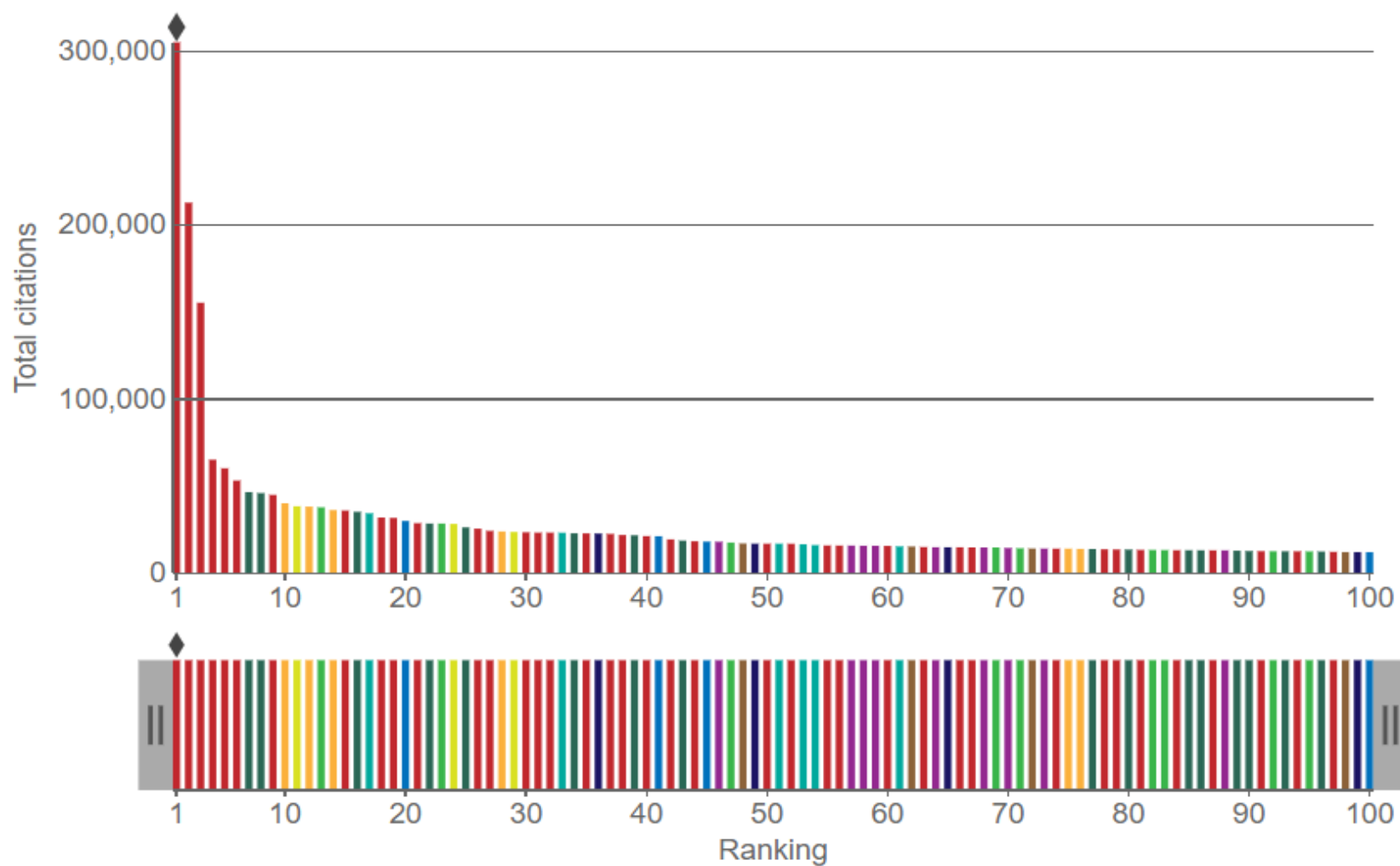
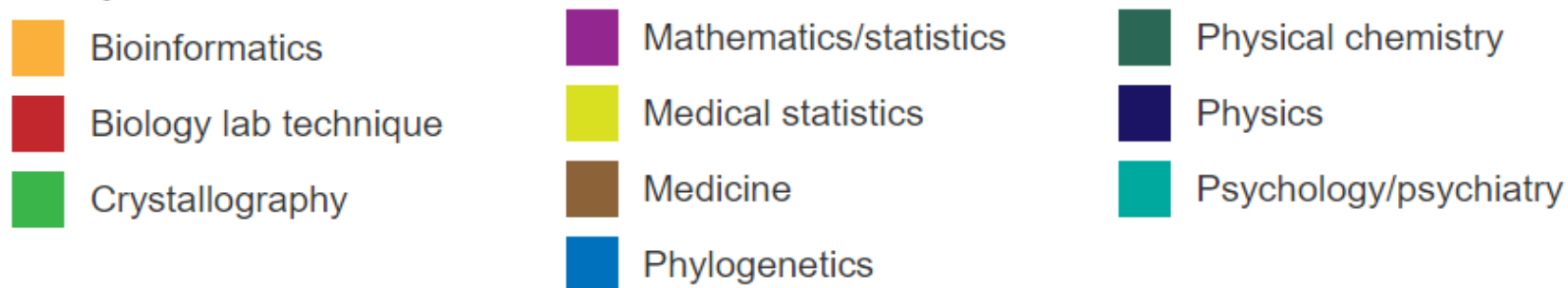


# Экспериментальные методы в современной биофизике

Введение



**Discipline colour**

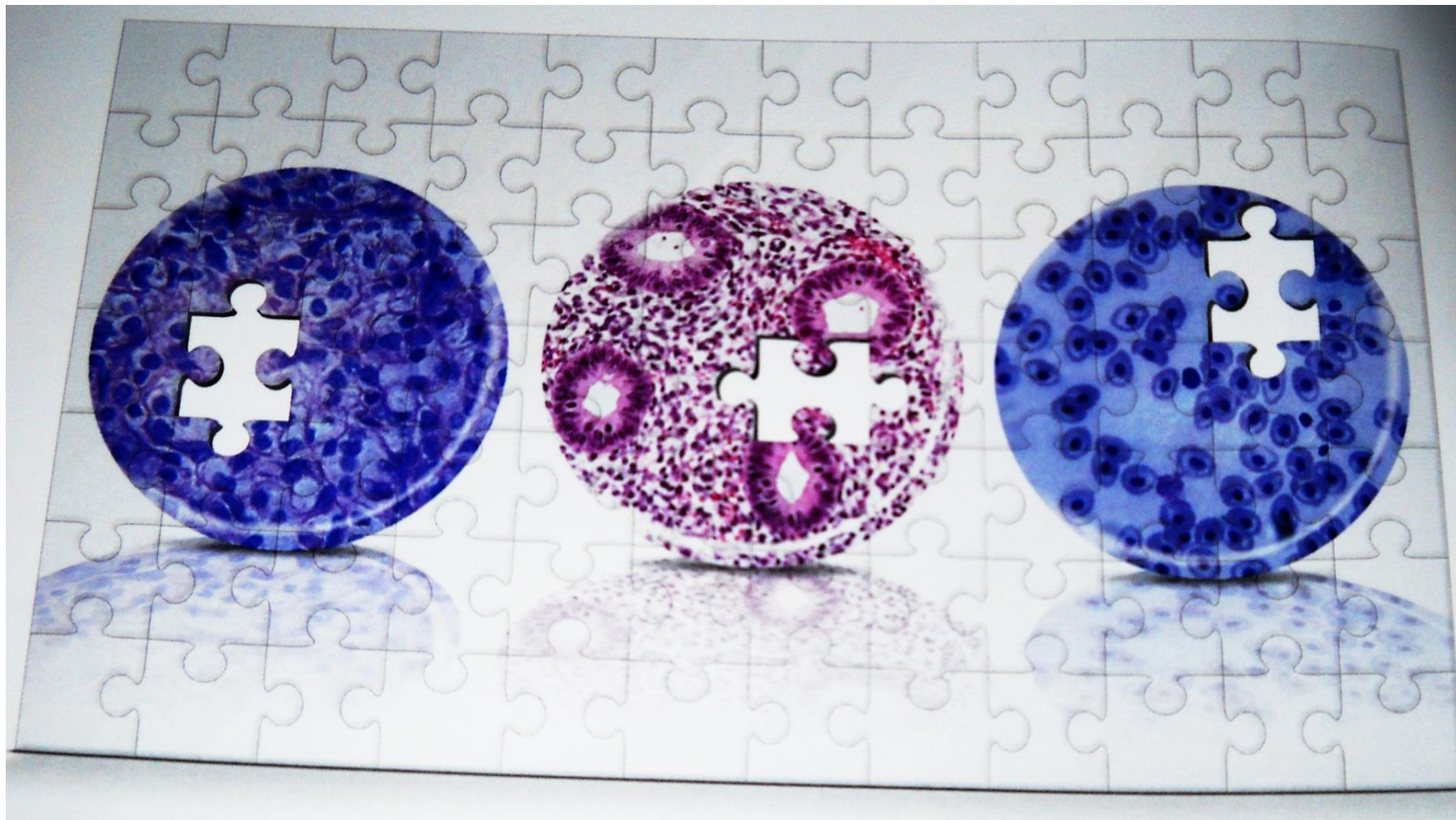




# Цели курса

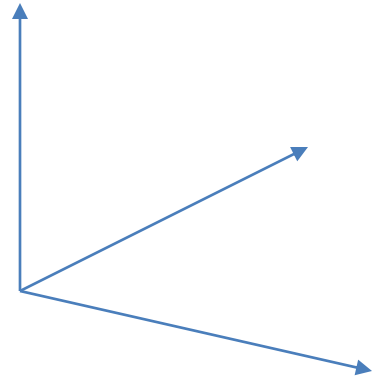
- Получить представление о принципах и ограничениях основных методов (**структурной**) биологии
- Познакомиться с некоторыми открытиями, сделанными на основе этих методов
- **Познакомиться с прорывными методами, разработанными в последние годы**
- Проследить тенденции в развитии методов
- Обмен полезной информацией

# Дополнительность методов исследования



# Особенности и ограничения методов

- Физик: пространственное и временное разрешение
- Биолог: *in vivo*, *ex vivo*, *in vitro*
- Пример «крайних» случаев:  
*рентгеноструктурный анализ и  
прижизненная микроскопия*



# Неполная классификация

- Термодинамические методы
- Гидродинамические методы
- Рассеяние излучения
- Поглощение излучения (спектроскопия)
- Электрохимические методы
- .....

# Календарь методов на «биомолекуле»



ГЕНЕТИКА ДНК СЕКВЕНИРОВАНИЕ ДНК

12 методов в картинках:  
секвенирование нуклеиновых кислот



БИОЛОГИЯ БИОМОЛЕКУЛЫ БИОТЕХНОЛОГИИ

12 методов в картинках: очистка молекул и разделение смесей



ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ ЦИТОЛОГИЯ

12 методов в картинках:  
микроскопия



БИОМОЛЕКУЛЫ ДРАГ-ДИЗАЙН СТРУКТУРНАЯ БИОЛОГИЯ

12 методов в картинках:  
структурная биология



ВАКЦИНЫ ИММУНОЛОГИЯ МИКРОБИОЛОГИЯ  
ОНКОЛОГИЯ ОПТОГЕНЕТИКА ОТВОЛОВЫЕ  
КЛЕТКИ ЦИТОЛОГИЯ ЭМБРИОЛОГИЯ

12 методов в картинках:  
клеточные технологии



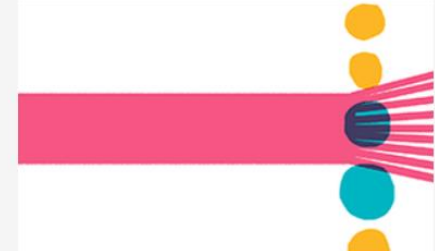
БИОТЕХНОЛОГИИ ГЕНЕТИКА ДНК ПРОЦЕССЫ РНК

12 методов в картинках:  
полимеразная цепная реакция



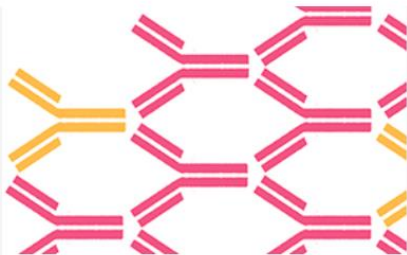
БИОМЕМБРАНЫ БИОФИЗИКА ИОННЫЕ КАНАЛЫ  
МЕДИЦИНА НЕЙРОБИОЛОГИЯ ОПТОГЕНЕТИКА  
ЦИТОЛОГИЯ

12 методов в картинках:  
нейробиология



АПОПТОЗ ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ ЦИТОЛОГИЯ

12 методов в картинках:  
проточная цитофлуориметрия



БИОМОЛЕКУЛЫ БИОТЕХНОЛОГИИ  
ИММУНОЛОГИЯ

12 методов в картинках:  
иммунологические технологии



БИОЛОГИЯ БИОМОЛЕКУЛЫ БИОТЕХНОЛОГИИ

12 методов в картинках:  
протеомика



ДРАГ-ДИЗАЙН СТРУКТУРНАЯ БИОЛОГИЯ «СУХАЯ»  
БИОЛОГИЯ

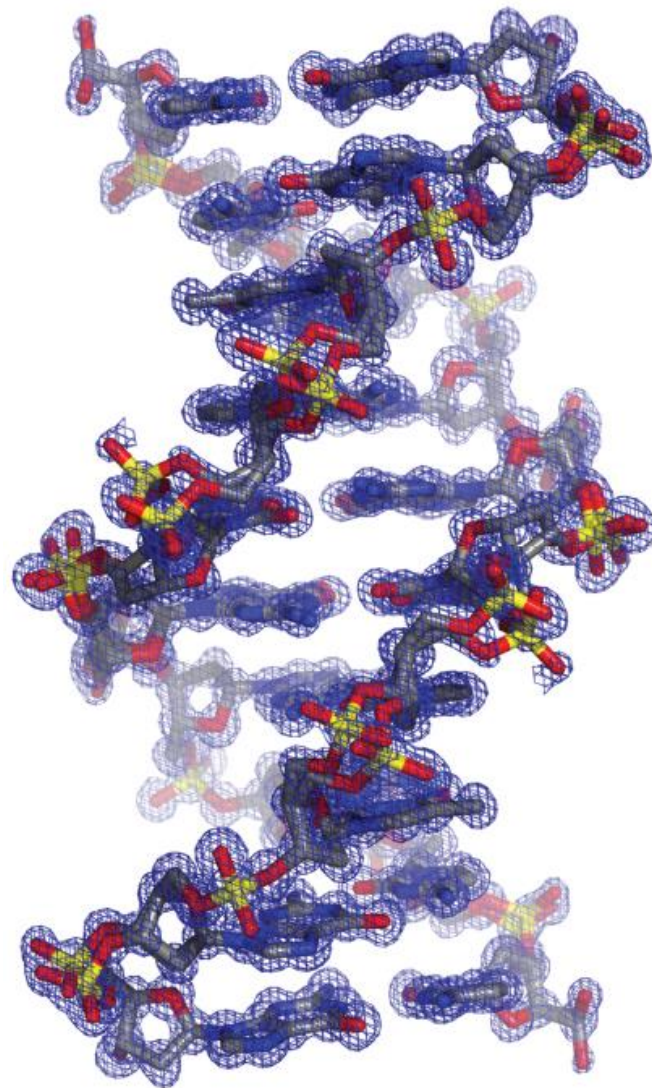
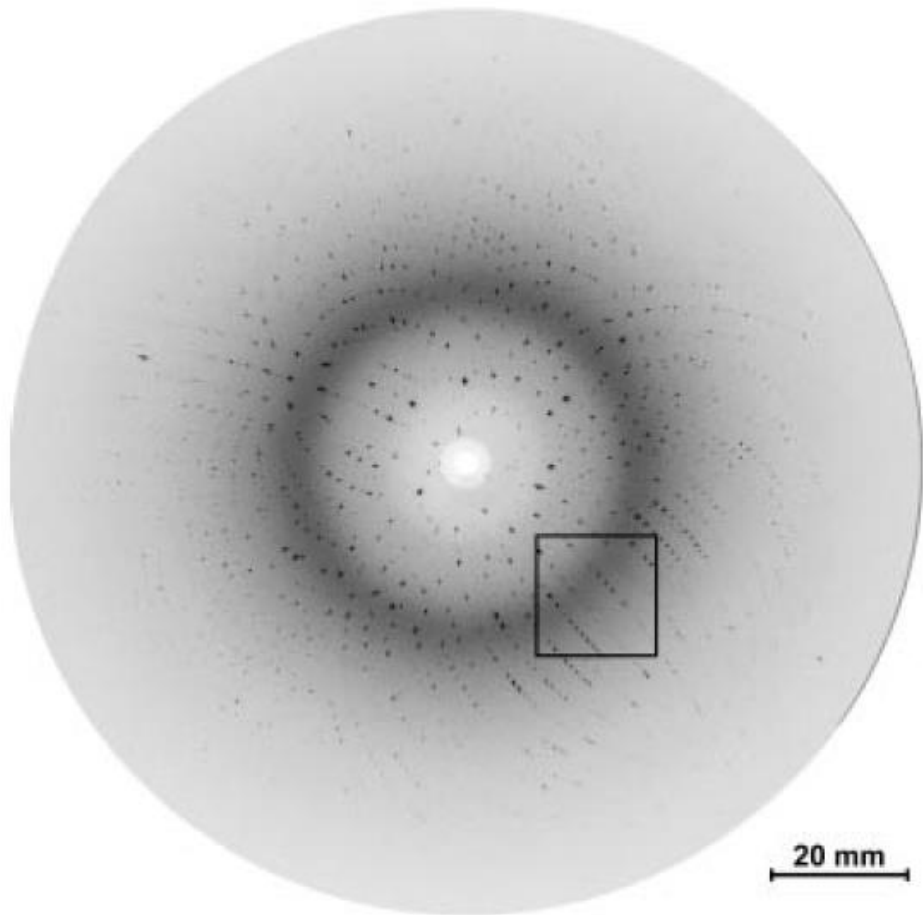
12 методов в картинках: «сухая» биология



CRISPR/CAS ГЕНЕТИКА ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ  
ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ ГМО ДНК МГЭ  
МИКРОБИОЛОГИЯ РНК РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ  
ЦИТОЛОГИЯ

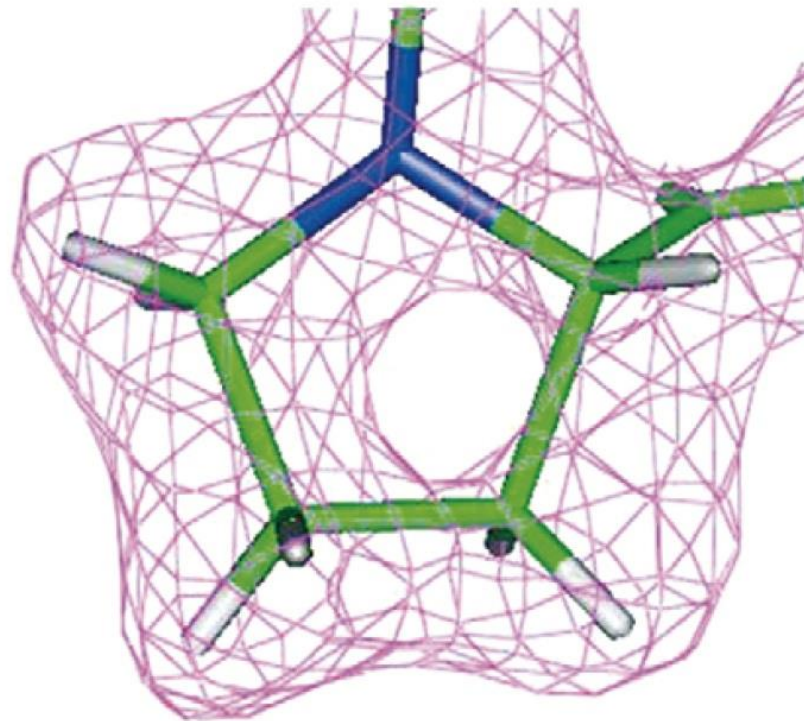
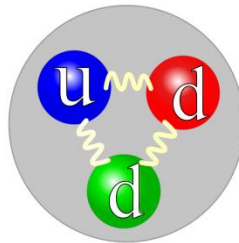
12 методов в картинках: генная инженерия

# Рентгеноструктурный анализ

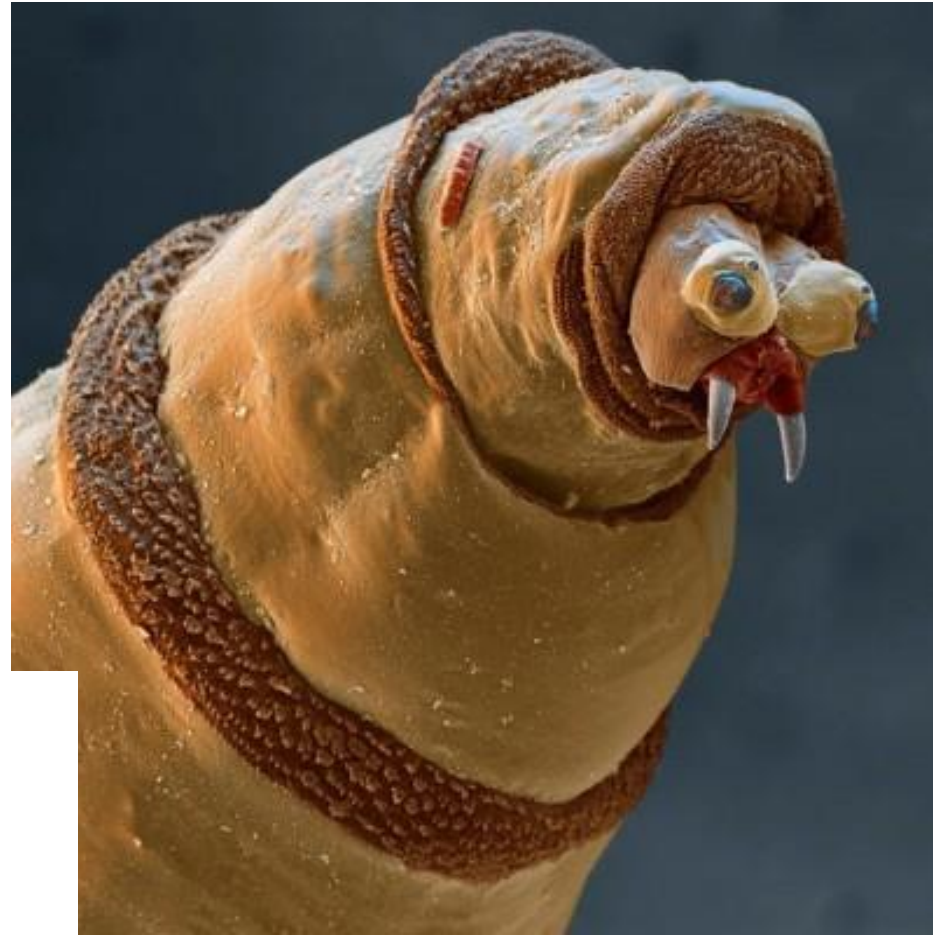
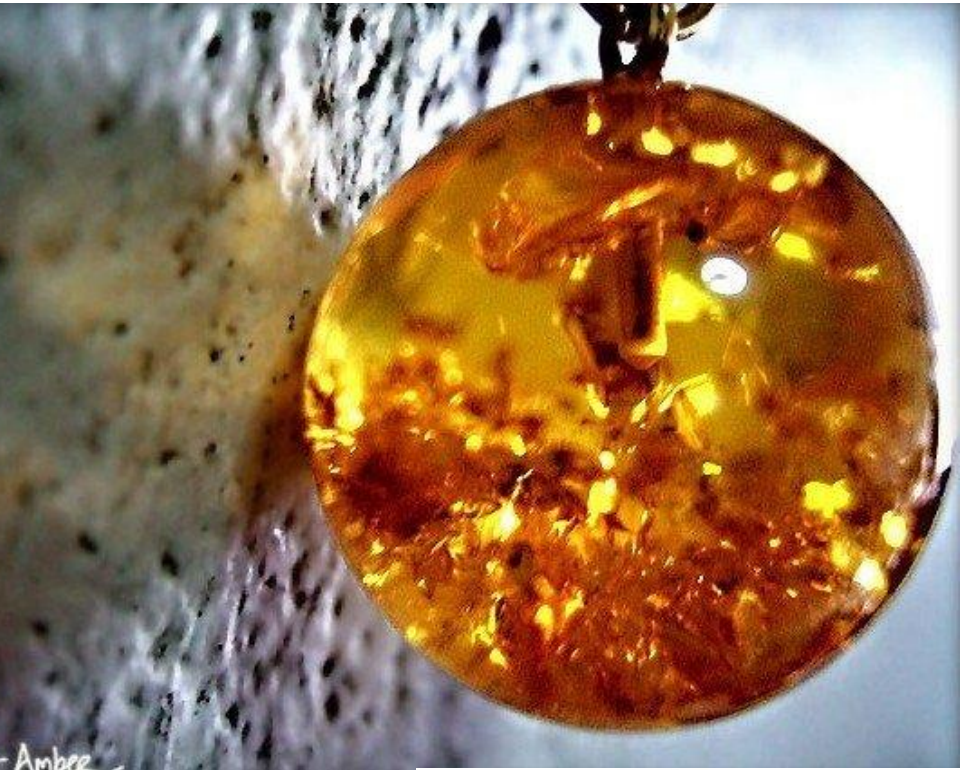




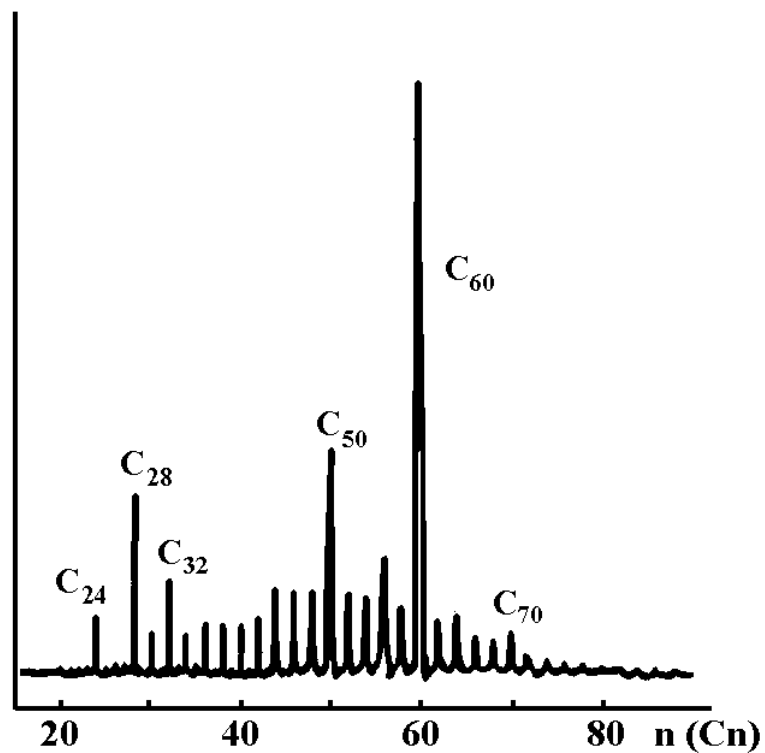
# Нейтроннография



# Электронная микроскопия



# Масс-спектрометрия

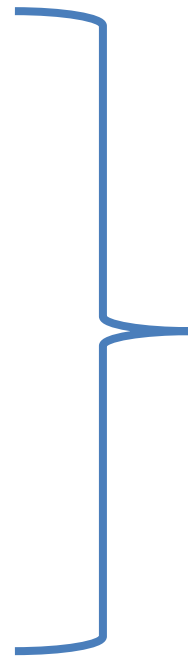


# Оптические методы

Классическая и флуоресцентная микроскопия

Конфокальная и двухфотонная микроскопия

- STED
- FRET
- PALM
- STORM
  
- MINFLUX



SRM =  
**Super  
Resolution  
Microscopy**

## Methods of the Year

**2007** : NGS (Next Generation Sequencing)

**2008** : STED microscopy (STimulated Emission Depletion)

**2009** : iPS cells (induced Pluripotent Stem cells)

**2010** : Optogenetics

**2011** : Genome Editing with Engineered Nucleases

2012 : Targeted Proteome Analysis

2013 : DNA & RNA sequencing of single cells

2014 : Light-Sheet fluorescence microscopy

## Methods of the Year

**2015** : Single-particle cryo-EM

2016 : Epitranscriptome analysis

**2017** : Organoids

«Life happens in (at least) three dimensions..»

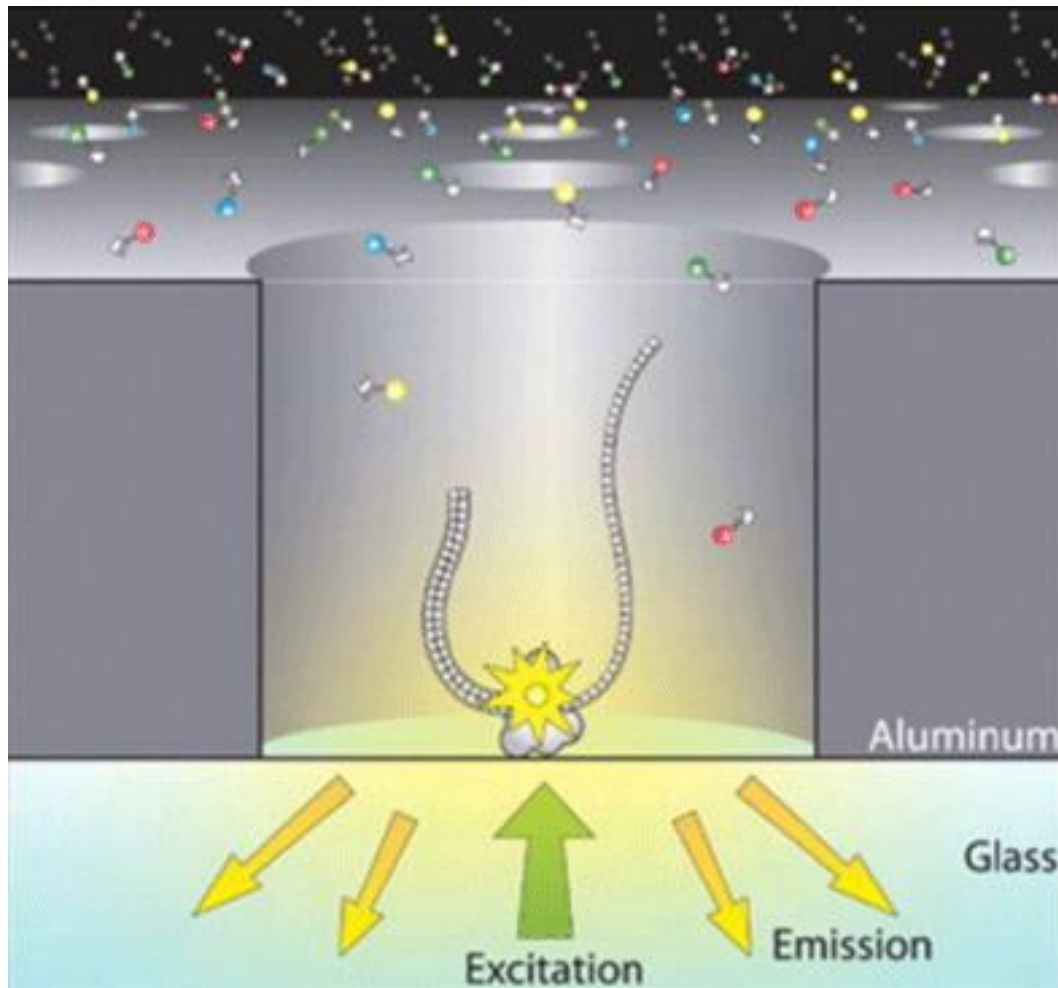
2018: **Imaging in freely behaving animals**

2019: Single-cell multimodal omics





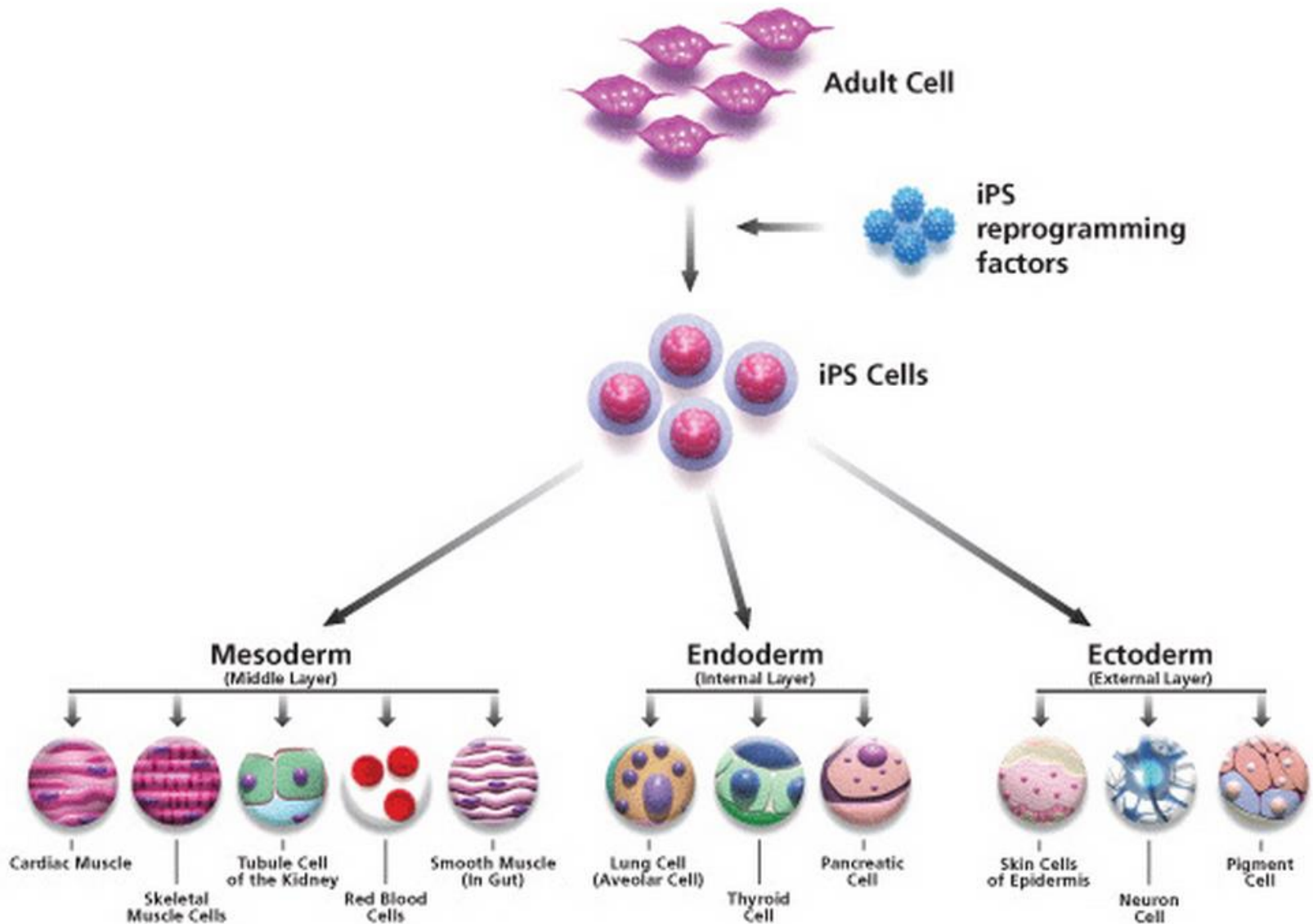
# NGS: SMRT by PAC BIO



- Single mol. seq.
- 6-8 kb per run
- Methylation detection with kinetics
- 85% accuracy per single base
- 99.99 % accuracy by reseq.



# Induced pluripotent stem cells (**iPS cells**)



SUPPORTED BY **NEW ENGLAND BIOLABS, INC.**



**VISIT [WWW.NEB.COM](http://WWW.NEB.COM)**  
FOR OUR MONTHLY SPECIAL OFFERS

CELEBRATING  
**35**  
YEARS

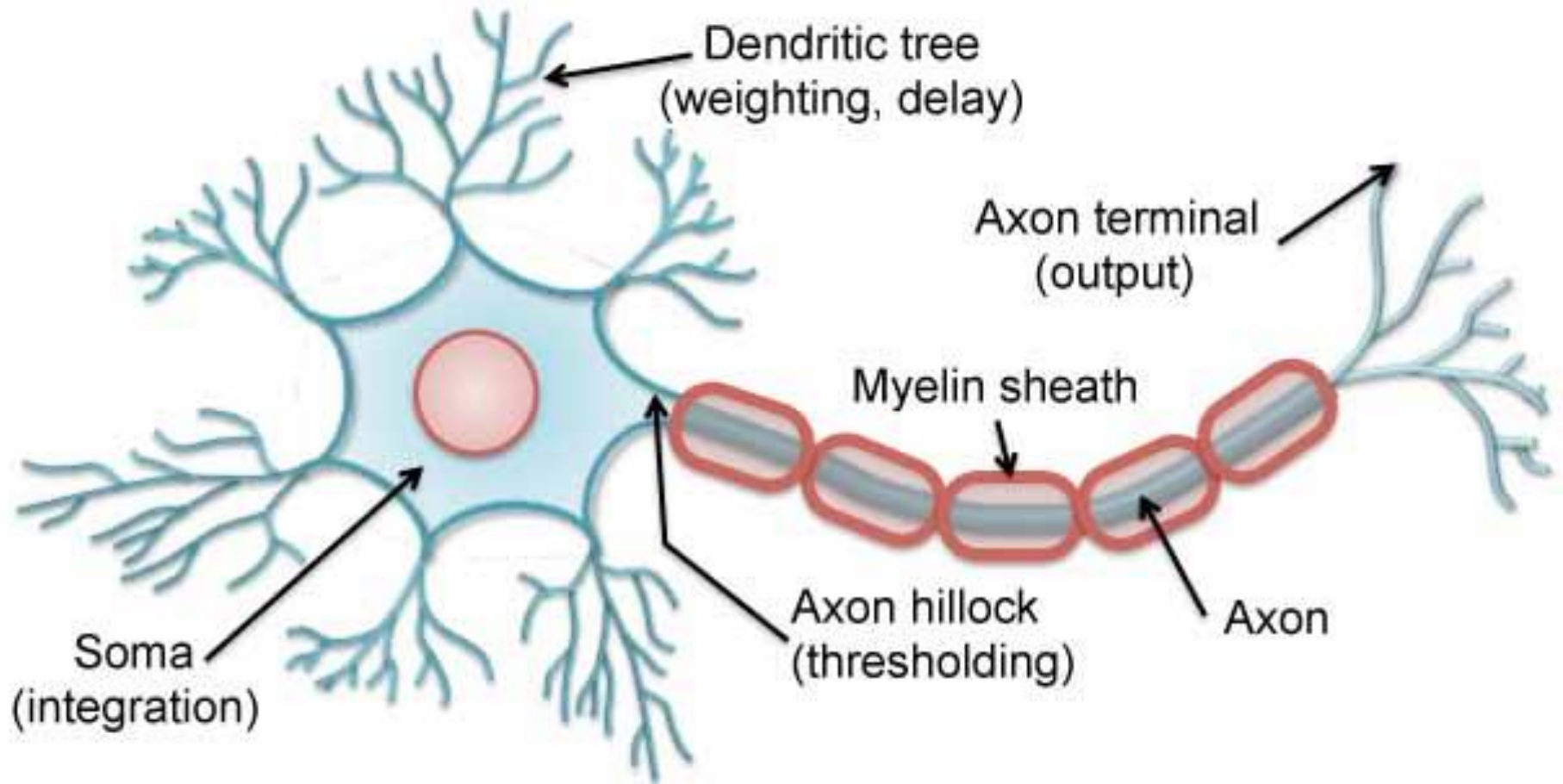


NEW ENGLAND  
**BioLabs**<sup>®</sup> Inc.  
*enabling technologies in the life sciences*

## Текущие проблемы подхода:

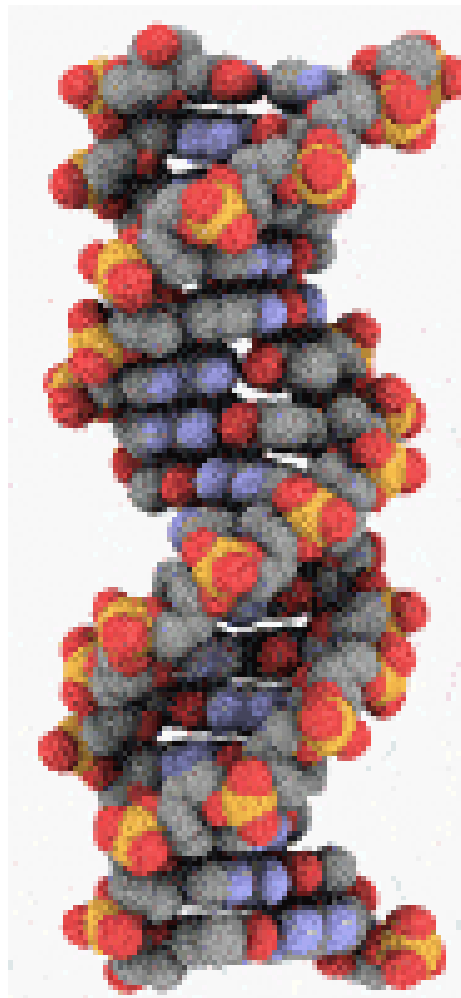
- 1) очень низкий выход – от 0.01–0.1%
- 2) баланс между эффективностью и риском перерождения клеток в раковые (p53)
- 3) неполное перепрограммирование

# Optogenetics

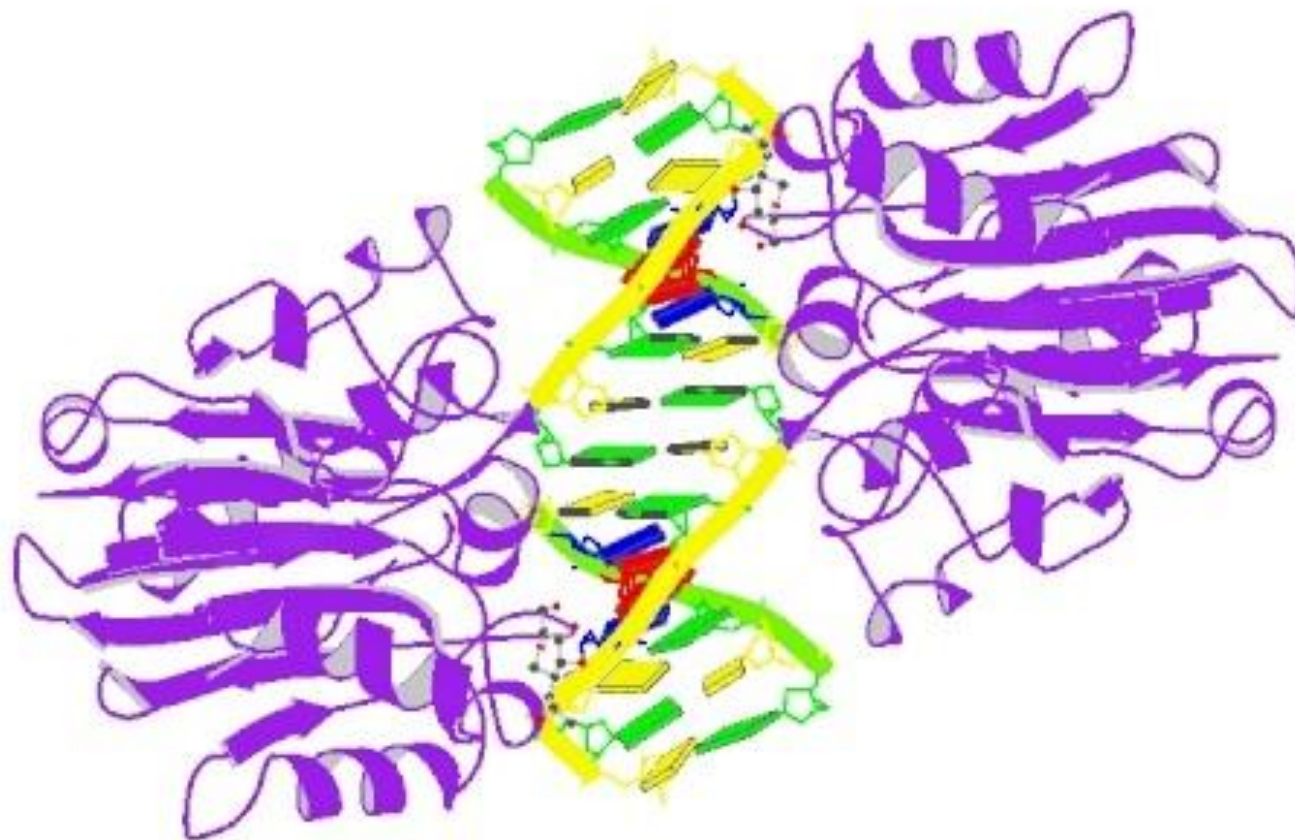


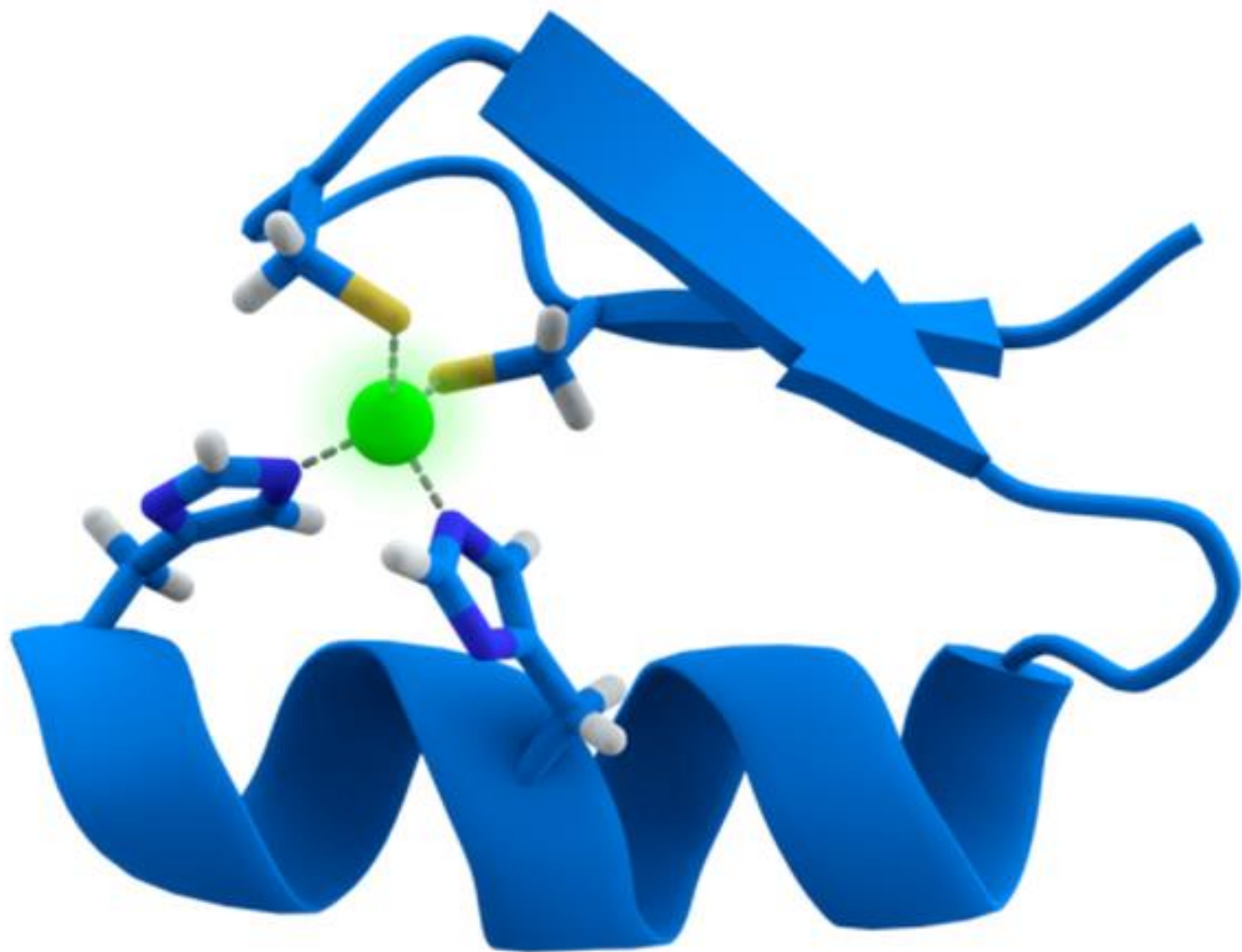


# Genome Editing with Engineered Nucleases. **TALENs**

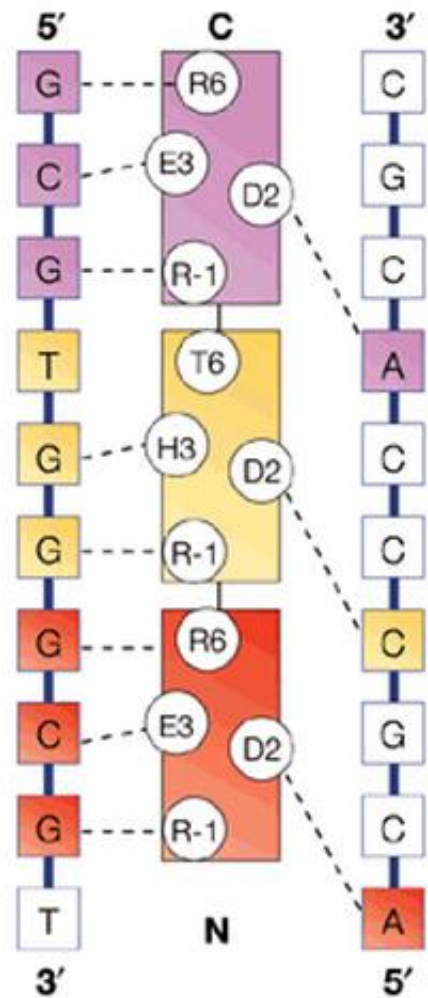
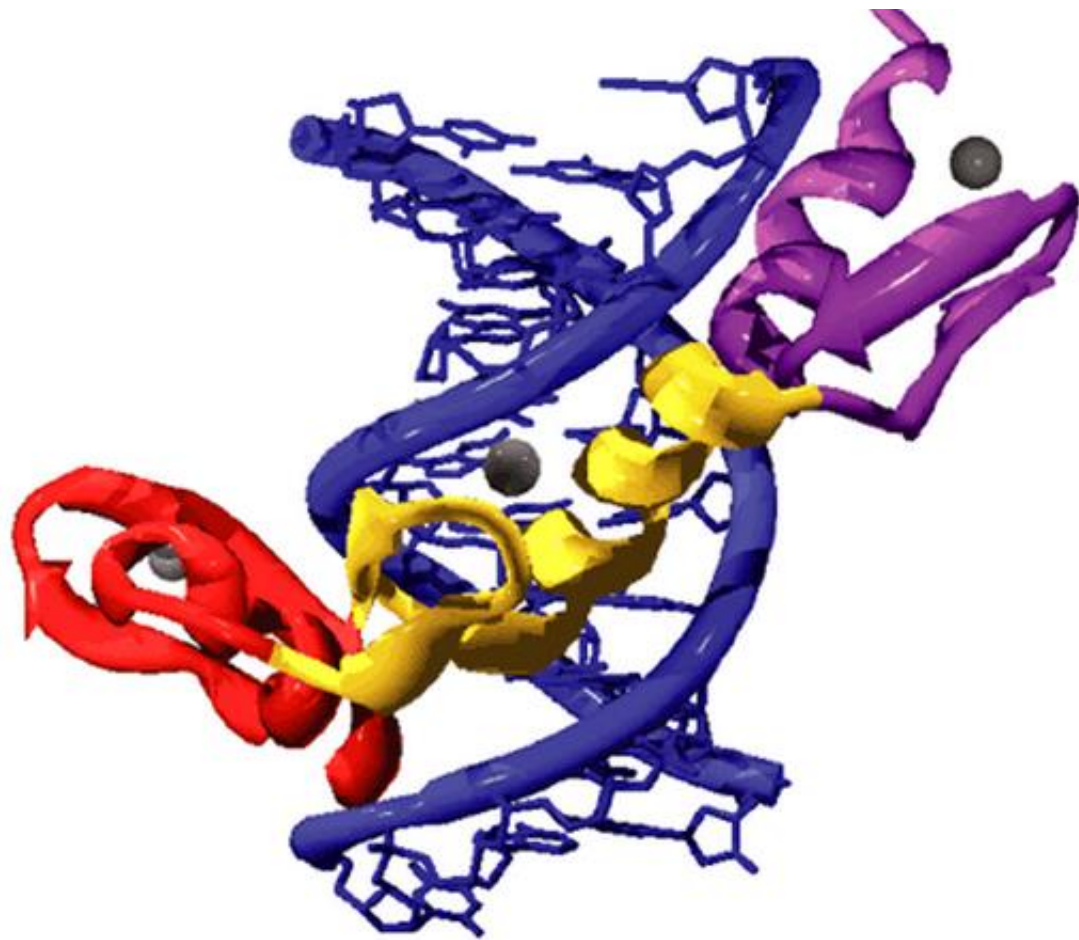


# DNAse I и ДНК

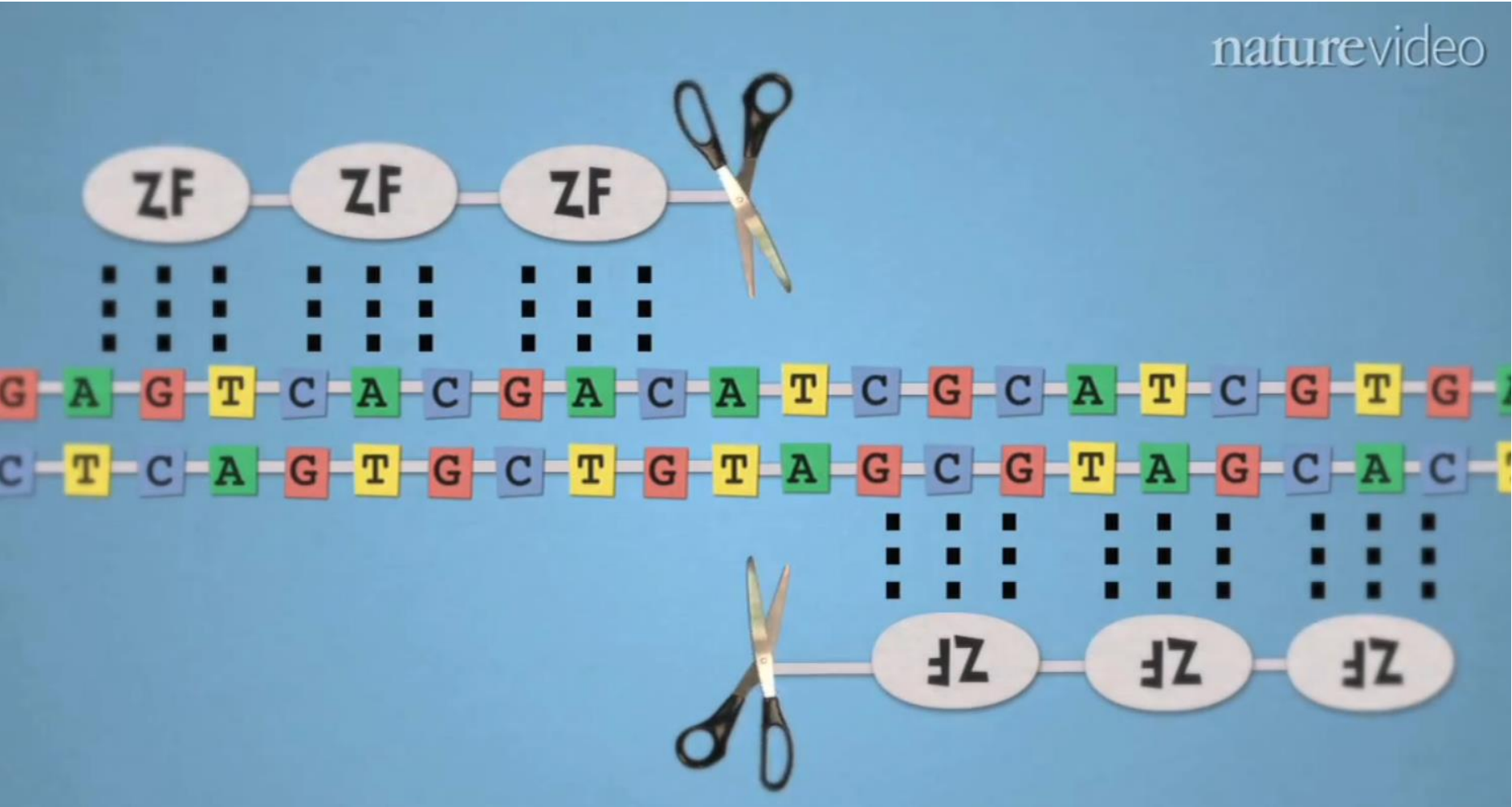




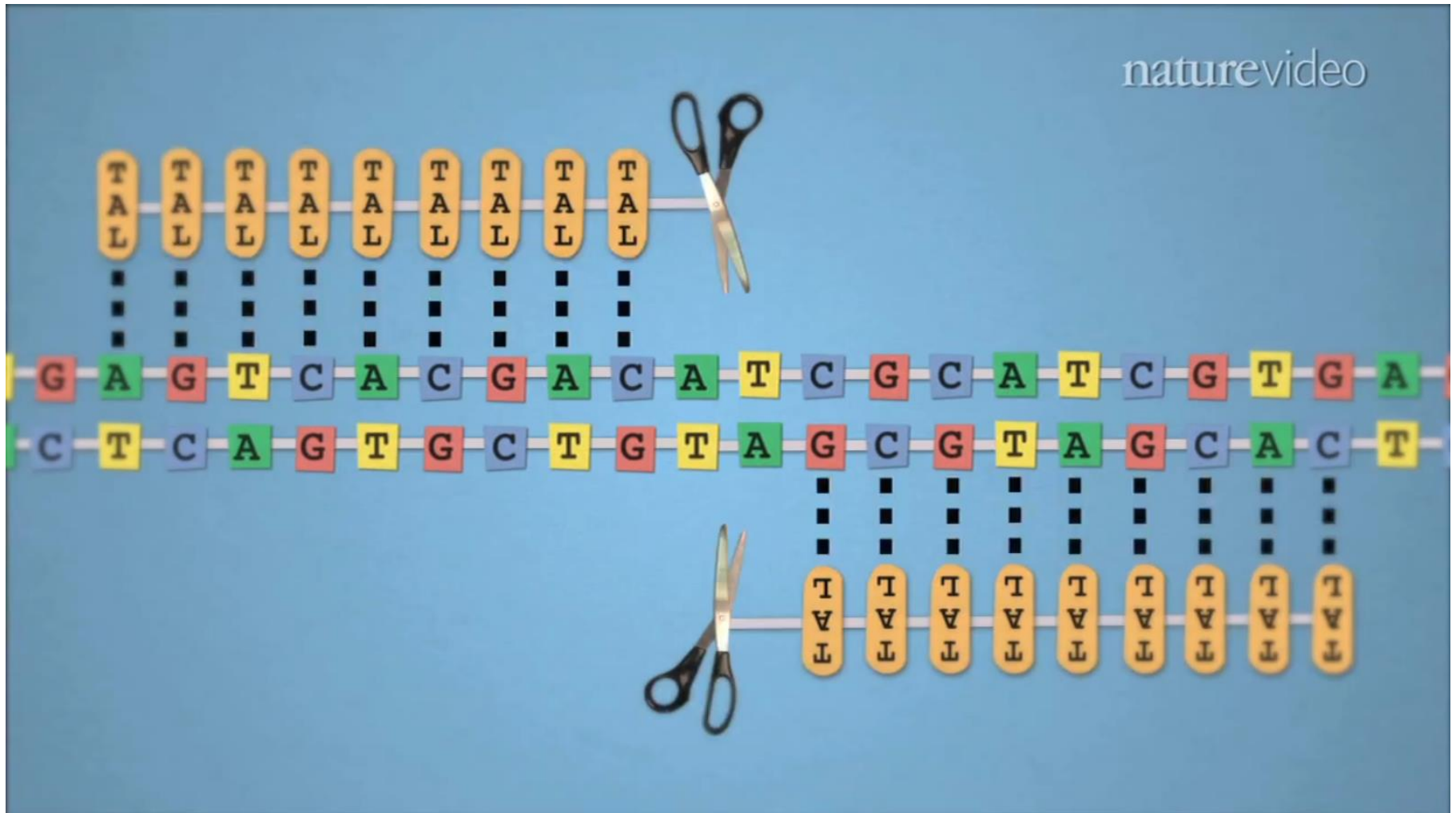




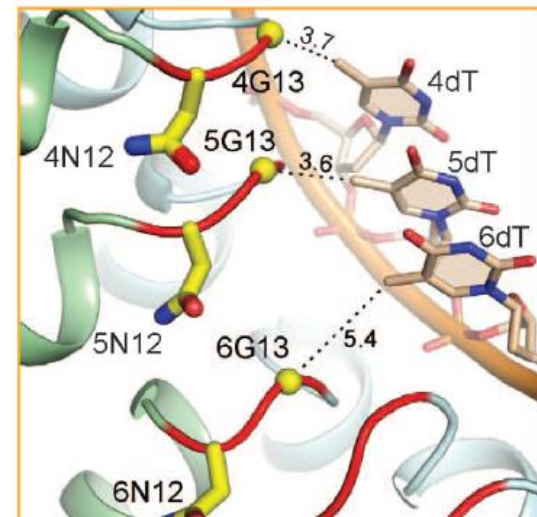
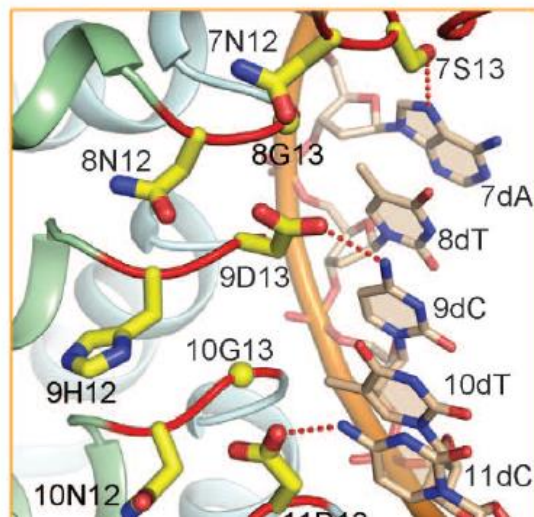
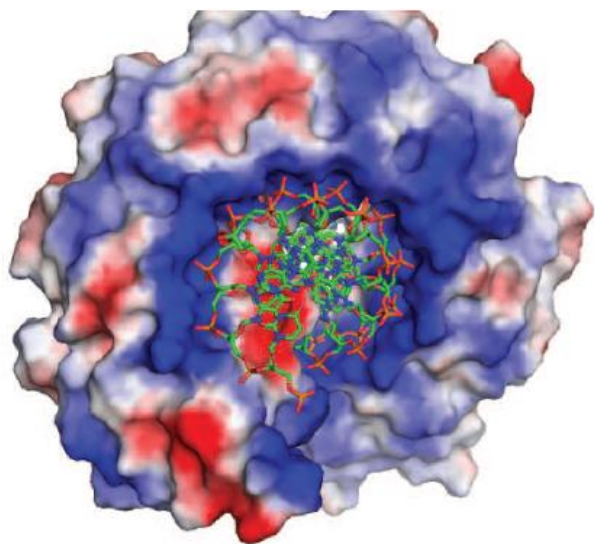
# Цинковые пальцы + нуклеаза



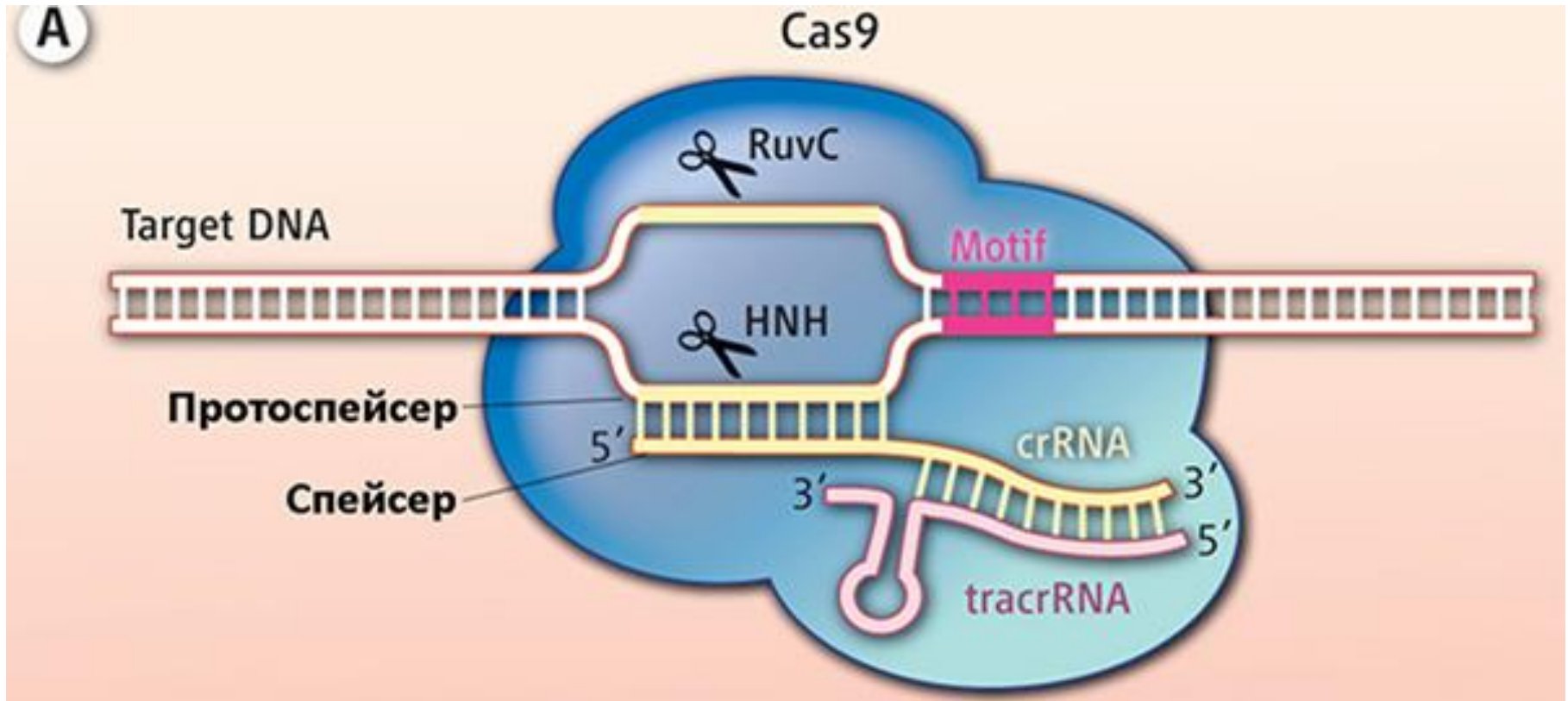
# Transcription activator-like effector nuclease: **TALENs**



# ДНК-белковое узнавание: неспецифическое и специфическое



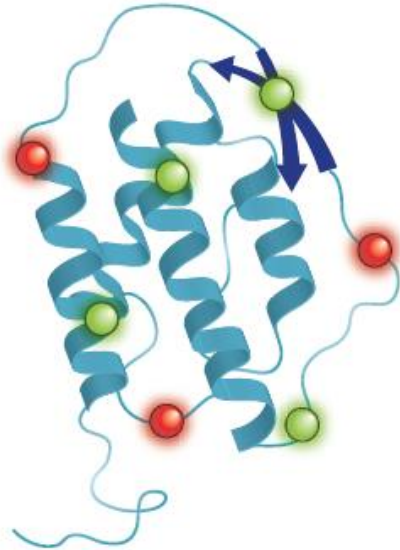
# CRISPR-Cas9



Stan J. J. Brouns, 2012. A Swiss Army Knife of Immunity

nature methods

Special feature: methods to watch



Fluorescence can illuminate protein structure.

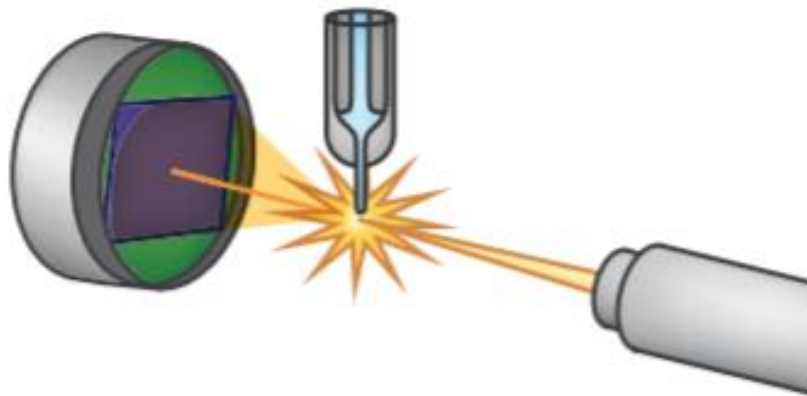
## >> Structure via super-resolution

Fluorescence nanoscopy is extending its reach into structural biology.

The group of Vahid Sandogdhar reported Angstrom resolution with SMLM on proteins at cryogenic temperatures (*Nat. Methods* **14**, 141–144, 2017).

## >> The new XFELs

New X-ray free-electron (XFEL) facilities will broaden access to this technology, facilitate methods development, and push boundaries in structural biology.



Powerful and ultrafast XFELs enable new approaches to macromolecular structure determination.

---

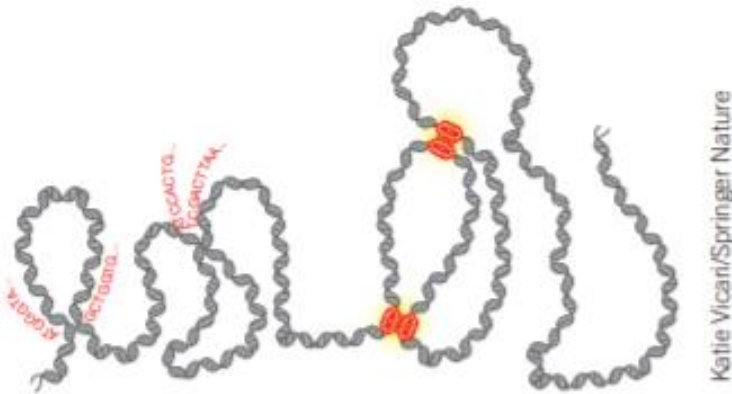
# Когда физики не ШУТЯТ

European XFEL in particular has been long anticipated by many in the structural biology community—not only is it the largest facility, but also it is based on new superconducting accelerator technology that enables it to generate 27,000 X-ray flashes per second—more than 200 times the repetition rate of any other XFEL.



## »» Towards a dynamic 3D genome

Sequencing and imaging bring unique aspects to genome architecture.



Combining imaging and sequencing for a better 3D genome.

---

Hi-C  
FISH  
ChIP-Seq  
Hi-ChIP  
HCR & PCR

CRISPR-based new methods

# Какие подходы наиболее активно совершенствуются сегодня

Optical imaging

Proteomics (mass-spec)

Gene manipulation tools

Sequencing, expression and epigenetic analysis

Interactome analysis

# Тенденции

- Работа с **отдельными молекулами** (**регистрация**, изучение структурно-динамических характеристик и их направленное изменение)
- Новое «рождение» оптических методов: **микроскопия сверхвысокого разрешения** -> регистрация и изучение динамики отдельных молекул

**ABSTRACT**

**INTRODUCTION**

**RESULTS**

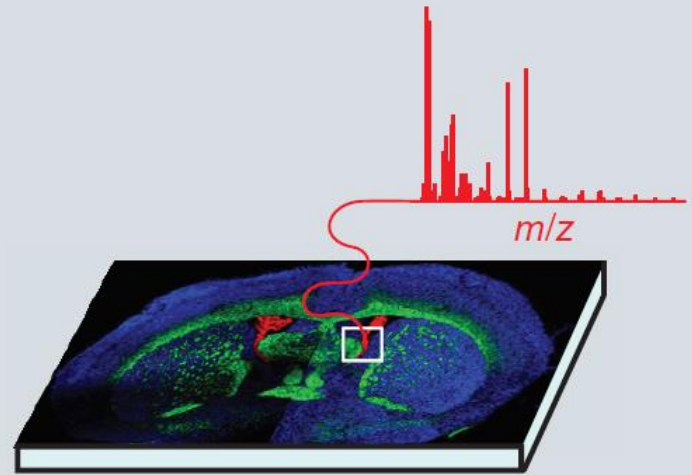


**#ILOVEPHD**

## >> Mass spectrometry imaging takes off

Recent advances in mass spectrometry imaging enable label-free molecular mapping in single cells and in 3D.

What if it were possible to image the locations of multitudes of molecules in a tissue or even a single cell and to determine their chemical identities without using any fluorescent labels or antibodies? It's not a fanciful idea—a technique called mass spectrometry imaging (MSI) has the potential to do just this.



Kim Caesar/Springer Nature

Mass spectrometry imaging maps the molecular composition of tissues and cells. Reproduced in part from Kompauer, M. *et al. Nat. Methods* **14**, 1156–1158, 2017.

## >> Spatial transcriptomics

It will soon be commonplace to localize gene expression in tissues.

