

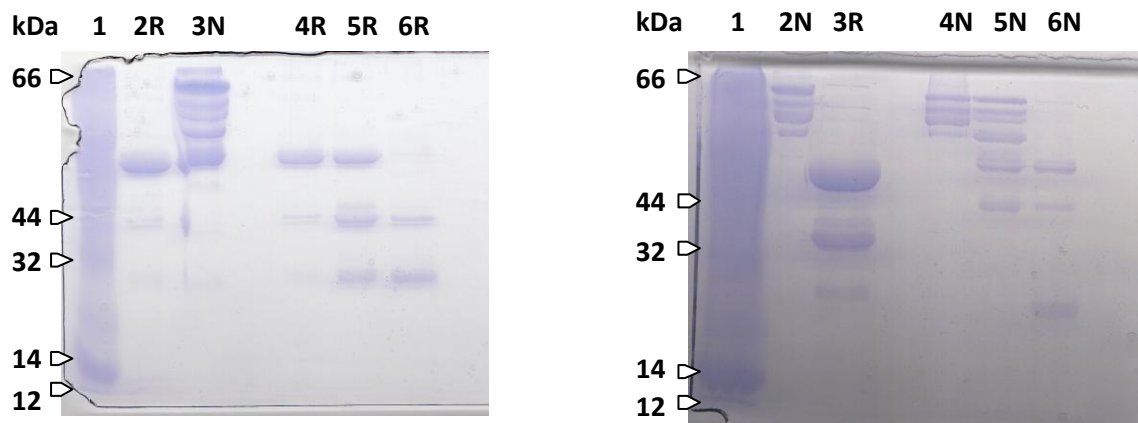
Opravný lístek

Název práce: Příprava dimerní formy myšního NK buněčného receptoru
NKR-P1C

Řešitel: Helena Pucholtová

Oprava SDS elektroforéz:

str. 41, obr. 13:



Obr. 13: SDS-PAGE vzorků zachycující průběh purifikace proteinu.

Vlevo jsou vzorky v redukujícím pufru (R) (až na vzorek 3 – omylem prohozen), vpravo jsou vzorky v neredukujícím pufru (N) (vzorek 3 – prohozen).

1 – marker,

2 – vzorek z GPC, fúzní protein (52 kDa v R)

3 – vzorek Fc fragmentu (pro ustálení pH bylo přidáno malé množství Tris),

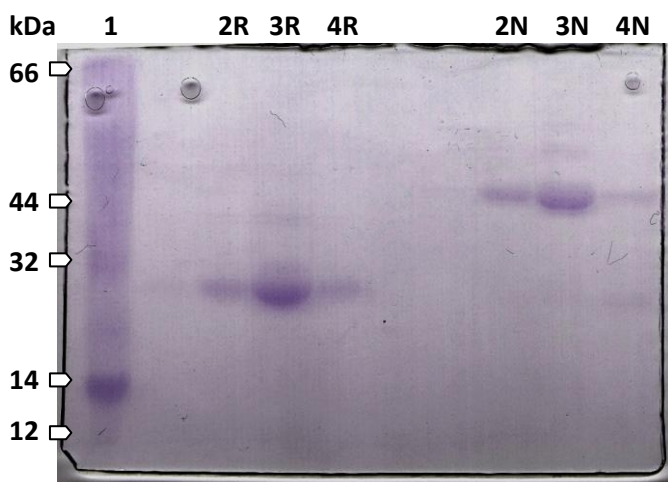
4,5,6 – vzorky z GPC/TEV,

4 – frakce 2 (neodštěpil se Fc fragment),

5 – frakce 4, je zde viditelný dimer (46 kDa v N, 23 kDa v R),

6 – frakce 5 z gelové permeační chromatografie, monomer (23 kDa v N a R)

str. 42, obr. 15:



Obr. 15: Frakce vzorků z gelové permeační chromatografie (GPC/TEV 2).

1 – marker,

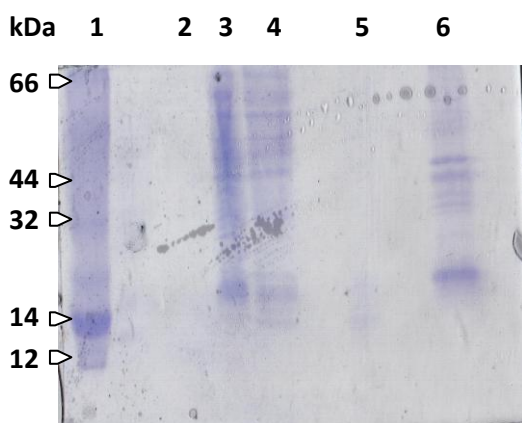
2 – frakce 1, dimer (46 kDa v N, 23 kDa v R),

3 – zakoncentrovaná frakce 1 z GPC/TEV 2,

4 – frakce 2 je monomer (23 kDa v R),

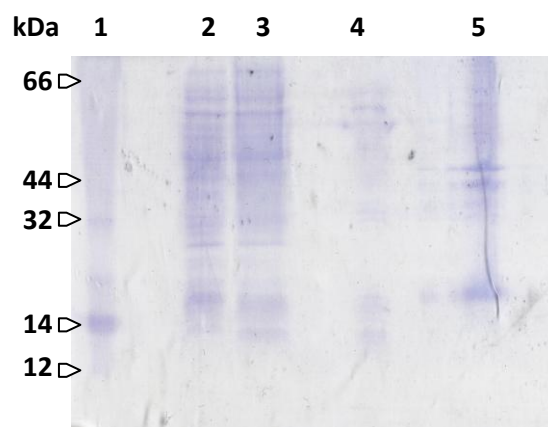
R – redukující vzorkový pufr, N – neredukující vzorkový pufr

str. 44, obr. 17 a 18



Obr. 17: SDS-PAGE vzorků zachycující průběh izolace inkluzí (LB)

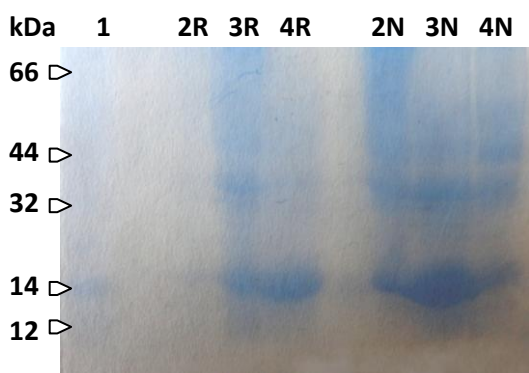
1 – marker, 2 – LB medium po centrifugaci buněk, 3 – sacharózový pufr, 4 – tritonový pufr, 5 – promývací pufr, 6 – pelet z inkluze, vzorky jsou v neredukujícím pufru (N)



Obr. 18: SDS-PAGE vzorků zachycující průběh izolace inkluzí (AI)

1 – marker, 2 – sacharózový pufr, 3 – tritonový pufr, 4 – promývací pufr, 5 – pelet z inkluze, vzorky jsou v neredukujícím pufru (N)

str. 46, obr. 21

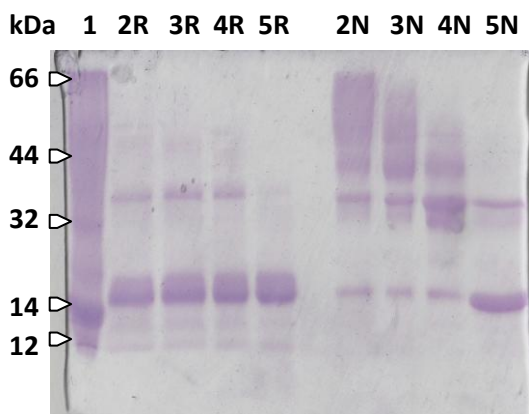


1 – marker,
2 – frakce 1 z LB media,
3 – frakce 1 z AI,
4 – frakce 2 z AI
R – v redukujícím pufru,
N – v neredukujícím pufru

Obr.21: SDS-PAGE vzorků z ionexové chromatografie

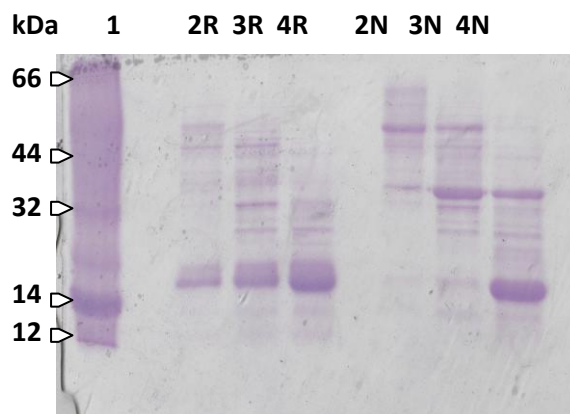
Jelikož vzorky byly v roztoku soli, po povaření se srážely, do jamky 2R se ani nepodařilo napipetovat vzorek. Z elektroforézy je vidět, že renaturací vznikl monomer (18 kDa), dimer (36 kDa) i malé množství trimeru (54 kDa).

str. 47. obr. 24 a 25:



Obr. 24: Vzorky z GPC chromatografie (produkce v LB)

1 – marker,
2 – frakce 1,
3 – frakce 2 – obsahuje dimer (36kDa v N, 18 kDa v R),
4 – frakce 3 – největší množství dimeru
5 – frakce 4 – monomer (18 kDa)

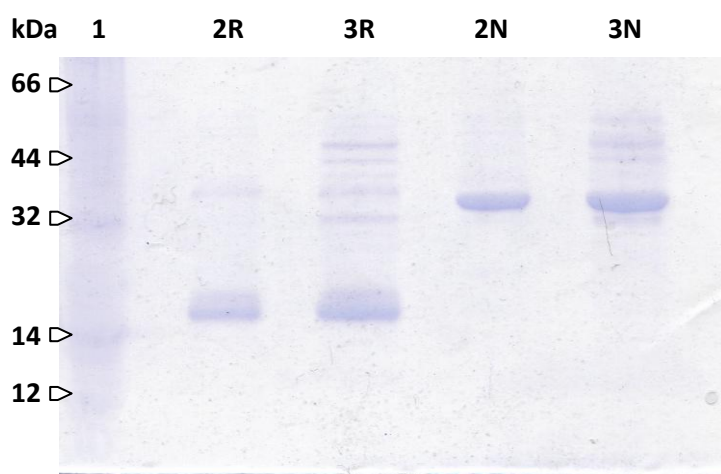


Obr. 25: Vzorky z GPC chromatografie (produkce v AI)

1 – marker,
2 – frakce 1,
3 – frakce 2 – největší množství dimeru (36 kDa v N, 18 kDa v R),
4 – frakce 3 – monomer (18 kDa)

R – v redukujícím pufru, N – v neredukujícím pufru

str. 49, obr. 30:



Obr. 30: SDS elektroforéza ze vzorků z GPC (obr. 28 a 29) ukazující čistotu dimerní formy NKR-P1C produkovaného v LB médiu s IPTG a v AI médiu.

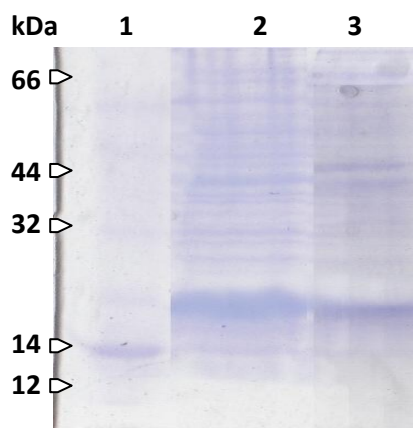
1 – marker,

2 – dimerní NKR-P1C produkované v LB médiu s IPTG (36 kDa v N, 18 v R)

3 – dimerní NKR-P1C produkované v AI médiu (36 kDa v N, 18 v R)

R – vzorky v redukujícím pufru, N – vzorky v neredučujícím pufru

str. 53, obr. 32:



Obr. 32: Porovnání inkluzí.

1 – marker,

2 – inkluze z dovezených produkčních kmenů,

3 – inkluze ze stávajících produkčních kmenů (z nich byly získány výsledky)

vzorky jsou v neredučujícím pufru