

"Методы исследования биополимеров"

1. Основные типы биополимеров. Их физико-химические свойства.

А. Нуклеиновые кислоты.

- a. Одноцепочечные (ДНК и РНК).
- b. Двухцепочечные (ДНК). Структурные характеристики В-ДНК.
- c. Денатурация ДНК. Хаотропные агенты.

В. Белки.

- a. Разнообразие структур белка. Заряд белка, изоэлектрическая точка.
- b. Денатурация белков с использованием ДСН и 2-меркаптоэтанола.

2. Методы детекции биополимеров.

А. Использование радиоизотопов для детекции биополимеров.

- a. Типы распада. Излучаемые частицы.
- b. Интенсивность распада и энергия испускаемых частиц.
 - Период полураспада, теоретическая и практическая удельная активность, объемная активность. Единицы измерения. Закон радиоактивного распада. Изотопное разбавление.
 - Энергия испускаемых частиц. Спектр распределения частиц по энергиям.
- c. Взаимодействие испускаемых частиц с веществом. Радиоллиз. Стабилизаторы. Меры безопасности при работе с РА веществами.
- d. Свойства наиболее часто применяемых изотопов, сфера их применения.
- e. Детекция РА распада счетчиком Гейгера.
 - Устройство и принцип действия счетчика Гейгера.
 - Зависимость между интенсивностью потока частиц и эффективностью счета. Недостатки счетчика Гейгера.
- f. Детекция РА распада с использованием сцинтилляторов.
 - Устройство и принцип действия регистратора сцинтилляции.
 - Твердые и жидкие сцинтилляторы.
 - Сместители спектра (вторичные сцинтилляторы). Назначение, передача возбуждения молекулам сместителей спектра. Оптическое и химическое тушение сцинтилляции.
 - Связь между энергией частицы и интенсивностью вспышки. Одновременная регистрация изотопов с разной энергией частиц. Каналы счета, коэффициент проникновения.
- g. Детекция РА распада по излучению Вавилова-Черенкова.
 - Связь между энергией частицы и интенсивностью вспышки.
- h. Авторадиография.
 - Принцип метода, его достоинства и недостатки.
 - Типы используемых фотоматериалов, их применимость для разных изотопов. Использование низких температур для стабилизации скрытого изображения. Авторадиография *in situ*.
 - Усиливающие экраны: принцип действия, достоинства, недостатки, эффективность для разных изотопов.
 - Устройство и принцип действия PhosphoImager
- i. Использование радиоизотопов для исследования конформации биополимеров и их комплексов.

В. Поглощение света веществом (спектрофотометрия).

- a. Коэффициент пропускания. Оптическая плотность. Приборы для ее определения, их устройство и характеристики. Зависимость относительной погрешности определения от ее величины.
- b. Спектр поглощения. Типичные спектры ДНК, РНК, белков.
- c. Гипер- и гипохромный эффект на примере плавления ДНК-дуплексов.
- d. Использование красителей для детекции биополимеров.
 - Примеры красителей, используемых для разных классов биополимеров, чувствительность окрашивания.
 - Использование флуоресценции на примере EtBr и акридинового оранжевого. Причины и примеры изменения интенсивности и смещения спектра испускания при интеркаляции.
- e. Использование флуоресцентных меток, примеры широко используемых флуорохромов. Преимущества флуоресцентных меток. Метки с внутримолекулярным переносом энергии, их назначение и преимущества.
- f. Нанокристаллы полупроводников в качестве флуоресцентных меток.

3. Электрофорез.

А. Принципы метода.

- a. Движение заряженной частицы в растворе под действием эл. поля. Зависимость равновесной скорости частицы от параметров процесса и свойств частицы, длительность переходных (неравновесных) процессов. Параметр разделения. Подвижность, относительная подвижность.
- b. Принцип электронейтральности раствора.
- c. Изоэлектрофорез – принцип метода, равновесные концентрации зон (вывод соотношений), история разработки, сфера применения.
- d. Эндоэлектроосмос.

В. Буферы для электрофореза.

- a. Критерии выбора компонентов буфера:
 - характер и интенсивность процессов электролиза,
 - зависимость проводимости раствора от заряда и размера частиц;
 - зависимость буферной емкости от соотношения рН и рКа.
- b. Примеры наиболее часто используемых буферов, их характеристики, достоинства, недостатки. Образование полиборатов и аддуктов при использовании ТВЕ.

С. Электрофорез в гелях.

- a. Типы гелей. Их свойства.
 - Гели агарозы: химическая структура, размеры пор.
 - Гели полиакриламида: структура мономеров, реакция полимеризации, катализаторы, источники свободных радикалов, фотоактивируемая полимеризация, специальные поперечные сшивки для приготовления растворимых гелей. Зависимость размера пор от концентрации и соотношения мономеров. Преполимеризованные блоки мономеров для приготовления ПААГ. Ковалентное присоединение ПААГ к стеклу.
 - Использование комбинированных гелей и линейного ПАА. "Виртуальные" ПАА гели с нековалентными поперечными "сшивками", сферы их применения.
- b. Подвижность биополимеров в гелях.
 - Зависимость подвижности от размеров и конформации молекул. Диапазон эффективного использования гелей агарозы и ПАА различных концентраций. Аномальная подвижность различных форм ДНК кольцевых плазмид.

- Использование неоднородных гелей для выравнивания информационной нагрузки участков геля: гели, неоднородные по толщине, концентрации буфера, концентрации геля. Способы приготовления, преимущества.
 - непрерывная регистрация результатов электрофореза.
 - Электрофорез в переменном ("пульсирующем") поле (PFGE): аномальная подвижность больших молекул ДНК.
- c. Приборы для электрофореза. Технология нанесения образцов. Артефакты электрофореза.
- Приборы для горизонтального открытого и вертикального электрофореза. Рециркуляция буфера.
 - Артефакты нанесения образцов. Использование техники нанесения shark-teeth, ее преимущества.
 - Эффект улыбки: причины, способы устранения. Термостатируемые приборы для электрофореза.

D. Электрофорез нуклеиновых кислот.

- a. Электрофорез НК в неденатурирующих условиях. Зависимость подвижности оц- и дц- нуклеиновых кислот от длины, выбор адекватных условий э/ф (% и тип геля). Подвижность кольцевых молекул дц-ДНК, влияние на нее EtBr.
- b. Электрофорез в денатурирующих условиях. Денатурирующие агенты для денатурации ДНК и РНК. Разрешающая способность.
- c. Разделение цепей дц-ДНК электрофорезом: принцип и особенности электрофореза.
- d. Двумерный электрофорез нуклеиновых кислот.

E. Электрофорез белков.

- a. Электрофорез в неденатурирующих условиях. Параметр разделения
- b. Электрофорез в денатурирующих условиях.
 - Денатурация белка. Параметр разделения.
 - Принцип DISC-электрофореза (система буферов Орнштейна и Дэвиса, электрофорез SDS-денатурированных белков по Лэммли).
 - Использование градиента концентрации геля, равновесный электрофорез.
- c. Изоэлектрофокусирование.
 - Принцип метода, параметр разделения.
 - Амфолины. Формирование и стабильность градиента pH.
- d. Двумерный электрофорез белков.

F. Специальные варианты электрофореза.

- a. Электрофорез ДНК в пульсирующем поле (PFGE): преимущества, сфера применения.
- b. Детекция не полностью комплементарных ДНК-дуплексов (гетеродуплексов) электрофорезом в градиенте денатурирующего агента (DGGE).
- c. Афинный электрофорез на примере электрофореза т-РНК, содержащих атомы S.
- d. Электрофорез на целлюлозе с неподвижными границами (изотахофорез в равновесии с эндоэлектроосмосом) – варианты применения, основные преимущества (работы Абелева Г.И. с соавторами).
- e. Капиллярный электрофорез (в свободной среде) на примере устройства и принципа работы прибора "Капель" (Люмэкс). Структура двойного электрического слоя, величина и направление осмотического потока, его использование. Способы нанесения образцов. Разделение неполярных веществ мицеллярной электрокинетической хроматографией.
- f. Электрофорез в геле в капилляре на примере устройства и принципа работы "генного анализатора" ABI 310 (Applied Genomics). Принципы конструирования используемых для детекции флуорохромов, система детекции, автоматизация нанесения образцов и смены геля.

Аналитический электрофорез в микрокапиллярах на примере Shimadzu MCE-202 MultiNA и Agilent 2100 bioanalyzer.

G. Элюция биополимеров из геля.

- a. Пассивная элюция.
 - Элюция с использованием диффузии.
 - Способы частичного разрушения геля.
 - Солюбилизация гелей агарозы. Агароза с низкой температурой плавления. Использование хаотропных агентов. Способы удаления агарозы.
 - Солюбилизация ПААГ.
- b. Электроэлюция. Принцип, устройство аппарата ISCO.
- c. Перенос на мембраны. Перенос под действием потока жидкости (по Саузерну и с использованием вакуума) и электрического поля: эффективность, преимущества и недостатки.
- d. Непрерывная элюция (извлечение биополимеров в процессе электрофореза):
 - использование диализных мембран и скачка концентрации соли;
 - непрерывная элюция олигонуклеотидов после электрофореза в денатурирующем ПААГ потоком жидкости.

4. Центрифугирование.

A. Принципы метода.

- a. Диффузия - общие закономерности.
 - Зависимость диффузионного потока от концентрации при стационарной диффузии (I закон Фика). Коэффициент диффузии.
 - Нестационарная диффузия. Скорость изменения концентрации (II закон Фика). Решения для простых случаев.
 - Зависимость коэффициента диффузии от температуры и размера частиц. Коэффициенты диффузии некоторых молекул биополимеров.
- b. Седиментация - общие закономерности.
 - Равновесная скорость осаждения. Коэффициент седиментации.
 - Определение коэффициента седиментации из эксперимента. Стандартные условия.
 - Связь между коэффициентом седиментации и свойствами (размеры, плотность, масса) частицы. 1-е уравнение Сведберга.
 - Равновесная седиментация. Форма градиента концентрации.
 - Определение молекулярной массы по результатам равновесного центрифугирования (2-е уравнение Сведберга).

B. Общее устройство центрифуги.

- a. Типы центрифуг: аналитические, препаративные, настольные, ультрацентрифуги.
- b. Основные узлы: ротор, привод, холодильник, вакуумный насос. Их назначение.
- c. Основные характеристики роторов: максимальная скорость, минимальный и максимальный радиусы. Их значения для разных вариантов седиментации.
- d. Основные типы роторов: с горизонтальным ("откидные"), наклонным и вертикальным расположением пробирок. Их сравнительные преимущества и недостатки.
- e. Проточное центрифугирование.
- f. Использование центрифугирования в промышленности, промышленные центрифуги.

C. Варианты практического использования седиментации.

- a. Скоростная седиментация. Объемная и зональная скоростная седиментация. Зависимость скорости седиментации от расстояния до оси вращения,

- использование градиентов вязкости и плотности. Степень применимости различных типов роторов.
- b. Изопикническое центрифугирование. Вещества, используемые для формирования градиентов плотности и способы их формирования. Наиболее адекватные типы роторов.
 - c. Примеры использования центрифугирования: фракционирование клеточных органелл / субмолекулярных комплексов скоростным и зональным скоростным ц/ф; очистка суперскрученной кольцевой дцДНК изопикническим ц/ф в градиенте плотности.

5. Хроматография.

A. Принципы метода.

- a. Хроматографическая система. Основные понятия: сорбент, элюент, коэффициент распределения, коэффициент селективности.
- b. Свободный объем, объем удержания, исправленный объем удержания, коэффициенты массового распределения и емкости. Коэффициент разделения и степень разделения.
- c. Концепция теоретических тарелок. Идеализация хроматографической системы. Зависимость доли вещества в выбранной тарелке от времени (вывод). Форма и скорость миграции хроматографической зоны. Число теоретических тарелок, высота теоретической тарелки. Зависимость степени разделения от числа теоретических тарелок и коэффициента селективности. Экспериментальное определение ширины зоны и числа теоретических тарелок. Альтернативные концепции моделирования хроматографического процесса.

B. Классификация и примеры хроматографических методов.

- a. По агрегатному состоянию фаз:
 - Газо-жидкостная, жидкостно-газовая. Носитель стационарной фазы.
 - Жидкостно-жидкостная (распределительная), ЖЖХ с обращенными фазами (экстракционная), ковалентная иммобилизация стационарной фазы.
 - Жидкость-твердая фаза. Сорбенты. Пористые и поверхностные сорбенты. Размеры частиц твердых сорбентов, шкалы размеров. Влияние размеров частиц на емкость, гидравлическое сопротивление, радиус диффузии и макс. скорость хроматографии. Монолитные сорбенты.
- b. По геометрии пространства процесса:
 - Колоночная.
 - Плоскостная: бумажная, ТСХ на пластинках. Относительная подвижность. Двумерные варианты.
 - Капиллярная.
- c. По способу элюции (составу элюента). Форма и относительное положение зон, преимущества, недостатки, область применения.
 - Фронтальный.
 - Вытеснительный.
 - Проявительный. Элюенты постоянного и переменного (градиенты) состава.
- d. По направлению относительного перемещения фаз:
 - Прямоточная.
 - Противоточная. Выражение для скорости перемещения компонента. Непрерывное разделение 2-х компонентных смесей.
 - Двумерная. Непрерывное разделение многокомпонентных смесей: координаты точки выхода, пленочные и многоколоночные аппараты.
- e. По природе сорбции (физико-химическим свойствам сорбента):

- Адсорбционная. Параметры разделения. Используемые сорбенты и элюенты.
- Гель-фильтрация. Принцип и параметр разделения. Диапазон изменения объема удержания. Сорбенты для гель-фильтрации, их подготовка. Микроколоночный вариант гель-фильтрации с использованием микроцентрифуги: достоинства, недостатки, эффективность разделения.
- Ионообменная хроматография. Параметр разделения. Типы и химическая структура сорбентов. Использование комплексных ионообменников для удаления электролитов.
- Афинная хроматография. Параметры разделения. Наиболее распространенные сорбенты и способы иммобилизации лигандов.

6. Масс-спектрометрия как метод анализа молекул биополимеров.

- a. Общее устройство TOF спектрометра. Назначение основных узлов. Параметр разделения.
- b. Способы ионизации (хим. иониз., ESI, MALDI). Матрица для MALDI: принципы выбора и примеры химического состава. Устройство MALDI TOF спектрометра.
- c. Тандемная масс-спектрометрия. Основные узлы тандемного масс-спектрометра (квадруполь, ионная ловушка и др.), их назначение. Возможности и примеры применения комбинированных масс-спектрометров.
- d. Сферы применения масс-спектрометрии для анализа биополимеров (примеры).

7. Количественные аспекты ПЦР.

A. "Полуколичественная" ПЦР (детекция на неэкспоненциальном участке кривой накопления продукта).

- a. Принцип "полуколичественной" ПЦР. Конкурентный и неконкурентный варианты.
- b. Требования к стандарту. Разновидности стандартов (гомологичный, гетерологичный, эндогенный, экзогенный), способы их получения.

B. Real-Time PCR (детекция на экспоненциальном участке кривой накопления продукта).

- a. Общее устройство и принцип функционирования приборов для проведения Real-Time PCR на примере приборов производства Bio-Rad.
- b. Метки, используемые для Real-Time PCR, принципы детекции, преимущества, недостатки, основные сферы применения:
 - Неспецифические интеркаляторы на примере SYBR Green.
 - Технология TaqMan.
 - Molecular Beacons. Выбор структуры адреса и "шпильчатой" части, температура детекции.

C. Digital PCR в изолированных макроскопических объемах.

- a. Принцип подхода, основные преимущества.
- b. Примеры и возможные сферы применения.

D. Метод молекулярных колоний.

- a. Принцип подхода, основные преимущества.
- b. Примеры и возможные сферы применения.

E. Digital PCR в инвертированной эмульсии вода-масло на примере BioRad QX100.

- a. Принцип подхода, основные преимущества.
- b. Примеры и возможные сферы применения.

8. Системы массового параллельного секвенирования (MPSS).

A. Используемые в MPSS методы клональной амплификации и определения нукл. последовательностей амплификатов:

- a. ePCR;
- b. мол. колонии на тв. подложке;
- c. пиросеквенирование;
- d. микросеквенирование Illumina;
- e. тандемное лигирование;
- f. детекция изменения pH;

B. Внедренные в практику системы MPSS (принцип работы, основные характеристики, достоинства и недостатки):

- a. Life Science 454 (Roche Genome Sequencer FLX, Junior).
- b. HiSeq, MySeq (Illumina).
- c. SOLiD 4, SOLiD 5500 (Applied Biosystems).
- d. Ion Torrent PGM, Proton (Applied Biosystems).

C. Принципы функционирования перспективных разработок MPSS, основанных на определении нукл. последовательностей единичных молекул ДНК:

- a. Pacific BioScience.
- b. ABI single molecules sequencer.
- c. Oxford Nanopore.
- d. IBM "DNA transistor".