Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт белка
Российской академии наук

ПРИНЯТО Ученым советом ИБ РАН
Протокол № 5 от 08.06.2026 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:

кандидат биологических наук

О. В. Кравченко

Пущино 2026

Рабочая программа по дисциплине «Методы химии белка»

1. Цели и задачи изучения дисциплины.

Цель курса «Методы химии белка» – сформировать у обучающихся целостное представление о химии и структуре белков: от свойств отдельных аминокислот и пептидной связи до пространственной организации белковой молекулы, а также познакомить с современными методами получения, очистки, анализа и определения структуры белков, необходимыми для самостоятельной исследовательской работы в области биохимии, молекулярной биологии и биотехнологии.

В курсе лекций раскрыты основы химии аминокислот, пептидов и белков, а также детально разобрана их структурная организация – от первичной последовательности до четвертичной структуры. Подробно рассмотрены практические подходы к выделению, очистке и анализу белков: хроматография, электрофорез, методы определения концентрации и установления аминокислотной последовательности. Отдельное внимание уделено современным методам изучения пространственной структуры макромолекул – рентгеноструктурному анализу, крио-ЭМ, ЯМР, а также вычислительным подходам.

Задачи дисциплины:

- Изучить свойства, классификацию и качественные реакции аминокислот, методы их получения и разделения рацемических смесей.
- Изучить строение пептидов, их функции, принципы синтеза.
- Разобраться в физико-химических и кислотно-основных свойствах белков, их функциях, а также в уровнях структурной организации.
- Ознакомиться с методами определения концентрации и аминокислотной последовательности белков.
- Научиться подбирать методы выделения и очистки белков: лизис, центрифугирование, диализ, ультрафильтрацию, хроматографию.
- Получить знания о электрофоретических методах анализа белков.
- Понять принципы и ограничения методов структурной биологии: рентгеноструктурного анализа, крио ЭМ, ЯМР, малоуглового рассеяния.
- Сформировать представление о вычислительных подходах к предсказанию структуры и оценке качества моделей.

В результате освоения дисциплины обучающийся должен знать строение и свойства аминокислот, пептидов и белков, уметь выбирать адекватные методы их получения, анализа и очистки, а также владеть базовыми представлениями о структурной биологии и биоинформатических инструментах работы с белками.

Курс «Методы химии белка» 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.

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

Аминокислоты

Понятие о белках. История химии белка. Звенья белка – аминокислоты. Обозначения аминокислот и история их названий.

Протеиногенные и непротеиногенные аминокислоты. Нестандартные протеиногенные аминокислоты. Классификация α-аминокислот по химическому строению радикала, по полярности и заряду боковой цепи, по питательной ценности.

Физические свойства аминокислот. Спектры поглощения аминокислот. Кислотно-основные свойства аминокислот, цвиттер-ионы. Кислоты Бренстеда. Изоэлектрическая точка аминокислот, константа диссоциации. Оптическая изомерия аминокислот, L- и D-изомеры.

Химические реакции, характерные для аминокислот: реакции с совместным участием обеих групп, реакции карбоксильных групп, реакции аминогрупп. Специфические реакции на аминокислоты. Реакции на индивидуальные аминокислоты.

Получение α-аминокислот: биологический метод (ферментативный синтез, микробиологический синтез, гидролиз белков), химический метод. Проблемы химического метода синтеза. Методы разделения рацемических смесей: физический, физико-химический, химический, биологический (ферментативный).

Пептиды

Понятие о пептидах. История открытия пептидов. Граница разделения пептидов и белков.

Образование пептидной связи. Геометрия пептидной связи. Химические свойства пептидов. Обозначения пептидов; тривиальные названия; названия, отражающие биологическую роль.

Особенности строение пептидов: линейные, разветвлённые, циклические. Классификация пептидов по типу химической связи: гомодетные и гетерогетные. Классификация пептидов по составу: гомомерные и гетеромерные. Природные пептиды с D-аминокислотами. Модифицированные малые пептиды. Малые линейные пептиды, глутатион. Циклические пептиды.

Биологические функции пептидов. Пептидные гормоны, токсины, антибактериальное действие пептидов. Антимикробные пептиды.

Способы получения пептидов. Первые эксперименты по химическому синтезу. Хлорангидридный метод. Азидный метод.

Сложности и проблемы химического синтеза пептидов. Защитные группы при пептидном синтезе. Активация карбоксильной группы. Временные и постоянные защитные группы при химическом синтезе. Boc- и Fmoc-стратегии, сравнение стратегий.

Два основных метода синтеза пептидов: твердофазный и жидкофазный, их сравнение. Смола Меррифилда. Плюсы и минусы твердофазного и жидкофазного синтеза. Нобелевская премия по химии 2026 года: открытие нелинейных эффектов и автокатализа в асимметричном органическом синтезе.

Белки

Понятие о белках. Элементный состав белков. Биологические функции белков. Физико-химическая классификация белков. Классификация белков по химическому составу. Классификация по форме белка.

Уровни организации структуры белка.

Первичная структура белка. Гомология и эволюционное родство. Гомологичные белки. Ортологи и Паралоги.

Вторичная структура белка. α-спираль, спираль 3_{10}, π-спираль, полипролиновая спираль, β-лист. Антипараллельный и параллельный β-лист. β-поворот. Регулярные и

нерегулярные элементы вторичной структуры. Карта Рамачандрана. Углы φ и ψ. Разрешенные и запрещенные области.

Третичная структура белка. Типы взаимодействий, удерживающих форму белка в третичной структуре. Понятие о домене белка.

Четвертичная структура белка. Типы олигомеров. Взаимодействия, удерживающие четвертичную структуру.

Сравнение белков и пептидов.

Химические свойства белков. Кислотно-основные свойства белков. Группы боковых радикалов аминокислотных остатков, способные у ионизации. Причина ограниченной буферной емкости белков. Изоэлектрическая точка белка. Экспериментальные методы определения изоэлектрической точки. Сервисы для расчета изоэлектрической точки.

Качественные реакции на белки.

Концентрация белка. Определение концентрации белка по оптической плотности. Биуретовый метод (стандартный и микробиуретовый), метод Лоури, метод с бицинхониновой кислотой, метод Бредфорда, метод Кьельдаля.

Определение аминокислотной последовательности белка. Прямой и косвенный подход. Подготовка образцов к анализу. Расщепление полипептидной цепи на фрагменты с помощью химических агентов или ферментов. Определение N-концевой аминокислоты. Метод Сенгера. Дансильный метод. Амипептидазный метод. Определение С-концевой аминокислоты. Карбоксипептидазный метод. Метод Акабори. Определение полной аминокислотной последовательности. Стратегия фрагментации и комбинаторной сборки. Метод Эдмана.

Метод масс-спектрометрии. Методы ионизации: электроспрей, лазерно-индуцированная десорбция с матрицей. Метод пептидного фингерпринтинга. Тандемная масс-спектрометрия.

Выделение белка

История развития методик очистки и разделения макромолекул. Типы клеток, использующихся для выделения белка.

Источники белков для исследовательских целей. Общая схема выделения белка. Проблемы при выделении белков: протеолиз, агрегация, денатурация. Виды денатурации. Классификация видов денатурации белка по природе воздействующего фактора.

Физическая денатурация. Химическая денатурация. Виды детергентов. Термофильные организмы и термофильные белки.

Ренатурация белка. Самопроизвольная ренатурация, ренатурация с помощью шаперонов, искусственная ренатурация (в лаборатории).

Составы экстракционных буферов при выделении белка: типы солей, буферов и добавок и ингибиторов протеаз.

Мембранные белки. Ионные и неионные детергенты.

Разрушение клеток. Методы разрушения клеток. Химический лизис. Осмотический шок. Автолизис. Истирание в ступке с окисью алюминия. Ультразвук: плюсы и минусы метода.

Метод французского пресса: плюсы и минусы метода.

Центрифугирование. Скорость вращения и относительное центробежное ускорение. Виды роторов. Правила безопасности и точности пользования центрифугой. Виды центрифуг. Дифференциальное центрифугирование. Тельца включения и мембранные белки: особенности работы.

Очистка белка

Дохроматографическая очистка белка. Диализ: суть метода, протокол работы, цели применения, плюсы и минусы метода. Ультрафильтрация. Высаливание, тепловая денатурация, осаждение органическими растворителями.

Хроматография. История развития метода. Принципы хроматографии. Коэффициент распределения. Тонкослойная и колоночная хроматография. Основные элементы колоночной хроматографии. Виды элюирования.

Особенности белков, на которых основано их разделение.

Адсорбционная хроматография. Распределительная хроматография. Нормально-фазовая и обратно-фазовая хроматография: принцип и сравнение.

Гель-проникающая хроматография: виды смол, свободный объем колонки, длина колонки, коэффициент доступности, применение.

Гидрофобная хроматография. Суть метода, виды и сила носителей, влияние буферного раствора, этапы.

Ионообменная хроматография. Суть метода, катионообменная и анионообменная хроматография, виды смол, правила выбора смол, этапы хроматографии.

Аффинная хроматография. Суть метода, ключевые компоненты, основные разновидности, этапы.Металл-хелатная аффинная хроматография. Иммуносорбция.

Очистка и хранение хроматографических колонок.

Методы электрофореза

Явление электрофореза. Развитие метода электрофореза. Полиакриламидный гель: компоненты и их характеристики. Полимеризация полиакриламидного геля. Общая плотность геля и степень сшивки геля, их соотношение. Визуализация белков в геле, виды красителей.

Электрофорез в денатурирующих условиях. Принцип метода, разделяющий и концентрирующий гель. Диск-электрофорез. Миграция белков и буферных ионов в денатурирующем электрофорезе. Ограничения на допустимую загрузку геля. Электронный буфер, буферные системы для денатурирующего электрофореза. Для каких целей применяется.

Электрофорез в неденатурирующих условиях. Принцип разделения. Электронный буфер, буферные системы для неденатурирующего электрофореза. Для каких целей применяется.

Градиентный гель, для чего применяется.

Изоэлектрофокусирование, принцип метода.

Двумерный электрофорез. Два этапа двумерного электрофореза. Принцип и возможности метода. Варианты реализации. Протеомные карты.

Двумерный электрофорез для идентификации компонентов рибосом.

Кристаллизация белков. Сложность кристаллизации макромолекул. Требования к белковому препарату. Фазовая диаграмма и описание процесса кристаллизации. Методы проведения кристаллизации. Компоненты кристаллизационной среды. Факторы, влияющие на кристаллизацию. Режим просмотра плашек и оценка качества кристаллов. Кристаллизация мембранных белков.

Пространственная структура белка

Для чего необходимо знать пространственную структуру макромолекулы. Методы определения пространственной структуры макромолекул: экспериментальный методы высокого разрешения, экспериментальный методы низкого разрешения, вычислительные методы.

Рентгеноструктурный анализ. История развития белковой кристаллографии. Принцип метода и этапы исследования. Банк белковых структур. Кристалл в рентгеноструктурном анализе. Источники рентгеновского излучения. Дифракционная картина. Фазовая проблема и методы ее решения. Понятие разрешения в рентгеноструктурном анализе и от чего оно зависит. Плюсы и минусы рентгеноструктурного анализа для решения трехмерных структур макромолекул.

Криоэлектронная микроскопия. История развития метода. Задачи, которые решает криоэлектронная микроскопия. Витрифицированный лед. Этапы работы метода. Анализ одиночных частиц. Криоэлектронная томография. Разрешение в криоэлектронной микроскопии: локальное и глобальное. Плюсы и минусы метода.
Ядерный магнитный резонанс (ЯМР). Принцип работы метода, стадии анализа. Объекты для ЯМР.

Малоугловое рассеяние рентгеновского излучения. Принцип работы метода, особенности метода. Проведение эксперимента. Данные, которые можно получить из экспериментальной кривой. Основные направления применения метода малоуглового рассеяния рентгеновского излучения для биологических объектов. Перспективы и современные направления.

Предсказание пространственной структуры белка. AlphaFold, AlphaFold2, AlphaFold3. Развитие метода и его возможности. Оценка достоверности модели, pLDDT. Ограничения метода. AlphaFold – помощник структурных биологов.

Гомологичное моделирование. Принцип работы и этапы работы метода. Программы для реализации метода. Сравнение гомологичного моделирования и AlphaFold.

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

Типовые контрольные задания для проведения текущего контроля успеваемости:
Перечислите уровни структурной организации белков.
(с примерами).
Какой атом в протеиногенных аминокислотах является хиральным (и что это такое)?
Какие оптические изомеры аминокислоты входят в состав природных белков и почему?
Сколько хиральных атомов в молекуле треонина?
Дайте определение pH и pK. Что такое изоэлектрическая точка (pI)?
Что такое ионное произведение воды? Чему равен pH 10 мМ раствора NaOH?
Какой суммарный заряд (+ или -) будет иметь белок, имеющий pI=5.5 в растворе при pH=7.4 (и почему)?
Дайте определение хроматографии.
Перечислите известные Вам виды хроматографии (по принципу разделения).
Опишите принцип, лежащий в основе тель-фильтрации.
Что такое свободный объем колонки?
В каком порядке предположительно элюируются с гель-фильтрационной колонки белки А, Б и В, если: Mw(A) = 100 кДа, Mw(B)=30 кДа. Mw(B)=20 кДа; белок В образует гомодимер?
Опишите принцип, лежащий в основе ионообменной хроматографии.
Ионообменник какого типа нужно использовать для очистки белка, имеющего pI=5,5, в буфере с pH=7,0?
Что такое электрофорез?
Перечислите основные известные Вам химические вещества, используемые при формировании гелей для электрофореза. Какие гели используются для электрофореза белков.
Каким образом можно регулировать «пористость» геля и для чего это необходимо?
В чем состоит главное преимущество двумерного гель-электрофореза по сравнению с одномерным?
Какие методы используются для определения концентрации белков?
Какие аминокислотные остатки вносят вклад в поглощение белком света при длине волны 280 нм?
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.
Каким образом обычно определяют аминокислотный состав (не последовательность!) полипептида. Для чего используется при этом нингидрин (флуорескамин)?
Чем отличаются N- и С-концевой аминокислотные остатки в полипептиде от прочих? Каким образом можно их определить?
Какие основные способы фрагментации (гидролиза) полипептида в контексте определения аминокислотной последовательности Вам известны?
В чем суть метода Эдмана для определения аминокислотной последовательности полипептида?
Каково преимущество непосредственного определения аминокислотной последовательности белка перед теоретической (по последовательности гена)?
Опишите процесс твердофазного синтеза полипептида и назовите его преимущества перед синтезом полипептида на рибосомах.

Примерные темы докладов:

- Развитие методов химии и их применение для изучения свойств биологических макромолекул.
- Свойства биологических макромолекул (физико-химические свойства, структура и функция) и накопленный арсенал методов для их исследования.
- Разнообразие белков: простые и сложные белки, биологические пептиды.
- Особенности выделения белков из разных биологических объектов
- Хроматографическая очистка биополимеров. Основные принципы.
- Кристаллизация белков.
- Понятие об аминокислотах, структура и свойства.
- Понятие о нуклеотидах, структура и свойства.

Типовые вопросы для проведения аттестации:

Разнообразие белков. Классификация и ее типы.
Разнообразие аминокислот. Классификация и ее типы.
Кислотно-основные свойства аминокислот, изоэлектрическая точка, оптическая изомерия.
Методы получения α-аминокислот. Разделение рацемических смесей.
Химические реакции, характерные для аминокислот. Специфические реакции на аминокислоты.
Пептидная связь и химические свойства пептидов.
Биологические функции белков и пептидов. Примеры.
Химический синтез пептидов. Активация карбоксильной группы. Защитные группы. Boc- и Fmoc-стратегии.
Жидкофазный и твердофазный методы синтеза пептидов, плюсы и минусы методов и их сравнение.
Классификация пептидов и особенности структуры. Примеры.
Определение N- и С-концевых аминокислотных остатков.
Компоненты белков и их физико-химические свойства.
Протеазы и их ингибиторы. Энзиматическое расщепление белка. Задачи, решаемые методом.
Физико-химические свойства белков.
Химическое расщепление белка. Задачи, решаемые методом. Избранные примеры.
Методы дохрамографической очистки белка.
Уровни организации пространственной структуры белка.
Карта Рамачандрана.
Химические свойства белков. Изоэлектрическая точка, методы ее определения.

Сравнение белков и пептидов.
Качественные реакции на белки.
Определение аминокислотной последовательности белка.
Методы определения N-концевой аминокислоты.
Методы определения С-концевой аминокислоты.
Определение полной аминокислотной последовательности.
Метод Эдмана.
Метод масс-спектрометрии, принципы метода и какие задачи решает.
Тандемная масс-спектрометрия. Особенности и преимущества метода.
Взаимодействия, удерживающие вторичную, третичную и четвертичную структуру белка.
Основные типы хроматографических методов очистки белков (принципы разделения).
Фингерпринт.
Общая схема выделения белка.
Денатурация белка.
Ренатурация белка.
Термофильные белки, особенности их выделения.
Растворы для экстракции белков.
Гель-хроматография и другие методы разделения молекул по размеру.
Ионообменная, аффинная и металлохелатная хроматографии. Принципы методов.
Способы синтеза белков и пептидов (принципы и краткая характеристика).
Твердофазный синтез пептидов.
Адсорбционная хроматография. Методы концентрирования макромолекул.
Оптические свойства биополимеров и методы определение концентрации белка.
Электрофорез в ПААГ. Разнообразие подходов.
Экспериментальные задачи, решаемые методом электрофореза молекул в ПААГ.
Методы, позволяющие оценить чистоту препарата биомолекул.
Определение аминокислотного состава белка (принцип и решаемые задачи).
Колометрические методы определения концентрации биополимеров. Принципы и чувствительность.
Детергенты, виды детергентов, механизм действия на белки.
Основные методы разрушения клеточной стенки (зависимость выбора метода от экспериментальной задачи).
Центрифугирование и дифференциальное центрифугирование.
Определение пространственных структур методом рентгеноструктурного анализа.
Определение пространственных структур методом криоэлектронной микроскопии.
Ядерный магнитный резонанс, принципы и особенности метода.
Определение пространственных структур методом малоуглового рентгеновского рассеяния.
Вычислительные методы определения пространственных структур.
Компоненты полиакриламидного геля и их характеристики.
Миграция белков и буферных ионов в денатурирующем электрофорезе.
Электродный буфер и буферные системы для денатурирующ его и неденатурирующего электрофореза.
Визуализация белков в геле, виды красителей.
Двумерный электрофорез, принцип метода и варианты исполнения. Система Кальтшмидта и Виттмана.
Кристаллизация белка. Методы кристаллизации белка и фазовая диаграмма.
Компоненты кристаллизационной среды и факторы влияющие на кристаллизацию белка.

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

ОСНОВНАЯ ЛИТЕРАТУРА

Геккелер, К. и Экштайн, Х. Аналитические и препаративные лабораторные методы. — М.: Химия, 1994.
Практическая химия белка. Под. ред. А. Дарбре. – М.: Мир, 1989.
Принципы и методы биохимии и молекулярной биологии. Под. Ред. К. Уилсон, Дж. Уолкер. – М.: Лаборатория знаний, 2025.
Аминокислоты. Пептиды. Белки. Под. ред. Т. Дэвени и Я. Гергей. – М.: Мир, 1976
Дэвидсон, Д. Биохимия нуклеиновых кислот. – М.: Мир, 1976.
Ленинджер, А. Основы биохимии. 1-3 т. – М.: Мир, 1985.
Овчинников, Ю.А. Биоорганическая химия. – М.: Просвещение, 1987.
Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: электрофорез и ультрацентрифугирование. – М.: Hayka, 1981.
Остерман Л.А. Исследование биологических макромолекул электрофокусированием, иммуноэлектрофорезом и радиоизотопными методами. – М.: Наука, 1983.
Остерман Л.А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот. – М.: Наука, 1985.
Скоупс Р. Методы очистки белков. – М.: Мир, 1985.
Степанов В.М. Молекулярная биология: структура и функция белков. – М.: Hayka, 2005,
Фрайфельдер Д. Физическая биохимия. – М.: Мир, 1980.
Шабарова З.А. и Богданов. А.А. Химия нуклеиновых кислот. – М.: Химия, 1978.
Шугалей И.В., Гарабаджиу А.В., Целинский И.В. Химия белка. – СПб.: Проспект Науки, 2011.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА ДЛЯ УГЛУБЛЕННОГО ИЗУЧЕНИЯ ПРЕДМЕТА

Гринштейн, Д. и Виниц, М. Химия аминокислот и пептидов. – М. Мир, 1966
Жидкостная колоночная хроматография. под. ред. З. Дейл, К. Мацек, Я. Янак. – М.: Мир,1983.
Бландел Т., Джонсон Л. Кристаллография белка. – М.: Мир, 1979.
Диксон, М. и Y966, Э. Ферменты. 1-3 т. – М.: Мир, 1982.
Кирхнер, Ю. Тонкослойная хроматография. – М.: Мир, 1981.
Лурье А.А. Сорбенты и хроматографические носители. – М.: Химия, 1972.
Мосолов, В.В. Протеолитические ферменты. – М.: Наука, 1971.
Биохимия. Учебник. Под ред. Е.С. Северина. – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2004.
Степанов В.М. Молекулярная биология. Структура и функции белков. под ред. А.С. Спирина. – М.: Высшая школа, 1996.
Торчинский Ю.М. Сера в белках. – М.: Наука, 1977.
Туркова Я. Афинная хроматография. – М.: Мир, 1980.
Шулы, Г. и Ширмер, Р. Принципы структурной организации белков. – М.: Мир, 1982.
Якубке, Х.-Д. и Ешкайт, Х. Аминокислоты, пептиды, белки. – М.: Мир, 1985.
Drenth J. Principles of protein x-ray crystallography. Springer, 2007.

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/
https://cryosparc.com/

https://www.uniprot.org/
https://www.rcsb.org/
https://alphafoldserver.com/welcome

Рабочая программа по дисциплине «Методы химии белка»

1. Цели и задачи изучения дисциплины.

Цель курса «Методы химии белка» – сформировать у обучающихся целостное представление о химии и структуре белков: от свойств отдельных аминокислот и пептидной связи до пространственной организации белковой молекулы, а также познакомить с современными методами получения, очистки, анализа и определения структуры белков, необходимыми для самостоятельной исследовательской работы в области биохимии, молекулярной биологии и биотехнологии.

В курсе лекций раскрыты основы химии аминокислот, пептидов и белков, а также детально разобрана их структурная организация – от первичной последовательности до четвертичной структуры. Подробно рассмотрены практические подходы к выделению, очистке и анализу белков: хроматография, электрофорез, методы определения концентрации и установления аминокислотной последовательности. Отдельное внимание уделено современным методам изучения пространственной структуры макромолекул – рентгеноструктурному анализу, крио-ЭМ, ЯМР, а также вычислительным подходам.

Задачи дисциплины:

- Изучить свойства, классификацию и качественные реакции аминокислот, методы их получения и разделения рацемических смесей.
- Изучить строение пептидов, их функции, принципы синтеза.
- Разобраться в физико-химических и кислотно-основных свойствах белков, их функциях, а также в уровнях структурной организации.
- Ознакомиться с методами определения концентрации и аминокислотной последовательности белков.
- Научиться подбирать методы выделения и очистки белков: лизис, центрифугирование, диализ, ультрафильтрацию, хроматографию.
- Получить знания о электрофоретических методах анализа белков.
- Понять принципы и ограничения методов структурной биологии: рентгеноструктурного анализа, крио ЭМ, ЯМР, малоуглового рассеяния.
- Сформировать представление о вычислительных подходах к предсказанию структуры и оценке качества моделей.

В результате освоения дисциплины обучающийся должен знать строение и свойства аминокислот, пептидов и белков, уметь выбирать адекватные методы их получения, анализа и очистки, а также владеть базовыми представлениями о структурной биологии и биоинформатических инструментах работы с белками.

Курс «Методы химии белка» 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.

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

Аминокислоты

Понятие о белках. История химии белка. Звенья белка – аминокислоты. Обозначения аминокислот и история их названий.

Протеиногенные и непротеиногенные аминокислоты. Нестандартные протеиногенные аминокислоты. Классификация α-аминокислот по химическому строению радикала, по полярности и заряду боковой цепи, по питательной ценности.

Физические свойства аминокислот. Спектры поглощения аминокислот. Кислотно-основные свойства аминокислот, цвиттер-ионы. Кислоты Бренстеда. Изоэлектрическая точка аминокислот, константа диссоциации. Оптическая изомерия аминокислот, L- и D-изомеры.

Химические реакции, характерные для аминокислот: реакции с совместным участием обеих групп, реакции карбоксильных групп, реакции аминогрупп. Специфические реакции на аминокислоты. Реакции на индивидуальные аминокислоты.

Получение α-аминокислот: биологический метод (ферментативный синтез, микробиологический синтез, гидролиз белков), химический метод. Проблемы химического метода синтеза. Методы разделения рацемических смесей: физический, физико-химический, химический, биологический (ферментативный).

Пептиды

Понятие о пептидах. История открытия пептидов. Граница разделения пептидов и белков.

Образование пептидной связи. Геометрия пептидной связи. Химические свойства пептидов. Обозначения пептидов; тривиальные названия; названия, отражающие биологическую роль.

Особенности строение пептидов: линейные, разветвлённые, циклические. Классификация пептидов по типу химической связи: гомодетные и гетерогетные. Классификация пептидов по составу: гомомерные и гетеромерные. Природные пептиды с D-аминокислотами. Модифицированные малые пептиды. Малые линейные пептиды, глутатион. Циклические пептиды.

Биологические функции пептидов. Пептидные гормоны, токсины, антибактериальное действие пептидов. Антимикробные пептиды.

Способы получения пептидов. Первые эксперименты по химическому синтезу. Хлорангидридный метод. Азидный метод.

Сложности и проблемы химического синтеза пептидов. Защитные группы при пептидном синтезе. Активация карбоксильной группы. Временные и постоянные защитные группы при химическом синтезе. Boc- и Fmoc-стратегии, сравнение стратегий.

Два основных метода синтеза пептидов: твердофазный и жидкофазный, их сравнение. Смола Меррифилда. Плюсы и минусы твердофазного и жидкофазного синтеза. Нобелевская премия по химии 2026 года: открытие нелинейных эффектов и автокатализа в асимметричном органическом синтезе.

Белки

Понятие о белках. Элементный состав белков. Биологические функции белков. Физико-химическая классификация белков. Классификация белков по химическому составу. Классификация по форме белка.

Уровни организации структуры белка.

Первичная структура белка. Гомология и эволюционное родство. Гомологичные белки. Ортологи и Паралоги.

Вторичная структура белка. α-спираль, спираль 3_{10}, π-спираль, полипролиновая спираль, β-лист. Антипараллельный и параллельный β-лист. β-поворот. Регулярные и

нерегулярные элементы вторичной структуры. Карта Рамачандрана. Углы φ и ψ. Разрешенные и запрещенные области.

Третичная структура белка. Типы взаимодействий, удерживающих форму белка в третичной структуре. Понятие о домене белка.

Четвертичная структура белка. Типы олигомеров. Взаимодействия, удерживающие четвертичную структуру.

Сравнение белков и пептидов.

Химические свойства белков. Кислотно-основные свойства белков. Группы боковых радикалов аминокислотных остатков, способные у ионизации. Причина ограниченной буферной емкости белков. Изоэлектрическая точка белка. Экспериментальные методы определения изоэлектрической точки. Сервисы для расчета изоэлектрической точки.

Качественные реакции на белки.

Концентрация белка. Определение концентрации белка по оптической плотности. Биуретовый метод (стандартный и микробиуретовый), метод Лоури, метод с бицинхониновой кислотой, метод Бредфорда, метод Кьельдаля.

Определение аминокислотной последовательности белка. Прямой и косвенный подход. Подготовка образцов к анализу. Расщепление полипептидной цепи на фрагменты с помощью химических агентов или ферментов. Определение N-концевой аминокислоты. Метод Сенгера. Дансильный метод. Амипептидазный метод. Определение С-концевой аминокислоты. Карбоксипептидазный метод. Метод Акабори. Определение полной аминокислотной последовательности. Стратегия фрагментации и комбинаторной сборки. Метод Эдмана.

Метод масс-спектрометрии. Методы ионизации: электроспрей, лазерно-индуцированная десорбция с матрицей. Метод пептидного фингерпринтинга. Тандемная масс-спектрометрия.

Выделение белка

История развития методик очистки и разделения макромолекул. Типы клеток, использующихся для выделения белка.

Источники белков для исследовательских целей. Общая схема выделения белка. Проблемы при выделении белков: протеолиз, агрегация, денатурация. Виды денатурации. Классификация видов денатурации белка по природе воздействующего фактора.

Физическая денатурация. Химическая денатурация. Виды детергентов. Термофильные организмы и термофильные белки.

Ренатурация белка. Самопроизвольная ренатурация, ренатурация с помощью шаперонов, искусственная ренатурация (в лаборатории).

Составы экстракционных буферов при выделении белка: типы солей, буферов и добавок и ингибиторов протеаз.

Мембранные белки. Ионные и неионные детергенты.

Разрушение клеток. Методы разрушения клеток. Химический лизис. Осмотический шок. Автолизис. Истирание в ступке с окисью алюминия. Ультразвук: плюсы и минусы метода.

Метод французского пресса: плюсы и минусы метода.

Центрифугирование. Скорость вращения и относительное центробежное ускорение. Виды роторов. Правила безопасности и точности пользования центрифугой. Виды центрифуг. Дифференциальное центрифугирование. Тельца включения и мембранные белки: особенности работы.

Очистка белка

Дохроматографическая очистка белка. Диализ: суть метода, протокол работы, цели применения, плюсы и минусы метода. Ультрафильтрация. Высаливание, тепловая денатурация, осаждение органическими растворителями.

Хроматография. История развития метода. Принципы хроматографии. Коэффициент распределения. Тонкослойная и колоночная хроматография. Основные элементы колоночной хроматографии. Виды элюирования.

Особенности белков, на которых основано их разделение.

Адсорбционная хроматография. Распределительная хроматография. Нормально-фазовая и обратно-фазовая хроматография: принцип и сравнение.

Гель-проникающая хроматография: виды смол, свободный объем колонки, длина колонки, коэффициент доступности, применение.

Гидрофобная хроматография. Суть метода, виды и сила носителей, влияние буферного раствора, этапы.

Ионообменная хроматография. Суть метода, катионообменная и анионообменная хроматография, виды смол, правила выбора смол, этапы хроматографии.

Аффинная хроматография. Суть метода, ключевые компоненты, основные разновидности, этапы.Металл-хелатная аффинная хроматография. Иммуносорбция.

Очистка и хранение хроматографических колонок.

Методы электрофореза

Явление электрофореза. Развитие метода электрофореза. Полиакриламидный гель: компоненты и их характеристики. Полимеризация полиакриламидного геля. Общая плотность геля и степень сшивки геля, их соотношение. Визуализация белков в геле, виды красителей.

Электрофорез в денатурирующих условиях. Принцип метода, разделяющий и концентрирующий гель. Диск-электрофорез. Миграция белков и буферных ионов в денатурирующем электрофорезе. Ограничения на допустимую загрузку геля. Электронный буфер, буферные системы для денатурирующего электрофореза. Для каких целей применяется.

Электрофорез в неденатурирующих условиях. Принцип разделения. Электронный буфер, буферные системы для неденатурирующего электрофореза. Для каких целей применяется.

Градиентный гель, для чего применяется.

Изоэлектрофокусирование, принцип метода.

Двумерный электрофорез. Два этапа двумерного электрофореза. Принцип и возможности метода. Варианты реализации. Протеомные карты.

Двумерный электрофорез для идентификации компонентов рибосом.

Кристаллизация белков. Сложность кристаллизации макромолекул. Требования к белковому препарату. Фазовая диаграмма и описание процесса кристаллизации. Методы проведения кристаллизации. Компоненты кристаллизационной среды. Факторы, влияющие на кристаллизацию. Режим просмотра плашек и оценка качества кристаллов. Кристаллизация мембранных белков.

Пространственная структура белка

Для чего необходимо знать пространственную структуру макромолекулы. Методы определения пространственной структуры макромолекул: экспериментальный методы высокого разрешения, экспериментальный методы низкого разрешения, вычислительные методы.

Рентгеноструктурный анализ. История развития белковой кристаллографии. Принцип метода и этапы исследования. Банк белковых структур. Кристалл в рентгеноструктурном анализе. Источники рентгеновского излучения. Дифракционная картина. Фазовая проблема и методы ее решения. Понятие разрешения в рентгеноструктурном анализе и от чего оно зависит. Плюсы и минусы рентгеноструктурного анализа для решения трехмерных структур макромолекул.

Криоэлектронная микроскопия. История развития метода. Задачи, которые решает криоэлектронная микроскопия. Витрифицированный лед. Этапы работы метода. Анализ одиночных частиц. Криоэлектронная томография. Разрешение в криоэлектронной микроскопии: локальное и глобальное. Плюсы и минусы метода.
Ядерный магнитный резонанс (ЯМР). Принцип работы метода, стадии анализа. Объекты для ЯМР.

Малоугловое рассеяние рентгеновского излучения. Принцип работы метода, особенности метода. Проведение эксперимента. Данные, которые можно получить из экспериментальной кривой. Основные направления применения метода малоуглового рассеяния рентгеновского излучения для биологических объектов. Перспективы и современные направления.

Предсказание пространственной структуры белка. AlphaFold, AlphaFold2, AlphaFold3. Развитие метода и его возможности. Оценка достоверности модели, pLDDT. Ограничения метода. AlphaFold – помощник структурных биологов.

Гомологичное моделирование. Принцип работы и этапы работы метода. Программы для реализации метода. Сравнение гомологичного моделирования и AlphaFold.

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

Типовые контрольные задания для проведения текущего контроля успеваемости:
Перечислите уровни структурной организации белков.
(с примерами).
Какой атом в протеиногенных аминокислотах является хиральным (и что это такое)?
Какие оптические изомеры аминокислоты входят в состав природных белков и почему?
Сколько хиральных атомов в молекуле треонина?
Дайте определение pH и pK. Что такое изоэлектрическая точка (pI)?
Что такое ионное произведение воды? Чему равен pH 10 мМ раствора NaOH?
Какой суммарный заряд (+ или -) будет иметь белок, имеющий pI=5.5 в растворе при pH=7.4 (и почему)?
Дайте определение хроматографии.
Перечислите известные Вам виды хроматографии (по принципу разделения).
Опишите принцип, лежащий в основе тель-фильтрации.
Что такое свободный объем колонки?
В каком порядке предположительно элюируются с гель-фильтрационной колонки белки А, Б и В, если: Mw(A) = 100 кДа, Mw(B)=30 кДа. Mw(B)=20 кДа; белок В образует гомодимер?
Опишите принцип, лежащий в основе ионообменной хроматографии.
Ионообменник какого типа нужно использовать для очистки белка, имеющего pI=5,5, в буфере с pH=7,0?
Что такое электрофорез?
Перечислите основные известные Вам химические вещества, используемые при формировании гелей для электрофореза. Какие гели используются для электрофореза белков.
Каким образом можно регулировать «пористость» геля и для чего это необходимо?
В чем состоит главное преимущество двумерного гель-электрофореза по сравнению с одномерным?
Какие методы используются для определения концентрации белков?
Какие аминокислотные остатки вносят вклад в поглощение белком света при длине волны 280 нм?
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.
Каким образом обычно определяют аминокислотный состав (не последовательность!) полипептида. Для чего используется при этом нингидрин (флуорескамин)?
Чем отличаются N- и С-концевой аминокислотные остатки в полипептиде от прочих? Каким образом можно их определить?
Какие основные способы фрагментации (гидролиза) полипептида в контексте определения аминокислотной последовательности Вам известны?
В чем суть метода Эдмана для определения аминокислотной последовательности полипептида?
Каково преимущество непосредственного определения аминокислотной последовательности белка перед теоретической (по последовательности гена)?
Опишите процесс твердофазного синтеза полипептида и назовите его преимущества перед синтезом полипептида на рибосомах.

Примерные темы докладов:

- Развитие методов химии и их применение для изучения свойств биологических макромолекул.
- Свойства биологических макромолекул (физико-химические свойства, структура и функция) и накопленный арсенал методов для их исследования.
- Разнообразие белков: простые и сложные белки, биологические пептиды.
- Особенности выделения белков из разных биологических объектов
- Хроматографическая очистка биополимеров. Основные принципы.
- Кристаллизация белков.
- Понятие об аминокислотах, структура и свойства.
- Понятие о нуклеотидах, структура и свойства.

Типовые вопросы для проведения аттестации:

Разнообразие белков. Классификация и ее типы.
Разнообразие аминокислот. Классификация и ее типы.
Кислотно-основные свойства аминокислот, изоэлектрическая точка, оптическая изомерия.
Методы получения α-аминокислот. Разделение рацемических смесей.
Химические реакции, характерные для аминокислот. Специфические реакции на аминокислоты.
Пептидная связь и химические свойства пептидов.
Биологические функции белков и пептидов. Примеры.
Химический синтез пептидов. Активация карбоксильной группы. Защитные группы. Boc- и Fmoc-стратегии.
Жидкофазный и твердофазный методы синтеза пептидов, плюсы и минусы методов и их сравнение.
Классификация пептидов и особенности структуры. Примеры.
Определение N- и С-концевых аминокислотных остатков.
Компоненты белков и их физико-химические свойства.
Протеазы и их ингибиторы. Энзиматическое расщепление белка. Задачи, решаемые методом.
Физико-химические свойства белков.
Химическое расщепление белка. Задачи, решаемые методом. Избранные примеры.
Методы дохрамографической очистки белка.
Уровни организации пространственной структуры белка.
Карта Рамачандрана.
Химические свойства белков. Изоэлектрическая точка, методы ее определения.

Сравнение белков и пептидов.
Качественные реакции на белки.
Определение аминокислотной последовательности белка.
Методы определения N-концевой аминокислоты.
Методы определения С-концевой аминокислоты.
Определение полной аминокислотной последовательности.
Метод Эдмана.
Метод масс-спектрометрии, принципы метода и какие задачи решает.
Тандемная масс-спектрометрия. Особенности и преимущества метода.
Взаимодействия, удерживающие вторичную, третичную и четвертичную структуру белка.
Основные типы хроматографических методов очистки белков (принципы разделения).
Фингерпринт.
Общая схема выделения белка.
Денатурация белка.
Ренатурация белка.
Термофильные белки, особенности их выделения.
Растворы для экстракции белков.
Гель-хроматография и другие методы разделения молекул по размеру.
Ионообменная, аффинная и металлохелатная хроматографии. Принципы методов.
Способы синтеза белков и пептидов (принципы и краткая характеристика).
Твердофазный синтез пептидов.
Адсорбционная хроматография. Методы концентрирования макромолекул.
Оптические свойства биополимеров и методы определение концентрации белка.
Электрофорез в ПААГ. Разнообразие подходов.
Экспериментальные задачи, решаемые методом электрофореза молекул в ПААГ.
Методы, позволяющие оценить чистоту препарата биомолекул.
Определение аминокислотного состава белка (принцип и решаемые задачи).
Колометрические методы определения концентрации биополимеров. Принципы и чувствительность.
Детергенты, виды детергентов, механизм действия на белки.
Основные методы разрушения клеточной стенки (зависимость выбора метода от экспериментальной задачи).
Центрифугирование и дифференциальное центрифугирование.
Определение пространственных структур методом рентгеноструктурного анализа.
Определение пространственных структур методом криоэлектронной микроскопии.
Ядерный магнитный резонанс, принципы и особенности метода.
Определение пространственных структур методом малоуглового рентгеновского рассеяния.
Вычислительные методы определения пространственных структур.
Компоненты полиакриламидного геля и их характеристики.
Миграция белков и буферных ионов в денатурирующем электрофорезе.
Электродный буфер и буферные системы для денатурирующ его и неденатурирующего электрофореза.
Визуализация белков в геле, виды красителей.
Двумерный электрофорез, принцип метода и варианты исполнения. Система Кальтшмидта и Виттмана.
Кристаллизация белка. Методы кристаллизации белка и фазовая диаграмма.
Компоненты кристаллизационной среды и факторы влияющие на кристаллизацию белка.

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

ОСНОВНАЯ ЛИТЕРАТУРА

Геккелер, К. и Экштайн, Х. Аналитические и препаративные лабораторные методы. — М.: Химия, 1994.
Практическая химия белка. Под. ред. А. Дарбре. – М.: Мир, 1989.
Принципы и методы биохимии и молекулярной биологии. Под. Ред. К. Уилсон, Дж. Уолкер. – М.: Лаборатория знаний, 2025.
Аминокислоты. Пептиды. Белки. Под. ред. Т. Дэвени и Я. Гергей. – М.: Мир, 1976
Дэвидсон, Д. Биохимия нуклеиновых кислот. – М.: Мир, 1976.
Ленинджер, А. Основы биохимии. 1-3 т. – М.: Мир, 1985.
Овчинников, Ю.А. Биоорганическая химия. – М.: Просвещение, 1987.
Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: электрофорез и ультрацентрифугирование. – М.: Hayka, 1981.
Остерман Л.А. Исследование биологических макромолекул электрофокусированием, иммуноэлектрофорезом и радиоизотопными методами. – М.: Наука, 1983.
Остерман Л.А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот. – М.: Наука, 1985.
Скоупс Р. Методы очистки белков. – М.: Мир, 1985.
Степанов В.М. Молекулярная биология: структура и функция белков. – М.: Hayka, 2005,
Фрайфельдер Д. Физическая биохимия. – М.: Мир, 1980.
Шабарова З.А. и Богданов. А.А. Химия нуклеиновых кислот. – М.: Химия, 1978.
Шугалей И.В., Гарабаджиу А.В., Целинский И.В. Химия белка. – СПб.: Проспект Науки, 2011.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА ДЛЯ УГЛУБЛЕННОГО ИЗУЧЕНИЯ ПРЕДМЕТА

Гринштейн, Д. и Виниц, М. Химия аминокислот и пептидов. – М. Мир, 1966
Жидкостная колоночная хроматография. под. ред. З. Дейл, К. Мацек, Я. Янак. – М.: Мир,1983.
Бландел Т., Джонсон Л. Кристаллография белка. – М.: Мир, 1979.
Диксон, М. и Y966, Э. Ферменты. 1-3 т. – М.: Мир, 1982.
Кирхнер, Ю. Тонкослойная хроматография. – М.: Мир, 1981.
Лурье А.А. Сорбенты и хроматографические носители. – М.: Химия, 1972.
Мосолов, В.В. Протеолитические ферменты. – М.: Наука, 1971.
Биохимия. Учебник. Под ред. Е.С. Северина. – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2004.
Степанов В.М. Молекулярная биология. Структура и функции белков. под ред. А.С. Спирина. – М.: Высшая школа, 1996.
Торчинский Ю.М. Сера в белках. – М.: Наука, 1977.
Туркова Я. Афинная хроматография. – М.: Мир, 1980.
Шулы, Г. и Ширмер, Р. Принципы структурной организации белков. – М.: Мир, 1982.
Якубке, Х.-Д. и Ешкайт, Х. Аминокислоты, пептиды, белки. – М.: Мир, 1985.
Drenth J. Principles of protein x-ray crystallography. Springer, 2007.

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/
https://cryosparc.com/

https://www.uniprot.org/
https://www.rcsb.org/
https://alphafoldserver.com/welcome