

## Практикум по методам молекулярной и клеточной биологии

К.б.н. Хабибуллина Нелли Фамзуловна, Охрименко Иван Сергеевич, Мишин Алексей Викторович, Лугинина Александра Павловна, Шевцов Михаил Борисович

Целью курса «Методы молекулярной и клеточной биологии» является освоение базовых методов, применяемых в современных биологических науках, изучающих структуру и функции белков; изучение их теоретических основ и применение на практических занятиях для дальнейшего использования универсальных технологий студентами в их будущей научной работе.

Содержание курса:

### 1. Генетическая инженерия

Машинерия экспрессии генов в клетках про и эукариот. Транскрипция, трансляция, посттрансляционные модификации, транспорт мембранных белков после трансляции у про- и у эукариот. Репликация, ориджин репликации, горизонтальный перенос, векторы для генной инженерии, группы совместимости плазмид, копияность плазмид, сайт-направленный мутагенез.

Полимеразная цепная реакция. Дизайн праймеров. Точечные мутации, ПЦР с наложением/перекрытием, агарозный гель-электрофорез.

### 2. Экспрессия белков.

Виды экспрессионных систем. Экспрессия в *E. coli*, дрожжевых системах, бакуловирусная экспрессия, экспрессия в млекопитающих, бесклеточная экспрессия. Сигнальные последовательности, драйверы экспрессии, последовательности для детекции и очистки рекомбинантных белков. Условия экспрессии: температура, pH, продолжительность, метаболические и не метаболические добавки. Бакуловирусная система экспрессии. Проточная цитометрия. Коллоидные растворы полимеров (ДНК, белки, ПЭГ), детергентов, липидов, жиров, и их смесей. Мелкодисперсные пены.

### 3. Очистка белков.

Методы выделения гомогенного препарата белка. Методы лизиса. Солюбилизация. Основные детергенты, их ККМ, HLB, и особенности. Типичные хроматографические смолы. Аффинные смолы. Принцип С-Р-Р. Нехроматографические методы: УЦФ в градиенте плотности, избирательное осаждение СА, препаративный электрофорез в иммобилизованной и подвижной среде. Иммуноблоттинг, аффинность и моноклональные антитела.

Методы стабилизации белка, лиганды, кросс-сшивающие реагенты, протеазы и их ингибиторы. Рефолдинг. Методы измерения константы связывания с лигандом. Методы проверки функциональности белка, полученного в ходе гетерологической экспрессии.

### 4. Кристаллизация белков.

Основные методы кристаллизации белков. Кубическая мезофаза и её свойства. Диффузия белков в ней, FRAP. Методы визуализации кристаллов. Элементы нелинейной оптики. SONICC.

Структурные исследования. X-ray, NMR, просвечивающая криоэлектронная микроскопия. Методы исследования динамики белков. (<sup>19</sup>F-NMR, HDX).

Основная литература

- 1) I. Mus-Veteau, Membrane Proteins Production for Structural Analysis. - 2014, XXIII, 425 p.
- 2) Северин. Биохимия. – 2003, 779 с.
- 3) Геннис Р. Биомембраны: Молекулярная структура и функции. – 1997, 314с.
- 4) Р. Скоупс. Методы очистки белков. – 1985., 358 с.
- 5) Дарбре А. Практическая химия белка. – 1989, М.: Мир, 622 с.

Дополнительная литература

- 1) Caffrey M, Cherezov V. Crystallizing membrane proteins using lipidic mesophases. *Nat Protoc.* 2009; 4(5):706-31.
- 2) Cherezov V, Rosenbaum DM, Hanson MA, Rasmussen SG, Thian FS, Kobilka TS, Choi HJ, Kuhn P, Weis WI, Kobilka BK, Stevens RC. High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science.* 2007; 318(5854): 1258-65.
- 3) Г.Шульц, Р.Ширмер. Принципы структурной организации белков. – 1982, М.: Мир, 354 с.
- 4) Остерман Л.А. «Хроматография белков и нуклеиновых кислот», «Наука», Москва, 1985.
- 5) Остерман Л.А. «Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование», «Наука», Москва, 1981.
- 6) Остерман Л. А. «Исследование биологических макромолекул электрофокусированием, иммуноэлектрофорезом и радиоизотопными методами», «Наука», Москва, 1983.
- 7) PharMingen. Baculovirus Expression Vector System Manual. – 1999, 108p.
- 8) A.S. Spirin and J.S.Swartz “Cell-free protein synthesis. Methods and Protocols”, 2008, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co.KGaA, Weinheim, 242 p.