

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт белка
Российской академии наук

ПРИНЯТО Ученым советом ИБ РАН

Протокол № 5 от 08.06.2023 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 2023

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. Стереизомеры. 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 Леймли. 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 аминокислотной группы, тиольных групп цистеина и метионина, имидазола гистидина, гидроксильных групп серина и треонина, гидроксила тирозина, триптофана, аргинина и лизина, аспарагиновой и глютаминовой 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 геномной инженерии для изучения структуры белка (*сайт направленный мутагенез*).

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

- Общая стратегия изучения пространственной структуры и других свойств НК;
- 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, $M_w(B)=20$ 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 рандомного (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 ферментативного 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/>