

Spis treści

PRZEDMOWA	13
ROZDZIAŁ I	
INFORMACJE OGÓLNE	15
1 Jednostki miary	17
2 Podstawowe informacje o komórce	19
2.1 Komórka eukariotyczna	19
2.2 Komórka prokariotyczna	22
3 Makromolekuły	24
3.1 Kwas deoksyrybonukleinowy	24
3.1.1 Struktura	25
3.1.2 Upakowanie DNA w komórce	27
3.2 Kwas rybonukleinowy	28
3.2.1 Struktura	29
3.2.2 Rodzaje RNA	29
3.2.2.1 Matrycowe RNA	29
3.2.2.2 Rybosomalne RNA	30
3.2.2.3 Transportowe RNA	30
3.2.2.4 Małe jądrowe RNA	32
3.3 Białka	32
3.3.1 Struktura	32
3.3.1.1 Struktura pierwszorzędowa	32
3.3.1.2 Struktura drugorzędowa	35
3.3.1.3 Struktura trzeciorzędowa	35
3.3.1.4 Struktura czwartorzędowa	36
3.3.2 Właściwości białek	36
4 Procesy komórkowe	37
4.1 Replikacja	37
4.2 Transkrypcja	39
4.3 Translacja	42
4.3.1 Inicjacja translacji	42
4.3.2 Elongacja	43
4.3.3 Terminacja	43
ROZDZIAŁ II	
PRZYGOTOWANIE MATERIAŁU BADAWCZEGO	45
1 Rodzaje materiału badawczego	47
1.1 Tkanki	47
1.1.1 Pobór materiału	47

1.1.2 Rodzaje preparatów	48
1.1.2.1 Preparaty mrożone	48
1.1.2.2 Preparaty barwione	49
1.2 Hodowle	52
1.2.1 Rodzaje hodowli	52
1.2.1.1 Hodowle komórkowe	53
1.2.1.2 Hodowle tkankowe	53
1.2.1.3 Hodowle narządowe	53
1.2.2 Typy hodowli komórkowych	54
1.2.2.1 Hodowla pierwotna	54
1.2.2.2 Linia komórkowa	55
1.2.3 Przygotowanie do prowadzenia hodowli	55
1.2.3.1 Odkazanie	56
1.2.3.2 Komora	57
1.2.3.3 Inkubator	58
1.2.3.4 Inny sprzęt laboratoryjny	59
1.2.4 Pożywki	60
1.2.4.1 Pożywki do hodowli komórek zwierzęcych	60
1.2.4.2 Pożywki do hodowli komórek roślinnych	63
1.2.4.3 Pożywki do hodowli bakterii	64
1.2.5 Zakładanie i prowadzenie hodowli	67
1.2.5.1 Hodowla komórek zwierzęcych i ludzkich	68
1.2.5.2 Hodowla komórek macierzystych	69
1.2.5.3 Hodowla komórek roślinnych	71
1.2.5.4 Hodowle bakteryjne	72
1.2.6 Pasażowanie	74
1.2.7 Oznaczanie liczebności komórek	75
1.2.7.1 Hemocytometr	76
1.2.7.2 Liczniki półautomatyczne	79
1.2.7.3 Licznik Coultera	79
1.2.7.4 Metoda płytkowa	81
1.2.7.5 Turbidymetria	82
1.2.7.6 Cytometria przepływowa	82
2 Izolacja makromolekuł	83
2.1 Izolacja DNA	83
2.1.1 Ekstrakcja przy użyciu związków organicznych	83
2.1.2 Wysalanie	84
2.1.3 Wirowanie	85
2.2 Izolacja RNA	86
2.3 Izolacja białek	87
2.3.1 Wysalanie	87
2.3.1.1 Precypitacja z użyciem soli jonowych	89
2.3.1.2 Precypitacja z użyciem soli niejonowych	91
2.3.1.3 Precypitacja z użyciem związków organicznych	91
2.3.2 Wirowanie	92
2.3.3 Chromatografia	92

2.3.3.1 Podział technik chromatograficznych	96
2.3.3.2 Chromatografia gazowa	97
2.3.3.3 Chromatografia cieczowa	98
2.3.3.4 Chromatografia kolumnowa	99
2.3.3.5 Chromatografia planarna	101
2.3.3.6 Chromatografia adsorpcyjna	103
2.3.3.7 Chromatografia podziałowa	106
2.3.3.8 Chromatografia jonowymienna	106
2.3.3.9 Chromatografia wykluczenia	108
2.3.3.10 Chromatografia powinowactwa	109
2.3.4 Oczyszczanie białek fuzyjnych	111
2.3.4.1 His-tag	112
2.3.4.2 GST-tag	113
2.3.4.3 FLAG-tag	114
2.3.5 Inne metody	114
2.3.5.1 Izolacja przez zmianę pH	114
2.3.5.2 Izolacja przez zmianę temperatury	115
2.4 Izolacja plazmidów	115
2.4.1 Liza alkaliczna	116
2.4.2 Liza termiczna	117
3 Ekstrakcja poszczególnych struktur komórkowych	118
3.1 Izolacja jądra komórkowego	118
3.2 Izolacja mitochondriów	119
3.3 Izolacja błony komórkowej	120
4 Oznaczanie ilości makromolekuł	121
4.1 Ocena ilości kwasów nukleinowych	121
4.1.1 Kwantyfikacja opierająca się na absorbancji	121
4.1.2 Kwantyfikacja opierająca się na barwnikach fluorescencyjnych	123
4.1.3 Kwantyfikacja opierająca się na elektroforezie	124
4.2 Ocena ilości białek	125
4.2.1 Metody opierające się na redukcji jonów miedzi	125
4.2.1.1 Metoda Lowry'ego	126
4.2.1.2 Metoda BCA	127
4.2.2 Metody opierająca się na oddziaływaniach białko-barwnik	128
4.2.2.1 Metoda Bradforda	129

ROZDZIAŁ III

TWORZENIE BIBLIOTEK GENOWYCH	131
1 Wstęp	133
2 Rodzaje bibliotek	133
2.1 Biblioteki genomowe	134
2.2 Biblioteki cDNA	134
3 Klonowanie a reakcja łańcuchowa polimerazy	136
4 Przebieg klonowania	136
4.1 Enzymy restrykcyjne	136
4.1.1 Podział enzymów restrykcyjnych	137

4.1.1.1 Enzymy typu I	137
4.1.1.2 Enzymy typu II	138
4.1.1.3 Enzymy typu III	139
4.1.1.4 Enzymy typu IV	139
4.1.2 Nomenklatura	139
4.1.3 Ogólny mechanizm rozpoznawania sekwencji nukleotydowej	140
4.2 Ligacja DNA	140
4.3 Rodzaje wektorów	140
4.3.1 Plazmidy	142
4.3.1.1 Wektor pBR322	143
4.3.1.2 Wektor pUC18	145
4.3.2 Wektory bakteriofagowe	145
4.3.2.1 Bakteriofag lambda	147
4.3.2.2 Bakteriofag M13	150
4.3.2.3 Bakteriofag P1	151
4.3.3 Kosmidy i fosmidy	153
4.3.4 Sztuczne chromosomy	154
4.3.4.1 Sztuczne chromosomy drożdżowe	154
4.3.4.2 Sztuczne chromosomy bakteryjne	157
4.3.4.3 Sztuczny chromosom wyprowadzany z faga P1	157
4.3.4.4 Sztuczne chromosomy ludzkie	158
4.4 Przeszukiwanie bibliotek	160
4.4.1 Hybrydyzacja DNA	160
4.4.2 Analiza immunologiczna	160
4.4.3 Screening z zastosowaniem PCR	161

ROZDZIAŁ IV

WPROWADZANIE KONSTRUKTÓW DO KOMÓREK

EUKARIOTYCZNYCH

163

1 Wstęp	165
2 Rodzaje dostarczanych molekuł	165
3 Rodzaje transfekcji	167
3.1 Transfekcja przejściowa	167
3.2 Transfekcja stabilna	167
4 Metody chemiczne	168
4.1 Fosforan wapnia	168
4.2 DEAE-dekstran	169
4.3 Polietylenoimina	170
4.4 Dendrymer	171
4.5 Lipofekcja	172
4.6 Peptydy wnikaające do komórek	173
5 Metody fizyczne	174
5.1 Mikroiniekcja	174
5.2 Elektroporacja	175
5.3 Mikrowstrzeliwanie	178
5.4 Szok termiczny	179

6 Metody biologiczne	179
6.1 Agrobacterium	180
6.2 Metody modyfikacji komórek z użyciem wirusów	182
6.2.1 Wirusy DNA	186
6.2.1.1 Adenowirusy	187
6.2.1.2 Wirusy zależne od adenowirusów	189
6.2.1.3 Wektory herpeswirusowe	189
6.2.1.4 Pokswirusy	190
6.2.1.5 Bakulowirusy	190
6.2.2 Wirusy RNA	191
6.2.2.1 Retrowirusy	191
6.2.2.2 Lentiwirusy	192

ROZDZIAŁ V

REAKCJA ŁAŃCUCHOWA POLIMERAZY 195

1 Wstęp	197
2 Składniki mieszaniny reakcyjnej	197
2.1 Matryca	197
2.2 Polimeraza DNA	198
2.3 Mieszanina deoksynukleotydów (dNTP)	198
2.4 Bufor PCR	198
2.5 Magnez	199
2.6 Startery	199
3 Etapy PCR	201
4 Rodzaje PCR	202
4.1 Ilościowy PCR w czasie rzeczywistym	203
4.1.1 Niespecyficzne metody monitorowania przyrostu ilości produktu	204
4.1.2 Specyficzne metody monitorowania przyrostu ilości produktu	205
4.1.2.1 Sondy liniowe	205
4.1.2.2 Sondy o złożonej strukturze	208
4.1.3 Metody analiz danych	211
4.2 PCR z użyciem odwrotnej transkryptazy	214
4.3 MULTIPLEKS	218
4.4 Wewnętrzny PCR	219
4.5 PCR zdegenerowanych starterów oligonukleotydowych	221
4.6 Losowa amplifikacja polimorficznego DNA	222
4.7 Polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych	224
4.8 Polimorfizm konformacji pojedynczych nici DNA	225
4.9 Elektroforeza w gradientowych żelach denaturujących	225

ROZDZIAŁ VI

SEKWENCJONOWANIE 227

1 Wstęp	229
2 Sekwencjonowanie DNA	229
2.1 Metody klasyczne	229
2.1.1 Metoda Maxama i Gilberta	229

2.1.2 Metoda Sangera	232
2.2 Sekwencjonowanie nowej generacji	235
2.2.1 Pirosekwencjonowanie	235
2.2.1.1 Pirosekwencjonowanie 454	238
2.2.2 System Illumina	240
2.2.3 System SOLiD	242
2.3 Sekwencjonowanie trzeciej generacji	244
3 Sekwencjonowanie RNA	245
4 Sekwencjonowanie białek	245
4.1 Degradacja Edmana	245
4.2 Spektrometria mas	247

ROZDZIAŁ VII

ELEKTROFOREZA 251

1 Informacje ogólne	253
2 Nośniki elektroforetyczne	253
2.1 Agaroz	254
2.2 Poliakrylamid	254
3 Systemy elektroforetyczne	255
3.1 System pionowy	255
3.2 System poziomy	256
3.3 System kapilarny	256
4 Elektroforeza białek	257
4.1 Warunki przeprowadzenia rozdziału	258
4.1.1 Warunki denaturujące	258
4.1.2 Warunki natywne	259
4.2 Rodzaje elektroforezy białek	260
4.2.1 Elektroforeza strefowa	260
4.2.2 Izotachoforeza	260
4.2.3 Ogniskowanie izoelektryczne	261
4.2.4 Elektroforeza nieciągła	263
4.2.5 Elektroforeza dwukierunkowa	264
4.2.6 Immuno elektroforeza	265
5 Elektroforeza kwasów nukleinowych	265
5.1 Wizualizacja wyniku	266
5.1.1 SYBR Green I	266
5.1.2 SYBR Green II	266
5.1.3 Bromek etydyne	267
6 Marker elektroforetyczny	267

ROZDZIAŁ VIII

TECHNIKI BADAWCZE Z ZASTOSOWANIEM PRZECIWCIAŁ 269

1 Wstęp	271
2 Budowa przeciwciał	271
3 Klasy przeciwciał	272
3.1 Immunoglobulina G	273

3.2	Immunoglobulina A	273
3.3	Immunoglobulina M	273
3.4	Immunoglobulina D	274
3.5	Immunoglobulina E	275
4	Produkcja przeciwciał	275
4.1	Wywoływanie reakcji immunologicznej	276
4.1.1	Białka nośnikowe	276
4.1.1.1	Hemocyanina	276
4.1.1.2	Albumina surowicy bydlęcej	277
4.1.1.3	Owoalbumina	277
4.1.2	Przyłączanie antygeny do białka nośnikowego	277
4.1.3	Adiuwanty	278
4.1.4	Cechy organizmu stosowanego do produkcji przeciwciał	280
4.2	Otrzymywanie przeciwciał poliklonalnych	280
4.3	Otrzymywanie przeciwciał monoklonalnych	282
4.3.1	Produkcja przeciwciał z zastosowaniem fuzji komórek	282
4.3.2	Produkcja przeciwciał z zastosowaniem metody phage display	284
4.4	Różnice między przeciwciałami mono- i poliklonalnymi	287
4.5	Zwierzęta używane do produkcji przeciwciał	288
5	Determinacja specyficzności i oczyszczanie przeciwciał	289
5.1	Frakcjonowanie fizykochemiczne	289
5.2	Oczyszczanie klas przeciwciał	290
5.3	Specyficzne powinowactwo względem antygeny	292
6	Znakowanie przeciwciał	294
6.1	Radioizotopy	295
6.2	Związki fluorescencyjne	299
6.3	Enzymy	300
6.3.1	Peroksydaza chrzanowa	300
6.3.2	Alkaliczna fosfataza	301
6.3.3	Oksydaza glukozy	302
6.3.4	β -galaktozydaza	302
6.4	Cząsteczki nieorganiczne	303
6.5	Inne znaczniki	303
6.5.1	Biotyna-(strept)awidyna	304
6.5.2	Digoksygenina	304
7	Techniki badawcze z użyciem przeciwciał	305
7.1	Test immunoenzymatyczny	305
7.1.1	Rodzaje testu immunoenzymatycznego	305
7.1.1.1	ELISA homo- i heterogenna	305
7.1.1.2	Test ELISA bezpośredni, pośredni, kanapkowy	306
7.1.1.3	Kompetycyjna i niekompetycyjna ELISA	308
7.1.2	Przebieg testu ELISA	309
7.1.2.1	Przyłączanie (cross-linking) antygeny	309
7.1.2.2	Blokowanie (blocking)	310
7.1.2.3	Inkubacja	313
7.1.2.4	Usuwanie niezwiązanej frakcji przeciwciał	313

7.1.2.5 Detekcja	313
7.2 Immunohistochemia i immunocytochemia	314
7.3 Techniki bazujące na immunoprecypitacji	315
7.3.1 Wyodrębnienie pojedynczego białka - immunoprecypitacja (IP)	316
7.3.2 Koimmunoprecypitacja	317
7.3.3 Immunoprecypitacja chromatyny (ChIP)	318
7.3.3.1 Rodzaje immunoprecypitacji chromatyny	318
7.3.3.2 Przebieg immunoprecypitacji chromatyny	318
7.3.4 Immunoprecypitacja RNA	322
7.4 Western blot	323
7.4.1 Transfer	323
7.4.1.1 Rodzaje transferu	324
7.4.1.2 Bufory do transferu	326
7.4.1.3 Membrany	327
7.4.1.4 Stripping membran	328
7.4.1.5 Ocena wydajności transferu	329
7.4.3 Detekcja przy użyciu przeciwciał	329

ROZDZIAŁ IX

TECHNIKI BAZUJĄCE NA HYBRYDYZACJI	331
1 Informacje ogólne	333
2 Parametry i etapy hybrydyzacji	334
2.1 Denaturacja	334
2.1.1 Denaturacja termiczna	334
2.1.2 Denaturacja chemiczna	335
2.1.3 Denaturacja poprzez zmianę pH	335
2.2 Hybrydyzacja	335
2.2.1 Bufor hybrydyzacyjny	336
2.2.2 Parametry hybrydyzacji	337
2.3 Usuwanie nadmiaru sondy	337
3 Znakowanie sondy	338
3.1 Rodzaje znaczników	338
3.1.1 Znaczniki izotopowe	338
3.1.2 Znaczniki nieizotopowe	338
3.2 Sposoby znakowania sondy	338
3.2.1 Enzymatyczne metody znakowania sondy DNA	339
3.2.1.1 Metoda przemieszczania pęknięć	339
3.2.1.2 Metoda heksamerowa	340
3.2.1.3 Znakowanie na końcach	340
3.2.1.4 Znakowanie PCR	341
3.2.2 Enzymatyczne metody znakowania sondy RNA	343
3.2.2.1 Znakowanie końca 3' ligazą T4. RNA	343
3.2.2.2 Znakowanie równomierne	344
3.2.3 Chemiczne znakowanie sond	345
4 Techniki bazujące na hybrydyzacji	345
4.1 Hybrydyzacja in situ	345

4.1.1 Przebieg	345
4.1.2 Fluorescencyjna hybrydyzacja in situ (FISH)	346
4.1.2.1 3D-FISH	347
4.1.2.2 Multipleks FISH i SKY-FISH	347
4.1.2.3 Ilościowy FISH	348
4.1.2.4 Flow-FISH	349
4.1.2.5 Comet-FISH	350
4.1.2.6 Fiber-FISH	351
4.1.3 CISH	352
4.2 Southern blot	352
4.2.1 Przygotowanie materiału	352
4.2.2 Membrany	353
4.2.2.1 Membrany nylonowe	353
4.2.2.2 Pozytywnie naładowane membrany nylonowe	354
4.2.3 Bufory	354
4.2.3.1 Bufory stosowane podczas denaturacji	354
4.2.3.2 Bufory stosowane podczas transferu	355
4.2.4 Transfer	355
4.2.4.1 Transfer kapilarny	356
4.2.4.2 Transfer próżniowy	357
4.2.4.3 Elektroblotting	358
4.2.5 Immobilizacja	358
4.2.6 Hybrydyzacja	359
4.3 Northern blot	359
Bibliografia	361
Indeks	387