

**МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ**  
**имени М. В. ЛОМОНОСОВА**  
**ФИЛИАЛ В ПУЩИНО**

**Кафедра молекулярной биологии**

Программа курса

**МЕТОДЫ ХИМИИ БЕЛКА**

**Направление: 020200.68 – «Биология», квалификация – магистр биологии**

**Специализированная магистерская программа: 020200.68.11 –  
«Биохимия и молекулярная биология»**

**Составитель курса: д. б. н., в. н. с. Г. М. Гонгадзе**

**Пущино**

**2011**

## ПОЯСНИТЕЛЬНАЯ ЗАПИСКА

Курс посвящен, прежде всего, методам химии белков, а также химии белоксинтезирующего аппарата живых клеток, включая нуклеиновые кислоты, и является составной частью общей программы специализации по молекулярной биологии. Этот курс рассчитан на студентов, занимающихся по программе магистерской подготовки, аспирантов, специализирующихся в области молекулярной биологии, а также научных сотрудников, начинающих работать в этой области.

Данный курс непосредственно связан с рядом других курсов специализации по молекулярной биологии («Принципы структурной организации белков и нуклеиновых кислот», «Биосинтез белка и его регуляция» и «Физические методы в молекулярной биологии»), поэтому должен проводиться параллельно с ними.

В курсе лекций дается краткое представление о химической структуре белков и нуклеиновых кислот (свойствах аминокислот и нуклеотидов, полипептидной и нуклеотидной цепях, свойствах данных биополимеров). Описываются основные химические методы, которые применялись вчера и используются сегодня для выделения и исследований белков и нуклеиновых кислот. Проводится сравнительный анализ возможностей и недостатков различных методов, используемые при изучении структуры и функции белков и нуклеиновых кислот.

Курс состоит из лекций и семинарских занятий, общая трудоемкость – 100 часов.

Аудиторная нагрузка – 54 часа,

из них: лекции – 36 часов,

семинарские занятия – 18 часов;

самостоятельная работа студентов – 46 часов.

Форма контроля знаний: 9 семестр – экзамен.

# ПРОГРАММА

## 1. Введение.

- Белки, нуклеиновые кислоты и молекулярная биология (краткая историческая справка). Роль белков и нуклеиновых кислот (НК) в жизни и эволюции организмов;
- Разнообразие белков и НК: простые и сложные белки, биологические пептиды, ДНК и РНК. Классификация белков и НК;
- Стратегия изучения белков и нуклеиновых кислот. Свойства биологических макромолекул (физико-химические свойства, структура и функция) и накопленный арсенал методов для их исследования.

## 2. Химическая структура белка и нуклеиновой кислоты.

- Структурная организация белков и нуклеиновых кислот: аминокислоты, нуклеотиды и полимерная цепь, понятие о первичной структуре и других уровнях организации биологических макромолекул, мономеры, олигомеры и комплексы;
- Понятие об аминокислотах, структура и свойства. Разнообразие аминокислот и их классификация. Стереизомеры. Кислотно-основные свойства. Типы боковых групп. Проявление свойств аминокислотных остатков в белке.
- Понятие о нуклеотидах, структура и свойства. Компоненты нуклеотидов. Разнообразие нуклеотидов и их классификация. Проявление свойств нуклеотидных остатков в НК.

## 3. Выделение и очистка белков и нуклеиновых кислот.

- Оборудование и реактивы. Чистота проведения эксперимента;
- Особенности выделения белков и НК из разных биологических объектов (эукариоты, мезофильные бактерии, экстремофильные археи и бактерии, штаммы-продуценты). Методы разрушения клеточной стенки (физический, химический и ферментативный);
- Методы предварительной очистки образца:  
центрифугирование и задачи, которые можно решить этим методом. Виды центрифугирования;  
очистка образца, основанная на различии в растворимости белков, нуклеиновых кислот и других клеточных компонентов;  
очистка биополимеров с использованием ферментов.
- Материалы и основное оборудование хроматографии. Хроматографическая очистка биополимеров. Основные принципы. Распределительная хроматография в жидкой фазе и

в тонком слое. Адсорбционная хроматография. Гидрофобная хроматография. Гель-хроматография, эффект молекулярного сита. Ионообменная хроматография, аниониты, катиониты. Аффинная хроматография, принцип и возможности. Техника эксперимента. Высокоэффективная жидкостная хроматография. HPLC, FPLC. Принцип и оборудование.

- Использование для очистки белка полупроницаемых мембран.
- Эффективное сочетание хроматографических и других методов для очистки биомолекул. Факторы, влияющие на качество и количество выделенного образца.
- Кристаллизация белков или НК как способ их очистки.
- Как избежать инактивации биомолекулы (структурные или функциональные изменения, гидролиз и модификации) при ее выделении.

### **3. Электрофорез для анализа и очистки биополимеров.**

- Зональный электрофорез, среда. Метод Леймли. Ступенчатый и градиентный электрофорез в ПААГ;
- Электрофорез в денатурирующих и неденатурирующих условиях;
- Двумерный электрофорез, изоэлектрофокусирование, метод О'Фаррелла, другие варианты двумерного электрофореза в ПААГ;
- Маркеры и визуализация полос;
- Анализ и использование образца после его электрофоретического разделения: выделение образца из геля, перенос образца на мембрану, радиоавтограф.
- Препаративный электрофорез в полиакриламидном геле. Оборудование и возможности метода.

### **4. Характеристика образца и подготовка его к исследованиям.**

- Методы приготовления образцов белков и НК для исследований:  
Методы концентрирования. Осаждение солями, органическими растворителями и полимерами. Ультрафильтрация. Лиофилизация.  
Растворение осадков белков или НК (денатурация и ренатурация). Удаление низкомолекулярных веществ из раствора (пересаживание, диализ через полупроницаемую мембрану или хроматографическое обессоливание).
- Определение концентрации белка или НК в растворе:  
Определение количества белка по азоту или НК по фосфору;  
Колориметрические методы;  
Спектрофотометрические методы.
- Методы, позволяющие оценить чистоту препарата биомолекул:

Аналитическое ультрацентрифугирование и гель-хроматография, электрофорез в ПААГ, определение N- и C-концевых аминокислотных остатков, масс-спектрометрия.

- Аминокислотный состав белка: кислотный и щелочной гидролиз, их особенности, преимущества и недостатки;  
Аминокислотный анализатор, современные модели, чувствительность (флуорескамин и о-фталевый диальдегид, газожидкостная хроматография);
- Нуклеотидный состав НК: химический и ферментативный гидролиз, методы разделения нуклеотидов и определения состава НК.

## **6. Определение первичной структуры белка.**

- Определение N- и C-концевых аминокислотных остатков: динитрофенильный, дансильный методы, гидразинолиз, амино- и карбоксипептидазы;
- Методы фрагментации полипептидной цепи:  
Химические методы специфического расщепления белка;  
Энзиматические методы расщепления белка. Специфичность протеаз, понятие об ограниченном и исчерпывающем гидролизе. Триптический гидролиз белка только по остаткам лизина или аргинина, или цистеина;
- Методы разделения и очистки пептидов. Фингерпринт;
- Определение аминокислотной последовательности белка:  
Последовательная деградация пептидов по методу Эдмана и его современные модификации. Основные принципы работы секвенатора;
- Альтернативный метод определения первичной структуры белка – сиквенс по гену.
- Представление о химическом синтезе белков и пептидов. Синтезатор Меррифилда.

## **7. Определение первичной структуры ДНК и РНК.**

- Химические методы фрагментации полинуклеотидной цепи. Модификация нуклеотидов по азотистым основаниям и расщепление полинуклеотидной цепи;
- Энзиматические методы фрагментации полинуклеотидной цепи. Специфические и неспецифические нуклеазы. ДНКазы и РНКазы;
- Определение нуклеотидной последовательности ДНК:  
Метод Максама-Гилберта;  
Метод Сэнгера;  
Современные варианты секвенирования ДНК и РНК. Основные принципы работы секвенатора.

## **8. Изучение пространственной структуры белка, его межмолекулярных контактов и функциональных свойств химическими методами.**

- Общая стратегия изучения пространственной структуры и других свойств белка;
- Химическая модификация аминокислотного остатка в белке. Модифицирующие агенты. Специфичность реакции и полнота модификации. Модификация аминогруппы, тиольных групп цистеина и метионина, имидазола гистидина, гидроксильных групп серина и треонина, гидроксила тирозина, триптофана;
- Внутри- и межмолекулярные сшивки. Фотоактивируемые агенты;
- Использование белка как лиганда в аффинной хроматографии;
- Ограниченный ферментативный гидролиз белка. Специфичность и эффективность протеаз;
- Специфическое расщепление белка химическими агентами;
- Сравнительное расщепление или модификация свободного белка или его комплекса с другой молекулой.

## **9. Белковая инженерия.**

Задачи и возможности метода. Специфический и неспецифический мутагенез. Примеры различных приемов мутагенеза.

## **10. Изучение пространственной структуры НК, ее межмолекулярных контактов и функциональных свойств химическими методами.**

- Общая стратегия изучения пространственной структуры и других свойств НК;
- Химические модификации в РНК. Изучение укладки полинуклеотидной цепи и конформационных изменений в ее пространственной структуре;
- Использование РНК как лиганда в аффинной хроматографии;
- Энзиматический гидролиз РНК. Специфические ферменты. Выявление элементов пространственной структуры и участков, защищаемых другими молекулами. Пробинг и изменение конформации РНК;
- Транскрипция РНК и ее производных *in vitro*. Задачи и возможности метода. Препаративная наработка РНК. Внесение мутаций в РНК вне клетки. SELEX.

## ОСНОВНАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Практическая химия белка. Под. ред. А. Дарбре. – М.: Мир, 1989.
2. Аминокислоты. Пептиды. Белки. Под. ред. Т. Дэвени & Я. Гергей. – М.: Мир, 1976
3. Ленинджер, А. Основы биохимии. 1-3 т. – М.: Мир, 1985.
4. Овчинников, Ю.А. Биоорганическая химия. – М.: Просвещение, 1987.
5. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: электрофорез и ультрацентрифугирование. – М.: Наука, 1981.
6. Остерман Л.А. Исследование биологических макромолекул электрофокусированием, иммуноэлектрофорезом и радиоизотопными методами. – М.: Наука, 1983.
7. Остерман Л.А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот. – М.: Наука, 1985.
8. Скоупс Р. Методы очистки белков. – М.: Мир, 1985.
9. Фрайфельдер Д. Физическая биохимия. – М.: Мир, 1980.
10. Шабарова, З.А. & Богданов. А.А. Химия нуклеиновых кислот. – М.: Химия, 1978.

## ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА ДЛЯ УГЛУБЛЕННОГО ИЗУЧЕНИЯ ПРЕДМЕТА

1. Агол, В.И., Богданов, А.А., Гвоздев, В.А. и др. Молекулярная биология: Структура и биосинтез нуклеиновых кислот. под ред. А.С. Спирина. – М.: Высшая школа, 1990.
2. Геккелер, К. & Экштайн, Х. Аналитические и препаративные лабораторные методы. – М.: Химия, 1994.
3. Гринштейн, Д. & Вениц, М. Химия аминокислот и пептидов. – М.: Мир, 1966
4. Жидкостная колоночная хроматография. под. ред. З. Дейл, К. Мацек, Я. Янак. – М.: Мир, 1983.
5. Диксон, М. & Уэбб, Э. Ферменты. 1-3 т. – М.: Мир, 1982.
6. Дэвидсон, Д. Биохимия нуклеиновых кислот. – М.: Мир, 1976.
7. Кирхнер, Ю. Тонкослойная хроматография. – М.: Мир, 1981.
8. Кочетков, Н.К., Будовский, Э.И., Свердлов, Е.Д., Симукова, Н.А., Турчинский, М.Ф., Шибаяев, В.Н. Органическая химия нуклеиновых кислот. – М. Химия, 1970.
9. Лурье А.А. Сорбенты и хроматографические носители. – М.: Химия, 1972.
10. Микельсон, А. Химия нуклеозидов и нуклеотидов. – М. Мир, 1966.
11. Мосолов, В.В. Протеолитические ферменты. – М.: Наука, 1971.
12. Степанов В.М. Молекулярная биология. Структура и функции белков. под ред. А.С. Спирина. – М.: Высшая школа, 1996.
13. Турчинский Ю.М. Сера в белках. – М.: Наука, 1977.
14. Туркова Я. Афинная хроматография. – М.: Мир, 1980.
15. Шапот. В.С. Нуклеазы. – М.: Медицина. 1968.
16. Шульц, Г. & Ширмер, Р. Принципы структурной организации белков. – М.: Мир, 1982.
17. Якубке, Х.-Д. & Ешкайт, Х. Аминокислоты, пептиды, белки. – М.: Мир, 1985.