

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 (Dr. Pekárová, Mgr. Degtjarik, Mgr. Gelová)
	10:00 – 13:00	Struktura proteinů, proteomické databáze (Dr. Zdráhal, Ing. Zábrady, Mgr. Klumpler)
	13:00 – 13:45	OBĚD
	13:45 – 14:30	Expresse rekombinantních proteinů – indukce Příprava 1-DE gelů (pro SDS-PAGE a nativní PAGE)
	14:30 – 15:00	In-solution proteolytické štěpení směsi proteinů pro LC-MSMS analýzu
	15:00 – 15.30	Příprava 1-DE gelů (pro SDS-PAGE a nativní PAGE)
	15.30 -16.05	Příprava gelů pro 2-DE
	16:05 – 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 (prostrídání 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	Sekvencování DNA – vyhodnocení výsledků

ČTVRTEK

8:30 – 9:00	Nativní PAGE analýza – nanesení vzorků na gel
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 – 12:30	Ukončení nativní PAGE – aktivitní barvení (MUG) - Western blotting
12:30 – 13:30	OBĚD
13:30 – 16:30	Western blotting
Dle dohody	→ Analýza obrazu – densitometrie. software pro vyhodnocování 1D gelů (vyhodnocení čistoty purifikovaných proteinů) → Vyhodnocení sekvencování DNA, čtecí rámec (Work Bench)

PÁTEK

8:00 – 10:00	Vyhodnocení výsledků LC-MSMS a MALDI-TOF MS analýz
10:00 – 11:00	“dodělavky“, konzultace, vypracování a odevzdání protokolů
11:00	kolokvium

Cvičící (legenda):

2-DE a příprava pro MS

Analýza obrazu

MS analýza

Struktura proteinů

Expres a purifikace rekombinantních proteinů

Izolace a purifikace DNA, práce s WorkBench

Sekvencování DNA

Dohled nad laboratoří a přípravou materiálu

RNDr. Hana Konečná, Danuše Fridrichová

Mgr. Gábina Lochmanová

doc. RNDr. Zbyněk Zdráhal, Dr.

Ing. Matej Zábrady, Mgr. Tomáš Klumpler, Ph.D.

Ing. Blanka Pekárová, Ph.D., Mgr. Zuzana Gelová, Ing.

Matej Zábrady, Mgr. Oksana Degtjarik

Bc. Martina Válková,

Bc. Martina Válková

ing. Šárka Skoupá