

ВСТУП

Програму навчальної дисципліни “Методи дослідження біомембран” складено відповідно до освітньо-професійної програми підготовки магістрів

спеціальності 105 Прикладна фізики та наноматеріали (освітня програма “Біофізика”)

спеціалізації _____

1. Опис навчальної дисципліни

1.1. Мета викладання навчальної дисципліни - ознайомлення студентів з теоретичними та експериментальними підходами, які лежать в основі дослідження структури та функцій клітинних мембран. Вивчення курсу є необхідним етапом для формування компетенцій майбутнього біофізика.

1.2. Основні завдання вивчення дисципліни - розуміння студентами теоретичних засад та опанування ними ключовими методичними підходами, які застосовуються для дослідження іон-транспортної, сигнальної та ензиматичної функції клітинних мембран.

1.3. Кількість кредитів **4**

1.4. Загальна кількість годин **120**

1.5. Характеристика навчальної дисципліни	
Нормативна / за вибором	
Денна форма навчання	Заочна (дистанційна) форма навчання
Рік підготовки	
1-й	-й
Семестр	
1-й	-й
Лекції	
32 год.	год.
Практичні, семінарські заняття	
год.	год.
Лабораторні заняття	
год.	год.
Самостійна робота, у тому числі	
88 год.	год.
Індивідуальні завдання	

1.6. Заплановані результати навчання

Студент має знати:

Структуру і засади функціонування біологічних мембран,

Біофізику мембранних процесів,

Основні методи дослідження мембранних процесів, з використанням базових знань в області математики і природничих наук,

Методи комп’ютерного аналізу і моделювання в біомембранології.

вміти:

Аналізувати наявну інформацію, виявляти фундаментальні проблеми, ставити завдання і виконувати лабораторні біологічні дослідження при вирішенні конкретних завдань за спеціалізацією з використанням сучасної апаратури і обчислювальних засобів, демонструвати відповідальність за якість робіт і наукову достовірність результатів.

Розуміти і творчо використовувати в науковій і виробничо-технологічній діяльності знання фундаментальних і прикладних розділів дисципліни.

Генерувати нові ідеї і методичні рішення.

Застосовувати отримані знання і навички у вирішенні професійних завдань.

володіти:

Сучасними комп'ютерними технологіями при зборі, зберіганні, обробці, аналізі та передачі біофізичної інформації.

Методичними основами проектування та виконання лабораторних біологічних досліджень з використанням сучасної апаратури і обчислювальних комплексів,

Сучасними комп'ютерними технологіями для вирішення науково-дослідних і виробничо-технологічних завдань професійної діяльності, для збору і аналізу біологічної інформації.

В результаті вивчення дисципліни студент повинен набути таких загальних і професійних компетенцій:

здатність до творчості (креативність) і системного мислення;

здатність до інноваційної діяльності;

здатність до адаптації і підвищення свого наукового і культурного рівня;

здатний самостійно здобувати за допомогою інформаційних технологій і використовувати в практичній діяльності нові знання і вміння, в тому числі в нових галузях знань, безпосередньо не пов'язаних зі сферою діяльності.

самостійно аналізує наявну інформацію, виявляє фундаментальні проблеми, ставить задачу і виконує лабораторні дослідження при вирішенні конкретних завдань за спеціалізацією з використанням сучасної апаратури і обчислювальних засобів, демонструє відповідальність за якість робіт і наукову достовірність результатів.

творчо застосовує сучасні комп'ютерні технології при зборі, зберіганні, обробці, аналізі та передачі біологічної інформації.

глибоко розуміє і творчо використовує в науковій і виробничо-технологічній діяльності знання фундаментальних і прикладних розділів спеціальних дисциплін магістерської програми.

застосовує методичні основи проектування та виконання біологічних і фізичних досліджень з використанням сучасної апаратури і обчислювальних комплексів (відповідно до цілей магістерської програми), генерує нові ідеї і методичні рішення.

самостійно використовує сучасні комп'ютерні технології для вирішення науково-дослідних і виробничо-технологічних завдань професійної діяльності, для збору і аналізу біофізичної інформації.

2. Тематичний план навчальної дисципліни

Розділ 1. Структура та функціонування біологічних мембран

Тема 1. Хімічний склад біомембран

Класифікація і характеристика мембранних ліпідів. Мембранні білки. Вуглеводні компоненти.

Тема 2. Структура біологічних мембран

Динамічний стан ліпідів в бішарі. Фазові переходи. Модифікація бішару білками. Роль холестерину. Білок-ліпідні взаємодії. Цитоскелет тваринної клітини. Особливості будови мембран рослинних і бактеріальних клітин. Штучні мембрани і протеоліпосоми.

Розділ 2. Методи виділення органел і мембран тваринної клітини.

Тема 3. Недеструктивні методи. Методики, засновані на руйнуванні клітин

Розділення субклітинних компонентів. Центрифугування. Розділення в двофазній системі, яка містить дві полімери. Проникаюча (адсорбційна) хроматографія. Електрофорез. Імуноафінні методи.

Тема 4. Ідентифікація та оцінка чистоти субклітинних фракцій

Визначення ферментів-маркерів. Вибір маркерів і критерії їх використання.

Тема 5. Виділення окремих органел і мембранних систем

Ядра і ядерні мембрани. Мітохондрії. Лізосоми. Пероксисоми. Апарат Гольджі. Облямовані везикули. Ендосоми. Плазматичні мембрани.

Розділ 3. Імунологічні методи дослідження мембран.

Тема 6. Отримання поліклональних і моноклональних антитіл до компонентів мембран

Переваги та недоліки поліклональних і моноклональних антитіл. Імунізація тварин для отримання поліклональних антитіл. Отримання моноклональних антитіл. Скринінг моноклональних антитіл. Імуноблотинг і аналіз епітопів. Імунологічне очищення субклітинних фракцій. Антитіла, що використовуються при субклітинному фракціонуванні. Носії для імуноафінного субклітинного фракціонування. Практичні питання і можливості застосування імуноафінного виділення клітинних органел. Імунологічне виділення мембранних компонентів. Солюбілізація мембранних білків. Імунопреципітація. Очищення мембранних білків на імуносорбенті. Використання антитіл для відбору комплементарних ДНК, що кодують мембранні білки. Фагові вектори. Плазмідні вектори. Скринінг.

Розділ 4. Сучасні біофізичні підходи до дослідження біомембран.

Тема 7. Особливості застосування біофізичних методів для дослідження мембранних структур. Протеоміка та ліпідоміка.

Електронний парамагнітний резонанс (ЕПР). Ядерний-магнітний резонанс (ЯМР). Дисперсія оптичного обертання і круговий дихроїзм. Диференційна сканувальна калориметрія. Метод розсіювання нейтронів. Флуоресцентна спектроскопія. Конфокальна мікроскопія. Силова атомна мікроскопія та її модифікації. Молекулярна динаміка. Докінг. Імовірнісні підходи до симуляції проникності іонних каналів. Мас-спектрометрія та комбіновані МС-ВРРХ підходи в –оміках.

Тема 8. Виділення і характеристика мембранних фракцій

Мембранотропні сполуки. Використання детергентів в мембранології. Особливості роботи з мембранними ферментами.

Розділ 5. Виділення і аналіз ліпідних компонентів мембран.

Тема 9. Екстракція ліпідів

Розчинники і апаратура. Екстракція осаду мембран або невеликих обсягів концентрованих суспензій. Екстракція великих обсягів мембранної суспензії. Видалення розчинника з ліпідного екстракту.

Тема 10. Розділення та кількісне визначення ліпідів

Тонкошарова хроматографія. Системи розчинників для розділення мембранних ліпідів. Виявлення ліпідів на пластинках для ТШХ. Елюювання ліпідів. Визначення фосфоліпідів. Визначення складних ефірів. Визначення холестеролу і його ефірів. Визначення вільних жирних кислот.

Тема 11. Дослідження трансмембранного розподілу ліпідів

Мембрани мікросом. Збереження структурної організації мікросомальних мембран. Визначення трансмембранного розподілу фосфоліпідів за допомогою гідролітичних ферментів. З'ясування трансмембранного розподілу фосфоліпідів за допомогою хімічних

модифікуючих агентів. З'ясування трансмембранного розподілу фосфоліпідів за допомогою фосфоліпідобмінних білків. Акцепторні мембрани. Радіоактивне мічення донорної мембрани. Приготування ліпосом. Вивчення біосинтезу, кругообігу і внутрішньоклітинного транспорту мембранних фосфоліпідів. Включення мічених попередників у фосфоліпіди. Визначення локалізації новосинтезованих фосфоліпідів.

Розділ 6. Виділення та модифікація мембранних білків і пептидів.

Тема 12. Хроматографічне розділення білків.

Солюбілізація периферичних та інтегральних мембранних білків. Хроматографічне розділення білків за розміром, за зарядом. Гідрофобна хроматографія. Афінна хроматографія.

Тема 13. Гель-електрофорез.

Електрофорез у поліакриламідному гелі (SDS PAGE). Western blotting. Двомірний гель-електрофорез. Вилучення білка з гелю.

Тема 14. Аналіз мембранних білків.

Розщеплення білка. Визначення концентрації білка. Ковалентна модифікація білків. Реагенти, що модифікують поверхневі білки: гідрофобні реагенти, амфіфільні реагенти, зшиваючі реагенти. Радіаційна інактивація мембранних білків.

Розділ 7. Солюбілізація і реконструкція мембранних білків.

Тема 15. Солюбілізація інтегральних мембранних білків

Критерії солюбілізації. Вибір детергенту. Фактори, що впливають на стабільність солюбілізованих мембранних білків.

Тема 16. Стратегія реконструкції мембранних білків

Загальні методи реконструкції. Морфологічна характеристика везикул. Фактори, що визначають морфологію реконструйованих мембран. Характеристика реконструйованих везикул. Визначення функціональної активності реконструйованих мембран. Визначення зв'язування і ферментативної активності: гель-фільтрація, центрифугування, діаліз, осаджування ПЕГем. Методи реєстрації транспорту і проникності. Використання реконструйованих мембран для вивчення структури білків. Новітні можливості застосування реконструйованих мембран.

Розділ 8. Використання оптичної спектроскопії для вивчення біофізичних характеристик біологічних мембран.

Тема 17. Сценарій спектроскопічного експерименту.

Постановка експерименту. Устаткування. Вибір хромофора. Характеристика та калібрування оптичних сигналів. Артефакти. Визначення окислювально-відновлювального стану мітохондрій. Визначення мембранного потенціалу органел і клітин. Вивчення рН клітинних компартментів. Визначення поверхневого потенціалу мембран. Оптичні пінцети та оптичні скальпелі у клітинній мікроскопії.

Розділ 9. Особливості застосування традиційних біофізичних підходів та комп'ютерного моделювання до вивчення біологічних мембран.

Тема 18. Визначення макроскопічних параметрів мембранних білків.

Розміри, форма і конформація мембранних білків і їх комплексів. Молекулярна маса мономерних білків або субодиниць. Розміри молекул. Конформація поліпептидного ланцюга. Рухливість ділянок білкової молекули.

Тема 19. Вивчення динаміки ліпідів мембран.

Структура ліпідів в складі біологічних мембран і модельних систем. Виявлення фазових переходів. Структура фаз. Розділення фаз і доменна структура. Ліпідні кластери. Рафти. Рухливість вуглеводневих "хвостів" ліпідних молекул.

Тема 20. Білок-ліпідні взаємодії.

Обертальна, латеральна і трансбіслойная дифузія білків і ліпідів. Характеристика білково-ліпідного зв'язування. Вплив ліпідів на структуру білка. Вплив білка на структуру і рухливість ліпідів

3. Структура навчальної дисципліни

Назви розділів	Кількість годин											
	денна форма						заочна форма					
	усього	у тому числі					усього	у тому числі				
л		п	лаб.	інд.	с. р.	л		п	лаб.	інд.	с. р.	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Розділ 1. Структура та функціонування біологічних мембран												
Разом за розділом 1	10	2				8						
Розділ 2. Методи виділення органел і мембран тваринної клітини												
Разом за розділом 2	14	4				10						
Розділ 3. Імунологічні методи дослідження мембран												
Разом за розділом 3	14	4				10						
Розділ 4. Сучасні біофізичні підходи до дослідження біомембран												
Разом за розділом 4	12	2				10						
Розділ 5. Виділення і аналіз ліпідних компонентів мембран												
Разом за розділом 5	14	4				10						
Розділ 6. Виділення та модифікація мембранних білків і пептидів												
Разом за розділом 6	14	4				10						
Розділ 7. Солубілізація і реконструкція мембранних білків												
Разом за розділом 7	14	4				10						
Розділ 8. Використання оптичної спектроскопії для вивчення біофізичних характеристик біологічних мембран												
Разом за розділом 8	14	4				10						
Розділ 9. Особливості застосування традиційних біофізичних підходів та комп'ютерного моделювання до вивчення біологічних мембран												
Разом за розділом 9	14	4				10						
Усього годин	120	32				88						

4. Теми семінарських (практичних, лабораторних) занять

Не передбачено

5. Завдання для самостійної роботи

№ з/п	Назва теми, види, зміст самостійної роботи	Кількість годин	Форма контролю
1	Структура та функціонування біологічних мембран; складання опорних конспектів, написання рефератів, підготовка до виступу із коротким повідомленням, опрацювання першоджерел.	8	Перевірка домашніх завдань, поточне тестування, екзамен
2	Методи виділення органел і мембран тваринної клітини; складання опорних конспектів, написання рефератів, підготовка до виступу із коротким повідомленням, опрацювання	10	Перевірка домашніх завдань, поточне тестування, екзамен

	першоджерел.		
3	Імунологічні методи дослідження мембран; складання опорних конспектів, написання рефератів, підготовка до виступу із коротким повідомленням, опрацювання першоджерел.	10	Перевірка домашніх завдань, поточне тестування, екзамен
4	Сучасні біофізичні підходи до дослідження біомембран; складання опорних конспектів, написання рефератів, підготовка до виступу із коротким повідомленням, опрацювання першоджерел.	10	Перевірка домашніх завдань, поточне тестування, екзамен
5	Виділення і аналіз ліпідних компонентів мембран; складання опорних конспектів, написання рефератів, підготовка до виступу із коротким повідомленням, опрацювання першоджерел.	10	Перевірка домашніх завдань, поточне тестування, екзамен
6	Виділення та модифікація мембранних білків и пептидів; складання опорних конспектів, написання рефератів, підготовка до виступу із коротким повідомленням, опрацювання першоджерел.	10	Поточне тестування, екзамен
7	Солубілізація і реконструкція мембранних білків; складання опорних конспектів, написання рефератів, підготовка до виступу із коротким повідомленням, опрацювання першоджерел.	10	Поточне тестування, екзамен
8	Використання оптичної спектроскопії для вивчення біофізичних характеристик біологічних мембран; складання опорних конспектів, написання рефератів, підготовка до виступу із коротким повідомленням, опрацювання першоджерел.	10	Перевірка домашніх завдань, поточне тестування, екзамен
9	Особливості застосування традиційних біофізичних підходів та комп'ютерного моделювання до вивчення біологічних мембран; складання опорних конспектів, написання рефератів, підготовка до виступу із коротким повідомленням, опрацювання першоджерел.	10	Поточне тестування, екзамен
	Разом	88	

6. Індивідуальні завдання

Орієнтовні теми рефератів

- Лазерні пінцети та лазерні скальпелі.
- Надширококуткова діелектрометрія

- Tethered and supported мембрани
- Кріо-електронна мікроскопія
- Конфігурації методу "patch clamp".
- Підходи протеоміки та ліпідоміки в біомембранології
- Практичні методи виготовлення хлорсрібних, індиферентних електродів, металічних мікроелектродів.
- Методи одержання ізольованих клітин.
- Практичні методи виготовлення скляних мікропіпеток для методу "patch clamp".
- Методи швидкої аплікації біологічно активних речовин на клітину в електрофізіологічному експерименті.
- Ізоляція та інжекція ооцитів шпорцевої жаби *Xenopus laevis*.
- Принципи аналізу та інтерпретації активності поодинокого каналу.
- Ізоляція та культивування клітин з різних типів тканин.
- Електрофізіологія на багатоклітинних препаратах.
- Ооцити *Xenopus* та їх використання для функціонального тестування клонованих каналів.
- Підходи до структурно-функціонального аналізу клонованих каналів.
- Конфокальна мікроскопія.
- Хлорні струми в регуляції об'єму клітини.

Студенти заохочуються до пропонування власних тем рефератів з урахуванням порад викладача.

7. Методи контролю

Поточне тестування, перевірка домашніх завдань, виступи із рефератами із короткими повідомленнями, розв'язання ситуаційних задач (case-метод), іспит.

8. Схема нарахування балів

Умовою допуску до екзамену є виконання всіх домашніх завдань, щодо самостійної роботи; підготовка, виступ та публічне обговорення реферату.

За кожен із 20 тем курсу студенти отримують 1,25 бали із яких: 0,25 – відвідання лекції, 1 – підготований конспект самостійної роботи, 1 – правильні відповіді на опитування протягом заняття. За неповну відповідь при поточному опитуванні або за доповнення чи уточнення – 0,5 бала.

Індивідуальне завдання оцінюється в 15 балів. Три складові частини підготованого реферату: текст, доповідь, дискусія оцінюються окремо за критеріями традиційної п'ятибальної системи, при цьому робота за бажанням студента може виноситися на повторний захист на наступному занятті, якщо хоча б одна із частин набрала менше 5 балів. Доповідь та дискусія оцінюються наступним чином: 0 балів – відповідь неправильна або відсутня. 1 – участь у обговоренні певного питання, доповнення або уточнення основного питання. 3 – відповідь студента при відтворенні навчального матеріалу елементарна, зумовлюється початковими уявленнями про предмет вивчення. Студент відтворює основний навчальний матеріал, здатний виконувати завдання за зразком, володіє елементарними вміннями навчальної діяльності. 4 бали – студент знає істотні ознаки понять, явищ, закономірностей, зв'язків між ними, а також самостійно застосовує знання в стандартних ситуаціях, володіє розумовими операціями, вміє робити висновки, виправляти допущені помилки. Відповідь повна, правильна, логічна, обґрунтована. 5 балів – студент здатний самостійно здійснювати основні види навчальної діяльності. Знання студента є глибокими, міцними, узагальненими; студент вміє застосовувати знання творчо, його навчальна діяльність позначена вмінням самостійно оцінювати різноманітні життєві ситуації, явища, факти, виявляти і відстоювати особисту позицію.

Екзаменаційний білет складається з 3 питань, вичерпна відповідь на кожне з них зараховується як 20 балів, що дає в сумі максимальні 60 балів за іспит. Оцінювання відповідей на кожне запитання білету здійснюється так само як і при оцінці рефератів – за критеріями традиційної п'ятибальної системи із помноженням на коефіцієнт 4. Часткова відповідь на кожне питання знижує максимальну оцінку з 20 балів до меншої кількості балів пропорційно тому, яку частину від повної відповіді на це питання містить письмова робота студента. Наприклад, 15-20 балів заслуговує студент, який:

- демонструє повний виклад основних положень запропонованих питань,
- виявляє знання основних точок зору на теоретичні проблеми, що розглядаються в питаннях іспиту,
- логічно будує відповідь, робить обґрунтовані висновки і узагальнення,
- демонструє знання і розуміння визначень запропонованих термінів.

8-14 балів заслуговує студент, який:

- демонструє часткове виклад основних положень запропонованих питань,
- допускає помилки при викладі точок зору на теоретичні проблеми, що розглядаються в питаннях білету,
- відчуває труднощі при складанні висновків і узагальнень,
- демонструє часткове знання і розуміння визначень запропонованих термінів.

1-7 бали заслуговує студент, який:

- демонструє незнання або уривчасті уявлення щодо змісту питання білету,
- пропонує помилкові визначення запропонованих термінів.

Остаточна оцінка за кожний із видів робіт з даної дисципліни, включаючи екзамен, виставляється викладачем після розгляду вмотивованих претензій студента і роз'яснень викладача. Оцінки округлюються на користь студента – у більший бік.

Поточний контроль, самостійна робота, індивідуальні завдання					Екзамен	Сума
Розділи 1-2	Розділи 3-7	Розділи 8-9	Індивідуальне завдання	Разом		
Т 1 – Т 5	Т 6 – Т 17	Т 18 – Т 20				
6,25	15	3,75	15	40	60	100

T1, T2 ... – теми розділів.

Шкала оцінювання

Сума балів за всі види навчальної діяльності протягом семестру	Оцінка	
	для чотирирівневої шкали оцінювання	для дворівневої шкали оцінювання
90 – 100	відмінно	зараховано
70-89	добре	
50-69	задовільно	
1-49	незадовільно	не зараховано

9. Рекомендована література

Основна література

Биологические мембраны. Методы : пер. с англ. / У.Г. Эванз, Д.Д. Морре, Э. О'Брайтман, др.; Под ред. Дж. Финдлей, У. Эванз. – Москва: Мир, 1990. – 423 с.

- Мартин Д.К. Нанобиотехнология биомиметических мембран. - М.: Научный мир, 2012. - 216 с.
- Костюк П.Г., Зима В.Л., Магура І.С., Мірошніченко М.С., Шуба М.Ф. Біофізика. – Київ: Обереги, 2001. – 544 с.
- Lodish H. et al. Molecular Cell Biology – 6th Edition. – Freeman, W. H. & Company, 2007. – 1150 p.
- Cooper G.M., Hausman R.E. The Cell: A Molecular Approach, 7 edition. – Sinauer Associates, Oxford University Press, 2015. – 832 p.
- Karp G. Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments. – 7th Edition. – Wiley, 2013. – 874 p.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Morgan D., Raff M., Roberts K., Walter P. Molecular Biology of the Cell – 6th edition. – Garland Science, 2015. — 1465 p.
- B. Hille "Ion channels of excitable membranes", Sunderland, Massachusetts, USA, Sinauer Associates, Inc., 2001.
- Болдырев А.А. Введение в биомембранологию. – М.: Изд-во МГУ, 1990. – 208 с.
- Джаксон М. Молекулярная и клеточная биофизика. – М.: Мир. Бином, Лаборатория знаний, 2009. – 552 с.
- Зима В.Л. Біофізика. Збірник задач: навчальний посібник. – Київ : Вища школа, 2001 . – 124 с.
- Сборник задач по биофизике: учеб. Пособие [для студ. биол. спец. вузов] / под ред. А.Б. Рубина. – М. : Университет, 2010. – 167 с.
- Степанов В.М. Молекулярная биология. Структура и функции белков. – М.: МГУ, 2005. – 336 с.
- П.Г. Костюк, О.А. Крышталь "Механизмы электрической возбудимости нервной клетки", М., Наука, 1981.
- Б. Сакман, Э. Неер "Регистрация одиночных каналов", М., Мир, 1987.
- Болдырев А. А. Биомембранология : учебное пособие для студентов вузов, специализирующихся в области биологии, медицины и психологии / А. А. Болдырев, Е. И. Кяйвярайнен, В. А. Илюха ; науч. ред. В. А. Кратасюк. - Изд. 2-е, испр. и доп. - Красноярск : Сибирский федеральный университет, 2008. - 185 с.
- Малеев В. Я. Методы биофизических исследований : монография / Владимир Яковлевич Малеев, Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина . – Харьков : Издательство ХНУ им. В.Н. Каразина, 2014 . – 457 с.
- Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж., Рэфф М., Роберте К., Уотсон Дж., Молекулярная биология клетки, в 3-х т., т.1, М.: Мир, 1994.
- Структура и функции биологических мембран / П.Г. Богач, М.Д. Курский, Н.Е. Кучеренко, В.К. Рыбальченко. - К. : Вища школа, 1981. - 336 с
- Сердюк И. Методы в молекулярной биофизике. Структура. Функция. Динамика : учебное пособие : [в 2 томах] / И. Сердюк, Н. Заккай, Д. Заккай ; науч. ред. И. Сердюк. – М.: Книжный дом "Университет", 2009 - Том 2. - 2010. - 733 с.
- Сердюк И. Методы в молекулярной биофизике. Структура. Функция. Динамика : учебное пособие : [в 2 томах] / И. Сердюк, Н. Заккай, Д. Заккай ; науч. ред. И. Сердюк. – М.: Книжный дом "Университет", 2009 - Том 1. - 2009. - 567 с.

Допоміжна література

- Сейфулла Р.Д. Фармакология липосомальных препаратов (в эксперименте и клинике). – М.: Глобус Континенталь, 2010. – 241 с.
- Игнасимуту С. Основы биоинформатики. – М.-Ижевск, Институт компьютерных исследований, 2007. – 320 с.
- Динамическая структура липидного бислоя / В. Г. Ивков, Г.Н. Берестовский, Институт биологической физики АН СССР, АН СССР . – Москва : Наука, 1981 . – 293 с.

- Липидный бислой биологических мембран / В. Г. Ивков, Г.Н. Берестовский, Институт биологической физики АН СССР . – Москва : Наука, 1982 . – 224 с.
- Добрецов Г. Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов: монография / Г. Е. Добрецов. – М.: Наука, 1989. - 277 с.
- Владимиров Ю.А. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран – М.: Наука, 1980. - 320 с.
- Геннис Р. Биомембраны: Молекулярная структура и функции. – М.: Мир, 1997.
- Черницкий Е.А., Слобожанина Е.И. Спектральный люминесцентный анализ в медицине. – Минск: Наука и техника, 1989.
- Структура и функционирование белков. Применение методов биоинформатики. Под ред. Д. Д. Ригдена. – М.: УРСС, 2014. – 424 с.
- Стефанов В., Тулуб А., Мавропуло-Столяренко Г. Биоинформатика. – М.: Юрайт, 2018. – 254 с.
- Грегориадис Г., Аллисон А. Липосомы в биологических системах. – М.: Медицина, 1983. – 384 с.
- Высоцкая Р.У., Немова Н.Н. Лизосомы и лизосомальные ферменты рыб. – М.: Наука. 2008. – 284 с.
- Павлов А.Н. Экология и биоинформатика. – М.: НИИ-Природа, 2007. – 115 с.
- С. Крейн "Нейрофизиологические исследования в культуре ткани", М., Мир, 1980.
- R.D. Purves "Microelectrode methods for intracellular recording and iontophoresis", Lond., N.-Y. etc., Academic Press, 1981.
- А.В. Гнетов, Ю.П. Качалов, А.Д. Ноздрачев "Стеклоанный микроэлектрод", Л., Наука, 1986.
- Б. Хеймс, С. Хиггинс "Транскрипция и трансляция", М., Мир, 1987.
- Д. Мейл, Дж. Бростофф, Д. Б. Рот, А. Ройт. «Иммунология» 7-е издание, М., 2007, 568 с.
- Huang H, Akhtar MZ, Ploeg R, Kessler BM (2014) Lipidomics Techniques and its Applications in Medical Research. J Glycomics Lipidomics 4:115. DOI: 10.4172/2153-0637.1000115.
- Lydic, T and Goo, Y. (2018). Lipidomics unveils the complexity of the lipidome in metabolic diseases. Clinical and Translational Medicine, 7(1). DOI: 10.1186/s40169-018-0182-9.
- Yang, K. and Han, X. (2011). Accurate Quantification of Lipid Species by Electrospray Ionization Mass Spectrometry — Meets a Key Challenge in Lipidomics. Metabolites, 1(1), pp.21-40. DOI: 10.3390/metabo1010021.
- Jurowski, K., Kochan, K., Walczak, J., Barańska, M., Piekoszewski, W. and Buszewski, B. (2017). Analytical Techniques in Lipidomics: State of the Art. Critical Reviews in Analytical Chemistry, 47(5), pp.418-437. DOI: 10.1080/10408347.2017.1310613.

10. Посилання на інформаційні ресурси в Інтернеті, відео-лекції, інше методичне забезпечення

- http://www.axon.com/mr_Axon_Guide.html – "Axon Guide"
- <https://ppt-online.org/125794>
- <http://molbiol.ru> – освітній сайт з молекулярної біології.
- <http://ncbi.nlm.nih.gov> – (a.k.a. PubMed) – електронно-пошукова система та архів повнотекстових біомедичних публікацій з вільним доступом Національного центру США з біотехнологічної інформації, найбільша база даних з біотехнології, оригінальні журнальні статті та огляди.
- <http://edx.org> – он-лайн курси провідних світових університетів
- <http://coursera.org> – он-лайн курси провідних світових університетів
- Scopus <https://www.scopus.com/home.uri>
- Elsevier (журнали відкритого доступу) <http://www.sciencedirect.com/>
- Web of Science <https://clarivate.com/products/web-of-science/>
- Nature Publishing Group <http://www.nature.com/>
- Oxford University Press (Oxford Journals) <http://www.oxfordjournals.org/>
- AAAS: Журнал «Science» <http://www.sciencemag.org/magazine>

Електронні журнали видавництв Springer, Kluwer <http://link.springer.com/>

Перелік питань, що виносяться на іспит

1. Рідинно-мозаїчна модель біологічних мембран. Асиметрія бішару: роль фосфоліпідів, білків, ферментів.
2. Компоненти біологічних мембран.
3. Функції клітинних мембран, їх біологічне значення.
4. Класифікація і властивості мембранних ліпідів. Структура ліпідів в складі біологічних мембран і модельних систем. Хімічна структура ліпідів біомембран. Жирнокислотний склад ліпідів біомембран. Молекулярні види фосфоліпідів. Сфінголіпіди. Стерини.
5. Мембранні білки, класифікація, функції. Вторинна структура мембранних білків. Третинна і четвиртинна структура мембранних білків, основні мотиви. Класифікація білків біомембран. Чинники що визначають трансмембранну орієнтацію білка.
6. Вуглеводи в складі мембран, гліпротеїни і гліколіпіди. Глікокаликс.
7. Взаємодії мембранних компонентів. Рухливість компонентів мембрани, її види, характерні часи.
8. Фізико-хімічні механізми стабілізації мембран.
9. Динамічний стан ліпідів в бішарі. Обертальна і трансляційна рухливість фосфоліпідів. Рухливість вуглеводневих «хвостів» ліпідних молекул. Транс-гош ізомеризація. Фазові переходи ліпідів. Основні фазові стани ламелярного бішару з чистих фосфоліпідів. Ліотропний і термотропний мезоморфізм фосфоліпідних мембран.
10. Розділення фаз в бішарі. Ліпідні кластери. Вплив холестерину на в'язкість ліпідного бішару. Модифікація ліпідного бішару білками, вплив білка на структуру і рухливість ліпідів. Білок-ліпідні взаємодії в мембрані. Вплив ліпідів на структуру мембранних білків. Анулярні ліпіди.
11. Рухливість мембранних білків.
12. Штучні мембрани, приготування та використання ліпосом.
13. Детергенти, їх класифікація та способи застосування.
14. Природні модифікатори мембран.
15. Розділення й аналіз ліпідних компонентів мембран.
16. Екстракція ліпідів.
17. Розділення ліпідів різних класів.
18. Кількісне визначення ліпідів після їх розділення за допомогою тонкошарової хроматографії.
19. Визначення трансмембранного розподілу фосфоліпідів за допомогою гідролітичних ферментів.
20. З'ясування трансмембранного розподілу фосфоліпідів за допомогою хімічних модифікаторів.
21. З'ясування трансмембранного розподілу фосфоліпідів за допомогою фосфоліпід-обмінювальних білків.
22. Пласкі бімолекулярні ліпідні мембрани. Способи отримання БЛМ. Електрохімічні властивості БЛМ і модифікованих БЛМ. Вимірювання опору і ємності БЛМ. Визначення коефіцієнтів іонної вибіркості і проникності БЛМ.
23. БЛМ як інструмент вивчення мембранних білків, що беруть участь в транспорті іонів. Стратегія вивчення іонних каналів біомембран. Яку

інформацію можна отримати, вивчаючи модифіковані БЛМ? Методи вивчення механізму провідності мембранних каналів.

24. Властивості ліпосом як моделей біологічних мембран.

25. Яка проникність ліпосом до катіонів та аніонів?

26. Які процеси у біологічних мембран можна моделювати на штучних мембранах?

27. Вивчення поодиноких іонних каналів за допомогою БЛМ. Прийняті допущення при дослідженні іонних каналів. Первинна оцінка експериментальних даних. Схема обробки експериментальних даних.

28. Міцели. Обернені міцели.

29. Tethered- і supported- ліпідні мембрани.

30. Протеоліпосоми.

31. Плівки Ленгмюра-Блоджет.

32. Загальна стратегія реконструкції мембранних білків.

33. Визначення функціональної активності реконструйованих мембран.

34. Як визначити розташування білка в мембрані?

35. Виділення і модифікація мембранних білків і пептидів.

36. Солюбілізація мембранних білків. Солюбілізація периферичних та інтегральних мембранних білків. Критерії солюбілізації. Структура і заряд детергентів, вибір детергенту. Критична концентрація міцелоутворення. Фактори, що впливають на стабільність солюбілізованих мембранних білків: співвідношення ліпід-детергент-білок, вплив ліпідів на стабільність білків.

37. Виділення мембранних білків центрифугуванням. Константа седиментації. Диференційне центрифугування. Аналітичне центрифугування.

Центрифугування в градієнті щільності. Зонально-швидкісне центрифугування.

38. Хроматографічне розділення білків. Гель-фільтрація, розділення по масі. Іонообмінна хроматографія, розділення за зарядом. Афінна хроматографія. Хроматофокусування. Гідрофобна хроматографія. Хроматографія з оберненою фазою.

39. Гель-електрофорез. Гель-електрофорез в ПААГ. Гель-електрофорез в присутності додецилсульфату натрію. Двовимірний гель-електрофорез. Ізоелектричне фокусування, амфоліти. Капілярний електрофорез. Вилучення білка з гелю.

40. Аналіз мембранних білків за допомогою радіоактивних ізотопів. Радіаційна інактивація. Радіоактивне мічення. Авторадіографія.

41. Біохімічні методи дослідження біологічних мембран.

42. Фізіологічні методи дослідження біологічних мембран.

43. Генетичні методи дослідження біологічних мембран. Вивчення активності внутрішньоклітинних ферментів і мембранних білків за допомогою генетично кодованих міток. Зелений флуоресціюючий білок. Різновиди GFP - YFP, CFP ... Внутрішньо-молекулярне перенесення енергії флуоресценції в молекулі химери на основі GFP. Часова та просторова роздільна здатність методу.

44. Імунологічні методи дослідження і розділення мембранних компонентів. Хромогенні і світловипромінюючі ферментні реакції. Люциферази. Імуоафінне детектування і розділення білків. Western Blotting.

45. Метод флуоресцентної спектроскопії. Використання флуоресцентних зондів для вивчення біомембран.

46. Використання силової атомної мікроскопії для вивчення структурних змін мембран.
47. Математичне моделювання іонних каналів за допомогою комбінованого алгоритму Монте-Карло – броунівська динаміка.
48. Вимірювання ми кров'язкості мембран клітин.
49. Вимірювання мембранного потенціалу клітин.
50. Вимірювання внутрішньоклітинної концентрації кальцію.
51. Метод крио-електронної мікроскопії.
52. Метод електронного парамагнітного резонансу. Вивчення в'язкості мембранних ліпідів методом ЕПР. Спінові мітки і зонди. Дослідження обертальної і латеральної дифузії ліпідів і білків в бішарі. Дослідження трансбіслоного руху фосфоліпідів.
53. Метод ядерного магнітного резонансу. Переваги та недоліки ЯМР-спектроскопії в дослідженні мембран. Двовимірна ЯМР-спектроскопія мембранних білків.
54. Метод диференційної сканувальної калориметрії в дослідженні фазових переходів мембран. Гістерезис ліпідних систем при фазовому переході.
55. Метод конфокальної лазерної сканувальної мікроскопії.
56. Метод розсіювання нейтронів.
57. Лазерні пінцети і лазерні ножиці для внутрішньоклітинної мікрохірургії.
58. Протеоміка. Ліпідоміка.
59. Метод флуоресцентної мікроскопії.
60. Широкозмугова діелектрична спектроскопія.
61. Метод визначення дисперсії оптичного обертання і кругового дихроїзму.
62. Бліжньопольна мікроскопія. Мікроскопія повного внутрішнього відбиття.

Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна

Факультет	<u>РБЕКС</u>
Спеціальність	<u>105 Прикладна фізика та наноматеріали</u>
Освітня програма	<u>біофізика</u>
Семестр	<u>перший</u>
Форма навчання	<u>денна</u>
Рівень вищої освіти:	<u>другий (магістерський)</u>
Навчальна дисципліна:	<u>Методи дослідження біомембран</u>

ЕКЗАМЕНАЦІЙНИЙ БІЛЕТ № 1

- 1. Види клітинних мембран та їх функції. Морфологія біомембран.**
(20 балів)
- 2. Хроматографічне розділення білків мембран. Іонообмінна хроматографія, афінна хроматографія.**
(20 балів)
- 3. Коротко охарактеризуйте методи дослідження динаміки ліпідів у бішарі, які би ви використали для вивчення обертальної та трансляційної дифузії, фліп-флоп переходів. Наведіть у вигляді порівняльної таблиці можливості методів, їх переваги та недоліки.**
(20 балів)

Затверджено на засіданні кафедри молекулярної та медичної біофізики
протокол № ____ від " ____ " _____ 2018 р.

Декан факультету _____ (С.М.Шульга)

Екзаменатор _____ (В.П.Берест)