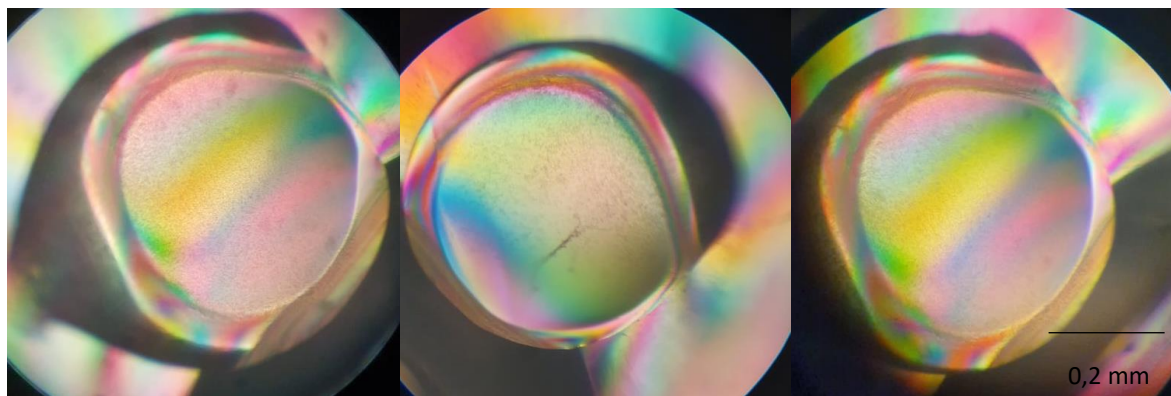
Protein s precipitačním činidlem ze sady SG1 v poměru 1:0,5 ve spodní jamce F12 také vytvořil krystal. Precipitační činidlo se podle výrobce skládalo z 0,02 M dihydrátu chloridu vápenatého, 0,1 M octanu sodného, pH 4.6 a 30 %v/v MPD.



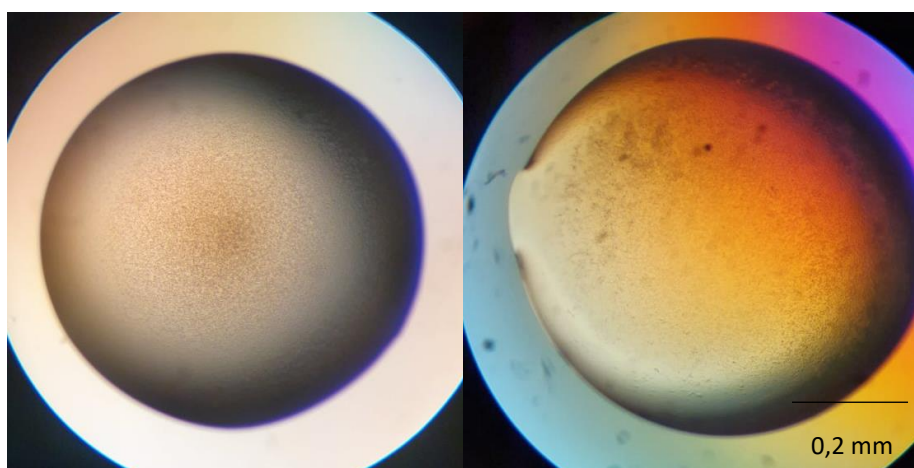
Obrázek 28: Krystal v jamce F12 v sadě SG1 (pořízeno autorkou).

#### 4.4.3 Výsledky optimalizace ručně

Precipitační činidla, která poskytla krystaly při krystalizačním screeningu pomocí robota, byla využita pro optimalizaci krystalizačních podmínek ručně. Experimenty byly první týden kontrolovány každé dva dny a po třech týdnech byly opět zkontrolovány a byly zaznamenány výsledky. Ve všech kapkách se vyskytovala lehká precipitace. Ukázky precipitací pro sedící kapku jsou na Obrázku 29 a pro visící kapky na Obrázku 30.



Obrázek 29: Precipitace po sedící kapce (pořízeno autorkou).



Obrázek 30: Precipitace po visící kapce (pořízeno autorkou).

#### 4.4.4 Rentgenová difrakční analýza

Krystaly, které se podařilo vypěstovat pomocí screeningu na robotovi se sadou precipitačních činidel JCSG++, MemGold2 a SG1, byly poslány na synchrotron BESSYII do Berlína. Tyto krystaly neposkytly žádnou difrakci.

## 5 Diskuze

V dnešní době není v PDB dostupná žádná struktura tryptofan syntasy TrpB pocházející z hub. Nejčastěji jsou charakterizovány struktury tryptofan syntasy u malých organismů např. bakterií, Archeí apod. Například Buller a Brinkmann-Chen (2015) vykryštovali a pomocí rentgenové difrakční analýzy určili strukturu tryptofan syntasy pocházející z *Pyrococcus furiosus*, což je termofilní bakterie druhu Archea. K expresi proteinu byly použity *E. coli* buňky BL21. Tato tryptofan syntasa obsahovala HisTag, proto byla pro purifikaci zvolena HisTrap kolona při Ni-NTA chromatografii [50]. Postup přípravy proteinu tedy probíhal stejným způsobem jako v této bakalářské práci. Ve většině krystalizačních studií tryptofan syntasy podle PDB byl použit tento postup přípravy, příklady těchto studií jsou následující: *Directed evolution of the tryptophan synthase  $\beta$ -subunit for stand-alone function recapitulates allosteric activation* (2015) [50], *Conservation of the structure and function of bacterial tryptophan synthases* (2019) [51], *Engineering Improves Enzymatic Synthesis of L-Tryptophan by Tryptophan Synthase from Escherichia coli* (2020) [52], *Directed Evolution Mimics Allosteric Activation by Stepwise Tuning of the Conformational Ensemble* [53].

Sekvence aminokyselin TrpB, která je kompletně i s HisTag uvedena v Přílohách, byla porovnána s ostatními sekvencemi proteinů pomocí PDB a SWISS-MODEL. Největší sekvenční podobnost 68,41 % byla s tryptofan syntasou 5EY5 ze syntetického konstruktu posledního společného předka bakterií (LBCA). V krystalizační studii *Ancestral Tryptophan Synthase Reveals Functional Sophistication of Primordial Enzyme Complexes* (2016) byl tento protein krystalizován metodou difúze par pomocí visící kapky, stejnou technikou probíhala optimalizace ručně v této bakalářské práci. Tento protein nebyl krystalován pomocí komerčně dodaných sad precipitačních činidel, ale byl krystalován pomocí připravených precipitačních činidel. Podle studie precipitační činidlo, ve kterém se podařilo vypěstovat krystal, obsahovalo 0,1 M trihydrát citrátu sodného pH 5,0, který byl titrovaný HCl, 200 mM NaCl a 15 % PEG 6000 (w/v) [54]. Při stejném pH se podařilo vypěstovat krystal se sadou MemGold2, ve kterém byl přítomen i 20 % v/v PEG 350 MME.

Podobnost 62,24 % vykazuje s tryptofan syntasou 5E0K studovanou Bullerem a Brinkmann-Chen (2015), pocházející z *Pyrococcus furiosus*. Pro krystalizaci Buller

a Brinkmann-Chen nejdříve používali krystalizačního robota Art Robbins Gryphon Nano a poté pro optimalizaci metodu sedící kapky, stejný postup byl zvolen i v praktické části této práce. Buller a Brinkmann-Chen také používali svá připravená precipitační činidla, která obsahovala 25 % PEG 3350 a 100 mM Na HEPES pH 7.5 [50]. Toto precipitační činidlo je velmi podobné ve složení s činidlem ze sady JCSG++, ve kterém se podařilo vypěstovat krystal. Precipitační činidlo ze sady obsahuje 20 % v/v Jeffamine M-600, což je komerčně připravený derivát PEGu 500, a poté obsahovalo 100 mM HEPES pH 7.5. Podařilo se tedy vypěstovat krystal v podobném precipitačním činidle jako ve studii Bullera a Brinkmann-Chena.

Sekvenční podobnost 61,98 % vykazuje mutace 6AM8 této tryptofan syntasy pocházející z *Pyrococcus furiosus*. Při této krystalizaci používal Buller a Royle (2018) cross-link očkování, ke kterému používali právě původní tryptofan syntasu 5E0K [53]. Sekvence tryptofan syntasy TrpB je také podobná z 55,1 % sekvenci  $\beta$ -podjednotky tryptofan syntasy 2DH5 pocházející z *Escherichia coli*. Tuto tryptofan syntasu Nishio a Ogasahara (2010) krystalizovali metodou mikrokrytalizace s parafinovým olejem také pomocí konkrétních precipitačních činidel. Krystaly se jim podařilo vypěstovat v činidle, které obsahovalo 0,8 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,1 M Tris, pH 8.0 [55].

Důvodem pro zvolení komerčně dostupných sad precipitačních činidel pro krystalizaci TrpB v praktické části byla nejen snaha rychle a efektivně otestovat širokou řadu krystalizačních podmínek, ale také fakt, že žádná struktura tryptofan syntasy pocházející z hub nebyla dosud publikována.

Charakterizace bakteriálních tryptofan syntas by mohla napomoci při zjišťování struktury a funkce tryptofan syntasy z hub. Ve studii *Tryptophan synthase: the workings of a channeling nanomachine* byl vytvořen obecný stužkový model tryptofan syntasy, který ukazuje, že právě rozšířená konformace proteinu by mohla ovlivňovat mechanismus směřování indolu, což by mohlo souviset s již známým mechanismem bakteriálních tryptofan syntas [40]. Nicméně domněnka, že struktura bakteriálních a houbových tryptofan syntas má vysokou strukturní podobnost, nemůže být finálně potvrzena, dokud nebude známa krystalová struktura tryptofan syntasy TrpB, pro kterou potřebujeme nejdříve vypěstovat kvalitní krystal.

Krystaly vypěstované v rámci této bakalářské práce měly žluté zbarvení, to by mohlo poukazovat na to, že se jednalo o proteinové krystaly, i navzdory tomu, že krystaly



neposkytly žádná difrakční data. Ve studii *Crystal Structure of Mycobacterium tuberculosis Diaminopimelate Decarboxylase* bylo prokázáno, že při použití kofaktoru PLP dochází ke vzniku žlutě zbarvených proteinových krystalů. PLP se pravděpodobně váže na Lys375  $\beta$ -podjednotky [56]. V této práci se kofaktor PLP přidával do pufrů při chromatografii. Na základě této studie by se dalo usuzovat o tom, že krystaly vypěstované v této práci byly proteinového původu a nejspíše se při krystalizaci špatně poskládaly do krystalové mřížky a z tohoto důvodu neposkytly žádnou difrakci. Vypěstované krystaly nebyly podrobeny barvicímu testu z důvodu brzké cesty na synchrotron po jejich vypěstování a obavy z vyschnutí kapky s krystaly. Test na domácím difraktometru není v naší laboratoři možný.

Krystalizační experimenty byly opakovány, aby byl vypěstován krystal v difrakční kvalitě, což se nepodařilo. Problémem mohlo být stáří vzorku, stabilita proteinu byla však ověřena pomocí SDS-PAGE elektroforézy a nebyla pozorována žádná degradace. Při optimalizačních experimentech protein nekystalizoval vůbec, což mohlo být způsobeno změnou provedení krystalizačního experimentu – byl prováděn ručně namísto pomocí krystalizačního robota.

## 6 Závěr

V teoretické části této bakalářské práce jsou popsány jednotlivé techniky pro přípravu proteinu pro krystalizaci. Je zde uveden princip exprese, popis základních chromatografických metod, které byly použity v praktické části. Poté se teoretická část zabývá základními požadavky na kvalitu proteinu pro úspěšnou krystalizaci, a to analýzou čistoty a homogenity. Mezi nejvýznamnější a nejvíce používanou technikou analýzy patří elektroforéza a její jednotlivé typy.

Následně teoretická část pojednává o principu krystalizace, o fázovém diagramu a o popisu základních krystalizačních technik, pomocí kterých se pěstují proteinové krystaly. Na závěr této kapitoly jsou uvedeny příklady testů pro odlišení krystalu proteinu od krystalu soli. Teoretická část se také zabývá studovaným proteinem tryptofan syntasou, který pochází z rodu *Psilocybe cubensis*. Je zde popsán význam tohoto proteinu, z jakých důvodů je důležité tento protein studovat, a proč může být zjištění jeho struktury zásadní pro vývoj léků na depresi ve farmaceutickém průmyslu.

Praktická část detailně popisuje postup přípravy proteinu v praxi a jeho následnou krystalizaci. Nejdříve byl protein naklonován prof. Dirkem Hoffmeisterem (University of Jena, Německo) a poté transformován v laboratoři pomocí protokolu BL21. Následně byl protein namnožen a purifikován nejdříve pomocí Ni-NTA afinitní chromatografie a posléze pomocí gelové chromatografie. Analýza čistoty byla provedena pomocí SDS-PAGE elektroforézy, která prokázala dostatečnou čistotu proteinu a pomocí markeru byla stanovena jeho velikost na 80 kDa.

Před krystalizací byl proveden PCT test a ke krystalizaci byly použity komerčně dodané sady precipitačních činidel. V několika podmínkách se podařilo vypěstovat malé žlutě zbarvené krystaly, konkrétně se krystaly objevily v jamkách, které obsahovaly precipitační činidla ze sad JCSG++ (JCSG), MemGold2 (Molecular Dimension) a SG1 (Molecular Dimension).

Tyto krystaly neposkytly žádnou difrakci, a proto nemohla být vyřešena struktura studovaného proteinu. Do budoucna je tedy zapotřebí optimalizovat krystalizační podmínky, ve kterých krystaly rostly tak, aby byl vypěstován krystal v difrakční kvalitě, a zároveň by mohl proběhnout další krystalizační screening pomocí odlišných komerčně dostupných sad s precipitačními činidly. Dalším možným způsobem, jak v budoucnu

zvýšit šance na krystalizaci, je podrobit celému procesu přípravy proteinu a krystalizace podjednotky alfa a beta proteinu tryptofan syntasy TrpB samostatně.

## 7 Seznam použité literatury

- [1] JOHNSON, Matthew W. a Roland R. GRIFFITHS. Potential Therapeutic Effects of Psilocybin. *Neurotherapeutics* [online]. 2017, 14(3), 734-740 [cit. 2021-03-10]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s13311-017-0542-y>
- [2] MCPHERSON, Alexander a Jose A. GAVIRA. Introduction to protein crystallization. *Acta Crystallographica: Section F* [online]. 2014, 70(1), 2-20 [cit. 2021-03-10]. Dostupné z: [doi:10.1107/S2053230X13033141](https://doi.org/10.1107/S2053230X13033141)
- [3] AL-KARADAGHI, Salam. Protein Crystallization: Basic Approach. AL-KARADAGHI, Salam. Structural bioinformatics, protein crystallography, sequence analysis & homolog modeling [online]. Department of Biochemistry and Structural Biology, Centre for Molecular Protein Science Lund University, 2010-2021 [cit. 2021-03-09]. Dostupné z: <https://proteinstructures.com/offsite/Experimental/protein-crystallization.html>
- [4] The Macromolecular Crystallography Research Center: Ilse Katz Institute for Nanoscale Science & Technology [online]. Israel: Ben Gurion University of the Negev [cit. 2021-03-10]. Dostupné z: <https://lifewp.bgu.ac.il/wp/crystallography/>
- [5] ROSYPAL, Stanislav. Terminologie molekulární biologie: České odborné termíny, jejich definice a anglické ekvivalenty [online]. Brno: Prof. RNDr Stanislav Rosypal, 2001 [cit. 2021-03-10]. ISBN 80-902-5623-6. Dostupné z: DOI: 10.13140/RG.2.1.1476.5527
- [6] WATSON, James D., Richard M. MEYERS, Amy A. CAUDY a Jan A. WITKOWSKI. *Recombinant DNA: Genes and Genomes: Genes and Genomes - A Short Course*. 3rd Edition. Gordonsville, Virginia: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2007. ISBN 9780716728665.
- [7] ROSANO, Germán L. a Eduardo A. CECCARELLI. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2014, (5), 5 [cit. 2021-03-10]. ISSN 1664-302X. Dostupné z:

doi:10.3389/fmicb.2014.00172

- [8] ARNOLD L., Demain a Preeti VAISHNAV. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology Advances* [online]. 2009, 27(3), 279-306 [cit. 2021-03-10]. ISSN 0734-9750. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.01.008>.
- [9] ADRIO, Jose L. a Arnold L. DEMAIN. Genetic improvement of processes yielding microbial products. *FEMS Microbiology Reviews* [online]. 2006, 30(2), 187-214 [cit. 2021-03-10]. ISSN 0168-6445. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2005.00009.x>
- [10] SEZONOV, Guennadi, Danièle JOSELEAU-PETIT a Richard D'ARI. *Escherichia coli* Physiology in Luria-Bertani Broth. *Journal Article* [online]. 2007, 189(23), 8746-8749 [cit. 2021-03-10]. Dostupné z: doi:10.1128/JB.01368-07
- [11] NAWAL, Abd El-Baky a Elrashdy M. REDWAN. Therapeutic Alpha-Interferons Protein: Structure, Production, and Biosimilar. *Preparative Biochemistry & Biotechnology* [online]. 2015, 45(2), 109-127 [cit. 2021-03-10]. Dostupné z: doi:10.1080/10826068.2014.907175
- [12] BERG, Jeremy M., Lubert STRYER a John L. TYMOCZKO. *Biochemistry: Section 4.1, The Purification of Proteins Is an Essential First Step in Understanding Their Function*. 5th ed. New York: W. H. Freeman, 2002. ISBN 07-167-3051-0. Dostupné také z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22410/>
- [13] HAMPTON RESEARCH. *Crystal Growth 101*. Hampton Research: Solutions for Crystal Growth [online]. California, Aliso Viejo, c1991-2021 [cit. 2021-03-11]. Dostupné z: [https://hamptonresearch.com/uploads/cg\\_pdf/CG101\\_COMPLETE.pdf](https://hamptonresearch.com/uploads/cg_pdf/CG101_COMPLETE.pdf)
- [14] LODISH, Harvey, Arnold BERK, S. Lawrence ZIPURSKY, Paul MATSUDAIRA, David BALTIMORE a James DARNELL. *Purifying, Detecting, and Characterizing Proteins*. *Molecular Cell Biology* [online]. 4th edition. New York: W. H. Freeman, 2000 [cit. 2021-03-11]. ISBN 0-7167-3136-3. Dostupné z:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21589/>

- [15] GE HEALTHCARE. Strategies for Protein Purification [online]. Sweden: GE Healthcare, 2010 [cit. 2021-03-11]. ISBN 28-9833-31 AA.
- [16] COSKUN, Ozlem. Separation techniques: Chromatography. Northern clinics of Istanbul [online]. 2016, 3(2), 156-160 [cit. 2021-03-10]. Dostupné z: doi:10.14744/nci.2016.32757
- [17] BOLLAG, Daniel M., Stuart J. EDELSTEIN a Michael D. ROZYCKI. Protein methods. 2nd ed. New York: Wiley-Liss, 1996. ISBN 04-711-1837-0.
- [18] CROWE, Joanne, Heinz DOBELI, Reiner GENTZ, Erich HOCHULI, Dietrich STIIBER a Karsten HENCO. 6xHis-Ni-NTA Chromatography as a Superior Technique in Recombinant Protein Expression/Purification. Protocols for *Gene Analysis* [online]. 31. Harwood A.J.: Humana Press, 1994, s. 371-387 [cit. 2021-03-10]. ISBN 978-1-59259-518-1. Dostupné z: <https://doi.org/10.1385/0-89603-258-2:371>
- [19] RAYNAL, Bertrand, Pascal LENORMAND, Bruno BARON, Sylviane HOOS a Patrick ENGLAND. Quality assessment and optimization of purified protein samples: why and how?. *Microbial Cell Factories* [online]. 2014, 13(180) [cit. 2021-03-10]. Dostupné z: doi:10.1186/s12934-014-0180-6
- [20] FLUIDIC ANALYTICS. Five Methods for Assessing Protein Purity and Quality. *BiteSize Bio* [online]. 2020 [cit. 2021-03-11]. Dostupné z: <https://bitesizebio.com/41757/five-methods-for-assessing-protein-purity-and-quality/>
- [21] THE EDITORS OF ENCYCLOPAEDIA BRITANNICA. Denaturation. *Encyclopædia Britannica* [online]. London, 2021 [cit. 2021-03-11]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/denaturation>
- [22] AUSTIN, Christopher P. Electrophoresis. National Human Genome Research Institute [online]. Rockville, U.S.A., 2021 [cit. 2021-03-11]. Dostupné z:

<https://www.genome.gov/genetics-glossary/Electrophoresis>

- [23] OVADOVÁ, Hana. Identifikace metaloproteinů a stanovení jim příslušných kovových specií. Brno, 2007. Diplomová práce. Masarykova univerzita v brně, Přírodovědecká fakulta.
- [24] ARYAL, Sagar. Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE). Microbe Notes: Online Microbiology and Biology Study Notes [online]. Kathmandu, Nepal, 2021 [cit. 2021-03-11]. Dostupné z: <https://microbenotes.com/polyacrylamide-gel-electrophoresis-page/>
- [25] BEER, Lynn A. a David W. SPEICHER. Protein Detection in Gels Using Fixation UNIT 10.5. Current Protocols in Protein Science [online]. 2018, 91(1), 1051–10520 [cit. 2021-03-10]. Dostupné z: doi:10.1002/cpp.48
- [26] WEISS, Walter, Florian WEILAND a Angelika GÖRG. Protein Detection and Quantitation Technologies for Gel-Based Proteome Analysis. Proteomics [online]. Humana Press, 2009, 564, 59-82 [cit. 2021-03-10]. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-60761-157-8\_4
- [27] GRASSIE, Laura. Silver or Blue: What's the Best Stain for Your Proteins?. BiteSize Bio [online]. 2020 [cit. 2021-03-11]. Dostupné z: <https://bitesizebio.com/9386/silver-or-blue-whats-the-best-stain-for-my-proteins/>
- [28] ALLIANCE PROTEIN LABORATORIES. Native Gels. Alliance Protein Laboratories: A Division of KBI Biopharma [online]. California, San Diego, 2019 [cit. 2021-03-11]. Dostupné z: <https://www.ap-lab.com/native-gel-analysis>
- [29] BIOFYZIKA A BIOCHEMIE ROSTLIN, Oddělení. Elektromigrační metody na nosičích. In: Ústav molekulární biologie rostlin [online]. České Budějovice, c2010-2021 [cit. 2021-03-11]. Dostupné z: <https://www.yumpu.com/cs/document/view/4655538/elektromigracni-metody-na-nosicich>

- [30] BROAD INSTITUTE. What is Mass Spectrometry?. Broad Institute [online]. Harvard, 2004 [cit. 2021-03-11]. Dostupné z: <https://www.broadinstitute.org/proteomics/what-mass-spectrometry>
- [31] HOLČAPEK, Michal. Úvod do hmotnostní spektrometrie. In: Michal Holčapek: Mass Spectrometry Group [online]. Univerzita Pardubice, 2006-2021 [cit. 2021-03-11]. Dostupné z: [https://holcapek.upce.cz/teaching/01\\_Uvod.pdf](https://holcapek.upce.cz/teaching/01_Uvod.pdf)
- [32] LIBRETEXTS. NMR: Introduction. LibreTexts: Chemistry [online]. 2021 [cit. 2021-03-11]. Dostupné z: <https://chem.libretexts.org/@go/page/1834>
- [33] DESSAU, Moshe A. a Yorgo MODIS. Protein Crystallization for X-ray Crystallography. Journal of visualized experiments [online]. 2011, 2285(47) [cit. 2021-03-10]. Dostupné z: doi:10.3791/2285
- [34] KUTÁ SMATANOVÁ, Ivana. Krystalizace biologických makromolekul. Krystalografická společnost: Czech and Slovak Crystallographic Association (CSCA) [online]. 2003 [cit. 2021-03-11]. Dostupné z: <http://www.xray.cz/kryst/difrakce/iva/krystalizace.htm>
- [35] RUSSO KRAUS, Irene, Antonello MERLINO, Alessandro VERGARA a Filomena SICA. An Overview of Biological Macromolecule Crystallization. International Journal of Molecular Sciences [online]. Basel, Switzerland, c1996-2021 [cit. 2021-03-09]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:11643-11691
- [36] ASHERIE, Neer. Protein crystallization and phase diagrams. Methods [online]. 2004, 34(3), 266-272 [cit. 2021-03-10]. ISSN 1046-2023. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2004.03.028>.
- [37] HAHN, Otto a Ida NODDACK. Phase diagram crystal growth. In: Science & Innovation with Neutrons in Europe in 2020 [online]. European Union, 2016 [cit. 2021-03-11]. Dostupné z: <https://www.sine2020.eu/about/the-road-to-the-ess/phase-diagram.html>



- [38] BERGFORS, Terese M. Protein Crystallization. Second Edition. La Jolla, CA: International University Line, 2009. ISBN 978-0-9720774-4-6.
- [39] RUPP, Bernhard. Biomolecular crystallography: principles, practice, and application to structural biology. 1st Edition. New York: Garland Science, 2010. ISBN 978-0815340812.
- [40] DUNN, Michael F., Dimitri NIKS, Huu NGO, Thomas R.M. BARENDSE a Ilme SCHLICHTING. Tryptophan synthase: the workings of a channeling nanomachine. Trends in Biochemical Sciences [online]. 2008, 33(6), 254-264 [cit. 2021-03-10]. ISSN 0968-0004. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2008.04.008>
- [41] HYDE, C. Craig, S. Ashrafudin AHMED, Eduardo A. PADLAN, Edith W. MILES a David R. DAVIES. Three-dimensional structure of the tryptophan synthase alpha 2 beta 2 multienzyme complex from Salmonella typhimurium. The Journal of Biological Chemistry [online]. U.S.A., 1988, **263**(33), 17857-17871 [cit. 2021-03-10]. PMID: 3053720. Dostupné z: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(19\)77913-7/pdf](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(19)77913-7/pdf)
- [42] MILES, E. W. Tryptophan synthase: Structure, function and protein engineering. Subcellular Biochemistry [online]. Springer, 1995, 24, 207-254 [cit. 2021-03-10]. PMID: 7900177. Dostupné z: [https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1727-0\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1727-0_8)
- [43] MILES, Edith Wilson, Sangkee RHEE a David R. DAVIES. The Molecular Basis of Substrate Channeling. Journal of Biological Chemistry [online]. 1999, 274(18), 12193-12196 [cit. 2021-03-10]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1074/jbc.274.18.12193>
- [44] KULIK, Victor, Michael WEYAND, Ralf SEIDEL, Dimitri NIKS, Demet ARAC, Michael F. DUNN a Ilme SCHLICHTING. On the Role of  $\alpha$ Thr183 in the Allosteric Regulation and Catalytic Mechanism of Tryptophan Synthase. Journal of Molecular Biology [online]. 2002, 324(4), 677-690 [cit. 2021-03-10]. ISSN 0022-2836. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(02\)01109-9](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)01109-9)
- [45] BLEI, Felix, Florian BALDEWEG, Janis FRICKE a Prof. Dr. Dirk HOFFMEISTER. Biocatalytic Production of Psilocybin and Derivatives in Tryptophan

- Synthase-Enhanced Reactions. *Chemistry: A European Journal* [online]. 2018, 24(40), 10028-10031 [cit. 2021-03-10]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/chem.201801047>
- [46] MATCHETT, William H. a John A. DEMOSS. The subunit structure of tryptophan synthase from *Neurospora crassa*. *The Journal of Biological Chemistry* [online]. U.S.A., 1975, 250(8), 2941-2946 [cit. 2021-03-10]. PMID: 123527. Dostupné z: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(19\)41577-9/pdf](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(19)41577-9/pdf)
- [47] TYLŠ, Filip, Tomáš PÁLENÍČEK a Jiří HORÁČEK. Psilocybin – Summary of knowledge and new perspectives. *European Neuropsychopharmacology* [online]. 2014, 24(3), 342-356 [cit. 2021-03-10]. ISSN 0924-977X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2013.12.006>
- [48] GEIGER, Haden A., Madeline G. WURST a R. Nathan DANIELS. DARK Classics in Chemical Neuroscience: Psilocybin. *ACS Chemical Neuroscience* [online]. 2018, 9(10), 2438-2447 [cit. 2021-03-10]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.8b00186>
- [49] DOUGLAS INSTRUMENTS. OryxNano: Protein Crystallization Robot for sitting drop screening with (simple) optimization. Douglas Instruments: Success in protein crystallization [online]. United Kingdom: Douglas House, 2021 [cit. 2021-03-11]. Dostupné z: <https://www.douglas.co.uk/oryxnano.htm>
- [50] BULLER, Andrew R., Sabine BRINKMANN-CHEN, David K. ROMNEY, Michael HERGER, Javier MURCIANO-CALLES a Frances H. ARNOLD. Directed evolution of the tryptophan synthase  $\beta$ -subunit for stand-alone function recapitulates allosteric activation. *PNAS* [online]. United Kingdom, 2015, 112(47), 14599-14604 [cit. 2021-03-20]. ISSN 1091-6490. Dostupné z: [doi:https://doi.org/10.1073/pnas.1516401112](https://doi.org/10.1073/pnas.1516401112)
- [51] MICHALSKA, Karolina, Jennifer GALE, Grazyna JOACHIMIAK et al. Conservation of the structure and function of bacterial tryptophan synthases. *IUCrJ* [online]. 2019, 6(4), 649-664 [cit. 2021-03-25]. ISSN 2052-2525. Dostupné z: [doi:https://doi.org/10.1107/S2052252519005955](https://doi.org/10.1107/S2052252519005955)

- [52] XU, Lisheng, Fangkai HAN a Zhaojun WEI. Engineering Improves Enzymatic Synthesis of L-Tryptophan by Tryptophan Synthase from *Escherichia coli*. *Microorganisms* [online]. 2020, 8(4) [cit. 2021-03-25]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.3390/microorganisms8040519>
- [53] BULLER, Andrew R., Paul van ROYE, Jackson K.B. CAHN, Remkes A. SCHEELE, Michael HERGER a Frances H. ARNOLD. Directed Evolution Mimics Allosteric Activation by Stepwise Tuning of the Conformational Ensemble. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 2018, 140(23), 7256-7266 [cit. 2021-03-25]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1021/jacs.8b03490>
- [54] BUSCH, Florian, Chitra RAJENDRAN, Kristina HEYN, Sandra SCHLEE, Rainer MERKL a Reinhard STERNER. Ancestral Tryptophan Synthase Reveals Functional Sophistication of Primordial Enzyme Complexes. *Cell Chemical Biology* [online]. 2016, 23(6), 709-715 [cit. 2021-03-25]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2016.05.009>
- [55] NISHIO, Kazuya, Kyoko OGASAHARA, Yukio MORIMOTO, Tomitake TSUKIHARA, Soo Jae LEE a Katsuhide YUTANI. Large conformational changes in the *Escherichia coli* tryptophan synthase  $\beta 2$  subunit upon pyridoxal 5'-phosphate binding. *The FEBS Journal: Science Publishing by Scientists* [online]. 2010, 277(9), 2157-2170 [cit. 2021-03-30]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07631.x>
- [56] GOKULAN, Kuppan, Bernhard RUPP, Martin S. PAVELKA JR., William R. JACOBS JR. a James C. SACCHETTINI. Crystal Structure of *Mycobacterium tuberculosis* Diaminopimelate Decarboxylase: An Essential Enzyme in Bacterial Lysine Biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2003, 278(20), 18588-18596 [cit. 2021-03-20]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1074/jbc.M301549200>

## 8 Seznam obrázků

Obrázek 1: Schéma přípravy proteinu pro krystalizaci (upraveno z [4]).	3
Obrázek 2: Schéma afinitní chromatografie (upraveno z [12]).	6
Obrázek 3: Schéma iontově-výměnné chromatografie (upraveno z [12]).	7
Obrázek 4: Schéma gelové chromatografie (upraveno z [12]).	7
Obrázek 5: Schéma elektroforézy (upraveno z [22]).	8
Obrázek 6: Schéma SDS-PAGE elektroforézy (upraveno z [24]).	9
Obrázek 7: Schéma izoelektrické fokusace (převzato z [29]).	10
Obrázek 8: Schéma hmotnostní spektrometrie (převzato z [31]).	11
Obrázek 9: Fázový diagram růstu krystalů (upraveno z [37]).	13
Obrázek 10: Crush test	18
Obrázek 11: Dehydratace	18
Obrázek 12: Dye test	18
Obrázek 13: SDS-PAGE elektroforéza	18
Obrázek 14: Rtg. Difra. Analýza	18
Obrázek 15: Reakční schéma $\alpha$ a $\beta$ -reakcí (upraveno z [31]).	19
Obrázek 16: Biosyntéza <i>Psilocybinu</i> za použití TrpB (Bernhard Rupp, osobní komunikace).	20
Obrázek 17: Aparatura pro filtraci a degassing (pořízeno autorkou).	22
Obrázek 18: Robot OryxNano 4 (převzato z [49]).	27
Obrázek 19: Vypěstované kolonie proteinu v buňkách <i>E. coli</i> kmenu BL21 (pořízeno autorkou).	30
Obrázek 20: Vypěstovaná kultura kompetentních buněk <i>E. coli</i> kmenu BL21 přes noc (pořízeno autorkou).	31
Obrázek 21: Stočené buňky po expresi (pořízeno autorkou).	31
Obrázek 22: Oddělený pelet a supernatant po ultracentrifuze (pořízeno autorkou).	32

Obrázek 23: Záznam gelu po afinitní chromatografii (pořízeno autorkou).....	33
Obrázek 24: Záznam gelu po gelové chromatografii (pořízeno autorkou). ....	34
Obrázek 25: Precipitace při použití PCT testu (pořízeno autorkou). ....	35
Obrázek 26: Krystal v jamce F4 v sadě JCSG++ (pořízeno autorkou). ....	36
Obrázek 27: Krystal v jamce D9 v sadě MemGold2 (pořízeno autorkou).....	36
Obrázek 28: Krystal v jamce F12 v sadě SG1 (pořízeno autorkou).....	37
Obrázek 29: Precipitace po sedící kapce (pořízeno autorkou). ....	37
Obrázek 30: Precipitace po visící kapce (pořízeno autorkou). ....	38

## 9 Seznam tabulek

Tabulka I: Nejpoužívanější krystalizační techniky (Obrázky převzaty z [35]).....	16
Tabulka II: Základní faktory ovlivňující krystalizaci (upraveno z [2]).....	17
Tabulka III: Test krystalů (Obrázek 10, 12, 13 pořízeno autorkou, Obrázek 11, 14 převzat z [13]).....	18
Tabulka IV: Pořadí vzorků pro SDS-PAGE elektroforézu po Ni-NTA chromatografii. ....	25
Tabulka V: Pořadí vzorků pro SDS-PAGE elektroforézu po gelové chromatografii. ....	25
Tabulka VI: Schéma jednotlivých kapek pro TrpB pro PCT. ....	26
Tabulka VII: Schéma první jamky pro TrpB pro screening na robotovi.....	27
Tabulka VIII: Schéma první jamky pro TrpB pro optimalizaci ručně. ....	28

# 10 Přílohy

## Složení činidel sady PCT (Hampton Research)

### PCT Formulation

- Reagent A1 - 0.1 M TRIS hydrochloride pH 8.5, 2.0 M Ammonium sulfate
- Reagent B1 - 0.1 M TRIS hydrochloride pH 8.5, 1.0 M Ammonium sulfate
- Reagent A2 - 0.1 M TRIS hydrochloride pH 8.5,  
0.2 M Magnesium chloride hexahydrate,  
30% w/v Polyethylene glycol 4,000
- Reagent B2 - 0.1 M TRIS hydrochloride pH 8.5,  
0.2 M Magnesium chloride hexahydrate,  
15% w/v Polyethylene glycol 4,000

# Seznam precipitačních činidel sady Index HR (Hampton Research)

Index™

HR2-144 Reagent Formulation

Tube #	Salt	Tube #	Buffer ◊	Tube #	Precipitant
1.	None	1.	0.1 M Citric acid pH 3.5	1.	2.0 M Ammonium sulfate
2.	None	2.	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.5	2.	2.0 M Ammonium sulfate
3.	None	3.	0.1 M BIS-TRIS pH 5.5	3.	2.0 M Ammonium sulfate
4.	None	4.	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	4.	2.0 M Ammonium sulfate
5.	None	5.	0.1 M HEPES pH 7.5	5.	2.0 M Ammonium sulfate
6.	None	6.	0.1 M TRIS pH 8.5	6.	2.0 M Ammonium sulfate
7.	None	7.	0.1 M Citric acid pH 3.5	7.	3.0 M Sodium chloride
8.	None	8.	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.5	8.	3.0 M Sodium chloride
9.	None	9.	0.1 M BIS-TRIS pH 5.5	9.	3.0 M Sodium chloride
10.	None	10.	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	10.	3.0 M Sodium chloride
11.	None	11.	0.1 M HEPES pH 7.5	11.	3.0 M Sodium chloride
12.	None	12.	0.1 M TRIS pH 8.5	12.	3.0 M Sodium chloride
13.	None	13.	0.1 M BIS-TRIS pH 5.5	13.	0.3 M Magnesium formate dihydrate
14.	None	14.	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	14.	0.5 M Magnesium formate dihydrate
15.	None	15.	0.1 M HEPES pH 7.5	15.	0.5 M Magnesium formate dihydrate
16.	None	16.	0.1 M TRIS pH 8.5	16.	0.3 M Magnesium formate dihydrate
17.	None	17.	None - pH 5.6	17.	1.26 M Sodium phosphate monobasic monohydrate 0.14 M Potassium phosphate dibasic
18.	None	18.	None - pH 6.9	18.	0.49 M Sodium phosphate monobasic monohydrate 0.91 M Potassium phosphate dibasic
19.	None	19.	None - pH 8.2	19.	0.056 M Sodium phosphate monobasic monohydrate 1.344 M Potassium phosphate dibasic
20.	None	20.	0.1 M HEPES pH 7.5	20.	1.4 M Sodium citrate tribasic dihydrate
21.	None	21.	None	21.	1.8 M Ammonium citrate tribasic pH 7.0
22.	None	22.	None	22.	0.8 M Succinic acid pH 7.0
23.	None	23.	None	23.	2.1 M DL-Malic acid pH 7.0
24.	None	24.	None	24.	2.8 M Sodium acetate trihydrate pH 7.0
25.	None	25.	None	25.	3.5 M Sodium formate pH 7.0
26.	None	26.	None	26.	1.1 M Ammonium tartrate dibasic pH 7.0
27.	None	27.	None	27.	2.4 M Sodium malonate pH 7.0
28.	None	28.	None	28.	35% v/v Tacsimate™ pH 7.0
29.	None	29.	None	29.	60% v/v Tacsimate™ pH 7.0
30.	0.1 M Sodium chloride	30.	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	30.	1.5 M Ammonium sulfate
31.	0.8 M Potassium sodium tartrate tetrahydrate	31.	0.1 M TRIS pH 8.5	31.	0.5% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 5,000
32.	1.0 M Ammonium sulfate	32.	0.1 M BIS-TRIS pH 5.5	32.	1% w/v Polyethylene glycol 3,350
33.	1.1 M Sodium malonate pH 7.0	33.	0.1 M HEPES pH 7.0	33.	0.5% v/v Jeffamine® ED-2001 pH 7.0
34.	1.0 M Succinic acid pH 7.0	34.	0.1 M HEPES pH 7.0	34.	1% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 2,000
35.	1.0 M Ammonium sulfate	35.	0.1 M HEPES pH 7.0	35.	0.5% w/v Polyethylene glycol 8,000
36.	15% v/v Tacsimate™ pH 7.0	36.	0.1 M HEPES pH 7.0	36.	2% w/v Polyethylene glycol 3,350
37.	None	37.	None	37.	25% w/v Polyethylene glycol 1,500
38.	None	38.	0.1 M HEPES pH 7.0	38.	30% v/v Jeffamine® M-600® pH 7.0
39.	None	39.	0.1 M HEPES pH 7.0	39.	30% v/v Jeffamine® ED-2001 pH 7.0
40.	None	40.	0.1 M Citric acid pH 3.5	40.	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
41.	None	41.	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.5	41.	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
42.	None	42.	0.1 M BIS-TRIS pH 5.5	42.	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
43.	None	43.	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	43.	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
44.	None	44.	0.1 M HEPES pH 7.5	44.	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
45.	None	45.	0.1 M TRIS pH 8.5	45.	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
46.	None	46.	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	46.	20% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 5,000
47.	None	47.	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	47.	28% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 2,000
48.	0.2 M Calcium chloride dihydrate	48.	0.1 M BIS-TRIS pH 5.5	48.	45% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol

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

Index contains ninety-six unique reagents. To determine the formulation of each reagent, simply read across the page.



Tube #	Salt	Tube #	Buffer $\diamond$	Tube #	Precipitant
49.	0.2 M Calcium chloride dihydrate	49.	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	49.	45% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
50.	0.2 M Ammonium acetate	50.	0.1 M BIS-TRIS pH 5.5	50.	45% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
51.	0.2 M Ammonium acetate	51.	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	51.	45% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
52.	0.2 M Ammonium acetate	52.	0.1 M HEPES pH 7.5	52.	45% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
53.	0.2 M Ammonium acetate	53.	0.1 M Tris pH 8.5	53.	45% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
54.	0.05 M Calcium chloride dihydrate	54.	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	54.	30% v/v Polyethylene glycol monomethyl ether 550
55.	0.05 M Magnesium chloride hexahydrate	55.	0.1 M HEPES pH 7.5	55.	30% v/v Polyethylene glycol monomethyl ether 550
56.	0.2 M Potassium chloride	56.	0.05 M HEPES pH 7.5	56.	35% v/v Pentaerythritol propoxylate (5/4 PO(OH))
57.	0.05 M Ammonium sulfate	57.	0.05 M BIS-TRIS pH 6.5	57.	30% v/v Pentaerythritol ethoxylate (15/4 EO(OH))
58.	None	58.	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	58.	45% v/v Polypropylene glycol P 400
59.	0.02 M Magnesium chloride hexahydrate	59.	0.1 M HEPES pH 7.5	59.	22% w/v Poly(acrylic acid sodium salt) 5,100
60.	0.01 M Cobalt(II) chloride hexahydrate	60.	0.1 M Tris pH 8.5	60.	20% w/v Polyvinylpyrrolidone K 15
61.	0.2 M L-Proline	61.	0.1 M HEPES pH 7.5	61.	10% w/v Polyethylene glycol 3,350
62.	0.2 M Trimethylamine N-oxide dihydrate	62.	0.1 M Tris pH 8.5	62.	20% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 2,000
63.	5% v/v Tacsimate™ pH 7.0	63.	0.1 M HEPES pH 7.0	63.	10% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 5,000
64.	0.005 M Cobalt(II) chloride hexahydrate 0.005 M Nickel(II) chloride hexahydrate 0.005 M Cadmium chloride hydrate 0.005 M Magnesium chloride hexahydrate	64.	0.1 M HEPES pH 7.5	64.	12% w/v Polyethylene glycol 3,350
65.	0.1 M Ammonium acetate	65.	0.1 M BIS-TRIS pH 5.5	65.	17% w/v Polyethylene glycol 10,000
66.	0.2 M Ammonium sulfate	66.	0.1 M BIS-TRIS pH 5.5	66.	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
67.	0.2 M Ammonium sulfate	67.	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	67.	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
68.	0.2 M Ammonium sulfate	68.	0.1 M HEPES pH 7.5	68.	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
69.	0.2 M Ammonium sulfate	69.	0.1 M Tris pH 8.5	69.	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
70.	0.2 M Sodium chloride	70.	0.1 M BIS-TRIS pH 5.5	70.	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
71.	0.2 M Sodium chloride	71.	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	71.	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
72.	0.2 M Sodium chloride	72.	0.1 M HEPES pH 7.5	72.	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
73.	0.2 M Sodium chloride	73.	0.1 M Tris pH 8.5	73.	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
74.	0.2 M Lithium sulfate monohydrate	74.	0.1 M BIS-TRIS pH 5.5	74.	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
75.	0.2 M Lithium sulfate monohydrate	75.	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	75.	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
76.	0.2 M Lithium sulfate monohydrate	76.	0.1 M HEPES pH 7.5	76.	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
77.	0.2 M Lithium sulfate monohydrate	77.	0.1 M Tris pH 8.5	77.	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
78.	0.2 M Ammonium acetate	78.	0.1 M BIS-TRIS pH 5.5	78.	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
79.	0.2 M Ammonium acetate	79.	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	79.	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
80.	0.2 M Ammonium acetate	80.	0.1 M HEPES pH 7.5	80.	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
81.	0.2 M Ammonium acetate	81.	0.1 M Tris pH 8.5	81.	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
82.	0.2 M Magnesium chloride hexahydrate	82.	0.1 M BIS-TRIS pH 5.5	82.	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
83.	0.2 M Magnesium chloride hexahydrate	83.	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	83.	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
84.	0.2 M Magnesium chloride hexahydrate	84.	0.1 M HEPES pH 7.5	84.	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
85.	0.2 M Magnesium chloride hexahydrate	85.	0.1 M Tris pH 8.5	85.	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
86.	0.2 M Potassium sodium tartrate tetrahydrate	86.	None	86.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
87.	0.2 M Sodium malonate pH 7.0	87.	None	87.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
88.	0.2 M Ammonium citrate tribasic pH 7.0	88.	None	88.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
89.	0.1 M Succinic acid pH 7.0	89.	None	89.	15% w/v Polyethylene glycol 3,350
90.	0.2 M Sodium formate	90.	None	90.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
91.	0.15 M DL-Malic acid pH 7.0	91.	None	91.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
92.	0.1 M Magnesium formate dihydrate	92.	None	92.	15% w/v Polyethylene glycol 3,350
93.	0.05 M Zinc acetate dihydrate	93.	None	93.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
94.	0.2 M Sodium citrate tribasic dihydrate	94.	None	94.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
95.	0.1 M Potassium thiocyanate	95.	None	95.	30% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 2,000
96.	0.15 M Potassium bromide	96.	None	96.	30% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 2,000

$\diamond$  Buffer pH is that of a 1.0 M stock prior to dilution with other reagent components: pH with HCl or NaOH.

*Index contains ninety-six unique reagents. To determine the formulation of each reagent, simply read across the page.*

34 Journey  
Aliso Viejo, CA 92656-3317 U.S.A.  
Tel: (949) 425-1321 • Fax: (949) 425-1611  
E-mail: tech@hrmail.com

# Seznam precipitačních činidel sady JCSG++ (JCSG)



JBScreen JCSG++ HTS  
Cat.-No.: CS-206L

SCREEN FORMULATION



No.	Precipitant	Precipitant 2	Buffer	Additive
A1	50 % v/v Polyethylene glycol 400	none	100 mM Sodium acetate; pH 4.5	200 mM Lithium sulfate
A2	20 % w/v Polyethylene glycol 3,000	none	100 mM tri-Sodium citrate; pH 5.5	none
A3	20 % w/v Polyethylene glycol 3,350	none	none	200 mM di-Ammonium hydrogen citrate; pH 5.0
A4	30 % v/v 2-Methyl-2,4-pentandiol	none	100 mM Sodium acetate; pH 4.6	20 mM Calcium chloride
A5	20 % w/v Polyethylene glycol 3,350	none	none	200 mM Magnesium formate; pH 5.9
A6	20 % w/v Polyethylene glycol 1,000	none	100 mM Potassium phosphate citrate; pH 4.2	200 mM Lithium sulfate
A7	20 % w/v Polyethylene glycol 8,000	none	100 mM CHES; pH 9.5	none
A8	20 % w/v Polyethylene glycol 3,350	none	none	200 mM Ammonium formate; pH 6.6
A9	20 % w/v Polyethylene glycol 3,350	none	none	200 mM Ammonium chloride; pH 6.3
A10	20 % w/v Polyethylene glycol 3,350	none	none	200 mM Potassium formate; pH 7.3
A11	50 % v/v 2-Methyl-2,4-pentandiol	none	100 mM TRIS; pH 8.5	200 mM Ammonium di-hydrogen phosphate
A12	20 % w/v Polyethylene glycol 3,350	none	none	200 mM Potassium nitrate; pH 6.9
B1	none	none	100 mM tri-Sodium citrate; pH 4.0	800 mM Ammonium sulfate
B2	20 % w/v Polyethylene glycol 3,350	none	none	200 mM Sodium thiocyanate; pH 6.9
B3	20 % w/v Polyethylene glycol 6,000	none	100 mM BICINE; pH 9.0	none
B4	10 % w/v Polyethylene glycol 8,000	8 % v/v Ethylene glycol	100 mM HEPES; pH 7.5	none
B5	40 % v/v 2-Methyl-2,4-pentandiol	5 % w/v Polyethylene glycol 8,000	100 mM MES; pH 6.5	none
B6	30 % v/v Ethanol	5 % w/v Polyethylene glycol 1,000	100 mM Potassium phosphate citrate; pH 4.2	none
B7	8 % w/v Polyethylene glycol 4,000	none	100 mM Sodium acetate; pH 4.6	none
B8	10 % w/v Polyethylene glycol 8,000	none	100 mM TRIS; pH 7.0	200 mM Magnesium chloride
B9	20 % w/v Polyethylene glycol 6,000	none	100 mM tri-Sodium citrate; pH 5.0	none
B10	50 % v/v Polyethylene glycol 200	none	100 mM MES; pH 6.5	200 mM Magnesium chloride
B11	none	none	none	16 M tri-Sodium citrate
B12	20 % w/v Polyethylene glycol 3,350	none	none	200 mM tri-Potassium citrate; pH 8.3

\*pH values indicated are those of the 1.0 M buffer stock solution prior to dilution with other components



**JBScreen JCSG++ HTS**  
Cat.-No.: CS-206L

## SCREEN FORMULATION



No.	Precipitant	Precipitant 2	Buffer	Additive
C1	20 % w/v Polyethylene glycol 8,000	none	100 mM Potassium phosphate citrate; pH 4.2	200 mM Sodium chloride
C2	20 % w/v Polyethylene glycol 6,000	none	100 mM Tris-Sodium citrate; pH 4.0	1 M Lithium chloride
C3	20 % w/v Polyethylene glycol 3,350	none	none	200 mM Ammonium nitrate; pH 6.3
C4	10 % w/v Polyethylene glycol 6,000	none	100 mM HEPES; pH 7.0	none
C5	800 mM Sodium di-hydrogen phosphate	800 mM Potassium di-hydrogen phosphate	100 mM HEPES; pH 7.5	none
C6	40 % v/v Polyethylene glycol 300	none	100 mM Potassium phosphate citrate; pH 4.2	none
C7	10 % w/v Polyethylene glycol 3,000	none	100 mM Sodium acetate; pH 4.5	200 mM Zinc acetate
C8	20 % v/v Ethanol	none	100 mM TRIS; pH 8.5	none
C9	25 % v/v 1,2-Propanediol	10 % v/v Glycerol	100 mM Sodium Potassium phosphate; pH 6.2	none
C10	10 % w/v Polyethylene glycol 20,000	2 % v/v 1,4-Dioxane	100 mM BICINE; pH 9.0	none
C11	none	none	100 mM Sodium acetate; pH 4.6	2 M Ammonium sulfate
C12	10 % w/v Polyethylene glycol 1,000	10 % w/v Polyethylene glycol 8,000	none	none
D1	24 % w/v Polyethylene glycol 1,500	20 % v/v Glycerol	none	none
D2	30 % v/v Polyethylene glycol 400	none	100 mM HEPES; pH 7.5	200 mM Magnesium chloride
D3	50 % v/v Polyethylene glycol 200	none	100 mM Sodium Potassium phosphate; pH 6.2	200 mM Sodium chloride
D4	30 % w/v Polyethylene glycol 8,000	none	100 mM Sodium acetate; pH 4.5	200 mM Lithium sulfate
D5	70 % v/v 2-Methyl-2,4-pentanediol	none	100 mM HEPES; pH 7.5	none
D6	20 % w/v Polyethylene glycol 8,000	none	100 mM TRIS; pH 8.5	200 mM Magnesium chloride
D7	40 % v/v Polyethylene glycol 400	none	100 mM TRIS; pH 8.5	200 mM Lithium sulfate
D8	40 % v/v 2-Methyl-2,4-pentanediol	none	100 mM TRIS; pH 8.0	none
D9	25.5 % w/v Polyethylene glycol 4,000	15 % v/v Glycerol	none	170 mM Ammonium sulfate
D10	40 % v/v Polyethylene glycol 300	none	100 mM MES; pH 6.5	200 mM Calcium acetate
D11	14 % v/v 2-Propanol	30 % v/v Glycerol	70 mM Sodium acetate; pH 4.6	140 mM Calcium chloride
D12	16 % w/v Polyethylene glycol 8,000	20 % v/v Glycerol	none	40 mM Potassium di-hydrogen phosphate

\*pH values indicated are those of the 1.0 M buffer stock solution prior to dilution with other components



**IBScreen JCSG++ HTS**  
Cat.-No.: CS-206L

## SCREEN FORMULATION



Jena Bioscience

No.	Precipitant	Precipitant 2	Buffer	Additive
E1	none	none	100 mM MES, pH 6.5	1 M trisodium citrate
E2	2 M Ammonium sulfate	none	100 mM MES, pH 6.5	200 mM sodium chloride
E3	10 % v/v 2-Propanol	none	100 mM HEPES, pH 7.5	200 mM sodium chloride
E4	1.26 M Ammonium sulfate	none	100 mM TRIS, pH 8.5	200 mM lithium sulfate
E5	40 % v/v 2-Methyl-2,4-pentanediol	none	100 mM CAPS, pH 10.5	none
E6	20 % w/v polyethylene glycol 3,000	none	100 mM imidazole, pH 8.0	200 mM zinc acetate
E7	10 % v/v 2-Propanol	none	100 mM MES, pH 6.5	200 mM zinc acetate
E8	none	none	100 mM sodium acetate, pH 4.5	1 M di-Ammonium hydrogen phosphate
E9	none	none	100 mM MES, pH 6.5	1.6 M Magnesium sulfate
E10	10 % w/v Polyethylene glycol 6,000	none	100 mM BICINE, pH 9.0	none
E11	14.4 % w/v Polyethylene glycol 8,000	20 % v/v glycerol	80 mM MES, pH 6.5	160 mM Calcium acetate
E12	10 % w/v Polyethylene glycol 8,000	none	100 mM imidazole, pH 8.0	none
F1	30 % v/v Jeffamine® M-600	none	100 mM MES, pH 6.5	50 mM Calcium chloride
F2	none	none	100 mM trisodium citrate, pH 5.0	3.15 M Ammonium sulfate
F3	20 % v/v 2-Methyl-2,4-pentanediol	none	100 mM TRIS, pH 8.0	none
F4	20 % v/v Jeffamine® M-600	none	100 mM HEPES, pH 7.5	none
F5	50 % v/v Ethylene glycol	none	100 mM TRIS, pH 8.5	200 mM Magnesium chloride
F6	10 % v/v 2-Methyl-2,4-pentanediol	none	100 mM BICINE, pH 9.0	none
F7	none	none	none	800 mM di-Sodium succinate, pH 7.0
F8	none	none	none	2.1 M di-Sodium DL-malate, pH 7.0
F9	none	none	none	2.4 M di-Sodium malonate, pH 7.0
F10	0.5 % w/v Jeffamine® ED-2001, pH 7.0	none	100 mM HEPES, pH 7.0	1.1 M di-Sodium malonate, pH 7.0
F11	1 % w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 2,000	none	100 mM HEPES, pH 7.0	1 M di-Sodium succinate, pH 7.0
F12	30 % v/v Jeffamine® M-600, pH 7.0	none	100 mM HEPES, pH 7.0	none

\*pH values indicated are those of the 1.0 M buffer stock solution prior to dilution with other components



**JBScreen JCSG++ HTS**  
Cat.-No.: CS-206L

## SCREEN FORMULATION



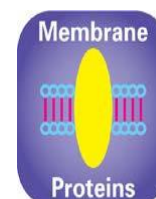
No.	Precipitant	Precipitant 2	Buffer	Additive
G1	30 % w/v Jefamine® ED-2001; pH 7.0	none	100 mM HEPES; pH 7.0	none
G2	22 % w/v Poly(acrylic acid sodium salt) 5,100	none	100 mM HEPES; pH 7.5	20 mM Magnesium chloride
G3	20 % w/v Polyvinylpyrrolidone K15	none	100 mM TRIS; pH 8.5	100 mM Cobalt (II) chloride
G4	20 % w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 2,000	none	100 mM TRIS; pH 8.5	200 mM Trimethylamine N-oxide
G5	12 % w/v Polyethylene glycol 3,350	none	100 mM HEPES; pH 7.5	5 mM Cobalt (II) chloride, 5 mM Cadmium chloride, 5 mM Nickel (II) chloride, 5 mM Magnesium chloride
G6	20 % w/v Polyethylene glycol 3,350	none	none	200 mM di-sodium malonate; pH 7.0
G7	15 % w/v Polyethylene glycol 3,350	none	none	100 mM di-sodium succinate; pH 7.0
G8	20 % w/v Polyethylene glycol 3,350	none	none	150 mM di-sodium DL-malate; pH 7.0
G9	30 % w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 2,000	none	none	100 mM Potassium thiocyanate
G10	30 % w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 2,000	none	none	150 mM Potassium bromide
G11	none	none	100 mM BIS-TRIS; pH 5.5	2 M Ammonium sulfate
G12	none	none	100 mM BIS-TRIS; pH 5.5	3 M Sodium chloride
H1	none	none	100 mM BIS-TRIS; pH 5.5	300 mM Magnesium formate
H2	1 % w/v Polyethylene glycol 3,350	none	100 mM BIS-TRIS; pH 5.5	1 M Ammonium sulfate
H3	25 % w/v Polyethylene glycol 3,350	none	100 mM BIS-TRIS; pH 5.5	none
H4	45 % w/v 2-Methyl-2+-pentanediol	none	100 mM BIS-TRIS; pH 5.5	200 mM Calcium chloride
H5	45 % w/v 2-Methyl-2+-pentanediol	none	100 mM BIS-TRIS; pH 5.5	200 mM Ammonium acetate
H6	17 % w/v Polyethylene glycol 10,000	none	100 mM BIS-TRIS; pH 5.5	100 mM Ammonium acetate
H7	25 % w/v Polyethylene glycol 3,350	none	100 mM BIS-TRIS; pH 5.5	200 mM Ammonium sulfate
H8	25 % w/v Polyethylene glycol 3,350	none	100 mM BIS-TRIS; pH 5.5	200 mM Sodium chloride
H9	25 % w/v Polyethylene glycol 3,350	none	100 mM BIS-TRIS; pH 5.5	200 mM Lithium sulfate
H10	25 % w/v Polyethylene glycol 3,350	none	100 mM BIS-TRIS; pH 5.5	200 mM Ammonium acetate
H11	25 % w/v Polyethylene glycol 3,350	none	100 mM BIS-TRIS; pH 5.5	200 mM Magnesium chloride
H12	45 % w/v 2-Methyl-2+-pentanediol	none	100 mM HEPES; pH 7.5	200 mM Ammonium acetate

\*pH values indicated are those of the 1.0 M buffer stock solution prior to dilution with other components

## Seznam precipitačních činidel sady MemGold2 (Molecular Dimension)

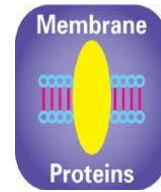


Molecular  
Dimensions



### MemGold2™ HT-96 / FX-96 Conditions A1-D12 MD1-64 / MD1-64-FX

Tube #	Conc. Salt	Conc. Salt2	Conc. Buffer	pH	Conc.	Precipitant
A1	0.2 M Magnesium chloride hexahydrate	0.005 M Cadmium chloride hemi(pentahydrate)	0.1 M Tris	7.5	14 % v/v	PEG 500 MME
A2	0.1 M Potassium acetate	0.01 M Potassium chloride	0.02 M Tris	7.0	44 % w/v	PEG 3000
A3	0.08 M Magnesium sulfate heptahydrate	0.02 M Sodium chloride	0.02 M MES	6.0	10 % w/v	PEG 1450
A4	0.04 M Magnesium sulfate heptahydrate	0.02 M Sodium chloride	0.02 M MES	6.5	8 % w/v	PEG 1450
A5	0.05 M Sodium sulfate	0.05 M Lithium chloride	0.05 M Tris	8.5	32 % v/v	PEG 400
A6	0.1 M Sodium phosphate monobasic mono	0.1 M Potassium phosphate dibasic	0.1 M Bis-Tris propane	7.5	10 % w/v	PEG 3350
A7	0.1 M Sodium chloride	0.1 M Lithium sulfate	0.1 M ADA	6.5	11.5 % w/v	PEG 4000
A8	0.1 M Lithium chloride	0.1 M Cadmium chloride hemi(pentahydrate)	0.1 M Sodium acetate	4.5	30 % v/v	PEG 400
A9	0.2 M Ammonium sulfate	0.1 M Sodium chloride	0.1 M Sodium citrate	6.0	20 % w/v	PEG 2000
A10	0.2 M Lithium sulfate	0.1 M Sodium chloride	0.1 M HEPES	7.0	31 % v/v	PEG 400
A11	0.2 M Ammonium phosphate monobasic	0.1 M Ammonium sulfate	0.1 M Sodium citrate	4.5	32 % v/v	PEG 400
A12	0.05 M Sodium citrate tribasic dihydrate	0.12 M Potassium chloride	0.08 M Bis-Tris	6.0	14 % w/v	PEG 4000
B1	0.1 M Sodium chloride	0.15 M Ammonium sulfate	0.01 M MES	6.5	19 % w/v	PEG 1000
B2	0.01 M Nickel(II) sulfate hexahydrate		0.1 M Sodium citrate	6.0	18 % w/v	PEG 2000 MME
B3	0.02 M Magnesium chloride hexahydrate		0.02 M MES	6.0	3.5 % w/v	PEG 3350
B4	0.02 M Sodium chloride		0.05 M MES	5.5	14 % v/v	PEG 350 MME
B5	0.025 M Magnesium chloride hexahydrate		0.02 M MOPS	7.0	35 % v/v	PEG 500 MME
B6	0.03 M Magnesium chloride hexahydrate		0.1 M MES	6.5	28 % v/v	PEG 400
B7	0.04 M Sodium chloride		0.04 M Tris	8.0	25 % v/v	PEG 350 MME
B8	0.04 M Magnesium acetate tetrahydrate		0.1 M MES	6.0	36 % v/v	MPD
B9	0.05 M Zinc acetate dihydrate		0.05 M ADA	6.3	11 % w/v	PEG 8000
B10	0.05 M Magnesium acetate tetrahydrate		0.1 M MES	6.5	26 % v/v	PEG 400
B11	0.05 M Magnesium acetate tetrahydrate		0.1 M Glycine	9.5	32 % v/v	PEG 400
B12	0.066 M Sodium chloride		0.02 M Tris	7.5	3 % w/v	PEG 4000
C1	0.075 M Magnesium chloride hexahydrate		0.1 M Sodium cacodylate	6.5	30 % w/v	PEG 2000 MME
C2	0.08 M Magnesium acetate tetrahydrate		0.1 M Sodium citrate	6.0	14 % w/v	PEG 5000 MME
C3	0.01 M Zinc acetate dihydrate	1.5 M Ammonium sulfate	0.1 M MES	6.0		
C4	0.087 M Ammonium sulfate		0.05 M Tris	7.0	22 % v/v	PEG 250 DME
C5	0.1 M Magnesium chloride hexahydrate		0.1 M Tris	7.5	13 % w/v	PEG 8000
C6	0.1 M Magnesium formate dihydrate		0.1 M MOPS	7.0	17 % w/v	PEG 3350
C7	0.1 M Potassium chloride		0.1 M Bis-Tris	6.0	18 % w/v	PEG 4000
C8	0.1 M Potassium chloride		0.1 M Potassium phosphate	7.5	18 % v/v	PEG 200
C9	0.1 M Magnesium acetate tetrahydrate		0.1 M MES	6.0	22 % w/v	PEG 4000
C10	0.1 M Calcium acetate hydrate		0.1 M MES	6.0	22 % w/v	PEG 8000
C11	0.1 M Ammonium sulfate		0.1 M HEPES	8.5	23 % w/v	PEG 3350
C12	0.1 M Potassium chloride		0.1 M MES	6.0	32 % v/v	PEG 400
D1	0.1 M Sodium chloride		0.1 M MES	6.5	36 % v/v	PEG 300
D2	0.1 M Sodium chloride		0.1 M BICINE	9.0	45 % v/v	PEG 500 MME
D3	0.15 M Calcium chloride dihydrate		0.1 M Glycine	9.0	35 % v/v	PEG 400
D4	0.2 M Ammonium sulfate		0.05 M ADA	6.5	13 % w/v	PEG 4000
D5	0.2 M Choline chloride		0.1 M Tris	7.5	14 % w/v	PEG 2000 MME
D6	0.2 M Sodium chloride		0.05 M MOPS	7.0	19 % w/v	PEG 6000
D7	0.05 M Sodium chloride		0.05 M MOPS	7.0	19 % w/v	PEG 6000
D8	0.2 M Magnesium formate dihydrate		0.05 M Tris	8.0	19 % w/v	PEG 3350
D9	0.2 M Calcium chloride dihydrate		0.1 M MES	5.0	20 % v/v	PEG 350 MME
D10	0.2 M Ammonium nitrate		0.05 M HEPES	7.0	20 % w/v	PEG 3350
D11	0.02 M Lithium chloride	0.05 M Magnesium chloride hexahydrate	0.02 M Glycine	10.0	33 % w/v	PEG 1000
D12	0.2 M Calcium acetate hydrate		0.1 M HEPES	7.0	24 % v/v	PEG 400

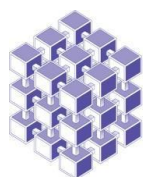


**MemGold2™ HT-96 / FX-96 Conditions E1-H12**

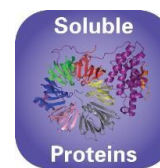
**MD1-64 / MD1-64-FX**

Tube #	Conc. Salt	Conc. Salt2	Conc. Buffer	pH	Conc. Precipitant
E1	0.2 M Sodium acetate trihydrate		0.1 M MES	6.5	28 % v/v PEG 400
E2	0.2 M Sodium chloride		0.05 M Calcium acetate	5.0	29 % v/v PEG 400
E3	0.2 M Sodium chloride		0.1 M HEPES	7.0	29 % v/v PEG 400
E4	0.2 M Ammonium formate		0.1 M Tris	7.0	31 % v/v Pentaerythritole ethoxylate (15/4 EO/OH)
E5	0.2 M Ammonium sulfate		0.1 M Tris	8.5	35 % w/v PEG 3350
E6	0.2 M Calcium acetate hydrate		0.1 M Sodium acetate	5.0	38 % v/v PEG 400
E7	0.2 M Sodium chloride		0.1 M MOPS	7.5	38 % v/v PEG 400
E8	2.0 M Ammonium sulfate	0.2 M Sodium chloride	0.1 M Sodium cacodylate	6.5	
E9	0.225 M Ammonium sulfate		0.05 M Sodium acetate	4.0	12 % w/v PEG 4000
E10	0.23 M Sodium chloride		0.05 M Sodium acetate	4.5	33 % v/v PEG 400
E11	0.25 M Magnesium formate dihydrate		0.1 M Sodium cacodylate	6.5	22 % w/v PEG 3000
E12	0.25 M Magnesium chloride hexahydrate		0.1 M Tris	8.5	40 % w/v PEG 1000
F1	0.3 M Lithium sulfate		0.1 M MES	6.5	25 % v/v PEG 400
F2	0.3 M Ammonium formate		0.05 M Tris	9.0	33 % v/v PEG 500 MME
F3	0.3 M Barium chloride dihydrate		0.1 M MES	6.0	34 % v/v PEG 400
F4	0.32 M Lithium chloride		0.1 M Sodium citrate	5.5	14 % w/v PEG 4000
F5	0.34 M Ammonium sulfate		0.1 M Sodium citrate	5.5	12 % w/v PEG 4000
F6	0.35 M Lithium sulfate		0.1 M Sodium acetate	4.0	11 % v/v PEG 600
F7	0.37 M Potassium nitrate		0.1 M MES	6.5	22 % v/v PEG 400
F8	0.4 M Ammonium sulfate		0.1 M MES	6.5	10 % w/v PEG 3350
F9	0.04 M Magnesium chloride hexahydrate	0.05 M Sodium chloride	0.1 M HEPES	7.5	32 % v/v PEG 400
F10	0.4 M Potassium chloride		0.05 M HEPES	7.5	12 % v/v PEG 400
F11	0.4 M Ammonium thiocyanate		0.1 M Sodium acetate	4.5	15 % w/v PEG 4000
F12	0.4 M Sodium thiocyanate		0.1 M Sodium acetate	4.0	16 % w/v PEG 4000
G1	0.5 M Potassium chloride		0.05 M HEPES	6.5	20 % v/v PEG 400
G2	0.5 M Magnesium chloride hexahydrate		0.05 M Tris	7.5	21 % v/v PEG 350 MME
G3	0.8 M Potassium formate		0.1 M Sodium acetate	5.0	11 % w/v PEG 4000
G4	none		0.1 M MOPS	7.0	9 % w/v PEG 8000
G5	none		0.1 M MES	6.0	11 % w/v PEG 20,000
G6	none		0.1 M MES	6.5	13 % v/v PEG 400
G7	none		0.1 M ADA	5.5	14 % w/v PEG 6000
G8	none		0.05 M Tris	7.5	17 % v/v PEG 350 MME
G9	none		0.07 M Sodium citrate	4.5	22 % v/v PEG 300
G10	none		0.05 M ADA	6.5	24 % v/v PEG 400
G11	none		0.1 M Sodium cacodylate	6.5	24 % w/v PEG 1500
G12	none		0.1 M HEPES	7.5	28 % v/v PEG 600
H1	none		0.05 M Tris	8.5	28 % v/v PEG 400
H2	none		0.1 M BICINE	9.0	30 % v/v PEG 400
H3	none		0.1 M ADA	7.0	31 % v/v PEG 600
H4	none		0.1 M Tris	8.5	32 % v/v PEG 500 MME
H5	none		0.1 M HEPES	7.5	33 % v/v PEG 400
H6	none		0.18 M Sodium citrate	4.0	34 % w/v PEG 3350
H7	none		0.1 M Tris	8.5	44 % v/v PEG 200
H8	none		0.1 M Tris	8.0	65 % v/v MPD
H9	2.75 M Ammonium chloride		0.025 M Bis-Tris	7.0	
H10	2.8 M Ammonium chloride		0.075 M HEPES	7.5	
H11	3.0 M Ammonium sulfate		0.1 M MES	5.5	

## Seznam precipitačních činidel sady SG1 (Molecular Dimension)



Molecular  
Dimensions



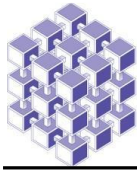
### SG1 Screen HT-96

### Conditions A1 - D12

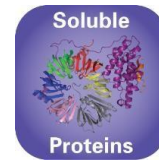
### MD1-89 / MD1-89-FX

Well #	Conc. Salt1	Conc. Salt2	Conc. Buffer	pH	Conc. Precipitant1	Conc. Precipitant2
A1	0.2 M Magnesium chloride hexahydrate		0.1 M Tris	8.5	30 % w/v PEG 4000	
A2	2.0 M Ammonium sulfate					
A3	0.2 M Sodium acetate trihydrate				20 % w/v PEG 3350	
A4	2.0 M Ammonium sulfate		0.1 M Tris	8.5		
A5	0.2 M Sodium citrate tribasic dihydrate				20 % w/v PEG 3350	
A6			0.1 M Sodium HEPES	7.5	20 % w/v PEG 4000	10 % v/v 2-Propanol
A7	2.0 M Ammonium sulfate		0.1 M Sodium HEPES	7.5	2 % v/v PEG 400	
A8	1.4 M Sodium citrate tribasic dihydrate		0.1 M Sodium HEPES	7.5		
A9	0.2 M Sodium acetate trihydrate		0.1 M Tris	8.5	30 % w/v PEG 4000	
A10	0.2 M Lithium sulfate		0.1 M Tris	8.5	30 % w/v PEG 4000	
A11	4.0 M Sodium formate					
A12	0.2 M Magnesium acetate tetrahydrate		0.1 M Sodium cacodylate	6.5	20 % w/v PEG 8000	
B1			0.1 M Bis-Tris	5.5	25 % w/v PEG 3350	
B2			0.1 M MES	6.5	12 % w/v PEG 20000	
B3	0.2 M Magnesium chloride hexahydrate		0.1 M Bis-Tris	5.5	25 % w/v PEG 3350	
B4	0.2 M Ammonium sulfate		0.1 M MES	6.5	30 % w/v PEG 5000 MME	
B5	0.2 M Calcium chloride dihydrate				20 % w/v PEG 3350	
B6			0.1 M Sodium HEPES	7.5	20 % w/v PEG 10000	
B7	0.2 M Sodium formate				20 % w/v PEG 3350	
B8	0.2 M Ammonium sulfate		0.1 M Bis-Tris	5.5	25 % w/v PEG 3350	
B9	1.6 M Sodium citrate tribasic dihydrate					
B10	0.2 M Calcium chloride dihydrate		0.1 M Sodium HEPES	7.5	28 % v/v PEG 400	
B11	0.2 M Ammonium chloride				20 % w/v PEG 3350	
B12	0.2 M Magnesium formate dihydrate				20 % w/v PEG 3350	
C1	0.2 M Ammonium sulfate		0.1 M Sodium acetate	4.6	25 % w/v PEG 4000	
C2	1.4 M Sodium malonate dibasic monohydrate pH 7.0					
C3	0.2 M Lithium sulfate		0.1 M Bis-Tris	5.5	25 % w/v PEG 3350	
C4	0.2 M Potassium sodium tartrate tetrahydrate				20 % w/v PEG 3350	
C5	0.2 M Ammonium sulfate		0.1 M Sodium cacodylate	6.5	30 % w/v PEG 8000	
C6	2.0 M Ammonium sulfate		0.1 M Sodium acetate	4.6		
C7			0.1 M Sodium HEPES	7.5	25 % w/v PEG 3350	
C8	0.2 M Magnesium chloride hexahydrate		0.1 M Bis-Tris	6.5	25 % w/v PEG 3350	
C9	0.2 M Magnesium chloride hexahydrate		0.1 M Tris	8.5	25 % w/v PEG 3350	
C10	0.2 M Magnesium chloride hexahydrate		0.1 M Sodium HEPES	7.5	25 % w/v PEG 3350	
C11	0.2 M Sodium acetate trihydrate		0.1 M Sodium cacodylate	6.5	30 % w/v PEG 8000	
C12	0.2 M Sodium acetate trihydrate		0.1 M Bis-Tris	5.5	25 % w/v PEG 3350	
D1	1.5 M Lithium sulfate		0.1 M Sodium HEPES	7.5		
D2			0.1 M Sodium citrate	5.5	20 % w/v PEG 3000	
D3					25 % w/v PEG 1500	
D4	0.2 M Potassium thiocyanate				20 % w/v PEG 3350	
D5	0.2 M Sodium acetate trihydrate		0.1 M Sodium cacodylate	6.5	18 % w/v PEG 8000	
D6	0.2 M Lithium sulfate		0.1 M Sodium HEPES	7.5	25 % w/v PEG 3350	
D7	0.2 M Ammonium sulfate				30 % w/v PEG 8000	
D8			0.1 M Bis-Tris	6.5	20 % w/v PEG 5000 MME	
D9	0.2 M Ammonium sulfate		0.1 M Sodium acetate	4.6	30 % w/v PEG 2000 MME	
D10	0.2 M Lithium sulfate		0.1 M Bis-Tris	6.5	25 % w/v PEG 3350	
D11			0.1 M Sodium acetate	4.6	8 % w/v PEG 4000	
D12	2.0 M Ammonium sulfate		0.1 M Bis-Tris	6.5		





Molecular  
Dimensions



## SG1 Screen HT-96

## Conditions E1 - H12

## MD1-89 / MD1-89-FX

Well #	Conc. Salt1	Conc. Salt2	Conc. Buffer	pH	Conc.	Precipitant1
E1	2.0 M Ammonium sulfate		0.1 M Bis-Tris	5.5		
E2					25 % w/v	PEG 3350
E3	0.2 M Magnesium chloride hexahydrate		0.1 M Sodium HEPES	7.5	30 % v/v	PEG 400
E4	2.0 M Ammonium sulfate		0.1 M Sodium HEPES	7.5		
E5	3.5 M Sodium formate					
E6	1.6 M Magnesium sulfate heptahydrate		0.1 M MES	6.5		
E7	0.2 M Magnesium chloride hexahydrate				20 % w/v	PEG 3350
E8	0.2 M Ammonium sulfate				30 % w/v	PEG 4000
E9	0.1 M Potassium thiocyanate				30 % w/v	PEG 2000 MME
E10	0.2 M Sodium malonate dibasic monohydrate pH7				20 % w/v	PEG 3350
E11	2.0 M Sodium formate		0.1 M Sodium acetate	4.6		
E12	0.2 M Ammonium sulfate		0.1 M Sodium HEPES	7.5	25 % w/v	PEG 3350
F1	0.2 M Potassium sodium tartrate tetrahydrate	2.0 M Ammonium sulfate	0.1 M Sodium citrate	5.6		
F2	0.2 M Sodium acetate trihydrate		0.1 M Sodium HEPES	7.5	25 % w/v	PEG 3350
F3	0.2 M Ammonium sulfate				20 % w/v	PEG 3350
F4	1.0 M Sodium citrate tribasic dihydrate		0.1 M Sodium cacodylate	6.5		
F5	0.2 M Ammonium sulfate		0.1 M Bis-Tris	6.5	25 % w/v	PEG 3350
F6	0.2 M Ammonium nitrate				20 % w/v	PEG 3350
F7	0.2 M Sodium thiocyanate				20 % w/v	PEG 3350
F8	0.2 M Potassium nitrate				20 % w/v	PEG 3350
F9			0.1 M Sodium HEPES	7.5	20 % w/v	PEG 8000
F10	0.2 M Magnesium acetate tetrahydrate				20 % w/v	PEG 3350
F11			0.1 M Bis-Tris	6.5	25 % w/v	PEG 3350
F12	0.02 M Calcium chloride dihydrate		0.1 M Sodium acetate	4.6	30 % v/v	MPD
G1	0.2 M Sodium acetate trihydrate		0.1 M MES	6.0	20 % w/v	PEG 8000
G2	0.2 M Sodium sulfate				20 % w/v	PEG 3350
G3	0.01 M Zinc sulfate heptahydrate		0.1 M MES	6.5	25 % v/v	PEG 550 MME
G4	0.2 M Sodium tartrate dibasic dihydrate				20 % w/v	PEG 3350
G5					60 % v/v	T-mate pH 7.0
G6	0.5 M Ammonium sulfate	1.0 M Lithium sulfate	0.1 M Sodium citrate	5.6		
G7					30 % w/v	PEG 1500
G8	0.2 M Magnesium chloride hexahydrate		0.1 M Tris	8.5	20 % w/v	PEG 8000
G9	0.2 M Ammonium tartrate dibasic				20 % w/v	PEG 3350
G10	0.2 M Sodium fluoride				20 % w/v	PEG 3350
G11	0.2 M Sodium chloride	2.0 M Ammonium sulfate	0.1 M Sodium cacodylate	6.5		
G12	0.1 M Sodium chloride	1.6 M Ammonium sulfate	0.1 M Sodium HEPES	7.5		
H1	0.2 M Ammonium formate				20 % w/v	PEG 3350
H2	0.2 M Lithium citrate tribasic tetrahydrate				20 % w/v	PEG 3350
H3	0.2 M Ammonium iodide				20 % w/v	PEG 3350
H4	0.2 M Sodium acetate trihydrate		0.1 M Bis-Tris	6.5	25 % w/v	PEG 3350
H5					30 % w/v	PEG 4000
H6			0.1 M Tris	8.5	25 % w/v	PEG 3350
H7	0.2 M Ammonium fluoride				20 % w/v	PEG 3350
H8	0.1 M Sodium acetate trihydrate		0.1 M Bis-Tris	5.5	17 % w/v	PEG 10000
H9	0.2 M Sodium acetate trihydrate		0.1 M Imidazole	8.0	10 % w/v	PEG 8000
H10	0.2 M Ammonium sulfate		0.1 M Tris	8.5	25 % w/v	PEG 3350
H11			0.1 M CHES	9.0	20 % w/v	PEG 8000
H12	4.3 M Sodium chloride		0.1 M Sodium HEPES	7.5		

## Seznam precipitačních činidel sady MorpheusII (Molecular Dimension)

Screen ID	Well #	Conc.	Additives (PDB ligands)	Conc.	Buffer	pH	Conc.	Precipitant
1-1	A1	90 mM	LiNaK	0.1 M	Buffer System 4	6.5	36 % v/v	Precipitant Mix 5
1-2	A2	90 mM	LiNaK	0.1 M	Buffer System 4	6.5	32.5 % v/v	Precipitant Mix 6
1-3	A3	90 mM	LiNaK	0.1 M	Buffer System 4	6.5	30 % v/v	Precipitant Mix 7
1-4	A4	90 mM	LiNaK	0.1 M	Buffer System 4	6.5	31 % v/v	Precipitant Mix 8
1-5	A5	90 mM	LiNaK	0.1 M	Buffer System 5	7.5	36 % v/v	Precipitant Mix 5
1-6	A6	90 mM	LiNaK	0.1 M	Buffer System 5	7.5	32.5 % v/v	Precipitant Mix 6
1-7	A7	90 mM	LiNaK	0.1 M	Buffer System 5	7.5	30 % v/v	Precipitant Mix 7
1-8	A8	90 mM	LiNaK	0.1 M	Buffer System 5	7.5	31 % v/v	Precipitant Mix 8
1-9	A9	90 mM	LiNaK	0.1 M	Buffer System 6	8.5	36 % v/v	Precipitant Mix 5
1-10	A10	90 mM	LiNaK	0.1 M	Buffer System 6	8.5	32.5 % v/v	Precipitant Mix 6
1-11	A11	90 mM	LiNaK	0.1 M	Buffer System 6	8.5	30 % v/v	Precipitant Mix 7
1-12	A12	90 mM	LiNaK	0.1 M	Buffer System 6	8.5	31 % v/v	Precipitant Mix 8
1-13	B1	2 mM	Divalents II	0.1 M	Buffer System 4	6.5	36 % v/v	Precipitant Mix 5
1-14	B2	2 mM	Divalents II	0.1 M	Buffer System 4	6.5	32.5 % v/v	Precipitant Mix 6
1-15	B3	2 mM	Divalents II	0.1 M	Buffer System 4	6.5	30 % v/v	Precipitant Mix 7
1-16	B4	2 mM	Divalents II	0.1 M	Buffer System 4	6.5	31 % v/v	Precipitant Mix 8
1-17	B5	2 mM	Divalents II		none		36 % v/v	Precipitant Mix 5
1-18	B6	2 mM	Divalents II		none		32.5 % v/v	Precipitant Mix 6
1-19	B7	2 mM	Divalents II		none		30 % v/v	Precipitant Mix 7
1-20	B8	2 mM	Divalents II		none		31 % v/v	Precipitant Mix 8
1-21	B9	2 mM	Divalents II	0.1 M	Buffer System 6	8.5	36 % v/v	Precipitant Mix 5
1-22	B10	2 mM	Divalents II	0.1 M	Buffer System 6	8.5	32.5 % v/v	Precipitant Mix 6
1-23	B11	2 mM	Divalents II	0.1 M	Buffer System 6	8.5	30 % v/v	Precipitant Mix 7
1-24	B12	2 mM	Divalents II	0.1 M	Buffer System 6	8.5	31 % v/v	Precipitant Mix 8
1-25	C1	4 mM	Alkalis	0.1 M	Buffer System 4	6.5	36 % v/v	Precipitant Mix 5
1-26	C2	4 mM	Alkalis	0.1 M	Buffer System 4	6.5	32.5 % v/v	Precipitant Mix 6
1-27	C3	4 mM	Alkalis	0.1 M	Buffer System 4	6.5	30 % v/v	Precipitant Mix 7
1-28	C4	4 mM	Alkalis	0.1 M	Buffer System 4	6.5	31 % v/v	Precipitant Mix 8
1-29	C5	4 mM	Alkalis	0.1 M	Buffer System 5	7.5	36 % v/v	Precipitant Mix 5
1-30	C6	4 mM	Alkalis	0.1 M	Buffer System 5	7.5	32.5 % v/v	Precipitant Mix 6
1-31	C7	4 mM	Alkalis	0.1 M	Buffer System 5	7.5	30 % v/v	Precipitant Mix 7
1-32	C8	4 mM	Alkalis	0.1 M	Buffer System 5	7.5	31 % v/v	Precipitant Mix 8
1-33	C9	4 mM	Alkalis	0.1 M	Buffer System 6	8.5	36 % v/v	Precipitant Mix 5
1-34	C10	4 mM	Alkalis	0.1 M	Buffer System 6	8.5	32.5 % v/v	Precipitant Mix 6
1-35	C11	4 mM	Alkalis	0.1 M	Buffer System 6	8.5	30 % v/v	Precipitant Mix 7
1-36	C12	4 mM	Alkalis	0.1 M	Buffer System 6	8.5	31 % v/v	Precipitant Mix 8
1-37	D1	2 mM	Oxometalates	0.1 M	Buffer System 4	6.5	36 % v/v	Precipitant Mix 5
1-38	D2	2 mM	Oxometalates	0.1 M	Buffer System 4	6.5	32.5 % v/v	Precipitant Mix 6
1-39	D3	2 mM	Oxometalates	0.1 M	Buffer System 4	6.5	30 % v/v	Precipitant Mix 7
1-40	D4	2 mM	Oxometalates	0.1 M	Buffer System 4	6.5	31 % v/v	Precipitant Mix 8
1-41	D5	2 mM	Oxometalates	0.1 M	Buffer System 5	7.5	36 % v/v	Precipitant Mix 5
1-42	D6	2 mM	Oxometalates	0.1 M	Buffer System 5	7.5	32.5 % v/v	Precipitant Mix 6
1-43	D7	2 mM	Oxometalates	0.1 M	Buffer System 5	7.5	30 % v/v	Precipitant Mix 7
1-44	D8	2 mM	Oxometalates	0.1 M	Buffer System 5	7.5	31 % v/v	Precipitant Mix 8
1-45	D9	2 mM	Oxometalates	0.1 M	Buffer System 6	8.5	36 % v/v	Precipitant Mix 5
1-46	D10	2 mM	Oxometalates	0.1 M	Buffer System 6	8.5	32.5 % v/v	Precipitant Mix 6
1-47	D11	2 mM	Oxometalates	0.1 M	Buffer System 6	8.5	30 % v/v	Precipitant Mix 7
1-48	D12	2 mM	Oxometalates	0.1 M	Buffer System 6	8.5	31 % v/v	Precipitant Mix 8

Screen should be stored between 10-18°C and gently mixed before use

Screen ID	Well #	Conc.	Additives (PDB ligands)	Conc.	Buffer	pH	Conc.	Precipitant
2-1	E1	2 mM	Lanthanides*	0.1 M	Buffer System 4	6.5	36 % v/v	Precipitant Mix 5
2-2	E2	2 mM	Lanthanides*	0.1 M	Buffer System 4	6.5	32.5 % v/v	Precipitant Mix 6
2-3	E3	2 mM	Lanthanides*	0.1 M	Buffer System 4	6.5	30 % v/v	Precipitant Mix 7
2-4	E4	2 mM	Lanthanides*	0.1 M	Buffer System 4	6.5	31 % v/v	Precipitant Mix 8
2-5	E5	2 mM	Lanthanides*	0.1 M	Buffer System 5	7.5	36 % v/v	Precipitant Mix 5
2-6	E6	2 mM	Lanthanides*	0.1 M	Buffer System 5	7.5	32.5 % v/v	Precipitant Mix 6
2-7	E7	2 mM	Lanthanides*	0.1 M	Buffer System 5	7.5	30 % v/v	Precipitant Mix 7
2-8	E8	2 mM	Lanthanides*	0.1 M	Buffer System 5	7.5	31 % v/v	Precipitant Mix 8
2-9	E9	2 mM	Lanthanides*	0.1 M	Buffer System 6	8.5	36 % v/v	Precipitant Mix 5
2-10	E10	2 mM	Lanthanides*	0.1 M	Buffer System 6	8.5	32.5 % v/v	Precipitant Mix 6
2-11	E11	2 mM	Lanthanides*	0.1 M	Buffer System 6	8.5	30 % v/v	Precipitant Mix 7
2-12	E12	2 mM	Lanthanides*	0.1 M	Buffer System 6	8.5	31 % v/v	Precipitant Mix 8
2-13	F1	100 mM	Monosaccharides II	0.1 M	Buffer System 4	6.5	36 % v/v	Precipitant Mix 5
2-14	F2	100 mM	Monosaccharides II	0.1 M	Buffer System 4	6.5	32.5 % v/v	Precipitant Mix 6
2-15	F3	100 mM	Monosaccharides II	0.1 M	Buffer System 4	6.5	30 % v/v	Precipitant Mix 7
2-16	F4	100 mM	Monosaccharides II	0.1 M	Buffer System 4	6.5	31 % v/v	Precipitant Mix 8
2-17	F5	100 mM	Monosaccharides II	0.1 M	Buffer System 5	7.5	36 % v/v	Precipitant Mix 5
2-18	F6	100 mM	Monosaccharides II	0.1 M	Buffer System 5	7.5	32.5 % v/v	Precipitant Mix 6
2-19	F7	100 mM	Monosaccharides II	0.1 M	Buffer System 5	7.5	30 % v/v	Precipitant Mix 7
2-20	F8	100 mM	Monosaccharides II	0.1 M	Buffer System 5	7.5	31 % v/v	Precipitant Mix 8
2-21	F9	100 mM	Monosaccharides II	0.1 M	Buffer System 6	8.5	36 % v/v	Precipitant Mix 5
2-22	F10	100 mM	Monosaccharides II	0.1 M	Buffer System 6	8.5	32.5 % v/v	Precipitant Mix 6
2-23	F11	100 mM	Monosaccharides II	0.1 M	Buffer System 6	8.5	30 % v/v	Precipitant Mix 7
2-24	F12	100 mM	Monosaccharides II	0.1 M	Buffer System 6	8.5	31 % v/v	Precipitant Mix 8
2-25	G1	100 mM	Amino acids II	0.1 M	Buffer System 4	6.5	36 % v/v	Precipitant Mix 5
2-26	G2	100 mM	Amino acids II	0.1 M	Buffer System 4	6.5	32.5 % v/v	Precipitant Mix 6
2-27	G3	100 mM	Amino acids II	0.1 M	Buffer System 4	6.5	30 % v/v	Precipitant Mix 7
2-28	G4	100 mM	Amino acids II	0.1 M	Buffer System 4	6.5	31 % v/v	Precipitant Mix 8
2-29	G5	100 mM	Amino acids II	0.1 M	Buffer System 5	7.5	36 % v/v	Precipitant Mix 5
2-30	G6	100 mM	Amino acids II	0.1 M	Buffer System 5	7.5	32.5 % v/v	Precipitant Mix 6
2-31	G7	100 mM	Amino acids II	0.1 M	Buffer System 5	7.5	30 % v/v	Precipitant Mix 7
2-32	G8	100 mM	Amino acids II	0.1 M	Buffer System 5	7.5	31 % v/v	Precipitant Mix 8
2-33	G9	100 mM	Amino acids II	0.1 M	Buffer System 6	8.5	36 % v/v	Precipitant Mix 5
2-34	G10	100 mM	Amino acids II	0.1 M	Buffer System 6	8.5	32.5 % v/v	Precipitant Mix 6
2-35	G11	100 mM	Amino acids II	0.1 M	Buffer System 6	8.5	30 % v/v	Precipitant Mix 7
2-36	G12	100 mM	Amino acids II	0.1 M	Buffer System 6	8.5	31 % v/v	Precipitant Mix 8
2-37	H1	40 mM	Polyamines†	0.1 M	Buffer System 4	6.5	36 % v/v	Precipitant Mix 5
2-38	H2	40 mM	Polyamines†	0.1 M	Buffer System 4	6.5	32.5 % v/v	Precipitant Mix 6
2-39	H3	40 mM	Polyamines†	0.1 M	Buffer System 4	6.5	30 % v/v	Precipitant Mix 7
2-40	H4	40 mM	Polyamines†	0.1 M	Buffer System 4	6.5	31 % v/v	Precipitant Mix 8
2-41	H5	40 mM	Polyamines†	0.1 M	Buffer System 5	7.5	36 % v/v	Precipitant Mix 5
2-42	H6	40 mM	Polyamines†	0.1 M	Buffer System 5	7.5	32.5 % v/v	Precipitant Mix 6
2-43	H7	40 mM	Polyamines†	0.1 M	Buffer System 5	7.5	30 % v/v	Precipitant Mix 7
2-44	H8	40 mM	Polyamines†	0.1 M	Buffer System 5	7.5	31 % v/v	Precipitant Mix 8
2-45	H9	40 mM	Polyamines†	0.1 M	Buffer System 6	8.5	36 % v/v	Precipitant Mix 5
2-46	H10	40 mM	Polyamines†	0.1 M	Buffer System 6	8.5	32.5 % v/v	Precipitant Mix 6
2-47	H11	40 mM	Polyamines†	0.1 M	Buffer System 6	8.5	30 % v/v	Precipitant Mix 7
2-48	H12	40 mM	Polyamines†	0.1 M	Buffer System 6	8.5	31 % v/v	Precipitant Mix 8

**Screen should be stored between 10-18°C and gently mixed before use**

\*A light pellet may form in tubes 2-1 to 2-12/well numbers B-1 to B-12 which contain Lanthanides (2-1 to 2-12). It is easily re-suspended with gentle mixing.

†The polyamine mix must be prepared and added to the 12 corresponding tubes by the user. The raw chemicals in a powder mix are provided in the kit in a 15 mL glass bottle. Sufficient ultrapure (>18.0 MΩ) water should be added to this bottle to make up a 13 mL solution.

## Sekvence aminokyselin tryptofan syntasy TrpB s His-Tagem

```
1          10          20          30          40          50
|          |          |          |          |          |
MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQQMGRGSEFELRRQASMEAIKKV
FENKKAEGIPVLVTFVVTAGYPRPEDTVPILLAMEAGGADIIELGMPFSDP
IADGPVIQETNTIAPANQVDYTTVLGQLREARKQGLKAPVLLMGYYNPIL
AYGEDRSIQDAAEAGANGFIMVDLPPEEAVAFREKCIKSNLSYVPLIAPS
TTLSRIKFLSTIADTFIYVVS KMGTGSSEKVAMNNALPTIIDRIREYAE
VPLAVGFGVATRAHFNYVADSGADGVVIGTKLVNVIKES PQGEAPKNVEA
YCREMSQKGETNRVKS PPTARAASSESI PVVVP SVLPARFGEFGGQYVPE
ALVDCLVELEEAHKSAMADPEFQKELQSHAGYANRPSQIYLAENLTKDAG
GANIWLKREDLNHTGSHKINNALGQILLARRIGKTRIIAETGAGQHGVAT
ATVCAKFGMECVIYMGAEDVRRQALNVFRIEMLGAKVVPVTS GSCTLKDA
VNEAFRDWVTNLSTTHYLVGSVIGPHPFPTIVRDFQKVIQEIKAQMLAA
RGKLPDVVACVGGGSAIGTFYDFIGDKSVRLVGV EAGGEGIDGDRHSA
TLSMGQPGVLHGVRTYILQDKAGQIIETHSISAGLDYPGVGPEHAWLKDS
KRAEYVVATDEEALRGFRMLTQREGIIPALESSHAIWEAVRIARTMSKDQ
DLVVCLSGRGDKDVEQISQLLPKWADILDWHVSSHAVGHTTKF
```