

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»
Химический факультет

УТВЕРЖДАЮ

И.о. декана химического факультета,
Чл.-корр. РАН, профессор



/С.Н. Калмыков/

«20» мая 2019 г.

РАБОЧАЯ ПРОГРАММА ДИСЦИПЛИНЫ (МОДУЛЯ)
Спецпрактикум «Фундаментальная и прикладная энзимология»

Уровень высшего образования:
Специалитет

Направление подготовки (специальность):
04.05.01 Фундаментальная и прикладная химия

Направленность (профиль) ОПОП:
Фундаментальная и прикладная энзимология

Форма обучения:
очная

Рабочая программа рассмотрена и одобрена
Учебно-методической комиссией факультета
(протокол №3 от 13.05.2019)

Москва 2019

Рабочая программа дисциплины разработана в соответствии с самостоятельно установленным МГУ образовательным стандартом (ОС МГУ) для реализуемых основных профессиональных образовательных программ высшего образования по направлению подготовки / специальности 04.05.01 «Фундаментальная и прикладная химия» (программа специалитета), утвержденного приказом МГУ от 29 декабря 2018 года № 1770 (с изменениями по приказу № 1109 от 11.09.2019).

Год (годы) приема на обучение 2019/2020

1. Место дисциплины (модуля) в структуре ООП: вариативная часть ООП, блок ПД.

2. Планируемые результаты обучения по дисциплине, соотнесенные с планируемыми результатами освоения образовательной программы (компетенциями выпускников). Соответствие результатов обучения по данному элементу ОПОП результатам освоения ОПОП (в форме компетенция – индикатор - ЗУВ) указано в Общей характеристике ОПОП.

Компетенция	Индикатор достижения	Планируемые результаты обучения по дисциплине (модулю)
<p>ОПК-3.С. Способен использовать методы регистрации и обработки результатов экспериментов, в том числе, полученных на современном научном оборудовании</p>	<p>ОПК-3.С.2. Систематизирует и анализирует результаты химических экспериментов, наблюдений, измерений</p>	<p>Уметь: проводить математическую обработку физико-химических данных, обобщать полученные результаты</p>
<p>СПК-1.С. Способен использовать сведения о строении и биологических функциях основных классов биологических соединений, свойствах микроорганизмов, способах регуляции биохимических процессов, основных направлениях современной биотехнологии и прикладной биохимии при решении задач профессиональной деятельности</p>	<p>СПК-1.С(итог) использует сведения о строении и биологических функциях основных классов биологических соединений, свойствах микроорганизмов, способах регуляции биохимических процессов, основных направлениях современной биотехнологии и прикладной биохимии при планировании и выполнении исследований, интерпретации полученных результатов</p>	<p>Уметь: самостоятельно применять знания о строении и биологических функциях основных классов биологических соединений, свойствах микроорганизмов, способах регуляции биохимических процессов, основных направлениях современной биотехнологии и прикладной биохимии с целью решения профессиональных задач Владеть: Навыками самостоятельного анализа задач современной биотехнологии и прикладной биохимии</p>
<p>СПК-2.С. Способен применять общие закономерности физической химии ферментов при описании химической и ферментативной кинетики и механизмов ферментативных реакций</p>	<p>СПК-2.С(итог) грамотно использует аппарат физической химии при описании кинетики и механизмов ферментативных реакций</p>	<p>Уметь: анализировать экспериментальные данные и делать выводы о физико-химических закономерностях действия ферментов Владеть: методологией исследования физико-химических закономерностей действия ферментов</p>
<p>СПК-3.С. Способен применять методы генетической инженерии и компьютерного моделирования биоструктур при реше-</p>	<p>СПК-3.С.1 использует современное программное обеспечение при моделировании структур биомолекул и процессов с их участием</p>	<p>Уметь: применять методологию генной инженерии и компьютерного моделирования биоструктур к решению профессиональных задач Владеть: методологией современной генной ин-</p>

нии профессиональных задач		женерии и навыками компьютерного моделирования биоструктур
СПК-4.С. Способен использовать основные физико-химические методы исследования биомолекул в практической деятельности	СПК-4.С(итог) использует экспериментальные и расчетно-теоретические физико-химические методы исследования биомолекул при решении практических задач	Уметь: составлять план исследования биосистемы современными физико-химическими методами Владеть: методологией физико-химических методов анализа биосистем в рамках решения профессиональных задач

3. Объем дисциплины в зачетных единицах с указанием количества академических или астрономических часов, выделенных на контактную работу обучающихся с преподавателем (по видам учебных занятий) и на самостоятельную работу обучающихся:

Объем дисциплины (модуля) составляет 8 зачетных единиц, всего 288 часов, из которых 244 часа составляет контактная работа студента с преподавателем (192 часа – лабораторные занятия, 46 часов – индивидуальные консультации, 6 часов – промежуточный контроль успеваемости, 44 часа составляет самостоятельная работа студента.

4. Входные требования для освоения дисциплины (модуля), предварительные условия.

Обучающийся должен

Знать: математические, физические и физико-химические дисциплины по программе Химического факультета МГУ

Уметь: планировать эксперимент

Владеть: навыками обработки экспериментальных данных в рамках общих практикумов 1-4 курсов Химического факультета МГУ

5. Содержание дисциплины (модуля), структурированное по темам.

Наименование и краткое содержание разделов и тем дисциплины (модуля), форма промежуточной аттестации	Всего (часы)	В том числе	
		Контактная работа (работа во взаимодействии с преподавателем), часы из них	Самостоятельная работа обучающегося, часы из них

		Занятия лекционного типа	Занятия семинарского типа	Групповые консультации	Индивидуальные консультации	Учебные занятия, направленные на проведение текущего контроля успеваемости, промежуточной аттестации	Всего	Выполнение домашних заданий	Подготовка рефератов и т.п..	Всего
Тема 1. Гомогенный катализ	38		32		4		36			2
Тема 2. Стационарная и предстационарная кинетика, гидролиза п-НФТМА, катализируемого а-химотрипсином	28		18		6		24			4
Тема 3. Ингибирование ферментативных реакций	26		16		4	2	22			4
Тема 4. Денатурация и стабилизация ферментов	36		24		8		32			4
Тема 5. Стационарная кинетика двухсубстратных ферментативных реакций, дискриминация возможных механизмов	22		16		4		20			2
Тема 6. Иммуноферментный анализ	26		18		4		22			4
Тема 7. Выделение и очистка белков. Масс-спектрометрия белка	30		20		8		28			2
Тема 8. Методы молекулярной	26		18		4		22			4

биологии										
Тема 9. Флуоресцентные методы анализа	38		30		4		34			4
Промежуточная аттестация <i>зачет</i>	18					4	4			14
Итого	288		192		46	6	244			44

6. Образовательные технологии:

- применение компьютерных симуляторов, обработка данных на компьютерах, использование компьютерных программ, управляющих приборами;
- использование средств дистанционного сопровождения учебного процесса;
- преподавание дисциплин в форме авторских курсов по программам, составленным на основе результатов исследований научных школ МГУ.

7. Учебно-методические материалы для самостоятельной работы по дисциплине (модулю):

Литература из рекомендованного списка

8. Ресурсное обеспечение:

- Перечень основной и вспомогательной учебной литературы ко всему курсу

Основная литература

Конспекты кафедральных спецкурсов

Дополнительная литература

Описание задач практикума, предоставляется преподавателями

- Материально-техническое обеспечение:

Центрифуга высокоскоростная с охлаждением - 1 шт.; Источник тока Пауэр пак с ячейкой для проведения электрофореза - 1 шт.; Планшетный спектрофотометр Anthos 2010 - 1 шт.; Шейкер планшетный Elmi S 3.02 - 1 шт.; Дистиллятор PHS Aqua 4 - 1 шт.; Перемешивающее устройство Biosan MSH-300i - 1 шт.; Термостат планшетный Biosan ST-3M - 1 шт.; Центрифуга ELMi CM-50 - 1 шт.; Весы аналитические ExplorerProOhaus - 1 шт.; pH-метр MettlerToledo - 1 шт.
Автоматический титратор - 1 шт.

Spectramax Plate reader M5 - 1 шт.; рН-метр - 1 шт.; Весы аналитические - 1 шт.; Система очистки воды - 1 шт.; Холодильник - 1 шт.
 Магнитная мешалка Biosan MSH-300 - 1 шт.; Спектрофотометр Shimadzu UV1202 - 1 шт.; Центрифуга mini Spin - 1 шт.
 ИКФурье спектрометрическая система Bruker Tensor 27 - 1 шт.; Генератор сухого воздуха JunAir - 1 шт.
 Высокоэффективная хроматографическая система высокого давления - 1 шт.; Хроматографическая система низкого давления с коллектором фракций - 1 шт.
 Флуориметр Cary Eclipse - 1 шт.
 рН-метр - 1 шт.
 Ламинарный шкаф 2 класса защиты - 1 шт.

9. Язык преподавания – русский

10. Преподаватели: к.х.н. доц. Белова А.Б., к.х.н. н.с. Курзеев С.А., к.х.н. с.н.с. Филатова Л.Ю., д.х.н. доц. Кудряшова Е.В., к.х.н. асс. Ле-Дейген И.М., д.х.н. проф. Тишков В.И., к.х.н. доц. Осипов А.П., к.х.н. с.н.с. Самсонова Ж.А., к.х.н. с.н.с. Зоров И.Н., к.х.н. доц. Белогурова Н.Г., к.х.н. асс. Чубарь Т.А., к.х.н. н.с. Гладченко М., д.х.н. проф. Савицкий А.П., аспиранты кафедры

Фонды оценочных средств, необходимые для оценки результатов обучения

Образцы оценочных средств для текущего контроля усвоения материала и промежуточной аттестации - зачета. На зачете проверяется достижение промежуточных индикаторов компетенций, перечисленных в п.2.

Вопросы для зачета:

Вопросы к разделу Гомогенный катализ:

Основные понятия и определения химической кинетики. Стехиометрия, порядок и молекулярность реакции. Формальная кинетика: способы определения кажущегося порядка реакции; кинетика обратимой и необратимой реакций первого порядка, способы расчета констант скорости из экспериментальных данных (интегральный метод, метод Гугенгейма и др.), условия их применимости; последовательные реакции первого порядка:

лимитирующая стадия; метод стационарных концентраций.

Элементарный акт химической реакции. Теория столкновений. Теория переходного состояния: основные постулаты, статистическая и термодинамическая интерпретация уравнения для константы скорости.

Влияние температуры, давления, ионной силы растворителя на константы скоростей элементарных реакций. Кинетические изотопные эффекты.

Связь структуры и реакционной способности. Принцип линейной зависимости свободной энергии. Уравнения Гаммета и Тафта. Использование корреляционных уравнений для установления механизмов реакций. Нуклеофильная реакционная способность. Понятие о "силе", "жесткости", и "мягкости" льюисовых кислот и оснований.

Катализ. Ковалентный (нуклеофильный, электрофильный, катализ сближением) кислотно-основной гомогенный катализ. Примеры реакций и способы доказательства механизмов. Анализ рН-зависимостей наблюдаемых констант скорости. Уравнение Бренстеда: качественная интерпретация и смысл параметров. Металлокомплексный гомогенный катализ в реакциях переноса ацильной группы; активация субстрата и нуклеофила. Понятие о каталитической активации малых молекул (H_2 , O_2 , N_2 , C_2H_2).

Вопросы к разделу Стационарная и предстационарная кинетика, гидролиза п-НФТМА, катализируемого α -химотрипсином:

Двухстадийная схема ферментативной реакции (схема Михаэлиса-Ментен). Уравнение Михаэлиса-Ментен. Принцип стационарности. Схема Анри (в стационарном режиме). Определение кинетических параметров ферментативных реакций из экспериментальных данных. Физический смысл K_M и $k_{кат}$. Интегральный анализ кинетики действия ферментов. Кинетика ферментативных реакций при избытке фермента.

Трехстадийная схема ферментативной реакции. Понятие о лимитирующих стадиях. Физический смысл K_M и $k_{кат}$ в трехстадийных ферментативных реакциях. Методические подходы к определению констант элементарных стадий.

Предстационарная кинетика ферментативных реакций с участием одного промежуточного соединения. Кинетические закономерности ферментативных реакций с участием двух промежуточных соединений. Экспериментальные методы предстационарной кинетики. Релаксационные методы.

Вопросы к разделу Ингибирование ферментативных реакций

Классификация эффекторов по механизму действия и кинетическим проявлениям в ферментативных реакциях. Обратимые и необратимые ингибиторы. Задачи, решаемые с использованием ингибиторов различного типа.

Двухкомпонентное ингибирование. Основы анализа топографии активных центров ферментов.

Некинетические методы определения числа центров связывания эффекторов с белками и их характеристик (средства).

Ингибирование и активация субстратом. Ингибирование продуктом

Вопросы к разделу Денатурация и стабилизация ферментов

1. Структурные уровни организации белков: аминокислота, пептидная связь, первичная и вторичная структура, домены, третичная и четвертичная структура. Полиферментные комплексы. Конформация белка. Методы изучения структуры белков.

2. Синтез и самоорганизация белковых молекул. Биосинтез (репликация-транскрипция-трансляция), химический и клеточный синтез. Термодинамический и кинетический КОНТРОЛЬ сворачивания белков, посттрансляционная модификация и ПРОЦЕССИНГ. Генетическая инженерия и сайт-направленный мутагенез.

3 Стабильность белковой молекулы. Силы, поддерживающие нативную, конформацию фермента. Денатурация и инактивация Фермента. Денатурация как процесс нарушения структуры белка. Кооперативный характер денатурации. Взаимосвязь термодинамических параметров денатурации и способы их определения.

4. Молекулярные механизмы термоинактивации ферментов и методы их установления. Обратимая и необратимая инактивация (конформационный, агрегационный, химические механизмы). Влияние низкомолекулярных веществ на конформацию и стабильность Фер-

мента (соли: электростатические и специфические взаимодействия, РЯДГоффмейстера. Денатуранты, органические растворители, поверхностно-активные вещества). Влияние pH.

5 Методы стабилизации Ферментов. Химическая модификация, генноинженерные подходы. Химические и Физические методы иммобилизации. Адсорбционная и ковалентная иммобилизация. Носители, методы их активации. Иммобилизация Ферментов путем включения в гель. Использование полупроницаемых мембран, систем двухфазного типа. Кинетико-термодинамические закономерности катализа иммобилизованными ферментами (диффузионные ограничения, стерические Факторы).

Вопросы к разделу Стационарная кинетика двухсубстратных ферментативных реакций, дискриминация возможных механизмов
Классификация кинетических механизмов двухсубстратных ферментативных реакций. Представление многосубстратных ферментативных реакций с помощью схем Келланда. Общие основы метода графов для вывода уравнений зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстратов. Вывод с помощью метода графов уравнения для скорости реакции в случае двухсубстратного упорядоченного кинетического механизма с образованием тройного комплекса. Вывод с помощью метода графов уравнения скорости реакции для двухсубстратного механизма «пинг-понг» (с замещением). Вывод уравнения скорости реакции для двухсубстратного неупорядоченного кинетического механизма в квазиравновесном режиме. Определение констант в уравнении скорости реакции для двухсубстратных реакций. Методы линеаризации уравнения Михаэлиса-Ментен. Статистическая обработка экспериментальных данных. Статистические веса для различных методов линеаризации уравнения Михаэлиса-Ментен. Определение порядка присоединения субстратов для двухсубстратного упорядоченного кинетического механизма с образованием тройного комплекса с помощью альтернативных субстратов. Определение порядка присоединения субстратов и отщепления продуктов с помощью ингибирования продуктами реакции и аналогами субстратов. Кинетика изотопного обмена при равновесии. Определение лимитирующей стадии в многосубстратных ферментативных реакциях.

Вопросы к разделу Иммуноферментный анализ

Структура и свойства антител и антигенов: основные иммунохимические понятия; биосинтез антител; структура и специфичность антигенов; общая структурная характеристика молекул иммуноглобулинов; первичная структура легких и тяжелых цепей иммуноглобулинов; трехмерная структура иммуноглобулинов; антигенсвязывающие центры антител.

Физико-химические закономерности взаимодействия антиген-антитело;

иммунологическая специфичность; взаимодействие антигена с субпопуляцией антител; методы определения аффинности антител; способы расчета, констант комплексообразования реакции антиген-антитело; кинетические закономерности реакции антиген антитело.

Ферменты как метки в иммуноанализе: основные физико-химические и каталитические свойства ферментов; ферменты, используемые в качестве меток в ИФА; методы определения активности пероксидазы, щелочной фосфатазы, глюкозооксидазы.

Методы иммуноферментного анализа; классификация методов ИФА; гомогенные и гетерогенные методы, конкурентные и неконкурентные методы; сравнительная оценка различных схем проведения ИФА; твердофазный иммуноферментный анализ в проточных системах.

Вопросы к разделу Выделение ферментов, определение их биохимических и каталитических свойств

Источники ферментов и их специфика. Принципы выбора источника для выделения требуемого фермента. Внутриклеточные, мембранные и секретируемые ферменты.

Гомогенизация биоматериала: приемы и оборудование. Приготовление грубых экстрактов.

Основные лабораторные приемы, используемые при очистке ферментов. Фильтрация, центрифугирование, диализ, гель- и ультрафильтрация, лиофилизация. Аналитические методы, используемые при определении концентрации белков в растворе.

Разделение белков путем осаждения. Изоэлектрическое осаждение, высаливание, осаждение органическими растворителями. Денатурация балластных белков под действием температуры, органических растворителей и путем изменения pH.

Хроматография. Основные принципы и элементы теории элюции. Матрицы для хроматографии. Виды хроматографической элюции. Матрицы для хроматографии. Хроматография высокого давления. Методы детектирования.

Ионообменная хроматография. Основные принципы. Сильные и слабые ионообменники. Факторы среды и свойства белков, влияющие на эффективность разделения. Изократическая и градиентная элюция.

Гель-проникающая (эксклюзионная) хроматография. Разделение макромолекул и обессоливание белков. Требования к проведению хроматографического процесса. Факторы, мешающие проведению качественного разделения. Определение параметров колонки. Определение молекулярной массы белков.

Гидрофобная хроматография. Основные принципы. Свойства функциональных групп носителей для гидрофобной хроматографии. Влияние температуры и значения pH на гидрофобные взаимодействия. Ослабление гидрофобных взаимодействий и элюирование.

Аффинная хроматография. Основные принципы. Эффективность очистки. Групповая аффинность.

Электрофоретические методы. Препаративный и аналитический электрофорез. Нативный электрофорез и электрофорез в присутствии детергентов. Определение степени гомогенности и молекулярной массы. Изоэлектрофокусирование. Основные принципы и области применения. Изоэлектрофорез.

Методы седиментационного анализа. Скоростная и равновесная седиментация.

Очистка и выделение ферментов при помощи высокоэффективной белковой хроматографии и проведения белкового электрофореза в денатурирующих условиях.

Хроматографическая система среднего давления Pharmacia FPLC. Знакомство с устройством и принципами работы. Основные блоки – насосы, узел ввода образца (инжектор), хроматографические колонки, детектор, коллектор фракций, система управления и программирования. Основы управления хроматографической системой, ручной и автоматический режим, система команд, создание методов.

Подготовка хроматографической системы к работе. Приготовление элюентов, подготовка хроматографических колонок к работе.

Выбор буферных растворов, буфер для нанесения образца, выбор элюирующего буфера. Подготовка и нанесение образца, элюирование связавшихся белков, сбор фракций. Регенерация колонки и консервация системы по окончании работы.

Проведение электрофореза белков в присутствии додецилсульфата натрия (электрофорез в денатурирующих условиях). Знакомство с оборудованием. Приготовление и заливка гелей. Подготовка образцов для электрофореза, осаждение и концентрирование. Проведение электрофореза, фиксация и окрашивание белковых полос. Отмывка и хранение. Построение градуировочного графика с использованием белков-маркеров. Расчет молекулярной массы определяемых белков.

Измерение ферментативных активностей. Подбор разбавлений растворов ферментов. Определение фона фермента и субстрата. Расчет активности ферментов.

Введение в масс-спектрометрию биомолекул, основные понятия (молекулярный ион, базовый пик, относительная интенсивность, разрешение).

Составные части масс-спектрометра. Источники ввода и ионизации образца, границы применения. Электронная и химическая ионизация, основные принципы. Электроспрей. MALDI, основные принципы, типы матриц. Масс-анализаторы: квадруполь, ионная ловушка, времяпролетный, ячейка ион-циклотронного резонанса. Разрешение и диапазон m/z . Тандемные / гибридные системы. Варианты сопряжения источника ионов и масс-анализатора.

Протеомные исследования. Разделение белков хроматографическими и электрокинетическими методами. Специфичность протеаз, получение пептидов. Идентификация белка по пептидному отпечатку.

Принципы дефрагментации пептидов. Установление первичной последовательности по масс-спектрометрическим данным.

Вопросы к разделу Методы микробиологии и генетической инженерии

Основные методы работы с микроорганизмами. Стерилизация посуды и сред для культивирования. Выращивание бактерий (*E. coli*) на жидкой и агаризованной средах. Определение численности бактерии.

Основные представления о клонировании генов. Идентификация рекомбинантных клонов, обладающих целлюлолитической активностью. Выделение плазмидной ДНК. Рестрикционный анализ ДНК. Электрофорез в агарозном геле.

Определение целлюлолитической активности в клеточных экстрактах.

Вопросы к разделу Основы флуоресцентной спектроскопии биологических объектов. Структурно-функциональные исследования и аналитические применения

Фотофизика процессов фотолюминесценции. Диаграмма энергетических уровней (флуоресценция, фосфоресценция, замедленная флуоресценция), кинетика затухания фотолюминесценции, возбуждение и эмиссия, релаксация растворителя, процессы тушения фотолюминесценции, перенос протона в возбужденном состоянии, ферстеровский перенос энергии, поляризация флуоресценции, фотолюминесценция биологических объектов, аминокислоты, НАДН, флавины, порфирины, хлорофиллы, люциферины, зеленый белок, фикобиллипротеины

Методические материалы для проведения процедур оценивания результатов обучения

Шкала оценивания знаний, умений и навыков является единой для всех дисциплин (приведена в таблице ниже)

ШКАЛА И КРИТЕРИИ ОЦЕНИВАНИЯ РЕЗУЛЬТАТА ОБУЧЕНИЯ по дисциплине (модулю)				
Оценка \ Результат	2	3	4	5
Знания	Отсутствие знаний	Фрагментарные знания	Общие, но не структурированные знания	Сформированные систематические знания
Умения	Отсутствие умений	В целом успешное, но не систематическое умение	В целом успешное, но содержащее отдельные пробелы умение (допускает неточности непринципиального характера)	Успешное и систематическое умение
Навыки (владения)	Отсутствие навыков	Наличие отдельных навыков	В целом, сформированные навыки, но не в активной форме	Сформированные навыки, применяемые при решении задач

РЕЗУЛЬТАТ ОБУЧЕНИЯ по дисциплине (модулю)	ФОРМА ОЦЕНИВАНИЯ
<p>Уметь: проводить математическую обработку физико-химических данных, обобщать полученные результаты</p> <p>Уметь: самостоятельно применять знания о строении и биологических функциях основных классов биоорганических соединений, свойствах микроорганизмов, способах регуляции биохимических процессов, основных направлениях современной биотехнологии и прикладной биохимии с целью решения профессиональных задач</p> <p>Уметь: анализировать экспериментальные данные и делать выводы о физико-химических закономерностях действия ферментов</p> <p>Уметь: применять методологию геномной инженерии и компьютерного моделирования биоструктур к решению профессиональных задач</p> <p>Уметь: составлять план исследования биосистемы современными физико-химическими методами</p>	<p>мероприятия текущего контроля успеваемости, устный опрос на зачете</p>
<p>Владеть: Навыками самостоятельного анализа задач современной биотехнологии и прикладной биохимии</p> <p>Владеть: методологией исследования физико-химических закономерностей действия ферментов</p> <p>Владеть: методологией современной геномной инженерии и навыками компьютерного моделирования биоструктур</p> <p>Владеть: методологией физико-химических методов анализа биосистем в рамках решения профессиональных задач</p>	<p>мероприятия текущего контроля успеваемости, устный опрос на зачете</p>