

5% FeCl₃ 10μl

Isidora - tip intracelularna!

20μM ABTS	}	140μl PUFERA	
5μM H ₂ O ₂		20μl ABTS	na kosum
50μM NaAcetat sa 1μM CaCl ₂		20μl E	
<small>pH 4,5</small>		20μl H ₂ O ₂	

STAR, indukujem 0,5L - 500μl aminolevulinatne i 200μl IPTG 20h

27.05.2021.

Pomogala sam isi predhodnu dawa

Radiju transformaciju ~~pelB~~^{intra} - αGlu u STARu i sejem pelB - dGlu na ploči. 28.5.

Dawas prejevavam pošto nije savršeno.

Transformišem gen koji je stigao u XL10, star i OVER.

Kada stigne gen onda ga rastvorim u vodi, vorteksujem i pustim da odstoji u sobnoj 30'.

→ Galaktozidura ✓

30.5.2021.

→ Chrome

Cherry - radovi i dokumentacija za SMART перепроинг (има фолгер)

cherry.chem.bg.ac.rs chem.

Региструј се са адресе chem.bg.ac.rs

Постоје твочи доступности (тип шиф пројекта окажи а ми не узиммо)

Ако нешто не знаш или код не у библиотеку

Унос радова - објављено: (публиковано/рецензирано)

То се у главну колекцију 1. хф - 2. публикације

Метаподаци - снимци, аудио снимци... subwt

NC - радови које не желимо у комерцијалне сврхе

Argos - бесилатна платформа за план пројекта Европских (на српском има)

DMP online

12:56
✓

↑ intracel

31.5.2021.

Сејемо преносителну за галактозидазу и глукозидазу - intracel
Галактозидазу и празан PET 226, сејемо и за изоловање плазмида, и за ишц. шток!
и глукозидазу

XhoI

Засејати мултанте у МР и скертирали плоче са 1с РМБ.

1.6.2021.

✓

Изолирамо плазмиде - Gal у OVER
Gal у XL10 PET226
Glc у OVER

Предајемо 30ml културе у 500ml LB+Amp. Чекамо ОД
Сиремамо буфере за HPLC, за MAC

50mM NaP pH 7,5 са 300mM NaCl 10mM imidazolom 0,5L
-||- 300mM -||- 0,3L

XhoI Термо

10x Fast digest green buffer

} Restriction

✓ Sve ok!
Синке код Тујане на месу

02.06.2021

Синфисовали, мерим активност

αGlu - пре HPLC

7ul (6,5ul)

Bredford : 0,370 1,090 0,438 1,831 Nanja Stanić st. prava
Активност : 0,435 0,150

~~Galactosidase~~ Galaktosidaza

Pre HPLC (15ul)

Bredford : SP(5ul) uz(5ul) 0,337 0,771
SP(20ul) uz(20ul) 0,368 1,7

CK

ЕЦЕЈ ЗА ГАЛАКТОЗИДАЗУ

$\left. \begin{matrix} 50 \mu\text{l P} \\ 50 \mu\text{l Gal} \\ 50 \mu\text{l Raf} \end{matrix} \right\} 15' \text{ инкубирање} + \text{Glc} \left\{ \text{инкубирање } 3' \right. + 100 \mu\text{l DNS} \text{ кривава; } \left. \begin{matrix} \text{Позитивни контрола} \\ 1 \mu\text{l} \end{matrix} \right.$

SP 1	SP 2	Salt + Glukoz.				Gal + Glc + Raf ^{Galaktozidaza}
SP 1 0,078	0,07	0,208	0,097	0,080	0,108	0,128 0,132

Galaktozidaza

15ml pre HPLC
 Bradford

Kada radiš na šećerima mora da bude 100mM šećer!

Glukozidaza je osta!

3.6.2021.

$M_r = 504,42 \text{ g/mol}$ rafinoza $V = 10 \text{ ml} = 0,01 \text{ L}$

$c = 100 \text{ mM}$

$c = \frac{n}{V}$ $n = \frac{m}{M}$ $n = \frac{504,42 \cdot 0,01}{504,42} = 0,001 \text{ mol}$ $n = 0,001 \cdot 504,42 = 0,5 \text{ g}$

Galaktoza ($M_r = 180,16 \text{ g/mol}$)

Raf 50μl
 Raf 50μl
~~Raf~~ E 50μl

$c = \frac{n}{V}$; $n = c \cdot V = 0,01 \cdot 0,1 = 0,001$
 $m = 0,001 \cdot 180 = 0,18$

7.6.2021.

Мериши галактозидазу $\lambda_{280} = 0,018$

To je y 1ml

y 20ml 0,36 • \square ~ 1mg → Питай капри како рачуна proteins

Гликозидаза $\lambda_{280} = 0,523$
 $E = 14,87 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

$A = \epsilon b c$
 $c = \frac{0,523}{14,87} = 0,035 \mu\text{mol/ml} \cdot 66 \frac{\text{mg}}{\mu\text{mol}} = 2,31 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$

\square 55 mg proteins

• λ 405 nm

0,1M сахароза + перфогат + K1	0,063
0,1M Glc - -	0,052
1mM #H - -	0,157
10mM Hidrohinon + перфогат + K1	0,052
1mM арбузин + перфогат + K1	0,207
10mM - -	0,054
Glc + перфогат + K1 + арбузин ^{1mM}	0,042
Glc - - + арбузин 10mM	0,044

14. јун 2021.

W

Галактозидаза: урадити олот
Празне ћелије и инкубују
Проверити инклузиона
Рескрипцијомо монтрање

Глукозидаза: урадити 0,1M и 1mM позитивне мутаната
за сахарозу и рNPG и упоређити са wt
1mM \downarrow 100mM \downarrow
кверцетин са сахарозом и одржити кол.Е

Продати екстракту арбузина из рје иранскино
(етер, етанол)

16.6.2021.

Завсјала мушанте у 50 μ л (Y71) у 11h
Скенирам библиотеку V108 са рNPG
Измерила есеј са кверцетинам ($\lambda = 405\text{nm}$)

SP \approx 0,391

R_{2a} \approx 0,337

Хваљам аливоите за Galaktozidaru

Узели све активне мушанте и тестирали са DNS ам!
обавезно тестирали рЕТ и wt!

Gal инкубована у 12³⁶ 0h
N 15³⁶ 3h
18³⁶ 6h

Neusi (индукујеш и 13^h) - одн 300 μ л II
200 μ л

* Са две кону кверцетина у 3x и мерили то почесну и крају
PMP

E из глицералсиој

A₀ 0,139

dA/t = 0,382

A_{2min} 0,864

30°C 20h

I V = 1ml

~~100~~ml кверцетин 302,2g/mol

~~100~~ml сах

~~100~~

1ml

250 μ л иверу. 4ml 1,2mg

250 μ л сах 400ml

500 μ л E

342,39/ml

II 1ml ивер. ~~450~~ ^{финално} 1ml $\sim 0,450\text{mM}$
100ml сах. ~~200~~ $0,45\text{mM}$ 450 μ л
E ~~200~~ $\sim 45\text{mM}$ 100 μ л
~~150~~

$$c = \frac{m}{V} \quad m = 400\text{mM} \cdot 1\text{ml} \\ = 0,4 \cdot 1 \cdot 10^{-3} \cdot 342,3 = 0,1369\text{g}$$

Плочуца за трансилуко

Y71(7), Y71(40), Y71(56), F177(30), F177(48), F177(71)

D68(35), D68(81), D68(5), D68(10), D68(19), D68(38)

R441(24), R441(66), R441(79), R441(5), R441(33), R441(55),

R441(57), wt и pET

→ Тује се вугера разлика

Џидрак, 13. јул 2021.

Засејана сом wt-pelB, pET 22b, V108(79), V108(55), Y71(7), D68(10), R441(55)

среда, 14.07.2021. ✓

Мерим од и индукцијет

увече заледим

* трансформација α6и I, α6и II

Цейбрилак,

мерење, лосиавлање трансилуко есеја

α6и-pelB, pET 22b

D68(10), R441(55), H111(13), V108(55), V108(79), Y71(7),

16 мг : 3 = 5,3 ml

100 mM Na-citratni buffer pH 5,5

100 mM NaP 50 ml 0,69 g

100 mM Na-citrat 50 ml

10. abizcui

$\lambda = 540 \text{ nm}$

0.488 0.46 0.551 0.494 0.437 0.398 0.322 0.407

$\lambda = 405 \text{ nm}$

0.953 0.879 0.947 0.988 0.810 0.651 0.535 0.750

$\lambda = 492 \text{ nm}$

0.596	0.549	0.643	0.608	0.520	0.453	0.362	0.478
HMM	dGlu	γ-PA	DG8	pET	V108	R441	V108(55)

Meirobavam ekstrakcyuz ## sa eimil alyematomu y 500ul gogoyem 300ul eimilacyemaita

gluk 2 (star)	180,5 ng/ul
gluk 1 (iz DHS α)	3558,5 ng/ul
galaktozidaze (iz star)	777,5 ng/ul
gluk 1 (iz xL10)	1899,8 ng/ul

W

γ-PA duo dareteta

30. abizcui

Тресежаваше на илоче
Тосиани на сибенцурине

280
A 0,05

31.8.2021.

LB шточе

квантитативне мерење рлус

CaCl₂ solution V = 100ml

60mM CaCl₂ Mr = 147,02g

$$60 \cdot 10^{-3} \text{ M} \cdot 0,1 = n$$

$$n = 6 \cdot 10^{-3}$$

$$n = \frac{m}{M}$$

$$c = \frac{n}{V}$$

$$m = 6 \cdot 10^{-3} \cdot 147,02 = 0,882$$

$$m = \frac{n \cdot M}{c} = 60 \cdot 0,1 \cdot 10^{-3} \cdot 147,02 \text{ g} =$$

15% глицерол

15g - 100g

10mM TRIS pH 7

$$c = \frac{n}{V} \quad n = c \cdot V = 10 \cdot 10^{-3} \cdot 0,1 = 10^{-3} \text{ mol}$$

$$m = \frac{n \cdot M}{c} \quad m = 10^{-3} \cdot 121 = 0,121 \text{ g}$$

Засејавам рлус на шпроти LB

-II- дубок - * i over $\frac{I}{II}$ г LB суп
LB кан

ПЛАН

- Врсе сејем α -глм I и II \rightarrow сушра теком од (среда) \rightarrow преносушра ширам (кети)
- Врсе сејем рлус на шпроти \rightarrow сушра бере у штењу \rightarrow преносушра шрабим комитет.

Сушра # шрабим CaCl₂ и еве за мини spin

у понедељак ЕФ и засејани моје шут за активност са мантозом

рлус иде само на chloramphenicol ; а када radiš transfer
onda chlor i amp

канамисе 1/4 од V

W

• α Glc - I sece $\alpha 1,2$

• α Glc - II $\alpha 1,3$ 110kDa - katal gomet u 60kDa Hmat. gomet

→ samo on pokazuje $\alpha 1,3$ aktivnosti

4 gomena u 3 subgomena

EC 3.2.1.84 / 207

Primeri: GH31 i glukozidaza

I - bezuspehni gomet je kao kod osimanih glukozidaza

Reaktiviraju ga u 20mM TrisHCl pH 7,5 u 150mM NaCl

Km [mM] 0,5 - 0,52 pNPG ✓

endoplazmatični rehk

!
samo 110kDa

Mt 110kDa - α subjediniice } heterodimer
250 (mahina)
80 - β cytofes.

inhibicija

inhibicija za inhibiciju

po shemi

→ 88,3kDa (795aa), His - stop - His

• α Glc I

EC 3.2.1.106.

- nema Gst, ima His Salt i Ref

85-98 kDa negde piše 80-110kDa

katalizuje hidrolizu $\alpha 1,2$ veze

10mM NaP pH 6,8

Primeri su ta u 20mM NaP pH 6,8 sa 100mM NaCl

Hej pokazano da radi sa pNPG.

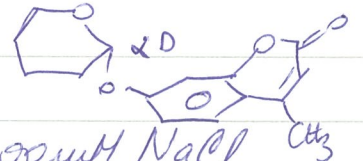
pH 6,25

hidroliza O- i noshugite veze

95kDa - SDS

stabilna na 25°C 14 dana

1.9.2021.



- α Glc II u OVERu nije prastla

- izolovan H111

- Pravi inozit. phys

Izena sam Oh glc I * u glc II OVER

50mM Tris sa 300mM NaCl

Tris NaCl imigazol
0,3g 0,87

-||-

sa 25mM imigazolom

0,09g

sa 300mM imigazolom

1,02g

W

Радиона сом експресују на 25°C у ^{линојо} OVERу нема протеина

Bredford (лизирано)

PET - ~~0,224~~ 0,668

SP - 0,504

GlcI и OVERu - ~~0,112~~ ~~0,112~~ 0,535

GI и ★ - ~~0,112~~ 0,699

GII и ★ - ~~0,112~~ 0,695

} $y = -0,1304x + 1,3321$

1351	0,306	0,196	0,105	0,126	} Не ради ни после 40 мин
1355	0,307	0,197	0,105	0,126	

- OVER, пр стар на делу лизирано тамош док и као да нема протеина

6. септембар 2021.

Трансформација plus - Радиобојеви плазмиди
и OVER

WT₂

TM₂

Трешолића - мушкетер!

Y71-1

V55-2

H111-3

R441-4

D68-5

WT-6

V79-7

у ↑ conc мантозе Efc I због ВИСКОЗИТОУ! W

13. септембар 2021.

Galaktozidaza

EC 3.2.1.22

0,1 0,5 1 5 10 ~~20~~ 30 40 50 ml Tu kome koristiti

$$M_w = 301,25 \text{ g/mol}$$

dimer (homodimer)
46/49 kDa

1 ml

$$c = \frac{n}{V} \quad n = 50 \cdot 10^{-3} \text{ M} \cdot 1 \cdot 10^{-3} \text{ L} \cdot 301,25$$

$$n = 50 \cdot 10^{-6} \cdot 301,25$$

$$n = 15,0 \cdot 10^{-3}$$

$$n = 15 \text{ mg}$$

100 ml NaP/citrat V=50 ml

$$c = \frac{n}{V} \quad n = 100 \cdot 10^{-3} \cdot 50 \cdot 10^{-3} = 5000 \cdot 10^{-6}$$

$$n = 5 \cdot 10^{-3} = 0,005 \text{ mola}$$

$$m = 0,005 \cdot 294,10 = 1,47 \text{ g citrat}$$

$$m = 0,005 \cdot 119,38 = 0,59 \text{ g NaP}$$

$$50 \cdot x = 40 \cdot 1$$

$$x = 0,8 \text{ ml} + 0,2 \text{ ml boje}$$

$$40 \cdot x = 30 \cdot 1$$

$$x = 0,75 + 0,25 \text{ boje}$$

$$30 \cdot x = 20 \cdot 1$$

$$x = 0,66 \text{ ml} + 0,34 \text{ ml boje}$$

20

20

160

$$20 \cdot x = 10 \cdot 1$$

$$x = 0,5 \text{ ml} + 0,5 \text{ ml boje}$$

$$10 \cdot x = 5 \cdot 1$$

$$x = 0,5 \text{ ml}$$

$$5 \cdot x = 1$$

$$x = 0,2 + 0,8 \text{ boje}$$

$$1 \cdot x = 0,5$$

$$0,5 + 0,5$$

$$0,5 \cdot x = 0,1$$

$$x = 0,2 + 0,8 \text{ boje}$$

W/ II način

5mM S u 0.1M Na-citratnom puferu pH 4.6 50ul

6min na 37°C

0.7mM 0.1M glicinskog pufera pH 10.6

50ul E + 50ul S

50mM S → 25mM

3xSP

5'

10'

30'

50mM S

164

uzimati 10x ↓

u karbonat pH 10

28. септембар 2021.

Гуче трансформисот стар α Gal и α Gal1

Занас преконохта за Gal

20h на 27°C 0.4mM IPTG

Четвртак фуда, на HPLC

Дијализа на пешак

Galaktozidaza indukovanja oko 13h y BL21 Star

- a) 50mM NaP pH 7,5 300mM NaCl ; 10mM umirazon 0,5L
- b) 50mM NaP ; 300mM H - 0,1L

NaP
 0,5L 0,1L
 0,59.5 0,59g

300mM NaCl
 1,75.5 1,75

umirazon

~~6g~~ ~~0,1g~~

10mM
 a) $C = 50mM$ $V = 0,5L$
 $C = \frac{n}{V}$ $n = 50 \cdot 10^{-3} \cdot 0,5$
 $n = \frac{m}{M}$
 $m = 5 \cdot 10^{-2} \cdot 0,5 \cdot 119,38g = \boxed{2,98g}$

300mM umirazon
 b) $n = 50 \cdot 10^{-3} \cdot 0,1 = 5 \cdot 10^{-3}$
 NaP $m = 5 \cdot 10^{-3} \cdot 119,38 = \boxed{0,59g}$
 NaCl $m = 0,3 \cdot 0,1 \cdot 58,44 = \boxed{1,75g}$

300mM NaCl $V = 0,5L$
 $C = \frac{n}{V}$ $n = 0,3 \cdot 0,5$
 $m = 0,3 \cdot 0,5 \cdot 58,44g = \boxed{8,76g}$

300mM umirazon = 0,3M
 $C = \frac{n}{V}$ $n = 0,3 \cdot 0,1 = \cancel{0,3}$
 $n = \frac{m}{Mr}$ $m = 0,3 \cdot 0,1 \cdot 68,077 = \boxed{2g}$

10mM umirazon

10mM = $\frac{n}{V}$ $n = 10 \cdot 10^{-3} \cdot 0,5 = 5 \cdot 10^{-3}$
 $n = \frac{m}{M}$ $m = 5 \cdot 10^{-3} \cdot 68,077g/mol$
 $m = \cancel{0,34g} \quad \boxed{0,34g}$

W

Koncentracija Enzimske aktivnosti $\rightarrow \Delta A$

$= \frac{R \cdot A_{rs} \cdot V_{rs} \text{ (ukupna } V \text{ 200 } \mu\text{l)}}{E \cdot t \cdot V_e \text{ (enzima 20 } \mu\text{l)}}$

u ybracavanu 2/3

ako si razblažio E pre nego što si krenuo rgu $\rightarrow 18,3$

Fuga velika, pa ostari malo sn a ovela reny i no avu rasu fugu
Pre HPLC
Bredford 20ul u 200ul

SP 0,309
uzorak 0,578

esej SP 0,125 uzorak 0,234 (nakon 20') u 37°C

uzorak nakon 30' 0,236 ; a uzorak bez bikarbonata 0,229

50ul s 50ul + 50ul E + 50ul putera pH 4,6

u gogaio og me ameme 100ul + 100ul

бикарбонат pH 10,6

Меретт FT } \otimes SP 0,125 FT 0,116
Hebesattu }
Nev 0,117

Am, avo ce goga 100ul s 50ul + 50ul E + 50ul putera pH 4,6 } 37°C 20'

u Hanon nioia 100ul toia + 100ul бикарбонат.

$\Delta A = 0,836$

Hydop x duo 0,1g NaHCO₃ } pH 10,6
0,9g Na₂CO₃ }

Gal PRE HPLC, FT, Nucleami, 2, 10 i 11

W

Нуже нуклео ↑

5. Октобар 2021.

1320h
dr. mitajloni
30000h

Требуемо конструисати старе ћелије. Зачејати смо Gal, Glu I и Glu II

* DTT и glicerol dodati u pufer pri likom predstavljanju

uradih forezu, sa markerima za Galakt.

Vrv se skida 0-50% B

50mM Na₂PO₄

500mM NaCl

20mM imidazol

1M -||-

100% Glicerol 1mM DTT

Galaktozidaza - najbolja u 3h 0.4mM IPTG 27°C

posle 3h smo pokazali aktivnost / 20h

S 50mg/ml

100ul S

100ul E

50ul P NaP pH 4,6

30' 37°C

100ul + 100ul sukard. pH 10,6

405A

среча, 6. Октобар 2021.

Gal дуже порасла. Зонас нрфансф.

Glu I } згод → нисестипраци на активносту цуипе

Glu II } → -||-

Glu II - 0h (10ml), 3h (10h), 20h (10ml)

Glu I - 0h (10ml анубот), 3h (10ml), 20h (10ml)

SN ↓
↓
нубат (SN)
↓
ћелије

} у обену се меру
активност

100ul P NaP pH 7/4.6
20ul S pNPG 0.3mg/ml
20ul E

λ = 405nm

7.10.

анализ

Сактитин ~~фрактуре~~ - 0h SN (намот венте дуге), SN намот музе, ~~тенуе~~
 3h -||- ; -||- ; ~~намот музе~~
 20h -||- ; -||- ; -||-

1. Тен

0h Glc I SN, 0h SN (муза) Glc I, 0h тенуе Glc I, 0h Glc II SN, 0h SN (муза) Glc II, 0h тенуе Glc II, 3h Glc I SN, SN (муза), тен.

(директе марку ☺)

2. Тен

3h - Glc II SN, Glc II муза (SN), тенуе G II ; 20h GI SN, муза, тен. и 2d G II SN, муза, тенуе

$$M_r(OTT) = 154,25 \text{ g/mol}$$

$$V = 2 \text{ ml}$$

$$c = 1 \text{ mM}$$

$$c = \frac{u}{V} \quad n = 2 \cdot 10^{-3} \cdot 10^{-3}$$

$$n = \frac{u}{M} \quad u = 2 \cdot 10^{-6} \cdot 154,25$$

$$u = 0,0003085 \text{ g}$$

$$u = 0,3 \text{ мкг}$$

W

Вербашто одлазе у инклузиона тела!
 Делативовали активност у SN нашоу мизе у
 Glc I (3h) ^{1020h} → јамо еторо (има га мало); али брже ради у 3h
 Glc II (20h) → еторо (има га мало)
 Додавала сам 40ul E
 20ul S
 160ul пуфера pH 7

Скучишии Т експресији на 20°C.

Закас трансформација М. ошторбар
 Сушра премототна Gal (ушорак)
 Среда - пребауивање премототне, мерење OD и индукција
 Чеш - HPLC
 → Направшии телове и пуфере
 Субота - скитишио са диализе

W

Cenbuuya

Glukozidaza I - Amp rezistenciya

His tag na C-term
88,3 kDa - 90 kDa

Gluk II - Kau R

GST - His Tag - sequence - His Tag
110 samu geu
sa gst tagom 141 kDa

} samo katalitiki
domen

↓
pomoz da
ne ide u inkluziona tela

Čak i kada iseće - GST ostane
na wayu His Tag

S-tag

Gal - Amp rezistenciya

46,5 kDa

↓
Geu - His (C terminus)

$$0,4 \cdot 10^{-3} \quad 0,3$$

$$M \cdot x = 0,4 \text{ mM} \cdot 300 \text{ ul}$$

$$x = 0,12 \text{ L}$$

$$120 \text{ ul}$$

~~XXXXXXXXXX~~
~~XXXXXXXXXX~~
~~XXXXXXXXXX = namu~~

W

15.10.2021.

50ml NaP pH 7,5 300mM NaCl 100mM мунгазон 1mM DTT + glycerol
300mM -||-

50mM NaH_2PO_4 pKa 4 $V = 50\text{ml}$

$$C = \frac{n}{V} \quad n = 50 \cdot 10^{-3} \cdot 50 \cdot 10^{-3} = 2500 \cdot 10^{-6} = 2,5 \cdot 10^{-3}$$

$$n = \frac{m}{M} \quad m = 2,5 \cdot 10^{-3} \cdot 119,98 = 299,95 \cdot 10^{-3} = \boxed{0,3\text{g}}$$

300mM NaCl

$$C = \frac{n}{V} \quad n = 0,3\text{M} \cdot 50 \cdot 10^{-3} = 15 \cdot 10^{-3} = 0,015\text{ mol}$$

$$n = \frac{m}{M_r} \quad m = 0,015 \cdot 58,44 = \boxed{0,87\text{g}}$$

100mM мунгазон

$$C = \frac{n}{V} \quad n = 0,1 \cdot 50 \cdot 10^{-3} = 5 \cdot 10^{-3}$$

$$m = 5 \cdot 10^{-3} \cdot 68,077 = \boxed{0,34\text{g}}$$

300mM

$$C = \frac{n}{V} \quad n = 0,3 \cdot 50 \cdot 10^{-3} = 15 \cdot 10^{-3}$$

$$n = \frac{m}{M} \quad m = 15 \cdot 10^{-3} \cdot 68,077$$

$$m = \boxed{1,02\text{g}}$$

1mM DTT

$$M_r = 154,25$$

$$1\text{mM} = \frac{n}{V} \quad n = 1 \cdot 10^{-3} \cdot 50 \cdot 10^{-3} = 50 \cdot 10^{-6}$$

$$n = \frac{m}{M_r} \quad m = 50 \cdot 10^{-6} \cdot 154,25 = 7712,5 \cdot 10^{-6} = \boxed{0,0077\text{g}}$$

Глицерол 10%

$$\boxed{5\text{ml}}$$

Тренировка бал та сэтгэж. Умано маурке г фрууз. Узмеш ог 2ml
мануе цурцу сивавиу гол (та гто) мрзлекс и халивану пасте-
ризон маурке (100ml) г. ~~25~~¹⁹ml воде, ~~25~~¹⁹ml 10mM мунгазон нурер
Небезати фракцие ~~25~~¹⁹ml шундану гол бредфорс бусе нсавиван.
Ханосимо (свор фровок) - ~~25~~¹²ml безане ~~10~~^{1,5}ml.
300mM NaCl,

W

По 10ml од сваког пуфера - 10 mM од овог 15ml
 → 700 mM
 → 300 mM
 → 500 mM

Прешли на масу цолову од 1ml

Сушарат тисмо бизем тисма на тегу. Ради се фореза и спот да видимо да ли нека трака потише од Gal.

Ту смо добили неку траку на тегу, али с. соли има и ендогену Gal (бојимо се да је активност од тсе). 19. октобар 2021.

Правимо STAR квантитативне ћелије. Сејемо бетерас за преносителу културу. Лође су STAR, имамо PET22b и STAR⁺.

26.10.2021.

- Gal у XL10 / DH5α } Трансформација
- NTD (zeocin) XL10 }

Тробоно сеј за Gal са фракцијана са HPLC. Лођујемо замућење а не дејинг у хевоганим и 100mM имидазол фракцијана

29.10.2021.

Трансформисем STAR, SAFL и OVER са Gal која је јуре изолована. Хотимо да тестирамо STAR-Gal 0h, 3h и 20h

STAR - PET22b

у пуферима разл pH

и суседително pH пуфера за лизу (може издати NaCl, ~~PH~~ ^{имидазол})

Чувани ћелије / SN за форезу.

С растворити у ↑ pH.

1,83 1,65 2,42 1,74

28

McIlvaine buffer

20ml

0,2 M Na₂HPO₄
0,1 M citrat

pH 4 4	pH 6,5
7,7	13
12,3	7

→ og janyttave!

0,2 M Na₂HPO₄ V=20ml

$$C = \frac{n}{V}$$

$$0,2 = \frac{n}{20 \cdot 10^{-3}}$$

$$n = 0,2 \cdot 20 \cdot 10^{-3}$$

$$n = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol}$$

$$m = 4 \cdot 10^{-3} \cdot \text{Mr}$$

$$m = \text{~~0,564g~~}$$

$$\text{0,504g} \quad 0,336g$$

$$\text{Mr (Na}_2\text{HPO}_4) = 141,96$$

0,1 M citrat V=20ml

$$n = 0,1 \cdot 20 \cdot 10^{-3}$$

$$n = 2 \cdot 10^{-3} \text{ mol}$$

$$m = \frac{m}{\text{Mr}} \quad m = 2 \cdot 10^{-3} \cdot \text{210,14}$$

$$m = \text{~~0,42g~~}$$

$$m = 0,42g$$

40

84,01

20ml anukbotu

uzerim smo buffer pH 4 100ul

bozj 100ul

pH za mby

lanimo pH 4-5 pokazao

i uceno je on pH

za pH 6-7

W

Gal: da bi duo akribat mora ga gumerizuje

8.11.2021.

Трансформ. αGlu 1 - * Amp
αGlu 2 - DTT Kan

9.11.

αGlu 1 - uopasno

αGlu 2 - 1- ali snabuje

dGal - ~~je~~ je jure rafeta ferm; danas skintu 2oh

uzurap ~~4.5ml~~ uzurap pH 6.5 NaP 50mM; 300mM NaCl u 1mM DTT

uzimamo SN za esej

oh PET u dGal

3h -11-

2oh -11-

Турдер pH 6.5 u pH 4

0min, 60min, 120min

у ендогору: 250ul E } ograde uzeti 100ul + 100ul dimarbotanov
250ul P } 700ul
200ul S }

3ml 2,5mg/ml
~~1.5ml S~~ ~~5mg/ml~~

⇒ 1,5mg/ml ⇒ 0,5mg/ml

$$\begin{array}{r} 5\text{ml} \times \\ 3\text{ml} - 2,5 \\ \hline x = 5 \cdot 2,5 \\ \hline 12,5 \end{array}$$

W

W

za

10. новембар 2021.

2atase transformacija Gluk 2 u \star (oko je per godar)
 11 zasejati prekoblitu za Gluk 1. \rightarrow 50ml LB+Amp
 LB 1,5L
 2x erlenmajer od 1L

Za plitak $\rightarrow V = \text{~~500ml~~ 250ml}$
 50mM NaP pH 7,5 or 300mM NaCl; imidazol 10mM
 1mM 10%
 DTT i glicerol
~~500mM~~
 500
~~0,1L~~

12. 11. 2021.

Глукозидаза II

Хидролизује ~~3-глицерофосфат~~ Glc (~~1-4-галактоза~~)
 α 1,3 везане Glc (унутрашње)

Примера фамилија 31, катероглимер је
 α субјект. је каталитичка и одликује је консензус сеquenс
 G/F - L/I/V/M - ~~K~~X D M N E

Постоје 2 форме E - једна у Ереидиуму и једна у ендоцитима
 * copurify ; одвајање у cos7 титраци, радове у мезоплазми
 фибробласта мачака - мембране

Gal: Za su suo akribat

I su rogabanu deoxinojirinicin
y 2 konu. - 100µM u 500µM.

$$K_m = 0,5 - 0,52 \mu M$$

Testirani u maltozu $K_m = 0.43 \mu M$

Transform. αGlu 1 - * Amp
αGlu 2 - DHTd Kan

* pNPG

0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 µM

αGlu 1 - uopasno

↑ afinitivnost sites 0,25-1 µM

αGlu 2 - 1- ali slabije

↓ 11-

8-14 µM

GII - 2 x α 1,3 vezanu Glc za N'-terminusku novosintetizovanu i mikroproteinu

Хетеродимер GIIα - катал. домен и он је тесно повезан са β-субј. GIIβ

GIIβ соррџи малтоза-Р рецептор хомологи домен

GIIα - примарна функција за ендол. локализацију и β-суб. нема тмаков знакој за активност GII.

Узели га буде 5µM pNPG Mr* 301,39/мол

Они су лизирали 293Т ћелије (аденовирус у хуманим ембрионским ћелијама бубрега)
50-150µM TrisHCl pH 7.4; 150µM NaCl; 1% Triton; 1µM EDTA; 1µM PMSF и
1µg/ml Leupeptin. Лиза са софификацијом на леду и брза 15' 13000rpm.

SN - одређени α E

10µg лизата + 125µL pNPG (1µg/ml) 37°C 15h

α Glukozidaza

W



Gen je na frámenú VII xromozoma

Teorýcia pI 5,4

Molekulová hmotnosť 68

584 kDa

R441 ? y sekvenciu je Ha 441 - His

Ha 443 - R

α Galaktozidaza

pH optimum 4,3 (za kľuč...)

T - 11 - 37

dimer - gelf uaze 110 kDa

SOS uaze 50 kDa

glykoprotein

skladistiť na 4°C, dodati 5% PVP

* PET 226 y 50ml

Gluk 1 y 50ml

Gluk 2 y 50ml

medoľa, 14.11.21

$M_r = 301$

$$C = \frac{m}{V}$$

$V = 10 \text{ ml}$

5ml

10ml

$$m = \frac{C \cdot V}{10^{-3}} = 10^{-3} \cdot 10^{-3} = 10^{-5}$$

$$m = \frac{C \cdot V}{M}$$

$$m = 10^{-5} \cdot 301 = 301 \cdot 10^{-5}$$

$$0,3 \cdot 10^{-2} = 0,003 \text{ g} = 3 \text{ mg}$$

$$0,0015 \text{ g} = 1,5 \text{ mg} = 3 \text{ mg} - 10$$

5mg - 15ml

0,3mg/ml

SUM Y SMEVN DA BYDE

100µl S + 100µl P + 40µl E

$\alpha 1$

$\alpha 2$

W

100ml → ~~94ml~~ 0,1 μl
100ml Amp

25 μg фитанно! за птис

- 1,138
- 0,984
- 0,965
- 0,738
- 0,593
- 0,519
- 0,419
- 0,371
- 0,439

0,1

1x chlor

4x chlor, amp

$25 \cdot 10^{-3}$

$$25 \mu\text{g/ml} \cdot x = 50 \text{ml} \cdot 25 \mu\text{g/ml}$$

0,05 ml
50 μl

0,1

$$100 \mu\text{g/ml} \cdot x = 50 \text{ml} \cdot 100 \mu\text{g/ml}$$

50 μl

25

$$10 \cdot x = 2,5$$

$$10 \mu\text{g/ml} \cdot x = 20 \text{ml} \cdot 1 \mu\text{g/ml}$$

1 μg

2 μg

Bradford

	0h	3h	20h	sp	0,219		
PET	0,411	0,719	0,422	-sp	0,192	0,5	0,203
αG1	0,657	0,684	0,515	αG1	0,438	0,465	0,296
αG2	0,557	0,464	0,607	αG2	0,338	0,245	0,388

$$y = 0,368x + 0,02$$

$$\frac{0,192 - 0,02}{0,368} = x$$

0,44	1,307	0,497
1,135	1,209	0,75
0,86	0,611	1

SMART COVID препарат



15. Июля 2021.

Препаративно αGlu-1 (20h, star). Колота селин, пuffer 1 - 10 mM имидазол,
пuffer 2 - 50 mM имидазол.

75
~~100~~ μl P
100 μl E
75 μl S 18 mg/5h (3,6 mg/ml, а у смеси је 3,6 mM)
12 mM
Mr = 301 g/mol

Почина

2x PET 0h, 2x PET 3h, 2x PET 20h

αGlu1 -1-

16, 18, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30

31, 32, 34, 36

Ситанг права, микро-SP; 0,01; 0,025; 0,05; 0,075; 0,1
макро-SP; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1 mg/ml

микро: $y = 1,223x - 0,0017$ $R^2 = 0,9916$

макро: $y = 0,2308x + 0,0066$ $R^2 = 0,9973$

конц. протеина ферм. лизат

PET 22b 0h, 3h и 20h и αGlu1 0h; αGlu 3h; αGlu1 20h

19. 11. 2021.

Тестирали активност α Glu1* и α Glu2* Аасурам прозних *келуја и рЕТ226(+)-одн. Температуе је била $\sim 20^\circ\text{C}$, узимали смо еликвоте 04, 34 и 204.

Мизирање: NaP 50mM 150mM NaCl 10mM илупазол 10% глицерол и 1mM DTT
pH 7.063

Буфери за есеј:

0.2M NaPcit. pH 4

50mM NaP pH 7

конц S 12mM у смешу 3,6mM

¹⁰⁰
~~150~~ μL S, 150 μL P, ⁵⁰
~~150~~ μL E

Буфер за есеј:

$$119,98 + 18 = 137,98 \text{ g/mol}$$

$$c = \frac{n}{V} \quad n = 0,1 \cdot 50 \cdot 10^{-3} = 5 \cdot 10^{-3} \text{ mol}$$

$$m = 5 \cdot 10^{-3} \cdot 137,98 = 0,689 \text{ g}$$

$$V = 8 \text{ ml} \quad c = 12 \text{ mM}$$

$$c = \frac{n}{V} \quad n = 8 \cdot 10^{-3} \cdot 12 \cdot 10^{-3} = 96 \cdot 10^{-6} \Rightarrow$$

$$m = 96 \cdot 10^{-6} \cdot 301 = 28,89 \cdot 10^{-3} = \cancel{0,02889} \quad \boxed{28,8 \text{ mg}}$$

$$\left. \begin{array}{l} 28,8 \text{ mg} - 8 \text{ ml} \\ 30 \text{ mg} - x \end{array} \right\} x = \frac{240}{28,8} = 8,3 \text{ ml}$$

Gluk 2 - neka gijva lieno termophilum Chaetomium thermophilum

• Tanostu se širokom gijvanze na pH 7 i pH 5 (prema bogu)

pH 7 : 10mM NaP

EC 3.2.1.207

Zamuyrak: Pobetaim c com 50mM NaP

110kDa

Gluk 1 - mny musculus EC 3.2.1.106. 88,3kDa

Slabo se vezala za polostu, kar je stineu muzati 20h mizjku.

↓T encipracije - uzemim 3h

19.11.2021.

Koncentracija proteina izmerena Bredfordom

ODH 0h $C_p = 0,66 \text{ mg/mL}$

ODH 3h $C_p = 0,38 \text{ mg/mL}$

ODH 20h $C_p = 2,64 \text{ mg/mL}$

Glu 2 0h $C_p = 0,49 \text{ mg/mL}$

Glu 2 3h $C_p = 0,59 \text{ mg/mL}$

Glu 2 20h $C_p = 1,02 \text{ mg/mL}$

Glu 1 0h $C_p = 0,44 \text{ mg/mL}$

Glu 1 3h $C_p = 0,43 \text{ mg/mL}$

Glu 1 20h $C_p = 0,81 \text{ mg/mL}$

* 0h $C_p = 0,45 \text{ mg/mL}$

* 3h $C_p = 0,51 \text{ mg/mL}$

* 20h $C_p = 0,43 \text{ mg/mL}$

SH 0h $C_p = 0,12 \text{ mg/mL}$

SH 3h $C_p = 0,12 \text{ mg/mL}$

SH 20h $C_p = 0,68 \text{ mg/mL}$

21.11.2021.

Zasejaini Shuttle za komplementni klenije

23

~~22~~.11.2021.

Pravljene klenija i transformacija svega u Saflu

22.11.2021.

Sejake preko noći u mešer sa mešim E

24.11.2021.

Indukovani sa $0,4 \text{ mM}$ u otopini T na 20°C u ga me 20h

** Додавати дикарбонат после есеја са рНРС збој рНР, највише ϵ одговара на рН (9, 10, 11...)

ϵ	6	7	7.5	8	8.5	9.0
рН						
$\epsilon_M (M^{-1} cm^{-1})$	1607	8378	13294	16302	17104	17738

22. 11. 2021.

S. cerevisiae - E

$K_{m1} \sim 0,3 mM$ рНРС

I_c^{50} (за deoxythymidine) - ~~0,0018 mM~~

$0,0018 mM = 1,8 \mu M$

Тестирање инхибиције
на том ензиму

Дијализати

2x E, S, P

2x E, S, P, I

2x S, P

I израчунао ниток

$m = 1,5 \mu g$ $M_r = 199,631$

$c = \frac{n}{V}$ $n = 7,51 \mu mol$ $V = 100 \mu l = 0,1 ml$
 $7,51 \cdot 10^{-6} / 0,1 \cdot 10^{-3} = 0,075 M = 75 \mu M$

$c = 0,4256 \cdot 10^{-3}$ $V = 100 \mu l$

$c = \frac{n}{V} \Rightarrow n = 0,4256 \cdot 10^{-3} \cdot 0,1 \cdot 10^{-3}$

$n = 0,04256 \cdot 10^{-6} mol$

$n = \frac{m}{M_r}$ $m = 0,04256 \cdot 10^{-6} \cdot 199,631$
 $m = 8,5 \mu g$

Inhibitor (20 μl и 200 μl ~~swise~~)

~~$V = 100 \mu l$ $c = 4,256 mM$~~

~~$c = \frac{n}{V}$ $n = 4,256 \cdot 10^{-3} M \cdot 0,1 \cdot 10^{-3} = 0,4256 \cdot 10^{-6} mol$~~

~~$n = \frac{m}{M_r}$ $m = 0,4256 \cdot 10^{-6} \cdot 199,631$~~

~~$m = 84,96 \cdot 10^{-6} = 84,96 \mu g$~~

Ако израчунао 0,5 μg

$n = \frac{0,5 \mu g}{199,631} = 2,5 \mu mol$ $V = \frac{1}{10} ml$

$c = \frac{n}{V}$ $c = \frac{2,5 \cdot 10^{-6}}{0,1 \cdot 10^{-3}} = 0,025 = 25 \mu M$

у паку $11,4 \mu M = 11,4 \cdot 10^{-3} mM$
 $= 0,0114 mM$

рНРС највише га буде ~~збој~~
 $10 \times \uparrow K_m$

W

100mM NaP V=50mL

$$c = \frac{n}{V} \quad n = 0,1 \cdot 50 \cdot 10^{-3} = 5 \cdot 10^{-3} \text{ mola}$$

$$n = \frac{m}{M} \quad m = 5 \cdot 10^{-3} \cdot 149,98 = 0,7499 \text{ g}$$

$$0,0005999 \text{ g} = 0,6 \text{ mg}$$

400mM Na₂CO₃ V=50mL

$$M_r = 105,99 \text{ g}$$

$$c = \frac{n}{V} \quad m = 50 \cdot 10^{-3} \cdot 0,4 \cdot 105,99$$

$$= 2,1198 \text{ g}$$

DNJ se pravi od bogu!

DNJ ima I Glu II isto Glu I, 20μL je 50% I Glu I (saccharomyces)

koncentracija u smesi I

0,2 μM

0,5

1

3

5*
20 μL
50 μM

10

12

15

20*
20 μL
200 μM
stok

20 μL u 200 μL smese
20 μL I u bogu
20 μL E
140 μL P

I

$$V = 0,2 \text{ mL} = 0,2 \cdot 10^{-3} \text{ L}$$

$$c = 0,2 \text{ mM} = 0,2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$$

$$c = \frac{n}{V} \quad n = 0,2 \cdot 10^{-3} \cdot 0,2 \cdot 10^{-3} \Rightarrow m = 0,00000799 \text{ g}$$

$$M_r = 199,631 \quad = 7,99 \mu\text{g}$$

Logovano u smesu P, E, I koncentracija 15' na pozivak S

Libgen.is → cajta kao scihub

$$\begin{aligned} A_1 & 159P + 20E + 20S + 0,8I \\ A_2 & 159P + 20E + 20S + 0,8I \end{aligned} \left. \vphantom{\begin{aligned} A_1 \\ A_2 \end{aligned}} \right\} 0,2 \mu M$$

$$\begin{aligned} A_3 & 158P + 20E + 20S + 2I \\ A_4 & 158P + 20E + 20S + 2I \end{aligned} \left. \vphantom{\begin{aligned} A_3 \\ A_4 \end{aligned}} \right\} 0,5 \mu M$$

$$\begin{aligned} A_5 & 156P + 20E + 20S + 4I \\ A_6 & 156P + 20E + 20S + 4I \end{aligned} \left. \vphantom{\begin{aligned} A_5 \\ A_6 \end{aligned}} \right\} 1 \mu M$$

$$\begin{aligned} A_7 & 148P + 20E + 20S + 12I \\ A_8 & 148P + 20E + 20S + 12I \end{aligned} \left. \vphantom{\begin{aligned} A_7 \\ A_8 \end{aligned}} \right\} 3 \mu M$$

$$\begin{aligned} A_9 & 140P + 20E + 20S + 20I \\ A_{10} & 140P + 20E + 20S + 20I \end{aligned} \left. \vphantom{\begin{aligned} A_9 \\ A_{10} \end{aligned}} \right\} 5 \mu M$$

$$\begin{aligned} B_1 & 150P + 20E + 20S + 10I \\ B_2 & 150P + 20E + 20S + 10I \end{aligned} \left. \vphantom{\begin{aligned} B_1 \\ B_2 \end{aligned}} \right\} 10 \mu M$$

$$\begin{aligned} B_3 & 148P + 20E + 20S + 12I \\ B_4 & 148P + 20E + 20S + 12I \end{aligned} \left. \vphantom{\begin{aligned} B_3 \\ B_4 \end{aligned}} \right\} 12 \mu M$$

$$\begin{aligned} B_5 & 145P + 20E + 20S + 15I \\ B_6 & 145P + 20E + 20S + 15I \end{aligned} \left. \vphantom{\begin{aligned} B_5 \\ B_6 \end{aligned}} \right\} 15 \mu M$$

$$\begin{aligned} B_7 & 140P + 20E + 20S + 20I \\ B_8 & 140P + 20E + 20S + 20I \end{aligned} \left. \vphantom{\begin{aligned} B_7 \\ B_8 \end{aligned}} \right\} 20 \mu M$$

$$\begin{aligned} B_9 & 180P + 20S \\ B_{10} & 180P + 20S \end{aligned} \left. \vphantom{\begin{aligned} B_9 \\ B_{10} \end{aligned}} \right\} KS$$

$$\begin{aligned} B_{11} & 160P + 20E + 20S \\ B_{12} & 160P + 20E + 20S \end{aligned} \left. \vphantom{\begin{aligned} B_{11} \\ B_{12} \end{aligned}} \right\} KE$$

$$\begin{aligned} C_1 & 150P + 100E + 50S \\ C_2 & 150P + 100E + 50S \end{aligned} \left. \vphantom{\begin{aligned} C_1 \\ C_2 \end{aligned}} \right\} Glu II 300 \mu L$$

$$\begin{aligned} C_3 & 100P + 100E + 50S + 50I \\ C_4 & 100P + 100E + 50S + 50I \end{aligned} \left. \vphantom{\begin{aligned} C_3 \\ C_4 \end{aligned}} \right\} \begin{array}{l} - 1 \mu M \\ Glu II 300 \mu L \end{array}$$

200 μM - finalno 33,3 μM

$$\begin{aligned} C_5 & 180P + 20I \\ C_6 & 180P + 20I \end{aligned} \left. \vphantom{\begin{aligned} C_5 \\ C_6 \end{aligned}} \right\} KI$$

Мерење инхибиција рач 2

Данас родојемо свуда по ~~20~~²⁰ μM инхибитора у $200\mu\text{l}$ ($20 \times R$)
 5' инкубирати рач Е+Р+И и додати $40\mu\text{l}$ Е

за $20\mu\text{M}$ ($200\mu\text{l}$)
 $75\text{mM} \cdot x = \frac{200500}{50\mu\text{l}} \cdot 20\mu\text{M} \cdot 0,2\text{mM}$
 $x = \frac{0,27\mu\text{l I} + 49,73\mu\text{l boga}}$
 ~~$187,5x$~~
 ~~375~~
 ~~$0,133$~~ + ~~$49,867\mu\text{l boga}$~~
 ~~$0,58\mu\text{l I} + 199,47\mu\text{l boga}$~~

1) $1,33\mu\text{l I} + 498,67\mu\text{l boga}$

2) $\frac{100}{200\mu\text{l}} \cdot 20\mu\text{M} = \frac{100}{x} \cdot 18\mu\text{M}$

$x \cdot 200\mu\text{M} = 100 \cdot 180$

$x = \frac{180\mu\text{l}}{200\mu\text{l}} \cdot 90\mu\text{l I} = 90\mu\text{l I} + 10\mu\text{l boga}$

3) $x \cdot \frac{20}{48} = \frac{100}{100} \cdot 15$ за $100\mu\text{l}$

$x = \frac{37,5}{48} \cdot 48\mu\text{l} = 37,5 + 12,5\mu\text{l boga}$
 $(45,18) \mu\text{l} + 28\mu\text{l boga}$

4) $x \cdot 20 = \frac{100}{50} \cdot 12$ $24,82$

~~$x \cdot 20 = 50 \cdot 12$~~
 $(60,24\mu\text{l} + 39,76\mu\text{l boga})$

5) $x \cdot 20 = \frac{100}{50} \cdot 10$

~~$x \cdot 20 = 50 \cdot 10$~~
 $x = \frac{50\mu\text{l}}{20} + 50\mu\text{l}$

6) $x \cdot 20 = \frac{100}{50} \cdot 5$

~~$x \cdot 20 = 50 \cdot 5$~~
 $(25\mu\text{l} + 75\mu\text{l})$

7) $x \cdot 20 = 100 \cdot 4$

~~$x \cdot 20 = 100 \cdot 4$~~
 $(20\mu\text{l} + 80\mu\text{l boga})$

8) $x \cdot 20 = 100 \cdot 3$

~~$x \cdot 20 = 100 \cdot 3$~~
 $(15\mu\text{l} + 85\mu\text{l})$

9) $x \cdot 20 = \frac{100}{50} \cdot 2$

$x = \frac{10}{20} \mu\text{l} + \frac{90}{20} \mu\text{l boga}$

10) $x \cdot 20 = \frac{100}{80} \cdot 1,5$

$x = \frac{7,5}{80} \mu\text{l} + \frac{92,5}{80} \mu\text{l boga}$

11) $x \cdot 20 = \frac{100}{80} \cdot 1\mu\text{M}$

$x = \frac{5}{80} \mu\text{l} + \frac{95}{80} \mu\text{M boga}$

12) $x \cdot 20 = 100 \cdot 0,8$

$x = \frac{4\mu\text{l}}{20} + \frac{48}{36} \mu\text{l boga}$

13) $x \cdot 20 = 100 \cdot 0,4$

$x = \frac{2\mu\text{l}}{20} + \frac{98}{40} \mu\text{l boga}$

14) $x \cdot 20 = \frac{100}{100} \cdot 0,2$

$x = \frac{1}{100} \mu\text{l} + \frac{99}{100} \mu\text{l boga}$

W Ojhapuku

20µL S
40µL E
20µL I
120µL P

ØI
20µL S
40µL E
160µL P

P+S uotupana
20µL S
180µL P

E I P
20µL I
40µL E
140µL P

Cejeno:

~~αGlu2 - ★ - 150µL~~

~~urazati ★ - 150µL~~

~~Saft αGlu2 - 500µL~~

~~Saft urazati - 150µL~~

~~0h, 3h, 20h → euzbeme sul~~

~~-||-~~

0h (50µL), 3 (200µL), 20h (200µL) 25µL

0, 3, 20h

Kam

28.11.2021.

αGlu2 ★ - cejanu y 5µL → ^{mera V} euzpa y 150µL

urazati ★ - -||-

Saft αGlu2 - -||-

Saft urazati - -||-

Saft Glu 1 - }
★ Glu 1 - } Aup
Gal ★ - }
Gal Saft - }

29.11.2021.

Prebacuju 5µL y 150µL Lba u tekano OD

Saft mnguzuju se sa 0.25µM IPTG, a ★ sa 0.95µM u T

18-20°C

Telovu za ef 10%

150µL kom je sfermentirajuca u zemu no 10µL za svaku h

→ 0h, 3h, 20h



Гли 1 - * нема дисулфиде, има Cys601 у S-везујућем месту

Зодају OTT да сиреје I ензима

pH оптимум 6,6-7

α 1,2-хидролиза терминалне везе

EP протеин

Користили су I протеина 0.5 mM PMSF и леукеитин 2 μ g/ml,
 σ -сфенампролин^{1 mM} и β -аминохексанску киселину 1 mM.

* 10 mM NaP pH 6,8 за солубилизацују

Особине:

4°C - недељу дана

-20°C - неколико месеци

25°C - $\frac{1}{2}$ активности \downarrow након 24h, ако су се дода PEG 1%
4000 задржава 75% активности након 72h

Прнос након афинитетне - 25%, након DEAE 6%

85kDa (мономер)

pH оптимум 6,6-7.0; меширали од pH 4.5-6 са $\left. \begin{array}{l} 25 \text{ mM} \\ \text{NaP/citrat} \end{array} \right\}$
а од 6-7.5 са 25 mM NaP

DN1 је инхибира 77% у кону. 5 μ M

30. 11. 2021.

Препарација свих Е

Припреми

Glu 1 и Glu 2 → ~~200~~ μL S, $100 \mu\text{L}$ E, $100 \mu\text{L}$ P
Буфер 100 mM NaP pH 6,9

Тестирамо 20h $53,6 \mu\text{g/mL}$

Galaktozidaza - 20h

$5 \mu\text{g/mL}$ S, pH 4.5

Мали шприци, ставили пружке на дно, смали пастеризом око 1 mL машице, смекали да се пошаложи и пустили проток.

1. буфер 50 mM NaP , 150 mM NaCl , 10 mM млигазол, 1 mM DTT, 10% глицерол,
 0.5 mM PMSF pH = 7.5

2. буфер - || - 500 mM млигазол pH = 7.5

Презимитена је само глукозидаза и * и β gal у 20h
Невезани скробани по 0.5 mL да за сорезу сидјени у 1 фракцију
Везане фракције по $100 - 150 \text{ mL}$.

Електрофореза на 10% гелу

Мериле активности у фракцијама из Шафра презимитеним.

Додавале $20 \mu\text{L}$ P + $20 \mu\text{L}$ S + $20 \mu\text{L}$ E (F 6, 7, 9-12, 16, 17, 20, 26, 27, 29, 30)

Нимиа жује конјугат

Тен 1:

- 1) Glu 10h š
- 2) Glu 120h š
- 3) FT
- 4) nevezane
- 5) F 6
- 6) F 7 ←
- 7) MM ←
- 8) F 8
- 9) F 10
- 10) F 11
- 11) F 12
- 12) F 17

Тен 2:

- 1) F 18
- 2) F 20
- 3) F 26
- 4) F 27
- 5) F 28
- 6) F 29
- 7) F 30
- 8) F 31
- 9) MM
- 10) Gal * 3h 1
- 11) Gal * 3h 2
- 12) Gal * 3h 3

u

Мериле активності у свини мизантима

Акти у свини 20/20/20
6,7, 9-12 ^{3,6} ¹⁶ ^{wg/ml}
1, 17, 20,
бумага (16)
26, 27, 29, 30 32, 33
↓ ↓
B1 B4

1. децембар 2021.

u

Препитавано 86u-2 из шара и шара на софтор Ni-NTA.
Мисли ештор водом (10ml), онда издереам (~5ml).

Натосмо

Невезати - 0,5ml по ниталити spot меса (Bredford)

Везати - 2+3 кони - 11 -

100% В - 5ml

Вода - 11 -

20% ЕтоН - 11 - ; оставити у ЕтоН, замачати парафини и горе шифру и
горе одвод



V- ~~3,5, 10, 11, 12,~~ 3, 4, 8, 9, 12, 20-23, 25, 31

~~26, 27, 29, 30~~

~~36-40 (?)~~

w

Ухишувууја N-Сутула-DNJ

$M_r = 255,631 \text{ g/mol}$

$3,6 \text{ mg/ml S} = 12 \mu\text{M} \rightarrow 1,2 \text{ mM}$ фронтално

- 20 μl S
- 20 μl I
- 40 μl E
- 120 μl P

NaP pH 7 100 mM $V = 0,1 \text{ L}$

$C = \frac{n}{V}$ $n = C \cdot V = 0,1 \text{ M} \cdot 0,1 = 0,01$ $m = 0,01 \cdot 138 = 1,38 \text{ g/za } 100 \text{ ml}$

Ухишувууја 5' E+P+I

$M_r = 255,631 \text{ g/mol}$

0,5, 10, 20, 50, 100 μM I

$m = 2,5 \text{ mg} = 2,5 \cdot 10^{-3} \text{ g}$

$\frac{m}{M_r} = \frac{2,5 \cdot 10^{-3} \text{ g}}{255,631 \text{ g/mol}} = 0,00000978 = 9,7 \cdot 10^{-6} \mu\text{mol}$

$V = 100 \mu\text{l} = 0,1 \cdot 10^{-3} \text{ L}$ $0,2 \text{ ml} = 0,1 \cdot 10^{-3} \text{ L} = 0,0001 \text{ ml}$

$C = \frac{n}{V}$ $C = \frac{9,7 \cdot 10^{-6}}{0,1 \cdot 10^{-3}} = 0,0978 \frac{\text{mol}}{\text{L}} = 97,8 \mu\text{M} \Rightarrow 48,9 \text{ mM}$

48 900

~~97800 μM · x = 1000 μM · 200 μl~~

~~$V = 97,8 \mu\text{l} + 120 \mu\text{l}$
 $197,8 \mu\text{l} + 204 \mu\text{l}$~~

DNJ - n-Сутула

293,87 + 6,13 μl usorky boze

~~293,87 + 6,13 μl usorky boze~~

~~$97800 \mu\text{M} \cdot x = 500 \mu\text{M} \cdot 100 \mu\text{l}$~~

~~$99,49 \mu\text{l} + 0,51 \mu\text{l}$~~

1000 μM (100 μl + 100 μl boze) \rightarrow 500 μM

500 μM · (x = 200 μM · 200 μl)

x = 80 μl + 120 μl boze

100 μ l + 100 μ l boze \Rightarrow 100 μ M
100 μ l (100 μ M) + 100 μ l boze \Rightarrow 200 μ l 50 μ M

Тноууа

duplikat

E GK (kvasac) \emptyset , 5, 10, 20, 50, 100 μ M

F GII -||-

G EIP, ESP, PS, SIP

H \downarrow
wybeta c

EIP 20 μ l I, 40 μ l E, 140 μ l P

ESP 20 μ l S, 40 μ l E, 140 μ l P

PS 20 μ l S, 180 μ l P

SIP 20 μ l, 20 μ l I, 160 μ l P

**

- Сиабууиуи ГК \downarrow 2x (20 μ l) и узгунуи је!

- Узем стунуи илуиууу

Зап 2. 3.12.2021.

E1 - E, S, P 20, 20, 180 i E2 (ноууиуу сиабууиуи 20 μ l E)
ГК

3.12.2021.

Затворами смо да је пошло до померања А за безане фракције

★ Glu II - 4, 23, 25, 31

§ Glu II - 4

n-butyl DMS

~~Hegeka,~~

Потезовак, 6.12.2021.

sol

0.2 → 2 μ M

12 → 120 μ M

0.4 → 4

15 → 150

0.8 → 8

18 → 180

1 → 10

20 → 200

1.5 → 15

50 → 500

2 → 20

100 → 1000

3 → 30

125 → 1250

4 → 40

150 → 1500

5 → 50

175 → 1750

10 → 100

200 → 2000 μ M ~~5000~~ AmL

$$48,9 \mu\text{M} \cdot x = 2000 \mu\text{M} \cdot 1 \mu\text{l}$$

$$48900 \mu\text{M} \cdot x = 2000 \mu\text{M} \cdot 1 \mu\text{l}$$

$$x = \frac{40,89 \mu\text{l} \gamma_3 \text{opu} \gamma_3}{41} + \frac{2959,11 \mu\text{l} \text{ boje}}{959} = 1 \mu\text{l} \quad \checkmark$$

$$2000 \mu\text{M} \cdot x = 1750 \mu\text{M} \cdot 100 \mu\text{l}$$

$$x = \frac{40,875 \mu\text{M}}{87,5} + \frac{91,25 \mu\text{l} \text{ boje}}{12,5}$$

$$87,5 \mu\text{l} + 12,5 \mu\text{l} \text{ boje}$$

$$87,5 + 12,5 \quad \checkmark$$

$$2000 \mu\text{M} \cdot x = 1500 \mu\text{M} \cdot 100 \mu\text{l} \text{ boje}$$

$$x = \frac{75 \mu\text{l}}{75} + \frac{92,5 \mu\text{l} \text{ boje}}{25}$$

$$75 \mu\text{l} + 25 \mu\text{l} \text{ boje} \quad \checkmark$$

$$2000 \mu\text{M} \cdot x = 1250 \mu\text{M} \cdot 100 \mu\text{l} \quad \checkmark$$

$$62,5 \mu\text{l} + 37,5 \mu\text{l} \text{ boje}$$

$$2000 \mu\text{M} \cdot x = 1000 \mu\text{M} \cdot 100 \mu\text{l}$$

$$50 \mu\text{l} \gamma_3 + 50 \mu\text{l} \text{ boje} \quad \checkmark$$

$$2000 \mu\text{M} \cdot x = 500 \mu\text{M} \cdot 100 \mu\text{l}$$

$$25 \mu\text{l} \gamma_3 + 75 \mu\text{l} \text{ boje} \quad \checkmark$$

$$2000 \mu\text{M} \cdot x = 200 \mu\text{M} \cdot 100 \mu\text{l} \quad \checkmark$$

$$x = 10 \mu\text{l} + 90 \mu\text{l} \text{ boje} \quad \checkmark$$

$$2000 \mu\text{M} \cdot x = 180 \mu\text{M} \cdot 100 \mu\text{l}$$

$$x = 9 \mu\text{l} + 91 \mu\text{l} \text{ boje} \quad \checkmark$$

$$2000 \mu\text{M} \cdot x = 150 \mu\text{M} \cdot 100 \mu\text{l}$$

$$x = 7,5 + 92,5 \mu\text{l} \text{ boje} \quad \checkmark$$

$$2000 \mu\text{M} \cdot x = 120 \mu\text{M} \cdot 100 \mu\text{l}$$

$$x = 6 + 94 \mu\text{l} \text{ boje}$$

$$\begin{aligned} 7,4 - x \\ 36 - 1 \mu\text{l} \\ x = 2,05 \mu\text{l} \end{aligned} \quad \checkmark$$

$$\begin{aligned} \underline{200\mu\text{M}} \cdot x &= 500\mu\text{l} \cdot 100\mu\text{M} \\ x &= 25\mu\text{l} + 475\mu\text{M boze} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 100\mu\text{M} \cdot x &= 50\mu\text{M} \cdot 100\mu\text{l} \\ x &= 50 + 50\mu\text{l boze} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 100\mu\text{M} \cdot x &= 40\mu\text{M} \cdot 100\mu\text{l} \\ x &= 40 + 60\mu\text{l boze} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 100\mu\text{M} \cdot x &= 30\mu\text{M} \cdot 100\mu\text{l} \\ x &= 30 + 70\mu\text{l boze} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 100\mu\text{M} \cdot x &= 20\mu\text{M} \cdot 100\mu\text{l} \\ x &= 20 + 80\text{ boze} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 100\mu\text{M} \cdot x &= 15\mu\text{M} \cdot 100\mu\text{l} \\ x &= 15\mu\text{l} + 85\mu\text{l boze} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 100\mu\text{M} \cdot x &= 10\mu\text{M} \cdot 100\mu\text{l} \\ x &= 10\mu\text{l} + 90\mu\text{l boze} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 100\mu\text{M} \cdot x &= 8\mu\text{M} \cdot 100\mu\text{l} \\ x &= 8\mu\text{l} + 92\mu\text{l boze} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 100\mu\text{M} \cdot x &= 4\mu\text{M} \cdot 100\mu\text{l} \\ x &= 4\mu\text{l} + 96\mu\text{l boze} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 100\mu\text{M} \cdot x &= 2\mu\text{M} \cdot 100\mu\text{l} \\ x &= 2\mu\text{l} + 98\mu\text{l boze} \end{aligned}$$

w

7.12.2021.

Засејани синоти мацкс, гатас направитио од. Узимомо 0h, 3h и 20h
Припрема света за HPLC и тенова.

Позабери:

50mM NaP

150mM NaCl

10mM ммигасол

10% гллицерол

1mM DTT

0,5mM PMSF

V=300ml

→ 500mM ммигасол

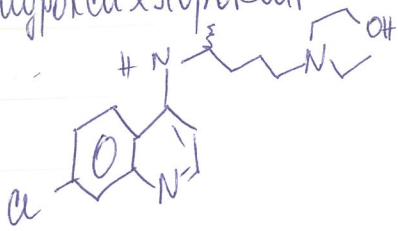
V=100ml



Hlorokin (CQ)

- Main Pro

Хлороквин хлороквин



$$M_r = 335,87 \text{ g/mol}$$

унамо ја 10,9 mg

DO 300 - crni marker

$$pI (\text{Main Pro}) = 5,95$$

33,7 kDa

Тестирају 10.000 левова и родуми 10^{50} (за Main) = 0,67 - 21,4 μM

$$C = \frac{n}{V}$$

$$n = \frac{m}{M} = \frac{10,9 \cdot 10^{-3}}{335,87} = 3,24 \cdot 10^{-5} \text{ mol}$$

$$V = 0,5 \text{ mL} = 0,5 \cdot 10^{-3} \text{ L}$$

$$C = \frac{3,24 \cdot 10^{-5} \text{ mol}}{0,5 \cdot 10^{-3} \text{ L}} = 32,4 \cdot 10^{-2} = 0,32 \text{ mol/L} = 0,3 \text{ M} = 3 \cdot 10^1 \text{ M} = 324 \mu\text{M} : 5 = \boxed{64,8 \mu\text{M}}$$

C [I] stok (20 μL)

0,15 μM

6 μM

0,63

25,2

1,25

50

2,5

100

5

200

10 μM

400 μM

$$324 \mu\text{M} \cdot x = 50 \mu\text{M} \cdot 400 \mu\text{M} \cdot x$$

$$x = 1 \mu\text{L}$$

$$1296 \mu\text{M} \cdot x = 50 \mu\text{L} \cdot 400 \mu\text{M} \quad \checkmark$$

$$x = 15,43 \mu\text{L} \text{ r3opka} + 34,57 \mu\text{L} \text{ boqe}$$

$$400 \mu\text{M} \cdot x = 200 \mu\text{M} \cdot 20 \mu\text{L}$$

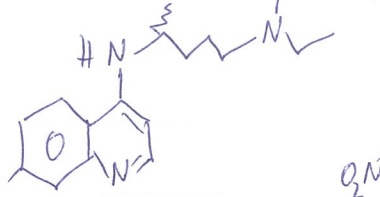
$$x = 10 \mu\text{L} \text{ r3opka} + 10 \mu\text{L} \text{ boqe}$$

$$400 \mu\text{M} \cdot x = 100 \mu\text{M} \cdot 20 \mu\text{L}$$

$$x = 5 \mu\text{L} \text{ r3} + 15 \mu\text{L} \text{ boqe}$$

nyj'cto-chl

N C

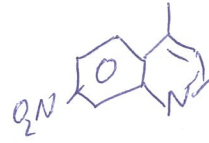


$$M_r = 326,43 \text{ g/mol}$$

унамо ја 9,3 mg

DO301 - crni marker

Huwp'o-chl



$$M_r = 340,42 \text{ g/mol}$$

m = 15,4 mg

AS 24 - zeleni marker

$$64,8 \mu\text{M} \cdot 1 \mu\text{L} = 50 \mu\text{M} \cdot x$$

$$x = 1,296 \mu\text{M} = \boxed{1296 \mu\text{M}} \quad \checkmark \quad 50 \mu\text{L}$$

$$\boxed{400 \mu\text{M}}$$

$$400 \mu\text{M} \cdot x = 50 \mu\text{M} \cdot 20 \mu\text{L}$$

$$x = 2,5 \mu\text{L} \text{ r3} + 17,5 \mu\text{L} \text{ boqe}$$

$$400 \mu\text{M} \cdot x = 25,2 \cdot 20$$

$$x = 1,26 \mu\text{L} \text{ r3} + 13,74 \mu\text{L} \text{ boqe}$$

W Cigano - CQ

$$M_r = 326,43 \text{ g/mol}$$

$$m = 9,3 \text{ mg}$$

$$2,849 \cdot 10^{-5} \text{ mol}$$

~~MILITO~~

Main pro

$$n = \frac{m}{M_r} = \frac{9,3 \cdot 10^{-3} \text{ g}}{326,43 \text{ g/mol}} = 0,00002849 \text{ mol} = 0,028 \text{ mmol}$$

$$c = \frac{n}{V} = \frac{0,028 \text{ mmol}}{0,5 \text{ mL}} = 0,056 \text{ mM}$$

$$V = 0,5 \cdot 10^{-3} \text{ L} = 0,0005 \text{ L}$$

$$c = \frac{0,5 \cdot 10^{-3} \text{ L} \cdot 2,849 \cdot 10^{-5} \text{ mol}}{0,0005 \text{ L}} = 1,42 \cdot 10^{-8} \text{ mol/L} = 1,42 \cdot 10^{-5} \text{ mmol/L} = 0,0000142 \text{ mmol/L}$$

$$c = \frac{n}{V} = \frac{0,028 \text{ mmol}}{0,0005 \text{ L}} = \boxed{56,9 \text{ mM}}$$

0 μM

25,2 μM

50 μM

100 μM

200 μM

400 μM

$$56,9 \text{ mM} \cdot x = 50 \mu\text{L} \cdot x$$

$$x = 1,138 \text{ mL} = 1138 \mu\text{L}$$

$$1138 \mu\text{L} \cdot x = 400 \mu\text{M} \cdot 50 \mu\text{L}$$

$$x = 17,6 \mu\text{L} \text{ g3orka} + 32,4 \mu\text{L} \text{ boga}$$

$$400 \mu\text{M} \cdot x = 200 \mu\text{M} \cdot 20 \mu\text{L}$$

$$x = 10 \mu\text{L} \text{ g3orka} + 10 \mu\text{L} \text{ boga}$$

$$400 \mu\text{M} \cdot x = 100 \mu\text{M} \cdot 20 \mu\text{L}$$

$$x = 5 \mu\text{L} \text{ g3} + 15 \mu\text{L} \text{ boga}$$

$$400 \mu\text{M} \cdot x = 50 \mu\text{M} \cdot 20 \mu\text{L}$$

$$x = 2,5 \mu\text{L} \text{ g3} + 17,5 \mu\text{L} \text{ boga}$$

$$400 \mu\text{M} \cdot x = 25,2 \mu\text{M} \cdot 20 \mu\text{L} \quad x = 1,26 \mu\text{L} \text{ g3} + 18,74 \mu\text{L} \text{ boga}$$

$$400 \mu\text{M} \cdot x = 6 \mu\text{M} \cdot 20 \mu\text{L}$$

$$x = 0,3 \mu\text{L} + 19,7 \mu\text{L} \text{ boga}$$

Nitro - CO

$$M_r = 346,42 \text{ g/mol}$$

$$m = 15,4 \text{ mg}$$

$$88,90 \text{ mM}$$

$$0 \text{ mL} - 0,3 \text{ mL} (400 \text{ mM}) + 19,7 \text{ mL} \text{ боче}$$

$$25,2 - 1,26 (400 \text{ mM}) + 18,74 \text{ mL} \text{ боче}$$

$$50 - 2,5 \text{ mL} (400 \text{ mM}) + 17,5$$

$$100 - 5 \text{ mL} (400 \text{ mM}) + 15$$

$$200 - 10 \text{ mL} + 10 \text{ mL} \text{ боче} (400 \text{ mM} \text{ узорак})$$

400 mM

$$88,9 \text{ mM} \cdot 1 \text{ mL} = x \cdot 50 \text{ mL}$$

$$x = 1778 \text{ mM}$$

$$1778 \text{ mM} \cdot x = 400 \text{ mM} \cdot 50 \text{ mL}$$

$$x = 11,25 \text{ mL} + 38,75 \text{ mL} \text{ боче} \\ \text{узорак} (1778)$$

Маджукцием СагЛ

$$1M = 1000 \text{ mM} \cdot x = 300 \text{ mL} \cdot 0,4 \text{ mM}$$

$$x = 0,12 \text{ mL} = \underline{120 \text{ mL}}$$

Узорак оситам затравкени у фрути

W

Bunarıci # euzum 50 y. qhc
kasıfıyeye 7 ipo min

B₂ KP 200 MLP ✓

B₃ KS 199 P + 1 MLP S

B₄ KE 195 P + 5 E neseçeni

B₅ KE 195 P + 5 E sečen dyali

B₆ E₁ 194 P + 5 E + 1 S - neseçeu

B₇ E₂ 194 P + 5 E + 1 S - seçeu uedij

B₈ E₃ 194 P + 5 E + 1 S - seçeu dipal.

B₉ KP 200 P

B₁₀ KS 199 P + 1 S

B₁₁ KE 195 P + 5 E

Main Pro

C₂ E₁ 194 P + 5 E + 1 S

C₃ E₂ 194 P + 5 E + 1 S

C₄ E₃ 194 P + 5 E + 1 S

C₅ 189 P + 5 I + 5 E + 1 S ✓ } 6

C₆ 189 P + 5 I + 5 E + 1 S } -

C₇ 189 P + 5 I + 5 E + 1 S ✓ } 25,2

C₈ 189 P + 5 I + 5 E + 1 S } -

300

C₉ 189 P + 5 I + 5 E + 1 S ✓ } 50 51

C₁₀ 189 P + 5 I + 5 E + 1 S } - 501

C₁₁ 189 P + 5 I + 5 E + 1 S ✓ } 100

~~D₂~~ 189 P + 5 I + 5 E + 1 S } -

D₃ 189 P + 5 I + 5 E + 1 S ✓ } 200

D₄ 189 P + 5 I + 5 E + 1 S } -

D₅ 189 P + 5 I + 5 E + 1 S ✓ } 400

D₆ 189 P + 5 I + 5 E + 1 S } - 194

D₇ 194 P + 5 I + ~~5 E~~ + ~~1 S~~ } - 189

uz D7 y D6 ripedareno 5 ml

D₈ 189 P + 5 I + 5 E + 1 S ✓ } 6 çpanno 5 ml rıspere

301

D₉ 189 P + 5 I + 5 E + 1 S } -

Main Pro

301

- D₁₀ 189 P + 5 I + 5 E + 1 S } 25, 2 ✓
- D₁₁ 189 P + 5 I + 5 E + 1 S } - ✓
- E₁ 189 P + 5 I + 5 E + 1 S } 50 ✓
- E₂ 189 P + 5 I + 5 E + 1 S } - ✓
- E₃ 189 P + 5 I + 5 E + 1 S } E₄ ✓
- E₄ 189 P + 5 I + 5 E + 1 S } 100 E₅ - ✓
- E₅ 189 P + 5 I + 5 E + 1 S } E₆ ✓
- E₆ 189 P + 5 I + 5 E + 1 S } 200 E₇ - ✓
- E₇ 189 P + 5 I + 5 E + 1 S } E₈ - ✓
- E₈ 189 P + 5 I + 5 E + 1 S } 400 ~~100~~ uema KI E₉ - ✓
- E₉ 194 P + 5 I + ~~5 E~~ + ~~1 S~~ } E₁₀ - ✓
- E₁₁ 189 P + 5 I + 5 E + 1 S } 6 E₁₁ ✓
- F₂ 189 P + 5 I + 5 E + 1 S } 6 F₂ ✓
- F₃ 189 P + 5 I + 5 E + 1 S } 25, 2 24 F₃ ✓
- F₄ 189 P + 5 I + 5 E + 1 S } 25, 2 F₄ ✓
- F₅ 189 P + 5 I + 5 E + 1 S } 50 F₅ - ✓
- F₆ 189 P + 5 I + 5 E + 1 S } 50 F₆ - ✓
- F₇ 189 P + 5 I + 5 E + 1 S } 100 F₇ - ✓
- F₈ 189 P + 5 I + 5 E + 1 S } 100 F₈ - ✓
- F₉ 189 P + 5 I + 5 E + 1 S } 200 F₉ - ✓
- F₁₀ 189 P + 5 I + 5 E + 1 S } 200 F₁₀ - ✓
- F₁₁ 189 P + 5 I + 5 E + 1 S } F₁₁ - ✓
- G₂ 189 P + 5 I + 5 E + 1 S } 400 G₂ - ✓
- G₃ 194 P + 5 I + ~~5 E~~ + ~~1 S~~ } 400 G₃ - ✓

* Sami I ne fluoresciraju.

Samo sečen dijalizovan imaju za Cp
sečen nedijalizovan uema za Cp

nesečen dijalizovan Cp izmereno pre
sečenja

08.12.2021.

Main Pro

B2 KP 200µl P

B3 Ks 199µl P + 1µl S

B4 KE 195µl P + 5µl E (mesečeni)

B5 KE -||- (sečeni, dijalizovan)

B6 E1 194µl P + 5µl E + 1µl S - mesečeni

B7 E2 -||- - sečen nedijalizovan

B8 E3 -||- - sečen dijalizovan

B9 kp 200µl P

B10 Ks 199µl P + 1µl S

B11 KE 195µl P + 5µl E

C2 E1 194µl P + 5µl E + 1µl S

C3 E2 194µl P -||-

C4 E3 194µl P -||-

C5 189 P + 5µl E + 5µl I + 1µl S } 6µM I → 0,15µM fruktanoz

C6 189 P + 5 + 5 + 1

C7 189 P + 5 + 5 + 1

C8 189 P + 5 + 5 + 1

C9 189 P + 5 + 5 + 1

C10 189 P + 5 + 5 + 1

C11 189 P + 5 + 5 + 1

D2 189 P + 5 + 5 + 1

D3 189µl + 5 + 5 + 1

D4 189µl + 5 + 5 + 1

D5 189µl + 5 + 5 + 1µl S

D6 189µl + 5µl + 5µl + 1µl S

D7 194µl + 5µl I

D8 189µl + 5 + 5µl + 1µl S } 6µM I

D9 189µl + 5µl + 5µl + 1µl S

} 25,2µM I → 0,63µM fruktanoz
 } 500µM I → fruktanoz 1,25µM
 } 1000µM I → fruktanoz 2,5µM
 } 200µM I → 5µM
 } 400µM I → 10µM fruktanoz

~~W~~
W

Main
Pro

- D10 189 μ l P + 5 μ l I + 5 μ l E + 1 μ l S } 25,2 μ M
- D11 189 μ l P + 5 μ l + 5 μ l + 1 μ l S } 25,2 μ M
- E2 189 μ l P + 5 + 5 + 1 μ l S } 50 μ M
- E3 189 P + 5 + 5 + 1 μ l S } 50 μ M
- E4 189 P + 5 + 5 + 1 μ l S } 100 μ M
- E5 189 P + 5 μ l + 5 μ l + 1 μ l S } 100 μ M
- E6 189 P + 5 μ l + 5 μ l + 1 μ l S } 200 μ M
- E7 189 μ l P + 5 μ l + 5 μ l + 1 μ l S } 200 μ M
- E8 189 μ l P + 5 μ l + 5 μ l + 1 μ l S } 400 μ M
- E9 189 μ l P + 5 μ l + 5 μ l + 1 μ l S } 400 μ M
- E10 194 μ l P + 5 μ l S }
- E11 189 μ l P + 5 μ l S + 5 μ l E + 1 μ l S } 6 μ M
- F2 189 μ l P + 5 μ l I + 5 μ l E + 1 μ l S } 6 μ M
- F3 189 μ l P + 5 + 5 + 1 μ l S } 25,2 μ M
- F4 189 μ l P + 5 + 5 + 1 μ l S } 25,2 μ M
- F5 189 μ l P + 5 + 5 + 1 μ l S } 50 μ M
- F6 189 μ l P + 5 μ l + 5 μ l + 1 μ l S } 50 μ M
- F7 189 μ l P + 5 + 5 μ l + 1 μ l S } 100 μ M
- F8 189 μ l P + 5 μ l + 5 μ l + 1 μ l S } 100 μ M
- F9 189 μ l P + 5 μ l + 5 μ l + 1 μ l S } 200 μ M
- F10 189 μ l P + 5 μ l + 5 μ l + 1 μ l S } 200 μ M
- F11 189 μ l P + 5 + 5 + 1 μ l S } 200 μ M
- G2 189 μ l P + 5 + 5 + 1 μ l S } 400 μ M
- G3 194 μ l P + 5 μ l I }

9.12.2021.

Трекотојната Шаски, у 20ml LB (5ml пош) и на 37°C.
Уради ми #PLC; дијагноза инфламација (го измери мутера)

3 мутера

10mM имидазол-сидимор и неволати, мутера се до - брег

100mM -||-

500mM -||-

мој елази у FT и у неволатим

За му те догајет NaCl

Дијагноза на мутерам 50mM NaCl pH 7,5

У мутерам догајет 10mM имидазол

Измери ми A^{280} и брегфорда.

Пресрајет на све мутерам Gal и Glu1 (LB Amp)

$$A^{280} = 0,164$$

Bredford 20μl у 200μl

$$0,218 \quad 0,210 \quad 0,210 \quad SP - 0,191$$

$$y = 0,2308x + 0,0066$$

20μl у 200μl

$$y = 1,223x - 0,0017$$

мутера

$$0,212 - 0,191 = 0,021$$

$$y = 0,021$$

$$\frac{0,021 + 0,0017}{1,223} = x$$

$$x = 0,018 \text{ mg/ml}$$

$$0,018 \text{ mg} - 1 \text{ ml} \quad x = 0,24 \text{ mg}$$

$$x - 157 \text{ ml}$$

e

Ha 20 mg - 50 ml HRV3C 20h

mg/ml = g/L

$$0,24 - x$$

$$x = 0,61 \text{ ml HRV3C 20h}$$

8531

0,0083 SP

4839

$$* \epsilon = 255470 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} = 255,47 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$A = \epsilon \cdot b \cdot c$$

$$0,164 - 0,0083 = 0,1557 \cdot 13,7 \text{ ml} \cdot A = 2,13309$$

$$0,1557 = 255,47 \cdot 1 \cdot x$$

$$x = \frac{0,1557 \cdot 13,7 \text{ ml}}{255,47} = 0,0094 \text{ mg} / 13,7 \text{ ml}$$

$$x = \frac{0,1557 \text{ ml/ml} \cdot 1 \text{ cm}}{255,47 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}} = \frac{0,1557 \text{ g/L}}{255,47 \text{ (mol/L)}^{-1}} = \frac{\text{mol}}{\text{L}}$$

$$\epsilon = 255,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$A = \epsilon \cdot b \cdot c$$

$$0,1557 = 255,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1} \cdot 1 \text{ cm} \cdot c \text{ (mol/L)}$$

$$0,1557 = 255,4 \text{ mM}^{-1} \cdot c \text{ mM}$$

$$c = \frac{0,1557}{255,4} = 0,0006 \text{ mM} = \frac{\text{mmol}}{\text{L}}$$

$$0,0006 \cdot 135 \text{ g/mol} = 0,081 \text{ g/L} \cdot 13,7 \text{ ml} = 1,12$$

$$\frac{0,0006 \cdot 10^{-3} \text{ mol}}{0,0006 \text{ mmol/L}} \cdot \frac{135000 \text{ g/mol}}{\text{g/mol}} = 0,081 \text{ g/L}$$

$$= 0,081 \text{ mg/ml}$$

kDa

10kDa

✓ Проверено скитубнэци Е тре серена GST мата.

100ul P 100ml NaP pH 7

200ul S 3,6 ml/ml

200ul E

GII oh 0,067

1h 0,068

GK 0,071 oh

0,254 1h

- 245

- 180

- 135

- 100

- creux 75

- 63

- 48

35

- zelex 25

- 20

- 17

- 11

Glu II

+ kwasae

0,50, 150, 200ml

DNI

DNI - hkih



3a sada I

Тестирање узата саф кој и α-βи кбасој

20μl узата
20μl I
20μl S
140μl P

10μl рачуној E
20μl I
20μl S
180μl P

u

KS

20μl S
20μl I
160μl P

~~KE~~

~~20μl E
20μl S
160μl P~~

KI

20μl I
20μl E
160μl P

KI₂

20μl I
20μl S
160μl P

Kontrola E

L₁P?

15.12.2021.

Потврени инхибиције (тврди митохондри)

0μM DNJ и нb DNJ

50μM

150μM

200μM

20μl I у 200μl смеси 10×R

500μM

1500μM

2000μM

DNJ - 2000μM мена

нb DNJ - 2000μM мена

$$2000\mu\text{M} \cdot x = 100\mu\text{M} \cdot 1500$$

$$76\mu\text{l} \text{ узорка} + 24\mu\text{l} \text{ боче (75+25)}$$

$$2000 \cdot x = 100 \cdot 500$$

$$x = 25\mu\text{l} \text{ узорка} + 75\mu\text{l} \text{ боче}$$

∅ 160μl P + 20μl ~~E~~ + 20μl S

I 140μl P + 20μl E + 20μl I + 20μl S

15.12.2021.

Потврдио ЕФ за фракције које смо проузгнели на His-калони (кодеј)
Ставимо на Тел:

М, пре хроматографије, ФТ, N1-N5, V1+V4, V8, V12
↓
након HPLCа 10мМ млијека 100мМ
после дигестије

Поставили рју

200μl S

200μl E → након HPLC, дигестије у млијеку / и без млијека / и сл.

100μl P

0h 200μl + 100μl дикарбоната

SP - 0,281 ~~1~~ 100μl смеше + 100μl дикарбоната

узорак дијализован - 0,325 ⇒ 0,325

SP - 0,332

100μl смеше + 200μl дикарбоната

узорак дијализован - 0,374

~~200,904~~

W

12¹³ 13⁰⁶

- Km u Vmax za usat u za empty cej
- Usat og Omel go 50mM

21. 12. 2021.

10ml nepokrovene y 300ml LB Safl-Glu II

UHGykyja 0.4mM
T = 22°C 18h

50mM NaP

V = 100ml

Mr = 138g/mol

$$c = \frac{n}{V} \quad n = c \cdot V \Rightarrow 50 \cdot 10^{-3} \cdot 0,1 = 5 \cdot 10^{-3} \text{ mol}$$

$$n = \frac{m}{Mr} \Rightarrow m = 5 \cdot 10^{-3} \cdot 138 = 0,69 \text{ g}$$

100mM NaP

UHXWbWtopu 0mM, 5, 10, 25, 50mM

pNPG 3,6mg/ml

0,2 Km - 5 Km

0,1 · 10 = 1mM

- 0,5mM PNP -

0,2 ; 0,5 ; 1 ; 2, 3, 4, 5 Km

↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓

0,1mM 0,25 0,5 1 1,5 2 2,5

c = 1mM 2,5 5 10 15 20 25mM 20ul y 200ul R = 10
pNPG

Mr = 301g/mol

V = 0,5ml

$$c = \frac{n}{V} \quad n = 1 \text{ mM} \cdot 0,5 \text{ ml} = 5 \cdot 10^{-7} \text{ mol}$$

$$n = 1 \cdot 10^{-3} \text{ M} \cdot 0,5 \cdot 10^{-3} = 0,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \Rightarrow n = \frac{m}{M} \quad m = 0,5 \cdot 10^{-6} \cdot 301 = 150,5 \cdot 10^{-6} = 0,15 \text{ mg}$$

0,75mg

0,15mg

$$C = 2,5 \text{ mM}$$

$$V = 0,5 \text{ ml}$$

$$C = \frac{n}{V} \quad n = 2,5 \cdot 10^{-3} \cdot 0,5 \cdot 10^{-3} = 0,75 \text{ mp}$$

Рецепт за K_m и V_{max}

20 μl S

40 μl E

140 μl P

SP - 160 μl P

40 μl E

A1 - lysate 6th strutte

B1 - lysate strutte empty cells

Ухудшеније
DNJ и уб-DNJ

0 μM

5 μM

10 μM

25 μM

50 μM

120 μl Putera

40 μl E

20 μl I

20 μl S

10x R

SP

40 μl E

20 μl S

140 μl P

50 μM

100 μM

250 μM

500 μM

0g ебаног I = 100 μl

управо DNJ

$$1750 \mu\text{M} \cdot x = \frac{300}{500} \mu\text{l} \cdot 500 \mu\text{M}$$

$$x =$$

$$2000 \mu\text{M} \cdot x = 500 \mu\text{M} \cdot 0,5 \text{ mL}$$

$$x = 125 \mu\text{l} \text{ узорак} + 375 \mu\text{l} \text{ бозе}$$

$$500 \mu\text{M} \cdot x = 250 \cdot 0,5 \text{ mL}$$

$$x = 250 \mu\text{l} \text{ узорак} + 250 \mu\text{l} \text{ бозе}$$

$$250 \mu\text{M} \cdot x = 100 \cdot 0,5$$

$$x = 200 \mu\text{l} \text{ узорак} + 300 \mu\text{l} \text{ бозе}$$

$$100 \cdot x = 50 \cdot 0,5$$

$$x = 250 \mu\text{l} + 250 \mu\text{l}$$

w
humana gal

Received : 28.12.2021

Stavljeno u Roze kutiju Aleksandra (-80°C)

1



$89 \mu\text{l}$ y $200 \mu\text{l}$ $R = 22,47 / (22,5 \times)$

$V =$

$C = 0,1 \text{ mM}$ $M_r = 416,51$

~~$C = 0,1 \text{ mM}$~~ ^{more: 2} $25 \text{ mg/ml} \rightarrow 25 \text{ g/L} \rightarrow \text{mol}$

$0,06 \text{ M} = 60 \text{ mM}$



$C = 22,5 \cdot 10^{-3}$

$V = 100 \mu\text{l} = 0,1 \text{ ml} = 0,0001 \text{ L}$

$C = \frac{n}{V}$ $n =$

$C = 100 \text{ mM}$

$V = 100 \mu\text{l} = 0,0001 \text{ L}$

$M_r = 149,21$

NAD

$C = \frac{n}{V}$ $n = 1,49 \text{ mg}$

$C = 0,8 \text{ mM} = 0,8 \cdot 10^{-3}$

$V = 5 \mu\text{l}$

$C = \frac{n}{V}$ $n = 0,8 \cdot 10^{-3} \cdot 2 \cdot 10^{-3}$

$= 1,6 \cdot 10^{-6} \cdot 244,31 = 0,39 \text{ mg}$

$\frac{0,4 \text{ mg}}{1} = \boxed{1 \text{ mg}}$ *дополнительно*

$V = 100 \mu\text{l} = 0,0001 \text{ L}$

$C = 22,5 \text{ mM} = 22,5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$

$C = \frac{n}{V}$ $n = 22,5 \cdot 10^{-3} \cdot 0,0001 \cdot 468,96$

$n = 0,001 \text{ g}$

$\boxed{= 1,05 \text{ mg}}$ *дополнительно*



Linezolid
 1,5 - 100µl
 1,6 - x
 x = 106,6µl

Ramipril
 1 - 100µl
 1,2 - x
 x = 120µl

~~1,1~~

himeu
 1 - 100
 1,8 - x

A 10' 2,3

D 0' 2

αGalaktozidaza

W

20µg y Tris/KCl
 45-55 kDa

Антирапидра:

- 2mM S (RP)
- 50mM citrat, 176mM K₂PO₄ и 0,01% Tween 20 pH 5,9
- 1mM E
- Stop 0,5M NaOH и 0,5M glicin pH 11,6

*

Есеј за αGal → 160µl P
 → 20µl S
 → 20µl E 10x 1µg

→ 37°C парилни на топе

→ Буфер Na-цифрат-фосфат (пипутока) pH 4.5 100mM

→ 0,1 µg E фронтално

→ ~~1~~ mM S фронтално

за гудерма 2,2 mM KCl

0'
 30'
 60'

1µl ga разбавувамо до 6µl

15µl згуста смеша (амбуот) + 135µl
 и гогарин 1µl 2, 3µl
 STOP
 Buffer

W

Есеј за α-Gal

14. јануар

→ Има 25 mL штока

Узели 1 mL E и разблажили до 5 mL (или по 6 mL) *

Буфер 100 mL NaP-цивирање pH 4.5

E разблажили у буферу

S (* 0,5 mL pNPGal) 40 mM

100 mL

1 mL E, 10 mL S, 89 mL P pH 4.5

Узимами 0' по 15 mL и мешаји са 135 mL 400 mM Na₂CO₃
30'
60'

$$\lambda = 405 \text{ nm}$$

$$\epsilon = 18,1$$

Mr = 301 g/mol за pNPGal

Како рачунају R?

$$40 \text{ mM} = \frac{n}{V} \quad n = 40 \cdot 10^{-3} \cdot 0,5 \cdot 10^{-3}$$

$$n = 20 \cdot 10^{-6}$$

$$n = \frac{m}{Mr} \quad m = 20 \cdot 10^{-6} \cdot 301$$

$$m = 6020 \cdot 10^{-6}$$

$$m = 0,006 \text{ g} = 6 \mu\text{g S}$$

или 3 μg у 250 mL буфера

$$2,7 - x$$

$$x = 225 \mu\text{L буфера}$$

$$9 \mu\text{g} - 750 \mu\text{L}$$

pH 4,4-4,6

0,2 M Na₂HPO₄ 8,82 mL

0,1 M лимунска 12 mL Mr = 210,14 g/mol

Mr = 105,99 (Na₂CO₃)

Na₂HPO₄ · 12H₂O Mr = 358,14 g/mol



лимунока

$C = 0,1 M$

$V = 50 ml$

$C = \frac{n}{V} \quad n = 50 \cdot 10^{-3} \cdot 0,1 = 5 \cdot 10^{-3} mol$

$n = \frac{m}{Mr} \quad m = 5 \cdot 10^{-3} \cdot 210,14 = \boxed{1,05 g}$

44
✓

карбонат

$C = 0,4 M$

$V = 0,1$

$C = \frac{n}{V} \quad n = 0,4 \cdot 0,1 \Rightarrow m = 0,4 \cdot 0,1 \cdot 105,99 = \boxed{4,2 g}$

Na₂HPO₄ · 12H₂O

$V = 50 ml$

$C = 0,2 M$

$C = \frac{n}{V} \quad n = 0,2 \cdot 50 \cdot 10^{-3} = 10 \cdot 10^{-3} = 0,01 mol$

$n = \frac{m}{Mr} \quad m = 0,01 \cdot 358,14 = \boxed{3,5814 g}$

Na₂HPO₄

$Mr = 141,96 g/mol$

$C = 0,2 M \quad V = 50 ml$

$C = \frac{n}{V} \Rightarrow n = C \cdot V = 0,2 \cdot 50 \cdot 10^{-3}$

$m = 141,96 \cdot 0,2 \cdot 50 \cdot 10^{-3}$

$m = \boxed{1,41 g}$

- * E₁
- 1 ml E
- 10 ml S
- 89 ml P

- * E₂
- 3 ml E
- 10 ml S
- 87 ml P

- * SP
- 10 ml S
- 90 ml P

$Mr_{12H_2O} : X = Mr_{Na_2HPO_4} : 3,58$

$141 : X = 358 : 3,58$

$X =$

Рафetto у HPLC коди на температураху, та 37 °C

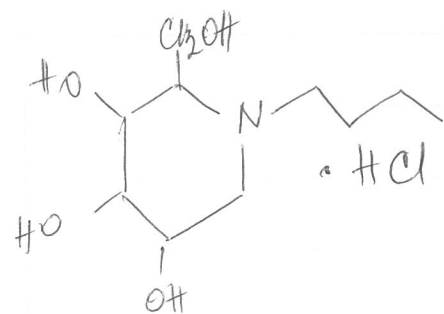
14.1.2021.

W

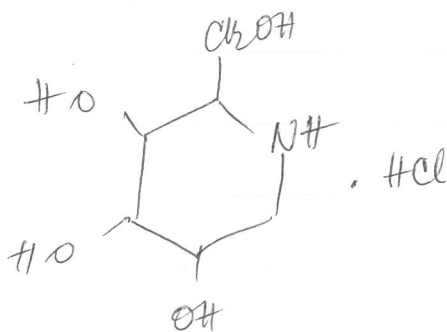
α -Galaktozidaza
(komercijalna)

Aktivnost ✓

n-butil DNJ



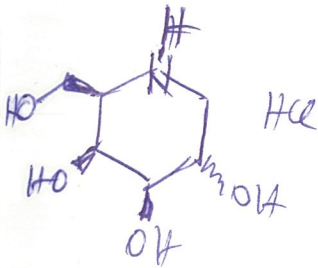
DNJ



17. jattzap 2022.

MIT 1055

u



$m = 1.37 \text{ mg}$
 $mw = 199.63$



Migalostat

$1 \mu\text{M}$ u $10 \mu\text{M}$

Rad:

α -Gal - cyclophellitol cyclosulfamide is a Michaelis complex analog that stabilizes therapeutic lysosomal α -gal A in Fabry disease

Nereno sa metilbiferil

\bullet $IC_{50} (\mu\text{M})$ $0,079 \pm 0,005$

konstanta I $K_i = 0,23 \mu\text{M}$

* $1 \mu\text{M}$ u $10 \mu\text{M}$

$0 \mu\text{M}$,

$0,5 K_i$ do $8 K_i$

Brenda (Rad)

* $0,5 \cdot 0,23 = 0,115 \mu\text{M}$ *фриварно*
 $8 \cdot 0,23 = 1,84 \mu\text{M}$ *фриварно*

DGI 0, 50, 100 u 200 nM
 K_i 38 nM 0,038 μM

$0,1 \mu\text{M}$; $1 \mu\text{M}$ u $10 \mu\text{M}$ I

ctrl f

W

0', 10', 30', 60'

Узетин 1μl E и раздратуми по 5μl

Турдер pH 4,5 направуми узетин

E раздратуми у турдеру

S (* ~~0,5M~~ 40mM направуми 400

SP(E+I) 1μl E, 10μl (I), 89μl

Blank 1μl E, 10μl S, 89μl P

опитанно

1 - 0,1μM I (1μl) 1μl E, 10μl S, 10μl I, 79μl

2 - 1μM I (10μl)

3 - 10μM I (100μl)

$6,7 \cdot 10^{-6} \text{ mol}$

M=199,63g

$1,34 \mu\text{g } 100\mu\text{l} = 0,0134 \mu\text{g}/\mu\text{l}$

$c = 13,4 \mu\text{g}/\mu\text{l}$

$6,7 \cdot 10^{-8} \text{ mol}/\mu\text{L}$

Mr=199,63 g/mol

$6,7 \cdot 10^{-2} \text{ mol}/\text{L}$

$\frac{13,4 \mu\text{g}}{199,63 \cdot 10^6 \mu\text{g}}$

$0,067 \cdot 10^{-6} \text{ mol}/\mu\text{l}$

$x = 10^6 \text{ L}$

$0,067 \text{ M} = 67 \mu\text{M} = 67000 \mu\text{M}$

I (10xR)

6700μM (у 1μl) боге!

~~1000~~ $\frac{100 \mu\text{M}}$

$1,5 \mu\text{l} + 98,5 \mu\text{l} \text{ P}$

$\frac{10 \mu\text{M}}$

$10 \mu\text{l} + 90 \mu\text{l} \text{ P}$

$\frac{1 \mu\text{M}}$

$10 \mu\text{l} + 90 \mu\text{l} \text{ P}$

$6,7 \cdot 10^{-6} \text{ mol} - \text{u } 1 \text{ L}$

$6,7 \cdot 10^{-6} \text{ M}$

$6,7 \cdot 10^{-9} \text{ M}$

$$1,34 \cdot 10^{-3} \text{ mg/ml} : 199,63 \frac{\text{g}}{\text{mol}} = 0,0067$$

$$1,34 \cdot 10^{-3} \frac{\text{g}}{\text{ml}} \cdot \frac{1}{199,63 \frac{\text{g}}{\text{mol}}} = 0,0000067 \text{ mol/ml}$$

$$0,0000067 \text{ mol} / 10^{-3} \text{ L}$$

$$x - 1 \text{ L}$$

$$x =$$

2

$$1,34 \text{ mg/ml}$$

$$M_r = 199,63 \text{ g/mol}$$

$$\text{mol/L}$$

$$1,34 \cdot 10^{-3} \text{ g} - 1 \text{ ml}$$

$$x \text{ g} - 1 \text{ L}$$

$$x = 1,34 \text{ g/L}$$

$$199,63$$

$$c = \frac{n}{V} \Rightarrow n = \frac{m}{M} \quad m = \frac{1,34}{199,63} = 0,0067 \text{ mola}$$
$$6700 \mu\text{M}$$

E, P, I - 5'

gogabare S ta upayu y HPLC code

Matydayuj'a ta 37°C

$$13,1 - x$$

$$3 - 250 \mu\text{l}$$

$$x = 109 \mu\text{l}$$

W

$c [I] \mu M$

Methyl groups MW 213,6580 (~~мг/мл~~ ^{честота})

Lezokau (upbu) MW 183,6320

- DGS

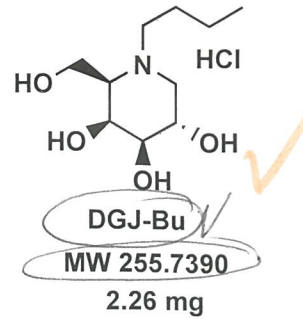
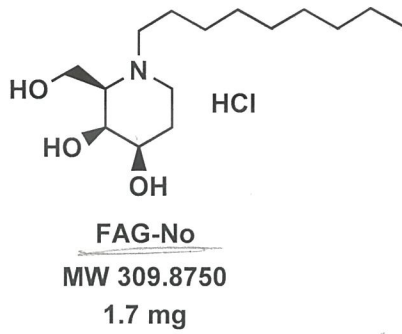
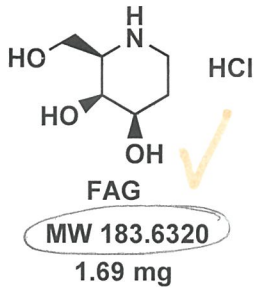
dyuau MW = 255,7390

0,1 1 10 100

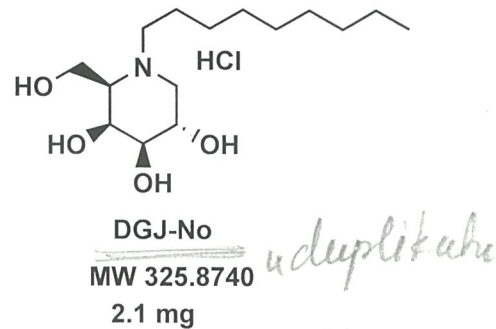
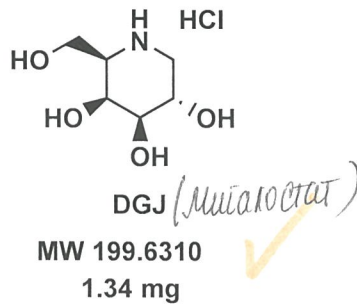
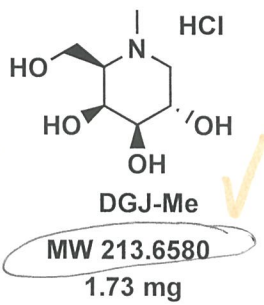
0,1; 0,2; 1; 10; 100 μM



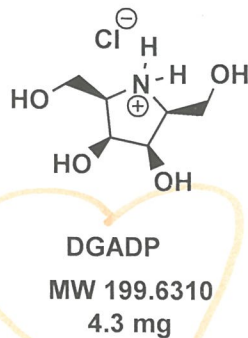
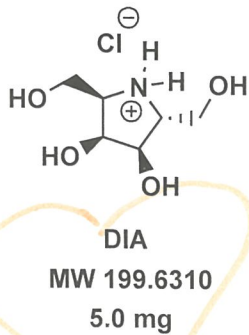
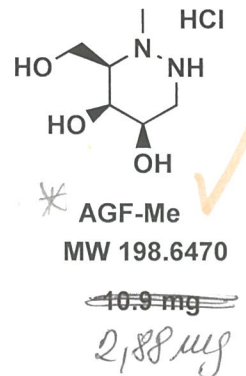
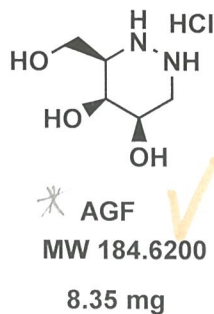
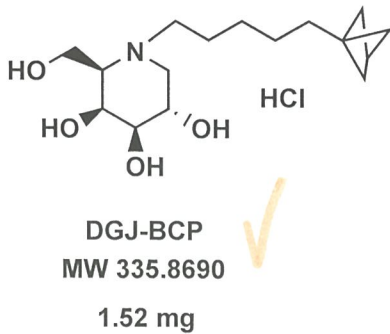
Figure 1: Galactosidase A inhibitors



2x 10 u 100 μM



10 u 100 μM



19.01.2021.

U

0 μM 0,1 μM 0,2 μM 1 μM 10 μM 100 μM

S y μz фepу 3 - 250 μl
3,2 mg - x x = 266,6

1) Ишарасишати

1 ~~0,1~~ μl E } 0 μM
10 μl S (40 μM) } + коншурола
89,5 μl P }

Раздроктукеро E y шипариз
10x

2 μl E + 18 μl P

Ишфep 4,498

0 0,05 0,1 0,2 1 10 μM

100 μM

1,5 μl (6700 μM) + 98,5 μl P

10 μM

10 μl + 90 μl P

2 μM

20 μl + 80 μl P

1 μM

30 μl + 70 μl P

0,5 μM

20 + 20 μl

0,5 μl E }
10 μl S } за обе I
10 μl I }
79,5 μl P }

Ирба 3 джара: 1 μl E, 10 μl S, 89 μl ишфepу

Ошари джари: 1 μl E, 10 μl S, 10 μl I, 79 μl ишфepу

W

100% + 10%

2) **FAG**

5 μl E y 50 μl uždere!

Mw = 183,6320

m = 1,69 mg

- 0 μM
- 0,1 μM
- 0,2 μM
- 1 μM
- 10 μM
- 100 μM

∅ 1 μl E, 10 μl S, 89 μl P
 ostali 1 μl E, 10 μl S, 10 μl I, 79 μl P

Rastvorimur y vodu (1 ml) u godija ce 9200 μM.

$$9200 \mu\text{M} \cdot x = \underline{1000 \mu\text{M}} \cdot 100 \mu\text{l}$$

$$x = \del{10,87} 10,87 \mu\text{l uizorka} + 89,13$$

$$10,9 \mu\text{l uizorka} + 89,1 \mu\text{l uždere}$$

100 μM

10 μl uizorka (1000 μM) + 90 μl uždere

10 μM

10 μl (1000 μM) + 90 μl uždere

2 μM

20 μl (10 μM) + 80 μl uždere

1 μM

20 μl (2 μM) + 20 μl uždere

3) DGJ-Bu

MW 255,7390

m = 2,26 мг

Растворим в 1 мл вода! Зодуца се 8837 μM .

1000 μM

$$8837 \cdot x = 1000 \cdot 100$$

$$x = 11,3 \text{ мл вода} + 88,7 \text{ мл буфера}$$

100 μM

10 мл (уз) + 90 мл буфера
↓
1000 μM

10 μM

10 мл (узорак 100 μM) + 90 мл буфера

2 μM

20 мл (узорак 10 μM) + 80 мл буфера

1 μM

20 мл (2 μM) + 20 мл буфера

W

4) **DGJ-Me**

$$M_r = 213,6580$$

$$m = 1,73 \text{ мг}$$

Растворим в 1 мл воды \rightarrow 8100 μM .

1000 μM

$$8100 \mu\text{M} \cdot x = 1000 \mu\text{M} \cdot 100 \mu\text{l}$$

$$x = 12,3 \mu\text{l} \text{ образца (8100 } \mu\text{M)} + 87,7 \mu\text{l} \text{ воды}$$

100 μM

$$10 \mu\text{l (1000 } \mu\text{M)} + 90 \mu\text{l} \text{ воды}$$

10 μM

$$10 \mu\text{l (100 } \mu\text{M)} + 90 \mu\text{l} \text{ воды}$$

2 μM

$$20 \mu\text{l (10 } \mu\text{M)} + 80 \mu\text{l} \text{ воды}$$

1 μM

$$20 \mu\text{l (2 } \mu\text{M)} + 20 \mu\text{l} \text{ воды}$$

Потребности за 0.1 μM

0 μM	5xRE (1 μl)	1 μl E, 10 μl S, 89 μl P u	1 μl E, 10 μl I, 10 μl S, 79
0 μM	10xRE (2 μl)	2 μl E, 10 μl S, 88 μl P u	2 μl E, 10 μl I, 10 μl S, 78 μl

5) DGJ-BCP

$$M_R = 335.869 \text{ g/mol}$$

$$m = 1.52 \text{ mg}$$

Растворили в 1 mL воды \rightarrow 4526 μM

1000 μM

$$4526 \mu\text{M} \cdot x = 1000 \mu\text{M} \cdot 100 \mu\text{L}$$

$$x = 22 \mu\text{L} (4526 \mu\text{M}) + 78 \mu\text{L} \text{ \u0443\u0447\u0441}$$

100

$$10 \mu\text{L} (1000 \mu\text{M}) + 90 \mu\text{L} \text{ \u0443\u0447\u0441}$$

10

$$10 \mu\text{L} (100 \mu\text{M}) + 90 \mu\text{L} \text{ \u0443\u0447\u0441}$$

2

$$20 \mu\text{L} (10 \mu\text{M}) + 80 \mu\text{L} \text{ \u0443\u0447\u0441}$$

1

$$20 \mu\text{L} (2 \mu\text{M}) + 20 \mu\text{L} \text{ \u0443\u0447\u0441}$$

6) AGF

$$M_R = 184.62$$

$$m = 8.35 \text{ mg}$$

$$V = 1 \text{ ml боче}$$

$$c = 44\,957 \mu\text{M} \quad 45\,228,036$$

1) 1000 μM

$$\frac{44\,957}{45\,228} \cdot x = 100 \mu\text{l} \cdot 1000 \mu\text{M}$$

$$\underline{2,22 \mu\text{l (микрока)}} + 97,8 \mu\text{l пугфера}$$

2) 100 μM

$$10 \mu\text{l (1000 } \mu\text{M)} + 90 \mu\text{l пугфера}$$

3) 10 μM

$$10 \mu\text{l (100 } \mu\text{M)} + 90 \mu\text{l пугфера}$$

4) 2 μM

$$20 \mu\text{l (10 } \mu\text{M)} + 80 \mu\text{l пугфера}$$

5) 1 μM

$$20 \mu\text{l (2 } \mu\text{M)} + 20 \mu\text{l пугфера}$$

7) AGF-Me

Mr 198.647

$$m = 2,88 \text{ mg}$$

$$V = 1 \text{ ml} \text{ боче}$$

$$C = 14\,498 \mu\text{M}$$

1) 1000 μM

$$14\,498 \cdot x = 1000 \cdot 100 \mu\text{l}$$

$$x = 6,9 \mu\text{l} \text{ узорка мидола} + 93,1 \mu\text{l} \text{ пусфера}$$

7 μl + 93

2) 100 μM

$$10 \mu\text{l} (1000 \mu\text{M}) + 90 \mu\text{l} (\text{пусфера})$$

3) 10 μM

$$10 (100 \mu\text{M}) + 90 \mu\text{l} \text{ пусфера}$$

4) 2 μM

$$20 \mu\text{l} (10 \mu\text{M}) + 80 \mu\text{l} \text{ пусфера}$$

5) 1 μM

$$20 \mu\text{l} (2 \mu\text{M}) + 20 \mu\text{l} \text{ пусфера}$$

1 μ l E, 10 μ l S, 89 μ l P

1 μ l E, 10 μ l S, 10 μ l I, 79 μ l P

21. 1. 2022.

8) DIA

$$M_w = 199,6310$$

$$m = 5 \text{ } \mu\text{g}$$

Растворити у 1 μ l \rightarrow 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l} \rightarrow$ 5 g/L

$$c = 25\,046,2 \text{ } \mu\text{M}$$

1) 1000 μ M

$$25\,046,2 \cdot x = 100 \cdot 1000$$

$$x = 4 \text{ } \mu\text{l (миліка)} + 96 \text{ } \mu\text{l піщера}$$

2) 100 μ M

$$10 \text{ } \mu\text{l (1000 } \mu\text{M)} + 90 \text{ } \mu\text{l піщера}$$

3) 10 μ M

$$10 \text{ (1000 } \mu\text{M)} + 90 \text{ } \mu\text{l піщера}$$

4) 2 μ M

$$20 \text{ } \mu\text{l (10 } \mu\text{M)} + 80 \text{ } \mu\text{l піщера}$$

5) 1 μ M

$$20 \text{ } \mu\text{l (2 } \mu\text{M)} + 20 \text{ } \mu\text{l піщера}$$

Піщера 12 μ l милька
8,8 Na_2HPO_4

$$12 - 8,8$$

$$8,5 - x$$

$$x = 6,2 \text{ } \mu\text{l } \text{Na}_2\text{HPO}_4$$

✓

g) DGADP

$$M_r = 199,631$$

$$m = 4,3 \text{ mg}$$

Рациборундз ы 1ml бoгe → 4,3 g/L

$$c = \frac{4,3}{199,631} = 21\,539,7 \mu\text{M}$$

1) 1000 μM

$$21\,539,7 \cdot x = 100 \mu\text{l} - 1000 \mu\text{M}$$

$$x = 4,6 \mu\text{l} \text{ стока} + \frac{95,4 \mu\text{l} \text{ илгeрeрa}}{95,5}$$

2) 100 μM

$$10 \mu\text{l} (1000 \mu\text{M}) + 90 \mu\text{l} \text{ илгeрeрa}$$

3) 10 μM

$$10 (100 \mu\text{M}) + 90 \mu\text{l} \text{ илгeрeрa}$$

4) 2 μM

$$20 \mu\text{l} (10 \mu\text{M}) + 80 \mu\text{l} \text{ илгeрeрa}$$

5) 1 μM

$$20 \mu\text{l} (2 \mu\text{M}) + 20 \mu\text{l} \text{ илгeрeрa}$$

$$3 \text{ mg} - 280 \mu\text{l} \text{ илгeрeрa}$$

$$6,9 - x$$

$$x = 575 \mu\text{l}$$



10

10) FAG - No

$$MW = 309,87$$

$$m = 1,7 \text{ mg}$$

$$V = 1 \text{ mL}$$

$$1,7 \text{ g/L}$$

$$C = 5486,17 \mu\text{M}$$

1) 1000 μM

$$5486,17 \cdot x = 1000 \mu\text{M} \cdot 100 \mu\text{L}$$

$$x = 18,2 \mu\text{L} + 81,8 \mu\text{L} \text{ тэсрер}$$

2) 100 μM

$$1000 \mu\text{M} \cdot x = 100 \cdot 100$$

$$x = 10 \mu\text{L} \text{ узорак} + 90 \mu\text{L} \text{ тэсрер}$$

89
10
1

79

11) DGJ-No

W

$$M_r = 325,874 \text{ g/mol}$$

$$m = 2,1 \text{ mg y 1 ml bage} \Rightarrow 2,1 \text{ g/L}$$

$$C = 444,2 \mu\text{M}$$

1) 1000 μM

$$C_{444,2} \cdot x = 1000 \cdot 100$$

$$x = 15,5 \mu\text{l} + 84,5 \mu\text{l} \text{ \u00e4tzbera}$$

2) 100 μM

$$10 \mu\text{l (1000 } \mu\text{M)} + 90 \mu\text{l } \text{\u00e4tzbera}$$

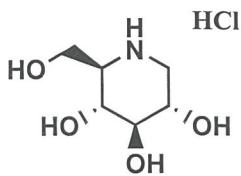
y 9,5 $\mu\text{l E}$ rogann 2 μl \u00e4tzbera

α -Глюкозидаза II

ce

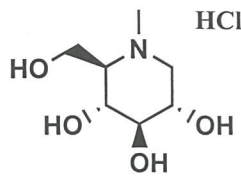
Интибитори:

Figure 2: α -Glucosidase inhibitors

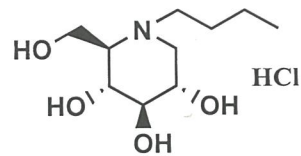


DNJ
MW 199.6310

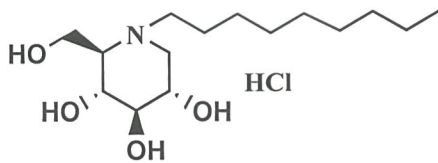
Деооксијуримидин



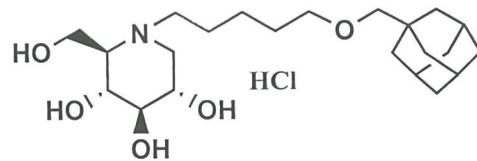
DNJ-Me
MW 213.6580
1.55 mg + 8.27 mg



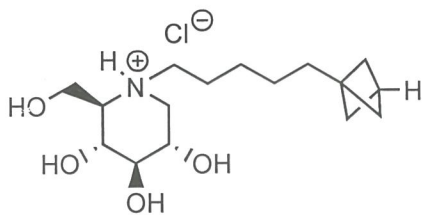
DNJ-Bu
MW 255.7390



DNJ-No
MW 325.8740



DNJ-Ad
MW 434.0140
1.61 mg + 11.56 mg



DNJ-BCP
MW 335.8690
25 mg (98.5%)

Раставарају се у води

Ранг TOP-DNJ :

$50 \mu\text{M}$ - 10 DNJ

$10 \mu\text{M}$ - 13 w/DNJ

$$\left. \begin{array}{l} 2,3 \mu\text{g} - x \\ 3 \mu\text{g} - 1 \mu\text{ml} \end{array} \right\} x = 0,76 \mu\text{ml}$$

✓

160 μl P
20 μl S
20 μl E
1 μl

50 μg je učitano, y 200 μl ~~#4~~,
= 0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

1 μl E
20 μl S (3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
179 μl P

0' 0,062
30' 0,046
60' 0,048

3 $\mu\text{g}/\mu\text{l} \Rightarrow 3:1000$

$M_r \sim 300$

$3:301 = 0,0099 \text{ mol y } 1 \mu\text{l L}$

$:1000$

~~996 $\mu\text{mol/L}$~~ $\sim 0,09$

~~10 $\mu\text{mol/L}$~~

$\sim 10 \mu\text{M}$

$R \times 10$ 20 μl S y 200 μl

1 μM

β -cydjeritacija ne papu sa PNP6 (pap 15h)

28. janyar 2022.

✓

10 mM u 5 mM pNPG

$$V = 0,5 \text{ ml}$$

$$c = 10 \text{ mM}, V = 0,5 \text{ ml}$$

$$c = \frac{n}{V}$$

$$n = c \cdot V = 10^{-3} \cdot 10 \cdot 0,5$$

$$n = 5 \cdot 10^{-3} \text{ mol}$$

$$n = \frac{m}{M_r} \quad m = 5 \cdot 10^{-3} \cdot 301 = 1505 \cdot 10^{-3} \text{ g}$$

$$m = 1,5 \text{ mg}$$

2 μl ta 100 μl suwe

~~88~~ μl suwe 100 mM \rightarrow 88

10 ~~10~~ μl S \rightarrow 10

2 μl E \rightarrow 2 μl E

R x 10 (S)

5 mM fruktanoz

50 mM

$$c = \frac{n}{V} \quad n = 50 \cdot 10^{-3} \cdot 5 \cdot 10^{-3} = 250 \cdot 10^{-6}$$

$$n = \frac{m}{M_r} \quad m = 250 \cdot 10^{-6} \cdot 301 = 75250 \cdot 10^{-6} \text{ g}$$
$$= 75 \text{ mg}$$

250 μl

$$\boxed{125 \mu\text{l}} \text{ S} \rightarrow 75 : 4 =$$

$$18,75 \text{ mg} - 125 \mu\text{l}$$

$$22,75 - x$$

$$x = 151,6 \mu\text{l} \text{ suwe}$$

12³⁸

NTD - проект

1.2.2022.

U

Производња у Filiji Pastoris

Клонирање са EcoRI и NotI у pPic (лиако је квалитет)

?
Застава на 100μL (4x ↓ него Amp)

100 μg/ml 25 μL

Кам (100 μg/ml) 25 μL

2.2.2022.

Трансформација NTD-рфк - у хл10

αGlu2 - II - у шаски

αGlu-квасац

NTD

Мерење цри ↓ и ↑ саис S.M. одга индигу Кам!
Линат Главука - докидораит!

2x Кам ↓ и 5x Кам ↑

у 3ml (8-10 IU) микролит

αGlu2 и ~~REP~~ NTD

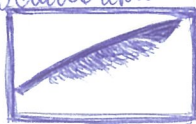
у Негеуоу бехе сејакс (LB мичи)

Потеревак: Пресејаване Glu2 и NTD изабаване (лину. мик)

Цитрах: Фила, Лица, HPLC Glu2, фореза, гујализе

Среда: Сидгане с гујализе и поставишо семене ↓

Четириак: PLPro HPLC, фореза, гујализе



Сушраган сода

Тлицеролски тидок - NTD домен у розе култури на -80°C (Александрс)

Засејани смо αGlu2-shuffle и лизати shuffle у 700ml / 300ml. Утврђивати са 0.45 mM IPTG, 20°C
 Сушрадон брја, лиза, HPLC.

Тисер 1 - 50 mM NaP, 10 mM мизгазол, ¹⁵⁰~~300~~ mM NaCl } → 250 ml
 pH 7.5
 Тисер 2 - 50 mM NaP, 50 mM мизгазол, ¹⁵⁰~~300~~ mM NaCl }
 pH 7.5
 5% глицерол
 1 mM DTT
 0.5 mM PMSF
 ↓
 100 ml

αGlu 2

Решавајуће колоне

NaP 50 mM
 NaCl 150 mM
 EDTA (комплексот) 50 mM } V = 100 ml
 NaCl - 0,87g ; NaP - 0,69g ; EDTA - 1,86g

0,1 M NiCl₂ } V = 100 ml
~~10~~ m = 1,29g

NaCl - 0,87g
 NaP - 0,69g
 EDTA (комплексот III)
 $c = \frac{n}{V}$ $n = c \cdot V = 50 \cdot 10^{-3} \cdot 0,1 = 5 \cdot 10^{-3}$
 $n = \frac{m}{Mr}$ $m = 5 \cdot 10^{-3} \cdot 372,24$
m = 1,86g
 NiCl₂ Mr = 129,6g/mol
 $c = \frac{n}{V}$ $n = c \cdot V = 0,1 \cdot 0,1 = 0,01 \text{ mol}$
 $n = \frac{m}{Mr}$ $m = 0,01 \cdot 129,6 = 1,29g$

Раунд за тисере:

NaP
 $c = \frac{n}{V}$ $n = c \cdot V$
 $n = 50 \cdot 10^{-3} \cdot 250 \cdot 10^{-3}$
 $n = 12500 \cdot 10^{-6}$
 $n = 0,0125 \text{ mol}$
m = 1,725g
V = 250 ml

NaP
 $n = 50 \cdot 10^{-3} \cdot 0,1$
 $n = 5 \cdot 10^{-3}$
 $m = 690 \cdot 10^{-3} \text{ g}$
m = 0,69g
V = 100 ml

NaCl
 $n = 150 \cdot 10^{-3} \cdot 0,25$
 $n = 37,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol}$
m = 2,19g
V = 250 ml
 Mr = 58,44g/mol

$c = \frac{n}{V}$
 $n = 150 \cdot 10^{-3} \cdot 0,1$
 $n = 15 \cdot 10^{-3} \text{ mol}$
m = 0,876g
V = 100 ml

Мизгазол
 V = 250 ml
 $c = \frac{n}{V}$ $n = 0,25 \cdot 10 \cdot 10^{-3} = 2,5 \cdot 10^{-3}$
 $m = 0,17 \text{ g}$

V = 100 ml
 $c = \frac{n}{V}$
 $n = 500 \cdot 10^{-3} \cdot 100 \cdot 10^{-3}$
 $n = 0,05$
 $n = \frac{m}{Mr}$ m = 3,4g
V = 100 ml

14⁰⁰ h magykoban shuttle

14³⁰ h -11- αGlu2-shuttle

12

PMSF 0,5 mM у EtOH!

$M_r = 174,19 \text{ g/mol}$

$V = 250 \text{ ml}$ $V = 100 \text{ ml}$

$$c = \frac{n}{V}$$

$$n = c \cdot V = 0,5 \cdot 10^{-3} \cdot 0,25 = 0,000125 \text{ mol} \cdot 174,19 = 0,02 \text{ g} = 20 \text{ mg} \text{ (250 ml)}$$

$$= 0,5 \cdot 10^{-3} \cdot 0,1 = 0,00005 \text{ mol} \cdot 174,19 = 0,008 \text{ g} = 8 \text{ mg} \text{ (100 ml)}$$

DTT 1 mM

$c = \frac{n}{V}$ $M_r = 154,24 \text{ g/mol}$

$$n = c \cdot V = 1 \cdot 10^{-3} \cdot 0,25 \cdot 154,24 = 0,038 \text{ g} = 38 \text{ mg} \text{ (250 ml)}$$

$$= 1 \cdot 10^{-3} \cdot 0,1 \cdot 154,24 = 0,015 \text{ g} = 15,4 \text{ mg} \text{ (100 ml)}$$

Транзит у 3 ml bove и копираним намот 10!

8.2.2022.

HPLC αGlu2-Saft

PMSF се расува у EtOH

Умано 18 ml Glu II-Saft, 15 ml на колону.

[Не додавати DTT за колоне које имају $\text{Ni}^{\text{II}}/\text{Co}$.
Може, али ако је колоне добро испрана од вишка Ni^{2+}]

Триванас Асм је експеримент јер је колоне поштена.



dGlu II

u

Индукцијено 1L LB-a са dGlu II - PECT416 (у 14⁰⁰h)

IPTG

$$1M \quad V = 10ml$$

$$c = \frac{n}{V} \quad n = 1 \cdot 10 \cdot 10^{-3} = 10 \cdot 10^{-3} = 10^{-2} \text{ mol}$$

$$M_r = 238,3 \text{ g/mol}$$

$$n = \frac{m}{M_r} \quad m = 238,3 \cdot 10^{-2} = \boxed{2,38g}$$

Узорак пре HPLC - меримо концентрацију протеина

Наносимо 35ml (35ml) \rightarrow $C_p = 0,357$ $A = 0,154$ $0,203$

$$\frac{0,203 - 0,0066}{0,2308} = 0,85 \text{ mg/ml}$$

$$0,85 \text{ mg/ml} \cdot 35 \text{ ml} = \underline{29,75 \text{ mg}}$$

HPLC рађен са 50mM NaP, 10mM амгазон, 150mM NaCl, 1mM DTT; мито то са 500mM амгазон
Selin колота 40mg/ml мапурикеа!

протеина

Фракције са HPLC - а ~~PLP~~ PLP напош гујализе, PLP напош вода, PLP напош изфер

1. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18; неке фракције за PLP \rightarrow 50ml (PLP фракције)

2. 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34

лиза, фт, небезати, 10, 12, 14, 16 - то 15ml наносити

$$C_p \text{ фрузи } \text{у} \text{у} \quad A_u = 0,42 \quad A_{sp} = 0,181 \quad \Delta A = 0,239 \Rightarrow C_p = 1 \text{ mg/ml}$$

Стајано од 21 до 30. фракције. Пала на гујализу, а пала не.

8,8ml

5ml

3,8ml

Микро: мало протеина 20ml + 200ml 0,01 - 0,1 mg/ml

Мауро: ују -||- 5ml + 200ml 0,1 mg/ml - 1 mg/ml

Bradford

50mM NaP pH 7,5
1L

$n = \frac{m}{M}$ ← Трудно за гуајансу

$$c = \frac{n}{V} \quad n = 50 \cdot 10^{-3} \cdot 1L \Rightarrow m = 50 \cdot 10^{-3} \cdot 138 = 6,9g$$

Наша гуајанза имамо 4,1 ml.

На еквиваленту: $1g/L = 1,8 \quad A^{280}$

$E = 254 \text{ g}^{-1} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ у води мерено

Ми измерили наша гуајанза $0,196 - 0,096 = 0,1$

$$\left. \begin{array}{l} 1g/L = 1,8 \\ x = 0,1 \end{array} \right\} x = \frac{0,1}{1,8} = 0,055 g/L \Rightarrow 0,055 \text{ mg/ml}$$

У другој половини, која није гуајанзована смо додали 10% инхибитора и забили.

Гуајанзована половина:

Бредфорд:

$$A^{620} \text{ вода (20 ml у 200 ml)} = 0,193$$

$$A^{620} \text{ узорак наша гуајанза} = 0,614 \text{ (20 у 200 ml)}$$

$$A^{620} \text{ - II -} = 0,361 \text{ (5 у 200)}$$

$$A^{620} \text{ вода (5 у 200 ml)} = 0,174$$

$$A^{620} \text{ пре гуајанзе (5 у 200)} = 0,443$$

микро

$$\Delta A = 0,421$$

$$y = 1,223x - 0,0017$$

$$0,421 = 1,223x - 0,0017$$

$$1,223x = 0,421 + 0,0017$$

$$x = 0,345 \text{ mg/ml}$$

после гуајанзе

Излази из опсега!

Користимо макро!

макро

пре гуајанзе

$$0,443 - 0,174$$

$$= 0,269$$

$$x = 1,136 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$$

макро

после гуајанзе

$$0,361 - 0,174$$

$$= 0,187$$

$$x = 0,78 \text{ mg/ml}$$

Logarismo PMSF (1mM) y anukbouiē

W

ūianōi (soqul)

$$M_r = 174,19 \text{ g/mol}$$

$$1 \text{ mM} = \frac{n}{0,5 \text{ ml}}$$

$$n = 1 \text{ mM} \cdot 0,5 \text{ ml} = 1 \cdot 10^{-3} \cdot 0,5 \cdot 10^{-3}$$

$$n = \frac{m}{M_r}$$

$$m = 0,5 \cdot 10^{-6} \cdot 174,19 = 87 \cdot 10^{-6} = 0,87 \mu\text{g}$$

$$87 \cdot 10^{-3} \mu\text{g}$$

$$87 \mu\text{g}$$

1

SN(1,3ml) SN(2) 1,3ml

$$n = 1 \text{ mM} \cdot 1,3 \text{ ml} = 1 \cdot 10^{-3} \cdot 1,3 \cdot 10^{-3}$$

$$n = 1,3 \cdot 10^{-6}$$

$$n = \frac{m}{M_r}$$

$$m = 1,3 \cdot 10^{-6} \cdot 174,19$$

$$m = 226,4 \cdot 10^{-6}$$

$$m = 0,2 \mu\text{g}$$

SN(3) 2ml

$$n = 1 \text{ mM} \cdot 2 \cdot 10^{-3} = 10^{-6} \cdot 2$$

$$m = 2 \cdot 10^{-6} \cdot 174,19$$

$$m = 348,38 \cdot 10^{-6}$$

$$m = 0,35 \mu\text{g}$$

0,5ml

~~50ml~~ 10mM

$$C = \frac{n}{V} \quad n = \frac{m}{M_r}$$

$$m = 10 \cdot 10^{-3} \cdot 0,5 \cdot 10^{-3} = 5 \cdot 10^{-6} \cdot 174,19 = 870,95 \cdot 10^{-6} = 0,87 \cdot 10^{-3} = 0,87 \mu\text{g}$$

PBS

$$V = 0,2 \text{ ml}$$

$$140 \text{ mM NaCl} \rightarrow m = 1,64 \text{ g}$$

$$2,7 \text{ mM KCl} \rightarrow m = 0,04 \text{ g}$$

$$10 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4 \rightarrow m = 0,76 \text{ g (0,76)}$$

$$1,8 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4 \rightarrow m = 0,05 \text{ g}$$

Љосџабули есеј и бугели га

не разили ни користећи Glu II.

Слика тела показује да је сечење јаче
али Е није разили.

MeOH je glavni izvor C i liske ekspresije mrdžer.

↑ conc MeOH → akumulacije acetilaldehida
i vodonik-peroksida → stupa
veliče

↓ c MeOH → proteolitička degradacija
kiselololnih proteina

KM 71 → najbolje 1% MeOH

T za rast je 28°C - 30°C! Ne sme ↓ T jer vodi do ER stres
redukcionik rja

Produkciono vreme je oko 100h

- 50ml kulture u 125ml erlenmajerz
- Sve urave po Pichia Expression kit manual
- × 100ml K-P pH 6 → optičer sterna.
- × 1.34% YNB bez aa sa
- (NH₄)₂SO₄
- × 4 · 10⁻⁵% w/v biotin → optičer sterna.

Staju 0.5ml prekonolite u BMG (OD^{600nm} 8-10)
veliče rasti na 30°C, na 270rpm. 24h после инокулације
дода се 0.5% MeOH

$V_1 = 300 \text{ ml} \rightarrow 300 \text{ ml}$

NaP 2,06 g (50 mM)

NaCl 3,6 g (300 mM)

инсулин 0,2 g (10 mM)

$V_2 \rightarrow 150 \text{ ml}$

NaP 1,03 g (50 mM)

NaCl 1,8 g (300 mM)

инсулин 5,106 g (500 mM)

28. март 2022.

AMY

Требацили 40 ml преинотитне културе у 300 ml LB-a. (3x)
Датас чекам од м индужујем експресују. 0.4 mM IPTG, 12 h

W

XTD

српално
100 ml

српално
12,5 ml

6 ерленмајера, прво у 10 ml (додати зео и снл.) серији на
на наих 10 ml у 40 ml (суша збере)

* 400 ml медијума BCG

присадија узму од 5-6 срџа
у стер. ваљана 30' зоопри
и ресусциндужемо у 10 ml ~~мед~~ (BCM)
медијум без метанол.

Измеримо V у ваљу, узмемо алмивот

500 ml као контролу и додано мети да буде 0.5% српално.

тежије ресусциндужемо у PBS-у више изја исцпрано.

у лон сфорза

* 400 ml метанолот BSM

$9,38\text{ g}$ YNB ~~ca~~ ^{ca} ASiHaf } BCG
 7 g Yeast extract } raskoniti u $560\text{ ml H}_2\text{O}$
 14 g pepton } autoklav

- $1\text{ M K}_2\text{HPO}_4$ pH 6 (pH podесити еврским кош) } autoklav
 $V = 70\text{ ml}$ $13,6\text{ g} - 100\text{ ml}$
- $V = 70\text{ ml}$ 10% gly - autoklavirane $12\text{ ml } 85\% + 88\text{ ml vode}$
- $1,4\text{ ml}$ D $0,02\%$ - fruktozа интермедијација

obe komponente
 na vodu

BCM

$1,34\text{ g}$ YNB ~~ca~~ ^{ca} ASi }
 1 g yeast extract } 9 g $89\text{ ml dH}_2\text{O}$ autoklavirati
 2 g pepton

- $10\text{ ml K}_2\text{HPO}_4$ pH 6
- 200 ml D - fruktozа
- 50% MeOH 10 ml - fruktozа

Засејати 3 tbe и 2 ml D и 10 ml BCG медијума са Zeo и chl (10 ml (Zeo) i 5 ml (chl)) и 1 empty $\text{pPC}\alpha 2$.

31. март 2021.

x

NTD

Ујутру мерити OD и рекалти да порасте 5-6. Онда фуџа 30' на 3000rpm.

PC - 12 ml (узена 500µl) → 11,5 ml

NC1 - 11 ml (-11-) → 10,5 ml

NC2 - 11 ml -11- → 10,5 ml

NC3 - 12 ml (-11-) → 11,5 ml

SC1 - 12 ml (-11-) → 11,5 ml

SC2 - 11 ml (-11-) → 10,5 ml

~~C1V1 = C2V2~~
~~0,5 · x = 0,5 · 11,5~~
 $0,057 \text{ ml} = 57,5 \mu\text{l} \cdot 2$
 $0,052 \text{ ml} = 52,5 \mu\text{l} \cdot 2$
 $52,5 \mu\text{l}$
 $57,5 \mu\text{l}$
 $52,5 \mu\text{l}$

115 µl
105 µl

x концентровање узорка за histag

$$50\% \cdot x = 11,5 \cdot 0,5$$

$$x = 0,115 \text{ ml} = 115 \mu\text{l}$$

$$50 \cdot x = 10,5 \cdot 0,5$$

$$x = 105 \mu\text{l}$$

y 16h догабаити метод.

x Провести LB + Amp за трансформацију

F177

1 - Cys

2 - Leu

✓

x NTD- узети odoniti telove sredrom V
Трескаче се корак 2 у протеоколу!

x узети аминокиселине за ртнју

4. 4. 2022.

Понављамо трансформацију XL10Gold за

Val → 2 Leu

108 → 3 Arg

F158 → 2 Leu

→ 3 Glu

F177 → 1 Cys

→ 2 Leu

Q → 2 Val

→ 3 Ile

R441 → 1

5
M ~~20~~ - 1

- 2

M20 - 1

- 2

SM 4K - 1

W

БЛОТ

11. април 2022.

Направили смо 14% тел (SDS) за NTD домен (30-40kDa) - 2 тела

○ Измеримо димензије тела:

- ду сисеца до сисеца
- висину доњеј тела (збој сетња мембране и сфилтер папира)

○ Измерити конц. протеина

Наносити 20μL узорка и по следетим редом:

Pr10 OH, OH (3N^o), 1-5, Pr10, Маркери
7 дан ферментаци

Узорци се наносе на оба тела ИСТИМ РЕДОМ

Конц протеина:

Pr10 OH	OH N ^o 3	7dan Pr10	7dan N ^o 1	7dan N ^o 2	7dan N ^o 3	7dan SC1	SC2
0,039 $\frac{\mu\text{g}}{\mu\text{L}}$	0,123 $\frac{\mu\text{g}}{\mu\text{L}}$	0,091 $\frac{\mu\text{g}}{\mu\text{L}}$	0,263 $\frac{\mu\text{g}}{\mu\text{L}}$	0,491 $\frac{\mu\text{g}}{\mu\text{L}}$	0,427 $\frac{\mu\text{g}}{\mu\text{L}}$	0,1 $\frac{\mu\text{g}}{\mu\text{L}}$	0,17 $\frac{\mu\text{g}}{\mu\text{L}}$

Са десна на лево наanela узорке 20μL

Pr10 OH, N^o3 OH, N^o1 7dan, N^o2 7dan, N^o3 7dan, SC1 7dan, SC2 7dan,

Pr10 7dan, MM

Тестування DNJ та Glu II

21.4.2022.

u

100mM NaP

3,6 mg/ml pNPG

0 - 150 μM

0, 5, 10, 12, 15, 18, 20, 100, 150 } DNJ Star
 0, 50, 100, 125, 150, 175, 200 } =

wbDNJ 0,5, 10, 20, 50, 100 } Star
 wbDNJ 0,5, 10, 15, 20, 50, 100, 125 }
 150, 175, 200 }

Sat:

0, 50, 100, 200 DNJ i wbDNJ

DNJ та wbDNJ

Glu II - shuffle

EIP 40 μl E, 20 μl I, 140 μl P
 ESP 40 μl, 20 μl, 140 μl P
 ESIP 40, 20, 20, 120 μl P

10xS

10xI

0, 10, 50, 150, 200 ← 2000 μM
 ↓ 1000 μM ↓ 800 μM
 ↗ 1500 μM

3,6 mg/ml → 1,2 mM
 chymotrypsin

DNJ - boga
75 mM

~~a) $41 \mu\text{l} (75 \text{ mM}) + 959 \mu\text{l boga} = 1000 \mu\text{l} (2000 \mu\text{M})$
 $8,2 \mu\text{l} + 191,8$~~

~~δ) $87,6 \mu\text{l} (\text{75 mM}) + 12,4 \mu\text{l boga} \rightarrow 1500 \mu\text{M} \quad 1500$
 $2000 \mu\text{M}$~~

~~b) $25 \mu\text{l} (2000 \mu\text{M}) + 75 \mu\text{l boga} \rightarrow 500 \mu\text{M}$~~

~~π) $20 \mu\text{l} (500 \mu\text{M}) + 80 \mu\text{l boga} \rightarrow 100 \mu\text{M}$~~

mB DNJ - boga

48,9 mM \Rightarrow 48 900 μM a mpeba ga dyge 2000 μM

~~a) $24,5 \mu\text{l} \text{ r3opka} + 975,5 \mu\text{l boga} \Rightarrow 1000 \mu\text{l}$~~

~~$48900 \cdot x = 2000 \cdot 1 \text{ ml}$
 $x = \frac{2000}{48900} = 0,04 \mu\text{l}$~~

40,89

a) (40,89) $40,9 \mu\text{l} \text{ r3opka} + 959,1 \mu\text{l boga} \quad 2000 \mu\text{M}$

δ) 1500 μM
 $87,6 \mu\text{l} + 12,4 \mu\text{l boga}$

b) 500 μM
 $25 \mu\text{l} + 75 \mu\text{l boga}$

π) $20 \mu\text{l} (500 \mu\text{M}) + 80 \mu\text{l boga} \quad (100 \mu\text{M})$

$$48,9 \mu\text{M} = 48900 \mu\text{M}$$

$$2000 \mu\text{M}$$

no DNJ

$$48900 \cdot x = 1000 \mu\text{l} \cdot 2000 \mu\text{M}$$

$$x = 40,9 \mu\text{l} \text{ g3opka} + 959,1 \mu\text{l} \text{ boze}$$

$$\downarrow$$

$$191,82$$

$$45000 \cdot x = 1000 \mu\text{l} \cdot 2000 \mu\text{M}$$

DNJ

$$x = 26 \mu\text{l} + 974 \mu\text{l}$$

$$\downarrow :5$$

$$\boxed{5,2 + 194,8}$$

$$5,2 \text{ — } 2000 \mu\text{M}$$

$$8,2 \text{ — } x$$

$$x = 3153$$

$$3153 \cdot x = 2000 \cdot 200 \mu\text{l}$$

$$x = 126 \mu\text{l} + 74 \mu\text{l} \text{ boze}$$

$$60$$

$$126 - 74$$

$$68 - x$$

$$x = 40 \mu\text{l} \text{ boze}$$

$$\underline{110 \mu\text{l}}$$

$$\times 100 \mu\text{l}$$

$$\frac{3153}{1500} \text{ — } (87,6)$$

$$87,6 (3153) + 12,4 \mu\text{l} \text{ boze}$$

$$\text{chut } \underline{2866}$$

$$2765,7$$

$$\boxed{1,9}$$

4. maj 2022.

✓

• NTD

6 минимални и 6 комплекти

100
12 x ~~500~~ ml ерзетнајери (20 ml погноте)
12 x 500 ml -||- (12 x 200 ml -||-)
12 x 100 ml ерзетнајери } ?

BCG и BNG

Велике буре стерилисати! - Вајне! (за фџуз)

BCG
1,5L

BNG
1,5L

BCM

150ml

BMM

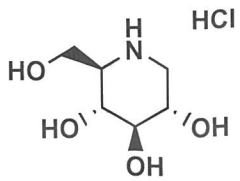
150ml

Узимајте аликвоте од 500ml

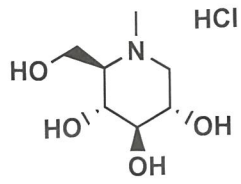
* 3 колоније + прџа



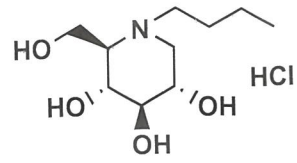
Figure 2: α -Glucosidase inhibitors



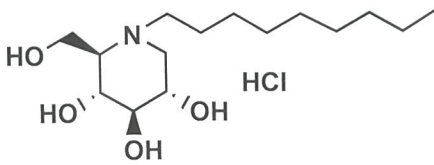
DNJ
MW 199.6310
vec predato



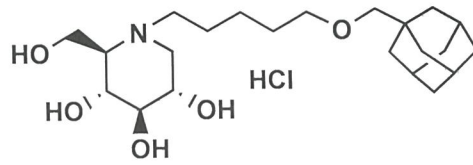
DNJ-Me
MW 213.6580
1.55 mg



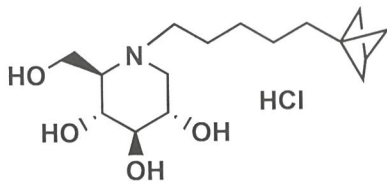
DNJ-Bu
MW 255.7390
vec predato



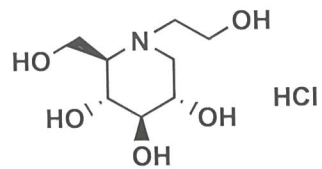
DNJ-No
MW 325.8740
2.83 mg



DNJ-Ad
MW 434.0140
1.47 mg



DNJ-BCP
MW 335.8690
1.5 mg



DNJ-Ep
MW 243.6840
1.77 mg

миллион

ABTS * na pH 4,5 Gle
1° benzil alkohol

DNS
~~ki = 0,44 μM~~
DNS ki = 30 μM

11.5.2022.

NaP pH 7

Митининин

50% ~ 40 μM

~~0,5~~ ~~1~~ ~~2,5~~ ~~10~~ ~~40~~ ~~100~~ ~~500~~

0,5 1 2,5 10 **40** 100 500

0,2 0,8 ~~4~~ ~~20~~ ²⁴

4x 5x ~~6x~~

✓

0 ²⁰⁰ 9 8 16 40 100 500
8x 2x 2,5 2,5 5x

ki 0,2ki
8ki

11.5.2022.

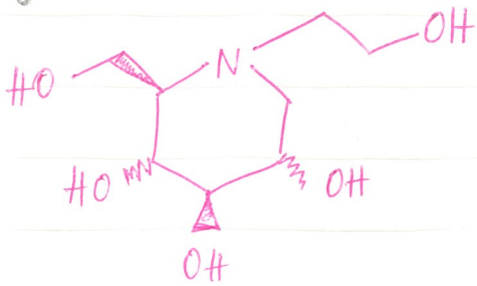
Testiranje I αGlu kvasca

Enzim je korišćen αGlu prečišćen nakon HPLC medijaltvorana u 50% glicerolu! / konstitucio 4000x R!

Митининино Е и I у буферу 100mM NaP pH 7,
потом разложено 8 (3,6 мг/мл)

ензим 4000 x K дуралован, без glicerola

DNJ-Ep ⇒ митишвал - од вете ка мањој СТ и плошци



Mr 243,6840 g/mol

m = 1,77 mg

100 μl P	} R _{1a} 1
20 μl S	
20 μl E	

140 μl P	} R _{1c} ...
20 μl S	
20 μl E	
20 μl I	

штокови:

0, 10 μM, 80 μM, 160 μM, 400 μM, 1000, 2000 μM
5000 μM

↓
опитално: 0, 1, 8, 16, 40, 100, 200, 500 μM

1) 5000 μM

$$c = \frac{n}{V} \quad n = \frac{m}{Mr} = 7,26 \cdot 10^{-6} \text{ mol} = 7,26 \cdot 10^{-3} \text{ mmol} = 7,26 \mu\text{mol}$$

$$V = \frac{7,26 \mu\text{mol}}{5000 \frac{\mu\text{mol}}{\text{L}}} = 0,001452 \text{ L} = 1,45 \mu\text{L}$$

2) 2000 μM

V = 300 μl

120 μl (уштка 5000 μM) + 180 μl воде

3) 1000 μM

100 μl (2000 μM) + 100 μl воде

4) 400 μM

80 μl (1000 μM) + 120 μl воде

5) 160 μ M
80 μ l (400 μ M) + 120 μ l boze

ce

6) 80 μ M
100 μ l + 100 μ l boze
(160 μ M)

7) 10 μ M
25 μ l (80 μ M) + 175 μ l boze

DNI

75 μ M nutok = 75 000 μ M

0, 10, ~~20~~, ~~30~~, 40, 100, 150, 300, 500

1) 5000 μ M.
V = 300 μ l
20 μ l (75 μ M) + 280 μ l boze

2) 3000 μ M.
V = 200 μ l
8 μ l (75 μ M) + 192 μ l boze

3) 1500 μ M.
V = 200 μ l
100 μ l (3000 μ M) + 100 μ l boze

4) 1000 μ M.
V = 200 μ l
40 μ l (5000 μ M) + 160 μ l boze

5) 400 μ M
V = 200 μ l
16 μ l (5000 μ M) + 184 μ l boze

6) 100 μ M
50 μ l (400 μ M) + 150 μ l boze

w

nb DNS

M~~u~~stak je $48,9 \mu\text{M} = 48\,900 \mu\text{M}$

0, 10, 40, 100, 150, 300, 500

1) $5000 \mu\text{M}$.

$V = 300 \mu\text{l}$

$30,6 \mu\text{l} (\overset{48\,900}{\cancel{48\,900}} \mu\text{M}) + 269,4 \mu\text{l} \text{ boga}$

2) $3000 \mu\text{M}$.

$V = 200 \mu\text{l}$

$12,2 \mu\text{l} (48\,900 \mu\text{M}) + 187,8 \mu\text{l} \text{ boga}$

3) $1500 \mu\text{M}$.

$100 \mu\text{l} (3000 \mu\text{M}) + 100 \mu\text{l} \text{ boga}$

4) $1000 \mu\text{M}$.

$V = 200 \mu\text{l}$

$40 \mu\text{l} (5000 \mu\text{M}) + 160 \mu\text{l} \text{ boga}$

5) $400 \mu\text{M}$

$V = 200 \mu\text{l}$

$80 \mu\text{l} (1000 \mu\text{M}) + 120 \mu\text{l} \text{ boga}$

6) $100 \mu\text{M}$

$50 \mu\text{l} (400 \mu\text{M}) + 150 \mu\text{l} \text{ boga}$



DNI - Me

✓

$M_r = 213,6580 \text{ g/mol}$

0, 10, 40, 100, 150, 300, 500

$m = 1,55 \text{ mg} = 1,55 \cdot 10^{-3} \text{ g}$

1) 5000 μM

~~V = 500 μL~~

$c = \frac{n}{V} \quad n = \frac{m}{M_r} = \frac{1,55 \cdot 10^{-3}}{213,658} = 0,00000725 \text{ mol} = 7,25 \text{ } \mu\text{mol}$

$V = \frac{7,25 \text{ } \mu\text{mol}}{5000 \frac{\mu\text{mol}}{\text{L}}} = 0,00145 \text{ L} = 1,45 \text{ } \mu\text{L}$

2) 3000 μM

$V = 200 \text{ } \mu\text{L}$

$5000 \cdot x = 3000 \cdot 200$

$x = 120 \text{ } \mu\text{L} (5000 \text{ } \mu\text{M}) + 80 \text{ } \mu\text{L} \text{ boga}$

3) 1500 μM

$100 \text{ } \mu\text{L} (3000 \text{ } \mu\text{M}) + 100 \text{ } \mu\text{L} \text{ boga}$

4) 1000 μM

$5000 \cdot x = 1000 \cdot 200$

$x = 40 \text{ } \mu\text{L} (5000 \text{ } \mu\text{M}) + 160 \text{ } \mu\text{L} \text{ boga}$

5) 400 μM

$1000 \cdot x = 400 \cdot 200$

$x = 80 \text{ } \mu\text{L} (1000 \text{ } \mu\text{M}) + 120 \text{ } \mu\text{L} \text{ boga}$

6) 100 μM

$400 \cdot x = 100 \cdot 200$

$x = 50 \text{ } \mu\text{L} (400 \text{ } \mu\text{M}) + 150 \text{ } \mu\text{L} \text{ boga}$

DNJ - No

W

$$M_r = 325,8740 \text{ g/mol}$$

$$m = 2,83 \text{ mg}$$

1) 5000 μM

$$V = 300 \mu\text{l}$$

$$c = \frac{n}{V}$$

$$n = \frac{m}{M_r}$$

$$n = \frac{2,83 \cdot 10^{-3}}{325,8740} = 0,00000868 \text{ mol} = 0,00868 \text{ mmol} = 8,68 \mu\text{mol}$$

$$5000 \mu\text{M} = \frac{8,68 \mu\text{mol}}{V}$$

$$V = \frac{8,68}{5000} = 0,00173 \text{ L} = 1,73 \text{ ml}$$

2) 3000 μM

$$V = 200 \mu\text{l}$$

$$5000 \cdot x = 3000 \cdot 200$$

$$x = 120 \mu\text{l} (5000 \mu\text{M}) + 80 \mu\text{l} \text{ boje}$$

DNJ - Ad

u

$$M_r = 434,014 \text{ g/mol}$$

$$m = 1,47 \text{ mg}$$

1) 5000 μM

$$V = 300 \mu\text{l}$$

$$c = \frac{n}{V} \quad n = \frac{m}{M_r} = \frac{1,47 \cdot 10^{-3}}{434,014} = 0,00000339 \text{ mol} = 3,38 \mu\text{mol}$$

$$V = \frac{3,38}{5000} = 0,0006774 = 0,67 \mu\text{l}$$

DNJ-BCP

$M_r = 335,8690 \text{ g/mol}$

$m = 1,5 \text{ mg}$

1) $5000 \mu\text{M}$

$V = 300 \mu\text{l}$

$c = \frac{n}{V}$ $n = \frac{m}{M_r} = \frac{1,5 \cdot 10^{-3}}{335,8690} = 0,00000447 \text{ mol} = 4,46 \mu\text{mol}$

$5000 \mu\text{M} = \frac{4,46 \mu\text{mol}}{V}$ $V = 0,000892 \text{ L} = 0,892 \text{ ml}$

DNJ-EPB

W

$$M_r = 207,2260 \text{ g/mol}$$

$$m = 1,38 \text{ mg}$$

$$c = \frac{m}{V} \quad n = \frac{m}{M_r} = \frac{1,38 \cdot 10^{-3} \text{ g}}{207,2260 \text{ g/mol}} = \frac{0,00138}{207,2260} = 0,00000666 \text{ mol}$$
$$= 0,0066594 \text{ mmol}$$
$$= 6,659 \text{ } \mu\text{mol}$$

$$5000 \mu\text{M} = \frac{n}{V} \quad V = \frac{6,659 \mu\text{mol}}{5000 \frac{\mu\text{M}}{\text{L}}} = 0,0013 \text{ L} = 1,33 \text{ ml}$$

1) 5000 μM

2) 3000 μM

$$5000 \cdot x = 3000 \cdot 200 \mu\text{l}$$

$$x = 120 \mu\text{l (zboraka)} + 80 \mu\text{l vode}$$

* Милилитал HCl - додати P, E, I 37°C 30' до 15⁰⁰

Мери се σ и 25' на 37°C је све време осим када се мери

на $\lambda = 405$

у 18h скитиуида ферм. догади рНРБ

16. мај 2022.

У мењак смо мерили

рЕТ; wt; # F158-3; F158-2; SM4K-1; SM5K-1; SM4K-2;
M5-1; SM4K-3; SM5K-2; SM5K-3; M20-2; M5-2; M20-1

са км и скм рНРО

Резултатима касту га је wt најбољи а га page:

F158-2	} 5 км резултатима
SM4K-1	
SM4K-3	
SM5K-2	

Са 1x км

wt најбољи, SM4K-1, SM4K-3, SM5K-2, F158-2

17. мај

Мерене гли II-стаfl са мхидишорима

W

* 0,2 mM рНРС мильион квасоу

✓

Ad

BCP

24. May 2022.

Потавлямо рНРС мильион квасоу со мильионот и
до 0,2 mM рНРС

$$V = 10 \text{ ml}$$

$$2 \text{ mM} = \frac{n}{V}$$

$$n = 2 \cdot 10^{-3} \cdot 10 \cdot 10^{-3}$$

$$n = 2 \cdot 10^{-6} \text{ mol}$$

$$n = \frac{m}{M_r}$$

$$m = 2 \cdot 10^{-6} \cdot 301 = \frac{6020}{10^6} \cdot 10^{-6}$$

$$m = 6 \cdot 10^{-3} \text{ g}$$

$$m = 6 \text{ mg}$$

$$n = 2 \cdot 10^{-3} \cdot 10 \cdot 10^{-3}$$

$$n = 20 \cdot 10^{-6} \text{ mol}$$

$$n = \frac{m}{M_r}$$

$$m = 20 \cdot 10^{-6} \cdot 301$$

$$m = 6020 \cdot 10^{-6} \text{ g}$$

$$m = 6020 \cdot 10^{-3} \text{ mg}$$

$$m = 6 \text{ mg}$$

* Мили резултат со добри под кара со разлик со
1.2 mM

25. Maj 2022.

U

Заточително ферментацију NTD домена

Протокол за продукцију протеина у *Pichia pastoris* KM71H соју

Радимо у 2 медијума:

- минимални BMS глицеролни медијум
- комплексни BMS / BCG -II-

* инокулација са збојитом (колико медијума имамо збојити) и хлораиф.
 Сејеш колоније у 30ml BMS/BCG са 1M K_2PO_4 , 10% glycerol, 0.02%.

Биоинт, Суфрадан, пребацују 30ml културе у 270ml истог медијума.
 28°C, 24h ујутру (око 10/11h) * суботак

BMS
 13,4g yeast nitrogen base са $(NH_4)_2SO_4$
 у 800ml dH₂O
 аутоклава
 на догаји (стерилно, аутоклавамо):

BCG
 13,4g YNB ~~base~~ with AS
 10g yeast extract
 20g pepton/tripton
 расиборити у 800ml
 на догаји: 1, 2, 3

- 1) 1M K_2PO_4 pH 6, 100ml (pH наместили збрисати кон) аутоклава
- 2) 10% глицерол, 100ml → да финално буде 1%.
- 3) 0.02% биоинт (w/v), 2ml → -II- $4 \cdot 10^{-5}$ % → филтер стерилисан !!!

* срез

Када се добије у сваком еректацију 5-6, центрифугирамо ферм. течност у кибетицама великим које су стерилне 2000rpm/3000rpm 30min.

Одбацујем глицеролни медијум што више (и лимитом) и велике ресуситовање у метанолном медијуму (без метанола), у 10x ↓ запремини (у 30ml). Узети аликоот пре догајања MeOH, као контролу.

BMM

Buffered Minimal Methanol media = BMM

13,4g YNB or AS of 890ml dH₂O, аутиоклавирацији
додајући, након стерилизације, преходно стерилисате:

1. 1M KH₂PO₄ pH 6, 100ml → аутиоклав

2. 50% MeOH v/v, 10ml

3. 0.02% биовит, 2ml

→ филтер стерил. → додаје се директно
у ферментацију!
→ -|| -

BCM

Buffered Complex Methanol media = BCM

13,4g YNB or AS

10g yeast extract

20g pepton/tripton

додајући након стерилизације, преходно стерилисате

1) 1M KH₂PO₄, pH 6, 100ml (погодити pH еврским кот)

2) 50% MeOH (v/v), 10ml — додаје се директно у ферментацију!

3) 0.02% биовит (w/v), 2ml (фитал соус 4·10⁻⁵% биовит)

Након узимања аликвата (контролно) додати MeOH до фитално
буде 0.5%. (преходно у ваји измерених V фермент. млечноста) и
свакој дана (поредних 5-7 дана) додати MeOH.

10ml

200 10ml

5ml 5ml

NC3, SC2, NC2

27. мај 2022.

ce

Инджовали у комплексном медијуму све осим NC_3 у M^{SO}

Фропеза:

1. Тел. Минималти мес.

келује, SN
↓ ↓
10μл макс

ppic, NO₂, NO₃, SO₂, M 0 гаг (пештак)

2. комплексти медиум

к, SN

ppic, ppic, NO₂, NO₂, M, NO₃, NO₃, SO₂, SO₂ 0 гаг (пештак)
к SN к SN к SN к SN

Ог данас годажено МедН (финално 1./.)

Следети пуну стабилност 5μл келуја макс!

3. јун 2022.

Стабилност на ЕФ 12% тел зорке од гуче (четвртак) - месни гаг експресије

пештак - 0 гаг
субота - 1 24h
недела - 2 48h
понедељак - 3 72h
уторак - 4 96h
среда - 5 120h
четвртак - 6 144h

Телови: Ог мене: келује 5μл, SN 30μл

минималти

небо ppic, ppic, M, NO₂, NO₂, NO₃, NO₃, SO₂, SO₂
к SN к SN к SN к SN

ко мене

комплексти ppic, ppic, NO₂, NO₂, M, NO₃, NO₃, SO₂, SO₂
к SN к SN к SN к SN

Moherovan, 7. jyh 2022. *SN*

Jelovi:

Og methe:

minimantni

ppic, ppic, M, NC2, NC2, NC3, NC3, SC2, SC2
k SN k SN k SN k SN

ka methe

kamilekshi

ppic, ppic, NC2, NC2, M, NC3, NC3, SC2, SC2
k SN k SN k SN k SN

Stavljamo uzorke og jzre, hegera. To je duo minimant og gogavaka 1.j. MeOH.

7. jyh 2022.

Bradford

20ul u 200ul

voda 0,325

minimantni ppic 0,387

-||- NC2 0,339

NC3 0,347

SC2 0,353

Kompleksni ppic 0,435

NC2 0,609

NC3 0,716

SC2 0,464

~~micro~~ mikro

~~$y = 0,3275x + 0,0158$~~

$y = 1,9341x - 0,0215$

30ul SN m ppic, NC2, NC3, SC2, ~~M~~

-||- k ——— | | ———

} isti raspored i n2
2. zelu

m pPIC, Nc2, Nc3, Sc2, 10 pPIC, Nc2, Nc3, Sc2, M

4

14. јуна 2022.

ома Трансминазе CV CV-2025

2.6.1.62 / 2.6.1.18

PLP

Сејање вечерас, суша индукције, четвртак промишљавање

24h нон индукције

1mM IPTG

$$1M \cdot x = 300 \text{ ml} \cdot 1 \cdot 10^{-3}$$

$$x = 0,3 \text{ ml} = \underline{\underline{300 \mu\text{l}}}$$

PBS лиза : 0,1mM PLP

Selen колони

20. јуна

1M IPTG

$$V = 10 \text{ ml} = 10 \cdot 10^{-3} = 0,01$$

y вода

$$M_r = 238,30 \text{ g/mol}$$

$$c = \frac{n}{V} \quad n = 1 \cdot 10 \cdot 10^{-3} = 0,01 \text{ mol}$$

$$n = \frac{m}{M_r} \quad m = 0,01 \cdot 238,30 = 2,38 \text{ g}$$

Направљен 1M IPTG

трансформисане 2 библиотеке