



**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ПРИКАРПАТСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ВАСИЛЯ СТЕФАНІКА
Факультет природничих наук
Кафедра біохімії та біотехнології**



СИЛАБУС НАВЧАЛЬНОЇ ДИСЦИПЛІНИ

ФЛУОРЕСЦЕНТНА МІКРОСКОПІЯ ТА СПЕКТРОСКОПІЯ

Для спеціальностей

091 Біологія

102 Хімія

Освітній рівень

Магістр

3 кредити ECTS

16 год. – лекції,

8 год. – лабораторні заняття

6 год. – практичні заняття

60 год. – самостійна робота



Затверджено на засіданні
Вченої ради
факультету природничих наук
Протокол № ____
від __ грудня 2023 р.

ОПИС КУРСУ

Цей курс розповідає про один найпотужніших методів досліджень сучасної клітинної біології який дозволяє отримувати дво- та тривимірні зображення клітинних структур, вивчати розміщення окремих протеїнів в клітині та їхні взаємодії, спостерігати за процесами в живих клітинах у реальному часі. Він передбачає як засвоєння теоретичних основ так і експериментальну роботу на флуорометрах та практичну обробку зображень флуоресцентної мікроскопії.

Матеріал сформовано так щоб його засвоєння не вимагало попередніх знань біології, фізики чи хімії. Курс розпочнеться з опанування основних властивостей світла, вивчення принципу флуоресценції, властивостей природних та синтетичних флуоресцентних барвників. Буде розглянуто мічення білків та спеціальні техніки що застосовуються при вивченні взаємодій біологічних молекул (FRET, анізотропія флуоресценції). Після цього вивчатимуться принципи роботи світлових та флуоресцентних мікроскопів, основні техніки флуоресцентної мікроскопії, підходи до отримання тривимірних зображень клітин. Особливу увагу буде приділено практичним навичкам цифрової обробки мікроскопічних зображень в спеціалізованих програмах (ImageJ/Fiji). Закінчиться курс вивченням сучасних технік флуоресцентної мікроскопії які застосовуються для отримання зображень надвисокої роздільної здатності.

Практична частина курсу передбачає роботу на флуорометрі (Shimadzu RF-5301PC і DeNovix DS-11 FX+), мічення білків, обробку зображень конфокальної мікроскопії.

ЦІЛІ КУРСУ

Метою цього курсу є навчити студентів працювати на спектрофлуорометрах та використовувати флуоресцентні методи для вивчення взаємодій біологічних молекул чи характеристики барвників, розповісти про можливості сучасних флуоресцентних мікроскопів та навчити обробляти зображення отримані на них.

ОЧІКУВАНІ РЕЗУЛЬТАТИ НАВЧАННЯ

Після успішного проходження курсу студенти зможуть:

1. Розуміти основні принципи флуоресценції
2. Описати основні флуорофори що зустрічаються в природі
3. Вимірювати спектри флуоресценції
4. Мітити протеїни флуоресцентними барвниками
5. Характеризувати нові флуоресцентні барвники
6. Вимірювати квантовий вихід флуоресценції та яскравість барвників
7. Використовувати анізотропію флуоресценції для вивчення взаємодії біомолекул
8. Використовувати сольватохромні барвники та зміни спектрів флуоресценції
9. Описати принцип роботи та сфери застосування класичного, конфокального флуоресцентного та двофотонного мікроскопів
10. Готувати ілюстрації на основі файлів конфокальної мікроскопії
11. Працювати з тривимірними мікроскопічними зображеннями в програмах ImageJ/Fiji
12. Оцінювати взаємодію протеїнів в клітині за допомогою FRET та колокалізації
13. Підбирати флуоресцентні протеїни під різні задачі мікроскопії

ПРОГРАМА КУРСУ



Лекції

- 1. Світло.**
Колір і довжина хвилі світла. Поглинання, заломлення та відбиття світла. Природні хромофори. Дипольний момент молекул. Спектри абсорбції. Спектрофотометри.
- 2. Флуоресценція.**
Діаграма Яблонського. Квантовий вихід флуоресценції, яскравість. Сольватахромізм. Спектрофлуориметри. Спектри флуоресценції та збудження.
- 3. Синтетичні флуорофори.**
Мічення білків. Мітки для цистеїнів та лізінів. Інтеркалюючі барвники.
- 4. Вивчення взаємодій молекул за допомогою флуоресценції.**
FRET та його застосування для вивчення взаємодій білків. Час життя збудженого стану. Гасіння флуоресценції. Поляризоване світло. Анізотропія флуоресценції та її застосування.
- 5. Оптична мікроскопія.**
Трансмісійна мікроскопія, фазовий контраст. Принципові схеми мікроскопів. Цифрові зображення. Роздільна здатність, мікрони та пікселі.
- 6. Флуоресцентна мікроскопія.**
Будова мікроскопа. Використання лазерів, фільтрів, дихроїчних дзеркал. Канали побудови зображення. Конфокальний мікроскоп та тривимірні зображення.
- 7. Виявлення взаємодій молекул в клітині за допомогою мікроскопії.**
Колокалізація. FRET, FLIM, FRAP. Флуоресцентні білки в мікроскопії клітин.
- 8. Новітні методики флуоресцентної мікроскопії.**
Флуоресцентна мікроскопія в живих організмах. Двофотонна мікроскопія *in vivo*. Деконволюція. TIRF. Дифракційна межа. Подолання ліміту роздільної здатності при мікроскопії, STORM. PALM.



Лабораторні

- 9. Вимірювання спектрів флуоресценції.**
- 10. Вивчення впливу рН та полярності середовища на інтенсивність та спектри флуоресценції.**
- 11. Флуоресцентне мічення протеїну. Оцінка ступеня мічення.**
- 12. Анізотропія флуоресценції та розмір молекули.**



Практичні

- 13. Розрахунок параметрів взаємодії протеїнів на основі даних FRET.**
- 14. Обробка зображень отриманих флуоресцентною мікроскопією в ImageJ/Fiji.**
Кольорова гама, корекція, уникнення свідомої та несвідомої втрати інформації.
- 15. Обробка тривимірних зображень конфокальної мікроскопії, обробка відеоданих з мікроскопа на прикладі зображень клітин.**

ЛІТЕРАТУРА ТА МАТЕРІАЛИ

1. Пивоваренко В.Г. Абсорбційна та флуоресцентна спектроскопія органічних сполук; К.: ВПЦ «Київський університет», 2023
2. Peter Jomo Walla Modern Biophysical Chemistry Detection and Analysis of Biomolecules, Wiley-VCH 2014 // розділи 1,2
3. Schermelleh, L., Ferrand, A., Huser, T. *et al.* Super-resolution microscopy demystified. *Nat Cell Biol* **21**, 72–84 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0251-8>
4. Tam, J. and Merino, D. (2015), Stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) in comparison with stimulated emission depletion (STED) and other imaging methods. *J. Neurochem.*, 135: 643-658. <https://doi.org/10.1111/jnc.13257>
5. <https://www.olympus-lifescience.com/en/resources/>
6. <https://www.ibiology.org/online-biology-courses/microscopy-series/fluorescence-microscopy/>
7. <https://www.microscopyu.com/techniques/confocal>
8. Звантаження безкоштовної програми для обробки зображень Fiji <https://fiji.sc/>
9. Peter Bankhead. [Analyzing fluorescence microscopy images with ImageJ](#), 2014

ІНФОРМАЦІЯ ПРО ВИКЛАДАЧА

Володимир ШВАДЧАК

Доцент кафедри біохімії та біотехнології



Захистив дисертацію по розробці двосмугових флуоресцентних барвників для вивчення вірусних протеїнів в університеті Страсбурга (2009). Працював над розробкою сольватохромних флуоресцентних міток для протеїн-мембранних взаємодій (Інститут Біофізичної хімії, Німеччина 2009-2012), засобів контрольованого для фотовивільнення біологічно активних речовин під час мікроскопії речовин Інститут органічної хімії та біохімії АН Чехії 2015-2022). Зараз займається розробкою флуоресцентних барвників для селективного мікроскопічного детектування амілоїдних фібрил.



ORCID [0000-0001-8302-8073](https://orcid.org/0000-0001-8302-8073) (список публікацій)



Scopus-ID [13411269400](https://scopus.org/13411269400) (список цитувань)



[Сторінка на сайті кафедри](#)



Робочі години: Пн-Пт – 9:00 – 17:00



volodymyr.shvadchak@pnu.edu.ua

ПОЛІТИКА КУРСУ

Загальні положення

Основою політики курсу є взаємоповага у спілкуванні та фокусування на навчання. Телефони під час занять повинні бути переведені в беззвучний режим і відлучення з аудиторії для спілкування допускаються тільки в нагальних випадках. Очікується використання імені а прізвища студента під час онлайн спілкування (назви профілів в Zoom та месенджерах). При оформленні робіт у вигляді файлів необхідно надавати назви що ідентифікують автора та тип роботи. Також очікується що файли надані студентами мають містити всю необхідну інформацію для розуміння та оцінювання й не вимагати додаткових усних пояснень. Під час онлайн занять студенти повинні бути готові вмикати камеру та мікрофон за потреби. Вживання напоїв під час лекцій допускається, якщо це не заважає іншим.

Лекції

Запитання до викладача та коментарі під час лекцій вітаються. Коментарі щодо робіт інших студентів та запитання повинні мати конструктивний характер та бути виваженими. Студенти мають змогу підготувати короткі *доповіді* що розширюють чи поглиблюють розуміння лекції, чи *задати практичні запитання* які вони хотіли б розглянути занятті про що треба повідомити про них до початку занять.

Лабораторні заняття

Під час виконання лабораторних робіт необхідно дотримувати загальних правил техніки безпеки роботи в лабораторіях. Виконання всіх лабораторних робіт необхідне для допуску до іспиту. Звіти про роботи мають бути надіслані викладачеві у електронній формі та обговорені ("захищені") не пізніше ніж через 2 тижні після проведення. У випадку недотримання терміну здачі оцінка знижується на 1 бал. Курс розрахований на наявність у студентів можливості працювати за власним комп'ютером удома. Наявність ноутбуків під час лабораторних не є необхідною, проте студенти повинні самостійно подбати про своєчасне експортування та копіювання всіх експериментальних файлів з пристроїв.

Практичні заняття

Виконання практичних робіт необхідне для допуску до іспиту, ці роботи мають бути надіслані викладачеві у електронній формі. Курс розрахований на наявність у студентів *можливості працювати за власним комп'ютером* під час практичних занять. За потреби практичні завдання можна виконувати удома.

Відвідування

У випадку пропусків лекційних чи лабораторних занять з поважної причини допускається зарахування результатів неформальної освіти у формі проходження курсів на платформах Udemy, Prometheus, Coursera чи аналогічних **за умови попереднього погодження теми онлайн-курсів з викладачем**. Виконання практичних робіт необхідне для допуску до іспиту, ці роботи мають бути надіслані викладачеві у електронній формі.

Академічна доброчесність

Копіювання матеріалів лабораторних чи практичних робіт інших студентів (в тому числі студентів що проходили курс іншого року) призводить до повторного виконання та зниження оцінки на 3 бали або, при незначній частці скопійованого, до зниження оцінки на 1 бал. При повторному порушенні студенту буде надана можливість приготувати доповідь на основі однієї з нових статей по темі курсу для допуску до повторного виконання практичної чи лабораторної роботи.

- Під час іспиту допускається використання конспектів, електронних та друкованих підручників, пошук інформації в інтернеті. Проте будь-яке спілкування з іншими людьми призведе до завершення іспиту з незадовільною оцінкою.

Неформальна освіта

Сертифікат про успішне проходження курсу зміст якого частково або повністю відповідає змісту дисципліни дає можливість замінити або доповнити підсумковий контроль згідно з «Положенням про порядок зарахування результатів неформальної освіти у Прикарпатському національному університеті імені Василя Стефаника». Цю можливість, а також назви та програми курсів бажано обговорити з викладачем завчасно. Як загальне правило, курси по мікроскопії, хімічній біології, флуоресцентній спектроскопії будуть зараховані.

ОЦІНЮВАННЯ

Активність	% від оцінки	термін	примітки
Активність на лекціях	15	впродовж курсу	Оцінка ставиться по найкращій з відповідей студента.
Лабораторні	20	2 тижні з дня заняття	По 5 балів за кожну лабораторну. Мінімум 2 бали за кожну для допуску до іспиту.
Практичні	15	2 тижні з дня заняття	По 5 балів за кожну практичну. Мінімум 2 бали за кожну для допуску до іспиту.
Іспит	50	в кінці курсу	Тест на 8 запитань з короткими відповідями (32 бали) та одне розвернуте запитання (18 балів)

За підсумками вивчення курсу студент зможе отримати максимально 100 балів: 50 балів впродовж курсу та 50 балів за екзамен.

Сума балів	Оцінка ECTS	Оцінка за національною шкалою
90 – 100	A	відмінно
80 – 89	B	добре
70 – 79	C	добре
60 – 69	D	задовільно
50 – 59	E	задовільно
25 – 49	Fx	незадовільно з можливістю повторного складання
0 – 24	F	незадовільно з обов'язковим повторним вивченням дисципліни

