

Białka są składnikami budulcowymi komórek, które bezpośrednio zapewniają potencjalną funkcję genów poprzez enzymatyczną katalizę, sygnalizację molekularną i fizyczne interakcje. Badania związane z tym obszarem dotyczą proteomiki. Z chwilą pojawienia się całego sekwencjonowania genomu, proteomika na dużą skalę zaczęła szybko dominować w wieku postgenomicznym.

Jedną z pierwszych technik analitycznych używanych w proteomice była dwuwymiarowa elektroforeza żelowa (2D-GE), w której następuje migracja naładowanych elektrycznie cząstek w polu elektrycznym i separacja białek. Obecnie jednak badania proteomiczne wiążą się z dużą różnorodnością metod analitycznych takich jak spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (FT-IR), spektroskopia Ramana, spektroskopia ultrafioletowa (UV-VIS), magnetyczny rezonans jądrowy (NMR) czy też metody fluorescencyjne. Jednakże, obecnie najpotężniejszym narzędziem w tym obszarze badań jest spektrometria mas obejmująca identyfikację/charakterystykę białek oraz ich modyfikacje potranslacyjne (PTM). PTM są zmianami chemicznymi reszt aminokwasowych wywierającymi wpływ na właściwości fizykochemiczne białek. Wprowadzenie nowych grup chemicznych w określone pozycje białka może prowadzić do wielu zmian w funkcji białka, którego różne izoformy mogą uczestniczyć w różnych procesach biologicznych. Obecność PTM w białku prowadzi do zmian w oddziaływaniach z innymi białkami czy też wpływa na trzeciorzędową strukturę białek. Znaczenie PTM znajduje szerokie zastosowanie wykorzystywane w procesach biochemicznych, klinicznych i technologii żywności. Mimo że stopień modyfikacji jest zwykle niski, to efekty funkcjonalne mogą okazać się poważne w przypadku oddziaływania na domeny funkcyjne. Dlatego też, głównym celem projektu są badania mające na celu opracowanie metod analizy PTM na bazie białek mleka i serwatki. W tym celu zostanie wykorzystane najnowocześniejsze instrumentarium badawcze, jak na przykład technologia laserowej jonizacji/desorpcji próbki wspomaganą matrycą z analizatorem czasu przelotu (MALDI-TOF MS) oraz wspomaganą nanostrukturami (NALDI). W celu pozyskania biologicznie aktywnych białek wykorzystane zostanie mleko krowie oraz serwatka, która przez długi okres czasu postrzegana była jedynie jako odpad. W trakcie realizacji projektu przeprowadzona zostanie fizykochemiczna charakterystyka wyizolowanych białek za pomocą elektroforezy żelowej, a także przeprowadzone zostaną pomiary potencjału zeta celem określenia ich punktów izoelektrycznych. Dodatkowo opracowana zostanie klasyczna metoda trawienia w roztworze oraz przy wykorzystaniu kapilarnych reaktorów enzymatycznych (CER), a także próba połączenia CER z robotem do frakcjonowania. Dogłębny przegląd oraz badania różnych PTM odgrywają istotną rolę w uutorowaniu prawidłowej drogi do identyfikacji i ukierunkowania nowych biomarkerów w celu ułatwienia rozwoju skutecznej diagnostyki i terapii. Dodatkowo lepsze zrozumienie PTM występujących w mleku podczas przetwarzania i przechowywania może pomóc modulować wpływ obróbki cieplnej na właściwości odżywcze i technologiczne. Znajomość miejsc modyfikacji zmodyfikowanych białek daje nowe spojrzenie na to w jaki sposób każde miejsce może mieć korzystny lub niekorzystny wpływ na konkretną właściwość mleka.

Niewątpliwą zaletą spektrometrii mas jest jej bardzo wysoka czułość, selektywność, szeroki zakres analizy mas, które w połączeniu z innymi technikami analitycznymi, takimi jak chromatografia cieczowa (LC-MS) lub elektroforeza kapilarna (np. metoda elektroforezy stref kapilarnych (CZE-MS) i dwuwymiarowa elektroforeza żelowa (2D-GE)) daje potężne narzędzie do analizy bardzo złożonych mieszanin, takich jak peptydy i białka. Sekwencjonowanie profilowanych peptydów przez MALDI-TOF MS oraz odmiana tego podejścia NALDI-TOF MS zapewniają dodatkowy aspekt zawartości informacji w profilach proteomicznych, co ma kluczowe znaczenie w wykrywaniu nowych biomarkerów. Istotność spektrometrii mas w tym kontekście badań podkreślono w 2002 r. nagrodą Nobla w dziedzinie chemii. Trawienie białka najczęściej odbywa się za pomocą trypsyny. Proteolityczne peptydy są wymywane i preparowane na płytce MALDI. MALDI-TOF MS zapewnia dobrą kompatybilność wysokiej przepustowości, a także dobrą czułość w zakresie niskich wartości femtomoli. Identyfikacja białka zależy od masowego odcisku palca peptydowego, który używany jest do przeszukiwania bazy danych sekwencji białek. W badaniach MS/MS pierwszym etapem jest wybranie jonu prekursorowego i rozdrobnienie go na kawałki. Natomiast drugim etapem jest masowa analiza powstałych fragmentów. Jony fragmentów powstałe w wyniku rozszczepienia szkieletu peptydowego są najbardziej korzystne dla identyfikacji białka, z tego względu iż pozwalają na swoistą identyfikację i szybkie wyszukiwanie komputerowe baz danych sekwencji białek.