

KBB/SZZPR – Proteomika

1. Proteom a peptidom, vysvětlení pojmů, popis jejich vlastností a rozdílů/odlišností. Významné obory a jejich přínos v rozvoji proteomiky a peptidomiky. Strategie analýzy proteinů a peptidů (Bottom-up, Shotgun, Top-down), popis principů, rozdílů a využití.
2. Peptidové mapování (PMF), základní princip metody, základní charakteristiky a omezení metody. Příprava vzorků a typy hmotnostních analyzátorů vhodných pro PMF. Vyhledávací algoritmy a databáze, identifikace proteinů ze spekter.
3. Peptidové sekvenování (PS, MS/MS), základní princip metody, základní charakteristiky, typy přístupů k PS (DDA, Mse). Významné kroky při přípravě vzorků a typy hmotnostních analyzátorů využívaných pro PS. Vyhledávací algoritmy a databáze, postupy identifikace peptidů a proteinů ze spekter.
4. Analýza proteinů a jejich vlastností. Metodické přístupy charakterizace molekulové hmotnosti proteinů a isoelektrických vlastností. Stanovení molekulové hmotnosti proteinů při použití MALDI a ESI ionizace, jejich rozdílů.
5. Frakcionace proteinů a peptidů na základě velikosti a hydrofobních vlastností. Metodické přístupy, principy metod (SEC, gelová elektroforéza, SPE-C18) a uveďte příklady aplikace jednotlivých metod. Analýza makromolekulárních komplexů – přístupy a metody.
6. Frakcionace proteinů a peptidů na základě náboje a biospecifických vlastností. Metodické přístupy, principy metod (SCX, SAX, IEF, Chromatofokuzace, afinitní a imunoafinitní chromatografie), příklady aplikace jednotlivých metod.
7. Isoelektrická fokusace. Vysvětlení pojmů, principu metody, uspořádání, provedení a vlastností; aplikace pro analýzu peptidů a proteinů, možnosti uspořádání pro analytické a preparativní účely, způsoby identifikace proteinů po dělení.
8. Polyakrylamidová elektroforéza. Vysvětlení pojmů, principu metody, uspořádání, provedení a vlastností; aplikace pro analýzu peptidů a proteinů, možnosti uspořádání pro analytické a preparativní účely, způsoby identifikace proteinů po dělení.
9. Dvoudimenzionální polyakrylamidová elektroforéza. Vysvětlení pojmů, principu metody, uspořádání, provedení a vlastností; aplikace při analýze proteinů, výhody/nevýhody této techniky; technika DIGE, princip, výhody, provedení a použití.
10. Multidimenzionální techniky dělení proteinů a peptidů. Vysvětlení pojmů, princip metody, typy uspořádání, provedení a vlastností. Vysvětlete aplikaci při analýze proteinů a peptidů, uveďte výhody/nevýhody této techniky v porovnání s 2-DE; příklady kombinací technik a jejich zdůvodnění.
11. Fragmentace peptidů v hmotnostní spektrometrii. Techniky fragmentace peptidů v hmotnostní spektrometrii (CID, ETD, ECD, SID, IRMPD, HCD); jejich principy, vlastnosti, typy iontových sérií a použití. Nomenklatura fragmentace peptidů (iontové série vs. způsob aktivace).
12. Ionizační techniky v hmotnostní spektrometrii využívané v proteomice. Principy MALDI a ESI ionizace peptidů a proteinů, jejich vlastnosti, využití, typy hmotnostních analyzátorů. Hlavní kroky přípravy vzorků pro jednotlivé ionizační techniky.

13. Kvantitativní proteomika. Vysvětlení pojmů, obecné dělení metod pro kvantitativní proteomiku. Definice ideálního standardu pro hmotnostní spektrometrii, použití kvantitativní proteomiky. Výhody/nevýhody různých přístupů ke značení proteinů a peptidů v kvantitativní proteomice z hlediska přesnosti analýzy.
14. Metody metabolického a enzymového izotopického značení proteinů a peptidů v kvantitativní proteomice. Principy metod (SILAC, N15-značení, C13-značení, O16/O18 inkorporace); výhody/nevýhody jednotlivých metod a jejich použití.
15. Metody chemického izotopického značení proteinů a peptidů v kvantitativní proteomice. Principy metod (ICAT, ICPL, ITRAQ, TMT, redukční dimethylace), pojem isobarická značka; výhody/nevýhody jednotlivých metod a jejich použití.
16. Absolutní kvantifikace a label-free metody kvantitativní analýzy proteinů a peptidů pomocí hmotnostní spektrometrie. Principy metod (AQUA, MRM, Peptide ion intensity counting, Ion accounting, Spectral counting); základní výhody/nevýhody jednotlivých metod a jejich použití.

PROTEOMIKA – sylabus znalostí

Proteomika – znalosti by měly pokrývat oblasti použití moderních biochemických a analytických technik ke kvalitativní a kvantitativní charakterizaci peptidů a proteinů v biologických materiálech.

Proteomika, peptidomika – definice, přehled, vysvětlení pojmů, cíle, komplexita a dynamičnost proteomu. Strategie analýzy peptidů a proteinů (Bottom-up, Shotgun, Top-down) – principy uspořádání, rozdíly, využití. Základní postupy přípravy vzorků pro proteomickou analýzu (pufry pro nativní nebo denaturační analýzu, inhibitory proteáz, denaturanty, reduktans) – vysvětlení důvodů použití. Metody prefrakcionace komplexních směsí proteinů (konvenční biochemické, biospecifické)-rozdělení, principy metod, využití. Elektroforetické metody analýzy proteinů - isoelektrická fokusace (isoelektrický bod proteinu, fokusační efekt, amfolyty, uspořádání IEF, IPG stripy) – vlastnosti, příprava, použití, podmínky provedení IEF, detekce proteinů); nativní, denaturační a redukující elektroforéza (principy technik, principy provedení, rozdíly, uspořádání, využití, detekce proteinů); dvoudimenzionální elektroforéza (princip metody, princip provedení, upořádání, omezení a využití). Štěpení proteinů pro identifikaci pomocí MS metod (typy enzymů a jejich dělení, princip štěpení proteinů a postupy při štěpení v gelu a v roztoku). Multidimenzionální techniky identifikace peptidů a proteinů (princip kapalinové chromatografie, dělení typů kapalinové chromatografie, principy sil a efektů ovlivňující dělení a aplikace v peptidové a proteinové analýze); multidimenzionální techniky (MuD) – princip uspořádání, důvody použití, typy kombinací technik, píková kapacita, typy propojení + výhody a nevýhody, MuD techniky pro dělení proteinů a peptidů. Hmotnostní spektrometrie (princip, vlastnosti, schéma MS přístroje, základní procesy v MS, ionizační techniky ESI, MALDI, vlastnosti, použití, typy hmotnostních analyzátorů – kvadrupol, iontová past, analyzátor doby letu, OrbiTrap – vlastnosti, použití, princip; tandemové hmotnostní analyzátoři + principy, aplikace, využití). Metody excitace a fragmentace peptidů – CAD/CID, ETD, ECD, HCD, PQD – rozdíly, využití, nomenklatura štěpení peptidů. Interpretace hmotnostních spekter v proteomice (hmotnostní spektrum, kvazimolekulární ionty, monoizotopická a průměrná hmotnost,

izotopické píky, určování náboje iontů, stanovení rozlišení přístroje). Metody identifikace peptidů a proteinů – Peptide Mass Fingerprinting (PMF) a pomocí peptidového sekvenování „Data dependent/independent analysis“, příprava a analýza vzorků pomocí MALDI a ESI ionizace, čišťení peptidů na RP fázích, MALDI matrice – princip použití, vlastnosti, aplikace v proteomice). Interpretace MS dat v proteomice (určení molekulové hmotnosti proteinů pomocí MALDI a ESI ionizace – rozdíly, databázové vyhledávací algoritmy pro identifikace peptidů a proteinů – principy, rozdíly, použití; zdroje a typy databází pro proteomiku). Kvantifikace v proteomice (důvody, ideální standard pro MS, dělení přístupů a technik pro kvantifikaci proteinů a peptidů, rozdíly, výhody vs nevýhody, aplikace – relativní vs. absolutní, in vitro vs in vivo značení, 2D elektroforéza, metabolické izotopické, enzymatické a chemické značení, absolutní kvantifikace AQUA, labelfree kvantifikace).