

Программа

спецкурса для биологов и химиков 4 курса ФЕН "Методы исследования биополимеров". Лектор – к.б.н. И.В. Морозов. (36 час.).

1. Организационно-методический раздел.

1.1. Название курса.

Методы исследования биополимеров.

Естественно-научная дисциплина, вузовская компонента.

1.2. Цели и задачи курса.

Дисциплина "Методы исследования биополимеров" предназначена для ознакомления студентов с теоретическими основами, а также примерами и особенностями практического применения современных методов исследования биополимеров.

Основной целью освоения дисциплины является освоение знаний и подходов, необходимых для самостоятельного планирования экспериментов по фракционированию биополимеров и определению их основных характеристик, а также для самостоятельной интерпретации результатов таких экспериментов. Для достижения поставленной цели выделяются задачи курса:

- изучение физико-химических закономерностей, лежащих в основе основных методов фракционирования и анализа биополимеров;
- изучение устройства и особенностей функционирования оборудования, используемого для этих целей;
- изучение реальных примеров экспериментов по фракционированию и анализу биополимеров.

1.3. Требования к уровню освоения содержания курса.

По окончании изучения указанной дисциплины

1.4. Формы контроля.

Итоговый контроль. Для контроля усвоения дисциплины учебным планом предусмотрен экзамен.

Текущий контроль. В течение семестра выполняется письменное решение задач по темам курса (всего 13 задач). Решение задач является обязательным для всех студентов. Результаты решения служат основанием для выставления оценок в ведомость контрольной недели на факультете, а также определяют индивидуальный объем письменного экзамена.

2. Содержание дисциплины.

2.1. Новизна курса (научная, содержательная; сравнительный анализ с подобными курсами в России и за рубежом) – для дисциплин специальной подготовки.

- Новизна настоящего курса состоит в том, что в нем представлены современные данные о физико-химических закономерностях, лежащих в основе основных методов фракционирования и анализа биополимеров; а также новые результаты о реальных примерах экспериментов по фракционированию и анализу биополимеров. Актуальность курса диктуется необходимостью освоения знаний и подходов, необходимых для самостоятельного планирования экспериментов.

2.2. Тематический план курса (распределение часов)

Наименование разделов и тем	Количество часов			
	лекции		Самостоятельная работа	Всего часов
Основные типы биополимеров. Их физико-химические свойства.	6		3	9
Методы детекции биополимеров.	12		6	18
Электрофорез. Центрифугирование. Хроматография. MALDI TOF Масс-спектрометрия. ПЦР.	18		9	27
Итого по курсу	36		18	54

2.3. Содержание отдельных разделов и тем.

Основные типы биополимеров. Их физико-химические свойства.

Нуклеиновые кислоты.

Одноцепочечные (ДНК и РНК).

Двухцепочечные (ДНК). Структурные характеристики В-ДНК.

Денатурация ДНК. Хаотропные агенты.

Белки.

Разнообразие структур белка. Заряд белка, изоэлектрическая точка.

Денатурация белков с использованием ДСН и 2-меркаптоэтанола.

Методы детекции биополимеров.

Использование радиоизотопов для детекции биополимеров.

Типы распада: (-распад и К-захват. Излучаемые частицы.

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.

Взаимодействие испускаемых частиц с веществом. Радиоллиз. Стабилизаторы.

Меры безопасности при работе с РА веществами.

Свойства наиболее часто применяемых изотопов, сфера их применения.

Детекция РА распада счетчиком Гейгера.

Устройство и принцип действия счетчика Гейгера.

Зависимость между интенсивностью потока частиц и эффективностью счета.

Недостатки счетчика Гейгера.

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.

Детекция РА распада по излучению Вавилова-Черенкова.

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 PhosphorImager

Использование радиоизотопов для исследования конформации биополимеров и их комплексов.

Поглощение света веществом (спектрофотометрия).

Коэффициент пропускания. Оптическая плотность. Приборы для ее определения.

Зависимость относит. погрешности определения от ее величины.

Спектр поглощения. Типичные спектры ДНК, РНК, белков.

Гипер- и гипохромный эффект на примере плавления ДНК-дуплексов.

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.

Использование флуоресцентных меток. Преимущества флуоресцентных меток.

Метки с внутримолекулярным переносом энергии, их назначение и преимущества.

Нанокристаллы полупроводников в качестве флуоресцентных меток.

Электрофорез.

Принципы метода.

Движение заряженной частицы в растворе под действием эл. поля. Зависимость равновесной скорости частицы от параметров процесса и свойств частицы.

Параметр разделения. Подвижность, относительная подвижность.

Принцип электронейтральности раствора.

Изоэлектрофорез – принцип метода, равновесные концентрации зон (вывод соотношений), история разработки, сфера применения.

Эндоэлектроосмос.

Буферы для электрофореза.

Критерии выбора компонентов буфера:

характер и интенсивность процессов электролиза,

зависимость проводимости раствора от заряда и размера частиц;

зависимость буферной емкости от соотношения pH и pK_a .

Примеры наиболее часто используемых буферов, их характеристики, достоинства, недостатки. Образование полиборатов и аддуктов при использовании ТВЕ.

Электрофорез в гелях.

Типы гелей. Их свойства.

Гели агарозы: химическая структура, размеры и однородность 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.
Подвижность биополимеров в гелях.
Зависимость подвижности от размеров молекул. Диапазон эффективного использования гелей агарозы и ПАА различных концентраций.
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.
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.
Электрофорез нуклеиновых кислот.
Электрофорез НК в неденатурирующих условиях. Зависимость подвижности оц- и дц- нуклеиновых кислот от длины. Подвижность кольцевых молекул дц-ДНК, влияние на нее EtBr.
Электрофорез в денатурирующих условиях. Денатурирующие агенты для денатурации ДНК и РНК. Разрешающая способность.
Разделение цепей дц-ДНК электрофорезом: принцип и особенности электрофореза.
Двумерный электрофорез нуклеиновых кислот.
Электрофорез белков.
Электрофорез в неденатурирующих условиях. Параметр разделения
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.
Изоэлектрофокусирование.
Принцип метода, параметр разделения.
Амфолины. Формирование и стабильность градиента pH.
Двумерный электрофорез белков.
Специальные варианты электрофореза.
Электрофорез ДНК в пульсирующем поле (PFGE): преимущества, сфера применения.
Детекция не полностью комплементарных ДНК-дуплексов (гетеродуплексов) электрофорезом в градиенте денатурирующего агента (DGGE).

Афинный электрофорез на примере электрофореза т-РНК, содержащих атомы S.
Электрофорез на целлюлозе с неподвижными границами (изотахофорез в равновесии с эндоэлектроосмосом) – варианты применения, основные преимущества (работы Абелева Г.И. с соавторами).

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.

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.

Элюция биополимеров из геля.

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.

Электроэлюция. Принцип, устройство аппарата ISCO.

Перенос на мембраны. Перенос под действием потока жидкости (по Саузерну и с использованием вакуума) и электрического поля: эффективность, преимущества и недостатки.

Непрерывная элюция (извлечение биополимеров в процессе электрофореза):

использование диализных мембран и скачка концентрации соли;

непрерывная элюция олигонуклеотидов после электрофореза в денатурирующем ПААГ потоком жидкости.

Центрифугирование.

Принципы метода.

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, полуширина зоны.

Зависимость коэффициента диффузии от температуры и размера частиц.

Коэффициенты диффузии некоторых молекул биополимеров.

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).

Общее устройство центрифуги.

Типы центрифуг: аналитические, препаративные, настольные, ультрацентрифуги.

Основные узлы: ротор, привод, холодильник, вакуумный насос. Их назначение.

Основные характеристики роторов: максимальная скорость, минимальный и максимальный радиусы. Их значения для разных вариантов седиментации.

Основные типы роторов: с горизонтальным ("откидные"), наклонным и вертикальным расположением пробирок. Их сравнительные преимущества и недостатки.

Проточное центрифугирование.

Варианты практического использования седиментации.

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.

Изопикническое центрифугирование. Вещества, используемые для формирования градиентов плотности и способы их формирования. Наиболее адекватные типы роторов.

Примеры использования центрифугирования: фракционирование клеточных органелл / субмолекулярных комплексов скоростным и зональным скоростным ц/ф; очистка суперскрученной кольцевой дцДНК изопикническим ц/ф в градиенте плотности.

Хроматография.

Принципы метода.

Хроматографическая система. Основные понятия: сорбент, элюент, коэффициент распределения, коэффициент селективности.

Свободный объем, объем удержания, исправленный объем удержания, коэффициенты распределения и емкости. Коэффициент разделения и степень разделения.

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.

Классификация и примеры хроматографических методов.

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 и радиус диффузии (макс. скорость хроматографии). Монолитные сорбенты.

По геометрии пространства процесса:

Колоночная.

Плоскостная: бумажная, ТСХ на пластинках. Относительная подвижность.

Двумерные варианты.

Капиллярная.

По способу элюции (составу элюента). Форма и относительное положение зон, преимущества, недостатки, область применения.

Фронтальный.

Вытеснительный.

Проявительный. Элюенты постоянного и переменного (градиенты) состава.

По направлению относительного перемещения фаз:

Прямоточная.

Противоточная. Выражение для скорости перемещения зоны. Непрерывное разделение 2-х компонентных смесей.

Двумерная. Непрерывное разделение многокомпонентных смесей: координаты точки выхода, пленочные и многоколоночные аппараты.

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.

MALDI TOF Масс-спектрометрия.

Общее устройство MALDI TOF спектрометра. Назначение основных узлов.

Параметр разделения.

Матрица: принципы выбора и примеры химического состава.

Возможности метода, сферы применения, примеры использования для анализа биополимеров.

Количественные аспекты ПЦР.

"Полуколичественная" ПЦР (детекция на стадии выхода на "плато").

Принцип "полуколичественной" ПЦР. Конкурентный и неконкурентный варианты.

Требования ко внутреннему стандарту. Типы внутренних стандартов, способы их получения.

Real-Time PCR (детекция до начала выхода на "плато") .

Общее устройство и принцип функционирования приборов для проведения Real-Time PCR.

Метки, используемые для Real-Time PCR, принципы детекции, преимущества, недостатки, основные сферы применения:

Неспецифические интеркаляторы на примере SYBR Green.

Технология TaqMan.

Molecular Beacons. Проблема выбора структуры адреса и "шпилечной" части, температура детекции.

Digital PCR.

Принцип подхода, основные преимущества.

Примеры и возможные сферы применения.

Метод молекулярных колоний.
Принцип подхода, основные преимущества.
Примеры и возможные сферы применения.

2.4. Перечень примерных контрольных вопросов и заданий для самостоятельной работы.

Перечень вопросов и заданий для самостоятельной работы соответствуют разделам и темам п. 2.2. и заключаются в решении домашних заданий (задач).

3. Учебно-методическое обеспечение дисциплины.

3.2. Темы рефератов (курсовых работ).

Не предусмотрены.

3.3. Образцы вопросов для подготовки к экзамену.

Типы РА распада. Интенсивность распада, энергия испускаемых частиц. Радиолиз.

Свойства наиболее распространенных изотопов. (Пункты 2.A.a-d программы).

Детекция РА распада счетчиком Гейгера и по излучению Черенкова-Вавилова.

Преимущества, ограничения, сфера применения (Пункты 2.A.e и g программы).

Детекция РА распада с использованием сцинтилляторов.

Преимущества, ограничения, сфера применения (Пункт 2.A.f программы).

Детекция РА распада с использованием автордиографии.

Преимущества, ограничения, сфера применения (Пункт 2.A.h программы).

Поглощение света веществом (спектрофотометрия) (Пункты 2.B.a-c программы).

Общие принципы электрофореза в свободной среде (Пункты 3.A.a-d программы).

Электрофорез в гелях (Пункты 3.C.a-c программы).

Электрофорез белков (Пункты 3.E.a-d программы).

Седиментация – принципы метода (Пункты 4.A.a-b программы).

Варианты практического использования седиментации (Пункты 4.C.a-c программы).

Хроматография - принципы метода (Пункты 5.A.a-c программы).

Классификация хроматографических методов по агрегатному состоянию фаз и природе сорбции (Пункты 5.B.a,e программы).

Классификация хроматографических методов по геометрии пространства процесса, способу элюции, направлению перемещения фаз (Пункты 5.B.b,c,d программы).

MALDI TOF Масс-спектрометрия (Пункты 6.a-c программы). Типы РА распада.

Интенсивность распада, энергия испускаемых частиц. Радиолиз.

Свойства наиболее распространенных изотопов. (Пункты 2.A.a-d программы).

Детекция РА распада счетчиком Гейгера и по излучению Черенкова-Вавилова.

Преимущества, ограничения, сфера применения (Пункты 2.A.e и g программы).

Детекция РА распада с использованием сцинтилляторов.

Преимущества, ограничения, сфера применения (Пункт 2.A.f программы).

Детекция РА распада с использованием автордиографии.

Преимущества, ограничения, сфера применения (Пункт 2.A.h программы).

Поглощение света веществом (спектрофотометрия) (Пункты 2.B.a-c программы).

Общие принципы электрофореза в свободной среде (Пункты 3.A.a-d программы).

Электрофорез в гелях (Пункты 3.C.a-c программы).

Электрофорез белков (Пункты 3.E.a-d программы).

Седиментация – принципы метода (Пункты 4.A.a-b программы).

Варианты практического использования седиментации (Пункты 4.С.а-с программы).

Хроматография - принципы метода (Пункты 5.А.а-с программы).

Классификация хроматографических методов по агрегатному состоянию фаз и природе сорбции (Пункты 5.В.а,е программы).

Классификация хроматографических методов по геометрии пространства процесса, способу элюции, направлению перемещения фаз (Пункты 5.В.б,с,д программы).

MALDI TOF Масс-спектрометрия (Пункты 6.а-с программы). Типы РА распада.

Интенсивность распада, энергия испускаемых частиц. Радиолиз.

Свойства наиболее распространенных изотопов. (Пункты 2.А.а-д программы).

Детекция РА распада счетчиком Гейгера и по излучению Черенкова-Вавилова.

Преимущества, ограничения, сфера применения (Пункты 2.А.е и g программы).

Детекция РА распада с использованием сцинтилляторов.

Преимущества, ограничения, сфера применения (Пункт 2.А.ф программы).

Детекция РА распада с использованием автордиографии.

Преимущества, ограничения, сфера применения (Пункт 2.А.х программы).

Поглощение света веществом (спектрофотометрия) (Пункты 2.В.а-с программы).

Общие принципы электрофореза в свободной среде (Пункты 3.А.а-д программы).

Электрофорез в гелях (Пункты 3.С.а-с программы).

Электрофорез белков (Пункты 3.Е.а-д программы).

Седиментация – принципы метода (Пункты 4.А.а-б программы).

Варианты практического использования седиментации (Пункты 4.С.а-с программы).

Хроматография - принципы метода (Пункты 5.А.а-с программы).

Классификация хроматографических методов по агрегатному состоянию фаз и природе сорбции (Пункты 5.В.а,е программы).

Классификация хроматографических методов по геометрии пространства процесса, способу элюции, направлению перемещения фаз (Пункты 5.В.б,с,д программы).

MALDI TOF Масс-спектрометрия (Пункты 6.а-с программы).

Использование радиоизотопов для исследования конформации биополимеров и их комплексов (Пункт 2.А.и программы).

Использование красителей для детекции биополимеров (Пункт 2.В.д программы).

Использование флуоресцентных меток (Пункты 2.В.е-ф программы).

Буферы для электрофореза (Пункты 3.В.а-б программы).

Электрофорез нуклеиновых кислот (Пункты 3.Д.а-д программы).

Детекция не полностью комплементарных ДНК-дуплексов (гетеродуплексов) электрофорезом в градиенте денатурирующего агента (Пункт 3.Ф.б программы).

Афинный электрофорез на примере электрофореза т-РНК, содержащих атомы S (Пункт 3.Ф.с программы).

Электрофорез на целлюлозе с неподвижными границами (изотахофорез в равновесии с эндоэлектроосмосом) (Пункт 3.Ф.д программы).

Капиллярный электрофорез (в свободной среде) на примере устройства и принципа работы прибора "Капель" (Люмэкс) (Пункт 3.Ф.е программы).

Электрофорез в геле в капилляре на примере устройства и принципа работы "генного анализатора" ABI 310 (Applied Genomics) (Пункт 3.Ф.ф программы).

Элюция биополимеров из геля (Пункты 3.Г.а-д программы).

Общее устройство центрифуги (Пункты 4.B.a-e программы).

"Полуколичественная" и Real-Time ПЦР как метод определения количества матрицы. (Пункты 7.A.a-b, 7.B.a программы).

Метки, используемые для Real-Time PCR, принципы детекции, преимущества, недостатки, основные сферы применения (Пункт 7.B.b программы).

Альтернативные подходы к точному определению количеств матрицы ПЦР: Digital PCR и метод молекулярных колоний (Пункты 7.C.a-b и 7.D.a-b программы).

За счет чего при детекции радиоактивности с использованием сцинтилляторов возможно определение не только интенсивности потока, но и энергии частиц?

Возможно ли определение энергии частиц при счете по Черенкову и при использовании счетчиков Гейгера и почему?

Связаны ли и как именно между собой УАтеор., УАпрат., период полураспада и Макс. энергия частиц при радиоактивном распаде. Выведите соответствующие зависимости.

Для чего используются вторичные сцинтилляторы? Какая часть энергии возникающих при распаде частиц превращается в кванты, испускаемые первичным сцинтиллятором при использовании вторичного и почему?

Причины деградации веществ, содержащих радиоактивные атомы. Как можно уменьшить ее скорость и до какого предела?

От чего (объем пробы, количество вещества в ней; время, ток/напряжение и температура электрофореза; концентрация компонентов системы (каких именно)) и как зависит минимально возможная ширина зоны при Disc-электрофорезе и изoeлектрическом фокусировании.

Почему по значениям равновесной концентрации при равновесном центрифугировании можно определить молекулярную массу, а по скорости седиментации – нет? Какие дополнительные данные необходимы в последнем случае и почему?

Оценить минимальное и максимальное количество препарата, содержащего ^{32}P (в Ci и моль изотопа), которое можно достоверно (с погрешностью менее 20%) измерить газоразрядным счетчиком, уровень фона которого составляет 10 имп/сек, а порог насыщения – 5000 имп/сек. $1 \text{ Ci} = 3.7 \times 10^{10} \text{ Bq(DPS)}$, удельная активность $^{32}\text{P} = 9200 \text{ Ci/mmol}$. Эффективность счёта считать 100% ($\text{CPS} = \text{DPS}$).

Теоретическая УА радиоизотопа составляет 3000 Ci/mmol . Каков период полураспада этого изотопа? Число Авогадро считать равным 6×10^{23} .

Период полураспада радиоизотопа составляет 1 год. Какова теоретическая УА этого изотопа? Число Авогадро считать равным 6×10^{23} .

Оценить минимальную ширину зоны 1 мкг белка молекулярной массы 50 кД при Disc-электрофорезе в присутствии SDS (M.W. аниона = 199). Ширина зоны (дорожки) – 5 мм, толщина геля – 1 мм. Концентрация Cl^- в разделяющем геле 100 mM. Считать, что одна молекула SDS приходится на каждые 250 Д белка, подвижность Cl^- в условиях электрофореза $-35 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/(\text{вольт} \cdot \text{сек})$, подвижность катиона (TrisH^+) - 15×10^{-5} , подвижность комплекса белка 50 кД с SDS при заряде -1 составляла бы 0.005×10^{-5} .

Суммарное максимальное количество дц.ДНК, которое можно нанести на агарозный гель без ухудшения качества результатов электрофореза, составляет 0.5 мкг. Фрагмент какой минимальной длины в смеси, содержащей эквимольные

количества фрагментов дцДНК длиной от 100 до 5000 н.п., различающиеся по длине на 100 п.н. (т.е. 100, 200, 300 4900, 5000), можно детектировать после электрофореза прокрашиванием EtBr, если порог чувствительности 10 нг в полосе ?
Определить максимальную длину зоны нанесения смеси частиц с константами седиментации 100S и 200S, обеспечивающую разделение смеси (отсутствие 100S частиц в осадке) при полном осаждении 200S частиц в процессе зонального скоростного центрифугирования в роторе Beckman SW 60 Ti (Swing bucket, $r_{\min} \cong 60 \text{ mm}$, $r_{\max} \cong 120 \text{ mm}$) при 40000 об/мин.

3.4 Список основной и дополнительной литературы.

- Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие). М.: Наука, 1981. 288 с.
- Остерман Л.А. Исследование биологических макромолекул электрофокусированием, иммуноэлектрофорезом и радиоизотопными методами. М.: Наука, 1983. 304 с.
- Остерман Л.А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот. М.: Наука, 1985. 536 с.
- Сакодынский К.И., Бражников В.В., Волков С.А., Зельвенский В.Ю. Приборы для хроматографии. М.: Машиностроение, 1987. 264 с.
- Бидлингмейер Б. и др. Препаративная жидкостная хроматография. М.: Мир, 1990. 360 с.
- Сакодынский К.И., Бражников В.В., Волков С.А., Зельвенский В.Ю. Приборы для хроматографии. М.: Машиностроение, 1987. 264 с.
- Москвин Л.Н., Царицына Л.Г. Методы разделения и концентрирования в аналитической химии. Л.: Химия, 1991. 256 с.
- Галь Э., Медьеша Г., Верецки Л. Электрофорез в разделении биологических макромолекул. М.: Мир, 1982. 448 с.
- Simpson C.F., Whittaker M. Electrophoretic techniques. Academic Press, 1983. 280 p.
- Справочники:
- Р.Досон, Д.Эллиот, У.Эллиот, К.Джонс. Справочник Биохимика. Москва, "Мир", 1991г. (R.M.C.Dawson, D.C.Elliot, W.H.Elliot, K.M.Jones. Data for Biochemical Research. 3rd edition. Clarendon Press, Oxford, 1986) [константы и спектры нуклеотидов, подвижности ионов!]
- Оригинальные статьи:
- V.N.Karamychev et al. Detecting the DNA kinks in a DNA-CRP complex in solution with iodine-125 radioprobe. Nature structural biol., 1999, V.6, pp.747-750.
- B.Vogelstein, K.V.Kinzler. Digital PCR. PNAS, 1999, V.96, pp.9236-9241.
- H.V.Chetverina, T.R.Samatov, V.I.Ugarov, A.B.Chetverin. Molecular Colony Diagnostics: Detection and Quantitation of Viral Nucleic Acids by In-Gel PCR. BioTechniques, 2002, V.33, pp.150-156.