

# Современные физико-химические методы исследования белков

Лектор: проф., д.б.н., В.И. Муронец, к.б.н. П.И. Семенюк

## Программа курса

Курс посвящен знакомству с комплексом современных физико-химических методов исследования белков и других биологических макромолекул. Будут рассмотрены основные принципы методов, особенности применения и круг основных решаемых ими задач. Особое внимание будет уделено изучению структуры белка и взаимодействий белков как с низкомолекулярными, так и с полимерными лигандами. Акцент будет сделан на комплексном использовании нескольких физико-химических методов для решения реальной исследовательской задачи.

1. Методы определения размера частиц в растворе: аналитическое ультрацентрифугирование, динамическое светорассеяние и анализ траекторий наночастиц.
2. Спектроскопические методы: ИК- и Рамановская спектроскопия, спектроскопия кругового дихроизма в ближнем и дальнем ультрафиолете
3. Калориметрические методы в биологии: дифференциальная сканирующая калориметрия, изотермическая титрационная калориметрия.
4. Масс-спектрометрия.
5. Малоугловое рентгеновское рассеяние.
6. Методы получения структуры белков высокого разрешения: спектроскопия ядерно-магнитного резонанса и рентгеноструктурный анализ.
7. Микрочипы. Поверхностный плазмонный резонанс.
8. Введение в биоинформатику.

1. Методы определения размера частиц в растворе. Аналитическое ультрацентрифугирование. Равновесный и неравновесный седиментационный анализ, методы приближения к равновесию. Коэффициент Сведберга. Способы определения молекулярной массы. Динамическое светорассеяние частиц. Гидродинамический диаметр. Методы анализа автокорреляционной функции рассеяния, определение Z-среднего диаметра и распределения частиц по размерам. Электрофоретическая подвижность и определение дзета-потенциала. Анализ траекторий наночастиц. Основные принципы. Исследование траекторий отдельных молекул. Сравнение трех методов определения размера частиц, их преимущества и недостатки.

2. Спектроскопические методы. ИК- и Рамановская спектроскопия. Основные принципы, применение к изучению структуры белков. Характеристические участки спектра. Исследование вторичной структуры. Спектроскопия кругового дихроизма в

ближнем и дальнем ультрафиолете и вибрационного кругового дихроизма. Природа явления, применение для исследования вторичной и третичной структуры белка.

3. Калориметрические методы в биологии. Дифференциальная сканирующая калориметрия. Исследование кооперативных температурно-зависимых переходов в белках. Обратимая и необратимая денатурация. Термодинамика плавления белка. Применения для изучения стабильности белков и структурных перестроек, происходящих в результате связывания лиганда или кофактора. Сканирующая калориметрия при исследовании влияния точечных мутаций. Исследование денатурации многодоменных белков. Метод последовательного отжига. Изотермическая титрационная калориметрия. Термодинамическая характеристика взаимодействия – определение константы связывания и стехиометрии, энтальпии и энтропии взаимодействия. Применение калориметрии для изучения кинетики ферментативных реакций.

4. Масс-спектрометрия. Принцип метода. Основные способы ионизации биологических молекул. Типы масс-анализаторов. Тандемная масс-спектрометрия. Масс-спектрометрия в протеомике и изучение посттрансляционных модификаций белков. Количественный масс-спектрометрический анализ.

5. Малоугловое рентгеновское рассеяние. Основные принципы. Определение размера и формы частиц в растворе. Методы восстановления структуры низкого разрешения. Использование априорной информации – восстановление недостающих петель, метод жестких тел.

6. Методы получения структуры белков высокого разрешения. Спектроскопия ядерно-магнитного резонанса (ЯМР). Суть явления, спин-спиновые взаимодействия в спектрах ЯМР протона. Гомоядерный и гетероядерный двумерный ЯМР. Определение структуры белков с помощью многомерной спектроскопии ЯМР. Магнитно-резонансная томография. Рентгеноструктурный анализ. Кристаллографическая и некристаллографическая симметрия. Дифракция на кристалле. Решение обратной задачи рассеяния. Способы решения фазовой проблемы. Разрешение структуры. R-фактор и R-free.

7. Микрочипы. Микрочипы в геномных исследованиях. Поверхностный плазмонный резонанс. Основные принципы, способы иммобилизации лиганда. Различные варианты технологии. Определение константы связывания и констант скорости ассоциации/диссоциации.

8. Введение в биоинформатику. Биологический смысл и основные принципы построения выравниваний. Гомологи – ортологи и паралоги – и способы их поиска. Филогенетические деревья. Гомологичное моделирование. Докинг и симуляция молекулярной динамики. Использование биоинформационных подходов для экспериментального исследования белков и дизайна лекарств.

9. Подведение итогов – примеры комплексного применения рассмотренных методов для решения реальных исследовательских задач.