

Spis treści

Części oznaczone ikonką  znajdują się na dołączonym do książki dysku CD.

 Autorzy	XVII
 Słowo wstępne	XXI
 1. „Omika” i biologia systemów (Jerzy Silberring, Anna Drabik)	 1
 2. Wprowadzenie do proteomiki i strategii identyfikacji białek (Anna Drabik, Jerzy Silberring)	 7
2.1. Wprowadzenie	7
2.2. Jaka strategia?	8
2.3. Wybór materiału biologicznego	9
2.4. Strategie proteomiki	10
2.5. Wybór strategii	11
2.6. Proteomika i jej działy	12
 3. Analiza metabolomu – zróżnicowanej chemicznie matrycy (Agnieszka Kraj)	 15
3.1. Co to jest metabolom?	15
3.2. Techniki analityczne i wyzwania ilościowej analizy metabolitów	16
 4. Przygotowanie materiału biologicznego do analizy (Magdalena Niedziółka)	 21
4.1. Wprowadzenie	21
4.2. Pobranie i przechowywanie materiału	22
4.3. Które składniki badanej próbki są ważne?	24
4.4. Zanieczyszczenia – podstawowy problem analityka	24
4.5. Separacja i izolacja białek	25
4.6. Oczyszczanie białek	27
4.7. Współczesne kierunki badań	34

5. Chromatografia gazowa w połączeniu ze spektrometrią mas (<i>Hana Raoof</i>).....	37
5.1. Wprowadzenie.....	37
5.2. Zasada działania GC-MS.....	38
5.3. Wielowymiarowa metoda GC × GC-MS.....	39
5.4. GC-MS czy LC-MS?	40
5.5. Derywatyzacja	40
5.6. Biblioteki widm i identyfikacja związków na podstawie widma masowego	43
6. Elektroforeza jednowymiarowa (1-DE) (<i>Anna Drabik, Piotr Laidler</i>).....	49
6.1. Wprowadzenie.....	49
6.2. Rozdział elektroforetyczny – zasada działania.....	49
6.3. Polimeryzacja żelu poliakrylamidowego (PAGE, ang. <i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>)	50
6.4. Przygotowanie próbki.....	52
6.5. Elektroforeza w warunkach natywnych (niedenaturujących, ang. <i>native PAGE</i>).....	53
6.6. Elektroforeza w warunkach denaturujących SDS-PAGE (ang. <i>sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>)	54
6.7. Żel agarozowy	55
6.8. Tricyna /SDS-PAGE.....	55
6.9. Kwas octowy /mocznik PAGE.....	55
6.10. Barwienie.....	55
6.11. Znakowanie izotopowe.....	57
6.12. Przechowywanie wyników	57
6.13. Wady techniki elektroforetycznej.....	57
6.14. Najczęściej popełniane błędy (w 1-DE).....	58
7. Elektroforeza dwuwymiarowa 2-DE (<i>Anna Drabik, Anna Bodzoń-Kuśakowska</i>)	61
7.1. Wprowadzenie.....	61
7.2. Przygotowanie próbki do rozdzielu 2-DE.....	63
7.3. Pierwszy wymiar – ogniskowanie izoelektryczne (IEF)	64
7.4. Drugi wymiar w SDS-PAGE.....	66
7.5. Analiza komputerowa skanów żeli	67
7.6. Różnicowa elektroforeza żelowa	74
7.7. Barwniki fluorescencyjne stosowane w DIGE	75
7.8. Standard wewnętrzny	76
7.9. Techniki znakowania stosowane w DIGE	78
7.10. Podsumowanie	80
8. Elektroforeza kapilarna (<i>Bogusław Buszewski, Ewa Kłodzińska, Michał Szumski, Marek Noga, Jerzy Silberring</i>)	85
8.1. Wprowadzenie.....	85
8.2. Elektroforeza kapilarna – podstawy teoretyczne	85

8.3.	Mechanizm rozdzielania w elektroforezie kapilarnej – pojęcia podstawowe.....	87
8.4.	Sposoby detekcji	91
9.	Ogniskowanie do punktu izoelektrycznego (IEF, ang. <i>isoelectric focusing</i>) (Anna Drabik).....	99
9.1.	Wprowadzenie.....	99
9.2.	Możliwości zastosowań ogniskowania do punktu izoelektrycznego.....	101
10.	Spektroskopia Ramana (Małgorzata Barańska, Anna Baran)	105
10.1.	Wprowadzenie.....	105
10.2.	Aparatura	108
10.3.	Wprowadzenie do analizy aminokwasów, białek i metabolitów	109
10.4.	Specjalne techniki ramanowskie w proteomice i metabolomice.....	113
10.5.	Mapowanie ramanowskie, RM	120
11.	Blotting białek (Ibeth Guevara-Lora, Anna Gołda, Andrzej Kozik)	125
11.1.	Wprowadzenie.....	126
11.2.	Transfer białek i peptydów na membranę.....	126
11.3.	Detekcja.....	130
11.4.	Przykłady zastosowania blotingu białek w proteomice.....	135
12.	Electrospray i nanoelectrospray (ESI i nanoESI) (Piotr Suder)	139
12.1.	Wprowadzenie.....	139
12.2.	Cechy techniki <i>electrospray</i>	140
12.3.	Zasada działania metody ESI	141
12.4.	Modyfikacje źródła jonów typu ESI: <i>nanoelectrospray</i> (nanoESI)	144
12.5.	Modyfikacje źródła jonów typu ESI: DESI (ang. <i>desorption by electrospray</i>)	146
12.6.	Podstawy analizy widm.....	146
13.	Chromatografia cieczowa połączona ze spektrometrią mas (LC-MS) (Piotr Suder).....	151
13.1.	Wprowadzenie.....	151
13.2.	Rodzaje połączeń LC-ESI-MS	152
13.3.	LC-MALDI-MS	156
13.4.	HPLC vs UPLC	159
13.5.	Wybór kolumny chromatograficznej dla techniki LC-MS	160
13.6.	Chromatografia kapilarna a spektrometria mas.....	164
13.7.	Interpretacja wyników analiz.....	166
14.	Wielowymiarowe techniki separacji połączone ze spektrometrią mas (Marek Noga, Anna Drabik)	171
14.1.	Wprowadzenie.....	171

14.2. Zasada działania.....	172
14.3. Rozdzielczość systemu chromatograficznego.....	172
14.4. Zastosowania układów wielowymiarowych.....	174
14.5. Zastosowania	175
14.6. Kolumny z innymi wypełnieniami.....	179
14.7. Połączenia LC-CE.....	180
14.8. Zintegrowane układy CE-CE.....	180
14.9. Wielowymiarowe techniki	180
15. Desorpcja/ionizacja laserowa wspomagana matrycą (MALDI) (<i>Adam Moszczyński, Magdalena Niedziółka</i>)	185
15.1. Wprowadzenie.....	185
15.2. Matryce	186
15.3. Nanoszenie próbek	188
15.4. Analiza widm	189
15.5. MALDI w analizie i identyfikacji białek	192
15.6. MALDI a fragmentacja	192
15.7. MALDI a sekwencjonowanie białek.....	193
15.8. Analizator czasu przelotu – TOF oraz TOF/TOF	193
16. Warianty laserowej desorpcji/ionizacji (<i>Adam Moszczyński</i>)	199
16.1. SELDI (ang. <i>surface-enhanced laser desorption/ionization</i>).....	200
16.2. Zastosowania SELDI w proteomice	200
16.3. Powierzchnie wykorzystywane w SELDI	200
16.4. Układ antygen–przeciwciało (chromatografia powinowactwa)	201
16.5. LAC (ang. <i>lectin affinity capture</i>).....	202
16.6. Oddziaływania międzycząsteczkowe (ang. <i>biomolecular interactions</i>)	202
16.7. Oddziaływania hydrofobowe, jonowymieniacze	202
16.8. MELDI (ang. <i>material-enhanced laser desorption/ionization</i>)	203
16.9. SALDI (ang. <i>surface-assisted laser desorption/ionization</i>)	204
16.10. Desorpcja/ionizacja na krzemie (DIOS)	204
16.11. Węgiel oraz inne materiały	205
16.12. Nanostruktury	205
17. Skaningowa spektrometria mas (<i>Małgorzata Iwona Szynkowska, Jerzy Silberring</i>)	209
17.1. Wprowadzenie.....	209
17.2. Spektrometria mas jonów wtórnych	210
17.3. Jonizacja/desorpcja laserowa wspomagana matrycą (MALDI)	215
17.4. Desorpcja/ionizacja laserowa pod ciśnieniem atmosferycznym.....	218
17.5. Desorpcja/ionizacja poprzez ESI (DESI)	219
17.6. Podsumowanie i ogólna charakterystyka metod skaningowych	220
18. Wysokorozdzielcza spektrometria mas w metabolomice (<i>Agnieszka Kraj</i>).....	223
18.1. Wprowadzenie.....	223
18.2. Zasada działania analizatora cyklotronowego rezonansu jonów z transformacją Fouriera (FT-ICR)	225

18.3.	Wysokorozdzielcza spektrometria mas w metabolomice	226
18.4.	Podsumowanie	230
19.	Techniki izolacji i fragmentacji jonów (<i>Filip Sucharski</i>)....	233
19.1.	Wprowadzenie.....	233
19.2.	Spektrometry masowe.....	233
19.3.	Metody fragmentacji.....	234
19.4.	Nomenklatura widm fragmentacyjnych.....	238
19.5.	Nomenklatura peptydów cyklicznych.....	239
20.	Identyfikacja białek wspomagana fragmentacją (<i>Marek Noga, Filip Sucharski</i>)	243
20.1.	Wprowadzenie.....	243
20.2.	Metoda „odcisku palca” mapy peptydowej.....	244
20.3.	Identyfikacja peptydów	246
20.4.	Weryfikacja identyfikacji peptydów	249
20.5.	Identyfikacja białek	252
21.	Fragmentacja wspomagana chemicznie (<i>Adam Moszczyński</i>)	259
21.1.	Wprowadzenie.....	259
21.2.	Dlaczego widma fragmentacyjne białek i peptydów moga stwarzać problemy interpretacyjne?	260
21.3.	Co daje derywatywacja?	261
21.4.	Przykłady derywatywacji.....	262
21.5.	Znakowanie peptydów za pomocą ^{18}O	266
21.6.	Acetylowanie i deuterioacetylowanie.....	266
22.	Sekwencjonowanie <i>de novo</i> (<i>Filip Sucharski, Adam Moszczyński</i>).....	271
22.1.	Wprowadzenie.....	271
22.2.	Sposób postępowania	272
22.3.	Podstawowy protokół sekwencjonowania <i>de novo</i>	273
23.	Proteomika funkcjonalna (<i>Anna Bodzoń-Kulakowska</i>).....	281
23.1.	Wprowadzenie.....	281
23.2.	Kompleksy białkowe	281
23.3.	Cele proteomiki funkcjonalnej	282
23.4.	Analiza interakcji.....	283
23.5.	Wielostopniowe oczyszczanie izolowanego kompleksu.....	283
23.6.	Oddziaływania białko-DNA.....	287
23.7.	Badanie interakcji binarnych.....	289
23.8.	Macierze białkowe i peptydowe	291
23.9.	Drożdżowy system dwuhybrydowy (Y2H, ang. <i>yeast two-hybrid system</i>) ..	291
23.10.	Metody fluorescencyjne	294
23.11.	Badanie aktywności enzymów (ang. <i>activity-based probes</i>).....	295
23.12.	Manipulowanie ekspresją genów	296
23.13.	Techniki komputerowe	299
23.14.	Problemy proteomiki funkcjonalnej	300

24. Macierze białkowe i peptydowe (Grzegorz Schroeder, Piotr Młynarz, Anna Czernicka)	305
24.1. Wprowadzenie.....	305
24.2. Mikromacierze diagnostyczne	306
24.3. Metody funkcjonalizacji powierzchni mikromacierzy	307
24.4. Synteza ligandów <i>in situ</i>	309
24.5. Znakowanie cząsteczek	310
24.6. Metody detekcji	310
24.7. Biosensory	313
24.8. Zastosowania mikromacierzy	315
25. Zastosowanie sieciowania chemicznego w celu badania interakcji między białkami (Przemysław Mielczarek)	319
25.1. Wprowadzenie.....	319
25.2. Analizy z zastosowaniem czynników sieciujących.....	320
25.3. Typy reakcji chemicznych z zastosowaniem czynników sieciujących	323
25.4. Projektowanie czynników sieciujących.....	327
25.5. Zastosowanie spektrometrii mas do analizy białek po reakcji chemicznego sieciowania.....	329
25.6. Identyfikacja produktów reakcji chemicznego sieciowania	328
26. Proteomika strukturalna (Grzegorz Bujacz, Anna Bujacz)	333
26.1. Wprowadzenie	333
26.2. Kryształizacja białek	334
26.3. Charakterystyka kryształów białkowych	340
26.4. Pomiar dyfrakcyjny.....	344
26.5. Rozwiązywanie struktury	347
26.6. Budowa modelu	354
26.7. Udokładnianie modelu.....	355
26.8. Analiza poprawności struktury	356
27. Proteomika ilościowa (Marek Noga)	361
27.1. Wprowadzenie.....	361
27.2. Analiza ilościowa na podstawie barwienia żeli.....	361
27.3. Analiza ilościowa w wykorzystaniu spektrometrii mas	362
27.4. Syntetyczne standardy wewnętrzne	364
27.5. Znakowanie różnicowe	365
27.6. Znakowanie metaboliczne	367
27.7. Znakowanie białek.....	368
27.8. Znakowanie peptydów	369
27.9. Znakowanie z wykorzystaniem widm MS/MS	370
27.10. Metoda ilościowa bez znakowania.....	371
27.11. Metody półilościowe.....	372
27.12. Podsumowanie	373
28. Proteomika kliniczna (Anna Bodzoń-Kuśkowska).....	377
28.1. Wprowadzenie.....	377
28.2. Biomarkery	379

28.3. Strategie proteomiki klinicznej.....	380
28.4. Implementacja biomarkera do praktyki klinicznej	385
28.5. Analiza płynów ustrojowych w proteomice klinicznej	389
28.6. Analiza tkanki.....	393
28.7. Podsumowanie – teoria a praktyka	395
29. Proteomika modyfikacji potranslacyjnych <i>(Filip Sucharski)</i>	401
29.1. Wprowadzenie.....	401
29.2. Metody badania modyfikacji potranslacyjnych.....	402
30. Metabolom człowieka (Agnieszka Kraj)	411
30.1. Wprowadzenie.....	411
30.2. Strategie badania metabolomu.....	411
30.3. Wybór platformy analitycznej.....	412
30.4. Dobór i przygotowanie próbek.....	413
30.5. Dostępne bazy danych metabolitów	413
31. Metabolom żywności i żywienia <i>(Elżbieta Kostyra, Henryk Kostyra)</i>	417
31.1. Ewolucja metabolomu żywności i żywienia	417
31.2. Definicja metabolomu żywności i żywienia.....	417
31.3. Podejście systemowe do analizy metabolomu żywności i żywienia.....	419
31.4. Metabolom żywności psychoaktywnej.....	423
31.5. Interaktywność składników żywności a metabolom żywności i żywienia.....	424
31.6. Strategia badań metabolomu żywności i żywienia.....	425
32. Metabolom roślinny (Maciej Stobiecki, Piotr Kachlicki)	429
32.1. Wprowadzenie.....	429
32.2. „Omika” funkcjonalna a biologia systemów.....	429
32.3. Specyfika analiz metabolomów roślinnych.....	434
32.4. Metody analityczne stosowane w badaniach metabolomów roślinnych ...	434
32.5. Przykłady badań metabolomów roślinnych	439
32.6. Materiały uzupełniające	440
33. Nowe podejście w oznaczaniu i identyfikacji mikroorganizmów (Ewa Kłodzińska, Michał Szumski, Bogusław Buszewski)	445
33.1. Wprowadzenie.....	445
33.2. Techniki elektromigracyjne, nowe metody detekcji oraz metody biologii molekularnej w analizie szczepów bakterii <i>S. aureus</i>	448
33.3. Rozważania końcowe	453
34. Metabolom drożdży (Filip Sucharski)	457
34.1. Wprowadzenie.....	457
34.2. Techniki analityczne w analizie metabolomu drożdży	457
34.3. Perspektywy badań metabolomu drożdży	459

35. Badania farmakologiczne (<i>Jolanta Kotlińska, Agnieszka Pachuta, Marcin Bocheński</i>)	463
35.1. Wprowadzenie.....	463
35.2. Badania wstępne	464
35.3. Testy poszerzone	473
36. Wstęp do chemii kombinatorycznej (<i>Adam Lesner, Krzysztof Rolka</i>).....	479
36.1. Chemia kombinatoryczna – historia i perspektywy	479
36.2. Synteza równoległa – metody tworzenia bibliotek	480
36.3. Metody syntezy kombinatorycznej	484
36.4. Biblioteki kodowane	487
36.5. Wybór polimeru do syntezy bibliotek peptydowych	491
36.6. Proces wyszukiwania sekwencji aktywnych (dekonwolucja biblioteki peptydowej).....	492
36.7. Zastosowanie chemii kombinatorycznej.....	496
37. Bioinformatyka – zarys ogólny (<i>Wojciech Rożek, Paweł Ciborowski</i>).....	501
37.1. Wprowadzenie.....	501
37.2. Definicja bioinformatyki.....	502
37.3. Biologia systemów i bioinformatyka.....	503
37.4. Bazy danych	505
37.5. Analiza danych.....	507
37.6. Walidacja danych.....	511
37.7. Powszechne udostępnianie danych – korzyść dla wszystkich	512
37.8. Organizacja danych.....	514
38. Chemometria w metabolomice i proteomice (<i>Beata Walczak, Marcin Daszykowski</i>).....	519
38.1. Wprowadzenie.....	519
38.2. Gromadzenie, przetwarzanie i interpretacja danych.....	521
39. FRET (<i>Stanisław Wysocki</i>)	535
39.1. Dlaczego FRET?.....	535
39.2. Podstawy fizyczne FRET.....	535
39.3. Metodyka pomiaru FRET.....	540
39.4. Zastosowanie FRET w badaniach dynamiki molekularnej peptydów i białek.....	541
39.5. FRET białek fluorescencyjnych – na tropach białek w komórce	546
Indeks	549

40. ● Laboratorium. Ćwiczenia praktyczne (Adam Moszczyński, Anna Drabik, Anna Bodzoń-Kuśakowska, Hana Raoof, Przemysław Mielczarek)	1
40.1. Zasady BHP.....	1
40.2. Przygotowanie białek rozdzielonych w żelu SDS-PAGE do analizy z zastosowaniem spektrometrii mas	2
40.3. Elektroforeza białek w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (SDS-PAGE)	4
40.4. Bioinformatyczne narzędzia identyfikacji białek	6
40.5. Identyfikacja peptydu z wykorzystaniem fragmentacji wspomaganej matrycą w źródle jonów MALDI	16
40.6. Zastosowanie metody LC-MS w proteomice	17
40.7. Kinetyka reakcji enzymatycznych	18
41. ● Dodatki: bazy danych, tabele i definicje (Magdalena Niedziółka, Filip Sucharski, Hana Raoof, Adam Moszczyński)	22
41.1. Literaturowe bazy danych	24
41.2. Bioinformatyczne bazy danych.....	24
41.3. Tabele	27
41.4. Definicje: masy i jednostki w spektrometrii mas	33