

Федеральное государственное бюджетное образовательное  
учреждение высшего образования  
«МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ М.В.ЛОМОНОСОВА»

ФИЛИАЛ МГУ В Г. ГРОЗНОМ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель директора филиала – руководитель  
образовательных программ  
А. С. Воронцов



20\_\_ г.

**РАБОЧАЯ ПРОГРАММА ДИСЦИПЛИНЫ**

Наименование дисциплины:

**Методы современной биологии и биотехнологии**

Уровень высшего образования:  
**Специалитет**

Специальность:  
**06.05.02 Фундаментальная и прикладная биология**

Направленность (профиль)/специализация образовательной программы:  
**Биотехнология**

Форма обучения:  
**Очная**

Москва 2024

Рабочая программа дисциплины разработана в соответствии с самостоятельно установленным МГУ образовательным стандартом (ОС МГУ) для реализуемых основных профессиональных образовательных программ высшего образования по специальности 06.05.02 «ФУНДАМЕНТАЛЬНАЯ И ПРИКЛАДНАЯ БИОЛОГИЯ» (образовательная программа специалитета «Биотехнология»).

ОС МГУ утвержден решением Ученого совета МГУ имени М.В.Ломоносова 20.01.2022 года.

Год приема на обучение 2024

## 1. Место дисциплины в структуре ОПОП

Дисциплина относится к обязательной части ОПОП ВО, раздел учебного плана: Вариативная часть, реализуется в 6 семестре.

Цели. Целью освоения дисциплины «Методы современной биологии» является изучение теоретических основ, практических возможностей и ограничений важнейших для биологов методов исследования, изучение современных экспериментальных подходов и условий проведения эксперимента, умение интерпретировать и грамотно оценивать экспериментальные данные.

Задачи.

1. освоение принципов современных физико-химических методов, применяемых в биологии;
2. ознакомление с принципами анализа данных, получаемых при исследовании биосистем различными физико-химическими методами;
3. формирование навыков оценки применимости и сопоставления эффективности различных физико-химических методов для исследования биологических систем на разных уровнях организации.

## 2. Входные требования

Перед началом освоения дисциплины «Методы современной биологии и биотехнологии» студент должен изучить следующие дисциплины: «Высшая математика», «Физика», «Физическая химия», «Аналитическая химия», «Клеточная биология»

## 3. Планируемые результаты обучения по дисциплине, соотнесенные с требуемыми компетенциями выпускников

Компетенция	Индикатор достижения компетенции	Планируемые результаты обучения по дисциплине (модулю), соотнесенные с индикаторами достижения компетенций
<b>ОПК-8.</b> Способен использовать и развивать новые представления и методы в области генетики, биотехнологии, биоинженерии,	<b>ОПК-8.3.</b> Использует физические, физико-химические, биофизические, молекулярно-биологические, биоинженерные методы для решения профессиональных задач	<b>Знает:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• основы методов оптической спектроскопии, спектроскопии комбинационного рассеяния, спектроскопии ядерного магнитного резонанса и спектроскопии электронного парамагнитного резонанса</li> </ul>

биоинформатики, синтетической биологии, моделирования биологических процессов для решения фундаментальных и прикладных проблем биологии и экологии (в том числе биомедицинских);	исследования биологических систем.	метода атомно-силовой микроскопии, метода лазерной интерференционной микроскопии. <ul style="list-style-type: none"> <li>о возможностях биофизических методов в решении биологических и биофизических проблем</li> </ul> <b>Умеет:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>сделать оптимальный выбор методов для решения поставленных задач и делать заключения на основании анализа и сопоставления всей совокупности имеющихся данных</li> </ul> <b>Владеет:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>навыками работы на современном научном оборудовании</li> </ul>
--	------------------------------------	--

#### 4. Объем дисциплины

Объем дисциплины - 3 з.е. (108 ак.ч), из них 72 ак.ч - контактная работа обучающихся с преподавателем на занятиях семинарского типа (лабораторные занятия - 72 ак.ч). Самостоятельная работа обучающихся - 36 ак.ч. Форма промежуточной аттестации - зачет (6 семестр).

#### 5. Форма обучения - очная

#### 6. Содержание дисциплины, структурированное по темам (разделам) с указанием отведенного на них количества академических часов, и виды учебных занятий

№ п/п	Раздел дисциплины	Занятия семинарского типа (Лабораторные занятия), ак.ч.	Самостоятельная работа обучающегося, ак.ч.
1.	Биоэлектрохимические методы. Примеры использования электродных методов. Примеры влияния электрических потенциалов на физиологические процессы в растениях. Электроды сравнения. Внутриклеточные измерения мембранного потенциала. Внеклеточная регистрация изменений	12	6

	<p>мембранного потенциала (МП). Метод локальной фиксации напряжения (пэтч-кламп). Емкостной ток липидных (БЛМ) и природных мембран. Метод фиксации напряжения. Ионоселективные электроды: рН-метрия. Амперометрические датчики: определение кислорода. Электродные методы в изучении липидных нанотрубок. Вибрирующие микроэлектроды</p>		
2.	<p>Оптическая спектроскопия. Абсорбционная спектроскопия. Спектрофлуориметрия. Основы лазерной спектроскопии биологических молекул. Флуоресцентные методы биомониторинга и биотестирования фототрофных организмов. Примеры использования лазерной техники для изучения биологических молекул, реакций и процессов.</p>	12	6
3.	<p>Радиоспектроскопия. Спектроскопия электронного парамагнитного резонанса. Спектроскопия ядерного магнитного резонанса</p>	12	6
4.	<p>Спектроскопия комбинационного рассеяния. Применение спектроскопии комбинационного рассеяния в биомедицинских исследованиях. Спектроскопия гигантского (поверхностно-усиленного) комбинационного рассеяния (surface-enhanced Raman spectroscopy, SERS) в биомедицинских исследованиях.</p>	12	6
5.	<p>Оптическая микроскопия. Методы оптической микроскопии и области их применения. Флуоресцентная микроскопия. Конфокальная микроскопия. Электронная микроскопия. Атомно-силовая микроскопия.</p>	12	6
6.	<p>Метод молекулярной динамики. Основы метода молекулярной динамики. Молекулярная динамика в биологии.</p>	12	6

	<b>Итого:</b>	<b>72</b>	<b>36</b>
--	---------------	-----------	-----------

## **6.1. Содержание дисциплины по разделам/темам**

### Тема 1. Примеры использования электродных методов

Исследование методом пэтч-кламп ионных каналов разных типов (каналы, управляемые электрическим полем, связыванием лигандов, механо- и фоточувствительные). Внеклеточная регистрация токов в суспензиях клеток и органелл (метод светового градиента). Канальные родопсины и перспективы их применения.

### Тема 2. Примеры влияния электрических потенциалов на физиологические процессы в растениях

Роль ионных насосов в открывании устьиц; быстрые движения листьев мимозы и насекомоядных растений; изменения фотосинтеза при потенциале действия.

### Тема 3. Электроды сравнения

Хлорсеребряный неполяризующийся электрод. Произведение растворимости AgCl. Выбор KCl для заполнения электрода (диффузионный потенциал). Каломельный электрод.

### Тема 4. Внутриклеточные измерения мембранного потенциала

Особенности: высокое сопротивление микропипеток ( $10^8$  Ом) определяет необходимость высокого входного сопротивления усилителя ( $>10^{10}$  Ом). Временное разрешение метода –  $10^{-3}$  с (лимитирующие факторы). Измерения проводимости и емкости клеточных мембран: метод фиксации тока. Эквивалентная электрическая схема. Полный ток как сумма емкостного тока и тока проводимости. Постоянная времени мембраны  $\tau = R_m C_m$ .

### Тема 5. Внеклеточная регистрация изменений мембранного потенциала (МП)

Схема измерений. Изолирующие мостики. Знак и амплитуда изменений МП в разных частях цилиндрической клетки при пропускании импульса тока. Регистрация моно- и биполярных изменений электрического потенциала при генерации потенциала действия (ПД). Изменения сопротивления плазмалеммы при генерации ПД. Роль локальных токов в распространении ПД.

### Тема 6. Метод локальной фиксации напряжения (пэтч-кламп)

Электрическая схема измерений. Падение напряжений на разных участках прикрепленной клетки. Конфигурации измерений и формы токовых ответов при сдвигах потенциала в разных измерительных конфигурациях. Сопротивление межклеточных контактов.

### Тема 7. Емкостной ток липидных (БЛМ) и природных мембран

Схема измерения проводимости плоских БЛМ. Возрастание емкостного тока как критерий формирования БЛМ. Кинетические кривые трансмембр. тока при наложении на БЛМ импульсов электрического поля разной формы (импульс треугольной, прямоугольной и синусоидальной формы). Изменения емкости мембран при эндо- и экзоцитозе.

### Тема 8. Метод фиксации напряжения

Принцип метода. Устранение емкостного тока. Выведение ионных токов во внешнюю цепь. Протекание емкостных и ионных токов в состоянии покоя, при генерации

потенциала действия и в режиме фиксации напряжения. Описание ионных токов возбудимой мембраны соотношениями типа  $I = g(V - E_i)$ .

#### Тема 9. Ионоселективные электроды: рН-метрия

Стеклянный электрод. Изменения потенциала стеклянного электрода в зависимости от концентрации ионов. Влияние посторонних ионов. Обмен протонов на границе раздела стекло-раствор. Сравнение функциональных характеристик рН электрода и флуоресцентных зондов (на основе флуоресцеина). Применение электродных микросенсоров рН в биологических исследованиях. Влияние рН на содержание  $\text{CO}_2$ , бикарбоната и карбонат-ионов в растворах при равновесии с воздухом. Образование на свету неоднородного профиля рН вдоль клеток харовых водорослей как способ преобразования непроникающих форм неорганического углерода в свободно проникающую через мембраны углекислоту – субстрат фотосинтеза. Локальные изменения рН при микроповреждении клеток.

#### Тема 10. Амперометрические датчики: определение кислорода

Платиновый электрод. Вольт-амперная характеристика Pt электрода в паре с Ag/AgCl электродом. Устройство кларковского  $\text{pO}_2$  электрода. Выделение и поглощение  $\text{O}_2$  при освещении изолированных хлоропластов в присутствии разных акцепторов электронов (феррицианид, метилвиологен). Кислородный микроэлектрод. Локальные изменения концентрации  $\text{O}_2$  при микроповреждении клетки харовой водоросли.

#### Тема 11. Электродные методы в изучении липидных нанотрубок

Вытягивание нанотрубок из однослойных липосом с помощью стеклянных микропипеток. Доказательство наличия внутреннего просвета (распределение красителя между липосомами, объединенными нанотрубкой; зависимости проводимости трубки от ее длины и площади сечения). Нанотрубки как модель для изучения отшнуровки везикул при экзо- и эндоцитозе.

#### Тема 12. Вибрирующие микроэлектроды

Картирование локальных круговых токов, протекающих между разными участками пространственно неоднородных клеток. Круговые токи в клетках харовых водорослей. Вибрирующие ион-селективные микроэлектроды.

*Задания для самостоятельной работы:*

Проводимость мембран в переменном электрическом поле разных частот. Простейшая эквивалентная электрическая схема мембраны. Импеданс, дисперсия электропроводности.

Схема возбудимой мембраны (по Ходжкину-Хаксли). Значения потенциала в покое и при возбуждении. Равновесные потенциалы. Проводимости для ионов  $\text{K}^+$  и  $\text{Na}^+$ .

Влияние внешнего электрического поля на клетки и клеточные мембраны. Образование цепочек клеток в направлении силовых линий поля. Сжатие клеток с силой  $F \sim E^2$ . Диэлектрофорез и электровращение. Электрический пробой везикул (липосом) и клеточных мембран. Сдвиг мембранного потенциала сферической клетки как функция напряженности поля и радиуса сферы. Электрослияние клеток и липосом.

## **Раздел II. Оптическая спектроскопия**

### Тема 1. Абсорбционная спектроскопия

Световое излучение. Спектральный состав излучения. Взаимодействие света с веществом. Поглощение света молекулами. Возбужденные электронные состояния. Диаграмма Яблонского. Дипольный момент перехода. Условия поглощения электромагнитного излучения. Количественные законы поглощения светового

излучения. Закон Бугера–Ламберта–Бера. Спектры поглощения. Качественный спектрофотометрический анализ. Количественный спектрофотометрический анализ. Спектры поглощения биологически важных соединений. Спектры молекул, содержащих гетероатомы (O, N), входящие в систему сопряженных связей или непосредственно примыкающие к ней. Влияние растворителя на спектры поглощения. Спектры поглощения эксимеров.

Трудности при измерении спектров поглощения биологических объектов. Оптическая спектроскопия мутных сред. Прохождение света через оптически неоднородную среду. Увеличение длины оптического пути света за счет многократного рассеяния в суспензиях и биологических тканях (лист растений как ловушка для света). Спектроскопия отражения биологических объектов (Оптические свойства растительных организмов). Определение спектрального коэффициента поглощения суспензий и биологических тканей с учетом рассеяния. Способ определения спектрального коэффициента поглощения суспензий и биологических тканей путем измерения коэффициентов отражения и пропускания. Способ компенсации спектров поглощения на рассеяние. Особенности спектроскопии поглощения в полости интегрирующей сферы.

### Тема 2. Спектрофлуориметрия

Равновесное излучение Солнца и распределение энергии в спектре излучения абсолютно черного тела. Электронные переходы в возбужденной молекуле. Законы флуоресценции. Спектры флуоресценции. Регистрация спектров флуоресценции. Флуоресцентная микроскопия. Влияние микроокружения на спектры и квантовые выходы флуоресценции. Эндогенная флуоресценция. Флуоресцентные зонды и метки. Резонансная передача энергии. Миграция энергии. Спектры возбуждения флуоресценции. Эффект экранирования флуоресценции. Явление реабсорбции флуоресценции. Флуоресценция хлорофилла как показатель функционального состояния ФСА. Хемилюминесценция и применение.

### Тема 3. Флуоресцентные методы биомониторинга и биотестирования фототрофных организмов

Природа генерации быстрой и замедленной флуоресценции в растворах. Механизм быстрой флуоресценции хлорофилла в фотосинтетических мембранах. Методы регистрации различных параметров флуоресценции растений и водорослей. Метод оценки фотосинтетической продукции фитопланктона. Биоиндикация растительных организмов с использованием флуоресцентной аппаратуры. Природа генерации замедленной флуоресценции и термолюминесценция хлорофилла в фототрофных организмах. Применение замедленной флуоресценции и термолюминесценция для индикации физиологического состояния растений и природного фитопланктона.

### Тема 4. Основы лазерной спектроскопии биологических молекул

Генерация лазерного излучения и коротких (пико- и фемтосекундных) лазерных импульсов. Однофотонное и двухфотонное поглощение лазерного излучения, генерация второй гармоники и суперконтинуума. Преимущества двухфотонной лазерной микроскопии. Радиационные и нерадиационные каналы дезактивации возбужденного состояния. Методы регистрации изменений поглощения и флуоресценции для оценки времени жизни возбужденного состояния биологических молекул с помощью импульсного возбуждения короткими и сверхкороткими импульсами света. Анизотропия флуоресценции и скорость вращения молекул. Методы термооптической спектроскопии, основанные на регистрации изменений показателя преломления. Термофорез. Спектроскопия комбинационного рассеяния.

Плазмонный резонанс. Принцип функционирования оптического пинцета и оптического скальпеля. Фотостабильность и фотосенсибилизированная генерация активных форм кислорода.

#### Тема 5. Примеры использования лазерной техники для изучения биологических молекул, реакций и процессов

Флуоресцентное мечение, флуоресцентные и фотоактивные белки. Цитометрия. Получение 2D, 3D и nD изображений с помощью различных видов лазерной сканирующей микроскопии. Оценка эффективности донорно-акцепторных взаимодействий, определение межмолекулярных расстояний и визуализация комплексов биологических молекул с помощью теории индуктивно-резонансного переноса энергии (теория Ферстера). Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy и Phosphorescence Lifetime Imaging Microscopy (FLIM/PLIM) для визуализации метаболических процессов в клетках с помощью флуоресцентной микроскопии. Использование лазерного пинцета для измерения силы взаимодействия между молекулами и клетками.

*Задания для самостоятельной работы:*

Дифференциальная спектрофотометрия.

Биолюминесценция и применение.

Биотестирование загрязнений окружающей среды флуоресцентными методами.

Применение наночастиц (квантовые точки, апконвертеры) в лазерной сканирующей микроскопии.

Рамановская микроскопия.

### **Раздел III. Радиоспектроскопия**

#### Тема 1. Основы радиоспектроскопии. Спектроскопия ЭПР

Магнитные свойства веществ. Орбитальный и спиновый угловые моменты электрона. Спиновый и орбитальный магнитные моменты. Соотношение между угловыми и магнитными моментами электронов.  $g$ -Фактор. Магнитные моменты в магнитном поле. Взаимодействие магнитных моментов с электромагнитным излучением. Принцип электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). Блок-схема спектрометра ЭПР.

Спин-решеточное и спин-спиновое взаимодействие. Времена спин-решеточной и спин-спиновой релаксации. Механизмы спин-решеточной и спин-спиновой релаксации. Ширина линии. Связь ширины линии с временами спин-решеточной и спин-спиновой релаксации. Интенсивность сигнала ЭПР. Определение количества парамагнитных частиц в образце. Форма линии ЭПР.

Сверхтонкое взаимодействие электронов и ядер. Механизмы сверхтонкого взаимодействия. Сверхтонкая структура в спектрах ЭПР. Энергетические уровни неспаренных электронов при взаимодействии с ядрами с различными спинами. Эквивалентные и неэквивалентные протоны. Изотропная и анизотропная сверхтонкая структура. Анализ сверхтонкой структуры. Проблемы регистрации разрешенных спектров ЭПР в биологических системах. Причины анизотропии спектров ЭПР: анизотропия сверхтонкого взаимодействия и  $g$ -фактора.

Метод спиновых зондов и меток. Вещества, применяемые в качестве спиновых меток и зондов. Требования к их химическим свойствам. Особенности сигналов ЭПР зондов и меток. Применение зондов и меток в исследовании структурно-динамических свойств биомакромолекул и биомембран.

Применение ЭПР в биологии. Особенности биологических образцов.

Современные направления развития экспериментальной техники ЭПР. Использование различных частотных диапазонов.



Сигналы ЭПР растительных и животных тканей. Природа парамагнитных центров, обуславливающих эти сигналы. Использование низкотемпературной техники при регистрации сигналов ЭПР парамагнитных ионов. Основные направления применения ЭПР в биологии. Примеры исследования радиобиологических, фотобиологических и ферментативных процессов.

### Тема 2. Спектроскопия ЯМР

Принцип метода ядерного магнитного резонанса (ЯМР). Спины ядер. Магнитный момент ядра. Поведение магнитного момента ядра в магнитном поле. Макроскопическая намагниченность. Лабораторная и подвижная система координат. Эффективное магнитное поле. Спин-решеточная и спин-спиновая релаксация. Уравнения Блоха. Стационарный и импульсный методы регистрации сигналов ЯМР. Импульсная Фурье-спектроскопия ЯМР. Импульсные методы регистрации времен спин-спиновой и спин-решеточной релаксации.

Ширина линии ЯМР. Связь ширины линии с временами спин-решеточной и спин-спиновой релаксации. Понятие о квадрупольной релаксации. Интенсивность сигналов ЯМР. Аппаратурные причины уширения линий.

Химический сдвиг. Природа химического сдвига. Составляющие химического сдвига. Примеры химических сдвигов различных ядер. Спин-спиновое взаимодействие и его отражение в спектрах ЯМР.

Особенности сигналов ЯМР в жидкостях и твердых телах. Современные методы регистрации разрешенных спектров ЯМР в твердых телах. Двумерная спектроскопия ЯМР.

Основные направления использования ЯМР в биологии и медицине. Применение ЯМР в изучении структурно-динамических свойств макромолекул и биомембран. Современное состояние применения ЯМР в биологии и медицине.

#### *Задания для самостоятельной работы:*

Спиновые ловушки. Принцип метода. Актуальность использования спиновых ловушек в исследовании интактных биологических систем. Примеры применения спиновых ловушек в регистрации короткоживущих свободных радикалов.

ЯМР-томография.

## **Раздел IV. Спектроскопия комбинационного рассеяния (КР)**

### Тема 1. Применение спектроскопии комбинационного рассеяния в биомедицинских исследованиях

Основы метода спектроскопии КР. Биомедицинские задачи, которые могут быть решены при помощи спектроскопии КР. Преимущества и недостатки спектроскопии КР по сравнению с флуоресцентной спектроскопией и ИК-спектроскопией. Особенности построения эксперимента с использованием спектроскопии КР. Анализ данных, полученных методом спектроскопии КР, и сопоставление результатов с данными других методов. Примеры использования спектроскопии КР в биологии: исследование гемосодержащих белков, изолированных клеток, перфузированного сердца, срезов мозга.

### Тема 2. Спектроскопия гигантского (поверхностно-усиленного) комбинационного рассеяния (surface-enhanced Raman spectroscopy, SERS) в биомедицинских исследованиях

Эффект плазмонного резонанса и плазмона, лежащие в основе метода SERS. Спектр физических, химических и биологических задач, решаемых SERS. Наноструктуры, обладающие поверхностным плазмоном. Примеры SERS-сенсоров на основе наночастиц серебра и золота для определения внутриклеточной концентрации ионов

H<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, активных форм кислорода. Использование метода SERS для исследования конформационных изменений мембранных белков при их функционировании.

*Задания для самостоятельной работы:*

Использование SERS для исследования переноса электронов в дыхательной цепи митохондрий.

## **Раздел V. Оптическая микроскопия**

### Тема 1. Методы оптической микроскопии и области их применения

Широкопольная микроскопия проходящего и отраженного света, методы микроскопии фазовых объектов, широкопольная флуоресцентная микроскопия, лазерная сканирующая конфокальная микроскопия, многофотонная флуоресцентная микроскопия, методы флуоресцентной микроскопии сверхвысокого разрешения, проточная флуоресцентная цитометрия.

Световой микроскоп: его устройство и принцип работы. Основные характеристики светового микроскопа и его элементов: увеличение, числовая апертура, разрешающая способность, диск Эйри. Объекты и задачи световой микроскопии.

### Тема 2. Флуоресцентная микроскопия

Спектральные параметры, используемые во флуоресцентной микроскопии. Устройство флуоресцентного микроскопа. Объекты и задачи флуоресцентной микроскопии. Флуоресцирующие соединения, флуоресцентные метки и флуоресцентные молекулярные инструменты. Фёрстеровский резонансный перенос энергии и его применения во флуоресцентной микроскопии.

### Тема 3. Конфокальная микроскопия

Принципы конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. Недостатки конвенциональной флуоресцентной микроскопии; преимущества конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. Строение конфокального лазерного сканирующего микроскопа. Основные приёмы работы с конфокальным микроскопом. Получение 3-мерных изображений; исследования подвижности молекул в живой клетке методом восстановления флуоресценции после отбеливания; изучение взаимодействия макромолекул в живой клетке методом безызлучательного переноса энергии по Фёрстеру.

## **Раздел VI. Электронная микроскопия**

Устройство просвечивающего электронного микроскопа. Типы электронных детекторов. Подготовка образцов для просвечивающей электронной микроскопии (негативное контрастирование, крио-электронная микроскопия). Отличия сканирующей и просвечивающей электронной микроскопии. Рассеяние электронов. Фазовый и амплитудный контраст. Обработка изображений, полученных с помощью просвечивающей электронной микроскопии, и получение трёхмерных реконструкций молекул. Интерпретация реконструкций в зависимости от разрешения. Преимущества и недостатки метода крио-электронной микроскопии для определения структур белков в сравнении с методами рентгеноструктурного анализа и ЯМР.

## **Раздел VII. Атомно-силовая микроскопия**

Конструкция атомно-силового микроскопа (АСМ): кантилевер, лазерно-оптическая система, пьезосканер. Основные режимы сканирования: контактный, полуконтактный. Изображения микрорельефа поверхности и их представление. Примеры применения АСМ для визуализации биологических объектов: ДНК, белков, ДНК-белковых

комплексов, наночастиц, вирусов, бактерий, эукариотических клеток. Уширение, связанное с конечным радиусом кривизны кантилевера. Особенности проведения измерений в жидкости. Силовая спектроскопия для измерения локальных механических свойств объектов. Измерение модуля Юнга клеток. Нанохирургия с помощью атомно-силового микроскопа.

Силовая спектроскопия для измерения адгезии. Измерение межмолекулярных взаимодействий с помощью АСМ. Предельное разрешение: примеры применения АСМ для визуализации отдельных молекул, псевдоатомное разрешение. Типы и параметры кантилеверов. Рекомендации по выбору и использованию кантилеверов. Новые тенденции в развитии атомно-силовой микроскопии. Быстрая атомно-силовая микроскопия для визуализации динамических процессов. Совмещение атомно-силовой микроскопии с другими аналитическими методами: оптической микроскопией, спектроскопией комбинационного рассеяния света. Режим быстрой съемки силовых кривых.

## **Раздел VIII. Метод молекулярной динамики**

### Тема 1. Основы метода молекулярной динамики

Метод молекулярной динамики и его приложения к исследованию биологических систем – конформационной подвижности белков, биологических мембран, взаимодействия биомолекул. Молекулярно-динамические модели: с неявно- и явно заданными молекулами растворителя, полноатомное и крупнозернистое моделирование. Моделирование валентных и невалентных взаимодействий, силовые поля, понятия термостата и баростата. Оптимизация геометрии молекулы и собственно молекулярно-динамический расчет.

### Тема 2. Молекулярная динамика в биологии

Применение метода молекулярной динамики к проблеме моделирования взаимодействия электрон-транспортных белков, моделированию клеточной стенки грам-отрицательных бактерий и взаимодействию с ней молекул антимикробных агентов – фталоцианинов.

## **7. Фонд оценочных средств для оценивания результатов обучения по дисциплине:**

### **7.1. Перечень оценочных средств**

Компетенция	Результат обучения по дисциплине (модулю)	Оценочные средства
<b>ОПК-8.</b> Способен использовать и развивать новые представления и методы в области генетики, биотехнологии, биоинженерии, биоинформатики, синтетической биологии, моделирования биологических процессов для решения фундаментальных и	<b>Знает:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>основы методов оптической спектроскопии, спектроскопии комбинационного рассеяния, спектроскопии ядерного магнитного резонанса и спектроскопии электронного парамагнитного резонанса метода атомно-силовой</li> </ul>	• Вопросы для промежуточной аттестации (тестирование, зачет)

<p>прикладных проблем биологии и экологии (в том числе биомедицинских);</p>	<p>микроскопии, метода лазерной интерференционной микроскопии.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>о возможностях биофизических методов в решении биологических и биофизических проблем</li> </ul> <p><b>Умеет:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>сделать оптимальный выбор методов для решения поставленных задач и делать заключения на основании анализа и сопоставления всей совокупности имеющихся данных</li> </ul> <p><b>Владеет навыками:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>работы на современном научном оборудовании</li> </ul>	
---	--	--

## 7.2. Типовые задания и иные материалы, необходимые для оценки результатов обучения

### *Примерные задания промежуточной аттестации (вопросы зачета)*

1. Электроды. неполяризуемый хлорсеребряный электрод сравнения. Устранение диффузионного потенциала. Ионоселективные (рН) электроды; ионный обмен на поверхности стекла. Применение Pt электрода для определения O<sub>2</sub>. Система для электропорации клеток.
2. Эл. свойства плоских бислойных липидных мембран (БЛМ). Схема установки. Критерии формирования БЛМ по данным электродного и оптич. методов. Роль поверхностного натяжения в образовании БЛМ. Сопротивление мембран на переменном токе.
3. Внутриклеточные измерения мембранного потенциала при пропускании эл. тока. Постоянная времени мембраны  $\tau$  ( $\tau_{au}$ ). Кабельные свойства цилиндрических клеток. Кабельное уравнение. Зависимость постоянной длины  $\lambda$  (лямда) от радиуса волокна.
4. Изучение эл. свойств цилиндрических клеток методом фиксации тока и изолирующих мостиков. Сравнение эл. свойств (R и C) внутриклеточных капиллярных микроэлектродов и пипеток для пэтч-кламп регистрации тока и потенциала. Временное разрешение методов.
5. Измерение токов одиночных каналов и интегральных ионных токов методами пэтч-кламп. Применение метода для анализа межклеточных контактов. Чем ограничено применение метода для измерения интегральных токов на разных объектах? Численные примеры.
6. Эквивалентная эл. схема возбудимой мембраны (по Ходжкину-Хаксли). Интерпретация элементов схемы. Равновесные потенциалы. Мембранный потенциал в условиях разомкнутой цепи: его связь с величинами равновесных потенциалов и проводимостей.

7. Метод фиксации напряжения. Схема установки. Преимущества и временное разрешение метода. Описание ионных токов в модели Ходжкина-Хаксли. Вольт-амперные характеристики для натриевого и калиевого тока в аксонах. Определение проводимости по эксп. данным. Воротные токи.
8. Преимущества и недостатки метода крио-электронной микроскопии для определения структур белков в сравнении с методами рентгеноструктурного анализа и ЯМР.
9. Устройство просвечивающего электронного микроскопа. Типы электронных детекторов.
10. Подготовка образцов для просвечивающей электронной микроскопии (негативное контрастирование, крио-электронная микроскопия).
11. Отличия сканирующей и просвечивающей электронной микроскопии. Рассеяние электронов. Фазовый и амплитудный контраст.
12. Обработка изображений, полученных с помощью просвечивающей электронной микроскопии, и получение трёхмерных реконструкций молекул. Интерпретация реконструкций в зависимости от разрешения.
13. Конструкция атомно-силового микроскопа. Основные понятия: кантилевер, пьезосканер, фотодетектор.
14. Основные режимы атомно-силового микроскопа?
15. Физический смысл изображений, получаемых с помощью атомно-силового микроскопа.
16. Примеры применения атомно-силовой микроскопии для исследования отдельных молекул.
17. Примеры применения атомно-силовой микроскопии для исследования клеток.
18. Характеристики светового излучения. Электронные переходы в молекулах. Поглощение монохроматического света растворами. Закон Бугера-Ламберта-Бера.
19. Спектры пропускания и спектры поглощения. Методы измерения спектров поглощения в биологии. Устройство однолучевых и двухлучевых спектрофотометров. Разностная спектрофотометрия.
20. Искажения спектров в биологических объектах. Способы измерения поглощения в суспензии рассеивающих частиц. Применение интегрирующих сфер в спектрофотометрическом анализе.
21. Соотношение между коэффициентами отражения, поглощения и пропускания. Измерение спектров отражения и пропускания. Информация о состоянии растительных организмов, получаемая из спектров отражения.
22. Явление люминесценции. Электронные переходы. Возбужденные молекулы. Время жизни возбужденной молекулы. Законы люминесценции. Принцип Франка-Кондона.
23. Квантовый выход люминесценции. Связь интенсивности люминесценции с концентрацией вещества. Эффекты экранирования и реабсорбции люминесценции. Тушение люминесценции.
24. Приборы для наблюдения люминесценции. Скрещенные светофильтры. Флуоресцентная микроскопия. Устройство спектрофлуориметра. Регистрация спектров люминесценции и спектров возбуждения люминесценции.
25. Флуоресценция хлорофилла для оценки состояния фотосинтетического аппарата высших растений и водорослей.
26. Влияние микроокружения на спектры и квантовый выход люминесценции. Примеры использования методов флуоресцентных зондов и меток.
27. Хемилюминесценция и биолюминесценция. Механизм и энергетика хемилюминесцентной реакции. Устройства для измерения слабых световых потоков.

28. Применение коротких лазерных импульсов для исследования биологических систем. Квантовый выход и время жизни флуоресценции. Кинетика затухания флуоресценции и анизотропии флуоресценции.
29. Индуктивно-резонансный перенос энергии возбуждения (теория Ферстера). Примеры донорно-акцепторных взаимодействий в нативных биологических и гибридных системах. Эффективное сечение поглощения.
30. Природа генерации быстрой и замедленной флуоресценции в растворах.
31. Механизм быстрой флуоресценции хлорофилла в фотосинтетических мембранах.
32. Методы регистрации различных параметров флуоресценции растений и водорослей. Метод оценки фотосинтетической продукции фитопланктона
33. Биоиндикация растительных организмов с использованием флуоресцентной аппаратуры
34. Природа генерации замедленной флуоресценции и термолюминесценция хлорофилла в фототрофных организмах.
35. Применение замедленной флуоресценции и термолюминесценция для индикации физиологического состояния растений и природного фитопланктона
36. Биотестирование загрязнений, флуоресцентными методами.
37. Устройство и основные элементы прямого оптического микроскопа. Объективы для оптической микроскопии: увеличение, числовая апертура, иммерсия.
38. Разрешение оптического микроскопа при наблюдении объектов в проходящем белом свете. Применения широкопольной микроскопии белого света.
39. Амплитудные и фазовые объекты. Микроскопия темного поля: принцип и применения. Метод ультрамикроскопии.
40. Амплитудные и фазовые объекты. Фазово-контрастная микроскопия: принцип и применения. Инвертированный микроскоп: устройство, преимущества и недостатки.
41. Устройство микроскопа для широкопольной флуоресцентной микроскопии. Разрешение флуоресцентного микроскопа.
42. Молекулярные объекты исследования методом флуоресцентной микроскопии: флуоресцирующие ксенобиотики; собственные клеточные флуорофоры.
43. Молекулярные объекты исследования методом флуоресцентной микроскопии: флуоресцентные зонды и сенсоры на основе органических молекул-флуорофоров.
44. Принцип конфокальной фильтрации сигнала. Устройство лазерного сканирующего конфокального микроскопа.
45. Метод лазерной сканирующей конфокальной микроскопии и его основные возможности. Разрешение лазерного сканирующего конфокального микроскопа.
46. Примеры использования спектроскопии КР в биомедицинских исследованиях.
47. Основы метода спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния (SERS). Понятия плазмона и плазмонного резонанса, условие усиления комбинационного рассеяния от исследуемых молекул. Наноструктуры и наночастицы, обладающие плазмонным резонансом. Информация о молекулах и клетках, которую можно получить из спектров ГКР (SERS).
48. Примеры использования спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния (SERS) в биомедицинских исследованиях.
49. Принцип метода электронного парамагнитного резонанса. Условие резонанса. g-фактор. Регистрация спектра ЭПР. Основные характеристики спектра ЭПР. Информация, получаемая из спектра ЭПР.
50. Спин-решеточная и спин-спиновая релаксация. Времена спин-решеточной и спин-спиновой релаксации. Ширина линии в спектре ЭПР. Связь ширины линии с временами спин-решеточной и спин-спиновой релаксации.
51. Сверхтонкое взаимодействие электронов и ядер. Константа СТС.

52. Применение ЭПР в биологии. Особенности биологических образцов. Примеры исследования радиобиологических, фотобиологических и ферментативных процессов.
53. Метод спиновых зондов и меток. Применение зондов и меток в исследовании структурно-динамических свойств биомакромолекул и биомембран.
54. Принцип метода ядерного магнитного резонанса (ЯМР). Квантово-механическая и классическая интерпретация явления ЯМР. Условие резонанса.
55. Регистрация спектров ЯМР. Стационарный и импульсный методы регистрации сигналов ЯМР. Спектр ЯМР. Основные характеристики. Информация, получаемая из спектра ЯМР.
56. Спин-решеточная и спин-спиновая релаксация. Ширина линии ЯМР. Связь ширины линии с временами спин-решеточной и спин-спиновой релаксации. Причины уширения линий.
57. Химический сдвиг. Природа химического сдвига. Факторы, определяющие химический сдвиг. Спин-спиновое взаимодействие.
58. Основные направления использования ЯМР в биологии и медицине. ЯМР-томография.
59. Методы реконструкции изображений в томографии. Виды излучений, используемые для томографии.
60. Рентгеновская компьютерная томография.
61. Магнитно-резонансная томография.
62. Позитронная эмиссионная томография.
63. Однофотонная эмиссионная компьютерная томография.
64. Типы машинного обучения: с учителем (классификация, регрессия), без учителя (кластеризация).
65. Сбор и очистка данных. Визуальный анализ данных, их распределение, статистики. Отбор и определение признаков, которые будут использоваться для построения моделей. Разделение на данные для обучения модели и тестовые. Оценка результата на тестовых данных. Интерпретация полученной модели, визуализация результатов.
66. Случайный лес: дерево принятия решений, ансамбль деревьев, случайные леса. Метод главных компонент (PCA)/SVD, уменьшение размерности данных.
67. Понятие кластеризации. Отбор выборки объектов для кластеризации. Вычисление значений меры сходства между объектами. Применение метода кластерного анализа для создания групп сходных объектов (кластеров). Представление результатов анализа.
68. Метод k-средних. Создание кластеров точек на основе расстояний между ними. Иерархическая кластеризация. DBSCAN - Метод кластеризации на основе плотности
69. Ограниченная линейная регрессия, логистическая регрессия однослойная нейронная сеть. Многослойная нейронная сеть. Свёрточные нейронные сети. Рекуррентные нейронные сети
70. Физические основы метода молекулярной динамики. Уравнения движения, лежащие в основе метода.
71. Понятие силового поля, параметры молекулярно-динамических моделей. Описание связей между атомами в молекуле.
72. Применение метода мол. динамики к описанию конформационных движений в макромолекулах.
73. Учёт влияния среды в молекулярной динамике. Периодические граничные условия. Понятие термостата.
74. Применение метода мол. динамики в биологии. Ограничения применения метода мол. динамики.

### 7.3. Описание критериев и шкал оценивания

Описание критериев оценивания выполнения задания

Показатель	Баллы
Студент выполняет менее 50% задания	0-20
Задание студент выполняет все или большей частью, есть отдельные неточности, способен при направляющих вопросах исправить допущенные неточности	21-32
Задание выполнено студентом правильно, самостоятельно в полном объеме	33-40

#### Шкала оценивания сформированности компетенций

Уровень сформированности компетенции	Баллы	Оценка в 5-ти балльной шкале
Недостаточный	Менее 20	неудовлетворительно
Базовый	20-26	удовлетворительно
Высокий (повышенный)	27-32	хорошо
Продвинутый (повышенный)	33-40	отлично

#### ШКАЛА И КРИТЕРИИ ОЦЕНИВАНИЯ результатов обучения по дисциплине (модулю)

(\*оценка сформированности компетенций дается в соответствии со шкалой выше)

Оценка	2 (не зачтено)	3 (зачтено)	4 (зачтено)	5 (зачтено)
Результат обучения				
Знания (приведены в п.3.)	Отсутствие знаний	Фрагментарные знания	Общие, но не структурированные знания	Сформированные систематические знания
Умения (приведены в п.3.)	Отсутствие умений	В целом успешное, но не систематическое умение	В целом успешное, но содержащее отдельные пробелы умение (допускает неточности не принципиального характера)	Успешное и систематическое умение
Навыки /владения/опыт деятельности (приведены в п.3.)	Отсутствие навыков (владений, опыта деятельности)	Наличие отдельных навыков	В целом, сформированные навыки (владения), но используемые не в активной форме	Сформированные навыки (владения), применяемые при решении задач

### 8. Ресурсное обеспечение:

#### 8.1. Перечень учебной литературы

Основная литература:



1. Сердюк И., Заккаи Н., Заккаи Дж. Методы в молекулярной биофизике. Структура. Функция. Динамика. Москва. КДУ.2009
2. Современные методы биофизических исследований. Рубин А.Б., Москва. Высшая школа. 1988
3. А.Б. Рубин. Биофизика В 3-х томах. М.-Ижевск: Институт компьютерных исследований, 2013.
4. Ю.А. Владимиров, А.Я. Потапенко. Физико-химические основы фотобиологических процессов. М: Дрофа, 2006. 285с
5. С.И.Погосян, И.В.Конюхов, А.Б.Рубин. Проблемы экологической биофизики. М.-Ижевск: Институт компьютерных исследований, 2017. 272 с.
6. В. Л. Миронов Основы сканирующей зондовой микроскопии Учебное пособие для студентов старших курсов высших учебных заведений Российская академия наук, Институт физики микроструктур г. Нижний Новгород, 2004 г.
7. Шмидт В. Оптическая спектроскопия для химиков и биологов Москва Техносфера2007
8. Миронов А.А., Комиссарчик Я.Ю., Миронов А.В. Методы электронной микроскопии в биологии и медицине Санкт-Петербург Наука1994

## **8.2. Перечень лицензионного и(или) свободно распространяемого программного обеспечения, в том числе отечественного производства**

1. Яндекс Браузер
2. Libre Office
3. Adobe Acrobat Reader
4. Для подготовки и показа презентаций используют программу Microsoft Power Point.

## **8.3. Перечень ресурсов информационно-телекоммуникационной сети «Интернет»**

- Базы данных по тематике дисциплины
- Базы публикаций
- Зарубежные журналы и библиографические базы данных, доступные через Интернет
- Страница кафедры биофизики биологического факультета МГУ <http://www.biophys.msu.ru/>
- <http://www.cis.rit.edu/htbooks/nmr>  
<http://www.chem.msu.su/rus/teaching/ustyniuk-nmr-lectures/welcome.html>

## **8.4. Описание материально-технической базы**

Для освоения дисциплины требуется свободный доступ к сети Интернет, а также:

- Аудитории для проведения лекционных и лабораторных занятий, текущего контроля успеваемости и промежуточной аттестации
  - А. Помещения: аудитории для проведения лекционных/лабораторных занятий, текущего контроля и промежуточной аттестации: учебная аудитория филиала МГУ в г. Грозном;
  - Б. Оборудование: наборы ученической мебели, рабочее место преподавателя, ученическая доска, компьютер, проектор, экран, доска.

## **9. Язык преподавания**

Русский.

## **10. Преподаватели**

Рубин Андрей Борисович заведующий кафедрой биофизики биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова, академик РАН.

## **11. Авторы программы**

Рубин Андрей Борисович заведующий кафедрой биофизики биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова, академик РАН

Булычев Александр Александрович, профессор кафедры биофизики биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова, д.б.н.

Погосян Сергей Иосифович, профессор кафедры биофизики биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова, д.б.н.

Маторин Дмитрий Николаевич, ведущий научный сотрудник кафедры биофизики биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова, д.б.н.

Максимов Евгений Георгиевич, ведущий научный сотрудник кафедры биофизики биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова, к.б.н.

Браже Надежда Александровна, ведущий научный сотрудник кафедры биофизики биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова, к.б.н.

Яковлева Ольга Валентиновна - кандидат физико-математических наук, ведущий научный сотрудник кафедры биофизики биологического факультета МГУ

ведущий научный сотрудник кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова, к.ф.-м.н. Багров Дмитрий Владимирович,

Коваленко Илья Борисович, ведущий научный сотрудник кафедры биофизики биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова, д.ф.-м.н.

Алова Анна Владимировна, ассистент кафедры биофизики биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова, к.б.н.

Локтюшкин Алексей Владимирович, старший преподаватель кафедры биофизики биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова, к.б.н.