

KURZ ZÁKLADŮ PROTEOMIKY

ČASOVÝ ROZVRH:

<u>PONDĚLÍ</u>	7:50- 7:55	Zahájení praktika (UKB, A2, 1.NP, místnost č. 1.21, 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, MSc. Szmitkowska)
	10:00 – 13:00	Struktura proteinů, proteomické databáze (Dr. Klumpler, Dr. Jackson)
	13:00 – 13:45	OBĚD
		Budova A2
	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 – 16:00	Expresse rekombinantních proteinů – sklizeň kultury Příprava noční kultury pro izolaci plazmidové DNA Přesun do budovy A26
	16.05 - 16.30	Příprava gelů pro 2-DE
	16.30 – 17:00	1. rozměr 2-D elektroforézy: izoelektrická fokusace (IEF)
<u>ÚTERÝ</u>		Budova A2
	8:00 – 9:15	Izolace plazmidové DNA
	9:15– 10:00	Sekvenování – PCR Přesun do budovy A26
	10:00 – 11.00	2. rozměr 2-D elektroforézy: SDS-PAGE
	11,00 – 12.00	OBĚD
		Budova A26
	12.00 – 14.00	Barvení 2-DE gelů, densitometrie
	14.00 – 14.30	Ukončení in-solution proteolytického štěpení proteinů pro LC-MS/MS analýzu Nasazení vzorků do autosampleru a začátek LC-MS/MS analýzy Přesun do budovy A2
	14.35 – 17.35	Software pro vyhodnocování 2-D gelů, databáze 2-D gelů Sekvence DNA –čištění vzorku (prostředání skupin), nasazení vzorku

STŘEDA

7:30 – 8:30	Budova A26 In-gel proteolytické štěpení proteinů separovaných 2-D Elektroforézou
8:30-13:00	Přesun do budovy A2 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

ČTVRTEK

8:30 – 9:00	Budova A2 Nativní PAGE analýza – nanesení vzorků na gel Přesun do budovy A26
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) Přesun do budovy A2
11:00 – 12:30	Ukončení nativní PAGE – aktivitní barvení (MUG) - Western blotting
12:30 – 13:30	OBĚD
13:30 – 16:30	Budova A2 Western blotting
Dle dohody	→ Analýza obrazu – densitometrie. software pro vyhodnocování 1D gelů (vyhodnocení čistoty purifikovaných proteinů) → Vyhodnocení sekvencování DNA, čtecí rámeček (Work Bench)

PÁTEK

8:00 – 10:00	Budova A2 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, Ph.D.

doc. RNDr. Zbyněk Zdráhal, Dr.

Mgr. Tomáš Klumpler, Ph.D., Phil Jackson, Ph.D.

Ing. Blanka Pekárová, Ph.D., MSc. Agnieszka
Szmikowska

Bc. Martina Válková,

Bc. Martina Válková

ing. Šárka Skoupá