

УТВЕРЖДАЮ  
Директор Межфакультетского научно-  
образовательного центра МГУ в г. Пущино

академик \_\_\_\_\_ А.И. Мирошников

" 20 " декабря 2016 г.

**ПРОГРАММА**  
повышения квалификации  
**«Освоение современных методов исследования**  
**биологических объектов»**

город Пущино  
2016

## 1. Цель реализации программы

**Целью Программы** является освоение слушателем современных молекулярно-биологических, физико-химических, спектральных и физиолого-микробиологических методов исследования биологических объектов.

**Задачей Программы** является повышение квалификации преподавателей биологии средних общеобразовательных и средних профессиональных учебных заведений, студентов естественно-научных факультетов вузов и средних профессиональных учебных заведений, а также любых слушателей, имеющих соответствующую квалификацию и интересующихся современными методами исследования.

В ходе освоения программы и в соответствии с Учебным планом слушатель должен ознакомиться с теоретическими основами и приобрести навыки лабораторных работ в сфере современных методов, используемых в биохимии, молекулярной биологии, физической химии, спектроскопии, физиологии и микробиологии.

Программа состоит из четырех самостоятельных Модулей, каждый из которых включает пять Тем (задач), выбранных из предложенного более широкого перечня в Учебном плане и предлагаемых для освоения как суммарно, так и выборочно, по одному или более Модулю, совпадающих по времени проведения с периодом осенних, зимних, весенних и летних школьных каникул.

### *Модуль 1*

*Молекулярно-биологические методы изучения биологических макромолекул (пять задач по выбору из предложенного в Учебном плане списка тем)*

При освоении данного Модуля слушатель должен:

Получить следующие знания:

- Теоретические основы биохимии и молекулярной биологии;
- Представление о ДНК и способах ее получения из клетки;
- Знать современные способы изучения свойств хромосомной ДНК, ДНК плазмид и вирусов.

Приобрести умения:

- Выделять плазмидную ДНК из бактериальных клеток;
- Осуществлять полимеразную цепную реакцию;
- Уметь проводить рестрикционный анализ;
- Проводить электрофорез ДНК в агарозном геле;
- Осуществлять трансформацию бактериальных клеток;
- Выделять белок GFP и его аналогов из бактериальных клеток.

Получить навыки:

- Общей техники лабораторных работ с ДНК;
- Постановки разных экспериментов, связанных с ДНК;
- Подготовки и проведения электрофореза ДНК в разных условиях;
- Проведения расчётов, построения таблиц, графиков;
- Осмысления результатов лабораторного исследования ДНК;
- Оформления протокола исследования;
- Представления результатов и выводов.

## Модуль 2

*Физико-химические методы изучения биологических макромолекул*  
(пять задач по выбору из предложенного в Учебном плане списка тем)

При освоении данного Модуля слушатель должен:

Получить следующие знания:

- Теоретические основы физико-химической биологии;
- Представление о белках и других биологических полимерах и мономерах;
- О современных методах исследования биологических материалов на примере белков и аминокислот.

Приобрести умения:

- Проводить электрофоретическое исследование белков;
- Осуществлять ионообменную и тонкослойную хроматографию;
- Постановки опытов по ультрафильтрации, лиофилизации и кристаллизации белков;
- Определения активности, концентрации белков и идентификации аминокислот;
- Определение кинетики ферментативной активности.

Получить навыки:

- Общей техники лабораторных работ с белками и аминокислотами;
- Постановки эксперимента, связанного с белками и аминокислотами;
- Проведения расчётов, построения таблиц, графиков;
- Осмысление результатов лабораторного исследования с белками и аминокислотами;
- Оформления протокола исследования;
- Представление результатов и выводов.

## Модуль 3

*Спектральные методы исследования биологических объектов*  
(пять задач по выбору из предложенного в Учебном плане списка тем)

При освоении данного Модуля слушатель должен:

Получить следующие знания:

- Теоретические основы биологической спектроскопии;
- Представление о спектроскопических способах изучения белков, нуклеиновых кислот и других биологических объектов;
- Современные способы изучения биологических объектов с помощью абсорбционной и люминесцентной спектроскопии, ЯМР и ИКС с Фурье-преобразованием.

Приобрести умения:

- Качественного и количественного спектрального анализа биологических объектов;
- Исследования спектров поглощения веществ в ультрафиолетовой, видимой и инфракрасной областях;
- Исследования спектров люминесценции и возбуждения люминесценции биологических веществ;

- ЯМР-спектроскопии.

Получить навыки:

- Общей техники спектральных исследований аминокислот, белков, нуклеиновых кислот, хлорофиллов, антоцианов, хлоропластов, а также небольших молекул;
- Постановки эксперимента, связанного со спектроскопией веществ;
- Осмысления результатов лабораторного спектрального исследования;
- Проведения расчётов, построения таблиц, графиков;
- Оформления протокола исследования;
- Представления результатов и выводов.

#### Модуль 4

##### *Физиолого-микробиологические методы исследования*

(пять задач по выбору из предложенного в Учебном плане списка тем)

При освоении данного Модуля слушатель должен:

Получить следующие знания:

- Теоретические основы физиологических, электрофизиологических и микробиологических методов исследования;
- Представление о способах изучения стресса у растений;
- Современные способы изучения свойств клеточных мембран, введения генетического материала в ядра клеток;
- Микробиологические способы изучения численности бактерий и влияния на них различных фитонцидов.

Приобрести умения:

- Поводить электрофизиологическое исследование мембран клеток – потенциал в клетке;
- Подготовки и проведения микроинъекции генетического материала в клетку;
- Постановки опытов по исследованию окислительного стресса биологических систем на примере растений;
- Проводить исследование численности молочнокислых бактерий в пищевых продуктах;
- Определять влияние фитонцидов чеснока, лука, ели на рост микроорганизмов *P. putida*.

Получить навыки:

- Общей техники микробиологических работ;
- Общей техники физиологических и электрофизиологических работ;
- Изготовления микроэлектродов и использование их в экспериментах на одиночной клетке;
- Постановки микробиологического эксперимента. Посев микроорганизмов, способы оценки их численности;
- Способов выявления влияния фитонцидов на микроорганизмы;
- Постановки физиологического и электрофизиологического эксперимента;
- Осмысления результатов лабораторного микробиологического исследования;

- Осмысления результатов лабораторного физиологического и электрофизиологического исследования;
- Проведения расчётов, построения таблиц, графиков;
- Оформления протокола исследования;
- Представления результатов и выводов.

## **2. Формализованные результаты обучения**

В ходе освоения Программы, или любого из Модулей, её составляющих, слушатель получит теоретическую подготовку и навыки практического выполнения современных методов исследования, специфических для каждого Модуля.

Компетенции, полученные при освоении программы, позволят школьному учителю биологии или преподавателю среднего профессионального заведения более эффективно и успешно готовить одарённых учащихся к практическим турам Олимпиад разного уровня (в том числе и Международных), что приведет к успеху его учеников и даст им возможность поступить в вуз без экзаменов, как победителю Олимпиад высокого уровня. Для самого же учителя кроме повышения его профессиональной квалификации, освоение Программы (или любого из её Модулей) поможет быть более конкурентоспособным при выборе места работы. Коды профессиональных стандартов 01.001 и 01.004.

Студентам полученные в результате обучения по программе компетенции помогут в сравнительно короткое время освоить ряд современных молекулярно-биологических, физико-химических, спектральных и физиолого-микробиологических методов и с их помощью успешнее, и в более сжатые сроки выполнить свою квалификационную работу. А это, в свою очередь позволит ускорить научный и карьерный рост. Удостоверение о повышении квалификации установленного образца выдается после предоставления документа о квалификации (диплома о высшем или среднем профессиональном образовании). Коды направления подготовки 06.03.01. и 06.04.01.

## **3. Содержание программы**

Общая трудоемкость - 144 часов, Программа состоит из четырех Модулей по 36 час. каждый, включающий пять Тем (задач) из предложенного в Учебном плане перечня (методов исследования).

Каждый Модуль Программы включает 10 часов тематических лекций по методам; 24 часов лабораторных работ; 2 часа на сдачу всех пяти выполненных работ в виде зачета.

**Учебный план**  
 программы повышения квалификации  
**«Освоение современных методов исследования  
 биологических объектов»**

Категория слушателей (требования к слушателям) – преподаватели биологии средних общеобразовательных и средних профессиональных учебных заведений, студенты естественно-научных факультетов вузов и средних профессиональных учебных заведений, а также любые слушатели, имеющие соответствующую квалификацию и интересующиеся современными методами исследования.

Срок обучения – 144 час (четыре недели). Или 36 час при освоении одного из четырёх Модулей Программы (одна неделя).

Форма обучения – очная (с отрывом от работы)

№ п/п	Наименование разделов	Всего, час.	В том числе	
			лекции	практич. и лаборат. занятия
1	Модуль 1 Молекулярно-биологические методы изучения биологических макромолекул	36	10	26
2	Модуль 2 Физико-химические методы изучения биологических макромолекул	36	10	26
3	Модуль 3 Спектральные методы исследования биологических объектов	36	10	26
4	Модуль 4 Физиолого-микробиологические методы исследования	36	10	26
	Итого:	144	40	104
Итоговая аттестация			зачет	

Учебно-тематический план  
программы повышения квалификации  
«Освоение современных методов исследования  
биологических объектов»

№ п/п	Наименование разделов и тем	Всего, час.	В том числе	
			лекции	практич. и лаборат. занятия
1	2	3	4	5
<b>1</b>	<b>Модуль 1</b> <b>Молекулярно-биологические методы изучения биологических макромолекул</b> (пять задач по выбору из предложенного списка тем)	<b>36</b>	<b>10</b>	<b>26</b>
1.1	Выделение плазмидной ДНК из бактериальных клеток	7,2	2	5,2
1.2	Цепная полимеразная реакция (ПЦР)	7,2	2	5,2
1.3	Рестрикционный анализ	7,2	2	5,2
1.4	Электрофорез нуклеиновых кислот в агарозном геле	7,2	2	5,2
1.5	Трансформация бактериальных клеток	7,2	2	5,2
1.6	Выделение GFP и его аналогов из бактериальных клеток.	7,2	2	5,2
<b>2</b>	<b>Модуль 2</b> <b>Физико-химические методы изучения биологических макромолекул</b> (пять задач по выбору из предложенного списка тем)	<b>36</b>	<b>10</b>	<b>26</b>
2.1	Электрофоретическое исследование белков (Электрофорез белков)	7,2	2	5,2
2.2	Ионообменная хроматография	7,2	2	5,2
2.3	Хроматография в тонком слое. Тонкослойная хроматография (ТСХ)	7,2	2	5,2
2.4	Методы фильтрования. Определение белка	7,2	2	5,2
2.5	Лиофилизация биологических материалов	7,2	2	5,2
2.6	Кристаллизация биологических материалов	7,2	2	5,2
2.7	Полярография. Определение скорости обмена кислорода при дыхании и фотосинтезе	7,2	2	5,2
2.8	Методы разделения и идентификации аминокислот. Химический метод определения пролина.	7,2	2	5,2
2.9	Кинетика ферментативной реакции на примере каталазы	7,2	2	5,2
<b>3</b>	<b>Модуль 3</b> <b>Спектральные методы исследования биологических объектов</b> (пять задач по выбору из предложенного списка тем)	<b>36</b>	<b>10</b>	<b>26</b>

3.1	Фотоколориметрия. Количественный анализ биологических объектов	7,2	2	5,2
3.2	Абсорбционная спектрофотометрия	7,2	2	5,2
3.3	Исследование спектров поглощения биологических объектов в ультрафиолетовой области	7,2	2	5,2
3.4	Люминесцентная спектроскопия. Исследование флуоресценции биологических объектов (Спектры флуоресценции)	7,2	2	5,2
3.5	Спектры поглощения белков и нуклеиновых кислот	7,2	2	5,2
3.6	Исследование свойств биологических объектов методом инфракрасной спектроскопии высокого разрешения с Фурье-преобразованием	7,2	2	5,2
3.7	Ядерный магнитный резонанс (ЯМР) высокого разрешения	7,2	2	5,2
<b>4</b>	<b>Модуль 4</b> <b>Физиолого-микробиологические методы исследования</b> (пять задач по выбору из предложенного списка тем)	<b>36</b>	<b>10</b>	<b>26</b>
4.1	Микроэлектродные исследования электрических процессов в клетке (Потенциал в клетке)	7,2	2	5,2
4.2	Микроинъекция (Микрохирургия)	7,2	2	5,2
4.3	Исследование окислительного стресса биологических систем на примере растений	7,2	2	5,2
4.4	Исследование численности молочнокислых бактерий в пищевых продуктах	7,2	2	5,2
4.5	Влияние фитонцидов чеснока, лука, ели на рост микроорганизмов <i>P. putida</i> .	7,2	2	5,2

Учебная программа  
повышения квалификации  
«Освоение современных методов исследования  
биологических объектов»»

### Раздел 1. Модуль 1

#### Молекулярно-биологические методы изучения биологических макромолекул (36 час)

(Модуль состоит из пяти Тем (задач) по выбору из предложенного перечня)

#### Тема 1.1. Выделение плазмидной ДНК из бактериальных клеток (7,2 час)

В теоретической части задачи рассматривается понятие о хромосомной и плазмидной ДНК в бактериальных клетках, различные способы их получения. Особое внимание уделяется способу получения плазмидной ДНК методом щелочного лизиса бактериальных клеток.



В практической части задачи проводится лизис бактериальных клеток, очистка препарата нуклеиновых кислот двукратным переосаждением изопропанолом. Полученные препараты анализируют при помощи электрофореза в агарозном геле. Для этого проводят подготовку и проведение электрофореза, предварительно выяснив и обсудив условия его проведения, способы визуализация полос нуклеиновых кислот в геле.

Из-за особенности разделения разных форм ДНК (кольцевая, "сверхскрученная") по характеру подвижности полос в агарозном геле, полученных в результате опыта, можно определить разные формы плазмидной ДНК. Таким образом, судят и о чистоте полученного препарата.

### **Тема 1.2. Цепная полимеразная реакция (ПЦР) (7,2 час)**

В теоретической части задачи обсуждаются различные способы образования дополнительных копий участков хромосомной ДНК (амплификация), а также возможность реализации накопления копий определенной нуклеотидной последовательности во время цепной полимеразной реакции – ПЦР. Этот метод основан на многократном избирательном копировании определённого участка ДНК при помощи ферментов в искусственных условиях (*in vitro*). При этом происходит копирование только того участка, который удовлетворяет заданным условиям.

В практической части задачи проводится знакомство с приборами для ПЦР-амплификации, с принципами подбора праймеров, оптимизации параметров цикла амплификации. Определяется зависимость ПЦР-реакции от ионов магния, количества Tag-полимеразы и числа циклов амплификации. Проверкой служит электрофоретическое разделение полученных копий ДНК.

### **Тема 1.3. Рестрикционный анализ (7,2 час)**

В теоретической части задачи вводится представление о специализированных ферментах: рестриктирующих эндонуклеазах (рестриктазах) и их функциях. Обсуждаются особенности в обозначении названий рестриктаз, их специфичность. Рассматриваются типы рестриктаз, их особенности. Дается понятие системы рестрикции – модификации. Метилазы. Сайты рестрикции, их узнавание.

В практической части задачи подбираются условия для проведения рестрикции ДНК плазмиды или фага T7. В задачу также входит подготовка и проведение электрофореза, условия его проведения, способы визуализация полос фрагментов нуклеиновых кислот в геле. Проводится оценка величины фрагментов ДНК, полученных их электрофоретическим разделением.

### **Тема 1.4. Электрофорез нуклеиновых кислот в агарозном геле (7,2 час)**

Задача носит методический характер и нацелена на детальное рассмотрение самого метода электрофореза. В теоретической части задачи рассматривается принцип метода, применение его в разнообразных исследованиях. Особенности разделения нуклеиновых кислот и их фрагментов в гелях агарозы. Условия проведения электрофореза. Выбор пористости геля. Вводится понятие маркерных молекул.

В практической части задачи проводится подготовка аппарата для электрофореза и образцов. При помощи электрофореза осуществляется разделение разных форм нуклеиновых кислот (двунитевые и однострунчатые структуры),

кольцевые, "сверхскрученные"). Обсуждается несколько способов визуализации нуклеиновых кислот в геле в виде полос, полученных от разных форм. Проводится оценка молекулярных масс разных форм нуклеиновых кислот и их фрагментов.

### **Тема 1.5. Трансформация бактериальных клеток (7,2 час)**

Трансформация бактерий плазмидной ДНК – метод генетической инженерии, позволяющий быстро и эффективно переносить внутрь живых бактериальных клеток необходимую наследственную информацию в виде генов. Перенос чужеродных генов в бактерии осуществляется, как правило, в составе специально приспособленного для этого “транспортного средства” – плазмидного вектора (плазмиды).

В теоретической части задачи проводится знакомство с историческими предпосылками установления роли дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) как носителя наследственной информации. Слушатели также знакомятся с теоретическими основами направленного переноса генов в различные организмы.

В практической части задачи слушатели получают представление о базовых манипуляциях в генетической инженерии. При помощи одного из наиболее простых и легких в осуществлении - “кальциевого” метода - проводят трансформацию бактерий, приводящую к созданию трансгенных микроорганизмов с заранее заданными новыми биологическими свойствами.

### **Тема 1.6. Выделение GFP и его аналогов из бактериальных клеток (7,2 час)**

Выделение белка из бактериальных клеток и его дальнейшая очистка весьма трудоемкий и длительный процесс. С открытием и широким распространением зеленого флуоресцентного белка (GFP) и его аналогов, покрывающих весь спектр видимого света, эта задача существенно упростилась. Теоретическая часть задачи посвящена открытию и характеристике GFP, а также созданию его аналогов, подробно рассматривается применение GFP в различных областях молекулярной и клеточной биологии с обзором используемых методов.

Практическая часть задачи включает в себя разрушение бактериальных клеток и очистку флуоресцентного белка на хроматографической смоле. Задача позволяет продемонстрировать весь процесс очистки белка за короткий промежуток времени и освоить базовые методы работы в лаборатории.

#### **Перечень лабораторных работ**

Номер темы	Наименование лабораторной работы
1.1	Выделение плазмидной ДНК из бактериальных клеток (5,2 час)
1.2	Цепная полимеразная реакция (ПЦР) (5,2 час)
1.3	Рестрикционный анализ (5,2 час)
1.4	Электрофорез нуклеиновых кислот в агарозном геле (5,2 час)
1.5	Трансформация бактериальных клеток (5,2 час)
1.6	Выделение GFP и его аналогов из бактериальных клеток (5,2 час)

## **Раздел 2. Модуль 2**

### **Физико-химические методы изучения биологических макромолекул**

#### **Тема 2.1. Электрофоретическое исследование белков (Электрофорез белков)**

В теоретической части задачи практикума обсуждается принцип метода, его возможности и разрешающая способность.

В практической части проводится подготовка образцов к электрофорезу, смеси стандартных полипептидов известной молекулярной массы, используемых для совместного электрофоретического разделения, и искомого белка. Осуществляется электрофоретическое разделение белков в соответствии с их молекулярными массами. На основании полученных данных проводится построение калибровочного графика, по которому и определяется молекулярная масса неизвестного белка.

#### **Тема 2.2. Ионообменная хроматография**

В теоретической части задачи обсуждается общая характеристика метода, использующиеся ионообменники и хроматографируемые вещества. Рассматриваются ионные взаимодействия вещества и сорбента, способы управления силой взаимодействия. Уделяется особое внимание особенностям ионообменной хроматографии белков, выбору оптимальных условий, сохранению нативности препарата.

В практической части задачи проводится очистка и фракционирование белков. Определяется количество белка и ферментативная активность белка амилазы. Оценивается её удельная активность.

#### **Тема 2.3. Хроматография в тонком слое. Тонкослойная хроматография (ТСХ)**

В теоретической части задачи рассматриваются разные типы хроматографического разделения веществ, понятие подвижной и неподвижной фазы. Заостряется внимание на особенностях хроматографии в тонком слое, вводится представление о адсорбционном замещении, об элюотропном ряде растворителей, о способах определения и идентификации разделенных веществ.

В практической части задачи производится подбор условий для хроматографирования в тонком слое сорбента. Проводится экстракция пигментов растений и их последующее разделение на пластинах с сорбентом. Рассчитывается  $R_f$  каждого пигмента. Проводится выявление хлорофиллов по их флуоресценции в красной области спектра, оценивается пигментный состав листа. В другой хроматографической системе проводится тонкослойная хроматография стероидов и их идентификация.

#### **Тема 2.4. Методы фильтрования. Определение белка**

В теоретической части задачи рассматриваются различные способы фильтрования, факторы, определяющие скорость и эффективность фильтрования. Вводятся понятия диализ, полые волокна. Более детально рассматриваются методы мембранной и ультрафильтрации. Обсуждаются также разные методы определения количества белка, качественные и количественные реакции.

В практической части задачи проводится концентрирование растворов макромолекул (белков) в ячейке с ультрафильтром с использованием повышенного давления инертного газа.

Для определения количества белка в растворе до и после ультрафильтрации строится калибровочный график. По нему проводится определение количества белка по методу Лоури.

### **Тема 2.5. Лиофилизация биологических материалов**

В теоретической части задачи рассматривается понятие сублимации, закон фазовых состояний Гиббса, физико-химические основы процесса замораживания биопрепаратов, кривая эвтектики раствора поваренной соли, понятие об эвтектической температуре и эвтектической концентрации. Обратимость биопрепаратов, подвергшихся замораживанию. Криопротекторы. Свободная и связанная вода биологических материалов и периоды лиофилизации. Причины гибели живых клеток при охлаждении.

В практической части задачи проводится оценка сохранения качества лиофилизируемого материала на примере алкогольдегидрогеназы путём измерения ее активности до и после лиофилизации.

### **Тема 2.6. Кристаллизация биологических материалов**

Теоретическая часть посвящена основам кристаллизации белков и кристаллографии белковых структур. Вводится представление о рентгеноструктурном анализе. Основное внимание уделяется таким способам получения кристаллов белка, которые оказались бы пригодными для рентгеноструктурного анализа.

Практическая часть посвящена кристаллизации белков на примере лизоцима. Слушатели получают кристаллы лизоцима методом диффузии паров в висячей капле, а также изучают влияние температуры и различных добавок на кристаллизацию данного белка. Полученные кристаллы наблюдаются с помощью микроскопа, что позволяет оценить чистоту белка и определить лучшие условия получения кристаллов лизоцима.

### **Тема 2.7. Полярография. Определение скорости обмена кислорода при дыхании и фотосинтезе**

В теоретической части задачи рассматривается понятие полярографии, являющейся одним из важнейших электрохимических методов анализа веществ, а также особенности измерения полярограмм с платиновым электродом. Устройство и принцип действия полярографических ячеек интегрального типа (электроды Кларка). Измерение содержания кислорода ( $O_2$ ) в разных средах. Определение скорости обмена кислорода; измерение вольтамперной кривой восстановления  $O_2$ , калибровка в единицах концентрации, специфика измерений в биологических системах.

В практической части задачи проводится измерение зависимости скорости фотосинтеза у одноклеточной водоросли хлореллы (оксигенный фотосинтетик) от интенсивности падающего на нее света и от содержания углекислого газа в окружающей среде с использованием электрода Кларка. Результаты измерений представляются графически.

## Тема 2.8. Методы разделения и идентификации аминокислот.

### Химический метод определения пролина

В теоретической части задачи рассматриваются основные методы определения аминокислот. Принципы разделения аминокислот. Специфическая нингидриновая реакция на аминокислоты. Особенности молекулярной структуры и спектра поглощения пролина по сравнению с другими аминокислотами. Роль пролина в физиологических процессах растений. Специфика химического метода определения пролина, выбор оптимальных условий.

В практической части задачи проводится предварительная очистка и фракционирование экстракта растительной ткани. Проводится количественный анализ пролина по построенному калибровочному графику.

### Тема 2.9. Кинетика ферментативной реакции на примере каталазы

В теоретической части задачи обсуждаются основы кинетики ферментативных реакций. Понятие скорости ( $v$ ) и максимальной скорости ( $V_{max}$ ) ферментативной реакции, уравнение Михаэлиса-Ментена, константа Михаэлиса ( $K_m$ ) и коэффициент молярной экстинкции ( $E_\lambda$ ). Классификация ферментов. Четвертичная структура каталазы, реакционный центр (гем) и его локализация на белковой глобуле. Механизм реакции окисления-восстановления двух молекул пероксида водорода при участии  $Fe^{2+} \leftrightarrow Fe^{3+}$  с образованием воды и свободного кислорода. Пероксидазная реакция каталазы на примере перекисного окисления этанола с образованием ацетальдегида и воды.

В практической части задачи проводится измерение каталазной активности коммерческого препарата каталазы (Sigma) по убыли пероксида водорода ( $\lambda=240\text{nm}$ ) на спектрофотометре GENESYS 10UV. Измерение зависимости скорости каталазной реакции от концентрации пероксида водорода (2 – 12 мМ). Построение концентрационной кривой с использованием программ Excel и SigmaPlot.

### Перечень лабораторных работ

Номер темы	Наименование лабораторной работы
2.1	Электрофоретическое исследование белков (Электрофорез белков) (5,2 час)
2.2	Ионообменная хроматография (5,2 час)
2.3	Хроматография в тонком слое. Тонкослойная хроматография (ТСХ) (5,2 час)
2.4	Методы фильтрования. Определение белка (5,2 час)
2.5	Лиофилизация биологических материалов (5,2 час)
2.6	Кристаллизация биологических материалов (5,2 час)
2.7	Полярография. Определение скорости обмена кислорода при дыхании и фотосинтезе (5,2 час)
2.8	Методы разделения и идентификации аминокислот. Химический метод определения пролина (5,2 час)
2.9	Кинетика ферментативной реакции на примере каталазы (5,2 час)

## **Раздел 3. Модуль 3**

### **Спектральные методы исследования биологических объектов**

#### **Тема 3.1. Фотоколориметрия. Количественный анализ биологических объектов**

В теоретической части задачи обсуждается принцип фотоколориметрии и турбидиметрии (нефелометрии). Проводится знакомство с прибором фотоэлектрический колориметр (ФЭК) и работа на нем; оптическая схема, выбор светофильтров и условий измерений в зависимости от биологической задачи и спектральных свойств объекта. Обсуждается также использование нефелометрии применительно к определению концентрации клеток.

Рассматриваются различные способы количественного определения биологически важных веществ на основе получения цветных реакций (определение крахмала в пробах из растительных тканей, пероксидазной активности, растительных пигментов). Особенное внимание уделяется определению нитратов и нитритов в окружающей среде в свете экологической безопасности.

В практической части задачи проводится измерение концентрации нитритных и аммонийных ионов в питьевой и сточной воде.

#### **Тема 3.2. Абсорбционная спектрофотометрия**

В теоретической части задачи рассматриваются узлы, из которых состоит современный спектрофотометр. Источники и детекторы излучений, используемых в современных исследованиях. Источники сплошного и линейчатого спектра. Оптические квантовые генераторы - лазеры. Основные характеристики фотоприемников. Неселективные и селективные приемники света. Люксметры, фотоэлементы и фотоэлектронные умножители. Интегральная и спектральная чувствительность селективных фотоприемников. Абсорбционные и интерференционные светофильтры. Монохроматоры. Назначение и общее устройство. Диспергирующие элементы монохроматора: призма, дифракционная решетка. Ход лучей в монохроматоре. Дисперсия призмного монохроматора. Зависимость от длины волны. Порядки дифракционной решетки. Входная и выходная щель монохроматора. Связь интенсивности светового потока с шириной щелей монохроматора для источников сплошных и линейчатых спектров. Входной и выходной коллиматоры. Отражательная оптика - сферические зеркала. Стекланные (кварцевые) конденсоры. Светосила и разрешающая способность. Особенности монохроматизации в различных зонах спектра и спектральная чувствительность установки.

Принцип абсорбционной спектрофотометрии. Регистрация спектров поглощения на однолучевых и двухлучевых спектрофотометрах СФ-56 и "Specord M40".

Практическая часть задачи начинается с выбора оптимальных условий измерения поглощения. Изучается влияние режима измерения на спектр поглощения образца: выбор спектральной ширины щели, шага измерения спектра. Проводится измерение спектров поглощения растительных объектов: пигменты в растворе (хлорофиллы, антоцианы). Изучаются также рН-зависимые реакции антоцианов методом дифференциальной спектрофотометрии. Рассматриваются измерение и анализ производных спектров (вторая и четвертая производные сложных полос спектров поглощения).

### **Тема 3.3. Исследование спектров поглощения биологических объектов в ультрафиолетовой области**

В теоретической части задачи обсуждаются основы поглощения биологических объектов в ультрафиолетовой области (аминокислот, белков, нуклеиновых кислот). Аппаратура измерения УФ спектров поглощения: основные элементы, устройство и принципы действия. Измерение УФ-спектров поглощения водных растворов ароматических аминокислот.

В практической части задачи производится построение спектров аминокислот, изменяющихся под влиянием внешних факторов (рН среды).

### **Тема 3.4. Люминесцентная спектроскопия. Исследование флуоресценции биологических объектов (Спектры флуоресценции)**

В теоретической части обсуждается исследование флуоресценции биологически важных веществ. Регистрация спектров флуоресценции и качественный анализ веществ. Зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации, количественный анализ веществ, влияние эффектов реабсорбции, экранирования, выбор оптимальных условий измерений. Применение низких температур. Спектрофлуориметр на основе монохроматора, фотоумножителя и автоматической системы регистрации спектров.

В практической части задачи производится знакомство с люминесцентным спектрометром LS-55 «PerkinElmer» (USA), работа на нем, измерение и сопоставление спектров флуоресценции пигментов в водном гомогенате, ацетоновом экстракте и в нативной клетке. Определение концентрации веществ по спектрам флуоресценции.

### **Тема 3.5. Спектры поглощения белков и нуклеиновых кислот**

В теоретической части задачи обсуждаются общие закономерности ультрафиолетового (УФ)-поглощения свободных аминокислот, белков и нуклеиновых кислот. Проводится знакомство с основными элементами и принципами действия спектрофотометра "Specord UV-VIS", работа на приборе. В практической части задачи осуществляется измерение УФ спектров поглощения ароматических аминокислот в водном растворе. Исследуются спектральные параметры аминокислот, тонкая структура спектра. Наблюдается изменение спектров поглощения аминокислот под влиянием внешних факторов (рН среды).

Во второй части задачи измеряются ультрафиолетовые спектры поглощения белков. Рассматриваются особенности структуры спектров белков по сравнению со спектрами индивидуальных ароматических аминокислот, входящих в их состав, методы учёта вклада рассеяния в поглощение белков. Влияние рН на спектр поглощения белка рибонуклеазы. Оценка вклада аминокислоты тирозина, доступного внешнему воздействию (рН), методом дифференциальной спектрофотометрии. Расчет содержания хромофоров в молекуле белка.

В третьей части задачи проводится измерение УФ поглощения нуклеиновых кислот. Хромофоры нуклеиновых кислот. Гиперхромный эффект при переходе от двухспиральных структур ДНК (нативной формы) к односпиральной (денатурированной формы). В задаче проводится тепловая денатурация ДНК и её ренатурация. Расчет гиперхромного эффекта. Определение концентрации ДНК по спектрам поглощения.

### **Тема 3.6. Исследование свойств биологических объектов методом инфракрасной спектроскопии высокого разрешения с Фурье-преобразованием**

В теоретической части задачи обсуждаются общие принципы измерения спектров поглощения в инфракрасном диапазоне. Преимущества Фурье-спектроскопии. Механизм формирования интерферограммы, разложение периодической временной функции в ряд Фурье и Фурье-анализ такого разложения. Зависимость формы интерферограммы от частоты излучения, ширины спектральных линий и соотношения амплитуд. Современный Фурье-спектрометр Equinox-55 фирмы «Bruker» и работа на нем. Алгоритм измерения спектров.

В практической части задачи производится подбор условий для измерения колебательно-вращательных спектров поглощения простых молекул: CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, ацетон, бензол, спирты и др. Рассчитывается и строится общая схема колебательных и вращательных переходов в молекуле CO<sub>2</sub>. Рассчитывается величина вращательной постоянной, момента инерции и длины межатомных связей. Проводится идентификация веществ и анализ структуры с использованием компьютерного банка данных.

### **Тема 3.7. Ядерный магнитный резонанс (ЯМР) высокого разрешения**

В теоретической части задачи вводится понятие ядерный магнитный резонанс (ЯМР), резонансная частота. Химический сдвиг. Спин-спиновое взаимодействие. Времена спин-решеточной и спин-спиновой релаксации. Исследование временных характеристик. Некоторые методики ЯМР, применяемые для изучения молекул белков, их конформаций, структуры и динамики молекул белков в растворе. Исследования межбелковых взаимодействий. Одномерный (1D), двумерный (2D) и многомерный спектр ЯМР. Преобразованный спектр ЯМР. Импульсная ЯМР Фурье спектроскопия. Применение упрощенного метода Фурье-преобразования для непосредственного получения спектров из сигналов спада свободной индукции. Определение числа и положения атомов водорода в молекуле.

В практической части задачи проводится ознакомление с современным ЯМР-спектрометром “Avance-600” (Bruker), криогенной техникой. Освоение систем команд для регистрации спектра ЯМР. Получение релаксационных спектров. Определение времен релаксации для простых соединений.

#### **Перечень лабораторных работ**

Номер темы	Наименование лабораторной работы
3.1	Фотоколориметрия. Количественный анализ биологических объектов (5,2 час)
3.2	Абсорбционная спектрофотометрия (5,2 час)
3.3	Исследование спектров поглощения биологических объектов в ультрафиолетовой области (5,2 час)
3.4	Люминесцентная спектроскопия. Исследование флуоресценции биологических объектов (Спектры флуоресценции) (5,2 час)
3.5	Спектры поглощения белков и нуклеиновых кислот (5,2 час)
3.6	Исследование свойств биологических объектов методом инфракрасной спектроскопии высокого разрешения с Фурье-преобразованием (5,2 час)
3.7	Ядерный магнитный резонанс (ЯМР высокого разрешения) (5,2 час)



## Раздел 4. Модуль 4

### Физиолого-микробиологические методы исследования

#### Тема 4.1. Микроэлектродные исследования электрических процессов в клетке (Потенциал в клетке)

В теоретической части задачи обсуждаются микроэлектродные методы исследования генерации потенциалов одиночными клетками, знакомство с процессами генерации потенциалов клетками на примере клеток водоросли *Chara carollina*. Обсуждаются методики внутриклеточной регистрации электрических процессов и аппаратура, тонкости изготовления микроэлектродов.

В практической части задачи осуществляется работа на установке для регистрации потенциала и ионных токов на клетках (“Dagan 8500”, USA). Установка имеет компьютерное управление, регистрацию и обработку данных амплитудно-временных характеристик потенциала покоя и потенциала действия клетки. Анализ полученных результатов включает фиксацию напряжения, измерение токов, идущих через кальциевый, хлорный и калиевый каналы, потенциал реверсии. Проводится расчет активности Cl<sup>-</sup> в клетке.

#### Тема 4.2. Микроинъекция (Микрохирургия)

В теоретической части задачи обсуждаются возможности введения веществ и органелл в клетку. Классические и новейшие методы (баллистические, перфорационные методы, микроинъекция под действием физических факторов и химических агентов, а также перенос генетического материала при помощи вирусов, спермиев и молекулярных конструкций). Достоинства и ограничения метода микроинъекции при использовании стеклянных микропипеток под давлением.

В практической части задачи проводится овладение методикой работы с микроманипулятором, самостоятельное изготовление микроинструментов и микрокамеры. С их помощью проводится введение генетического материала в клетку.

#### Тема 4.3. Исследование окислительного стресса биологических систем на примере растений

В теоретической части задачи обсуждаются основные положения современных представлений о стрессе. Специфические и неспецифические реакции организма на стресс. Образование реакционных форм кислорода, как окислительного стресса организмов на примере растений. Известно, что об окислительном стрессе (окислительной деструкции) можно судить по содержанию тиобарбитуровой кислоты (ТБКРп).

В практической части задачи проводится подготовка реакционной смеси и растительного материала. После обработки реакционной смеси бутанолом и центрифугирования проводится спектрофотометрическое измерение поглощения

ТБКРп в бутанольной фракции при  $\lambda=532$  и  $\lambda=600$  нм. Рассчитывается содержание ТБКРп в листьях растений.

#### **Тема 4.4. Исследование численности молочнокислых бактерий в пищевых продуктах**

В теоретической части задачи обсуждаются особенности устройства микробиологической лаборатории и правила работы в ней. Рассматривается, каким образом осуществляется культивирование микроорганизмов на примере лактобактерий. Принципы составления питательных сред. Стерилизация питательных сред. Способы культивирования аэробных и анаэробных микроорганизмов. Выделение чистых культур микроорганизмов. Изучение культуральных особенностей микроорганизмов. Определение количества клеток микроорганизмов высевом на питательные среды и нефелометрически. Микроскопия. Что такое лактобактерии, понятие о полезных микроорганизмах для человека и об их использовании в пищевой промышленности и сельском хозяйстве.

В практической части задачи проводится оценка качества промышленных молочных продуктов (биокефир, сметана, йогурты и др.) по количеству находящихся в них живых лактобактерий, способных к размножению. Расчет количества бактерий в исследуемых продуктах производится после посева серии последовательных десятикратных разведений на чашки Петри, содержащие твердую агаризованную питательную среду, и в пробирки с полужидкой средой. Также проводится подготовка препарата и проведение световой микроскопии лактобактерий.

#### **Тема 4.5. Влияние фитонцидов чеснока, лука, ели на рост микроорганизмов *P. putida*.**

В теоретической части задачи вводятся понятие о фитонцидах, обсуждается их роль в иммунитете растений и во взаимоотношениях организмов в биоценозах. Применение в медицине.

В практической части задачи проводится проверка влияния фитонцидов чеснока, лука и хвои на рост бактерий *P. putida* на твердой агаризованной питательной среде. Приготовление препарата для микроскопии. Подсчет числа выросших бактерий.

#### **Перечень лабораторных работ**

Номер темы	Наименование лабораторной работы
4.1	Микроэлектродные исследования электрических процессов в клетке (Потенциал в клетке) (5,2 час)
4.2	Микроинъекция (Микрохирургия) (5,2 час)
4.3	Исследование окислительного стресса биологических систем на примере растений (5,2 час)
4.4	Исследование численности молочнокислых (5,2 час)
4.5	Влияние фитонцидов чеснока, лука, ели на рост микроорганизмов <i>P. Putida</i> (5,2 час)

## **5. Материально-технические условия реализации программы**

Преподавательский коллектив формируется из преподавателей биологического факультета МГУ, сотрудников Межфакультетского научно-образовательного центра МГУ в г. Пущино, научных сотрудников институтов Научного Центра Биологических Исследований РАН Пущино, привлекаемых на условиях почасовой оплаты и имеющих многолетний опыт преподавательской работы со студентами биологического и других факультетов МГУ.

Занятия будут проводиться в учебном корпусе Межфакультетского научно-образовательного центра МГУ в г. Пущино, в 15 просторных помещениях, оборудованных современным парком приборов, а также в лабораториях институтов ПНЦ РАН.

Быт слушателей обеспечивается общежитием Межфакультетского научно-образовательного центра МГУ в г. Пущино, где кроме комнат для проживания, кухню, санузлов, душевых комнат - есть аудитории для самостоятельной работы, спортзал и большая аудитория на 110 мест, при необходимости преобразуемая в место досуга слушателей.

## **6. Учебно-методическое обеспечение программы**

Слушателям предоставляется необходимая учебно-методическая литература, имеющаяся в достаточном количестве.

а) основная литература:

По каждой Теме (задаче) Программы существует подробное методическое описание, которое выдается слушателям в учебно-методическом кабинете Межфакультетского научно-образовательного центра МГУ в г. Пущино за день до выполнения ими задачи

б) дополнительная литература:

Учебно-методический кабинет Межфакультетского научно-образовательного центра МГУ в г. Пущино имеет большой фонд книжной литературы по всем представленным в Программе методам

в) программное обеспечение и Интернет-ресурсы:

Межфакультетский научно-образовательный центр МГУ в г. Пущино оснащен проводной сетью с выходом в Интернет и беспроводной сетью. Слушатели используют Интернет-ресурсы для подготовки ко многим задачам практикумов.

## **7. Требования к результатам обучения**

По мере выполнения каждой задачи (Темы) Модуля, слушатель обязан самостоятельно подготовить полный письменный отчет, включающий название задачи, изложение принципа освоенного метода, описание установки (прибора), на котором проводилось исследование. В отчете также должна быть указана цель каждого из выполненных заданий, представлен подробный протокол всех этапов исследования (ход выполнения каждого упражнения), включающий полученные результаты (таблицы, графики, уравнения, схемы, расчеты), сформулированы выводы. Текущая аттестация включает также сдачу преподавателю этой задачи зачета именно по данной задаче.

По итогам каждого из Модулей слушатель должен сдать зачет, на котором он обязан представить полные отчеты по всем пройденным задачам с проставленными там оценками. Правильно ответить на вопросы, касающиеся освоенных им методов, уметь использовать полученные знания для решения предложенных контрольных заданий. По итогам Полного цикла Программы слушатель должен сдать зачет, на котором он обязан представить полный отчет по всем четырем пройденным Модулям Программы. Слушатель должен правильно ответить на вопросы, касающиеся освоенных им методов Модулей, уметь использовать полученные знания для решения предложенных контрольных заданий. По окончании обучения слушателю выдаётся Удостоверение о повышении квалификации установленного образца выдается после предоставления документа о квалификации (диплома о высшем или среднем профессиональном образовании).

### **8. Составитель программы**

Сатина Людмила Яковлевна, старший преподаватель кафедры биохимии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.