

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ВОРОНЕЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИНЖЕНЕРНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ»

УТВЕРЖДАЮ
И.о. проректора по учебной работе

_____ Василенко В.Н.
(подпись) (Ф.И.О.)

«30» мая 2024 г.

РАБОЧАЯ ПРОГРАММА ДИСЦИПЛИНЫ

Современные методы физико-химической биологии

Направление подготовки

06.04.01 Биология

Направленность (профиль)

Микробиология

Квалификация выпускника

магистр

Воронеж

1. Цели и задачи дисциплины

Целью освоения дисциплины (модуля) «Современные методы физико-химической биологии» является формирование компетенций обучающегося в области профессиональной деятельности и сфере профессиональной деятельности:

- 22 Пищевая промышленность, включая производство напитков и табака (в сфере технологий комплексной переработки мясного и молочного сырья);
- 40 Сквозные виды профессиональной деятельности.

В рамках освоения программы магистратуры выпускники могут готовиться к решению задач профессиональной деятельности следующих типов: *научно-исследовательский; экспертно-аналитический.*

Программа составлена в соответствии с требованиями Федерального государственного образовательного стандарта высшего образования по направлению подготовки 06.04.01 Биология (уровень образования - магистратура).

2. Перечень планируемых результатов обучения, соотнесенных с планируемыми результатами освоения образовательной программы

№ п/п	Код компетенции	Наименование компетенции	Код и наименование индикатора достижения компетенции
1	ПКв-4	Способен к формированию необходимой методической документации по образовательным программам в области микробиологии с применением информационных технологий	ИД1 _{ПКв-4} - Разрабатывает научно-методические и учебно-методические материалы, обеспечивающие реализацию образовательных программ
			ИД2 _{ПКв-4} - Проводит отдельные виды учебных занятий по образовательным программам под руководством специалиста более высокой квалификации
			ИД3 _{ПКв-4} -Использует технические средства поиска научно-биологической (микробиологической) информации в глобальных компьютерных сетях, универсальные пакеты прикладных компьютерных программ, специализированные базы данных

Код и наименование индикатора достижения компетенции	Результаты обучения (показатели оценивания)
ИД1 _{ПКв-4} - Разрабатывает научно-методические и учебно-методические материалы, обеспечивающие реализацию образовательных программ	Знает: основные методологические принципы и методы научно-исследовательской деятельности в области биологии; методы публичного представления результатов выполненных научных исследований
	Умеет: готовить и публиковать научно-технические отчёты и проекты; обосновывать выбор методов и методических приемов, адекватных поставленной цели; ставить цель и организовать проведение научного исследования по актуальной проблеме и разрабатывать научно-методические и учебно-методические материалы, обеспечивающие реализацию образовательных программ
	Владеет: навыками выполнения биохимического эксперимента с использованием возможностей различных физико-химических методов анализа, организации учебных занятий
ИД2 _{ПКв-4} - Проводит отдельные виды учебных занятий по образовательным программам под руководством специалиста более высокой квалификации	Знает: области применения и возможности различных физико-химических методов анализа по образовательным программам биологии
	Умеет: проводить отдельные виды учебных занятий по образовательным программам под руководством специалиста более высокой квалификации
	Владеет: навыками проведения учебных занятий по физико-химическим методам исследования
ИД3 _{ПКв-4} -Использует технические средства поиска научно-биологической (микробиологической) информации	Знает: технические средства поиска научно-биологической (микробиологической) информации в глобальных компьютерных сетях, универсальные пакеты прикладных компьютерных программ, специализированные базы данных

в глобальных компьютерных сетях, универсальные пакеты прикладных компьютерных программ, специализированные базы данных	Умеет: использовать технические средства поиска научно-биологической (микробиологической) информации в глобальных компьютерных сетях, универсальные пакеты прикладных компьютерных программ, специализированные базы данных
	Владеет: навыками работы на современном компьютерном оборудовании в сфере биологии и микробиологии

3. Место дисциплины (модуля) в структуре ОП ВО

Дисциплина относится к *части, формируемой участниками образовательных отношений* Блока 1 ООП. Дисциплина является обязательной к изучению.

Изучение дисциплины основано на знаниях, умениях и навыках, полученных при изучении обучающимися дисциплин: *Молекулярная биология микробной клетки, Большой практикум по микробиологии, Биология различных таксономических групп микроорганизмов, Генетика адаптаций, Система ХАССП в пищевых производствах.*

Дисциплина является предшествующей для следующих дисциплин и практик: *Специальный практикум по микробиологии, Геномика, протеомика и эпигенетика, Стратегия биохимической адаптации, Молекулярные методы диагностики в биологии, Современные методы производства микробных биопрепаратов, Учебная практика, практика по направлению профессиональной деятельности, Производственная практика, практика по профилю профессиональной деятельности, практическая подготовка, подготовка к процедуре защиты и защита выпускной квалификационной работы, проведения государственной итоговой аттестации.*

4. Объем дисциплины (модуля) и виды учебной работы

Общая трудоемкость дисциплины (модуля) составляет 2 зачетные единицы.

Виды учебной работы	Всего ак. ч	Распределение трудоемкости по семестрам, ак. ч
		3 семестр
Общая трудоемкость дисциплины (модуля)	72	72
Контактная работа в т. ч. аудиторные занятия:	37	37
Лекции	18	18
<i>в том числе в форме практической подготовки</i>	-	-
Практические/лабораторные занятия	18	18
<i>в том числе в форме практической подготовки</i>	18	18
Консультации текущие	0,9	0,9
Вид аттестации (зачет)	0,1	0,1
Самостоятельная работа:	35	35
Проработка материалов по лекциям, учебникам, учебным пособиям	10	10
Подготовка к практическим/лабораторным занятиям	10	10
Домашнее задание, решение кейс-задач	15	15

5 Содержание дисциплины (модуля), структурированное по темам (разделам) с указанием отведенного на них количества академических часов и видов учебных занятий

5.1 Содержание разделов дисциплины (модуля)

№ п/п	Наименование раздела дисциплины	Содержание раздела (указываются темы и дидактические единицы)	Трудоемкость раздела, ак.ч
1	Хроматография, электрофорез, центрифугирование	Общие принципы хроматографии. Коэффициент распределения. Подвижные и неподвижные фазы в хроматографии и их характеристики. Классификация хроматографических методов анализа. Тонкослойная хроматография. Преимущество метода.	23

	вание.	Используемые сорбенты. Последовательность анализа. Качественный и количественный анализ в тонкослойной хроматографии. Газожидкостная хроматография. Используемые носители. Газожидкостные хроматографы. Детекторы, используемые в газожидкостной хроматографии. Использование газожидкостной хроматографии для анализа спиртов, сложных эфиров, жирных кислот и аминов. Высокоэффективная жидкостная хроматография. Области применения. Хромато-массспектрометрия. Теоретические основы электрофоретических методов анализа. Электрофоретическая подвижность. Факторы, влияющие на подвижность: электрическое поле, буфер, носитель. Приготовление носителей и их свойства. Последовательность работы при электрофоретическом разделении веществ. Диск-электрофорез и его использование при разделении белков. Капиллярный электрофорез. Изоэлектрическое фокусирование. Применение электрофоретических методов для разделения и идентификации биомолекул в биологии и медицине. Принцип метода. Центробежное ускорение. Понятие о коэффициенте седиментации. Устройство центрифуги. Типы центрифуг. Характеристики роторов. Препаративное центрифугирование. Дифференциальное центрифугирование, зонально-скоростное центрифугирование. Изопикническое центрифугирование. Равновесное центрифугирование в градиенте плотности. Формирование градиентов. Анализ субклеточных фракций. Аналитическое ультрацентрифугирование и его применение для определения молекулярных масс, проверки чистоты образцов и исследования конформационных изменений в макромолекулах.	
2	Масс-спектрометрия Флуоресцентная спектроскопия. Поляризация флуоресценции	Принцип метода масс-спектрометрии. Способы ионизации атомов и молекул (метод ионизации электронным ударом, метод фотоионизации, ионизация электрическим полем, химическая ионизация, поверхностная ионизация). Процесс ионизации и типы ионов (молекулярные ионы, осколочные ионы, перегруппировочные ионы, метастабильные ионы, отрицательные ионы, многозарядные ионы). Принципиальные схемы масс-спектрометров. Применение масс-спектрометрии в биологических исследованиях. Идентификация и установление строения веществ. Расшифровка масс-спектра. Люминесценция. Происхождение люминесценции. Флуоресценция. Фосфоресценция. Выход люминесценции. Спектр люминесценции. Закон Стокса-Ломмеля. Связь интенсивности флуоресценции и концентрации. Тушение флуоресценции. Качественный и количественный флуоресцентный анализ. Флуоресцентные зонды и метки. Техника измерения флуоресценции зондов. Использование зондов для исследования структуры биомембран и липопротеинов. Безызлучательный перенос энергии. Поляризация флуоресценции. Применение поляризации флуоресценции для изучения белков и нуклеиновых кислот. Собственная флуоресценция белков. Устройство и принцип работы спектрофлуориметров.	23
3	Иммунохимические методы анализа	Принцип метода. Чувствительность и специфичность иммунохимических методов анализа. Современные методы иммунохимического анализа, основанные на применении меченых реагентов. Классификация иммунохимических методов анализа. Радиоиммунный анализ. Достоинство метода РИА. Технологии иммуноферментного анализа. Ферментно – мультиплицируемый иммунный тест. Преимущество теста. Клонированный ферментно – донорный иммуноанализ. Кинетическое взаимодействие микрочастиц в растворе. Поляризационный флуоресцентный иммуноанализ. Иммунохроматографические стрип – тесты. Иммунофильтрационные метод.	25
		<i>Консультации текущие</i>	0,9
		<i>Вид аттестации (зачет)</i>	0,1

5.2 Разделы дисциплины и виды занятий

№ п/п	Наименование раздела дисциплины	Лекции, ак. ч	ЛР, ак. ч	СРО, ак. ч
1	Хроматография, электрофорез, центрифугирование.	6	6	11
2	Масс-спектрометрия. Флуоресцентная спектроскопия. Поляризация флуоресценции	6	6	11
3	Иммунохимические методы анализа	6	6	13
	<i>Консультации текущие</i>		0,9	
	<i>Вид аттестации (зачет)</i>		0,1	

5.2.1 Лекции

№ п/п	Наименование раздела дисциплины	Тематика лекционных занятий	Трудоемкость, ак. ч
1	Хроматография, электрофорез, центрифугирование.	Общие принципы хроматографии. Коэффициент распределения. Подвижные и неподвижные фазы в хроматографии и их характеристики. Классификация хроматографических методов анализа. Тонкослойная хроматография. Преимущество метода. Используемые сорбенты. Последовательность анализа. Качественный и количественный анализ в тонкослойной хроматографии. Газожидкостная хроматография. Используемые носители. Газожидкостные хроматографы. Детекторы, используемые в газожидкостной хроматографии. Использование газожидкостной хроматографии для анализа спиртов, сложных эфиров, жирных кислот и аминов. Высокоэффективная жидкостная хроматография. Области применения. Хромато-массспектрометрия. Теоретические основы электрофоретических методов анализа. Электрофоретическая подвижность. Факторы, влияющие на подвижность: электрическое поле, буфер, носитель. Приготовление носителей и их свойства. Последовательность работы при электрофоретическом разделении веществ. Диск-электрофорез и его использование при разделении белков. Капиллярный электрофорез. Изоэлектрическое фокусирование. Применение электрофоретических методов для разделения и идентификации биомолекул в биологии и медицине. Принцип метода. Центробежное ускорение. Понятие о коэффициенте седиментации. Устройство центрифуги. Типы центрифуг. Характеристики роторов. Препаративное центрифугирование. Дифференциальное центрифугирование, зонально-скоростное центрифугирование. Изопикническое центрифугирование. Равновесное центрифугирование в градиенте плотности. Формирование градиентов. Анализ субклеточных фракций. Аналитическое ультрацентрифугирование и его применение для определения молекулярных масс, проверки чистоты образцов и исследования конформационных изменений в макромолекулах.	6
2	Масс-спектрометрия. Флуоресцентная спектроскопия. Поляризация флуоресценции	Принцип метода масс-спектрометрии. Способы ионизации атомов и молекул (метод ионизации электронным ударом, метод фотоионизации, ионизация электрическим полем, химическая ионизация, поверхностная ионизация). Процесс ионизации и типы ионов (молекулярные ионы, осколочные ионы, перегруппировочные ионы, метастабильные ионы, отрицательные ионы, многозарядные ионы). Принципиальные схемы масс-спектрометров. Применение масс-спектрометрии в биологических исследованиях. Идентификация и установление строения веществ. Расшифровка масс-спектра. Люминесценция. Происхождение люминесценции. Флуоресценция.	6

		Фосфоресценция. Выход люминесценции. Спектр люминесценции. Закон Стокса Ломмеля. Связь интенсивности флуоресценции и концентрации. Тушение флуоресценции. Качественный и количественный флуоресцентный анализ. Флуоресцентные зонды и метки. Техника измерения флуоресценции зондов. Использование зондов для исследования структуры биомембран и липопротеинов. Безызлучательный перенос энергии. Поляризация флуоресценции. Применение поляризации флуоресценции для изучения белков и нуклеиновых кислот. Собственная флуоресценция белков. Устройство и принцип работы спектрофлуориметров.	
3	Иммунохимические методы анализа	Принцип метода. Чувствительностью и специфичность иммунохимических методов анализа. Современные методы иммунохимического анализа, основанные на применении меченых реагентов. Классификация иммунохимических методов анализа. Радиоиммунный анализ. Достоинство метода РИА. Технологии иммуноферментного анализа. Ферментно – мультиплицируемый иммунный тест. Преимущество теста. Клонированный ферментно – донорный иммуноанализ. Кинетическое взаимодействие микрочастиц в растворе. Поляризационный флуоресцентный иммуноанализ. Иммунохроматографические стрип – тесты. Иммунофльтрационные метод.	6

5.2.2 Практические занятия (семинары) *не предусмотрены*

5.2.3 Лабораторный практикум

№ п/п	Наименование раздела дисциплины	Наименование лабораторных работ	Трудоемкость, ак. ч
1	Хроматография, электрофорез, центрифугирование.	Получение субклеточных фракций из гомогената печени крысы методом дифференциального центрифугирования.	6
2	Масс-спектрометрия. Флуоресцентная спектроскопия. Поляризация флуоресценции.	Определение погруженности белков в липидный матрикс мембран эритроцитов тушением флуоресценции зонда АНС. Определение структурнодинамических параметров мембран эритроцитов с помощью зонда пирена.	6
3	Иммунохимические методы анализа.	Радиоиммунный анализ. Ферментно – мультиплицируемый иммунный тест. Клонированный ферментно – донорный иммуноанализ. Иммунохроматографические стрип – тесты.	6

5.2.4 Самостоятельная работа обучающихся

№ п/п	Наименование раздела дисциплины	Вид СРО	Трудоемкость, час
1	Хроматография, электрофорез, центрифугирование.	Проработка материалов по лекциям, учебникам, учебным пособиям	3
		Подготовка к практическим/лабораторным занятиям	3
		Домашнее задание, решение кейс-задач	5
2	Масс-спектрометрия. Флуоресцентная спектроскопия. Поляризация флуоресценции.	Проработка материалов по лекциям, учебникам, учебным пособиям	3
		Подготовка к практическим/лабораторным занятиям	3
		Домашнее задание, решение кейс-задач	5
3	Иммунохимические методы анализа.	Проработка материалов по лекциям, учебникам, учебным пособиям	4
		Подготовка к практическим/лабораторным занятиям	4

6 Учебно-методическое и информационное обеспечение дисциплины (модуля)

Для освоения дисциплины обучающийся может использовать:

6.1 Основная литература

Физико-химические методы анализа : учебное пособие для вузов (гриф УМО ВО) / В. Н. Казин [и др.] ; под редакцией Е. М. Плисса. — Москва : Издательство Юрайт, 2023. — 201 с. <https://urait.ru/bcode/518222>

Аналитическая химия и физико-химические методы анализа : учебное пособие / Г. Н. Дударева, Е. А. Анциферов, Л. А. Бегунова, В. И. Дударев. — Иркутск : ИРНИТУ, 2018. — 196 с. <https://e.lanbook.com/book/216926>

6.2 Дополнительная литература

Александрова, Т. П. Аналитическая химия и физико-химические методы анализа : учебное пособие. — Новосибирск : НГТУ, 2016. — 106 с. <https://e.lanbook.com/book/118503>

Никитина, Н. Г. Аналитическая химия и физико-химические методы анализа : учебник и практикум для вузов (гриф УМО ВО) . — 4-е изд., перераб. и доп. — Москва : Издательство Юрайт, 2023. — 394 с. : <https://urait.ru/bcode/510484>

6.3 Перечень учебно-методического обеспечения для самостоятельной работы обучающихся

Громов, Н. В. Аналитическая химия и физико-химические методы анализа. Сборник задач с основами теории и примерами решений : учебное пособие. — Новосибирск : НГТУ, 2018. — 112 с. <https://e.lanbook.com/book/118497>

6.4 Перечень ресурсов информационно-телекоммуникационной сети «Интернет», необходимых для освоения дисциплины (модуля)

Наименование ресурса сети «Интернет»	Электронный адрес ресурса
Научная электронная библиотека	http://www.elibrary.ru/defaulttx.asp?
Образовательная платформа «Юрайт»	https://urait.ru/
ЭБС «Лань»	https://e.lanbook.com/
АИБС «МегаПро»	https://biblos.vsu.ru/MegaPro/Web
Сайт Министерства науки и высшего образования РФ	http://minobrnauki.gov.ru
Электронная информационно-образовательная среда ФГБОУ ВО «ВГУИТ»	http://education.vsu.ru

6.5 Перечень информационных технологий, используемых при осуществлении образовательного процесса по дисциплине (модулю), включая перечень программного обеспечения, современных профессиональных баз данных и информационных справочных систем

При изучении дисциплины используется программное обеспечение, современные профессиональные базы данных и информационные справочные системы: ЭИОС университета, в том числе на базе программной платформы «Среда электронного обучения ЗКЛ», автоматизированная информационная база «Интернет-тренажеры», «Интернет-экзамен» и пр. (указать средства, необходимы для реализации дисциплины).

При освоении дисциплины используется лицензионное и открытое программное обеспечение:

Программы	Лицензии, реквизиты подтверждающего документа
-----------	---

Adobe Reader XI	(бесплатное ПО) https://acrobat.adobe.com/ru/ru/acrobat/pdf-reader/volume-distribution.html
Альт Образование	Лицензия № AAA.0217.00 с 21.12.2017 г. по «Бессрочно»
Microsoft Windows 8	Microsoft Open License
Microsoft Windows 8.1	Microsoft Windows Professional 8 Russian Upgrade Academic OPEN 1 License No Level#61280574 от 06.12.2012 г. https://www.microsoft.com/ru-ru/licensing/licensing-programs/open-license
Microsoft Office Professional Plus 2010	Microsoft Open License Microsoft Office Professional Plus 2010 Russian Academic OPEN 1 License No Level #48516271 от 17.05.2011 г. https://www.microsoft.com/ru-ru/licensing/licensing-programs/open-license Microsoft Open License Microsoft Office Professional Plus 2010 Russian Academic OPEN 1 License No Level #61181017 от 20.11.2012 г. https://www.microsoft.com/ru-ru/licensing/licensing-programs/open-license
Microsoft Office 2007 Standart	Microsoft Open License Microsoft Office 2007 Russian Academic OPEN No Level #44822753 от 17.11.2008 https://www.microsoft.com/ru-ru/licensing/licensing-programs/open-license
Libre Office 6.1	Лицензия № AAA.0217.00 с 21.12.2017 г. по «Бессрочно» (Включен в установочный пакет операционной системы Альт Образование 8.2)

Справочно-правовые системы

Программы	Лицензии, реквизиты подтверждающего документа
Справочные правовая система «Консультант Плюс»	Договор о сотрудничестве с «Информсвязь-черноземье», Региональный информационный центр общероссийской сети распространения правовой информации Консультант Плюс № 8-99/RD от 12.02.1999 г.

7. Материально-техническое обеспечение дисциплины

Учебная аудитория для проведения учебных занятий №403	Ноутбук, мультимедийный проектор ACER, экран. Комплекты мебели для учебного процесса. Альт Образование 8.2 [Лицензия № AAA.0217.00 г. по «Бессрочно»], Libre Office 6.1 [Лицензия № AAA.0217.00 с 21.12.2017 г. по «Бессрочно» (Включен в установочный пакет операционной системы Альт Образование 8.2)].
Учебная аудитория для проведения учебных занятий №414	Аквадистиллятор ДЭ-10М, термостат с охлаждением ТСО-1/80, насос вакуумный Vacuum-Sel, баня водяная UT 4329E, насос вакуумный Комовского, испаритель ротационный Heidolph Hei-VAP Value, прибор Сокслета-01 КШ 9/32, прибор Элекс-7М аналог прибора Чижовой, холодильник, ноутбук, мультимедийный, проектор ACER, экран. Альт Образование 8.2 [Лицензия № AAA.0217.00 г. по «Бессрочно»], Libre Office 6.1 [Лицензия № AAA.0217.00 с 21.12.2017 г. по «Бессрочно» (Включен в установочный пакет операционной системы Альт Образование 8.2)].
Помещение для самостоятельной работы № 416	Компьютеры - 2 шт., ноутбук, мультимедийный проектор ACER, экран. Комплекты мебели для учебного процесса. Альт Образование 8.2 [Лицензия № AAA.0217.00 г. по «Бессрочно»], Libre Office 6.1 [Лицензия № AAA.0217.00 с 21.12.2017 г. по «Бессрочно» (Включен в установочный пакет операционной системы Альт Образование 8.2)].

8. Оценочные материалы для промежуточной аттестации обучающихся по дисциплине (модулю)

Оценочные материалы (ОМ) для дисциплины (модуля) включают:

- перечень компетенций с указанием индикаторов достижения компетенций, этапов их формирования в процессе освоения образовательной программы;

- описание шкал оценивания;
- типовые контрольные задания или иные материалы, необходимые для оценки знаний, умений, навыков;
- методические материалы, определяющие процедуры оценивания знаний, умений, навыков и (или) опыта деятельности.

ОМ представляются отдельным комплектом и **входят в состав рабочей программы дисциплины (модуля)**.

Оценочные материалы формируются в соответствии с П ВГУИТ «Положение об оценочных материалах».

ПРИЛОЖЕНИЕ
к рабочей программе

1. Организационно-методические данные дисциплины для очно-заочной формы обучения

1.1 Объемы различных форм учебной работы и виды контроля в соответствии с учебным планом

Общая трудоемкость дисциплины (модуля) составляет 2 зачетные единицы.

Виды учебной работы	Всего ак. ч	Распределение трудоемкости по семестрам, ак. ч
		4 семестр
Общая трудоемкость дисциплины (модуля)	72	72
Контактная работа в т. ч. аудиторные занятия:	24,7	24,7
Лекции	12	12
<i>в том числе в форме практической подготовки</i>	-	-
Практические/лабораторные занятия	12	12
<i>в том числе в форме практической подготовки</i>	12	12
Консультации текущие	0,6	0,6
Вид аттестации (зачет)	0,1	0,1
Самостоятельная работа:	47,3	47,3
Проработка материалов по лекциям, учебникам, учебным пособиям	16,3	16,3
Подготовка к практическим/лабораторным занятиям	15	15
Домашнее задание, решение кейс-задач	16	16

**ОЦЕНОЧНЫЕ МАТЕРИАЛЫ
ДЛЯ ПРОМЕЖУТОЧНОЙ АТТЕСТАЦИИ**

по дисциплине

Современные методы физико-химической биологии

1. Перечень компетенций с указанием этапов их формирования

№ п/п	Код компетенции	Наименование компетенции	Код и наименование индикатора достижения компетенции
1	ПКв-4	Способен к формированию необходимой методической документации по образовательным программам в области микробиологии с применением информационных технологий	ИД1 _{ПКв-4} - Разрабатывает научно-методические и учебно-методические материалы, обеспечивающие реализацию образовательных программ
			ИД2 _{ПКв-4} - Проводит отдельные виды учебных занятий по образовательным программам под руководством специалиста более высокой квалификации
			ИД3 _{ПКв-4} -Использует технические средства поиска научно-биологической (микробиологической) информации в глобальных компьютерных сетях, универсальные пакеты прикладных компьютерных программ, специализированные базы данных

Код и наименование индикатора достижения компетенции	Результаты обучения (показатели оценивания)
1	2
ИД1 _{ПКв-4} - Разрабатывает научно-методические и учебно-методические материалы, обеспечивающие реализацию образовательных программ	Знает: основные методологические принципы и методы научно-исследовательской деятельности в области биологии; методы публичного представления результатов выполненных научных исследований
	Умеет: готовить и публиковать научно-технические отчёты и проекты; обосновывать выбор методов и методических приемов, адекватных поставленной цели; ставить цель и организовать проведение научного исследования по актуальной проблеме и разрабатывать научно-методические и учебно-методические материалы, обеспечивающие реализацию образовательных программ
	Владеет: навыками выполнения биохимического эксперимента с использованием возможностей различных физико-химических методов анализа, организации учебных занятий
ИД2 _{ПКв-4} - Проводит отдельные виды учебных занятий по образовательным программам под руководством специалиста более высокой квалификации	Знает: области применения и возможности различных физико-химических методов анализа по образовательным программам биологии
	Умеет: проводить отдельные виды учебных занятий по образовательным программам под руководством специалиста более высокой квалификации
	Владеет: навыками проведения учебных занятий по физико-химическим методам исследования
ИД3 _{ПКв-4} - Использует технические средства поиска научно-биологической (микробиологической) информации в глобальных компьютерных сетях, универсальные пакеты прикладных компьютерных программ, специализированные базы данных	Знает: технические средства поиска научно-биологической (микробиологической) информации в глобальных компьютерных сетях, универсальные пакеты прикладных компьютерных программ, специализированные базы данных
	Умеет: использовать технические средства поиска научно-биологической (микробиологической) информации в глобальных компьютерных сетях, универсальные пакеты прикладных компьютерных программ, специализированные базы данных
	Владеет: навыками работы на современном компьютерном оборудовании в сфере биологии и микробиологии

2. Паспорт фонда оценочных средств по дисциплине

№ п/п	Контролируемые модули/разделы/темы дисциплины	Индекс контролируемой компетенции (или ее части)	Оценочные средства		Технология оценки (способ контроля)
			наименование	№№ заданий	
1.	Хроматография, электрофорез, центрифугирование	ПКв-4	Тест, собеседование (зачет),	1-8 58-82	Бланочное или компьютерное тестирование Контроль преподавателем

			лабораторные работы (собеседование, вопросы к защите лабораторных работ), кейс-задания	26-28 39-46	Защита лабораторных работ Проверка кейс-задания
2.	Масс-спектрометрия. Флуоресцентная спектроскопия. Поляризация флуоресценции	ПКв-4	Тест, собеседование (зачет), лабораторные работы (собеседование, вопросы к защите лабораторных работ), кейс-задания	9-17 83-94 29-32 47-51	Бланочное или компьютерное тестирование Контроль преподавателем Защита лабораторных работ Проверка кейс-задания
3.	Иммунохимические методы анализа	ПКв-4	Тест, собеседование (зачет), лабораторные работы (собеседование, вопросы к защите лабораторных работ), кейс-задания	18-25 95-100 33-38 52-57	Бланочное или компьютерное тестирование Контроль преподавателем Защита лабораторных работ Проверка кейс-задания

3. Оценочные средства для промежуточной аттестации

Типовые контрольные задания или иные материалы, необходимые для оценки знаний, умений, навыков и (или) опыта деятельности, характеризующих этапы формирования компетенций в процессе освоения образовательной программы

Аттестация обучающегося по дисциплине проводится в форме тестирования и предусматривает возможность последующего собеседования (зачета).

Каждый вариант теста включает 25 контрольных заданий, из них:

- 10 контрольных заданий на проверку знаний;
- 10 контрольных заданий на проверку умений;
- 5 контрольных заданий на проверку навыков.

3.1 Тесты (тестовые задания к зачету)

ПКв-4 Способен к формированию необходимой методической документации по образовательным программам в области микробиологии с применением информационных технологий

№ задания	Тестовое задание с вариантами ответов и правильными ответами
1.	<p>Что называют элюентом?</p> <p>1) поток жидкости или газа, прошедший через слой неподвижной фазы 2) неподвижную фазу 3) поток жидкости или газа, перемещающий анализируемые вещества вдоль неподвижной фазы 4) смесь анализируемых веществ</p>
2.	<p>Что называют элюатом?</p> <p>1) поток жидкости или газа на выходе из хроматографической колонки 2) поток жидкости или газа на входе в хроматографическую колонку 3) поток жидкости или газа в хроматографической колонке 4) неподвижную фазу</p>
3.	<p>Что характеризует удерживание вещества в сорбенте в тонкослойной хроматографии?</p> <p>1) скорость передвижения подвижной фазы 2) отношение расстояния, пройденное зоной компонента, к расстоянию, пройденному фронтом подвижной фазы за то же время 3) высоту пика на хроматограмме 4) коэффициент распределения</p>

4.	<p>Что называется временем удерживания компонента в газовой хроматографии?</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) время нахождения компонента в испарителе хроматографа 2) время нахождения компонента в подвижной фазе колонки 3) время нахождения компонента в неподвижной фазе колонки 4) время от момента ввода пробы, до появления максимума на хроматограмме
5.	<p>С помощью какой характеристики проводят качественную идентификацию веществ в газовой хроматографии?</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) по площади хроматографического пика 2) по времени удерживания анализируемого компонента 3) по времени нахождения компонента в испарителе хроматографа 4) по времени пребывания анализируемого компонента в подвижной фазе
6.	<p>Какие задачи решают с помощью газовой хроматографии?</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) только качественную идентификацию веществ 2) только количественный анализ веществ 3) выполняют как качественные, так и количественные определения веществ 4) используют только для выделения чистых веществ
7.	<p>В чем преимущество тонкослойной хроматографии перед газо-адсорбционной колоночной?</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Дешевизна оборудования и простота выполнения 2) Лучшее разделение компонентов 3) Меньшая погрешность определений 4) Все перечисленное
8.	<p>Как провести качественный анализ смеси спиртов на газовом хроматографе?</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Получить хроматограмму смеси, по справочным данным определить качественный состав 2) Получить хроматограммы смеси и стандартов спиртов. Сравнить времена удержания определить качественный состав 3) Получить хроматограмму смеси, определить площадь каждого пика и методом нормировки определить состав 4) Эта задача невыполнима на газовом хроматографе
9.	<p>Масс-спектрометрия – это метод разделения</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) аналита и матрицы 2) белков, полипептидов, олигопептидов 3) ионов по величинам m/z – отношения массы к заряду 4) молекул по молекулярным массам 5) низкомолекулярных и высокомолекулярных соединений
10.	<p>Теоретические основы масс-спектрометрии заложены:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Джозефом Томсоном 2) Львом Ландау 3) Нильсом Бором 4) Эрнестом Резерфордом
11.	<p>Что такое энергетический выход люминесценции?</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Отношение интенсивности прошедшего через раствор излучения к интенсивности падающего излучения 2) отношение излучаемой веществом энергии к поглощенной 3) отношение поглощенной энергии к энергии, затраченной на безызлучательные процессы 4) отношение поглощенной энергии к энергии, излучаемой веществом
12.	<p>Что такое спектр люминесценции?</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) распределение интенсивности люминесценции в зависимости от концентрации примесей в образце 2) распределение интенсивности люминесценции по длинам волн или частотам поглощаемого света 3) распределение интенсивности люминесценции по длинам волн или частотам излучаемого свечения 4) распределение интенсивности люминесценции по длинам волн или частотам возбуждаемого света
13.	<p>Какие из этих методов используют эффект тушения люминесценции?</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) используется тушение люминесценции посторонними (определяемыми веществами) 2) используется концентрационное тушение люминесценции при увеличении концентрации определяемого компонента 3) используются химические реакции с образованием люминесцирующего комплекса 4) используются химические реакции, которые поглощают свет в другой области
14.	<p>Люминесценцию также называют:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) «горячим свечением» 2) «тепловым свечением» 3) «теплым свечением» 4) «холодным свечением»
15.	<p>Параметрами люминесценции, которые оценивают при ее практическом применении являются:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) интенсивность возбуждения люминесценции 2) интенсивность люминесценции 3) спектр люминесценции

	4) спектр поглощения
16.	Спектр люминесценции измеряется при: 1) Любой длине волны возбуждающего света 2) Любой длине волны люминесценции 3) Фиксированной длине волны возбуждающего света 4) Фиксированной длине волны люминесценции
17.	Сущность метода флюоресцирующих антител заключается: 1) в визуализации реакции антиген-антитело люминесцентными маркерами 2) в визуализации реакции антиген-антитело ферментами 3) в визуализации реакции антиген-антитело радионуклеидными маркерами
18.	Иммуноферментный анализ представляет собой: 1) высокочувствительный метод диагностики инфекционных заболеваний, основанный на выявлении антигенов с помощью соответствующих им антител, конъюгированных с ферментом 2) высокочувствительный метод диагностики инфекционных заболеваний, основанный на выявлении антигенов с помощью соответствующих им антител, конъюгированных с флюорохромом 3) количественное определение антигенов или антител, меченных радионуклеидом
19.	В зависимости от того, какие антигены используются, иммуноферментные тест-системы подразделяются на следующие группы: а) лизатные б) рекомбинантные в) пептидные
20.	В рекомбинантных иммуноферментных тест-системах используются: а) смесь нативных антигенов (лизированный или обработанный ультразвуком возбудитель инфекции, полученный в культуре б) полученные генно-инженерным способом белки-аналоги определённых белковых антигенов возбудителя в) химически синтезированные фрагменты белков.
21.	В пептидных иммуноферментных тестсистемах используется: 1) смесь нативных антигенов (лизированный или обработанный ультразвуком возбудитель инфекции, полученный в культуре 2) полученные генно-инженерным способом белки-аналоги 3) химически синтезированные фрагменты белков
22.	Иммуноферментный анализ используется для определения: 1) только антигенов 2) только антител 3) антител и антигенов 4) иммуноглобулинов и эндотоксинов
23.	Иммуноферментный анализ основан: 1) на реакции агглютинации 2) на реакции связывания комплемента 3) на реакции преципитации 4) на определении комплекса «антиген-антитело»
24.	К недостаткам радиоиммунного метода относятся: 1) дорогостоящее оборудование и реактивы 2) большие размеры анализатора 3) высокая чувствительность 4) необходимость работы с радиоактивными изотопами
25.	Радиоиммунологический анализ представляет собой: 1) высокочувствительный метод диагностики инфекционных заболеваний; основанный на выявлении антигенов с помощью соответствующих им антител, конъюгированных с ферментом 2) высокочувствительный метод диагностики инфекционных заболеваний, основанный на выявлении антигенов с помощью соответствующих им антител, конъюгированных с флюорохромом 3) количественное определение антигенов или антител, меченных радионуклеидом

3.2 Собеседование (лабораторные работы)

ПКв-4 Способен к формированию необходимой методической документации по образовательным программам в области микробиологии с применением информационных технологий

№ задания	Текст вопроса (задачи, задания) со структурой /алгоритмом ответа
26.	Общие принципы хроматографии. Задачи, решаемые в физико-химической биологии с помощью хроматографии. Хроматография - это динамический сорбционный метод разделения смесей веществ, основанный на многократном распределении веществ между двумя несмешивающимися фазами, одна из которых неподвижная, а другая — подвижная, непрерывно перемещающаяся вдоль неподвижной фазы.

	<p>В качестве подвижной фазы выбирается жидкость или газ, проходящие под давлением через слой неподвижной фазы. Неподвижной фазой выбирается либо твердое пористое вещество с развитой поверхностью, либо пленка жидкости, нанесенная на поверхность твердого инертного носителя.</p> <p>В процессе хроматографирования анализируемое вещество вместе с потоком подвижной фазы поступает в слой сорбента. По мере перемещения вдоль колонки вещество сорбируется с последующим десорбированием при контакте со свежими порциями подвижной фазы. Происходит непрерывное движение подвижной фазы, и как следствие, многократная сорбция и десорбция вещества. В этих условиях часть вещества находится в неподвижной фазе, а другая часть остается в подвижной фазе, перемещаясь вместе с ней. Таким образом, чем сильнее сорбируется вещество, тем медленнее оно перемещается вдоль колонки.</p> <p>В случае хроматографирования смеси веществ скорость перемещения каждого из них будет различна вследствие разного сродства к сорбенту. В результате этого одни компоненты задерживаются в начале пути, другие продвигаются дальше, что в итоге приводит на выходе из колонки к разделению исследуемых веществ.</p> <p>Во всех случаях разделение компонентов происходит вследствие разности в коэффициентах распределения между подвижной и неподвижной фазами. Закон распределения описывает динамическое равновесие, в котором молекулы непрерывно обмениваются между фазами. Равновесное распределение анализируемого вещества между несмешивающимися фазами характеризуется коэффициентом распределения (K). Коэффициент распределения определяется как отношение концентраций анализируемого вещества в неподвижной и подвижной фазах.</p> <p>Понятие «коэффициент распределения», взятое из закона распределения Нернста, является основополагающим в хроматографии.</p> <p>Величина его зависит только от природы подвижной и неподвижной фаз и температуры (с ростом температуры коэффициент распределения уменьшается).</p> <p>Относительная скорость движения анализируемого вещества обратно пропорциональна коэффициенту распределения K. При больших значениях коэффициента распределения большая часть вещества находится в неподвижной фазе и поэтому не перемещается. Напротив, если коэффициент мал, то это растворенное вещество перемещается с подвижной фазой. При отсутствии взаимодействия растворенных веществ с подвижной и неподвижной фазами в системе быстро устанавливается термодинамическое равновесие, в котором каждому компоненту соответствует определенное среднее время пребывания в подвижной фазе. Чем больше это время, тем быстрее компонент перемещается с подвижной фазой. Наибольшая скорость, равная скорости перемещения подвижной фазы, наблюдается при $K = 0$. Наименьшая скорость, равная нулю, отвечает случаю, когда компонент не растворяется в подвижной фазе. Различие молекул компонентов по скоростям движения приводит к разделению их на группы, перемещающиеся с различными скоростями.</p> <p>Подбор фаз для хроматографического разделения производится так, чтобы коэффициенты распределения компонентов смеси в них были различными. Термином «эффективный коэффициент распределения» обозначают отношение общего количества вещества (в отличие от концентрации) в одной фазе к общему количеству этого вещества в другой фазе, следовательно, это есть произведение коэффициента распределения вещества и отношения объемов обеих фаз.</p>
27.	<p>Виды хроматографии. Области применения.</p> <p>Методы, используемые в анализе, можно классифицировать по различным критериям. Основной набор таких критериев следующий: агрегатное состояние неподвижной и подвижной фаз; физико-химическая природа взаимодействия сорбента и сорбатов; способ введения элюента и его перемещения; способ размещения неподвижной фазы, то есть техника проведения хроматографии; цели хроматографирования.</p> <p>Кроме того, методы могут основываться на разной природе сорбционного процесса, на технических условиях проведения хроматографического разделения (например, низкое или высокое давление). Рассмотрим подробнее вышеперечисленные основные критерии и связанные с ними наиболее широко используемые виды хроматографии. Агрегатное состояние элюента и сорбента По этому признаку хроматография подразделяется на жидкостную и газовую. Названия методов отражают состояние подвижной фазы. Жидкостная хроматография – это метод, применяемый в процессах разделения смесей высокомолекулярных соединений, в том числе биологически важных.</p> <p>В зависимости от агрегатного состояния сорбента она делится на жидкостно-жидкостную и жидкостно-твердофазную.</p> <p>Газовая хроматография бывает следующих видов: Газоадсорбционная (газо-твердофазная), в которой используется твердый сорбент, например уголь, силикагель, цеолиты либо пористые полимеры. В роли элюента – переносчика разделяемой смеси выступает инертный газ (аргон, гелий), азот, углекислый газ. Разделение летучих компонентов смеси осуществляется благодаря разной степени их адсорбции. Газо-жидкостная. Неподвижная фаза в данном случае состоит из пленки жидкости, нанесенной на твердую инертную основу. Компоненты пробы разделяются соответственно их адсорбируемости или растворимости.</p> <p>Метод газовой хроматографии широко применяется для анализа смесей органических соединений (с использованием продуктов их распада или производных в газообразной форме). Взаимодействие сорбента и сорбатов</p> <p>По данному критерию выделяют такие виды, как: Адсорбционная хроматография, посредством которой осуществляется разделение смесей за счет различий в степени адсорбции веществ неподвижным сорбентом. Распределительная. С ее помощью проводят разделение на основе разной растворимости компонентов смеси. Растворение происходит либо в подвижной и неподвижной фазах (в жидкостной хроматографии), либо только в неподвижной фазе (в газо-жидкостной хроматографии). Осадочная. В основе этого метода хроматографии лежит разная растворимость образующихся осадков разделяемых</p>

	<p>веществ.</p> <p>Эксклюзионная, или гель-хроматография. Базируется на различии в размерах молекул, благодаря чему варьирует их способность проникать в поры сорбента – так называемой гелевой матрицы.</p> <p>Аффинная. Этот специфический метод, основой которого служит особый тип биохимического взаимодействия разделяемых примесей с лигандом, образующим комплексное соединение с инертным носителем в неподвижной фазе. Данный метод эффективен при разделении смесей белков-ферментов и распространен в биохимии. Ионообменная. В качестве фактора разделения пробы этот способ использует различие в способности компонентов смеси к ионному обмену с неподвижной фазой (ионообменником). В ходе процесса происходит замещение ионов неподвижной фазы ионами веществ в составе элюента, при этом вследствие разного сродства последних к ионообменнику возникает разница в скорости их перемещения, и таким образом смесь разделяется. Для неподвижной фазы чаще всего употребляются ионообменные смолы – особые синтетические полимеры. Ионообменная хроматография имеет два варианта – анионный (задерживает отрицательные ионы) и катионный (задерживает соответственно положительные ионы).</p> <p>Применяется данный метод чрезвычайно широко: в разделении электролитов, редкоземельных и трансурановых элементов, в очистке воды, в анализе лекарственных препаратов. Существуют два основных способа, посредством которых проба перемещается относительно неподвижной фазы: Колоночная хроматография осуществляет процесс разделения в особом устройстве – хроматографической колонке – трубке, во внутренней полости которой помещается неподвижный сорбент. По способу заполнения колонки подразделяются на два типа: насадочные (так называемые «набивные») и капиллярные, в которых слой твердого сорбента или жидкостная пленка неподвижной фазы наносится на поверхность внутренней стенки. Насадочные колонки могут иметь различную форму: прямую, U-образную, спиральную. Капиллярные колонки имеют спиральную форму. Плоскостная (планарная) хроматография. В качестве носителя для неподвижной фазы в данном случае может применяться специальная бумага либо пластина – металлическая, стеклянная, пластиковая – на которую нанесен тонкий слой сорбента. Метод хроматографии при этом именуется соответственно бумажным или тонкослойным. В отличие от колоночного метода, где хроматографические колонки используются многократно, в плоскостной хроматографии любой носитель со слоем сорбента может быть использован только один раз. Процесс разделения происходит при погружении пластины или листа бумаги в емкость с элюентом.</p>
28.	<p>Получение субклеточных фракций из гомогената печени крысы методом дифференциального центрифугирования.</p> <p>Этот метод основан на различиях в скоростях седиментации частиц, отличающихся друг от друга размерами и плотностью. Разделяемый материал, например гомогенат ткани, центрифугируют при ступенчатом увеличении центробежного ускорения, которое выбирается так, чтобы на каждом этапе на дно пробирки осаждалась определенная фракция. В конце каждой стадии осадок отделяют от надосадочной жидкости и несколько раз промывают, чтобы в конечном итоге получить чистую осадочную фракцию. К сожалению, получить абсолютно чистый осадок практически невозможно; чтобы понять, почему это происходит, обратимся к рассмотрению процесса, происходящего в центрифужной пробирке в начале каждой стадии центрифугирования. Сначала все частицы гомогената распределены по объему центрифужной пробирки равномерно, поэтому получить чистые препараты осадков самых тяжелых частиц за один цикл центрифугирования невозможно: первый образовавшийся осадок содержит в основном самые тяжелые частицы, но, кроме этого, также некоторое количество всех исходных компонентов. Получить достаточно чистый препарат тяжелых частиц можно лишь при повторном суспендировании и центрифугировании исходного осадка. Дальнейшее центрифугирование супернатанта при последующем увеличении центробежного ускорения приводит к седиментации частиц средних размеров и плотности, а затем и к осаждению самых мелких частиц, имеющих наименьшую плотность</p>
29.	<p>Принцип метода масс - спектрометрии.</p> <p>Разделение происходит в условиях высокого вакуума в электрических и магнитных полях, имеет своей целью определение масс молекул (атомов) и относительного содержания в анализируемом веществе компонентов, различных по массе.</p> <p>Масс-спектральный анализ сводится, в основном, к следующим операциям:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Превращение атомов вещества в положительные ионы. 2. Создание ионного пучка или групп ионов в статическом или импульсном электростатическом полях. 3. Пространственное или временное разделение потока частиц в магнитном и электрическом полях. 4. Раздельное измерение и регистрация интенсивности каждого компонента потока. <p>Основные составляющие приборов масс-спектрометрии.</p> <p>Принцип, по которому проводится анализ, определяет наличие следующих основных узлов у каждого масс-спектрометра:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Источник ионов, в котором осуществляется новообразование и формирование пучка или групп частиц. 2. Масс-анализатор, где производится разделение сформированного потока на компоненты, отличающиеся величиной отношения их массы к заряду. 3. Устройства для улавливания и регистрации частиц. Принцип действия устройств — измерение интенсивности ионного тока каждого компонента. <p>Кроме перечисленных основных узлов, в них также содержатся вакуумные системы с насосами и вентилями для получения высокого вакуума, манометры, системы подготовки и ввода анализируемого вещества в источник ионов, электронные схемы питания, индикаторы массовых чисел, стабилизаторы тока и напряжений и т.д.</p> <p>Классификация масс-спектральных приборов.</p>

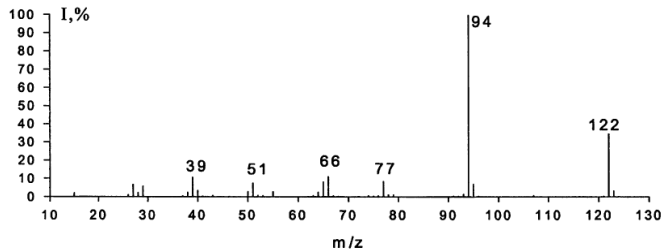
	<p>Принцип классификации масс-спектрометров: типы действия приборов делятся на статические и динамические, в зависимости от метода разделения ионов в масс-анализаторе. К статическим масс-спектрометрам относятся приборы, в которых применяется магнитный масс-анализатор для сепарации. Ионный поток разделяется на составляющие компоненты в однородном секторном поперечном магнитном поле</p>
30.	<p>Применение масс-спектрометрии в биологических исследованиях.</p> <p>Применение газовой хроматографии-масс-спектрометрии (ХМС) используется для определения в биологических пробах человека компонентов клеточных стенок микроорганизмов, так называемых микробных маркеров из числа высших жирных кислот. У каждого микроорганизма есть "свои", т.е. характерные только ему маркеры, при обнаружении которых делаются заключения о присутствии тех, или иных микробов с их количественной оценкой.</p>
31.	<p>Поляризация флуоресценции. Применение поляризации флуоресценции в биохимии и биофизике.</p> <p>При возбуждении поляризованным светом испускание флуоресцирующего образца также поляризовано. Поляризация является результатом фотоотбора флуорофоров в соответствии с их ориентацией по отношению к направлению поляризованного возбуждения. Испускание может быть деполяризовано по ряду причин, относительная важность которых зависит от исследуемого образца. Вращательная диффузия флуорофоров - одна из общих причин деполяризации. Измерения поляризации или анизотропии выявляют среднее угловое смещение флуорофора, которое происходит между поглощением и последующим испусканием фотона. Оно зависит от скорости и степени вращательной диффузии за время жизни возбужденного состояния. Диффузионные движения в свою очередь зависят от вязкости растворителя и размеров и формы диффундирующих частиц. Например, для флуорофора, находящегося в растворе, скорость вращения зависит от вязкого сцепления, накладываемого на флуорофор растворителем. В результате изменение вязкости растворителя будет приводить к изменению анизотропии флуоресценции. Обнаружение зависимости анизотропии флуоресценции от вращательной диффузии привело к многочисленным применениям этого метода в биохимических исследованиях. В качестве примера отметим, что измерение анизотропии флуоресценции использовалось для количественной оценки денатурации и реакций ассоциации белков с лигандами, изучения скорости вращения белков. Кроме того, на основе анизотропии мембранно-связанных флуорофоров были установлены внутренняя вязкость мембран и влияние состава мембран на их фазовые переходы.</p>
32.	<p>Определение структурнодинамических параметров мембран эритроцитов с помощью зонда пирена.</p> <p>В процессе доклинических испытаний и последующих клинических исследований перфторана стало ясно, что расширился круг патологических состояний, при которых перфторан нашел применение не в качестве кровезаменителя, а как лекарственный препарат, обладающий противогипоксическим и противоишемическим действием. Одним из ключевых звеньев патогенетического процесса при ишемических и гипоксических состояниях, и особенно при реперфузии, является сдвиг в соотношении про- и антиоксидантных систем организма, определяющих программу функционирования клеток вплоть до развития апоптоза и некроза. Относительно влияния плеторического введения перфторана на состояние про- и антиоксидантных систем организма существуют весьма неоднозначные представления. Настоящее исследование посвящено экспериментальному изучению влияния однократного плеторического введения перфторана на интенсивность начальных стадий перекисного окисления липидов и на некоторые параметры структурно-функционального состояния мембран эритроцитов</p>
33.	<p>Принцип метода. Чувствительность и специфичность иммунохимических методов анализа.</p> <p>Имунохимический анализ объединяет методы, основанные на реакциях антиген-антитело. Такие реакции часто называют «серологическими», так как до недавних пор единственным источником антител служила сыворотка (лат. serum) крови иммунизированных животных. Лишь с появлением гибридной технологии антитела стали получать в культурах клеток. Это существенно повысило специфичность анализа, так как каждая гибридома продуцирует антитела против единственного эпитопа.</p> <p>С помощью иммунохимического анализа решаются две основных задачи: выявление антител и антигенов. Определение антител проводят в реакциях с известными антигенами, для обнаружения антигенов используют известные антитела. Например, выявление поверхностного антигена вируса гепатита В проводят при помощи антител против HBsAg, а наличие анти-HBs антител тестируют в реакциях с HbsAg.</p> <p>Главным стимулом для совершенствования иммунохимических методов было (и остается) стремление к повышению их чувствительности: она тем выше, чем меньше концентрация выявляемых антител и антигенов. Другим мотивом служило изучение антигенных смесей, нацеленное на расшифровку входящих в их состав компонентов. Сюда примыкает анализ спектра антител, продуцируемых в ходе иммунного ответа, например инфекционного процесса.</p>
34.	<p>Современные методы иммунохимического анализа, основанные на применении меченых реагентов</p> <p>Эволюция иммуноанализа последние 50 лет идет в следующих направлениях: повышение чувствительности и специфичности: применение моноклональных антител; применение рекомбинантных антител; применение рекомбинантных и синтетических антигенов; применение fusion-белков (рекомбинантные белки, продукты слияния различных генов для придания молекулам желаемых свойств: специфичности, структуры, биохимической или рецепторной активности); применение аптомеров (одноцепочечный олигонуклеотид, проектируемый для специфического связывания с белками или другими нуклеиновыми кислотами); разработка методов с повышенным соотношением сигнал/шум: твердофазный ИФА в «сэндвич»-модификации, ФИА с временным разрешением, электрохемоллюминесцентный иммуноанализ (ЭХИА);</p>

	<p>упрощение и ускорение анализа: отказ от конкурентного анализа в пользу неконкурентного; отказ от радиоизотопных меток в пользу ферментных или флуоресцентных (хемолюминесцентных); создание ускоренных методов иммуноанализа, не требующих специального оборудования и навыков (иммунохроматография (ИХА), дотИФА, и др.); создание наборов для одновременного исследования нескольких параметров; миниатюризация анализа: уменьшение размеров устройств; сокращение количества образца, необходимого для анализа; сокращение количества реагентов, необходимых для анализа.</p>
35.	<p>Классификация иммунохимических методов анализа. В основу классификации методов ИФА положено несколько подходов:</p> <p>1 — по типу реагентов, присутствующих на первой стадии ИФА:</p> <ul style="list-style-type: none"> • В конкурентном ИФА на первой стадии в системе присутствуют одновременно анализируемое соединение и его аналог, меченный ферментом и конкурирующий за центры специфического связывания с ним; • Для неконкурентных методов характерно присутствие на первой стадии только анализируемого соединения и специфичных к нему центров связывания. <p>2 — по принципу определения исследуемого вещества:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Прямое определение концентрации вещества (АГ или АТ). Используют антитела к исследуемому веществу, соединенные со специфической меткой. В этом случае метка будет находиться в образовавшемся специфическом комплексе АГ-АТ. Концентрация определяемого вещества будет прямо пропорциональна регистрируемому сигналу; • Непрямое определение концентрации вещества – по разности общего числа мест связывания и оставшихся свободными центрами связывания. Концентрация определяемого вещества при этом будет возрастать, а регистрируемый сигнал снижаться, следовательно, в данном случае прослеживается обратная зависимость от величины регистрируемого сигнала. <p>3 — по типу результатов:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Количественный; • Полуколичественный; • Качественный.
36.	<p>Радиоиммунный анализ. Достоинство метода РИА. Радиоиммунный анализ (РИА), также радиоиммунологический или изотопный иммунологический анализ, (англ. Radioimmunoassay, RIA) — метод количественного определения биологически активных веществ в биологических жидкостях, основанный на конкурентном связывании искомого стабильного и аналогичных им меченных радионуклидом веществ со специфическими связывающими системами, с последующей детекцией на специальных счетчиках — радиоспектрометрах. Впервые метод был разработан Соломоном Берсоном и Розалин Сасмен Ялоу в 1950-х годах. С помощью этого метода они изучали клиренс инсулина у больных диабетом. Р. Ялоу получила за это Нобелевскую премию в 1977 году. Для метки антител или антигенов чаще всего используется изотоп йода ¹²⁵I, который имеет период полураспада 60 дней и высокую удельную радиоактивность. В основе метода радиоиммунного анализа (РИА) — маркирование радионуклидом Аг или АТ, вступающих в реакцию. Образующиеся иммунные комплексы выделяют из системы и определяют их радиоактивность на счётчиках импульсов. Наибольшее распространение получил радиоиммунный анализ на твёрдой фазе (твёрдофазный РИА) с использованием меченых Аг или АТ, сорбированных в лунках полистироловых панелей. РИА применяют для выявления микробных Аг, различных гормонов, ферментов и т.д. Широкое распространение метода ограничивает необходимость создания условий, обеспечивающих безопасность работы с радионуклидами.</p>
37.	<p>Технологии иммуноферментного анализа. Поляризационный флуоресцентный иммуноанализ. Имуноферментный анализ (сокращённо ИФА, англ. enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) — лабораторный иммунологический метод качественного или количественного определения различных низкомолекулярных соединений, макромолекул, вирусов и пр., в основе которого лежит специфическая реакция антиген-антитело. Выявление образовавшегося комплекса проводят с использованием фермента в качестве метки для регистрации сигнала. Теоретические основы ИФА опираются на современную иммунохимию и химическую энзимологию, знание физико-химических закономерностей реакции антиген-антитело, а также на основные принципы аналитической химии. ИФА является одним из наиболее активно развивающихся направлений химической энзимологии. Это обусловлено тем, что в ИФА уникальная специфичность иммунохимической реакции (то есть антитела связываются исключительно с определёнными антигенами, и ни с какими другими) сочетается с высокой чувствительностью детекции ферментативной метки (вплоть до 10⁻²¹ моль в образце). Высокая стабильность реагентов, простота методов регистрации, возможность создания каскадных систем усиления различных химических сигналов, относительно низкая цена и многие другие достоинства метода ИФА способствовали его широкому внедрению в различные области медицины, сельское хозяйство, микробиологическую и пищевую промышленность, охрану окружающей среды, а также в научные исследования</p>
38.	<p>Ферментно – мультиплицируемый иммунный тест. Преимущество теста. Ферментно-мультиплицируемый иммунный тест - один из первых гомогенных ИФА, разработанный в 1973 году. Это простой, быстрый метод, который в настоящее время используется для регистрации широкого спектра веществ (в частности, малых молекул). В этом иммуноанализе антиген в образце</p>

3.3. Кейс-задания

ПКв-4 Способен к формированию необходимой методической документации по образовательным программам в области микробиологии с применением информационных технологий

№ задания	Текст вопроса (задачи, задания) со структурой /алгоритмом ответа															
39.	<p>Задача. Определить массовую долю (%) компонентов газовой смеси по следующим данным:</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Компонент:</th> <th>Пропан</th> <th>Бутан</th> <th>Пентан</th> <th>Циклогексан</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>S, мм²</td> <td>175</td> <td>203</td> <td>182</td> <td>35</td> </tr> <tr> <td>k</td> <td>0,68</td> <td>0,68</td> <td>0,69</td> <td>0,85</td> </tr> </tbody> </table> <p>Ответ: Расчеты проводим по методу внутренней нормализации, согласно которому: $\omega_i = S_i \cdot k_i / \sum S_i \cdot k_i \cdot 100\%$, где ω_i – массовая доля i-го компонента в смеси, %; S_i – площадь пика i-го компонента; k_i – поправочный коэффициент, определяемый чувствительностью детектора к i-му компоненту. Найдем приведенную суммарную площадь пиков: $\sum S_i \cdot k_i = 175 \cdot 0,68 + 203 \cdot 0,68 + 182 \cdot 0,69 + 35 \cdot 0,85 = 412,4$. Отсюда массовая доля (%) пропана равна $\omega(\text{пропана}) = (175 \cdot 0,68 / 412,4) \cdot 100\% = 28,6\%$. Массовая доля пропана 28,6%. Аналогично находим массовые доли ω (%) остальных компонентов смеси: $\omega(\text{бутана}) = 33,46\%$, $\omega(\text{пентана}) = 30,46\%$, $\omega(\text{циклогексана}) = 7,22\%$. При выполнении анализа по методу внутреннего стандарта расчет проводят по формуле $\omega_i = (S_i \cdot k_i) / (S_{\text{СТ}} \cdot k_{\text{СТ}}) \cdot R \cdot 100\%$, где $S_{\text{СТ}}$ – площадь пика вещества, введенного в качестве внутреннего стандарта; $k_{\text{СТ}}$ – его поправочный коэффициент; R – отношение массы внутреннего стандарта к массе анализируемой пробы.</p>	Компонент:	Пропан	Бутан	Пентан	Циклогексан	S, мм ²	175	203	182	35	k	0,68	0,68	0,69	0,85
Компонент:	Пропан	Бутан	Пентан	Циклогексан												
S, мм ²	175	203	182	35												
k	0,68	0,68	0,69	0,85												
40.	<p>Задача. Реакционную массу после нитрования толуола проанализировали методом газожидкостной хроматографии с применением этилбензола в качестве внутреннего стандарта. Определить процент непрореагировавшего толуола по следующим экспериментальным данным:</p> <table border="1"> <tbody> <tr> <td>Взято толуола, г</td> <td>12,7500</td> </tr> <tr> <td>Внесено этилбензола, г</td> <td>1,2530</td> </tr> <tr> <td>S_{толуола}, мм²</td> <td>307</td> </tr> <tr> <td>K_{толуола}</td> <td>1,01</td> </tr> <tr> <td>S_{этилбензола}, мм²</td> <td>352</td> </tr> <tr> <td>K_{этилбензола}</td> <td>1,02</td> </tr> </tbody> </table> <p>Ответ: Расчет проводят по методу внутреннего стандарта, используя формулу: $\omega_i = (S_i \cdot k_i) / (S_{\text{СТ}} \cdot k_{\text{СТ}}) \cdot R \cdot 100\%$, Подставляем данные задачи в эту формулу: $\omega_i = (307 \cdot 1,01) / (352 \cdot 1,02) \cdot (1,2530 / 12,75) \cdot 100 = 8,49\%$</p>	Взято толуола, г	12,7500	Внесено этилбензола, г	1,2530	S _{толуола} , мм ²	307	K _{толуола}	1,01	S _{этилбензола} , мм ²	352	K _{этилбензола}	1,02			
Взято толуола, г	12,7500															
Внесено этилбензола, г	1,2530															
S _{толуола} , мм ²	307															
K _{толуола}	1,01															
S _{этилбензола} , мм ²	352															
K _{этилбензола}	1,02															
41.	<p>Задача. Для хроматографического определения никеля на бумаге, пропитанной раствором диметилглиоксима, приготовили три стандартных раствора. Для этого навеску 0,2480 NiCl₂ · 6H₂O растворили в мерной колбе на 50 мл. Затем из этой колбы взяли 5,0; 10,0 и 20,0 мл и разбавили в колбах на 50 мл. Исследуемый раствор также разбавили в мерной колбе на 50 мл. Постройте калибровочный график в координатах h – C_{Ni} и определите содержание никеля (мг) в исследуемом растворе, если высота пиков стандартных растворов равна h₁ = 25,5; h₂ = 37,5; h₃ = 61,3, а высота пика исследуемого раствора равна h_x = 49,0 мм.</p> <p>Ответ: Находим массу никеля в навеске NiCl₂ · 6H₂O, учитывая, что M(NiCl₂ · 6H₂O) и M(Ni) – молярные массы NiCl₂ · 6H₂O и Ni соответственно равны 238 г/моль и 59 г/моль. Тогда масса никеля в исследуемой навеске NiCl₂ · 6H₂O составит: $m_{\text{Ni}} = (59 \cdot 0,248) / 238 = 0,0615$ г 0,0615г – 50 мл содержание никеля в первой колбе 0,00615 г/50мл X г - 5 мл 0,0615г – 50 мл содержание никеля во второй колбе 0,0123 г/50мл Xг - 10 мл 0,0615 - 50 мл содержание никеля в третьей колбе 0,0246 г/50 мл Xг - 20 мл На основании проведенных расчетов строим график в координатах: h, мм – содержание никеля (C, г/50 мл). На график наносим высоту пика исследуемого раствора h=49 мм и находим содержание никеля в исследуемом растворе C = 18,45 мг/50мл</p>															
42.	<p>Задача. В централизованную лабораторию доставлена проба венозной крови на определение белковых фракций. Полученная сыворотка оказалась молочно-белого цвета.</p> <p>Задания:</p>															

	<p>1. На чем основано определение белковых фракций методом электрофореза?</p> <p>2. Какие преимущества имеет электрофорез на ацетатной пленке по сравнению с электрофорезом на бумаге?</p> <p>3. Какие фракции белков крови выделяются методом электрофореза?</p> <p>Ответ:</p> <p>1. Принцип: частицы белка перемещаются в электрическом поле постоянного тока (в щелочной среде - к аноду, в кислой - к катоду) с разной скоростью в зависимости от величины заряда и молекулярной массы. В щелочной среде наиболее быстро перемещаются альбумины, затем α_1 -, α_2 -, β - и γ - глобулины.</p> <p>2. Электрофорез на ацетатной пленке имеет ряд преимуществ:</p> <ol style="list-style-type: none"> четкость разделения фракций из-за однородности пленки; меньшее время электрофореза; легкая отмываемость фона; минимальная абсорбция белком пленки, а значит, высокая точность. <p>3. Количество выделенных фракций зависит от поддерживающей среды. Белки сыворотки крови разделяются методом электрофореза на бумаге на 5 фракций: α_1 -, α_2 -, β - и γ - глобулины и альбумины.</p>
43.	<p>Задача. После центрифугирования пробы крови, взятой без антикоагулянта, направленной для определения активности лактатдегидрогеназы, надосадочная жидкость получилась слегка розового цвета.</p> <p>Задание:</p> <ol style="list-style-type: none"> Назовите эту жидкость. Можно ли в ней определять активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ)? В какой биологической жидкости предпочтительнее определять активность ЛДГ? <p>Ответ:</p> <ol style="list-style-type: none"> Плазма. Нельзя использовать в качестве антикоагулянта оксалата натрия. Особенностью является точное соотношение количества крови и антикоагулянта: 1 : 9 является критическим. Если объем антикоагулянта не соответствует высокому значению гематокрита, протромбиновое время увеличивается. Кровь до центрифугирования должна храниться в ледяной бане. Правила измерения протромбинового времени следующие: запуск секундомера левой рукой должен быть скоординирован с прибавлением хлористого кальция или плазмы, а остановка (левой рукой) - с появлением нитей фибрина или сетки на дне пробирки.
44.	<p>Задача. К какой группе методов биологической науки относятся хроматография, метод меченых атомов, электрофорез? Где применяются эти методы?</p> <p>Ответ: Эти методы относятся к группе биохимических методов так как ориентированы на работу с химическими веществами организмов. Применяются в медицине для диагностики и лечения заболеваний (электрофорез, метод меченых атомов). Применяются для разделения веществ в смеси (электрофорез, хроматография).</p>
45.	<p>Задача. Известно, что в растительных клетках присутствует два вида хлорофилла: хлорофилл а и хлорофилл b. Учёному для изучения их структуры необходимо разделить эти пигменты. Какой метод он должен использовать для их разделения? На чём основан этот метод?</p> <p>Ответ: Целесообразно применить метод хроматографии. Метод основан на разной скорости движения веществ смеси через адсорбент в зависимости от их молекулярной массы.</p>
46.	<p>Задача. Каким методом учёный может отделить ядра клеток от остального содержимого? На чём основан этот метод?</p> <p>Ответ:</p> <ol style="list-style-type: none"> с помощью центрифугирования метод основан на разной скорости оседания органоидов под действием центробежных сил.
47.	<p>Задача. Ниже представлен масс-спектр ЭУ органического соединения. Укажите, какому из перечисленных ниже соединений принадлежит этот спектр.</p> <p>А) бензойная кислота, б) о-этилфенол, в) о-метокситолуол, г) п-этилфенол, д) фенилэтиловый эфир, е) п-толилметилэфир, ж) 2-фенилэтиловый спирт, з) 1-фенилэтиловый спирт, и) 2,4-диметилфенол, к) 2,6-диметилфенол.</p>  <p>Ответ: Фенилэтиловый эфир</p>
48.	<p>Задача. Составьте схему фрагментации бутирофенона, масс-спектр которого представлен ниже.</p>

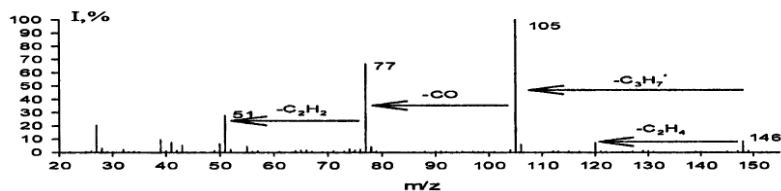
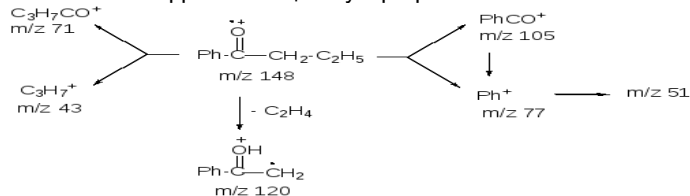


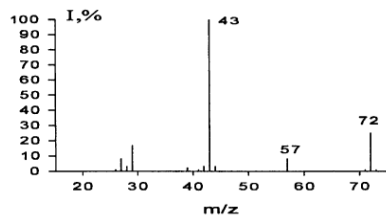
Рис. Масс-спектр с ионизацией ЭУ бутирофенона.

Ответ: Схема фрагментации бутирофенона



49.

Задача. Идентифицируйте соединение, масс-спектр ЭУ которого представлен ниже:



m/z	I, %	m/z	I, %
15	4,31	42	3,12
26	1,12	43	100
27	8,34	44	2,23
28	3,25	57	8,87
29	17,6	71	1,29
39	2,78	72	25,0
41	1,03	73	1,11

Ответ:

Пик с m/z 72 удовлетворяет критериям, для того, чтобы его можно было рассматривать в качестве молекулярного. По пику M+1 устанавливаем максимальное количество атомов углерода (см. табл. пиков):

25.0 – 100%

1.11 – x%

x = 4.44

Определяется количество атомов углерода = 4.44 : 1.11 = 4.

Далее, используя таблицу «Точные величины масс для определения формул», предполагаем брутто-формулу C₄H₈O.

По интенсивности пика m/z 44 можно сделать вывод, что ион с m/z 43 (максимальный) имеет состав C₂H₃O и образуется в результате элиминирования этильного радикала из M⁺, а ион с m/z 29 представляет собой этил-катион. Следовательно, на рисунке представлен масс-спектр бутанона-2.

50.

Задача. Навеску урановой руды массой 0.1500 г растворили и после соответствующей обработки раствор разбавили водой до 100.0 мл. Интенсивность флуоресценции раствора составила 60.0 у.е. После добавления к 20.0 мл этого раствора 5.0000 мкг урана интенсивность флуоресценции увеличилась до 110.0 у.е. Рассчитайте массовую долю урана (ω, %), считая, что интенсивность флуоресценции пропорциональна концентрации урана, а интенсивность флуоресценции контрольного опыта эквивалентна флуоресценции 1 мкг урана. Какое количество урана (кг) содержится в 1 т руды?

Ответ: В 1 т урановой руды содержится 0.19 кг урана.

51.

Задача. При определении марганца в алюминии атомноабсорбционным способом был построен градуировочный график по следующим данным:

Концентрация стандартных 0.5 1.0 1.5 2.0 растворов Mn, мкг/см³

Атомное поглощение Mn 12 25 37 49 при 279.5 нм (число делений)

Навеска анализируемого образца массой 0.2000 г растворена в смеси кислот и перенесена в мерную колбу вместимостью 100.0 мл. Атомное поглощение этого раствора составляет 23 деления шкалы. Определить массовую долю марганца в алюминии (в %).

Ответ: Согласно данным задачи, строим градуировочный график в координатах Сст – Аст. По графику, методом интерполяции по величине Ax находим Сx; получаем - Сx=0.925 мкг Mn в 1.0 см³. Массовая доля марганца в алюминии равна: 0.0462%

52.

Задача. В лабораторию института вакцин и сывороток поступила противодифтерийная сыворотка для определения ее специфической активности. Какую реакцию следует использовать для этой цели? Какие ингредиенты следует приготовить для ее постановки?

Ответ: Можно использовать реакцию флоккуляции. Ингредиенты реакции: противодифтерийная сыворотка в различных разведениях, дифтерийный анатоксин с активностью 1Lf, физиологический раствор.

Активность сыворотки выражается в МЕ/мл. (минимальное количество сыворотки, которое даёт интенсивную «инициальную» флоккуляцию с 1Lf анатоксина). Феномен флоккуляции – (помутнение) – внешнее проявление образования комплекса анатоксин + антитоксин в оптимальных количественных соотношениях ингредиентов.

53.

Задача. У доярки совхоза при исследовании крови на наличие антител к бруцеллам обнаружен титр 1:200. Как доказать, больна ли доярка в настоящий момент или этот показатель – результат прививки?

Ответ: Подтвердить диагноз можно с помощью ИФА определением противобруцеллезных IgM и

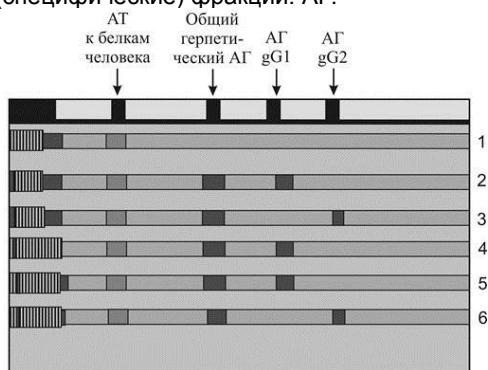
54.	<p>IgG. IgM является показателем острого бруцеллеза.</p> <p>Задача. Дать понятие реакциям с мечеными компонентами</p> <p>Ответ: В настоящее время широко применяются серологические реакции с мечеными тем или иным способом компонентами (антителами – АТ или антигенами – АГ). Они отличаются высокой специфичностью, позволяют быстро получить результаты, поэтому используются для экспресс-диагностики вирусных и бактериальных инфекций. К ним относятся реакция иммунофлюоресценции – РИФ, иммуноферментный анализ – ИФА, радиоиммунный анализ – РИА.</p> <p>В качестве меток используются:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) флюорохромы – вещества, способные флюоресцировать при облучении ультрафиолетом (поглощают энергию света определенной длины волны и излучают свет большей длины волны): флюоресцеин изотиоцианат (зеленый цвет), фикоэритрин (оранжевый), родамин (красный); используются в РИФ; 2) ферменты: пероксидаза хрена, галактозидаза, щелочная фосфатаза; вызывают расщепление субстрата с образованием окрашенных продуктов при взаимодействии с хромогеном; используются для ИФА; 3) радиоактивные метки – используются в РИА.
55.	<p>Задача. Охарактеризовать реакцию иммунофлюоресценции (РИФ), ее разновидности, постановку и применение.</p> <p>Ответ: РИФ (реакция Кунса) – основана на том, что антигены тканей или микроорганизмы после обработки иммунными сыворотками с антителами, мечеными флюорохромами, способны светиться в УФ-лучах, что обнаруживается при люминесцентной микроскопии мазков. Т.о. обязательно используется люминесцентная микроскопия (т.е. данный метод является разновидностью микроскопического метода диагностики). Использование флюорохромов основано на том, что они способны вступать в химическую связь с антителами, не нарушая их иммунологической специфичности. Метод позволяет обнаружить микроорганизмы непосредственно в инфекционном материале, тканях животных и культурах клеток. Простота метода, не требующего выделения чистой культуры в сочетании с быстротой получения результатов, позволяют отнести РИФ в разряд экспресс-диагностики.</p> <p>Различают 3 основные разновидности метода: 1) прямой; 2) непрямой; 3) непрямой с комплементом (антикомплементарная РИФ).</p> <p>Прямая РИФ. Компоненты (ингредиенты).</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Антигены тканей или микроорганизмы. 2. Флюоресцирующая (люминесцирующая) иммунная антисыворотка – содержит известные антитела (против искомого антигена), меченные флюорохромами. <p>Антигенами могут быть культуры бактерий, грибов, простейших; препараты из материала от больных (кал при холере, мокрота при коклюше); инфицированные культуры клеток, срезы тканей.</p> <p>Постановка реакции.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Исследуемый материал наносят на предметное стекло и фиксируют (чаще всего в ацетоне, 10 мин, при комн. t⁰), высушивают 20 мин, 37⁰С. 2. На фиксированный мазок наносят люминесцентную сыворотку, содержащую специфические антитела, меченные изотиоцианатом, 30 мин, 25⁰С (во влажной камере). 3. Промывка буферным раствором, 10 мин, 25⁰С. 4. Люминесцентная микроскопия: сначала при 40х, а затем – 90х (обращают внимание не только на наличие свечения, но и его интенсивность, характер распределения). <p>Учет реакции. «+» реакция – клетки светятся (видимый эффект) по периферии в виде каймы желто-зеленого цвета в люминесцентном микроскопе.</p> <p>Недостатком прямого метода является необходимость приготовления широкого набора флюоресцирующих антисывороток против каждого изучаемого антигена.</p> <p>Непрямая РИФ проводится использованием двух различных антисывороток. Вначале применяют немеченые АТ против искомого антигена, а затем образовавшиеся комплексы АГ-АТ обрабатывают люминесцирующей антисывороткой, содержащей меченые антитела против гамма-глобулинов того вида животного, которого иммунизировали при получении немеченой сыворотки (например, антиглобулиновая кроличья сыворотка, содержащая антитела к глобулинам кролика).</p> <p>Если немеченая антисыворотка была получена путем иммунизации кроликов, то на втором этапе используют меченую антивидовую кроличью сыворотку, полученную путем иммунизации кроличьими гамма-глобулинами ослов или каких-либо других животных.</p> <p>Таким образом, необходимо иметь только антивидовую флюоресцирующую сыворотку.</p> <p>При постановке непрямой РИФ:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) обработка препарата немеченой специфической антисывороткой 30 мин, 25⁰С и промывка 10 мин, 25⁰С – образуется несветящийся комплекс АГ-АТ (антитела покрывают антиген первым слоем); 2) обработка антивидовой меченой сывороткой 30 мин, 25⁰С, промывка 10 мин, 25⁰С – антиглобулиновые меченые антитела связываются со специфическими антителами, которые служат для них антигенами (меченые АТ покрывают искомым АГ вторым слоем: АГ-АТ-АТ+флюорохром), вызывая свечение при люминесцентной микроскопии (т.е. АГ становится видимым в люминесцентном микроскопе). <p>Антикомплементарная РИФ предполагает применение меченых АТ против комплемента морской свинки. Для реакции используется комплемент, который фиксируется на комплексе антиген-антитело. Добавление к такой системе антикомплементарной меченой сыворотки позволяет увидеть АГ по специфическому свечению в люминесцентном микроскопе.</p> <p>При постановке РИФ с комплементом:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) обработка препарата немеченой специфической антисывороткой и комплементом морской свинки 30 мин, 25⁰С и промывка 10 мин, 25⁰С – образуется несветящийся иммунный комплекс (АГ-АТ), на котором

	<p>адсорбируется комплемент (АГ-АТ-комплемент);</p> <p>2) обработка антикомплементарной меченой сывороткой (содержит антитела против глобулинов морской свинки) 30 мин, 25⁰С, промывка 10 мин, 25⁰С - комплекс АГ-АТ-комплемент взаимодействует с флюоресцирующим антителом к комплементу и полученный многокомпонентный комплекс (АГ-АТ-комплемент-АТ+флюорохром) светится в УФ-лучах люминесцентного микроскопа.</p> <p>Необходимо иметь только одну флюоресцирующую сыворотку – антикомплементарную.</p> <p>Достоинством непрямой и антикомплементарной РИФ является использование лишь одной светящейся сыворотки (антивидовой или антикомплементарной) при обнаружении различных антигенов. Это значительно удешевляет реакцию. Но с другой стороны по мере усложнения процедуры РИФ возрастает и возможность ошибок. РИФ нельзя отнести и к числу высокочувствительных реакций. Не исключается возможность неспецифической адсорбции меченых АТ на препарате.</p> <p>Для исключения ложноположительных результатов реакцию сопровождают рядом контролей (контроль с гетерологичным антигеном, контроль с неинфицированной культурой и т.д.). Применение лантаноидной метки (металлы лантаноидной группы) существенно повышает чувствительность метода.</p> <p>Непрямой вариант РИФ можно использовать и для определения АТ в сыворотке больного. Для этого известный антиген (культура клеток, срезы тканей) наносят на предметное стекло и инкубируют в присутствии исследуемой сыворотки, а затем - в присутствии меченых флюорохромом антител к иммуноглобулину человека (антисыворотка к глобулинам человека). Этот метод используют для выявления антинуклеарных антител при аутоиммунных заболеваниях и антител к некоторым вирусам.</p>
56.	<p>Задача. Охарактеризовать иммуноферментный анализ (ИФА). Привести схемы постановки реакции для определения антигена и антитела.</p> <p>Ответ: Иммуноферментный анализ (ИФА) – выявление антигенов или антител с помощью антител, меченных ферментом. После присоединения этих антител добавляют субстрат данного фермента, который расщепляется с образованием продуктов, реагирующих с хромогенами, и наблюдается окрашивание раствора в желто-коричневый цвет (при использовании пероксидазы) или в желто-зеленый цвет (при использовании фосфатазы). Конъюгированные с ферментом антитела сохраняют способность соединяться с гомологичным антигеном. Интенсивность окраски хромогена соответствует количеству образовавшихся комплексов АГ-АТ-фермент. Возможность использования ферментов в качестве метки обусловлена их высокой каталитической активностью и специфичностью. ИФА применяется для диагностики вирусных, бактериальных и паразитарных заболеваний (ВИЧ-инфекции, гепатита А, В, С, Е).</p> <p>В настоящее время чаще всего используется твердофазная модификация ИФА. Ее суть заключается в том, что на твердом материале сорбируют АГ или АТ, после чего добавляют остальные ингредиенты реакции. В качестве твердофазного носителя обычно используют пластиковые планшеты (шарики, пленки, пробирки), изготовленные из синтетических инертных материалов (полистерол, метакрил и др.) АГ или АТ в высушенном состоянии длительное время сохраняют свою специфичность и способность вступать в реакции.</p> <p>Этапы определения неизвестных антигенов (прямой вариант – «сэндвич» - метод).</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) связывание специфичных антител с пластиком в лунках планшета; 2) внесение антигенсодержащего материала; 3) внесение антител той же специфичности, меченых ферментом пероксидазой; 4) добавление субстрата фермента с хромогеном (например, для пероксидазы субстратом является перекись водорода, а хромоген – 5 аминсалициловая кислота, ортофенилендиамин); 5) измерение количества окрашенных продуктов реакции. <p>Этапы определения неизвестных антител.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) связывание известного антигена с пластиком в лунках планшета; 2) внесение исследуемой сыворотки; 3) внесение конъюгата – антиглобулиновой сыворотки, меченой ферментом (содержит антитела к глобулинам человека); 4) добавление субстрата фермента с хромогеном; 5) измерение количества окрашенных продуктов реакции. <p>Учет результатов. При «+» реакции изменяется цвет раствора. Интенсивность окрашивания пропорциональна активности фермента, а количество фермента, присоединенного к твердой фазе, соответствует количеству АГ или АТ. Результаты реакции учитывают визуально или с помощью специального ФЭКа. Для проведения ИФА необходимы полистироловые планшеты, имеющие лунки с плоским дном и автоматические пипетки. Для количественного учета используют СФ- регистратор экстинкции при длине волны 492 нм. Применяются также автоматические анализаторы (ридеры).</p> <p>ИФА характеризуется высокой специфичностью и быстротой получения результатов (4-6 час). Стабильность конъюгатов позволяет их хранить в течение длительного времени. Измерение оптической плотности проводят в оптическом диапазоне. Результаты можно оценить визуально (полуколичественно) без применения прибора. ИФА очень легко поддается автоматизации. Для повышения чувствительности ИФА необходимо использовать высокоспецифичные антитела (высокоаффинные моноклональные антитела).</p> <p>Существует много методических вариантов ИФА. При непрямом варианте определения антигенов используют меченые ферментом антитела не той же специфичности, а антиглобулиновые (антивидовые – противочеловеческие) антитела. Опишите этапы постановки такого варианта определения антигенов при помощи ИФА и необходимые ингредиенты реакции. Разработаны так называемые «безреагентные» системы, в которых все необходимые компоненты иммобилизованы или импрегнированы в пористую поверхность. Для проведения анализа необходимо только нанести образец и визуально наблюдать изменение окраски.</p>
57.	<p>Задача. Охарактеризовать радиоиммунный анализ (РИА) и иммуноблотинг.</p>

Ответ: Радиоиммунный анализ (РИА). Основан на том же принципе, что и ИФА, только вместо фермента вносится радиоактивная метка. Радиоактивность определяют по счетчику импульсов. Применение РИА связано с использованием сложной регистрирующей аппаратуры, и существенной биологической и экологической опасностью.

Иммуноблоттинг. При постановке иммуноблоттинга вначале препарат известного антигена фракционируют – разделяют методом электрофореза в агарозном геле на фракции (отдельные АГ). После этого гель накладывают на нитроцеллюлозную бумагу (фильтр), плотно прижимают к ней и создают электрическое поле, в результате происходит перенос фракций на бумагу (блоттинг). При этом сохраняется взаиморасположение фракций и их расстояние от старта (картина электрофореза). Далее обработку фильтра ведут также, как и при ИФА или РИА.

Учет результатов. Появление окрашивания фильтра в виде полос на тех местах, где располагались особые (специфические) фракции. АГ.



Вид фильтра после внесения хромогенного субстрата и окончательной промывки. 1 – отрицательный контроль, 2,4,5 – сыворотки больных, инфицированных вирусом простого герпеса -1 (ВПГ-1); 3,6 – сыворотки больных, инфицированных вирусом простого герпеса-2 (ВПГ-2).

3.4 Собеседование (зачет)

ПКв-4 Способен к формированию необходимой методической документации по образовательным программам в области микробиологии с применением информационных технологий

№ задания	Текст вопроса (задачи, задания) со структурой /алгоритмом ответа
58.	<p>Центрифугирование. Центрифугирование – это разделение в поле центробежных сил жидких дисперсных систем с частицами размером более 100 нм. Данный метод используют для выделения составляющих фаз из двухкомпонентных (суспензии, эмульсии) и трехкомпонентных (эмульсии, содержащие твердую фазу) систем. Выделяемые фазы могут быть жидкими (фугат или фильтрат) и твердыми (осадок). Центрифугирование проводят в специальных машинах – центрифугах и жидкостных центробежных сепараторах. Эти аппараты разделяют неоднородные смеси на составные части различной плотности с помощью центробежной силы. Первая центрифуга была сконструирована в 1877 г. в Германии. Принцип работы любой центрифуги заключается в том, что центробежная сила, возникающая при вращении с большой частотой ротора (основной рабочий орган аппарата), смещает находящиеся в растворе частицы в направлении от оси вращения при условии, что плотность частиц превышает плотность раствора. Скорость разделения зависит от центробежного ускорения, которое обычно выражается в единицах g (гравитационная постоянная, $g=9,81 \text{ м/с}^2$) и называется относительное центробежное ускорение. Величины до 10 000 g получают с помощью простой настольной центрифуги, высокоскоростные рефрижераторные центрифуги позволяют достигнуть 50 000 g, а ультрацентрифуги, работающие с охлаждением и в вакууме до 500 000 g. Центрифугирование применяется в биологии, медицине, технике, химической, пищевой, микробиологической, горнорудной и других отраслях промышленности. Центрифугирование может заменять процессы отстаивания, фильтрования и отжимания, а также играет важную роль в решении экологических проблем (очистка коммунальных и промышленных стоков) в ресурсосберегающих технологиях.</p>
59.	<p>Классификация центрифуг. По принципу действия (по физической сущности) центрифуги делят на осадительные и фильтрующие. В осадительных центрифугах роторы сплошные и при разделении суспензий твердые частицы, имеющие больший удельный вес, чем жидкая фаза, под действием центробежной силы осаждаются в виде кольцевого слоя; жидкая фаза также в виде кольцевого слоя располагается ближе к оси вращения. В фильтрующих центрифугах роторы – перфорированные (могут быть покрыты фильтровальной тканью или сеткой) и при разделении суспензий жидкая фаза проходит через фильтрующую перегородку, а твердая одновременно откладывается на фильтрующей перегородке в виде кольцевого слоя. По расположению ротора центрифуги делятся на вертикальные и горизонтальные. По режиму работы</p>

	<p>установки делятся на центрифуги периодического действия и центрифуги непрерывного действия. В центрифугах 9 периодического действия различные операции центрифугирования – загрузка, разделение, выгрузка исследуемого материала – происходят последовательно и периодически. В центрифугах непрерывного действия все эти операции происходят одновременно и непрерывно. Одной из разновидностей центрифуг являются центробежные сепараторы. Их роторы снабжены пакетом конических тарелок, установленных по отношению друг к другу с небольшим зазором (от 0,4 мм до 1,5 мм). Высокая степень разделения достигается благодаря его протеканию в тонком слое межтарелочного зазора при ламинарном режиме (то есть исследуемое вещество перемещается слоями без перемешивания и пульсаций). Ультрацентрифуга – прибор для разделения частиц менее 100 нм (коллоиды, субклеточные частицы, макромолекулы белков, нуклеиновые кислоты, липиды, полисахариды, синтетические полимеры и прочее), взвешенных или растворённых в жидкости. Это достигается вращением ротора, создающего центробежное поле с ускорением, которое на много порядков превышает ускорение силы тяжести.</p>
60.	<p>Виды центрифугирования</p> <p>Центрифугирование может быть двух видов: препаративное (когда выделяют какой-то определенный биологический материал для последующих исследований) и аналитическое (изучение чистых или практически чистых препаратов макромолекул или частиц). Существует несколько вариантов препаративного центрифугирования. 1) Дифференциальное центрифугирование. Данный метод основан на различиях в скоростях седиментации (осаждения) частиц, отличающихся друг от друга размерами и плотностью.</p> <p>Зонально-скоростное центрифугирование (s-зональное центрифугирование). Данный метод заключается в наслаивании исследуемого образца на поверхность раствора с непрерывным градиентом плотности. Затем образец центрифугируют до тех пор, пока частицы не распределятся вдоль градиента в виде дискретных зон или полос (рисунок 3). Благодаря созданию градиента плотности удается избежать смешивания зон, возникающего в результате конвекции. Данный метод центрифугирования применяют для разделения гибридов РНК-ДНК, субъединиц рибосом и других клеточных компонентов.</p> <p>Изопикническое центрифугирование. Данный метод проводят как в градиенте плотности, так и обычным путем. Если центрифугирование проводится не в градиенте плотности, препарат сначала центрифугируют так, чтобы осели частицы, молекулярный вес которых больше, чем у исследуемых частиц. Эти тяжелые частицы отбрасывают, и образец суспендируют в среде, плотность которой такая же, как и у фракции, которую хотят выделить, а затем центрифугируют до тех пор, пока исследуемые частицы не осядут на дно пробирки, а частицы меньшей плотности не всплывут на поверхность жидкости</p>
61.	<p>Формирование и извлечение градиентов.</p> <p>Для создания градиентов плотности растворов чаще всего применяются растворы сахарозы и тяжелых металлов, но существует и ряд других веществ. Выбор градиента диктуется конкретными задачами фракционирования. В центрифужную пробирку вносят при помощи пипетки несколько растворов с последовательно уменьшающейся плотностью. Затем на самый верхний слой (который имеет самую низкую плотность) наслаивают образец, после чего пробирку центрифугируют. Получить плавные линейные градиенты можно за счет сглаживания ступенчатых градиентов при длительном стоянии раствора. Процесс можно ускорить, осторожно перемешивая содержимое пробирки проволокой или слегка покачивая пробирку, либо с помощью специального устройства. После завершения процедуры центрифугирования и разделения частиц необходимо извлечь образовавшиеся зоны. Это делают несколькими способами, чаще всего методом вытеснения. Центрифужную пробирку прокалывают у основания и в нижнюю ее часть медленно вводят очень плотную среду (например, сахарозу). Растворы, которые находятся сверху, вытесняются, а фракции отбираются с помощью шприца, пипетки или специального приспособления. В другом способе (если пробирка изготовлена из целлулоида или нитроцеллюлозы) пробирку надрезают специальным лезвием под нужной зоной и отсасывают фракцию шприцом или пипеткой. Сбор фракций также осуществляют с помощью проколов тонкой поллой иглой. Капли, которые вытекают из пробирки через иглу, собирают в коллектор для дальнейшего анализа.</p>
62.	<p>Хроматография. Задачи и методы.</p> <p>Задача, с которой биохимикам постоянно приходится сталкиваться при исследовании биологических соединений – это их выделение и очистка. Одним из наиболее удобных методов разделения является хроматографический метод, с помощью которого можно разделять как большие (несколько граммов), так и малые (пикограммы) количества материала. Хроматография (от др.-греч. χρῶμα – цвет) – это физико-химический метод разделения и анализа смесей газов, паров, жидкостей или растворенных веществ и определения физико-химических свойств индивидуальных веществ, основанный на распределении разделяемых компонентов смесей между двумя фазами: подвижной и неподвижной. Неподвижная фаза (носитель, сорбент) может быть твердой, жидкой или представлять собой смесь твердой и жидкой фаз. Подвижная фаза (растворитель, элюент) бывает жидкой или газообразной, и она обычно течет по неподвижной фазе или пропускается через нее. Фазы для хроматографического разделения выбирают так, чтобы коэффициенты распределения (отношение концентрации вещества в подвижной фазе к его концентрации в неподвижной фазе) компонентов смеси в них были различными. Важными моментами в хроматографии являются понятия «сорбции» (поглощение твердым телом либо жидкостью различных веществ из окружающей среды) и «десорбции» (процесс, обратный сорбции, при котором поглощенное вещество покидает поверхность или объем адсорбента). Различают два вида сорбции: адсорбцию – поглощение веществ твердой поверхностью и абсорбцию – растворение газов и жидкостей в жидких растворителях. При движении подвижной фазы вдоль неподвижной, компоненты смеси сорбируются на неподвижной фазе. Каждый компонент сорбируется в соответствии со сродством к материалу неподвижной фазы (вследствие адсорбции или других механизмов). Поэтому неподвижную фазу называют также сорбентом. Захваченные сорбентом молекулы могут перейти в подвижную фазу и продвигаться с ней дальше, а затем снова сорбироваться. Выбор того или иного вида хроматографии</p>

	<p>зависит от природы выделяемого материала. Зачастую для достижения необходимой степени очистки приходится последовательно применять несколько хроматографических методов. Таким образом, хроматография – процесс, основанный на многократном повторении актов сорбции и десорбции вещества при перемещении его в потоке подвижной фазы вдоль неподвижного сорбента. Чем сильнее сродство компонента к неподвижной фазе, тем сильнее он сорбируется и дольше задерживается на сорбенте; тем медленнее его продвижение вместе с подвижной фазой. Поскольку компоненты смеси обладают разным сродством к сорбенту, при перемещении смеси вдоль сорбента произойдет разделение: одни компоненты задержатся в начале пути, другие продвинулись дальше. В хроматографическом процессе сочетаются термодинамические (установление равновесия между фазами) и кинетические (движение компонентов с разной скоростью) аспекты. Хроматографический метод позволяет производить: а) разделение и анализ состава сложной смеси веществ; б) очистку веществ от ненужных примесей; в) концентрирование веществ; г) идентификацию веществ. Хроматографический метод анализа универсален и применим к разнообразным объектам исследования (нефть, лекарственные препараты, вещества растительного и животного происхождения, биологические жидкости, пищевые продукты и другие). Эффективность метода повышается при его сочетании с другими методами анализа, автоматизацией и компьютеризацией процесса разделения, обнаружения и количественного определения.</p>
63.	<p>Возникновение и развитие хроматографии. Метод хроматографии был открыт в 1903 году известным русским ученым Михаилом Семеновичем Цветом в ходе исследования механизма преобразования солнечной энергии в растительных пигментах. Ученый пропускал раствор анализируемых веществ (экстракт хлорофилла) и подвижной фазы (петролейный эфир) через столб адсорбента (мел), находящегося в стеклянной трубке (такой метод получил название колоночной хроматографии). С помощью этого метода ему удалось разделить хлорофилл на составляющие окрашенные вещества. Полученные окрашенные зоны он назвал хроматограммой. Дальнейшие ключевые моменты развития хроматографического метода представлены в таблице 1. Таблица 1 – История развития хроматографии В настоящее время разработана теория протекания хроматографического процесса, а также множество методов хроматографического анализа и их модификаций.</p>
68.	<p>Аппаратура для хроматографии. Основными блоками хроматографического аппарата являются система насосов (система ввода пробы), хроматографическая колонка и детектор</p> <p>1) Система насосов (система ввода пробы). Хроматография, как и любой другой метод анализа, не является абсолютным методом. Качественное определение вещества осуществляется только по времени удерживания. Удерживание – это явление замедленного движения исследуемого вещества относительно движения подвижной фазы. Если удерживание веществ различно, то и скорость у них разная. Чем больше разность скоростей, тем лучше будет эффективность разделения. Подвижная фаза должна прокачиваться через хроматограф с необходимой и постоянной скоростью, чтобы избежать появления пульсаций (это особенно важно при прохождении подвижной фазы через колонку и детектор). Важно постоянно проверять хроматографическую систему с помощью смесей с уже известным составом. При каких-либо отклонениях необходима повторная калибровка аппарата. Также очень важен способ введения пробы, так как даже лучшие колонки могут дать плохие результаты разделения, когда ввод пробы не соответствует предъявляемым требованиям. Во время процесса ввода пробы в колонку не должен попасть воздух. Ввод пробы происходит при непрерывном движении подвижной фазы. Следует сохранять постоянное давление и скорость потока на колонке. Для удобства оператора должна быть возможность легкого и быстрого изменения объема пробы.</p> <p>2) Хроматографическая колонка. Колка представляет собой трубку из нержавеющей стали или стекла. Современные колонки не нужно заполнять вручную, так как они имеют гарантировано оптимальное значение заполнения, что увеличивает разрешение хроматограммы. Для хорошей работы колонки необходимо, чтобы ее внутренняя поверхность была идеально отполирована. Как материал трубки, так и материал наполнения колонки должны быть химически устойчивы к действию подвижной фазы, чтобы избежать вымывания каких-либо продуктов из колонки. Есть две основные причины разрушения колонок – термическая и химическая деструкция. Для удерживания стационарной фазы в колонку с обоих концов помещают металлические фритты или стеклянную (металлическую) вату. При подсоединении начала колонки к системе ввода пробы и конца колонки к детектору необходимо избегать любых ненужных мертвых объемов.</p> <p>3) Система детектирования. Детектор – это измерительное устройство, которое должно распознать появление вещества на выходе из колонки. Детектор устанавливает изменение состава подвижной фазы, преобразовывает полученную информацию в электрический сигнал и передает ее на специальное устройство, которое создает и обрабатывает хроматограмму.</p>
69.	<p>Классификации хроматографических методов. В основе всех методов хроматографии лежит один принцип: непрерывный поток подвижной фазы с растворенным в ней анализируемым образцом проходит через стационарную (неподвижную) фазу. Последняя, в зависимости от своей природы, по-разному взаимодействует с отдельными компонентами смеси образца. В результате, компоненты вымываются и движутся относительно неподвижной фазы с различными скоростями. Многообразие видоизменений и вариантов метода хроматографии требует их систематизации и классификации. В основу классификации можно положить различные признаки, а именно: агрегатное состояние фаз, механизм разделения, способ проведения процесса, цель проведения процесса, способ элюции (промывания).</p>
70.	<p>Классификация по агрегатному состоянию фаз. В зависимости от агрегатного состояния фаз выделяют следующие виды хроматографии: а) газовая; б) жидкостная; в) сверхкритическая флюидная. 1) Газовая хроматография. Это</p>

	<p>хроматографический метод, в котором в качестве подвижной фазы применяется инертный газ (газ-носитель) или пар.</p> <p>Хроматографическая колонка. Хроматографические колонки в соответствии с их назначением подразделяются на несколько вариантов. Аналитические колонки (установление качественного и количественного состава смеси). Препаративные колонки (получение в чистом виде необходимых количеств тех или иных компонентов, которые присутствовали во вводимой пробе). Предколонки (решают задачу предварительного концентрирования компонентов пробы из достаточно больших объемов для последующего их разделения или извлечения из объема анализируемой пробы мешающих разделению компонентов). Материал колонки не должен быть химически активным или действовать каталитически по отношению к неподвижной фазе и разделяемым компонентам. В основном колонки изготавливают из следующих материалов: нержавеющая сталь, медь, алюминий, стекло, кварц. Также колонки должны выдерживать нагревание до нужной температуры.</p>
71.	<p>Классификация по механизму разделения.</p> <p>По механизму разделения смесей выделяют следующие методы хроматографии: а) адсорбционная; б) ионообменная; в) осадочная; г) эксклюзионная (молекулярно-ситовая); д) адсорбционно-комплексобразовательная; е) аффинная; ж) распределительная. 1) Адсорбционная хроматография. Такой вид хроматографии основан на избирательной адсорбции отдельных компонентов анализируемой смеси соответствующими адсорбентами. Адсорбционная хроматография подразделяется на жидкостную (жидкостно-адсорбционная хроматография) и газовую (газо-адсорбционная хроматография). 2) Ионообменная хроматография. Метод, основанный на использовании ионообменных процессов, протекающих между подвижными ионами адсорбента и ионами электролита при пропускании раствора анализируемого вещества через колонку, заполненную ионообменным веществом (ионитом). Иониты представляют собой нерастворимые неорганические и органические высокомолекулярные соединения. В качестве ионитов применяют окись алюминия, пермутит, сульфоголь и разнообразие синтетические органические ионообменные вещества – ионообменные смолы. 3) Осадочная хроматография. Хроматография, основанная на различной способности разделяемых компонентов выпадать в осадок на твердой неподвижной фазе. Например, при пропускании раствора смеси солей ртути и свинца через колонку с носителем, предварительно пропитанным раствором йодида калия, образуются два окрашенных слоя: верхний, окрашенный в оранжево-красный цвет (HgI_2), и нижний, окрашенный в желтый цвет (PbI_2). 4) Эксклюзионная (молекулярно-ситовая) хроматография. Такой метод хроматографии основан на разной проницаемости молекулярных компонентов в неподвижную фазу. Неподвижная фаза представляет собой высокопористый неионогенный гель. Эксклюзионная хроматография подразделяется на гель-проникающую (элюент – неводный растворитель), и гель-фильтрацию (элюент – вода). 5) Адсорбционно-комплексобразовательная хроматография. Хроматография, в которой разделение основано на образовании координационных соединений (комплексных соединений) различной прочности в фазе или на поверхности адсорбента. 6) Аффинная хроматография. Метод очистки и разделения белков, основанный на их избирательном взаимодействии с лигандом, который ковалентно связан с инертным носителем. Применяют биологически активные вещества (белки, ферменты), вступающие в специфические взаимодействия, такие как антиген/антитело.</p>
72.	<p>Классификация по способу проведения процесса хроматографии.</p> <p>По способу проведения процесса хроматографического разделения выделяют следующие виды: а) колоночная; б) бумажная; в) тонкослойная; г) хроматография в толстом слое.</p>
73.	<p>Классификация по цели проведения хроматографического процесса</p> <p>В зависимости от цели проведения процесса выделяют следующие виды хроматографии: а) аналитическая; б) препаративная; в) промышленная.</p>
74.	<p>Классификация по способу элюции</p> <p>В соответствии с режимом вводы пробы выделяют следующие виды хроматографии: а) вытеснительная; б) элюентная; в) фронтальная.</p>
75.	<p>Общие понятия об электрофорезе.</p> <p>Под электрофорезом понимают направленное перемещение ионов в электропроводящем растворе под действием внешнего электрического поля. Под действием электрического поля заряженные частицы перемещаются в зависимости от знака их суммарного заряда в сторону катода или анода. После начала электрофореза скорость движения компонентов увеличивается, пока не уравновесит силу трения, затем частицы продолжают двигаться с постоянной скоростью. Различия в подвижности частиц служат основой для разделения смеси веществ в аналитических и препаративных целях.</p> <p>Большое число молекул от простых до самых сложных, попадая в раствор, приобретают положительный, либо отрицательный заряд. При подключении постоянного электрического тока заряженные молекулы начинают двигаться в направлении электрода противоположенного заряда: отрицательно заряженные ионы (анионы) – к положительно заряженному электроду (аноду), положительно заряженные (катионы) – к отрицательно заряженному электроду (катоду).</p>
76.	<p>Общие принципы метода электрофореза.</p> <p>Оборудование для электрофореза состоит в основном из двух частей: источника питания и собственно электрофоретического блока. Источник питания генерирует стабилизированный постоянный ток и имеет системы контроля напряжения и силы тока на выходе. В электрофоретический блок входят источник тока, электроды, буферные камеры, опора для носителя и прозрачная изолирующая крышка</p>
77.	<p>Влияние некоторых факторов на подвижность разделяемых веществ</p> <p>1) Образец исследования. Электрофоретическая подвижность заряженных молекул образца зависит от ряда факторов. А) Заряд. Подвижность возрастает с увеличением суммарного заряда, а величина заряда в большинстве случаев зависит от pH. Б) Размеры. Чем крупнее молекулы, тем меньше</p>

	<p>их подвижность. Это связано с возрастанием сил трения и электростатических взаимодействий крупных молекул с окружающей средой по сравнению с молекулами меньших размеров. В) Форма. Молекулы одинакового размера, но различной формы (например, фибриллярные и глобулярные белки, обладают разной подвижностью; это обусловлено различиями в силе трения и электростатическом взаимодействии).</p> <p>2) Электрическое поле. Согласно закону Ома, сила тока I (в амперах), напряжение V (в вольтах) и сопротивление K (в омах) связаны следующим соотношением: $I = V/R$. На разделение ионов в электрическом поле влияют все эти три фактора. А) Сила тока. Для максимальной воспроизводимости результатов сила тока в процессе электролиза не должна меняться (ток должен быть постоянным). Б) Напряжение. Используются как низкие (от 100 В до 500 В), так и высокие (от 500 В до 10000 В) напряжения. Высокие напряжения применяют в основном для разделения высокомолекулярных веществ. В) Сопротивление. Сопротивление возрастает с увеличением длины слоя носителя и уменьшается при увеличении его ширины, а также с возрастанием концентрации буферных ионов. В ходе электрофореза выделяется тепло, при этом сопротивление уменьшается. Следовательно, при постоянном напряжении такое нагревание приведет к увеличению силы тока и усиленному испарению растворителя. Для обеспечения максимальной воспроизводимости результатов применяют стабилизированные источники питания, которые автоматически поддерживают на постоянном уровне либо напряжение, либо силу тока. Испарение сводят до минимума, помещая аппарат под воздухонепроницаемую крышку. Для дополнительного охлаждения при работе с высоким напряжением в аппарат встраивается охлаждающая система.</p> <p>3) Буфер. Буфер создает и стабилизирует pH носителя, а также самым различным образом влияет на скорость миграции веществ. А) Состав буфера. Наиболее, широко применяемые буферы – формиатный, ацетатный, цитратный, вероналовый, фосфатный, трис (трисаминометан), ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота) и пиридиновый. Поскольку буферы служат для образца растворителями, то некоторая диффузия нанесенного образца неизбежна. Это особенно заметно для малых молекул, таких, как аминокислоты и сахара. Диффузию можно свести до минимума, если наносить образцы в виде узких полос и в умеренных количествах, использовать высокое напряжение и как можно быстрее проводить разделение, а по его завершении быстро вынимать и высушивать образцы. Б) Концентрация буфера. По мере увеличения ионной силы буфера компонент тока, обусловленный переносом ионов буфера, будет возрастать, а доля, приходящаяся на ток за счет ионов образца, уменьшаться. Таким образом, скорость миграции образца уменьшится. При высокой ионной силе буфера суммарный ток увеличивается, а, следовательно, возрастает и количество выделяемого тепла. При низкой ионной силе ток, обусловленный переносом ионов буфера, уменьшается, а доля, приходящаяся на ток за счет ионов образца, возрастает. Таким образом, миграция образца ускоряется. В буфере с низкой ионной силой общая сила тока и выделение тепла уменьшаются, но диффузия возрастает, вследствие чего разрешающая способность хуже, чем при высокой ионной силе. Таким образом, при выборе ионной силы буфера приходится идти на некоторые компромиссы. 4) Носитель. В качестве носителей используют относительно инертные вещества, однако, их состав все же не безразличен для подвижности разных веществ, и выбор соответствующей среды зависит от природы образца. А) Адсорбция. Адсорбция – удерживание молекул образца носителем, как при адсорбционной хроматографии. Это приводит к размыванию пятен, в результате чего образец движется не в виде четкой полосы, а имеет вид кометы и разрешающая способность метода при этом уменьшается. Адсорбция приводит также к уменьшению скорости миграции. Наибольшей способностью к адсорбции обладает бумага, однако это нежелательное ее свойство удается устранить, если использовать ацетат целлюлозы. Б) Электроосмос (электроэндосмос). Это явление обусловлено возникновением относительного заряда между молекулами воды буферного раствора и поверхностью носителя. Ионизация групп носителя и поверхностная адсорбция ионов буфера обычно приводит к образованию из молекул воды ионов гидроксония (H_3O^+, комплексный ион – соединение протона с молекулой воды). Так как эти ионы заряжены положительно, они движутся к катоду, захватывая растворенные нейтральные вещества и убыстряя движение катионов; скорость движения анионов при этом падает. Обычно данными эффектами можно пренебречь, однако, если определяют изоэлектрическую точку вещества (pI; кислотность среды, при которой определенная молекула или поверхность не несёт электрического заряда), нужно вводить соответствующую поправку. Как правило, это делают, следя за движением электрически нейтральных соединений, таких, как мочевины или глюкоза. Электроосмос менее заметен в носителе из ацетата целлюлозы или в полиакриламидном геле, чем в крахмальном геле или на бумаге. В) Молекулярное сито. Свойствами молекулярного сита обладает применяемый в гель-электрофорезе полужесткий носитель (гель); такие его свойства способствуют разделению смесей заряженных макромолекул, например белков, которые различаются не только по электрофоретической подвижности, но также формой и размерами. Гели состоят из беспорядочно переплетающихся молекулярных цепей, распределенных по всему объему геля и образующих ситоподобную структуру. В соответствии с конкретными требованиями, разделения размер пор гелей можно варьировать в некоторых пределах. Принцип действия молекулярного сита в агаровом, крахмальном и полиакриламидном гелях заключается в том, что крупные молекулы движутся сквозь него тем медленнее, чем меньше размер пор, которые определяется числом поперечных швов в геле. При использовании гелей типа сефадекса (микропористый материал, представляющий собой декстран, молекулы которого соединены химическими связями) ситуация обратная – в соответствии со спецификой их природы миграция малых молекул тормозится сильнее, чем крупных.</p>
78.	<p>Приготовление носителей и их свойства.</p> <p>1) Бумага. Специальной электрофоретической бумаги не существует – подходит обычная хроматографическая бумага. Для удаления загрязнений, затрудняющих в ряде случаев дальнейший анализ, некоторые виды хроматографической бумаги обрабатывают кислотой. Бумага очень удобна в качестве носителя, так как не требует подготовки. Ее только нужно разрезать до определенного размера.</p>

	<p>При электрофорезе с использованием бумаги всегда наблюдается некоторая адсорбция. Ее можно уменьшить, используя буфер с более высоким значением pH, чем изоэлектрическая точка образца, однако электроосмос вследствие особенностей химического состава бумаги всегда будет проявляться в той или иной степени. Данный метод является самым простым.</p> <p>2) 2) Ацетат целлюлозы. Вследствие его очень незначительной адсорбирующей способности можно даже для макромолекул получить высокое разрешение с небольшим количеством вещества. Ацетат целлюлозы менее гидрофилен, чем бумага, поэтому он удерживает меньшее количество буферного раствора. Таким образом, большая часть тока обусловлена ионами образца, что обеспечивает очень быстрое их разделение. Тем не менее, это сопровождается выделением большого количества тепла, и поэтому при работе с высоким напряжением нужно принимать меры предосторожности, чтобы полосы не высохли вследствие испарения. Электрофорез на ацетате целлюлозы широко применяется в клинических исследованиях, а в сочетании с иммунодиффузией может использоваться и для иммуноэлектрофореза. Отсутствие адсорбции на ацетате целлюлозы и обусловленная этим высокая разрешающая способность позволяет при использовании радиоизотопов получать четко разграниченные радиоактивные области.</p>
79.	<p>Специальные электрофоретические методы. Обычно выделяют следующие основные типы электрофоретических систем.</p> <p>А) Электрофорез с подвижной границей (фронтальный электрофорез). Речь идет о свободном перемещении заряженных частиц в буферном растворе. При этом не происходит полного разделения фракций, а можно только различать границы движущихся фронтов белка.</p> <p>Б) Зональный электрофорез. При таком способе возможно разделение смеси веществ на фракции и отдельные зоны.</p> <p>В) Стационарный или вытесняющий электрофорез. Через некоторое время после начала разделения устанавливается состояние равновесия, и ширина зон в дальнейшем не изменяется.</p> <p>Различные методы электрофоретического разделения веществ кратко освещены в следующих пунктах.</p> <p>1) Высоковольтный электрофорез. При использовании такого метода электрофореза улучшается разрешение, и разделение проходит очень быстро. Для этой цели используют источники питания, обеспечивающие напряжение 50 до 10 000 В силу тока до 600 мА и создающие градиент потенциала до 200 В/см-1 (это скорость возрастания потенциала в направлении кратчайшем между двумя точками). При высоковольтном электрофорезе выделяется такое большое количество тепла, что требуется эффективная система охлаждения. Охлаждение осуществляют двумя способами. Первый с помощью полного погружения (насыщенную буфером бумагу с нанесенным образцом погружают в большой объем охлаждающей жидкости, которая действует как жидкий теплообменник и отводит от бумаги тепло, например, толуол). Такой метод достаточно эффективен и технически легко осуществим, однако охлаждающие жидкости, как правило, токсичны и легко воспламеняемы. Второй вариант – система охлаждающих пластин. Такой метод безопаснее и более эффективен. Две пластины (как правило, алюминиевые) плотно, под давлением прижимаются надувной прокладкой к изолированному от них носителю. В охлаждающих пластинах по специальным каналам циркулирует вода. Исключительно важно, чтобы все оборудование было полностью электрически изолировано, поскольку применяемые напряжения смертельны.</p> <p>2) Проточный электрофорез (непрерывный). Данный вид электрофореза считается разновидностью низковольтного электрофореза на бумаге. Образец (растворенный или суспендированный в буфере) непрерывно наносят в верхней части вертикально-расположенного листа бумаги. Образец увлекается вниз буфером, стекающим под действием силы тяжести, одновременно с этим заряженные компоненты образца под влиянием электрического поля перемещаются в горизонтальном направлении. Применяется в основном для фракционирования клеток различных типов, клеточных органелл и фрагментов мембран.</p>
80.	<p>Общие принципы центрифугирования. Центрифугирование – разделение веществ в поле центробежной силы. Центрифугирование применяется для разделения мелкодисперсных многокомпонентных смесей, а также для фракционирования клеточных органелл и определения молекулярного веса высокомолекулярных органических соединений, например белков, нуклеиновых кислот (седиментационный анализ). Разделение веществ с помощью центрифугирования основано на том, что в центробежном поле частицы, имеющие различные размеры, форму и плотность, осаждаются (седиментируют) с разной скоростью. Величина центробежной силы определяется скоростью вращения ротора и расстоянием от оси вращения. Для сравнения условий центрифугирования на разных центрифугах принято указывать относительное центробежное ускорение (фактор разделения), выраженное в g ($g = 9,8 \text{ м} \cdot \text{с}^{-2}$). Для примерных расчетов фактора разделения обычно пользуются номограммами или таблицами, которые прилагаются к каждому ротору. В зависимости от задач, стоящих перед исследователем, центрифугирование можно условно разделить на препаративное и аналитическое (седиментационный анализ). Препаративное центрифугирование заключается в выделении биологического материала для последующих биохимических исследований. С помощью препаративного центрифугирования выделяют большое количество клеточных частиц для изучения их морфологии, структуры и биологической активности. Метод применяется также для выделения таких биологических макромолекул, как ДНК и белки из предварительно очищенных препаратов. Аналитическое центрифугирование применяется главным образом для изучения чистых или практически чистых препаратов макромолекул или частиц, например, рибосом. В данном случае используется небольшое количество материала, а седиментация исследуемых частиц непрерывно регистрируется с помощью специальных оптических систем. Метод позволяет получать данные о чистоте, молекулярном весе и структуре материала</p>
81.	<p>Разделение клеточных органелл дифференциальным центрифугированием.</p>

	<p>Для дифференциального центрифугирования используются различные типы роторов, в зависимости от объемов и требуемого фактора разделения. Описанными методами можно выделять клеточные органеллы из гомогенатов тканей. Основные компоненты клетки осаждаются в следующей последовательности: сначала целые клетки и их фрагменты, затем ядра, хлоропласты, митохондрии, лизосомы (или другие микротельца), микросомы (фрагменты гладкой и шероховатой эндоплазматической сети) и, наконец, рибосомы. Центрифугирование. Исследуемую взвесь или коллоидный раствор наливают в пробирку, которую после уравнивания с точностью до 1 мг и удаления пузырьков воздуха (при использовании герметичных роторов углового типа) помещают в установленный на валу привода центрифуги ротор и центрифугируют при первом выбранном факторе разделения, что необходимо для осаждения самых тяжелых частиц.</p>
82.	<p>Способы центрифугирования в градиентах плотности. Скоростное зональное центрифугирование (s-зональное) применяют для разделения частиц по размеру. Его проводят с использованием линейного градиента плотности. Изучаемую смесь наносят на поверхность градиента и центрифугируют при максимально возможном для данного типа ротора факторе разделения 20–30 мин до получения дискретных зон или полос исследуемых фракций. Наличие градиента препятствует конвекционному смешиванию этих зон. Если разделение не достигнуто, то увеличивают время центрифугирования или фактор разделения (применяя другой ротор). Если все частицы осели на дно, то увеличивают плотность градиента или уменьшают фактор разделения. Изопикническое центрифугирование, в основе которого лежит разделение частиц в зависимости от их плавучей плотности. Плавучая плотность вещества определяется соотношением формы, размеров и удельной плотности разделяемых веществ, а также плотностью жидкого компонента, т. е. можно подобрать среду центрифугирования и фактор разделения так, что центробежная сила будет уравновешена силой диффузии на выделяемый компонент смеси не будет осаждаться на дно пробирки.</p>
83.	<p>Сущность метода масс-спектрометрии. Масс-спектрометрия - физический метод, основанный на ионизации молекул изучаемого вещества с последующим разделением ионов по величине отношения массы к заряду и детектированием. Масс-спектрометрия - это метод измерения отношения массы заряженных частиц к их заряду (m/z). Проведения анализа: - образец переводят в ионизированную форму. - производят разделение ионов по отношению их массы к зарядам и - регистрируют эти ионы, которые могут быть как положительными, так и отрицательными. Анализ дает важную информацию для определения молекулярной массы, молекулярной формулы или элементного состава и структуры молекул. Масс-спектрометрию используют для определения относительной молекулярной массы M_r соединения, которую выражают в атомных единицах массы (а.е.м.) или дальтонах, Да, В масс-спектре линии с определенным отношением m/z, соответствуют молекулярным фрагментам и также обозначаются целым числом, полученным при округлении точного значения m/z.</p>
84.	<p>Современное состояние масс-спектрометрии. Рутинно используется в тысячах лабораторий по всему миру. Объединение с хроматографией значительно увеличило возможности метода и расширило круг изучаемых объектов Возможны: • органический анализ, • неорганический анализ, • исследования по выяснению механизмов реакций в органической химии, • анализ поверхности.</p>
85.	<p>Аппаратурное оформление масс-спектрометрии. Чрезвычайно сложный компьютеризированный прибор. Состоит из пяти узлов, отражающих пять важных разделов аналитической масс-спектрометрии: 1.система ввода пробы, 2.система ионизации аналита, 3.система разделения ионов по массам (зарядам), 4.система детектирования ионов 5.система обработки данных. По полученному масс-спектру делается вывод • о составе образца и структуре его молекул, • по величине тока соответствующих ионов судят о количественном составе образца.</p>
86.	<p>Система ввода образца в масс-спектрометрии. Система ввода образца должна обеспечить необходимые условия при вводе образца в область его ионизации. Используются три типа систем ввода пробы: • холодные или обогреваемые стеклянные резервуары с натекателями, • различные штоки для ввода через вакуумный шлюз, • системы, соединяющие масс-спектрометр с хроматографом в режиме on-line.</p>
87.	<p>Способы ионизации. Для газовой фазы. Электронный удар (ЭУ) Пары образца подвергают бомбардировке ускоренными электронами. Источником электронов служит электрически нагретая вольфрамовая или ренийевая нить. Для увеличения эффективности ионизации молекул газа в источнике используется магнитное поле, силовые линии которого направлены вдоль пучка электронов. Столкновение электронов с молекулами образца приводит к их возбуждению, фрагментации и ионизации. ЭУ дает богатые фрагментами масс-спектры, которые обеспечивают структурную информацию.</p>
88.	<p>Тандемная масс-спектрометрия. Этот метод масс-спектрометрического анализа (массспектрометрия масс-спектрометрии, MS/MS) широко используется в настоящее время. Он особенно эффективен при анализе смесей. Смесь, вводимая в ионный источник, подвергается ионизации одним из "мягких" методов ионизации, когда, в основном, образуются молекулярные ионы с небольшой энергией возбуждения. После прохождения первого массанализатора, эти ионы каким-либо образом дополнительно активируются, распадаются на фрагменты, которые проходят через другой масс-анализатор и дают масс-спектр индивидуального соединения.</p>
89.	<p>Правило Каши. Испускание квантов флуоресценции всегда происходит с нижнего возбужденного электронного уровня молекулы, независимо от того, на каком уровне оказался электрон после поглощения фотона. •</p>

	<p>Форма спектра флуоресценции и положение максимума не зависят от длины волны возбуждения. • При изменении длины волны возбуждения меняется только интенсивность спектра флуоресценции</p>
90.	<p>Правило Лёвшина (закон зеркальной симметрии). Электронколебательные спектры поглощения и флуоресценции молекул зеркально симметричны относительно положения электронного перехода. Правило выполняется, если колебательные частоты молекул в основном и возбуждённом электронных состояниях одинаковы, а прямые и обратные электронные переходы равновероятны.</p>
91.	<p>Спектральные параметры, используемые во флуоресцентном анализе. 1. Интенсивность флуоресценции – наличие и относительная концентрация флуорофора. 2. Форма спектра и положение максимума – идентификация флуорофора, анализ его микроокружения и взаимодействий 3. Время жизни флуоресценции - идентификация флуорофора, анализ его микроокружения и взаимодействий</p>
92.	<p>Приборы и методы, использующие эффект флуоресценции. Спектрофлуориметры и планшетные флуориметры: измерения растворов и взвесей в кюветках и многолучевых планшетах ($V \approx$ мкл - мл) Флуоресцентные микроскопы: измерения пространственного распределения флуоресценции в объектах размером меньше 10 мм Флуоресцентные сканеры: измерения пространственного распределения флуоресценции в макрообъектах (электрофорезные гели, блоты и хроматограммы) Проточные цитометры: измерения флуоресценции клеток в проточных капиллярах Приборы для капиллярного электрофореза, ВЭЖХ, сиквенаторы, с системами детекции на основе флуоресценции</p>
93.	<p>«Биологические» флуорофоры. • белки – флуоресценция ароматических аминокислот; возбуждение – 280 нм; испускание - максимум 330-350 нм; преобладает сигнал триптофанов. • восстановленные никотинадениндинуклеотид, никотинадениндинуклеотид-фосфат (NADH, NADPH); возбуждение – 260 и 340 нм; испускание - 465--480 нм • окисленные флавопротеины в составе простетических групп содержат производные рибофлавина – флавиномононуклеотид и флавинаденинди-нуклеотид; возбуждение –450 нм; испускание - максимум 520--530 нм • каротиноиды (витамин А- испускание 480 нм); • пигменты старения (липофуцин и др. - испускание 560 нм); пигменты растений и водорослей : хлорофиллы и фикобилины (испускание 572- 660 нм); • порфирины (испускание- 580-640 нм).</p>
94.	<p>Методы иммунохимических исследований. Методы иммунного анализа широко вошли в медицинскую практику. Во всех областях современной медицины используется иммунный анализ с диагностической и аналитической целями. Особенно важно, что они дают возможность идентифицировать биологические компоненты (гормоны, ферменты, нейропептиды, продукты иммунной системы, антигены и т.д.) в низких и очень низких концентрациях. Иммунный анализ основывается на реакции взаимодействия антигена (АГ) и антитела (АТ) с образованием иммунного комплекса, с использованием различных вариантов мечения одного из компонентов (фермент, радионуклид, флуоресцентный краситель). Эти реакции называют серологическими, так как для их постановки используют сыворотки, содержащие антитела. Оценка реакции проводится автоматически на специальной аппаратуре, что позволяет стандартизировать эти методы Сферы применения. Данные методы показаны, когда необходимо количественно определить концентрации химических веществ, содержащихся в очень низких концентрациях: используются для лабораторной диагностики инфекционных и паразитарных болезней, определения групп крови, тканевых и опухолевых антигенов, видовой принадлежности белка, распознавания аллергии и аутоиммунных болезней, беременности, гормональных нарушений.</p>
95.	<p>Основные принципы метода иммунного анализа. В основе лежит реакция АГ-АТ. В зависимости от того, что является искомым веществом (АГ или АТ), от соотношения их количества методы различают по типу связывания: а) конкурентное связывание; б) неконкурентное связывание; в) неравновесное связывание.</p>
96.	<p>Радиоиммунологический анализ. Радиоиммунологический анализ (РИА) представляет количественное определение антигенов или антител, принципиальной основой которого является конкурентное связывание искомого (немеченого) и идентичных искусственно-меченого веществ со специфическими связывающими системами. Специфическая связывающая система («биндер», т.е. связывающий) вступает в равноправное взаимодействие как с исследуемым веществом («лигандом»), так и с его аналогом, меченным радиоактивным нуклидом, связываясь с ним в количествах, пропорциональных их исходным концентрациям. Таким образом, чем больше содержание исследуемого вещества в данной пробе, тем меньшая часть его меченого аналога свяжется со специфической связывающей системой и тем большая часть его останется несвязанной. В качестве связывающего агента используют – антитела, а в качестве лиганда – антигены.</p>
97.	<p>Основные этапы радиоиммунологического анализа. 1 этап. Внесение аналога определяемого вещества, меченого радиоактивной меткой, и опытного образца в пробирку, содержащую связывающий компонент. 2 этап. Стадия инкубации (образование специфических комплексов). Основная характеристика: время проведения – достаточное для полного связывания лиганда биндером (связывающий агент); температура реакционной среды (оптимальная для осуществления иммунной реакции). 3 этап. Этап разделения связанного и свободного лиганда. После взаимодействия антигенов с</p>

	антителами образовавшиеся комплексы антигенантитело отделяют от свободного меченого антигена.
98.	<p>Иммуноферментный анализ.</p> <p>Иммуноферментный анализ (ИФА) – лабораторный иммунологический метод выявления антигенов и антител, основанный на определении комплекса «антиген-антитело» за счет введения в один из компонентов реакции ферментативной метки с последующей ее детекцией с помощью соответствующего субстрата, изменяющего свою окраску. Основой проведения любого варианта ИФА служит определение продуктов ферментативных реакций при исследовании тестируемых образцов в сравнении с негативными и позитивными контролями. ИФА по сравнению с другими методами детекции антигенов и антител обладает следующими преимуществами: 1) высокой чувствительностью, позволяющей выявлять концентрации до 0,05 нг/мл. Такая чувствительность метода определяется способностью одной молекулы фермента катализировать превращение большого числа молекул субстрата; 2) возможностью использовать минимальные объемы исследуемого материала; 3) стабильностью при хранении всех ингредиентов, необходимых для проведения ИФА (до года и более); 4) простотой проведения реакции; 5) наличием как инструментального (в качественном и количественном варианте), так и визуального учета; 6) возможностью автоматизации всех этапов реакции; 7) относительно низкой стоимостью диагностических наборов</p>
99.	<p>Классификация иммуноферментного анализа.</p> <p>В основу классификации методов ИФА положено несколько подходов: 1) По типу реагентов, присутствующих на первой стадии ИФА, различают: а) конкурентный метод: в конкурентном ИФА на первой стадии в системе присутствуют одновременно анализируемое соединение и его аналог, меченный ферментном и конкурирующий за центры специфического связывания с ним. б) неконкурентный метод: для неконкурентных методов характерно присутствие в системе на первой стадии только анализируемого соединения и специфичных к нему центров связывания. 2) Все методы ИФА делятся на: а) гомогенные: если все три стадии ИФА проходят в растворе и между основными стадиями нет дополнительных этапов разделения образовавшихся иммунных комплексов от непрореагировавших компонентов, метод относится к группе гомогенных. В основе гомогенного ИФА, применяемого, как правило, для определения низкомолекулярных субстанций, лежит ингибирование активности фермента при его соединении с антигеном или антителом. Активность фермента восстанавливается в результате реакции антиген-антитело. При связывании антитела с антигеном, содержащим ферментную метку, происходит ингибирование активности фермента на 95% по отношению к высокомолекулярному субстрату, что обусловлено стерическим исключением субстрата из активного центра фермента. По мере увеличения концентрации антигена связывается все больше антител и сохраняется все больше свободных конъюгатов антигенфермент, способных гидролизовать высокомолекулярный субстрат. Анализ проводят очень быстро, для одного определения требуется 1 минута. Чувствительность метода достаточно высока. С его помощью можно определить вещество на уровне пикомолей.</p>
100.	<p>Компоненты иммуноферментного анализа.</p> <p>Компоненты: а) ферменты; б) субстраты; в) антигены и антитела; г) конъюгат; д) твердая фаза.</p>

4. Методические материалы, определяющие процедуры оценивания знаний, умений, навыков и (или) опыта деятельности, характеризующих этапы формирования компетенций.

Процедуры оценивания в ходе изучения дисциплины знаний, умений и навыков, характеризующих этапы формирования компетенций, регламентируются положениями:

- П ВГУИТ 2.4.03 Положение о курсовых экзаменах и зачетах;

- П ВГУИТ 4.1.02 Положение о рейтинговой оценке текущей успеваемости, а также методическими указаниями.

Оценка по дисциплине выставляется как среднеарифметическое из всех оценок, полученных в течение периода изучения дисциплины.

5. Описание показателей и критериев оценивания компетенций на различных этапах их формирования, описание шкал оценивания для каждого результата обучения по дисциплине

Результаты обучения по этапам формирования компетенций	Методика оценки (продукт или процесс)	Показатель оценивания	Критерии оценивания сформированности компетенций	Шкала оценивания	
				Академическая оценка или баллы	Уровень освоения компетенции
<i>ПКв-4 Способен к формированию необходимой методической документации по образовательным программам в области микробиологии с применением информационных технологий</i>					
Знает: основные методологические принципы и методы научно-исследовательской деятельности в области биологии; методы публичного представления результатов выполненных научных исследований; области применения и возможности различных физико-химических методов анализа по образовательным программам биологии; технические средства поиска научно-биологической (микробиологической) информации в глобальных компьютерных сетях, универсальные пакеты прикладных компьютерных программ, специализированные базы данных/	Тест	Результаты тестирования	Количество правильных ответов более 60 %	зачтено	Освоена (базовый, повышенный)
			Количество правильных ответов менее 60 %	Не зачтено	Не освоена (недостаточный)
	Собеседование (зачет)	Правильность ответов	обучающийся активно участвовал в выполнении работы, получил и обработал результаты эксперимента, проанализировал их, допустил не более 5 ошибок в ответах на вопросы при защите лабораторной работы	Зачтено	Освоена (базовый, повышенный)
			обучающийся выполнял роль наблюдателя при выполнении работы, не внес вклада в обработку результатов эксперимента, не защитил лабораторную работу	Не зачтено	Не освоена (недостаточный)
Умеет: готовить и публиковать научно-технические отчёты и проекты; обосновывать выбор методов и методических приемов, адекватных поставленной цели; ставить цель и организовать проведение	Защита по лабораторным работам	Развернутый и полный ответ на контрольные вопросы	защита по лабораторной работе соответствует теме	зачтено	Освоена (базовый, повышенный)
			защита по лабораторной работе не соответствует теме	Не зачтено	Не освоена (недостаточный)

<p>научного исследования по актуальной проблеме и разрабатывать научно-методические и учебно-методические материалы, обеспечивающие реализацию образовательных программ;</p> <p>проводить отдельные виды учебных занятий по образовательным программам под руководством специалиста более высокой квалификации;</p> <p>использовать технические средства поиска научно-биологической (микробиологической) информации в глобальных компьютерных сетях, универсальные пакеты прикладных компьютерных программ, специализированные базы данных</p>					
<p>Владеет: навыками выполнения биохимического эксперимента с использованием возможностей различных физико-химических методов анализа, организации учебных занятий;</p> <p>навыками проведения учебных занятий по физико-химическим методам исследования;</p> <p>навыками работы на современном компьютерном оборудовании в сфере биологии и микробиологии</p>	<p>Кейс-задания</p>	<p>Содержание решения кейс-задания</p>	<p>обучающийся грамотно разобрался в ситуации, выявил причины ее возникновения, предложил несколько альтернативных вариантов выхода из сложившейся ситуации</p> <p>обучающийся разобрался в ситуации, выявил причины ее возникновения, предложил один вариант выхода из сложившейся ситуации</p> <p>обучающийся разобрался в сложившейся ситуации, однако не выявил причины случившегося и не предложил вариантов решения</p> <p>обучающийся не разобрался в сложившейся ситуации, не выявил причины случившегося и не предложил вариантов решения</p>	<p>Отлично</p> <p>Хорошо</p> <p>Удовлетворительно</p> <p>Неудовлетворительно</p>	<p>Освоена (повышенный)</p> <p>Освоена (повышенный)</p> <p>Освоена (базовый)</p> <p>Не освоена (недостаточный)</p>