

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт белка
Российской академии наук

ПРИНЯТО Ученым советом ИБ РАН

Протокол № 6 от 08.06.2024 г.

Зам. директора ИБ РАН



Д. х. н. А. Д. Никулин

Специальность 1.5.3. – Молекулярная биология

Рабочая программа по дисциплине

**«СПЕКТРАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.
МОЛЕКУЛЯРНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ»**

Составитель курса:

доктор физико-математических наук

Б. С. Мельник

Пушкино 2024

1. Цели и задачи изучения дисциплины

Курс "Спектральные методы исследования. Молекулярная спектроскопия" 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 рассказываются основы почти всех спектральных методов, которые могут потребоваться в научной работе студентов и аспирантов. Рассказывается теория и физические основы методов. Кроме того, в лекциях делается акцент на практическое использование методов, поэтому дополнительно рассказывается о том, для каких исследований целесообразно использовать каждый из методов. Для каждого метода объясняются возможные источники ошибки и способы их избежать.

Цели. В результате освоения дисциплины обучающийся должен знать современные актуальные направления спектральных методов исследований и арсенал методов и подходов, которые применяются в области молекулярной биологии и биотехнологии.

Задачи. Получение базовых теоретических знаний в области молекулярной спектроскопии: энергетическое состояние молекул, методы люминесценции и флуоресценции, спектроскопия кругового дихроизма и ядерного магнитного резонанса и других. Умение использовать полученные базовые знания для научной работы.

Дисциплина является факультативной.

Курс "Спектральные методы исследования. Молекулярная спектроскопия" непосредственно связан с рядом других курсов специализации по молекулярной биологии:

«Физика белка»,

«Физические методы в молекулярной биологии»

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

2. Содержание дисциплины (модуля)

Постановка опытов в спектроскопии. Параметры излучения меняющиеся при взаимодействии с веществом. Длина волны. Поляризация света. Интенсивность излучения. Спектральные методы исследования в разном диапазоне длин волн. Связь энергетических уровней молекулы со спектрами поглощения и испускания.

Дискретность энергетических состояний молекулы. Постулаты Бора.

Закон Бугера-Ламберта-Бера. Допущения, при которых этот закон выполняется.

Хромофоры в белках «ответственные» за поглощение света в ультрафиолетовом и видимом диапазоне длин волн.

Устройство однолучевого и двухлучевого спектрофотометра.

Измерение концентрации белка по спектрам поглощения в области поглощения ароматических аминокислот, в пептидной области (метод Уодделя), по красителю (метод Бредфорда).

Понятие люминесценции и флуоресценции. Стоксов сдвиг спектров флуоресценции. Закон симметрии спектров поглощения и флуоресценции. Квантовый выход флуоресценции. Время жизни возбужденного состояния. Затухание флуоресценции. Тушение флуоресценции в растворе.

Ферстеровский резонансный перенос энергии. Методика расчета расстояния между донором и акцептором.

Устройство спектрофлуориметра.

Анизотропия и поляризация флуоресценции. Деполяризация флуоресценции при движении молекул.

Явление оптической активности. Атомы обладающие оптической активностью.

Круговой дихроизм. Спектры кругового дихроизма белков в дальней и ближней ультрафиолетовой области. Спектры кругового дихроизма альфа-спиралей, бета-структуры и развернутой полипептидной цепи. Расчет процентного содержания вторичной структуры белка по спектрам кругового дихроизма. С чем связана зашумленность спектров кругового дихроизма. Ключевые точки на спектрах кругового дихроизма позволяющие проанализировать изменения в структуре белка.

Инфра красная спектроскопия. Интерферометр Майкельсона. Фурье ИК-спектрометр. ИК-спектры низкомолекулярных веществ и белков. Анализ вторичной структуры белка по ИК-спектрам.

Рассеяние света в видимом диапазоне длин волн. Постановка опыта, возможности метода.

Малоугловое рентгеновское рассеяние. Определение радиуса инерции белков.

Метод динамического рассеяние света. Связь между размером и скоростью движения разных частиц. Автокорреляционная функция. Понятие гидродинамического радиуса.

Рефрактометрия. Определение концентрации веществ по изменению преломляющей способности раствора.

Поверхностный плазмонный резонанс. Плазмон. Устройство прибора и постановка опыта по измерению поверхностного плазмонного резонанса.

Ядерный магнитный резонанс.

Понятие спина. Химический сдвиг, мультиплетность, интенсивность сигнала – определение и с какими параметрами молекулы связаны. Эффект Оверхаузера, селективное подавление спин-спинового взаимодействия. Два метода измерения спектра ЯМР. Одномерный и многомерный ЯМР. Расщепление линий в ЯМР спектре.

Расчет погрешностей, аппроксимация данных, обнаружение «промахов», соотношение сигнал/шум при усреднении данных.

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

Типовые вопросы для текущего контроля успеваемости

Образцы вопросов устного опроса и домашних заданий:

1. Что происходит при взаимодействии света с веществом?
2. Какие бывают виды излучения?
3. Каковы энергии водородной связи, углеводородной связи?
4. Диаграмма Яблонского.
5. Соотношение де Бройля.
6. Постулаты Бора.
7. Закон Бугера-Ламберта-Бера.
8. Хромофоры в беках: что такое и как образуются?
9. Спектр поглощения пептидной связи.
10. Спектры поглощения ароматических аминокислот.
11. Спектры поглощения нуклеиновых кислот.
12. Что такое изобестическая точка в спектрах.
13. Как по спектрам поглощения определить концентрацию белка.
14. Понятие люминесценции.
15. Что такое флуоресценция?
16. Закон симметрии спектров поглощения и флуоресценции.
17. От чего зависит квантовый выход флуоресценции?
18. Время жизни люминесценции.
19. Что такое тушение флуоресценции?
20. Как экспериментально определить квантовый выход флуоресценции?
21. Что такое спектр возбуждения?

22. Что такое спектр испускания?
23. Что такое анизотропия и поляризация флуоресценции?
24. Явление оптической активности.
25. Формы спектров КД в дальней УФ области для белковых структур.
26. О чем свидетельствует изменение формы спектра КД в ближней УФ области для белков?
27. С чем связано поглощение в ИК области спектра?
28. Какие области ИК спектра белка чувствительны к изменению вторичной структуры белка?
29. Что такое рассеяние Рэлея, Ми, дифракция Фраунгофера?
30. Какую информацию можно получить из динамического рассеяния света?
31. Кривые рентгеновского рассеяния в координатах Гинье.
32. Схема эксперимента по поверхностному плазмонному резонансу.
33. Что такое нуклоны, зарядовое число, массовое число, спин ядра, магнитный момент ядра, квантовые числа?
34. Схема эксперимента по ЯМР спектроскопии.
35. Классический и импульсный ЯМР.
36. Протонный магнитный резонанс.
37. Чем определяется химический сдвиг в спектрах ЯМР.
38. Селективное подавление спин-спинового взаимодействия.
39. Почему возникают погрешности измерений?
40. Что такое абсолютная погрешность, относительная погрешность?
41. Опишите процедуру вычисления средней квадратичной погрешности.

Примерные темы докладов:

1. Влияние межмолекулярных взаимодействий на электронно-колебательные переходы в молекулах.
2. Спектральные свойства изолированных белковых хромофоров: триптофан, тирозин, фенилаланин.
3. Влияние ионной силы и денатурантов на белковую флуоресценцию.
4. Использование метода собственной флуоресценции для прикладных исследований.
5. Использование метода спектроскопии кругового дихроизма для изучения переходов в белках и нуклеиновых кислотах.
6. Возможности спектроскопии ЯМР в биологии.
7. Примеры использования коммерческих программ типа Sigma Plot, Igor Pro и др. для анализа данных.

Типовые вопросы для проведения промежуточной аттестации:

1. Три основных варианта постановки опыта в спектроскопии. Три свойства света, которые регистрируют в экспериментах. Что такое поляризация?
В каком диапазоне длин волн можно использовать допущение, что свет проходит через однородную среду?
2. Энергетические состояния молекулы. Электронные, колебательные, вращательные уровни.
3. Закон Бугера-Ламберта-Бера. Допущения, при которых этот закон выполняется.
4. Принципиальная схема (устройство) однолучевого и двухлучевого спектрофотометра и флуориметра
5. Метод измерения концентрации белка по поглощению ароматических аминокислот.
6. Метод Уодделя.
7. Метод Бредфорда.
8. Понятие люминесценции и флуоресценции, в чем отличие этих терминов?

9. Стоксов сдвиг спектров флуоресценции. Закон симметрии спектров поглощения и флуоресценции.
10. Квантовый выход флуоресценции. Как экспериментально измерить квантовый выход флуоресценции.
11. Время жизни хромофоров в возбужденном состоянии. Затухание флуоресценции хромофора.
12. Тушение флуоресценции примесями в растворе.
13. Методика расчета расстояния между донором и акцептором. Ферстеровский резонансный перенос энергии.
14. Анизотропия и поляризация флуоресценции. Деполяризация флуоресценции при движении молекул.
15. Явление оптической активности
16. Спектры кругового дихроизма белков в дальней и ближней ультрафиолетовой области. Спектры кругового дихроизма альфа-спиралей, бета-структуры и развернутой полипептидной цепи.
17. С чем связана зашумленность спектров кругового дихроизма. «Ключевые точки» на спектрах кругового дихроизма, позволяющие проанализировать изменения в структуре белка.
18. Интерферометр Майкельсона. В чем принципиальное отличие «обычного» ИК-спектрометра от фурье ИК-спектрометра.
19. Анализ вторичной структуры белка по ИК-спектрам.
20. Рассеяние света в видимом диапазоне длин волн. Постановка опыта, возможности метода.
21. Малоугловое рентгеновское рассеяние. Возможности метода, определение радиуса инерции белков.
22. Метод динамического рассеяние света. Связь между размером и скоростью движения разных частиц.
23. Автокорреляционная функция. Понятие гидродинамического радиуса.
24. Определение концентрации веществ по изменению преломляющей способности раствора.
25. Плазмон. Устройство прибора и постановка опыта по измерению поверхностного плазмонного резонанса.
26. Понятие спина. Химический сдвиг, мультиплетность, интенсивность сигнала — определение и с какими параметрами молекулы связаны.
27. Что такое Эффект Оверхаузера. Селективное подавление спин-спинового взаимодействия.
28. Постановка опыта в одномерном и многомерном ЯМР.
29. Расщепление линий в ЯМР спектре. Какие особенности ЯМР спектров позволяют определить химическую формулу вещества?
30. Обнаружение «промахов» при проведении экспериментов. Соотношение сигнал/шум при усреднении данных. Что такое аппроксимация данных и как ее «правильно» проводить?

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

ОСНОВНАЯ

1. А. В. Финкельштейн, О. Б. Птицын. Физика белка. Курс лекций с цветными и стереоскопическими иллюстрациями и задачами. — 4-е издание, исправленное и

- дополненное. — Москва: Книжный дом Университет, 2012. — С. 15. — 524 с. — 500 экз. — ISBN 978-5-98227-834-0.
2. Лакович Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии. Пер. с англ. — М.: Мир, 1986. - 496 с., ил.
 3. Сердюк И., Заккаи Н., Заккаи Дж. Методы в молекулярной биофизике. Структура. Функция. Динамика. Учебное пособие. Издательство КДУ, 2009. - 543с. - ISBN: 978-5-98227-452-6

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/>