

**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ФГАОУ ВО "Новосибирский национальный
исследовательский государственный университет"**

Факультет естественных наук

УТВЕРЖДАЮ



Декан ФЕН НГУ, профессор

Резников В.А.

«29» августа 2014 г.

Методы исследования биополимеров

**Программа лекционного курса, семинаров и
самостоятельной работы студентов**

Учебно-методический комплекс

Курс 4, VIII семестр

Новосибирск 2014

Учебно-методический комплекс предназначен для студентов IV курса факультета естественных наук, специальность 020201 «Фундаментальная и прикладная химия». В состав комплекса включены: программа курса лекций, структура курса, правила индивидуальной оценки, типовые варианты задач для решения на семинарах с обсуждением схемы решения, типовые варианты вопросов экзамена, список литературы для самостоятельной работы.

Составитель

Морозов И.В., доц.

© Новосибирский государственный
университет, 2014

Содержание

Аннотация рабочей программы	5
Цели освоения дисциплины	6
Место дисциплины в структуре ООП	7
Компетенции обучающегося, формируемые в результате освоения дисциплины.....	7
Структура и содержание дисциплины	9
Рабочий план по неделям семестров.....	9
Программа курса лекций.....	10
Основные типы биополимеров. Их физико-химические свойства.	10
<i>Нуклеиновые кислоты.</i>	10
<i>Белки.</i>	10
Методы детекции биополимеров.....	10
<i>Использование радиоизотопов для детекции биополимеров.</i> .	10
<i>Поглощение света веществом (спектрофотометрия).</i>	11
Электрофорез.....	12
<i>Принципы метода.</i>	12
<i>Буферы для электрофореза.</i>	12
<i>Электрофорез в гелях.</i>	13
<i>Электрофорез нуклеиновых кислот.</i>	14
<i>Электрофорез белков.</i>	14
<i>Специальные варианты электрофореза.</i>	14
<i>Элюция биополимеров из геля.</i>	15
Центрифугирование.....	15
<i>Принципы метода.</i>	15
<i>Общее устройство центрифуги.</i>	16
<i>Варианты практического использования седиментации.</i>	16
Хроматография.....	17

<i>Принципы метода</i>	17
<i>Классификация и примеры хроматографических методов</i>	17
Масс-спектрометрия как метод анализа молекул биополимеров.	19
Количественные аспекты ПЦР.....	19
<i>"Полуколичественная" ПЦР (детекция на неэкспоненциальном участке кривой накопления продукта)</i>	19
<i>Real-Time PCR (детекция на экспоненциальном участке кривой накопления продукта)</i>	19
<i>Digital PCR в изолированных макроскопических объемах</i>	20
<i>Метод молекулярных колоний – ПЦР в геле</i>	20
<i>Digital PCR в инвертированной эмульсии вода-масло на примере BioRad QX100</i>	20
Системы массового параллельного секвенирования (MPSS).	20
<i>Используемые в MPSS методы клональной амплификации и определения нукл. последовательностей амплификатов</i> :	20
<i>Внедренные в практику системы MPSS (принцип работы, основные характеристики, достоинства и недостатки)</i> :	20
<i>Принципы функционирования перспективных разработок MPSS, основанных на определении нукл. последовательностей единичных молекул ДНК</i> :	20
Образовательные технологии	21
Учебно-методическое обеспечение самостоятельной работы студентов	21
Примеры условий обязательных задач	22
Перечень вопросов к экзамену.....	25
Учебно-методическое и информационное обеспечение дисциплины	27
Материально-техническое обеспечение дисциплины	29

Аннотация рабочей программы

Дисциплина "Методы исследования биополимеров" относится к вариативной части профессионального цикла ООП по специальности 020201 «Фундаментальная и прикладная химия». Дисциплина реализуется на Факультете естественных наук Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования "Новосибирский национальный исследовательский государственный университет" (НГУ) кафедрой молекулярной биологии.

Содержание дисциплины охватывает физико-химические основы методов детекции и фракционирования биополимеров, принципы, области применения и примеры использования подходов, основанных на комбинировании таких методов, для решения типичных задач молекулярной биологии.

Дисциплина нацелена на формирование у выпускника следующих профессиональных компетенций: ПК-3, ПК-4, ПК-9, ПК-10, ПК-19.

Преподавание дисциплины предусматривает следующие формы организации учебного процесса: лекции, семинарские занятия, самостоятельная работа студента (включая подготовку к сдаче домашних заданий и экзамена), консультации, сдача экзамена.

Программой дисциплины предусмотрены следующие виды контроля:

Текущий контроль. Прохождение студентами курса проходит с использованием системы ИКИ (индивидуального кумулятивного индекса). Для подготовки к семинарам студенты получают домашнее задание, в частности комментарии по принципам решения обязательных задач. Во время семинаров студенты письменно решают набор задач, состоящий из обязательных для получения допуска к экзамену и дополнительных задач. По результатам проверки решений студенты получают определенное количество баллов в зависимости от уровня сложности выбранного студентом варианта задачи, а также наличия и количества ошибок, допущенных при решении. К концу семестра студент набирает некоторую сумму баллов, которая учитывается при оценке результатов экзамена, давая определенный вклад (в пределах одного балла) в итоговую оценку.

Итоговый контроль. Итоговую оценку за семестр студент получает по результатам письменного экзамена в конце семестра, с уче-

том результатов решения задач на семинарах по сумме баллов системы ИКИ.

Общая трудоемкость дисциплины составляет 3 зачетных единицы. Общее время освоения дисциплины - 108 академических часов. Программой дисциплины предусмотрены 32 часа лекций, 12 часов семинарских занятий, 5 часов на контроль знаний (сдачу 5 домашних заданий), а также 57 часов самостоятельной работы студентов (из них 30 часов на выполнение домашних заданий).

Цели освоения дисциплины

Дисциплина "Методы исследования биополимеров" предназначена для того, чтобы ознакомить студентов с принципами основных и наиболее широко используемых методов молекулярной биологии, а также с особенностями их применения для решения тех или иных задач молекулярной биологии. На лекциях даются основные представления о наиболее часто используемых способах детекции, идентификации и фракционирования молекул биополимеров, а также лежащих в основе таких способов физико-химических принципах; разбираются физико-химические принципы функционирования приборов и приборных комплексов, используемых в молекулярной биологии, а также инструментальные подходы к решению комплексных задач молекулярной биологии, в частности идентификации компонентов сложных биологических объектов, точное измерение сверхмалых концентраций биополимеров, определение тонкой структуры биополимеров (в частности полинуклеотидных последовательностей), входящих в состав сложных биологических объектов.

Основной целью освоения дисциплины является усвоение студентами физико-химических принципов, лежащих в основе применяемых в молекулярной биологии методов и приборов, и на этой основе – понимания возможностей и ограничений этих методов и приборов, и, в итоге, формирование навыков эффективного самостоятельного планирования сложных экспериментов по анализу биополимеров, входящих в состав комплексных биологических объектов.

Место дисциплины в структуре ООП

Дисциплина "Методы исследования биополимеров" относится к вариативной части профессионального цикла ООП по специальности 020201 «Фундаментальная и прикладная химия».

Дисциплина "Методы исследования биополимеров" опирается на следующие дисциплины данных ООП:

- Математический анализ (дифференциальное и интегральное исчисления);
- Теория вероятностей и математическая статистика (статистика нормального распределения, оценки среднего и дисперсий);
- Физика (электрофизика, взаимодействие света с веществом, физика α распада, термодинамика, диффузия);
- Физическая химия (строение и свойства атома, природа химической связи, химическая реакция, понятия о кинетике и термодинамике реакций, кислотно-основные равновесия);
- Неорганическая химия (строение и свойства атомов, строение молекул, химическая связь);
- Аналитическая химия (химические равновесия, органические соединения как лиганды);
- Биохимия (структура и свойства биополимеров);
- Основы компьютерной грамотности (навыки обращения с ПК);

Результаты освоения дисциплины "Методы исследования биополимеров" используются в следующих дисциплинах данных ООП:

- Строение биополимеров;
- Молекулярная вирусология;
- Научно-исследовательская практика;
- Итоговая государственная аттестация.

Компетенции обучающегося, формируемые в результате освоения дисциплины профессиональные компетенции:

- *способность использовать в познавательной и профессиональной деятельности базовые знания в области математики и естественных наук (ПК-3);*

- *использование основных законов естественнонаучных дисциплин в профессиональной деятельности, применением методов математического анализа и моделирования, теоретического и экспериментального исследования (ПК-4);*
- *понимание принципов работы и умением работать на современной научной аппаратуре при проведении научных исследований (ПК-9);*
- *владение современными компьютерными технологиями, применяемыми при обработке результатов научных экспериментов и сборе, обработке, хранении и передаче информации при проведении самостоятельных научных исследований, свободным владением ими при проведении самостоятельных научных исследований (ПК-10);*
- *способность анализировать полученные результаты, делать необходимые выводы и формулировать предложения (ПК-19);*

В результате освоения дисциплины обучающийся должен:

- иметь представление о наиболее часто используемых способах детекции, идентификации и фракционирования молекул биополимеров, а также лежащих в основе таких способов физико-химических принципах; о физико-химические принципах функционирования приборов и приборных комплексов, используемых в молекулярной биологии;
- знать основные инструментальные подходы к решению комплексных задач молекулярной биологии, основные принципы их функционирования и использования;
- уметь предсказывать и объяснять результаты применения физико-химических подходов и созданных на их основе приборов и приборных комплексов для решения задач молекулярной биологии, планировать эксперименты с использованием соответствующих приборов для решения таких задач.

Структура и содержание дисциплины

Общая трудоемкость дисциплины составляет 3 зачетных единицы, всего 108 академических часов. Программой дисциплины предусмотрены 32 часа лекций, 12 часов семинарских занятий, 5 часов на контроль знаний (сдачу 5 домашних заданий), а также 57 часов самостоятельной работы студентов (из них 30 часов на выполнение домашних заданий).

Рабочий план по неделям семестров

№ п/п	Раздел дисциплины	Неделя семестра	Виды учебной работы, включая самостоятельную работу студентов и трудоемкость (в часах)					Формы текущего контроля успеваемости (по неделям семестра) Форма промежуточной аттестации (по семестрам)
			Лекция	Семинарские занятия	Домашние задания	Самостоятельная работа	Экзамен	
1	Основные типы биополимеров. Их физико-химические свойства.	1	0.2					
2	Методы детекции биополимеров: Использование радиоизотопов для детекции биополимеров.	1-2	3.8	2	1	7		Домашнее задание
3	Методы детекции биополимеров: Поглощение света веществом (спектрофотометрия).	3-4	4	2	1	7		Домашнее задание
4	Электрофорез.	5-7	6	2	1	7		Домашнее задание
5	Центрифугирование.	8-10	6	2	1	7		Домашнее задание
6	Хроматография.	11-13	6	2	1	7		Домашнее задание
7	Масс-спектрометрия как метод анализа молекул биополимеров.	14	2	2		1		
8	Количественные аспекты ПЦР.	15	2			1		
9	Системы массового параллельного секвенирования (MPSS).	16	2			1		
						19	2	Экзамен
	Всего:		32	12	5	57	2	

Неделя	Темы семинаров
ФЕВРАЛЬ 2 неделя	Семинар 1, домашнее задание 1. Использование радиоизотопов для детекции биополимеров.
4-я неделя	Семинар 2, домашнее задание 2. Поглощение света веществом (спектрофотометрия).
МАРТ 3-я неделя	Семинар 3, домашнее задание 3. Электрофорез.
АПРЕЛЬ 2-я неделя	Семинар 4, домашнее задание 4. Центрифугирование.
МАЙ 2-я неделя	Семинар 5, домашнее задание 5. Хроматография.

Программа курса лекций

Основные типы биополимеров. Их физико-химические свойства.

Нуклеиновые кислоты.

Одноцепочечные (ДНК и РНК).

Двуцепочечные (ДНК). Структурные характеристики В-ДНК.

Денатурация ДНК. Хаотропные агенты.

Белки.

- Разнообразие структур белка. Заряд белка, изоэлектрическая точка.
- Денатурация белков с использованием ДСН и 2-меркаптоэтанола.

Методы детекции биополимеров.

Использование радиоизотопов для детекции биополимеров.

- Типы распада. Излучаемые частицы.
- Интенсивность распада и энергия испускаемых частиц.
- Период полураспада, теоретическая и практическая удельная активность, объемная активность. Единицы измерения. Закон радиоактивного распада. Изотопное разбавление.
- Энергия испускаемых частиц. Спектр распределения частиц по энергиям.
- Взаимодействие испускаемых частиц с веществом. Радиолиз. Стабилизаторы. Меры безопасности при работе с РА веществами.

- Свойства наиболее часто применяемых изотопов, сфера их применения.
- Детекция РА распада счетчиком Гейгера.
 - Устройство и принцип действия счетчика Гейгера.
 - Зависимость между интенсивностью потока частиц и эффективностью счета.
 - Недостатки счетчика Гейгера.
- Детекция РА распада с использованием сцинтилляторов.
 - Устройство и принцип действия регистратора сцинтилляции.
 - Твердые и жидкие сцинтилляторы.
 - Сместители спектра (вторичные сцинтилляторы). Назначение, передача возбуждения молекулам сместителей спектра. Оптическое и химическое тушение сцинтилляции.
 - Связь между энергией частицы и интенсивностью вспышки. Одновременная регистрация изотопов с разной энергией частиц. Каналы счета, коэффициент проникновения.
- Детекция РА распада по излучению Вавилова-Черенкова. Связь между энергией частицы и интенсивностью вспышки.
- Авторадиография.
 - Принцип метода, его достоинства и недостатки.
 - Типы используемых фотоматериалов, их применимость для разных изотопов. Использование низких температур для стабилизации скрытого изображения.
 - Авторадиография *in situ*.
 - Усиливающие экраны: принцип действия, достоинства, недостатки, эффективность для разных изотопов.
 - Устройство и принцип действия PhosphoImager
- Использование радиоизотопов для исследования конформации биополимеров и их комплексов.

Поглощение света веществом (спектрофотометрия).

- Коэффициент пропускания. Оптическая плотность. Приборы для ее определения, их устройство и характеристики. Зависимость от погрешности определения от ее величины.
- Спектр поглощения. Типичные спектры ДНК, РНК, белков.
- Гипер- и гипохромный эффект на примере плавления ДНК-дуплексов.

- Использование красителей для детекции биополимеров.
 - Структурные особенности молекул красителей, обуславливающие специфичность взаимодействия с биополимерами и оптические свойства.
 - Примеры красителей, используемых для разных классов биополимеров, чувствительность окрашивания.
 - Использование флуоресценции на примере EtBr и акридинового оранжевого. Причины и примеры изменения интенсивности и смещения спектра испускания при интеркаляции.
- Использование флуоресцентных меток.
 - Примеры широко используемых флуорохромоов.
 - Преимущества флуоресцентных меток.
 - Метки с внутримолекулярным переносом энергии, их назначение и преимущества.
- Нанокристаллы полупроводников в качестве флуоресцентных меток.

Электрофорез.

Принципы метода.

- Движение заряженной частицы в растворе под действием эл. поля. Зависимость равновесной скорости частицы от параметров процесса и свойств частицы, длительность переходных (неравновесных) процессов. Параметр разделения. Подвижность, относительная подвижность.
- Принцип электронейтральности раствора.
- Изотахорофорез – принцип метода, равновесные концентрации зон (вывод соотношений), история разработки, сфера применения.
- Эндоелектроосмос.

Буферы для электрофореза.

- Критерии выбора компонентов буфера:
- характер и интенсивность процессов электролиза,
- зависимость проводимости раствора от заряда и размера частиц;
- зависимость буферной емкости от соотношения рН и рКа.

- Примеры наиболее часто используемых буферов, их характеристики, достоинства, недостатки. Образование полиборатов и аддуктов при использовании ТВЕ.

Электрофорез в гелях.

- Типы гелей. Их свойства.
- Гели агарозы: химическая структура, размеры пор.
- Гели полиакриламида: структура мономеров, реакция полимеризации, катализаторы, источники свободных радикалов, фотоактивируемая полимеризация, специальные поперечные сшивки для приготовления растворимых гелей. Зависимость размера пор от концентрации и соотношения мономеров. Преполимеризованные блоки мономеров для приготовления ПААГ. Ковалентное присоединение ПААГ к стеклу. Использование комбинированных гелей и линейного ПАА. "Виртуальные" ПАА гели с нековалентными поперечными "сшивками", сферы их применения.
- Подвижность биополимеров в гелях. Зависимость подвижности от размеров и конформации молекул. Диапазон эффективного использования гелей агарозы и ПАА различных концентраций. Аномальная подвижность различных форм ДНК кольцевых плазмид.
- Использование неоднородных гелей для выравнивания информационной нагрузки участков геля: гели, неоднородные по толщине, концентрации буфера, концентрации геля. Способы приготовления, преимущества. Непрерывная регистрация результатов электрофореза.
- Электрофорез в переменном ("пульсирующем") поле (PFGE): аномальная подвижность больших молекул ДНК.
- Приборы для электрофореза. Технология нанесения образцов. Артефакты электрофореза.
 - Приборы для горизонтального открытого и вертикального электрофореза. Рециркуляция буфера.
 - Артефакты нанесения образцов. Использование техники нанесения shark-teeth, ее преимущества.
 - Эффект улыбки: причины, способы устранения. Термостатируемые приборы для электрофореза.

Электрофорез нуклеиновых кислот.

- Электрофорез НК в неденатурирующих условиях. Зависимость подвижности оц- и дц- нуклеиновых кислот от длины, выбор адекватных условий э/ф (% и тип геля). Подвижность кольцевых молекул дц-ДНК, влияние на нее EtBr.
- Электрофорез в денатурирующих условиях. Денатурирующие агенты для денатурации ДНК и РНК. Разрешающая способность.
- Разделение цепей дц-ДНК электрофорезом: принцип и особенности электрофореза.
- Двумерный электрофорез нуклеиновых кислот.

Электрофорез белков.

- Электрофорез в неденатурирующих условиях (на примере анализа изоформ ферментов). Параметр разделения.
- Электрофорез в денатурирующих условиях.
 - Денатурация белка. Параметр разделения.
 - Принцип DISC-электрофореза (система буферов Орнштейна и Дэвиса, электрофорез SDS-денатурированных белков по Лэммли).
 - Использование градиента концентрации геля, равновесный электрофорез.
- Изоэлектрофокусирование.
 - Принцип метода, параметр разделения.
 - Амфолины. Формирование и стабильность градиента рН.
- Двумерный электрофорез белков.

Специальные варианты электрофореза.

- Электрофорез ДНК в пульсирующем поле (PFGE): преимущества, сфера применения.
- Детекция не полностью комплементарных ДНК-дуплексов (гетеродуплексов) электрофорезом в градиенте денатурирующего агента (DGGE).
- Афинный электрофорез на примере электрофореза т-РНК, содержащих атомы S.
- Электрофорез на целлюлозе с неподвижными границами (изотахофорез в равновесии с эндоэлектроосмосом) – варианты применения, основные преимущества (работы Абелева Г.И. с соавторами).

- Капиллярный электрофорез (в свободной среде) на примере устройства и принципа работы прибора "Капель" (Люмэкс). Структура двойного электрического слоя, величина и направление осмотического потока, его использование. Способы нанесения образцов. Разделение неполярных веществ мицеллярной электрокинетической хроматографией.
- Электрофорез в геле в капилляре на примере устройства и принципа работы "генного анализатора" ABI 310 (Applied Genomics). Принципы конструирования используемых для детекции флуорохромов, система детекции, автоматизация нанесения образцов и смены геля.
- Аналитический электрофорез в микрокапиллярах на примере Shimadzu MCE-202 MultiNA и Agilent 2100 bioanalyzer.

Элюция биополимеров из геля.

- Пассивная элюция.
 - Элюция с использованием диффузии.
 - Способы частичного разрушения геля.
 - Солюбилизация гелей агарозы. Агароза с низкой температурой плавления. Использование хаотропных агентов. Способы удаления агарозы.
 - Солюбилизация ПААГ.
- Электроэлюция. Принцип, устройство аппарата ISCO.
- Перенос на мембраны. Перенос под действием потока жидкости (по Саузерну и с использованием вакуума) и электрического поля: эффективность, преимущества и недостатки.
- Непрерывная элюция (извлечение биополимеров в процессе электрофореза):
 - использование диализных мембран и скачка концентрации соли;
 - использование противотока буфера (аппарат ELFE, элюция олигонуклеотидов после электрофореза в денатурирующем ПААГ);

Центрифугирование.

Принципы метода.

- Диффузия - общие закономерности.

- Зависимость диффузионного потока от концентрации при стационарной диффузии (I закон Фика). Коэффициент диффузии.
- Нестационарная диффузия. Скорость изменения концентрации (II закон Фика). Решения для простых случаев.
- Зависимость коэффициента диффузии от температуры и размера частиц. Коэффициенты диффузии некоторых молекул биополимеров.
- Седиментация - общие закономерности.
 - Равновесная скорость осаждения. Коэффициент седиментации.
 - Определение коэффициента седиментации из эксперимента. Стандартные условия.
 - Связь между коэффициентом седиментации и свойствами (размеры, плотность, масса) частицы . 1-е уравнение Сведберга.
 - Равновесная седиментация. Форма градиента концентрации.
 - Определение молекулярной массы по результатам равновесного центрифугирования (2-е уравнение Сведберга).

Общее устройство центрифуги.

- Типы центрифуг: аналитические, препаративные, настольные, ультрацентрифуги.
- Основные узлы: ротор, привод, холодильник, вакуумный насос. Их назначение.
- Основные характеристики роторов: максимальная скорость, минимальный и максимальный радиусы. Их значения для разных вариантов седиментации.
- Основные типы роторов: с горизонтальным ("откидные"), наклонным и вертикальным расположением пробирок. Их сравнительные преимущества и недостатки.
- Проточное центрифугирование.
- Использование центрифугирования в промышленности, промышленные центрифуги.

Варианты практического использования седиментации.

- Скоростная седиментация. Объемная и зональная скоростная седиментация. Зависимость скорости седиментации от

расстояния до оси вращения, использование градиентов вязкости и плотности. Степень применимости различных типов роторов.

- Изопикническое центрифугирование. Вещества, используемые для формирования градиентов плотности и способы их формирования. Наиболее адекватные типы роторов.
- Примеры использования центрифугирования: фракционирование клеточных органелл / субмолекулярных комплексов скоростным и зональным скоростным ц/ф; очистка суперскрученной кольцевой дцДНК изопикническим ц/ф в градиенте плотности.

Хроматография.

Принципы метода.

- Хроматографическая система. Основные понятия: сорбент, элюент, коэффициент распределения, коэффициент селективности.
- Свободный объем, объем удержания, исправленный объем удержания, коэффициенты массового распределения и емкости. Коэффициент разделения и степень разделения.
- Концепция теоретических тарелок. Идеализация хроматографической системы. Зависимость доли вещества в выбранной тарелки от времени (вывод). Форма и скорость миграции хроматографической зоны. Число теоретических тарелок, высота теоретической тарелки. Зависимость степени разделения от числа теоретических тарелок и коэффициента селективности. Экспериментальное определение ширины зоны и числа теоретических тарелок. Альтернативные концепции моделирования хроматографического процесса (например, кинетическая теория).

Классификация и примеры хроматографических методов.

- По агрегатному состоянию фаз:
 - Газо-жидкостная, жидкостно-газовая. Носитель стационарной фазы.
 - Жидкостно-жидкостная (распределительная), ЖЖХ с обратными фазами (экстракционная), ковалентная иммобилизация стационарной фазы.

- Жидкость-твердая фаза. Сорбенты. Пористые и поверхностные сорбенты. Размеры частиц твердых сорбентов, шкалы размеров. Влияние размеров частиц на емкость, гидравлическое сопротивление, радиус диффузии и макс. скорость хроматографии. Монолитные сорбенты.
- По геометрии пространства процесса:
 - Колоночная.
 - Плоскостная: бумажная, ТСХ на пластинках. Относительная подвижность. Двумерные варианты.
 - Капиллярная.
- По способу элюции (составу элюента). Форма и относительное положение зон, преимущества, недостатки, область применения.
 - Фронтальный.
 - Вытеснительный.
 - Проявительный. Элюенты постоянного и переменного (градиенты) состава.
- По направлению относительного перемещения фаз:
 - Прямоточная.
 - Противоточная. Выражение для скорости перемещения компонента. Непрерывное разделение 2-х компонентных смесей.
 - Двумерная. Непрерывное разделение многокомпонентных смесей: координаты точки выхода, пленочные и многоколоночные аппараты.
- По природе сорбции (физико-химическим свойствам сорбента):
 - Адсорбционная. Параметры разделения. Используемые сорбенты и элюенты.
 - Гель-фильтрация. Принцип и параметр разделения. Диапазон изменения объема удержания. Использование гель-фильтрации для оценки размеров частиц. Сорбенты для гель-фильтрации, их подготовка. Микроколоночный вариант гель-фильтрации с использованием микроцентрифуги: достоинства, недостатки, эффективность разделения.

- Ионообменная хроматография. Параметр разделения. Типы и химическая структура сорбентов. Использование комплексных ионообменников для удаления электролитов.
- Афинная хроматография. Параметры разделения. Наиболее распространенные сорбенты и способы иммобилизации лигандов.

Масс-спектрометрия как метод анализа молекул биополимеров.

- Общее устройство TOF спектрометра. Назначение основных узлов. Параметр разделения.
- Способы ионизации (хим. иониз., ESI, MALDI). Матрица для MALDI: принципы выбора и примеры химического состава. Устройство MALDI TOF спектрометра.
- Tandemная масс-спектрометрия. Основные узлы тандемного масс-спектрометра (квадруполь, ионная ловушка и др.), их назначение. Возможности и примеры применения комбинированных масс-спектрометров.
- Сферы применения масс-спектрометрии для анализа биополимеров (примеры).

Количественные аспекты ПЦР.

"Полуколичественная" ПЦР (детекция на неэкспоненциальном участке кривой накопления продукта).

- Принцип "полуколичественной" ПЦР. Конкурентный и неконкурентный варианты.
- Требования к стандарту. Разновидности стандартов (гомологичный, гетерологичный, эндогенный, экзогенный), способы их получения.

Real-Time PCR (детекция на экспоненциальном участке кривой накопления продукта).

- Общее устройство и принцип функционирования приборов для проведения Real-Time PCR на примере приборов производства Bio-Rad.
- Метки, используемые для Real-Time PCR, принципы детекции, преимущества, недостатки, основные сферы применения:

- Неспецифические интеркаляторы на примере SYBR Green.
- Технология TaqMan.
- Molecular Beacons. Выбор структуры адреса и "шпилечной" части, температура детекции.

Digital PCR в изолированных макроскопических объемах.

- Принцип подхода, основные преимущества.
- Примеры и возможные сферы применения.

Метод молекулярных колоний – ПЦР в геле.

- Принцип подхода, основные преимущества.
- Примеры и возможные сферы применения.

Digital PCR в инвертированной эмульсии вода-масло на примере BioRad QX100.

- Принцип подхода, основные преимущества.
- Примеры и возможные сферы применения.

Системы массового параллельного секвенирования (MPSS).

Используемые в MPSS методы клональной амплификации и определения нукл. последовательностей амплификатов:

- ePCR;
- мол. колонии на тв. подложке;
- пиросеквенирование;
- микросеквенирование Illumina;
- тандемное лигирование;
- детекция изменения pH;

Внедренные в практику системы MPSS (принцип работы, основные характеристики, достоинства и недостатки):

- Life Science 454 (Roche Genome Sequencer FLX, Junior).
- HiSeq, MySeq (Illumina).
- SOLiD 4, SOLiD 5500 (Applied Biosystems).
- Ion Torrent PGM, Proton (Applied Biosystems).

Принципы функционирования перспективных разработок MPSS, основанных на определении нукл. последовательностей единичных молекул ДНК:

- Pacific BioScience.
- ABI single molecules sequencer.

- Oxford Nanopore.
- IBM "DNA transistor".

Формы организации учебного процесса: лекция, семинар, самостоятельная работа студента, консультации, экзамен.

Образовательные технологии

Виды/формы образовательных технологий. Особенностью курса является применение в нем рейтинговой системы оценки, учитывающей как результаты сдачи экзамена по итогам курса, так и работу студента в течение семестра, в частности результаты решения задач по темам курса, что стимулирует студента к активной работе в течение всего семестра. Для того чтобы заинтересовать студента в подготовке к семинарам, каждое семинарское занятие включает тест, результат которого может существенным образом повлиять на итоговую оценку студента. Для большей мотивации студентов кроме обязательных задач, имитирующих те, которые возникают при планировании типичных экспериментов в молекулярной биологии, студентам предлагаются также вопросы и задачи, требующие творческого использования материалов, изложенных на лекциях, которые не являются обязательными, но также могут повысить итоговую оценку.

Необходимые для изучения курса и самостоятельной работы учебно-методические пособия, такие как: иллюстрации, используемые на лекциях, комментарии по принципам решения задач, списки литературы, а также некоторые оригинальные публикации из этих списков, размещаются в электронном виде с возможностью доступа через сеть интернет.

Учебно-методическое обеспечение самостоятельной работы студентов.

Итоговая оценка курса "Методы исследования биополимеров" определяется по системе ИКИ (индивидуальный кумулятивный индекс) на основе баллов за решение обязательных и дополнительных задач на семинарах и баллов за ответы на каждый из вопросов экзамена. При этом для допуска к экзамену студентам необходимо решить обязательные задачи по всем темам курса. В

случае пропуска семинаров по уважительной причине и наличии подтверждающих такую причину документов студенту предоставляется дополнительное время для решения обязательных задач. Внутри темы возможен выбор более сложных или более простых задач, при этом более сложные задачи дают большее количество баллов. Решение дополнительных задач не является необходимым для допуска к экзамену, но может обеспечить повышение итоговой оценки за счет дополнительных баллов.

По результатам экзамена студент имеет право на письменную апелляцию в тех случаях, когда темы вопросов билета раскрыты не полностью или ответы на некоторые вопросы носят двусмысленный характер. Апелляция проводится в форме письменных ответов на дополнительные уточняющие вопросы, подразумевающие дискретные ответы ("да"/"нет") или выбор вариантов ответа из списка. По результатам апелляции итоговая оценка может быть улучшена на 1 балл.

Примеры условий обязательных задач

- радиоактивность: удельная радиоактивность
Рассчитать удельную активность препарата с начальной удельной активностью A Ci/mmol после B суток хранения. Теоретическая (максимальная) удельная активность изотопа составляет C Ci/mmol, $T_{1/2} = D$ суток. Считать, что в результате радиоактивного распада содержащая распавшийся атом молекула также распадается. Другими видами радиолитиза пренебречь.
- радиоактивность: расчет необходимого количества препарата
Даны количество биополимера (ДНК или олигонуклеотид) или объем и концентрация реакционной смеси, коэффициент избытка радиоактивного препарата, его удельная и объемная активности и время хранения. В более сложных вариантах задачи вместо количества или концентрации даны оптическая плотность и коэффициент экстинции. Определить необходимый для проведения реакции объем радиопрепарата (пояснение: как правило нужное количество радиопрепарата перед реакцией лиофильно высушивается, так что его объем не влияет на объем реакционной смеси).
- радиоактивность: расчет эффективности счетчика Гейгера
Руководитель попросил студента определить среднюю радиоак-

тивность N образцов с использованием счетчика Гейгера, измеряя радиоактивность каждого образца отдельно. Для экономии времени студент поместил все образцы на детектор счетчика одновременно и разделил результат на количество образцов, получив при этом $C_{stud} CPS$. Правильно ли он поступил (почему)? Какое значение он бы получил, если бы послушался руководителя, при условии, что образцы были абсолютно одинаковыми. Предел использованного счетчика составляет $C_{max} CPS$, импульсы считать равномерно распределенными во времени.

- детекция: количество ДНК по результатам электрофореза
Оценить суммарное количество (по массе) ДНК плазмиды, содержащей вставку, выделенное из бактериальной культуры, по результатам окрашивания EtBr геля агарозы после аналитического электрофореза продуктов гидролиза части препарата эндонуклеазой рестрикции, вырезающей вставку из состава плазмиды. Длина плазмиды (pBlueScript) без вставки 3000 н.п. На гель наносили 1/60 выделенной плазмиды по массе. В качестве маркера используется гидролизат плазмиды pQpR' (длина интактной плазмиды около 7000), содержащий фрагменты следующих длин: 1326 919 762 587 540 504 458 434 307 267 234 213 184 124 88 80 54 52 21 18.
- электрофорез: зависимость скорости от напряженности
При проведении электрофореза в камере длиной L_1 см в течение T_1 час при напряжении V_1 В длина миграции лидирующего красителя составила X_1 см. Какое напряжение необходимо установить в камере длиной L_2 см чтобы лидирующий краситель мигрировал за то же время на X_2 см ?
- электрофорез: ширина зон при изотахофорезе
При проведении изотахофореза смеси 3х однозарядных анионов с концентрациями C_1 , C_2 и C_3 и подвижностью u_1 , u_2 и u_3 соответственно ширина зоны образца до начала электрофореза составляла 1 см. Какова будет ширина зон после достижения равновесия, если концентрация лидирующего аниона C_L , его подвижность - u_L , а подвижность общего катиона - u_K ? Площадь поперечного сечения системы и концентрация лидирующего аниона постоянны.
- диссоциация электролитов: заряд молекул при разных рН
вариант 1: Вещество содержит две ионогенные группы: кислоту

с рКа 3.0 и основание с рКа 7.0. При каком рН это вещество не будет иметь заряда? Какова при этом степень диссоциации ионогенных групп?

вариант 2: При проведении электрофореза содержащего 2 ионогенные группы (кислоту с рКа 4.0 и основание с рКа 7.0) вещества при рН 7.0 в камере длиной 40 см в течение 4 час при напряжении 120 V длина миграции анионов составила 30 см. Сколько времени надо вести электрофорез при 90 V для достижения той же длины миграции при рН 8.0? рН 6.0?

- диссоциация электролитов: буферная емкость

Определить время, в течение которого можно вести электрофорез в горизонтальном аппарате с буфером TSE (25mM Tris рКа = 8.2, 30mM $\text{HOCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$ (Serine) рКа1 = 9.21, рКа2 = 2.20; рН буфера = 8.65) при токе 50mA (0.05A) при условии изменения рН электродных камер не более чем на а) 1.0 б) 2.0. Объем каждой электродной камеры считать равным 0.6 л. (Число Фарадея = 96500 А*сек / г-экв.).

- центрифугирование: коэффициент седиментации

Для полного осаждения частиц в роторе Beckman SW 65 Ti (Swing bucket, $r_{\min}=41.2\text{mm}$, $r_{\max}=89.0\text{mm}$) из полностью заполненной пробирки требуется 1 час при 30000 об/мин. Определить коэффициент седиментации частиц в S. Сколько времени потребуется для полного осаждения частиц в роторе Beckman SW 55 Ti (Swing bucket, $r_{\min}=60.8\text{mm}$, $r_{\max}=108.5\text{mm}$) при 40000 об/мин?

- центрифугирование: градиент плотности

При формировании градиента концентрации CsCl равновесным центрифугированием в роторе Beckman VTi 80 (Vertical, $r_{\min}=57.9\text{mm}$, $r_{\max}=71.1\text{mm}$) при 60000 об/мин диапазон концентраций составил 0.3 – 6.0 M. Определить макс. концентрацию CsCl в градиенте, полученном в роторе Beckman VTi 65.2 (Vertical, $r_{\min}=74.4\text{mm}$, $r_{\max}=87.9\text{mm}$) при 40000 об/мин если минимальная концентрация составила 0.2 M?

- центрифугирование: эффективность разделения скоростной седиментацией

Определить эффективность разделения скоростной седиментацией (% более легких частиц, не попадающих в осадок “тяжелых” при полном осаждении последних) смеси частиц с константами седиментации 100S и 200S, равномерно заполняющей ци-

цилиндрическую пробирку, в роторах Beckman SW 65 Ti (Swing bucket, $r_{\min}=41.2\text{mm}$, $r_{\max}=89.0\text{mm}$) при 25000 об/мин и Beckman SW 60 Ti (Swing bucket, $r_{\min}=63.1\text{mm}$, $r_{\max}=120.3\text{mm}$) при 15000 об/мин.

- **хроматография: основные понятия**

Объем удержания и ширина пика для веществ А и В с коэффициентами распределения $K_{DA} = 0.6$ и $K_{DB} = 1.4$ составили соответственно $V_{RA} = 2.4$ мл, $W_A = 0.2$ мл, $V_{RB} = 5.2$ мл, $W_B = 0.3$ мл. Определить объем носителя (мертвый объем) и объем сорбента использованной хроматографической системы, а также коэффициент разделения и степень разделения веществ.

- **хроматография: параметры хр. системы по результатам эксперимента**

Преподаватель попросил студента разделить хроматографией смесь 2х веществ, отбирая фракции, концентрации в которых были не менее $\frac{1}{2}$ максимальных. При скорости элюции 1.2 мл/мин максимум пика первого вещества вышел через 24 минуты после нанесения образца, а второго – через 32 минуты. Суммарные объемы отобранных студентом фракций составили соответственно 1.4 и 1.9 мл. Определить свободный (мертвый) объем системы (V_0), эффективное число теоретических тарелок ($N_{\text{эфф}}$, считать его одинаковым для разделяемых веществ), а также коэффициент разделения (K_s) и степень разделения (R_s) веществ.

Перечень вопросов к экзамену

- Типы РА распада. Интенсивность распада, энергия испускаемых частиц. Радиолиз. Свойства наиболее распространенных изотопов.
- Детекция РА распада счетчиком Гейгера и с использованием автордиографии. Преимущества, ограничения, сфера применения.
- Детекция РА распада с использованием сцинтилляторов и по излучению Черенкова-Вавилова. Преимущества, ограничения, сфера применения.
- Поглощение света веществом (спектрофотометрия).
- Общие принципы электрофореза в свободной.
- Электрофорез в гелях.
- Электрофорез белков.

- Седиментация – принципы метода.
- Варианты практического использования седиментации.
- Хроматография - принципы метода.
- Классификация хроматографических методов по агрегатному состоянию фаз и природе сорбции.
- "Полуколичественная" и Real-Time ПЦР как метод определения количества матрицы.
- Использование радиоизотопов для исследования конформации биополимеров и их комплексов.
- Использование красителей для детекции биополимеров.
- Использование флуоресцентных меток.
- Буферы для электрофореза.
- Электрофорез нуклеиновых кислот.
- Детекция неполностью комплементарных ДНК-дуплексов (гетеродуплексов).
- Афинный электрофорез.
- Электрофорез на целлюлозе с неподвижными границами (изотактофорез в равновесии с эндоэлектроосмосом).
- Капиллярный электрофорез (в свободной среде) на примере устройства и принципа работы прибора "Капель" (Люмэкс).
- Электрофорез в геле в капилляре на примере устройства и принципа работы "генного анализатора" ABI 310 (Applied Genomics).
- Элюция биополимеров из геля.
- Общее устройство центрифуги.
- Классификация хроматографических методов по геометрии пространства процесса, способу элюции, направлению перемещения фаз.
- Использование масс-спектрометрии для анализа молекул биополимеров.
- "Полуколичественная ПЦР" как способ оценки начальной концентрации матрицы - варианты метода и способов обработки результатов, критерии оценки адекватности проведения эксперимента, разновидности стандартов, ограничения подхода.
- Метки, используемые для Real-Time PCR, принципы детекции, преимущества, недостатки, основные сферы применения.
- Альтернативные подходы к точному определению количества матрицы ПЦР: Digital PCR и метод молекулярных колоний.

- Используемые в MPSS методы клональной амплификации и определения нукл. последовательностей амплификатов.
- Внедренные в практику системы массового параллельного секвенирования.
- Перспективные системы массового параллельного секвенирования.

Учебно-методическое и информационное обеспечение дисциплины

основная литература:

Учебные пособия:

1. Остерман Л.А. Исследование биологических макромолекул электрофокусированием, иммуноэлектрофорезом и радиоизотопными методами. М.: Наука, 1983. 304 с.
2. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие). М.: Наука, 1981. 288 с.
3. Остерман Л.А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот. М.: Наука, 1985. 536 с.
4. Москвин Л.Н., Царицына Л.Г. Методы разделения и концентрирования в аналитической химии. Л.: Химия, 1991. 256 с.
5. Сакодынский К.И., Бражников В.В., Волков С.А., Зельвенский В.Ю. Приборы для хроматографии. М.: Машиностроение, 1987. 264 с.
6. Сакодынский К.И., Бражников В.В., Волков С.А., Зельвенский В.Ю. Аналитическая хроматография. М.: Химия, 1993. 463 с.
7. Бидлингмейер Б. и др. Препаративная жидкостная хроматография. М.: Мир, 1990. 360 с.
8. Галь Э., Медьеши Г., Верецки Л. Электрофорез в разделении биологических макромолекул. М.: Мир, 1982. 448 с.
9. Simpson C.F., Whittaker M. Electrophoretic techniques. Academic Press, 1983. 280 p.
10. Годовикова Т.С., Попова Т.В. Биоорганическая химия. Часть 2. Методы выделения, фракционирования, очистки

белков и их компонентов. Учебное пособие. Редакционно-издательский центр НГУ. 2006.144 с.

Справочники:

1. Р.Досон, Д.Эллиот, У.Эллиот, К.Джонс. Справочник Биохимика. Москва, "Мир", 1991г. (R.M.C.Dawson, D.C.Elliot, W.H.Elliot, K.M.Jones. Data for Biochemical Research. 3rd edition. Clarendon Press, Oxford, 1986)

Оригинальные статьи, обзоры:

2. Г.И.Абелев, Э.Р.Карамова Автоматика на пленках: противоточный изотахофорез и иммуноэлектрохроматография. Биохимия, 1996, т.61, вып.11, с.1984-1994
3. V.N.Karamychev et al. Detecting the DNA kinks in a DNA-CRP complex in solution with iodine-125 radioprobing. Nature structural biol., 1999, V.6, pp.747-750.
4. B.Vogelstein, K.V.Kinzler. Digital PCR. PNAS, 1999, V.96, pp.9236-9241.
5. H.V.Chetverina, T.R.Samatov, V.I.Ugarov, A.B.Chetverin. Molecular Colony Diagnostics: Detection and Quantitation of Viral Nucleic Acids by In-Gel PCR. BioTechniques, 2002, V.33, pp.150-156.
6. Organelle Proteomics in Methods in Molecular Biology™ Volume 432, 2008, pp 51-64. Purification of Saccharomyces cerevisiae Mitochondria by Zone Electrophoresis in a Free Flow Device Hans Zischka, Norbert Kinkl, Ralf J. Braun, Marius Ueffing

дополнительная литература:

7. Р.Досон, Д.Эллиот, У.Эллиот, К.Джонс. Справочник Биохимика. Москва, "Мир", 1991г. (R.M.C.Dawson, D.C.Elliot, W.H.Elliot, K.M.Jones. Data for Biochemical Research. 3rd edition. Clarendon Press, Oxford, 1986)
8. Г.И.Абелев, Э.Р.Карамова Автоматика на пленках: противоточный изотахофорез и иммуноэлектрохроматография. Биохимия, 1996, т.61, вып.11, с.1984-1994
9. V.N.Karamychev et al. Detecting the DNA kinks in a DNA-CRP complex in solution with iodine-125 radioprobing. Nature structural biol., 1999, V.6, pp.747-750.
10. B.Vogelstein, K.V.Kinzler. Digital PCR. PNAS, 1999, V.96, pp.9236-9241.
11. H.V.Chetverina, T.R.Samatov, V.I.Ugarov, A.B.Chetverin. Molecu-

- lar Colony Diagnostics: Detection and Quantitation of Viral Nucleic Acids by In-Gel PCR. BioTechniques, 2002, V.33, pp.150-156.
12. Organelle Proteomics in Methods in Molecular Biology™ Volume 432, 2008, pp 51-64. Purification of Saccharomyces cerevisiae Mitochondria by Zone Electrophoresis in a Free Flow Device Hans Zischka, Norbert Kinkl, Ralf J. Braun, Marius Ueffing

Материально-техническое обеспечение дисциплины

- В качестве технического обеспечения лекционного процесса используется ноутбук, мультимедийный проектор, доска.
- Для демонстрации иллюстрационного материала используется программа Microsoft Power Point.
- Проведение контрольных работ и экзамена обеспечивается печатным раздаточным материалом.

Программа составлена в соответствии с требованиями ФГОС ВПО и с ОС ВПО, принятым в ФГАОУ ВО Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, с учетом рекомендаций ООП ВПО по направлению «020201 ФУНДАМЕНТАЛЬНАЯ И ПРИКЛАДНАЯ ХИМИЯ».

Автор: Морозов Игорь Владимирович, к.б.н., доцент кафедры молекулярной биологии ФЕН НГУ.

Программа одобрена на заседании кафедры молекулярной биологии "22" августа 2014 г.

Секретарь кафедры к.х.н.  Л.М. Халимская