

### **Zkratky použité v opravném lístku a v názvech příložených souborů**

$M_R$  ... relativní molekulová hmotnost; p-NP ... p-nitrofenol; GalN ... galaktosamin; GalNAc ... N-acetyl-D-galaktosamin; GlcN ... glukosamin; GalNAc ... N-acetyl-D-glukosamin; p-NP-GlcNAc ... p-nitrofenyl- $\beta$ -N-acetyl-D-glukosaminid; p-NP-GalNAc ... p-nitrofenyl- $\beta$ -N-acetyl-D-galaktosaminid; RuBisCO ... ribulosa-1,5-bisfosfát-karboxylasa/oxygenasa;

### **Srovnání sekvencí proteinů (úvod, tabulka 2)**

Srovnání sekvencí jsem provedl na stránkách UniProt.org (použitý program Clustal Omega, výchozí nastavení verze 1.2.0).

### **Příprava roztoků**

V kapitolách 3.5.2.3., 3.5.3.1. až 3.5.3.6 jsem koncentrace pevných látek rozpuštěných v roztoku vyjadřoval výhradně jako hmotnostní zlomek (v % m/m). Koncentraci tekutých látek jsem pak vyjadřoval výhradně objemovým zlomkem.(jako % v/v).

### **Ekvilibrace kolon**

Ekvilibraci kolony Sephacryl S-300 (I) (kap. 3.5.1.3.) jsem uskutečnil pomocí 300 ml 0,1 M citrátového pufru pH 6,0 a v případě kolony Sephacryl S-300 (II) (kap. 3.5.1.5.) pomocí 100 ml citrátového pufru pH 6,0 a v případě kolony Sephacryl S-300 ke stanovení  $M_R$  (kap. 3.5.5.1.) pomocí 250 ml 0,1 M citrátového pufru pH 6,0. Ekvilibraci kolony ConA-Sepharosy (kap. 3.5.1.4.) jsem uskutečnil pomocí 80 ml 0,5 M NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub> a 5 mM MnCl<sub>2</sub> v 0,1 M citrátovém pufru pH 6,0.

### **Množství pufru k resuspendování precipitátů**

Při precipitaci hrubého extraktu jsem k resuspendování sedimentu druhého kroku o objemu přibližně 1 ml použil 0,5 ml pufru (kap. 3.5.1.2.). K resuspendování precipitátu po ConA afinitní chromatografii jsem použil 40  $\mu$ l pufru na přibližně 40  $\mu$ l sedimentu (kap. 3.5.1.4.). Při stanovení  $M_R$  jsem precipitoval přibližně 100  $\mu$ l sedimentu pomocí 50  $\mu$ l pufru (kap. 3.5.5.1.).

### **Stanovení kinetických parametrů $\beta$ -NAHA (kap. 3.5.4.4.)**

Koncentrace substrátu byla u p-NP značených substrátů: 0,025 a 0,05 a 0,1 a 0,2 a 0,4 a 0,65 a 1,0 a 1,75 a 2,5 mM. V případě N,N'-diacetylchitobiosy pak 0,1 a 0,2 a 0,4 a 0,6 a 0,8 a 1,0 a 2,0 mM.

### **Stanovení inhibičních konstant $\beta$ -NAHA (kap. 3.5.4.5.)**

Koncentrace substrátu byla při všech měřeních 0,25 a 0,375 a 0,625 a 0,875 a 1,25 mM. Koncentrace inhibitorů jsou shrnuty v následující tabulce:

inhibitor \ substrát	p-NP-GlcNAc	p-NP-GalNAc
GalN [mM]	30, 45, 60	20, 60, 100
GalNAc [mM]	10, 20, 30	10, 20, 30
GlcN [mM]	6,25 a 12,5 a 18,75	8, 16, 24
GlcNAc [mM]	6, 12, 24	6, 12, 24

### **Podmínky stanovení pomocí kapilární elektroforézy (kap. 3.5.4.2.)**

Podmínky elektrokinetického dávkování: při napětí 5 kV po dobu 5 sec při všech stanoveních.

### **Stanovení $M_R$ (výsledky, kap. 4.3.1.)**

K vyhodnocení výsledků nativní elektroforézy (kap. 4.3.1.2.) byla použita hodnota pohyblivosti RuBisCO v dráze číslo 5 (viz. obr. 16, str. 55).

Stanovené hodnoty  $M_R$  pomocí nativní elektroforézy a gelové chromatografie není možné považovat za přesné. Na základě šířky vrcholů a proužků jsem při obou stanoveních odhadl směrodatnou odchylku stanovení:

	$M_R$
Nativní elektroforéza	285 000 $\pm$ 40 000
Gelová chromatografie	275 000 $\pm$ 25 000

28. 10. 2013, Praha

Robert Valenta