

KURZ ZÁKLADŮ PROTEOMIKY

ČASOVÝ ROZVRH:

<u>PONDĚLÍ</u>	7:50- 7:55	Zahájení praktika (UKB, A2, 2.NP, místnost č. 211, Dr. Hejátko)
	8:00 – 9:00	2-D elektroforéza – rehydratace proužků
	9:00 – 9:30	Expresse rekombinantních proteinů – zaočkování expresní kultury
	9:30 – 10:00	Úvod do experimentální části (přednáška)
		9:30-9:40 2D elektroforéza (Dr. Konečná)
		9:40-9:50 MS analýza (Dr. Zdráhal)
		9:50-10:00 Rekombinantní proteiny (Mgr. Fohlerová)
	10:00 – 10.50	Příprava 1-DE gelů (pro SDS-PAGE i nativní PAGE)
	10.50 -11.20	Příprava gelů pro 2-DE
	11:20 – 12:30	OBĚD
	12:30 – 13:30	Expresse rekombinantních proteinů – indukce PAGE analýza – příprava gelů (SDS-PAGE, nativní PAGE)
	13:30 – 14:00	In-solution proteolytické štěpení směsi proteinů pro LC-MSMS analýzu
	14:00 – 16:00	Struktura proteinů, proteomické databáze
16:00 – 16:45	Expresse rekombinantních proteinů – sklizeň kultury Příprava noční kultury pro izolaci plazmidové DNA	
16.45 – 18:00	1. rozměr 2-D elektroforézy: izoelektrická fokuzace (IEF)	
<u>ÚTERÝ</u>	7:45 – 9:15	Izolace plazmidové DNA
	9:15– 10:00	Sekvenování – PCR
	10:00 – 11.00	2. rozměr 2-D elektroforézy: SDS-PAGE
	11,00 – 12.00	OBĚD
	12.00 – 14.00	Barvení 2-DE gelů, densitometrie
	14.00 – 17.00	Software pro vyhodnocování 2-D gelů, databáze 2-D gelů Sekvence DNA –čištění vzorku (prostředání skupin), nasazení vzorku
	17.00 – 17.30	Ukončení in-solution proteolytického štěpení proteinů pro LC-MS/MS analýzu Nasazení vzorků do autosampleru a začátek LC-MS/MS analýzy
<u>STŘEDA</u>	7:30 – 8:30	In-gel proteolytické štěpení proteinů separovaných 2-D elektroforézou
	8:30-13:00	Purifikace rekombinantních proteinů pomocí metalochelatační afinitní chromatografie Demonstrační chromatografie – FPLC PAGE analýza rekombinantních proteinů – příprava vzorků - SDS-PAGE analýza Stanovení koncentrace proteinů metodou dle Bradfordové
	13:00 – 14:00	OBĚD
	14:00 – 15:00	Sekvenování DNA – vyhodnocení výsledků
<u>ČTVRTEK</u>	8:00 – 9:00	Nativní PAGE analýza
	9:00 – 11:00	Analýza proteomu – identifikace proteinů metodou MALDI-TOF

		MS (ukončení in-gel proteolytického štěpení proteinů separovaných 2-D elektroforézou a analýza vzorků MALDI-TOF hmotnostní spektrometrií)
11:00 – 13:00		Ukončení nativní PAGE – aktivitní barvení (MUG) - Western blotting
13:00 – 14:00		OBĚD
14:00 – 16:30		Western blotting
Dle dohody	→	Analýza obrazu – densitometrie, software pro vyhodnocování 1D gelů (vyhodnocení čistoty purifikovaných proteinů)
	→	Vyhodnocení sekvenování DNA, čtecí rámeček (Work Bench)

PÁTEK

8:00 – 10:00		Vyhodnocení výsledků LC-MSMS a MALDI-TOF MS analýz
10:00 – 12:00		“dodělavky“, konzultace, vypracování a odevzdání protokolů
12:00 – 13:00		OBĚD
13:00 – 17:00		vypracování a odevzdání protokolů

Cvičící (legenda):

2-DE a příprava pro MS

Dr. Konečná
Danuše Fridrichová

Analýza obrazu

Dr. Kovářová

MS analýza

Dr. Zdráhal

Struktura proteinů

Dr. Janda (Dr. Marek)

Expres a purifikace rekombinantních proteinů

Mgr. Fohlerová

Martina Válková

Izolace a purifikace DNA, práce s WorkBench

Dr. Nejedlá

Sekvenování DNA

Mgr. Paděrová