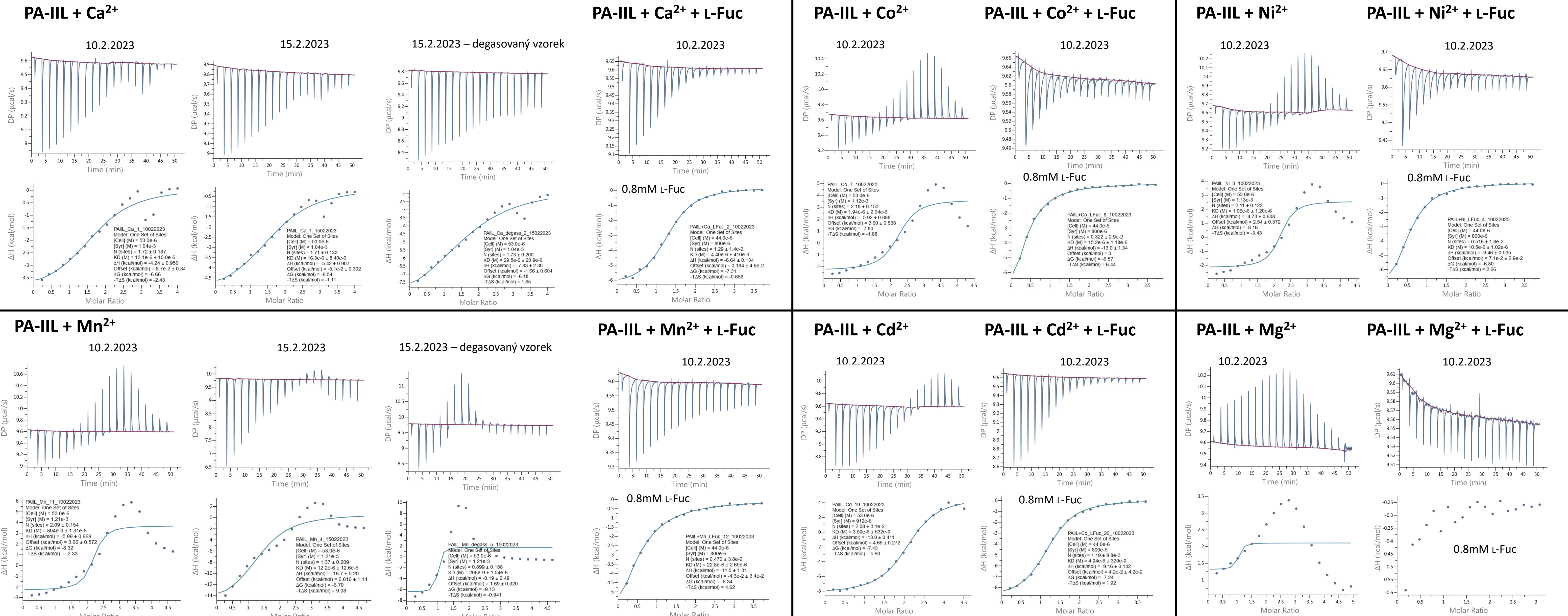
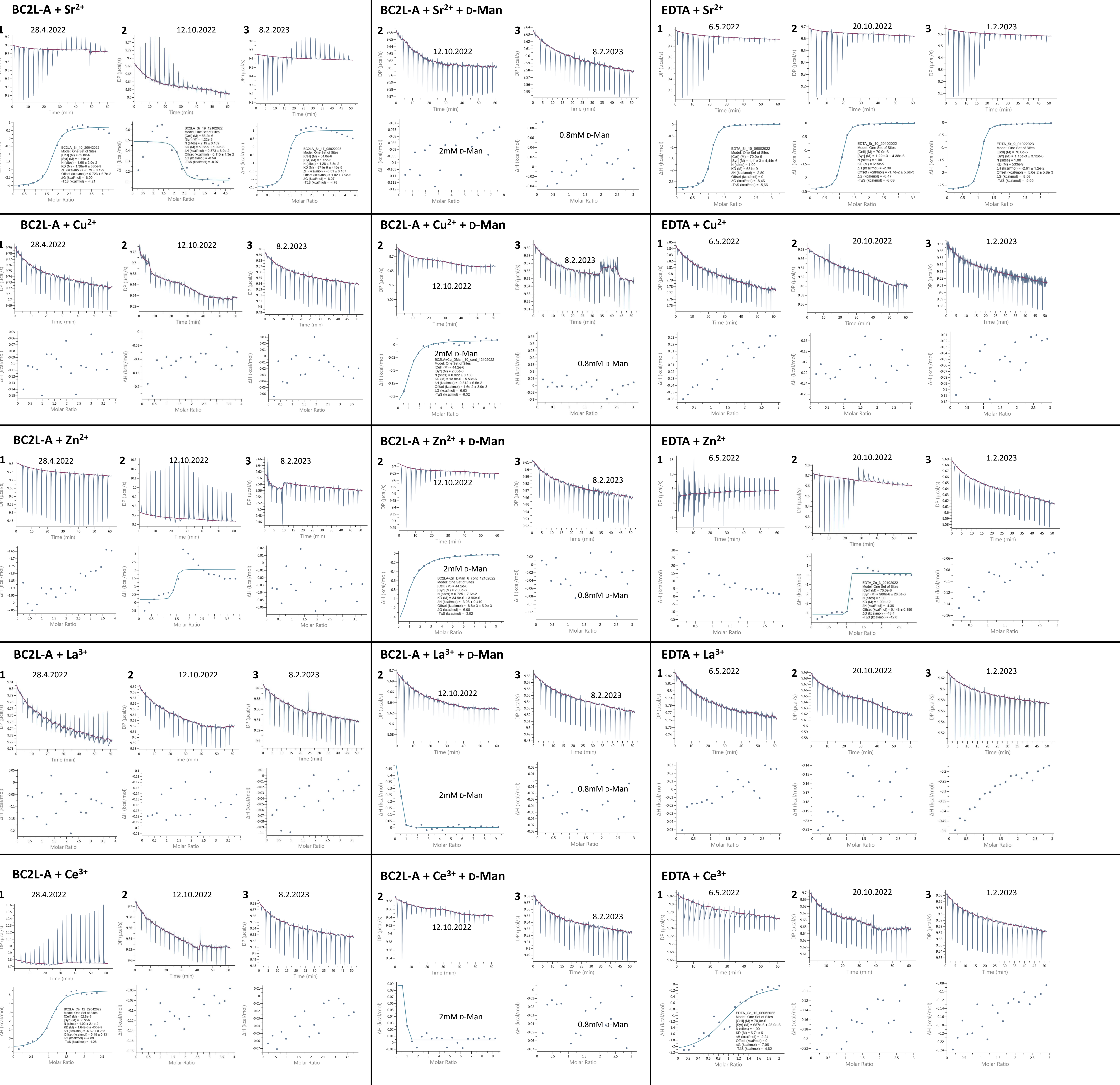
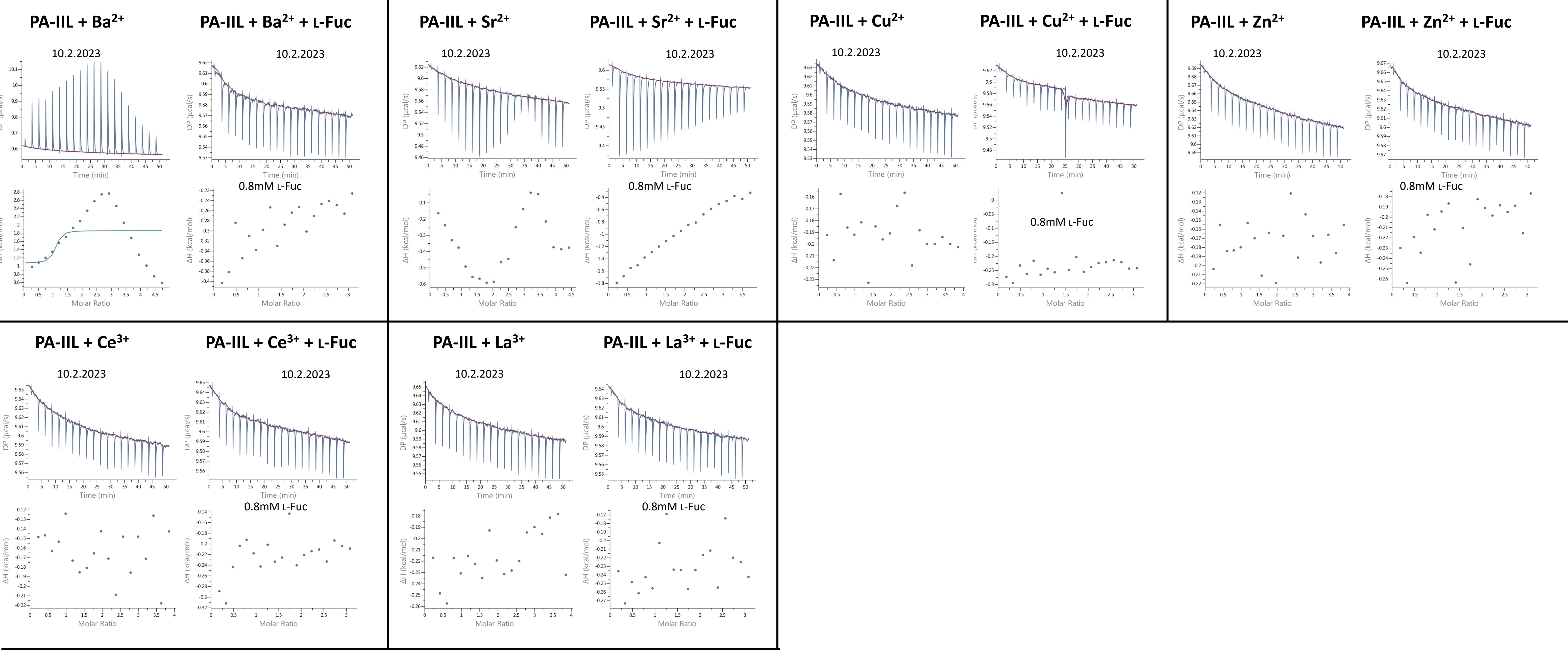


Souhrn provedených experimentů ITC – BC2L-A = 0.05mM, kov = 1mM, EDTA = 0.07mM, pufr: 20mM HEPES, pH 7.5

1. purifikace proteinu 11.3.2022, dialýza proti MilliQ do 17.3.2022, zakoncentrování pomocí Vivaspin 21.3.2022, poté skladováno v MilliQ v 6 °C. Roztoky byly připraveny pipetováním a naředěním, tzn. 2x koncentrovaný roztok proteinu/kovu/EDTA byl smíchán 1:1 s 2x koncentrovaným roztokem pufru. Všechny roztoky přefiltrovány přes 0.22 µm filtr. **U téhle sady experimentů nebyla měřena kontinuální titrace se sacharidem.** ITC měřeno pomocí Auto-ITC 200.
2. purifikace 19.9.2022, diylýza proti MilliQ do 26.9.2022, zakoncentrování pomocí Vivaspin 27.9.2022, skladováno v MilliQ v 6 °C, dialýza proti pufru 2x24h proti 1l 20mM HEPES, pH 7.5. V tomto pufru poté připraveny rozpuštěním zásobní roztoky kovů 100mM, z nichž naředěním stejným pufrém byly připraveny výsledné 1mM roztoky kovů. V tomto pufru byla také rozpuštěna EDTA a sacharidy. Při potřebě naředění byly roztoky dále ředěny tímto pufrém. Před měřením byly roztoky zfiltrOVány přes 0.22 µm filtr. ITC měřeno pomocí Auto PEAQ-ITC.
3. purifikace 23.11.2022, dialýza proti MilliQ do 30.11.2022, potom skladováno v MilliQ v 6 °C do 23.1.2023, dialýza proti 20mM HEPES, pH 7.5 2x24h 5 litrů. Roztok HEPES byl připraven z jiné zásobní lahve (nově otevřená). Postup přípravy roztoků na ITC viz. 2., roztoky poté zfiltrOVány přes 0.22 µm filtr. ITC měřeno pomocí Auto PEAQ-ITC.
- Všechna data byla vyhodnocována pomocí MicroCal PEAQ-ITC Analysis Software verze 1.1.0.1262.

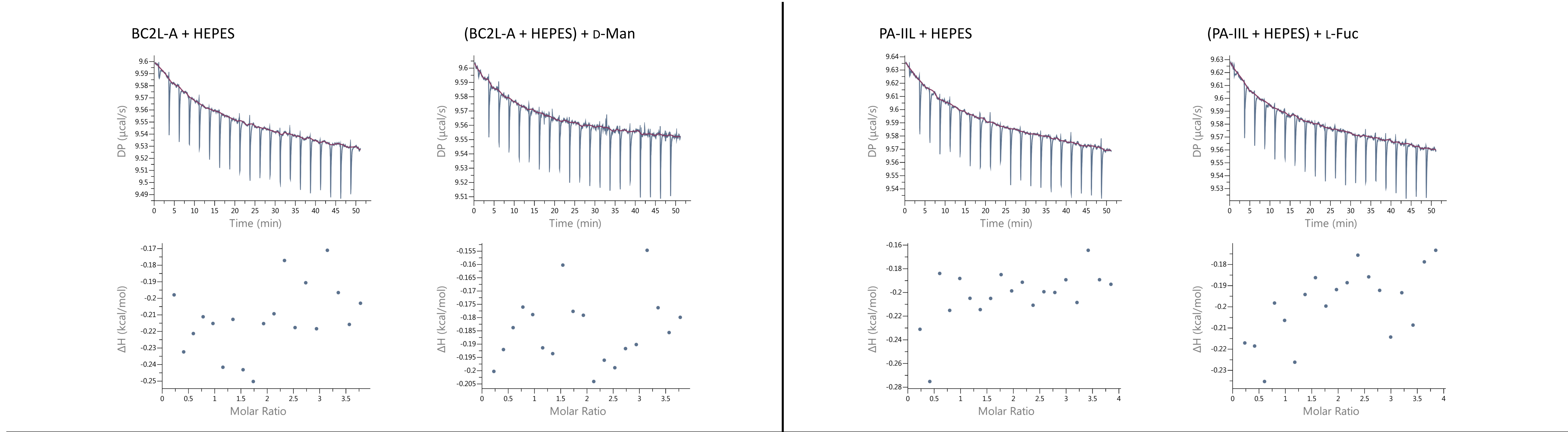






Kontrolní experimentu u jednotlivých sad experimentů:

- EDTA + kov:
 - HEPES-kov, odečteno metodou „line“ nebo „point-to-point“
 - EDTA-HEPES, „line“
 - HEPES-HEPES, „line“
- Protein + kov:
 - HEPES-kov, odečteno metodou „line“ nebo „point-to-point“
 - Protein-HEPES, „line“
 - HEPES-HEPES, „line“
- (Protein + kov) + cukr:
 - (Protein + HEPES) + cukr, odečteno metodou „point-to-point“



Kontrolní experiment BC2L-A v 20mM HEPES pufru s pH: (A) 6,8; (B) 7,5; (C) 8,2. První obrázek: protein o koncentraci 1 mg/ml byl titrován roztokem 1mM Ca²⁺ ve stejném pufru jako protein. Druhý obrázek: kontinuální titrace komplexu proteinu s Ca²⁺ ionty titrovaného roztokem 0,8mM L-fukosy. Měřeno na přístroji Auto PEAQ-ITC. Data byla vyhodnocována pomocí MicroCal PEAQ-ITC Analysis Software verze 1.1.0.1262.

