

УТВЕРЖДАЮ  
Декан биологического ф-та  
МГУ имени М.В.Ломоносова,  
академик РАН

\_\_\_\_\_ М.П.Кирпичников

" \_\_\_\_ " \_\_\_\_\_ 20\_\_ г.

**ПРОГРАММА**  
повышения квалификации

Применение синхротронных и нейтронных источников излучения для  
решения задач структурной биологии

Москва – 2021

## **1. Цель реализации программы**

Дополнительная профессиональная образовательная программа "Применение синхротронных и нейтронных источников излучения для решения задач структурной биологии" (далее, Программа) направлена на совершенствование профессиональных компетенций, необходимых для выполнения следующих видов профессиональной деятельности в рамках имеющейся квалификации:

- участвовать в проведении структурных исследований белков, белковых комплексов, сложных биополимерных структур
- планировать исследования с применением методов структурной биологии с использованием синхротронных и нейтронных источников.

Программа реализуется во исполнение Соглашения о предоставлении из федерального бюджета грантов в форме субсидий № 075-15-2021-1354 от 07.10.2021 г. (заказчик Министерство науки и высшего образования Российской Федерации, головной исполнитель ФИЦ Биотехнологии РАН, соисполнитель МГУ имени М.В.Ломоносова, биологический факультет, договор № 154-244 от 29.10.2021г.)

## **2. Формализованные результаты обучения**

В результате освоения программы слушатель должен приобрести следующие знания и умения:

слушатель должен знать:

- принципиальное устройство и возможности современных источников синхротронного и рентгеновского лазерного излучения для структурных исследований биообъектов;
- принципиальное устройство и возможности современных источников нейтронов для структурных исследований биообъектов;
- принципиальное устройство и возможности альтернативных приборов и методов для структурных исследований биообъектов;
- основы методов пробоподготовки биообъектов для структурных исследований;
- основы современных методов обработки результатов структурных исследований, включая методы компьютерного моделирования и искусственного интеллекта.

слушатель должен уметь:

- планировать проведение структурных исследований биообъектов с использованием современных источников синхротронного и рентгеновского лазерного излучения;
- планировать проведение структурных исследований биообъектов с использованием современных источников нейтронов;
- проводить пробоподготовку биообъектов, включая кристаллизацию белков, для структурных исследований;
- понимать и интерпретировать данные компьютерной обработки и компьютерного моделирования структурных исследований биообъектов;
- пользоваться международными информационными ресурсами по структурной биологии.

### 3. Содержание программы

#### Учебный план

программы повышения квалификации

Применение синхротронных и нейтронных источников излучения для решения задач структурной биологии

Категория слушателей (требования к слушателям) – студенты магистратуры, а также аспиранты биологических, химических, физических, математических специальностей. Работники науки и образования, а также реального сектора экономики, имеющие высшее специальное образование в области биологии, физики, химии, математики.

Срок обучения – 88 часа, в том числе 28 часов самостоятельной подготовки.

Форма обучения – очная с применением дистанционных технологий, без отрыва от работы

| № п/п               | Наименование разделов    | Всего, час. | В том числе |                             |                        |
|---------------------|--------------------------|-------------|-------------|-----------------------------|------------------------|
|                     |                          |             | лекции      | практич. и лаборат. занятия | самостоятельная работа |
| 1                   | Теоретическая подготовка | 56          | 28          | -                           | 28                     |
| 2                   | Практическая подготовка  | 32          | -           | 32                          | -                      |
| Итоговая аттестация |                          | зачет       |             |                             |                        |

**Учебно-тематический план**  
 программы повышения квалификации  
 Применение синхротронных и нейтронных источников излучения для  
 решения задач структурной биологии

| №<br>п/п | Наименование разделов и тем   | Всего,<br>час. | В том числе |                                   |                                |
|----------|---|----------------|-------------|-----------------------------------|--------------------------------|
|          |   |                | лекции      | практич.<br>и лаборат.<br>занятия | самостоя-<br>тельная<br>работа |
| 1        | 2   | 3              | 4           | 5                                 |                                |
| <b>1</b> | <b>Теоретическая подготовка</b>   | <b>56</b>      | <b>28</b>   | -                                 | <b>28</b>                      |
| 1.1      | Физические принципы, устройство и возможности современных источников синхротронного, рентгеновского лазерного и нейтронного излучения для структурных исследований биообъектов. | 8              | 4           | -                                 | 4                              |
| 1.2      | Устройство и возможности альтернативных приборов и методов для структурных исследований биообъектов   | 8              | 4           | -                                 | 4                              |
| 1.3      | Методы пробоподготовки биообъектов для структурных исследований.  | 12             | 6           | -                                 | 6                              |
| 1.4      | Методы обработки, интерпретации и моделирования результатов структурных исследований.   | 12             | 6           | -                                 | 6                              |
| 1.5      | Международные информационные ресурсы для структурной биологии   | 8              | 4           | -                                 | 4                              |
| 1.6      | Результаты современных структурных исследований и их значение для развития науки и приложений в области биомедицины   | 8              | 4           | -                                 | 4                              |
|          |   |                |             |                                   |                                |
| <b>2</b> | <b>Практическая подготовка</b>  | <b>32</b>      | -           | <b>32</b>                         | -                              |
| 2.1      | Методы получения и очистки рекомбинантных белков  | 16             | -           | 16                                | -                              |
| 2.2      | Получение кристаллов белков   | 4              | -           | 4                                 | -                              |
| 2.3      | Обработка данных рентгеноструктурного анализа.  | 12             | -           | 12                                | -                              |
|          |   |                |             |                                   |                                |

**Учебная программа**  
повышения квалификации  
Применение синхротронных и нейтронных источников излучения для  
решения задач структурной биологии

**Раздел 1. Теоретическая подготовка (56 часов)**

Тема 1.1. Физические принципы, устройство и возможности современных источников синхротронного, рентгеновского лазерного и нейтронного излучения для структурных исследований биообъектов (8 час)

Вопросы, раскрывающие содержание темы:

Открытие В.К. Рентгеном X- лучей. Устройство рентгеновской трубки. Длина волны и яркость рентгеновского излучения. Взаимодействие рентгеновского излучения с веществом. Принцип Гюйгенса. Упругое и неупругое рассеяние рентгеновских квантов на электронах. Эффект Комптона. Атомные форма-факторы. Дифракция рентгеновского излучения на кристаллах. Закон Вульфа-Брэгга. Структурный фактор. Проблема фаз. Методы использования рентгеновского излучения для структурных исследований. Основные достижения кристаллографии в досинхротронную эпоху. Метод Лауэ. Метод Дебая-Шеррера. Принцип устройства синхротрона и характеристики рентгеновского излучения синхротронов различных поколений. Рентгеновские лазеры на свободных электронах. Устройство рентгеновских лазеров и пространственно-временные характеристики рентгеновских лазерных импульсов. Имеющиеся в мире рентгеновские лазеры и возможности проведения структурных исследований. Фемтосекундная лазерная кристаллография.

Метод рентгеноструктурного анализа и его место в современной структурной биологии. Основные стадии рентгеноструктурного анализа. Кристаллизация белков (принцип, основные методы и подходы). Строение кристалла и пространственные группы.

Эксперименты с единичными частицами. Исследование вирусов. Малоугловое рассеяние и его использование в структурных исследованиях биобъектов.

Современные источники нейтронов. Взаимодействие нейтронов с веществом. Форм-факторы для рассеяния нейтронов. Использование дифракции нейтронов в структурной биологии. Сравнение возможностей методов рассеяния рентгеновского излучения и нейтронов для структурной биологии.

Тема 1.2. Устройство и возможности альтернативных приборов и методов для структурных исследований биообъектов (8 час).

Вопросы, раскрывающие содержание темы:

Электронная микроскопия. Возможности современной крио-электронной микроскопии для изучения пространственной структуры белков, белковых комплексов и других биополимеров. Сравнение результатов крио-электронной микроскопии и рентгено-структурного анализа. Атомно-силовая микроскопия (АСМ). Принципы АСМ и возможности использования для

структурных исследований макромолекулярных объектов. Возможности современных методов оптической микроскопии в различных вариантах для структурных исследований. Проблема интеграции данных различных методов структурных исследований.

Тема 1.3. Методы пробоподготовки биобъектов для структурных исследований (12 час).

Вопросы, раскрывающие содержание темы:

Введение в клонирование и мутагенез. Традиционные и современные генно-инженерные подходы к клонированию и сайт-направленному мутагенезу.

Электрофоретические методы исследования биомолекул. Электрофорез в полиакриламидном геле по Лэммли и электрофорез нуклеиновых кислот в агарозном геле. Способы окрашивания (визуализации) и анализа полос в гелях.

Экспрессия и очистка белков. Организмы, используемые для получения рекомбинантных белков, получение белков в клетках бактерий. Выделение белков из природных источников. Хроматографические методы разделения (очистки) белков. Стратегии, используемые для инженерии белковых конструкций для структурной биологии.

Методы получения и очистки белков. Методы кристаллизации водорастворимых белков. Методы кристаллизации мембранных белков. Не кристаллизующиеся белки. Особенности применения кристаллов различных размеров. Нанокристаллы. Методы доставки биообъектов в камеру измерения для различных устройств.

Пробоподготовка объектов в крио-электронной микроскопии. Пробоподготовка объектов для АСМ.

Тема 1.4. Методы обработки, интерпретации и моделирования результатов структурных исследований (12 час).

Вопросы, раскрывающие содержание темы:

Взаимодействие излучения с кристаллом. Дифракция и интерференция рассеянных кристаллом волн. Связь наблюдаемых величин с электронной плотностью.

Рентгеноструктурный эксперимент. Обработка экспериментальных данных. Фазовая проблема и методы ее преодоления.

Формат выдачи данных по структуре биообъектов. Карты электронной плотности. Пространственные атомные структуры. Общие принципы обработки данных - от картин дифракции - к электронной плотности - и атомной структуре. Проблема фаз в рентгеноструктурном анализе. Величина пространственного разрешения атомной структуры и ее зависимость от условий проведения эксперимента и методов обработки. В - факторы. Общие вопросы теории взаимодействия рентгеновского излучения с веществом. Амплитуды рассеяния рентгеновских квантов. Корреляционные функции Ван-

Хова. Роль статического и динамического беспорядков. Рентгено-динамический анализ. Поглощение рентгеновских квантов и эффект Мессбауэра. Спектр рассеяния рентгеновского излучения. Компьютерное моделирование структурных и динамических экспериментов. Компьютерные методы прогноза пространственной структуры белков по их последовательности. Использование технологий искусственного интеллекта для обработки данных структурных исследований.

Тема 1.5. Международные информационные ресурсы для структурной биологии (8 час).

Вопросы, раскрывающие содержание темы:

Банки данных по структурам белков. Правила регистрации пространственных структур в банках данных. Структура документов и представление информации в базах данных. Качество информации по пространственным структурам в банках данных.

Тема 1.6. Результаты современных структурных исследований и их значение для развития науки и приложений в области биомедицины (8 час).

Вопросы, раскрывающие содержание темы:

Количественные характеристики пространственных структур, содержащихся в базах данных. Скорость прироста числа разрешенных структур в зависимости от методов. Водорастворимые белки. Мембранные белки. Комплексы белков. Фотобелки. Использование структурных данных в фармакологии и биомедицине. Структуры комплексов белков с лигандами.

## **Раздел 2. Практическая подготовка (32 часа)**

Тема 2.1. Методы получения и очистки рекомбинантных белков (16 час).

Вопросы, раскрывающие содержание темы:

Выделение плазмидной ДНК из клеток бактерий и проведение полимеразной цепной реакции (ПЦР) для получения точечных мутантов каротиноид-связывающего белка (СВР) из тутового шелкопряда. Анализ фрагментов ДНК с помощью агарозного гель-электрофореза. Определение концентрации ДНК спектрофотометрическим методом.

Трансформация клеток *E. coli* плазмидной ДНК. Экспрессия белка СВР в клетках *E. coli*. Анализ экспрессии и растворимости белка СВР методом электрофореза по Лэммли.

Выделение и очистка рекомбинантного белка СВР с помощью металло-аффинной хроматографии. Анализ хода очистки целевого белка методом ЭФ по Лэммли. Определение концентрации СВР спектрофотометрическим методом.

Тема 2.2. Получение кристаллов белков (4 час).

Вопросы, раскрывающие содержание темы:

Кристаллизационный скрининг рекомбинантного белка СВР, включая роботизированный (один планшет) и ручной (один планшет, оптимизация).

Тема 2.3. Обработка данных рентгено-структурного анализа (12 час).

Вопросы, раскрывающие содержание темы:

Обработка данных рентгеноструктурного анализа. Определение точечной и пространственной группы. Оценка количества молекул в ячейке. Решение фазовой проблемы методом молекулярного замещения.

Кристаллографическое уточнение, анализ и валидация структуры.

### Перечень лабораторных работ

| Номер темы | Наименование лабораторной работы  |
|------------|---|
| 2.1        | Выделение плазмидной ДНК из клеток бактерий и проведение полимеразной цепной реакции (ПЦР) для получения точечных мутантов (2 час.)   |
| 2.1        | Анализ фрагментов ДНК с помощью агарозного геле-электрофореза. Определение концентрации ДНК спектрофотометрическим методом. (2 час.)  |
| 2.1        | Трансформация клеток <i>E. coli</i> плазмидной ДНК. Экспрессия белка в клетках <i>E. coli</i> . Анализ экспрессии и растворимости белка методом электрофореза по Лэммли (3 час.)                                  |
| 2.1        | Выделение и очистка рекомбинантного белка с помощью металло-аффинной хроматографии. Анализ хода очистки целевого белка методом ЭФ по Лэммли. Определение концентрации СВР спектрофотометрическим методом (3 час.) |
| 2.2        | Кристаллизационный скрининг рекомбинантного белка, включая роботизированный и ручной (4 час.)   |
| 2.3        | Обработка данных рентгеноструктурного анализа. Решение фазовой проблемы методом молекулярного замещения. (4 час)  |
| 2.3        | Кристаллографическое уточнение, анализ и валидация структуры. (8 час)   |

#### 4. Материально-технические условия реализации программы

Для реализации программы необходимо следующее материально-техническое обеспечение:



- для теоретической подготовки:
- оборудованные аудитории для проведения аудиторных занятий;
  - компьютер с выходом в Интернет и проектор для презентаций;
- для практической подготовки:
- лабораторный практикум с тягой и оборудованием для препаративной биохимии и кристаллизации белков.
  - компьютер с выходом в Интернет и программами для обработки данных.

## 5. Учебно-методическое обеспечение программы

### Теоретическая подготовка:

- Хир К. Статистическая механика, кинетическая теория и стохастические процессы. М.: Мир, 1976.
- Финкельштейн А.В., Птицын О.Б. Физика белка. М.: КДУ, 2012.
- Зоркий П.М. Симметрия молекул и кристаллических структур. М.: Изд. МГУ, 1986.
- Свергун Д.И., Фейгин Л.А. Рентгеновское и нейтронное малоугловое рассеяние. М.: Наука, 1986.
- Современные методы изучения структуры и функций ионных каналов/ О.С.Соколова (отв.ред.). М.: КМК, 2020.
- Лунин В.Ю. Математический аппарат рентгено-структурного анализа макромолекул. [http://www.impb.ru/pdf/LCM\\_1994\\_6r.pdf](http://www.impb.ru/pdf/LCM_1994_6r.pdf)
- Вайнштейн Б.К. Рентгеноструктурный анализ глобулярных белков. УФН. 1966. т.88(3). с.527-565.
- Гудмен Дж. Статистическая оптика. М.: Мир, 1988.
- Whitford D. Proteins. Structure and Function. John Wiley & Sons Ltd. 2005.
- A Guide to CIF for Authors. [https://www.iucr.org/\\_data/assets/pdf\\_file/0019/22618/cifguide.pdf](https://www.iucr.org/_data/assets/pdf_file/0019/22618/cifguide.pdf)
- Protein Data Bank <https://www.rcsb.org/>

### Практическая подготовка

- Tripathi, N.K. (2016), Production and Purification of Recombinant Proteins from Escherichia coli. ChemBioEng Reviews, 3: 116-133. <https://doi.org/10.1002/cben.201600002>
- Knudsen, C.R. and Clark, B.F.C. (2002). Recombinant Proteins. In Encyclopedia of Molecular Biology, (Ed.). <https://doi.org/10.1002/047120918X.emb1287>
- Goehring, A., Lee, CH., Wang, K. et al. Screening and large-scale expression of membrane proteins in mammalian cells for structural studies. Nat Protoc 9, 2574–2585 (2014). <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.173>
- Berger, I., Fitzgerald, D. & Richmond, T. Baculovirus expression system for heterologous multiprotein complexes. Nat Biotechnol 22, 1583–1587 (2004). <https://doi.org/10.1038/nbt1036>
- Edavettal S.C., Hunter M.J., Swanson R.V. (2012) Genetic Construct Design and Recombinant Protein Expression for Structural Biology. In: Tari L. (eds) Structure-Based Drug Discovery. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols), vol 841. Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-520-6\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-520-6_2)
- Unger T., Peleg Y. (2012) Recombinant Protein Expression in the Baculovirus-Infected Insect Cell System. In: Zanders E. (eds) Chemical Genomics and Proteomics. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols), vol 800. Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-349-3\\_13](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-349-3_13)
- Liu, H., Naismith, J.H. An efficient one-step site-directed deletion, insertion, single and multiple-site plasmid mutagenesis protocol. BMC Biotechnol 8, 91 (2008). <https://doi.org/10.1186/1472-6750-8-91>

Gale Rhodes. Crystallography Made Crystal Clear: A Guide for users of Macromolecular Models (Second edition). Academic press (2000).

<https://www.sciencedirect.com/book/9780125870733/crystallography-made-crystal-clear> Jan

Drenth. Principles of Protein X-Ray Crystallography (Third edition). Springer (2007).

<https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F0-387-33746-6.pdf>

Г.В.Фетисов. Синхротронное излучение. Методы исследования структуры веществ. Издательство М.: Физматлит (2007) ISBN 978-5-9221-0805-8.

## **6. Требования к результатам обучения**

**Итоговая аттестация** - проводится в устной форме в виде зачета, который принимается аттестационной комиссией. При проведении зачета испытуемый выбирает случайным образом билет с вопросами. В билете должны присутствовать два вопроса по разделам теоретической и практической подготовки. В ходе зачета задается также дополнительный вопрос.

Перечень основных вопросов, выносимых на аттестацию в форме зачета:

1. Основные типы источников рентгеновского излучения.
2. Характеристики рентгеновского излучения от различных источников.
3. Основные типы источников нейтронов.
4. Характеристики нейтронных пучков, используемых в структурных исследованиях.
5. Возможности использования различных источников рентгеновского излучения для решения задач структурной биологии.
6. Возможности использования источников нейтронов для решения задач структурной биологии.
7. Физические основы применения дифракции рентгеновских лучей для установления пространственной структуры кристаллов.
8. Физические основы применения дифракции нейтронов для установления пространственной структуры кристаллов.
9. Атомные форм-факторы для рассеяния рентгеновского излучения.
10. Форм-факторы рассеяния нейтронов на ядрах атомов.
11. Упругие и неупругие эффекты при рассеянии рентгеновского излучения. Комptonовское рассеяние.
12. Упругие и неупругие эффекты при рассеянии нейтронов.
13. Влияние статической и динамической неупорядоченности на дифракцию рентгеновского излучения. В - факторы.
14. Проблема фаз в рентгеноструктурном анализе.
15. Влияние статической и динамической неупорядоченности на дифракцию нейтронов.
16. Корреляционные функции Ван-Хова в теории рассеяния рентгеновского и нейтронного излучения.
17. Тепловые флуктуации и их влияние на дифракцию рентгеновских лучей и нейтронов.
18. Принципы устройства синхротронов. Типы синхротронов. Применение синхротронного излучения в биологии.

19. Принципы устройства рентгеновских лазеров на свободных электронах.
20. Основные характеристики и возможности применения рентгеновских лазеров на свободных электронах в биологии.
21. Резонансное поглощение рентгеновских квантов. Эффект Мессбауэра.
22. Применение резонансного поглощения рентгеновских квантов для изучения динамики биоструктур.
23. Методы молекулярного моделирования для изучения пространственной структуры и динамики биополимеров.
24. Моделирование пространственной структуры белков по гомологии.
25. Принципы формирования пространственной структуры белков, фолдинг.
26. Особенности проведения экспериментов с глобулярными и мембранными белками.
27. Методы кристаллизации глобулярных белков.
28. Методы кристаллизации мембранных белков.
29. Использование методов белковой инженерии при изучении пространственной структуры белков и их комплексов.
30. Особенности структурных исследований не кристаллических объектов. Эксперименты на рентгеновских лазерах с единичными частицами.
31. Закономерности дифракции на простых не кристаллических объектах (сферы, цилиндры).
32. Методы фемтосекундной серийной кристаллографии. Результаты, которые могут быть получены для фотобелков.
33. Малоугловое рассеяние рентгеновского излучения. Информация об объекте, которая может быть получена при малоугловом рассеянии.
34. Малоугловое рассеяние нейтронов. Информация об объекте, которая может быть получена при малоугловом рассеянии нейтронов.
35. Закономерности при формировании простых кристаллических структур. Правила Полинга.
36. Методы расшифровки пространственной структуры биомакромолекул по дифракции от их кристаллов.
37. Методы минимизации пространственной структуры.
38. Основные типы лабораторного оборудования, которые необходимы для современных исследований пространственной структуры биообъектов с использованием источников синхротронного излучения и нейтронов.
39. Альтернативные методы структурной биологии. Электронная микроскопия, атомно-силовая микроскопия, варианты оптической микроскопии. Особенности применения этих методов и интеграция результатов исследования пространственной структуры с использованием различных подходов.
40. Международные базы данных по пространственной структуре биообъектов и их применение в биологических и медицинских исследованиях.
41. Общее строение плазмид и принципиальная схема клонирования генов в рамку считывания. Методы трансформации клеток *E. coli*.
42. Электрофоретические методы разделения биомолекул.
43. Методы сайт-направленного мутагенеза.

44. Преимущества и недостатки про- и эукариотических систем экспрессии белков.
45. Сравнение выделения и очистки рекомбинантных белков и белков из нативных источников.
46. Основные методы кристаллизации макромолекул.
47. Уравнение Брэгга и основные следствия из него. Связь наблюдаемых в рентгеноструктурном эксперименте величин и электронной плотности.
48. Проблема фаз и методы ее преодоления.
49. Метод молекулярного замещения и функция Паттерсона. Функции вращения и трансляции.
50. Кристаллографическое уточнение. Зачем оно нужно и какие параметры уточняются. Фактор сходимости.

## **7. Составители программы**

Зав. кафедрой биоинженерии,  
доктор биологических наук, академик                      М.П.Кирпичников

Зав. кафедрой синтетической биологии  
доктор химических наук, академик                                      В.О. Попов

профессор каф.биоинженерии,  
доктор физико-математических наук, профессор                                      К.В.Шайтан