

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

**Strukturní studie serpinu Iripin-5 z klíšťat *Ixodes
ricinus***

Bakalářská práce

Nikola Spěváková

Školitelka: Mgr. Barbora Kaščáková

Konzultant: Mgr. Petra Havlíčková

České Budějovice 2022

Bibliografické údaje

Spěváková, N., 2022: Strukturní studie serpinu Iripin-5 z klišťat *Ixodes ricinus*. [Structural study of serpin Iripin-5 from ticks *Ixodes ricinus*, Bc. Thesis, in Czech]- 58p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

The aim of this bachelor thesis was a crystallization of serpin Iripin-5 from ticks *Ixodes ricinus*. Iripin-5 is the most produced serpin in the salivary glands of ticks. The focus of this thesis was to prepare protein Iripin-5 and perform crystallization experiments. Obtained crystals of Iripin-5 were in diffraction quality.

Prohlášení

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

V Českých Budějovicích dne 13. dubna 2022

.....

Podpis

Poděkování

Poděkování patří především mé školitelce Mgr. Barboře Kašćákové za obrovskou dávku trpělivosti, odborné vedení a velké množství cenných rad nejen při práci v laboratoři. Také bych chtěla poděkovat konzultantce Mgr. Petře Havlíčkové za užitečné rady a přátelský přístup.

Velké poděkování patří především mé rodině a přátelům za jejich podporu během celého studia.

Obsah

1	Úvod	1
2	Cíle práce	2
3	Literární přehled.....	3
3.1	Serpiny.....	3
3.1.1	Struktura serpinů.....	3
3.1.2	Serpin – enzym komplex.....	4
3.1.3	Dysfunkce serpinů	5
3.1.4	Proteázové inhibitory u klíšťat	5
3.2	Metody strukturní analýzy serpinů.....	6
3.2.1	Purifikace.....	6
3.2.2	Proteinová krystalografie	7
3.2.2.1	Krystalizace	7
3.2.2.2	X-ray krystalografie	11
3.2.2.3	Neutronová krystalografie	13
3.2.3	Kryo – elektronová mikroskopie	13
4	Materiál a metody.....	14
4.1	Použité chemikálie a materiály	14
4.2	Transformace	15
4.3	Pilotní exprese.....	16
4.4	Analýza přítomnosti proteinu	17
4.4.1	Příprava vzorků z pilotní exprese	17
4.4.2	Příprava 12,5 % gelu	18
4.4.3	SDS-PAGE elektroforéza.....	18
4.4.4	Hmotnostní spektrometrie	18
4.5	Exprese ve velkém měřítku.....	19
4.6	Purifikace	20

4.6.1 Iontově výměnná chromatografie	20
4.6.2 Gelová chromatografie.....	20
4.6.3 Purifikace z inkluzních tělísek.....	21
4.7 Krystalizace lysozymu.....	22
4.8 Krystalizace Iripin-5.....	22
4.8.1 Pre-krystalizační test	22
4.8.2 Krystalizační screening Iripin-5 pomocí krystalizačního robota.....	22
5 Výsledky	24
5.1 Pilotní exprese proteinu Iripin-5	24
5.2 Hmotnostní spektrometrie	25
5.3 Exprese ve velkém měřítku.....	25
5.4 Purifikace solubilní části	26
5.5 Purifikace inkluzních tělísek.....	28
5.6 Krystalizace lysozymu.....	29
5.7 Krystalizace Iripin-5.....	31
6 Diskuze	34
7 Závěr.....	37
8 Použitá literatura	39
9 Seznam obrázků	43
10 Seznam tabulek	45
11 Seznam příloh	46

Seznam zkratek

AE chromatografie – anionová chromatografie (anion exchange chromatography)

ATB - antibiotikum

EM – elektronová mikroskopie

GST – glutathion S-transferáza

IPTG – isopropyl- β -D-thiogalaktosid

LB médium – lysogenylové médium (lysogeny broth medium)

MBP – peptid vázající maltózu (maltose binding peptide)

OD – optická hustota (optical density)

PDB – proteinová data banka (protein data bank)

PEG – roztok polyethylenglykolu (polyethylene glycol solution)

pH – vodíkový exponent (potential of hydrogen)

Poly-His – polyhistidin

RCL – centrální reaktivní smyčka (reactive centre loops)

rpm – otáčky za minutu (revolutions per minute)

SBP – peptid vázající streptavidin (streptavidin binding peptide)

SEC chromatografie – gelová chromatografie (size exclusion chromatography)

SOC médium – super optimální vývar s katabolickými restrikcemi (Super Optimal broth with Catabolite repression)

TB médium – terrific broth medium

2D – dvourozměrný (two dimensional space)

3D – trojrozměrný (three dimensional space)

1 Úvod

Ixodes ricinus patří k nejrozšířenějšímu zástupci čeledi klíšťatovitých (*Ixodidae*) ve střední Evropě. Jeho výskyt je spojen s přenášením mnoha nemocí, mezi ně patří především lymská borelióza. K přenosu patogenů na hostitele se podílí hlavně slinné žlázy klíštěte. Znalost složení slin klíštěte může pomoci k vytvoření např. vakcín či protilátek k zamezení šíření patogenů a napadání imunitního systému hostitele.

Serpiny jsou skupinou proteinů vyskytující se i ve slinných žlázách klíštěte. K jejich funkcím se hlavně řadí inhibice serinových proteáz, čímž ovlivňují imunitní systém v těle hostitele. Iripin-5 patří mezi serpiny vyskytující se u *I. ricinus* s funkcí inhibice především neutrofilní elastázy a proteinázy 3. Vyřešení struktury Iripin-5 by pomohlo k hlubšímu pochopení biologie klíšťat.

Teoretická část této bakalářské práce se zabývá charakterizací proteinové skupiny serpinů, jejich strukturou, inhibiční funkcí a tvorbou komplexů. Je zmíněn i výskyt serpinů u klíšťat a jejich role přenosu patogenů a dopad na hostitele. Další kapitolou jsou metody strukturní analýzy serpinů. Zde je popsána purifikace jakožto důležitý krok před zahájením samotné krystalizace. V poslední části jsou zmíněny možnosti strukturní analýzy z již vypěstovaných krystalů. Tu je možné provést na základě X-ray krystalografie, neutronové krystalografie nebo pomocí kryo – elektronové mikroskopie.

Experimentální část práce popisuje přípravu studovaného proteinu ke strukturní analýze. Popsány jsou jednotlivé části postupu od transformace, pilotní exprese, exprese ve velkém měřítku až k samotné purifikaci. K purifikaci byly využity dva typy chromatografií - iontově výměnná a gelová. Krystalizace pro Iripin-5 byla zahájena krystalizačním screeningem. Na základě mnou provedeného krystalizačního screeningu došlo k optimalizaci podmínek pro růst krystalů Iripin-5 a byly získány krystaly v difrakční kvalitě.

2 Cíle práce

Cíle pro tuto bakalářskou práci byly nastaveny takto:

1. Zvládnout základní a pokročilé krystalizační metody na modelovém proteinu
2. Vypurifikovat protein Iripin-5 za pomoci standardních chromatografických metod
3. Charakterizovat studovaný protein a nalézt krystalizační podmínky pro přípravu proteinových krystalů Iripin-5
4. Optimalizovat krystalizační podmínky a připravit krystaly proteinu Iripin-5 v difrakční kvalitě
5. Otestovat připravené krystaly a pokusit se získat difrakční data

3 Literární přehled

3.1 Serpiny

Serpiny (serinové proteázové inhibitory) patří do velké rodiny proteinů, které se vyskytují u živočichů, virů, rostlin, bakterií a archaea. Bylo identifikováno přes 1500 serpinových zástupců, kdy typická délka jednoho aminokyselinového řetězce serpinu je v rozmezí 350–400 aminokyselin a jejich velikost se pohybuje okolo 40–60 kDa (Huntington *et al.*, 2011; Gettins *et al.*, 2009). Vzhledem k velikosti skupiny se objevuje velká škála funkcí jak intracelulárních, tak i extracelulárních a mezi nejznámější patří inhibice serinových proteáz (Irvin *et al.*, 2000, Law *et al.*, 2006). U některých serpinů se vyskytly i další inhibiční funkce jako např. inhibice cysteinových proteáz inhibujících kaspázy nebo katepsiny (Huntington *et al.*, 20011). Některé serpiny v průběhu evoluce ztratily svou inhibiční funkci a nahradily ji jinými funkcemi jako transporty hormonů (Pemberton *et al.*, 1988), molekulové chaperony, nebo tumorové supresory (Zou *et al.*, 1994).

3.1.1 Struktura serpinů

První struktura serpinu, štípnutého antitrypsinu, byla určena v roce 1984. Největší množství určených struktur serpinů je těch bez navázané proteázy (Gettins, 2002). Postupem času bylo zjištěno, že serpiny mohou zaujímat různé konformace a mezi základní konformace se řadí: nativní, částečně nativní, δ – forma, latentní a rozštípnutá (Dunstone *et al.*, 2011).

Identifikace serpinů byla založena na pozorování primární struktury mezi třemi proteiny: lidským antitrombinem, inhibitorem lidské proteázy R1 a vaječným albuminem. Vztah mezi nimi byl potvrzen, i když byla zjištěna pouze 30% shoda sekvencí (Gettins, 2002). Serpiny se vyznačují velmi konzervativní základní sekundární strukturou, jež sdílejí napříč skupinou. Z této skutečnosti vyplývá výhoda, kdy objev nové informace o jednom serpinu, lze následně aplikovat i na další zástupce této super rodiny. Konzervativní struktura má význam pro jejich funkci jako serinové proteázové inhibitory (Huntington *et al.*, 20011). Skládá se ze tří hlavních β -listů, sedmi nebo více α -šroubovic (Gettins *et al.*, 2009) a také RCL, která interaguje s proteázami (Huntington *et al.*, 2011). Velikost této smyčky se pohybuje v rozmezí 20-25 aminokyselin (Whissstock *et al.*, 2006). RCL serpinů slouží jako návnada pro proteázu, neboť jsou dlouhé, flexibilní a volně přístupné (Huntington *et al.*, 2011).

Proces inhibice je charakterizován jako ireverzibilní, vedoucí k inaktivaci serpinu i cílené proteázy (Huntington *et al.*, 2011). Počátek procesu inhibice začíná vytvořením

Michaelis-Mentenova komplexu s proteázou. Následuje vznik kovalentního komplexu s navázanou proteázou, a to přidáním nového řetězce u β – listu A, což je způsobeno translokací RCL s navázanou proteázou. Proteáza je transponována o 70 Å z jedné strany „těla“ serpinu na stranu druhou a zároveň je aktivní místo proteázy narušeno (Silverman *et al.*, 2011).

Fungování serpinů je dáno čtyřmi důležitými faktory. Pohyblivost a délka RCL patří mezi strukturní faktory a mezi faktory založené na sekvenci se řadí sekvence rozeznávaná proteázami a exosity.

- Pohyblivost RCL, serpiny využívají pro stabilizaci a inhibici enzymů, což je umožněno tím, že při štěpení serpinu dochází k vložení smyčky do β – listu A. Tomu předchází N – terminální sekvence, která usnadňuje mobilitu RCL a inzerci smyčky.
- Délka RCL má dopad na kinetickou stabilitu serpin – proteázového komplexu. Při zkracování délky RCL ubíráním aminokyselinových zbytků se snižuje účinnost inhibice, naopak přidávání těchto aminokyselinových zbytků dojde k narušení stability komplexu serpin – proteáza.
- Sekvence rozeznávaná proteázou se vyznačuje vysokou variabilitou mezi jednotlivými serpiny.
- Exosity napomáhají serpinům k jejich specifitě, a to třemi způsoby. Pomáhají tím, že umožňují dočasné navázání proteázy se strukturou serpinu nejen prostřednictvím RCL. Objevují se též na C- a N- koncích, kde napomáhají vazbě k cílové proteáze. Exosity v neposlední řadě umožňují interakci s kofaktorem. Interakce s kofaktorem v mnoha případech zvyšuje schopnost serpinů inhibovat proteázy (Sanrattana *et al.*, 2019).

3.1.2 Serpin – enzym komplex

U serpinů, jejichž hlavní funkce je inhibice proteáz, je jejich hlavní úloha vytváření už zmíněný kovalentních komplexů s danými proteázami (Huntington *et al.*, 2011). Poznání strukturní informace komplexu serpinu s navázanou proteázou napomáhá pochopení biologie serpinů (Mahon, 2018). První struktura komplexu serpinu s proteázou byla určena v roce 2000 (PDB ID: 1EZK). Bylo odhaleno, že proteáza zůstává kovalentně spojena s RCL mezi serinem v aktivním místě a P1 místě na RCL. Aktivní místo proteázy je narušeno tím, že dochází k přitlačení proteázy k bázi serpinu, a to díky správné délce RCL (Dunstone *et al.*, 2011).

3.1.3 Dysfunkce serpinů

U serpinů může docházet k různým mutacím, ztrátám nebo získáním funkcí, i přesto že se u nich vyskytuje lepší mechanismus, než je „zámek a klíč“. Mezi nejběžnější důvody dysfunkce serpinů se řadí mutace RCL, kdy může dojít ke změně specifity nebo zpomalení začlenění RCL do β – listu A, což znemožní inhibiční funkci. K dalším patří mutace ovlivňující schopnost serpinu se složit do metastabilní nativní struktury a následkem toho se neprodukuje aktivní protein, a tudíž nastává serpinová insuficience – nedostatek serpinu (Huntington *et al.*, 2011).

Dále může u serpinů docházet k polymerizaci, která vede ke snížené produkci nativního aktivního proteinu. Pokud dojde k většímu nedostatku, mohou se objevit nemoci spojené s insuficiencí aktivních serpinů. Velmi zřídka vede velké množství polymerů serpinů k toxicitě vůči buňkám nebo až k poškození tkáně. Kritický nedostatek serpinů vede ke ztrátě funkce. Heterozygotní mutace u neuroserpinů často vedou k demenci či smrti. Homozygotní mutace jsou spíše spojeny s onemocněním jater, jako je např. cirhóza jater. Nemoci spojené s polymerizací serpinů jsou vzácné, lze k nim přiřadit Alzheimerovu, Huntingtonovu a Parkinsonovu chorobu (Huntington *et al.*, 2011).

3.1.4 Proteázové inhibitory u klíšťat

Ixodes ricinus (klíšť obecné) patří do čeledi *Ixodidae*. Řadí se k nejvíce studovaným klíšťatům vzhledem k jeho hojnému výskytu v Evropě. *I. ricinus* má několikaletý vývojový cyklus, neboť v rámci jednoho cyklu napadne tři hostitele. Na své hostitele čekají na vegetaci a vykazují nízkou specifitu pro přisátí k hostiteli (Kotsyfakis *et al.*, 2015).

Obživou *I. ricinus* je krev, ta je potřebná pro vývoj a schopnost reprodukce. Krmení trvá několik dní. Je to pomalý a složitý proces, protože je třeba vyřadit imunitní reakce hostitele. Sliny klíšťat hrají několik rolí během krmení krví, aby nedošlo k přerušení krmení, tzn., že sliny působí proti hemostatickým, zánětlivým a imunitním reakcím hostitele a jako cement k přilnutí na kůži hostitele (Kotsyfakis *et al.*, 2015). Sliny obsahují velké množství proteinů, mezi které spadají i proteázové inhibitory (PI). Jednou z charakteristik PI je pozorování více než jednoho účinku a jejich celkové fungování je dáno dlouhodobou evolucí klíšťate s jeho hostitelem. Ve slinách klíšťat lze najít tři velké skupiny proteázových inhibitorů: Kunitzovy inhibitory, cysteiny a serpiny (Chmelař *et al.*, 2017).

Serpiny se u klíšťat vyskytují v hojném množství. Doposud bylo charakterizováno kolem 20 serpinů se známou funkcí napříč druhovými skupinami klíšťat. K jedné z funkcí

patří regulace imunitního systému hostitele (Chmelař *et al.*, 2017). Klíšťata přenáší mnoho nemocí, a to především skrze sliny. Mezi nejzávažnější nemoci patří klíšťová meningoencefalitida a lymfská borelióza (Gray *et al.*, 2021; Volf *et al.*, 2007).

3.2 Metody strukturní analýzy serpinů

Díky různým metodám používaným k určení struktury, mezi které se řadí X-ray krystalografie, neutronová krystalografie a kryo – EM, je možné porozumět funkčním a mechanickým vlastnostem serpinů. Díky tomu lze pozorovat dynamickou strukturu serpinů, vodíkové vazby u komplexů serpin - enzym nebo rozluštění velkých struktur agregátů serpinů. Pro strukturní analýzu je důležité získání kvalitních dat, kterých se dosáhne pouze s vypurifikovaným proteinem s minimální čistotou 95 % (Mahon *et al.*, 2018).

3.2.1 Purifikace

Purifikace se využívá jak u základních výzkumů, které umožňují produkci a detailní charakterizaci proteinů *in vivo* experimentů, tak i u aplikovaných výzkumů (např. pro přípravu proteinů s terapeutickým využitím). Purifikaci lze popsat jak řadu experimentů vedoucí k získání jednoho proteinu z komplexní směsi (Růčková *et al.*, 2014). Právě homogenita studovaného proteinu je důležitá pro funkční i strukturní studie proteinů. I minimální kontaminace v dobře vypurifikovaném proteinu může vést k nesprávným výsledkům, nebo mohou vznikat zavádějící pozorování a závěry. Dosažení homogenního proteinu není jednoduché, avšak jakýkoli článek o purifikaci proteinů lze považovat za předběžný návod (Ward *et al.*, 2009).

Metody pro purifikaci proteinů lze rozdělit podle typu proteinu:

A) přirozeně vyskytující se proteiny

B) rekombinantní proteiny (zavádí se pomocí vhodných genů do mikroorganismů nebo kultivovaných eukaryotických buněk)

C) komplexní směsi vznikajících proteinů (Ward *et al.*, 2009).

První struktury serpinů byly získány z přirozeně vyskytujících se proteinů. Během 90. let minulého století se přešlo na rekombinantní proteiny. Navíc některé serpiny nemusí produkovat solubilní/rozpuštěný protein, ale mohou se uskláňovat v inkluzních tělíčkách. K lepší stabilitě serpinů pro studování se k nim přidávají afinitní značky (např. poly-His-tag,

GST, Strep-tag, SBP-tag, MBP-tag). Na základě výběru značky se vybere vhodná purifikační metoda (Mahon *et al.*, 2018; Růčková *et al.*, 2014).

Nejčastěji používaná purifikační metoda u proteinu s afinitní značkou je afinitní chromatografie. Tento typ chromatografie funguje na principu specifického zachycení na chromatografické koloně díky afinitní značce. Proteiny bez specifické značky jsou v promývacím kroku odplaveny pryč z kolony. Specificky navázaný a čistý protein se uvolní přidáním kompetitivního ligandu, změnou pH, iontové síly, či polaroty (Růčková *et al.*, 2014).

Někdy je potřeba provést více purifikačních metod, aby byl studovaný protein dostatečně čistý. Další purifikační kroky rozdělují proteiny podle specifických vlastností (Růčková *et al.*, 2014).

Mezi další typy chromatografií se řadí iontově výměnná chromatografie. K elektrostatickým interakcím dochází mezi směsí proteinů a kolonou. Kolona má opačný náboj než směs proteinů, která má být separovaná. Afinita proteinů ke koloně je dána iontovými vazbami. Navázané proteiny na kolonu se od ní mohou oddělit např. změnou pH. Anexová kolona je kladně nabitá a zachytávají se na ní negativně nabitě proteiny. Katexová kolona funguje opačně (Coskun *et al.*, 2016).

Gelová chromatografie se též řadí k metodám sloužícím k purifikaci. Podstata této metody spočívá ve stanovení molekulových hmotností proteinů a ve snížení koncentrace soli v roztocích proteinů. Stacionární fáze se skládá z hydrofilních gelů. Směs procházející kolonou obsahuje proteiny různé velikosti. Velké molekuly se do menších pórů nedostanou, a tak prochází kolonou bez zadržení, kdežto malé molekuly jsou zachytávány porézními otvory kolony (Coskun *et al.*, 2016).

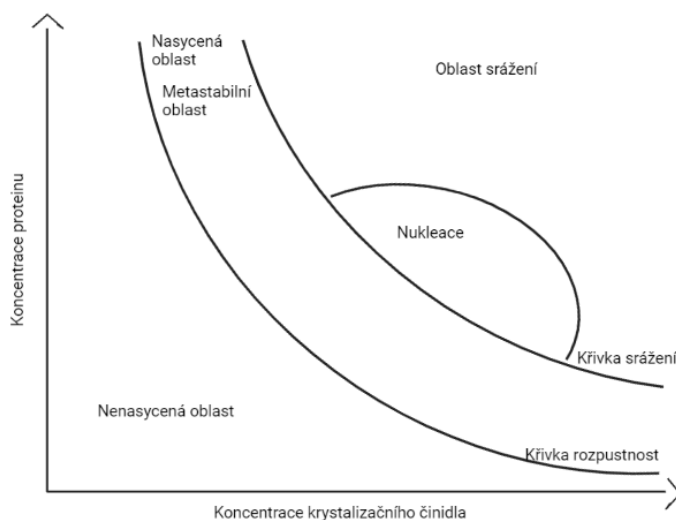
3.2.2 Proteinová krystalografie

3.2.2.1 Krystalizace

Proces krystalizace se skládá z hledání individuálních podmínek a parametrů ideálních pro vznik krystalů a jejich následné optimalizace. Nejprve se začíná s navyšováním koncentrace precipitačního činidla a následně se modifikují další parametry ovlivňující krystalizaci (pH, teplota, koncentrace proteinu a typ rozpouštědla). Snahou je dojít ke zjištění precipitačního bodu roztoku (Cordara *et al.*, 2013; Kutá Smatanová, 2006). I nepatrná změna může ovlivnit vznik krystalů. Cílem je vznik kvalitních, stabilních krystalických jader, z kterých vznikají monokrystaly sloužící pro X-ray strukturní analýzu. Proces krystalizace

nemusí být vždy úspěšný, mohou vznikat precipitace, nekystalické gely, amorfni precipitace, nebo nedojde k žádné změně a roztok zůstane čirý. Další obtížnost procesu krystalizace je dána složitostí, labilitou a dynamickými vlastnostmi biomakromolekul (Kutá Smatanová, 2006).

Tvorba krystalů je popsána třemi fázemi: nukleace, růst a ukončení růstu. Fáze nukleace je charakterizována oboustranným kontaktem vhodně orientovaných molekul, dochází k překročení limitu nasycení a tato fáze končí ve chvíli, kdy se vytvoří precipitát, nebo submikroskopická jádra. Následuje fáze růstu krystalů, při které dochází k interakci molekul nebo iontů s povrchem krystalického jádra a jejich uspořádání na tomto povrchu, a tím dochází k zvětšování krystalů. Konečnou fází je zastavení růstu krystalů, kdy krystaly už nezvětšují svoji velikost (Kutá Smatanová, 2006). Graficky lze proces krystalizace popsat pomocí fázového diagramu na Obr. 1.



Obr. 1: Fázový diagram krystalizace (vytvořeno autorkou, inspirováno [Kutá Smatanová, 2006]).

K náročnosti procesu krystalizace se řadí nalezení vhodných krystalizačních podmínek pro tvorbu krystalů. Nejvíce se čerpá z informací předchozích krystalizačních experimentů. V současné době se hojně využívají komerčně vyráběné sady krystalizačních roztoků, které lze popsat jako specifický set obsahující předem připravené precipitační roztoky jako startovací sadu. Další možností je využití mřížkovaných screenů PEG-pH. Dále lze také využít veřejně dostupný krystalizační predikční web (např. the SECRET server, the XtalPred server, the ParCrys server), které jsou založeny na krystalizačních predikčních algoritmech z již provedených úspěšných krystalizací (Cordara *et al.*, 2013).

3.2.2.1.1 Krystalizační metody

Existuje několik standartních krystalizačních technik, které se používají k experimentům. Mezi nejběžnější patří dialýza a difúze. Principem je regulované převedení proteinového roztoku do stavu nasycení na základě difúze par s použitím daných precipitantů (Kutá Smatanová, 2006).

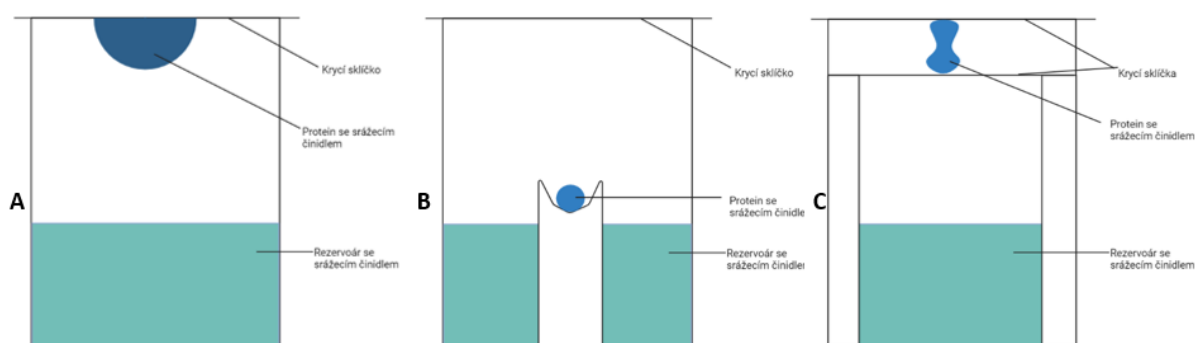
Přesycení roztoku u metod založených na difúzi par se dosáhne na základě vypařování par rozpouštědla. Je efektivní pracovat s malými kapkami. Bylo zjištěno, že pro dosažení rovnovážného stavu, při kterém dochází k vyloučení krystalů za určitých podmínek, je třeba mít minimální energii pro daný objem krystalu. Dochází k přesunu vody či jiné těkavé látky z roztoku proteinu do kapky rezervoáru na základě rozdílných koncentrací. Kapka proteinu obsahuje pufr, precipitant a aditivum, naproti tomu kapka rezervoáru obsahuje stejné složky až na roztok proteinu. Optimalizovat podmínky nukleace pro krystalizaci lze v tomto případě měnit úpravou obsahu srážecího činidla, dále to lze využít pro zvýšení stabilizace proteinu či pravděpodobnost krystalizace. Prostředí, ve kterém se provádí metody difúze par, je utěsněné prostředí. Je několik typů kapek pro metody založené na difúzi par: kapka visící, sedící a sendvičové (Mahon *et al.*, 2018; Kutá Smatanová, 2006).

Metoda difúze par se nejvíce využívá pro získání krystalů serpínů. Pro serpiny platí stejná pravidla pro tvorbu krystalů touto metodou jako pro ostatní proteiny (Mahon *et al.*, 2018). S vývojem robotických technologií pro krystalizaci se zmenšil potřebný objem kapek (z mililitrů na nanolity). Krystalizace antitrombinu byl speciální případ ve srovnání s ostatními serpiny. Krystalizoval heterodimer a došlo k tomu, že v krystalu byla přítomna molekula aktivního a molekula latentního antitrombinu, tzn., podmínky pro růst byly rozdílné a muselo nejdříve dojít k tvorbě latentního antitrombinu za určitých podmínek a za určitého času, aby tam bylo dostatečné množství latentní formy (Read *et al.*, 2011; Carrell *et al.*, 1994).

Metoda visící kapky (hanging-drop vapor diffusion) patří mezi jednu z nejpoužívanějších krystalizačních metod a i nejméně náročných. Uspořádání pro tuto metodu (Obr. 2 A), je takové, že rezervoár je částečně naplněn matečným roztokem. Dále je rezervoár překryt mikroskopickým krycím sklíčkem, kde na vnitřní straně visí kapka obsahující roztok s proteinem. K zajištění utěsnění systému je využít silikonový tuk nebo viskózní olej. Při výběru správných podmínek dojde k nárůstu krystalu proteinu (Mahon *et al.*, 2018).

Metoda sedící kapky (sitting-drop vapor diffusion) se též řadí mezi populární metody. Používají se destičky o 24 či až 96 jamkách pro větší možnost vyhledání nejlepších krystalizačních podmínek. Kapka roztoku s proteinem je umístěna nad rezervoár naplněným matečným roztokem (Obr. 2 B), roztok s proteinem má většinou nižší koncentraci precipitantu, než je v rezervoáru. Kapka sedí na vyvýšeném místě nad rezervoárem, někdy tam může být i více vyvýšených míst pro kapky s rozdílnými koncentracemi, ať už proteinu či srážecího činidla. Mezi výhody se řadí cenová dostupnost, časová nenáročnost, jednoduchost použití, kapky jsou umístěny ve stabilní sedící poloze (Hampton Research, 2019).

Metoda sendvičové kapky (sandwich-drop vapor diffusion) se především využívá pro větší kapky. Tato metoda je založena na principu umístění kapky proteinu se srážecím činidlem mezi dvě sklíčka (Obr. 2 C), kde horní sklíčko uzavírá celý systém a spodní odděluje kapku od rezervoáru se srážecím činidlem. Mezi výhody patří možnost vyjmutí sklíček držící kapku pro její zkontrolování bez rušení, snadné nasazování krystalů a jejich manipulace a samozřejmě i jejich dlouhodobé uchování (Hampton Research, 2019).



Obr. 2: Metody založené na difuzi pár. **A** Schéma metody visící kapky, **B** Schéma metody sedící kapky, **C** Schéma metody sendvičové kapky, (vytvořeno autorkou, inspirováno [Hampton Research, 2019]).

Existuje mnoho dalších metod, jejichž přehled je zobrazen v Tab. I.

Tab. I: Přehled dalších krystalizačních metod

Název metody	Podtyp metody	Obrázek	Výhody	Nevýhody
Dialýza	Mikrodialýza		Snadná změna koncentrace rezervoáru, modulace rychlosti dosažení rovnováhy	Nelze využít PEG
Přímé přesycení roztoku	Dávková		Jednoduchost přípravy	Rychlá ekvilibrace, která může ovlivnit rychlost růstu a kvalitu krystalu, roztok může vyschnout
	Mikrokrystalizace pod olejem		Jednoduchost, rychlost, ochrana krystalu před vysušením	Rychlá ekvilibrace, která může ovlivnit rychlost růstu a kvalitu krystalu
Volné difúze			Získání kvalitních větších krystalů	Nutnost velkého objemu vzorku
Difúze přes překážku			Možnost otestování větší škálu podmínek, všechny kroky se mohou provádět bez dotyku krystalů	Nutnost velkého objemu vzorku

3.2.2.2 X-ray krystalografie

X-ray krystalografie se využívá k zjištění struktury až k atomovému rozlišení u krystalizovaných molekul. V roce 1895 bylo poprvé X-ray záření popsáno Wilhelmem Röntgenem. Při X-ray difrakční analýze dochází k interakci elektromagnetického záření (v rozmezí 0,01 – 10 nm) s nějakou formou zkrystalizované látky (Huxford, 2013).

Pro stanovení struktury serpinů se využívají stejné obecné metody jako pro ostatní makromolekuly. Nejprve je potřeba krystal v dobré difrakční kvalitě, zpracovat difrakční data, určit fáze a mapy elektronové hustoty, a nakonec upřesnit a ověřit vytvořený 3D model dané makromolekuly, takto zjednodušený postup je vyobrazen na Obr. 3 (Mahon *et al.*, 2018).



Obr. 3: Obecný postup X-ray krystalografie (vytvořeno autorkou; mapa elektronové hustoty převzata z [Mahon *et al.*, 2018], finální model struktury [PDB ID: 7B2T]).

Na sběr dat je potřebný zdroj produkující X-ray paprsek, často se využívá synchrotronové záření. Paprsek nasměrovaný na krystal vytváří difrakční obrazec, který je nakonec přečten. Krystal je vystaven záření určitou dobu. Získaná data jsou dále zpracována a vytvoří se mapa elektronové hustoty, která nese informace o struktuře krystalu. Při experimentu se krystal udržuje při teplotě okolo 100 K pomocí „kryoproudu“ (tekutý dusík). Pro vytvoření 3D struktury se musí shromáždit difrakční snímky z různých úhlů krystalu. Nejčastěji se využívá goniometr k rotaci okolo krystalu (Elton *et al.*, 1966; Sliz *et al.*, 2003; Mahon *et al.*, 2018).

K nevýhodám X-ray krystalografie se řadí absence informací o fázových úhlech, které jsou potřebné pro výpočet map elektronové hustoty (Mahon *et al.*, 2018).

Proces určování a analýzy serpinových struktur je obtížnější ve srovnání s ostatními proteiny. Složitost určení struktury je dáno vnitřní konformační flexibilitou, především RCL. Uspořádání krystalu mohou narušit i posttranslační modifikace serpinů. Před dokončením modelu struktury serpinů jako u všech proteinů je nutné ověřit strukturní a chemickou geometrii, jakékoli ligandy, nebo rozpouštědla. To se provádí po dokončení výpočtu nejpřesnější elektronové mapy. Nově určené serpinové struktury je také nutné podrobit validaci s tím, co je známo o proteinových strukturách a serpinové biologii jako celku (Mahon & Ambadapadi *et al.*, 2018; Mahon *et al.*, 2018).

3.2.2.3 Neutronová krystalografie

Experimenty neutronové difrakce jsou podobné X-ray krystalografii, i zde je nutná krystalizace vzorku. Po krystalizaci je možné zahájit ozáření neutronovým paprskem. Poté dochází k Braggově difrakci. Data se sbírají na detektoru. Sběr dat trvá týdny až měsíce a jsou potřeba krystaly o velikosti mm a to kvůli nízkému produkovanému toku neutronového zdroje. Kvůli těmto požadavkům není moc vyřešených struktur touto metodou (Blakeley *et al.*, 2008; Mahon *et al.*, 2018).

Tato metoda se používá především pro vyřešení postavení vodíků ve struktuře. Vodíky a jejich vazby jsou nutné pro pochopení makromolekulárních interakcí. Též je možno i vyřešit postavení atomů vodíků méně uspořádaných nebo přechodných. Výhodou je zamezení radiačního poškození a možnost sběru dat za pokojové teploty. Především se toho využívá ve farmaceutickém průmyslu. V budoucnu díky zlepšujícím se technologiím bude možný sběr dat krystalů serpinů a jejich komplexů (Mahon *et al.*, 2018).

3.2.3 Kryo – elektronová mikroskopie

Tato metoda se využívá ke studii velkých makromolekul a jejich komplexů. Umožňuje vyřešení struktury až na atomové uspořádání. Funguje na principu, kdy rychlý vysokoenergetický paprsek se zaostří a do vzorku je uveden pomocí elektromagnetických čoček, detektor vybere výsledné elasticky rozptýlené elektrony, a nakonec detektor vytvoří 2D zvětšený obraz dané molekuly. Tato metoda se může přirovnat ke klasické mikroskopii, rozdíl spočívá v použití typu světla. U kryo – EM se využívá svazek elektronů o vlnové délce nižší, než je angstrom, což zajišťuje informace o atomovém rozložení vzorku, a tím se získají přesnější výsledky než u klasické mikroskopie. Výsledné obrazy v 2D lze pomocí složitých schémat zpracovat a vytvořit 3D model s vysokým rozlišením. Mezi nevýhody se řadí poškození vzorku, které je způsobené použitím vysokoenergetického elektronového paprsku. Na základě tohoto poškození může dojít ke ztrátám informací o vysokém rozlišení. Aby se takovému poškození zabránilo, dochází k vitrifikaci při teplotě kolem 70 K. Vitřifikace uchová vzorek v amorfní vrstvě molekul vody, což sníží poškození (Thompson *et al.*, 2016; Mahon *et al.*, 2018).

Kryo – EM se zatím nevyužívá u serpinů k určování jejich struktury. Problém je ve velikosti serpinů, nachází se mimo detekční limit pro kryo – EM. Na druhou stranu je zde možnost využít tuto metodu u agregátů velkých serpinových komplexů (Mahon *et al.*, 2018).

4 Materiál a metody

Cílem bakalářské práce bylo vypurifikovat studovaný protein pomocí standartních chromatografických metod, charakterizovat studovaný protein a nalézt vhodné krystalizační podmínky. Studovaný protein Iripin-5 zakomponovaný v plazmidu pET 17b byl poskytnut z Katedry medicínské biologie, PřF, JČU.

4.1 Použité chemikálie a materiály

Kompetentní buňky

Název	Výrobce
BL21(DE3)	New England Biolabs, Inc. (USA)
BL21(DE3) – CodonPlus	Invitrogen
Rosetta – gami 2 (DE3)	Novagen, Sigma – Aldrich (Německo)

Chemikálie pro transformaci, pilotní expresi, expresi ve velkém měřítku

Název roztoku	Složení
SOC médium	2% bacto-trypton, 0,5% bacto-yeast extract, 0,05% NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , 20 mM glukóza, pH 7,0; sterilní
LB médium	1% bacto-trypton, 0,5% bacto-yeast extract, 0,5% NaCl, pH 7,0; sterilní
TB médium	1,2% tryptone, 2,4% yeast extract, 0,5% glycerol, 10X TB salt (170 mM KH ₂ PO ₄ , 72 mM K ₂ HPO ₄)
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactoside (zásobní roztok: 1 M)
AMP	Ampicilin (zásobní roztok: 50 mg*ml ⁻¹ H ₂ O)
CHLO	Chloramfenikol (zásobní roztok: 50 mg*ml ⁻¹ H ₂ O)

Analýza vzorků

Název roztoku	Složení
Lyzační pufr	50 mM PB (1 M K ₂ HPO ₄ , 1 M KH ₂ PO ₄), 400 mM NaCl, 100 mM KCl, 10% glycerol, 0,5% triton X – 100, 10 mM imidazol, DNAza (10μl*ml ⁻¹), proteázové inhibitory (Protease Inhibitor Cocktail Tablets, EDTA-Free, Sigma – Aldrich, Německo); pH 7,8; filtrován
SDS-PAGE vzorkový pufr	250 mM Tris – HCl (pH 6,8), 8% sodium dodecyl sulfate (SDS), 0,2% bromophenol blue, 40% glycerol, 20% β-merkptoethanol
40% AA	Akrylamid a bisakrylamid (37,5 : 1)
ddH ₂ O	Destilovaná deionizovaná voda
Gelový pufr	Separáčnı gel (1,5 M Tris, pH 8,8) Zaostřovací gel (1 M Tris, pH 6,8)
10% SDS	Laurylsulfát sodný
10% APS	Amonium persulfát
TEMED	N, N, N', N'- tetramethylethylendiamin
Elektrodový pufr	15,1 g Tris, 72,0 g glycinu, 5,0 g SDS a 1000 ml destilované vody

Marker	PageRuler Prestained Protein Ladder
Fixační roztok	50% ethanolu, 2% kyseliny fosforečné a destilovaná voda
Barvicí roztok	Coomasie blue

Pufry

Název pufru	Složení
AE ekvilibrační	50 mM Tris, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8
AE eluční	50 mM Tris, 1 M NaCl, 1 mM EDTA, pH 8
Buffer Exchange	20 mM Tris, 200 mM NaCl, pH 8
SEC	50 mM Tris, 200 mM NaCl, pH 8
Lyzační pufr pro inkluzní tělíska	50 mM Hepes, 6 M Guanidín, 5 mM DTT, 1 mM EDTA, pH 8
Pro refolding purifikaci AE ekvilibrační	6 M Urea, 50 mM Tris, 200 mM NaCl, pH 8
Pro refolding purifikaci AE eluční	6 M Urea, 50 mM Tris, 1 M NaCl, pH 8
Dialyzační	20 mM Tris, 20 mM NaCl, pH 8

4.2 Transformace

Studovaný protein Iripin-5 byl zakódovaný v expresním vektoru pET 17b. Koncentrace plazmidové DNA studovaného proteinu byla $133 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. Transformace byla provedena pomocí transformačních protokolů pro daný typ kompetentních buněk.

Všechny kompetentní buňky byly dány na led na 10 minut. Ke kompetentním buňkám BL21(DE3), BL21(DE3) – CodonPlus, Rosetta – gami 2 (DE3) byl přidán 1 μl roztoku plazmidové DNA o dané koncentraci. Zkumavka se směsí byla opatrně 4 – 5x protřepána a ponechána na ledu 30 minut. Tepelný šok byl proveden při teplotě $42 \text{ }^\circ\text{C}$ ve vodní lázni pro kompetentní buňky BL21(DE3) na 10 sekund, pro BL21(DE3) – CodonPlus 20 sekund, pro Rosetta-gami 2 (DE3) na 30 sekund. Během tepelného šoku došlo k proniknutí plazmidu do kompetentních buněk. Směs byla znovu ponechána na ledu na 5 minut. Ke každé směsi bylo přidáno 200 μl SOC média o pokojové teplotě. Následně byly směsi vloženy do třepačky na 180 rpm / $37 \text{ }^\circ\text{C}$ / 60 minut. Předem byly nahřáty agarové plotny vhodné pro rozdílné typy kompetentních buněk na $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Pro kompetentní buňky byly použity: BL21(DE3) ampicilinové, BL21(DE3) – CodonPlus ampicilinové s chloramfenikolem, Rosetta-gami 2 (DE3) ampicilinové. Nakonec byly směsi rozetřeny na příslušné plotny, na jednu plotnu 50 μl směsi a na další plotnu zbylý objem. Inkubace bakteriálních kolonií byla provedena přes noc při teplotě $37 \text{ }^\circ\text{C}$.

4.3 Pilotní exprese

Pro pilotní expresi bylo potřeba připravit zkumavky o velikosti 50 ml s 15 ml LB média. Dále byla přidána antibiotika, aby výsledná koncentrace byla u všech 1 mM, ampicilin pro BL21(DE3), ampicilin a ampicilin s chloramfenikolem pro BL21(DE3) – CodonPlus, ampicilin pro Rosetta-gami 2 (DE3). Následně pomocí pipetovací špičky byla vybrána příslušná kolonie z příslušné agarové plotny a byla vložena do zkumavky. Tyto kroky byly aplikovány stejně i pro TB médium. Všechny zkumavky byly vloženy do třepačky na 180 rpm / přes noc / 37°C.

Následující den byly připraveny zkumavky pro 48 různých podmínek. Do každé zkumavky bylo odpipetováno 15 ml LB/TB média, příslušná ATB s výslednou koncentrací 1 mM a 1 ml vypěstovaných buněk z předešlého kroku. Zkumavky byly dány do třepačky na 180 rpm / 37°C. Po dosažení OD₆₀₀ bylo přidáno IPTG jako induktor tak, aby výsledná koncentrace byla 1 mM. Některé zkumavky nebyly indukovány, byly využity jako kontrola indukce. Po dosažení hodnoty OD₆₀₀ a indukci byly zkumavky ještě dále rozřazeny dle podmínek v Tab. II, ve kterých byl dokončen jejich růst. Dokončení růstu bylo provedeno v třepačce při 180 rpm.

Tab. II: Rozdělení zkumavek dle rozdílných podmínek.

Buňky	Antibiotikum	Médium	Indukce	Teplota
BL21 (DE3)	AMP	LB	+	18°C
				25°C
				37°C
			-	18°C
				25°C
				37°C
		TB	+	18°C
				25°C
				37°C
			-	18°C
				25°C
				37°C
BL21(DE3) – CodonPlus	AMP	LB	+	18°C
				25°C
				37°C
			-	18°C
				25°C
				37°C
		TB	+	18°C
				25°C
				37°C

	AMP + CHLO	LB	-	18°C
				25°C
				37°C
			+	18°C
				25°C
				37°C
	TB	+	18°C	
			25°C	
			37°C	
		-	18°C	
			25°C	
			37°C	
Rosetta – gami 2 (DE3)	AMP	LB	+	18°C
				25°C
				37°C
			-	18°C
				25°C
				37°C
	TB	+	18°C	
			25°C	
			37°C	
		-	18°C	
			25°C	
			37°C	

Postupně byly odebrány 1 ml vzorky pro analýzu. Nejprve byly odebrány při nulté hodině, tj. hned po indukování. U teplot 25 °C a 37 °C byly odebrány ještě po třech hodinách a po šesti hodinách. U teploty 18 °C byly odebrány po šesti hodinách a po 16 hodinách. Vzorky byly následně po odebrání stočeny na 12 000 rpm / 1 minutu. Buněčný pelet byl ponechán bez zbylého média a uložen do mrazáku při teplotě -21°C.

4.4 Analýza přítomnosti proteinu

4.4.1 Příprava vzorků z pilotní exprese

K buněčným peletům všech vzorků bylo přidáno 200 µl lyzačního pufru. Buňky byly fyzikálně rozbity způsobem: 3krát po sobě zmrazeny v tekutém dusíku a poté rozmražené při 42°C. Vzorky byly stočeny na centrifuze na 14 000 rpm / 2 minuty / 4°C. Supernatant byl odebrán do nové zkumavky. K peletu bylo přidáno 250 µl 1x SDS-PAGE vzorkového pufru.

K supernatantu bylo přidáno odpovídající množství 4x SDS-PAGE vzorkového pufru. Zkumavky jak pro pelet i supernatant byly povařeny 5 minut na termobloku při teplotě 95°C.

4.4.2 Příprava 12,5% gelu

Před přípravou samotného gelu byla sestavena aparatura pro přípravu gelů. Příprava gelu byla zahájena nejprve přípravou spodního separačního gelu, složení je uvedeno v Tab. III. Roztok byl nalit do aparatury na přípravu gelů a převrstven propanolem sloužící na vyrovnání hladiny gelu. Polymerace trvala 40 minut.

Následně byl propanol slit a gel byl promyt pomocí destilované vody. Poté byl připraven zaostřovací gel podle Tab. III. Po nalití zaostřovacího gelu byl vložen plastový hřeben pro vytvoření jamek sloužící pro nanesení vzorku. Polymerace trvala 30 minut. Plastový hřeben byl vyndán a gel byl hotový pro okamžité použití, nebo byl uložen do lednice pro pozdější použití.

Tab. III: Složení separačního a zaostřovacího gelu.

Separací gel 12,5%	Objem [ml]	Zaostřovací gel	Objem [ml]
40% AA	12,5	40% AA	2
H ₂ O	16,66	H ₂ O	11,66
1,5 M Tris, pH 8,8	10	1 M Tris, pH 6,8	2
10 % SDS	0,400	10 % SDS	0,160
10 % APS	0,400	10 % APS	0,160
TEMED	0,040	TEMED	0,016

4.4.3 SDS-PAGE elektroforéza

Vzorky získané z pilotní exprese a poté i z následujících metod byly zanalyzovány pomocí SDS-PAGE. Využití této metody bylo především ke kontrole studovaného proteinu – jeho čistoty a přítomnosti ve vzorku. Na první pozici gelu bylo napipetováno 5 µl markeru (PageRuler Protein Prestained Ladder, Thermo Fisher Scientific, USA). Marker ukazuje molekulové hmotnosti proteinů od 10 do 250 kDa. Do dalších jamek byly napipetovány vzorky o objemu 10 µl.

4.4.4 Hmotnostní spektrometrie

Pro další identifikaci a charakterizaci studovaného proteinu byla využita metoda hmotnostní spektrometrie. Po provedení gelové chromatografie byly vzorky zanalyzovány pomocí SDS-PAGE. Pro analýzu byl vybrán proužek studovaného proteinu z gelu, který byl

vyříznut skalpelem a přenesen do nové 1,5 ml zkumavky. Následně byl vyříznutý pruh zpracován podle protokolu na štěpení proteinů v gelu pomocí trypsinu (Schevchenko *et al.*, 2006). K odsolení vzorku byl využit disk C₁₈ EmporeTM (Rappsilber *et al.*, 2007).

K analýze peptidů byl využit systém nanoLC systém UltiMate 3000 RLSCnano (Thermo Fisher Scientific, USA) připojený online k hmotnostnímu spektrometru timsTOF Pro (Bruker Daltonics, Německo). Měření byla provedena v režimu Parallel Accumulation-Serial Fragmentation (PASEF) skenování s pozitivní polaritou, kdy je využito iontové mobility (trapped ion mobility spektrometry, TIMS). Použitá metoda separace proteinů pomocí nanoLC a parametry nastavené při měření na hmotnostním spektrometru byly popsány v článku (Forinová *et al.*, 2021). Ke zpracování dat byl využit software MaxQuant (verze 1.6.14) se zabudovaným vyhledávačem Andromeda (Cox *et al.*, 2008). K identifikaci studovaného proteinu byly použity databáze obsahující sekvenci proteinu Iripin-5 *Escheria coli* stažený z Uniport a databáze kontaminantů v softwaru MaQuant. Získané tabulky proteinových dat ze softwaru MaxQuant byly analyzovány pomocí softwaru Perseus (verze 1.6.14.0).

4.5 Exprese ve velkém měřítku

Na základě výsledků z pilotní exprese získaných pomocí SDS-PAGE byla započata exprese ve velkém měřítku. Na začátku byly připraveny zkumavky o objemu 50 ml, do kterých bylo nalito 15 ml LB média, příslušná ATB s výslednou koncentrací 1 mM a kolonie z plotny nabraná pomocí pipetovací špičky. Inkubace kultury probíhala v třepačce na 220 rpm / přes noc / 37°C.

Druhý den byly připraveny kultivační Erlenmayerovy láhve o objemu 2 l. Do nich bylo nalito 800 ml LB média, příslušná ATB s výslednou koncentrací 1 mM a obsah ze zkumavek z noční kultury. Láhve byly dány do třepačky na 220 rpm / 37°C. OD₆₀₀ bylo změřeno pomocí spektrofotometru. IPTG bylo přidáno do jedné kultivační nádoby s výslednou koncentrací 1 mM, do další bylo dáno s výslednou koncentrací 0,5 mM, dále byla i nádoba bez IPTG jako kontrola. Inkubace byla provedena v třepačce na 220 rpm / přes noc / 18°C. Před zahájením indukce v shakerech byl odebrán 1 ml pro pozdější analýzu.

Následující den byl před stočením kultur znovu odebrán 1 ml vzorku z každé Erlenmayerovy láhve. Centrifugace narostlých kultur byla provedena na 4200 rpm / 30 minut / 4°C. Supernatantu bylo ponecháno pouze cca 20 ml. Resuspendované buňky byly znovu dány do centrifugy v 50 ml zkumavkách na 4200 rpm / 20 minut / 4°C. Supernatant byl vylit

a pelet byl uložen na - 80°C pro další purifikační kroky. Po dokončení exprese ve velkém měřítku byla provedena SDS-PAGE elektroforéza.

4.6 Purifikace

4.6.1 Iontově výměnná chromatografie

Pro prvotní purifikaci byla použita iontově výměnná chromatografie, její podtyp anexová chromatografie. Na základě sekvence byl zjištěn izoelektrický bod studovaného proteinu, jehož hodnota byla zjištěna na 5,63. Díky této informaci byly připraveny pufry o odpovídajícím pH 8,0.

K buňkám, které byly uloženy v mrazáku na -80°C, bylo přidáno 50 ml lyzačního pufru s proteázovými inhibitory a DNazou. Lepšího rozpuštění buněk v roztoku bylo dosaženo zvortexováním. Po rozpuštění všech buněk v lyzačním pufru byly buňky rozbity na French pressu. Následně bylo provedeno stočení na ultracentrifuze na 40000 rpm / 1 hod / 4° C. Supernatant byl slit do nové zkumavky a pelet byl přendán do další zkumavky. Na základě výsledků z exprese ve velkém měřítku byla prvotní snaha získat protein ze solubilní části vzorku.

Pro anexovou chromatografii byla použita kolona HiTrap Q HP (od Cytiva Sweden AB) o objemu 5 ml. Kolona pro AE chromatografii byla udržována v 20% ethanolu, tzn., že před samotnou purifikací bylo provedeno promytí destilovanou vodou, elučním pufrem a ekvilibračním pufrem. Po promytí byl na kolonu nanesen supernatant při teplotě 4°C. Průtok byl nastaven na 1 ml*min⁻¹. Po zvýšení UV absorbance byl protein sbírán do frakcí o objemu 3 ml. Informace potřebné k purifikaci byly zaznamenány do chromatogramu, které byly vytvořeny pomocí GraphPad Prism verze 9.0.0 pro Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com". Frakce byly zanalyzovány na gelu. U sesbíraných frakcí byla změřena koncentrace pomocí Nanodrop One (Thermo Fisher Scientific, USA).

4.6.2 Gelová chromatografie

Před započítím další purifikace bylo provedeno zakoncentrování vzorku na 500 µl z 3 ml a výměna pufrů pro vzorky, které byly dále přečišťovány. Pro zakoncentrování a výměnu pufrů byl využit Amicon Ultra - 4 10K (Merck Millipore Ltd., Ireland). Pro výměnu pufrů byl využit příslušný pufr. Vzorky při zakoncentrování i výměně pufrů byly stáčeny na centrifuze na 4100 rpm / 4°C, dále pak byly vzorky zanalyzovány.

Pro další purifikaci byla využita gelová chromatografie s kolonou Superdex75 10/300 GL (Cytiva, USA). Kolona byla na počátku v 20% ethanolu, proto byla následně promyta destilovanou vodou a ekvilibrována pufrem pro SEC chromatografii. Vzorky o objemu 500 μ l byly nejdříve stočeny na centrifuze na 14 000 rpm / 2 minuty / 4 °C, poté byly nanесeny na kolonu. Průtok byl nastaven na 0,4 ml*min⁻¹. Sběr frakcí byl zahájen se zvyšující se UV absorbancí, jednotlivé frakce byly sbírány po objemu 500 μ l. Po ukončení sběru jednotlivých frakcí byla kolona promyta destilovanou vodou, a nakonec byla ponechána v 20% ethanolu. Průběhy chromatografií byly zaznamenány do chromatogramu, které byly vytvořeny pomocí GraphPad Prism verze 9.0.0 pro Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com". Nasbírané frakce byly zanalyzovány a byla u nich změřena i koncentrace pomocí Nanodrop One (Thermo Fisher Scientific, USA). Část vzorků o objemu 500 μ l byla rozdělena po 100 μ l do 0,5 ml zkumavek, zmrazení bylo provedeno pomocí tekutého dusíku a byly uloženy do mrazáku na -80°C. Zbylá část byla použita pro krystalizaci Iripin-5.

4.6.3 Purifikace z inkluzních tělísek

Po přidání lyzačního pufru a rozbití buněk pomocí French pressu byly pomocí ultracentrifugy rozděleny buňky na supernatant a pelet. K peletu byl přidán pufr na rozbití inkluzních tělísek a velké kousky peletu byly rozřezány skalpelem pro jednodušší resuspendaci. Tato zkumavka byla ponechána na míchačce cca 24 hodin ve 4°C. Směs poté byla zcentrifugována na ultracentrifuze na 40000 rpm / 1 hod / 4° C. Supernatant byl dán do nové zkumavky a pelet byl vyhozen. Koncentrace supernatantu byla změřena na 8,6 mg*ml⁻¹ pomocí Nanodrop One.

Před zahájením refoldingu byla u supernatantu inkluzních tělísek provedena iontově výměnná chromatografie. Po zanalyzování výsledků byl zahájen refolding použitím 1 ml vzorky do dialyzačního střeva o velikosti pórů 14 kDa spolu s příslušným pufrem na refolding o objemu 85 ml. Výsledná koncentrace supernatantu inkluzních tělísek byla 0,1 mg*ml⁻¹. Naplněné dialyzační střevo bylo dáno do válce (1 l) s magnetickým míchadlem. Na počátku bylo složení pufru ve válci 1 l refoldovacího pufru. Po následující týden byla prováděna postupná výměna pufru, kdy byl postupně nahrazován dialyzačním pufrem. Po dokončení refoldingu byl supernatant inkluzních tělísek vylit ze střev do zkumavky.

Purifikace solubilní části proteinu z inkluzních tělísek byla provedena jako pro supernatant solubilní části. Nejprve byla provedena iontově výměnná chromatografie,

po zanalyzování na gelu byla provedena gelová chromatografie. Nakonec bylo i po dokončení gelové chromatografie zrealizováno zanalyzování.

4.7 Krystalizace lysozymu

Základní krystalizační metody byly nejprve vyzkoušeny na modelovém proteinu. Lysozym byl vybrán díky jednoduchosti krystalizace. Byly vyzkoušeny dvě metody. Nejprve byla vyzkoušena metoda sedící kapky („sitting drop“) a následně visící kapka („hanging drop“). Pro metodu sedící kapky byla vybrána příslušná 24 jamková krystalizační destička. Do rezervoáru bylo napipetováno pomocí automatické pipety 50 μ l precipitačního činidla: 50 mM octan sodný a NaCl o koncentracích 4 %, 6 %, 8 %, 10 %, 12 %. Do příslušného důlku bylo vždy napipetováno 1 μ l roztoku precipitačního činidla (o stejné koncentraci jako v rezervoáru) a 1 μ l lysozymu, oba tyto roztoky byly promíchány pomocí automatické pipety. Krystalizační destička byla zalepena krystalově čistou páskou, aby byla vytvořena uzavřená soustava pro jednotlivé důlky na krystalizační destičce.

Druhou provedenou metodou byla krystalizace metodou visící kapky („hanging drop“). Do rezervoáru bylo napipetováno 50 μ l precipitačního činidla: 50 mM octan sodný a NaCl o koncentracích 4 %, 6 %, 8 %, 10 %, 12 %. Na krycí sklíčko bylo napipetováno 1 μ l roztoku činidla (o stejné koncentraci jako v rezervoáru) a 1 μ l lysozymu. Roztok precipitačního činidla a roztok lysozymu byl dohromady promíchán. Sklíčko bylo položeno nad rezervoár a přitlačeno do silikonového kroužku na destičce, aby byl zajištěn vznik uzavřené soustavy.

4.8 Krystalizace Iripin-5

4.8.1 Pre-krystalizační test

Před samotnou krystalizací studovaného proteinu byl proveden pre-krystalizační test metodou sedící kapky. Tímto testem byla zjištěna vhodná koncentrace pro krystalizační experimenty. Byla využita komerčně vyráběná sada PCT Pre-Crystallization Test (Hampton Research, USA).

4.8.2 Krystalizační screening Iripin-5 pomocí krystalizačního robota

Pro krystalizační screening byly využity komerčně vyráběné sady s precipitačními činidly: JCSG++ (Jena Bioscience, USA), SG1 a PGA (Molecular Dimension, USA), PEGRx a PEG/Ion (Hampton Research, USA). Seznam podmínek u jednotlivých precipitačních činidel je uveden v Přílohách č. 2, 3, 4, 5, 6.

Ke krystalizačnímu screeningu byl využit krystalizační robot (OryxNano crystallization robot, Douglas Instruments, Velká Británie). Komerčně vyráběné sady precipitačních činidel byly použity za účelem zjištění vhodných podmínek pro tvorbu krystalů. Krystalizační robot byl využit za účelem rychlejšího rozkapání do destiček. U všech krystalizačních screeningů byl postup rozkapání stejný. Pro rozkapání pomocí robota byla využita 96 jamková destička (MRC 2-Drop Plate, Hampton Research, USA). Do rezervoáru bylo napipetováno 50 μ l precipitačního činidla podle seznamu od výrobce. Do jamky A1 bylo napipetováno první precipitační činidlo (A1) ze seznamu a tímto způsobem byla napipetována celá destička. Vzorek proteinu byl v pufru o složení: 20 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl. Krystalizace byla provedena metodou difúze par, konkrétně podtypem sedící kapky. Nad rezervoárem byl roztok proteinu o objemu 1 μ l smíchán s činidlem v rezervoáru o objemu 0,5 μ l nebo 1 μ l. Každá destička byla izolována krystalově čistou lepicí páskou a dána do lednice na 4°C. K průkaznosti, že studovaný vzorek obsahoval protein a nebyla vykrystalizována pouze sůl, byl použit mikroskop pro detekci propustnosti UV záření (JANSI UVEXm Imaging Systems, SWISSCI, Velká Británie).

5 Výsledky

V této části bakalářské práce byly zaznamenány výsledky experimentů potřebných pro produkci a vykrystalizování proteinu Iripin-5 ze skupiny serpinů. Byly provedeny experimenty od transformace proteinu až k získání proteinových krystalů v dostačující difrakční kvalitě.

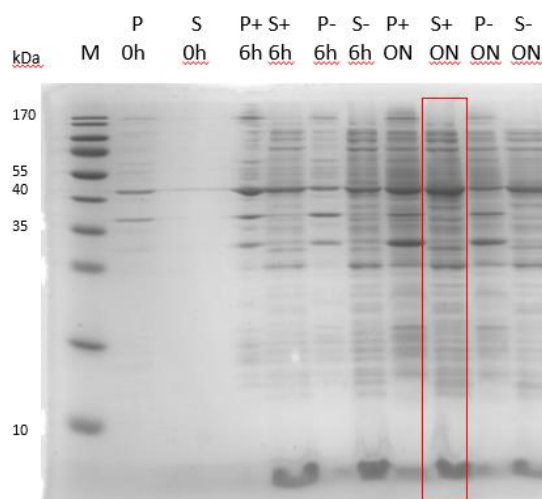
5.1 Pilotní exprese proteinu Iripin-5

Pilotní exprese byla provedena pro zjištění vhodných podmínek pro namnožení studovaného proteinu v expresních systémech. Studovaný protein, který byl v plazmidu pET17b, byl transformován do kompetentních buněk *E. coli*: BL21(DE3), BL21(DE3) – CodonPlus, Rosetta gami 2 (DE3). Pro růst kolonií při 37°C kompetentních buněk byly vybrány plotny: ampicilinové a ampicilinové s chloramfenikolem.

Pilotní exprese byla provedena pro všechny typy narostlých kolonií. Namnožení kultivačních směsí bylo provedeno přes noc a následující den byl zahájen růst kompetentních buněk v podmínkách zaznamenaných v Tab. II. Po ukončení růstu byly vzorky zanalyzovány.

Na Obr. 4 byl zachycen výsledek SDS – PAGE pro kompetentní buňky BL21(DE3) – CodonPlus kultivované v LB médiu s AMP, které byly naprodukovány při 18°C. Nejlepší produkce solubilního proteinu byla s induktorem o koncentraci 1 mM po inkubaci přes noc. Ale zároveň lze vidět, že i v neindukovaném vzorku byl protein produkován.

Na základě výsledků získaných z SDS-PAGE (Obr. 4), byly vybrány kompetentní buňky BL21(DE3) – CodonPlus. Studovaný protein se nachází okolo velikosti 42 kDa a byl zobrazen v červeném rámečku. Při porovnání výsledků z SDS-PAGE je zřejmé, že studovaný protein byl v těchto buňkách produkován dostatečně pro následující experimenty. Výsledky ostatních buněk viz Příloha č. 7.



Obr. 4: Pilotní exprese BL21(DE3) – CodonPlus, LB médium, 18°C; M – marker, P – pelet, S – supernatant, 0h – nula hodin, 6h – šest hodin, ON – overnight (přes noc), [+] – 1 mM IPTG, [-] – negativní kontrola (pořízeno autorkou).

5.2 Hmotnostní spektrometrie

Analýzou vyříznutého proužku proteinu z SDS-PAGE gelu pomocí hmotnostní spektrometrie byla potvrzena přítomnost proteinu Iripin-5 (Obr. 5). Celkem bylo identifikováno 55,8 % peptidů přiřazených k proteinu Iripin-5. Podrobnější údaje o analýze byly zaznamenány v Přílohách č. 8 a 9.

IRS5, 211210_IRS5

MRYENEMRLANNRFAVDLLRGLPSSPEKNIFFSPYSISTAMGMVFAGAKGETLKNLYDGF
 GYLRSGLKEDWVLQAYADHAKQLQVGGQSSTFDVANAAAIHERLALLSAYENTLDSTFHA
 QLLKVDFVNGGPAIDEINRWVKQKTHDKIDKLFDGPLDPLTRLVLLNAIFFKGVWSTKF
 DENATTKKQFLNGGTTPTQVDTMTKSIRIGYKLLPTMRLEIAELPYDGGNYSMVILLPRG
 SEGIEAFKHSLTDHRLQDYIGHVELREVAVSLPKFKLETEYSLKDSLKSLGITEIFGTQA
 DLSGISSDGELVVS DVVHKAVVEVNEEGTEAAAVSGVAVVTRLIEVPTLELNVNQPFLLF
 IRNTHTKDLLFAGQVNH

Obr. 5: Pokrytí sekvence proteinu Iripin-5 analyzovaného pomocí timsTOF Pro.

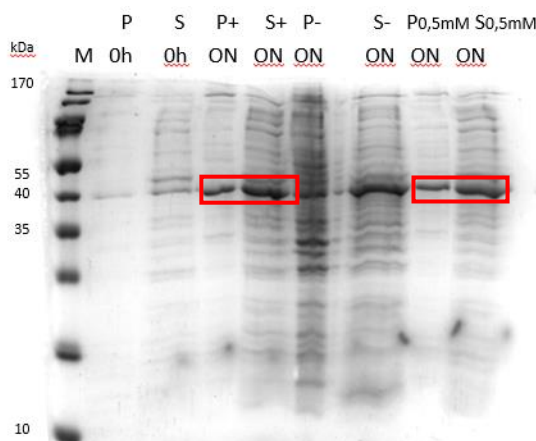
Identifikované aminokyseliny byly zvýrazněny červeně.

5.3 Exprese ve velkém měřítku

Exprese ve velkém měřítku byla provedena pro kompetentní buňky BL21(DE3) – CodonPlus. Nejprve den před zahájením produkce byla kultura buněk namnožena přes noc. Následující den tedy došlo k produkci buněk v LB médiu s AMP. Po dosažení $OD_{600} = 0,562$ po 2,5 hodinách bylo přidáno IPTG v koncentraci 1 mM nebo 0,5 mM. Důvodem dvou rozdílných koncentrací IPTG bylo zjištění, zda rozdílná koncentrace IPTG bude mít vliv

na produkci proteinu. Kontrola byla provedena pomocí buněk bez IPTG. Buňky byly dány do shakeru na 200 rpm / přes noc / 18°C. Následující den byly stočeny na ultracentrifuze a pelety byly dány do mrazáku na - 80°C. Během exprese ve velkém měřítku byly sbírány vzorky, které byly zanalyzovány na SDS – PAGE (Obr. 6).

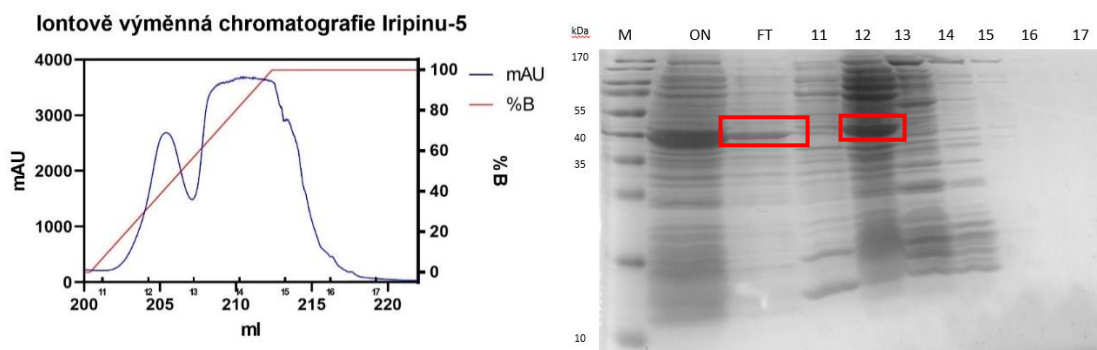
Na Obr. 6 byl zachycen výsledek SDS – PAGE exprese ve velkém měřítku. Bylo zaznamenáno, že v indukovaných buňkách byl studovaný protein produkován, jak když bylo dáno 1 mM IPTG tak i 0,5 mM IPTG (viz červené rámečky). Z výsledku bylo vyvozeno, že studovaný protein je produkován jak při koncentraci 0,5 mM IPTG tak i při 1 mM IPTG. Dále z obrázku bylo zaznamenáno, že protein byl produkován v inkluzních tělískách tak i v solubilní části. V neindukované části bylo zaznamenáno větší množství proteinů z expresních buněk.



Obr. 6: Exprese ve velkém měřítku BL21(DE3) – CodonPlus, LB médium, 18°C; M – marker, P – pelet, S – supernatant, 0h – nula hodin, ON – overnight (přes noc), [+] – 1mM IPTG, [-] – negativní kontrola, 0,5 mM – koncentrace IPTG (pořízeno autorkou).

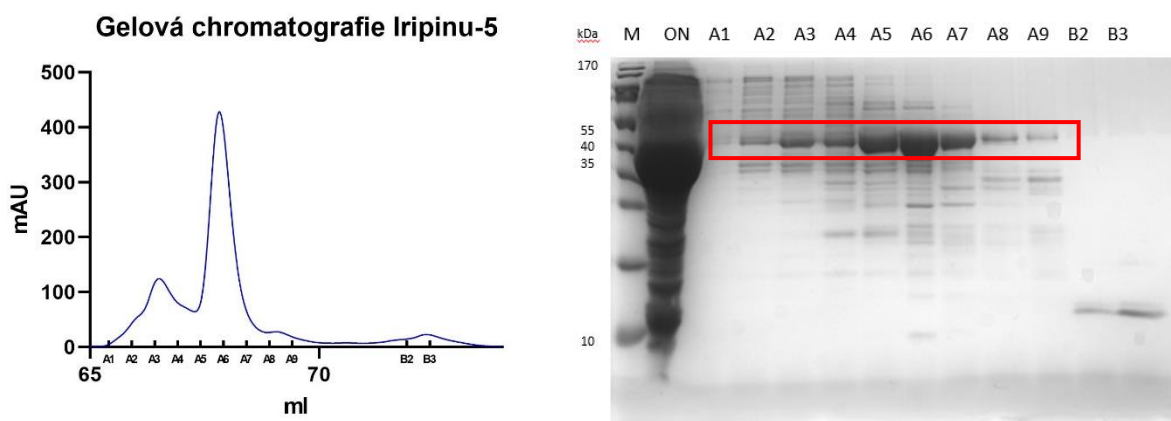
5.4 Purifikace solubilní části

Nejprve byla purifikována rozpustná část studovaného proteinu. Vzorek Iripinu-5 produkováný v BL21(DE3) – CodonPlus, LB médium (AMP), 18°C, 0,5 mM IPTG byl nanesen na kolonu. Průběh purifikace byl zaznamenán na chromatogram (Obr. 7 vlevo). Frakce byly sbírány od 7 % koncentrace AE elučního pufru. Po proběhnutí chromatografie byly vzorky zanalyzovány a záznam o provedení byl zachycen na Obr. 7 vpravo. Na základě provedení SDS-PAGE bylo vyhodnoceno, že studovaný protein byl především ve frakci 12 a část proteinu i ve FT (viz červený rámeček na Obr. 7 vpravo).



Obr. 7: Vlevo iontově výměnná chromatografie vzorku Iripinu-5 (BL21(DE3) – CodonPlus, LB médium, 18°C, 0,5 mM IPTG, AMP), vpravo SDS-PAGE iontově výměnné chromatografie proteinu Iripinu-5 (M – marker, ON – on column, FT- flow through, 11-17 – frakce) (pořízeno autorkou).

Vzorek frakce 12 z iontově výměnné chromatografie byl zakoncentrován z 3 ml na 500 μ l pomocí Amicon Ultra - 4 10K a byla u něj provedena výměna pufrů pomocí připraveného pufru na výměnu pufrů. U zakoncentrovaného vzorku frakce 12 byla provedena gelová chromatografie, tato chromatografie byla zaznamenána na chromatogram (Obr. 8 vlevo). Vzorek ON (frakce 12 z předešlé purifikace) a eluované frakce (A1-B3) byly analyzovány pomocí SDS-PAGE (Obr. 8 vpravo). U výsledných frakcí byla změřena koncentrace, viz Tab. IV. Koncentrace a čistota proteinu byla dostatečná pro následné použití (zamrazení a krystalizaci Iripinu-5).



Obr. 8: Vlevo gelová chromatografie zakoncentrované frakce 12 proteinu Iripin-5 (vytvořeno autorkou), vpravo SDS-PAGE gelové chromatografie zakoncentrované frakce 12 proteinu Iripin-5, (M – marker, ON – on column, FT- flow through, A1-B3 – frakce) (pořízeno autorkou).

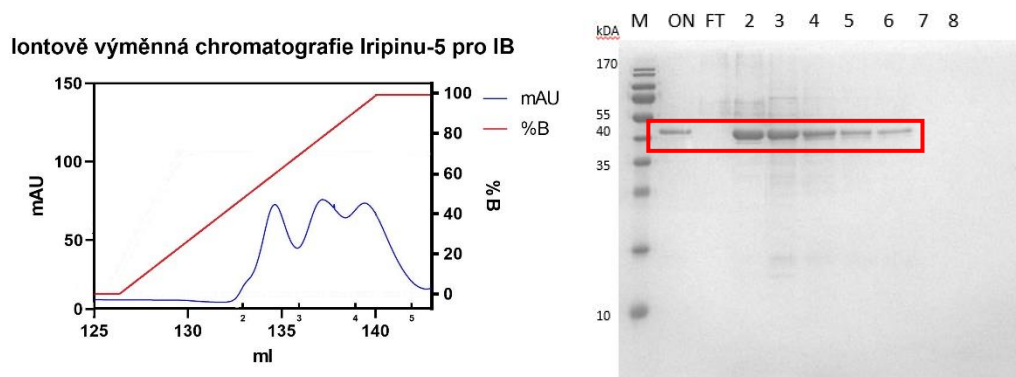
Tab. IV: Naměřené koncentrace frakcí (A3-A9).

Frakce	Koncentrace [$\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$]
A3	0,438
A4	0,506
A5	1,013
A6	1,590
A7	0,683
A8	0,424
A9	0,156

5.5 Purifikace proteinu z inkluzních tělísek

Po expresi ve velkém měřítku byly připraveny k purifikaci inkluzní tělíska, byl k nim přidán pufr na rozbití inkluzních tělísek. Před zahájením refoldingu byla provedena iontově výměnná chromatografie. Následně byla změřena koncentrace inkluzních tělísek, která byla $8,6 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$.

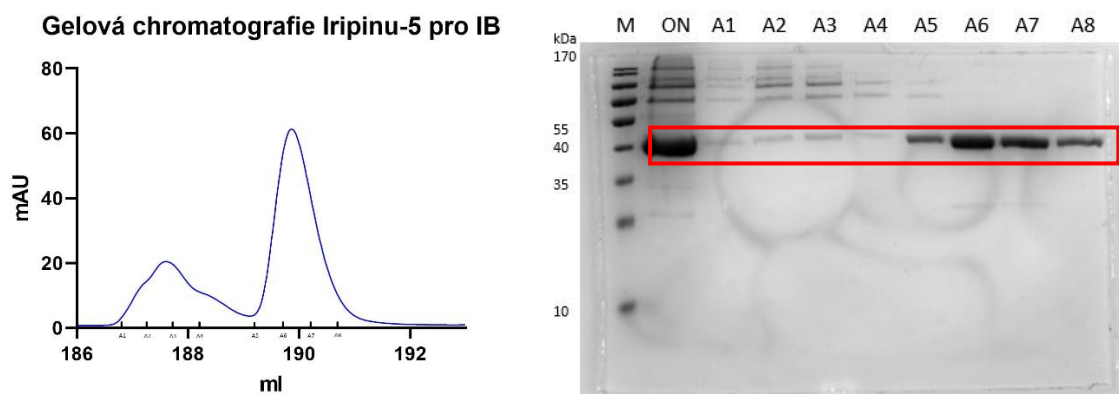
U inkluzních tělísek byl proveden refolding pomocí příslušných pufrů. Následně na to byla provedena iontově výměnná chromatografie. Průběh purifikace byl zaznamenán na chromatogram (Obr. 9 vlevo). Vzorky z iontově výměnné chromatografie byly zanalyzovány pomocí SDS-PAGE (Obr. 9 vpravo). Sebrané frakce byly poměrně čisté.



Obr. 9: Vlevo iontově výměnná chromatografie vzorky získané z refoldingu proteinů inkluzních tělísek (vytvořeno autorkou), vpravo SDS-PAGE iontově výměnné chromatografie vzorky získané z refoldingu proteinů inkluzních tělísek, (M – marker, ON – on column, FT- flow through, 2-8 – frakce) (pořízeno autorkou).

Pro lepší pročištění proteinu a zjištění velikosti částic byla provedena gelová chromatografie frakce 2 z předešlé purifikace. Provedení gelové chromatografie bylo zaznamenáno na chromatogram (Obr. 10 vlevo). Posbírané frakce byly zanalyzovány pomocí

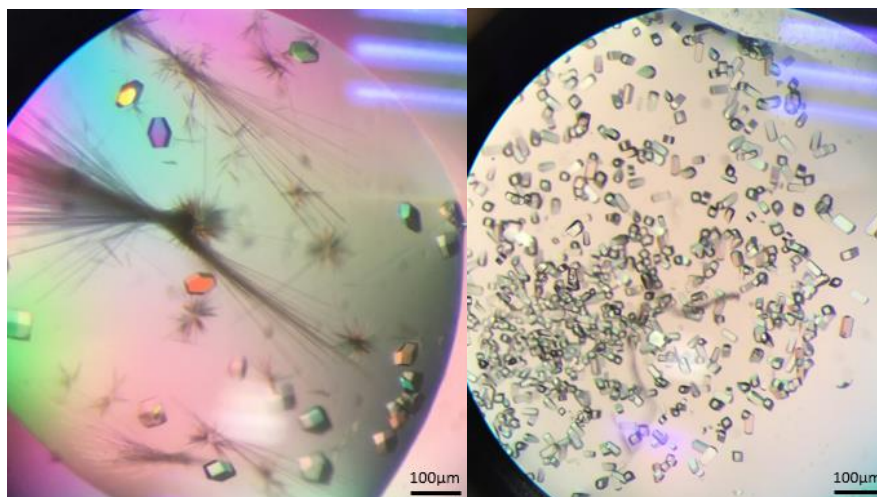
SDS-PAGE (Obr. 10 vpravo). Z výsledků bylo zjevné, že i z inkluzních tělísek bylo možné získat studovaný protein a to v dobré čistotě.



Obr. 10: Vlevo gelová chromatografie vzorky získané z iontové výměnné chromatografie inkluzních tělísek (vytvořeno autorkou), vpravo SDS-PAGE vzorky získané z iontové výměnné chromatografie inkluzních tělísek, (M – marker, ON – on column, FT- flow through, A1-A8 – frakce) (pořízeno autorkou).

5.6 Krystalizace lysozymu

Krystalizační metodou sedící kapky byly zachyceny 3D krystaly lysozymu v kombinaci lysozym o koncentraci $40 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ a roztokem 50 mM octanu sodného s 8% NaCl (Obr. 11 vlevo). Byly vypěstovány jehličky, mořští ježci (černé šmouhy) a monokrystaly (Obr. 11 vlevo). Další pořízené 3D krystaly byly vypěstovány v kombinaci lysozym o koncentraci $60 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ a roztokem 50 mM octanem sodným s 4% NaCl (Obr. 11 vpravo).



Obr. 11: Výsledky krystalizační metody sedící kapky: vlevo $40 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ lysozym, 50 mM octan sodný a 8% roztok NaCl, vpravo $60 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ lysozym, 50 mM octan sodný a 4% roztok NaCl (pořízeno autorkou).

Pomocí krystalizační metody visící kapky byly získány 3D krystaly lysozymu o koncentraci $40 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ a 50 mM octanem sodným s 6% NaCl (Obr. 12 vlevo). Velké množství malých 3D krystalů bylo zachyceno na Obr. 12 vpravo v kombinaci $60 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ lysozymu a 50 mM octanu sodného s 4% NaCl.

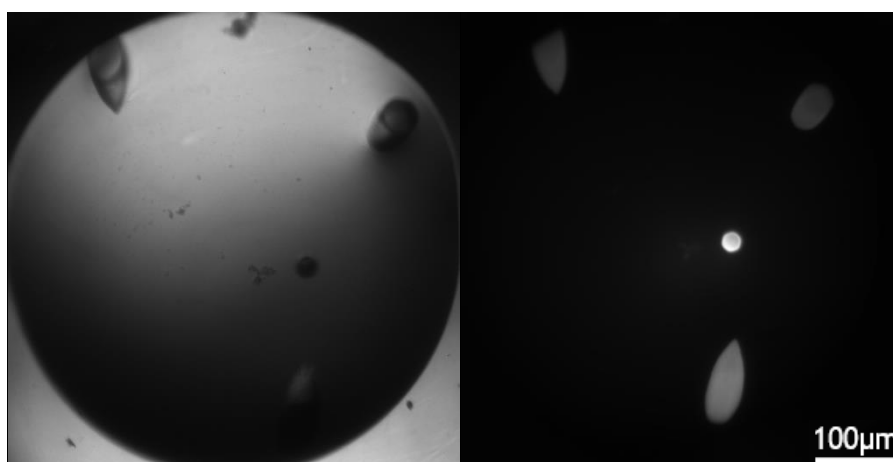


Obr. 12: Výsledky krystalizační metody visící kapky: vlevo $40 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ lysozym, 50 mM octan sodný a 6% roztok NaCl, vpravo $60 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ lysozym, 50 mM octan sodný a 4% roztok NaCl (pořízeno autorkou).

5.7 Krystalizace Iripin-5

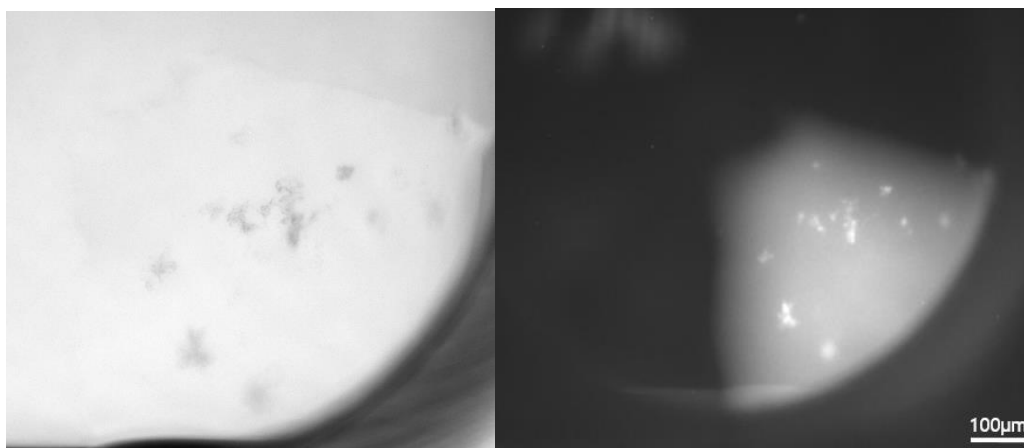
Pomocí pre-krystalizačního testu byla zjištěna vhodná koncentrace Iripinu-5 pro krystalizační experimenty a to $1,14 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$.

Narostlé krystaly byly zaznamenány pomocí UVEXu pro světelné pole na Obr. 13 vlevo, tyto krystaly byly vypěstovány při kombinaci Iripin-5 ($1,14 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) s precipitačním činidlem JCSG++ v jamce D7 o složení 40% (w/v) polyethylen glykol 400, 100 mM Tris o pH 8,5, 200 mM sulfát lithný v poměru proteinu a precipitačního činidla 1:1 ($1 \mu\text{l}$ proteinu + $1 \mu\text{l}$ precipitačního činidla) nad $50 \mu\text{l}$ precipitačního činidla v rezervoáru. Vpravo na Obr. 13 byla zachycena přítomnost proteinových krystalů v kapce pomocí UVEXu.



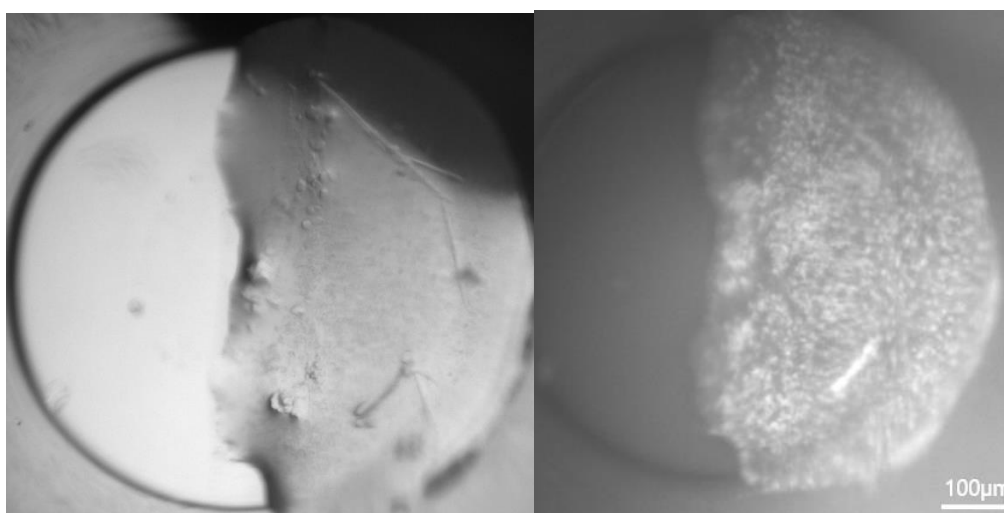
Obr. 13: Vlevo krystaly Iripinu-5 pod UVEXem pro světelné pole, vpravo krystaly Iripinu-5 pod UVEXem.

Další krystaly Iripinu-5 byly zaznamenány na Obr. 14 vlevo, tyto krystaly byly vypěstovány při kombinaci Iripin-5 ($1,14 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) s precipitačním činidlem JCSG++ v jamce G3 o složení: 20% (w/v) polyvinylpyrolidin K15, 100mM Tris o pH 8,5, 100mM chlorid kobaltnatý v poměru proteinu a precipitačního činidla 1:1 o objemu $1 \mu\text{l}$ roztoku proteinu + $1 \mu\text{l}$ precipitačního činidla nad $50 \mu\text{l}$ precipitačního činidla v rezervoáru. Vpravo na Obr. 14 bylo prokázáno, že byly opravdu vypěstovány krystaly proteinu, a to ve tvaru jehliček.



Obr. 14: Vlevo krystaly Iripinu-5 pod UVEXem pro světelné pole, vpravo krystaly Iripinu-5 pod UVEXem (pořízeno autorkou).

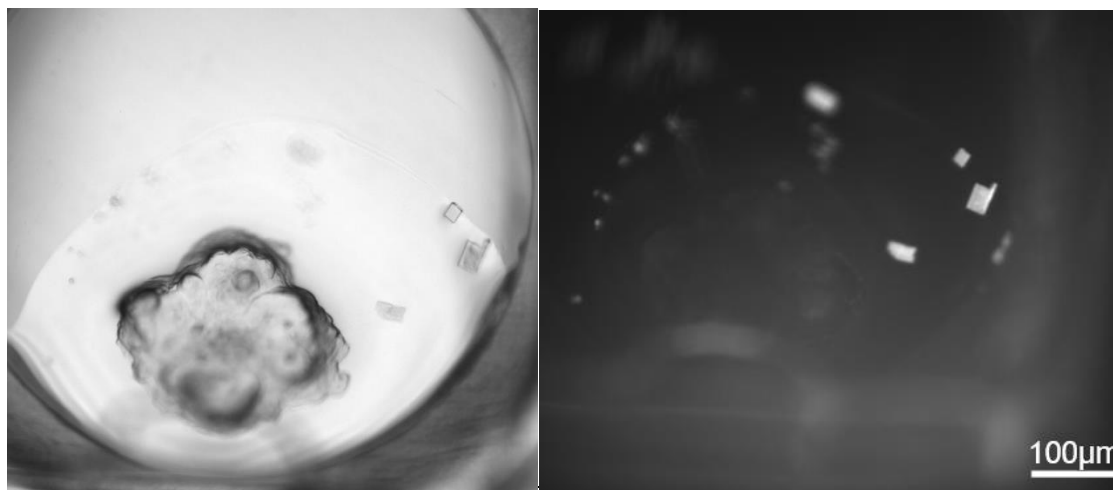
Krystaly Iripinu-5 ($1,14 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$), které narostly v kombinaci s precipitačním činidlem JCSG++ v jamce D3 byly zaznamenány na Obr. 15 vlevo. V této jamce bylo složení precipitačního činidla: 40% (w/v) polypropylen glykol 400, 100mM Tris o pH 8,5, 200mM sulfát lithný. Poměr proteinu a precipitačního činidla byl 1:1 o objemu $1 \mu\text{l}$ roztoku proteinu + $1 \mu\text{l}$ precipitačního činidla nad $50 \mu\text{l}$ precipitačního činidla v rezervoáru. Vpravo na Obr. 15 byly vypěstovány proteinové krystaly, a to konkrétně mikrokrystaly. Mikrokrystaly nebyly shledány jako vhodné pro difrakční analýzu, ale byla zde možnost provedení další optimalizace pomocí mikročkovací metody.



Obr. 15: Vlevo krystaly Iripin-5 pod UVEXem pro světelné pole, vpravo krystaly Iripin-5 pod UVEXem (pořízeno autorkou).

Další krystaly byly zaznamenány na Obr. 16, vlevo byly zachyceny krystaly pod UVEXem pro světelné pole. Krystaly byly vypěstovány při kombinaci Iripin-5

($1,14 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) s precipitačním činidlem SG1 v jamce A1 o složení: 200 mM chlorid hořečnatý, 100 mM hexahydrát Tris o pH 8,5, 30% (w/v) PEG 4000. Poměr proteinu a precipitačního činidla byl 1:0,5 o objemu $1 \mu\text{l}$ roztoku proteinu + $0,5 \mu\text{l}$ precipitačního činidla nad $50 \mu\text{l}$ precipitačního činidla v rezervoáru. Vpravo na Obr. 16 jsou zaznamenány získané jednotlivé krystaly kubického tvaru studovaného proteinu.



Obr. 16: Vlevo krystaly Iripin-5 pod UVEXem pro světelné pole, vpravo krystaly Iripinu-5 pod UVEXem (pořízeno autorkou).

Jako nejlepší krystaly Iripin-5 byly vyhodnoceny monokrystaly, které byly zachyceny na Obr. 13 a 16, a zároveň to byly i krystaly v difrakční kvalitě.

6 Diskuze

I. ricinus je jedním z hlavních přenašečů lymfské boreliózy a klíšťové encefalidity ve střední Evropě. Lze ho tedy využít jako modelový organismus pro studium serpinů (Kotsyfakis *et al.*, 2015; Kaščáková *et al.*, 2021). Důvodem využití *I. ricinus* je výskyt serpinů ve slinách klíštěte přisátého k hostiteli. A právě přítomnost serpinů ovlivňuje hostitele a jeho imunitní systém (Chmelař *et al.*, 2017). Pro pochopení vlastností a funkcí serpinů je důležitá znalost jejich struktury (Mahon *et al.*, 2018).

Proteázy jsou enzymy, které štěpí peptidy na aminokyseliny a menší peptidy, jsou součástí mnoha fyziologických procesů. Role proteázových inhibitorů je především v inhibici celých skupin látek. A právě přítomnost proteázových inhibitorů ve slinných žlázách je výhodná pro klíště a nepříznivá pro hostitele. Z tohoto pohledu jsou inhibitory proteáz u klíšťat předmětem mnoha výzkumů pro vývoj vakcín (Chmelař *et al.*, 2017).

Pro Iripin-5 na základě vykonání testu antiproteázové selektivity byla zjištěna inhibice proti následujícím proteázám: trombin, faktor Xa, kalikrein, chymáza, trypsin, α -chymotrypsin, β -tryptáza, neutrofilní elastáza, katepsin B, u-PA, plazmin, matriptáza, faktor XIa, faktor XIIa, t-PA, proteináza 3. Iripin-5 nejvíce inhibuje neutrofilní elastázu a proteinázu 3. Dále také bylo zjištěno, že v P1 reziduu je aminokyselina arginin, který interaguje s krevními koagulačními proteázami (Kaščáková *et al.*, 2021).

Purifikace je nedílnou součástí přípravy čistého proteinu. Pro Iripinu-5 byla k purifikaci využita iontově výměnná a gelová chromatografie. Studovaný protein se podařilo vypurifikovat jak ze solubilní části, tak z inkluzních tělísek. Během purifikace solubilní části vzorku studovaný protein protekl kolonou během iontově výměnné chromatografie, pravděpodobně k tomu došlo přítomností vyšší soli v lyzačním pufru. Nicméně nakonec se podařilo studovaný protein vypurifikovat. K analýze vzorků a zjištění přítomnosti studovaného proteinu ve vzorku byla využita SDS-PAGE. Přítomnost Iripinu-5 ve vzorku byla dále potvrzena i pomocí hmotnostní spektrometrie.

Samotná krystalizace byla zahájena krystalizačním screeningem za použití pěti komerčně vyráběných sad precipitačních činidel. Nejlepší výsledky byly zaznamenány u dvou sad JCSG++ a SG1. Krystalizace Iripinu-5 byla provedena pomocí metody difúze par, a to konkrétně metodou sedící kapky. Krystaly studovaného proteinu byly pozorovány pomocí světelného mikroskopu pro detekci propustnosti UV záření. Na základě výsledků krystalizačního screeningu bylo možné optimalizovat podmínky pro krystalizaci Iripinu-5.

Následně se podařilo získat krystaly v difrakční kvalitě, díky čemu mohla být určena struktura štípnutého Iripinu-5 (PDB ID: 7B2T).

Vzájemné porovnání krystalizace serpinů je jeden z nástrojů, jak lze dojít k nalezení vhodných krystalizačních podmínek pro další serpiny. Dále lze využít i skutečnosti, že serpiny se vyznačují konzervativní sekundární strukturou, tudíž poznatky o jednom serpinu lze aplikovat i na další.

Jedním ze serpinů nacházející se ve slinách klíštěte je IRS-2. Na základě experimentů bylo zjištěno, že inhibiční aktivita IRS-2 je především proti chymotrypsinovým proteázám, takže má protizánětlivý účinek. K produkci studovaného proteinu bylo použito 0,5mM IPTG. IRS-2 byl získán z inkluzních tělísek a k jeho purifikaci byla využita iontově-výměnná chromatografie. Pro krystalizaci IRS-2 byla použita krystalizační metoda difúze par, konkrétně její podtyp visící kapky. Pro krystalizační screening byly použity komerčně vyráběné sady precipitačních činidel (Sigma Aldrich, USA). Poměr roztoku proteinu s precipitačním činidlem byl 2:1, o objemu 2 μ l precipitačního činidla a 1 μ l roztoku proteinu. Koncentrace IRS-2 pro jeho krystalizaci byla 3,5 mg*ml⁻¹. Krystaly byly získány ve tvaru jehel, v kombinaci IRS-2 o koncentraci 3,5mg*ml⁻¹ a precipitačním roztoku: 75 mM Hepes o pH 6,5, 9% (w/v) PEG 20000. Finální struktura IRS-2, která byla naměřená na 1,8 Å, je strukturou ve štípnuté konformaci. Došlo k tomu kvůli přítomnosti proteáz v expresním bakteriálním systému (Kovářová *et al.*, 2010).

IRS-3 se též řadí k serpinům vyskytujícím se ve slinách klíšťat. Studovaný protein inhibuje serinové proteázy podobné trypsinu, těmi jsou kalikrein a matriptáza. U IRS-3 byly provedeny *in vitro* testy jeho funkcí: inhibice vnější koagulační dráhy krve, zeslabení produkce interleukinu-6, snížení přežití a proliferace CD4⁺T buněk a potlačení imunitní odpovědi Th1. Protein byl produkován po přidání 0,5 mM IPTG. IRS-3 byl získán z inkluzních tělísek. K purifikaci studovaného proteinu byla využita gelová chromatografie. Krystalizace byla provedena pomocí komerčně vyráběných sad precipitačních činidel. Pre-krystalizačním testem byla stanovena minimální koncentrace studovaného proteinu na 1,88 mg*ml⁻¹. Metodou krystalizace byla metoda difúze par, konkrétně její podtyp sedící kapky. Krystaly v difrakční kvalitě byly získány v kombinaci IRS-3 o koncentraci 1,88 mg*ml⁻¹ a precipitačního činidla o složení: 200 mM thiokyanátu draselného, 100 mM kakodylátu sodného a 8% (w/v) γ -polyglutamové kyseliny o pH 6,5, v poměru 2:1 (2 μ l precipitačního činidla:1 μ l roztoku proteinu nad 50 μ l rezervoárem). Struktura IRS-3 (PDB ID: 7AHP) byla

vyřešena pomocí metody molekulární náhrady s využitím struktury IRS-2 (PDB ID: 7AHP). 3D struktura byla získána X-ray krystalografií a data byla naměřena na 1,95 Å (Chlastáková *et al.*, 2021).

Další ze serpinů vyskytující se ve slinách klíšťat, u kterého byla vyřešena struktura, je IRS-8 (PDB ID: 7PMU). Na základě *in vivo* experimentu bylo zjištěno, že studovaný protein inhibuje tyto proteázy: trombin, faktor VIIa, faktor IXa, faktor XIa, faktor XIIa, plazmin, APC, kalikrein a trypsin. Nejrychleji byl inhibován plazmin. Mezi funkce IRS-8 se řadí modulace hostitelského komplementu a regulace koagulační kaskády, které klíště využívá k usnadnění krmení. Protein IRS-8 měl pro lepší purifikaci značky SUMO a HisTag. Nejprve byla provedena afinitní chromatografie. Následovalo štěpení značek pomocí SUMO proteázy. K odstranění značek od nativního proteinu byla provedena afinitní chromatografie. Protein byl ještě pročištěn pomocí iontově-výměnné a následně i gelové chromatografie. Ke krystalizaci IRS-8 byla využita komerčně prodávaná sada precipitačních činidel PGA screen (Molecular Dimensions, USA). Krystaly byly vypěstovány o koncentraci IRS-8 6,5 mg*ml⁻¹ s precipitačním o složení: 100 mM Tris o pH 7,5, 5% PGA-LM, 30% (w/v) PEG 550 MME. Struktura IRS-8 byla vyřešena pomocí molekulární náhrady, k tomu byl využit model conserpinu (PDB ID: 5CDX). Nativní, neštípnutá struktura IRS-8 byla vyřešená na 1,93 Å (Kotál *et al.*, 2021).

Při porovnání jednotlivých serpinů z klíšťat *I. ricinus*, u kterých byla provedena strukturní analýza, je zřejmé, že každý ze serpinů napomáhá klíštěti překonat imunitní odpověď hostitele, a tím se mohou klíšťata déle krmit, čímž mohou snadněji přenášet různé patogeny.

7 Závěr

Teoretická část práce popsala obecný úvod k serpinům. Byly zmíněny jejich funkce, především inhibice serinových proteáz. Byl popsán i proces inhibice proteázy serpinem a kovalentní vazba mezi serpinem a proteázou. Vzhledem k tomu, že studovaný protein byl získán z klíš'at, část teoretické práce byla zaměřena i na výskyt serpinů u klíš'at. Serpiny se vyskytují ve slinných žlázách klíš'at a napomáhají přenosu patogenů.

Další kapitolou v teoretické části této bakalářské práce byl popis metod sloužících k následné strukturní analýze serpinů. Před zahájením strukturní analýzy je dobré získat dostatečně čistý vzorek studovaného proteinu, k dosažení tohoto bodu slouží purifikace. Byly popsány především tři typy chromatografií (afinitní, iontově výměnná a gelová chromatografie) jako metody purifikace. Následujícím krokem ke zjištění struktury je krystalizace. Byly zmíněny nejčastěji používané metody pro krystalizaci serpinů, těmi jsou metody difúze par, její podtypy: metoda sedící kapky, metoda visící kapky a metoda sendvičové kapky. K samotnému zjištění struktury u serpinů se využívá X-ray krystalografie, kterou bylo popsáno nejvíce struktur serpinů. Dále je možná strukturní analýza pomocí neutronové difrakce nebo kryo – EM, která se využívá ke zjištění struktury komplexů.

V experimentální části byl popsán postup přípravy proteinu Iripin-5 ke krystalizaci a následná krystalizace studovaného proteinu. Iripin-5 byl dodán v plazmidu pET 17b z Katedry medicínské biologie, PřF, JČU. Byla provedena transformace do kompetentních buněk. Pomocí pilotní exprese byly zjištěny vhodné podmínky pro namnožení studovaného proteinu. Po provedení exprese ve velkém měřítku byla zahájena purifikace. Nejprve byl studovaný protein pročištěn pomocí iontově výměnné chromatografie a následně pomocí gelové chromatografie. Podařilo se získat studovaný protein jak ze supernatantu, tak z inkluzních tělísek. Přítomnost Iripinu-5 ve vzorku byla potvrzena i pomocí hmotnostní spektrometrie.

Samotná krystalizace Iripinu-5 byla zahájena krystalizačním screeningem, pro ten byly využity komerčně vyráběné sady precipitačních činidel. Celkem bylo využito pět sad. Dvě sady byly vyhodnoceny jako nejlepší JCSG++ (Jena Bioscience, USA) a SG1 (Molecular Dimension, USA). Narostlé krystaly studovaného proteinu byly zaznamenány pomocí UVEXu pro světelné pole. Potvrzení o přítomnosti proteinových krystalů bylo provedeno pomocí mikroskopu pro detekci propustnosti UV záření. Na základě mnou provedeného krystalizačního screeningu bylo možné optimalizovat podmínky pro růst krystalů Iripin-5.

Optimalizací podmínek byly získány krystaly v difrakční kvalitě a díky nim mohla být vyřešena struktura štípnutého Iripinu-5.

8 Použitá literatura

Blakeley, M. P., Langan, P., Niimura, N., & Podjarny, A. (2008). Neutron crystallography: opportunities, challenges, and limitations. *Current Opinion in Structural Biology*, 18 (5), 593–600. doi: 10.1016/j.sbi.2008.06.009.

Carrell, R. W., Stein, P. E., Fermi, G., & Wardell, M. R. (1994). *Biological implications of a 3A structure of dimeric antithrombin*, 2 (4), 257-270. ISSN: 0969-2126.

Cordara, G., & Krenzel, U. (2013). Structure determination of lectins by X-ray crystallography - A hands-on approach. *Carbohydrate Chemistry*, 39, 222–246. doi:10.1039/9781849737173-00222.

Coskun, O. (2016). Separation Techniques: CHROMATOGRAPHY. *Northern Clinics of Istanbul*, 3 (2), 156-160. doi: 10.14744/nci.2016.32757.

Cox, J., & Mann, M. (2008). MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nature Biotechnology*, 26 (12), 1367–1372. doi: 10.1038/nbt.1511.

Dunstone, M. A., & Whisstock, J. C. (2011). Crystallography of serpins and serpin complexes. *Methods in Enzymology*, 501, 63–87. doi: 10.1016/B978-0-12-385950-1.00005-5.

Elton, L. R. B., & Jackson, D. F. (1966). X-Ray Diffraction and the Bragg Law. *American Journal of Physics*, 34 (11), 1036–1038. doi:10.1119/1.1972439.

Forinová M, Pilipenco A, Víšová I, Lynn NS Jr, Dostálek J, Mašková H, Hönig V, Palus M, Selinger M, Kočová P, Dyčka F, Štěřba J, Houska M, Vrabcová M, Horák P, Anthi J, Tung CP, Yu CM, Chen CY, Huang YC, Tsai PH, Lin SY, Hsu HJ, Yang AS, Dejneka A, Vaisocherová-Lísalová H. (2021). Functionalized Terpolymer-Brush-Based Biointerface with Improved Antifouling Properties for Ultra-Sensitive Direct Detection of Virus in Crude Clinical Samples. *ACS Appl Mater Interfaces*, 13 (50), 60612-60624. doi: 10.1021/acscami.1c16930.

Gettins, P. G. W. (2002). Serpin Structure, Mechanism, and Function. *Chem. Rev.*, 102 (12), 4715-4803. doi: 1021/cr010170.

Gettins, P. G. W., & Ofson, S. T. (2009). Exosite determinants of serpin specificity. *Journal of Biological Chemistry*, 284 (31), 20441–20445. doi: 10.1074/jbc.R800064200.

Gray, J., Kahl, O., & Zintl, A. (2021). What do we still need to know about *Ixodes ricinus*?. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 12 (3). doi: 10.1016/j.ttbdis.2021.101682.

Hampton research. Crystal Growth 101. Hampton research: Solutions fo Crystal Growth [online]. California, Aliso Viejo, c1991-2021 [cit. 2022-04-04]. Dostupné z: https://hamptonresearch.com/uploads/cg_pdf/CG101_COMPLETE.pdf.

Huntington, J. A. (2011). Serpin structure, function and dysfunction. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 9 (1), 26–34. doi: 10.1111/j.1538-7836.2011.04360.

Chmelař, J., Kotál, J., Langhansová, H., & Kotsyfakis, M. (2017). Protease inhibitors in tick saliva: The role of serpins and cystatins in tick-host-pathogen interaction. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7 (MAY), Article 216. doi: 10.3389/fcimb.2017.00216.

Irving, J. A., Pike, R. N., Lesk, A. M., & Whisstock, J. C. (2001). Phylogeny of the Serpin Superfamily: Implications of Patterns of Amino Acid Conservation for Structure and Function. *Genome reasearch*. doi: 10.1101/gr.147800.

Kascakova B, Kotal J, Martins LA, Berankova Z, Langhansova H, Calvo E, Crossley JA, Havlickova P, Dycka F, Prudnikova T, Kutý M, Kotsyfakis M, Chmelar J, Kuta Smatanova I (2021). Structural and biochemical characterization of the novel serpin Iripin-5 from *Ixodes ricinus*. *Acta Cryst. D Structural Biology*, 77 (9), 1183-1196. doi: 10.1107/S2059798321007920.

Krauss, I. R., Merlino, A., Vergara, A., & Sica, F. (2013). An overview of biological macromolecule crystallization. *International Journal of Molecular Sciences*, 14 (6), 11643–11691. doi: 10.3390/ijms140611643.

Kutá Smatanová I. Krystalizace biologických makromolekul [online]. Česká a slovenská krystalografická společnost. Dostupné z: <http://www.xray.cz/kryst/difrakce/iva/krystalizace.htm>. [citováno dne 22. 1. 2022].

Law, R. H. P., Zhang, Q., McGowan, S., Buckle, A. M., Silverman, G. A., Wong, W., Rosado, C. J., Langendorf, C. G., Pike, R. N., Bird, P. I., & Whisstock, J. C. (2006). An overview of the serpin superfamily. *Genome Biology*, 7 (5), Article 216. doi: 10.1186/gb-2006-7-5-216.

Mahon, B. P., Ambadapadi, S., Yaron, J. R., Lomelino, C. L., Pinard, M. A., Keinan, S., Kurnikov, I., Macaulay, C., Zhang, L., Reeves, W., McFadden, G., Tibbetts, S., McKenna, R., & Lucas, A. R. (2018). Crystal Structure of Cleaved Serp-1, a Myxomavirus-Derived Immune

Modulating Serpin: Structural Design of Serpin Reactive Center Loop Peptides with Improved Therapeutic Function. *Biochemistry*, 57 (7), 1096–1107. doi: 10.1021/acs.biochem.7b01171.

Mahon, B. P., McKenna, R. (2018). Methods for determining and understanding serpin structure and function: X-ray crystallography. *Methods in Molecular Biology*, 1826, 9–39. doi: 10.1007/978-1-4939-8645-3_2.

Pemberton, P. A., Stein, P. E., Pepys, M. B., Potter, J. M., & Carrell, R. W. (1988). Hormone binding globulins undergo serpin conformational change in inflammation. *Nature*, 336 (6196). doi: 10.1038/336257a0.

Rappsilber, J., Mann, M., & Ishihama, Y. (2007). Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nature Protocols*, 2 (8), pp. 1896–1906. doi: 10.1038/nprot.2007.261.

Read, R. J., Zhou, A., & Stein, P. E. (2011). Solving serpin crystal structures. *Methods in Enzymology*, 501, 49–61. doi: 10.1016/B978-0-12-385950-1.00004-3.

Růčková E, Müller P, & Vojtěšek B. (2014). Expres a purifikace proteinů Protein Expression and Purification. *Klin Onkol*, 27 (1).

Sanrattana, W., Maas, C., & de Maat, S. (2019). SERPINs-From trap to treatment. *Frontiers in Medicine*, 6 (FEB), Article 25. doi: 10.3389/fmed.2019.00025

Sauter, C., Lorber, B., & Giegé, R. (2012). Crystallization-General Methods. *International Tables for Crystallography*, F, kapitola 4,1, 99-121. Dostupné z: <https://www.researchgate.net/publication/235940625>.

Shaw Stewart, P., & Mueller-Dieckmann, J. (2014). Automation in biological crystallization. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications*, 70 (6), 686–696. doi: 10.1107/S2053230X14011601.

Shevchenko, A., Tomas, H., Havliš, J., Olsen, J. v., & Mann, M. (2007). In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature Protocols*, 1 (6), 2856–2860. doi: 10.1038/nprot.2006.468.

Silverman, G. A., Bird, P. I., Carrell, R. W., Church, F. C., Coughlin, P. B., Gettins, P. G. W., Irving, J. A., Lomas, D. A., Luke, C. J., Moyer, R. W., Pemberton, P. A., Remold-O'Donnell, E., Salvesen, G. S., Travis, J., & Whisstock, J. C. (2001). The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of

inhibition, novel functions, and a revised nomenclature. *Journal of Biological Chemistry*, 276 (36), 33293–33296. doi: 10.1074/jbc.R100016200.

Sliz, P., Harrison, S. C., & Rosenbaum, G. (2003). Notes from the Bench How does Radiation Damage in Protein Crystals Depend on X-Ray Dose? *Structure*, 11 (1), 13-19. doi: 10.1016/S0969-2126(02)00910-3.

Thompson, R. F., Walker, M., Siebert, C. A., Muench, S. P., & Ranson, N. A. (2016). An introduction to sample preparation and imaging by cryo-electron microscopy for structural biology. *Methods*, 100, 3–15. doi: 10.1016/j.ymeth.2016.02.017.

Volf P., Horák P. (2007). Paraziti a jejich biologie. Triton, 262 – 264. ISBN: 9788073870089.

Ward, W. W., & Swiatek, G. (2009). Protein Purification. *Current Analytical Chemistry*, 5 (2), 85-105. doi: 10.2174/157341109787846171.

Whisstock, J. C., Silverman, G. A., Bird, P. I., Bottomley, S. P., Kaiserman, D., Luke, C. J., Pak, S. C., Reichhart, J. M., & Huntington, J. A. (2010). Serpins flex their muscle: II. Structural insights into target peptidase recognition, polymerization, and transport functions. *Journal of Biological Chemistry*, 285 (32), 24307–24312. doi: 10.1074/jbc.R110.141408.

Zou, Z., Anisowicz, A., Hendrix, M., Thor, A., Neveu, M., Sheng, S., Rafidi, K., Seftor, E., & Sager, R. (1994). Maspin is a serpin with tumour-suppressing activity in human mammary epithelial cells. *Science*, 263 (5146), 526-529. doi: 10.1126/science.8290962.

9 Seznam obrázků

Obr. 1: Fázová diagram krystalizace

Obr. 2: A - metoda visící kapky, B – metoda sedící kapky, C – metoda sendvičové kapky

Obr. 3: Obecný postup X-ray krystalografie

Obrázky 1-3 byly vytvořeny pomocí biorender.com.

Obr. 4: Pilotní exprese BL21(DE3) – CodonPlus, LB médium, 18°C

Obr. 5: Pokrytí sekvence proteinu Iripin-5 analyzovaného pomocí timsTOF Pro

Obr. 6: Exprese ve velkém měřítku BL21(DE3) – CodonPlus, LB médium, 18°C

Obr. 7: Vlevo iontově výměnná chromatografie vzorku Iripin-5 (BL21(DE3) – CodonPlus, LB médium, 18°C, 0,5 mM IPTG, AMP), vpravo SDS-PAGE iontově výměnné chromatografie proteinu Iripin-5

Obr. 8: Vlevo gelová chromatografie zakoncentrované frakce 12 proteinu Iripin-5, vpravo SDS-PAGE gelové chromatografie zakoncentrované frakce 12 proteinu Iripin-5

Obr. 9: Vlevo iontově výměnná chromatografie vzorky získané z refoldingu proteinů inkluzních tělísek, vpravo SDS-PAGE iontově výměnné chromatografie vzorky získané z refoldingu proteinů inkluzních tělísek

Obr. 10: Vlevo gelová chromatografie vzorky získané z iontově výměnné chromatografie inkluzních tělísek, vpravo SDS-PAGE vzorky získané z iontově výměnné chromatografie inkluzních tělísek

Obr. 11: Výsledky krystalizační metody sedící kapky: vlevo 40 mg*ml⁻¹ lysozym, 50 mM octan sodný a 8% roztok NaCl, vpravo 60 mg*ml⁻¹ lysozym, 50 mM octan sodný a 4% roztok NaCl

Obr. 12: Výsledky krystalizační metody visící kapky: vlevo 40 mg*ml⁻¹ lysozym, 50 mM octan sodný a 6% roztok NaCl, vpravo 60 mg*ml⁻¹ lysozym, 50 mM octan sodný a 4% roztok NaCl

Obr. 13: Vlevo krystaly Iripinu-5 pod UVEXem pro světelné pole, vpravo krystaly Iripinu-5 pod UVEXem

Obr. 14: Vlevo krystaly Iripinu-5 pod UVEXem pro světelné pole, vpravo krystaly Iripinu-5 pod UVEXem

Obr. 15: Vlevo krystaly Iripinu-5 pod UVEXem pro světelné pole, vpravo krystaly Iripinu-5 pod UVEXem

Obr. 16: Vlevo krystaly Iripinu-5 pod UVEXem pro světelné pole, vpravo krystaly Iripinu-5 pod UVEXem

10 Seznam tabulek

Tab. I: Přehled dalších krystalizačních metod

Tab. II: Rozdělení zkumavek dle rozdílných podmínek

Tab. III: Složení separačního a zaostřovacího gelu

Tab. IV: Naměřené koncentrace frakcí (A3-A9)

11 Seznam příloh

Příloha č. 1: Složení činidel sady PCT (Hampton research, USA)

PCT Formulation

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

Příloha č. 2: Složení precipitačních činidel sady JCSG++ (Jena Bioscience, USA)



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

SCREEN FORMULATION



No.	Precipitant	Precipitant 2	Buffer	Additive
A1	50 % w/v Polystyrene glycol 400	none	100 mM Sodium acetate; pH 4.5	200mM L-Asn um soluble
A2	20 % w/v Polystyrene glycol 3,000	none	100 mM L4 -Sodium citrate; pH 5.5	none
A3	20 % w/v Polystyrene glycol 3,000	none	none	200mM di-Ammonium hydrogen citrate; pH 5.0
A4	20 % w/v 2-Methyl-2,4-pentanediol	none	100 mM Sodium acetate; pH 4.6	20 mM Calcium chloride
A5	20 % w/v Polystyrene glycol 3,000	none	none	200mM Magnesium formate; pH 5.9
A6	20 % w/v Polystyrene glycol 1,000	none	100 mM Potassium phosphate citrate; pH 4.2	200mM L-Asn um soluble
A7	20 % w/v Polystyrene glycol 8,000	none	100 mM CHES; pH 9.3	none
A8	20 % w/v Polystyrene glycol 3,000	none	none	200mM Ammonium formate; pH 6.6
A9	20 % w/v Polystyrene glycol 3,000	none	none	200mM Ammonium chloride; pH 6.3
A10	20 % w/v Polystyrene glycol 3,000	none	none	200mM Potassium formate; pH 7.3
A11	50 % w/v 2-Methyl-2,4-pentanediol	none	100 mM Tris; pH 8.5	200mM Ammonium di-hydrogen phosphate
A12	20 % w/v Polystyrene glycol 3,000	none	none	200mM Potassium nitrate; pH 6.9
B1	none	none	100 mM L4 -Sodium citrate; pH 4.0	800 mM Ammonium sulfate
B2	20 % w/v Polystyrene glycol 3,000	none	none	200mM Sodium thiocyanate; pH 6.9
B3	20 % w/v Polystyrene glycol 6,000	none	100 mM BICINE; pH 9.0	none
B4	10 % w/v Polyethylene glycol 8,000	8 % w/v Ethylene glycol	100 mM HEPES; pH 7.5	none
B5	40% v/v 2-Methyl-2,4-pentanediol	5 % w/v Polyethylene glycol 8,000	100 mM MES; pH 6.5	none
B6	20 % w/v Ethanol	5 % w/v Polyethylene glycol 1,000	100 mM Potassium phosphate citrate; pH 4.2	none
B7	8 % w/v Polyethylene glycol 4,000	none	100 mM Sodium acetate; pH 4.6	none
B8	10 % w/v Polyethylene glycol 8,000	none	100 mM Tris; pH 20	200mM Magnesium chloride
B9	20 % w/v Polystyrene glycol 6,000	none	100 mM L4 -Sodium citrate; pH 5.0	none
B10	50 % w/v Polystyrene glycol 2,000	none	100 mM MES; pH 6.5	200mM Magnesium chloride
B11	none	none	none	1.6M tri-Sodium citrate
B12	20 % w/v Polystyrene glycol 3,000	none	none	200mM tri-Potassium citrate; pH 8.3


*pH values indicated are those of the 10 mM buffer stock solution prior to dilution with other components



© 2014 JBScreen JCSG++ HTS according to the terms and conditions of the JBScreen JCSG++ HTS and JBScreen HTS. Jena Bioscience GmbH and Jena Bioscience AG.


Jena Bioscience GmbH
Lobstedter Str. 7 | 07749 Jena, Germany | Tel: +49-3641-62 85 000
http://www.jenabioscience.com

Page 1
Version: 0.001, Last updated: 04.20.2014



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

SCREEN FORMULATION



No.	Precipitant	Precipitant 2	Buffer	Additive
C1	20 % w/v Polystyrene glycol 8,000	none	100 mM Potassium phosphate citrate; pH 4.2	200mM Sodium chloride
C2	20 % w/v Polystyrene glycol 8,000	none	100 mM L4 -Sodium citrate; pH 4.0	1M Lithium chloride
C3	20 % w/v Polystyrene glycol 3,000	none	none	200mM Ammonium nitrate; pH 6.3
C4	10 % w/v Polyethylene glycol 6,000	none	100 mM HEPES; pH 7.0	none
C5	800 mM Sodium di-hydrogen phosphate	800mM Potassium di-hydrogen phosphate	100 mM HEPES; pH 7.5	none
C6	40% v/v Polystyrene glycol 300	none	100 mM Potassium phosphate citrate; pH 4.2	none
C7	10 % w/v Polyethylene glycol 2,000	none	100 mM Sodium acetate; pH 4.5	200mM Zinc acetate
C8	20 % w/v Ethanol	none	100 mM Tris; pH 8.5	none
C9	25 % w/v 1,2-Propanediol	10 % w/v Glycerol	100 mM Sodium Potassium phosphate; pH 6.3	none
C10	10 % w/v Polyethylene glycol 2,000	2 % w/v D-Glucose	100 mM BICINE; pH 9.0	none
C11	none	none	100 mM Sodium acetate; pH 4.6	2M Ammonium sulfate
C12	10 % w/v Polyethylene glycol 1,000	10 % w/v Polystyrene glycol 8,000	none	none
D1	24 % w/v Polyethylene glycol 1,900	2.0 % v/v Glycerol	none	none
D2	20 % w/v Polystyrene glycol 4,000	none	100 mM HEPES; pH 7.5	200mM Magnesium chloride
D3	50 % w/v Polystyrene glycol 2,000	none	100 mM Sodium Potassium phosphate; pH 6.3	200mM Sodium chloride
D4	20 % w/v Polystyrene glycol 8,000	none	100 mM Sodium acetate; pH 4.5	200mM L-Asn um soluble
D5	20 % w/v 2-Methyl-2,4-pentanediol	none	100 mM HEPES; pH 7.5	none
D6	20 % w/v Polystyrene glycol 8,000	none	100 mM Tris; pH 8.5	200mM Magnesium chloride
D7	40% v/v Polystyrene glycol 400	none	100 mM Tris; pH 8.5	200mM L-Asn um soluble
D8	40% v/v 2-Methyl-2,4-pentanediol	none	100 mM Tris; pH 8.0	none
D9	25.5 % v/v Polyethylene glycol 4,000	15 % w/v Glycerol	none	170 mM Ammonium sulfate
D10	40% v/v Polystyrene glycol 300	none	100 mM MES; pH 6.5	200mM Calcium acetate
D11	14 % v/v 2-Propanol	3.0 % v/v Glycerol	70mM Sodium acetate; pH 4.6	140 mM Calcium chloride
D12	16 % v/v Polyethylene glycol 8,000	2.0 % v/v Glycerol	none	40 mM Potassium di-hydrogen phosphate

*pH values indicated are those of the 10 mM buffer stock solution prior to dilution with other components



© 2014 JBScreen JCSG++ HTS according to the terms and conditions of the JBScreen JCSG++ HTS and JBScreen HTS. Jena Bioscience GmbH and Jena Bioscience AG.

Jena Bioscience GmbH
Lobstedter Str. 7 | 07749 Jena, Germany | Tel: +49-3641-62 85 000
http://www.jenabioscience.com

Page 2
Version: 0.001, Last updated: 04.20.2014



No.	Precipitant	Precipitant 2	Buffer	Additive
E1	none	none	100 mM HES, pH 6.5	18 mM Sodium citrate
E2	2 mM Ammonium sulfate	none	100 mM HES, pH 6.5	20 mM Sodium citrate
E3	10 % w/v 2-Propanol	none	100 mM HES, pH 7.5	20 mM Sodium citrate
E4	12.68 mM Ammonium sulfate	none	100 mM HES, pH 6.5	20 mM Lithium sulfate
E5	4.0% w/v 2-Methyl-2,4-pentanediol	none	100 mM CAPS, pH 10.5	none
E6	20 % w/v Polyethylene glycol 3,000	none	100 mM Tris, pH 8.0	20 mM Zinc acetate
E7	10 % w/v 2-Propanol	none	100 mM HES, pH 6.5	20 mM Zinc acetate
E8	none	none	100 mM Sodium acetate, pH 4.5	18 mM Ammonium hydrogen phosphate
E9	none	none	100 mM HES, pH 6.5	168 mM Magnesium sulfate
E10	10 % w/v Polyethylene glycol 6,000	none	100 mM BICINE, pH 9.0	none
E11	14.4 % w/v Polyethylene glycol 6,000	2.0 % w/v Glycerol	80 mM HES, pH 6.5	160 mM Calcium acetate
E12	10 % w/v Polyethylene glycol 8,000	none	100 mM Tris, pH 8.0	none
F1	30 % w/v affluvine® H400	none	100 mM HES, pH 6.5	50 mM Calcium chloride
F2	none	none	100 mM Tris-Sodium citrate, pH 5.0	25.58 mM Ammonium sulfate
F3	20 % w/v 2-Methyl-2,4-pentanediol	none	100 mM Tris, pH 8.0	none
F4	20 % w/v affluvine® H400	none	100 mM HES, pH 7.5	none
F5	50 % w/v Ethylene glycol	none	100 mM Tris, pH 8.5	20 mM Magnesium chloride
F6	10 % w/v 2-Methyl-2,4-pentanediol	none	100 mM BICINE, pH 9.0	none
F7	none	none	none	800 mM D-Sodium succinate, pH 7.0
F8	none	none	none	25 mM D-Sodium DL-malate, pH 7.0
F9	none	none	none	24 mM D-Sodium malonate, pH 7.0
F10	0.5 % w/v affluvine® ED200, pH 7.0	none	100 mM HES, pH 7.0	10 mM D-Sodium malonate, pH 7.0
F11	1% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 2,000	none	100 mM HES, pH 7.0	18 mM Sodium succinate, pH 7.0
F12	30 % w/v affluvine® H400, pH 7.0	none	100 mM HES, pH 7.0	none



*pH values indicated are those of the 10 mM buffer stock solution prior to dilution with other components



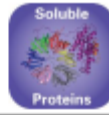
No.	Precipitant	Precipitant 2	Buffer	Additive
G1	30 % w/v affluvine® ED-200, pH 7.0	none	100 mM HES, pH 7.0	none
G2	22 % w/v Polyglycolic acid sodium salt 5,200	none	100 mM HES, pH 7.5	20 mM Magnesium chloride
G3	20 % w/v Polylactopropionolone K6	none	100 mM Tris, pH 8.5	100 mM Calcium chloride
G4	20 % w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 2,000	none	100 mM Tris, pH 8.5	20 mM Trisethylamine HCl
G5	12 % w/v Polyethylene glycol 3,350	none	100 mM HES, pH 7.5	5 mM Cobalt II chloride, 5 mM Calcium chloride, 5 mM Nickel II chloride, 5 mM Magnesium chloride
G6	20 % w/v Polyethylene glycol 3,350	none	none	20 mM D-Sodium malonate, pH 7.0
G7	15 % w/v Polyethylene glycol 3,350	none	none	100 mM D-Sodium succinate, pH 7.0
G8	20 % w/v Polyethylene glycol 3,350	none	none	100 mM D-Sodium DL-malate, pH 7.0
G9	30 % w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 2,000	none	none	100 mM Potassium thiocyanate
G10	30 % w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 2,000	none	none	100 mM Potassium benzoate
G11	none	none	100 mM BS-TRIS, pH 5.5	18 mM Ammonium sulfate
G12	none	none	100 mM BS-TRIS, pH 5.5	18 mM Calcium chloride
H1	none	none	100 mM BS-TRIS, pH 5.5	20 mM Magnesium formate
H2	1% w/v Polyethylene glycol 3,350	none	100 mM BS-TRIS, pH 5.5	18 mM Ammonium sulfate
H3	25 % w/v Polyethylene glycol 3,350	none	100 mM BS-TRIS, pH 5.5	none
H4	45 % w/v 2-Methyl-2,4-pentanediol	none	100 mM BS-TRIS, pH 5.5	20 mM Calcium chloride
H5	45 % w/v 2-Methyl-2,4-pentanediol	none	100 mM BS-TRIS, pH 5.5	20 mM Ammonium acetate
H6	1% w/v Polyethylene glycol 10,000	none	100 mM BS-TRIS, pH 5.5	100 mM Ammonium acetate
H7	25 % w/v Polyethylene glycol 3,350	none	100 mM BS-TRIS, pH 5.5	20 mM Ammonium sulfate
H8	25 % w/v Polyethylene glycol 3,350	none	100 mM BS-TRIS, pH 5.5	20 mM Sodium citrate
H9	25 % w/v Polyethylene glycol 3,350	none	100 mM BS-TRIS, pH 5.5	20 mM Lithium sulfate
H10	25 % w/v Polyethylene glycol 3,350	none	100 mM BS-TRIS, pH 5.5	20 mM Ammonium acetate
H11	25 % w/v Polyethylene glycol 3,350	none	100 mM BS-TRIS, pH 5.5	20 mM Magnesium chloride
H12	45 % w/v 2-Methyl-2,4-pentanediol	none	100 mM HES, pH 7.5	20 mM Ammonium acetate

*pH values indicated are those of the 10 mM buffer stock solution prior to dilution with other components

Příloha č. 3: Složení precipitačních činidel sady SG1 (Molecular Dimensions, USA)

SG1 Screen		Box 1 Conditions 1 - 48		MD1-88		
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 N w/v PEG 4000	
1-2	2.0 M Ammonium sulfate					
1-3	0.2 M Sodium acetate trihydrate				30 N 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				30 N w/v PEG 3350	
1-6			0.1 M Sodium HEPES	7.5	30 N w/v PEG 4000	30 N w/v 2-Propanol
1-7	2.0 M Ammonium sulfate		0.1 M Sodium HEPES	7.5	2 N w/v PEG 4000	
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 N w/v PEG 4000	
1-10	0.2 M Lithium sulfate		0.1 M Tris	8.5	30 N 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	30 N w/v PEG 8000	
1-13			0.1 M Bio-Tris	5.5	25 N w/v PEG 3350	
1-14			0.1 M MMS	6.5	12 N w/v PEG 20000	
1-15	0.2 M Magnesium chloride hexahydrate		0.1 M Bio-Tris	5.5	25 N w/v PEG 3350	
1-16	0.2 M Ammonium chloride		0.1 M MMS	6.5	30 N w/v PEG 10000 mM	
1-17	0.2 M Calcium chloride dihydrate				30 N w/v PEG 3350	
1-18			0.1 M Sodium HEPES	7.5	30 N w/v PEG 10000	
1-19	0.2 M Sodium formate				30 N w/v PEG 3350	
1-20	0.2 M Ammonium sulfate		0.1 M Bio-Tris	5.5	25 N 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 N w/v PEG 4000	
1-23	0.2 M Ammonium chloride				30 N w/v PEG 3350	
1-24	0.2 M Magnesium formate dihydrate				30 N w/v PEG 3350	
1-25	0.2 M Ammonium sulfate		0.1 M Sodium acetate	4.4	25 N 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 Bio-Tris	5.5	25 N w/v PEG 3350	
1-28	0.2 M Potassium sodium tartrate tetrahydrate				30 N w/v PEG 3350	
1-29	0.2 M Ammonium sulfate		0.1 M Sodium cacodylate	6.5	30 N w/v PEG 8000	
1-30	2.0 M Ammonium sulfate		0.1 M Sodium acetate	4.4		
1-31			0.1 M Sodium HEPES	7.5	25 N w/v PEG 3350	
1-32	0.2 M Magnesium chloride hexahydrate		0.1 M Bio-Tris	6.5	25 N w/v PEG 3350	
1-33	0.2 M Magnesium chloride hexahydrate		0.1 M Tris	8.5	25 N w/v PEG 3350	
1-34	0.2 M Magnesium chloride hexahydrate		0.1 M Sodium HEPES	7.5	25 N w/v PEG 3350	
1-35	0.2 M Sodium acetate trihydrate		0.1 M Sodium cacodylate	6.5	30 N w/v PEG 8000	
1-36	0.2 M Sodium acetate trihydrate		0.1 M Bio-Tris	5.5	25 N 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	30 N w/v PEG 3000	
1-39					25 N w/v PEG 1500	
1-40	0.2 M Potassium thiocyanate				30 N w/v PEG 3350	
1-41	0.2 M Sodium acetate trihydrate		0.1 M Sodium cacodylate	6.5	18 N w/v PEG 8000	
1-42	0.2 M Lithium sulfate		0.1 M Sodium HEPES	7.5	25 N w/v PEG 3350	
1-43	0.2 M Ammonium sulfate				30 N w/v PEG 8000	
1-44			0.1 M Bio-Tris	6.5	20 N w/v PEG 10000 mM	
1-45	0.2 M Ammonium sulfate		0.1 M Sodium acetate	4.4	30 N w/v PEG 2000 mM	
1-46	0.2 M Lithium sulfate		0.1 M Bio-Tris	6.5	25 N w/v PEG 3350	
1-47			0.1 M Sodium acetate	4.4	8 N w/v PEG 4000	
1-48	2.0 M Ammonium sulfate		0.1 M Bio-Tris	6.5		



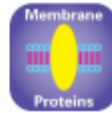
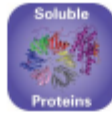
SG1 Screen Box 2 Conditions 1 - 48 MD1-88

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 % w/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	

Abbreviations: Bis-Tris; Bis-[2-hydroxyethyl]imino-tris(hydroxymethyl) methane, CAPS; N-Cyclohexyl-3-aminopropanesulfonic acid, CHES; 2-[N-Cyclohexylamino]ethane Sulfonic Acid, HEPES; 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic Acid, Sodium HEPES; 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic Acid Sodium Salt, MES; 2-[N-morpholino]ethanesulfonic acid, MPD; 2,4-methyl pentanediol, PEG; Polyethylene glycol, T-mate; Sodium malonate dibasic monohydrate, Ammonium citrate dibasic, Succinic acid, DL-Malic acid, Sodium acetate trihydrate, Sodium formate, Ammonium tartrate tribasic.

Příloha č. 4: Složení precipitačních činidel sady PGA (Molecular Dimention, USA)

Molecular Dimensions		Soluble Proteins		Membrane Proteins	
The PGA Screen™ HT-96 / FX-96					
Conditions A1-D12			MD1-51 / MD1-51-FX		
Well #	Conc. Salt 1	Conc. Salt 2	Conc. Buffer	pH	Conc. Precipitant
A1	0.1 M Potassium bromide		0.1 M Sodium acetate	5.0	8 % w/v γ-PGA (N+ form, LM)
A2	0.2 M Magnesium chloride		0.1 M Sodium acetate	5.0	8 % w/v γ-PGA (N+ form, LM)
A3	0.3 M Sodium malonate dibasic monohydrate		0.1 M Sodium acetate	5.0	8 % w/v γ-PGA (N+ form, LM)
A4	0.4 M Sodium formate		0.1 M Sodium acetate	5.0	8 % w/v γ-PGA (N+ form, LM)
A5	1 M Ammonium formate		0.1 M Sodium acetate	5.0	8 % w/v γ-PGA (N+ form, LM)
A6	0.2 M Potassium thiocyanate		0.1 M Sodium acetate	5.0	8 % w/v γ-PGA (N+ form, LM)
A7	0.2 M L-Proline		0.1 M Sodium acetate	5.0	8 % w/v γ-PGA (N+ form, LM)
A8	0.2 M L-Arginine		0.1 M Sodium acetate	5.0	8 % w/v γ-PGA (N+ form, LM)
A9			0.1 M Sodium acetate	5.0	1 % w/v γ-PGA (N+ form, LM) 30 % w/v PEG 400
A10			0.1 M Sodium acetate	5.0	1 % w/v γ-PGA (N+ form, LM) 30 % w/v PEG 1000 MW
A11			0.1 M Sodium acetate	5.0	1 % w/v γ-PGA (N+ form, LM) 30 % w/v NP0
A12			0.1 M Sodium acetate	5.0	1 % w/v γ-PGA (N+ form, LM) 20 % w/v PEG 2000 MW
B1			0.1 M Sodium acetate	5.0	1 % w/v γ-PGA (N+ form, LM) 20 % w/v PEG 1000
B2			0.1 M Sodium acetate	5.0	1 % w/v γ-PGA (N+ form, LM) 15 % w/v PEG 4000
B3			0.1 M Sodium acetate	5.0	1 % w/v γ-PGA (N+ form, LM) 12 % w/v PEG 8000
B4			0.1 M Sodium acetate	5.0	1 % w/v γ-PGA (N+ form, LM) 8 % w/v PEG 20000
B5	0.2 M Potassium bromide	0.2 M Potassium thiocyanate	0.1 M Sodium acetate	5.0	8 % w/v γ-PGA (N+ form, LM) 30 % w/v PEG 400
B6	0.2 M Potassium bromide	0.2 M Potassium thiocyanate	0.1 M Sodium acetate	5.0	8 % w/v γ-PGA (N+ form, LM) 20 % w/v PEG 1000 MW
B7	0.2 M Potassium bromide	0.2 M Potassium thiocyanate	0.1 M Sodium acetate	5.0	8 % w/v γ-PGA (N+ form, LM) 20 % w/v NP0
B8	0.2 M Potassium bromide	0.2 M Potassium thiocyanate	0.1 M Sodium acetate	5.0	8 % w/v γ-PGA (N+ form, LM) 20 % w/v PEG 2000 MW
B9	0.2 M Potassium bromide	0.2 M Potassium thiocyanate	0.1 M Sodium acetate	5.0	8 % w/v γ-PGA (N+ form, LM) 1 % w/v PEG 1000
B10	0.2 M Potassium bromide	0.2 M Potassium thiocyanate	0.1 M Sodium acetate	5.0	8 % w/v γ-PGA (N+ form, LM) 5 % w/v PEG 4000
B11	0.2 M Potassium bromide	0.2 M Potassium thiocyanate	0.1 M Sodium acetate	5.0	8 % w/v γ-PGA (N+ form, LM) 5 % w/v PEG 8000
B12	0.2 M Potassium bromide	0.2 M Potassium thiocyanate	0.1 M Sodium acetate	5.0	8 % w/v γ-PGA (N+ form, LM) 8 % w/v PEG 20000
C1	0.1 M Ammonium sulfate		0.1 M Sodium formate	5.0	8 % w/v γ-PGA (N+ form, LM) 30 % w/v PEG 400
C2	0.1 M Ammonium sulfate		0.1 M Sodium formate	5.0	8 % w/v γ-PGA (N+ form, LM) 20 % w/v PEG 1000 MW
C3	0.1 M Ammonium sulfate		0.1 M Sodium formate	5.0	8 % w/v γ-PGA (N+ form, LM) 20 % w/v NP0
C4	0.1 M Ammonium sulfate		0.1 M Sodium formate	5.0	8 % w/v γ-PGA (N+ form, LM) 20 % w/v PEG 2000 MW
C5	0.1 M Ammonium sulfate		0.1 M Sodium formate	5.0	8 % w/v γ-PGA (N+ form, LM) 1 % w/v PEG 1000
C6	0.1 M Ammonium sulfate		0.1 M Sodium formate	5.0	8 % w/v γ-PGA (N+ form, LM) 5 % w/v PEG 4000
C7	0.1 M Ammonium sulfate		0.1 M Sodium formate	5.0	8 % w/v γ-PGA (N+ form, LM) 5 % w/v PEG 8000
C8	0.1 M Ammonium sulfate		0.1 M Sodium formate	5.0	8 % w/v γ-PGA (N+ form, LM) 8 % w/v PEG 20000
C9	0.1 M Potassium bromide		0.1 M Sodium cacodylate	6.5	8 % w/v γ-PGA (N+ form, LM)
C10	0.1 M Magnesium chloride		0.1 M Sodium cacodylate	6.5	8 % w/v γ-PGA (N+ form, LM)
C11	0.1 M Sodium malonate dibasic monohydrate		0.1 M Sodium cacodylate	6.5	8 % w/v γ-PGA (N+ form, LM)
C12	0.1 M Sodium formate		0.1 M Sodium cacodylate	6.5	8 % w/v γ-PGA (N+ form, LM)
D0	1 M Ammonium formate		0.1 M Sodium cacodylate	6.5	8 % w/v γ-PGA (N+ form, LM)
D2	0.2 M Potassium thiocyanate		0.1 M Sodium cacodylate	6.5	8 % w/v γ-PGA (N+ form, LM)
D3	0.2 M L-Proline		0.1 M Sodium cacodylate	6.5	8 % w/v γ-PGA (N+ form, LM)
D4	0.2 M L-Arginine		0.1 M Sodium cacodylate	6.5	8 % w/v γ-PGA (N+ form, LM)
D5			0.1 M Sodium cacodylate	6.5	1 % w/v γ-PGA (N+ form, LM) 30 % w/v PEG 400
D6			0.1 M Sodium cacodylate	6.5	1 % w/v γ-PGA (N+ form, LM) 30 % w/v PEG 1000 MW
D7			0.1 M Sodium cacodylate	6.5	1 % w/v γ-PGA (N+ form, LM) 30 % w/v NP0
D8			0.1 M Sodium cacodylate	6.5	1 % w/v γ-PGA (N+ form, LM) 20 % w/v PEG 2000 MW
D9			0.1 M Sodium cacodylate	6.5	1 % w/v γ-PGA (N+ form, LM) 20 % w/v PEG 1000
D10			0.1 M Sodium cacodylate	6.5	1 % w/v γ-PGA (N+ form, LM) 15 % w/v PEG 4000
D11			0.1 M Sodium cacodylate	6.5	1 % w/v γ-PGA (N+ form, LM) 12 % w/v PEG 8000
D12			0.1 M Sodium cacodylate	6.5	1 % w/v γ-PGA (N+ form, LM) 8 % w/v PEG 20000



The PGA Screen™ HT-96 / FX-96 Conditions E1-H12 MD1-51 / MD1-51-FX

Well #	Conc.	Salt 1	Conc.	Salt 2	Conc.	Buffer	pH	Conc.	Precipitant	Conc.	Precipitant
01	0.2 M	Potassium bromide	0.2 M	Potassium thiocyanate	0.1 M	Sodium cacodylate	6.5	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	80 % v/v	PEG-800
02	0.2 M	Potassium bromide	0.2 M	Potassium thiocyanate	0.1 M	Sodium cacodylate	6.5	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	20 % v/v	PEG-100/MME
03	0.2 M	Potassium bromide	0.2 M	Potassium thiocyanate	0.1 M	Sodium cacodylate	6.5	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	20 % v/v	MPD
04	0.2 M	Potassium bromide	0.2 M	Potassium thiocyanate	0.1 M	Sodium cacodylate	6.5	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	20 % v/v	PEG-2000/MME
05	0.2 M	Potassium bromide	0.2 M	Potassium thiocyanate	0.1 M	Sodium cacodylate	6.5	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	5 % w/v	PEG-1000
06	0.2 M	Potassium bromide	0.2 M	Potassium thiocyanate	0.1 M	Sodium cacodylate	6.5	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	5 % w/v	PEG-8000
07	0.2 M	Potassium bromide	0.2 M	Potassium thiocyanate	0.1 M	Sodium cacodylate	6.5	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	5 % w/v	PEG-8000
08	0.2 M	Potassium bromide	0.2 M	Potassium thiocyanate	0.1 M	Sodium cacodylate	6.5	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	3 % w/v	PEG-20000
09	0.1 M	Ammonium sulfate	0.1 M	Sodium formate	0.1 M	Sodium cacodylate	6.5	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	80 % v/v	PEG-800
10	0.1 M	Ammonium sulfate	0.1 M	Sodium formate	0.1 M	Sodium cacodylate	6.5	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	20 % v/v	PEG-100/MME
11	0.1 M	Ammonium sulfate	0.1 M	Sodium formate	0.1 M	Sodium cacodylate	6.5	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	20 % v/v	MPD
12	0.1 M	Ammonium sulfate	0.1 M	Sodium formate	0.1 M	Sodium cacodylate	6.5	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	20 % v/v	PEG-2000/MME
13	0.1 M	Ammonium sulfate	0.1 M	Sodium formate	0.1 M	Sodium cacodylate	6.5	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	5 % w/v	PEG-1000
14	0.1 M	Ammonium sulfate	0.1 M	Sodium formate	0.1 M	Sodium cacodylate	6.5	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	5 % w/v	PEG-8000
15	0.1 M	Ammonium sulfate	0.1 M	Sodium formate	0.1 M	Sodium cacodylate	6.5	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	5 % w/v	PEG-8000
16	0.1 M	Ammonium sulfate	0.1 M	Sodium formate	0.1 M	Sodium cacodylate	6.5	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	3 % w/v	PEG-20000
17	0.2 M	Magnesium chloride			0.1 M	Tris	7.8	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)		
18	0.1 M	Sodium malate dibasic monohydrate			0.1 M	Tris	7.8	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)		
19	0.1 M	Sodium formate			0.1 M	Tris	7.8	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)		
20	1 M	Ammonium formate			0.1 M	Tris	7.8	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)		
21	0.2 M	Potassium thiocyanate			0.1 M	Tris	7.8	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)		
22	0.2 M	L-Proline			0.1 M	Tris	7.8	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)		
23	0.2 M	L-Arginine			0.1 M	Tris	7.8	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)		
24					0.1 M	Tris	7.8	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	80 % v/v	PEG-800
25					0.1 M	Tris	7.8	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	80 % v/v	PEG-100/MME
26					0.1 M	Tris	7.8	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	80 % v/v	MPD
27					0.1 M	Tris	7.8	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	20 % v/v	PEG-2000/MME
28					0.1 M	Tris	7.8	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	20 % v/v	PEG-1000
29					0.1 M	Tris	7.8	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	20 % v/v	PEG-8000
30					0.1 M	Tris	7.8	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	5 % w/v	PEG-1000
31					0.1 M	Tris	7.8	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	5 % w/v	PEG-8000
32					0.1 M	Tris	7.8	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	5 % w/v	PEG-8000
33					0.1 M	Tris	7.8	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	3 % w/v	PEG-20000
34	0.2 M	Potassium bromide	0.2 M	Potassium thiocyanate	0.1 M	Tris	7.8	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	80 % v/v	PEG-800
35	0.2 M	Potassium bromide	0.2 M	Potassium thiocyanate	0.1 M	Tris	7.8	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	20 % v/v	PEG-100/MME
36	0.2 M	Potassium bromide	0.2 M	Potassium thiocyanate	0.1 M	Tris	7.8	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	20 % v/v	MPD
37	0.2 M	Potassium bromide	0.2 M	Potassium thiocyanate	0.1 M	Tris	7.8	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	20 % v/v	PEG-2000/MME
38	0.2 M	Potassium bromide	0.2 M	Potassium thiocyanate	0.1 M	Tris	7.8	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	5 % w/v	PEG-1000
39	0.2 M	Potassium bromide	0.2 M	Potassium thiocyanate	0.1 M	Tris	7.8	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	5 % w/v	PEG-8000
40	0.2 M	Potassium bromide	0.2 M	Potassium thiocyanate	0.1 M	Tris	7.8	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	5 % w/v	PEG-8000
41	0.1 M	Ammonium sulfate	0.1 M	Sodium formate	0.1 M	Tris	7.8	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	80 % v/v	PEG-800
42	0.1 M	Ammonium sulfate	0.1 M	Sodium formate	0.1 M	Tris	7.8	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	20 % v/v	PEG-100/MME
43	0.1 M	Ammonium sulfate	0.1 M	Sodium formate	0.1 M	Tris	7.8	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	20 % v/v	MPD
44	0.1 M	Ammonium sulfate	0.1 M	Sodium formate	0.1 M	Tris	7.8	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	20 % v/v	PEG-2000/MME
45	0.1 M	Ammonium sulfate	0.1 M	Sodium formate	0.1 M	Tris	7.8	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	5 % w/v	PEG-1000
46	0.1 M	Ammonium sulfate	0.1 M	Sodium formate	0.1 M	Tris	7.8	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	5 % w/v	PEG-8000
47	0.1 M	Ammonium sulfate	0.1 M	Sodium formate	0.1 M	Tris	7.8	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	5 % w/v	PEG-8000
48	0.1 M	Ammonium sulfate	0.1 M	Sodium formate	0.1 M	Tris	7.8	3 % w/v	γ-PGA (Na+ form, LM)	3 % w/v	PEG-20000

Abbreviations:
γ-PGA (Na+ form, LM), poly-γ-glutamic acid low molecular weight polymer, **PEG**, polyethylene glycol; **MME**, monomethyl ether; **MPD**, 2-methyl-2,4-pentanediol, Hexylene glycol; **Tris**; 2-Amino-2-(hydroxymethyl)propane-1,3-diol.

Příloha č. 5: Složení precipitačních činidel sady PEGRx (Hampton Research, USA)

PEGRx HT™ HR2-086 Reagent Formulation

Well #	Buffer ^o	Well #	Polymer
1. (A1)	0.1 M Citric acid pH 3.5	1. (A1)	34% v/v Polyethylene glycol 200
2. (A2)	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.5	2. (A2)	38% v/v Polyethylene glycol 200
3. (A3)	0.1 M HEPES pH 7.5	3. (A3)	42% v/v Polyethylene glycol 200
4. (A4)	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.5	4. (A4)	30% v/v Polyethylene glycol 300
5. (A5)	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	5. (A5)	25% v/v Polyethylene glycol 300
6. (A6)	0.1 M BICINE pH 8.5	6. (A6)	20% v/v Polyethylene glycol 300
7. (A7)	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.0	7. (A7)	15% v/v Polyethylene glycol 400
8. (A8)	0.1 M MES monohydrate pH 6.0	8. (A8)	22% v/v Polyethylene glycol 400
9. (A9)	0.1 M Tris pH 8.0	9. (A9)	30% v/v Polyethylene glycol 400
10. (A10)	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.0	10. (A10)	30% v/v Polyethylene glycol monomethyl ether 550
11. (A11)	0.1 M Imidazole pH 7.0	11. (A11)	25% v/v Polyethylene glycol monomethyl ether 550
12. (A12)	0.1 M BIS-TRIS propane pH 9.0	12. (A12)	20% v/v Polyethylene glycol monomethyl ether 550
13. (B1)	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.0	13. (B1)	10% v/v Jaffamine [®] M-600 [®] pH 7.0
14. (B2)	0.1 M MES monohydrate pH 6.0	14. (B2)	20% v/v Jaffamine [®] M-600 [®] pH 7.0
15. (B3)	0.1 M Tris pH 8.0	15. (B3)	30% v/v Jaffamine [®] M-600 [®] pH 7.0
16. (B4)	0.1 M Citric acid pH 3.5	16. (B4)	14% v/v Polyethylene glycol 1,000
17. (B5)	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.5	17. (B5)	22% v/v Polyethylene glycol 1,000
18. (B6)	0.1 M HEPES pH 7.5	18. (B6)	30% v/v Polyethylene glycol 1,000
19. (B7)	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.5	19. (B7)	30% v/v Polyethylene glycol 1,500
20. (B8)	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	20. (B8)	20% v/v Polyethylene glycol 1,500
21. (B9)	0.1 M BICINE pH 8.5	21. (B9)	15% v/v Polyethylene glycol 1,500
22. (B10)	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.0	22. (B10)	10% v/v Polyethylene glycol monomethyl ether 2,000
23. (B11)	0.1 M MES monohydrate pH 6.0	23. (B11)	20% v/v Polyethylene glycol monomethyl ether 2,000
24. (B12)	0.1 M Tris pH 8.0	24. (B12)	30% v/v Polyethylene glycol monomethyl ether 2,000
25. (C1)	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.0	25. (C1)	30% v/v Jaffamine [®] ED-2001 pH 7.0
26. (C2)	0.1 M Imidazole pH 7.0	26. (C2)	20% v/v Jaffamine [®] ED-2001 pH 7.0
27. (C3)	0.1 M BIS-TRIS propane pH 9.0	27. (C3)	10% v/v Jaffamine [®] ED-2001 pH 7.0
28. (C4)	0.1 M Citric acid pH 3.5	28. (C4)	25% v/v Polyethylene glycol 3,350
29. (C5)	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.5	29. (C5)	18% v/v Polyethylene glycol 3,350
30. (C6)	0.1 M HEPES pH 7.5	30. (C6)	12% v/v Polyethylene glycol 3,350
31. (C7)	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.0	31. (C7)	10% v/v Polyethylene glycol 4,000
32. (C8)	0.1 M MES monohydrate pH 6.0	32. (C8)	14% v/v Polyethylene glycol 4,000
33. (C9)	0.1 M Tris pH 8.0	33. (C9)	28% v/v Polyethylene glycol 4,000
34. (C10)	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.5	34. (C10)	30% v/v Polyethylene glycol monomethyl ether 5,000
35. (C11)	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	35. (C11)	20% v/v Polyethylene glycol monomethyl ether 5,000
36. (C12)	0.1 M BICINE pH 8.5	36. (C12)	8% v/v Polyethylene glycol monomethyl ether 5,000
37. (D1)	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.0	37. (D1)	10% v/v Polyethylene glycol 6,000
38. (D2)	0.1 M Imidazole pH 7.0	38. (D2)	20% v/v Polyethylene glycol 6,000
39. (D3)	0.1 M BIS-TRIS propane pH 9.0	39. (D3)	30% v/v Polyethylene glycol 6,000
40. (D4)	0.1 M Citric acid pH 3.5	40. (D4)	28% v/v Polyethylene glycol 8,000
41. (D5)	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.5	41. (D5)	16% v/v Polyethylene glycol 8,000
42. (D6)	0.1 M HEPES pH 7.5	42. (D6)	4% v/v Polyethylene glycol 8,000
43. (D7)	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.5	43. (D7)	10% v/v Polyethylene glycol 10,000
44. (D8)	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	44. (D8)	16% v/v Polyethylene glycol 10,000
45. (D9)	0.1 M BICINE pH 8.5	45. (D9)	20% v/v Polyethylene glycol 10,000
46. (D10)	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.0	46. (D10)	18% v/v Polyethylene glycol 20,000
47. (D11)	0.1 M Imidazole pH 7.0	47. (D11)	12% v/v Polyethylene glycol 20,000
48. (D12)	0.1 M BIS-TRIS propane pH 9.0	48. (D12)	8% v/v Polyethylene glycol 20,000

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

PEGRx™ 1 (Deep Well Block) contains forty-eight unique reagents beginning at position A1.
To determine the formulation of each reagent, simply read across the page.

Well #	Additive / Salt / Volatile Organic / Polymer	Well #	Buffer ^o	Well #	Polymer
49 (E1)	0.8 M Lithium sulfate monohydrate	49 (E1)	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.0	49 (E1)	4% v/v Polyethylene glycol 200
50 (E2)	0.2 M Lithium sulfate monohydrate	50 (E2)	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.0	50 (E2)	26% v/v Polyethylene glycol 200
51 (E3)	0.05 M Calcium chloride dihydrate	51 (E3)	0.1 M MES monohydrate pH 6.0	51 (E3)	45% v/v Polyethylene glycol 200
52 (E4)	26% v/v 2-Propanol	52 (E4)	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	52 (E4)	3% v/v Polyethylene glycol 200
53 (E5)	20% v/v Tacsimate pH 7.0	53 (E5)	0.1 M HEPES pH 7.5	53 (E5)	2% v/v Polyethylene glycol 200
54 (E6)	10% v/v 2-Propanol	54 (E6)	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.0	54 (E6)	26% v/v Polyethylene glycol 400
55 (E7)	0.2 M Ammonium acetate	55 (E7)	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.5	55 (E7)	24% v/v Polyethylene glycol 400
56 (E8)	0.2 M Ammonium sulfate	56 (E8)	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	56 (E8)	18% v/v Polyethylene glycol 400
57 (E9)		57 (E9)	0.1 M HEPES pH 7.5	57 (E9)	40% v/v Polyethylene glycol 400
58 (E10)	6% v/v 2-Propanol	58 (E10)	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.5	58 (E10)	26% v/v Polyethylene glycol monomethyl ether 550
59 (E11)	1.8 M Ammonium sulfate	59 (E11)	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	59 (E11)	2% v/v Polyethylene glycol monomethyl ether 550
60 (E12)	0.15 M DL-Malic acid pH 7.0	60 (E12)	0.1 M Imidazole pH 7.0	60 (E12)	22% v/v Polyethylene glycol monomethyl ether 550
61 (F1)	0.1 M Succinic acid pH 7.0	61 (F1)	0.1 M BICINE pH 8.5	61 (F1)	30% v/v Polyethylene glycol monomethyl ether 550
62 (F2)	0.1 M Lithium sulfate monohydrate	62 (F2)	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.5	62 (F2)	20% v/v Polyethylene glycol 1,000
63 (F3)	0.1 M Sodium malonate pH 8.0	63 (F3)	0.1 M Tris pH 8.0	63 (F3)	30% v/v Polyethylene glycol 1,000
64 (F4)	4% v/v (+)-2-Methyl-2,4-pentanediol	64 (F4)	0.1 M Citric acid pH 3.5	64 (F4)	20% v/v Polyethylene glycol 1,500
65 (F5)	0.2 M L-Proline	65 (F5)	0.1 M HEPES pH 7.5	65 (F5)	24% v/v Polyethylene glycol 1,500
66 (F6)	10% v/v 2-Propanol	66 (F6)	0.1 M BICINE pH 8.5	66 (F6)	30% v/v Polyethylene glycol 1,500
67 (F7)	0.1 M Sodium chloride	67 (F7)	0.1 M BIS-TRIS propane pH 9.0	67 (F7)	25% v/v Polyethylene glycol 1,500
68 (F8)	0.02 M Nickel(II) chloride hexahydrate, 0.02 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.02 M Cadmium chloride hydrate	68 (F8)	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.5	68 (F8)	24% v/v Polyethylene glycol monomethyl ether 2,000
69 (F9)	20% v/v 2-Propanol	69 (F9)	0.1 M MES monohydrate pH 6.0	69 (F9)	20% v/v Polyethylene glycol monomethyl ether 2,000
70 (F10)	0.2 M Ammonium citrate tribasic pH 7.0	70 (F10)	0.1 M Imidazole pH 7.0	70 (F10)	20% v/v Polyethylene glycol monomethyl ether 2,000
71 (F11)	4.0 M Potassium formate	71 (F11)	0.1 M BIS-TRIS propane pH 9.0	71 (F11)	2% v/v Polyethylene glycol monomethyl ether 2,000
72 (F12)	50% v/v Tacsimate pH 4.0	72 (F12)	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.5	72 (F12)	1% v/v Polyethylene glycol 3,350
73 (G1)	0.10% w/v n-Octyl-β-D-glucoside	73 (G1)	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.5	73 (G1)	22% v/v Polyethylene glycol 3,350
74 (G2)	2% v/v Tacsimate pH 7.0, 5% v/v 2-Propanol	74 (G2)	0.1 M Imidazole pH 7.0	74 (G2)	8% v/v Polyethylene glycol 3,350
75 (G3)	2% v/v 1,4-Dioxane	75 (G3)	0.1 M Tris pH 8.0	75 (G3)	15% v/v Polyethylene glycol 3,350
76 (G4)	18% v/v 2-Propanol	76 (G4)	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.5	76 (G4)	20% v/v Polyethylene glycol 4,000
77 (G5)	6% v/v Tacsimate pH 6.0	77 (G5)	0.1 M MES monohydrate pH 6.0	77 (G5)	25% v/v Polyethylene glycol 4,000
78 (G6)	0.2 M Magnesium formate dihydrate	78 (G6)	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.0	78 (G6)	18% v/v Polyethylene glycol monomethyl ether 5,000
79 (G7)	2% v/v Polyethylene glycol 400	79 (G7)	0.1 M Imidazole pH 7.0	79 (G7)	24% v/v Polyethylene glycol monomethyl ether 5,000
80 (G8)	0.2 M Sodium formate	80 (G8)	0.1 M BICINE pH 8.5	80 (G8)	20% v/v Polyethylene glycol monomethyl ether 5,000
81 (G9)	4% v/v 2-Propanol	81 (G9)	0.1 M BIS-TRIS propane pH 9.0	81 (G9)	20% v/v Polyethylene glycol monomethyl ether 5,000
82 (G10)	6% v/v Ethylene glycol	82 (G10)	0.1 M Citric acid pH 3.5	82 (G10)	10% v/v Polyethylene glycol 6,000
83 (G11)	0.15 M Lithium sulfate monohydrate	83 (G11)	0.1 M Citric acid pH 3.5	83 (G11)	18% v/v Polyethylene glycol 6,000
84 (G12)	10% v/v 2-Propanol	84 (G12)	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.0	84 (G12)	22% v/v Polyethylene glycol 6,000
85 (H1)	0.2 M Sodium chloride	85 (H1)	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.0	85 (H1)	22% v/v Polyethylene glycol 8,000
86 (H2)	20% v/v 2-Propanol	86 (H2)	0.1 M Tris pH 8.0	86 (H2)	5% v/v Polyethylene glycol 8,000
87 (H3)	10% v/v Polyethylene glycol 200	87 (H3)	0.1 M BIS-TRIS propane pH 9.0	87 (H3)	18% v/v Polyethylene glycol 8,000
88 (H4)	15% v/v 2-Propanol	88 (H4)	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.0	88 (H4)	10% v/v Polyethylene glycol 10,000
89 (H5)	0.4 M Sodium malonate pH 6.0	89 (H5)	0.1 M MES monohydrate pH 6.0	89 (H5)	0.5% v/v Polyethylene glycol 10,000
90 (H6)	0.2 M Potassium sodium tartrate tetrahydrate	90 (H6)	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	90 (H6)	10% v/v Polyethylene glycol 10,000
91 (H7)	5% v/v (+)-2-Methyl-2,4-pentanediol	91 (H7)	0.1 M HEPES pH 7.5	91 (H7)	10% v/v Polyethylene glycol 10,000
92 (H8)	0.2 M Ammonium acetate	92 (H8)	0.1 M Tris pH 8.0	92 (H8)	18% v/v Polyethylene glycol 10,000
93 (H9)	5% v/v 2-Propanol	93 (H9)	0.1 M Citric acid pH 3.5	93 (H9)	6% v/v Polyethylene glycol 20,000
94 (H10)	1.0 M Sodium malonate pH 5.0	94 (H10)	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.5	94 (H10)	2% v/v Polyethylene glycol 20,000
95 (H11)	0.2 M Magnesium chloride hexahydrate	95 (H11)	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.0	95 (H11)	10% v/v Polyethylene glycol 20,000
96 (H12)	3% v/v Dextran sulfate sodium salt	96 (H12)	0.1 M BICINE pH 8.5	96 (H12)	15% v/v Polyethylene glycol 20,000

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

PEGRx™ 2 (Deep Well Block) contains forty-eight unique reagents beginning at position E1.
To determine the formulation of each reagent, simply read across the page.



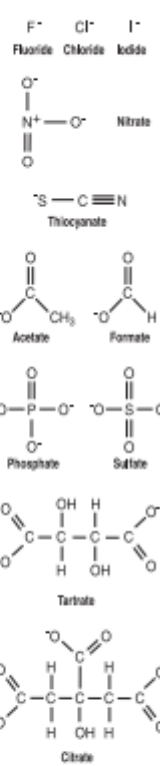
Advancing the Crystal Frontier

34 Journey
Aliso Viejo, CA 92656-1117 U.S.A.
Tel: (949) 425-1321 • Fax: (949) 425-1611
E-mail: tech@hampton.com
Website: www.hamptonresearch.com

© 1991 - 2003 Hampton Research Corp. All rights reserved.
Printed in the United States of America. This publication
parts thereof may not be reproduced in any form without
the written permission of the publisher.

Příloha č. 6: Složení precipitačních činidel sady PEG/Ion (Hampton Research, USA)

PEG/Ion HT™		HR2-139 Reagent Formulation			
Well #	Salt	Well #	Polymer	Well #	pH ^o
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



^o Measured pH at 25 °C

PEG/Ion HT contains ninety-six unique reagents. To determine the formulation of each reagent, simply read across the page.



Well #	Salt	Well #	Buffer ^o	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 4.5	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 5.5	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 7.8	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 heptahydrate, 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 Calcium 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 Tris(hydroxymethyl)aminomethane 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 Tris(hydroxymethyl)aminomethane 0.001 M Sodium azide	96 (H12)	0.05 M HEPES sodium pH 7.0	96 (H12)	20% w/v Polyethylene glycol 3,350

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

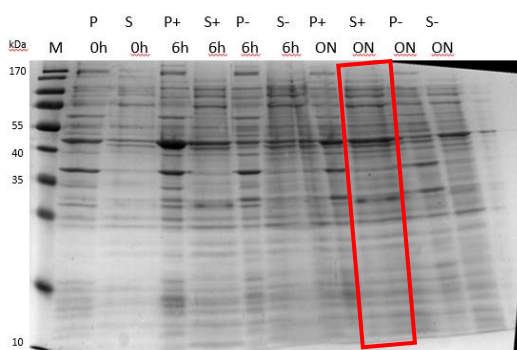
PEG/Ion HT contains ninety-six unique reagents. To determine the formulation of each reagent, simply read across the page.

H. Jarman
 Also: Yajay, CA 90566-3317 U.S.A.
 Tel: (949) 425-1321 • Fax: (949) 425-1611
 E-mail: tech@hampton.com
 Website: www.hamptonresearch.com

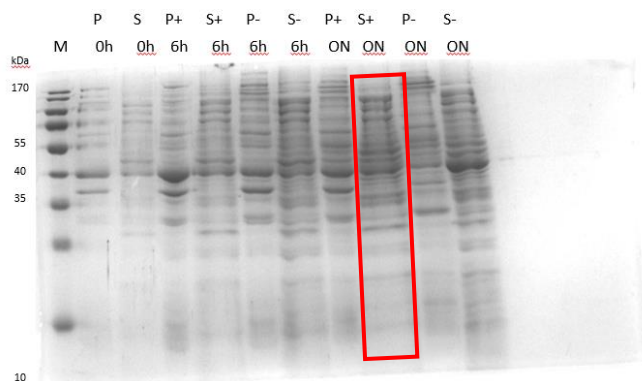


Solutions for Crystal Growth
 © 1995 - 2011 Hampton Research Corp. All rights reserved.
 Printed in the United States of America. This guide or
 parts thereof may not be reproduced in any form without
 the written permission of the publisher.

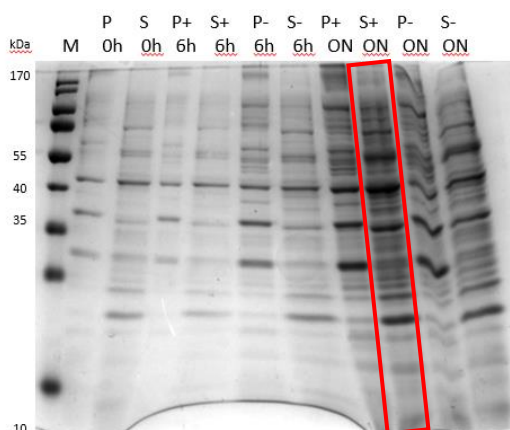
Příloha č. 7: Výsledky pilotní exprese pro ostatní buňky



BL21(DE3) – CodonPlus, AMP + CHLO, LB médium, 18°C; M – marker, P – pelet, S – supernatant, 0h – nula hodin, 6h – šest hodin, ON – overnight (přes noc), [+] – 1 mM IPTG, [-] – negativní kontrola



BL21(DE3), LB médium, 18°C; M – marker, P – pelet, S – supernatant, 0h – nula hodin, 6h – šest hodin, ON – overnight (přes noc), [+] – 1 mM IPTG, [-] – negativní kontrola



Pilotní exprese Rosseta – gami 2(DE3), LB médium, 18°C; M – marker, P – pelet, S – supernatant, 0h – nula hodin, 6h – šest hodin, ON – overnight (přes noc), [+] – 1 mM IPTG, [-] – negativní kontrola

Příloha č. 8: Tab. V: Analýza intaktního proteinu Iripinu-5 pomocí timsTOF Pro.

Razor peptidy	Proteinová molekulární hmotnost (kDa)	Proteinové skóre
17	41,973	217,45

Příloha č. 9: Tab. VI: Zjištěné peptidy z analýzy intaktního proteinu Iripin-5, pomocí timsTOF Pro, vyplývající ze štěpení proteázou jsou uvedeny od nejmenší teoretické hmotnosti. Výsledky intaktního proteinu jsou uvedeny na Obr. 5.

Peptidová sekvence	Hmota prekurzoru (Da)	Peptidové skóre
GLPSSPEK	813,42323	51,43
FAVDLLR	832,48069	119,06
GSEGIEAFK	936,45526	67,464
LVLLNAIFFK	1176,7271	97,033
NLYDGGFYLR	1216,5877	106,93
DLLFAGQVNHL	1225,6455	137,88
LFDGPLDPLTR	1242,6608	143,39
FKLETEYSLK	1256,6653	69,915
LQDYIGHVELR	1341,7041	117,45
EDWVLQAYADHAK	1544,726	81,799
VDFVNGGPAAIDEINR	1685,8373	108,91
FKLETEYSLKDSLK	1699,9033	62,454
SGLKEDWVLQAYADHAK	1929,9585	126,32
NIFFSPYSISTAMGMVFAGAK	2238,0853	110,9
AVVEVNEEGTEAAAVSGVAVVTR	2256,1598	129,03
LEIAELPYDGGNYSMVILLPR	2362,2243	54,912
QLQVGQSQSTFDVANAAAIHER	2369,1724	250,08