

**Федеральное государственное автономное образовательное  
учреждение высшего образования  
«Московский физико-технический институт  
(национальный исследовательский университет)»**

**УТВЕРЖДЕНО**  
**Проректор по учебной работе**

**А.А. Воронов**

	<b>Рабочая программа дисциплины (модуля)</b>
<b>по дисциплине:</b>	Методы исследования макромолекул
<b>по направлению:</b>	Биотехнология
<b>профиль подготовки:</b>	Системная и синтетическая биология Физтех-школа Биологической и Медицинской Физики кафедра физической химии
<b>курс:</b>	4
<b>квалификация:</b>	бакалавр

Семестр, формы промежуточной аттестации: 8 (весенний) - Дифференцированный зачет

Аудиторных часов: 30 всего, в том числе:

лекции: 30 час.

семинары: 0 час.

лабораторные занятия: 0 час.

Самостоятельная работа: 15 час.

Всего часов: 45, всего зач. ед.: 1

Количество контрольных работ, заданий: 2

Программу составили:

М.Ю. Высоких, канд. биол. наук, доцент

И.А. Попов, канд. физ.-мат. наук, доцент

Е.Н. Кукаев, канд. физ.-мат. наук, доцент

Программа обсуждена на заседании кафедры физической химии 04.06.2020

## Аннотация

Дисциплина формирует у студентов представления о необходимости применения высокоточных физико-химических методов анализа для проведения исследований макромолекул, их комплексов и свойств на современном уровне; представления о принципах анализа данных, получаемых при исследовании биологических и абиологических объектов современными физико-химическими методами. Происходит обучение студентов основам планирования эксперимента, подбора конфигурации сложных измерительных комплексов с учетом аналитических параметров, достижение которых необходимо для решения конкретной исследовательской задач. У студентов формируются навыки самостоятельной научно-исследовательской работы на базе оценки необходимости применения и выбора определенных физико-химических методов анализа для решения задач в рамках различных областей химии, наук о материалах, биохимии, молекулярной биологии, наук о Земле.

### 1. Цели и задачи

#### Цель дисциплины

- изучение современных физико-химических методов анализа, применяемых в физике, химии, науках о материалах, биохимии, молекулярной биологии, науках о Земле.

#### Задачи дисциплины

- формирование у студентов представления о необходимости применения высокоточных физико-химических методов анализа для проведения исследований макромолекул, их комплексов и свойств на современном уровне;
- формирование у студентов представления о принципах анализа данных, получаемых при исследовании биологических и абиологических объектов современными физико-химическими методами;
- обучение студентов основам планирования эксперимента, подбора конфигурации сложных измерительных комплексов с учетом аналитических параметров, достижение которых необходимо для решения конкретной исследовательской задач;
- формирование у студентов навыков самостоятельной научно-исследовательской работы на базе оценки необходимости применения и выбора определенных физико-химических методов анализа для решения задач в рамках различных областей химии, наук о материалах, биохимии, молекулярной биологии, наук о Земле;
- углубление у студентов методологических основ современной физики, химии, наук о материалах, наук о Земле, биохимии, молекулярной биологии.

### 2. Перечень формируемых компетенций

Освоение дисциплины направлено на формирование следующих компетенций:

Код и наименование компетенции	Индикаторы достижения компетенции
ОПК-1 Способен изучать, анализировать, использовать биологические объекты и процессы, основываясь на математических, физических, химических, биологических законах, закономерностях и взаимосвязях	ОПК-1.1 Способен анализировать поставленную задачу, намечать пути ее решения
	ОПК-1.3 Способен определять границы применимости полученных результатов
	ОПК-1.2 Способен строить математические модели, производить количественные расчеты и оценки
ОПК-2 Способен использовать современные информационные технологии и программные средства при решении задач профессиональной деятельности, соблюдая требования информационной безопасности	ОПК-2.1 Способен применять современные вычислительную технику и сервисы сети Интернет в области (сфере) профессиональной деятельности
	ОПК-2.2 Знает и умеет применять численные математические методы и прикладное программное обеспечение для решения научных задач в профессиональной области
	ОПК-2.3 Знает основные требования информационной безопасности
	ОПК-4.1 Владеет методами научного поиска и интеллектуального анализа информации при решении задач профессиональной деятельности

ОПК-4 Способен осуществлять сбор и обработку научно-технической и (или) технологической информации для решения фундаментальных и прикладных задач	ОПК-4.2 Знает основные источники научно-технической и (или) технологической информации в области профессиональной деятельности
	ОПК-4.4 Владеет навыками работы с компьютером и компьютерными сетями с целью получения, хранения и обработки научной (технической, технологической) информации
	ОПК-4.3 Умеет составлять аннотации, рефераты, библиографические перечни и обзоры информации в области своей профессиональной деятельности
ОПК-6 Способен эксплуатировать технологическое оборудование, выполнять технологические операции, управлять биотехнологическими процессами, проектировать элементы технических и технологических систем, технических объектов, технологических процессов биотехнологического производства на основе применения базовых инженерных и технологических знаний	ОПК-6.2 Способен к оценке, анализу и интерпретации полученных в результате биотехнологических процессов данных
ПК-1 Способен планировать и проводить научные эксперименты (в избранной предметной области) и (или) теоретические (аналитические и имитационные) исследования	ПК-1.1 Владеет фундаментальными понятиями, законами и теориями современной физики и биологии
ПК-3 Способен выбирать и применять подходящее оборудование, инструменты и методы исследований для решения задач в избранной предметной области	ПК-3.3 Умеет производить оценку точности численных методов, используемых на ЭВМ, вычислительной сложности используемых алгоритмов и объема требуемых вычислительных ресурсов
ПК-4 Способен критически оценивать применимость используемых методик и методов	ПК-4.3 Способен обосновать причинно-следственные отношения используемых понятий и моделей

### 3. Перечень планируемых результатов обучения по дисциплине (модулю)

В результате освоения дисциплины обучающиеся должны

знать:

- основные принципы современных физико-химических методов анализа макромолекул.

уметь:

- оценивать применимость и сопоставлять эффективность методов физико-химического анализа макромолекул, необходимых для подбора инструментальной базы с целью выполнения соответствующих научно-исследовательских лабораторных биологических работ в области химии, наук о материалах, молекулярной и клеточной биологии, биохимии.

владеть:

- теоретическими знаниями о современных и инновационных методах биохимических исследований; арсеналом современных методов исследований, инструментальной технической базой выполнения современных исследований и совокупностью физико-химических методов анализа макромолекул.

### 4. Содержание дисциплины (модуля), структурированное по темам (разделам) с указанием отведенного на них количества академических часов и видов учебных занятий

#### 4.1. Разделы дисциплины (модуля) и трудоемкости по видам учебных занятий

№	Тема (раздел) дисциплины	Трудоемкость по видам учебных занятий, включая самостоятельную работу, час.			
		Лекции	Семинары	Лаборат. работы	Самост.

		лекции	семинары	лаборат. работы	работа
1	Введение Методологические основы разделения и анализа макромолекул	4			1
2	Масс-спектрометрические методы идентификации макромолекул	4			1
3	Методы конфокальной и когерентной микроскопии	4			1
4	Оптическая спектроскопия макромолекул	6			2
5	Разделение макромолекул, частиц и субклеточных структур, аналитические подходы	6			5
6	Хроматография макромолекул	6			5
Итого часов		30			15
Подготовка к экзамену		0 час.			
Общая трудоёмкость		45 час., 1 зач.ед.			

#### 4.2. Содержание дисциплины (модуля), структурированное по темам (разделам)

Семестр: 8 (Весенний)

##### 1. Введение Методологические основы разделения и анализа макромолекул

Исторический обзор, анализ эволюции представлений о веществе, историческая шкала развития методов разделения и исследования макромолекул, введение в методологию биологического исследования, представление о спектре современных методов физико-химического анализа макромолекул, обсуждение критериев применимости методов и обработки полученных результатов, биоинформационные методы. Особенности выделения макромолекул разных классов из сложных смесей. Методы предварительной очистки образца: центрифугирование и задачи, которые можно решить этим методом. Очистка образца, основанная на различии в растворимости макромолекул, очистка биополимеров с использованием ферментов и частиц с активированной поверхностью.

##### 2. Масс-спектрометрические методы идентификации макромолекул

Конструкция масс-спектрометров для исследования макромолекул. Методы ионизации – электрораспыление, матричная лазерная десорбция/ионизация, методы прямой масс-спектрометрии. Масс-анализаторы высокого, сверхвысокого и ультравысокого разрешения. Конструкция масс-спектрометра для исследования макромолекул.

Исследование структуры органических молекул методами масс-спектрометрии с фрагментацией (МС/МС). Методы фрагментации ионов при захвате электронов, поглощении ИК излучения, при столкновениях с нейтралями, при столкновении с поверхностью. Техническая реализация селекции и фрагментации ионов в масс-спектрометрах. Хромато-масс-спектрометрия макромолекул.

##### 3. Методы конфокальной и когерентной микроскопии

Оптические методы визуализации внутренней структуры и микрорельефа поверхности объектов, представления об области применения и ограничениях, накладываемых физическими принципами функционирования на пространственное и временное разрешение рассматриваемых методов. Эпифлуоресцентные микроскопы (ход лучей, числовая апертура объектива, разрешение объектива и функция рассеяния точки). Теория интерференции оптических полей и теория интерференционных измерений; основы теории когерентности оптических полей и когерентные свойства оптических полей и лазерного излучения; теоретические и экспериментальные основы методов частично когерентных и лазерных оптических интерференционных измерений; математические основы преобразований и обработки оптических сигналов; математические основы визуализации двух- и трехмерных изображений; принципы получения информации о внутренней структуре объекта по измеренному интерференционному сигналу. Преимущества и ограничения интерференционных методов измерения внутренней структуры объектов. Методы FRET, SIM, STORM, STED, Light sheet, PALM. Флюоресцентные белки, внутриклеточные флюорофоры, применение флюоресцентной микроскопии для исследования быстрых клеточных процессов на примере измерения концентрации иона кальция.

#### 4. Оптическая спектроскопия макромолекул

Общие закономерности поглощения макромолекул в УФ-диапазоне. Спектральные параметры мономерных звеньев полимеров и тонкая структура спектра. Изменение спектров аминокислот под влиянием внешних факторов (рН среды, протонирование ионогенных групп). Ультрафиолетовые спектры поглощения белков. Особенности структуры спектров белков по сравнению со спектрами смеси ароматических аминокислот, входящих в их состав. Методы расчета вклада светорассеяния в измеряемое поглощение белков. Оценка вклада мономерных звеньев, доступных внешнему воздействию, методом дифференциальной спектрофотометрии. Расчет для белков (трипсина и рибонуклеазы) коэффициентов экстинкции и сечения поглощения аминокислотных остатков из экспериментальных данных. Расчет содержания хромофоров в молекуле белка. УФ поглощение нуклеиновых кислот, хромофоры. Расчет гиперхромного эффекта при переходе от двухспиральных структур ДНК к односпиральной. Вклад взаимодействия оснований в гиперхромный эффект. Тепловая денатурация и ренатурация ДНК. Кривые плавления ДНК. Определение концентрации макромолекул по спектрам поглощения.

Рассеяние электромагнитного излучения и нейтронов в биологических системах

Общая характеристика рассеяния света, рентгеновских лучей и нейтронов. Рассеяние света как рассеяние на "связанных" электронах, рассеяние рентгеновских лучей как рассеяние на "свободных" электронах, рассеяние нейтронов как рассеяние на ядрах. Основные физические следствия. Функция внутримолекулярной интерференции Дебая и ее свойства. Рассеяние на нулевой угол. Радиус инерции. Его связь с формой частицы и с распределением электронной (нейтронной) плотности внутри нее. Область формы. Общие законы спада кривой рассеяния для частиц разной формы (палочка, диск, гауссов клубок, компактные частицы). Метод сферических гармоник и его применение к восстановлению трехмерной структуры макромолекул. Рассеяние рентгеновских лучей. Формула Томпсона. Источники рентгеновского излучения (трубки, вращающиеся аноды, источники синхротронного излучения). Приемники рентгеновского излучения. Методы вариации контраста. Рассеяние света. Формула Реллея. Методы интерпретации экспериментальных данных. Рассеяние на малых и больших частицах. Метод Зимма. Проблема определения молекулярных масс и радиусов инерции больших биологических макромолекул. Изучение структуры ДНК. Методы вариации контраста. Рассеяние нейтронов. Нейтронные источники. Стационарные и пульсирующие реакторы. Мигающие источники. Малоугловые нейтронные спектрометры. Методы вариации контраста: метод H<sub>2</sub>O-D<sub>2</sub>O смесей, метод двойного и тройного изотопического замещения. Методы триангуляции. Метод спиновой вариации контраста. Биосинтетическое дейтерирование. Совместное использование рассеяния света рентгеновских лучей и нейтронов. Определение радиусов инерции компонентов и расстояний между их центрами тяжести в двухкомпонентных частицах. Совместное использование константы поступательного трения частицы и ее радиуса инерции.

Линейный дихроизм и ориентация молекул в биологических объектах

Основы спектрополяриметрии. Линейный дихроизм, дихроичное отношение и степень дихроизма. Метод расчета ориентации хромофоров молекул в биологических препаратах (мембраны, комплексы). Способы ориентации бактериальных и пигмент-белковых комплексов (методом линейной деформации). Устройство и принцип работы двухлучевого регистрирующего спектрофотометра с приставкой для спектрополяриметрических измерений. Расчет дихроичности и степени дихроизма. Вычисление углов ориентации хромофоров молекулы бактериохлорофилла в мембранах пурпурных бактерий.

Методы исследования флуоресценции макромолекул в видимой и ультрафиолетовой области спектра

Качественный и количественный анализ веществ по спектрам флуоресценции и спектрам возбуждения флуоресценции. Аппаратура для измерения спектров флуоресценции, ее возбуждения и производных спектров при комнатной и низкой (770К) температурах. Сопоставление спектров флуоресценции пигментов в растворе и в клетке. Тушение флуоресценции. Исследование эффекта тушения флуоресценции в зависимости от концентрации тушителя. Индукция флуоресценции фотосинтезирующих организмов (микроводоросли) и исследование механизма фотосинтеза. Фёрстеровский перенос энергии электронного возбуждения (FRET). Диполь-дипольное взаимодействие донора и акцептора энергии индуктивно-резонансный механизм, интеграл перекрывания спектров – зависимость от расстояния между донором и акцептором. Критический Фёрстеровский радиус. Роль ориентационного фактора. Феноменология явления – сенсibilизированная флуоресценция. Расчет по экспериментальным данным квантового выхода переноса энергии, константы переноса и расстояния между донором и акцептором. Метод флуоресцентных зондов. Определение константы связывания и концентрации мест связывания зонда в мембране. Флуоресцентные индикаторы pH. Использование зеленого флуоресцирующего белка (GFP) и цветных белков для внутриклеточного измерения pH, концентрации ионов. Принцип дифференциальной флуоресцентной спектроскопии.

Спектрофлуориметрическое исследование ароматических аминокислот и белков

Спектры флуоресценции и ее возбуждение в ароматических аминокислотах белков. Производная спектрофлуориметрия. Спектральный комплекс с двумя монохроматорами и работа на нем. Компьютерная обработка результатов измерений Форма одиночной спектральной полосы и ее производных при обычных и низких (-196ОС) температурах. Измерение спектров флуоресценции свободных аминокислот и белков. Исследование тонкой структуры спектров флуоресценции белков методом измерения первой, второй и четвертой производных. Сопоставление спектров белков со спектрами свободных аминокислот. Влияние денатурации на спектр флуоресценции, оценка вклада тирозиновой и триптофановой компонент во флуоресценцию белка. Разложение спектров флуоресценции многокомпонентных систем (белки, смеси аминокислот) на составляющие и оценка доли поглощения и флуоресценции составляющих в суммарном спектре с использованием данных производной спектроскопии. Поляризация флуоресценции, анизотропия флуоресценции. Уравнение Перрена. Корреляционные спектры флуоресценции. Получение информации о диффузии, величине и форме ориентации молекул в растворе и клетке, переносе энергии между молекулами.

## 5. Разделение макромолекул, частиц и субклеточных структур, аналитические подходы

Аналитическое ультрацентрифугирование и гель-хроматография, электрофорез в ПААГ. Понятие гидродинамически эквивалентной сферы и гидродинамически эквивалентного эллипсоида. Коэффициент поступательного трения и его связь с размерами и формой частиц. Формула Стокса. Формула Перрена. Зависимость константы поступательного трения от молекулярной массы в ряду частиц разной формы. Метод поступательной диффузии и его использование для анализа конформационного состояния макромолекул. Первый и второй законы Фика. Зависимость коэффициента диффузии от молекулярной массы макромолекул. Связь между константой диффузии и константой поступательного трения частицы. Формула Эйнштейна. Анализ конформационного состояния макромолекул исходя из зависимости их коэффициента диффузии от молекулярной массы. Метод скоростной седиментации. Коэффициент седиментации и его связь с коэффициентом поступательного трения. Зависимость коэффициента седиментации от молекулярной массы макромолекул. Анализ конформационного состояния макромолекул из зависимости их константы седиментации, поправленной на архимедов фактор, от молекулярной массы. Оптические методы регистрации в диффузии при аналитическом ультрацентрифугировании: метод Филпота-Свенссона, интерференционный метод, абсорбционный метод. Конструкция ультрацентрифуги и её элементов (роторов, кювет).

Определение молекулярной массы биологических макромолекул методом сочетания седиментации и диффузии. Первая формула Сведберга. Границы применимости. Классический метод седиментационного равновесия. Вторая формула Сведберга. Приближения к седиментационному равновесию. Метод Арчибальда. Метод Ифантиса. Равновесная седиментация в градиенте плотности. Дифференциальная седиментация. Вязкость. Характеристическая вязкость. Вязкость растворов сферических частиц. Вязкость растворов жестких асимметричных по форме, сплошных частиц. Формула Симха. Зависимость характеристической вязкости белков и нуклеопротеидов от молекулярной массы. Вязкость растворов полимерных молекул. Конформация Гауссова клубка. Белки в гуанидингидрохлориде и мочеvine. Зависимость вязкости от молекулярной массы для белков в гуанидингидрохлориде и мочеvine, возможность определения молекулярной массы белков в этих растворителях. Измерение вязкости: типы и конструкции вискозиметров. Градиентная зависимость вязкости. Вискозиметр Зимма. Вязкость ДНК. Совместное использование константы поступательного трения и вязкости. Формула Шераги-Манделькерна. Метод динамического двойного лучепреломления (эффект Максвелла). Ориентация макромолекул в гидродинамическом поле. Определение размеров, формы и гибкости макромолекул. Метод электрического двойного лучепреломления (эффект Керра). Ориентация макромолекул в электрическом поле. Определение размеров и формы макромолекул.

## 6. Хроматография макромолекул

Универсальность метода хроматографии применительно к разделению и идентификации самых разных классов соединений органической и неорганической природы. Использование хроматографии в науке, технике и производстве. История развитие хроматографических методов. Значение хроматографии для развития современной науки, успехи, достигнутые с использованием этого метода.

Основные положения теории хроматографического разделения. Подвижные и неподвижные фазы в хроматографических системах. Явления, происходящие при движении веществ по хроматограмме. Классификация хроматографических методов. Коэффициент Нернста. Изотермы адсорбции. Кинетика адсорбции-десорбции в потоке подвижной фазы. Концепция теоретических тарелок. Ширина и форма хроматографического пика. Разрешающая способность хроматографической колонки. Понятие «время удерживания», «объем удерживания», «исправленное время и объем удерживания». Коэффициент разделения. Эффективность, селективность и коэффициент емкости хроматографической системы. Использование теоретических предпосылок метода в практической деятельности.

Адсорбционная хроматография. Природа взаимодействия разделяемых соединений с адсорбентами. Требования, предъявляемые к сорбентам адсорбционной хроматографии. Полярные и неполярные адсорбенты. Размер образца и линейная емкость адсорбента. Активные центры и дезактивация адсорбентов. Полярность элюирующих систем. Энергия адсорбции элюирующих систем. Элюотропные ряды. Характеристика особенностей адсорбируемых соединений. Величины энергии адсорбции разделяемых соединений. Эволюция адсорбентов и адсорбционной хроматографии.

Высокоэффективная жидкостная хроматография высокого давления (ВЭЖХ) и ее особенности. Современное состояние этого вида хроматографии. Достоинства и недостатки ВЭЖХ.

Распределительная жидкостная хроматография. Распределение соединений между двумя несмешивающимися фазами. Разделение благодаря характеристике полярности разделяемых молекул. Подвижные и неподвижные жидкие фазы. Инертные носители, их гидрофильность и гидрофобность. Характеристика жидкостей, используемых в качестве подвижной и неподвижной фазы в распределительной хроматографии. Нормальная и обратнoфазная распределительная хроматография. Варианты распределительной хроматографии: колонки, тонкослойная хроматография, хроматография на бумаге. Достоинства и недостатки распределительной хроматографии.

Газовая хроматография. Газоадсорбционная и газораспределительная хроматографии, их характеристика. Особенности жидкостей и газов в газовой хроматографии. Устройство газового хроматографа. Колонки и детекторы, используемые в газовой хроматографии. Достоинства этого вида хроматографии и преимущества перед жидкостной хроматографией.

Гель-хроматография. Принцип метода. Параметры, характеризующие положение веществ при этом виде хроматографии:  $V_T$ ,  $V_0$ ,  $V_i$ ,  $V_m$ ,  $V_e$ ,  $V_s$ ,  $K_{av}$ . Природа и структура гелей в гель-хроматографии, гели на основе декстрана, агарозы, полиакриламида и др. Комбинированные гели и их концентрация. Кривые селективности. Подсчет возможного числа разделяемых фракций в хроматографической системе. Объем вносимых образцов и их концентрация. Скорость тока жидкости в хроматографической системе при гель-хроматографии. Высота и диаметр колонок с носителями. Хранение гелей. Задачи, решаемые гель-хроматографией.

Ионообменная хроматография. Принцип метода. Характеристика ионитов. Сильные и слабые иониты. Структура матриц ионитов, используемых для разделения низкомолекулярных соединений. Редко и плотно сшитые иониты. Обменная емкость ионитов. Маркировка ионитов. Механизм ионного обмена. Зависимость константы скорости обмена от величины заряда и радиуса хроматографируемых соединений. Условия десорбции в ионообменной хроматографии. Градиентная элюция. Типы градиентов. Задачи, решаемые ионообменной хроматографией. Разделение аминокислот на аминокислотном анализаторе.

Особенности фракционирования белков методом ионообменной хроматографии. Природа ионитов, их строение. Иониты на основе целлюлозы, декстрана, агарозы и др. Их сходство и различия. Функциональные группы ионитов, используемых для разделения белков. Зависимость зарядов ионитов от pH среды. Зависимость знака и величины заряда белка от pH среды. Особенности сорбции белков на ионитах. Зона стабильности белка. Выбор ионита (сильный-слабый, катионит-анионит). Количество ионита. Буферные растворы, используемые в ионообменной хроматографии белков. pH, ионная сила и природа буфера.

## **5. Описание материально-технической базы, необходимой для осуществления образовательного процесса по дисциплине (модулю)**

учебная аудитория, оснащенная компьютерами, мультимедиа проектором и экраном.

## **6.Перечень рекомендуемой литературы**

### **Основная литература**

1. Методы в молекулярной биофизике: структура, функция, динамика [Текст] : в 2 т. : учеб. пособие для вузов / И. Сердюк, Н. Заккаи, Дж. Заккаи .— М. : КДУ, 2009 .— Т. 1. - 2009. - 568 с.
2. Методы в молекулярной биофизике: структура, функция, динамика [Текст] : в 2 т. : учеб. пособие для вузов / И. Сердюк, Н. Заккаи, Дж. Заккаи .— М. : КДУ, 2009 .— Т. 2. - 2009. - 736 с.

### **Дополнительная литература**



Рекомендованная литература для самостоятельного изучения:

1. Высокоэффективная жидкостная хроматография в биохимии - Бауэр Г., Энгельгард Х., ... / под ред. Хеншен А., Хупе К.-П., Лотшпайх Ф., Вельтер В., М. «Мир», 1988.
2. Миронов В.Л. Основы сканирующей зондовой микроскопии. М.: 2004.
3. J. R. Trainor, P. J. Derrick (auth.), Michael L. Gross (eds.) Mass Spectrometry in the Biological Sciences- A Tutorial 1992 – разделы про ионные ловушки и тройные квадруполь.
4. Орлов В.И. Аратсков А.А. Жидкостная хроматография, теоретические основы. Дзержинск, 1997.
5. Дедкова Е.Г., Чуприк А.А., Бобринецкий И.И., Неволин В.К. Учебное пособие «Приборы и методы зондовой микроскопии». М.: 2011.
6. Лабораторное руководство по хроматографии и смежным методам, под ред. О.Микеш., М. «Мир», 1982. – разделы по гель-электрофорезу и ВЭЖХ.
7. Лебедев, А. Т. Масс-спектрометрия в органической химии, М. : БИНОМ. Лаб. знаний 2006, 2009

## **7. Перечень ресурсов информационно-телекоммуникационной сети "Интернет", необходимых для освоения дисциплины (модуля)**

Не используются

## **8. Перечень информационных технологий, используемых при осуществлении образовательного процесса по дисциплине (модулю), включая перечень необходимого программного обеспечения и информационных справочных систем (при необходимости)**

На лекционных занятиях используются мультимедийные технологии, включая демонстрацию презентаций в PowerPoint.

Выполнение самостоятельной работы по заданной преподавателем теме осуществляется в программах MS Office.

## **9. Методические указания для обучающихся по освоению дисциплины (модуля)**

Студент, изучающий дисциплину, должен с одной стороны, овладеть общим понятийным аппаратом, а с другой стороны, должен научиться применять теоретические знания на практике. В результате изучения дисциплины студент должен знать основные определения дисциплины, уметь применять полученные знания для решения различных задач.

Успешное освоение курса требует:

- посещения всех занятий, предусмотренных учебным планом по дисциплине;
- ведения конспекта занятий;
- напряжённой самостоятельной работы студента.

Самостоятельная работа включает в себя:

- чтение рекомендованной литературы;
- проработку учебного материала, подготовку ответов на вопросы, предназначенных для самостоятельного изучения;
- решение задач, предлагаемых студентам на занятиях;
- подготовку к выполнению заданий текущей и промежуточной аттестации.

Показателем владения материалом служит умение без конспекта отвечать на вопросы по темам дисциплины. Важно добиться понимания изучаемого материала, а не механического его запоминания. При затруднении изучения отдельных тем, вопросов, следует обращаться за консультациями к преподавателю. Возможен промежуточный контроль знаний студентов в виде решения задач в соответствии с тематикой занятий.

**ОЦЕНОЧНЫЕ МАТЕРИАЛЫ ПО ДИСЦИПЛИНЕ (МОДУЛЮ)**

**по направлению:** Биотехнология  
**профиль подготовки:** Системная и синтетическая биология  
Физтех-школа Биологической и Медицинской Физики  
кафедра физической химии  
**курс:** 4  
**квалификация:** бакалавр

Семестр, формы промежуточной аттестации: 8 (весенний) - Дифференцированный зачет

**Разработчики:**

М.Ю. Высоких, канд. биол. наук, доцент  
И.А. Попов, канд. физ.-мат. наук, доцент  
Е.Н. Кукаев, канд. физ.-мат. наук, доцент

## 1. Компетенции, формируемые в процессе изучения дисциплины

Код и наименование компетенции	Индикаторы достижения компетенции
ОПК-1 Способен изучать, анализировать, использовать биологические объекты и процессы, основываясь на математических, физических, химических, биологических законах, закономерностях и взаимосвязях	ОПК-1.1 Способен анализировать поставленную задачу, намечать пути ее решения
	ОПК-1.3 Способен определять границы применимости полученных результатов
	ОПК-1.2 Способен строить математические модели, производить количественные расчеты и оценки
ОПК-2 Способен использовать современные информационные технологии и программные средства при решении задач профессиональной деятельности, соблюдая требования информационной безопасности	ОПК-2.1 Способен применять современные вычислительную технику и сервисы сети Интернет в области (сфере) профессиональной деятельности
	ОПК-2.2 Знает и умеет применять численные математические методы и прикладное программное обеспечение для решения научных задач в профессиональной области
	ОПК-2.3 Знает основные требования информационной безопасности
ОПК-4 Способен осуществлять сбор и обработку научно-технической и (или) технологической информации для решения фундаментальных и прикладных задач	ОПК-4.1 Владеет методами научного поиска и интеллектуального анализа информации при решении задач профессиональной деятельности
	ОПК-4.2 Знает основные источники научно-технической и (или) технологической информации в области профессиональной деятельности
	ОПК-4.4 Владеет навыками работы с компьютером и компьютерными сетями с целью получения, хранения и обработки научной (технической, технологической) информации
	ОПК-4.3 Умеет составлять аннотации, рефераты, библиографические перечни и обзоры информации в области своей профессиональной деятельности
ОПК-6 Способен эксплуатировать технологическое оборудование, выполнять технологические операции, управлять биотехнологическими процессами, проектировать элементы технических и технологических систем, технических объектов, технологических процессов биотехнологического производства на основе применения базовых инженерных и технологических знаний	ОПК-6.2 Способен к оценке, анализу и интерпретации полученных в результате биотехнологических процессов данных
ПК-1 Способен планировать и проводить научные эксперименты (в избранной предметной области) и (или) теоретические (аналитические и имитационные) исследования	ПК-1.1 Владеет фундаментальными понятиями, законами и теориями современной физики и биологии
ПК-3 Способен выбирать и применять подходящее оборудование, инструменты и методы исследований для решения задач в избранной предметной области	ПК-3.3 Умеет производить оценку точности численных методов, используемых на ЭВМ, вычислительной сложности используемых алгоритмов и объема требуемых вычислительных ресурсов
ПК-4 Способен критически оценивать применимость используемых методик и методов	ПК-4.3 Способен обосновать причинно-следственные отношения используемых понятий и моделей

## 2. Показатели оценивания компетенций

В результате изучения дисциплины «Методы исследования макромолекул» обучающийся должен:

**знать:**

- основные принципы современных физико-химических методов анализа макромолекул.

**уметь:**

- оценивать применимость и сопоставлять эффективность методов физико-химического анализа макромолекул, необходимых для подбора инструментальной базы с целью выполнения соответствующих научно-исследовательских лабораторных биологических работ в области химии, наук о материалах, молекулярной и клеточной биологии, биохимии.

**владеть:**

- теоретическими знаниями о современных и инновационных методах биохимических исследований; арсеналом современных методов исследований, инструментальной технической базой выполнения современных исследований и совокупностью физико-химических методов анализа макромолекул.

### **3. Перечень типовых (примерных) вопросов, заданий, тем для подготовки к текущему контролю**

Примеры вопросов для текущего контроля успеваемости.

Оптические методы визуализации внутренней структуры и микрорельефа поверхности объектов, представления об области применения и ограничениях, накладываемых физическими принципами функционирования на пространственное и временное разрешение рассматриваемых методов.

Эпифлуоресцентные микроскопы (ход лучей, числовая апертура объектива, разрешение объектива и функция рассеяния точки).

Теоретические и экспериментальные основы методов частично когерентных и лазерных оптических интерференционных измерений; математические основы преобразований и обработки оптических сигналов; математические основы визуализации двух- и трехмерных изображений; принципы получения информации о внутренней структуре объекта по измеренному интерференционному сигналу.

Преимущества и ограничения интерференционных методов измерения внутренней структуры объектов.

Методы FRET, SIM, STORM, STED, Light sheet, PALM. Флюоресцентные белки, внутриклеточные флюорофоры, применение флюоресцентной микроскопии для исследования быстрых клеточных процессов на примере измерения концентрации иона кальция.

Методы ионизации: электронный удар и химическая ионизация, электроспрей (ESI), химическая ионизация при атмосферном давлении (APCI). Методы ионизации для прямой масс-спектрометрии: DESI, DART и др.

Решение структурных задач методами масс-спектрометрии. Определение элементного состава (элементный анализ, определение брутто-формулы). Идентификация по точной массе. Идентификация по изотопной структуре. Тандемная масс-спектрометрия (MS/MS). Селекция ионов. Методы фрагментации ионов (CID, ECD, IRMPD). Фрагментация пептидов.

Комбинации масс-спектрометра с жидкостным и газовым хроматографами. Применения масс-спектрометрии для решения задач биологии, химии, анализа окружающей среды, фармакологии, построения систем безопасности.

Центрифугирование. Аналитическое ультрацентрифугирование. Уравнение седиментации. Устройство центрифуги. Последовательные стадии фракционирования. Детектирование в аналитическом ультрацентрифугировании. Препаративное центрифугирование.

Электрофорез. Явление электроосмоса. Подвижность ионов в вязкой среде. Двойной электрический слой. Дзета-потенциал. Электрофорез с подвижной границей. Дисковый электрофорез. Зоновый электрофорез. Изоэлектрическое фокусирование. Изотахорофорез. Капиллярный электрофорез. Электрофорез в полиакриламидном геле (PAGE). Идентификация белков с помощью двумерного электрофореза в PAGE с использованием SDS.

Высокоэффективная жидкостная хроматография (HPLC). Факторы, влияющие на формирование и дисперсию хроматографического пика. Асимметричность пика. Способы оценки (тестирования) эффективности колонок в HPLC. Старение колонок.

Адсорбционная и распределительная хроматография. Жидкостная адсорбционная хроматография. Нормально-фазовая и обращено-фазовая распределительная хроматография. Градиентное элюирование. Устройство жидкостного хроматографа. Детекторы в жидкостной хроматографии. Ввод пробы: устройство шестиходового крана-дозатора с разрываемой ижекционной петлей. Комбинации масс-спектрометра с жидкостным и газовым хроматографами.

Разделение полимеров с помощью гелепроникающей хроматографии. Понятие об ионообменной хроматографии.

Твердофазная экстракция (SPE, удерживающая и неудерживающая). Виды сорбентов, используемых в SPE. Стадии SPE.

Применение поверхностного плазмонного резонанса для анализа макромолекул.

#### **4. Перечень типовых (примерных) вопросов и тем для проведения промежуточной аттестации обучающихся**

Примеры вопросов дифференцированного зачета.

1. Линейные квадрупольные и квадрупольные ионные ловушки. Параметрический резонанс. Движение в быстро осциллирующем поле. Квадрупольный масс-анализатор. Квадрупольные ионные ловушки (Ion Trap), принцип действия, сканирование по массам. Системы транспорта ионов с постадийной откачкой и радиочастотными квадрупольными. Тройной квадруполь.

2. Методы масс-спектрометрии сверхвысокого разрешения и высокой точности измерения массы (FTMS). Масс-спектрометрия ионно-циклотронного резонанса с преобразованием Фурье (ИЦР ПФ, FT ICR). Виды ловушек ИЦР. Способы возбуждения циклотронного движения. Детектирование сигнала ИЦР. Широкополосное и узкополосное детектирование. Абсолютный мировой рекорд разрешения в масс-спектрометрии. Орбитальные ионные ловушки (Orbitrap). Захват иона в орбитрепе. Детектирование сигнала. Как осуществить ввод ионов в масс-анализаторы ICR и Orbitrap?

3. Методы ионизации: электронный удар и химическая ионизация, электроспрей (ESI), химическая ионизация при атмосферном давлении (APCI). Методы ионизации для прямой масс-спектрометрии: DESI, DART и др.

4. Решение структурных задач методами масс-спектрометрии. Определение элементного состава (элементный анализ, определение брутто-формулы). Идентификация по точной массе. Идентификация по изотопной структуре. Tandemная масс-спектрометрия (MS/MS). Селекция ионов. Методы фрагментации ионов (CID, ECD, IRMPD). Фрагментация пептидов.

5. Комбинации масс-спектрометра с жидкостным и газовым хроматографами. Применения масс-спектрометрии для решения задач биологии, химии, анализа окружающей среды, фармакологии, построения систем безопасности.

6. Центрифугирование. Аналитическое ультрацентрифугирование. Уравнение седиментации. Устройство центрифуги. Последовательные стадии фракционирования. Детектирование в аналитическом ультрацентрифугировании. Препаративное центрифугирование.

7. Электрофорез. Явление электроосмоса. Подвижность ионов в вязкой среде. Двойной электрический слой. Дзета-потенциал. Электрофорез с подвижной границей. Дисковый электрофорез. Зоновый электрофорез. Изоэлектрическое фокусирование. Изоэлектрический фокусирование. Капиллярный электрофорез. Электрофорез в полиакриламидном геле (PAGE). Идентификация белков с помощью двумерного электрофореза в PAGE с использованием SDS.

8. Высокоэффективная жидкостная хроматография (HPLC). Факторы, влияющие на формирование и дисперсию хроматографического пика. Асимметричность пика. Способы оценки (тестирования) эффективности колонок в HPLC. Старение колонок.

Адсорбционная и распределительная хроматография. Жидкостная адсорбционная хроматография. Нормально-фазовая и обращено-фазовая распределительная хроматография. Градиентное элюирование. Устройство жидкостного хроматографа. Детекторы в жидкостной хроматографии. Ввод пробы: устройство шестиходового крана-дозатора с разрываемой ижекционной петлей. Комбинации масс-спектрометра с жидкостным и газовым хроматографами.

Разделение полимеров с помощью гелепроникающей хроматографии. Понятие об ионообменной хроматографии.

9. Твердофазная экстракция (SPE, удерживающая и неудерживающая). Виды сорбентов, используемых в SPE. Стадии SPE.

10. Применение поверхностного плазмонного резонанса для анализа макромолекул.

11. Принципы работы сканирующих зондовых микроскопов. Сканирующие элементы зондовых микроскопов (пьезосканеры). Конструкция атомно-силового микроскопа (АСМ). Принципиальная схема системы управления АСМ при работе в контактном и полуконтактном колебательном режимах. 12. Основные характеристики кантелеверов для АСМ. Силовая спектроскопия. Типы сил, возникающих в контактном и бесконтактном режимах. Типичные артефакты в АСМ.

13. Микроскопия ближнего поля. Принципы и аналитические возможности метода.

14. Электронная микроскопия. Принципы и аналитические возможности метода. Конструкция и режимы сканирования электронного микроскопа.

#### Критерии оценивания

Оценка отлично 10 баллов - выставляется студенту, показавшему всесторонние, систематизированные, глубокие знания учебной программы дисциплины, проявляющему интерес к данной предметной области, продемонстрировавшему умение уверенно и творчески применять их на практике при решении конкретных задач, свободное и правильное обоснование принятых решений.

Оценка отлично 9 баллов - выставляется студенту, показавшему всесторонние, систематизированные, глубокие знания учебной программы дисциплины и умение уверенно применять их на практике при решении конкретных задач, свободное и правильное обоснование принятых решений.

Оценка отлично 8 баллов - выставляется студенту, показавшему всесторонние, систематизированные, глубокие знания учебной программы дисциплины и умение уверенно применять их на практике при решении конкретных задач, правильное обоснование принятых решений, с некоторыми недочетами.

Оценка хорошо 7 баллов - выставляется студенту, если он твердо знает материал, грамотно и по существу излагает его, умеет применять полученные знания на практике, но недостаточно грамотно обосновывает полученные результаты.

Оценка хорошо 6 баллов - выставляется студенту, если он твердо знает материал, грамотно и по существу излагает его, умеет применять полученные знания на практике, но допускает в ответе или в решении задач некоторые неточности.

Оценка хорошо 5 баллов - выставляется студенту, если он в основном знает материал, грамотно и по существу излагает его, умеет применять полученные знания на практике, но допускает в ответе или в решении задач достаточно большое количество неточностей.

Оценка удовлетворительно 4 балла - выставляется студенту, показавшему фрагментарный, разрозненный характер знаний, недостаточно правильные формулировки базовых понятий, нарушения логической последовательности в изложении программного материала, но при этом он освоил основные разделы учебной программы, необходимые для дальнейшего обучения, и может применять полученные знания по образцу в стандартной ситуации.

Оценка удовлетворительно 3 балла - выставляется студенту, показавшему фрагментарный, разрозненный характер знаний, допускающему ошибки в формулировках базовых понятий, нарушения логической последовательности в изложении программного материала, слабо владеет основными разделами учебной программы, необходимыми для дальнейшего обучения и с трудом применяет полученные знания даже в стандартной ситуации.

Оценка неудовлетворительно 2 балла - выставляется студенту, который не знает большей части основного содержания учебной программы дисциплины, допускает грубые ошибки в формулировках основных принципов и не умеет использовать полученные знания при решении типовых задач.

Оценка неудовлетворительно 1 балл - выставляется студенту, который не знает основного содержания учебной программы дисциплины, допускает грубейшие ошибки в формулировках базовых понятий дисциплины и вообще не имеет навыков решения типовых практических задач.

#### **5. Методические материалы, определяющие процедуры оценивания знаний, умений, навыков и (или) опыта деятельности**

При проведении дифференцированного зачета обучающемуся предоставляется 30 минут на подготовку. Опрос обучающегося не должен превышать одного астрономического часа.