

Белорусский государственный университет

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по учебной работе



_____ А.Л. Толстик

« 15 » апр 2014 г.

Регистрационный № УД - 991/баз.

Биополимеры клетки и методы их анализа

**Учебная программа учреждения высшего образования
по учебной дисциплине для специальности:**

1-31 01 01 Биология (по направлениям)
специализаций 1-31 01 01-01 25 Молекулярная биология и
1-31 01 01-02 25 Молекулярная биология

СОСТАВИТЕЛЬ:

Ольга Борисовна Русь, доцент кафедры молекулярной биологии Белорусского государственного университета, кандидат химических наук, доцент

РЕЦЕНЗЕНТЫ:

Леонид Николаевич Валентович, заведующий лабораторией «Центр аналитических и генно-инженерных исследований», кандидат биологических наук;

Владислав Евгеньевич Мямин, доцент кафедры микробиологии Белорусского государственного университета, кандидат биологических наук, доцент

РЕКОМЕНДОВАНА К УТВЕРЖДЕНИЮ:

Кафедрой молекулярной биологии Белорусского государственного университета (протокол № 17 от 20 марта 2014 г.);

Научно-методическим советом Белорусского государственного университета (протокол № от 2014 г.)

Ответственный за редакцию: Ольга Борисовна Русь

Ответственный за выпуск: Ольга Борисовна Русь

ПОЯСНИТЕЛЬНАЯ ЗАПИСКА

Курс «Биополимеры клетки и методы их анализа» - первый учебный курс, читаемый студентам, распределившимся на кафедру молекулярной биологии. Изучение данной дисциплины – важный этап в подготовке современных специалистов в области молекулярной биологии.

Цель курса - расширить представление студентов, специализирующихся на кафедре молекулярной биологии, о строении природных биополимеров и о разнообразных экспериментальных подходах к исследованию состава и структуры биомолекул. Опыт, полученный студентами в ходе изучения данной дисциплины, будет полезен при выполнении курсовых и дипломных научных работ.

Задачей учебной дисциплины является изучение структурной организации биологических макромолекул и основных методов для их выделения и анализа.

Программа курса составлена с учетом межпредметных связей и программ по смежным учебным дисциплинам («Биохимия», «Молекулярная биология» и др.).

В ходе изучения данного курса студенты должны

знать:

- основные классы природных биополимеров,
- принципы физико-химических методов анализа биополимеров (центрифугирования, хроматографии, электрофоретических методов, спектральных методов),
- методы выделения и очистки белков,
- методы определения состава и последовательности аминокислотных остатков в белках,
- принципы организации вторичной, сверхвторичной, третичной и четвертичной структур белков, а также методы исследования биомолекул на различных уровнях организации,
- методы определения молекулярной массы белков и нуклеиновых кислот,
- методы секвенирования нуклеиновых кислот,
- характеристику форм ДНК на уровне вторичной структуры,
- методы исследования вторичной и третичной структур нуклеиновых кислот,
- иметь понятие о белок-белковых взаимодействиях и о взаимодействиях белков с ДНК и с низкомолекулярными лигандами, а также о методах, использующихся для исследования такого рода взаимодействий,
- биологическую роль и уровни структурной организации полисахаридов;

уметь:

- рассчитывать рабочие концентрации веществ, делать разведения препаратов;

- строить калибровочный график с использованием растворов с различным содержанием белка,
- количественно определять общее содержание белков в биологических препаратах различными методами,
- разделять биомолекулы посредством гель-фильтрации и определять коэффициент распределения для биомолекул при проведении гель-фильтрации.

владеть:

- навыками приготовления растворов и построения калибровочных графиков;
- базовыми методами, применяемыми для выделения и анализа белков и нуклеиновых кислот.

В соответствии с учебным планом продолжительность учебного курса составляет 64 ч, из которых 34 ч – аудиторных занятий: 24 ч – лекционных, 8 ч – лабораторных занятий, 2 ч – УСР. Программа курса включает пять взаимосвязанных разделов.

ПРИМЕРНЫЙ ТЕМАТИЧЕСКИЙ ПЛАН

№ разделов и тем	Наименование разделов и тем	Аудиторные часы				
		Всего	Лекции	Лабораторные занятия	УСР	Самостоятельная работа
1.	Введение	2	2		-	2
2.	Принципы физико-химических методов анализа биополимеров	11	6	4	1	10
3.	Методы исследования белков	13	8	4	1	8
4.	Исследование нуклеиновых кислот	6	6			8
5.	Анализ полисахаридов	2	2			2
ИТОГО:		34	24	8	2	30

СОДЕРЖАНИЕ УЧЕБНОГО МАТЕРИАЛА

1. ВВЕДЕНИЕ

Основные классы природных биополимеров. Размеры и форма биомолекул. Визуализация макромолекул. Фракционирование клеточного содержимого (гомогенизация, экстракция, центрифугирование). Способы разрушения клеток (физические, химические, химико-ферментативные методы).

2. ПРИНЦИПЫ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ МЕТОДОВ АНАЛИЗА БИОПОЛИМЕРОВ

Методы разделения. Центрифугирование (дифференциальное, зонально-скоростное, равновесное). Препаративное и аналитическое центрифугирование. Хроматография (адсорбционная, распределительная, ионообменная, проникающая, аффинная (биоспецифическая); ВЭЖХ). Разделение с помощью мембран: диализ, ультрафильтрация.

Электрофоретические методы. Электрофорез нативный и в денатурирующих условиях. Зональный электрофорез и электрофорез со свободной границей; ступенчатый (диск-электрофорез) и градиентный электрофорез. Изоэлектрическое фокусирование, изотахофорез, капиллярный электрофорез. Одномерный и двумерный электрофорез. Способы детекции белков в полиакриламидном геле. Радиоизотопные метки, нерадиоактивные метки (флуоресцентные метки, биотин-стрептавидиновая система, метод ECL). Особенности электрофореза нуклеиновых кислот: разделение и детекция. Пульсовый электрофорез.

Спектрометрические методы. Спектрофотометрия в видимой и УФ-областях, спектрофлуориметрия, ЭПР, ЯМР, масс-спектрометрия.

3. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ БЕЛКОВ

Молекулярная масса, размер и форма белковых молекул. Методы определения молекулярной массы белков (ультрацентрифугирование, гель-фильтрация, ДСН-ПААГ электрофорез, масс-спектрометрия).

Методы выделения и очистки белков. Классификация методов по используемому характерному параметру макромолекулы: (1) заряд: ионообменная хроматография, электрофорез, изоэлектрическое фокусирование, высаливание; (2) полярность: адсорбционная, гидрофобная хроматографии; (3) размер: диализ и ультрафильтрация, гель-электрофорез, гель-фильтрационная хроматография, ультрацентрифугирование; (4) специфичность: аффинная хроматография. Оценка гомогенности белкового препарата.

Методы количественного определения белка в биологическом материале (колориметрические методы: биуретовый метод, метод Лоури, метод Брэдфорда; спектрофотометрический метод).

Аминокислотный анализ белков. Устройство аминокислотного анализатора.

Определение последовательности аминокислот в белках (первичной структуры). Разделение и очистка полипептидных цепей. Разрыв дисульфидных связей внутри полипептидной цепи. Определение N- и C-концевых остатков полипептида. Фрагментация полипептидной цепи (ферментативные и химические методы). Разделение пептидов, получаемых при расщеплении белков. Определение аминокислотного состава каждого из

фрагментов (метод Эдмана, автоматическое определение аминокислотной последовательности, масс-спектрометрия). Реконструкция полипептидной цепи. Локализация дисульфидных связей. Определение первичной структуры белка по нуклеотидной последовательности ДНК.

Вторичная структура белков (α -спираль, β -складчатый слой, β -петля, неупорядоченные структуры полипептидных цепей). Методы исследования вторичной структуры (рентгеноструктурный анализ кристаллических образцов, круговой дихроизм, дисперсия оптического вращения).

Сверхвторичная структура белков. Понятие о структурных и функциональных доменах.

Третичная структура белков. Методы изучения третичной структуры (анализ кристаллических образцов и исследование пространственного строения белков и пептидов в растворе).

Четвертичная структура олигомерных белков. Методы исследования четвертичной структуры (рентгеноструктурный анализ, электронная микроскопия, электрофорез, ультрацентрифугирование).

Денатурация и ренатурация белков.

Взаимодействие белков с другими белками и с низкомолекулярными лигандами. Примеры взаимодействий белок-белок. Методы изучения белок-белковых взаимодействий (электрофорез, коиммунопреципитация, аффинная хроматография, FRET, дальний вестерн, двугибридная система). Методы исследования взаимодействия белков с низкомолекулярными лигандами. Примеры взаимодействий белок-низкомолекулярный лиганд. Методы, основанные на разделении свободной и связанной фракций лиганда. Методы, основанные на регистрации изменений физико-химических характеристик в процессе комплексообразования. Регистрация изменений размеров белковой молекулы, фиксирующей лиганд.

4. ИССЛЕДОВАНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Определение молекулярной массы нуклеиновых кислот. Количественное определение нуклеиновых кислот в биологическом материале (спектрофотометрический метод, флуориметрический метод с использованием этидиум-бромид). Методы выделения тотальной и плазмидной ДНК. Методы выделения РНК. Гидролиз нуклеиновых кислот.

Пуриновые и пиримидиновые основания. Нуклеозиды и нуклеотиды. Первичная структура нуклеиновых кислот. Секвенирование нуклеиновых кислот (метод химической дегградации, ферментативный метод (метод терминаторов), пиросеквенирование). Автоматическое секвенирование. Определение нуклеотидной последовательности РНК.

Вторичная структура нуклеиновых кислот. Двойная спираль ДНК. Комплементарные и межплоскостные взаимодействия нуклеиновых оснований. Полиморфизм двойной спирали ДНК (B-, A-, C-, T-, Z-формы). Макромолекулярная структура РНК. Различные типы РНК. Методы исследования вторичной структуры нуклеиновых кислот

(рентгеноструктурный анализ, круговой дихроизм, дисперсия оптического вращения и др.).

Третичная структура нуклеиновых кислот. Методы исследования третичной структуры (рентгеноструктурный анализ, метод разрезанных молекул и др.).

Денатурация и ренатурация нуклеиновых кислот.

Комплексы нуклеиновых кислот с белками. Примеры. Изучение взаимодействий молекул ДНК с белками: связывание на фильтрах, изменение электрофоретической подвижности в геле, футпринтинг, метод разрезанных молекул, спектральные методы.

5. АНАЛИЗ ПОЛИСАХАРИДОВ

Полисахариды про- и эукариотических организмов. Гомо- и гетерогликаны. Протеогликаны. Липополисахариды. Биологическая роль. Первичная, вторичная и более высокие уровни организации полисахаридов. Исследование строения полисахаридов. Применение полисахаридов в промышленности, биотехнологии, медицине.

ИНФОРМАЦИОННО-МЕТОДИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

ЛИТЕРАТУРА

О с н о в н а я

1. *Албертс Б.* Молекулярная биология клетки / Б. Албертс, Д. Брей, Дж. Льюис, М. Рефф, К. Робертс, Дж. Уотсон. М.: Мир, 1994, Т. 1-3.
2. *Кольман Я.* Наглядная биохимия / Я. Кольман, К.-Г. Рем. М: Мир, 2000.
3. *Овчинников Ю.А.* Биоорганическая химия / Ю.А. Овчинников. М.: Просвещение, 1987.
4. *Остерман Л.А.* Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование / Л.А. Остерман. М.: Наука, 1981.
5. *Остерман Л.А.* Исследование биологических макромолекул изоэлектрофокусированием, иммуноэлектрофорезом и радиоизотопными методами / Л.А. Остерман. М.: Наука, 1983.
6. *Остерман Л.А.* Хроматография белков и нуклеиновых кислот / Л.А. Остерман. М.: Наука, 1985.
7. *Чемерис А.В.* Секвенирование ДНК / А.В. Чемерис, Э.Д. Ахунов, В.А. Вахитов. М.: Наука, 1999.
8. *Alberts B.* Molecular biology of the cell / B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter. 4th edition, 2002.
9. *Berg J.M.* Biochemistry / J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer. New York: W.H. Freeman and Co., 2002.

Д о п о л н и т е л ь н а я

1. *Дарбре А.* Практическая химия белка / А. Дарбре. М.: Мир, 1989.
2. *Досон Р.* Справочник биохимика / Р. Досон, Д. Эллиот, У. Эллиот, К. Джонс. М.: Мир, 1991.
3. *Карасек Ф.* Введение в хромато-масс-спектрометрию / Ф. Карасек, Р. Клемент. М.: Мир, 1993.
4. Проблема белка, в 5 томах. М.: Наука, 1996.
5. Руководство по капиллярному электрофорезу: Курс лекций Х.Энгельгардта. - М., 1996.
6. *Сердюк И.Н.* Физические методы в структурной молекулярной биологии в начале XXI века / И.Н. Сердюк. Успехи биологической химии. 2002. Т. 42. С.3-28.
7. *Скоупс Р.* Методы очистки белков / Р. Скоупс. М.: Мир, 1985.
8. *Bloomfield V.A.* Nucleic acids. Structures, properties, and functions / V.A. Bloomfield, D.M. Crothers, I.T. Ir. University Science Books, Sausalito, California, 2000.
9. Essentials of glycobiology / ed. by A.Varki, R. Cummings et al., 1999.
10. Ссылки на сайты в Internet:
Medline (National Library of Medicine's search) - www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi
Химический портал - <http://chemport.ru/>
Соросовский образовательный журнал - <http://journal.issep.rssi.ru/>
Большая научная библиотека - <http://sci-lib.com/>

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ОРГАНИЗАЦИИ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ СТУДЕНТОВ

Для организации самостоятельной работы студентов по учебной дисциплине следует использовать современные информационные технологии: разместить в сетевом доступе комплекс учебных и учебно-методических материалов (программа, курс лекций, мультимедийные презентации, методические указания к лабораторным занятиям, список рекомендуемой литературы и информационных ресурсов, задания в тестовой форме для самоконтроля и др.).

Эффективность самостоятельной работы студентов целесообразно проверять в ходе текущего и итогового контроля знаний. Для общей оценки качества усвоения студентами учебного материала рекомендуется использование рейтинговой системы.

ПЕРЕЧЕНЬ РЕКОМЕНДУЕМЫХ СРЕДСТВ ДИАГНОСТИКИ

Учебным планом специальности 1-31 01 01 Биология, специализации Молекулярная биология в качестве формы итогового контроля по учебной

дисциплине рекомендован зачет. Для текущего контроля качества усвоения знаний студентами можно использовать следующий диагностический инструментарий:

- защита индивидуальных заданий при выполнении лабораторных работ;
- защита подготовленного студентом реферата;
- устные опросы;
- письменные контрольные работы по отдельным темам курса;
- компьютерное тестирование.