

## Экспериментальные методы молекулярной биофизики

Д.х.н. Чупин Владимир Викторович, к.ф.-м.н. Минеев Константин Сергеевич, к.х.н. Зиганшин Рустам Хусманович

Цель данного курса состоит в формировании знаний в области современных экспериментальных методов исследования сложных биофизических систем.

Содержание курса:

### 1. Оптическая спектроскопия

Абсорбционная спектроскопия в ультрафиолетовой и видимой областях. Закон Бугера-Ламберта-Бера. Спектрофотометры для измерения спектров в ультрафиолетовой и видимой областях. Техника проведения эксперимента. Хромофоры. Связь между структурой соединений и их спектральными характеристиками (максимум поглощения, коэффициент экстинкции). Спектры поглощения белков. Спектры поглощения нуклеиновых кислот. Примеры использования спектроскопии в ультрафиолетовой и видимой областях.

Флуоресцентная спектроскопия. Физические основы флуоресценции.

Спектрофлуориметр. Техника измерения спектров флуоресценции. Флуорофоры.

Флуоресцентные зонды. Методы введения флуоресцентных меток в биологические молекулы. Резонансный перенос энергии (FRET). Деполяризация флуоресценции.

Примеры использования флуоресцентной спектроскопии в биофизике.

Круговой дихроизм. Оптическая активность. Плоско поляризованный свет. Сравнение методов КД и ДОВ. Изучение вторичной структуры белков и пептидов методами КД. Изучение денатурации и ренатурации нуклеиновых кислот методами КД.

### 2. Малоугловое рассеяние рентгеновских лучей и нейтронов

Историческое введение. Теория малоуглового рассеяния от частиц в растворе. Кривая рассеяния при малых значениях  $Q$ . Аппроксимация Гинье. Асимптотическое поведение кривой рассеяния при больших значениях  $Q$ . Соотношение Порода. Монодисперсные растворы частиц. Полидисперсные растворы. Модели и имитации. От кривой рассеяния – к набору структур. Вариация контраста в рассеянии рентгеновских лучей и нейтронов. Изменение контраста за счет растворителя. Изменение контраста за счет рассеивающих свойств частицы. Синтетическое и биосинтетическое дейтерирование. Конформационные переходы. Мембранные белки.

### 3. Основные принципы ЯМР-спектроскопии. История открытия метода. Уравнение Блоха.

Химический сдвиг. Скалярные константы спин-спинового взаимодействия. ЯМР-релаксация. Импульсная Фурье ЯМР-спектроскопия. Устройство ЯМР-спектрометра.

Квантово-механическое описание эксперимента ЯМР, матрицы плотности и эволюция намагниченности. Двумерная и многомерная ЯМР-спектроскопия. Импульсные последовательности. Определение структуры низкомолекулярных соединений. Спектры ЯМР для исследования пространственной структуры белков. Спиновые системы.

Отнесение сигналов в спектрах ЯМР. Информация о пространственной структуре белков в спектрах ЯМР. Методики расчета пространственной структуры белков по данным спектроскопии ЯМР. Новейшие методы ЯМР-спектроскопии. ЯМР-спектроскопия твердого тела. Механизмы ЯМР-релаксации. Функция спектральной плотности, параметр порядка, время корреляции вращательной диффузии. Оптимизация ЯМР-релаксации в импульсных последовательностях. Изучение внутримолекулярной подвижности белков по данным ЯМР-релаксации, «модель-независимый» подход. Использование релаксации для определения пространственной структуры. Химический обмен. Исследование

равновесной кинетики химических реакций и конформационных переходов. Исследование пространственной структуры короткоживущих переходных состояний. Изучение неупорядоченных белков.

#### 4. Масс-спектрометрия

Определение масс-спектрометрии. Принципиальное устройство масс-спектрометра. Основные характеристики масс-спектрометров (диапазон масс, разрешающая способность, быстродействие, чувствительность). Методы ионизации биологических макромолекул (Электронный удар. Химическая ионизация. Полевая десорбция-ионизация. Бомбардировка быстрыми атомами (FAB, SIMS). Плазменная десорбция. Лазерная десорбция-ионизация. Лазерная десорбция-ионизация из матрицы (MALDI).

Электрораспыление (Электроспрей). Масс-анализаторы (магнитный секторный, электростатический, квадрупольный, времяпролетный, ионная ловушка, ячейка ионно-циклотронного резонанса).

Масс-спектрометрический анализ белков и пептидов. Методы идентификации белков и пептидов с использованием масс-спектрометрии (метод отпечатка пептидных масс, тандемная масс-спектрометрия). Масс-спектрометрический анализ сложных смесей белков и пептидов. Сопряжение масс-спектрометрического анализа белков и пептидов с различными методами разделения белков и пептидов (жидкостная хроматография, капиллярный электрофорез, гель-электрофорез).

Количественный масс-спектрометрический анализ (количественная масс-спектрометрия с использованием изотопных меток, безметочная количественная масс-спектрометр).

#### Основная литература

1. Сердюк И., Заккаи Н., Заккаи Дж. Методы в молекулярной биофизике. Учебное пособие. Т. 1, 2 - Издательство КДУ, 2010.
2. J. Cavanagh (2006) «Protein NMR Spectroscopy. Principles and Practice», Academic Press.
3. Х.Гюнтерт. Введение в курс спектроскопии ЯМР. Москва, Мир, 1984.
4. Лебедев А.Т. Масс-спектрометрия в органической химии. Москва. 2003 г.
5. Mass spectrometry basics. Eds. C.G. Herbert, R.A.W. Johnstone. 2003 CRC Press.
6. New and emerging proteomic techniques. Eds. D. Nedelkov, R.W. Nelson, Methods in molecular biology, 328. 2006, Humana Press.
7. "Proteomics of human body fluids: principles, methods, and applications" Ed: Visith Thongboonkerd. 2007, Humana Press.
8. LC-MS/MS in Proteomics. Eds. P.R. Citillas and J.F. Timms, Methods in molecular biology, 2010, Humana Press.

#### Дополнительная литература

1. Нельсон Д., Кокс М. «Основы биохимии Ленинджера. Т. 1, 2, 3» – М.: Бином, 2011-2014
2. Р. Эрнст, Дж. Боденхаузен, А. Вокуан. ЯМР в одном и двух измерениях. Москва, Мир, 1990.
3. Э. Дероум. Современные методы ЯМР для химических исследований. Москва, Мир, 1992.
4. Кантор Ч., Шиммель П. - Биофизическая химия, Т. 1, 2, 3.- М.:Мир, 1984-1985.
5. Гордон А., Форд Р. Спутник химика. Физико-химические свойства, методики, библиография – М.: Мир 1976. - 541 с.

#### Интернет-ресурсы:

1. <http://www.pdb.org> — база данных пространственных структур белковой
2. <http://www.bmrb.wisc.edu> — база данных химических сдвигов ЯМР белков и пептидов

3. <http://nmrshiftdb.nmr.uni-koeln.de/> - база данных химических сдвигов ЯМР низкомолекулярных соединений
4. <http://lib.mipt.ru/catalogue/1020/> -электронная библиотека Физтеха, раздел “Биохимия и биофизика”
2. <http://molbiol.ru> – образовательный сайт по молекулярной биологии.
3. <http://biomolecula.ru> - образовательный сайт по молекулярной биологии.
4. <http://ncbi.nlm.nih.gov> – крупнейшая база биологических и медицинских статей
5. <http://edx.org> – онлайн курсы ведущих мировых университетов
6. <http://coursera.org> - онлайн курсы ведущих мировых университетов