

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**

Krystalizační studie ptačího reovirálního proteinu σ NS

Bakalářská práce

Aneta Fořtová

Školitelka: Mgr. Barbora Kašćáková, Ph.D.

Konzultantka: Mgr. Petra Havlíčková

České Budějovice 2023

Forťová, A., 2023: Krystalizační studie ptačího reovirálního proteinu σ NS. [Crystallization study of the avian reoviral protein σ NS. Bc. Thesis, in Czech.] – 78 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

Optimal conditions for σ NS truncated protein expression and purification were studied. Then, RNA binding activity of this protein was tested. This thesis also deals with finding suitable conditions for protein crystal growth.

Prohlášení

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

V Českých Budějovicích dne 13. 4. 2023

.....

Podpis

Poděkování

Ráda bych tímto poděkovala své školitelce Mgr. Barboře Kašćákové, Ph.D. za odborné vedení mé práce, za její ochotu a věnovaný čas. Dále děkuji prof. Mgr. Ivaně Kuté Smatanové, Ph. D. a Mgr. Michalovi Kutému, Ph.D. za nabídku této práce. Děkuji také konzultantce Mgr. Petře Havlíčkové a celému týmu v laboratoři za užitečné rady a podporu.

Velké poděkování patří také mé rodině, příteli a přátelům, kteří mě během celého studia podporovali.

Obsah

1 Úvod.....	1
2 Ptačí reoviry	2
2.1 Charakterizace ptačích reovirů.....	2
2.2 Struktura a morfologie ptačího reoviru	2
2.3 Srovnání ptačích a savčích reovirů.....	4
2.4 Replikace ptačího reoviru.....	6
2.5 Ptačí reovirální protein σ NS.....	8
2.6 Porovnání funkčních homologů: ptačí reovirální protein σ NS a rotavirální NSP2	8
3 Makromolekulární krystalografie.....	10
3.1 Princip krystalogeneze	10
3.2 Podmínky pro krystalizaci proteinů	11
3.3 Metody krystalizace	12
4 Cíle práce.....	13
5 Materiály a metody.....	14
5.1 Klonování	14
5.1.1 Teplotní gradient pro amplifikaci plazmidu.....	14
5.1.2 Elektroforéza DNA v agarózovém gelu	14
5.1.3 Amplifikace DNA	15
5.1.4 Izolace DNA z agarózového gelu.....	16
5.1.5 Ligace a transformace do amplifikačních buněk.....	17
5.1.6 Colony PCR.....	18
5.1.7 Příprava a izolace plazmidu	19
5.2 Transformace.....	20
5.3 Pilotní exprese	21
5.4 Analýza vzorků	23
5.4.1 Příprava vzorků	23
5.4.2 SDS – PAGE elektroforéza	23
5.5 Exprese ve velkém měřítku	24
5.6 Homogenizace buněk	25
5.7 Purifikace	26
5.7.1 Příprava pufrů.....	26
5.7.2 Histidinová afinitní chromatografie	26
5.7.3 Heparinová afinitní chromatografie	27
5.7.4 Příprava vzorku pro gelovou chromatografii	27

5.7.5 Gelová chromatografie	28
5.8 Nativní gelová elektroforéza	28
5.9 Krystalizace proteinu σ NS truncated	30
5.9.1 Pre-krystalizační test	30
5.9.2 Manuální krystalizace	31
5.9.3 Krystalizace pomocí krystalizačního robota	31
5.9.4 Optimalizace krystalizačních podmínek	33
6 Výsledky	34
6.1 Klonování	34
6.1.1 Teplotní gradient	34
6.1.2 Amplifikace DNA	35
6.1.3 Izolace DNA z agarózového gelu	35
6.1.4 Colony PCR	36
6.1.5 Příprava a izolace plazmidu	36
6.2 Transformace do kompetentních buněk	37
6.3 Pilotní exprese	38
6.4 Exprese ve velkém měřítku	42
6.5 Purifikace	44
6.6 Nativní gelová elektroforéza	48
6.7 Krystalizace proteinu σ NS truncated	49
6.7.1 Pre-krystalizační test	49
6.7.2 Manuální krystalizace	49
6.7.3 Krystalizace pomocí krystalizačního robota	50
6.7.4 Optimalizace krystalizačních podmínek	54
7 Diskuze	56
8 Závěr	58
9 Seznam použité literatury	59
10 Přílohy	63
Příloha č. 1: Seznam činidel sady PCT Pre-Crystallization Test	63
Příloha č. 2: Seznam krystalizačních podmínek pro sadu Morpheus II	64
Příloha č. 3: Seznam krystalizačních podmínek pro sadu SG1	65
Příloha č. 4: Seznam krystalizačních podmínek pro sadu LFS	67
Příloha č. 5: Seznam krystalizačních podmínek pro sadu MemGold	69
Příloha č. 6: Seznam krystalizačních podmínek pro sadu MemGold 2	71
Příloha č. 7: Seznam krystalizačních podmínek pro sadu JCSG-plus	73

Příloha č. 8: Seznam krystalizačních podmínek pro sadu PEG/Ion HT.....	75
Příloha č. 9: Seznam krystalizačních podmínek pro sadu JBScreen Basic HTS	77

1 Úvod

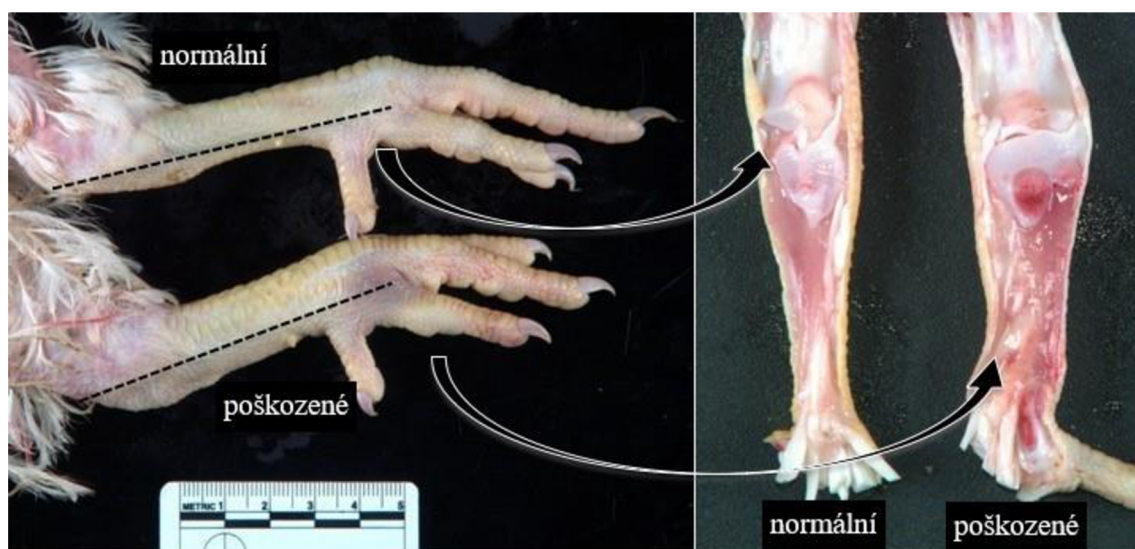
Ptačí reoviry z rodu *Orthoreovirus* jsou považovány za velmi významné patogeny napadající a poškozující ptáky, a to včetně jejich hospodářsky významných druhů. Dříve byla směřována hlavní pozornost výzkumů na savčí reoviry, jakožto prototyp tohoto rodu. Předpokládalo se, že ptačí reoviry jsou jim velmi podobné. Následné výzkumy zaměřené na ptačí reoviry ale odhalily mnohé odlišnosti těchto druhů.

Tato práce se zabývá studiem ptačího reovirálního proteinu σ NS. Teoretická část se zaměřuje na charakterizaci a strukturní popis ptačích reovirů, dále na porovnání ptačích a savčích reovirů, na replikační cyklus ptačích reovirů, na bližší popis ptačího reovirálního proteinu σ NS a na porovnání funkčních homologů proteinu σ NS, a to zejména rotavirálního proteinu NSP2. Teoretická část se dále věnuje makromolekulární krystalografii. Praktická část se zabývá expresí a purifikací ptačího reovirálního proteinu σ NS truncated, který má odstraněnou N-terminální část, pomocí standardních chromatografických metod. Také se zabývá testováním, zda má protein σ NS truncated zachovanou schopnost vazby RNA-funkce jako RNA chaperon. Dále se zaměřuje na krystalizaci tohoto proteinu, konkrétně na nalezení vhodných krystalizačních podmínek a jejich optimalizaci, s cílem vytvoření krystalů v difrakční kvalitě vhodných pro testování a získání difrakčních dat.

2 Ptačí reoviry

2.1 Charakterizace ptačích reovirů

Ptačí reoviry patří do rodu *Orthoreovirus* spadajícího do čeledě *Reoviridae* (Mertens 2004). Jsou závažnými patogeny ptáků. Mají negativní dopad na průmysl zabývající se chovem a zpracováním drůbeže, kde dochází v důsledku infekcí k velkým ztrátám (Rosenberger et al. 1989). Původně byly tyto reoviry objeveny u mladých kuřat, kde způsobují tenosynovitidu neboli syndrom virové artritidy. Toto onemocnění se u drůbeže projevuje otoky hlezenních kloubů a lézemi ve šlachách svalu lýtky (Jones 2000). Projev virové artritidy u drůbeže je vidět na Obr. 1.



Obrázek 1: Normální a poškozené šlachy u drůbeže (Nicholds, 2020).

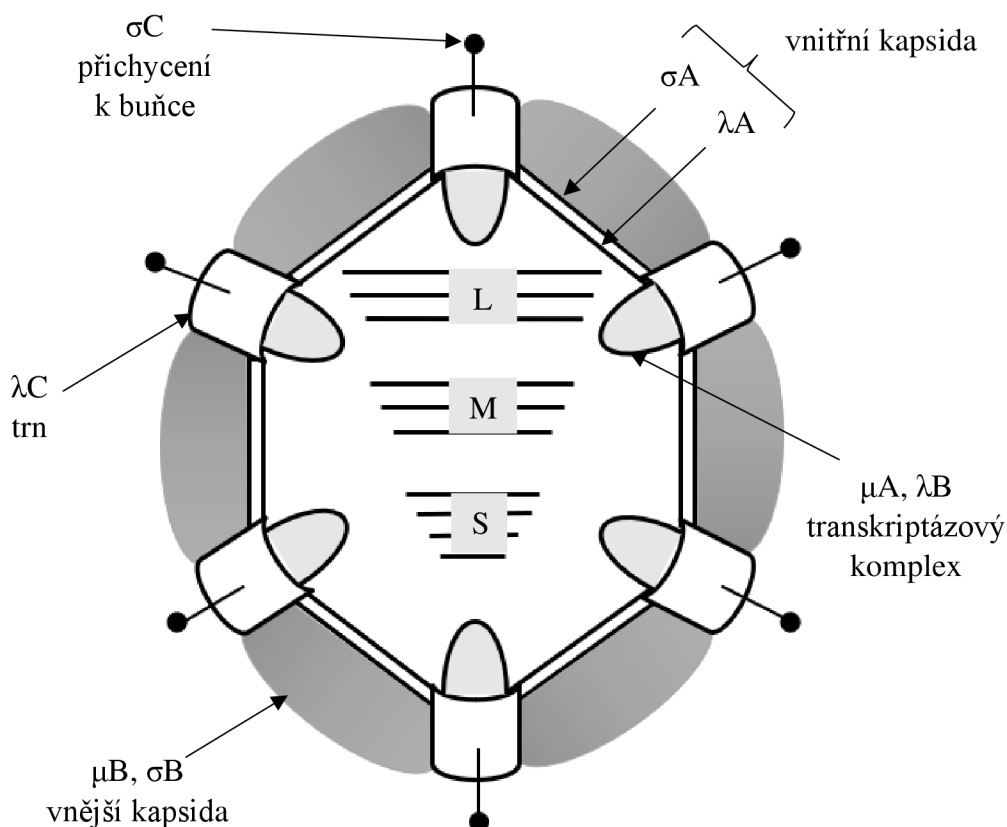
Následně byl zjištěn všudypřítomný výskyt ptačích reovirů mezi hejny drůbeže. Infekce způsobené těmito reoviry bývají sice často asymptomatické, ale jedná se o původce vážných onemocnění. Kromě již zmiňované tenosynovitidy způsobují také střevní a respirační onemocnění, myokarditidu (zánětlivé onemocnění srdeční svaloviny) nebo hepatitidu (zánět jater). Způsob infekce může být různý. Kromě nákazy fekálně-orální cestou byl prokázán přenos vajíčky a dýchacími cestami (Jones 2000, Benavente a Martínez-Costas 2007).

2.2 Struktura a morfologie ptačího reoviru

Genom ptačího reoviru se skládá z 10 segmentů dvouvláknové RNA (dsRNA) a je obalen dvouvrstvou kapsidou (Yin a Lee 2000). Tyto segmenty se na základě jejich elektroforetické mobility dělí do 3 velikostních tříd: S (malé), M (střední) a L (velké). Třída ‚S‘ zahrnuje celkem 4 segmenty dvouvláknové RNA (S1, S2, S3, S4), třída ‚M‘ se dělí

na 3 segmenty (M1, M2, M3) a třída ,L' obsahuje také 3 segmenty (L1, L2, L3). Segment L1 má ze všech nejnižší elektroforetickou mobilitu, zatímco u segmentu S4 je elektroforetická mobilita nejvyšší. Segment S1 by se podle tohoto pravidla měl řadit do třídy M (jednalo by se o segment M4), avšak z historických důvodů a s cílem udržení podobnosti se savčími reoviry byl zařazen do třídy S (Martínez-Costas et al. 1995, Benavente a Martínez-Costas 2007).

Doposud bylo zjištěno, že genom ptačího reoviru exprimuje 8 strukturálních proteinů (σA , σB , σC , μA , μB , λA , λB , λC) a 4 nestruturní proteiny (σNS , μNS , p10, p17) (Varela et al. 1996). Název většiny proteinů se skládá ze dvou částí: z písmene řecké abecedy (σ u proteinů exprimovaných třídou genů S, μ u proteinů exprimovaných třídou genů M a λ u proteinů exprimovaných třídou genů L) a z písmene A, B nebo C u strukturálních proteinů (tato písmena opět přímo souvisí s elektroforetickou mobilitou) nebo NS (případně NSC nebo NSN) u nestruturních proteinů. Struktura ptačího reoviru je schematicky zobrazena na Obr. 2 (Benavente a Martínez-Costas 2007).



Obrázek 2: Struktura ptačího reoviru (vytvořeno autorkou podle Benavente a Martínez-Costas 2007).

V Tab. I je zobrazen základní přehled proteinů ptačího reoviru. U každého proteinu je shrnuto, z jakého segmentu genomu je daný protein exprimován, dále je uvedeno rozdělení podle výskytu daného proteinu v rámci reoviru a jaká je jeho základní funkce.

Tabulka I: Přehled proteinů ptačího reoviru (upraveno dle Benavente a Martínez-Costas 2007).

Protein	Segment genomu	Rozdělení	Funkce
λA	L1	Vnitřní kapsida	Tvoří vnitřní obal jádra
λB	L2	Vnitřní kapsida	Předpokládaná transkriptáza
λC	L3	Trny	Capping enzym
μA	M1	Vnitřní kapsida	Předpokládaný kofaktor transkriptázy
$\mu B, \mu BN, \mu BC$	M2	Vnější kapsida	Penetrace ptačího reoviru do hostitelské buňky
$\mu NS, \mu NSC, \mu NSN$	M3	Nestrukturní	Formace virových inkluzí a vázání proteinů
σC	S1	Vnější kapsida	Uchycení k buňce
p10		Nestrukturní	Indukuje fúzi hostitelských buněk
p17		Nestrukturní	Neznámá
σA	S2	Vnitřní kapsida	Vazba dsRNA, anti-interferonová aktivita
σB	S3	Vnější kapsida	Neznámá
σNS	S4	Nestrukturní	Váže ssRNA

2.3 Srovnání ptačích a savčích reovirů

Rod *Orthoreovirus* zahrnuje celkem šest druhů: ptačí reovirus, savčí reovirus, reovirus paviána, reovirus Nelson Bay, rybí reovirus a plazí reovirus (Pitcovski a Goyal 2020).

Ptačí reoviry byly dlouhou dobu považovány za velmi podobné savčím reovirům, které jsou nejvíce prozkoumaným druhem z rodu *Orthoreovirus*. Ptačí a savčí reoviry se navzájem skutečně podobají v mnohých morfologických a fyzikálně-chemických vlastnostech. Postupem času ale ptačí reoviry přitáhly velkou pozornost molekulárních biologů, a tak došlo k odhalení mnoha aspektů, ve kterých se tyto druhy odlišují (Benavente a Martínez-Costas 2007). Jednou z hlavních odlišností ptačích reovirů je schopnost indukovat fúzi hostitelských buněk. Na rozdíl od savčích reovirů se vyznačují nedostatečnou hemaglutinační aktivitou (Pitcovski a Goyal 2019).

Jelikož spolu ptačí a savčí reoviry sdílí všech 8 strukturních homologních proteinů, je jejich struktura velmi podobná. Názvy jednotlivých strukturních proteinů savčích reovirů jsou

vyjádřeny pomocí písmen řecké abecedy (stejně jako u proteinů ptačích reovirů), avšak druhá část názvu je označena číslicemi 1, 2 nebo 3 (místo písmen A, B a C). V Tab. II jsou uvedeny savčí reovirální proteiny odpovídající svou strukturou i základní funkcí proteinům ptačího reoviru (Zhang et al. 2005).

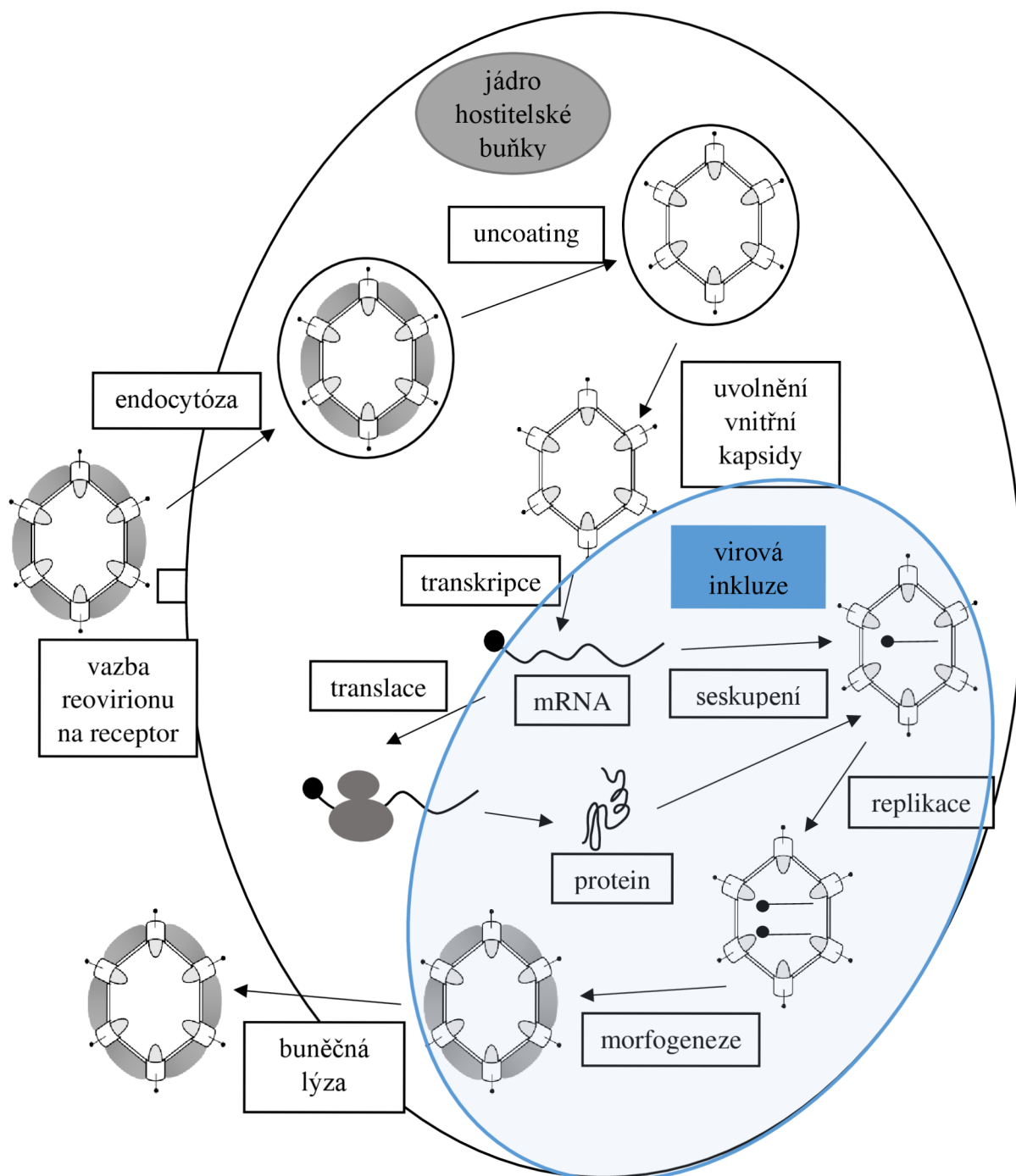
Tabulka II: Pojmenování ptačích a savčích reovirálních proteinů (Zhang et al. 2005).

ptačí reoviry	λA	λB	λC	μA	μB	σA	σB	σC	σNS	μNS
savčí reoviry	$\lambda 1$	$\lambda 3$	$\lambda 2$	$\mu 2$	$\mu 1$	$\sigma 2$	$\sigma 3$	$\sigma 1$	σNS	μNS

Významná podobnost se vyskytuje i u nestrukturních proteinů. Proteiny σNS těchto reovirů se sice výrazně liší svou sekvencí, ale i přes to je jejich funkce téměř totožná. Oba proteiny tvoří oligomery se schopností vázat se na jednořetězcovou RNA (pomocí konformačních domén) i DNA, avšak jejich afinita ke dvouřetězcové RNA a DNA je velmi nízká. Rozdílem je, že savčí protein σNS se lépe váže na ssRNA než na ssDNA, zatímco u ptačího proteinu σNS je afinita k ssRNA a ssDNA vyrovnaná (Borodavka et al. 2015).

2.4 Replikace ptačího reoviru

Ptačí reovirální protein σ NS má bezesporu velmi důležitou funkci v průběhu replikace. Replikační cyklus ptačího reoviru probíhá v cytoplasmě infikovaných buněk, a to v několika postupných a na sebe navazujících krocích. Schéma replikačního cyklu je zobrazeno na Obr. 3.



Obrázek 3: Replikační cyklus ptačího reoviru (vytvořeno dle Benavente a Martínez-Costas 2007).

Prvním krokem je penetrace, kdy viriony pronikají do hostitelské buňky pomocí endocytózy, jež je zprostředkována receptory (Grande a Benavente 2000). Po úspěšné penetraci následuje proces nazývaný „uncoating“ probíhající v intracelulárních vakuolách. Během něho jsou působením proteolytických enzymů částečně nebo zcela odstraněny vnější kapsidové proteiny. V důsledku tohoto procesu se uvolňují subvirové částice, které se vyznačují schopností procházet membránou (Benavente a Martínez-Costas 2007). Po uvolnění vnitřních kapsid do cytoplazmy následuje transkripce virového genomu. Templátem pro syntézu mRNA jsou negativní vlákna segmentů virového genomu. Transkripce je katalyzována virem kódovanou dsRNA-dependentní RNA polymerázou. Prostřednictvím transkripce segmentů genomu dvouvláknové RNA vzniká celkem 10 virových mRNA (Martinez-Costas et al. 1995). Tyto mRNA mají dvě odlišné funkce – jsou využity k translaci virových proteinů na ribozomech, nebo se používají jako templáty pro syntézu virových záporných řetězců genomu ve virové inkluzi. V případě translace by se dalo předpokládat, že poměr nově vytvořených polypeptidů bude vyrovnaný podobně jako výskyt virových transkriptů. Ve skutečnosti ale množství některých polypeptidů výrazně převažuje, konkrétně se jedná o proteiny σ NS, σ B a μ BC. Naopak množství proteinů λ B, μ A, σ C, p10 a p17 je poměrně nižší (Nibert and Schiff 2001). Na konci replikačního cyklu je virovou morfogenezí dokončena formace zralých reovirionů, tedy tvorba vnější kapsidy. Reoviriony v posledním kroku opouštějí infikovanou hostitelskou buňku, a to pomocí buněčné lýzy. Důležitým proteinem k uvolnění virionu je zřejmě protein p10 způsobující permeabilitu membrány a indukuje fúzi hostitelských buněk (Benavente a Martínez-Costas 2007).

Protein σ NS se v průběhu replikace uplatňuje zejména ve fázi, kdy dochází k třídění a seskupení vždy jedné kopie od každého z deseti druhů vzniklé virové mRNA a k jejich následnému zabalení do virových částic nazývaných virové inkluze neboli viroplazmy. Přesný mechanismus tohoto procesu ještě není znám, ale předpokládá se, že protein σ NS v něm hraje klíčovou roli díky jeho schopnosti vázat RNA. Globulární virové inkluze jsou formovány proteinem μ NS, avšak σ NS a λ A jsou jedinými proteiny, které se na inkluze následně vážou (Touris-Otero et al. 2004; Touris-Otero et al. 2005).

2.5 Ptačí reovirální protein σ NS

Nestrukturní protein σ NS, který je exprimován genomovým segmentem S4, se skládá z 367 aminokyselin a jeho molekulová hmotnost je 40 kDa (Huang et al. 2005). Nachází se ve velkých ribonukleoproteinových komplexech v cytoplazmě infikovaných buněk a vyznačuje se schopností vázat se na jednořetězcovou RNA (ssRNA) za účelem balení a replikace RNA, přičemž nezáleží na její sekvenci. Minimální velikost RNA, která umožní navázání proteinu σ NS, je 10 až 20 nukleotidů (Benavente a Martínez-Costas 2007). Na základě mutagenní analýzy se předpokládá, že protein σ NS, v jehož celé sekvenci je rozptýleno pět argininových bazických konzervovaných zbytků důležitých pro vazbu RNA, váže RNA prostřednictvím konformačních domén. (Tourís-Otero et al. 2005). Tyto argininové zbytky se nacházejí v pozicích 6, 329, 330, 335 a 365 (Borodavka et al. 2015).

Bylo zjištěno, že protein σ NS se na jednořetězcovou RNA váže jen ve formě hexamerů. Ty se tvoří z dimerů pomocí hydrofobních interakcí, přičemž je postačující nízká mikromolární koncentrace dimerů tohoto proteinu. Během pozdější fáze infekce se protein vyskytuje ve viroplazmách ve vysokých koncentracích. Předpokládá se tedy, že se hexamery proteinu σ NS vytváří bez problémů také *in vivo* (Borodavka et al. 2015).

Ptačí reovirální protein σ NS vykazuje aktivitu RNA chaperonu. Během třízení a balení segmentů do virových inkluzí napomáhá k tvorbě specifických interakcí mezi mRNA, jakožto různými genomovými prekurzory (Borodavka et al. 2015). Jak už bylo zmíněno, protein σ NS má schopnost vázat se ve formě hexamerů na jednořetězcovou RNA. Tato vazba má za následek lokální destabilizaci a odvíjení sekundární struktury RNA. V důsledku rozvinutí helixu je umožněné nasedání komplementárních řetězců. Tvoří se tak stabilnější intermolekulární duplexy. Podstata proteinu σ NS jako RNA chaperonu tedy spočívá v urychlení skládání RNA během tvorby virových inkluzí (Rajkowitsch et al. 2007).

2.6 Porovnání funkčních homologů: ptačí reovirální protein σ NS a rotavirální NSP2

Rotaviry patří do rodu *Rotavirus*, který se společně s rodem *Orthoreovirus* řadí do čeledě *Reoviridae*. Rotaviry jsou celosvětově považovány za nebezpečné patogeny způsobující gastroenteritidu, jež může být zejména u dětí život ohrožující. Genom rotaviru kóduje celkem 6 strukturních a 6 nestrukturních proteinů. Strukturní proteiny se označují jako „VPs,, (z angličtiny viral proteins), nestrukturní proteiny nesou označení „NSPs,, (z angličtiny non-structural proteins) (Greenberg a Estes 2009).

Ukázalo se, že obdobně jako v případě ptačích reovirů, dochází u rotavirů k tvorbě virových inkluzí. Objevují se přibližně 2 až 3 hodiny po infekci. Nejdůležitější roli v souvislosti s tvorbou virových inkluzí během replikačního cyklu mají nestrukturní proteiny NSP2 a NSP5 (Pesavento et al. 2006).

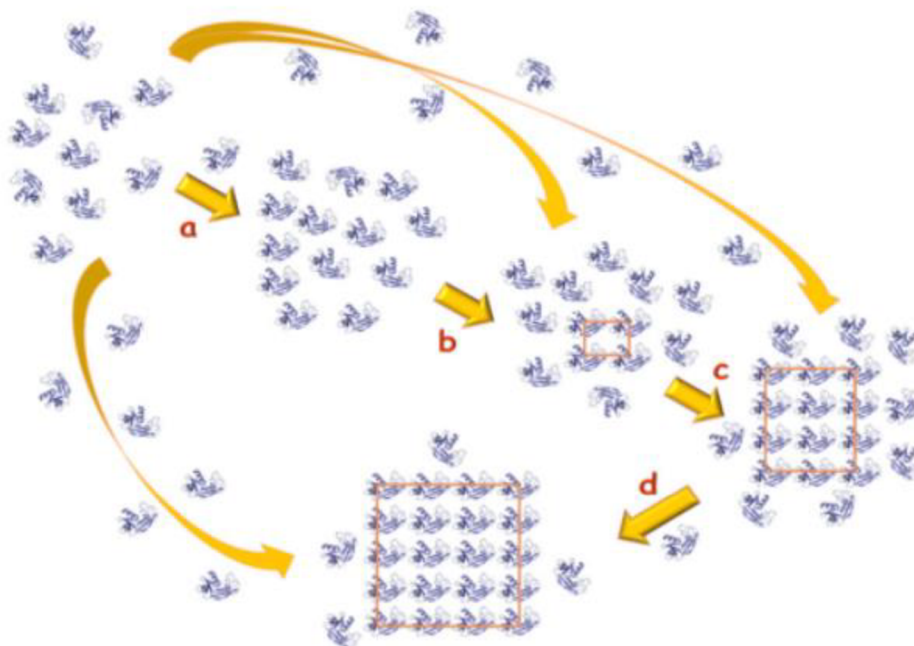
Protein NSP2 se vyznačuje schopností vázat jednořetězcovou RNA a narušovat strukturu helixu, čímž se velmi podobá ptačímu reovirálnímu proteinu σ NS (viz. 2.4 Replikace ptačího reoviru). Mimo to má rotavirální protein NSP2 přidruženou aktivitu nukleosidtrifosfatázy (NTPáza). Ta se v přítomnosti Mg^{2+} projevuje jako katalyzátor pro hydrolyzu NTP (nukleosidtrifosfát) na NDP (nukleosiddifosfát), čímž dochází k uvolnění energie. Díky ní může protein NSP2 fungovat jako molekulární motor a řídí tak balení virové mRNA (Taraporewala et al. 1999).

3 Makromolekulární krystalografie

Rentgenová krystalografie je jednou z velmi důležitých metod využívaných za účelem určení struktury různých biologických makromolekul. Znalost struktury těchto makromolekul je zásadní pro pochopení jejich funkce. Také umožňuje jejich modifikaci, čehož se využívá v různých odvětvích průmyslu, například ve farmaceutickém nebo zemědělském průmyslu (Kutá Smatanová 2003).

3.1 Princip krystalogeneze

Tvorba krystalů probíhá za vhodných podmínek v několika na sebe navazujících krocích. Celý proces, jehož hlavní fáze jsou nukleace a růst krystalu, je znázorněn na Obr. 4. Při ideálním nasycení roztoku se přiměřené množství molekul asociuje do neuspořádaných shluků. V tu chvíli začíná probíhat nukleace (a), kde se molekuly trojrozměrně orientují a redistribuují. Během následující fáze (b) dochází ke vzniku tzv. kritického jádra, které umožňuje navázání dalších molekul na svůj povrch (c), čímž vzniká samotný krystal. V poslední fázi (d) se další volné molekuly začleňují do krystalické mřížky, a tak se krystal zvětšuje. Růst krystalu je ukončen ve chvíli, kdy je v roztoku příliš nízká koncentrace molekul. Dalšími možnými důvody zastavení růstu krystalu může být výskyt nečistot na povrchu krystalu či napětí destabilizující krystalickou mřížku (Krauss et al. 2013).



Obrázek 4: Nukleace a růst krystalu (a – nukleace, b – vznik tzv. kritického jádra, c - vznik krystalu, d – růst krystalu) (Krauss et al. 2013).

3.2 Podmínky pro krystalizaci proteinů

K vypěstování krystalů vhodných pro rentgenovou strukturní analýzu je nutné znát faktory ovlivňující jejich vznik a růst. Přesné podmínky však nelze všeobecně definovat, a to z důvodu vysoké specifity jednotlivých proteinů, které chceme krystalizovat. Konkrétní podmínky musí být určeny jednotlivě pro každý protein, stejně tak musí být zvolena vhodná precipitační činidla (Kutá Smatanová 2003). Podle výsledků krystalizace daného proteinu by měly být podmínky následně měněny s očekávaným zlepšením tvorby krystalů a jejich kvality. Přehled důležitých podmínek ovlivňujících krystalizaci proteinů je zobrazen v Tab. III.

Tabulka III: Faktory ovlivňující krystalizaci (Krauss et al. 2013).

fyzikální faktory	chemické faktory	biochemické faktory
teplota	typ precipitačního činidla	čistota vzorku
tlak	koncentrace precipitačního činidla	homogenita vzorku
čas	pH	sekvenční modifikace
gravitace	typ pufru	posttranslační modifikace
viskozita	iontová síla	
povrch krystalizační destičky	koncentrace vzorku	chemické modifikace
metodologie	kovové ionty	agregace
manipulace se vzorky	detergenty	proteolýza
vibrace a zvuky	těžké kovy	izoelektrický bod vzorku
magnetická a elektrická pole	nečistoty	
rychlost ekvilibrace	crosslinkery	ligandy, kofaktory, inhibitory
dielektrické vlastnosti	zdroj a složení reagentu	

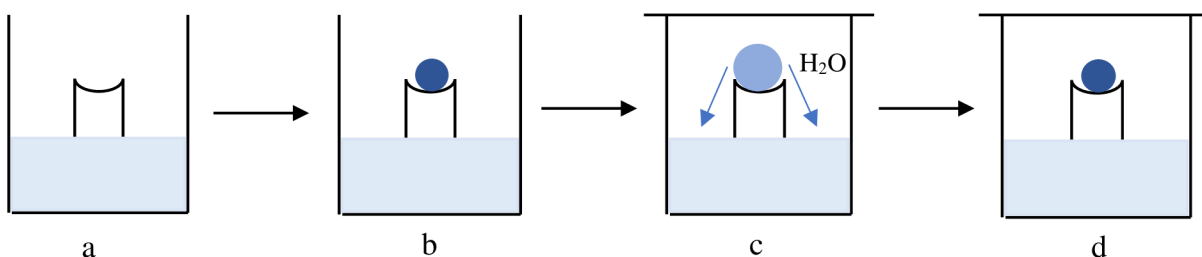
Základním principem tvorby krystalů je pomalé přivedení roztoku proteinu do mírného stavu nasycení. V tom okamžiku je umožněn vznik krystalizačních jader a růst krystalů, viz. proces krystalizace. Nasycený roztok je možné připravit zvýšením koncentrace roztoku nebo snížením jeho rozpustnosti pomocí úpravy fyzikálních nebo chemických podmínek. Nejjednodušší a nejvyužívanější způsob je použití precipitačních činidel (Kutá Smatanová 2003). Existují různé typy precipitantů, které se rozlišují na základě mechanismů pro podporu

krystalizace. Jedná se o soli, těkavá a netěkavá organická rozpouštědla nebo polymerní látky (McPherson 2004). Pro nalezení precipitačních podmínek je vhodné využít komerčně dostupné sady krystalizačních roztoků (Kutá Smatanová 2003), které obsahují širokou škálu různých precipitantů.

3.3 Metody krystalizace

Mezi nejčastěji využívané metody krystalizace patří difúze a dialýza. V obou případech dochází za využití precipitačního činidla k regulovanému přivedení roztoku proteinu do bodu nasycení. Metody krystalizace založené na difúzi par, kdy dochází k přesycení roztoku proteinu v mikrokapkách, můžeme rozdělit na tzv. metody sedící kapky („sitting drops“), visící kapky („hanging drops“) nebo sendvičové kapky („sandwich drops“) (Kutá Smatanová 2003).

Základní princip metody sedící kapky je znázorněn na Obr. 5. Rezervoár je naplněn precipitačním činidlem (a). Na stojánek je napipetována kapka roztoku proteinu (b). Ke kapce je přidáno malé množství precipitačního činidla (nejčastěji v poměru 1:1 nebo 1:0,5) a rezervoár je zakryt lepicí páskou (c). Na principu difúze pak dochází k pomalému odpařování vody z kapky do roztoku v rezervoáru (d) (Kutá Smatanová 2003, Dessau a Modis 2010).



Obrázek 5: Metoda sedící kapky (a – precipitační činidlo v rezervoáru, b – protein na stojánku, c – přidání precipitačního činidla k proteinu, d - difúze par) (vytvořeno autorkou podle Dessau a Modis 2010).

4 Cíle práce

1. Exprese a purifikace ptačího reovirálního proteinu σ NS truncated pomocí standardních chromatografických metod.
2. Ověření, zda má protein σ NS truncated zachovanou schopnost vázat RNA i přes skutečnost, že má odstraněnou N-terminální část.
3. Krystalizace tohoto proteinu (nalezení vhodných krystalizačních podmínek a jejich optimalizace) s cílem vytvoření krystalů v difrakční kvalitě vhodných pro testování a získání difrakčních dat.

5 Materiály a metody

5.1 Klonování

5.1.1 Teplotní gradient pro amplifikaci plazmidu

Prvním krokem byl dizajn primeru. Teplota byla stanovena z teplotního gradientu. Do 6 PCR mikrokumavek o objemu 0,2 ml bylo napipetováno vždy 12,5 μ l reakčního pufru PPP Master Mix (150 mM Tris-HCl, pH 8,8, 40 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,02% Tween 20, 5 mM MgCl_2 , 400 μ M dATP, 400 μ M dCTP, 400 μ M dGTP, 400 μ M dTTP, 100 U/ml Taq DNA polymeráza, barvivo, stabilizátory a přísady), 1 μ l F-primeru (sNS_N15-trunc_SUMO-F) o koncentraci 10 μ M, 1 μ l R-primeru (sNS_wholeSUMO_R) o koncentraci 10 μ M, 1 μ l templátu DNA (sNS pET SUMO) o koncentraci 36,4 ng/ μ l a 9,5 μ l PCR vody. Mikrokumavky byly umístěny do termocykleru přednastaveného dle Tab. IV. Vybrané teploty gradientu byly 52,3 $^\circ\text{C}$, 53,8 $^\circ\text{C}$, 56,9 $^\circ\text{C}$, 60,9 $^\circ\text{C}$, 63,1 $^\circ\text{C}$ a 64 $^\circ\text{C}$.

Tabulka IV: Podmínky PCR reakce pro zjištění teplotního gradientu.

krok	teplota	čas	počet cyklů
počáteční denaturace	98 $^\circ\text{C}$	30 sekund	1x
denaturace	98 $^\circ\text{C}$	10 sekund	30x
annealing	gradient (52,3 $^\circ\text{C}$ –64 $^\circ\text{C}$)	10 sekund	
polymerizace	72 $^\circ\text{C}$	35 sekund	
závěrečná polymerizace	72 $^\circ\text{C}$	3 minuty	1x
finální teplota	4 $^\circ\text{C}$		

Následně byly vzorky analyzovány pomocí elektroforézy DNA v agarózovém gelu. Na základě výsledků byla zvolena teplota, při níž je amplifikace templátu DNA nejúčinnější.

5.1.2 Elektroforéza DNA v agarózovém gelu

Nejprve byl připraven 1% agarózový gel. Do Erlenmeyerovy baňky byl navážen 1 g agarózy a poté bylo do baňky nalito 100 ml 1xTAE (Tris-Acetate-EDTA) pufru. Obsah baňky byl kroužením promíchán a za pravidelného míchání byl vařen v mikrovlnné troubě, a to do úplného rozpuštění agarózy. Baňka byla následně pomocí tekoucí vody zchlazena na teplotu cca 50-60 $^\circ\text{C}$. Do baňky bylo po ochlazení napipetováno 10 μ l barviva SERVA DNA Stain

Clear G a obsah baňky byl kroužením promíchán. V této fázi byl agar nalit do připravené formy a následně byl do gelu ve formě umístěn hřebínek. Agar byl ponechán cca 20 minut ztuhnout. Po ztuhnutí gelu z něj byl vyndán hřebínek, gel byl umístěn do elektroforetické vany a byl zalit dostatečným objemem 1xTAE pufru, aby byly jamky v pufru ponořené.

Do první jamky v gelu bylo napipetováno 10 μ l DNA Ladderu (Quick-Load 100 bp DNA Ladder). Do následujících 6 jamek byly napipetovány jednotlivé vzorky. Pořadí vzorků bylo zaznamenáno. Soustava pro elektroforézu byla následně uzavřena a připojena ke zdroji elektrického napětí a elektroforéza byla zapnuta při napětí 100 V po dobu cca 30 minut. V okamžiku dostatečné separace DNA byla elektroforéza ukončena. Gel byl přemístěn do UV transiluminátoru. Gel byl zdokumentován pro následné vyhodnocení.

5.1.3 Amplifikace DNA

Byla provedena amplifikace DNA, a to pomocí polymerázové řetězcové reakce (Q5 PCR). Do stojánku na ledu byly připraveny 2 kusy PCR mikrozkušavek o objemu 0,2 ml. Byly do nich napipetovány jednotlivé reakční komponenty dle Tab. V. Finální objem byl v obou případech 50 μ l, přičemž zkumavky se mezi sebou lišily přítomností 5x Q5 High GC Enhanceru, který může zlepšovat průběh reakce.

Tabulka V: Reakční komponenty pro Q5 PCR.

komponenty	zkumavka č. 1	zkumavka č. 2
5x Q5 reakční pufr	10 μ l	10 μ l
10 mM dNTPs	1 μ l	1 μ l
10 μ M F-primer (sNS_N15-trunc_SUMO-F) 5' CAC AGA GAA CAG ATT GGT GGA GCT GGT CAG ACA CTC TTT AGA AAC TTC 3'	2,5 μ l	2,5 μ l
10 μ M R-primer (sNS_wholeSUMO_R) 5' TGT CTC CTG AGT TCT AGA GTA CTT TAT TAC GCC ATC CTA GCT GGA 3'	2,5 μ l	2,5 μ l
templát DNA (sNS pET SUMO [36,4 ng/ μ l])	1 μ l	1 μ l
Q5 Hi-Fi DNA polymeráza	0,5 μ l	0,5 μ l
5x Q5 High GC Enhancer	10 μ l	-
PCR H ₂ O	22,5 μ l	32,5 μ l

PCR mikrozkušavky se vzorky byly umístěny do termocykleru, který byl nastaven podle Tab. VI, v níž jsou shrnuty jednotlivé kroky, teplota, čas a počet cyklů.

Tabulka VI: Podmínky reakce Q5 PCR.

krok	teplota	čas	počet cyklů
počáteční denaturace	98 °C	30 sekund	1x
denaturace	98 °C	10 sekund	30x
annealing	56 °C	10 sekund	
polymerizace	72 °C	35 sekund	
závěrečná polymerizace	72 °C	3 minuty	1x
finální teplota	4 °C		

Byl připraven 1% agarózový gel (viz. 5.1.2 Elektroforéza DNA v agarózovém gelu). Po skončení programu byly zkumavky umístěny na led. Do obou zkumavek bylo napipetováno 10 µl barviva (Gel Loading Dye, Purple, 6x). Do první jamky v gelu bylo napipetováno 10 µl DNA Ladderu (Quick-Load 100 bp DNA Ladder). Do následujících jamek byly napipetovány jednotlivé vzorky. Do poslední jamky bylo napipetováno 10 µl DNA Ladderu (Quick-Load 1 kb DNA Ladder). Pořadí vzorků bylo zaznamenáno. Soustava pro elektroforézu byla uzavřena a připojena ke zdroji elektrického napětí. Elektroforéza byla zapnuta při napětí 100 V po dobu cca 30 minut. V okamžiku dostatečné separace DNA byla elektroforéza ukončena. Gel byl přemístěn do UV transiluminátoru a byla pořízena fotografie.

5.1.4 Izolace DNA z agarózového gelu

Z agarózového gelu byly vyříznuty fragmenty DNA a byly vloženy do 2ml zkumavky. Do jedné zkumavky byly vloženy fragmenty DNA, pro jejichž amplifikaci byl použit 5x Q5 High GC Enhancer, do druhé zkumavky byly vloženy fragmenty DNA vzniklé bez použití Enhanceru. Izolace probíhala v obou případech stejně. Do zkumavek byl přidán 1 ml NTI vazebního pufru. Zkumavky byly umístěny na termoblok o teplotě 50 °C, kde byly ponechány do naprostého rozpuštění gelu, tedy asi 10 minut. Průběžně byl obsah zkumavek promícháván pomocí vortexu.

Následně byla vložena kolona (NucleoSpin Gel a PCR čistící kolona) do sběrné zkumavky. Na kolonu bylo napipetováno 700 µl rozpuštěného gelu a zkumavka s kolonou byly vloženy na centrifugu na 30 sekund při otáčkách 11 000 rpm. Vzorek, který protekl

do sběrné zkumavky, byl vylit. Na kolonu byla napipetována další část rozpuštěného gelu a celý proces se opakoval. DNA se díky tomu navázala na membránu kolony.

Membrána byla následně promyta. Na kolonu bylo napipetováno 700 μl promývacího pufru NT3 a zkumavka s kolonou byly umístěny na centrifugu na 30 sekund při otáčkách 11 000 rpm. Obsah sběrné zkumavky byl vylit a celé promývání bylo zopakováno podruhé.

Kolona s prázdnou sběrnou zkumavkou byly umístěny do centrifugy na 2 minuty při otáčkách 11 000 rpm, čímž došlo k vysušení membrány. Kolona byla přendána do nové 1,5ml zkumavky. Na kolonu bylo napipetováno 30 μl PCR vody a spolu se zkumavkou byla umístěna do centrifugy na 1 minutu při otáčkách 11 000 rpm. Do zkumavky byla eluována plazmidová DNA. Její koncentrace byla změřena pomocí přístroje NanoDrop One od výrobce Thermo Fisher Scientific a bylo posouzeno, zda měla přítomnost Enhanceru během amplifikace DNA pozitivní vliv. Zkumavky s plazmidovou DNA byly uskladněny v mrazáku při teplotě $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ a byly využity jako insert při následné ligaci.

5.1.5 Ligace a transformace do amplifikačních buněk

Byla provedena ligace za použití komerčně dostupné sady NEBuilder HiFi DNA Assembly Cloning Kit od výrobce New England Biolabs. Bylo postupováno dle protokolu od výrobce. Byl zvolen molární poměr DNA vektoru ku insertu 1:2. Do PCR mikrozkušavky bylo napipetováno 2 μl vektoru (pET SUMO [11,6 ng/ μl]), 2,6 μl insertu ($\sigma\text{NS truncated}$ [32,4 ng/ μl]), 0,4 μl PCR vody a 5 μl reakčního pufru (NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix). Poté byla umístěna na 15 minut do termocykleru předehřátého na $50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po uplynutí této doby byla zkumavka vyndána na led, kde byla ponechána 10 minut do rozmrazení kompetentních buněk použitých v dalším kroku.

Dalším krokem byla transformace ligačního produktu do kompetentních buněk DH5 α . Byly použity kompetentní buňky NEB 5-alpha Competent *E. Coli* od výrobce New England Biolabs. Transformace byla prováděna podle transformačního protokolu vytvořeného výrobcem kompetentních buněk. Nejprve byla zkumavka s kompetentními buňkami ponechána 10 minut na ledu pro rozmrazení. Poté byly k buňkám napipetovány 2 μl ligační směsi. Obsah zkumavky byl lehce promíchán. Zkumavka byla ponechána 30 minut na ledu. Po uplynutí této doby byl proveden tepelný šok, kdy byla zkumavka umístěna do vodní lázně o teplotě $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ na dobu 30 sekund. Poté byla zkumavka umístěna na 2 minuty na led a následně do ní bylo napipetováno 250 μl SOC media o pokojové teplotě. Zkumavka byla poté vložena do třepačky předehřáté na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, kde byla ponechána 60 minut při otáčkách

220 rpm. Během této doby byly 2 kusy kanamycinových ploten nahřáty na 37 °C. Po uplynutí 60 minut bylo rozetřeno 50 µl směsi na jednu plotnu a zbytek objemu směsi na druhou plotnu. Plotny byly následně inkubovány přes noc při teplotě 37 °C, druhý den ráno byly přendány do lednice a byly připraveny k dalšímu použití, tedy pro Colony PCR.

5.1.6 Colony PCR

Byla provedena Colony PCR za účelem potvrzení, že transformace plazmidu do buněk DH5α proběhla úspěšně, a aby byly vybrány pozitivní klony obsahující požadovaný úsek. Práce byla prováděna ve flow boxu. Bylo připraveno 9 PCR mikrozkušavek. Do každé z nich bylo napipetováno 20 µl PCR vody. Byla také připravena plotna s buňkami DH5α z předchozí transformace. Následně byla pomocí plastové špičky odebrána vždy jedna kolonie z plotny a špička byla vložena do zkumavky s PCR vodou a obsah jí byl promíchán. Tímto způsobem bylo odebráno 8 kolonií. Devátou špičkou byla provedena negativní kontrola, kdy se špička pouze dotkla plotny, ale nebyla odebrána žádná kolonie. Voda ve zkumavkách obsahovala templát DNA.

V následujícím kroku byly na novou předeřátou kanamycinovou plotnu udělány špičkami z vody s templátem DNA křížky, které byly očíslovány stejně jako zkumavky. Plotna byla následně inkubována přes noc při teplotě 37 °C.

Následně byla připravena nová sada 9 kusů PCR mikrozkušavek. Do každé zkumavky byly napipetovány jednotlivé reakční komponenty dle Tab. VII.

Tabulka VII: Reakční komponenty pro Colony PCR.

komponenty	objem
reakční pufr PPP Master Mix	12,5 µl
10 µM F-primer (sNS_N15-trunc_SUMO-F) 5' CAC AGA GAA CAG ATT GGT GGA GCT GGT CAG ACA CTC TTT AGA AAC TTC 3'	2,5 µl
10 µM R-primer (sNS_wholeSUMO_R) 5' TGT CTC CTG AGT TCT AGA GTA CTT TAT TAC GCC ATC CTA GCT GGA 3'	2,5 µl
templát DNA	1 µl
PCR H ₂ O	6,5 µl

Zkumavky byly následně vloženy do termocykleru, který byl přednastaven podle Tab. VI. Mezi tím byl připraven 1% agarózový gel a výsledek PCR reakce byl zanalyzován obdobně jako v předchozím kroku (viz. 5.1.3 Amplifikace DNA). Gel byl zdokumentován pro následné vyhodnocení.

5.1.7 Příprava a izolace plazmidu

Posledním krokem přípravy plazmidu σ NS truncated pET SUMO byla jeho izolace. Na základě analýzy pomocí elektroforézy DNA v agarózovém gelu byly vybrány celkem 4 kolonie buněk z plotny. Do 4 plastových nádob o objemu 500 ml bylo napipetováno vždy 150 ml LB media a 150 μ l kanamycinu. Plastovou špičkou byla odebrána vždy jedna vybraná kolonie, a i se špičkou byla vložena do nádoby. Nádoby byly poté umístěny do třepačky předehřáté na 37 °C, kde byly ponechány přes noc při otáčkách 220 rpm.

Následující ráno byly připraveny 4 kusy kónických zkumavek o objemu 50 ml. Do každé z nich bylo přidáno 50 ml buněčné kultury připravené přes noc. Zkumavky byly umístěny do centrifugy, kde byly ponechány 10 minut při teplotě 4 °C a otáčkách 4200 rpm. Po uplynutí této doby bylo slito LB medium a k peletům byla napipetována další část příslušné buněčné kultury. Tento proces byl opakován celkem třikrát. Výsledkem byl buněčný pelet ve 4 zkumavkách.

Následná izolace plazmidu byla prováděna za použití komerčně dostupné sady Plasmid DNA purification – NucleoBond Xtra Maxi od výrobce Macherey-Nagel. Bylo postupováno dle protokolu od výrobce.

Do každé ze 4 kónických zkumavek bylo napipetováno 12 ml resuspenzační pufru (RES) obsahujícího RNázu A. Buňky byly v pufru rozpuštěny pomocí vortexu. Do zkumavek bylo dále napipetováno 12 ml lyzačního pufru (LYS). Zkumavky byly pětikrát otáčeny dnem vzhůru, čímž byl obsah promíchán. Následně byly ponechány 5 minut v klidu při pokojové teplotě. Mezi tím byly sestaveny filtry vložením do kolon a byly pod ně postaveny kádinky. Filtry byly zkalibrovány 25 ml ekvilibračního pufru (EQU), který byl pipetován po okrajích filtru kolem dokola. Pufř byl nechán volně protéct do kádinek na odpad. Do zkumavek bylo napipetováno 12 ml neutralizačního pufru (NEU). Zkumavkami bylo otáčeno dnem vzhůru, dokud obsah nezbělal. Roztok ze zkumavek byl postupně nalit na připravené filtry. Po úplném protečení roztoků byly filtry promývány 15 ml ekvilibračního pufru (EQU). Poté byly filtry vyndány. Do zbylých kolon bylo napipetováno 25 ml promývacího pufru (Buffer Wash). Po protečení byly kádinky vyměněny za 15ml kónické zkumavky. Do kolon bylo

napipetováno 10 ml elučního pufru (ELU), který byl nechán volně protéct do zkumavek. Do každé zkumavky bylo následně napipetováno 5 ml 100% isopropanolu a obsah zkumavek byl důkladně promíchán pomocí vortexu. Následně byly zkumavky umístěny do centrifugy, kde byly ponechány 60 minut při teplotě 4 °C a otáčkách 4200 rpm. Pomocí pipety byl ze zkumavek odstraněn pufr. K peletům bylo napipetováno 2 ml 70% ethanolu a obsah zkumavky byl přepipetován do 2ml zkumavky a umístěny do centrifugy, a to na 10 minut při teplotě 4 °C a otáčkách 4200 rpm. Ethanol byl pomocí pipety odstraněn ze zkumavek a pelety byly ponechány 10-15 minut schnout při pokojové teplotě. Poté bylo do zkumavky napipetováno 100 µl PCR vody. Po rozpuštění peletů byla změřena koncentrace plazmidů pomocí přístroje NanoDrop One od výrobce Thermo Fisher Scientific. Poté bylo provedeno Sangerovo sekvenování. Takto připravené plazmidy σ NS truncated pET SUMO byly uskladněny v mrazáku při teplotě -18 °C.

5.2 Transformace

K transformaci byly použity dva typy kompetentních buněk, konkrétně buňky BL21(DE3) Competent *E. Coli* Cells od výrobce New England Biolabs a BL21-CodonPlus Competent Cells od firmy Agilent Technologies.

Dále byl použit předem připravený plazmid σ NS truncated pET SUMO o koncentraci 754,1 ng/µl.

Transformace byla prováděna podle transformačních protokolů vytvořených výrobcí kompetentních buněk.

Nejprve byly zkumavky s kompetentními buňkami ponechány 10 minut na ledu. Poté bylo k buňkám o objemech 30 µl přidáno po 1 µl plazmidu o již zmiňované koncentraci. Směsi v obou zkumavkách byly lehce promíchány. Zkumavky byly umístěny na 30 minut na led. Po uplynutí této doby byl proveden tepelný šok – zkumavky byly umístěny do vodní lázně o teplotě 42 °C, přičemž buňky BL21(DE3) v ní byly ponechány po dobu 10 sekund a buňky BL21-CodonPlus po dobu 20 sekund. Následně byly zkumavky dány na led, a to na 5 minut v případě buněk BL21(DE3) a na 2 minuty u buněk BL21-CodonPlus. Poté bylo do obou zkumavek napipetováno 250 µl SOC media o pokojové teplotě. Směsi v obou zkumavkách byly umístěny do třepačky předehřáté na 37 °C, kde byly ponechány 60 minut při otáčkách 220 rpm. Během této doby byly 4 kusy kanamycinových ploten nahřáty na 37 °C. Po uplynutí 60 minut bylo rozetřeno u obou typů buněk vždy 50 µl směsi na jednu plotnu a zbytek objemu

směsi na druhou plotnu. Plotny byly následně inkubovány přes noc při 37 °C. Druhý den ráno byly plotny přendány do lednice, aby kolonie buněk nepřerostly, a byly tak připravené pro následné použití.

5.3 Pilotní exprese

Pilotní exprese byla provedena za účelem určení podmínek vedoucích k co nejvyšší expresi proteinu a aby následně mohla být provedena exprese ve velkém měřítku.

Do 2 kusů kónických zkumavek o objemu 50 ml bylo napipetováno vždy 10 ml LB media a antibiotikum kanamycin o výsledné koncentraci 1 mM. Následně byla pomocí plastové špičky odebrána vždy jedna kolonie z plotny a celá špička byla vložena do kónické zkumavky. Tento proces byl zvláště proveden pro kolonie buněk BL21(DE3) a BL21-CodonPlus. Zkumavky byly následně umístěny do třepačky předehřáté na 37 °C, kde byly ponechány přes noc při otáčkách 220 rpm s cílem namnožení buněčné kultury.

Následující den bylo připraveno 8 kusů kónických zkumavek o objemu 50 ml. Do každé z nich bylo napipetováno 15 ml LB media a kanamycin o výsledné koncentraci 1 mM. Následně do nich byly přidány vždy 2 ml přes noc namnožené buněčné kultury (do 4 zkumavek buněčná kultura z buněk BL21(DE3) a do dalších 4 zkumavek kultura z buněk BL21-CodonPlus).

Všech 8 kónických zkumavek bylo umístěno do třepačky předehřáté na 37 °C, kde byly ponechány 30 minut při otáčkách 220 rpm. Po uplynutí této doby byly odebrány vzorky a pomocí spektrofotometru byla změřena optická hustota (OD_{600}), kdy slepým vzorkem bylo čisté LB medium. Požadovaná hodnota OD_{600} byla 0,4-0,6. Z důvodu nižší hodnoty OD_{600} byly zkumavky ponechány na třepačce ještě 10 minut, poté byla hodnota OD_{600} již dostačující.

Kónické zkumavky byly přemístěny do lednice a třepačky byly nastaveny na jinou teplotu (18 °C a 30 °C). Z roztoků obou typů kultur byl odebrán 1ml vzorek sloužící jako kontrolní vzorek v čase 0 hodin. Do poloviny kultur bylo přidáno indukční činidlo IPTG (izopropyl β -D-1-tiogalaktopyranosid) o výsledné koncentraci 1 mM. Druhá polovina zkumavek měla funkci negativní kontroly. Všechny kónické zkumavky byly umístěny na třepačky, kde byly ponechány při 18 °C nebo 30 °C a při otáčkách 220 rpm. V různých časech dle teploty byly odebírány 1ml vzorky kultury. Přehled různých podmínek pro expresi proteinu a časy odběru vzorků jsou uvedeny v Tab. VIII.

Tabulka VIII: Podmínky pro expresi proteinu a časy odběru vzorků.

typ buněk	teplota	koncentrace IPTG	čas odběru vzorku
BL21(DE3)	18 °C	0,001 M	po 3 hod.
		0 M	
		0,001 M	po 6 hod.
		0 M	
		0,001 M	přes noc
		0 M	
	30 °C	0,001 M	po 2 hod.
		0 M	
		0,001 M	po 4 hod.
		0 M	
		0,001 M	po 6 hod.
		0 M	
BL21-CodonPlus	18 °C	0,001 M	po 3 hod.
		0 M	
		0,001 M	po 6 hod.
		0 M	
		0,001 M	přes noc
		0 M	
	30 °C	0,001 M	po 2 hod.
		0 M	
		0,001 M	po 4 hod.
		0 M	
		0,001 M	po 6 hod.
		0 M	

Všechny odebrané vzorky (celkem 26) byly v mikrozkuvkách umístěny do centrifugy na 1 minutu při otáčkách 14 000 rpm. Došlo tak k oddělení peletu (buňky) od supernatantu (LB medium). Potřebný buněčný pelet byl uskladněn v mrazáku při teplotě -18 °C a později byl analyzován.

5.4 Analýza vzorků

5.4.1 Příprava vzorků

Mikrozkumavky s buněčným peletem byly vyndány z mrazáku a byly ponechány na ledě, aby se rozmrazily. Do každé mikrozkumavky bylo následně napipetováno 500 μ l lyzačního pufru (50 mM K₃PO₄, 400 mM NaCl, 100 mM KCl, 10% glycerol, 0,5% Triton X 100; pH 7,8). Pomocí vortexu byly pelety s lyzačním pufrem důkladně promíchány. Poté byly mikrozkumavky se vzorky vloženy na 3 minuty do tekutého dusíku. Po uplynutí této doby byly vyndány z dusíku a byly umístěny na termoblok o teplotě 42 °C, kde byly ponechány do úplného rozpuštění vzorků, tedy přibližně 5-10 minut. Následně byl tento proces ještě dvakrát zopakován. Po posledním rozpuštění vzorků byly vzorky v mikrozkumavkách centrifugovány, a to po dobu 5 minut při teplotě 4 °C a otáčkách 14 000 rpm. Po ukončení centrifugace byl supernatant odpipetován do nových mikrozkumavek, přičemž pelet byl ponechán v původních mikrozkumavkách. K supernatantům bylo přidáno vždy 166 μ l 4x SDS – PAGE pufru (4x Laemmli pufru a β merkaptoethanol v poměru 1: 0,1), do mikrozkumavek k peletům bylo přidáno vždy 500 μ l 1x SDS – PAGE pufru (4x Laemmli pufr a β merkaptoethanol v poměru 1: 0,1 naředěný 1x PBS v poměru 1: 3). Následně byly všechny vzorky vařeny na termobloku při teplotě 90 °C po dobu 5 minut. Poté byly vzorky připraveny k analýze pomocí SDS – PAGE elektroforézy.

5.4.2 SDS – PAGE elektroforéza

Pro SDS – PAGE elektroforézu byly použity 12,5% gely. V Tab. IX jsou uvedeny chemikálie a jejich množství potřebné pro přípravu jednoho gelu, konkrétně jeho koncentrační i separační části.

Tabulka IX: Složení gelu.

separační 12,5% gel		koncentrační 5% gel	
40% akrylamid	1,56 ml	40% akrylamid	250 μ l
H ₂ O	2,08 ml	H ₂ O	1,46 ml
1,5M Tris (pH 8,8)	1,25 ml	1M Tris (pH 6,8)	250 μ l
10% SDS	50 μ l	10% SDS	20 μ l
10% APS	50 μ l	10% APS	20 μ l
TEMED	5 μ l	TEMED	2 μ l

Prvním krokem přípravy gelu bylo sestavení tzv. sendvičové kazety pro nalití gelu. Následně byl připraven separační gel, který byl nalit do formy a do nezaplněné horní části byl nalit propanol. Gel byl ponechán tuhnout po dobu 20 minut. Po uplynutí této doby byl propanol promytý vodou a do formy byl nalit koncentrační gel. Do něj byl vložen hřebínek a gel byl ponechán 40 minut, aby zcela zatuhl. Poté byl gel se sklíčky vyndán ze stojánku, zabalen do navlhčeného ubrousku a byl připraven pro použití.

Byla sestavena elektroforetická aparatura, do níž byla umístěna skla s gely. Celkem byly použity 4 gely. Do komůrky mezi skly v držáku a do elektroforetické vany byl nalit elektroforetický pufr (0,25 M Tris, 1,92 M glycin, 0,03 M SDS).

Do prvních jamek v gelech bylo napipetováno 5 μ l ladderu (PageRuler Prestained Protein Ladder od výrobce Thermo Fisher Scientific). Do dalších jamek byly napipetovány jednotlivé vzorky o objemu 10 μ l. Pořadí, v jakém byly jednotlivé vzorky nanесeny na gely, bylo zaznamenáno.

Poté byla elektroforetická vana uzavřena a napojena na stejnosměrný elektrický proud o napětí 100 V po dobu 30 minut, následně bylo napětí zvýšeno na 150 V na dobu 60 minut. Poté byly gely vyndány ze skel a umístěny do skleněných misek. Bylo k nim napipetováno vždy 20 ml fixačního roztoku obsahujícího 50 % ethanolu a 2 % kyseliny fosforečné. Gely byly v tomto roztoku ponechány 30 minut. Poté byly gely 2x vymývány v destilované vodě po dobu 10 minut. V posledním kroku byly gely ponechány přes noc ve 20 ml roztoku barviva Coomassie Blue. Druhý den byly gely omyty v destilované vodě a zdokumentovány pro následné vyhodnocení.

5.5 Expresе ve velkém měřítku

Podmínky, za kterých došlo během pilotní exprese k nejvyšší expresi proteinu, byly použity pro expresi ve velkém měřítku.

Do dvou Erlenmeyerových baněk o objemu 500 ml bylo napipetováno vždy 100 ml LB media a kanamycin o výsledné koncentraci 1 mM. Pro expresi byly využity kolonie buněk z předchozí transformace. Pomocí plastové špičky byla do jedné z baněk vložena kolonie buněk BL21(DE3), do druhé baňky kolonie buněk BL21-CodonPlus. Obě baňky byly poté umístěny do třepačky předehřáté na 37 °C, kde byly ponechány přes noc při otáčkách 180 rpm.

Druhý den byly připraveny 4 dvoulitrové Erlenmeyerovy baňky. Do každé z nich bylo odměřeno 800 ml LB media, do něhož byl napipetován kanamycin o koncentraci 1 mM.

Dále bylo do každé nádoby napipetováno 50 ml přes noc namnožené buněčné kultury (do 2 baněk buněčná kultura z buněk BL21(DE3) a do dalších 2 baněk buněčná kultura z buněk BL21-CodonPlus).

Všechny 4 Erlenmeyerovy baňky byly umístěny do třepačky předeřáté na 37 °C, kde byly ponechány 60 minut při otáčkách 220 rpm. Po 60 minutách byla pomocí spektrofotometru změřena optická hustota (OD_{600}) odebraných vzorků, přičemž slepým vzorkem bylo čisté LB medium. Požadovaná hodnota OD_{600} byla minimálně 0,6. Změřené hustoty ale byly lehce nižší, a tak byly baňky ponechány v třepačce dalších 10 minut. Poté byla hodnota OD_{600} dostatečně vysoká.

Z roztoků obou typů buněčných kultur byly odebrány 1ml vzorky v čase 0 hod. sloužící k pozdější analýze. Do jedné Erlenmeyerovy baňky s buněčnou kulturou z buněk BL21(DE3) a do jedné baňky s buněčnou kulturou z buněk BL21-CodonPlus bylo přidáno IPTG o výsledné koncentraci 1 mM. Všechny Erlenmeyerovi baňky byly následně umístěny zpět na třepačky, kde byly ponechány 4 hodiny při 30 °C a při otáčkách 220 rpm.

Po uplynutí 4 hodin byly opět odebrány 1ml vzorky ze všech Erlenmeyerových baněk. Poté byl obsah Erlenmeyerových baněk přelit do plastových centrifugačních lahví. Po vyvážení byly tyto lahve umístěny do centrifugy. Centrifugace byla prováděna po dobu 30 minut při teplotě 4 °C a při otáčkách 4 200 rpm. Následně byla vylita většina LB media, v lahvi ho bylo ponecháno pouze cca 20 ml. Pomocí pipety byl tímto zbytkem media rozpuštěn usazený buněčný pelet. Zcela resuspendované buňky byly přepipetovány do kónických zkumavek o objemu 50 ml. Zkumavky s resuspendovanými buňkami byly opět centrifugovány, a to po dobu 20 minut při teplotě 4 °C a při otáčkách 4 200 rpm. Následně bylo slité veškeré medium. Buněčné pelety usazené v kónických baňkách byly uskladněny v mrazáku při teplotě -80 °C a byly tak připraveny pro následnou purifikaci.

Všechny odebrané vzorky (v čase 0 h. a 4 h.) byly analyzovány (viz 5.4 Analýza vzorků). Pořadí vzorků na gelu bylo zaznamenáno.

5.6 Homogenizace buněk

Zkumavky s buněčnými pelety z exprese ve velkém měřítku byly vyndány na led. Během jejich rozmrazování bylo připraveno 100 ml lyzačního pufru (20 nM Tris, 300 nM NaCl, 0,5 nM $MgCl_2$ a 1 tableta proteázového inhibitoru Protease Inhibitor Cocktail Tablets EDTA-Free od výrobce SIGMAFAST). Do každé zkumavky bylo k peletu napipetováno

15 ml tohoto lyzačního pufru a také DNáza a RNáza o výsledné koncentraci 1 mM. Pomocí vortexu byly buňky důkladně rozmíchány. Poté byly inkubovány 20 minut na ledu.

Následně byly buňky resuspendovány, a to pomocí French pressu. Roztoky buněčného lyzátu byly následně přelity do vhodných zkumavek a byly stočeny na ultracentrifuze po dobu 60 minut při teplotě 4 °C a při otáčkách 40 000 rpm. Po centrifugaci byly oddělené supernatanty přelity do nových kónických zkumavek a byly dále využity k purifikaci.

5.7 Purifikace

5.7.1 Příprava pufrů

K účelům purifikace byly připraveny celkem 4 pufrы o rozdílném složení. Přehled složení jednotlivých pufrů je zobrazen v Tab. X.

Tabulka X: Složení pufrů na purifikaci.

ekvilibrační pufr A1	ekvilibrační pufr A2	eluční pufr B1	eluční pufr B2
20 mM Tris	20 mM Tris	20 mM Tris	20 mM Tris
300 mM NaCl	100 mM NaCl	300 mM NaCl	2 M NaCl
0,5 mM MgCl ₂	0,5 mM MgCl ₂	0,5 mM MgCl ₂	0,5 mM MgCl ₂
		1 M Imidazol	

Nejprve byly naváženy chemikálie pro jednotlivé pufrы a byly rozpuštěny pomocí magnetického míchadla v přibližně 80 % požadovaného objemu destilované vody. Následně bylo pH pufrů upraveno na požadovanou hodnotu 7,6. Pufrы byly doplněny destilovanou vodou do finálního objemu (1 l v případě ekvilibračního pufru A1 a 0,5 l u zbývajících pufrů). Poté byly pufrы přefiltrovány do skleněných lahví. V posledním kroku byly pufrы degasovány.

5.7.2 Histidinová afinitní chromatografie

Pro histidinovou afinitní chromatografii byly využity ekvilibrační pufr A1 a eluční pufr B1. Dále byla použita HisTrap HP kolona o objemu 5 ml od výrobce GE Healthcare. Vzorkem byl supernatant získaný po homogenizaci buněk a jejich stočení, přičemž chromatografie byla postupně provedena pro oba typy buněk, tedy BL21(DE3) a BL21-CodonPlus.

Kolona se běžně uchovává v ethanolu, a tak ji bylo nutné nejprve promýt 5 objemy kolony ultračisté degasované vody. Poté byla kolona ekvilibrována, a to 5 objemy kolony pufru A1, dále 5 objemy kolony pufru B1 a nakonec opět 5 objemy kolony pufru A1.

Po dokončení ekvilibrace byl na kolonu nanesen vzorek, zároveň byl nanášen ekvilibrační pufr A1. Průtok vzorku byl nastaven na 1 ml/min. Se stoupajícím UV bylo sbíráno do kónické zkumavky tzv. flow through a čekalo se, až UV začne klesat. V tu dobu byl sběr flow through ukončen. Následně byla kolona promývána 5% elučním pufrem B1, jeho průtok byl 1 ml/min. Elouvané proteiny byly opět sbírány do kónické zkumavky, jednalo se o tzv. soft-wash. V důsledku následného gradientového zvyšování koncentrace elučního pufru B1 od 5 % do 100 % za dobu 20 minut docházelo k eluci proteinu, který byl automaticky sbírán do jednotlivých frakcí. Po skončení eluce proteinu z kolony byla kolona opět promyta, a to 5 objemy kolony ultračisté degasované vody a poté 5 objemy kolony degasovaného ethanolu.

Vzorky soft-washe, flow through a frakcí byly analyzovány. Ke 30 μ l vzorku bylo do mikrozkušavky napipetováno 10 μ l 4x SDS – PAGE pufru. Následně byly všechny vzorky vařeny na termobloku při teplotě 90 °C po dobu 1 minuty. Poté byly vzorky připraveny k analýze pomocí SDS – PAGE elektroforézy.

5.7.3 Heparinová afinitní chromatografie

Pro heparinovou afinitní chromatografii byly využity ekvilibrační pufr A1 a eluční pufr B2. Byla použita HiTrap Heparin HP kolona o objemu 5 ml od výrobce GE Healthcare. Vzorkem byly vybrané frakce získané histidinovou afinitní chromatografií.

Kolona byla nejprve promyta 5 objemy kolony ultračisté degasované vody. Poté byla kolona ekvilibrována, a to 5 objemy kolony pufru A1, dále 5 objemy kolony pufru B2 a poté opět 5 objemy kolony pufru A1.

Na kolonu byl nanesen vzorek, přičemž průtok vzorku byl 1 ml/min. UV stoupalo, a tak bylo flow through sbíráno do kónické zkumavky a čekalo se na dostatečný pokles UV. Po ukončení sběru flow through byla kolona promývána elučním pufrem B2 o stoupající koncentraci (5 % až 100 %), čímž došlo k eluci proteinu. Ten byl automaticky sbírán do frakcí, které byly následně spolu s flow through analyzovány pomocí SDS-PAGE elektroforézy.

V okamžiku skončení eluce proteinu byla kolona řádně promyta, a to 5 objemy kolony ultračisté degasované vody a následně 5 objemy kolony degasovaného ethanolu.

5.7.4 Příprava vzorku pro gelovou chromatografii

Frakce získané z heparinové afinitní chromatografie byly použity jako vzorek pro gelovou chromatografii. Nejprve byl u vzorku vyměněn pufr, a to za ekvilibrační pufr A2.

Byl k tomu použit filtr Amicon 10K o objemu 15 ml. Do filtru byl vzorek postupně přidáván a stáčen na centrifuze při otáčkách 4000 rpm. Vzorek byl dolit pufrem A2 a stáčen stejným způsobem, přičemž tento krok byl zopakován třikrát. Výsledný objem vzorku byl 20 ml.

Do zkumavky ke vzorku bylo následně přidáno 500 μ l SUMO proteázy ULP1 za účelem odštěpení SUMA od proteinu σ NS truncated. Zkumavka byla ponechána při teplotě 4 °C do druhého dne. Následně bylo pomocí SDS-PAGE elektroforézy potvrzeno, zda k odštěpení skutečně došlo. Protein byl následně zakoncentrován pomocí Amicon filtru 10K na výsledný objem 1 ml.

5.7.5 Gelová chromatografie

Na gelovou chromatografii byla použita kolona Superdex 200 Increase 10/300 GL o objemu 24 ml od výrobce GE Healthcare. Kolona byla nejprve promyta 1 objemem kolony ultračisté degasované vody a následně byla ekvilibrována 2 objemy kolony ekvilibračního pufru A2. Poté bylo na kolonu nanášeno 500 μ l vzorku. Průtok vzorku byl nastaven na 0,5 ml/min. Se zvyšujícím se UV byl protein eluován do jednotlivých frakcí o objemu 500 μ l. Kolona byla po ukončení sběru frakcí promyta 1 objemem kolony ekvilibračního pufru A2, poté ultračistou vodou a ethanolem.

Frakce byly analyzovány pomocí SDS-PAGE elektroforézy. Následně byla změřena koncentrace vybraných frakcí pomocí přístroje NanoDrop One od výrobce Thermo Fisher Scientific. Tyto frakce byly zamrazeny pomocí tekutého dusíku a byly uskladněny v mrazáku při teplotě -80 °C.

5.8 Nativní gelová elektroforéza

Nativní gelové elektroforéza byla provedena za účelem ověření, zda protein σ NS truncated, u něhož chybí N-terminální část, má zachovanou schopnost vázat RNA.

V prvním kroku byl připraven nativní 5% gel. Na přípravu 1 gelu byl použit 1 ml 30% akrylamidu, 300 μ l 10x TBE, 4,67 ml destilované vody, 22,5 μ l 10% APS a 7,5 μ l TEMED. Gel byl nalit do předem sestavené sendvičové kazety. Do gelu byl vložen hřebínek a gel byl ponechán tuhnout po dobu 40 minut, poté byl připraven k použití. Bylo dbáno na vysokou čistotu při práci, zejména na čistotu použitých sklíček, hřebínku a následně elektroforetické vany.

V dalším kroku byly připraveny vzorky pro nanesení na gel. Byl použit protein σ NS truncated o koncentraci 1,079 mg/ml. Dále byl použit protein σ NS o koncentraci 1,336 mg/ml, který sloužil k porovnání. Oba proteiny byly naředěny na koncentraci 1 μ M. Dále byla naředěna C15 fluor RNA na koncentraci 100 nM. Bylo připraveno 8 mikrozkušavek, do kterých byl napipetován daný protein a případně C15 fluor RNA, do finálního objemu 20 μ l byly směsi naředěny pufrům Hepes (0,1 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 25 mM Hepes, pH 7,6). Přehled složení jednotlivých směsí je uveden v Tab. XI.

Tabulka XI: Přehled složení směsí pro nativní gelovou elektroforézu.

číslo zkumavky	σ NS truncated	σ NS	C15 fluor RNA	pufr
1	1 μ l	-	-	19 μ l
2	1 μ l	-	1 μ l	18 μ l
3	-	1 μ l	-	19 μ l
4	-	1 μ l	1 μ l	18 μ l
5	1 μ l	-	-	19 μ l
6	1 μ l	-	1 μ l	18 μ l
7	-	1 μ l	-	19 μ l
8	-	1 μ l	1 μ l	18 μ l

Zkumavky č. 1–4 byly inkubovány 30 minut při pokojové teplotě, poté k nim bylo přidáno vždy 6,66 μ l barviva Native Gel-Loading Buffer. Do zkumavek č. 5-8 bylo toto barvivo přidáno okamžitě, tedy bez inkubace. V tu chvíli byly vzorky připraveny k nanesení na gel. Byla sestavena elektroforetická aparatura, přičemž elektroforetickým pufrům byl roztok 0,5x TBE. Do první jamky v gelu byly napipetovány 3 μ l ladderu (PageRuler Prestained Protein Ladder od výrobce Thermo Fisher Scientific), do následujících jamek bylo postupně napipetováno 10 μ l jednotlivých vzorků. Pořadí vzorků bylo zaznamenáno. Elektroforetická aparatura byla zabalena do silné vrstvy alobalu, aby byla ochráněna před světelným zářením, což je důležité kvůli fluorescenční RNA. Aparatura byla napojena na stejnosměrný elektrický proud o napětí 100 V po dobu 30 minut, následně bylo napětí zvýšeno na 150 V na dobu dalších 30 minut.

Poté byl gel vyndán ze skel a umístěn do skleněné misky. Bylo prováděno promývání a barvení sestávající z mnoha postupných kroků. Tento proces byl prováděn za využití činidel z komerčně dostupné sady ProteoSilver™ Silver Stain Kit od výrobce Sigma-Aldrich. Bylo

postupováno dle protokolu od výrobce. Jednotlivé kroky, použitá činidla a doba jejich působení jsou shrnuty v Tab. XII. Před přidáním následujícího činidla bylo vždy předchozí činidlo slité. Jedinou výjimkou je přechod z kroku č. 8 do kroku č. 9, kdy byl roztok ProteoSilver Stop Solution přidán přímo k vyvíjecímu roztoku. Po provedení všech kroků byl nativní gel zdokumentován a vyhodnocen.

Tabulka XII: Jednotlivé kroky promývání a barvení nativního gelu.

číslo kroku	činidla	doba působení
1	100 ml fixačního roztoku (50 ml ethanolu, 10 ml kyseliny octové, 40 ml ultračisté vody)	40 minut
2	100 ml 30% roztoku ethanolu	10 minut
3	200 ml ultračisté vody	10 minut
4	100 ml senzibilizačního roztoku (1 ml ProteoSilver Sensitizer, 99 ml ultračisté vody)	10 minut
5	200 ml ultračisté vody	2x 10 minut
6	100 ml ekvilibračního roztoku Silver (1 ml ProteoSilver Solution, 99 ml ultračisté vody)	10 minut
7	200 ml ultračisté vody	1 minuta
8	100 ml vyvíjecího roztoku (5 ml ProteoSilver Developer 1, 0,1 ml ProteoSilver Developer 2, 95 ml ultračisté vody)	3 minuty
9	5 ml roztoku ProteoSilver Stop Solution	5 minut
10	200 ml ultračisté vody	15 minut

5.9 Krystalizace proteinu σ NS truncated

5.9.1 Pre-krystalizační test

Před samotnou krystalizací proteinu σ NS truncated byl proveden pre-krystalizační test. Jeho cílem bylo zjistit koncentraci proteinu vhodnou pro jeho krystalizaci. Pro tento test byl použit protein σ NS truncated o koncentraci 5,443 mg/ μ l. Test byl proveden za využití komerčně dostupné sady PCT Pre-Crystallization Test od výrobce Hampton Research. Složení jednotlivých činidel je uvedeno v Příloze č. 1.

Pre-krystalizační test byl proveden metodou visící kapky. Do 4 rezervoárů bylo napipetováno vždy 20 μl různých PCT reagentů (A1, A2, B1, B2). Na sklíčko bylo napipetován vždy 1 μl reagentu z rezervoáru a k tomu byl napipetován 1 μl proteinu. Sklíčko bylo přilepeno kapkou dolů nad rezervoár opatřený vrstvou vazelíny. Po uplynutí 10 minut bylo zhodnoceno, zda došlo k precipitaci.

5.9.2 Manuální krystalizace

K manuální krystalizaci proteinu $\sigma\text{NS truncated}$ byly použity krystalizační destičky s 24 rezervoáry. Krystalizace byla prováděna metodou sedící kapky. Byla využita precipitační činidla z komerčně dostupné sady Morpheus II od výrobce Molecular Dimensions. Seznam precipitačních činidel je uveden v Příloze č. 2.

Do rezervoáru bylo napipetováno vždy 50 μl precipitačního činidla. Do první jamky byl pokaždé napipetován 1 μl příslušného precipitačního činidla z rezervoáru a 1 μl proteinu $\sigma\text{NS truncated}$ o koncentraci 5,443 mg/ml, poměr proteinu a precipitačního činidla byl tedy 1:1. Kapka v druhé jamce byla tvořena 2 μl precipitačního činidla a 1 μl proteinu, poměr proteinu a precipitačního činidla byl tedy 1:2. Destička byla následně překryta lepicí páskou a byla umístěna do lednice, kde byla ponechána při teplotě 4 °C. Destičky byly pravidelně kontrolovány a na základě výsledků bylo vybráno precipitační činidlo vhodné pro optimalizaci krystalizačních podmínek.

5.9.3 Krystalizace pomocí krystalizačního robota

Ke krystalizaci byl použit robot OryxNano od výrobce Douglas Instruments, který je zobrazen na Obr. 6.



Obrázek 6: Krystalizační robot OryxNano (Douglas Instruments, 2023)

Dále byly použity krystalizační destičky s 96 rezervoáry MRC 2-Drop Plate od výrobce Hampton Research. Byla použita precipitační činidla z různých komerčně dostupných sad. Přehled použitých sad precipitačních činidel a jejich výrobců je zobrazen v Tab. XIII. Seznam jednotlivých precipitačních činidel je uveden v Přílohách č. 3-9.

Tabulka XIII: Seznam použitých sad precipitačních činidel.

Název sady	Výrobce
SG1	Molecular Dimensions
LFS	
MemGold	
MemGold 2	
JCSG-plus	
PEG/Ion HT	Hampton Research
JBScreen Basic HTS	Jena Bioscience

Pro každou destičku byla vždy použita odlišná sada precipitačních činidel. Pomocí multikanálové automatické pipety bylo do každého rezervoáru napipetováno 50 μ l precipitačního činidla. Následně bylo pomocí robota napipetováno do první jamky 1 μ l precipitačního činidla z rezervoáru a 1 μ l proteinu σ NS truncated, tedy v poměru 1:1. Do druhé jamky bylo napipetováno 0,5 μ l precipitačního činidla a 1 μ l proteinu, a tak byl výsledný poměr proteinu a precipitačního činidla 1:0,5. Koncentrace použitého proteinu se v rámci různých krystalizačních destiček a použitých sad precipitačních činidel lišila a je znázorněna v Tab. XIV.

Tabulka XIV:

Název sady	Koncentrace použitého proteinu [mg/ml]
SG1	11,742
LFS	
MemGold	4,663
MemGold 2	4,991
JCSG-plus	
PEG/Ion HT	4,368
JBScreen Basic HTS	

Všechny použité destičky byly následně překryty lepicí páskou a byly umístěny do lednice, kde byly ponechány při teplotě 4 °C. Po dobu několika měsíců byly destičky pravidelně kontrolovány a byly zapisovány změny. Na základě pozitivních výsledků byla vybrána precipitační činidla vhodná pro optimalizaci krystalizačních podmínek.

5.9.4 Optimalizace krystalizačních podmínek

Za účelem získání krystalů v difrakční kvalitě byla provedena optimalizace podmínek. Byla vybrána celkem 3 různá precipitační činidla, která se během předchozí krystalizace jevila jako vhodná k růstu krystalů. Pro krystalizaci byla použita krystalizační destička s 96 rezervoáry MRC 2-Drop Plate od výrobce Hampton Research. Destička byla svisle rozdělena na 3 stejné části, přičemž každá z těchto částí byla využita pro jiné precipitační činidlo. Do všech rezervoárů bylo napipetováno 50 μ l precipitačního činidla. Pomocí robotu OryxNano byl vytvořen koncentrační gradient, kdy na začátku daného úseku destičky byla koncentrace proteinu 80 % a na jeho konci 20 %. K dosažení koncentračního gradientu byla využita ultračistá voda. Následně byla destička překryta lepicí páskou a byla umístěna do lednice. Růst krystalů tak probíhal při 4 °C a destička byla pravidelně kontrolována.

U krystalů, které narostly, bylo potřeba zjistit, zda se skutečně jedná o krystaly proteinu nebo pouze krystaly soli. K detekci byl použit zobrazovací systém JANSi UVEX od výrobce JAN Scientific. Proteinové krystaly se vyznačují tím, že pod UV zářením emitují viditelné světlo.

Vybrané krystaly byly následně testovány pomocí difrakční analýzy proškoleným personálem.

6 Výsledky

6.1 Klonování

6.1.1 Teplotní gradient

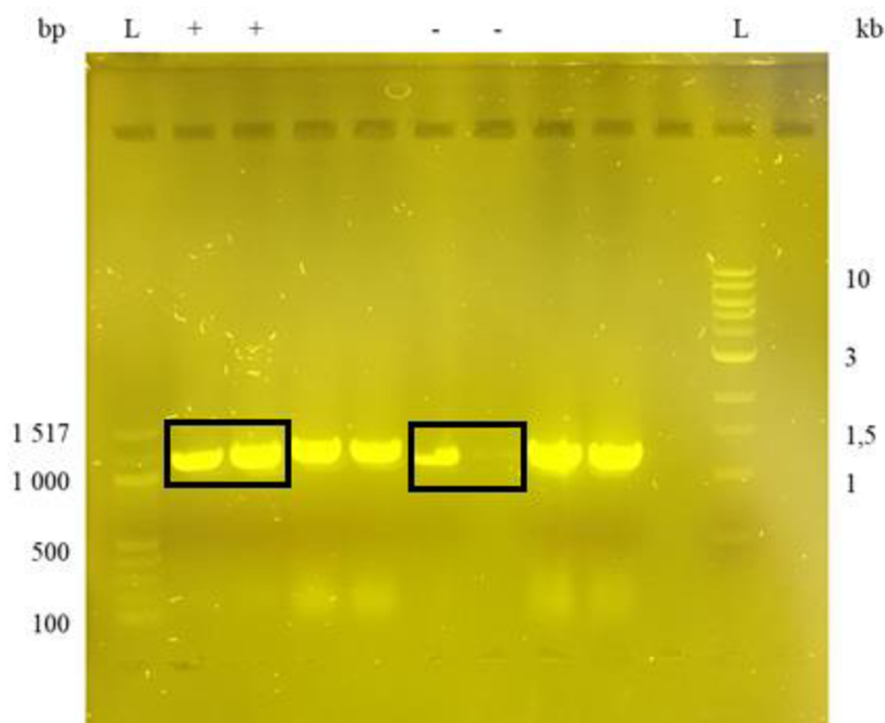
Na základě analýzy teplotního gradientu pomocí elektroforézy DNA v agarózovém gelu byla zvolena teplota, během které je amplifikace DNA nejvíce účinná. Bylo určeno, že tato teplota je 56 °C. Výsledky teplotního gradientu jsou zobrazeny na Obr. 7.



Obrázek 7: Výsledek teplotního gradientu. Na obrázku není vidět použitý Ladder z důvodu použití starého markeru.

6.1.2 Amplifikace DNA

Provedená polymerázová řetězová reakce (Q5 PCR) byla analyzována pomocí elektroforézy DNA v agarózovém gelu. Výsledek této PCR reakce je zobrazen na Obr. 8.



Obrázek 8: Výsledek amplifikace DNA pomocí Q5 PCR. Znaménkem „+“ jsou označeny vzorky, kdy byl při amplifikaci použit Enhancer, znaménkem „-“ jsou označeny vzorky bez použití Enhanceru. Tyto vzorky jsou označeny pomocí rámečků. Neoznačené fragmenty patří DNA jiného proteinu. „L“ značí Laddery a jejich velikost v bp nebo kb je uvedena po stranách gelu.

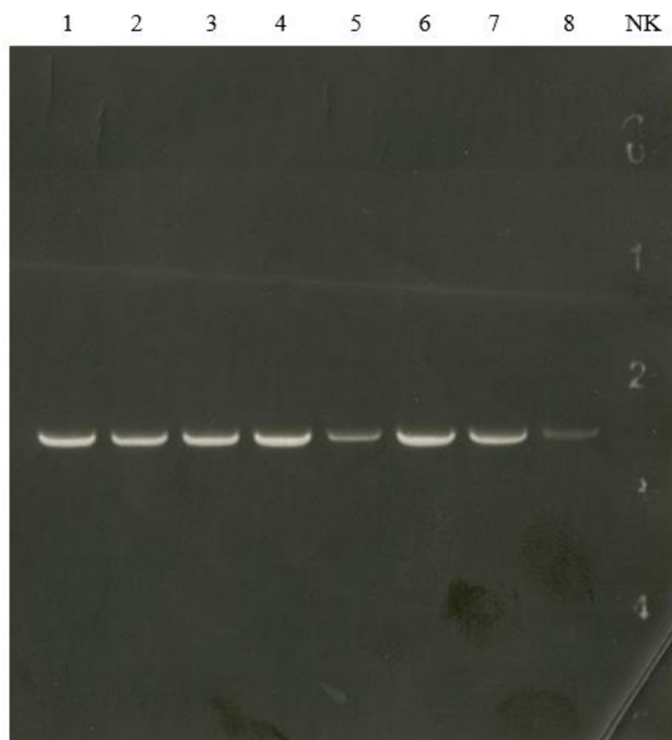
Velikost plazmidové DNA σ NS je 1152 bp. Velikost DNA σ NS truncated je 1055 bp, její amplifikace byla tedy analýzou potvrzena. Z důvodu chybného nanesení vzorku bez Enhanceru na gel se jeví amplifikace DNA za použití Enhanceru jako účinnější, avšak to nelze s jistotou určit.

6.1.3 Izolace DNA z agarózového gelu

V dalším kroku byla DNA izolována z gelu. Poté byla změřena koncentrace této plazmidové DNA pomocí přístroje NanoDrop One od výrobce Thermo Fisher Scientific. Bylo zjištěno, že koncentrace plazmidové DNA σ NS truncated, při jejíž amplifikaci byl použit Enhancer, je 32,4 ng/ μ l. Koncentrace plazmidové DNA σ NS truncated amplifikované bez Enhanceru je 10,6 ng/ μ l.

6.1.4 Colony PCR

Po ligaci a transformaci plazmidu do buněk DH5 α byla provedena Colony PCR. Jejím účelem bylo potvrzení úspěšnosti transformace plazmidu do buněk a také určení kolonií vhodných pro přípravu a izolaci plazmidu. Vzorky z Colony PCR byly analyzovány elektroforézou DNA v agarózovém gelu. Výsledek této PCR reakce je zobrazen na Obr. 9.



Obrázek 9: Výsledek Colony PCR. Fragменты jsou označeny čísly 1 až 8 a odpovídají jednotlivým koloniím buněk, které byly pro Colony PCR použity, NK značí negativní kontrolu. Ladder není na gelu vidět z důvodu použití starého markeru.

Na základě těchto výsledků byly vybrány celkem 4 různé kolonie z plotny s křížky, konkrétně kolonie č. 2, 5, 6 a 7. Tyto kolonie byly použité pro namnožení a izolaci plazmidu.

6.1.5 Příprava a izolace plazmidu

Plazmid připravený inkubací kolonií v LB mediu s kanamycinem přes noc byl izolován za použití komerčně dostupné sady Plasmid DNA purification – NucleoBond Xtra Maxi od výrobce Macherey-Nagel. Následně byla změřena koncentrace vyizolovaných plazmidů, a to pomocí přístroje NanoDrop One od výrobce Thermo Fisher Scientific. Koncentrace jednotlivých plazmidů v závislosti na č. použité kolonie pro jeho přípravu je udána v Tab. XV.

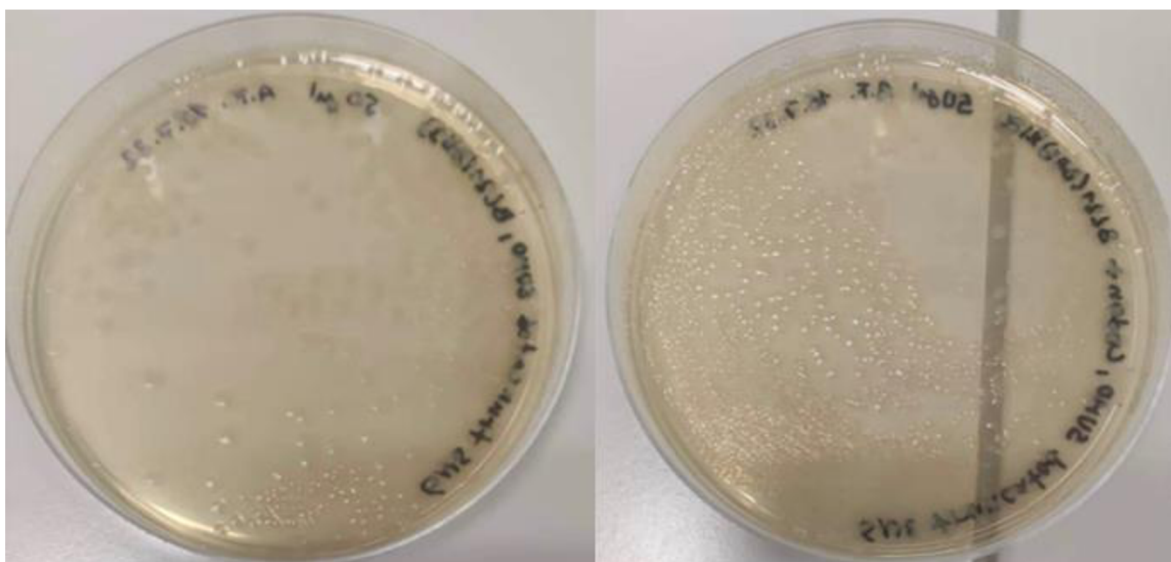
Tabulka XV: Koncentrace izolovaných plazmidů σ NS truncated pET SUMO.

číslo použité kolonie	koncentrace plazmidu [$\mu\text{g/ml}$]
2	469,4
5	754,1
6	385,8
7	615,4

Tyto kolonie byly analyzovány pomocí Sangerovy sekvenace a pozitivní klony byly použité k amplifikaci plazmidu. Pro následnou transformaci do kompetentních buněk byl zvolen plazmid σ NS truncated pET SUMO o koncentraci 754,1 $\mu\text{g/ml}$.

6.2 Transformace do kompetentních buněk

Plazmid σ NS truncated pET SUMO byl transformován do dvou typů kompetentních buněk – BL21(DE3) Competent *E. Coli* Cells a BL21-CodonPlus Competent Cells. Kolonie buněk byly následně inkubovány na kanamycinových plotnách přes noc. Na Obr. 10 jsou zobrazeny kolonie buněk BL21(DE3) a BL21-CodonPlus, přičemž bylo v obou případech rozetřeno na plotnu 50 μl buněk.



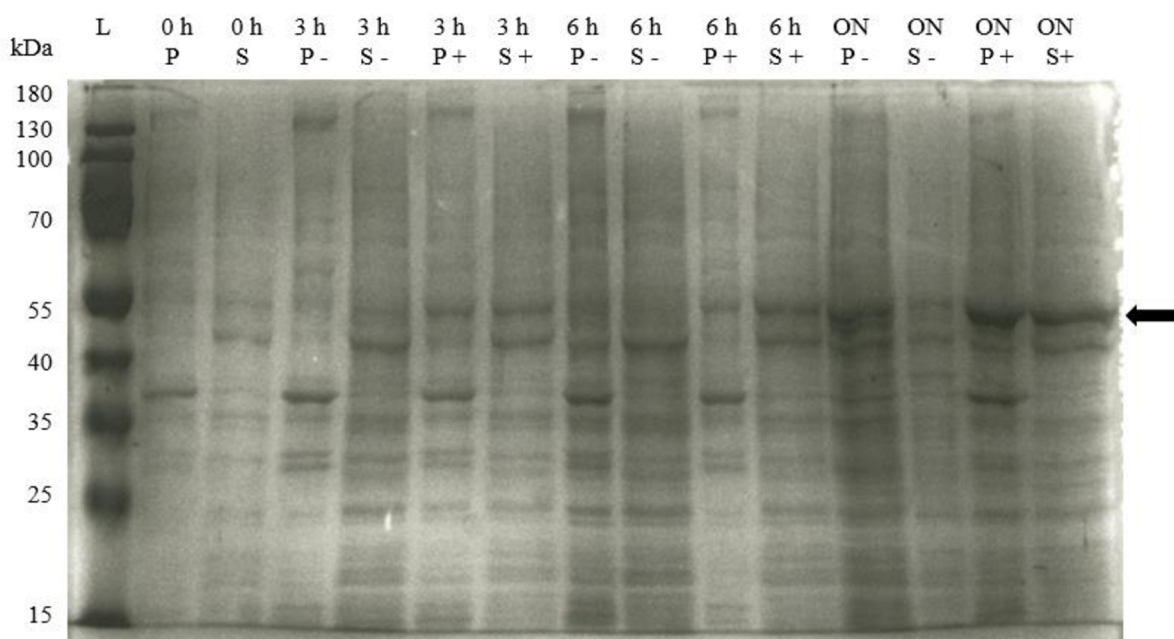
Obrázek 10: Kolonie buněk BL21(DE3) (vlevo) a BL21-CodonPlus (vpravo) na kanamycinových plotnách.

6.3 Pilotní exprese

Během pilotní exprese byly v průběhu inkubace odebírány 1ml vzorky v určených časech, a to v závislosti na teplotě inkubace. Koncentrace proteinu σ NS truncated v těchto vzorcích byla analyzována pomocí SDS-PAGE elektroforézy. Na základě výsledků byly zvoleny podmínky nejvyšší exprese proteinu a byly následně použity pro expresi proteinu ve velkém měřítku.

Exprese proteinu σ NS truncated v buňkách BL21(DE3) byla úspěšná při obou použitých teplotách, tedy při 18 °C a 30 °C. Pro expresi proteinu ve velkém měřítku byla zvolena inkubace při teplotě 30 °C po dobu 4 hodin.

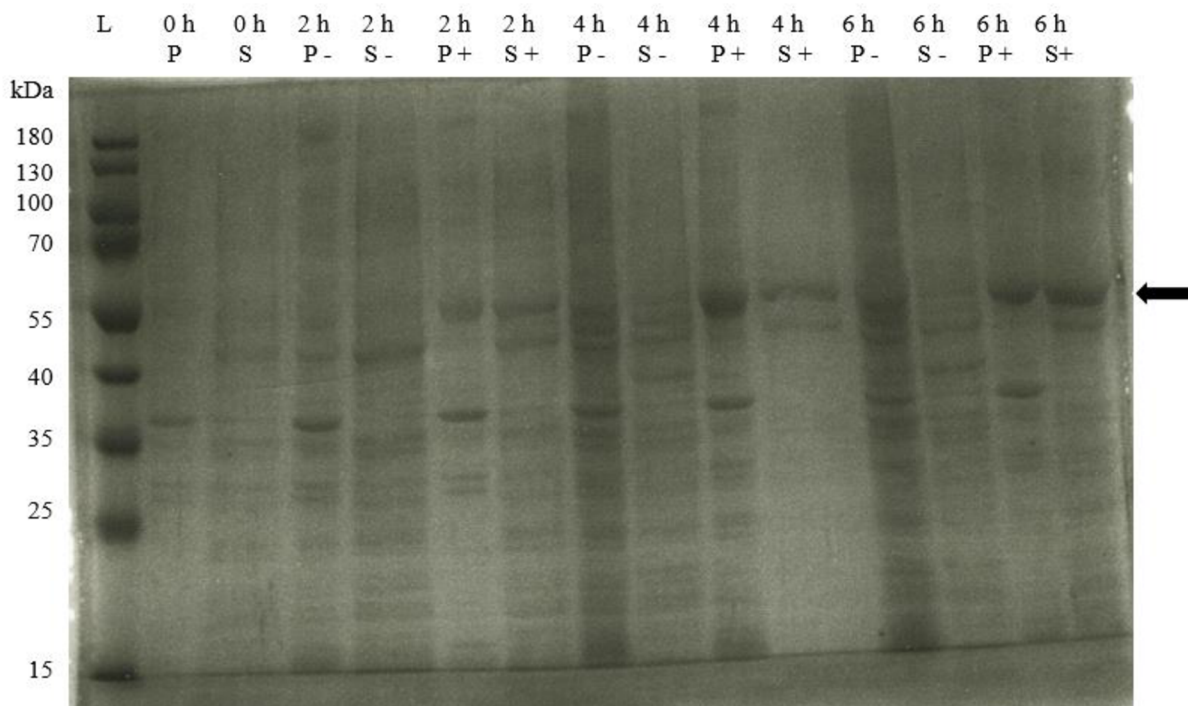
Výsledek exprese proteinu v buňkách BL21(DE3) při inkubaci za teploty 18 °C je zobrazen na Obr. 11.



Obrázek 11: Exprese proteinu σ NS truncated v buňkách BL21(DE3) při inkubaci v 18 °C. Označení 0 h, 3 h, 6 h a ON („overnight“ - přes noc) značí čas odběru vzorku. Pelety jsou označeny jako „P“, supernatanty jsou označeny jako „S“. Vzorky, u kterých byla provedena indukce pomocí IPTG, jsou označeny „+“, neindukované vzorky jsou označeny „-“. Ladder je označen jako „L“, jeho velikost v jednotkách kDa je uvedena u levého okraje snímku.

Protein σ NS truncated má molekulovou hmotnost 56 kDa a jeho poloha na gelu je znázorněna šipkou.

Výsledek exprese proteinu v buňkách BL21(DE3) při inkubaci za teploty 30 °C je zobrazen na Obr. 12.

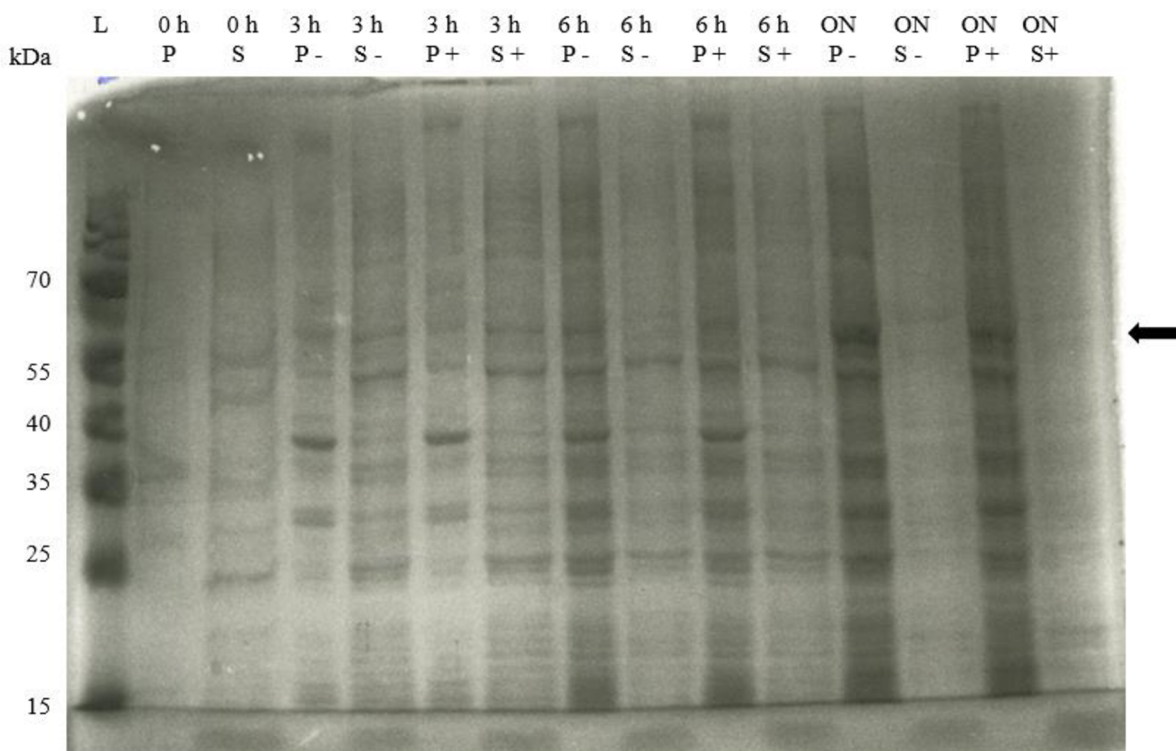


Obrázek 12: Exprese proteinu σ NS truncated v buňkách BL21(DE3) při inkubaci v 30 °C.

Označení 0 h, 2 h, 4 h a 6 h značí čas odběru vzorku. Pelety jsou označeny jako „P“, supernatanty jsou označeny jako „S“. Vzorky, u kterých byla provedena indukce pomocí IPTG, jsou označeny „+“, neindukované vzorky jsou označeny „-“. Ladder je označen jako „L“, jeho velikost v jednotkách kDa je uvedena u levého okraje snímku. Protein σ NS truncated má molekulovou hmotnost 56 kDa a jeho poloha na gelu je znázorněna šipkou.

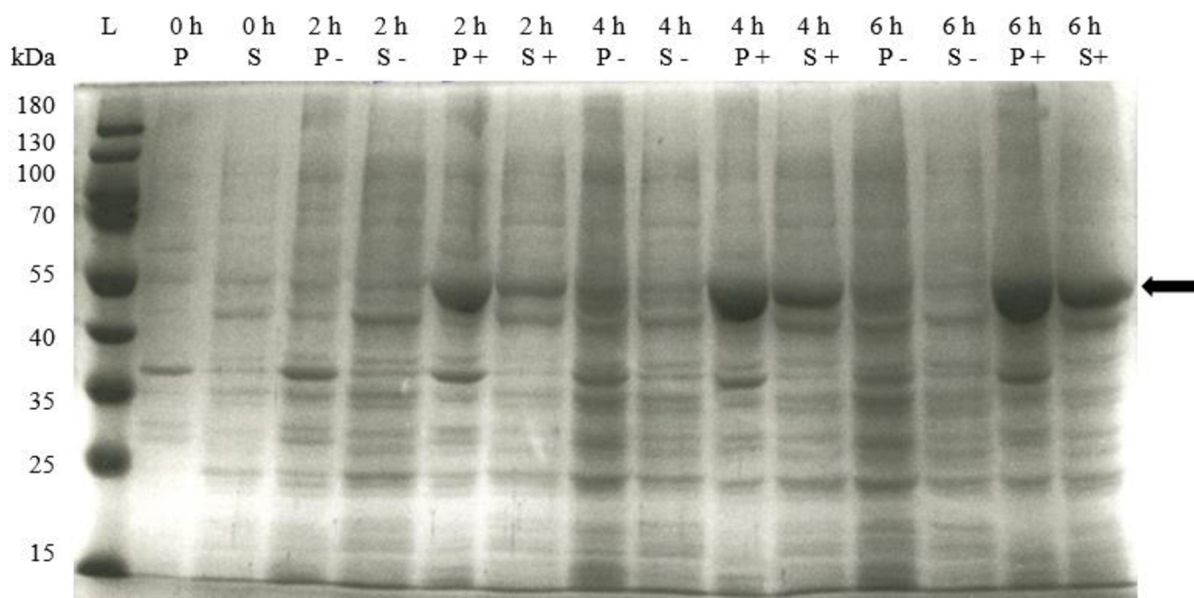
Expres proteinu σ NS truncated v buňkách BL21-CodonPlus byla účinnější při teplotě 30 °C. Pro expresi proteinu ve velkém měřítku byla v závislosti na výsledcích pilotní exprese zvolena inkubace při teplotě 30 °C po dobu 4 hodin.

Výsledek exprese proteinu v buňkách BL21-CodonPlus při inkubaci za teploty 18 °C je zobrazen na Obr. 13.



Obrázek 13: Expres proteinu σ NS truncated v buňkách BL21-CodonPlus při inkubaci v 18 °C. Označení 0 h, 3 h, 6 h a ON (přes noc) značí čas odběru vzorku. Pelety jsou označeny jako „P“, supernatanty jsou označeny jako „S“. Vzorky, u kterých byla provedena indukce pomocí IPTG, jsou označeny „+“, neindukované vzorky jsou označeny „-“. Ladder je označen jako „L“, jeho velikost v jednotkách kDa je uvedena u levého okraje snímku. Poloha proteinu σ NS truncated o molekulové hmotnosti 56 kDa je na gelu znázorněna šipkou.

Výsledek exprese proteinu v buňkách BL21-CodonPlus při inkubaci za teploty 30 °C je zobrazen na Obr. 14.

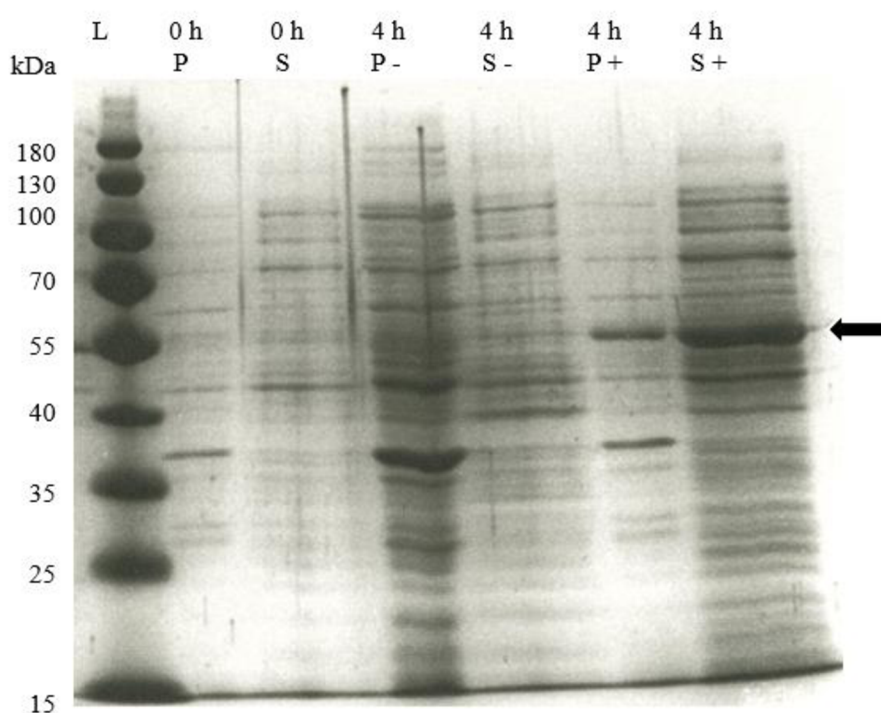


Obrázek 14: Exprese proteinu σ NS truncated v buňkách BL21-CodonPlus při inkubaci v 30°C. Označení 0 h, 2 h, 4 h a 6 h značí čas odběru vzorku. Pelety jsou označeny jako „P“, supernatanty jsou označeny jako „S“. Vzorky, u kterých byla provedena indukce pomocí IPTG, jsou označeny „+“, neindukované vzorky jsou označeny „-“. Ladder je označen jako „L“, jeho velikost v jednotkách kDa je uvedena u levého okraje snímku. Poloha proteinu σ NS truncated o molekulové hmotnosti 56 kDa je na gelu znázorněna šipkou.

6.4 Expresa ve velkém měřítku

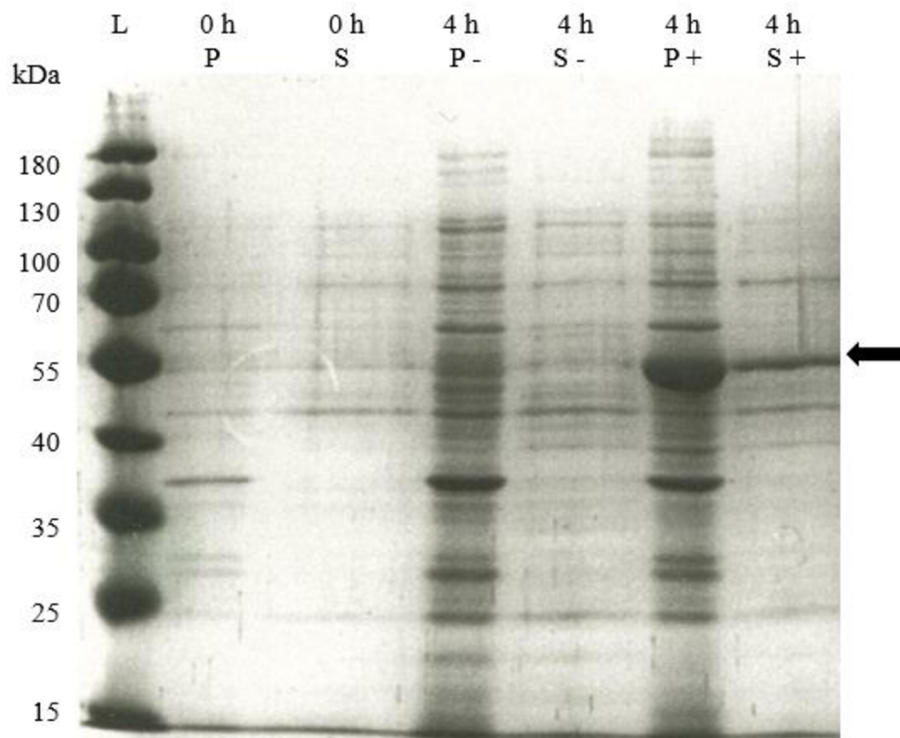
Během exprese ve velkém měřítku probíhala inkubace na třepačkách při teplotě 30 °C po dobu 4 hodin od okamžiku přidání induktoru IPTG o výsledné koncentraci 1 mM. Tyto podmínky platily pro oba typy buněk, tedy BL21(DE3) i BL21-CodonPlus. Před indukcí a po 4 hodinách inkubace byly odebrány 1 ml vzorky, které byly analyzovány pomocí SDS-PAGE elektroforézy a byla tak ověřena dostatečná exprese proteinu σ NS truncated.

Na Obr. 15 je zobrazen výsledek exprese proteinu σ NS truncated v buňkách BL21(DE3).



Obrázek 15: Expresa proteinu σ NS truncated v buňkách BL21(DE3). Označení 0 h a 4 h značí čas odběru vzorku. Pelety jsou označeny jako „P“, supernatanty jsou označeny jako „S“. Vzorky, u kterých byla provedena indukce pomocí IPTG, jsou označeny „+“, neindukované vzorky jsou označeny „-“. Ladder je označen jako „L“, jeho velikost v jednotkách kDa je uvedena u levého okraje snímku. Poloha proteinu σ NS truncated o molekulové hmotnosti 56 kDa je na gelu znázorněna šipkou.

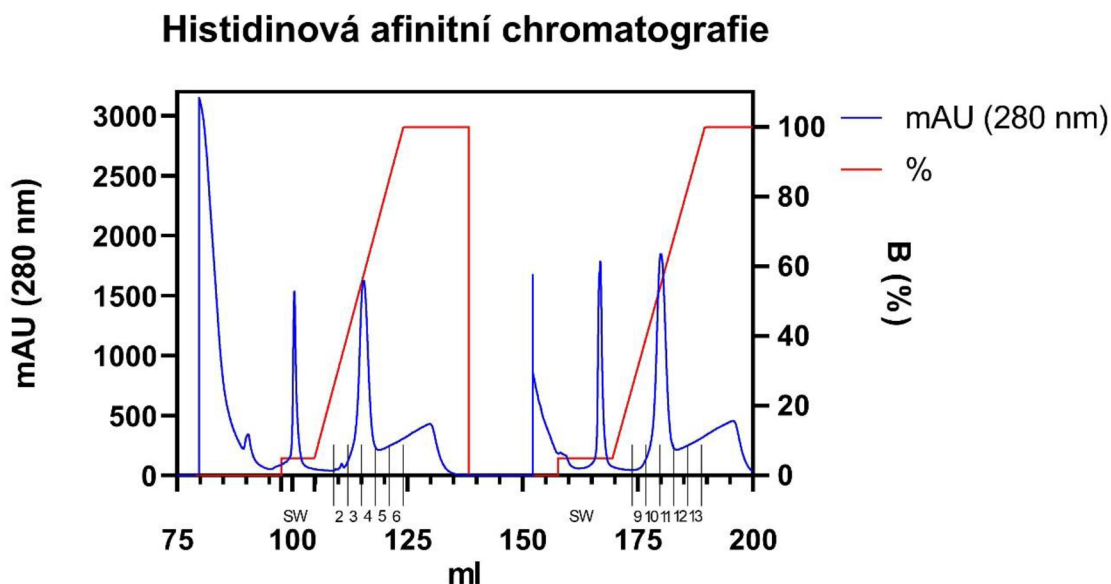
Na Obr. 16 je zobrazen výsledek exprese proteinu σ NS truncated v buňkách BL21-CodonPlus.



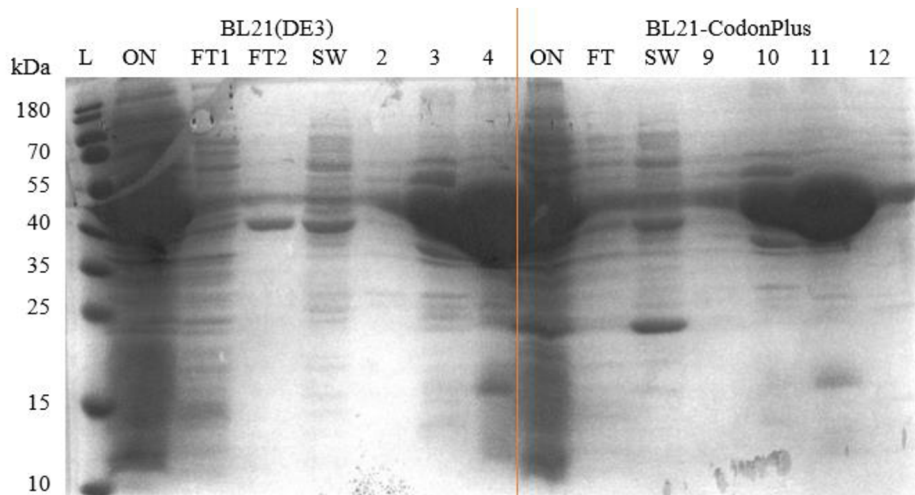
Obrázek 16: Exprese proteinu σ NS truncated v buňkách BL21-CodonPlus. Označení 0 h a 4 h značí čas odběru vzorku. Pelety jsou označeny jako „P“, supernatanty jsou označeny jako „S“. Vzorky, u kterých byla provedena indukce pomocí IPTG, jsou označeny „+“, neindukované vzorky jsou označeny „-“. Ladder je označen jako „L“, jeho velikost v jednotkách kDa je uvedena u levého okraje snímku. Poloha proteinu σ NS truncated o molekulové hmotnosti 56 kDa je na gelu znázorněna šipkou.

6.5 Purifikace

Nejprve byla provedena histidinová afinitní chromatografie. Na Obr. 17 je zobrazen průběh purifikace pomocí chromatogramu a na Obr. 18 je zobrazen její výsledek pomocí SDS-PAGE.

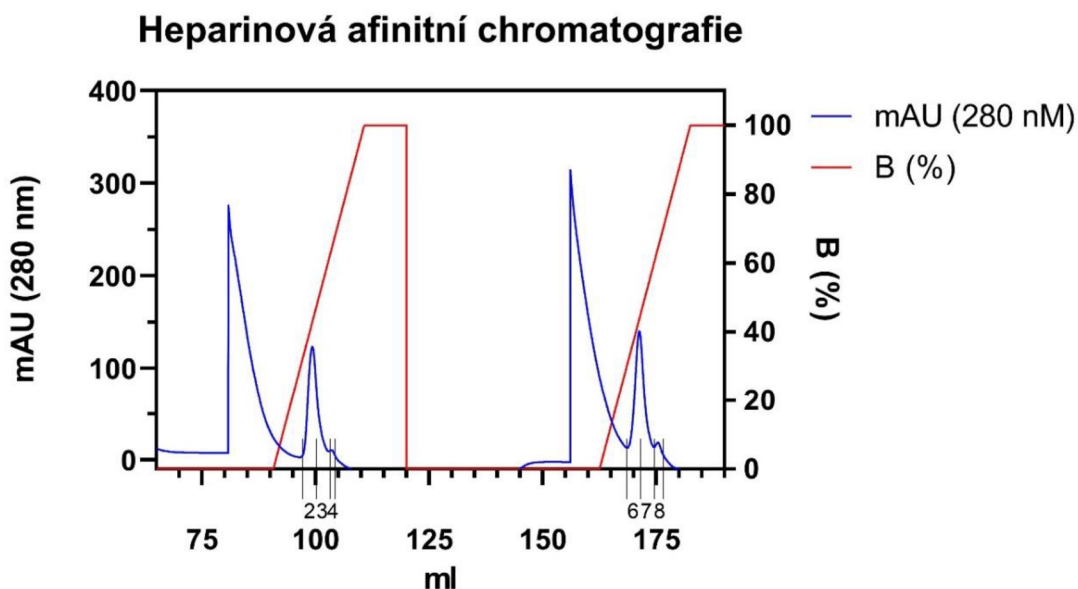


Obrázek 17: Chromatogram histidinové afinitní chromatografie proteinu σ NS truncated. „SW“ značí soft-wash a čísla jsou označeny jednotlivé frakce. Peaky bez označení (80-95 ml a 150-160 ml) odpovídají nanášení vzorku na kolonu.

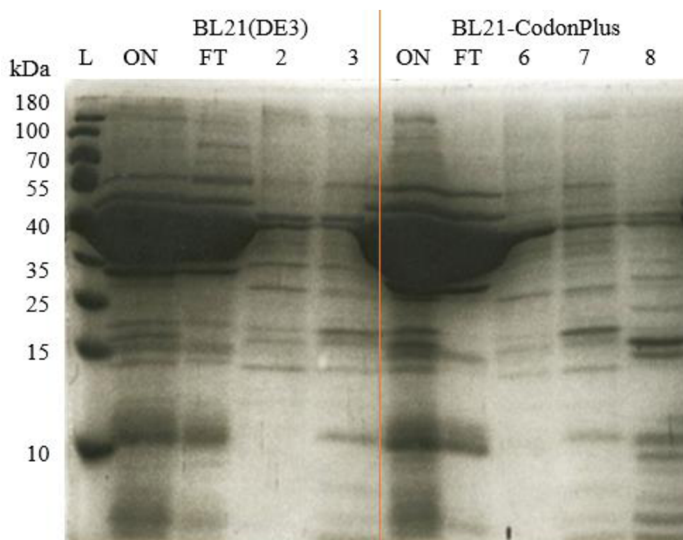


Obrázek 18: Výsledek frakcí získaných histidinovou afinitní chromatografií. „ON“ je vzorek nanesený na kolonu, „FT“ značí flow through, „SW“ je značení pro soft-wash a jednotlivými čísly jsou označeny frakce. Ladder je označen jako „L“, jeho velikost v jednotkách kDa je uvedena u levého okraje snímku.

V případě buněk BL21(DE3) byla nejvyšší koncentrace proteinu σ NS truncated ve frakcích č. 3 a 4 a v případě buněk BL21-CodonPlus ve frakcích č. 10 a 11. Uvedené frakce se vylučovali při koncentraci pufru B přibližně 60 %. Tyto frakce tedy byly dále purifikovány pomocí heparinové afinitní chromatografie. Její průběh je pomocí chromatogramu zobrazen na Obr. 19. Na Obr. 20 je zobrazen její výsledek pomocí SDS-PAGE.



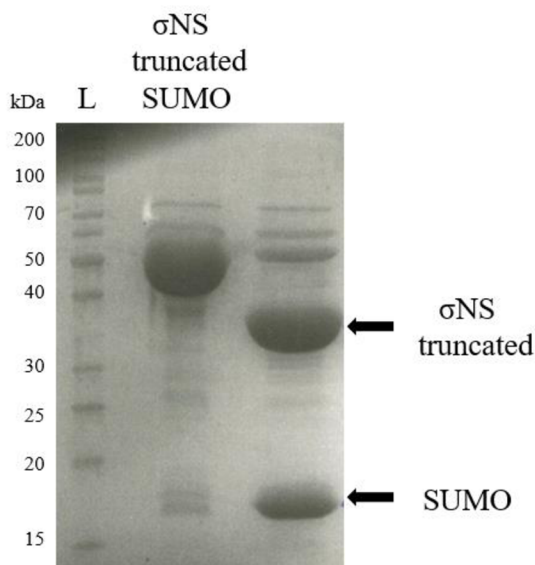
Obrázek 19: Chromatogram heparinové afinitní chromatografie proteinu σ NS truncated. Jednotlivé frakce jsou označeny čísly. Peaky bez označení (80-90 ml a 155-165 ml) odpovídají nanášení vzorku na kolonu.



Obrázek 20: Výsledek frakcí získaných heparinovou afinitní chromatografií. „ON“ je označení pro vzorek nanesený na kolonu, „FT“ značí flow through a jednotlivými čísly jsou označeny frakce. Ladder je označen jako „L“, jeho velikost v jednotkách kDa je uvedena u levého okraje snímku.

U obou typů buněk, tedy BL21(DE3) i BL21-CodonPlus, byla nejvyšší koncentrace proteinu σ NS truncated ve flow through, protože se protein na kolonu nenařadil.

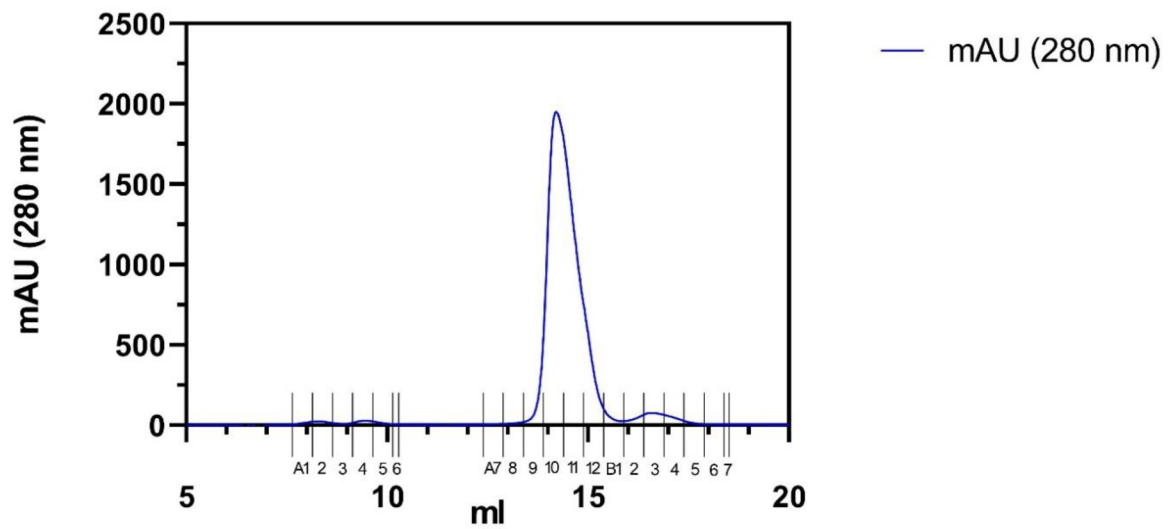
Flow through z buněk BL21(DE3) bylo následně purifikováno gelovou chromatografií. Nejprve byl ale vyměněn pufr vzorku za ekvilibrační pufr A2. Následně bylo pomocí SUMO proteázy ULP1 odštěpeno SUMO od proteinu σ NS truncated. Na Obr. 21 je zobrazen výsledek tohoto odštěpení.



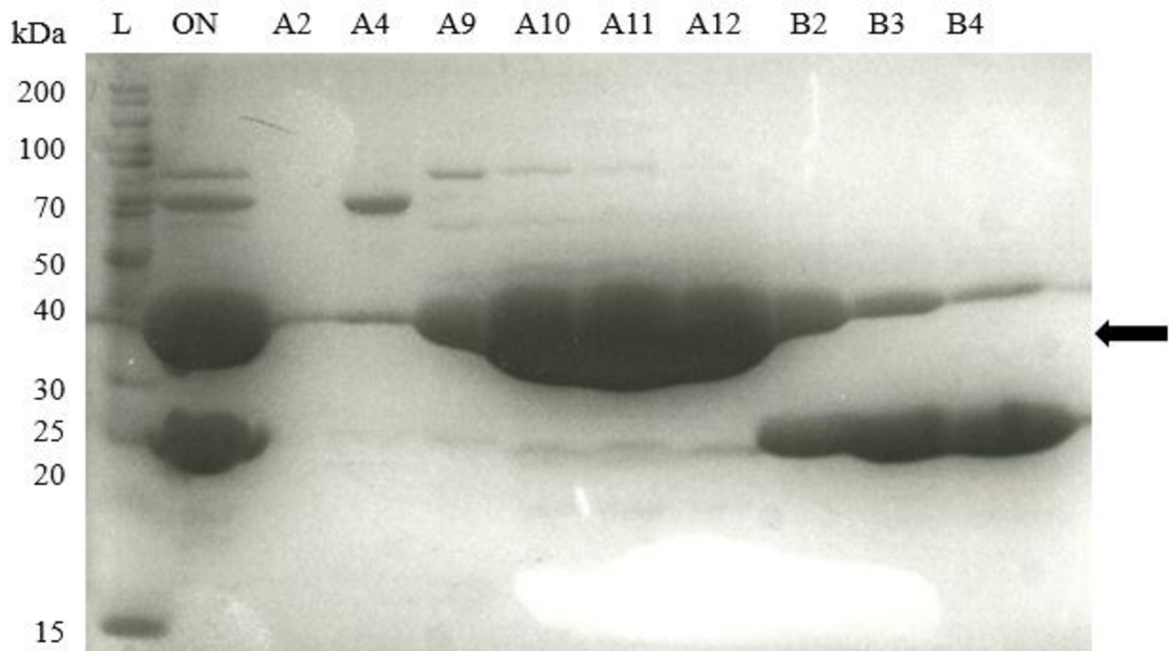
Obrázek 21: Výsledek použití SUMO proteázy.

Protein byl následně zakoncentrován pomocí Amicon filtru 10K na výsledný objem 1 ml a byl tak připraven k použití na gelovou chromatografií. Její průběh je zobrazen na Obr. 22. Na Obr. 23 je zobrazena její analýza pomocí SDS-PAGE. Změřená koncentrace vybraných frakcí je uvedena v Tab. XVI.

Gelová chromatografie



Obrázek 22: Chromatogram gelové chromatografie proteinu σ NS truncated. Nejvyšší peak znázorňuje protein σ NS truncated, menší peaky značí přítomnost jiných proteinů.



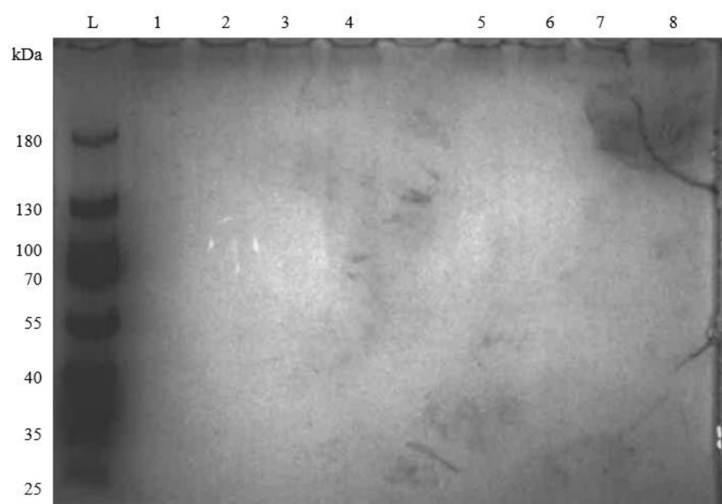
Obrázek 23: Výsledek frakcí získaných gelovou chromatografií. „ON“ je označení pro vzorek nanesený na kolonu a čísla jsou označeny jednotlivé frakce. Poloha proteinu σ NS truncated je na gelu znázorněna šipkou.

Tabulka XVI: Koncentrace frakcí získaných gelovou chromatografií.

frakce	koncentrace [mg/ml]
A9	0,852
A10	5,809
A11	8,002
A12	5,200
B2	0,895
B3	0,549
B4	0,390

6.6 Nativní gelová elektroforéza

Pomocí nativní gelové elektroforézy byly analyzovány jednotlivé vzorky obsahující protein (σ NS nebo σ NS truncated), pufr Hepes a případně C15 fluor RNA. Následovalo promývání a barvení použitého nativního gelu, který byl poté zdokumentován a vyhodnocen. Cílem bylo posoudit, zda má protein σ NS truncated zachovanou schopnost vázat RNA, jako je tomu u proteinu σ NS. Na Obr. 24 je zobrazen výsledek nativní gelové elektroforézy. Nativní gelová elektroforéza nebyla úspěšná, jelikož na gelu je vidět pouze Ladder, zatímco jednotlivé vzorky nejsou patrné. Nemohlo tedy být posouzeno, zda má protein σ NS truncated schopnost vazby RNA. Chyba pravděpodobně nastala při vyvíjení obrazu, konkrétně nepřesným pipetováním činidel.

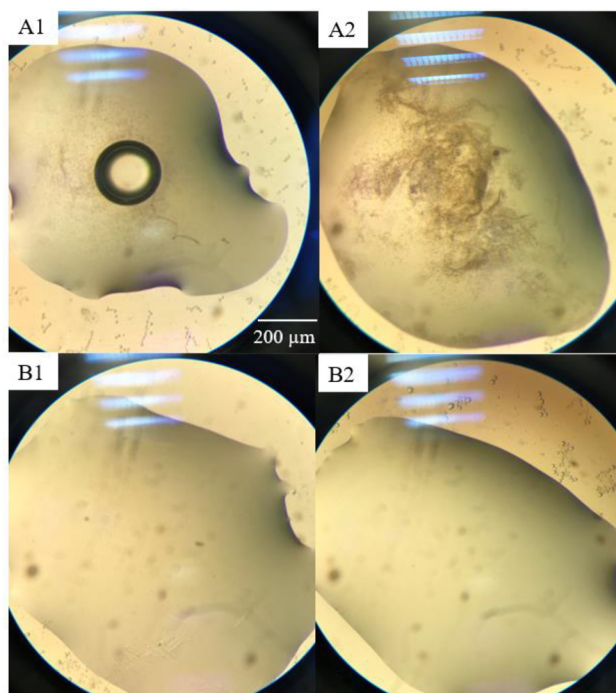


Obrázek 24: Výsledek nativní gelové elektroforézy. Čísla 1 až 8 značí jednotlivé vzorky (viz. Tab. XI). Ladder je označen jako „L“, jeho velikost v jednotkách kDa je uvedena u levého okraje snímku.

6.7 Krystalizace proteinu σ NS truncated

6.7.1 Pre-krystalizační test

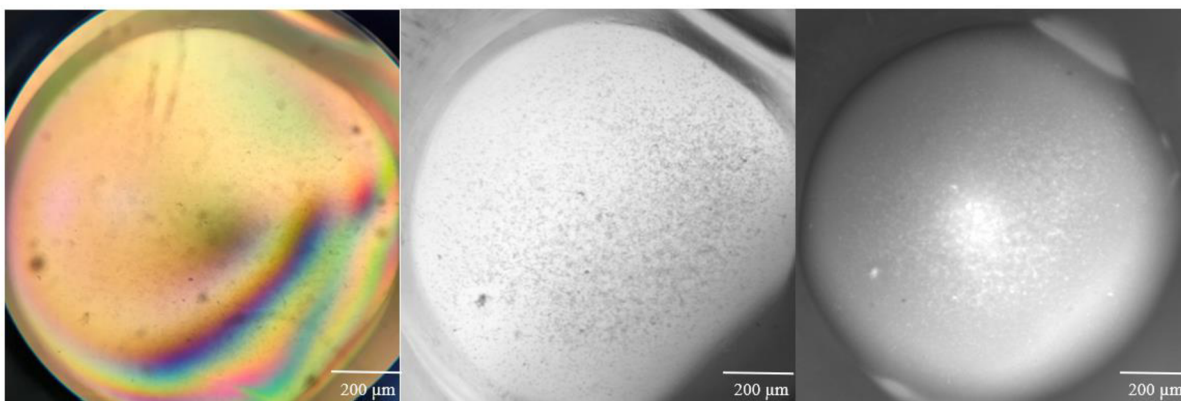
Před krystalizací byl proveden pre-krystalizační test s cílem určit ideální koncentraci proteinu pro krystalizaci. Byly použity 4 PCT reagenty (A1, A2, B1, B2) z komerčně dostupné sady PCT Pre-Crystallization Test. Za použití reagentu A1 došlo k vytvoření mírné precipitace. Reagent A2 způsobil silnou precipitaci. Reakce proteinu s reagenty B1 a B2 poskytla čiré kapky. Bylo vyhodnoceno, že použitá koncentrace proteinu je pro krystalizaci vhodná. Výsledky použití jednotlivých reagentů jsou zobrazeny na Obr. 25.



Obrázek 25: Precipitace za použití reagentů A1, A2, B1 a B2.

6.7.2 Manuální krystalizace

K manuální krystalizaci proteinu σ NS truncated byla využita precipitační činidla ze sady Morpheus II. V jamce s poměrem 1:1 proteinu a precipitačního činidla č. 45, které obsahovalo 0,005 M chroman sodný tetrahydrát, 0,005 M molybdenan sodný dihydrát, 0,005 M wolframian sodný dihydrát, 0,005 M orthovanadičnan sodný, 0,1 M Gly-Gly, AMPD pH 8,5, 15 % PEG 3000, 20% 1, 2, 4- butantriol, 1% NDSB 256, došlo pouze k vytvoření precipitace. Precipitace v této podmínce byla poté otestována pomocí zobrazovacího systému JANSi UVEX a je zobrazena na Obr. 26. Tato podmínka byla dále optimalizována.

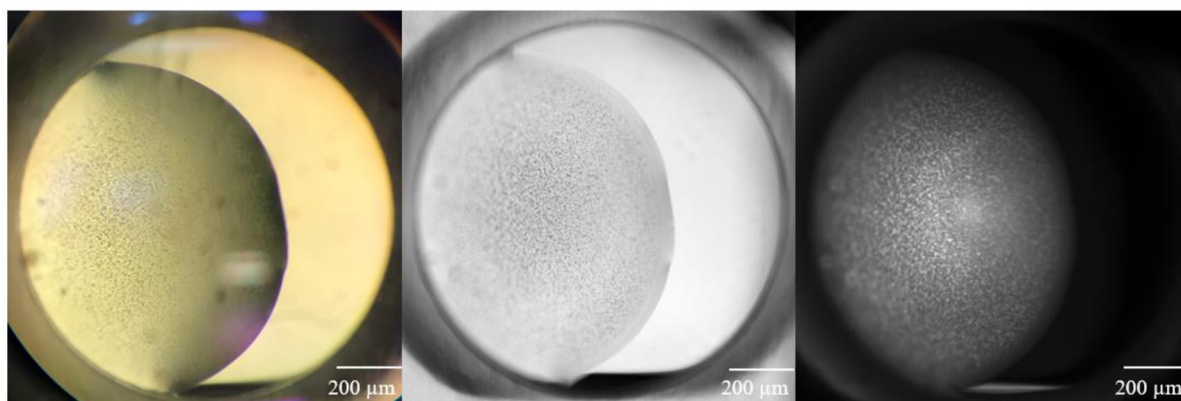


Obrázek 26: Precipitovaný protein vytvořen v podmínce č. 45 (0,005 M chroman sodný tetrahydrát, 0,005 M molybdenan sodný dihydrát, 0,005 M wolframnan sodný dihydrát, 0,005 M orthovanadičnan sodný, 0,1 M Gly-Gly, AMPD pH 8,5, 15 % PEG 3000, 20% 1,2, 4- butantriol, 1% NDSB 256) sady Morpheus II.

6.7.3 Krystalizace pomocí krystalizačního robota

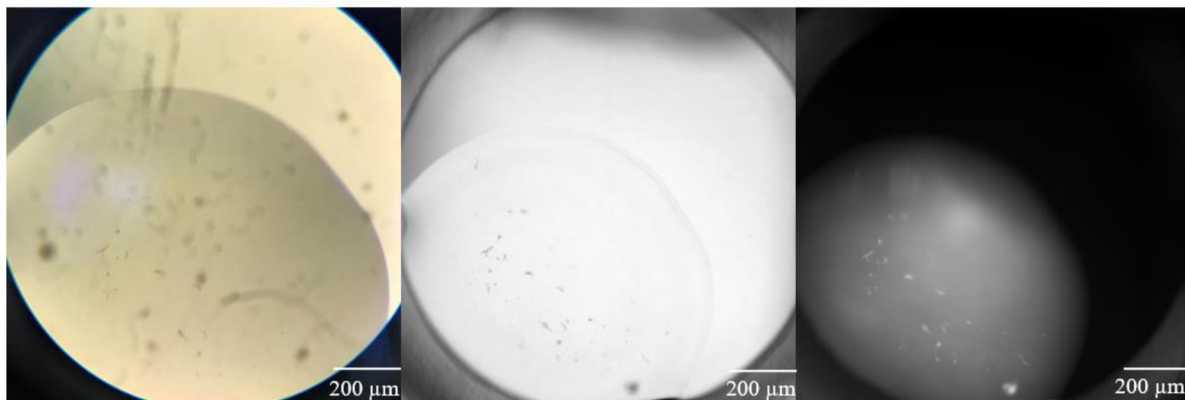
Ke krystalizaci pomocí krystalizačního robota OryxNano byla použita precipitační činidla ze 7 různých komerčně dostupných sad.

Mikrokrystaly vypěstované za použití sady SG1 se nacházely v jamce s poměrem 1:1 proteinu a precipitačního činidla č. 44, které obsahovalo 0.1 M Bis-Tris pH 6.5, 20 % PEG 5000 MME. Tyto krystaly byly následně otestovány pomocí zobrazovacího systému JANSI UVEX. Mikrokrystaly jsou zobrazeny na Obr. 27. Tato podmínka byla dále optimalizována.



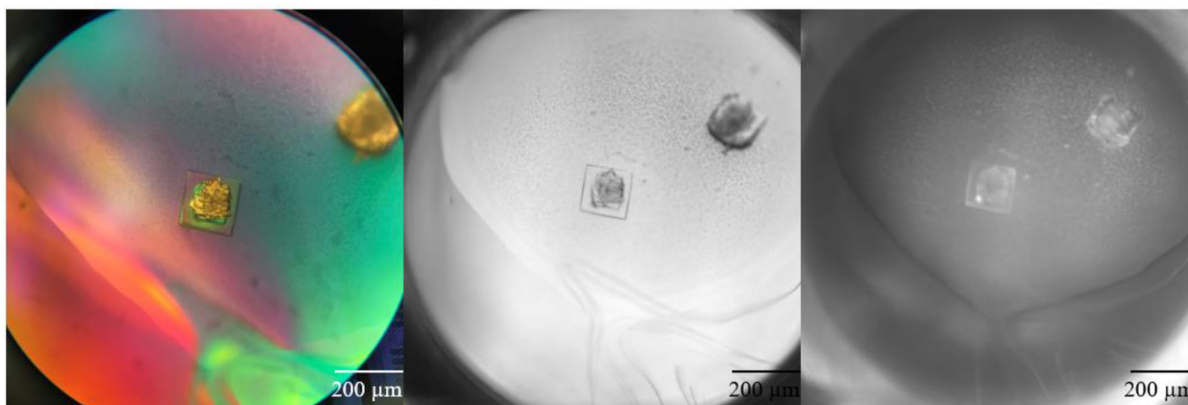
Obrázek 27: Mikrokrystaly vypěstované v podmínce č. 44 (0.1 M Bis-Tris pH 6.5, 20 % PEG 5000 MME) sady SG1.

Za použití sady LFS došlo pouze k vytvoření precipitace, konkrétně v jamce s poměrem 1:1 proteinu a precipitačního činidla č. 26, které obsahovalo 0,1 M PCTP pH 7, 30 % PEG 1000. Precipitace v této podmínce byla poté otestována pomocí zobrazovacího systému JANSi UVEX. Tato podmínka je zobrazena na Obr. 28 a byla dále optimalizována.



Obrázek 28: Precipitovaný protein vytvořen v podmínce č. 26 (0,1 M PCTP pH 7, 30 % PEG 1000) sady LFS.

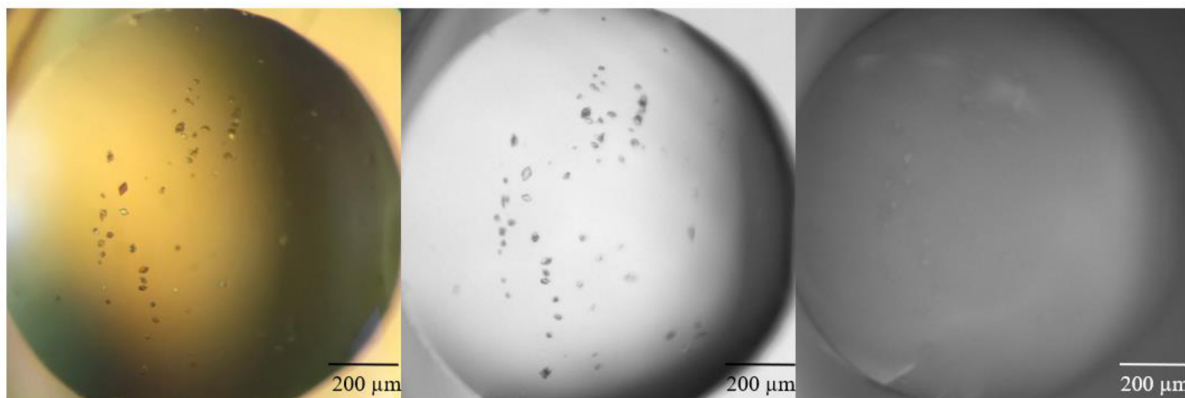
Krystaly vypěstované za použití sady MemGold se nacházely v jamce s poměrem 1:0,5 proteinu a precipitačního činidla č. 12, které obsahovalo 0,1 M octan hořečnatý tetrahydrát, 0,1 M citrát sodný pH 5,8, 14 % PEG 5000 MME. Tyto krystaly byly následně otestovány pomocí zobrazovacího systému JANSi UVEX a jsou zobrazeny na Obr. 29. Z výsledků testu je jasné, že se jedná o krystaly soli.



Obrázek 29: Krystaly soli vytvořené v podmínce č. 12 (0,1 M octan hořečnatý tetrahydrát, 0,1 M citrát sodný pH 5,8, 14 % PEG 5000 MME) sady MemGold.

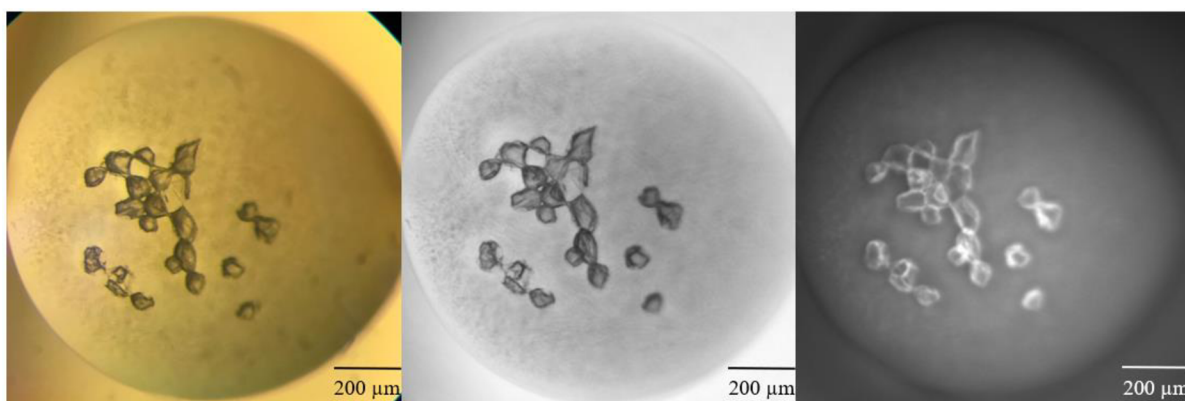
Za použití sady MemGold 2 byly zaznamenány krystaly v jamce s poměrem 1:0,5 proteinu a precipitačního činidla č. 45, které obsahovalo 0,2 M chlorid vápenatý dihydrát, 0,1 M MES pH 5, 20 % PEG 350 MME. Krystaly v této podmínce byly následně otestovány

pomocí zobrazovacího systému JANSi UVEX. Pod UV zářením ale nedošlo k emitaci viditelného světla, a tak bylo zjištěno, že se o krystaly nejedná. Výsledek je zobrazen na Obr. 30.



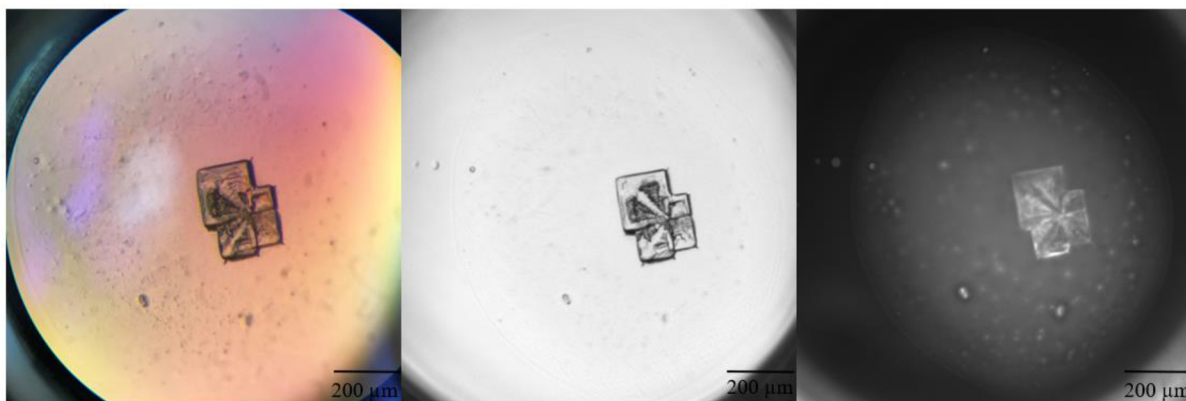
Obrázek 30: Výsledek použití podmínky č. 45 (0,2 M chlorid vápenatý dihydrát, 0,1 M MES pH 5, 20 % PEG 350 MME) sady MemGold 2. Vypěstované krystaly jsou anorganického původu.

Za použití sady JCSG-plus, kdy byl v jamce poměr proteinu a precipitačního činidla G5 1:0,5, které obsahovalo 0,005 M chlorid kobaltnatý hexahydrát, 0,005 M chlorid kademnatý hemipentahydrát, 0,005 M chlorid hořečnatý hexahydrát, 0,005 M chlorid nikelnatý hexahydrát, 0,1 M HEPES pH 7,5, 12 % PEG 3350, došlo ke vzniku tzv. skin precipitace. Ta byla následně otestována pomocí zobrazovacího systému JANSi UVEX a je zobrazena na Obr. 31.



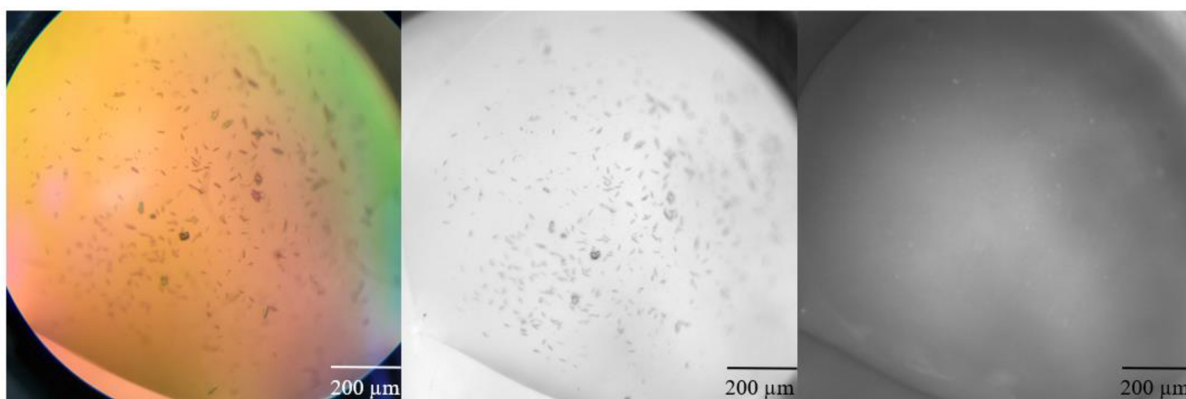
Obrázek 31: Skin precipitace vytvořená v podmínce G5 (0,005 M chlorid kobaltnatý hexahydrát, 0,005 M chlorid kademnatý hemipentahydrát, 0,005 M chlorid hořečnatý hexahydrát, 0,005 M chlorid nikelnatý hexahydrát, 0,1 M HEPES pH 7,5, 12 % PEG 3350) sady JCSG-plus.

Krystaly vypěstované za použití sady PEG/Ion HT se nacházely v jamce s poměrem 1:0,5 proteinu a precipitačního činidla č. 53, které obsahovalo 0,1 M malonan disodný pH 6,0, 12 % polyethylenglykol. Krystaly byly následně otestovány pomocí zobrazovacího systému JANSi UVEX. Tyto krystaly soli jsou zobrazeny na Obr. 32.



Obrázek 32: Krystaly soli vytvořené v podmínce č. 53 (0,1 M malonan disodný pH 6,0, 12 % polyethylenglykol) sady PEG/Ion HT.

Za použití sady JBScreen Basic HTS došlo k vypěstování krystalů v jamce s poměrem 1:1 proteinu a precipitačního činidla F4, které obsahovalo 1 M síran lithný, 100 mM Tris pH 8,5, 10 mM chlorid nikelnatý. Krystaly v této podmínce byly následně otestovány pomocí zobrazovacího systému JANSi UVEX. Krystaly soli jsou zobrazeny na Obr. 33.



Obrázek 33: Krystaly vypěstované v podmínce F4 (1 M síran lithný, 100 mM Tris pH 8,5, 10 mM chlorid nikelnatý) sady JBScreen Basic HTS. Vypěstované krystaly jsou anorganického původu.

Krystaly byly následně proškoleným personálem testovány pomocí difrakční analýzy. Výsledky rentgenové difrakce ale ukázaly, že se nejedná o proteinové krystaly. V některých případech šlo o krystaly soli z precipitačního činidla.

6.7.4 Optimalizace krystalizačních podmínek

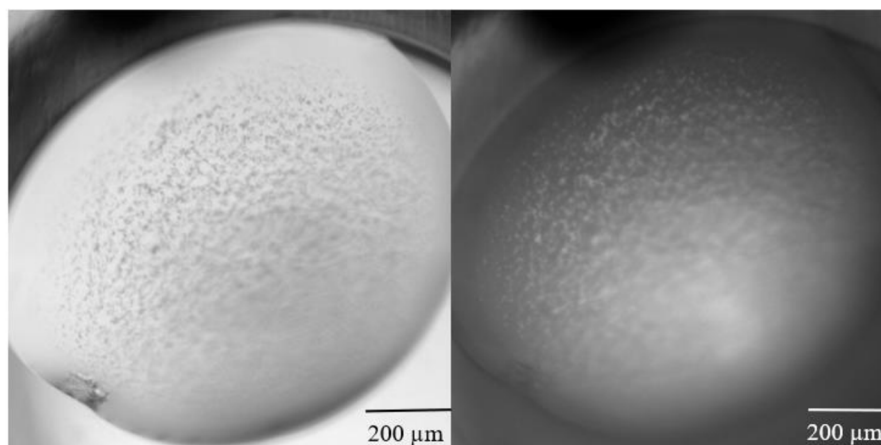
Některá precipitační činidla poskytující pozitivní výsledky byla vybrána pro optimalizaci podmínek. Přehled použitých podmínek a jejich složení je uveden v Tab. XVII.

Tabulka XVII: Precipitační činidla použitá pro optimalizaci podmínek.

název sady	Morpheus II	SG1	LFS
číslo podmínky	5	44	26
složení podmínky	30 mM síran lithný, 30 mM síran sodný, 30 mM síran draselný, 0,1 M BES/TEA pH 7,5, 15 % PEG 3K, 20 % 1,2,4-butantriol, 1 % NDSB 256	0.1 M Bis-Tris pH 6.5, 20 % PEG 5000 MME	0,1 M PCTP pH 7, 30 % PEG 1000

Pro krystalizaci byla použita krystalizační destička s 96 rezervoáry, která byla svisle rozdělena na 3 stejné části. Každá z těchto částí byla využita pro jiné precipitační činidlo. Pomocí robotu OryxNano byl vytvořen koncentrační gradient, kdy na začátku daného úseku destičky byla koncentrace proteinu 80 % a na jeho konci 20 %. Tím byly tyto podmínky rozšířeny a byla tak vyšší pravděpodobnost vytvoření krystalů a jejich lepšího růstu.

Ke vzniku krystalů ale v žádné z podmínek nedošlo. Na Obr. 34 je znázorněna precipitace, která vznikla v jamce s precipitačním činidlem č. 26 ze sady LFS. Precipitace byla následně otestována pomocí zobrazovacího systému JANSi UVEX, čímž byla potvrzena.



Obrázek 34: Precipitace vzniklá v podmínce č. 26 (0,1 M PCTP pH 7, 30 % PEG 1000) sady LFS, při poměru proteinu a precipitačního činidla 1:1.

U ostatních činidel o různé koncentraci došlo také pouze k precipitacím, vzniku a růstu krystalů v žádné z podmínek nebylo dosaženo.

7 Diskuze

Heparinová afinitní chromatografie je vhodná i pro purifikaci proteinů, jejichž koncentrace v buněčném lyzátu je nízká. Výhodou heparinové afinitní chromatografie je, že narozdíl od dalších typů afinitních chromatografií není závislá na afinitní značce (Xiong et al. 2008). Nevýhodou je, že k dostatečné purifikaci samotná heparinová chromatografie není postačující (Farooqui 1980), je tedy potřebné použít další vhodnou chromatografickou metodu. U heparinové afinitní chromatografie došlo u obou typů buněk k uvolnění nejvyšší koncentrace proteinu σ NS truncated do flow through. Důvodem je, že se protein na kolonu dostatečně nenařádal, a to v důsledku odstranění části proteinu zodpovědného za vazbu k RNA. Z toho důvodu bylo flow through dále přečištěno pomocí gelové chromatografie, a tak se podařilo získat protein v dostatečné čistotě.

Rotavirální nestrukturní protein NSP2, funkční homolog ptačího reovirálního proteinu σ NS, byl za účelem lepšího porozumění jeho struktury a funkce exprimován v *E.Coli* M15[pREP4] za použití TB media. Zvoleným induktorem bylo IPTG, přičemž stejný induktor byl použit i v této práci při expresi proteinu σ NS truncated. Doba inkubace (4 hodiny) se také shodovala, teplota se mírně lišila (37 °C u NSP2, 30 °C u σ NS truncated). Následně byl protein NSP2 purifikován, a to za nativních podmínek na Ni-nitrilotriacetátové agarózní koloně. Získaný eluát byl následně dialyzován po dobu 48 hodin při teplotě 4 °C proti pufru s nízkým obsahem soli (2 mM Tris-HCl,; pH 7,2, 0,5 mM EDTA, 0,5 mM dithiothreitol). Bylo zjištěno, že v purifikovaném stavu neexistoval ve formě monomeru, ale pouze jako homomultimer skládající se ze 4 až 8 jednotek rekombinantního proteinu NSP2 (dále rNSP2). Ke zjištění, zda jsou zachovány interakce rNSP2 se ssRNA byla použita tzv. EMSA neboli test gelového posunu. Z výsledku tohoto testu vyplynulo, že rNSP2 má sekvenčně nezávislou RNA vazebnou aktivitu (Taraporewala et al. 1999). Tato práce potvrzuje podobnost uvedených funkčních homologů a nabízí jiný pohled na purifikaci proteinu σ NS truncated a na testování jeho interakce s RNA.

Rotavirální protein NSP2 se navíc vyznačuje aktivitou nukleosidtrifosfatázy. Pro tuto enzymatickou aktivitu je podstatný konzervovaný histidin (H225) fungující jako katalytický zbytek. Další výzkum se zabýval krystalizací tohoto proteinu a stejného proteinu, který ale obsahoval mutaci tohoto zbytku. Výsledky této studie odhalily, že NTPázová aktivita NSP2 je podobná aktivitě pozorované u buněčných NDPázových kináz. Tato aktivita může být

důležitá v rámci homeostáze nukleotidů ve virových továrnách, které se uplatňují v rámci replikace genomu rotaviru (Kumar et al. 2007).

Dosud nebyly dostupné žádné výsledky krystalizačních studií proteinu σ NS truncated. Jelikož se jeví být „truncated“ protein jako dimer, v roztoku lze předpokládat, že bude průběh krystalizace tohoto proteinu jednodušší než v případě proteinu σ NS, který je ve formě hexamerů. Avšak krystalizace ani jednoho z těchto proteinu nebyla doposud úspěšná.

8 Závěr

V rámci této práce se podařilo amplifikovat plazmid σ NS truncated pET SUMO, následně byla úspěšně provedena jeho transformace do dvou typů kompetentních buněk – BL21(DE3) Competent *E. Coli* Cells a BL21-CodonPlus Competent Cells. Následná exprese proteinu σ NS truncated poskytla vyšší výtěžek v buňkách BL21(DE3) Competent *E. Coli* Cells. Po expresi proteinu následovala jeho purifikace, a to pomocí histidinové afinitní chromatografie, heparinové afinitní chromatografie, a nakonec gelové chromatografie. Ta zajistila dostatečnou čistotu proteinu, který mohl být použit ke krystalizační studii.

Dále bylo zkoumáno, zda má protein σ NS truncated zachovanou schopnost vazby RNA, avšak nebylo dosaženo zamýšleného cíle. V práci jsou zmíněny možné chyby, kvůli kterým nebyly získány pozitivní výsledky. Je tak možné tento proces opakovat a těmto chybám se vyvarovat.

Protein σ NS truncated byl následně krystalizován. V rámci této práce nebyly získány proteinové krystaly poskytující difrakční obrazce, bylo dosaženo pouze vzniku precipitací a tvorby mikrokrytalů. Hledání ideálních podmínek pro krystalizaci tohoto proteinu a získání krystalů vhodných pro rentgenovou difrakci se nabízí jako téma pro další výzkum.

9 Seznam použité literatury

AGILENT TECHNOLOGIES. BL21-CodonPlus Competent Cells: Instruction Manual.

Agilent Technologies [online]. USA, 2015 [cit. 2023-04-06]. Dostupné z:

<https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/230240.pdf>

BENAVENTE, Javier a Jose MARTÍNEZ-COSTAS, 2007. Avian reovirus: Structure and biology. *Virus Research* [online]. **123**(2), 105–119. ISSN 01681702. Dostupné z:

z: doi:10.1016/j.virusres.2006.09.005

BORODAVKA, Alexander, James AULT, Peter G. STOCKLEY a Roman TUMA, 2015.

Evidence that avian reovirus σ S is an RNA chaperone: Implications for genome segment assortment. *Nucleic Acids Research* [online]. **43**(14), 7044–7057. ISSN 13624962. Dostupné z:

z: doi:10.1093/nar/gkv639

DESSAU, Moshe A. a Yorgo MODIS, 2010. Protein crystallization for X-ray

crystallography. *Journal of Visualized Experiments* [online]. (47), 1–6. ISSN 1940087X.

Dostupné z: doi:10.3791/2285

DOUGLAS INSTRUMENTS. OryxNano: Protein Crystallization Robot for sitting drop screening with (simple) optimization. Douglas Instruments: Success in protein crystallization [online]. United Kingdom: Douglas House, 2023 [cit. 2023-03-21]. Dostupné z:

<https://www.douglas.co.uk/oryxnano.htm>

FAROOQUI, Akhlaq A., 1980. Purification of enzymes by heparin-sepharose affinity chromatography. *Journal of Chromatography A* [online]. **184**(3), 335–345. ISSN 00219673.

Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9673(00)89004-4

GRANDE, Ana a Javier BENAVENTE, 2000. Optimal conditions for the growth,

purification and storage of the avian reovirus S1133. *Journal of Virological Methods*

[online]. **85**(1–2), 43–54. ISSN 01660934. Dostupné z: doi:10.1016/S0166-0934(99)00155-

X

GREENBERG, Harry B. a Mary K. ESTES, 2009. Rotaviruses: From Pathogenesis to

Vaccination. *Gastroenterology* [online]. **136**(6), 1939–1951. ISSN 00165085. Dostupné z:

z: doi:10.1053/j.gastro.2009.02.076

HUANG, Pi H., Ying J. LI, Yu P. SU, Long H. LEE a Hung J. LIU, 2005. Epitope mapping

and functional analysis of sigma A and sigma NS proteins of avian reovirus. *Virology*

[online]. **332**(2), 584–595. ISSN 00426822. Dostupné z: doi:10.1016/j.virol.2004.12.005

JONES R.C.. Avian reovirus infections. *Scientific & Technical Review*. 2000 08 1; 19 (2): 614-625. doi: <http://dx.doi.org/10.20506/rst.19.2.1237>

KRAUSS, Irene Russo, Antonello MERLINO, Alessandro VERGARA a Filomena SICA, 2013. An overview of biological macromolecule crystallization. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **14**(6), 11643–11691. ISSN 14220067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms140611643

KUMAR, Mukesh, Hariharan JAYARAM, Rodrigo VASQUEZ-DEL CARPIO, Xiaofang JIANG, Zenobia F. TARAPOREWALA, Raymond H. JACOBSON, John T. PATTON a B. V. Venkataram PRASAD, 2007. Crystallographic and Biochemical Analysis of Rotavirus NSP2 with Nucleotides Reveals a Nucleoside Diphosphate Kinase-Like Activity. *Journal of Virology* [online]. **81**(22), 12272–12284. ISSN 0022-538X. Dostupné z: doi:10.1128/jvi.00984-07

KUTÁ SMATANOVÁ, Ivana. Krystalizace biologických makromolekul. Krystalografická společnost: Czech and Slovak Crystallographic Association (CSCA) [online]. [cit. 2023-01-30]. Dostupné z: <http://www.xray.cz/kryst/difrakce/iva/krystalizace.htm>

MARTINEZ-COSTAS, Jose, Rubén VARELA a Javier BENAVENTE, 1995. *Endogenous enzymatic activities of the avian reovirus S1133: Identification of the viral capping enzyme* [online]. 1995. ISSN 00426822. Dostupné z: doi:10.1006/viro.1995.1024

MCPHERSON, A, 1999. *Crystallization of Biological Macromolecules*; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor. New York, USA,

MCPHERSON, Alexander, 2004. Introduction to protein crystallization. *Methods* [online]. **34**(3), 254–265. ISSN 10462023. Dostupné z: doi:10.1016/j.ymeth.2004.03.019

MERTENS, Peter, 2004. The dsRNA viruses. *Virus Research* [online]. **101**(1), 3–13. ISSN 01681702. Dostupné z: doi:10.1016/j.virusres.2003.12.002

NICHOLDS, Jenny, 2020. Normal vs affected tendons in poultry with viral arthritis. In: *MSD Manual: Veterinary Manual* [online]. [cit. 2022-12-20]. Dostupné z: <https://www.msdsmanual.com/poultry/viral-arthritis/viral-arthritis-in-poultry>

PCR Using Q5® High-Fidelity DNA Polymerase. New England Biolabs [online]. England, 13.12.2013 [cit. 2023-04-06]. Dostupné z:

<https://international.neb.com/protocols/2013/12/13/pcr-using-q5-high-fidelity-dna-polymerase-m0491>

PESAVENTO, J. B., S. E. CRAWFORD, M. K. ESTES a B. V. VENKATARAM PRASAD, 2006. Rotavirus proteins: Structure and assembly. *Current Topics in Microbiology and Immunology* [online]. **309**, 189–219. ISSN 0070217X. Dostupné z: doi:10.1007/3-540-30773-7_7

PITCOVSKI, Jacob a Sagar M GOYAL, 2020. Avian Reovirus Infections - Introduction - History - Etiology. 382–400.

PITCOVSKI, Jacob a Sagar M. GOYAL, 2019. Avian reovirus infections. *Diseases of Poultry* [online]. **19**(2), 382–400. ISSN 0253-1933. Dostupné z: doi:10.1002/9781119371199.ch11

RAJKOWITSCH, Lukas, Doris CHEN, Sabine STAMPFL, Katharina SEMRAD, Christina WALDSICH, Oliver MAYER, Michael F. JANTSCH, Robert KONRAT, Udo BLÄSI a Renée SCHROEDER, 2007. RNA chaperones, RNA annealers and RNA helicases. *RNA Biology* [online]. **4**(3), 118–130. ISSN 15558584. Dostupné z: doi:10.4161/rna.4.3.5445

ROSENBERGER, J. K., F. J. STERNER, S. BOTTS, K. P. LEE a A. MARGOLIN, 1989. In vitro and in vivo characterization of avian reoviruses. I. Pathogenicity and antigenic relatedness of several avian reovirus isolates. *Avian diseases* [online]. **33**(3), 535–544. ISSN 00052086. Dostupné z: doi:10.2307/1591118

TARAPOREWALA, Zenobia, Dayue CHEN a John T. PATTON, 1999. Multimers Formed by the Rotavirus Nonstructural Protein NSP2 Bind to RNA and Have Nucleoside Triphosphatase Activity. *Journal of Virology* [online]. **73**(12), 9934–9943. ISSN 0022-538X. Dostupné z: doi:10.1128/jvi.73.12.9934-9943.1999

TOURIS-OTERO, Fernando, José MARTÍNEZ-COSTAS, Vikram N. VAKHARIA a Javier BENAVENTE, 2004. Avian reovirus nonstructural protein μ NS forms viroplasm-like inclusions and recruits protein σ NS to these structures. *Virology* [online]. **319**(1), 94–106. ISSN 00426822. Dostupné z: doi:10.1016/j.virol.2003.10.034

TOURÍS-OTERO, Fernando, José MARTÍNEZ-COSTAS, Vikram N. VAKHARIA a Javier BENAVENTE, 2005. Characterization of the nucleic acid-binding activity of the avian reovirus non-structural protein σ NS. *Journal of General Virology* [online]. **86**(4), 1159–1169. ISSN 00221317. Dostupné z: doi:10.1099/vir.0.80491-0

VARELA, R, J MARTÍNEZ-COSTAS, M MALLO a J BENAVENTE, 1996. Intracellular posttranslational modifications of S1133 avian reovirus proteins. *Journal of Virology* [online]. **70**(5), 2974–2981. ISSN 0022-538X. Dostupné z: doi:10.1128/jvi.70.5.2974-2981.1996

XIONG, Sheng, Ling ZHANG a Qing Yu HE, 2008. Fractionation of proteins by heparin chromatography. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* [online]. **424**, 213–221. ISSN 10643745. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-60327-064-9_18

YIN, Hsien Sheng a Long Huw LEE, 2000. Characterization of avian reovirus non structural protein σ NS synthesized in *Escherichia coli*. *Virus Research* [online]. **67**(1), 1–9. ISSN 01681702. Dostupné z: doi:10.1016/S0168-1702(00)00122-2

ZHANG, Xing, Jinghua TANG, Stephen B. WALKER, David O'HARA, Max L. NIBERT, Roy DUNCAN a Timothy S. BAKER, 2005. Structure of avian orthoreovirus virion by electron cryomicroscopy and image reconstruction. *Virology* [online]. **343**(1), 25–35. ISSN 00426822. Dostupné z: doi:10.1016/j.virol.2005.08.002

10 Přílohy

Příloha č. 1: Seznam činidel sady PCT Pre-Crystallization Test

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

Příloha č. 2: Seznam krystalizačních podmínek pro sadu Morpheus II

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	Divalentes II	0.1 M	Buffer System 4	6.5	36 % v/v	Precipitant Mix 5
1-14	B2	2 mM	Divalentes II	0.1 M	Buffer System 4	6.5	32.5 % v/v	Precipitant Mix 6
1-15	B3	2 mM	Divalentes II	0.1 M	Buffer System 4	6.5	30 % v/v	Precipitant Mix 7
1-16	B4	2 mM	Divalentes II	0.1 M	Buffer System 4	6.5	31 % v/v	Precipitant Mix 8
1-17	B5	2 mM	Divalentes II		none		36 % v/v	Precipitant Mix 5
1-18	B6	2 mM	Divalentes II		none		32.5 % v/v	Precipitant Mix 6
1-19	B7	2 mM	Divalentes II		none		30 % v/v	Precipitant Mix 7
1-20	B8	2 mM	Divalentes II		none		31 % v/v	Precipitant Mix 8
1-21	B9	2 mM	Divalentes II	0.1 M	Buffer System 6	8.5	36 % v/v	Precipitant Mix 5
1-22	B10	2 mM	Divalentes II	0.1 M	Buffer System 6	8.5	32.5 % v/v	Precipitant Mix 6
1-23	B11	2 mM	Divalentes II	0.1 M	Buffer System 6	8.5	30 % v/v	Precipitant Mix 7
1-24	B12	2 mM	Divalentes 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	DB	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

Příloha č. 3: Seznam krystalizačních podmínek pro sadu SG1

Tube #	Conc. Salt1	Conc. Salt2	Conc. Buffer	pH	Conc. Precipitant1	Conc. Precipitant2
1-1	0.2 M Magnesium chloride hexahydrate		0.1 M Tris	8.5	30 % w/v PEG 4000	
1-2	2.0 M Ammonium sulfate					
1-3	0.2 M Sodium acetate trihydrate				20 % w/v PEG 3350	
1-4	2.0 M Ammonium sulfate		0.1 M Tris	8.5		
1-5	0.2 M Sodium citrate tribasic dihydrate				20 % w/v PEG 3350	
1-6			0.1 M Sodium HEPES	7.5	20 % w/v PEG 4000	10 % v/v 2-Propanol
1-7	2.0 M Ammonium sulfate		0.1 M Sodium HEPES	7.5	2 % v/v PEG 400	
1-8	1.4 M Sodium citrate tribasic dihydrate		0.1 M Sodium HEPES	7.5		
1-9	0.2 M Sodium acetate trihydrate		0.1 M Tris	8.5	30 % w/v PEG 4000	
1-10	0.2 M Lithium sulfate		0.1 M Tris	8.5	30 % w/v PEG 4000	
1-11	4.0 M Sodium formate					
1-12	0.2 M Magnesium acetate tetrahydrate		0.1 M Sodium cacodylate	6.5	20 % w/v PEG 8000	
1-13			0.1 M Bis-Tris	5.5	25 % w/v PEG 3350	
1-14			0.1 M MES	6.5	12 % w/v PEG 20000	
1-15	0.2 M Magnesium chloride hexahydrate		0.1 M Bis-Tris	5.5	25 % w/v PEG 3350	
1-16	0.2 M Ammonium sulfate		0.1 M MES	6.5	30 % w/v PEG 5000 MME	
1-17	0.2 M Calcium chloride dihydrate				20 % w/v PEG 3350	
1-18			0.1 M Sodium HEPES	7.5	20 % w/v PEG 10000	
1-19	0.2 M Sodium formate				20 % w/v PEG 3350	
1-20	0.2 M Ammonium sulfate		0.1 M Bis-Tris	5.5	25 % w/v PEG 3350	
1-21	1.6 M Sodium citrate tribasic dihydrate					
1-22	0.2 M Calcium chloride dihydrate		0.1 M Sodium HEPES	7.5	28 % v/v PEG 400	
1-23	0.2 M Ammonium chloride				20 % w/v PEG 3350	
1-24	0.2 M Magnesium formate dihydrate				20 % w/v PEG 3350	
1-25	0.2 M Ammonium sulfate		0.1 M Sodium acetate	4.6	25 % w/v PEG 4000	
1-26	1.4 M Sodium malonate dibasic monohydrate pH 7.0					
1-27	0.2 M Lithium sulfate		0.1 M Bis-Tris	5.5	25 % w/v PEG 3350	
1-28	0.2 M Potassium sodium tartrate tetrahydrate				20 % w/v PEG 3350	
1-29	0.2 M Ammonium sulfate		0.1 M Sodium cacodylate	6.5	30 % w/v PEG 8000	
1-30	2.0 M Ammonium sulfate		0.1 M Sodium acetate	4.6		
1-31			0.1 M Sodium HEPES	7.5	25 % w/v PEG 3350	
1-32	0.2 M Magnesium chloride hexahydrate		0.1 M Bis-Tris	6.5	25 % w/v PEG 3350	
1-33	0.2 M Magnesium chloride hexahydrate		0.1 M Tris	8.5	25 % w/v PEG 3350	
1-34	0.2 M Magnesium chloride hexahydrate		0.1 M Sodium HEPES	7.5	25 % w/v PEG 3350	
1-35	0.2 M Sodium acetate trihydrate		0.1 M Sodium cacodylate	6.5	30 % w/v PEG 8000	
1-36	0.2 M Sodium acetate trihydrate		0.1 M Bis-Tris	5.5	25 % w/v PEG 3350	
1-37	1.5 M Lithium sulfate		0.1 M Sodium HEPES	7.5		
1-38			0.1 M Sodium citrate	5.5	20 % w/v PEG 3000	
1-39					25 % w/v PEG 1500	
1-40	0.2 M Potassium thiocyanate				20 % w/v PEG 3350	
1-41	0.2 M Sodium acetate trihydrate		0.1 M Sodium cacodylate	6.5	18 % w/v PEG 8000	
1-42	0.2 M Lithium sulfate		0.1 M Sodium HEPES	7.5	25 % w/v PEG 3350	
1-43	0.2 M Ammonium sulfate				30 % w/v PEG 8000	
1-44			0.1 M Bis-Tris	6.5	20 % w/v PEG 5000 MME	
1-45	0.2 M Ammonium sulfate		0.1 M Sodium acetate	4.6	30 % w/v PEG 2000 MME	
1-46	0.2 M Lithium sulfate		0.1 M Bis-Tris	6.5	25 % w/v PEG 3350	
1-47			0.1 M Sodium acetate	4.6	8 % w/v PEG 4000	
1-48	2.0 M Ammonium sulfate		0.1 M Bis-Tris	6.5		

Tube #	Conc. Salt1	Conc. Salt2	Conc. Buffer	pH	Conc. Precipitant1
2-1	2.0 M Ammonium sulfate		0.1 M Bis-Tris	5.5	
2-2					25 % w/v PEG 3350
2-3	0.2 M Magnesium chloride hexahydrate		0.1 M Sodium HEPES	7.5	30 % v/v PEG 400
2-4	2.0 M Ammonium sulfate		0.1 M Sodium HEPES	7.5	
2-5	3.5 M Sodium formate				
2-6	1.6 M Magnesium sulfate heptahydrate		0.1 M MES	6.5	
2-7	0.2 M Magnesium chloride hexahydrate				20 % w/v PEG 3350
2-8	0.2 M Ammonium sulfate				30 % w/v PEG 4000
2-9	0.1 M Potassium thiocyanate				30 % w/v PEG 2000 MME
2-10	0.2 M Sodium malonate dibasic monohydrate pH7				20 % w/v PEG 3350
2-11	2.0 M Sodium formate		0.1 M Sodium acetate	4.6	
2-12	0.2 M Ammonium sulfate		0.1 M Sodium HEPES	7.5	25 % w/v PEG 3350
2-13	0.2 M Potassium sodium tartrate tetrahydrate	2.0 M Ammonium sulfate	0.1 M Sodium citrate	5.6	
2-14	0.2 M Sodium acetate trihydrate		0.1 M Sodium HEPES	7.5	25 % w/v PEG 3350
2-15	0.2 M Ammonium sulfate				20 % w/v PEG 3350
2-16	1.0 M Sodium citrate tribasic dihydrate		0.1 M Sodium cacodylate	6.5	
2-17	0.2 M Ammonium sulfate		0.1 M Bis-Tris	6.5	25 % w/v PEG 3350
2-18	0.2 M Ammonium nitrate				20 % w/v PEG 3350
2-19	0.2 M Sodium thiocyanate				20 % w/v PEG 3350
2-20	0.2 M Potassium nitrate				20 % w/v PEG 3350
2-21			0.1 M Sodium HEPES	7.5	20 % w/v PEG 8000
2-22	0.2 M Magnesium acetate tetrahydrate				20 % w/v PEG 3350
2-23			0.1 M Bis-Tris	6.5	25 % w/v PEG 3350
2-24	0.02 M Calcium chloride dihydrate		0.1 M Sodium acetate	4.6	30 % v/v MPD
2-25	0.2 M Sodium acetate trihydrate		0.1 M MES	6.0	20 % w/v PEG 8000
2-26	0.2 M Sodium sulfate				20 % w/v PEG 3350
2-27	0.01 M Zinc sulfate heptahydrate		0.1 M MES	6.5	25 % v/v PEG 550 MME
2-28	0.2 M Sodium tartrate dibasic dihydrate				20 % w/v PEG 3350
2-29					60 % v/v T-mate pH 7.0
2-30	0.5 M Ammonium sulfate	1.0 M Lithium sulfate	0.1 M Sodium citrate	5.6	
2-31					30 % w/v PEG 1500
2-32	0.2 M Magnesium chloride hexahydrate		0.1 M Tris	8.5	20 % w/v PEG 8000
2-33	0.2 M Ammonium tartrate dibasic				20 % w/v PEG 3350
2-34	0.2 M Sodium fluoride				20 % w/v PEG 3350
2-35	0.2 M Sodium chloride	2.0 M Ammonium sulfate	0.1 M Sodium cacodylate	6.5	
2-36	0.1 M Sodium chloride	1.6 M Ammonium sulfate	0.1 M Sodium HEPES	7.5	
2-37	0.2 M Ammonium formate				20 % w/v PEG 3350
2-38	0.2 M Lithium citrate tribasic tetrahydrate				20 % w/v PEG 3350
2-39	0.2 M Ammonium iodide				20 % w/v PEG 3350
2-40	0.2 M Sodium acetate trihydrate		0.1 M Bis-Tris	6.5	25 % w/v PEG 3350
2-41					30 % w/v PEG 4000
2-42			0.1 M Tris	8.5	25 % w/v PEG 3350
2-43	0.2 M Ammonium fluoride				20 % w/v PEG 3350
2-44	0.1 M Sodium acetate trihydrate		0.1 M Bis-Tris	5.5	17 % w/v PEG 10000
2-45	0.2 M Sodium acetate trihydrate		0.1 M Imidazole	8.0	10 % w/v PEG 8000
2-46	0.2 M Ammonium sulfate		0.1 M Tris	8.5	25 % w/v PEG 3350
2-47			0.1 M CHES	9.0	20 % w/v PEG 8000
2-48	4.3 M Sodium chloride		0.1 M Sodium HEPES	7.5	

Příloha č. 4: Seznam krystalizačních podmínek pro sadu LFS

Well #	Tube #	Conc.	Buffer	Conc.	Salt	Conc.	Precipitant 1	Conc.	Precipitant 2
A1	1-1	0.1 M	SPG pH 6			30 % w/v	PEG 1000		
A2	1-2	0.1 M	SPG pH 7			30 % w/v	PEG 1000		
A3	1-3	0.1 M	SPG pH 8			30 % w/v	PEG 1000		
A4	1-4	0.1 M	SPG pH 6			55 % v/v	MPD		
A5	1-5	0.1 M	SPG pH 7			55 % v/v	MPD		
A6	1-6	0.1 M	SPG pH 8			55 % v/v	MPD		
A7	1-7			0.2 M	Sodium chloride	20 % w/v	PEG 6000	10 % v/v	Ethylene glycol
A8	1-8			0.2 M	Ammonium chloride	20 % w/v	PEG 6000	10 % v/v	Ethylene glycol
A9	1-9			0.2 M	Lithium chloride	20 % w/v	PEG 6000	10 % v/v	Ethylene glycol
A10	1-10			0.1 M	Magnesium chloride hexahydrate	20 % w/v	PEG 6000	10 % v/v	Ethylene glycol
A11	1-11			0.1 M	Calcium chloride dihydrate	20 % w/v	PEG 6000	10 % v/v	Ethylene glycol
A12	1-12			0.01 M	Zinc chloride	20 % w/v	PEG 6000	10 % v/v	Ethylene glycol
B1	1-13	0.1 M	MIB pH 6			30 % w/v	PEG 1000		
B2	1-14	0.1 M	MIB pH 7			30 % w/v	PEG 1000		
B3	1-15	0.1 M	MIB pH 8			30 % w/v	PEG 1000		
B4	1-16	0.1 M	MIB pH 6			55 % v/v	MPD		
B5	1-17	0.1 M	MIB pH 7			55 % v/v	MPD		
B6	1-18	0.1 M	MIB pH 8			55 % v/v	MPD		
B7	1-19	0.1 M	MES pH 6	0.2 M	Sodium chloride	20 % w/v	PEG 6000	10 % v/v	Ethylene glycol
B8	1-20	0.1 M	MES pH 6	0.2 M	Ammonium chloride	20 % w/v	PEG 6000	10 % v/v	Ethylene glycol
B9	1-21	0.1 M	MES pH 6	0.2 M	Lithium chloride	20 % w/v	PEG 6000	10 % v/v	Ethylene glycol
B10	1-22	0.1 M	MES pH 6	0.1 M	Magnesium chloride hexahydrate	20 % w/v	PEG 6000	10 % v/v	Ethylene glycol
B11	1-23	0.1 M	MES pH 6	0.1 M	Calcium chloride dihydrate	20 % w/v	PEG 6000	10 % v/v	Ethylene glycol
B12	1-24	0.1 M	MES pH 6	0.01 M	Zinc chloride	20 % w/v	PEG 6000	10 % v/v	Ethylene glycol
C1	1-25	0.1 M	PCTP pH 6			30 % w/v	PEG 1000		
C2	1-26	0.1 M	PCTP pH 7			30 % w/v	PEG 1000		
C3	1-27	0.1 M	PCTP pH 8			30 % w/v	PEG 1000		
C4	1-28	0.1 M	PCTP pH 6			60 % v/v	MPD		
C5	1-29	0.1 M	PCTP pH 7			60 % v/v	MPD		
C6	1-30	0.1 M	PCTP pH 8			60 % v/v	MPD		
C7	1-31	0.1 M	HEPES pH 7	0.2 M	Sodium chloride	20 % w/v	PEG 6000	10 % v/v	Ethylene glycol
C8	1-32	0.1 M	HEPES pH 7	0.2 M	Ammonium chloride	20 % w/v	PEG 6000	10 % v/v	Ethylene glycol
C9	1-33	0.1 M	HEPES pH 7	0.2 M	Lithium chloride	20 % w/v	PEG 6000	10 % v/v	Ethylene glycol
C10	1-34	0.1 M	HEPES pH 7	0.1 M	Magnesium chloride hexahydrate	20 % w/v	PEG 6000	10 % v/v	Ethylene glycol
C11	1-35	0.1 M	HEPES pH 7	0.1 M	Calcium chloride dihydrate	20 % w/v	PEG 6000	10 % v/v	Ethylene glycol
C12	1-36	0.1 M	HEPES pH 7	0.01 M	Zinc chloride	20 % w/v	PEG 6000	10 % v/v	Ethylene glycol
D1	1-37	0.1 M	MMT pH 6			30 % w/v	PEG 1000		
D2	1-38	0.1 M	MMT pH 7			30 % w/v	PEG 1000		
D3	1-39	0.1 M	MMT pH 8			30 % w/v	PEG 1000		
D4	1-40	0.1 M	MMT pH 6			60 % v/v	MPD		
D5	1-41	0.1 M	MMT pH 7			60 % v/v	MPD		
D6	1-42	0.1 M	MMT pH 8			60 % v/v	MPD		
D7	1-43	0.1 M	tris pH 7.5	0.2 M	Sodium chloride	20 % w/v	PEG 6000	10 % v/v	Ethylene glycol
D8	1-44	0.1 M	tris pH 7.5	0.2 M	Ammonium chloride	20 % w/v	PEG 6000	10 % v/v	Ethylene glycol
D9	1-45	0.1 M	tris pH 7.5	0.2 M	Lithium chloride	20 % w/v	PEG 6000	10 % v/v	Ethylene glycol
D10	1-46	0.1 M	tris pH 7.5	0.1 M	Magnesium chloride hexahydrate	20 % w/v	PEG 6000	10 % v/v	Ethylene glycol
D11	1-47	0.1 M	tris pH 7.5	0.1 M	Calcium chloride dihydrate	20 % w/v	PEG 6000	10 % v/v	Ethylene glycol
D12	1-48	0.1 M	tris pH 7.5	0.01 M	Zinc chloride	20 % w/v	PEG 6000	10 % v/v	Ethylene glycol

Well #	Tube #	Conc.	Buffer	Conc.	Salt	Conc.	Precipitant	Conc.	Precipitant 2
E1	2-1			0.2 M	Sodium fluoride	20 % w/v	PEG 3350	10 % v/v	Ethylene glycol
E2	2-2			0.2 M	Sodium bromide	20 % w/v	PEG 3350	10 % v/v	Ethylene glycol
E3	2-3			0.2 M	Sodium iodide	20 % w/v	PEG 3350	10 % v/v	Ethylene glycol
E4	2-4			0.2 M	Potassium thiocyanate	20 % w/v	PEG 3350	10 % v/v	Ethylene glycol
E5	2-5			0.2 M	Sodium nitrate	20 % w/v	PEG 3350	10 % v/v	Ethylene glycol
E6	2-6			0.2 M	Sodium formate	20 % w/v	PEG 3350	10 % v/v	Ethylene glycol
E7	2-7			0.2 M	Sodium acetate trihydrate	20 % w/v	PEG 3350	10 % v/v	Ethylene glycol
E8	2-8			0.2 M	Sodium sulfate	20 % w/v	PEG 3350	10 % v/v	Ethylene glycol
E9	2-9			0.2 M	Potassium sodium tartrate tetrahydrate	20 % w/v	PEG 3350	10 % v/v	Ethylene glycol
E10	2-10			0.02 M	sodium potassium phosphate pH 7.5	20 % w/v	PEG 3350	10 % v/v	Ethylene glycol
E11	2-11			0.2 M	Potassium citrate tribasic monohydrate	20 % w/v	PEG 3350	10 % v/v	Ethylene glycol
E12	2-12			0.2 M	Sodium malonate dibasic monohydrate	20 % w/v	PEG 3350	10 % v/v	Ethylene glycol
F1	2-13	0.1 M	Bis Tris Propane pH 6.5	0.2 M	Sodium fluoride	20 % w/v	PEG 3350	10 % v/v	Ethylene glycol
F2	2-14	0.1 M	Bis Tris Propane pH 6.5	0.2 M	Sodium bromide	20 % w/v	PEG 3350	10 % v/v	Ethylene glycol
F3	2-15	0.1 M	Bis Tris Propane pH 6.5	0.2 M	Sodium iodide	20 % w/v	PEG 3350	10 % v/v	Ethylene glycol
F4	2-16	0.1 M	Bis Tris Propane pH 6.5	0.2 M	Potassium thiocyanate	20 % w/v	PEG 3350	10 % v/v	Ethylene glycol
F5	2-17	0.1 M	Bis Tris Propane pH 6.5	0.2 M	Sodium nitrate	20 % w/v	PEG 3350	10 % v/v	Ethylene glycol
F6	2-18	0.1 M	Bis Tris Propane pH 6.5	0.2 M	Sodium formate	20 % w/v	PEG 3350	10 % v/v	Ethylene glycol
F7	2-19	0.1 M	Bis Tris Propane pH 6.5	0.2 M	Sodium acetate trihydrate	20 % w/v	PEG 3350	10 % v/v	Ethylene glycol
F8	2-20	0.1 M	Bis Tris Propane pH 6.5	0.2 M	Sodium sulfate	20 % w/v	PEG 3350	10 % v/v	Ethylene glycol
F9	2-21	0.1 M	Bis Tris Propane pH 6.5	0.2 M	Potassium sodium tartrate tetrahydrate	20 % w/v	PEG 3350	10 % v/v	Ethylene glycol
F10	2-22	0.1 M	Bis Tris Propane pH 6.5	0.02 M	Sodium potassium phosphate pH 7.5	20 % w/v	PEG 3350	10 % v/v	Ethylene glycol
F11	2-23	0.1 M	Bis Tris Propane pH 6.5	0.2 M	Potassium citrate tribasic monohydrate	20 % w/v	PEG 3350	10 % v/v	Ethylene glycol
F12	2-24	0.1 M	Bis Tris Propane pH 6.5	0.2 M	Sodium malonate dibasic monohydrate	20 % w/v	PEG 3350	10 % v/v	Ethylene glycol
G1	2-25	0.1 M	Bis Tris Propane pH 7.5	0.2 M	Sodium fluoride	20 % w/v	PEG 3350	10 % v/v	Ethylene glycol
G2	2-26	0.1 M	Bis Tris Propane pH 7.5	0.2 M	Sodium bromide	20 % w/v	PEG 3350	10 % v/v	Ethylene glycol
G3	2-27	0.1 M	Bis Tris Propane pH 7.5	0.2 M	Sodium iodide	20 % w/v	PEG 3350	10 % v/v	Ethylene glycol
G4	2-28	0.1 M	Bis Tris Propane pH 7.5	0.2 M	Potassium thiocyanate	20 % w/v	PEG 3350	10 % v/v	Ethylene glycol
G5	2-29	0.1 M	Bis Tris Propane pH 7.5	0.2 M	Sodium nitrate	20 % w/v	PEG 3350	10 % v/v	Ethylene glycol
G6	2-30	0.1 M	Bis Tris Propane pH 7.5	0.2 M	Sodium formate	20 % w/v	PEG 3350	10 % v/v	Ethylene glycol
G7	2-31	0.1 M	Bis Tris Propane pH 7.5	0.2 M	Sodium acetate trihydrate	20 % w/v	PEG 3350	10 % v/v	Ethylene glycol
G8	2-32	0.1 M	Bis Tris Propane pH 7.5	0.2 M	Sodium sulfate	20 % w/v	PEG 3350	10 % v/v	Ethylene glycol
G9	2-33	0.1 M	Bis Tris Propane pH 7.5	0.2 M	Potassium sodium tartrate tetrahydrate	20 % w/v	PEG 3350	10 % v/v	Ethylene glycol
G10	2-34	0.1 M	Bis Tris Propane pH 7.5	0.02 M	Sodium potassium phosphate pH 7.5	20 % w/v	PEG 3350	10 % v/v	Ethylene glycol
G11	2-35	0.1 M	Bis Tris Propane pH 7.5	0.2 M	Potassium citrate tribasic monohydrate	20 % w/v	PEG 3350	10 % v/v	Ethylene glycol
G12	2-36	0.1 M	Bis Tris Propane pH 7.5	0.2 M	Sodium malonate dibasic monohydrate	20 % w/v	PEG 3350	10 % v/v	Ethylene glycol
H1	2-37	0.1 M	Bis Tris Propane pH 8.5	0.2 M	Sodium fluoride	20 % w/v	PEG 3350	10 % v/v	Ethylene glycol
H2	2-38	0.1 M	Bis Tris Propane pH 8.5	0.2 M	Sodium bromide	20 % w/v	PEG 3350	10 % v/v	Ethylene glycol
H3	2-39	0.1 M	Bis Tris Propane pH 8.5	0.2 M	Sodium iodide	20 % w/v	PEG 3350	10 % v/v	Ethylene glycol
H4	2-40	0.1 M	Bis Tris Propane pH 8.5	0.2 M	Potassium thiocyanate	20 % w/v	PEG 3350	10 % v/v	Ethylene glycol
H5	2-41	0.1 M	Bis Tris Propane pH 8.5	0.2 M	Sodium nitrate	20 % w/v	PEG 3350	10 % v/v	Ethylene glycol
H6	2-42	0.1 M	Bis Tris Propane pH 8.5	0.2 M	Sodium formate	20 % w/v	PEG 3350	10 % v/v	Ethylene glycol
H7	2-43	0.1 M	Bis Tris Propane pH 8.5	0.2 M	Sodium acetate trihydrate	20 % w/v	PEG 3350	10 % v/v	Ethylene glycol
H8	2-44	0.1 M	Bis Tris Propane pH 8.5	0.2 M	Sodium sulfate	20 % w/v	PEG 3350	10 % v/v	Ethylene glycol
H9	2-45	0.1 M	Bis Tris Propane pH 8.5	0.2 M	Potassium sodium tartrate tetrahydrate	20 % w/v	PEG 3350	10 % v/v	Ethylene glycol
H10	2-46	0.1 M	Bis Tris Propane pH 8.5	0.02 M	Sodium potassium phosphate pH 8.5	20 % w/v	PEG 3350	10 % v/v	Ethylene glycol
H11	2-47	0.1 M	Bis Tris Propane pH 8.5	0.2 M	Potassium citrate tribasic monohydrate	20 % w/v	PEG 3350	10 % v/v	Ethylene glycol
H12	2-48	0.1 M	Bis Tris Propane pH 8.5	0.2 M	Sodium malonate dibasic monohydrate	20 % w/v	PEG 3350	10 % v/v	Ethylene glycol

Příloha č. 5: Seznam krystalizačních podmínek pro sadu MemGold

Tube #	Conc. Salt	Conc. Buffer	pH	Conc.	Precipitant
1-1	2.2 M Ammonium sulfate	0.08 M Sodium citrate	5.2		
1-2	1.2 M Sodium citrate tribasic dihydrate	0.01 M Tris	8.0		
1-3		0.015 M Thioine	8.5	24 % w/v	PEG 4000
1-4	0.36 M Sodium chloride	0.015 M Sodium phosphate	7.0	9.9 % w/v	PEG 4000
				0.1 % w/v	Sodium azide
1-5	0.3 M Sodium chloride	0.01 M Tris	8.0	27.5 % w/v	PEG 4000
1-6	0.1 M Ammonium sulfate	0.225 M MES/HEPES-Tris	6.6	6.6 % w/v	PEG 6000
		0.1 M HEPES	7.5	12 % w/v	PEG 4000
				22 % v/v	Glycerol
1-8	0.01 M Magnesium sulfate heptahydrate	0.02 M MES	6.5	7.7 % w/v	PEG 1500
	0.02 M Sodium chloride				
1-9	0.02 M Calcium chloride dihydrate	0.05 M HEPES	7.5		
1-10	2.5 M Ammonium sulfate	0.0665 M HEPES	7.5		
1-11	1.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate	0.15 M Potassium phosphate	6.5		
	3.3 M Ammonium sulfate				
1-12	0.1 M Magnesium acetate tetrahydrate	0.1 M Sodium citrate	5.8	14 % w/v	PEG 5000 (MME)
1-13	0.1 M Sodium chloride	0.02 M Sodium citrate	5.6	11 % w/v	PEG 3350
1-14	0.1 M Sodium chloride	0.02 M Sodium citrate	5.6	5.5 % w/v	PEG 3350
1-15	0.05 M Calcium chloride dihydrate	0.1 M Tris	8.2	32 % v/v	PEG 400
	0.05 M Barium chloride dihydrate				
1-16	0.05 M Sodium chloride	0.1 M Sodium phosphate	6.2	16 % w/v	PEG 4000
1-17	0.1 M Magnesium chloride hexahydrate	0.09 M Tris-HCl	8.2	19 % w/v	PEG 4000
1-18	0.2 M Sodium chloride	0.025 M HEPES	7.5	13 % w/v	PEG 4000
1-19		0.1 M HEPES	7.5	11 % w/v	PEG 3350
1-20	0.1 M Sodium chloride	0.02 M DMES	6.7	6.6 % w/v	PEG 4000
1-21	0.1 M Potassium chloride	0.02 M Tris	7.0	20 % w/v	PEG 4000
1-22	0.05 M Magnesium chloride hexahydrate	0.1 M Sodium cacodylate	6.7	6.6 % w/v	PEG 3350
		0.1 % w/v Sodium azide			
1-23	0.2 M Potassium chloride	0.1 M Sodium citrate	5.5	37 % v/v	Pentamerfthitol propoxyfate (5/4 PO/PH)
1-24		0.1 M Tris	8.0	5.5 % w/v	PEG 4000
1-25	0.1 M Sodium chloride	0.02 M Tris	7.0	7.7 % w/v	PEG 4000
1-26	0.1 M Magnesium chloride hexahydrate	0.1 M Tris	7.5	22 % v/v	PEG 400
1-27	0.04 M Sodium chloride	0.04 M Tris	8.0	27 % v/v	PEG 350 MME
1-28	0.05 M Sodium chloride	0.1 M Sodium citrate	6.0	22 % v/v	PEG 400
	0.02 M Magnesium chloride hexahydrate				
1-29		0.1 M Sodium acetate	5.5	8.8 % w/v	PEG 2000 (MME)
1-30		0.4 M Ammonium acetate	8.0	13 % w/v	PEG 2000 (MME)
1-31		0.02 M Bis-Tris	7.0	15 % w/v	PEG 2000
1-32	0.1 M Sodium chloride	0.02 M Tris	7.5	11 % w/v	PEG 1500
1-33	0.1 M Magnesium chloride hexahydrate	0.1 M HEPES	8.0	11 % w/v	PEG 1500
	0.1 M Sodium chloride				
1-34	0.2 M Sodium acetate trihydrate	0.1 M HEPES	7.0	22 % w/v	PEG 3000
	0.2 M Potassium chloride				
1-35	0.02 M Nickel(II) sulfate hexahydrate	0.01 M HEPES	7.0	33 % v/v	JuTarnissa [®] M-600
1-36	0.15 M Sodium chloride	0.1 M Tris	8.0	13 % w/v	PEG 6000
1-37	0.2 M Calcium chloride dihydrate	0.1 M HEPES	7.5	53 % v/v	PEG 400
1-38	0.05 M Magnesium acetate tetrahydrate	0.05 M Sodium acetate	5.0	28 % v/v	PEG 400
		0.05 M HEPES	7.5	22 % w/v	PEG 4000
1-39		0.1 M Tris-HCl	8.0	44 % v/v	PEG 400
1-40	0.2 M Calcium chloride dihydrate	0.05 M Sodium acetate	5.4	24 % v/v	PEG 400
1-41	0.05 M Magnesium acetate tetrahydrate	0.1 M MES	6.5	26 % v/v	PEG 350 MME
1-42	0.2 M Calcium chloride dihydrate	0.1 M Tris	8.5	39 % v/v	PEG 400
1-43	0.1 M Potassium chloride	0.1 M Glycine	9.0	22 % v/v	PEG 400
1-44	0.05 M Magnesium chloride hexahydrate	0.1 M Glycine	3.8	28 % v/v	Triethylene glycol (TEG)
1-45	0.1 M Ammonium sulfate	0.1 M HEPES	7.2	18 % w/v	PEG 3350
1-46	0.15 M Sodium formate	0.2 M Sodium acetate	6.8	8.8 % w/v	PEG 6000
1-47		0.1 M MES	6.5	18 % w/v	PEG 6000
1-48	0.2 M Potassium chloride				

Tube #	Conc.	Salt	Conc.	Buffer	pH	Conc.	Precipitant
2-1	0.22 M	Sodium citrate tribasic dihydrate	0.1 M	Tris	8.0	35 % v/v	PEG-400
2-2			0.1 M	Sodium acetate	4.5	17 % v/v	PEG-400
2-3	1.0 M	Lithium sulfate	0.02 M	Tris	8.5	1.8 % w/v	PEG 8000
2-4			0.02 M	Tris	7.5	22 % v/v	PEG 500 MME
2-5	0.05 M	Sodium chloride	0.02 M	Glycine	10.0	33 % w/v	PEG 1000
2-6	0.2 M	Magnesium chloride hexahydrate	0.1 M	Tris	8.5	25 % w/v	PEG-4000
2-7	0.2 M	Magnesium chloride hexahydrate	0.1 M	Sodium cacodylate	6.5	31 % w/v	PEG 2000
2-8			0.64 M	Sodium acetate	4.6	18 % w/v	PEG 3350
2-9	0.1 M	Sodium chloride	0.1 M	Tris-HCl	8.0	33 % v/v	PEG-400
	0.1 M	Cadmium chloride hemi(pentahydrate)					
2-10			0.1 M	BICINE	8.9	31 % w/v	PEG 2000
2-11	0.05 M	Sodium sulfate	0.05 M	Tris	8.5	35 % v/v	PEG-400
	0.05 M	Lithium sulfate					
2-12	0.1 M	Sodium chloride	0.05 M	Glycine	9.5	33 % v/v	PEG 300
2-13	0.3 M	Magnesium nitrate hexahydrate	0.1 M	Tris	8.0	23 % w/v	PEG 2000
2-14	0.12 M	Lithium sulfate	0.02 M	Tris	7.5	20 % v/v	PEG 300
			0.1 M	Sodium citrate	5.0		
2-15	0.1 M	Sodium chloride	0.12 M	Tris	9.4	20 % v/v	PEG 400
2-16	0.2 M	Sodium chloride	0.1 M	HEPES	7.0	22 % v/v	PEG 500 MME
2-17	0.1 M	Sodium chloride	0.1 M	Tris	8.0	21 % v/v	PEG-400
	0.325 M	Sodium acetate trihydrate					
2-18	0.02 M	Sodium citrate tribasic dihydrate	0.08 M	Sodium phosphate	6.2	18 % w/v	PEG 2000
2-19	0.02 M	Potassium nitrate	0.03 M	Potassium citrate	6.5	7.7 % w/v	PEG-4000
2-20	0.1 M	Sodium chloride	0.1 M	Tris	8.5	30 % w/v	PEG 2000 MME
	0.005 M	Magnesium chloride hexahydrate					
2-21	0.2 M	Calcium chloride dihydrate	0.1 M	HEPES	7.0	33 % v/v	PEG-400
2-22	0.1 M	Calcium chloride dihydrate	0.1 M	Tris	6.5	13 % w/v	PEG 2000 MME
2-23	0.2 M	Ammonium sulfate	0.02 M	Sodium acetate	4.0	33 % v/v	PEG 200
	0.02 M	Sodium chloride					
2-24	0.07 M	Sodium chloride	0.05 M	Sodium citrate	4.5	22 % v/v	PEG-400
2-25	0.2 M	Ammonium sulfate	0.1 M	Sodium acetate	4.6	28 % v/v	PEG 500 MME
2-26			0.05 M	Glycine	9.0	55 % v/v	PEG-400
2-27	0.1 M	Magnesium chloride hexahydrate	0.1 M	Tris	8.5	33 % v/v	PEG-400
	0.1 M	Sodium chloride					
2-28	0.05 M	Citric acid				19 % w/v	PEG 1000
	0.1 M	Lithium sulfate					
	0.05 M	Sodium phosphate dibasic dihydrate					
2-29	0.2 M	Magnesium chloride hexahydrate	0.025 M	Sodium citrate	4.0	33 % v/v	PEG-400
	0.1 M	Potassium chloride					
2-30	0.05 M	Zinc acetate dihydrate	0.05 M	MES	6.1	11 % w/v	PEG 8000
2-31	0.3 M	Magnesium nitrate hexahydrate	0.1 M	Tris	8.0	22 % w/v	PEG 8000
2-32	0.1 M	Sodium chloride	0.1 M	MES	6.5	33 % v/v	PEG-400
						4 % v/v	Ethylene glycol
2-33	0.05 M	Sodium chloride	0.1 M	Sodium citrate	5.5	26 % v/v	PEG-400
2-34	0.1 M	Lithium sulfate	0.1 M	Glycine	9.3	30 % v/v	PEG-400
2-35	0.15 M	Potassium citrate tribasic monohydrate				22 % w/v	PEG 6000
	0.05 M	Lithium citrate tribasic tetrahydrate					
	0.1 M	Sodium phosphate monobasic monohydrate					
2-36	0.001 M	Zinc sulfate heptahydrate	0.05 M	HEPES	7.8	28 % v/v	PEG 600
2-37	0.1 M	Sodium chloride	0.1 M	Sodium phosphate	7.0	33 % v/v	PEG 300
2-38	0.1 M	Sodium chloride	0.05 M	BICINE	9.0	33 % v/v	PEG 300
2-39	0.05 M	Zinc acetate dihydrate	0.1 M	Sodium cacodylate	6.0	6.6 % w/v	PEG 8000
						6 % v/v	Ethylene glycol
2-40	0.2 M	Lithium sulfate	0.1 M	Sodium citrate	3.5	28 % v/v	PEG-400
2-41	0.1 M	Sodium chloride	0.1 M	Tris	7.5	11 % w/v	PEG-4000
2-42	0.05 M	Lithium sulfate	0.1 M	Tricine	7.4	7 % w/v	PEG 3000
2-43	0.2 M	Calcium chloride dihydrate	0.1 M	MES	6.5	33 % v/v	PEG-400
2-44	1.0 M	Sodium chloride	0.1 M	Sodium citrate	6.0	28 % w/v	PEG-4000
2-45			0.1 M	HEPES	7.5	11 % w/v	PEG-4000
2-46	0.002 M	Zinc sulfate heptahydrate	0.08 M	HEPES	7.0	25 % v/v	Jeffamine® ED-2003
2-47	0.001 M	Cadmium chloride hemi(pentahydrate)	0.1 M	MES	6.5	30 % v/v	PEG-400
	0.03 M	Magnesium chloride hexahydrate					
2-48	3.0 M	Sodium chloride	0.1 M	Bis-Tris propane	7.0		

Příloha č. 6: Seznam krystalizačních podmínek pro sadu MemGold 2

Tube #	Conc.	Salt	Conc.	Salt2	Conc.	Buffer	pH	Conc.	Precipitant
1-1	0.2 M	Magnesium chloride hexahydrate	0.005 M	Cadmium chloride hemi(pentahydrate)	0.1 M	Tris	7.5	14 % w/v	PEG 500 MME
1-2	0.1 M	Potassium acetate	0.01 M	Potassium chloride	0.02 M	Tris	7.0	44 % w/v	PEG 3000
1-3	0.08 M	Magnesium sulfate heptahydrate	0.02 M	Sodium chloride	0.02 M	MES	6.0	10 % w/v	PEG 1450
1-4	0.04 M	Magnesium sulfate heptahydrate	0.02 M	Sodium chloride	0.02 M	MES	6.5	8 % w/v	PEG 1450
1-5	0.05 M	Sodium sulfate	0.05 M	Lithium chloride	0.05 M	Tris	8.5	32 % w/v	PEG 400
1-6	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
1-7	0.1 M	Sodium chloride	0.1 M	Lithium sulfate	0.1 M	ADA	6.5	11.5 % w/v	PEG 4000
1-8	0.1 M	Lithium chloride	0.1 M	Cadmium chloride hemi(pentahydrate)	0.1 M	Sodium acetate	4.5	30 % w/v	PEG 400
1-9	0.2 M	Ammonium sulfate	0.1 M	Sodium chloride	0.1 M	Sodium citrate	6.0	20 % w/v	PEG 2000
1-10	0.2 M	Lithium sulfate	0.1 M	Sodium chloride	0.1 M	HEPES	7.0	31 % w/v	PEG 400
1-11	0.2 M	Ammonium phosphate monobasic	0.1 M	Ammonium sulfate	0.1 M	Sodium citrate	4.5	32 % w/v	PEG 400
1-12	0.05 M	Sodium citrate tribasic dihydrate	0.12 M	Potassium chloride	0.08 M	Bis-Tris	6.0	14 % w/v	PEG 4000
1-13	0.1 M	Sodium chloride	0.15 M	Ammonium sulfate	0.01 M	MES	6.5	19 % w/v	PEG 1000
1-14	0.01 M	Nickel(II) sulfate hexahydrate			0.1 M	Sodium citrate	6.0	18 % w/v	PEG 2000 MME
1-15	0.02 M	Magnesium chloride hexahydrate			0.02 M	MES	6.0	3.5 % w/v	PEG 3350
1-16	0.02 M	Sodium chloride			0.05 M	MES	5.5	14 % w/v	PEG 350 MME
1-17	0.025 M	Magnesium chloride hexahydrate			0.02 M	MOPS	7.0	35 % w/v	PEG 500 MME
1-18	0.03 M	Magnesium chloride hexahydrate			0.1 M	MES	6.5	28 % w/v	PEG 400
1-19	0.04 M	Sodium chloride			0.04 M	Tris	8.0	25 % w/v	PEG 350 MME
1-20	0.04 M	Magnesium acetate tetrahydrate			0.1 M	MES	6.0	36 % w/v	MPD
1-21	0.05 M	Zinc acetate dihydrate			0.05 M	ADA	6.3	11 % w/v	PEG 8000
1-22	0.05 M	Magnesium acetate tetrahydrate			0.1 M	MES	6.5	26 % w/v	PEG 400
1-23	0.05 M	Magnesium acetate tetrahydrate			0.1 M	Glycine	9.5	32 % w/v	PEG 400
1-24	0.066 M	Sodium chloride			0.02 M	Tris	7.5	3 % w/v	PEG 4000
1-25	0.075 M	Magnesium chloride hexahydrate			0.1 M	Sodium cacodylate	6.5	30 % w/v	PEG 2000 MME
1-26	0.08 M	Magnesium acetate tetrahydrate			0.1 M	Sodium citrate	6.0	14 % w/v	PEG 5000 MME
1-27	0.01 M	Zinc acetate dihydrate	1.5 M	Ammonium sulfate	0.1 M	MES	6.0		
1-28	0.087 M	Ammonium sulfate			0.05 M	Tris	7.0	22 % w/v	PEG 250 DME
1-29	0.1 M	Magnesium chloride hexahydrate			0.1 M	Tris	7.5	13 % w/v	PEG 8000
1-30	0.1 M	Magnesium formate dihydrate			0.1 M	MOPS	7.0	17 % w/v	PEG 3350
1-31	0.1 M	Potassium chloride			0.1 M	Bis-Tris	6.0	18 % w/v	PEG 4000
1-32	0.1 M	Potassium chloride			0.1 M	Potassium phosphate	7.5	18 % w/v	PEG 200
1-33	0.1 M	Magnesium acetate tetrahydrate			0.1 M	MES	6.0	22 % w/v	PEG 4000
1-34	0.1 M	Calcium acetate hydrate			0.1 M	MES	6.0	22 % w/v	PEG 8000
1-35	0.1 M	Ammonium sulfate			0.1 M	HEPES	8.5	23 % w/v	PEG 3350
1-36	0.1 M	Potassium chloride			0.1 M	MES	6.0	32 % w/v	PEG 400
1-37	0.1 M	Sodium chloride			0.1 M	MES	6.5	36 % w/v	PEG 300
1-38	0.1 M	Sodium chloride			0.1 M	BICINE	9.0	45 % w/v	PEG 500 MME
1-39	0.15 M	Calcium chloride dihydrate			0.1 M	Glycine	9.0	35 % w/v	PEG 400
1-40	0.2 M	Ammonium sulfate			0.05 M	ADA	6.5	13 % w/v	PEG 4000
1-41	0.2 M	Choline chloride			0.1 M	Tris	7.5	14 % w/v	PEG 2000 MME
1-42	0.2 M	Sodium chloride			0.05 M	MOPS	7.0	19 % w/v	PEG 6000
1-43	0.05 M	Sodium chloride			0.05 M	MOPS	7.0	19 % w/v	PEG 6000
1-44	0.2 M	Magnesium formate dihydrate			0.05 M	Tris	8.0	19 % w/v	PEG 3350
1-45	0.2 M	Calcium chloride dihydrate			0.1 M	MES	5.0	20 % w/v	PEG 350 MME
1-46	0.2 M	Ammonium nitrate			0.05 M	HEPES	7.0	20 % w/v	PEG 3350
1-47	0.02 M	Lithium chloride	0.05 M	Magnesium chloride hexahydrate	0.02 M	Glycine	10.0	33 % w/v	PEG 1000
1-48	0.2 M	Calcium acetate hydrate			0.1 M	HEPES	7.0	24 % w/v	PEG 400

Tube #	Conc.	Salt	Conc.	Salt2	Conc.	Buffer	pH	Conc.	Precipitant
2-1	0.2 M	Sodium acetate trihydrate			0.1 M	MES	6.5	28 % v/v	PEG 400
2-2	0.2 M	Sodium chloride			0.05 M	Calcium acetate	5.0	29 % v/v	PEG 400
2-3	0.2 M	Sodium chloride			0.1 M	HEPES	7.0	29 % v/v	PEG 400
2-4	0.2 M	Ammonium formate			0.1 M	Tris	7.0	31 % v/v	Pentaerythritole ethoxylate (15/4 EO/OH)
2-5	0.2 M	Ammonium sulfate			0.1 M	Tris	8.5	35 % w/v	PEG 3350
2-6	0.2 M	Calcium acetate hydrate			0.1 M	Sodium acetate	5.0	38 % v/v	PEG 400
2-7	0.2 M	Sodium chloride			0.1 M	MOPS	7.5	38 % v/v	PEG 400
2-8	2.0 M	Ammonium sulfate	0.2 M	Sodium chloride	0.1 M	Sodium cacodylate	6.5		
2-9	0.225 M	Ammonium sulfate			0.05 M	Sodium acetate	4.0	12 % w/v	PEG 4000
2-10	0.23 M	Sodium chloride			0.05 M	Sodium acetate	4.5	33 % v/v	PEG 400
2-11	0.25 M	Magnesium formate dihydrate			0.1 M	Sodium cacodylate	6.5	22 % w/v	PEG 3000
2-12	0.25 M	Magnesium chloride hexahydrate			0.1 M	Tris	8.5	40 % w/v	PEG 1000
2-13	0.3 M	Lithium sulfate			0.1 M	MES	6.5	25 % v/v	PEG 400
2-14	0.3 M	Ammonium formate			0.05 M	Tris	9.0	33 % v/v	PEG 500 MME
2-15	0.3 M	Barium chloride dihydrate			0.1 M	MES	6.0	34 % v/v	PEG 400
2-16	0.32 M	Lithium chloride			0.1 M	Sodium citrate	5.5	14 % w/v	PEG 4000
2-17	0.34 M	Ammonium sulfate			0.1 M	Sodium citrate	5.5	12 % w/v	PEG 4000
2-18	0.35 M	Lithium sulfate			0.1 M	Sodium acetate	4.0	11 % v/v	PEG 600
2-19	0.37 M	Potassium nitrate			0.1 M	MES	6.5	22 % v/v	PEG 400
2-20	0.4 M	Ammonium sulfate			0.1 M	MES	6.5	10 % w/v	PEG 3350
2-21	0.04 M	Magnesium chloride hexahydrate	0.05 M	Sodium chloride	0.1 M	HEPES	7.5	32 % v/v	PEG 400
2-22	0.4 M	Potassium chloride			0.05 M	HEPES	7.5	12 % v/v	PEG 400
2-23	0.4 M	Ammonium thiocyanate			0.1 M	Sodium acetate	4.5	15 % w/v	PEG 4000
2-24	0.4 M	Sodium thiocyanate			0.1 M	Sodium acetate	4.0	16 % w/v	PEG 4000
2-25	0.5 M	Potassium chloride			0.05 M	HEPES	6.5	20 % v/v	PEG 400
2-26	0.5 M	Magnesium chloride hexahydrate			0.05 M	Tris	7.5	21 % v/v	PEG 350 MME
2-27	0.8 M	Potassium formate			0.1 M	Sodium acetate	5.0	11 % w/v	PEG 4000
2-28	none				0.1 M	MOPS	7.0	9 % w/v	PEG 8000
2-29	none				0.1 M	MES	6.0	11 % w/v	PEG 20,000
2-30	none				0.1 M	MES	6.5	13 % v/v	PEG 400
2-31	none				0.1 M	ADA	5.5	14 % w/v	PEG 6000
2-32	none				0.05 M	Tris	7.5	17 % v/v	PEG 350 MME
2-33	none				0.07 M	Sodium citrate	4.5	22 % v/v	PEG 300
2-34	none				0.05 M	ADA	6.5	24 % v/v	PEG 400
2-35	none				0.1 M	Sodium cacodylate	6.5	24 % w/v	PEG 1500
2-36	none				0.1 M	HEPES	7.5	28 % v/v	PEG 600
2-37	none				0.05 M	Tris	8.5	28 % v/v	PEG 400
2-38	none				0.1 M	BICINE	9.0	30 % v/v	PEG 400
2-39	none				0.1 M	ADA	7.0	31 % v/v	PEG 600
2-40	none				0.1 M	Tris	8.5	32 % v/v	PEG 500 MME
2-41	none				0.1 M	HEPES	7.5	33 % v/v	PEG 400
2-42	none				0.18 M	Sodium citrate	4.0	34 % w/v	PEG 3350
2-43	none				0.1 M	Tris	8.5	44 % v/v	PEG 200
2-44	none				0.1 M	Tris	8.0	65 % v/v	MPD
2-45	2.75 M	Ammonium chloride			0.025 M	Bis-Tris	7.0		
2-46	2.8 M	Ammonium chloride			0.075 M	HEPES	7.5		
2-47	3.0 M	Ammonium sulfate			0.1 M	MES	5.5		
2-48					0.01 M	HEPES	7.5	3.25 M	1,6-Hexanediol

Příloha č. 7: Seznam krystalizačních podmínek pro sadu JCSG-plus

Tube #	Conc.	Salt	Conc.	Buffer	pH	Conc.	Precipitant
1-1	0.2 M	Lithium sulfate	0.1 M	Sodium acetate	4.5	50 % w/v	PEG 400
1-2		None	0.1 M	Sodium citrate	5.5	20 % w/v	PEG 3000
1-3	0.2 M	Ammonium citrate dibasic		None		20 % w/v	PEG 3350
1-4	0.02 M	Calcium chloride dihydrate	0.1 M	Sodium acetate	4.6	30 % v/v	MPD
1-5	0.2 M	Magnesium formate dihydrate		None		20 % w/v	PEG 3350
1-6	0.2 M	Lithium sulfate	0.1 M	Phosphate/citrate	4.2	20 % w/v	PEG 1000
1-7		None	0.1 M	CHES	9.5	20 % w/v	PEG 8000
1-8	0.2 M	Ammonium formate		None		20 % w/v	PEG 3350
1-9	0.2 M	Ammonium chloride		None		20 % w/v	PEG 3350
1-10	0.2 M	Potassium formate		None		20 % w/v	PEG 3350
1-11	0.2 M	Ammonium phosphate monobasic	0.1 M	Tris	8.5	50 % v/v	MPD
1-12	0.2 M	Potassium nitrate		None		20 % w/v	PEG 3350
1-13	0.8 M	Ammonium sulfate	0.1 M	Citrate	4.0		None
1-14	0.2 M	Sodium thiocyanate		None		20 % w/v	PEG 3350
1-15		None	0.1 M	BICINE	9.0	20 % w/v	PEG 6000
1-16		None	0.1 M	HEPES	7.5	10 % w/v	PEG 8000
						8 % v/v	Ethylene glycol
1-17		None	0.1 M	Sodium cacodylate	6.5	40 % v/v	MPD
						5 % w/v	PEG 8000
1-18		None	0.1 M	Phosphate/citrate	4.2	40 % v/v	Ethanol
						5 % w/v	PEG 1000
1-19		None	0.1 M	Sodium acetate	4.6	8 % w/v	PEG 4000
1-20	0.2 M	Magnesium chloride hexahydrate	0.1 M	Tris	7.0	10 % w/v	PEG 8000
1-21		None	0.1 M	Citrate	5.0	20 % w/v	PEG 6000
1-22	0.2 M	Magnesium chloride hexahydrate	0.1 M	Sodium cacodylate	6.5	50 % v/v	PEG 200
1-23	1.6 M	Sodium citrate tribasic dihydrate pH 6.5		None			None
1-24	0.2 M	Potassium citrate tribasic monohydrate		None		20 % w/v	PEG 3350
1-25	0.2 M	Sodium chloride	0.1 M	Phosphate/citrate	4.2	20 % w/v	PEG 8000
1-26	1.0 M	Lithium chloride	0.1 M	Citrate	4.0	20 % w/v	PEG 6000
1-27	0.2 M	Ammonium nitrate		None		20 % w/v	PEG 3350
1-28		None	0.1 M	HEPES	7.0	10 % w/v	PEG 6000
1-29	0.8 M	Sodium phosphate monobasic monohydrate	0.1 M	Sodium HEPES	7.5		None
	0.80 M	Potassium phosphate monobasic					
1-30		None	0.1 M	Phosphate/citrate	4.2	40 % v/v	PEG 300
1-31	0.2 M	Zinc acetate dihydrate	0.1 M	Sodium acetate	4.5	10 % w/v	PEG 3000
1-32		None	0.1 M	Tris	8.5	20 % v/v	Ethanol
1-33		None	0.1 M	Sodium/potassium phosphate	6.2	25 % v/v	1,2-Propanediol
						10 % v/v	Glycerol
1-34		None	0.1 M	BICINE	9.0	10 % w/v	PEG 20,000
						2 % v/v	1,4-Dioxane
1-35	2.0 M	Ammonium sulfate	0.1 M	Sodium acetate	4.6		None
1-36		None		None		10 % w/v	PEG 1000
						10 % w/v	PEG 8000
1-37		None		None		24 % w/v	PEG 1500
						20 % v/v	Glycerol
1-38	0.2 M	Magnesium chloride hexahydrate	0.1 M	Sodium HEPES	7.5	30 % v/v	PEG 400
1-39	0.2 M	Sodium chloride	0.1 M	Sodium/potassium phosphate	6.2	50 % v/v	PEG 200
1-40	0.2 M	Lithium sulfate	0.1 M	Sodium acetate	4.5	30 % w/v	PEG 8000
1-41		None	0.1 M	HEPES	7.5	70 % v/v	MPD
1-42	0.2 M	Magnesium chloride hexahydrate	0.1 M	Tris	8.5	20 % w/v	PEG 8000
1-43	0.2 M	Lithium sulfate	0.1 M	Tris	8.5	40 % v/v	PEG 400
1-44		None	0.1 M	Tris	8.0	40 % v/v	MPD
1-45	0.17 M	Ammonium sulfate		None		25.5 % w/v	PEG 4000
						15 % v/v	Glycerol
1-46	0.2 M	Calcium acetate hydrate	0.1 M	Sodium cacodylate	6.5	40 % v/v	PEG 300
1-47	0.14 M	Calcium chloride dihydrate	0.07 M	Sodium acetate	4.6	14 % v/v	2-Propanol
						30 % v/v	Glycerol
1-48	0.04 M	Potassium phosphate monobasic		None		16 % w/v	PEG 8000
						20 % v/v	Glycerol

Tube #	Conc.	Salt	Conc.	Buffer	pH	Conc.	Precipitant
2-1	1.0 M	Sodium citrate tribasic dihydrate	0.1 M	Sodium cacodylate	6.5		None
2-2	2.0 M	Ammonium sulfate	0.1 M	Sodium cacodylate	6.5		None
	0.2 M	Sodium chloride					
2-3	0.2 M	Sodium chloride	0.1 M	HEPES	7.5	10 % v/v	2-Propanol
2-4	1.26 M	Ammonium sulfate	0.1 M	Tris	8.5		None
	0.2 M	Lithium sulfate					
2-5		None	0.1 M	CAPS	10.5	40 % v/v	MPD
2-6	0.2 M	Zinc acetate dihydrate	0.1 M	Imidazole	8.0	20 % w/v	PEG 3000
2-7	0.2 M	Zinc acetate dihydrate	0.1 M	Sodium cacodylate	6.5	10 % v/v	2-Propanol
2-8	1.0 M	Ammonium phosphate dibasic	0.1 M	Sodium acetate	4.5		None
2-9	1.6 M	Magnesium sulfate heptahydrate	0.1 M	MES	6.5		None
2-10		None	0.1 M	BICINE	9.0	10 % w/v	PEG 6000
2-11	0.16 M	Calcium acetate hydrate	0.08 M	Sodium cacodylate	6.5	14.4 % w/v	PEG 8000
						20 % v/v	Glycerol
2-12		None	0.1 M	Imidazole	8.0	10 % w/v	PEG 8000
2-13	0.05 M	Cesium chloride	0.1 M	MES	6.5	30 % v/v	Jeffamine® M-600
2-14	3.2 M	Ammonium sulfate	0.1 M	Citrate	5.0		None
2-15		None	0.1 M	Tris	8.0	20 % v/v	MPD
2-16		None	0.1 M	HEPES	7.5	20 % v/v	Jeffamine® M-600
2-17	0.2 M	Magnesium chloride hexahydrate	0.1 M	Tris	8.5	50 % v/v	Ethylene glycol
2-18		None	0.1 M	BICINE	9.0	10 % v/v	MPD
2-19	0.8 M	Succinic acid pH 7.0		None			None
2-20	2.1 M	DL-Malic acid pH 7.0		None			None
2-21	2.4 M	Sodium malonate dibasic monohydrate pH 7.0		None			None
2-22	1.1 M	Sodium malonate dibasic monohydrate	0.1 M	HEPES	7.0	0.5 % v/v	Jeffamine® ED-2003
2-23	1.0 M	Succinic acid	0.1 M	HEPES	7.0	1 % w/v	PEG 2000 MME
2-24		None	0.1 M	HEPES	7.0	30 % v/v	Jeffamine® M-600
2-25		None	0.1 M	HEPES	7.0	30 % v/v	Jeffamine® ED-2003
2-26	0.02 M	Magnesium chloride hexahydrate	0.1 M	HEPES	7.5	22 % w/v	Poly(acrylic acid sodium salt) 5100
2-27	0.01 M	Cobalt(II) chloride hexahydrate	0.1 M	Tris	8.5	20 % w/v	Polyvinylpyrrolidone
2-28	0.2 M	TMAO	0.1 M	Tris	8.5	20 % w/v	PEG 2000 MME
2-29	0.005 M	Cobalt(II) chloride hexahydrate	0.1 M	HEPES	7.5	12 % w/v	PEG 3350
	0.005 M	Cadmium chloride hemi(pentahydrate)					
	0.005 M	Magnesium chloride hexahydrate					
	0.005 M	Nickel(II) chloride hexahydrate					
2-30	0.2 M	Sodium malonate dibasic monohydrate		None		20 % w/v	PEG 3350
2-31	0.1 M	Succinic acid		None		15 % w/v	PEG 3350
2-32	0.15 M	DL-Malic acid		None		20 % w/v	PEG 3350
2-33	0.1 M	Potassium thiocyanate		None		30 % w/v	PEG 2000 MME
2-34	0.15 M	Potassium bromide		None		30 % w/v	PEG 2000 MME
2-35	2.0 M	Ammonium sulfate	0.1 M	BIS-Tris	5.5		None
2-36	3.0 M	Sodium chloride	0.1 M	BIS-Tris	5.5		None
2-37	0.3 M	Magnesium formate dihydrate	0.1 M	BIS-Tris	5.5		None
2-38	1.0 M	Ammonium sulfate	0.1 M	BIS-Tris	5.5	1 % w/v	PEG 3350
2-39		None	0.1 M	BIS-Tris	5.5	25 % w/v	PEG 3350
2-40	0.2 M	Calcium chloride dihydrate	0.1 M	BIS-Tris	5.5	45 % v/v	MPD
2-41	0.2 M	Ammonium acetate	0.1 M	BIS-Tris	5.5	45 % v/v	MPD
2-42	0.1 M	Ammonium acetate	0.1 M	BIS-Tris	5.5	17 % w/v	PEG 10,000
2-43	0.2 M	Ammonium sulfate	0.1 M	BIS-Tris	5.5	25 % w/v	PEG 3350
2-44	0.2 M	Sodium chloride	0.1 M	BIS-Tris	5.5	25 % w/v	PEG 3350
2-45	0.2 M	Lithium sulfate	0.1 M	BIS-Tris	5.5	25 % w/v	PEG 3350
2-46	0.2 M	Ammonium acetate	0.1 M	BIS-Tris	5.5	25 % w/v	PEG 3350
2-47	0.2 M	Magnesium chloride hexahydrate	0.1 M	BIS-Tris	5.5	25 % w/v	PEG 3350
2-48	0.2 M	Ammonium acetate	0.1 M	HEPES	7.5	45 % v/v	MPD

Příloha č. 8: Seznam krystalizačních podmínek pro sadu PEG/Ion HT

Well #	Salt	Well #	Polymer	Well #	pH °
1. (A1)	0.2 M Sodium fluoride	1. (A1)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	1. (A1)	7.3
2. (A2)	0.2 M Potassium fluoride	2. (A2)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	2. (A2)	7.3
3. (A3)	0.2 M Ammonium fluoride	3. (A3)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	3. (A3)	6.2
4. (A4)	0.2 M Lithium chloride	4. (A4)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	4. (A4)	6.8
5. (A5)	0.2 M Magnesium chloride hexahydrate	5. (A5)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	5. (A5)	5.9
6. (A6)	0.2 M Sodium chloride	6. (A6)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	6. (A6)	6.9
7. (A7)	0.2 M Calcium chloride dihydrate	7. (A7)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	7. (A7)	5.1
8. (A8)	0.2 M Potassium chloride	8. (A8)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	8. (A8)	7.0
9. (A9)	0.2 M Ammonium chloride	9. (A9)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	9. (A9)	6.3
10. (A10)	0.2 M Sodium iodide	10. (A10)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	10. (A10)	7.0
11. (A11)	0.2 M Potassium iodide	11. (A11)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	11. (A11)	7.0
12. (A12)	0.2 M Ammonium iodide	12. (A12)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	12. (A12)	6.2
13. (B1)	0.2 M Sodium thiocyanate	13. (B1)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	13. (B1)	6.9
14. (B2)	0.2 M Potassium thiocyanate	14. (B2)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	14. (B2)	7.0
15. (B3)	0.2 M Lithium nitrate	15. (B3)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	15. (B3)	7.1
16. (B4)	0.2 M Magnesium nitrate hexahydrate	16. (B4)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	16. (B4)	5.9
17. (B5)	0.2 M Sodium nitrate	17. (B5)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	17. (B5)	6.8
18. (B6)	0.2 M Potassium nitrate	18. (B6)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	18. (B6)	6.8
19. (B7)	0.2 M Ammonium nitrate	19. (B7)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	19. (B7)	6.2
20. (B8)	0.2 M Magnesium formate dihydrate	20. (B8)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	20. (B8)	7.0
21. (B9)	0.2 M Sodium formate	21. (B9)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	21. (B9)	7.2
22. (B10)	0.2 M Potassium formate	22. (B10)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	22. (B10)	7.3
23. (B11)	0.2 M Ammonium formate	23. (B11)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	23. (B11)	6.6
24. (B12)	0.2 M Lithium acetate dihydrate	24. (B12)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	24. (B12)	7.9
25. (C1)	0.2 M Magnesium acetate tetrahydrate	25. (C1)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	25. (C1)	7.9
26. (C2)	0.2 M Zinc acetate dihydrate	26. (C2)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	26. (C2)	6.4
27. (C3)	0.2 M Sodium acetate trihydrate	27. (C3)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	27. (C3)	8.0
28. (C4)	0.2 M Calcium acetate hydrate	28. (C4)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	28. (C4)	7.5
29. (C5)	0.2 M Potassium acetate	29. (C5)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	29. (C5)	8.1
30. (C6)	0.2 M Ammonium acetate	30. (C6)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	30. (C6)	7.1
31. (C7)	0.2 M Lithium sulfate monohydrate	31. (C7)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	31. (C7)	6.0
32. (C8)	0.2 M Magnesium sulfate heptahydrate	32. (C8)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	32. (C8)	6.0
33. (C9)	0.2 M Sodium sulfate decahydrate	33. (C9)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	33. (C9)	6.7
34. (C10)	0.2 M Potassium sulfate	34. (C10)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	34. (C10)	6.8
35. (C11)	0.2 M Ammonium sulfate	35. (C11)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	35. (C11)	6.0
36. (C12)	0.2 M Sodium tartrate dibasic dihydrate	36. (C12)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	36. (C12)	7.3
37. (D1)	0.2 M Potassium sodium tartrate tetrahydrate	37. (D1)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	37. (D1)	7.4
38. (D2)	0.2 M Ammonium tartrate dibasic	38. (D2)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	38. (D2)	6.6
39. (D3)	0.2 M Sodium phosphate monobasic monohydrate	39. (D3)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	39. (D3)	4.7
40. (D4)	0.2 M Sodium phosphate dibasic dihydrate	40. (D4)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	40. (D4)	9.1
41. (D5)	0.2 M Potassium phosphate monobasic	41. (D5)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	41. (D5)	4.8
42. (D6)	0.2 M Potassium phosphate dibasic	42. (D6)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	42. (D6)	9.2
43. (D7)	0.2 M Ammonium phosphate monobasic	43. (D7)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	43. (D7)	4.6
44. (D8)	0.2 M Ammonium phosphate dibasic	44. (D8)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	44. (D8)	8.0
45. (D9)	0.2 M Lithium citrate tribasic tetrahydrate	45. (D9)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	45. (D9)	8.4
46. (D10)	0.2 M Sodium citrate tribasic dihydrate	46. (D10)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	46. (D10)	8.3
47. (D11)	0.2 M Potassium citrate tribasic monohydrate	47. (D11)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	47. (D11)	8.3
48. (D12)	0.2 M Ammonium citrate dibasic	48. (D12)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	48. (D12)	5.1

Well #	Salt	Well #	Buffer	Well #	Polymer
49.(E1)	0.1 M Sodium malonate pH 4.0	49.(E1)	None	49.(E1)	12% w/v Polyethylene glycol 3,350
50.(E2)	0.2 M Sodium malonate pH 4.0	50.(E2)	None	50.(E2)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
51.(E3)	0.1 M Sodium malonate pH 5.0	51.(E3)	None	51.(E3)	12% w/v Polyethylene glycol 3,350
52.(E4)	0.2 M Sodium malonate pH 5.0	52.(E4)	None	52.(E4)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
53.(E5)	0.1 M Sodium malonate pH 6.0	53.(E5)	None	53.(E5)	12% w/v Polyethylene glycol 3,350
54.(E6)	0.2 M Sodium malonate pH 6.0	54.(E6)	None	54.(E6)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
55.(E7)	0.1 M Sodium malonate pH 7.0	55.(E7)	None	55.(E7)	12% w/v Polyethylene glycol 3,350
56.(E8)	0.2 M Sodium malonate pH 7.0	56.(E8)	None	56.(E8)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
57.(E9)	4% v/v Tacsimate™ pH 4.0	57.(E9)	None	57.(E9)	12% w/v Polyethylene glycol 3,350
58.(E10)	8% v/v Tacsimate™ pH 4.0	58.(E10)	None	58.(E10)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
59.(E11)	4% v/v Tacsimate™ pH 5.0	59.(E11)	None	59.(E11)	12% w/v Polyethylene glycol 3,350
60.(E12)	8% v/v Tacsimate™ pH 5.0	60.(E12)	None	60.(E12)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
61.(F1)	4% v/v Tacsimate™ pH 6.0	61.(F1)	None	61.(F1)	12% w/v Polyethylene glycol 3,350
62.(F2)	8% v/v Tacsimate™ pH 6.0	62.(F2)	None	62.(F2)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
63.(F3)	4% v/v Tacsimate™ pH 7.0	63.(F3)	None	63.(F3)	12% w/v Polyethylene glycol 3,350
64.(F4)	8% v/v Tacsimate™ pH 7.0	64.(F4)	None	64.(F4)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
65.(F5)	4% v/v Tacsimate™ pH 8.0	65.(F5)	None	65.(F5)	12% w/v Polyethylene glycol 3,350
66.(F6)	8% v/v Tacsimate™ pH 8.0	66.(F6)	None	66.(F6)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
67.(F7)	0.1 M Succinic acid pH 7.0	67.(F7)	None	67.(F7)	12% w/v Polyethylene glycol 3,350
68.(F8)	0.2 M Succinic acid pH 7.0	68.(F8)	None	68.(F8)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
69.(F9)	0.1 M Ammonium citrate tribasic pH 7.0	69.(F9)	None	69.(F9)	12% w/v Polyethylene glycol 3,350
70.(F10)	0.2 M Ammonium citrate tribasic pH 7.0	70.(F10)	None	70.(F10)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
71.(F11)	0.1 M DL-Malic acid pH 7.0	71.(F11)	None	71.(F11)	12% w/v Polyethylene glycol 3,350
72.(F12)	0.2 M DL-Malic acid pH 7.0	72.(F12)	None	72.(F12)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
73.(G1)	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 7.0	73.(G1)	None	73.(G1)	12% w/v Polyethylene glycol 3,350
74.(G2)	0.2 M Sodium acetate trihydrate pH 7.0	74.(G2)	None	74.(G2)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
75.(G3)	0.1 M Sodium formate pH 7.0	75.(G3)	None	75.(G3)	12% w/v Polyethylene glycol 3,350
76.(G4)	0.2 M Sodium formate pH 7.0	76.(G4)	None	76.(G4)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
77.(G5)	0.1 M Ammonium tartrate dibasic pH 7.0	77.(G5)	None	77.(G5)	12% w/v Polyethylene glycol 3,350
78.(G6)	0.2 M Ammonium tartrate dibasic pH 7.0	78.(G6)	None	78.(G6)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
79.(G7)	2% v/v Tacsimate™ pH 4.0	79.(G7)	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6	79.(G7)	16% w/v Polyethylene glycol 3,350
80.(G8)	2% v/v Tacsimate™ pH 5.0	80.(G8)	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.6	80.(G8)	16% w/v Polyethylene glycol 3,350
81.(G9)	2% v/v Tacsimate™ pH 6.0	81.(G9)	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	81.(G9)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
82.(G10)	2% v/v Tacsimate™ pH 7.0	82.(G10)	0.1 M HEPES pH 7.5	82.(G10)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
83.(G11)	2% v/v Tacsimate™ pH 8.0	83.(G11)	0.1 M Tris pH 8.5	83.(G11)	16% w/v Polyethylene glycol 3,350
84.(G12)	None	84.(G12)	0.07 M Citric acid, 0.03 M BIS-TRIS propane / pH 3.4	84.(G12)	16% w/v Polyethylene glycol 3,350
85.(H1)	None	85.(H1)	0.06 M Citric acid, 0.04 M BIS-TRIS propane / pH 4.1	85.(H1)	16% w/v Polyethylene glycol 3,350
86.(H2)	None	86.(H2)	0.05 M Citric acid, 0.05 M BIS-TRIS propane / pH 5.0	86.(H2)	16% w/v Polyethylene glycol 3,350
87.(H3)	None	87.(H3)	0.04 M Citric acid, 0.06 M BIS-TRIS propane / pH 6.4	87.(H3)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
88.(H4)	None	88.(H4)	0.03 M Citric acid, 0.07 M BIS-TRIS propane / pH 7.6	88.(H4)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
89.(H5)	None	89.(H5)	0.02 M Citric acid, 0.08 M BIS-TRIS propane / pH 8.8	89.(H5)	16% w/v Polyethylene glycol 3,350
90.(H6)	0.02 M Calcium chloride dihydrate, 0.02 M Cadmium chloride hydrate, 0.02 M Cobalt(II) chloride hexahydrate	90.(H6)	None	90.(H6)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
91.(H7)	0.01 M Magnesium chloride hexahydrate 0.005 M Nickel(II) chloride hexahydrate	91.(H7)	0.1 M HEPES sodium pH 7.0	91.(H7)	15% w/v Polyethylene glycol 3,350
92.(H8)	0.02 M Zinc chloride	92.(H8)	None	92.(H8)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
93.(H9)	0.15 M Cesium chloride	93.(H9)	None	93.(H9)	15% w/v Polyethylene glycol 3,350
94.(H10)	0.2 M Sodium bromide	94.(H10)	None	94.(H10)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
95.(H11)	1% w/v Tryptone, 0.001 M Sodium azide	95.(H11)	0.05 M HEPES sodium pH 7.0	95.(H11)	12% w/v Polyethylene glycol 3,350
96.(H12)	1% w/v Tryptone, 0.001 M Sodium azide	96.(H12)	0.05 M HEPES sodium pH 7.0	96.(H12)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350

Příloha č. 9: Seznam krystalizačních podmínek pro sadu JBScreen Basic HTS

No.	Precipitant	Precipitant 2	Buffer	Additive
A1	25 % v/v Ethylene glycol	none	none	none
A2	12 % v/v Glycerol	1.5 M Ammonium sulfate	100 mM TRIS; pH 8.5	none
A3	1 M 1,6-Hexanediol	none	100 mM Sodium acetate; pH 4.6	10 mM Cobalt (II) chloride
A4	2.5 M 1,6-Hexanediol	none	100 mM tri-Sodium citrate; pH 5.6	none
A5	3.4 M 1,6-Hexanediol	none	100 mM TRIS; pH 8.5	200 mM Magnesium chloride
A6	30 % v/v 2-Methyl-2,4-pentanediol	none	100 mM Sodium acetate; pH 4.6	200 mM Sodium chloride
A7	30 % v/v 2-Methyl-2,4-pentanediol	none	100 mM tri-Sodium citrate; pH 5.6	200 mM Ammonium acetate
A8	30 % v/v 2-Methyl-2,4-pentanediol	none	100 mM Sodium acetate; pH 4.6	20 mM Calcium chloride
A9	30 % v/v 2-Methyl-2,4-pentanediol	500 mM Ammonium sulfate	100 mM HEPES; pH 7.5	none
A10	30 % v/v 2-Methyl-2,4-pentanediol	none	100 mM HEPES; pH 7.5	200 mM tri-Sodium citrate
A11	50 % v/v 2-Methyl-2,4-pentanediol	none	100 mM TRIS; pH 8.5	200 mM Ammonium di-hydrogen phosphate
A12	70 % v/v 2-Methyl-2,4-pentanediol	none	100 mM HEPES; pH 7.5	none
B1	2 % w/v Ethylene imine polymer	none	100 mM tri-Sodium citrate; pH 5.6	500 mM Sodium chloride
B2	2 % v/v Polyethylene glycol 400	2 M Ammonium sulfate	100 mM HEPES; pH 7.5	none
B3	28 % v/v Polyethylene glycol 400	none	100 mM HEPES; pH 7.5	200 mM Calcium chloride
B4	30 % v/v Polyethylene glycol 400	none	100 mM TRIS; pH 8.5	200 mM tri-Sodium citrate
B5	30 % v/v Polyethylene glycol 400	none	100 mM HEPES; pH 7.5	200 mM Magnesium chloride
B6	30 % v/v Polyethylene glycol 400	none	100 mM Sodium acetate; pH 4.6	100 mM Calcium chloride
B7	20 % v/v Polyethylene glycol monomethyl ether 550	none	100 mM BICINE; pH 9.5	100 mM Sodium chloride
B8	25 % v/v Polyethylene glycol monomethyl ether 550	none	100 mM MES; pH 6.5	10 mM Zinc sulfate
B9	10 % w/v Polyethylene glycol 1,000	10 % w/v Polyethylene glycol 8,000	none	none
B10	30 % w/v Polyethylene glycol 1,500	none	none	none
B11	20 % w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 2,000	none	100 mM TRIS; pH 8.5	10 mM Nickel (II) chloride
B12	30 % w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 2,000	none	100 mM Sodium acetate; pH 4.6	200 mM Ammonium sulfate

No.	Precipitant	Precipitant 2	Buffer	Additive
C1	8 % w/v Polyethylene glycol 4,000	none	100 mM Sodium acetate; pH 4.6	none
C2	20 % w/v Polyethylene glycol 4,000	20 % v/v 2-Propanol	100 mM tri-Sodium citrate; pH 5.6	none
C3	20 % w/v Polyethylene glycol 4,000	10 % v/v 2-Propanol	100 mM HEPES; pH 7.5	none
C4	25 % w/v Polyethylene glycol 4,000	none	100 mM Sodium acetate; pH 4.6	200 mM Ammonium sulfate
C5	30 % w/v Polyethylene glycol 4,000	none	none	200 mM Ammonium sulfate
C6	30 % w/v Polyethylene glycol 4,000	none	100 mM Sodium acetate; pH 4.6	200 mM Ammonium acetate
C7	30 % w/v Polyethylene glycol 4,000	none	100 mM tri-Sodium citrate; pH 5.6	200 mM Ammonium acetate
C8	30 % w/v Polyethylene glycol 4,000	none	100 mM TRIS; pH 8.5	200 mM Sodium acetate
C9	30 % w/v Polyethylene glycol 4,000	none	100 mM TRIS; pH 8.5	200 mM Lithium sulfate
C10	30 % w/v Polyethylene glycol 4,000	none	100 mM TRIS; pH 8.5	200 mM Magnesium chloride
C11	30 % w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 5,000	none	100 mM MES; pH 6.5	200 mM Ammonium sulfate
C12	10 % w/v Polyethylene glycol 6,000	2 M Sodium chloride	none	none
D1	10 % w/v Polyethylene glycol 6,000	5 % v/v 2-Methyl-2,4-pentanediol	100 mM HEPES; pH 7.5	none
D2	2 % w/v Polyethylene glycol 8,000	1 M Lithium sulfate	none	none
D3	8 % w/v Polyethylene glycol 8,000	none	100 mM TRIS; pH 8.5	none
D4	10 % w/v Polyethylene glycol 8,000	8 % v/v Ethylene glycol	100 mM HEPES; pH 7.5	none
D5	15 % w/v Polyethylene glycol 8,000	500 mM Lithium sulfate	none	none
D6	18 % w/v Polyethylene glycol 8,000	none	100 mM MES; pH 6.5	200 mM Calcium acetate
D7	18 % w/v Polyethylene glycol 8,000	none	100 mM MES; pH 6.5	200 mM Zinc acetate
D8	20 % w/v Polyethylene glycol 8,000	none	none	50 mM Potassium di-hydrogen phosphate
D9	20 % w/v Polyethylene glycol 8,000	none	100 mM MES; pH 6.5	200 mM Magnesium acetate
D10	30 % w/v Polyethylene glycol 8,000	none	100 mM MES; pH 6.5	200 mM Sodium acetate
D11	30 % w/v Polyethylene glycol 8,000	none	none	200 mM Ammonium sulfate
D12	30 % w/v Polyethylene glycol 8,000	none	100 mM MES; pH 6.5	200 mM Ammonium sulfate

No.	Precipitant	Precipitant 2	Buffer	Additive
E1	10 % w/v Polyethylene glycol 10,000	2 % v/v 1,4-Dioxane	100 mM BICINE; pH 9.5	none
E2	20 % w/v Polyethylene glycol 10,000	none	100 mM HEPES; pH 7.5	none
E3	12 % w/v Polyethylene glycol 20,000	none	100 mM MES; pH 6.5	none
E4	5 % v/v 2-Propanol	2 M Ammonium sulfate	none	none
E5	20 % v/v 2-Propanol	none	100 mM HEPES; pH 7.5	200 mM tri-Sodium citrate
E6	20 % v/v 2-Propanol	none	100 mM Sodium acetate; pH 4.6	200 mM Calcium chloride
E7	30 % v/v 2-Propanol	none	100 mM HEPES; pH 7.5	200 mM Magnesium chloride
E8	30 % v/v 2-Propanol	none	100 mM TRIS; pH 8.5	200 mM Ammonium acetate
E9	10 % v/v 1,4-Dioxane	1.6 M Ammonium sulfate	100 mM MES; pH 6.5	none
E10	35 % v/v 1,4-Dioxane	none	none	none
E11	10 % v/v Ethanol	1.5 M Sodium chloride	none	none
E12	20 % v/v Ethanol	none	100 mM TRIS; pH 8.5	none
F1	25 % v/v 2-Methyl-2-propanol	none	100 mM TRIS; pH 8.5	none
F2	35 % v/v 2-Methyl-2-propanol	none	100 mM tri-Sodium citrate; pH 5.6	none
F3	1 M Imidazole; pH 7.0	none	none	none
F4	1 M Lithium sulfate	none	100 mM TRIS; pH 8.5	10 mM Nickel (II) chloride
F5	1.5 M Lithium sulfate	none	100 mM HEPES; pH 7.5	none
F6	400 mM Potassium Sodium tartrate	none	none	none
F7	800 mM Potassium Sodium tartrate	none	100 mM HEPES; pH 7.5	none
F8	1.4 M tri-Sodium citrate	none	100 mM HEPES; pH 7.5	none
F9	1.6 M tri-Sodium citrate; pH 6.5	none	none	none
F10	10 % v/v Jeffamine® M-600	none	100 mM tri-Sodium citrate; pH 5.6	10 mM Iron (III) chloride
F11	20 % v/v Jeffamine® M-600	none	100 mM HEPES; pH 7.5	none
F12	30 % v/v Jeffamine® M-600	none	100 mM MES; pH 6.5	50 mM Cesium chloride

No.	Precipitant	Precipitant 2	Buffer	Additive
G1	800 mM Potassium di-hydrogen phosphate	800 mM Sodium di-hydrogen phosphate	100 mM HEPES; pH 7.5	none
G2	400 mM Ammonium di-hydrogen phosphate	none	none	none
G3	1 M Ammonium di-hydrogen phosphate	none	100 mM tri-Sodium citrate; pH 5.6	none
G4	2 M Ammonium di-hydrogen phosphate	none	100 mM TRIS; pH 8.5	none
G5	2 M Ammonium formate	none	100 mM Sodium acetate; pH 4.6	none
G6	4 M Ammonium formate	none	100 mM HEPES; pH 7.5	none
G7	2 M Ammonium formate	none	none	none
G8	500 mM Ammonium sulfate	1 M Lithium sulfate	100 mM tri-Sodium citrate; pH 5.6	none
G9	1.6 M Ammonium sulfate	none	100 mM HEPES; pH 7.5	100 mM Sodium chloride
G10	1.8 M Ammonium sulfate	none	100 mM MES; pH 6.5	10 mM Cobalt (II) chloride
G11	2 M Ammonium sulfate	none	100 mM TRIS; pH 8.5	none
G12	2 M Ammonium sulfate	none	none	none
H1	2 M Ammonium sulfate	none	100 mM Sodium acetate; pH 4.6	none
H2	2 M Ammonium sulfate	none	100 mM tri-Sodium citrate; pH 5.6	200 mM Potassium Sodium tartrate
H3	200 mM Magnesium formate	none	none	none
H4	1.6 M Magnesium sulfate	none	100 mM MES; pH 6.5	none
H5	2 M Magnesium chloride	none	100 mM BICINE; pH 9.5	none
H6	1 M Sodium acetate	none	100 mM Imidazole; pH 6.5	none
H7	1 M Sodium acetate	none	100 mM HEPES; pH 7.5	50 mM Cadmium sulfate
H8	1.4 M Sodium acetate	none	100 mM MES; pH 6.5	none
H9	500 mM Sodium chloride	10 mM Magnesium chloride	none	10 mM Cetyltrimethylammonium bromide
H10	2 M Sodium chloride	none	100 mM Sodium acetate; pH 4.6	none
H11	2 M Sodium chloride	none	100 mM MES; pH 6.5	100 mM Sodium di-hydrogen phosphate, 100 mM Potassium di-hydrogen phosphate
H12	4.3 M Sodium chloride	none	100 mM HEPES; pH 7.5	none