

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ КАРЕЛЬСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
(ИБ КарНЦ РАН)



УТВЕРЖДАЮ

Директор ИБ КарНЦ РАН
член-корр. РАН

 Н.Н. Немова

«18» сентября 2014 г.

РАБОЧАЯ ПРОГРАММА ДИСЦИПЛИНЫ
«Белки и пептиды. Методы исследования»

для обучающихся по Основной образовательной программе высшего образования –
программе подготовки кадров высшей квалификации по направлению
06.06.01 Биологические науки, направленность «Биохимия»

Принято Ученым советом ИБ КарНЦ РАН 18.09.2014 г. протокол № 5.

Рабочая программа по дисциплине «Белки и пептиды. Методы исследования» разработана в соответствии с требованиями федерального государственного образовательного стандарта, утвержденного Приказом Минобрнауки РФ от 30 июля 2014 г. № 871 «Об утверждении федерального государственного образовательного стандарта высшего образования по направлению подготовки 06.06.01 Биологические науки (уровень подготовки кадров высшей квалификации)». Принята на Ученом совете ИБ КарНЦ РАН 18.09.2014 г. протокол № 5.

Разработчики программы:

Директор ИБ КарНЦ РАН,
главный научный сотрудник
лаборатории экологической
биохимии ИБ КарНЦ РАН
чл.-корр. РАН, профессор, д.б.н.



Н.Н. Немова

Заместитель директора по научной
работе ИБ КарНЦ РАН,
руководитель Отдела аспирантуры,
ведущий научный сотрудник
лаборатории экологической биохимии
ИБ КарНЦ РАН
к.б.н.



О.В. Мещерякова

Главный научный сотрудник
лаборатории экологической
биохимии ИБ КарНЦ РАН
профессор, д.б.н.



Р.У. Высоцкая

Ведущий научный сотрудник
лаборатории экологической
биохимии ИБ КарНЦ РАН
д.б.н., с.н.с.



Л.П. Смирнов

Пояснительная записка

Современный этап развития методов химии белка позволяет решать чрезвычайно разнообразный круг задач. Освоение этих подходов в обучении аспирантов в известной мере повторяет все последовательные исторические этапы развития этой области исследования. Высокоэффективные и специфичные методы выделения, очистки и характеристики белков включают методы осаждения, хроматографии, гель-фильтрации, ультрацентрифугирования, гель-электрофореза, иммуноблоттинга, иммуногистохимии, аминокислотного анализа и секвенирования белков. Исследование белков с ферментативной активностью, химическая характеристика их активных центров основаны на использовании специфичных ингибиторов и субстратов. Данные рентгеноструктурного анализа – чрезвычайно информативный источник для изучения нативной конформации и индуцированных конформационных переходов биомолекул, они также необходимы для систематизации и эволюционной классификации исследуемых белков. В настоящее время прогресс в изучении химии и биологии белков достигается, главным образом, за счет развития концепций и экспериментальных подходов масс-спектрологии, многомерного ЯМР и компьютерного моделирования структуры белка с использованием различных типов алгоритмов. Методы биоинформатики (применительно к белкам – протеомики) требуют от специалистов знания и умелого использования информационных ресурсов, содержащих информацию о белках (NCBI Entrez, Swiss-Prot, SCOP, PDB и др.). Совокупность указанных подходов позволяет установить химические и биологические параметры изучаемого белка и сделать выводы о его функции, что расширяет границы знаний о структурно-функциональном многообразии белков живых организмов. Вся совокупность этих достижений позволяет решать практические задачи, преследуемые в биологии, биотехнологии и медицине по созданию белков с заданными физиологическими свойствами, регуляции ферментативной активности *in vivo* и др.

Для того чтобы эффективно использовать современные биохимические методы для исследования белков, необходимы глубокие знания в самых разнообразных областях (биохимии, физиологии, физико-химической биологии, биофизики, математики, компьютерных технологий и др.). Таким образом, предложенный образовательный курс призван интегрировать полученные аспирантами новые знания, навыки и представления о многообразии экспериментальных и теоретических подходов в научный базис, заложенный в классических образовательных программах высшей школы. Ознакомление аспирантов с современными методами химии белковых соединений и энзимологии должно стать методологической составляющей их самостоятельной исследовательской работы.

1. Цель освоения дисциплины

Цель освоения дисциплины – освоение необходимых в исследовательской работе методических подходов к выделению, очистке и характеристике белков, формирование представления о многообразии существующих методов и задач, которые с их помощью можно решать.

Задачей преподавания данной дисциплины является формирование у аспирантов соответствующих знаний, умений и навыков в области современных методических приемов белковой химии, а также способности к их применению в самостоятельной исследовательской работе.

2. Место дисциплины в структуре основной образовательной программы

Дисциплина относится к вариативным элективным дисциплинам Блока 1, является обязательной и направлена на сдачу кандидатского экзамена по Биохимии (код дисциплины: Б1.В.ЭД2.)

3. Требования к уровню подготовки аспиранта, завершившего изучение данной дисциплины

Аспиранты, завершившие изучение данной дисциплины, должны:

– **знать:**

- белковый и пептидный состав биологических тканей, иметь углубленные сведения о строении веществ белковой природы, входящих в состав живых организмов. и о методах, позволяющих выделить полипептиды из тканей организмов и изучить структуру;
- функции белковых соединений в жизнедеятельности организма во всем их многообразии и современные методы их идентификации;
- структурные особенности белков с ферментативной активностью, механизмы действия ферментов и их роль в обменных процессах, механизмы регуляции их активности, а также методы, позволяющие установить эти параметры;
- основные направления методы биохимических исследований;
- теоретические основы химического синтеза белков и пептидов;
- основы биоинформационных методов в протеомике;

– **уметь:**

- ориентироваться в разнообразии и назначении методических подходов, связанных с выделением, очисткой и изучением свойств белков и пептидов;
- работать с биохимическим оборудованием и аппаратурой;
- использовать методы теоретического и экспериментального исследования различных аспектов структурно-функциональной характеристики веществ белковой природы;
- проводить качественный и количественный анализ биологического материала;
- использовать новейшие достижения в области практической химии белка для формулирования и решения практических задач;
- ориентироваться в источниках информации по химии и биологии белков и пептидов;

– **владеть:**

- методами биохимических исследований, навыками постановки и проведения эксперимента.

4. Объем дисциплины и виды учебной работы

Общая трудоемкость дисциплины составляет 5 зачетных единиц (180 часов), в т.ч.:

Вид учебной работы	Объем часов / зачетных единиц
Обязательная аудиторная учебная нагрузка (всего)	108/3
в том числе:	
лекции	36/1
практические занятия	54/1,5
семинары	18/0,5
Самостоятельная работа аспиранта (всего)	72/2

в том числе:	
подготовка к семинарам	36/1
подготовка к контрольным работам, реферату	36/1
Всего	180/5
Вид контроля по дисциплине	зачет

5. Содержание дисциплины:

5.2 Наименование и содержание тем лекционных занятий:

№ п/п	Наименование тем лекционных занятий и их содержание	Кол-во час.
1.	<p>Аминокислоты: химический состав, свойства, биологические функции</p> <p>История исследования аминокислот. Распространение, структура и свойства аминокислот. Номенклатура аминокислот. Трехбуквенная и однобуквенная системы обозначения аминокислот. Классификация аминокислот. Типы боковых групп. Стереои́зомерия аминокислот. Электронные спектры поглощения и кислотно-основные свойства аминокислот в растворах. Понятие и значения рК и рI. Буферные системы на примере буферных систем крови. Уравнение Гендерсона-Хассельбальха. Физические и химические свойства аминокислот. Реакции по γ-карбоксылльной группе. Реакции по ϵ-аминогруппе. Групповые реагенты на аминокислоты. Специфические реагенты на аминокислоты. Разработка методов синтеза аминокислот.</p>	2
2.	<p>Белки: химический состав, свойства, биологические функции</p> <p>История исследования белка. Начальные этапы в химии белка. Теория «углеазотных комплексов» А.Я. Данилевского. Теория «киринов» А. Косселя. Пептидная теория Э. Фишера. Кризис пептидной теории. Пептидная связь. Химическая структура белка. Элементный состав белков. Полипептидная цепь, отличие гомо- и гетерополимерных цепей. Белок как гетерополимерная цепь, виды записи белковых последовательностей. Определение числа полипептидных цепей в белке. Понятие о первичной, вторичной, третичной и высших структурах белка. Первичная структура белка. Пространственная структура белков. Структурная роль пептидной связи. Геометрические параметры пептидной связи. Вторичная структура белка и факторы, влияющие на ее образование. Спиральные структуры. Структура складчатого листа. Третичная структура белка. Четвертичная структура белка. Функциональное значение четвертичной структуры белка. Гибридные олигомерные белки. Домены в белках. Свойства. Классификация белков. Протеины и протеиды. Понятие простетической группы. Свойства белковой молекулы. Поведение белков в растворах.</p>	4

	<p>Кислотно-основные свойства белков. Осаждение белков из растворов в виде солей. Растворимость белков и факторы ее определяющие. Зависимость растворимости белков от pH среды. Зависимость растворимости белков от ионной силы раствора. Зависимость растворимости белков от полярности растворителя. Зависимость растворимости белков от температуры. Осмос и мембранное равновесие. Размер и форма белковых молекул. Оптические свойства белков. Дисперсия оптической активности. Поглощение белками света в УФ-, видимой и ИК-областях спектра.</p>	
3.	<p>Методы выделения и количественного определения белков.</p> <p>Отбор и консервация проб из биологических источников для последующего выделения и очистки белков. Пробоподготовка. Источники белков и их специфика. Принципы выбора источника для выделения требуемого белка. Внутриклеточные, мембранные и секретируемые ферменты. Гомогенизация биоматериала: приемы и оборудование. Приготовление грубых экстрактов. Методы разрушения клеток: лизоцим, осмотический шок, ультразвук, Френч-пресс и др. Центрифугирование и ультрацентрифугирование. Устройство ультрацентрифуги.</p> <p>Методы количественного определения белка в биопробах (растворимых, мембраносвязанных, в сухом веществе). Частные методы разделения белков. Методы микро-Кьельдаль, формольного титрования. Методы окрашивания: по Лоури, по Бредфорд, нингидриновый, с флуорескамином, о-фталевым диальдегидом, ВСА. Окрашивание после осаждения белка на миллипоровый фильтр. Кинетика окрашивания серебром. Эффект предварительного кислотного гидролиза на чувствительность определения концентрации белка. Определение белка по поглощению UV. Спектрофотометрические методы, минимизация вклада поглощения нуклеиновых кислот.</p>	3
4.	<p>Методы концентрирования белков. Электрофорез белков.</p> <p>Основные этапы выделения и очистки белков. Оборудование и реактивы. Методы концентрирования белка. Осаждение сульфатом аммония, органическими растворителями (спирт, ацетон). Ультрафильтрация (Амикон). Концентрирование с помощью полиэтиленгликолей, аквацида, сефадекса. Лиофилизация. Возможность побочных реакций при выделении белков (окисление, модификации в результате применяемых реагентов). Изoeлектрическое осаждение.</p> <p>Электрофорез. Физические основы электрофореза белков. Экспериментальные методы электрофореза. Фронтальный электрофорез. Электрофорез на бумаге. Электрофорез на полосках ацетата целлюлозы. Зональный электрофорез, подложки (целлюлоза, крахмал, полиакриламид). Ступенчатый и градиентный электрофорез в полиакриламидном геле. Метод Лемли. Диск-электрофорез. Электрофорез белков и пептидов в денатурирующих условиях (7М мочевины, 0,1% додецилсульфат натрия). Неденатурирующий электрофорез. Двухмерный электрофорез. Растворимость белков при двухмерном электрофорезе. Метод изоэлектрофокусирования. Метод</p>	3

	<p>О'Фаррелла. Изотахорез. Диагональный электрофорез. Количественная оценка радиоизотопномеченных белков в полиакриламидном геле. Количественный метод определения белка в полиакриламидном геле. Специфика выделения крупных пептидов (агрегация, плохая растворимость). Маркеры. Визуализация полос: кумасси, нитрат серебра, флюоресценция. Элюция белка из геля, удаление детергентов.</p>	
5.	<p>Хроматографические методы в исследовании белков и пептидов. История препаративной хроматографии. Виды хроматографии. Сорбция. Ситовой эффект. Распределительная хроматография в жидкой фазе и в тонком слое, понятие о коэффициенте распределения, Rf. Метод бумажной хроматографии. Метод тонкослойной хроматографии. Метод газо-жидкостной хроматографии. Хроматографическая очистка белков. Адсорбционная хроматография (окись алюминия, силикагель, гидроксипатит). Гель-хроматография в жидкой фазе, эффект молекулярного сита, понятие исключенного объема. Сефадекс, Сефароза, биогель, ультрагель, сефакрил и пр. Ионообменная хроматография, аниониты, катиониты, октил- и фенил-Сефароза. Процедура хроматографирования белков методом ионообменной хроматографии. Обратнофазная хроматография. Аффинная хроматография, принцип и возможности. Подложка (полисахарид, полиакриламид, пористое стекло), проблема минимизации неспецифической сорбции. Методы активации подложки: бромциан, периодат, эпоксиды, цианурхлорид, диазотизация. Методы введения различных функциональных групп. Проблема «руки». Получение сорбентов повышенной емкости. Количественная оценка иммобилизованного лиганда. Техника эксперимента. Очистка белков от низкомолекулярных примесей. Высокоэффективная жидкостная хроматография. HPLC, FPLC. Принцип высокого разрешения (монодисперсность и малые размеры гранул, их высокая пористость и жесткость, минимизация диффузионных процессов). Оборудование, разнообразие типов сорбентов.</p>	3
6.	<p>Иммунохимические методы. Получение антител. Антигенные свойства белков и нуклеиновых кислот. Моноклональные и поликлональные антитела. Реакция иммунопреципитации. Радиоиммунологический анализ. Иммуноферментный анализ (ELISA). Принципы и применение иммуноэлектрофореза. Перенос белка из геля на нитроцеллюлозную мембрану. Электроблоттинг, капиллярный, полусухой перенос. Вестерн-блот анализ, принцип и применение. Антитела, меченые щелочной фосфатазой, пероксидазой хрена, бета-галактозидазой, дигоксигенином. Радиоизотопномеченные вторичные лиганды. Конъюгация антител с флуорохромами, биотином, авидином. Иммуноблоттинг белков, разделенных методом двухмерного электрофореза. Детекция результатов Вестерн-блота: ECL, иммунозолото, хемифлюоресценция. Скрининг библиотек генов с помощью антител.</p>	3
7.	<p>Определение гомогенности белков. Определение молекулярной массы белков</p>	3

	<p>Критерии чистоты белковых препаратов. Контроль чистоты выделяемого белка. Оценка полноты очистки и гомогенности белков. Аналитическое ультрацентрифугирование. Электрофорез в нативных и денатурирующих условиях. Иммунохимические методы. Определение N- и C-концевых аминокислотных остатков: метод Сенджера, метод Эдмана, гидразиолиз, карбоксипептидазы. Идентификация белков.</p> <p>Методы определения молекулярной массы белков. Определение молекулярной массы по осмотическому давлению. Определение молекулярной массы по давлению насыщенных паров. Определение молекулярной массы методами эбулиоскопии и криоскопии. Определение молекулярной массы методом светорассеяния. Определение молекулярной массы методом гель-фильтрации. Определение молекулярной массы белков методом гель-электрофореза. Определение молекулярной массы методом седиментации. Метод седиментационного равновесия. Метод приближения к седиментационному равновесию. Диффузия и коэффициент диффузии.</p>	
8.	<p>Методы экспериментального исследования структуры белков. Секвенирование белка.</p> <p>Определение аминокислотного состава белка. Проблема определения триптофана, цистеина, цистина. Необычные аминокислоты. Установление C-концевых и N-концевых остатков пептидных цепей: динитрофенильный и дансильный методы. Методы фрагментации полипептидной цепи. Гидролиз белка: кислотный, щелочной, их особенности, преимущества и недостатки. Последовательная деградация пептидов по методу Эдмана, его модификации ("дансил-Эдман", субстратный метод). Методы идентификации ФТГ- и дансил-аминокислот. Ферментативная фрагментация. Использование амино- и карбоксипептидаз. Специфичность действия различных протеиназ: трипсин, химотрипсин, пепсин, термолизин, эластаза, субтилизин, папаин, стафилококковая протеаза. Характеристика протеаз с высокой и широкой специфичностью. Современное состояние проблемы последовательной деградации белков и пептидов с C-конца. Карбоксипептидаза А. Триптический гидролиз белка только по остаткам лизина, аргинина или цистеина. Химическая фрагментация. Механизмы реакций химической фрагментации. Химические методы специфического расщепления белка: по остаткам триптофана, метионина, по связям Asn-Gly, Asp-Pro, аминокислота-цистеин. Установление аминокислотной последовательности фрагментов белковых молекул. Автоматическое определение аминокислотной последовательности. Основные принципы работы секвенатора. Возможные источники ошибок. Брауницеровские реагенты. Твердо- и газофазный секвенаторы. Повышение чувствительности. Переход на пикомольный уровень, флуорескамин, о-фталевый диальдегид. Предварительные исследования белков перед секвенированием. Пептидное картирование. Методы определения дисульфидных мостиков. Использование методов диагонального электрофореза и ковалентной хроматографии для выделения цистин- (и цистеин-) содержащих пептидов. Альтернативные методы определения первичной структуры: сиквенс по гену, сравнения методов.</p>	3

9.	<p>Белки с ферментативной активностью. Методы изучения кинетики ферментативной реакции.</p> <p>Классификация и номенклатура ферментов. Шифр фермента. Единицы ферментативной активности и принципы ее определения. Роль ферментов в обмене веществ. Химическая природа ферментов. Отличия ферментов от небелковых катализаторов. Механизм действия ферментов. Энергия активации и энергетический барьер. Активный и аллостерический центры и их роль. Строение активного центра. Роль контактного и каталитического участков. Двухкомпонентные ферменты. Роль коферментов в ферментативном катализе. Изоферменты. Мультиэнзимные комплексы.</p> <p>Кинетика ферментативного катализа. Влияние факторов среды на кинетику ферментативной реакции. Эффекты температуры, pH среды, ионной силы и концентрации субстрата. Уравнение Михаэлиса-Ментен. Константа Михаэлиса и максимальная скорость реакции. Графический метод расчета кинетических констант. Методы изучения активного центра фермента. Специфичность действия ферментов. Специфичность по отношению к типу катализируемой реакции, субстратная специфичность (абсолютная, групповая, стереохимическая). Ферменты группы протеаз: сериновые, цистеиновые, аспартатные, треониновые, металлопротеиназы. Структура активного центра, механизм функционирования, понятие об ацилферменте. Вклад химических методов в изучение структуры и механизма функционирования активного центра ферментов. Механизмы регуляции активности ферментов. Активаторы и ингибиторы. Типы ингибирования и их практическое значение. Ингибиторы ферментов как инструмент их исследования. Механизмы ингибирования. Кинетика ингибирования. Константа ингибирования. Определение кинетических параметров односубстратной реакции в присутствии ингибитора.</p>	3
10.	<p>Масс-спектрометрия. Рентгеноструктурный анализ.</p> <p>Основные принципы образования масс-спектра. Процессы ионизации и принципиальные схемы масс-спектрометров. Понятие о ESI- и MALDI-масс-спектрометрии. Чувствительность этих методов и их сравнительная оценка. Задачи, решаемые с помощью ESI-MS и MALDI-MS: определение молекулярных масс и структуры синтетических и выделенных из природных объектов биополимеров; исследование свертывания белков, нековалентных комплексов, первичной структуры биополимеров. Требования к пептидам, анализируемым методом масс-спектрометрии. Методы подготовки пробы для масс-спектрометрии. Общие принципы масс-спектрометрического определения аминокислотной последовательности. Фрагментации первичных молекулярных ионов пептидов. Введение в пептид дейтериевой метки. Электронная микроскопия. Подготовка и окрашивание образцов. Оттенение. Трехмерная электронная микроскопия. Молекулярная электронная микроскопия. Рентгеноструктурный анализ. Краткие сведения об аппаратуре. Физические основы РСА. Характеристическое рентгеновское излучение. Дифракция рентгеновских лучей на кристаллах. Проблема начальных фаз в РСА. Особенности РСА белков. Использование синхронного излучения. Принципы и приемы кристаллизации. Фазовая проблема и методы ее решения. Метод изоморфных замещений. Разрешение. Точность. Ограничения метода.</p>	3

	Использование вычислительной техники в рентгеноструктурных исследованиях. Методы уточнения структуры. Метод молекулярных замещений. Исследование фермент-субстратных комплексов методом разностных синтезов. Основные направления современных рентгеноструктурных исследований. Использование компьютерной графики.	
11.	<p>Методы иммобилизации ферментов.</p> <p>Иммобилизация белков (ферментов). Общие определения. Преимущества иммобилизованных препаратов биокатализаторов. Типы иммобилизации. Основные методы иммобилизации: ковалентное присоединение фермента к водорастворимым и водонепроницаемым подложкам, адсорбция на специфичных поверхностях, окклюдование и капсулирование, внутри- и межмолекулярные сшивки фермента и др. Носители для иммобилизации белков (ферментов). Классификация. Приемы активации носителей. Физическая иммобилизация. Сравнительный анализ типов физической иммобилизации. Химическая иммобилизация. Выбор групп-мишеней (белка) для иммобилизации. Химические реакции, приводящие к созданию связей белок-носитель. Области применения химически иммобилизованных белков (ферментов). Кинетические закономерности катализа иммобилизованными ферментами. Конформационное состояние иммобилизованного фермента. Эффекты распределения компонентов системы с иммобилизованными ферментами. Понятие о кинетическом и диффузионных режимах протекания ферментативной реакции. Стабильность иммобилизованных ферментов. Обратимая денатурация и необратимая инактивация ферментов. Понятие о стабилизации фермента как следствие его иммобилизации, ее особенности: стабилизация против микробиальной и протеолитической деградации, автолиза, агрегации, денатурации, диссоциации, pH-инактивации, инактивации органическими растворителями, кислородом воздуха и среды. Иммобилизация клеточных органелл и целых клеток. Применение иммобилизованных ферментов в научных исследованиях, медицине и производстве. Техническая энзимология. Использование ферментных препаратов в пищевых технологиях. Промышленное производство ферментов.</p>	3
12.	<p>Синтез белков и пептидов. Биоинформатика в системе методов изучения структуры и функций белка</p> <p>Представление о химическом синтезе белков и пептидов. Методы защиты аминогруппы. Защитные группы уретанового типа. Алифатические защитные группы уретанового типа. Защитные группы алкильного типа. Методы защиты карбоксильной группы. Этерификация. Гидразидная группа. Защита карбоксильной группы путем солеобразования. Классические методы, твердофазный метод, синтезатор Меррифилда. Примеры синтеза белков. Метод смешанных ангидридов. Хлорангидридный метод. Смешанные ангидриды с моноэфирами угольной кислоты. Азидный метод. Пептидный синтез с использованием активированных эфиров. Пептидный синтез с использованием соединений с кратными C-N и C-C связями. Карбодиимиды. Цианамиды. Этоксиацетилен. Активированные соединения ряда гетероциклических амидов. Имидазольный метод.</p>	3

	<p>Активация путем образования производных оксазола. Синтез пептидов путем активирования аминокислотной группы. Получение пептидов с помощью ферментов. Использование протеаз для синтеза пептидов. Рацемизация аминокислот в пептидном синтезе. Инженерия белков. Получение мутантных белков методами сайт-специфического мутагенеза. Получение слитых белков. Синтез белков de novo.</p> <p>Методы биоинформатики в исследовании многообразия, структуры, эволюционного происхождения белков. Биоинформатика и интернет. NCBI как модель базы данных. Базы данных структур (PDB, MMDB и др.). Геномное картирование, базы данных. Биологические базы данных. Методы выравнивания последовательностей и поиск в базах данных. Методы выравнивания и анализ множества последовательностей. Предиктивные методы с использованием последовательностей ДНК. Предиктивные методы с использованием белковых последовательностей. Филогенетический анализ.</p>	
Итого часов/зачетных единиц		36/1

5.2 Содержание практических занятий:

№ п/п	Наименование тем практических занятий	Кол-во час.
1.	<p>Методы идентификации аминокислот и количественные методы определения белка.</p> <p>Универсальные и специфические цветные реакции на белки и пептиды, хроматография аминокислот. Количественное определение белка (растворимого, мембраносвязанного, в сухом веществе) в биопробах. Получение различных белковых фракций тканей животного (центрифугирование, обработка детергентами). Определение белка методами Кьельдаля, формольного титрования, по Лоури, по Бредфорд, с помощью нингидрина, флуорескамина, <i>o</i>-фталевого диальдегида.</p>	8
2.	<p>Получение препаратов белков грубой очистки и идентификация и компонентов.</p> <p>Выделение сложных белков: нуклеопротеинов из дрожжей, казеина из молока и гликопротеинов из слюны. Методы разрушения клеток бактерий и эукариот; осаждение методом высаливания сульфатом аммония, определение изоэлектрической точки белков; ультрацентрифугирование, гидролиз сложных белков и качественное определение их компонентов; количественное определение содержания белка в дрожжах.</p>	8
3.	<p>Электрофорез белков.</p> <p>Электрофорез частично очищенного белка из тканей животных в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия по методу Лемли. Количественное определение белка в полиакриламидном геле. Установление молекулярной массы субъединиц исследуемого белка в денатурирующих условиях при помощи маркеров молекулярной массы. Визуализация полос: сравнение окраски нитратом серебра и кумасси.</p>	8
4.	<p>Вестерн-блот анализ как способ определения количества и идентификации белка.</p>	10

	Полусухой перенос белка из полиакриламидного геля на нитроцеллюлозную мембрану. Вестерн-блот анализ: связывание с первичными моноклональными и поликлональными антителами, связывание со вторичными антителами, мечеными пероксидазой хрена. Детекция результатов Вестерн-блота с помощью системы ECL, количественная оценка хемифлюоресценции.	
5.	Белки с ферментативной активностью. Методы изучения активного центра фермента (на примере протеаз) Специфичность действия ферментов; количественное определение активности ферментов в тканях животного; влияние температуры, pH, активаторов и ингибиторов на активность ферментов. На примере кальпаинов и 20S и 26S протеасом. Тестирование активности ферментов методом неденатурирующего электрофореза (зимография).	10
6.	Иммуногистохимия и флюоресцентная микроскопия. Получение гистопрепарата органа животного, окраска антителами, конъюгированными с флюорогенной меткой, детекция флюоресценции. Оценка количества, локализации и солокализации изучаемых белков в ткани. На примере протеазы лизосом катепсина D и белка лизосомальной мембраны LAMP-2.	10
Итого часов/зачетных единиц		54/1,5

5.3 Содержание семинарских занятий:

№ п/п	Наименование тем семинарских занятий	Кол-во час.
1.	Функциональная классификация белков и пептидов: ферментативная, транспортная, запасная, защитная, сократительная, структурная, гормональная, белки-токсины и т.д. Условность классификации. Опрос по теме.	3
2.	Домены как структурная и функциональная единица в структуре белка. Многообразие доменов. Основные классы структур доменов. Методы изоляции доменов из полноразмерных молекул белков. Базы данных белковых доменов. Домен как единица эволюции белков.	3
3.	Хроматография в системе методов изучения структуры и свойств белка. Виды хроматографии, неподвижная и подвижная фазы, современные типы носителей. Проблемы, решаемые при помощи хроматографии биопробы. Ограничения метода. Опрос по теме.	3
4.	Методы химической модификации белков. Получение мутантных белков методами сайт-специфического мутагенеза. Экспрессия изучаемого белка в клетках модельного организма.	3
5.	Регуляция активности ферментов Ключевые регуляторные ферменты. Аллостерическая регуляция и ингибирование. Активация зимогена. Регуляция активности ферментов по типу обратной связи, регуляция субстратом, кофактором. Пространственное разделение (компартментализация). Видовые различия в механизмах регуляции. Гормональная регуляция. Генетический контроль синтеза ферментов. Контрольная работа.	3
6.	Посттрансляционная модификация белков Химическая модификация, протеолитический процессинг, белковый	3

сплайсинг. Иодирование остатков тирозина. Образование остатков γ -карбоксиглютаминовой кислоты. Гидроксилирование белков. Ацетилирование и ADP-рибозилирование белков. Фосфорилирование белков. Протеинкиназы и протеинфосфатазы. Сульфатирование тирозина. Протеолитический процессинг предшественников биологически активных пептидов. Сплайсинг белков (интеины). Избирательная деградация белков. Выполнение тестов.	
Итого часов/зачетных единиц	18/0,5

6. Самостоятельная работа аспиранта

№ п/п	Вид и наименование тем самостоятельной работы	Кол-во час.
1.	Подготовка к контрольной работе на тему «Основные проблемы выделения в индивидуальном виде компонентов из живых организмов».	12
2.	Работа с литературой и подготовка к семинару-дискуссии на тему «Функциональная классификация белков и пептидов»	6
3.	Работа с литературой и подготовка к семинару-дискуссии на тему «Домены как структурная и функциональная единица в структуре белка»	6
4.	Подготовка к семинару-конференции на тему «Хроматография в системе методов изучения структуры и свойств белка»	6
5.	Работа с литературой и подготовка к семинару-дискуссии на тему «Методы химической модификации белков»	6
6.	Подготовка к контрольной работе на тему «Структура активных центров и механизм действия ферментов. Специфичность ферментативного катализа»	12
7.	Работа с литературой и подготовка к семинару-конференции на тему «Регуляция активности ферментов».	6
8.	Работа с литературой и подготовка к семинару-конференции на тему «Посттрансляционная модификация белков»	6
9.	Подготовка реферата на тему «Методы изучения белок-белковых взаимодействий».	12
	Итого часов/зачетных единиц	72/2

Примечание. Аспиранты могут сами предлагать темы рефератов касающихся методических аспектов в рамках темы их исследовательской работы.

7. Учебно-методическое и информационное обеспечение дисциплины

Основная литература:

1. Bioinformatics. A practical guide to the analysis of genes and proteins. 2nd edn. Baxevanis A.D., Francis Ouellette B.F. (eds.), John Wiley & Sons, Inc., 2001. 470 p.
2. Enzymes: A practical introduction to structure, mechanism, and data analysis. 2nd edn. Robert A. Copeland (ed.). Wiley-VCH, 2000. 390 p.
3. Protein Engineering (A Practical approach). IRL Press, OXFORD, NY, Toronto A.R. Rees (ed).

4. The Protein Protocols Handbook. 2nd edn. John M. Walker (Ed.), Humana Press Inc., 2002:1146 p.
5. Гааль Э., Медьеша Г., Верецкеи Л. Электрофорез в разделении биологических макромолекул. М.: Мир, 1982. 448 с.
6. Коничев А. С. Биохимия и молекулярная биология / А. С. Коничев, Г. А. Севастьянова. – М.: Дрофа, 2008. – 359 с.
7. Корниш-Боуден Э. Основы ферментативной кинетики. Пер. с англ. М.: Мир, 1979. 281 с.
8. Козн Ф. Регуляция ферментативной активности: Пер. с англ. – М.: Мир., 1986. 144 с.
9. Кротович В.Л. Введение в энзимологию. М.: Наука, 1986. 336 с.
10. Молекулярные основы действия ферментов : Сборник / под ред. С.Е. Северина и Г.А. Кочетова. – М.: Изд-во моск. ун-та, 1985. – 189 с.
11. Овчинников Ю.А. Биоорганическая химия. М.: Просвещение, 1987.
12. Остерман Л.А. Исследование биологических макромолекул электрофокусированием, иммуноэлектрофорезом и радиоизотопными методами. М.: Наука, 1983.
13. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: электрофорез и ультрацентрифугирование. М.: Наука, 1981.
14. Остерман Л.А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот. М.: Наука, 1985.
15. Плакунов В.К. Основы энзимологии. М., 2001.
16. Практическая химия белка: Пер. с англ. / Под ред. Дарбре А. М.: Мир, 1989.
17. Проблема белка: Структура и функция белка / Попов Е.М., отв. ред. Иванов В.Т., ред. Соркина Т.И. М.: Наука, 2000.
18. Синицын А. П., Райнина Е. И., Лозинский В. И., Спасов С.Д. Имобилизованные клетки микроорганизмов. М.: Изд. МГУ. 1994.
19. Скоупс Р. Методы очистки белков. М.: Мир, 1985.
20. Справочник биохимика / Доусон Р., Эллиот Д., Эллиот У, Джонс К.: Пер. с англ. М.: Мир, 1991.
21. Степанов В.М. Молекулярная биология. Структура и функции белков: Учеб. для биол. спец. вузов / под ред. А.С. Спирина. М.: Высшая школа, 1996. 335 с.
22. Тривен М. Имобилизованные ферменты. М.: Мир, 1983.
23. Эллиот В., Эллиот Д. Биохимия и молекулярная биология: Пер. с англ. М., 1999.

Дополнительная литература:

1. Nelson D., Cox M. Lehninger Principles of Biochemistry. 3rd ed. W.P., 2000.
2. Stryer L. Biochemistry. 4^d ed. New York, 2000.
3. Антонов В.К. Химия протеолиза / 2-ое изд. испр. и доп. М.: Наука, 1991. 504 с.
4. Биохимия. Под ред. Северина Е.С. – Изд-во «ГЭОТАР - МЕД», 2003 г., 779 стр.
5. Лысенко Л.А., Немова Н.Н., Канцерова Н.П. Протеолитическая регуляция биологических процессов. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2011. 482 с.
6. Льюин Б. Гены: Пер. с англ. М.: Мир, 1987.
7. Материалы V Российского симпозиума “Белки и пептиды». Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2011. 450 с.
8. Материалы VI Российского симпозиума “Белки и пептиды». Уфа: ИСЭИ УНЦ РАН, 2013. 298 с.
9. Материалы VII Российского симпозиума “Белки и пептиды». Новосибирск: ЗАО ИПП Офсет, 2015. 475 с.

10. Мещлер Д. Биохимия: В 3 т.: Пер. с англ. М.: Мир, 1980.
11. Молекулярная биология клетки. / Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж. и др.: Пер. с англ. М.: Мир, 1993.
12. Немова, Н. Н. Протеолитические ферменты : учеб. пособие / Н. Н. Немова, Л. А. Бондарева ; КарНЦ РАН, Ин-т биологии. - Петрозаводск, 2005. - 91 с.
13. Нортроп Д., Кунитц М., Херриотт Р. Кристаллические ферменты, пер. с англ. М.: Изд-во иностранной литературы, 1950. 346 с.
14. Пептидная нейропротекция. Сборник научных статей. СПб: Наука, 2009. 256 с.
15. Проблема белка: Пространственное строение белка / Попов Е.М., Демин В.В. и др., отв. ред. Иванов В.Т., ред. Соркина Т.И. М.: Наука, 1996.
16. Протеолитические ферменты: структура, функции, эволюция. VII Всероссийская конференция. Тез. докл. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2014. 160 с.

Лицензионное программное обеспечение

Access 2010 Russian Open License Pack NoLevel Academic Edition – программа для работы с базами данных;

Программное обеспечение в комплекте с научным оборудованием для анализа пептидов, белков, в т.ч. ферментов и изоферментов (спектрофотометры, спекорд, флюориметр, ИФА).

8. Вопросы к зачету по дисциплине «Белки и пептиды. Методы исследования»

Тема 1. Аминокислоты: химический состав, свойства, биологические функции

1. Распространение, структура и свойства аминокислот
2. Классификация аминокислот
3. Типы боковых групп аминокислот
4. Кислотно-основные свойства аминокислот в растворах
5. Буферные системы крови
6. Групповые и специфические реагенты на аминокислоты

Тема 2. Белки: химический состав, свойства, биологические функции

1. Пептидная связь. Структурная роль пептидной связи
2. Белок как гетерополимерная цепь. Определение числа полипептидных цепей в белке
3. Структурная роль пептидной связи
4. Геометрические параметры пептидной связи
5. Основные типы пространственной укладки полипептидной цепи
6. Гибридные олигомерные белки. Функции доменов и доменных ансамблей в структуре белка
7. Оптические свойства белковой молекулы
8. Осмотические и кислотно-основные свойства белковой молекулы
9. Растворимость белков и факторы, ее определяющие.

Тема 3. Методы выделения и количественного определения белков

1. Пробоподготовка для выделения белка
2. Принципы выбора источника для выделения требуемого белка
3. Методы разрушения клеток
4. Методы количественного определения белка в биопробах, основанные на цветных реакциях (спектрофотометрические)

5. Методы количественного определения белка в сухом веществе.

Тема 4. Методы концентрирования белков. Электрофорез белков

1. Основные этапы выделения и очистки белков.
2. Методы концентрирования белка: осаждение, ультрафильтрация, ПЭГ, изоэлектрическое
3. Физические основы электрофореза белков.
4. Метод Лемли
5. Неденатурирующий электрофорез
6. Двухмерный электрофорез
7. Количественный метод определения белка в полиакриламидном геле
8. Визуализация полос в геле

Тема 5. Хроматографические методы в исследовании белков и пептидов

1. Виды хроматографии
2. Метод газо-жидкостной хроматографии
3. Адсорбционная хроматография
4. Гель-хроматография в жидкой фазе
5. Ионообменная хроматография
6. Аффинная хроматография
7. Очистка белков от низкомолекулярных примесей
8. Высокоэффективная жидкостная хроматография

Тема 6. Иммунохимические методы

1. Моно- и поликлональные антитела
2. Иммуноферментный анализ
3. Перенос белка из геля на нитроцеллюлозную мембрану
4. Детекция результатов иммуноблоттинга

Тема 7. Определение гомогенности белков. Определение молекулярной массы белков

1. Критерии чистоты белковых препаратов
2. Определение молекулярной массы по осмотическому давлению
3. Определение молекулярной массы методом светорассеяния
4. Определение молекулярной массы методом гель-фильтрации
5. Определение молекулярной массы белков методом ДСН-гель-электрофореза
6. Определение молекулярной массы методом седиментации.

Тема 8. Методы экспериментального исследования структуры белков.

Секвенирование белка.

1. Установление C- и N-концевых остатков пептидных цепей: динитрофенильный и дансильный методы
2. Методы фрагментации полипептидной цепи
3. Последовательная деградация пептидов по методу Эдмана
4. Кислотный и щелочной гидролиз белка
5. Ферментативная фрагментация белка
6. Химическая фрагментация белка
7. Установление аминокислотной последовательности фрагментов белковых молекул
8. Основные принципы работы секвенатора
9. Альтернативные методы определения первичной структуры

Тема 9. Белки с ферментативной активностью. Методы изучения кинетики ферментативной реакции.

1. Классификация и номенклатура ферментов
2. Механизм действия ферментов. Энергия активации и энергетический барьер
3. Кинетика ферментативного катализа. Основные понятия и уравнения
4. Влияние факторов среды на кинетику ферментативной реакции
5. Эффекты температуры, pH среды, ионной силы и концентрации субстрата
6. Методы изучения активного центра фермента
7. Структура активного центра, механизм функционирования на примере протеаз
8. Ингибиторы ферментов как инструмент их исследования

Тема 10. Масс-спектрометрия. Рентгеноструктурный анализ.

1. Основные принципы образования масс-спектра
2. Понятие о ESI- и MALDI-масс-спектрометрии
3. Задачи, решаемые с помощью ESI-MS и MALDI-MS
4. Требования к пептидам, анализируемым методом масс-спектрометрии
5. Электронная микроскопия
6. Рентгеноструктурный анализ. Физические основы РСА. Особенности РСА белков
7. Принципы и приемы кристаллизации
8. Основные направления современных рентгеноструктурных исследований

Тема 11. Методы иммобилизации ферментов.

1. Иммобилизация белков, общие определения
2. Основные методы иммобилизации
3. Кинетические закономерности катализа иммобилизованными ферментами
4. Стабильность иммобилизованных ферментов

Тема 12. Синтез белков и пептидов. Биоинформатика в системе методов изучения структуры и функций белка

- 1) Классические методы химического синтеза белков и пептидов
- 2) Методы защиты аминогруппы
- 3) Методы защиты карбоксильной группы
- 4) Синтез пептидов на твердой фазе (синтез Меррифилда)
- 5) Использование протеаз для синтеза пептидов
- 6) Методы биоинформатики в исследовании структуры белка
- 7) Примеры баз данных, принципы извлечения информации
- 8) Методы выравнивания последовательностей и поиск в базах данных
- 9) Филогенетический анализ.