

Минобрнауки России
Федеральное государственное
бюджетное учреждение науки
Федеральный исследовательский центр
«Карельский научный центр
Российской академии наук»
(КарНЦ РАН)

УТВЕРЖДАЮ

Врио председателя КарНЦ РАН
член-корр. РАН

_____ О.Н. Бахмет

« ____ » _____ 2018 г.

РАБОЧАЯ ПРОГРАММА ДИСЦИПЛИНЫ

«Белки и пептиды. Методы исследования»

Основной образовательной программы высшего образования –
программы подготовки научно-педагогических кадров в аспирантуре
по направлению подготовки
06.06.01 Биологические науки,
профиль: **Биохимия**

Принята Ученым советом КарНЦ РАН от 25 мая 2018 г. протокол № 07 .

Пояснительная записка

Рабочая программа дисциплины «Белки и пептиды. Методы исследования» составлена на основании следующих документов:

– Федеральный закон РФ от 29.12.2012 № 273-ФЗ «Об образовании в Российской Федерации»;

– Приказ Минобрнауки России от 19.11.2013 г. № 1259 «Об утверждении Порядка организации и осуществления образовательной деятельности по образовательным программам высшего образования – программам подготовки научно-педагогических кадров в аспирантуре (адъюнктуре)»;

– Приказ Министерства образования и науки Российской Федерации от 30.07.2014 № 871 «Об утверждении федерального государственного образовательного стандарта высшего образования по направлению подготовки 06.06.01 Биологические науки (уровень подготовки кадров высшей квалификации)» (в ред. Приказа Минобрнауки России от 30.04.2015 № 464);

– Положение о разработке и утверждении основных образовательных программ высшего образования – программ подготовки научно-педагогических кадров в аспирантуре (программ аспирантуры) и индивидуальных учебных планов обучающихся (принято Ученым советом КарНЦ РАН 27.06.2018, протокол № 8).

Составители программы:

Немова Нина Николаевна – член-корр. РАН, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории экологической биохимии ИБ КарНЦ РАН;

Лысенко Людмила Александровна – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории экологической биохимии ИБ КарНЦ РАН;

1. Цели и задачи 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 решаемых с их помощью задач в области химии и биологии азотсодержащих соединений (аминокислот, пептидов, белков). 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

Элективная дисциплина – обязательная по выбору аспиранта (Б1.В.ДВ1.1), направленная на сдачу кандидатского экзамена по научной специальности 03.01.04 Биохимия.

Относится к Блоку 1 «Дисциплины (модули)» (вариативная часть) ООП.

Период освоения – 2 семестр.

3. Входные требования для освоения дисциплины (модуля), предварительные условия

ЗНАТЬ:

иметь углубленные представления о составе и свойствах основных азотсодержащих соединений – аминокислот, пептидов, белков; белковом и пептидном репертуаре клеток, тканей и организмов, сведения о методах выделения пептидов и белков из тканей организмов и изучения их состава и структуры, истории возникновения и эволюции указанных методов;

разнообразие функций белковых соединений в жизнедеятельности организма и современные методы их изучения;

особенности структуры, механизма действия и регуляции белков с ферментативной активностью, их место в обменных процессах в организме, а также методы их изучения;

теоретические основы химического синтеза белков и пептидов, их прикладное значение; основы биоинформационных методов.

УМЕТЬ:

применять знания о многообразии и назначении существующих методов выделения, очистки и изучения свойств белков и пептидов и применяемом в них научном оборудовании и аппаратуре для формулирования и решения научных и практических задач, постановки эксперимента;

проводить качественный и количественный анализ биологического материала на содержание и состав белковых компонентов;

ориентироваться в источниках информации по химии и биологии белков и пептидов;

ВЛАДЕТЬ:

методами биохимических исследований, навыками постановки и проведения эксперимента.

4. Перечень компетенций выпускника аспирантуры, на формирование которых направлено освоение дисциплины

ПК-1: Способность генерировать теоретические знания и осваивать современные методы фундаментальных и прикладных исследований в области биохимии;

ПК-2: Способность генерировать теоретические знания и осваивать современные методы фундаментальных и прикладных исследований в области экологической биохимии;

ПК-3: Способность генерировать теоретические знания и осваивать современные методы фундаментальных и прикладных исследований в области биохимии белков и пептидов;

ПК-7: Способность планировать, организовывать и осуществлять экспериментальную работу в области биохимии;

5. Планируемые результаты обучения по дисциплине (модулю), соотнесенные с планируемыми результатами освоения образовательной программы (компетенциями выпускников)

ЗНАТЬ: особенности строения аминокислот, пептидов и белков, тканеспецифичность белкового состава, функции азотсодержащих соединений в жизнедеятельности организмов различных филогенетических групп, пути метаболизма аминокислот, пептидов и белков, теоретические основы биосинтеза белка, химического синтеза белков и пептидов, основы биоинформационных методов в протеомике и метаболомике;

структурные и функциональные особенности белков с ферментативной активностью, кинетику и механизмы действия ферментов, классификацию и роль в обменных процессах, механизмы регуляции ферментативной активности;

биохимические, аналитические, молекулярно-генетические и биоинформатические методы выделения, сепарирования, очистки, фрагментации, секвенирования, идентификации, изучения структуры, свойств, биологической активности, взаимодействия белковых молекул, возможности их применения для решения фундаментальных и прикладных научно-исследовательских задач в области биохимии.

УМЕТЬ:

используя теоретические знания, средства и сервисы поиска и анализа научной информации генерировать необходимые знания и сведения в области биохимии белков и пептидов

применить известные препаративные и аналитические методы для характеристики белкового и пептидного состава биологических тканей, строения, свойств и функций индивидуальных азотсодержащих веществ (аминокислот, пептидов, белков);

применить современные биохимические методы в области биохимии белков и пептидов для решения фундаментальных и прикладных научно-исследовательских задач.

ВЛАДЕТЬ:

навыками самостоятельной работы с литературой, поиска, анализа и обобщения теоретической и методологической информации в области биохимии белков и пептидов;

биохимическими, молекулярно-генетическими, биоинформатическими методами выделения, очистки, фрагментации, секвенирования, идентификации, изучения структуры, свойств, взаимодействий и функций соединений белковой природы;

навыками постановки и проведения эксперимента в области биохимии белков и пептидов, методами обработки и интерпретации полученных результатов.

6. Объем дисциплины и виды учебных занятий (в виде таблицы)

Общая трудоемкость дисциплины составляет 5 зачетных единиц, что составляет 180 часов.

Вид учебной работы	Объем часов / зачетных единиц
Объем дисциплины (всего)	180 / 5 з.е.
Аудиторная учебная нагрузка (всего), в том числе:	72 / 2 з.е.
лекции	18
практические занятия	36
семинары	18
Самостоятельная работа аспиранта (всего)	108 / 3 з.е.
Вид итогового контроля по дисциплине	Зачет

7. Структура дисциплины по темам (разделам) с указанием отведенного на них количества академических часов, видов учебных занятий, форм текущего контроля (см. Приложение)

8. Содержание тем (разделов) дисциплины

Лекционные занятия

№	Тема занятия	Кол-во час.
1	<p>Аминокислоты и белки: химический состав, свойства, биологические функции, развитие методов исследования.</p> <p>Распространение, структура и свойства аминокислот. Номенклатура аминокислот (трехбуквенная, однобуквенная системы обозначения). Классификация аминокислот. Типы боковых групп. Стереоизомерия 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-карбоксильной группе. Реакции по ϵ-аминогруппе. Групповые реагенты на аминокислоты. Специфические реагенты на аминокислоты. Разработка методов синтеза аминокислот.</p> <p>Химическая структура белка. Элементный состав белков. Полипептидная цепь, гомо- и гетерополимерные цепи. Белок как гетерополимерная цепь, виды записи белковых последовательностей. Понятия первичной, вторичной, третичной и высших структур белка. Структурная роль и геометрические параметры пептидной связи. Вторичные структуры (спиральные, складчатого листа) белка и факторы их образования. Упорядоченные и неупорядоченные вторичные структуры. Супервторичные структуры. Пространственная структура белков. Четвертичная структура белка, ее функциональное значение. Гибридные олигомерные белки. Домены в белках. Классификация белков. Протеины и протеиды. Понятие простетической группы. Свойства белковой молекулы. Размер и форма белковых молекул. Глобулярные и фибриллярные белки. Структура фибриллярных белков. Изoeлектрическая точка белков. Поведение белков в растворах.</p>	2

	<p>Кислотно-основные свойства белков. Осаждение белков из растворов в виде солей. Растворимость белков и факторы ее определяющие: рН среды, ионная сила раствора, полярность растворителя, температура. Осмос и мембранное равновесие. Поглощение белками света в УФ-, видимой и ИК-областях спектра. Конформационная динамика белковой молекулы. Денатурация белков и полипептидов. Фолдинг и рефолдинг. Шапероны. Прионы. Оптические свойства белков. Дисперсия оптической активности.</p>	
2	<p>Методы экстракции, концентрирования, разделения белков. Хроматографические методы в исследовании белков и пептидов. Оценка молекулярной массы белка.</p> <p>Основные этапы выделения и очистки белков. Пробоподготовка для выделения и очистки белков. Источники белков и их специфика. Принципы выбора источника для выделения целевого белка. Внутриклеточные, мембранные и секретируемые белки. Гомогенизация биоматериала: приемы и оборудование. Методы разрушения клеток: лизоцим, осмотический шок, ультразвук, френч-пресс и др. Центрифугирование и ультрацентрифугирование. Устройство ультрацентрифуги.</p> <p>Методы количественного определения белка в биопробах. 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). Изоэлектрическое осаждение.</p> <p>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, эпоксины, 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>	2
3	<p>Электрофорез белков. Иммунохимические методы идентификации белка.</p> <p>Электрофорез. Физические основы электрофореза белков, история</p>	2

	<p>метода. Фронтальный электрофорез. Ступенчатый и градиентный электрофорез в полиакриламидном геле. Метод Леммли – электрофорез белков и пептидов в денатурирующих условиях. Нативный электрофорез. Двухмерный электрофорез. Растворимость белков при двухмерном электрофорезе. Метод изоэлектрофокусирования. Метод О’Фаррелла. Изотахофорез. Диагональный электрофорез. Количественная оценка радиоизотопномеченных белков в полиакриламидном геле. Количественный метод определения белка в полиакриламидном геле. Маркеры. Визуализация полос: кумасси, нитрат серебра, флюоресценция, технология stain-free. Элюция белка из геля, удаление детергентов.</p> <p>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, иммуно-золото, хемифлюоресценция. Скрининг библиотек генов с помощью антител.</p>	
4	<p>Оценка гомогенности белков. Определение молекулярной массы белков</p> <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, гидразинолиз, 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>	2
5	<p>Белки с ферментативной активностью. Методы изучения кинетики ферментативной реакции. Имобилизация белков-ферментов</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.</p>	2

	<p>Мультиэнзимные комплексы. Кинетика ферментативного катализа. Влияние факторов среды на кинетику ферментативной реакции. Эффекты температуры, рН среды, ионной силы и концентрации субстрата. Уравнение Михаэлиса-Ментен. Константа Михаэлиса и максимальная скорость реакции. Методы изучения активного центра фермента. Специфичность действия ферментов. 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. 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. 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. Стабилизация иммобилизованного фермента против микробиальной и протеолитической деградации, автолиза, агрегации, денатурации, диссоциации, рН-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>	
6	<p>Методы экспериментального исследования структуры белков. Секвенирование белка. Определение аминокислотного состава белка. Проблема определения триптофана, цистеина, цистина. Необычные аминокислоты. Установление С-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 amino- и</p>	2

	<p>карбоксипептидаз. Специфичность действия различных протеиназ: трипсин, химотрипсин, пепсин, термолизин, эластаза, субтилизин, папаин, стафилококковая протеаза. Характеристика протеиназ с высокой и широкой специфичностью. Современное состояние проблемы последовательной деградации белков и пептидов с С-конца. Карбоксипептидаза А. Триптический гидролиз белка 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, Xx-Cys. Установление аминокислотной последовательности фрагментов белковых молекул. Автоматическое определение аминокислотной последовательности. Основные принципы работы секвенатора. Возможные источники ошибок. Браунищеровские реагенты. Твердо- и газожазный секвенаторы. Повышение чувствительности. Переход на пикомольный уровень, флуорескамин, офталевый 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, сравнение методов.</p>	
7	<p>Масс-спектрометрия. Электронная микроскопия. 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. Подготовка и окрашивание образцов для электронной микроскопии. 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. 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.</p>	2
9	<p>Синтез белков и пептидов. Биоинформатика в системе методов изучения структуры и функций белка</p>	2

	<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 С-N и С-С связями. Карбодиимиды. Цианамиды. Этоксиацетилен. Активированные соединения ряда гетероциклических амидов. Имидазolidный метод. Активация путем образования производных оксазола. Синтез пептидов путем активирования аминогруппы. 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	18

Практические занятия

№	Тема занятия	Кол-во час.
1	<p>Количественные методы определения белка в растворе. Универсальные и специфические цветные реакции на белки и пептиды. 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, о-фталевого диальдегида. Количественное определение содержания белка в дрожжах. Анализ и сравнение результатов, полученных разными методами. Опрос по теме</p>	6
2	<p>Получение препаратов белков грубой очистки, разделение, очистка компонентов. Выделение сложных белков: нуклеопротеинов из дрожжей, казеина из молока и гликопротеинов из слюны. Методы разрушения клеток, осаждение методом высаливания сульфатом аммония, определение изоэлектрической точки белков, ультрацентрифугирование, гидролиз сложных белков, хроматографическое разделение препарата грубой очистки</p>	6
3	<p>Электрофорез белков в денатурирующих условиях.</p>	6

	Электрофорез частично очищенного белка из тканей животных в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия по методу Леммли. 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.	
4	Вестерн-блот анализ как полуколичественный метод оценки содержания и способ идентификации целевого белка. 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.	6
5	Иммуногистохимия и флюоресцентная микроскопия. Получение гистопрепарата органа животного, окраска антителами, конъюгированными с флюорогенной меткой, детекция флюоресценции. Визуализация результата. Оценка количества, локализации и солокализации изучаемых белков в ткани (на примере протеиназы лизосом катепсина D и белка лизосомальной мембраны LAMP-2).	6
6	Белки с ферментативной активностью. Методы изучения активного центра фермента (на примере протеиназ) Специфичность действия ферментов; количественное определение активности ферментов из тканей 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).	4
7	Зачет	2
	Итого	36

Семинары

№	Тема занятия	Кол-во час.
1	Развитие методов изучения структуры и функций белков. Функциональная классификация белков и пептидов. Опрос по теме.	2
2	Хроматография в системе методов изучения структуры и свойств белка. Виды хроматографии, неподвижная и подвижная фазы, современные типы носителей. Задачи, решаемые при помощи хроматографии биопробы. Ограничения метода.	4
3	Регуляция активности ферментов Ключевые регуляторные ферменты. Аллостерическая регуляция ингибирование. Активация зимогена. Регуляция активности ферментов по типу обратной связи (метаболитом, продуктом реакции), субстратом, кофактором. Пространственное разделение (компарментализация) участников ферментативной реакции. Гормональная регуляция. Генетический контроль синтеза ферментов. Эволюция механизмов регуляции. Молекулярные основы гомеостаза клетки. Защита рефератов.	4
4	Домены как структурная и функциональная единица в структуре белка. Многообразие доменов. Основные структурные классы доменов. Методы изоляции доменов из полноразмерных молекул белков. Базы данных белковых доменов. Домен как единица эволюции белков. Занятие-дискуссия по теме «Домен как структурная, функциональная и	4

	эволюционная единица в структуре белка»	
5	Посттрансляционная и химическая модификация белков Посттрансляционная модификация: иодирование остатков тирозина, образование остатков γ -карбоксихлутаминовой кислоты, метилирование, гидроксильирование, ацетилирование, ADP-рибозилирование, фосфорилирование белков, сульфатирование тирозина. Протеинкиназы и протеинфосфатазы. Протеолитический процессинг предшественников биологически активных пептидов. Избирательная деградация белков. Сплайсинг белков (интеины). Методы химической модификации белков. Получение мутантных белков методами сайт-специфического мутагенеза. Экспрессия целевого белка в клетках модельного организма.	4
	Итого	18

9. Методические материалы для текущего контроля

Работа с литературой и устный опрос по теме практического занятия «Методы идентификации аминокислот и количественные методы определения белка»

1. Особенности количественного определения растворимых, мембраносвязанных белков, нормализация по сухому веществу
2. Суть методов микро-Кьельдаля, формольного титрования, их использование для количественной оценки белка.
3. Методы окрашивания белков: критическое сравнение.
Обсудить окрашивание по Лоури, по Бредфорд, нингидриновое, флуорескаминном, офталевым диальдегидом, на миллипоровом фильтре, серебром.
4. Спектрофотометрический метод определения белка по поглощению в UV области, минимизация вклада поглощения нуклеиновых кислот.

Самостоятельная работа с литературой и подготовка реферата по теме «Развитие методов изучения химической природы и функций белков». Возможные темы рефератов:

1. Начальные этапы химии белка, их вклад в становлении современных представлений о структуре белка.
Обсудить: теорию «углеазотных комплексов» А.Я. Данилевского, теорию «киринов» А. Косселя, пептидную теорию Э. Фишера, кризис пептидной теории.
2. Функциональная классификация белков и пептидов.
Привести примеры и обсудить биологические функции белков: ферментативную, транспортную, запасную, защитную, сократительную, структурную, гормональную, белков-токсинов и др.
3. Условность функциональной классификации белков.
Привести примеры и обсудить мультифункциональных белков, нефункциональных белков

Работа с литературой, подготовка обзора по теме «Применение хроматографических методов для препаративного и аналитического анализа белков»

Самостоятельная работа с литературой, подготовка обзора современной литературы по заданной теме

Подготовка презентаций по теме "Визуализация результатов разделения белков".

Предлагаемые темы презентации:

1. Визуализация результатов разделения белков методом электрофореза в денатурирующих условиях
2. Визуализация результатов разделения белков методом нативного электрофореза

3. Визуализация результатов зимографии белков
4. Визуализация результатов идентификации белков методом иммуноблоттинга
5. Электронно-микроскопическая визуализация локализации белков на срезах, окрашенных по методу иммуногистохимии

Работа с литературой и подготовка к защите рефератов по теме семинара «Регуляция активности ферментов»

Перечень предлагаемых тем рефератов:

1. Влияние факторов среды на кинетику ферментативной реакции. Эффекты температуры, рН среды, ионной силы и концентрации субстрата.
2. Значение константы Михаэлиса и максимальной скорости реакции. Способы получения экспериментальных значений для графического метода расчета кинетических констант.
3. Методы изучения структуры и механизма функционирования активного центра фермента. Химическая модификация активного центра.
4. Специфичность действия ферментов. Тип катализируемой реакции, субстратная специфичность (абсолютная, групповая, стереохимическая).
5. Ингибиторы активности ферментов, типы и механизмы ингибирования
6. Практическое значение ингибиторов ферментов. Ингибиторы как инструмент исследования ферментов.

Семинар-дискуссия на тему «Домен как структурная, функциональная и эволюционная единица в структуре белка»

Самостоятельная работа с литературой, подготовка к выступлению на семинар-дискуссии

Круглый стол по теме «Становление методов изучения структуры белка»

Самостоятельная работа с литературой и подготовка к дискуссии в рамках круглого стола.

10. Методические материалы для оценивания итоговых результатов обучения по дисциплине

Вопросы к зачету:

Тема 1. Методы идентификации аминокислот. Количественные методы определения белка в растворе.

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
7. Пептидная связь. Структурная роль пептидной связи
8. Белок как гетерополимерная цепь. Определение числа полипептидных цепей в белке
9. Структурная роль пептидной связи
10. Геометрические параметры пептидной связи
11. Основные типы пространственной укладки полипептидной цепи
12. Гибридные олигомерные белки. Функции доменов и доменных ансамблей в структуре белка
13. Оптические свойства белковой молекулы
14. Осмотические и кислотно-основные свойства белковой молекулы
15. Растворимость белков и определяющие ее факторы.

Тема 2. Методы экстракции и разделения белков. Метод хроматографической очистки 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.
6. Основные этапы выделения и очистки белков.
7. Методы концентрирования белка: осаждение, ультрафильтрация, ПЭГ, изоэлектрическое
8. Виды хроматографии
9. Метод газо-жидкостной хроматографии
10. Адсорбционная хроматография
11. Гель-хроматография в жидкой фазе
12. Ионообменная хроматография
13. Аффинная хроматография
14. Очистка белков от низкомолекулярных примесей
15. Высокоэффективная жидкостная хроматография

Тема 3. Методы идентификации, оценки молекулярной массы, локализации белков. Электрофорез белков. Определение гомогенности белков. Иммуноблоттинг, иммуногистохимия. Флюоресцентная микроскопия.

1. Физические основы электрофореза белков.
2. Метод Леммли
3. Нативный электрофорез
4. Двухмерный электрофорез
5. Количественный метод определения белка в полиакриламидном геле
6. Визуализация полос в геле
7. Критерии чистоты белковых препаратов
8. Определение молекулярной массы по осмотическому давлению
9. Определение молекулярной массы методом светорассеяния
10. Определение молекулярной массы методом гель-фильтрации
11. Определение молекулярной массы белков методом ДСН-гель-электрофореза
12. Определение молекулярной массы методом седиментации.
13. Моно- и поликлональные антитела
14. Иммуноферментный анализ
15. Перенос белка из геля на нитроцеллюлозную мембрану
16. Детекция результатов иммуноблоттинга

Тема 4. Белки с ферментативной активностью. Методы изучения кинетики ферментативной реакции. Иммобилизация белков-ферментов

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, рН 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
9. Иммобилизация белков, общие определения
10. Основные методы иммобилизации

11. Кинетические закономерности катализа иммобилизованными ферментами
12. Стабильность иммобилизованных ферментов

Тема 5. Методы экспериментального исследования структуры белков.

1. Установление С- и N-концевых остатков пептидных цепей: динитрофенильный и дансильный методы
2. Методы фрагментации полипептидной цепи: последовательная деградация пептидов по методу Эдмана, кислотный и щелочной гидролиз, химическая и ферментативная фрагментация
3. Установление аминокислотной последовательности фрагментов белковых молекул
4. Основные принципы работы секвенатора
5. Альтернативные методы определения первичной структуры
6. Основные принципы образования масс-спектра
7. Понятие о ESI- и MALDI-масс-спектрометрии
8. Задачи, решаемые с помощью ESI-MS и MALDI-MS
9. Требования к пептидам, анализируемым методом масс-спектрометрии
10. Электронная микроскопия
11. Рентгеноструктурный анализ. Физические основы РСА. Особенности РСА белков
12. Принципы и приемы кристаллизации
13. Основные направления современных рентгеноструктурных исследований
14. Классические методы химического синтеза белков и пептидов
15. Методы защиты аминогруппы
16. Методы защиты карбоксильной группы
17. Синтез пептидов на твердой фазе (синтез Меррифилда)
18. Использование протеаз для синтеза пептидов
19. Методы биоинформатики в исследовании структуры белка
20. Примеры баз данных, принципы извлечения информации
21. Методы выравнивания последовательностей и поиск в базах данных
22. Филогенетический анализ.

11. Учебная литература

1) Перечень основной литературы

- Биохимия: Учеб. / Под ред. Е.С. Северина. – М.: ГЭОТАР- Медиа, 2006. – 784 с.
- Мецлер Д. Биохимия: В 3-х т.: Пер. с англ. – М.: Мир, 1980.
- Ленинджер А. Основы биохимии: В 3-х т.: Пер. с англ. – М.: Мир, 1985.
- Проблемы белка: Химическое строение белка / Попов Е.М., Решетов П.Д., Липкин В.М. и др. – М.: Наука, 1995.
- 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.
- Проблема белка: Структура и функция белка / Попов Е.М., отв. ред. Иванов В.Т., ред. Соркина Т.И. – М.: Наука, 2000.
- Белки и пептиды / Ред. Иванов В.Т., Липкин В.М. – М.: Наука, 1995.
- Практическая химия белка: Пер. с англ. / Под ред. Дарбре А. – М.: Мир, 1989.
- Ryan B. and Henahan G.T.M. Overview of approaches to preventing and avoiding proteolysis during expression and purification of proteins// Curr. Protoc. Protein Sci. 2013, 71:5.25.1-5.25.7.
- Gallagher S.R. One-dimensional SDS gel electrophoresis of proteins // Curr. Protoc. Protein Sci. 2012, 68:10.1.1-10.1.44. doi:10.1002/0471140864.ps1001s68
- Kimple M.E., Brill A.L., Pasker R.L. Overview of affinity tags for protein purification // Curr. Protoc. Protein Sci. 2018, 73:9.9.1-9.9.23. doi:10.1002/0471140864.ps0909s73

Seidman J.G. In situ hybridization and immunohistochemistry // *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 2012, 98(1): 14.0.1-14.0.3. Doi:10.1002/0471142727.mb1400s98

Schaeffer R.D., Liao Y., Grishin N.V. Searching ECOD for homologous domains by sequence and structure // *Curr. Protoc. Bioinform.* 2018, 61(1):e45. Doi:10.1002/cpbi.45

Pichler K., Warner K., Magrane M. The UniProt Consortium. SPIN: submitting sequences determined at protein level to UniProt // *Curr. Protoc. Bioinform.* 2018, 62(1):e52. Doi:10.1002/cpbi.52

Fridrich S., Karmilin K., Stöcker W. Handling metalloproteinases // *Curr. Protoc. Protein Sci.* 2016, 83(1): 21.16.1-21.16.20. doi:10.1002/0471140864.ps2116s83

Skrincosky D., Santangelo C. Working with enzymes // *Curr. Protoc. Essent. Lab. Techniq.* 2008, 00(1):10.1.1-10.1.33. doi:10.1002/9780470089941.et1001s00

Cregg J.M., Tolstorukov I., Kusari A., Sunga A.J., Madden K., Chappell T. Expression of recombinant genes in the yeast // *Curr. Protoc. Essent. Lab. Techniq.* 2018, 17(1):e25. Doi:10.1002/cpet.25

Zhang G., Annan R.S., Carr S.A., Neubert T.A. Overview of peptide and protein analysis by mass spectrometry // *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 2014, 108(1):10.21.1-10.21.30. doi:10.1002/0471142727.mb1021s108

2) Перечень дополнительной литературы

Kent S.B.H. Novel protein science enabled by total chemical synthesis // *Protein Sci.* – 2018 Oct 21. doi: 10.1002/pro.3533.

The Protein Protocols Handbook. 2nd edn. John M. Walker (Ed.), Humana Press Inc., 2002. – 1146 p.

Гааль Э., Медьеша Г., Верецкеи Л. Электрофорез в разделении биологических макромолекул. – М.: Мир, 1982. 448 с.

Корниш-Боуден Э. Основы ферментативной кинетики. Пер. с англ. – М.: Мир, 1979. – 281 с.

Коэн Ф. Регуляция ферментативной активности: Пер. с англ. – М.: Мир., 1986. – 144 с.

Кретович В.Л. Введение в энзимологию. – М.: Наука, 1986. 336 с.

Лысенко Л.А., Немова Н.Н., Канцерова Н.П. Протеолитическая регуляция биологических процессов. – Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2011. – 482 с.

Молекулярные основы действия ферментов: Сборник / под ред. С.Е. Северина, Г.А. Кочетова. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1985. 189 с.

Остерман Л.А. Исследование биологических макромолекул электрофокусированием, иммуноэлектрофорезом и радиоизотопными методами. – М.: Наука, 1983.

Остерман Л.А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот. – М.: Наука, 1985.

Плакунов В.К. Основы энзимологии. – М.: Логос, 2002. – 128 с.

Скоупс Р. Методы очистки белков. – М.: Мир, 1985.

Сова В.В., Кусайкин М.И. Выделение и очистка белков. Методическое пособие по курсу Химия и биохимия белков и ферментов. – Владивосток: 2006. – 42 с.

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.

12. Перечень ресурсов информационно-телекоммуникационной сети «Интернет»

Электронный ресурсы научной библиотеки КарНЦ РАН

[режим доступа: <http://library.krc.karelia.ru/>]

Электронная научная библиотека eLIBRARY.RU

[режим доступа: <http://elibrary.ru/defaultx.asp>]

Электронная научная библиотека РАН

[режим доступа <https://ras.jes.su/>]

Библиотека по естественным наукам РАН

[режим доступа: <http://www.benran.ru/>]

Электронная научная библиотека Wiley Online Library

[режим доступа: <http://onlinelibrary.wiley.com/>]

Электронная научная библиотека издательства Springer

[режим доступа: <http://www.springer.com/gp/>]

Электронная научная библиотека издательства Elsevier

[режим доступа: <http://www.elsevier.com/>]

Библиографическая и реферативная база данных Scopus

[режим доступа: <http://www.scopus.com/>]

Национальная библиотека Республики Карелия

[режим доступа: <http://library.karelia.ru/>]

Медико-биологический информационный портал и поисковая система Medline

[режим доступа: <http://www.medline.ru/medsearch/>]

Национальная библиотека США по Медицине PubMed

[режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>]

13. Материально-техническое обеспечение

Оборудование для пробоподготовки, выделения веществ и органелл:

Холодильные и морозильные камеры, в т.ч. низкотемпературные, сосуды Дьюара СДСТ-35, IC 20 RX;

Гомогенизатор Qiagen Tissue Lyser LT (Qiagen, Германия);

Центрифуга Allegra 64R Centrifuge (BeckmanCoulter).

Ультрацентрифуга с набором роторов Optima Beckman LE 80 (BeckmanCoulter).

Центрифуга Rotina 35R (Hettich, Германия). Центрифуга с охлаждением на 24 места Eppendorf Centrifuge 5415R (Eppendorf, США).

Универсальный комплект микроволновой и фотолизной пробоподготовки.

Оборудование для разделения сложных белковых смесей, очистки, выделения и изучения свойств и функций пептидов, белков, ферментов:

Система для гель-хроматографии Bio-Rad;

Специализированная камера для электрофореза Mini-PROTEAN[®] Tetra Vertical Electrophoresis Cell (Bio-Rad);

Гель-документирующая система ChemiDoc[™];

Система блоттинга Trans-Blot[®] Turbo[™]; еще Bio-Rad

Камера для вертикального электрофореза Mini-PROTEAN Tetra Cell на 4 геля, для работы с готовыми гелями;

Планшетный монохроматорный флуориметр люминометр спектрофотометр CLARIOstar (BMG LABTECH);

Спектрофотометр СФ-2000 (ЗАО "ОКБ Спектр", Россия);

Оборудование для молекулярно-генетических исследований:

Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000, исполнения C1000 Touch в комплекте с модулем реакционным оптическим CFX96;

Система высокой очистки воды Simplicity с УФ лампой;

Лабораторная микроцентрифуга MiniSpin plus;

Микроцентрифуга-вортекс "Микроспин" FV-2400, 2800 об/мин, роторы R-1,5, R-0.5/0.2
Термостат твердотельный с таймером ТТ-2 "Термит";
Модуль HRM Manager для анализа кривых плавления;
Бокс микробиологической безопасности БМБ-II-"Ламинар-С в исполнении БМБ-II-
"Ламинар-С.»-1.2;
Бокс абактериальной воздушной среды для работы с ДНК-пробами при проведении ПЦР-
диагностики БАВ-ПЦР-"Ламинар-С."
Термостат твердотельный с таймером ТТ-2 "Термит". ВРОДЕ ПОВТОРЫ? есть выше

14. Перечень лицензионного программного обеспечения

1. Access 2010 Russian Open License Pack NoLevel Academic Edition – программа для работы с базами данных;
2. Power Point 2007 – программа для создания презентаций.
3. Программное обеспечение в комплекте с научным оборудованием.
4. Пакет программного обеспечения для создания и поддержки генетических баз данных Fingerprinting II Informatix (Bio-Rad, США).

15. Критерии оценивания для итогового контроля по дисциплине

Результаты зачета оцениваются на «зачтено», «не зачтено» по следующим основаниям:

«Зачтено» ставится, если ответ построен логично, в соответствии с планом, показано знание универсальных, общепрофессиональных и профессиональных вопросов, терминов и понятий, установлены содержательные межпредметные связи, выдвигаемые положения обоснованы, приведены примеры, показан аналитический и комплексный подход к раскрытию материала, сделаны содержательные выводы, продемонстрировано знание основной и дополнительной литературы.

«Не зачтено» ставится, если ответ построен не логично, план ответа соблюдается непоследовательно, отвечающий не раскрыты профессиональные знания и умения. Научное обоснование вопросов подменено рассуждениями дилетантского характера. Ответ содержит ряд серьезных неточностей и грубых ошибок. Не обнаружен аналитический и комплексный подход к раскрытию материала, сделанные выводы поверхностны или неверны, не продемонстрировано знание основной и дополнительной литературы.