

Spis treści

1. RÓŻNE ZAGADNIENIA ZWIĄZANE Z BADANIAMI POLIMERÓW	1
1.1. Biopolimery a polimery syntetyczne	1
1.1.1. Czym są biopolimery	1
1.1.2. Podstawowe różnice między polimerami a biopolimerami	2
1.1.3. Metodyka badań biopolimerów	9
1.2. Wiązania chemiczne w biopolimerach	10
1.2.1. Siły van der Waalsa	13
1.2.2. Wiązania wodorowe	15
1.2.3. Rola wiązania wodorowego w biopolimerach	18
1.2.4. Oddziaływania donorowo-akceptorowe (koordynacyjne)	21
1.2.5. Oddziaływania stackingowe	21
1.2.6. Oddziaływania jonowe	22
1.2.7. Oddziaływania jon–dipol	22
1.2.8. Transport elektronów w układach biologicznych	23
1.3. Konformacje strukturalne	25
1.3.1. Konformacja chiralna	25
1.3.2. Konformacja helikalna (spiralna)	28
1.4. Woda w strukturach biopolimerów	28
1.4.1. Struktura fizyczna wody	28
1.4.2. Oddziaływanie wody z biopolimerami	31
1.4.3. Otoczka hydratacyjna	34
1.4.4. Wiązanie wody przez peptydy	35
1.4.5. Oddziaływania hydrofilowe	36
1.4.6. Oddziaływania hydrofobowe	36
1.5. Oddziaływanie międzycząsteczkowe w roztworach	38
1.5.1. Rozpuszczanie biopolimerów	38
1.5.2. Roztwory i jednostki stężeń	41
1.5.3. Termodynamiczne podstawy przebiegu reakcji biochemicznych	44
1.5.4. Makrocząsteczka w roztworze	45
1.5.5. Proces pęcznienia	46
1.5.6. Kompleksy międzycząsteczkowe	49
1.5.7. Asocjacja, aglomeracja i agregacja białek	50

1.5.8. Agregacje makrocząsteczek	52
1.5.9. Surfactanty (detergenty) – środki pomocnicze	53
1.5.10. Błony komórkowe	55
1.5.11. Biokoloidy	62
1.5.12. Micele	62
1.5.13. Pęcherzyki – micle wielowarstwowe	65
1.6. Wilgoć	66
1.6.1. Wilgotność względna i bezwzględna	66
1.6.2. Właściwości higroskopijne biopolimerów	68
1.7. Ekstrakcja	69
1.8. Suszenie biopolimerów	73
1.8.1. Metody suszenia	73
1.8.2. Sita molekularne	76
1.9. Przygotowywanie próbek do badań	77
1.9.1. Oczyszczanie białek	79
1.9.2. Wysalanie białek	80
1.9.3. Denaturacja białek	81
1.10. Procesy oksydacyjne biopolimerów	84
1.10.1. Reakcje wolnych rodników z biopolimerami	84
1.10.2. Nadtlenek wodoru	90
1.10.3. Wychwyt rodnika tlenu azotu ($\bullet$ NO)	93
1.10.4. Stres oksydacyjny	94
1.10.5. Degradacja oksydacyjna biopolimerów tlenem molekularnym	95
1.10.6. Mechanizmy działania antyutleniaczy	98
1.10.7. Degradacja oksydacyjna biopolimerów tlenem singletowym	104
1.10.8. Degradacja oksydacyjna biopolimerów tlenem atomowym	106
1.10.9. Degradacja oksydacyjna biopolimerów ozonem	107
1.11. Homeostaza	109
1.12. Modyfikacja fizyczna i chemiczna biopolimerów – zagadnienia ogólne	110
1.13. Niebezpieczne preparaty w badaniach z biopolimerami	111
LITERATURA	115
2. CHROMATOGRAFICZNE METODY SEPARACJI I WYDZIELANIA BIOPOLIMERÓW	125
2.1. Techniki separacyjne – chromatografia	125
2.2. Podstawy chromatografii	126
2.3. Chromatografia cienkowarstwowa	129
2.4. Chromatografia powinowactwa	134

2.5. Kolumnowa chromatografia cieczowa	138
2.6. Klasyczna chromatografia HPLC	142
2.7. Polimerowe adsorbenty porowate	148
2.8. Metody rozwijania chromatogramu	150
2.9. Chromatografia jonowymienna	152
2.9.1. Jonity organiczne	152
2.9.2. Wymiana jonowa na kolumnie	157
2.9.3. Oznaczanie pojemności wymiennej	161
2.9.4. Oznaczanie pęcznienia jonitów	162
2.10. Chromatografia sitowa (wykluczenia)	162
2.11. Chromatografia gazowa	167
2.12. Wybór techniki chromatograficznej	172
LITERATURA	173
3. ELEKTROFORETYCZNE METODY SEPARACJI I WYDZIELANIA BIOPOLIMERÓW	177
3.1. Podstawy praktyczne elektroforezy	177
3.2. Elektroforeza bibułowa	178
3.3. Elektroforeza żelowa	181
3.3.1. Nośniki żelowe	183
3.4. Rozdział elektroforetyczny białek	185
3.5. Oznaczanie elektroforetyczne rodzaju białek w materiale biologicznym metodą Western blot	187
3.6. Pozostałe metody elektroforetyczne	190
3.7. Elektroforeza kapilarna	192
3.8. Elektroforeza swobodna z przepływem elektrodynamicznym	194
3.9. Przygotowywanie próbek do elektroforezy	195
3.10. Wyznaczanie względnej masy cząsteczkowej białka za pomocą elektroforezy	197
3.11. Elektroforetyczny rozdział białek i kwasów nukleinowych	198
3.12. Test immunoenzymatyczny ELISA	200
3.13. Znakowanie immunologiczne rozdzielonych białek	205
LITERATURA	207

4. FIZYKOCHEMICZNE METODY IDENTYFIKACJI STRUKTURY BIOPOLIMERÓW	209
4.1. Wyznaczanie mas molowych metodami sedymentacyjnymi	209
4.1.1. Wyznaczanie mas molowych za pomocą pomiarów sedymentacyjnych	209
4.1.2. Wyznaczanie mas molowych metodą pomiaru szybkości sedymentacji	211
4.1.3. Aparatura do ultrawiórowania	212
4.1.4. Współczynnik sedymentacji	215
4.1.5. Współczynnik dyfuzji	216
4.1.6. Pomiar współczynnika dyfuzji	218
4.1.7. Wyznaczanie mas cząsteczkowych metodą pomiaru równowagi sedymentacyjnej	220
4.1.8. Wyznaczanie mas cząsteczkowych metodą pomiaru sedymentacji w gradiencie gęstości	221
4.2. Wyznaczanie mas molowych metodą spektrometrii mas	222
4.2.1. Mechanizm jonizacji	222
4.2.2. Pomiar widm masowych	224
4.3. Metody spektroskopowe badania biopolimerów	232
4.3.1. Spektrometria absorpcyjna w zakresie widzialnym	232
4.3.2. Widma elektronowe	236
4.3.3. Podstawowe prawa spektroskopii UV/VIS	237
4.3.4. Aparatura do pomiarów widm absorpcyjnych	245
4.3.5. Spektroskopia absorpcyjna aminokwasów i białek	247
4.3.6. Spektroskopia absorpcyjna kwasów nukleinowych	248
4.4. Spektrofotometria emisyjna fluorescencji	249
4.4.1. Podstawy spektroskopii emisyjnej	249
4.4.2. Wygaszanie fluorescencji	250
4.4.3. Bezpromienne przeniesienie energii wzbudzenia	252
4.4.4. Aparatura do pomiarów widm fluorescencji	254
4.4.5. Spektroskopia emisyjna aminokwasów, białek i kwasów nukleinowych	257
4.4.6. Znakowanie biopolimerów do badań spektroskopowych	259
4.4.7. Zielona fluorescencja	268
4.4.8. Widma emisyjne fluorescencji chlorofilu	269
4.4.9. Efekt Kautsky'ego	270
4.4.10. Fluorescencyjne badanie rozwijania i zwijania białek	270
4.4.11. Metody badania szybkich reakcji w analizie przepływowej	272
4.5. Zastosowanie dichroizmu w badaniach biopolimerów	273
4.5.1. Dichroizm kołowy w badaniu struktury konformacyjnej białek	274
4.6. Metody optyczne badania biopolimerów	277
4.6.1. Dwójłomność	277
4.6.2. Skręcalność optyczna	279
4.6.2.1. Dyspersja skręcalności optycznej	280

4.6.3. Metoda dynamicznego rozpraszania światła	282
4.6.4. Małokątowe rozpraszanie światła (SALS)	286
4.7. Spektrometria w podczerwieni (IR)	287
4.7.1. Widma oscylacyjno-rotacyjne biopolimerów	287
4.7.2. Pomiar widm absorpcyjnych w podczerwieni (IR)	288
4.7.3. Przygotowywanie próbek biopolimerów do badań widm IR	291
4.7.4. Widma spektrofotometrii wewnętrznego odbicia promieniowania IR ...	294
4.7.5. Widma spektrofotometrii odbicia dyfuzyjnego	297
4.7.6. Spektroskopia IR wiązania wodorowego	303
4.7.7. Zastosowanie spektroskopii IR do badania deuterowanych biopolimerów	304
4.7.8. Spektrofotometria absorpcyjna IR w świetle spolaryzowanym	304
4.7.9. Spektroskopia IR w bliskiej podczerwieni	306
4.7.10. Analiza i zastosowania widm IR w badaniach biopolimerów	307
4.8. Badanie struktur polimerowych metodami spektroskopii Ramana	308
4.8.1. Podstawy spektroskopii Ramana	308
4.8.2. Pomiar widm Ramana	309
4.8.3. Badanie biopolimerów za pomocą spektroskopii Ramana	311
4.9. Badanie struktur polimerowych metodami magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR)	312
4.9.1. Podstawy spektroskopii NMR	312
4.9.2. Pomiar widm NMR biopolimerów	317
4.9.3. Przesunięcie chemiczne	321
4.9.4. Interpretacja widm NMR białek	324
4.9.5. Spektroskopia ^{13}C NMR białek	325
4.9.6. Spektroskopia NMR w fazie stałej	327
4.9.7. Dwuwymiarowa spektroskopia 2D-NMR	327
4.9.8. Metoda chemicznie indukowanej dynamicznej polaryzacji jąder	330
4.10. Spektroskopia elektronowego rezonansu jądrowego (EPR) w badaniach rodników	330
4.10.1. Podstawy rezonansu jądrowego	330
4.10.2. Pomiar rezonansu jądrowego	333
4.10.3. Znakowanie spinowe	338
4.10.4. Badanie rozwijania i zwijania białek za pomocą znaczników spinowych	340
4.11. Krystalizacja peptydów i białek	341
4.11.1. Podstawy krystalizacji	341
4.11.2. Krystalizacja polipeptydów i białek	342
4.11.3. Zagadnienia analizy krystalograficznej	349
4.12. Metody rentgenograficzne badania morfologii biopolimerów	350
4.12.1. Podstawy spektrometrii rentgenowskiej	350
4.12.2. Analiza rentgenograficzna metodami WAXS i SAXS	353
4.12.3. Bazy danych krystalograficznych	360

4.13. Metody mikroskopowe	364
4.13.1. Transmisyjna mikroskopia elektronowa	366
4.13.2. Skaningowa mikroskopia elektronowa	371
4.13.3. Skaningowa mikroskopia sił atomowych	374
4.13.4. Badanie mechanicznego rozwijania białka metodą AFM	377
LITERATURA	380
SKOROWIDZ	395
DOROBEK NAUKOWY PROF. JANA F. RABKA	409