

Основы взаимодействия биомолекул

Программа курса

к.х.н., доцент В. В. Коваль, д.х.н., доцент Д. В. Пышный

Кафедра молекулярной биологии, Факультет естественных наук
Новосибирский национальный исследовательский государственный
университет

Введение. Молекулярная биология XXI века: от ансамбля – к одиночным молекулам. Краткая история и перспективы. Языки и инструментальные средства. Шкалы длин и времени в биологии. Структурно-функциональные гипотезы. Комплементарность физических методов исследования: термодинамика, гидродинамика, рассеяние излучения, спектроскопия, детектирование одиночных молекул.

Биологические макромолекулы и физические инструменты. Макромолекулы и их окружение. Растворы макромолекул. Концентрация. Парциальный объем. Коллигативные свойства; закон Рауля. Химический потенциал и активность. Температура. Осмотическое давление. Вириальные коэффициенты.

Макромолекулы, вода и соли. Ионная сила и теория Дебая-Хюккеля. Полиэлектролиты и эффект Доннана. Взаимодействия между макромолекулами и растворителем. Вода, соль и гидрофобный эффект. Макромолекулы как физические частицы.

Биологическая масс-спектрометрия I. Масса и заряд. Историческое введение в биологические проблемы. Ионы в электрическом и магнитных полях. Методы ионизации. От ионов в растворе к ионам в газовой фазе. Электронная ионизация. Ионизация полем. Бомбардировка быстрыми атомами. Плазменная десорбция. Ионизация лазерной десорбцией при содействии матрицы. Ионизация электрораспылением.

Биологическая масс-спектрометрия II. Инструменты и передовые технологии. Масс-спектрометры с одиночной и двойной фокусировкой. Квадрупольный масс-фильтр. Квадрупольная ионная ловушка. Масс-спектрометр с использованием ионно-циклотронного резонанса. Время-пролетная масс-спектрометрия. Масс-спектрометрия с фурье-преобразованием. Тандемная масс-спектрометрия. Разрешение и точность определения массы. Моноизотопная масса. Измеренная масса. Средняя масса.

Биологическая масс-спектрометрия III. Структурно-функциональные исследования – структура и функция белков. Определение массы. Нековалентные комплексы. Сворачивание и динамика белков. Секвенирование белков. Идентификация белков в двумерном электрофорезе. Функциональная протеомика. Анализ смеси олигонуклеотидов. Большие и очень большие нуклеиновые кислоты. Секвенирование ДНК. Субклеточные комплексы и органеллы: рибосомы, рибосомные субъединицы и

рибосомные белки. Бактерии и бактериальная таксономия. Масс-спектрометрия в медицине; клиническая онкология; масс-спектрометрическая визуализация изображений.

Детектирование одиночных молекул I. Введение в биологические проблемы. Флуоресцентная спектроскопия одиночных молекул. Лазер-индуцируемая флуоресценция. Схемы мечения и наблюдаемые величины. Детектирование одиночных молекул в твердой фазе. Детектирование одиночных молекул в конденсированной фазе. Левитирующая микрокапля. Проточные кюветы. Капиллярные ловушки. Электрические ловушки. Оптическое детектирование одиночных молекул на поверхности. Сканирующая оптическая микроскопия ближнего поля. Конфокальная микроскопия дальнего поля. Широкопольная эпи-иллюминация. Флуоресценция в затухающем поле. Комбинация оптической и атомно-силовой микроскопии. Сканирующая раман-спектроскопия ближнего поля.

Детектирование одиночных молекул II. Одна молекула «говорит» больше, чем ансамбль молекул. Прямое наблюдение ферментативной активности. Неэкспоненциальная кинетика одиночных молекул. Катализ и конформация РНК. Оптические ловушки (лазерные твизеры). Магнитные ловушки (магнитные твизеры). Силовая мода в методе атомно-силовой микроскопии. Стекланные микроиглы. Механика ДНК. Молекулярная йога ДНК: S- и P-формы. Раскручивание и скручивание ДНК. Конденсация ДНК. Расплетание двойной спирали ДНК. Растяжение одиночных волокон хроматина и индивидуальной нуклеосомы. Механика РНК. Механика белков. Полибелки. Модели эластичности. Растяжение белков и механическая стабильность. Деформация полисахаридов.

Биологические моторы. Нанотехника для работы с биологическими моторами. Механика макромолекул: нанометровые шаги и пиконьютоновые силы. Линейные молекулярные моторы: кинезин: транспорт органелл вдоль микротрубочек; миозин: мышечный мотор; цитоплазматический динеин: мотор для транспорта микротрубочек; аксонемальный динеин: мотор эукариотических жгутиков и ресничек; РНК полимеразы – процессивная машина ДНК транскрипции. Роторные молекулярные моторы: АТФ-аза – мотор двойного действия; бактериальный жгутик: винт пропеллера. Упаковочные моторы: коннектор бактериофага φ29: ДНК-упаковочный мотор. Искусственные нано-электромеханические устройства. Молекулярные моторы и броуновское движение. Молекулярные моторы и второй закон термодинамики.

Основные направления исследований в области бионанотехнологии. Предмет и задачи бионанотехнологии. Отрасли народного хозяйства, использующие достижения биотехнологии. Основные направления бионанотехнологии, связанные с использованием наноразмерных объектов и наноструктурированных материалов. Молекулярный инструментарий бионанотехнологии. Молекулярные маяки, переключатели, двигатели,

ножницы, нанотранспортеры. Отличительные особенности и основные функции наноразмерных биомолекулярных объектов и решаемые с их помощью проблемы.

Принципы конструирования наноразмерных объектов на основе нуклеиновых кислот. ДНК-наноархитектоника. Историческая справка развития нового направления бионанотехнологии нуклеиновых кислот, направленной на конструирование наноразмерных объектов. Цели и задачи ДНК-наноархитектоники. Принципы сборки наноструктурированных объектов.

Разработка структурных блоков для ДНК-наноархитектоники. Основы конструирования и получения структурных блоков на основе нуклеиновых кислот и других биомолекулярных фрагментов, обеспечивающие получения дискретных наноразмерных объектов и наноструктурированных двух- и трехмерных периодических материалов.

Перспективы применения наноразмерных конструкций на основе нуклеиновых кислот. Практическая значимость объектов ДНК-наноархитектоники. Нанотранспортеры, наномашинны, наноструктурированные покрытия и т.д.

Гибридизационный анализ нуклеотидных маркеров. Гибридизационная способность синтетических фрагментов нуклеиновых кислот. Методы анализа нуклеиновых кислот, основанные на комплементарных взаимодействиях РНК- и ДНК-фрагментов. История развития метода молекулярной гибридизации. Принципы конструирования олигонуклеотидных зондов для специфического и селективного распознавания нуклеотидных маркеров. Гибридизационные свойства синтетических олигонуклеотидов и способы их регуляции.

Биочиповая технология анализа нуклеиновых кислот. История развития биочиповой технологии и основные задачи анализа биомолекул с помощью биочипов. Историческая справка о развитии методов параллельного анализа биомолекулярных маркеров. Сферы применения и типы биочипов.

Принципы разработки биочипа и его использования в НК-диагностике. Основные принципы конструирования биочипов. Рациональный дизайн олигонуклеотидных зондов. Иммуобилизация зондов на подложку-носитель. Способы генерации регистрируемого сигнала. Схема пробоподготовки биологического материала для анализа.

Проблемы биочипового анализа. Основные факторы, определяющие эффективность биочипового анализа биомолекулярных маркеров. Причины возникновения ложноположительных и ложноотрицательных результатов анализа.

Принципы конструирования наноструктурированных материалов и биосенсорных устройств на их основе. Типы современных биосенсоров. Оптические, электрохимические, гравиметрические и другие типы биосенсоров. Способы регистрации биомолекулярных взаимодействий.

Молекулярно-импринтированные полимеры. Способы получения полимерных материалов с молекулярной памятью. Молекулярные мишени для импринтинга.

Проблемы импринтинга биомолекул и клеток. Применение молекулярно импринтированных полимеров.

Аптамеры. Феномен аптамеров на примере РНК/ДНК-аптамеров. Способы получения аптамеров. Функционализация аптамеров. Сферы применения аптамеров.

Современные бионанотехнологические подходы к секвенированию ДНК. Современные подходы к секвенированию ДНК. Методы массового параллельного секвенирования нуклеиновых кислот, основанные на пиросеквенировании, лигировании, минисеквенировании. Способы генерации и анализа анализируемых сигналов при массовом параллельном секвенировании нуклеиновых кислот. Подходы к секвенированию одиночных молекул нуклеиновых кислот. Использование нанопор и нанореакторов при секвенировании НК.