


Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт белка
Российской академии наук

ПРИНЯТО Ученым советом ИБ РАН

Протокол № 4 от 09.06.2025 г.

Зам. директора ИБ РАН




д. х. н. А. Д. Никулин

Специальность 1.5.3. – Молекулярная биология

Рабочая программа по дисциплине

«МЕТОДЫ ХИМИИ БЕЛКА»

Составитель курса:

доктор химических наук

А. Д. Никулин

Пушино 2025

1. Цели и задачи изучения дисциплины

Курс «Методы химии белка» посвящен, прежде всего, методам химии белков, а также химии белоксинтезирующего аппарата живых клеток, включая нуклеиновые кислоты, и является составной частью образовательной программы аспирантуры по специальности 1.5.3. «Молекулярная биология». Курс рассчитан на аспирантов, специализирующихся в области молекулярной биологии, и научных сотрудников, начинающих работать в этой области.

В курсе лекций дается краткое представление о химической структуре белков и нуклеиновых кислот (свойствах аминокислот и нуклеотидов, полипептидной и нуклеотидной цепях, свойствах данных биополимеров). Описываются основные химические методы, которые применялись вчера и используются сегодня для выделения и исследований белков и нуклеиновых кислот. Проводится сравнительный анализ возможностей и недостатков различных методов, используемые при изучении структуры и функции белков и нуклеиновых кислот.

Цели. В результате освоения дисциплины обучающийся должен знать прежде всего, методы химии белков, а также химии белоксинтезирующего аппарата живых клеток, включая нуклеиновые кислоты.

Задачи. Получение представлений о химической структуре белков и нуклеиновых кислот (свойствах аминокислот и нуклеотидов, полипептидной и нуклеотидной цепях, свойствах данных биополимеров); основных химических методах, которые применялись вчера и используются сегодня для выделения и исследований белков и нуклеиновых кислот; сравнительном анализе возможностей и недостатков различных методов, используемые при изучении структуры и функции белков и нуклеиновых кислот. Умение использовать полученные знания.

Дисциплина является факультативной.

Курс «Методы химии белка» непосредственно связан с рядом других курсов программы послевузовского профессионального образования по молекулярной биологии:

«Принципы структурной организации белков и нуклеиновых кислот»;

«Биосинтез белка и его регуляция»;

«Физические методы в молекулярной биологии»

и должен проводиться параллельно с ними.

Общая трудоемкость курса – 2 ЗЕТ, из них лекции – 36 часов.

2. Содержание дисциплины (модуля)

1. Введение.

- Белки, нуклеиновые кислоты и молекулярная биология (краткая историческая справка). Роль белков и нуклеиновых кислот (НК) в жизни и эволюции организмов. Развитие методов химии и их применение для изучения свойств биологических макромолекул;
- Разнообразие белков и НК: простые и сложные белки, биологические пептиды, ДНК и РНК. Классификация белков и НК;
- Стратегия изучения белков и нуклеиновых кислот. Свойства биологических макромолекул (физико-химические свойства, структура и функция) и накопленный арсенал методов для их исследования.

2. Химическая структура белка и нуклеиновой кислоты.

- Структурная организация белков и нуклеиновых кислот: аминокислоты, нуклеотиды и полимерная цепь, понятие о первичной структуре и других уровнях организации биологических макромолекул, мономеры, олигомеры и комплексы;
- Понятие об аминокислотах, структура и свойства. Разнообразие аминокислот и их классификация. Протеиногенные и непротеиногенные аминокислоты. Стереоизомеры. Кислотно-основные свойства и растворимость аминокислот. Типы боковых групп. Проявление свойств аминокислотных остатков в белке.
- Понятие о нуклеотидах, структура и свойства. Компоненты нуклеотидов. Разнообразие нуклеотидов и их классификация. Основные и минорные нуклеотиды в НК. Проявление свойств нуклеотидных остатков в НК. Роль нуклеотидов и их производных в метаболизме клетки.

3. Выделение и очистка белков и нуклеиновых кислот.

- Оборудование и реактивы. Чистота проведения эксперимента;
- Особенности выделения белков и НК из разных биологических объектов (эукариоты, мезофильные бактерии, экстремофильные археи и бактерии, штаммы-продуценты). Методы разрушения клеточной стенки (физический, химический и энзиматический);
- Методы предварительной очистки образца:
центрифугирование и задачи, которые можно решить этим методом. Виды центрифугирования;
очистка образца, основанная на различии в растворимости белков, нуклеиновых кислот и других клеточных компонентов;
избирательная денатурация, как способ очистки белков или НК;
очистка биополимеров с использованием ферментов;
подготовка образца для последующих этапов очистки.
- Материалы и основное оборудование хроматографии. Хроматографическая очистка биополимеров. Основные принципы. Распределительная хроматография в жидкой фазе и в тонком слое. Адсорбционная хроматография. Гидрофобная хроматография. Гель-хроматография, эффект молекулярного сита. Ионообменная хроматография, аниониты, катиониты. Аффинная хроматография, принцип и возможности. Техника эксперимента. Высокоэффективная жидкостная хроматография. HPLC, FPLC. Принцип и оборудование.
- Использование для очистки белка полупроницаемых мембран.
- Эффективное сочетание хроматографических и других методов для очистки биомолекул. Факторы, влияющие на качество и количество выделенного образца.
- Кристаллизация белков или НК как способ их очистки.
- Как избежать инактивации биомолекулы (структурные или функциональные изменения, гидролиз и модификации) при ее выделении.

3. Электрофорез для анализа и очистки биополимеров.

- Электрофорез белков и НК (историческая справка). Полимерные гели, как среда для электрофореза биологических макромолекул;
- Зональный электрофорез. Метод Леймля. Ступенчатый и градиентный электрофорез в ПААГ;
- Электрофорез в денатурирующих и неденатурирующих условиях;
- Двумерный электрофорез, изоэлектрофокусирование, метод О'Фаррелла, другие варианты двумерного электрофореза в ПААГ;
- Маркеры, лидирующие красители и визуализация полос;
- Анализ и использование образца после его электрофоретического разделения: выделение образца из геля, перенос образца на мембрану, радиоавтограф.

- Препаративный электрофорез в полиакриламидном геле. Оборудование и возможности метода.
- 4. Характеристика образца и подготовка его к исследованиям.**
- Методы приготовления образцов белков и НК для исследований:
Методы концентрирования. Осаждение солями, органическими растворителями и полимерами. Ультрафильтрация. Лиофилизация.
Растворение осадков белков или НК (денатурация и ренатурация). Удаление низкомолекулярных веществ из раствора (пересаживание, диализ через полупроницаемую мембрану или хроматографическое обессоливание).
 - Определение концентрации белка или НК в растворе:
Определение количества белка по азоту или НК по фосфору;
Колориметрические методы;
Спектрофотометрические методы.
 - Методы, позволяющие оценить чистоту препарата биомолекул:
Аналитическое ультрацентрифугирование и гель-хроматография, электрофорез в ПААГ, определение N- и C-концевых аминокислотных остатков, масс-спектрометрия.
 - Аминокислотный состав белка: кислотный и щелочной гидролиз, их особенности, преимущества и недостатки;
Аминокислотный анализатор, современные модели, чувствительность (флуорескамин и о-фталевый диальдегид, газожидкостная хроматография);
 - Нуклеотидный состав НК: химический и ферментативный гидролиз, методы разделения нуклеотидов и определения состава НК.
- 6. Определение первичной структуры белка.**
- Определение N- и C-концевых аминокислотных остатков: динитрофенильный, дансильный методы, гидразиолиз, амино- и карбоксипептидазы;
 - Методы фрагментации полипептидной цепи:
Химические методы специфического расщепления белка. Факторы, влияющие на специфичность и эффективность расщепления полимера;
Энзиматические методы расщепления белка. Специфичность протеаз, понятие об ограниченном и исчерпывающем гидролизе. Триптический гидролиз белка только по остаткам лизина или аргинина, или цистеина;
 - Методы разделения и очистки пептидов. Фингерпринт;
 - Определение аминокислотной последовательности белка:
Последовательная деградация пептидов по методу Эдмана и его современные модификации. Основные принципы работы секвенатора;
 - Альтернативный метод определения первичной структуры белка – сиквенс по гену.
 - Представление о химическом синтезе белков и пептидов. Синтезатор Меррифилда.
- 7. Определение первичной структуры ДНК и РНК.**
- Химические методы фрагментации полинуклеотидной цепи. Модификация нуклеотидов по азотистым основаниям и расщепление полинуклеотидной цепи;
 - Энзиматические методы фрагментации полинуклеотидной цепи. Специфические и неспецифические нуклеазы. ДНКазы и РНКазы;
 - Определение нуклеотидной последовательности ДНК:
Метод Максама-Гилберта;
Метод Сэнгера;
Современные варианты секвенирования ДНК и РНК. Основные принципы работы секвенатора.
 - Представление о химическом синтезе НК.

8. Изучение пространственной структуры белка, его межмолекулярных контактов и функциональных свойств химическими методами.

- Общая стратегия изучения пространственной структуры и других свойств белка;
- Химическая модификация аминокислотного остатка в белке. Задачи, решаемые при модификации белка. Модифицирующие агенты. Специфичность реакции и полнота модификации. Модификация аминогруппы, тиольных групп цистеина и метионина, имидазола гистидина, гидроксильных групп серина и треонина, гидроксила тирозина, триптофана, аргинина и лизина, аспарагиновой и глутаминовой кислот;
- Внутри- и межмолекулярные сшивки. Фотоактивируемые агенты;
- Использование белка как лиганда в аффинной хроматографии;
- Ограниченный ферментативный гидролиз белка. Специфичность и эффективность протеаз;
- Специфическое расщепление белка химическими агентами;
- Сравнительное расщепление или модификация свободного белка или его комплекса с другой молекулой (*метод foot-printing*).

9. Белковая инженерия.

Задачи и возможности метода. Специфический и неспецифический мутагенез. Примеры различных приемов мутагенеза. Использование методов генной инженерии для изучения структуры белка (*сайт направленный мутагенез*).

10. Изучение пространственной структуры РНК, ее межмолекулярных контактов и функциональных свойств химическими методами.

- Общая стратегия изучения пространственной структуры и других свойств РНК;
- Химические модификации в РНК. Изучение укладки полинуклеотидной цепи и конформационных изменений в ее пространственной структуре;
- Использование РНК как лиганда в аффинной хроматографии;
- Энзиматический гидролиз РНК. Специфические ферменты. Выявление элементов пространственной структуры и участков, защищаемых другими молекулами. Пробинг и изменение конформации РНК;
- Транскрипция РНК и ее производных *in vitro*. Задачи и возможности метода. Препаративная наработка РНК. Внесение мутаций в РНК вне клетки.
- Мутагенез: естественный (молекулярная эволюция) и искусственный (неосознанное вмешательство в живые организмы и лабораторный эксперимент). SELEX, SERF и др.

3. Перечень учебно-методического обеспечения для самостоятельной работы аспирантов по дисциплине (модулю)

Типовые контрольные задания для проведения текущего контроля успеваемости:

1. Перечислите уровни структурной организации белков и нуклеиновых кислот (с примерами).
2. Какой атом в протеиногенных аминокислотах является хиральным (и что это такое)?
3. Какие оптические изомеры аминокислоты входят в состав природных белков и почему?
4. Сколько хиральных атомов в молекуле треонина?
5. Чем отличается рибоза от дезоксирибозы: изобразите структурные формулы для простоты и наглядности ответа. Что такое нуклеозид?
6. Дайте определение рН и рК. Что такое изоэлектрическая точка (pI)?
7. Что такое ионное произведение воды? Чему равен рН 10 mM раствора NaOH?
8. Какой суммарный заряд (+ или -) будет иметь белок, имеющий pI=5.5,

- в растворе при $pH=7.4$ (и почему)?
9. В чем суть гиперхромного эффекта?
 10. Дайте определение хроматографии.
 11. Перечислите известные Вам виды хроматографии (по принципу разделения).
 11. Вкратце опишите принцип, лежащий в основе гель-фильтрации.
 12. Если Вы знаете ответ на п. 3, то сумеете сказать, что такое доступный объем колонки? В каком порядке предположительно элюируются с гель-фильтрационной колонки белки А, Б и В, если: $M_w(A) = 100$ кДа, $M_w(B)=30$ кДа, $M_w(V)=20$ кДа; белок В образует гомодимер?
 13. Вкратце опишите принцип, лежащий в основе ионообменной хроматографии. Что такое α и какие значения может принимать этот параметр? Что означает $\alpha=0$?
 14. Ионообменник какого типа нужно использовать для очистки белка, имеющего pI 5,5, в буфере с $pH=7,0$?
 15. Что такое электрофорез?
 16. Перечислите основные известные Вам химические вещества, используемые при формировании гелей для электрофореза. Какие гели преимущественно используются для электрофореза НК, а какие – для электрофореза белков.
 17. Каким образом можно регулировать «пористость» геля и для чего это необходимо?
 18. В чем состоит главное преимущество двумерного гель-электрофореза по сравнению с одномерным?
 19. К какому электроду (аноду или катоду) будет мигрировать в полиакриламидном геле РНК в буфере с $pH=6,5$ и почему?
 20. Какие методы используются для определения концентрации белков и нуклеиновых кислот? Какие аминокислотные остатки вносят вклад в поглощение белком света при длине волны 280 нм?
 21. Поясните, как концентрация белка в растворе (в терминах больше/меньше или прямой/обратной пропорциональности) влияет на величину его молярного коэффициента экстинкции и оптическую плотность образца.
 22. Каким образом обычно определяют аминокислотный состав (не последовательность!) полипептида. Для чего используется при этом нингидрин (флуорескамин)?
 23. Чем отличаются N- и C-концевые аминокислотные остатки в полипептиде от прочих? Каким образом можно их определить?
 24. Какие основные способы фрагментации (гидролиза) полипептида в контексте определения аминокислотной последовательности Вам известны? Приведите некоторые примеры для обоих.
 25. В чем суть метода Эдмана для определения аминокислотной последовательности полипептида?
 26. Каково преимущество непосредственного определения аминокислотной последовательности белка перед теоретической (по последовательности гена)?
 27. В чем отличие прямого метода секвенирования нуклеиновых кислот от непрямого?
 28. Опишите процесс твердофазного синтеза полипептида и назовите его преимущества перед синтезом полипептида на рибосомах.
 29. Для чего необходима защита активных групп при синтезе белков и НК *in vitro*?
 30. Для каких целей используют химическую модификацию аминокислотных остатков в белках и пептидах?
 31. Назовите наиболее реакционноспособную группу (и соответствующий остаток) в белках, приведите какой-либо пример реакции с этим остатком.
 32. Каким образом (в общем виде) можно при помощи химической модификации установить остатки, предположительно входящие в состав каталитического центра фермента? Приведите пример.
 33. Как используется модификация нуклеотидов РНК для определения сайта

- связывания лиганда (белка)? Каким образом, помимо модификации оснований РНК, можно получить эту информацию?
34. Что такое (и чем отличаются) внутри- и межмолекулярные химические сшивки? Для чего они используются?
 35. Приведите примеры химических агентов, используемых для сшивок. Какой общий признак делает их пригодными для формирования сшивок?
 36. Какие виды физических и химических факторов используют для случайного (ненаправленного) мутагенеза?
 37. Как при помощи метода SERF можно определить, с каким фрагментом РНК взаимодействует исследуемый белок? Нарисуйте схему и дайте её поэтапное объяснение.
 38. Опишите принцип метода иммунной электронной микроскопии на примере исследования положения рибосомных белков в рибосоме.

Примерные темы докладов:

1. Развитие методов химии и их применение для изучения свойств биологических макромолекул
2. Свойства биологических макромолекул (физико-химические свойства, структура и функция) и накопленный арсенал методов для их исследования.
3. Разнообразие белков и НК: простые и сложные белки, биологические пептиды, ДНК и РНК
4. Особенности выделения белков и НК из разных биологических объектов
5. Хроматографическая очистка биополимеров. Основные принципы.
6. Кристаллизация белков или НК как способ их очистки.
7. Понятие об аминокислотах, структура и свойства
8. Понятие о нуклеотидах, структура и свойства

Типовые вопросы для проведения промежуточной аттестации:

Разнообразие белков и нуклеиновых кислот. Классификация и ее типы.

Химическое расщепление ДНК и РНК. Особенности и возможности.

Определение N- и C-концевых аминокислотных остатков. Задачи, решаемые методом.

Компоненты белков и их физико-химические свойства.

Нуклеазы. Энзиматическое расщепление РНК и ДНК. Задачи, возможности и ограничения.

Компоненты нуклеиновых кислот и их физико-химические свойства.

Протеазы и их ингибиторы. Энзиматическое расщепление белка. Задачи, решаемые методом.

Физико-химические свойства белков и НК (внутримолекулярные и внешние факторы).

Химическое расщепление белка. Задачи, решаемые методом. Избранные примеры.

Методы предварительной очистки образца (белка или НК).

Секвенирование ДНК. Метод Максама-Гилберта (принцип и особенности).

Основные типы хроматографических методов очистки белков и НК (принципы разделения).

Фингерпринт. Последовательная деградация пептидов по Эдману (секвенирование).

Гель-хроматография и другие методы разделения молекул по размеру.

Синтез ДНК или РНК вне клетки (принципы и примеры).

Ионообменная, аффинная и металлохелатная хроматографии. Принципы методов.

Способы синтеза белков и пептидов (принципы и краткая характеристика).

Адсорбционная хроматография. Методы концентрирования макромолекул.

Оптические свойства биополимеров и методы определения концентрации белка и НК.

Электрофорез в ПААГ или других полимерах. Разнообразие подходов.

Химические модификации НК. Краткая характеристика и решаемые задачи.

Экспериментальные задачи, решаемые методом электрофореза молекул в ПААГ.

Химические модификации белков. Применение и избранные примеры.

Методы, позволяющие оценить чистоту препарата биомолекул.

Химический пробинг РНК. Задачи, решаемые данным методом.

Определение аминокислотного состава белка (принцип и решаемые задачи).

Методы химии и биохимии, применяемые для изучения конформации макромолекулы.

Определение нуклеотидного состава НК. Особенности гидролиза РНК и ДНК.

Белковая инженерия: рациональное совмещение достижений методов химии, молекулярной биологии и генетики.

Аминокислотный анализатор и Секвенатор (принципы работы).

Иммобилизация белка или НК (белки и НК – лиганды в аффинной хроматографии).

Бифункциональные реагенты и их применение для изучения белков и НК (примеры).

Метод Сэнгера в секвенировании НК (принцип и разнообразие применения).

Разнообразие видов и форм аминокислот, обнаруженных в клетках (например, протеиногенные и непротеиногенные).

Колориметрические методы определения концентрации биополимеров. Принципы и чувствительность.

Разнообразие видов и форм нуклеотидов, обнаруженных в клетках (например, основные и минорные типы).

Химические модификации аминокислотных остатков, позволяющие повысить специфичность энзиматического гидролиза белка.

Мутагенез: основные типы модификаций и их эффект на жизненные процессы.

Основные методы разрушения клеточной стенки (зависимость выбора метода от экспериментальной задачи).

4. Перечень основной и дополнительной учебной литературы, необходимой для освоения дисциплины (модуля)

ОСНОВНАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Геккелер, К. и Экштайн, Х. Аналитические и препаративные лабораторные методы. – М.: Химия, 1994.
2. Практическая химия белка. Под ред. А. Дарбре. – М.: Мир, 1989.
3. Аминокислоты. Пептиды. Белки. Под ред. Т. Дэвени и Я. Гергей. – М.: Мир, 1976
4. Дэвидсон, Д. Биохимия нуклеиновых кислот. – М.: Мир, 1976.
5. Ленинджер, А. Основы биохимии. 1-3 т. – М.: Мир, 1985.
6. Овчинников, Ю.А. Биоорганическая химия. – М.: Просвещение, 1987.
7. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: электрофорез и ультрацентрифугирование. – М.: Наука, 1981.
8. Остерман Л.А. Исследование биологических макромолекул электрофокусированием, иммуноэлектрофорезом и радиоизотопными методами. – М.: Наука, 1983.
9. Остерман Л.А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот. – М.: Наука, 1985.
10. Скоупс Р. Методы очистки белков. – М.: Мир, 1985.
11. Фрайфельдер Д. Физическая биохимия. – М.: Мир, 1980.
12. Шабарова, З.А. и Богданов. А.А. Химия нуклеиновых кислот. – М.: Химия, 1978.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА ДЛЯ УГЛУБЛЕННОГО ИЗУЧЕНИЯ ПРЕДМЕТА

1. Агол, В.И., Богданов, А.А., Гвоздев, В.А. и др. Молекулярная биология: Структура и биосинтез нуклеиновых кислот. под ред. А.С. Спирина. – М.: Высшая школа, 1990.
2. Гринштейн, Д. и Вениц, М. Химия аминокислот и пептидов. – М.: Мир, 1966
3. Жидкостная колоночная хроматография. под ред. З. Дейл, К. Мацек, Я. Янак. – М.: Мир, 1983.
4. Диксон, М. и Уэбб, Э. Ферменты. 1-3 т. – М.: Мир, 1982.
5. Кирхнер, Ю. Тонкослойная хроматография. – М.: Мир, 1981.
6. Кочетков, Н.К., Будовский, Э.И., Свердлов, Е.Д., Симукова, Н.А., Турчинский, М.Ф., Шибаев, В.Н. Органическая химия нуклеиновых кислот. – М. Химия, 1970.
7. Лурье А.А. Сорбенты и хроматографические носители. – М.: Химия, 1972.
8. Микельсон, А. Химия нуклеозидов и нуклеотидов. – М. Мир, 1966.
9. Мосолов, В.В. Протеолитические ферменты. – М.: Наука, 1971.
10. Биохимия. Учебник. Под ред. Е.С. Северина. – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2004.
11. Степанов В.М. Молекулярная биология. Структура и функции белков. под ред. А.С. Спирина. – М.: Высшая школа, 1996.
12. Турчинский Ю.М. Сера в белках. – М.: Наука, 1977.
13. Туркова Я. Афинная хроматография. – М.: Мир, 1980.
14. Шапот. В.С. Нуклеазы. – М.: Медицина. 1968.
15. Шульц, Г. и Ширмер, Р. Принципы структурной организации белков. – М.: Мир, 1982.
16. Якубке, Х.-Д. и Ешкайт, Х. Аминокислоты, пептиды, белки. – М.: Мир, 1985.

5. Перечень ресурсов информационно-телекоммуникационной сети Интернет, необходимых для освоения дисциплины (модуля)

Интернет-ресурсы

Зарубежные журналы и библиографические базы данных, доступные через Интернет

<http://www.chem.msu.ru/rus/library/licenced.html>

<https://scifinder.cas.org>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>