

3) **Strana 16., obrázky 10 a 11, upravena legenda**

Obrázek 10 Závislost relativní aktivity nepenthesinů na pH měřena při 37 °C po dobu (A) 7 dnů a (B) 30 dnů při různých hodnotách pH. Černá: tekutina z láčky, světle šedá: nepenthesin I, tmavě šedá: nepenthesin II, transparentní: pepsin A. (C) pH stabilita nepenthesinů.- aktivita byla měřena na kyselinou denaturovaném hemoglobinu při různých hodnotách pH a při teplotě 37 °C. -o- nepenthesin I; -•- nepenthesin II; -▲- tekutina z láčky³⁹.

Obrázek 11. Srovnání teplotní stability nepenthesinů a pepsinu a teplotní optimum a stabilita nepenthesinů. Závislost relativní aktivity nepenthesinu na inkubační teplotě při pH 3 po dobu (A) 7 dnů a (B) 30 dnů. Černá: tekutina z láčky, světle šedá: nepenthesin I, tmavě šedá: nepenthesin II, transparentní: pepsin A. (C) Teplotní optimum nepenthesinů měřeno za různých teplot při pH 3,0. (D) Aktivita byla měřena při teplotě 37 °C po 1h inkubaci vzorků při různých teplotách a pH 3,0. -o- nepenthesin I; -•- nepenthesin II; -▲- tekutina z láčky³⁹.

4) **Strana 29, druhý odstavec, metoda 4.12, chybně uvedený postup**

Isolovaná inkusní tělíska o přibližné hmotnosti 1 g (namokro) byla rozpuštěna v **1. renaturačním** pufru, následně bylo pH roztoku upraveno 10M NaOH na hodnotu 10,5 a objem byl doplněn destilovanou vodou na 1 l.

by mělo být nahrazeno

Isolovaná inkusní tělíska o přibližné hmotnosti 1 g (namokro) byla rozpuštěna v 1 litru **1. renaturačního** pufru.

5) **Strana 29, kapitola 4.12, - není na konci popsána ultrafiltrace**

Po poslední dialýze byl roztok o objemu 1,5 l nalit do ultrafiltrační cely s membránou o nominální propustností 30 kDa. Poté byl do cely vpuštěn dusík pod tlakem 0,2 MPa. Roztok proteinu byl do cely průběžně doplňován, dokud konečný objem retenátu nedosáhl 50 ml. Potom byl retenát odebrán injekční stříkačkou, přesunut do centrifugační kyvety a odstředěn při 24000×g za účelem odstranění precipitátu.

6) **Strana 31, obrázek 13., upravena legenda**

Obrázek 12. Agarozová elektroforéza restričního štěpení plasmidu pET21a. (A) tři kolonie vybrané u minipreparativní izolace a (B) následná maxipreparativní izolace klonu č. 2 (vzorek označen V). **M** označuje standard délek fragmentů DNA. Štěpení bylo prováděno restriktasami HindIII a NdeI.

7) **Strana 32, obrázek 14., upravena legenda**

Obrázek 13. Analýza produkce proteinu v autoindukčních médiích pomocí SDS-PAGE (A) (ZYP-0,8G a P-0,5G) za různých teplot (28 a 37 °C) a koncentraci IPTG (I – 0,5 mM; II – 1 mM). (B) SDS-PAGE analýza z produkce proteinu v LB médiu za různých teplot a koncentraci induktoru, značení je stejné jako na obrázku A. **M** označuje standard molekulových hmotností proteinů. Protein byl vizualizován pomocí CBB-R250. Šipka označuje pozici nepenthesinu.

8) **Strana 33, obrázek 15., upravena legenda**

Obrázek 14. SDS-PAGE analýza produkce nepenthesinu v buňkách C41, C43 a Gold v LB, 2YT, minimálním a autoindukčním ZYP-0,8G médiu. Kromě produkce v minimálním médiu, prováděné při 28 °C, vše inkubováno při 37 °C. I a II značí 0,5 a 1 mM koncentraci IPTG. **M** označuje standard molekulových hmotností proteinů. + a - označují indukované a neindukované buněčné kultury. Protein byl vizualizován pomocí CBB-R250. Šipka označuje pozici nepenthesinu.

9) **Strana 33, obrázek 16., upravena legenda**

Obrázek 15. SDS-PAGE analýza buněčného obsahu z kontrolní produkce nepenthesinu I v buňkách C41 s (+) a bez (-) induktoru. **M** označuje standard molekulových hmotností proteinů. Protein byl vizualizován pomocí CBB-R250. Šipka označuje pozici nepenthesinu.

10) **Strana 33, obrázek 17., upravena legenda**

Obrázek 16. SDS-PAGE analýza buněčného obsahu ze čtyř produkcí s různými koncentracemi IPTG (mM) v médiu – vyznačeno nad jednotlivými drahami. **M** označuje standard molekulových hmotností proteinů. Protein byl vizualizován pomocí CBB-R250. Šipka označuje pozici nepenthesinu.

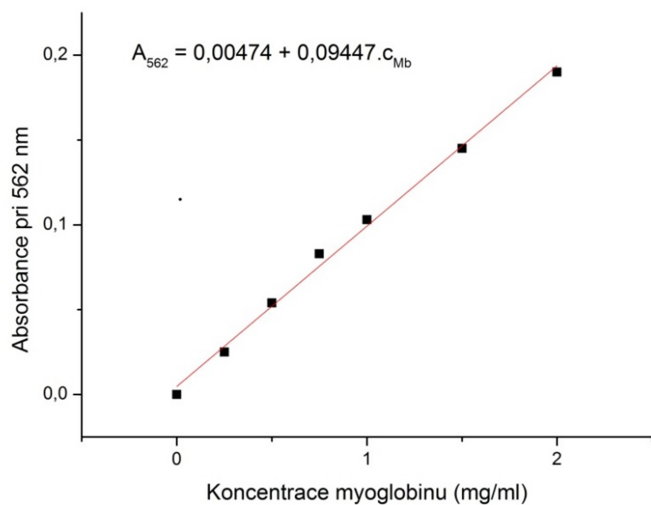
11) **Strana 34, obrázek 18., upravena legenda**

Obrázek 17. SDS-PAGE analýza produkce a izolace inkluzních tělísek z buněk *E.coli* C41. 1 – buňky před indukcí, 2 – po produkci, 3 – v sacharózovém pufru, 4 – tritónovém pufru, 5 – promývacím pufru. (a) – pelet, (b) – supernatant. **M** označuje standard molekulových hmotností proteinů. Protein byl vizualizován pomocí CBB-R250.

12) **Strana 34, obrázek 19., upravena legenda**

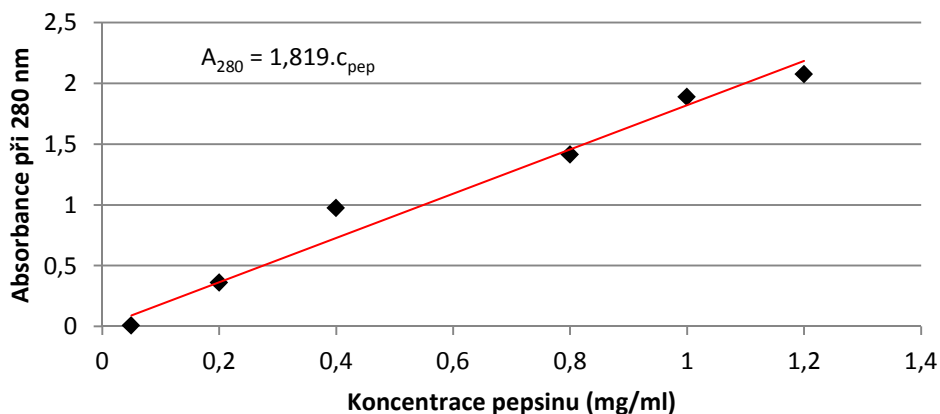
Obrázek 18. SDS-PAGE analýza průběhu renaturace proteinu. Vzorky z dialyzačních trubic byly nanášeny na gel v redukujícím (100 mM DTT) a neredukujícím vzorkovém pufru. 1 – 8M močovina, 300 mM BME, 2 – 50 mM Tris-HCl pH 10, 3 – 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 4 – 50 mM fosfátový pufr pH 7,5. **M** označuje standard molekulových hmotností proteinů. Protein byl vizualizován pomocí CBB-R250.

13) **Strana 35, obrázek 20., upravena legenda, popsány osy**



Obrázek 20. Kalibrační křivka pro stanovení koncentrace proteinu metodou BCA. Graf závislosti absorbance při vlnové délce 562 nm na koncentraci myoglobinu ve vzorku. Rovnice pro kalibrační křivku posloužila pro výpočet koncentrace nepenthesinu v roztoku.

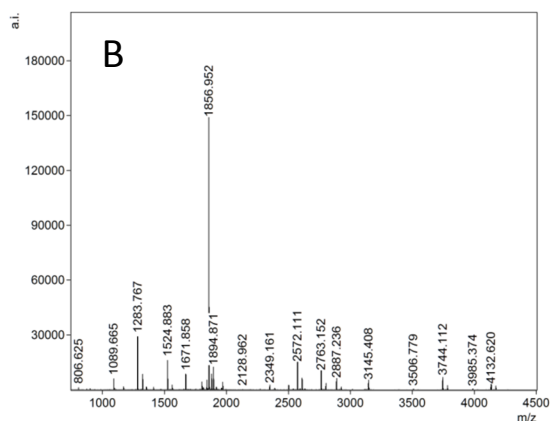
14) **strana 35, obrázek 21., upravená legenda, popsány osy**



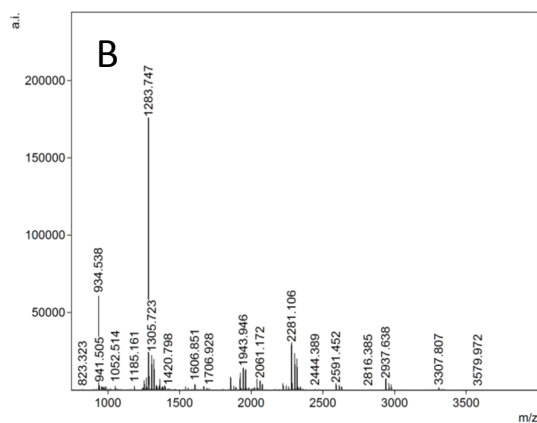
Obrázek 21. Kalibrační křivka pro stanovení aktivity nepenthesinu. Graf závislosti absorbance při vlnové délce 280 nm na koncentraci pepsinu ve vzorku. Rovnice kalibrační křivky byla využita pro určení množství pepsinu odpovídajícího aktivitě izolovaného nepenthesinu I.

15) Strana 37 obrázek 23B, špatně uvedené hmotnostní spektrum

stávající spektrum v panelu B



Má být nahrazeno následujícím



16) Strana 37, obrázek 24., upravena legenda

Obrázek 24. Analýza průběhu aktivace a aktivity nepenthesinu pomocí SDS-PAGE. **N** - neaktivovaný proenzym v neredukujícím a **N_{DTT}** - redukujícím prostředí. **aN** - aktivovaný nepenthesin v neredukujícím a **aN_{DTT}** - redukujícím prostředí. **N+Mb** - neaktivovaný proenzym po desetiminutové inkubaci se substrátem, **aN+Mb** - aktivovaný nepenthesin po desetiminutové inkubaci s myoglobinem, **Mb** - myoglobin. **aN_{5min}** - nepenthesin I po pětiminutové aktivaci v kyselém prostředí. **M** označuje standard molekulových hmotností proteinů. Protein byl vizualizován dusičnanem stříbrným.