



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Přístrojové metody molekulární biofyziky

**Mgr. Karel Kubíček, Ph.D., Ústav fyziky kondenzovaných látek,
CEITEC MU, karelk77@gmail.com, +420 549 49 3253**



CEITEC

Central European Institute of Technology
BRNO | CZECH REPUBLIC



CEITEC at Masaryk University





CEITEC



Central European Institute of Technology

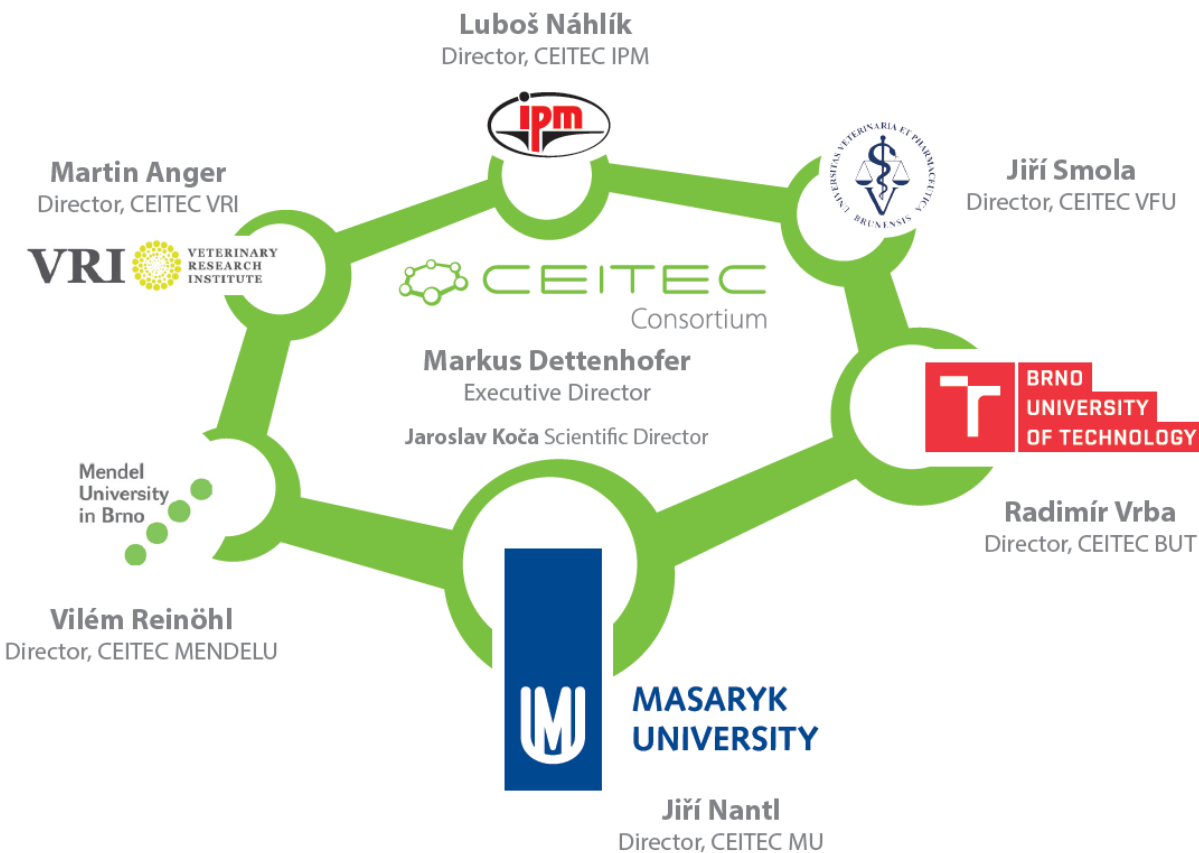
BRNO | CZECH REPUBLIC

CEITEC at Masaryk University



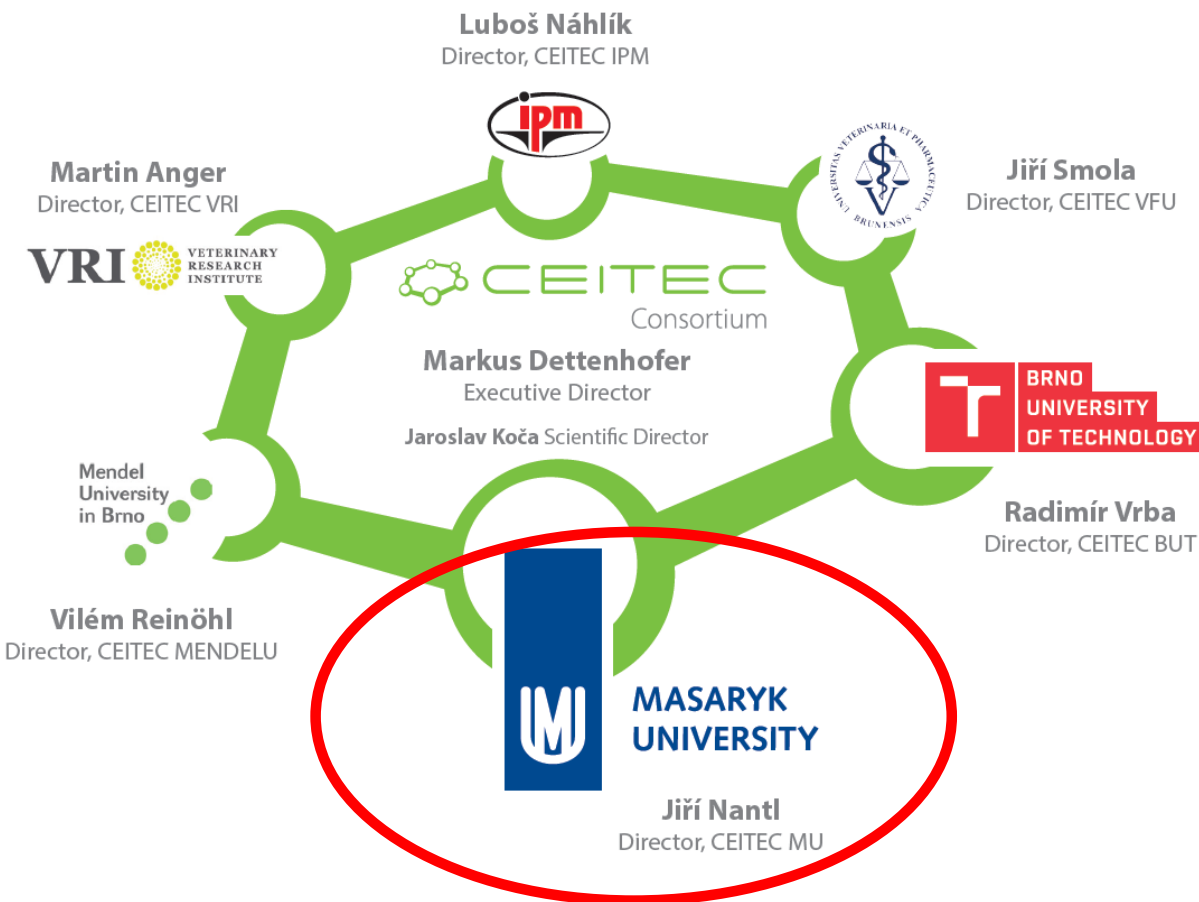
CEITEC is a centre of scientific excellence in the fields of life sciences and advanced materials and technologies.

- 6 partners
- 500+ researchers
- 7 research programmes
- 63 research groups
- 12 core facilities
- Budget: EUR 208 mil.
- Start of operation: 2011



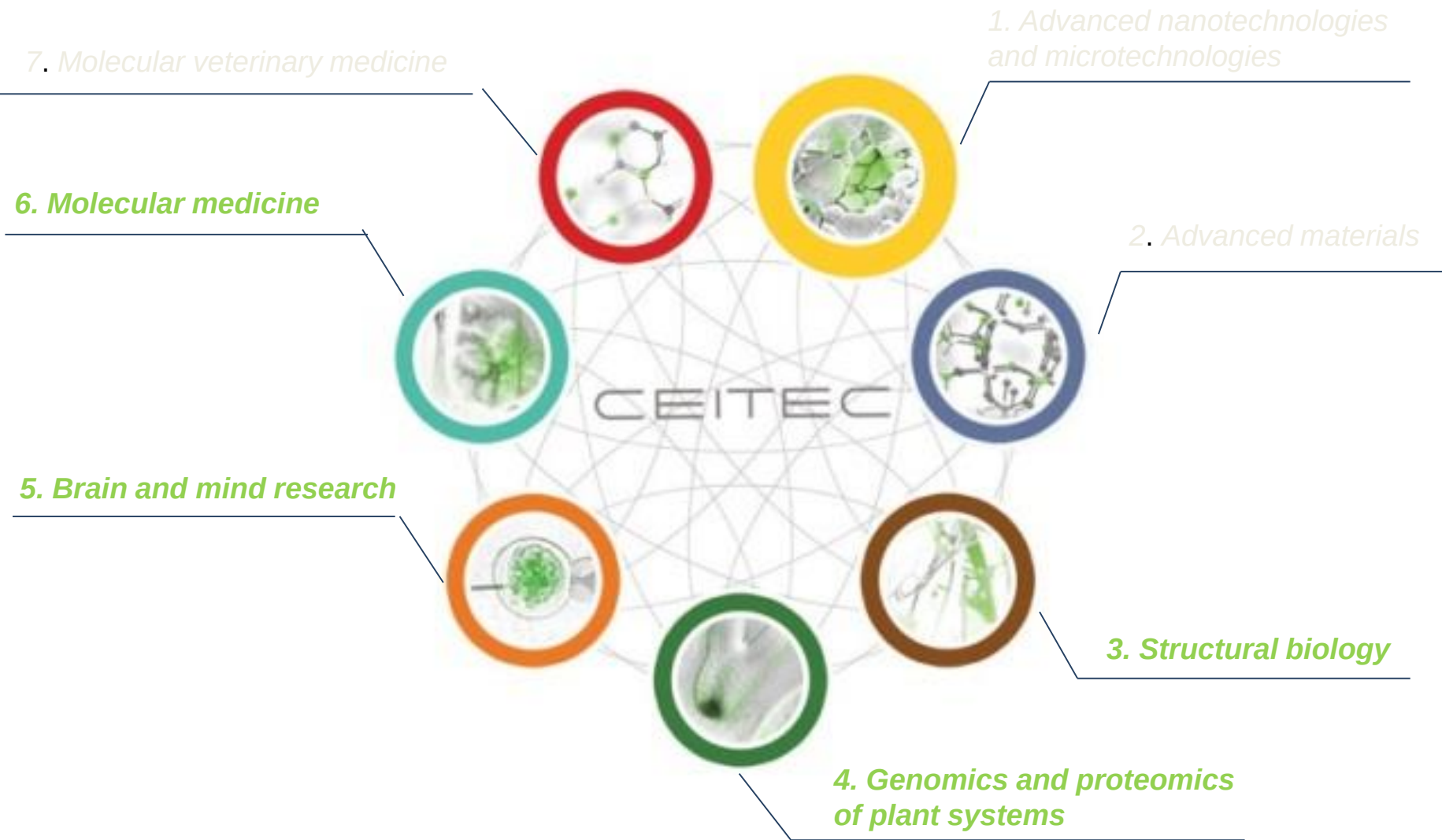
CEITEC is a centre of scientific excellence in the fields of life sciences and advanced materials and technologies.

- 6 partners
- 500+ researchers
- 7 research programmes
- 63 research groups
- 12 core facilities
- Budget: EUR 208 mil.
- Start of operation: 2011

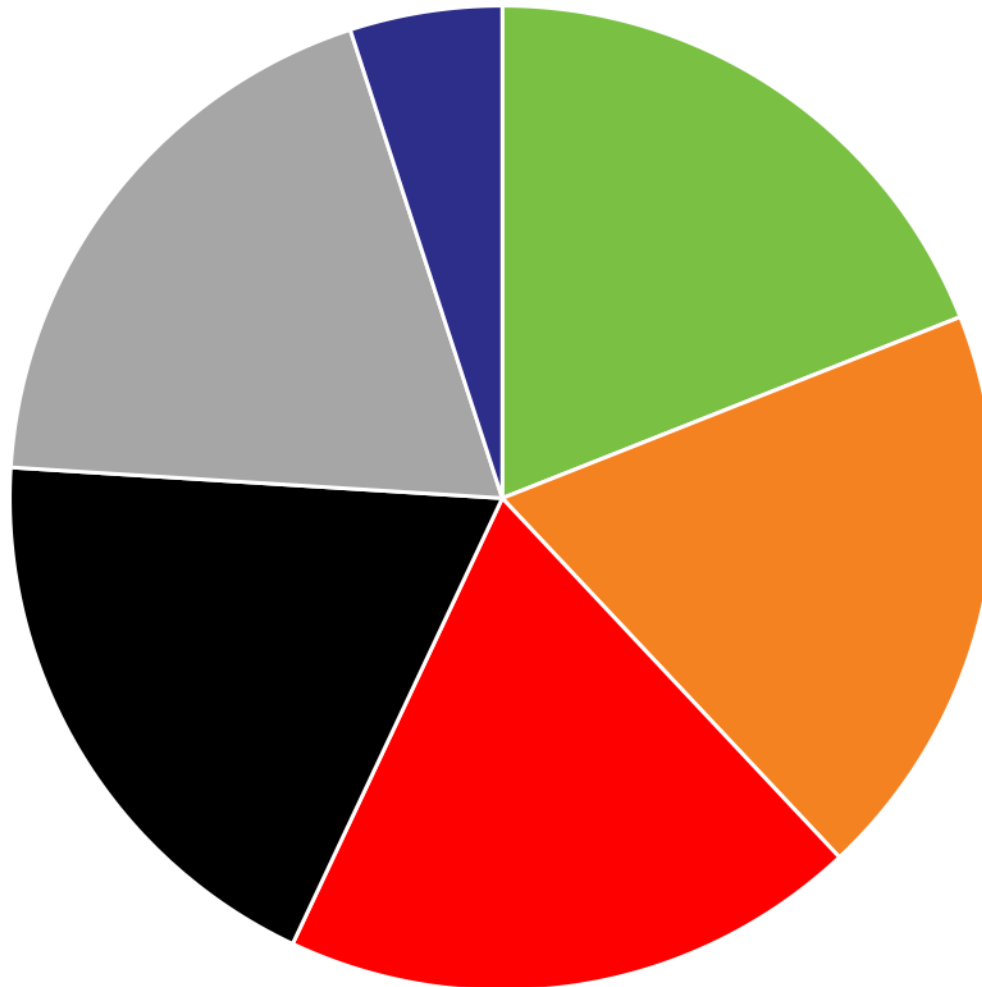


CEITEC MU

Life Sciences Research Programmes



To succeed, you need at least four of these



■ smart ■ motivation ■ creativity ■ hard-working ■ skill ■ luck

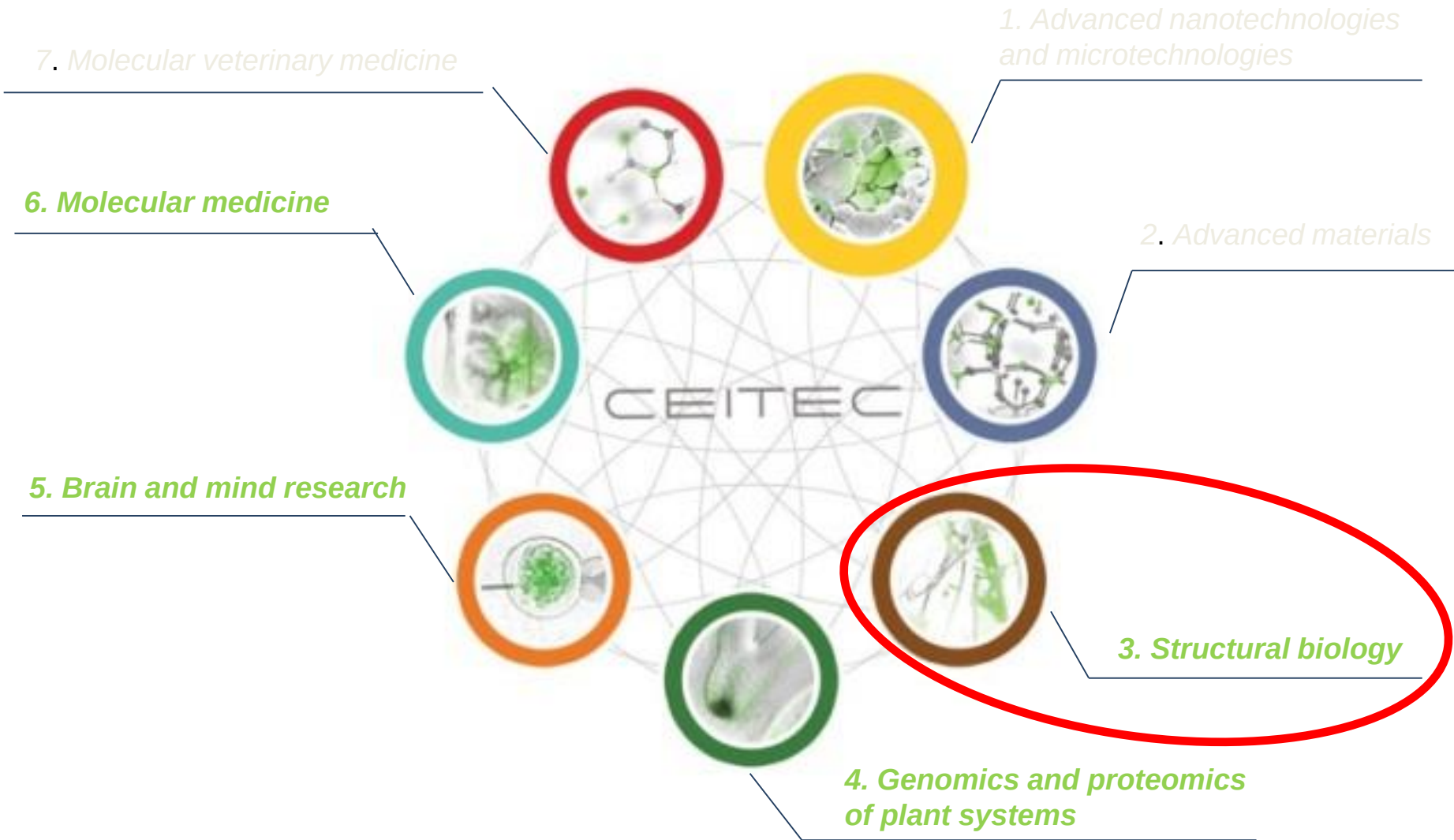
What background do I need for joining CEITEC



■ math ■ physics ■ chemistry ■ biology ■ informatics ■ medicine

CEITEC MU

Life Sciences Research Programmes



Structural Biology

ch P

nes

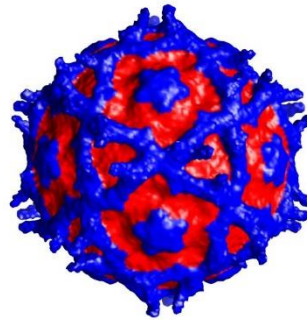
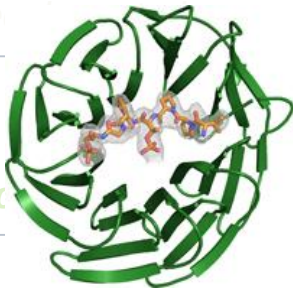
ologies

materials

7. Mole

medicine

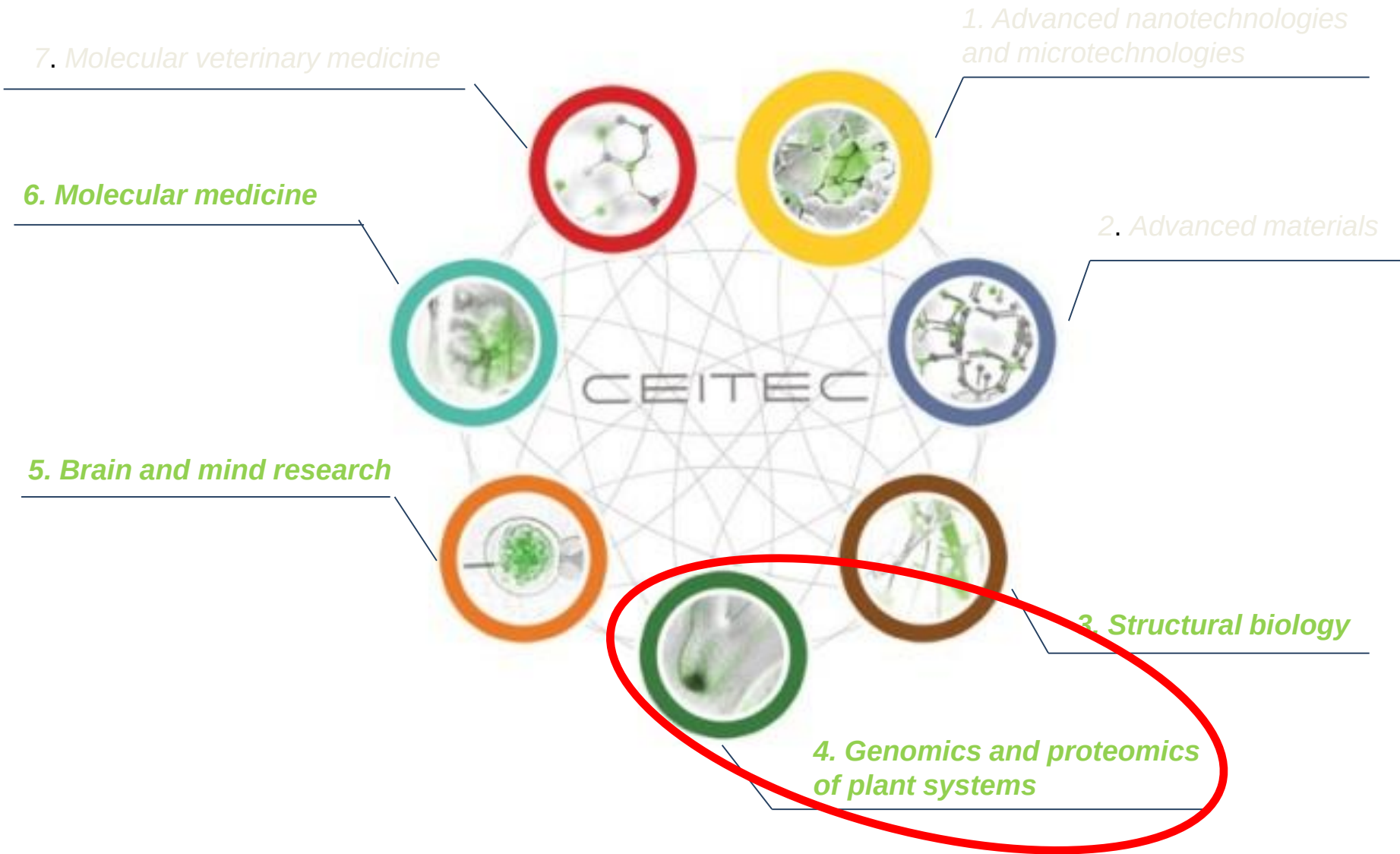
6. Molec



al biology

CEITEC MU

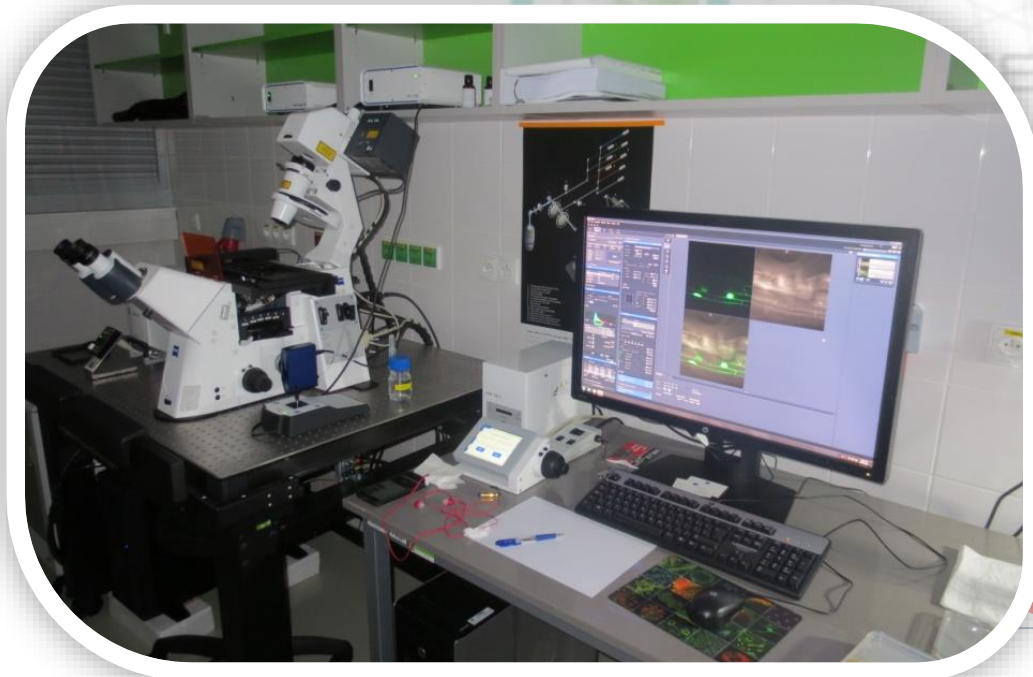
Life Sciences Research Programmes



Genomics and Proteomics of Plant Systems

grammes

6. Molecular medicine

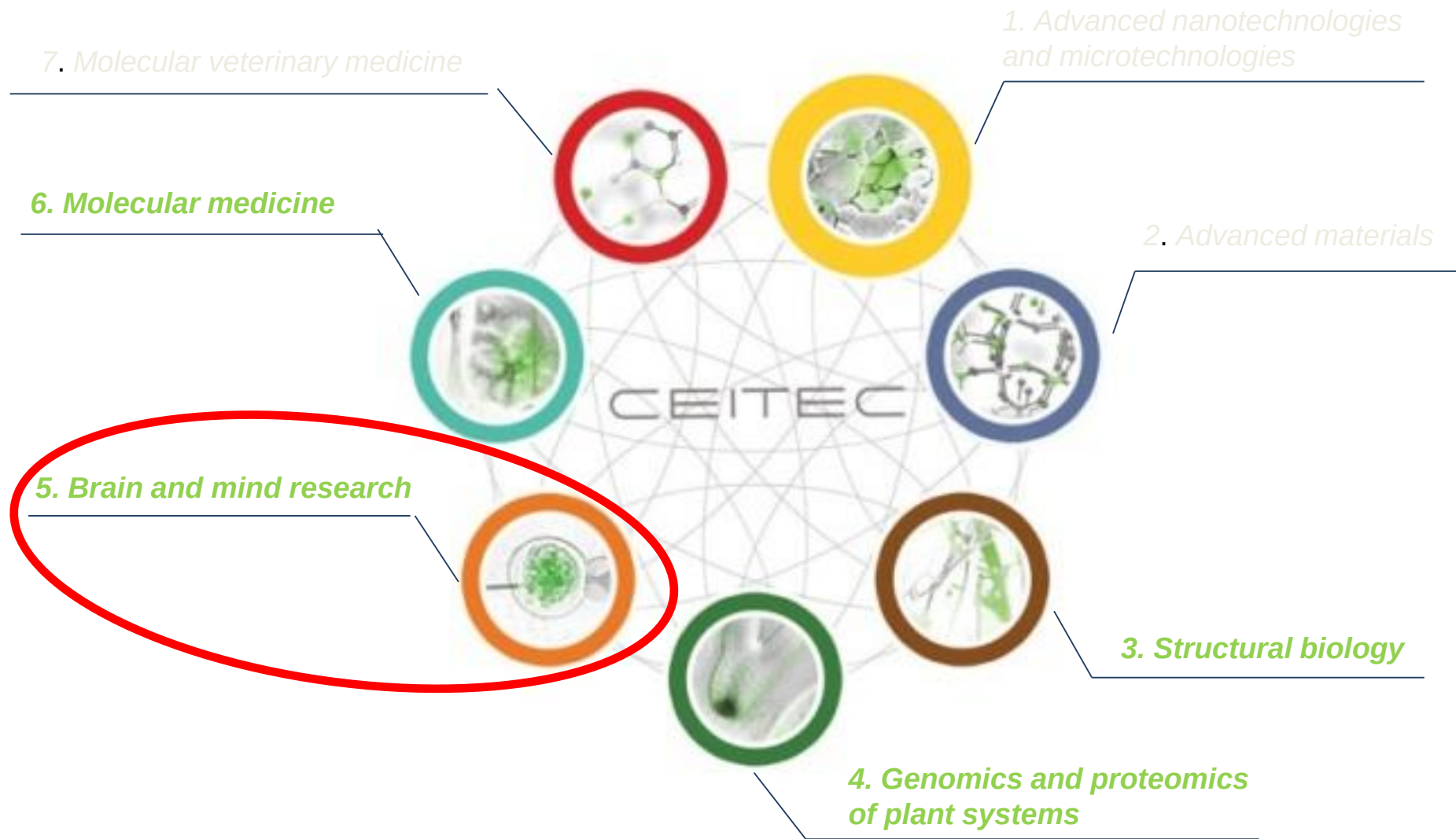


3. Structural biology

4. Genomics and proteomics
of plant systems

CEITEC MU

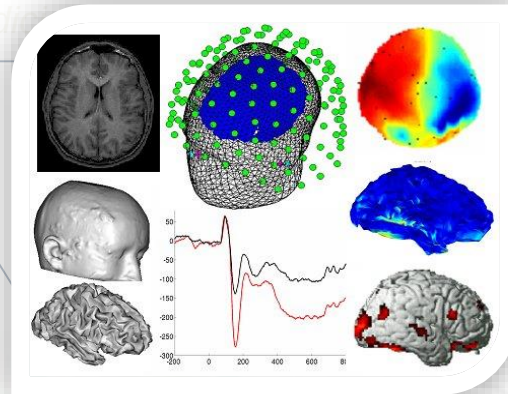
Life Sciences Research Programmes



Brain and Mind Research

names

7. Molecular veterinary medicine



6. Molecular medicine



1. Advanced nanotechnologies and microtechnologies

2. Advanced materials



4. Genomics and proteomics of plant systems

CEITEC MU

Life Sciences Research Programmes

7. *Molecular veterinary medicine*

1. *Advanced nanotechnologies and microtechnologies*

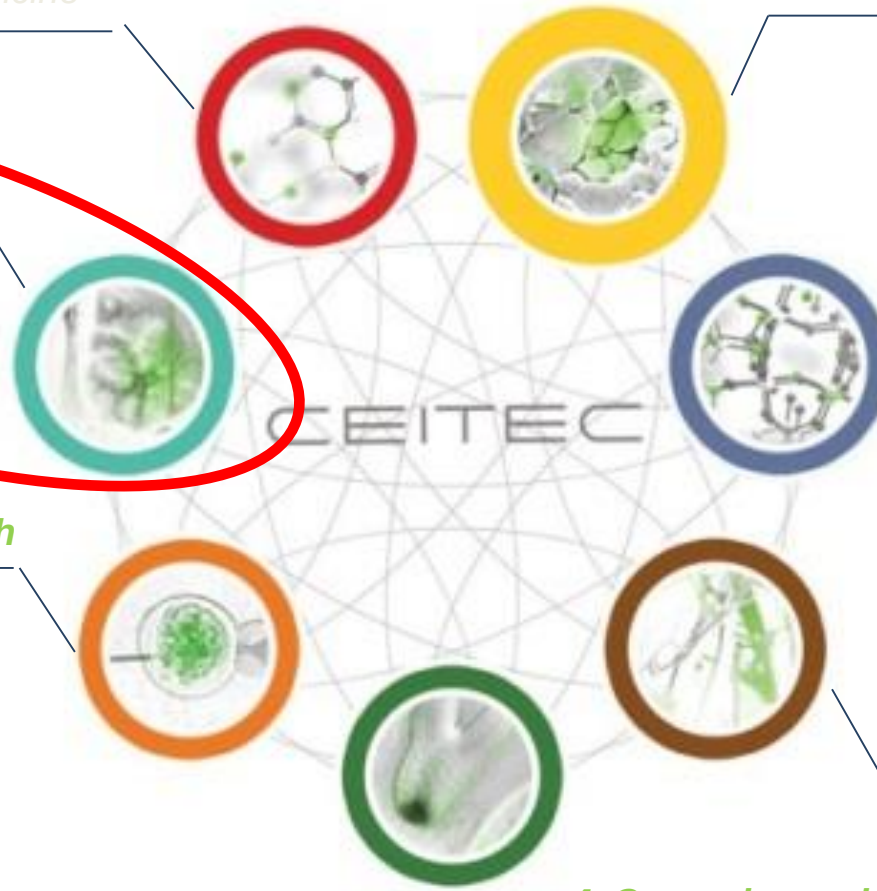
6. *Molecular medicine*

2. *Advanced materials*

5. *Brain and mind research*

3. *Structural biology*

4. *Genomics and proteomics of plant systems*

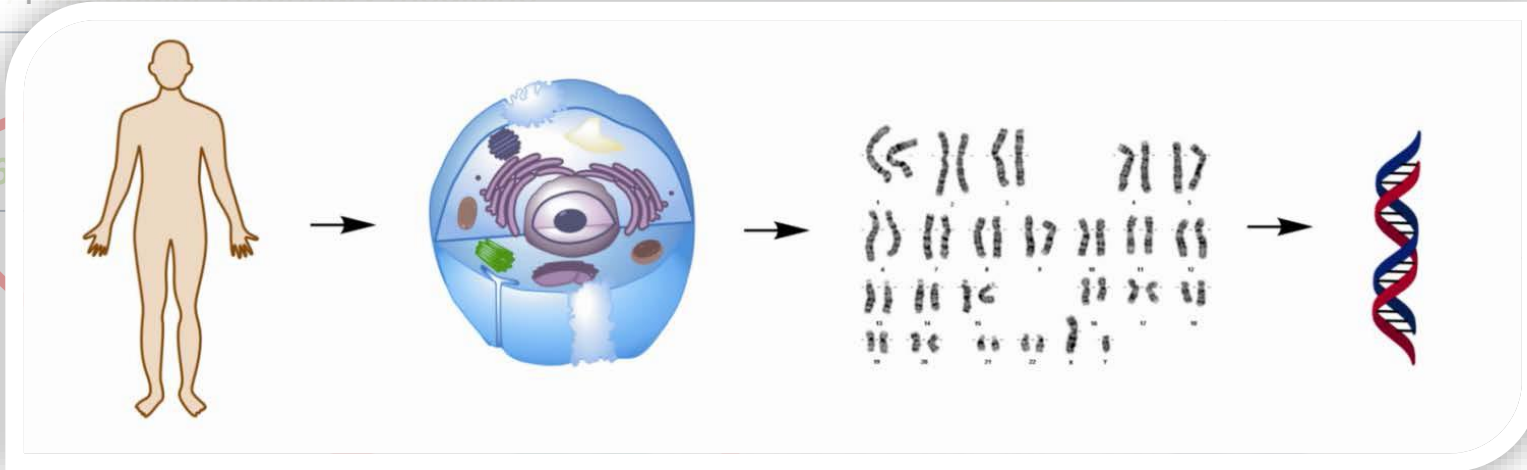


Molecular Medicine

7. Molecular veterinary medicine

1. Advanced nanotechnologies and microtechnologies

Advanced materials



5. Brain and mind research

4. Genomics of plants



<http://www.ceitec.eu>

← <https://www.facebook.com/CEITEC/> Search

f CEITEC

Robert Hlavní stránka Hledat přátele



CEITEC
@CEITEC

Hlavní stránka
Informace



<http://www.facebook.com/CEITEC/>

Komunita
Hodnocení
Příspěvky
Vytvořit stránku

 Napište něco na tuto stránku...

Videa

Ceremonial inauguration of the Josef Dadok National ...



5,0 ★★★★★

Komunita Zobrazit vše

 Vyzvěte přátele, ať se stanou fanoušky stránky

 2 403 lidem se to líbí

 2 388 lidí to sleduje

 Uživatelé Tomasz K. Kabziński a dalším přátelům (8) se toto místo líbí, nebo ho navštívili

Informace Zobrazit vše

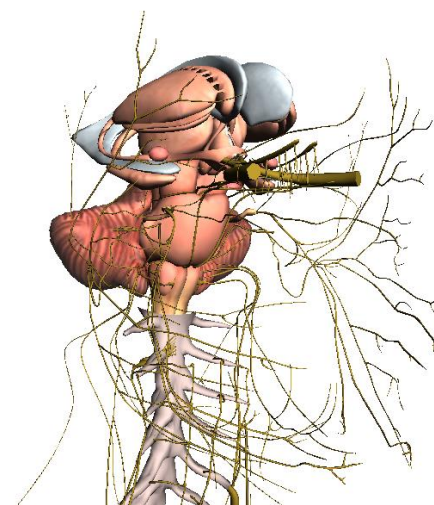
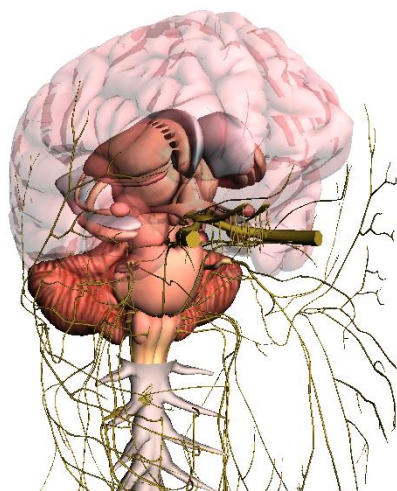
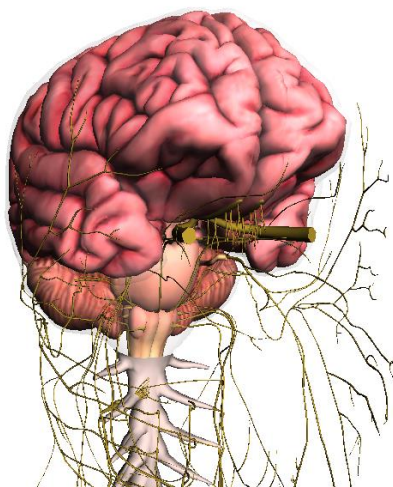
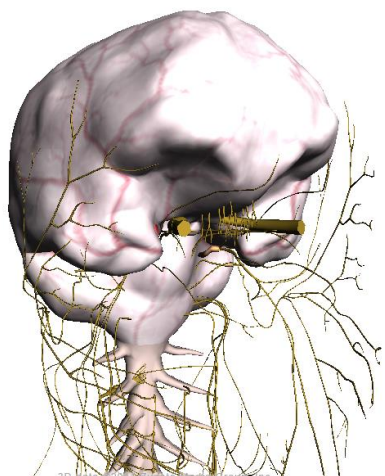
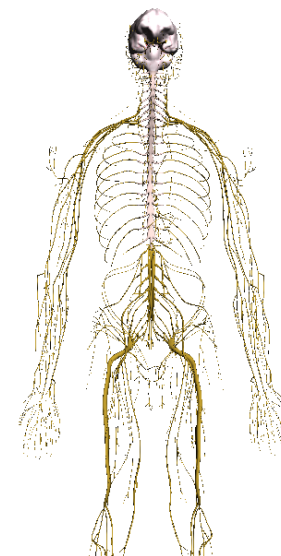
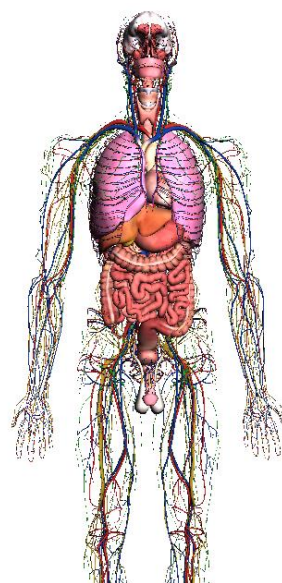
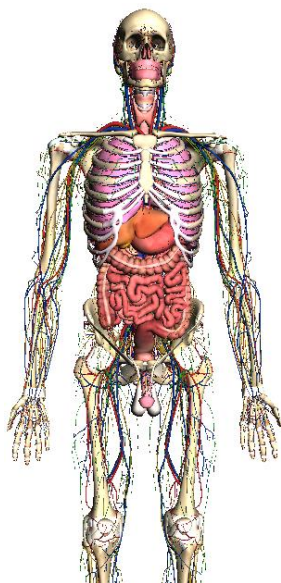
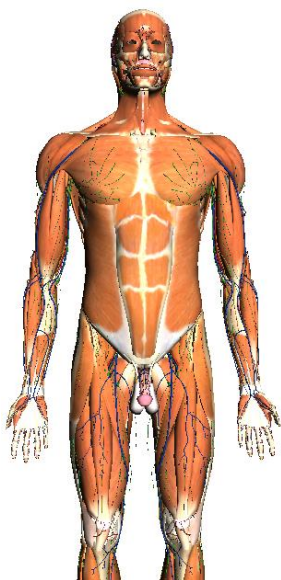
 549 494 461

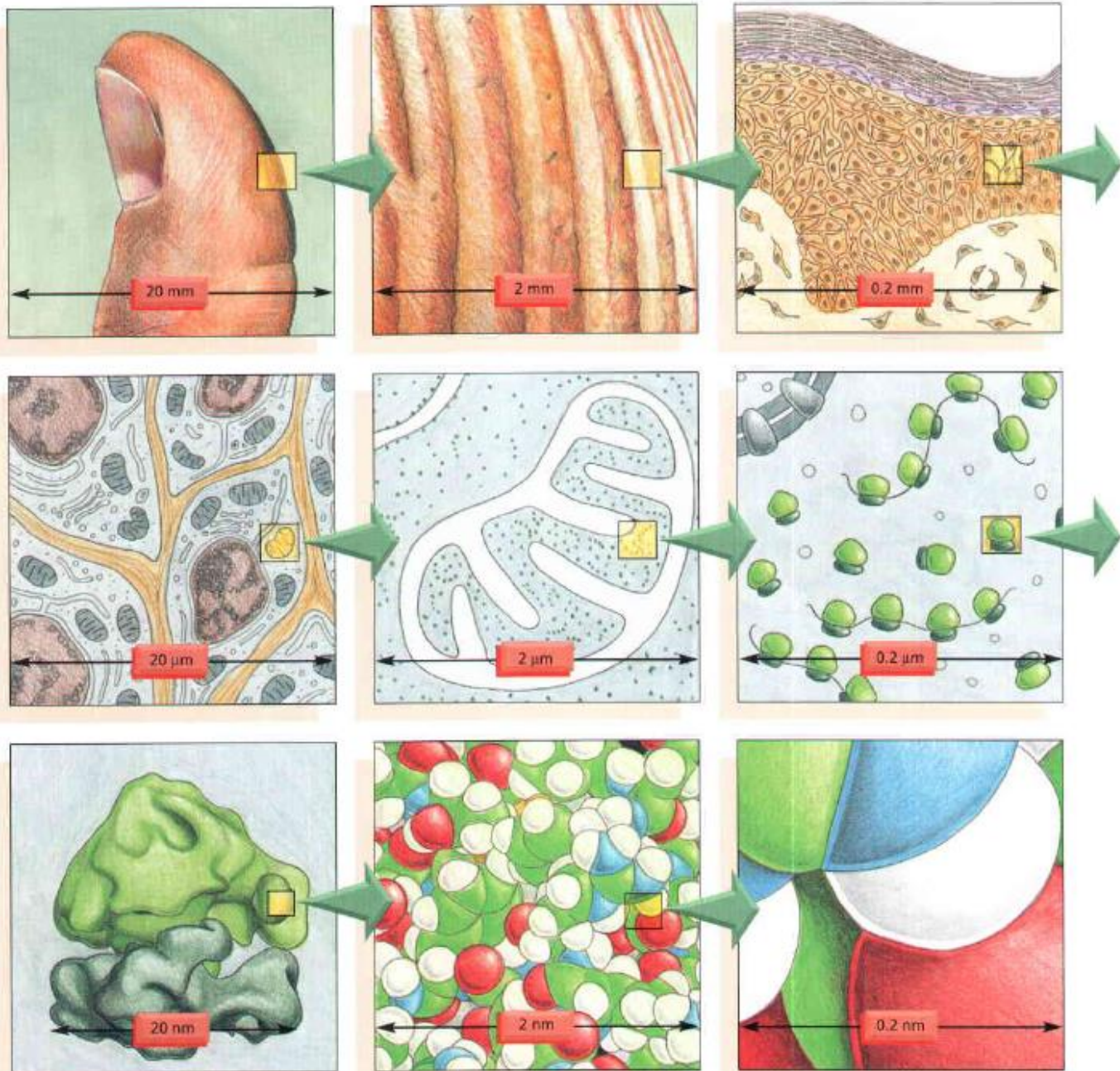
- **Biomolekulární vědy mají klíčový význam pro molekulární medicínu.**
 - Budeme se zabývat zařízeními pro studium struktury, měření koncentrace (*in-vitro* i *in-vivo*), a pro studium vlastností membrán
- Nejběžnější zařízení založená na interakci elektromagnetického záření s makromolekulami
 - VIS, UV a IR spektrofotometry
 - Ramanovy spektrometry
 - Zařízení pro měření cirkulárního dichroismu
 - Zařízení pro rentgenstrukturní analýzu
 - Nukleární magnetickou rezonanci
 - ITC/DSC
 - Fluorescenční techniky
- Zařízení založená na jiných vlastnostech biomolekul (např. mechanických a elektrických)
 - Elektroforéza
 - Langmuir-Blodgettové technika
- Zařízení pro měření membránových potenciálů a koncentrace iontů v buňkách

Biofyzika a biomolekulární výzkum

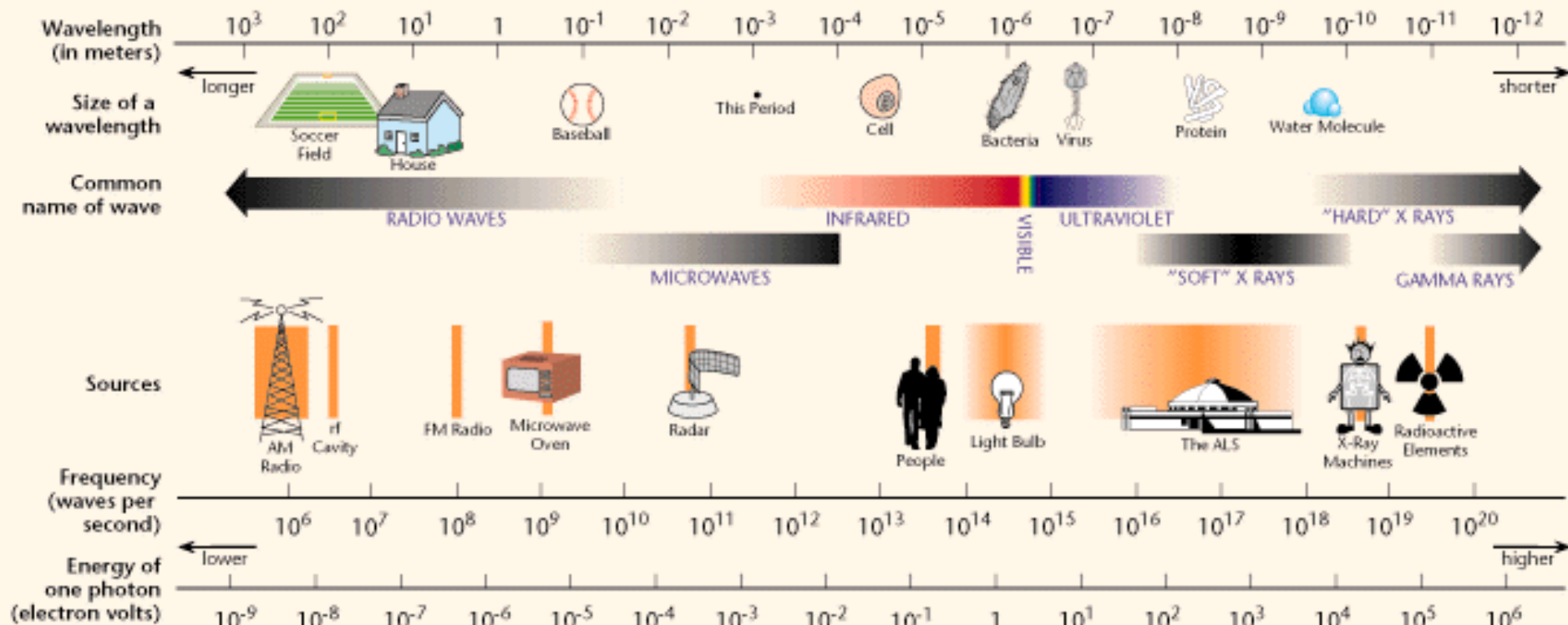
Tento výzkum je orientován zejména na strukturální studie, které umožňují porozumět např.:

- Specifičnosti enzymatických a imunologických reakcí
- Účinkům některých léků (např. cytostatik) na molekulární úrovni.
- Mechanismům pasivního i aktivního transportu
- Buněčnému pohybu
-





THE ELECTROMAGNETIC SPECTRUM

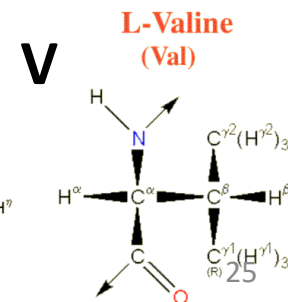
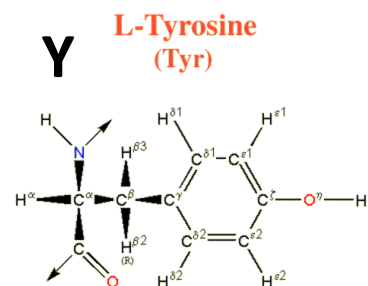
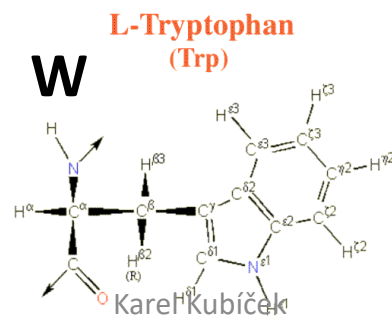
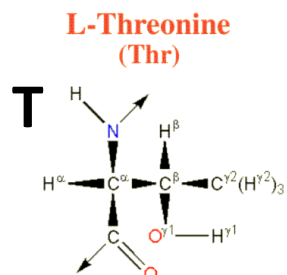
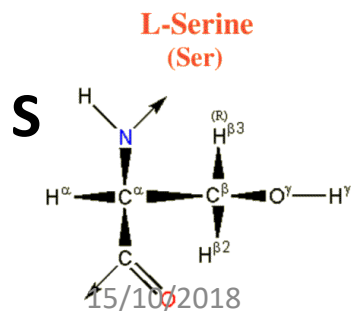
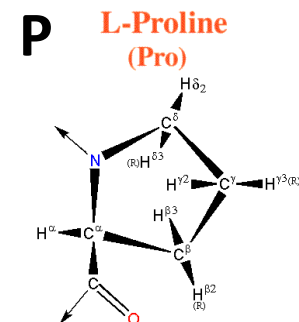
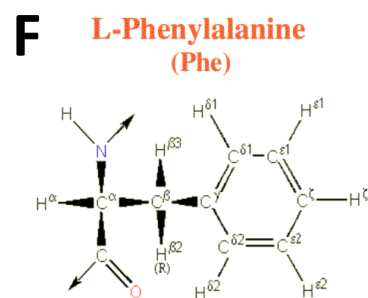
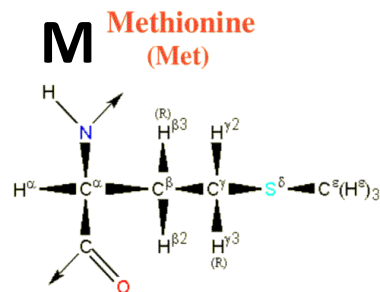
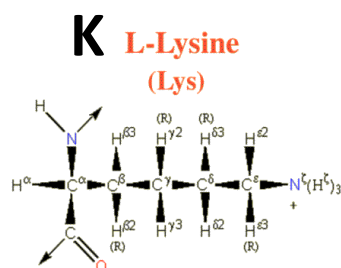
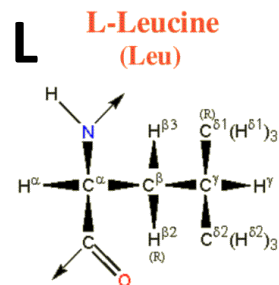
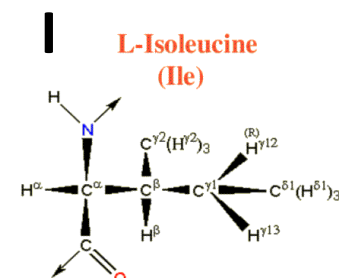
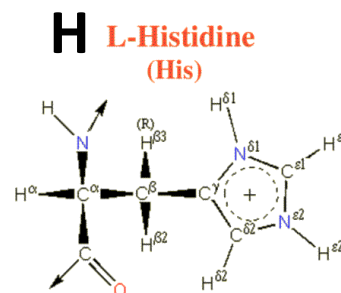
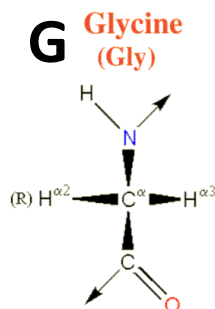
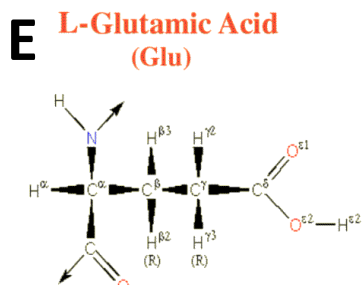
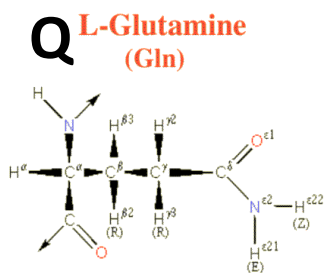
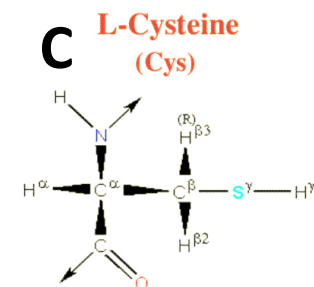
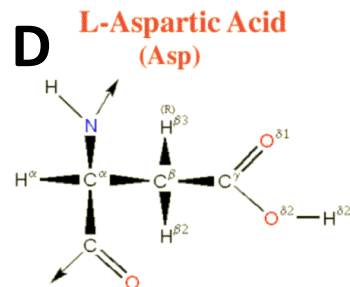
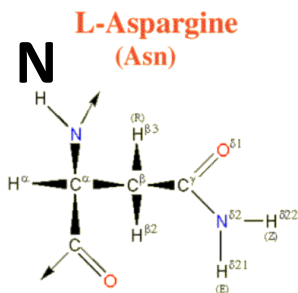
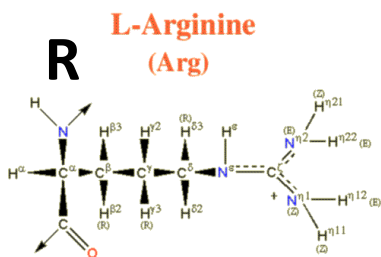
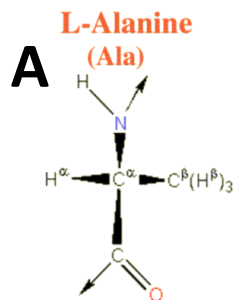


Composition of the Earth's Crust, Seawater, and the Human Body*

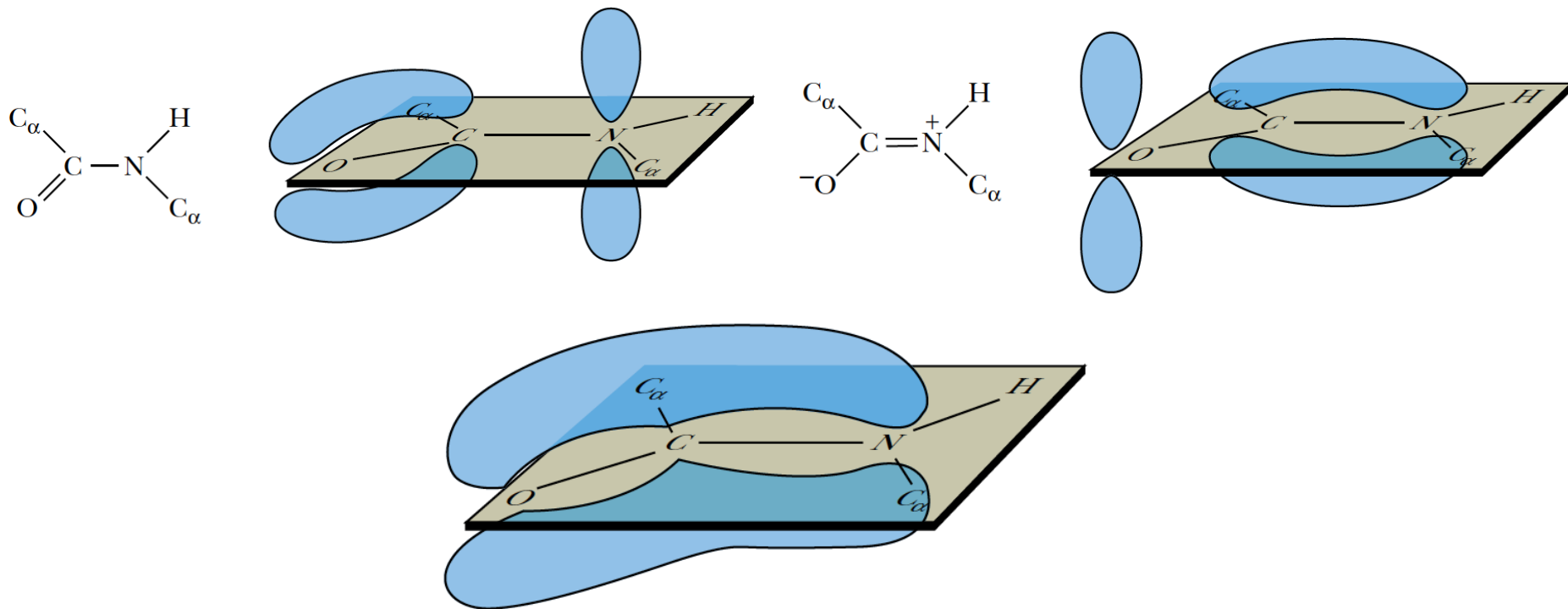
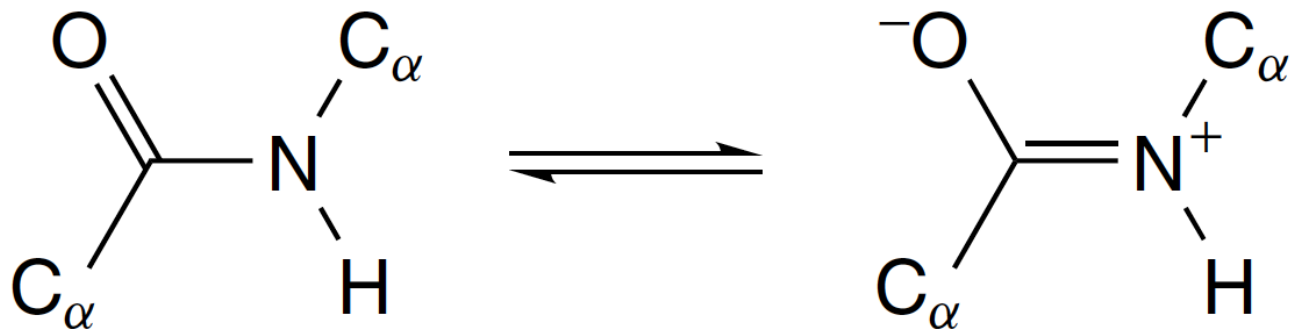
Earth's Crust		Seawater		Human Body [†]	
Element	%	Compound	mM	Element	%
O	47	Cl ⁻	548	H	63
Si	28	Na ⁺	470	O	25.5
Al	7.9	Mg ²⁺	54	C	9.5
Fe	4.5	SO ₄ ²⁻	28	N	1.4
Ca	3.5	Ca ²⁺	10	Ca	0.31
Na	2.5	K ⁺	10	P	0.22
K	2.5	HCO ₃ ⁻	2.3	Cl	0.08
Mg	2.2	NO ₃ ⁻	0.01	K	0.06
Ti	0.46	HPO ₄ ²⁻	<0.001	S	0.05
H	0.22			Na	0.03
C	0.19			Mg	0.01

*Figures for the earth's crust and the human body are presented as percentages of the total number of atoms; seawater data are millimoles per liter. Figures for the earth's crust do *not* include water, whereas figures for the human body do.

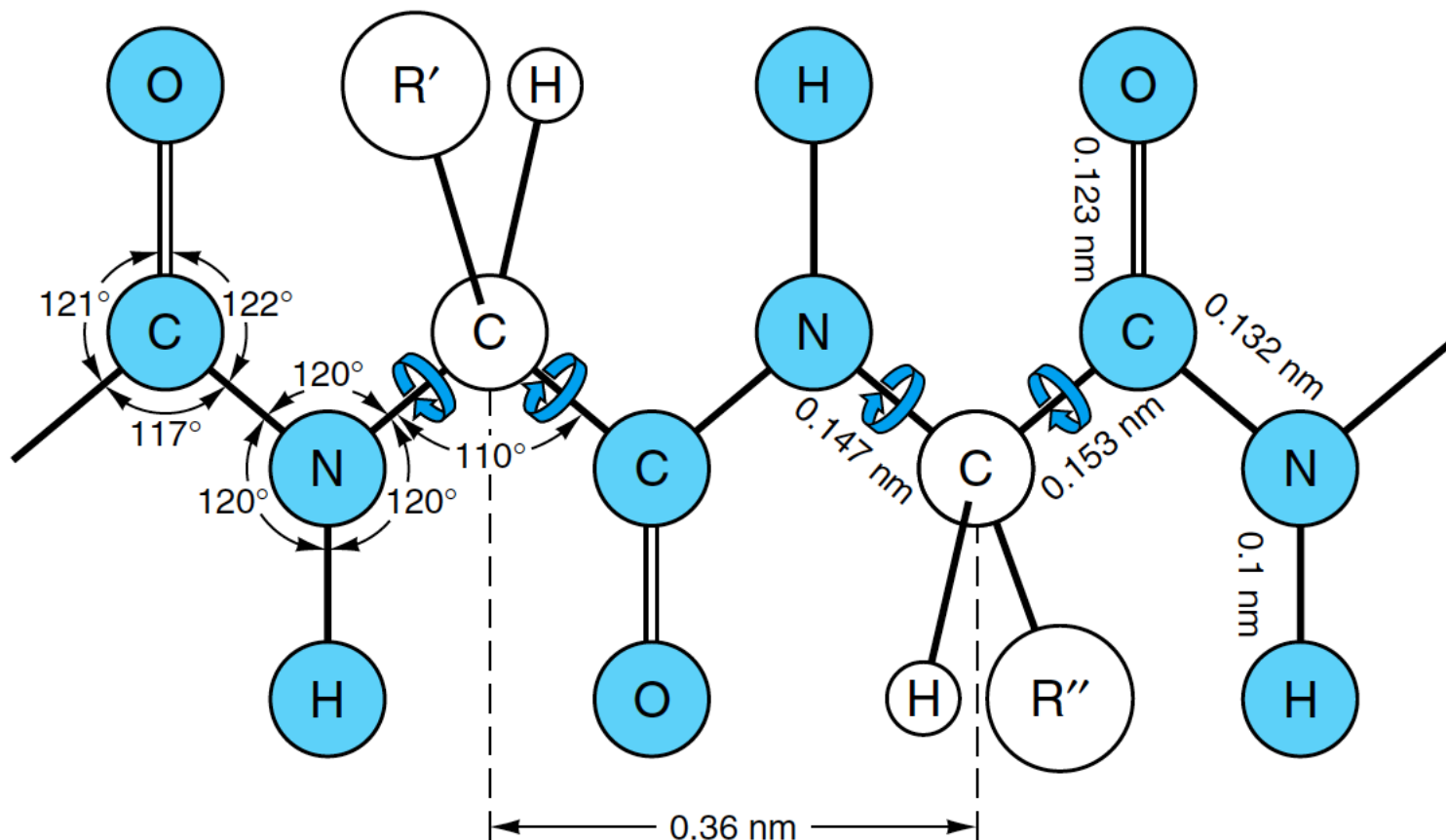
[†]Trace elements found in the human body serving essential biological functions include Mn, Fe, Co, Cu, Zn, Mo, I, Ni, and Se.

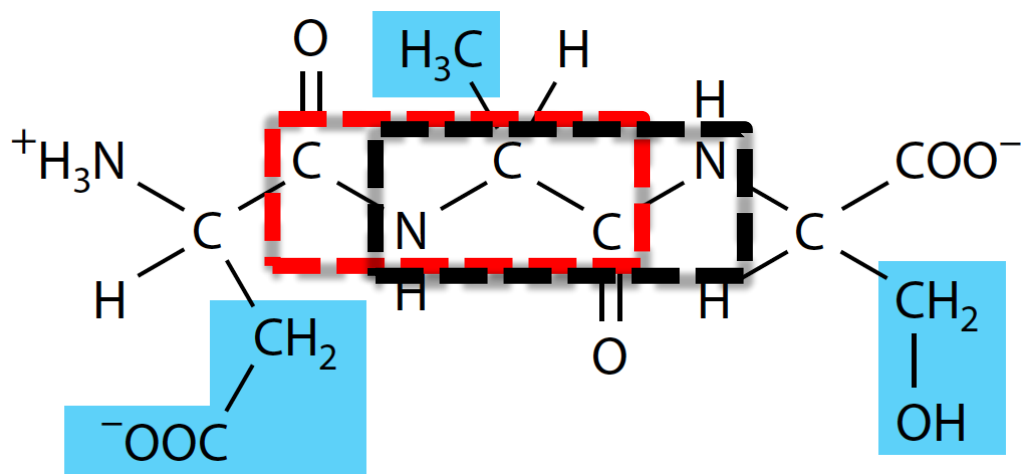
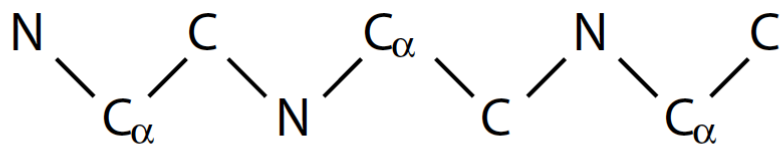


IV] Peptidová vazba – pseudo dvojitá vazba => amidová rovina

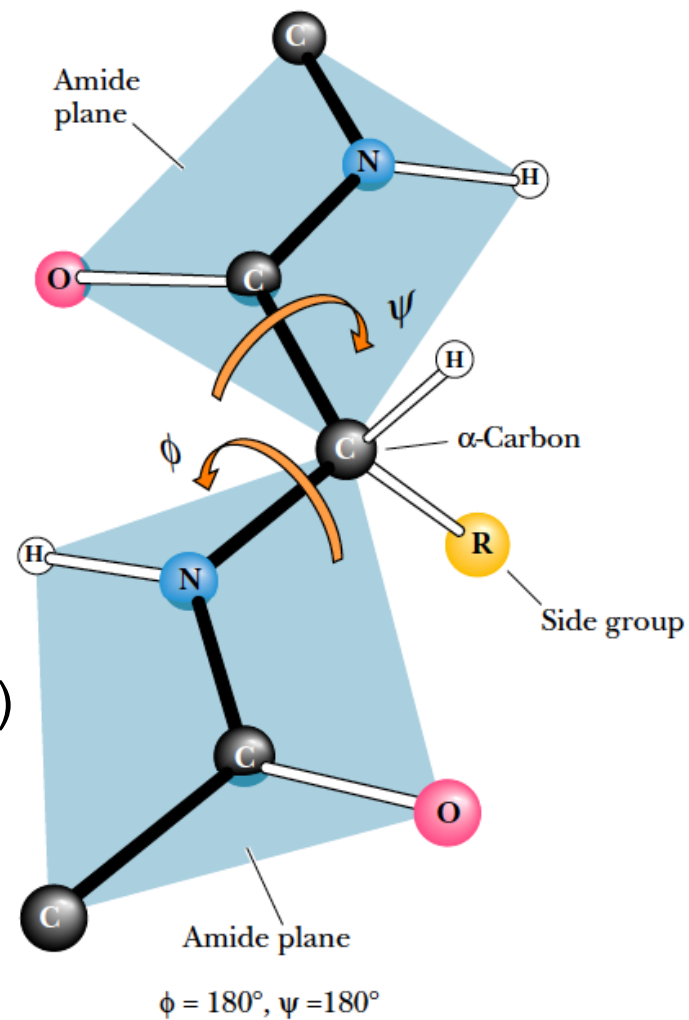


Proteinová páteř, primární struktura, číslování od **N**-konce (terminu) směrem k **C**-konci





ϕ – **CO, N, C_α , CO** (CO někdy značeno C')
 ψ – **N, C_α , CO, N**

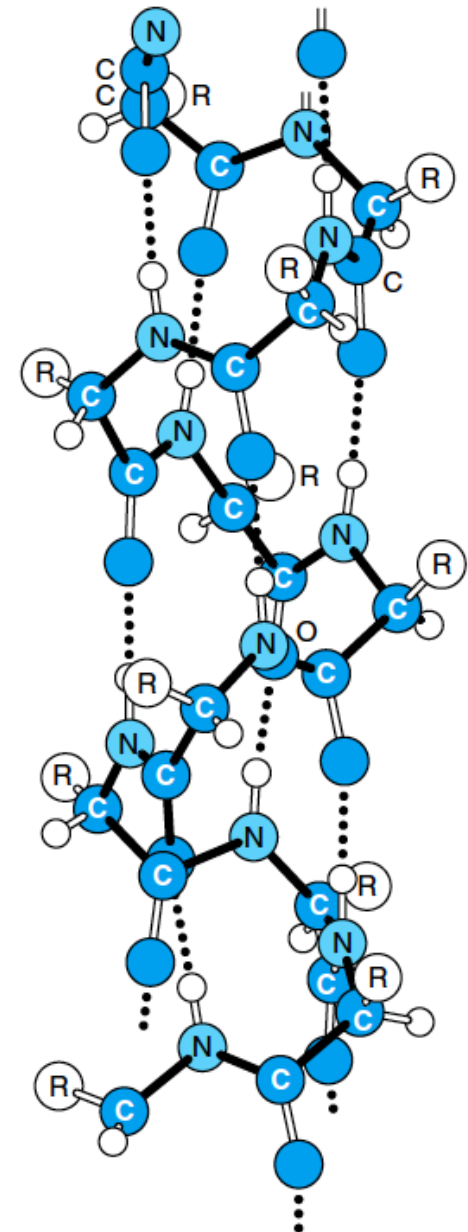
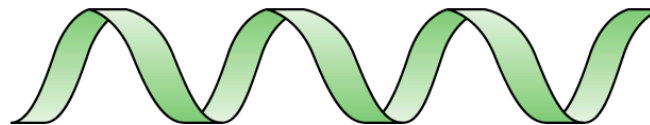
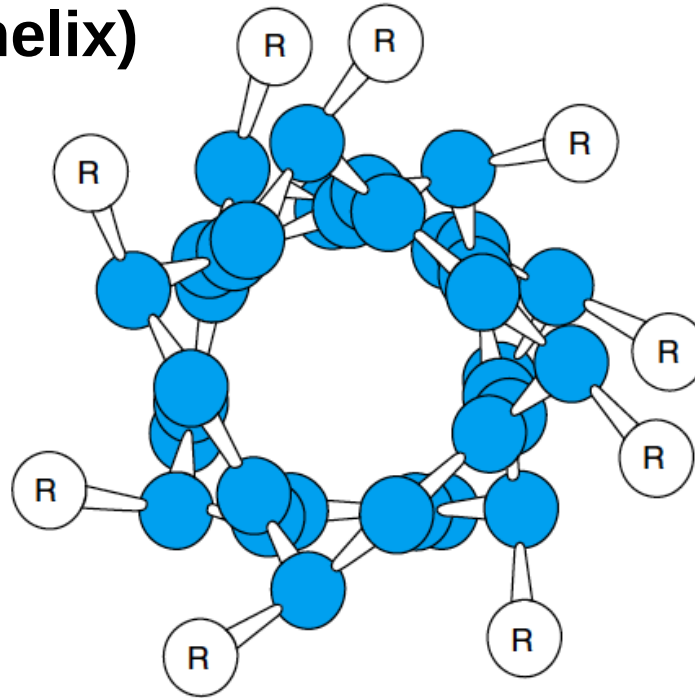
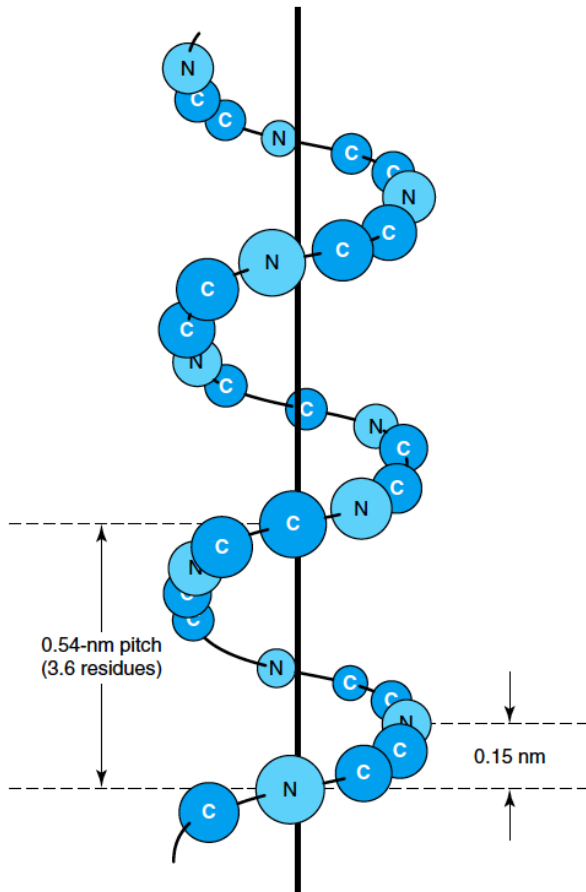


VII] Sekundární struktura

1) α -šroubovice (α -helix)

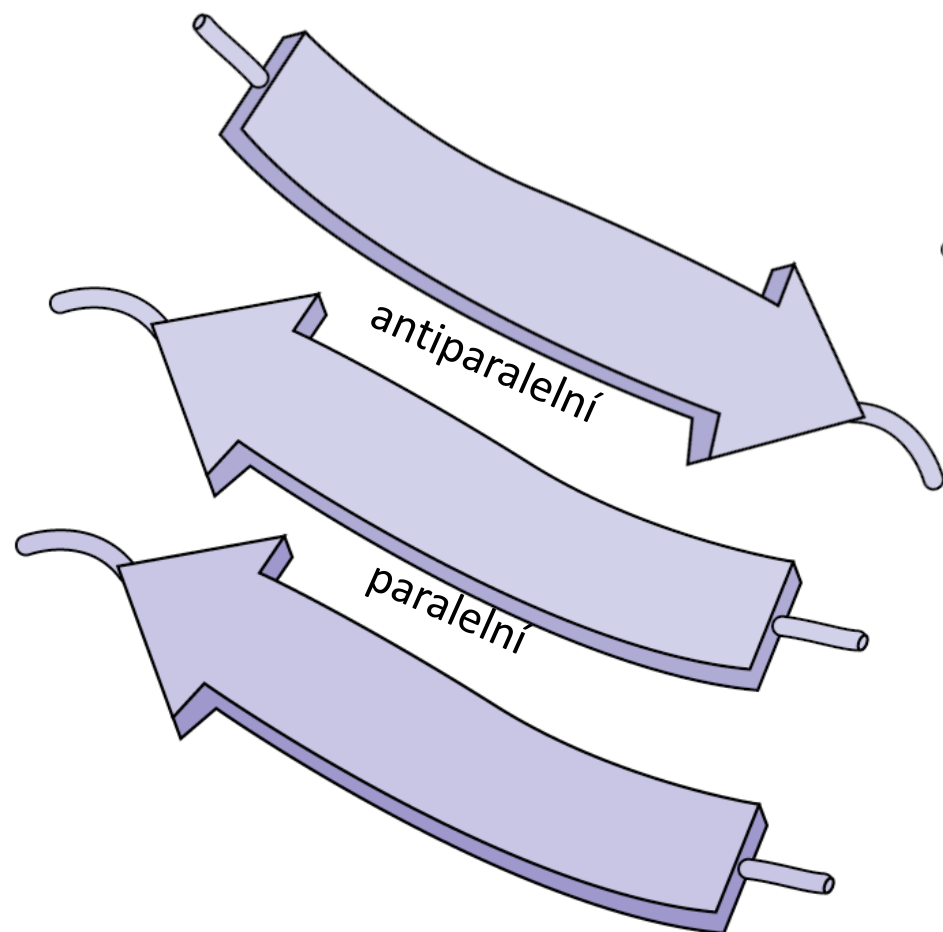
2) β -skládaný list (β -sheet)

3) Ohyb, smyčka (loop/turn)

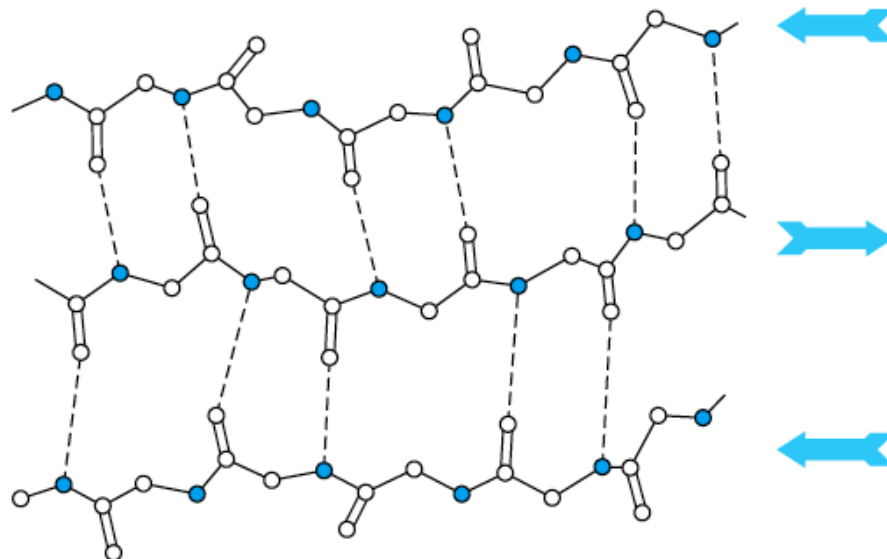


VII] Sekundární struktura

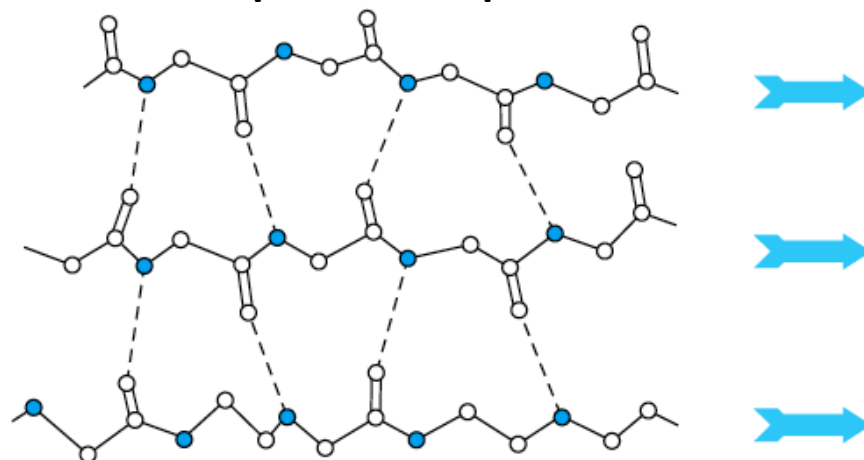
- 1) α -šroubovice (α -helix)
- 2) β -skládaný list (β -sheet)
- 3) Ohyb, smyčka (loop/turn)



antiparalelní uspořádání



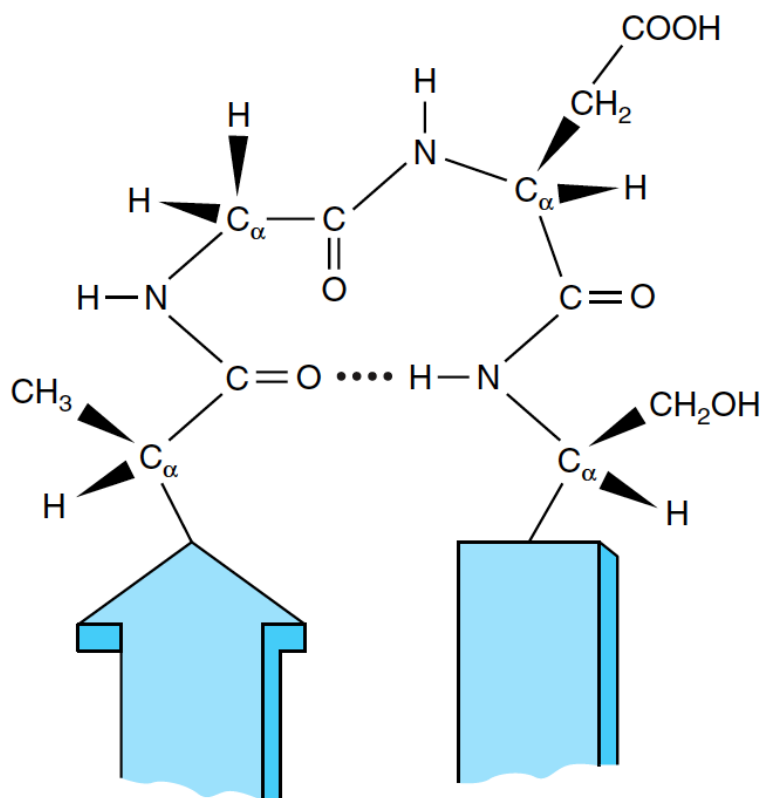
paralelní uspořádání



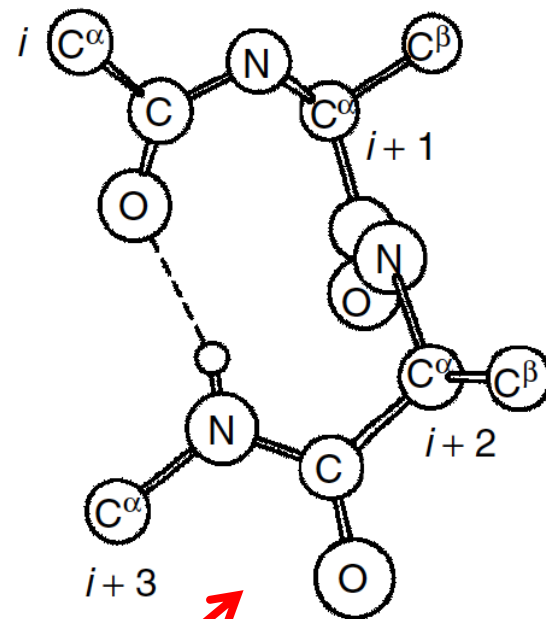
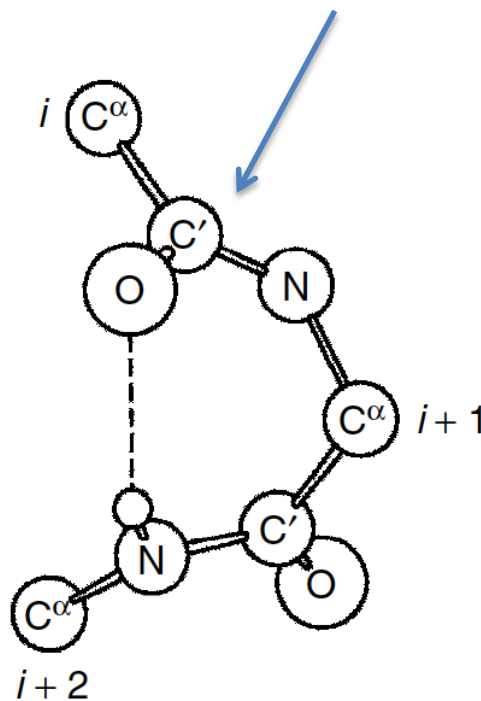
VII] Sekundární struktura

- 1) α -šroubovice (α -helix)
- 2) β -skládaný list (β -sheet)

3) Ohyb, smyčka (loop/turn)

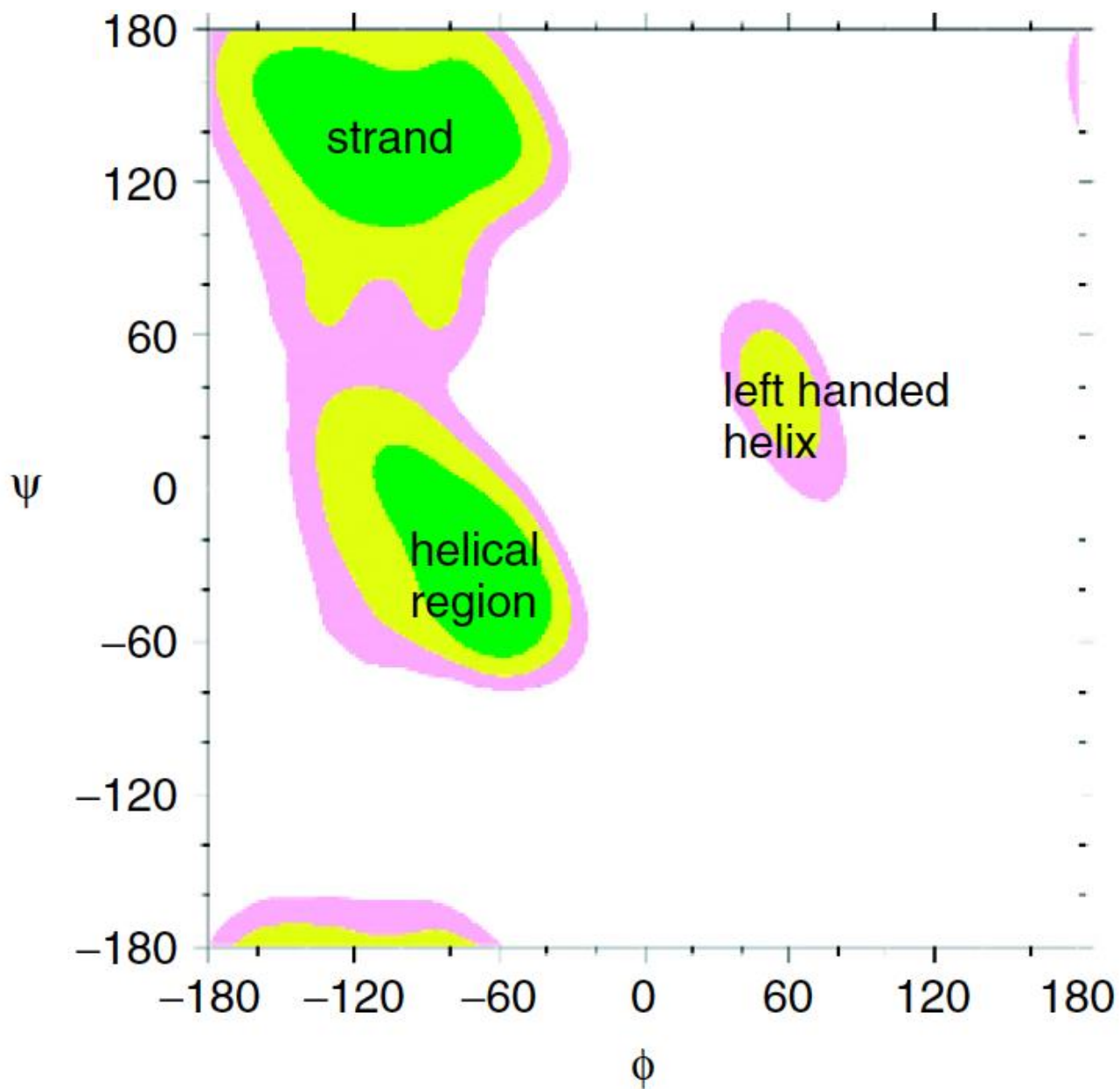


γ -smyčka/ohyb (3 residua)



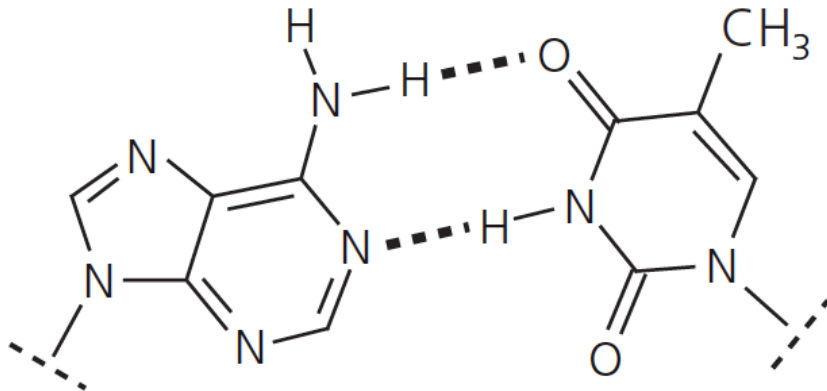
β -smyčka/ohyb (4 residua)

Ramachandranův diagram

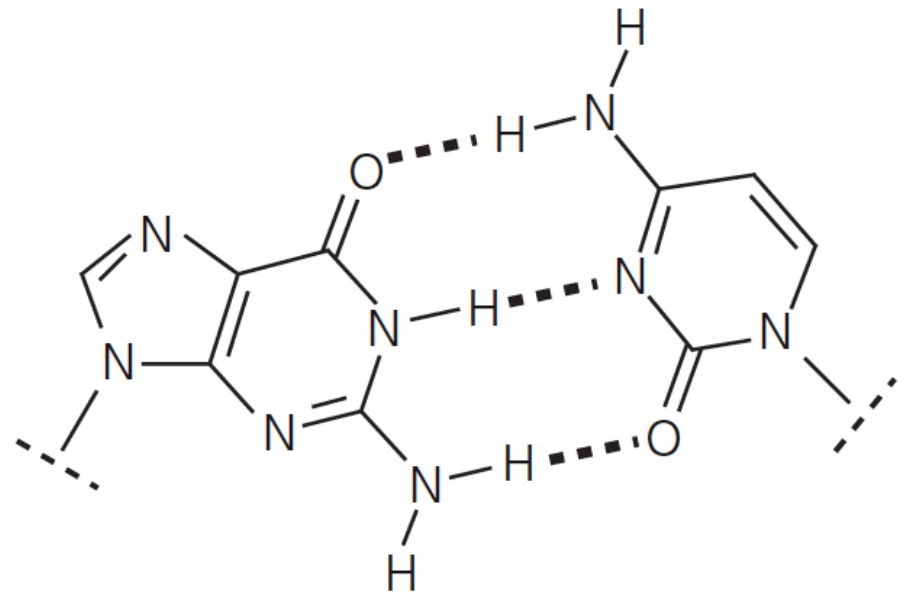


Nukleové kyseliny

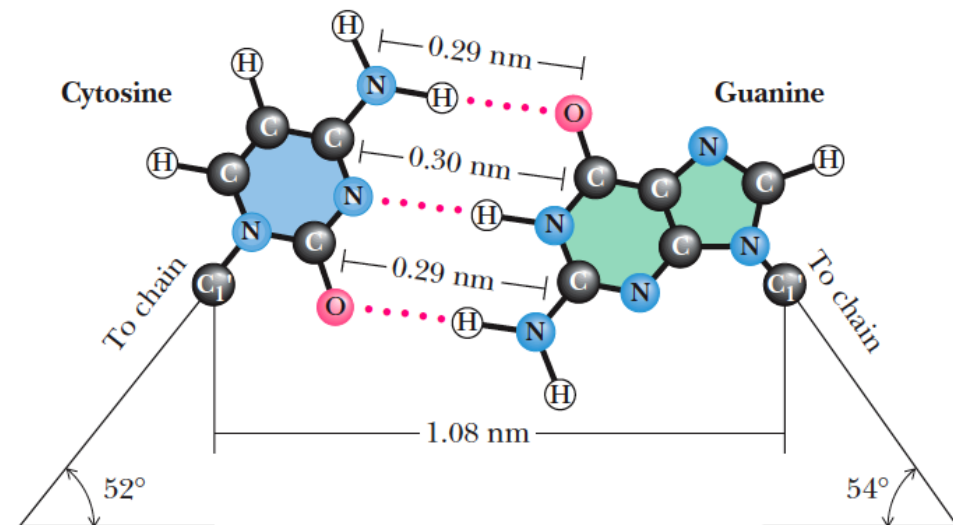
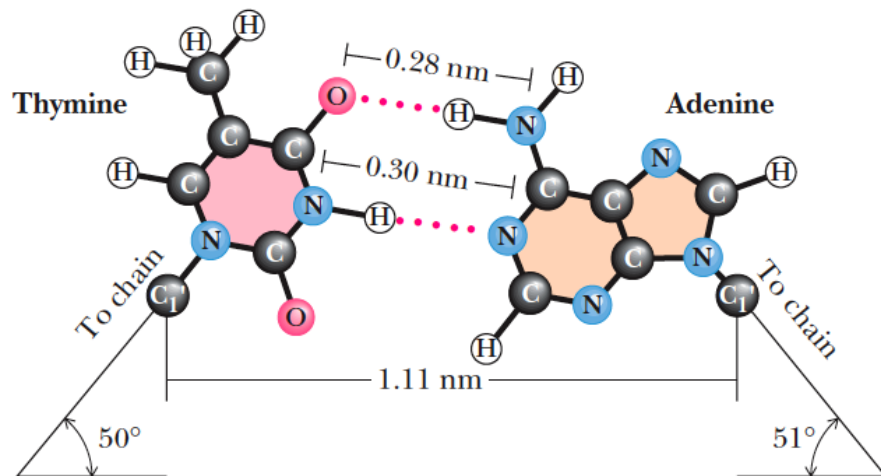
Watson-Crickovské párování bazí

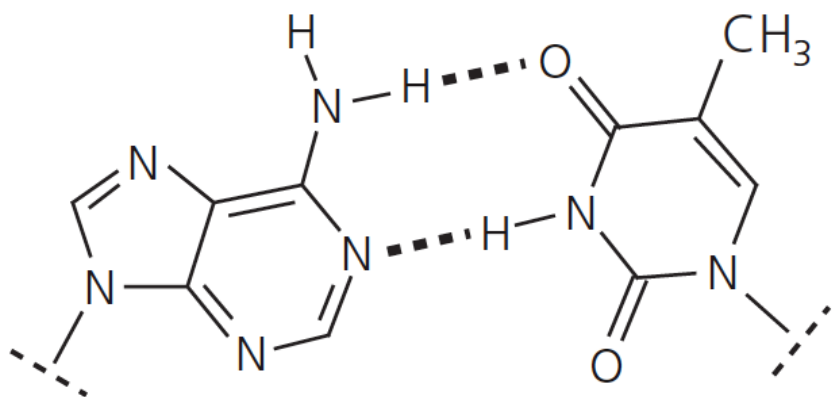


adenine : thymine

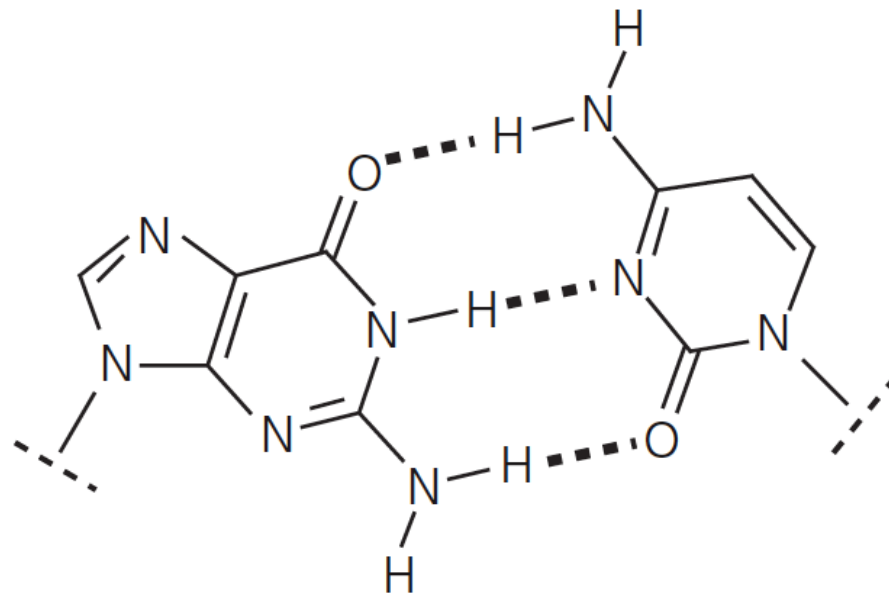


guanine : cytosine

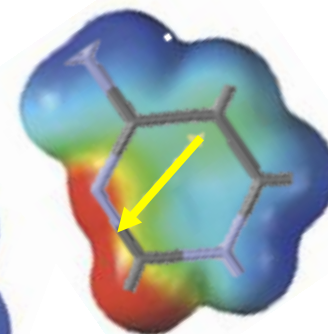
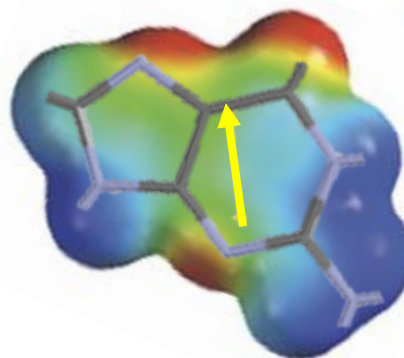
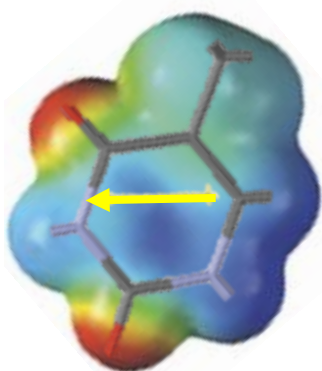
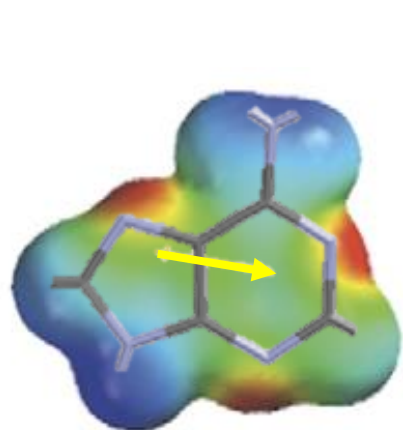




adenine : thymine

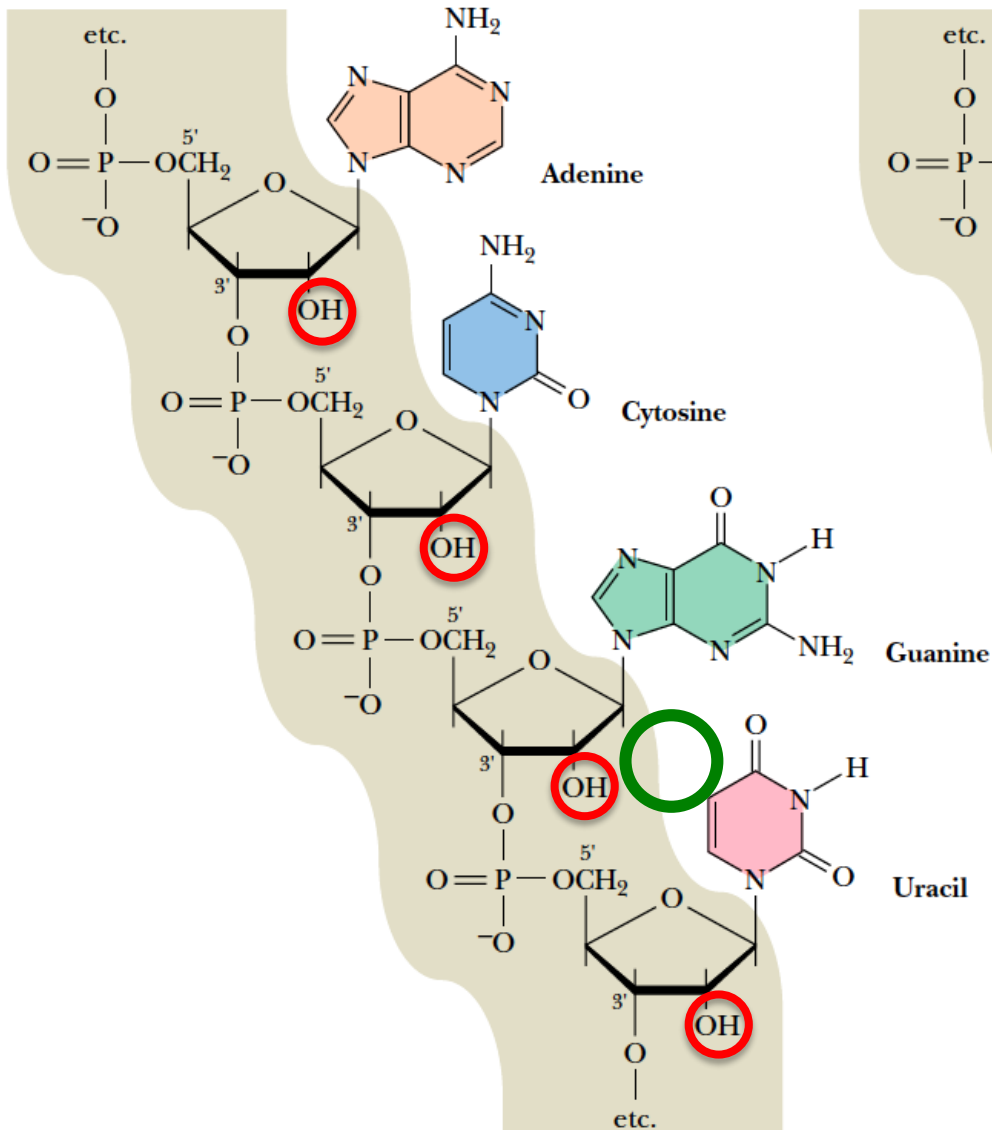


guanane : cytosine

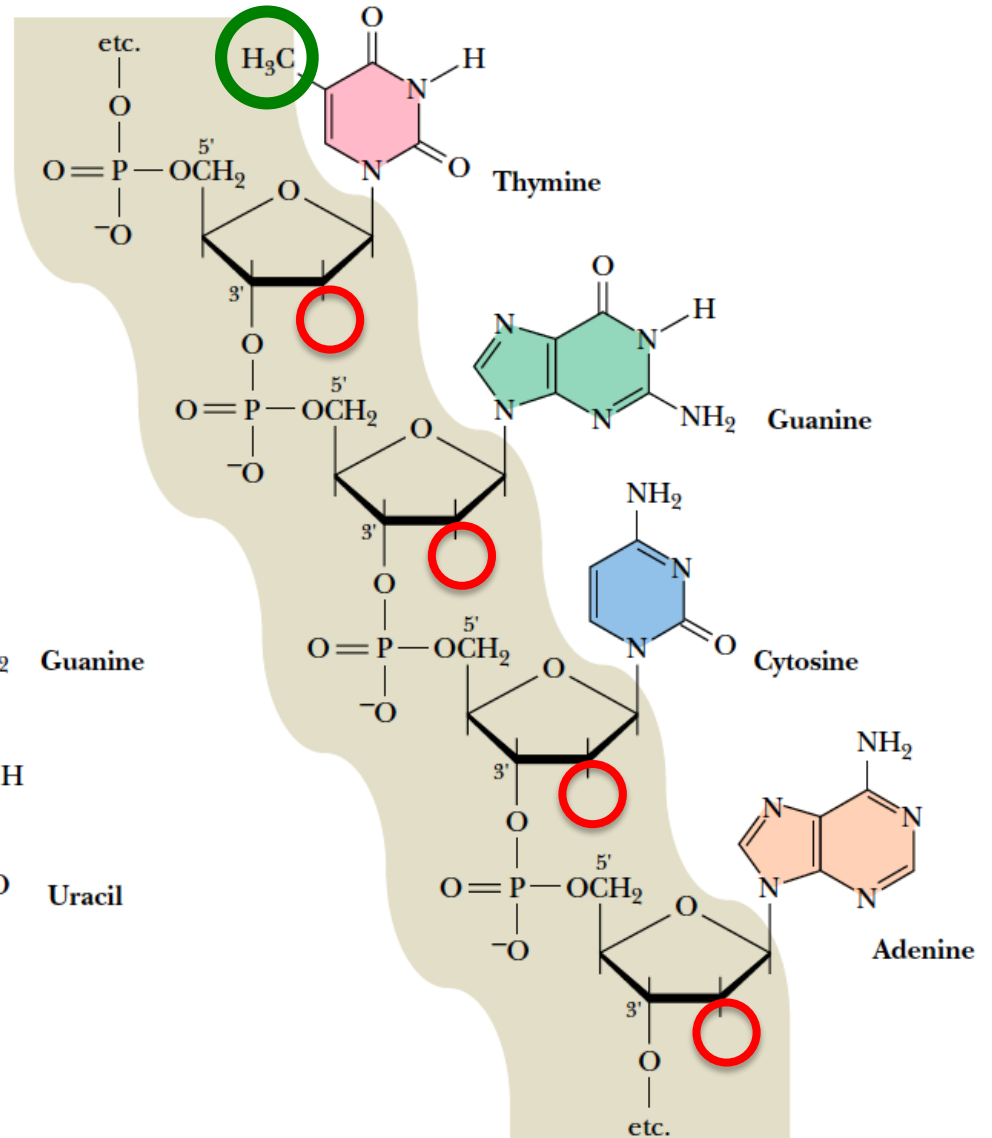


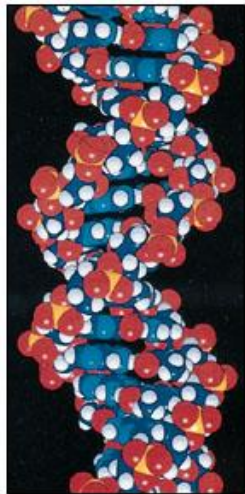
rozložení náboje v nukleobázích + 0 -, šipky označují dipólový moment

RNA



DNA



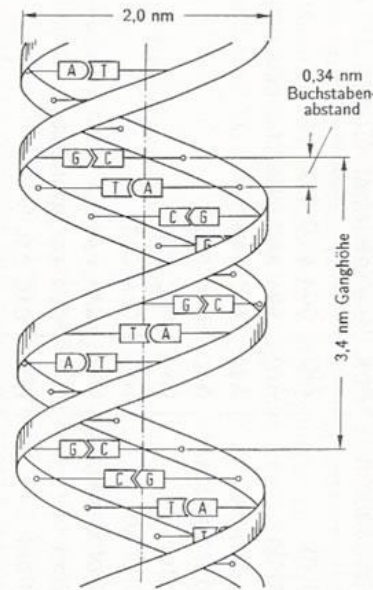
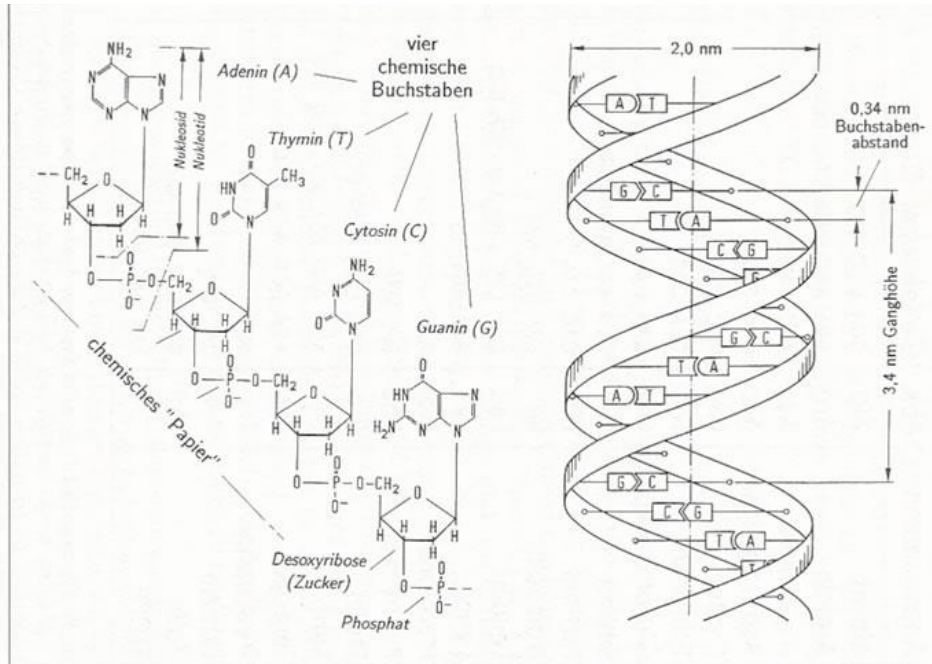
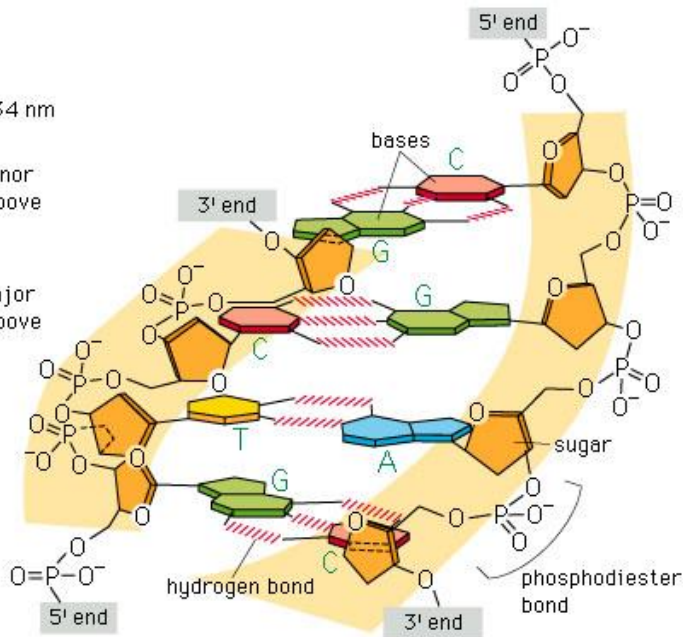


2 nm

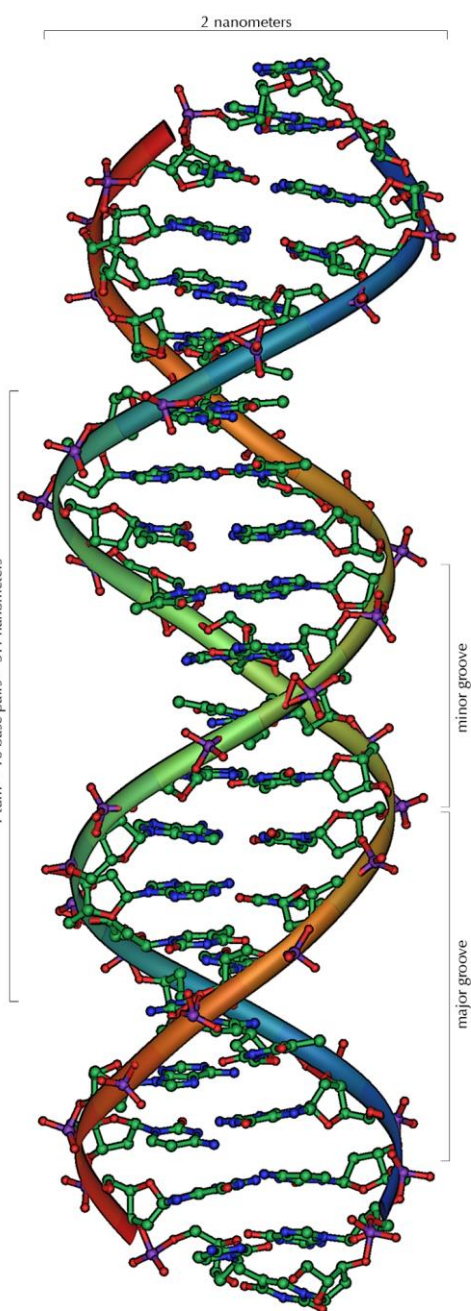
0.34 nm

minor groove

major groove

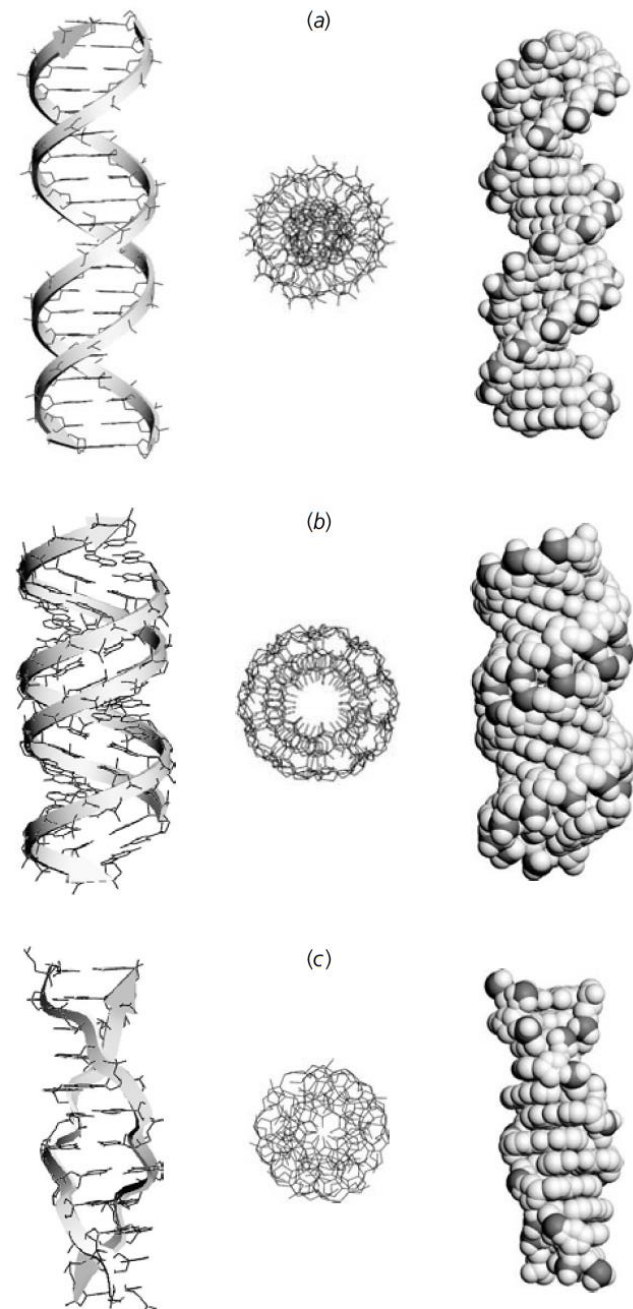


1 turn = 10 base pairs = 3.4 nanometers



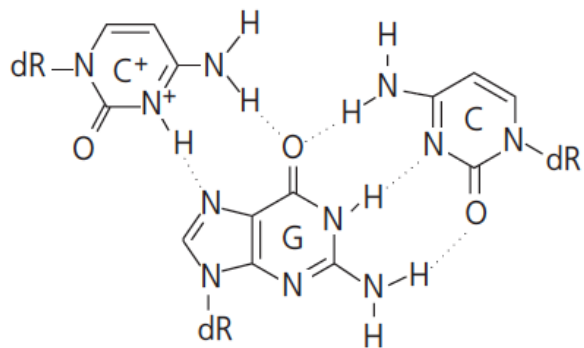
Nejběžnější typy DNA: **B**-DNA (a), **A**-DNA (b), **Z**-DNA (c)

DNA konformace	B	A	Z
Směr vinutí	pravotočivá	pravotočivá	levotočivá
Počet parů bazí na otáčku	10.5	11.0	12.0
Průměr šroubovice	~2.0 nm	~2.6 nm	~1.8 nm
Konformace cukru	C2'- <i>endo</i>	C3'- <i>endo</i>	C2'- <i>endo</i> (pyr) C3'- <i>endo</i> (pur)
Velký žlábek <i>Major groove</i>	široký, hluboký	úzký, hluboký	plochý
Malý žlábek <i>Minor groove</i>	úzký, hluboký	široký, mělký	úzký, hluboký

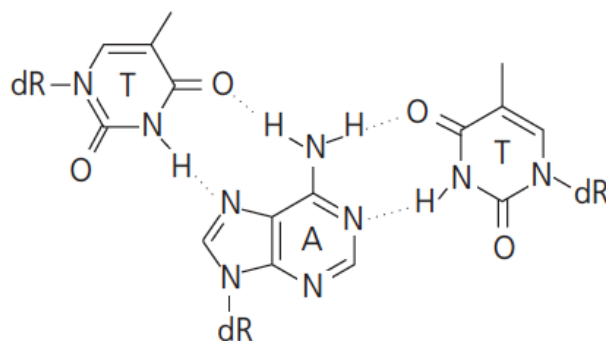


Non-Watson-Crickové (Hoogsteenovo – Karsten Hoogsteen) párování bází

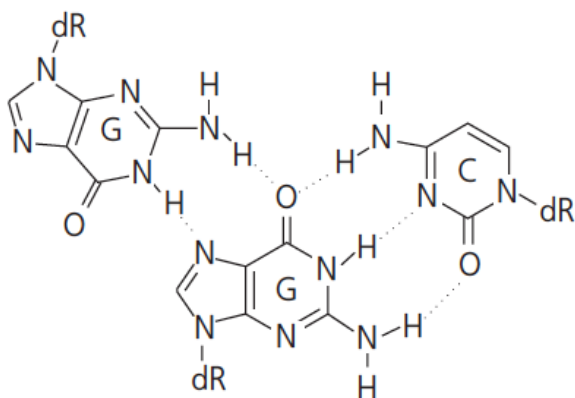
Triplexové struktury



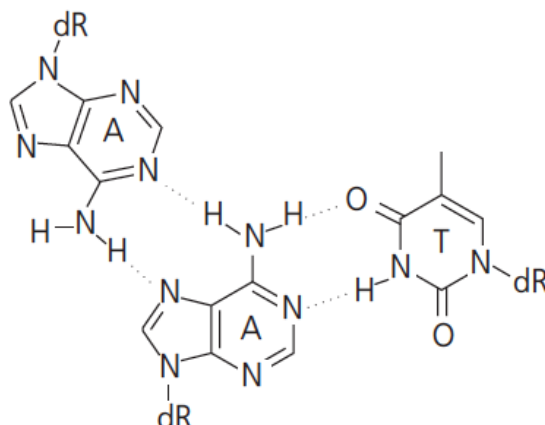
C⁺·GC



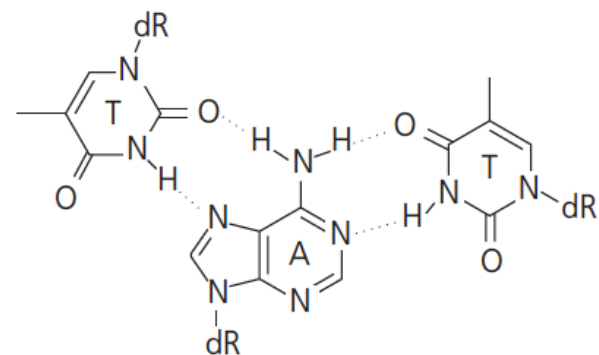
T·AT



G·GC

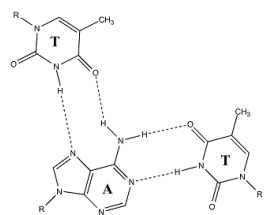


A·AT

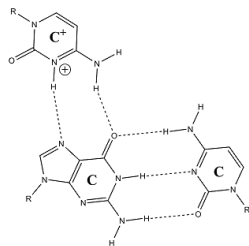


T·AT

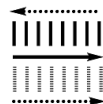
Triplexové struktury



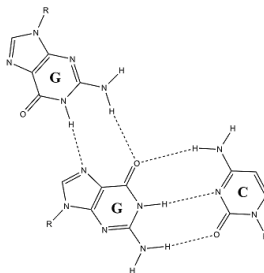
TA*T



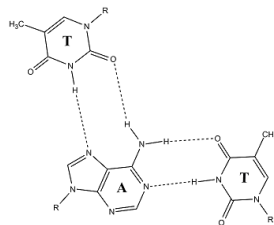
CG*C+



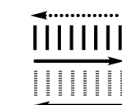
YR*Y



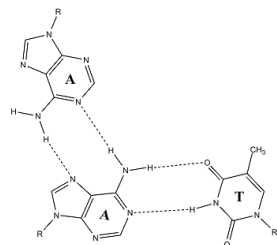
CG*G



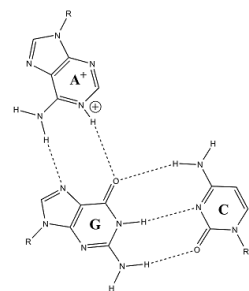
TA*A



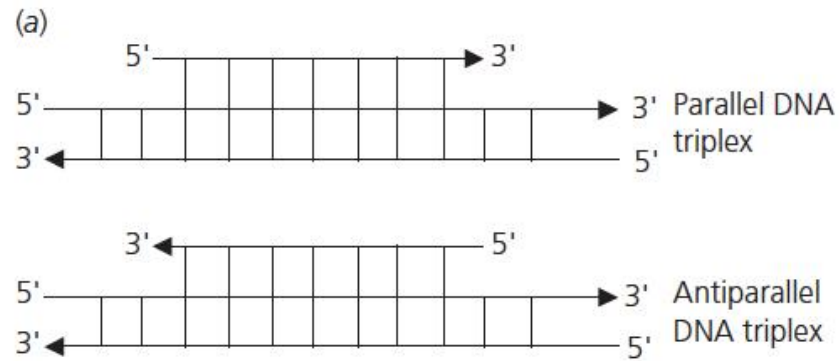
YR*R



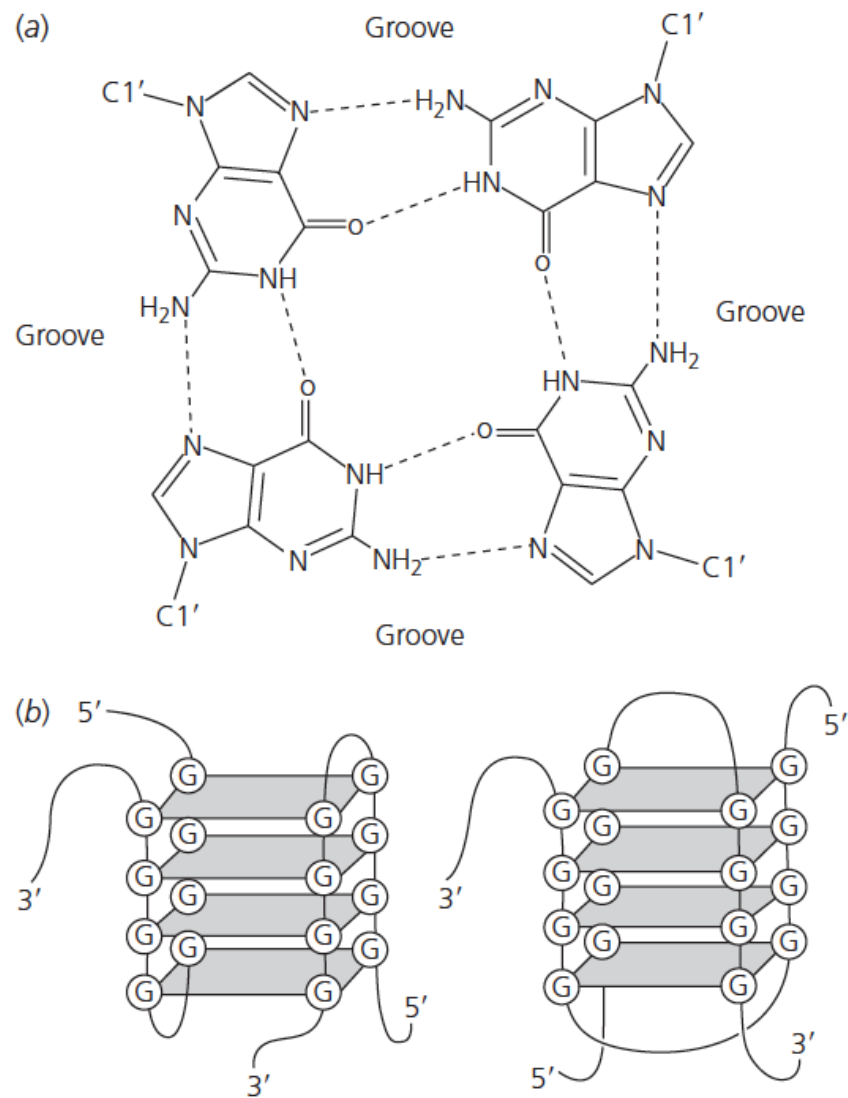
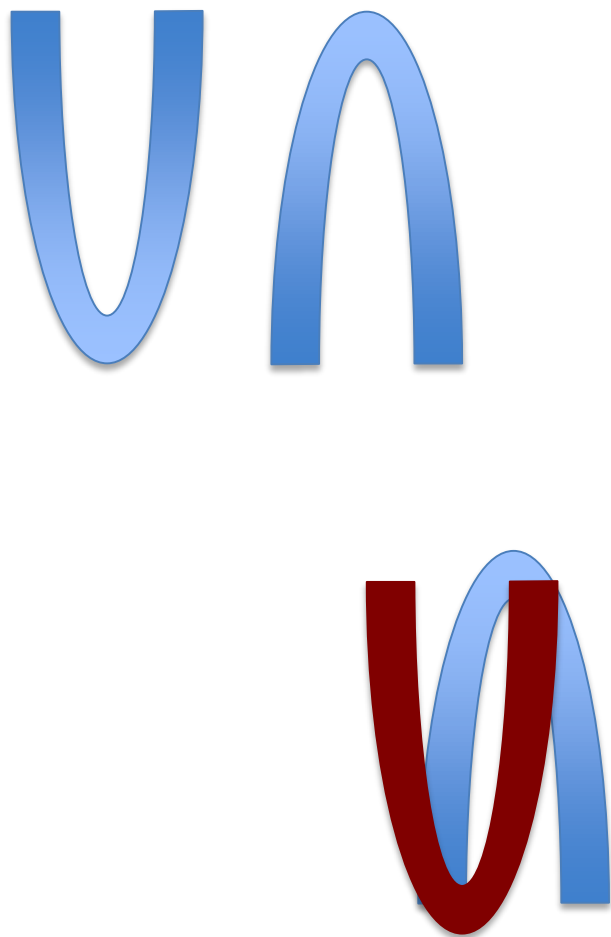
TA*T



CG*A+



Quadruplexové struktury



Confidence in structural features of proteins determined by X-ray crystallography

(estimates are very rough and strongly depend on the quality of the data)

Structural feature			Resolution		
	5 Å	3 Å	2.5 Å	2 Å	1.5 Å
Chain tracing	-	Fair	Good	Good	Good
Secondary structure	Helices fair	Fair	Good	Good	Good
Sidechain conformations	-	-	Fair	Good	Good
Orientation of peptide planes	-	-	Fair	Good	Good
Protein hydrogen atoms visible	-	-	-	-	Good

Zařízení založená na interakci elektromagnetického záření s makromolekulami

Druhy spektrofotometrů

- **Spektrofotometry** jsou laboratorní přístroje používané pro měření koncentrace látek absorbujících nebo emitujících infračervené, viditelné nebo ultrafialové světlo. Mohou být též použity pro studium jejich chemické struktury.
- **Absorpční spektrofotometry:** založeny na spektrální závislosti absorpce světla.
- **Emisní spektrofotometry:** Zdrojem světla je sama analyzovaná látka, jež je injektována nebo rozprašována do bezbarvého plamene. Emitované světlo prochází optickým hranolem nebo mřížkou, takže můžeme získat celé emisní spektrum. Frekvence přítomné ve spektru umožňují identifikovat např. přítomné ionty.
- **Spektrofluorimetry:** emise světla je vyvolána světlem o vlnové délce kratší než je vlnová délka světla emitovaného.

Absorpční spektrofotometry: Lambertův-Beerův zákon

Absorpční spektrofotometrie je založena na absorpci světla při průchodu vrstvou roztoku. Jeho koncentrace může být zjištěna pomocí **Lambertova-Beerova zákona**:

$$I = I_0 \cdot 10^{-\epsilon c x}$$

c je koncentrace rozpuštěné látky, x tloušťka vrstvy, I_0 původní intenzita světla, I je intenzita světla po průchodu vrstvou. Konstanta ϵ (epsilon, absorpční nebo extinkční koeficient) **závisí na vlnové délce světla, na rozpuštěné látce a rozpouštědle**. Její hodnoty pro běžné chemické sloučeniny lze nalézt v tabulkách. Tyto hodnoty jsou vždy udávány pro určitou vlnovou délku (obvykle absorpční maximum). Číselné hodnoty tohoto koeficientu závisí na tom, jak je vyjadřována koncentrace rozpuštěné látky. Když použijeme mol.l^{-1} , hovoříme o **molárním absorpčním koeficientu**.

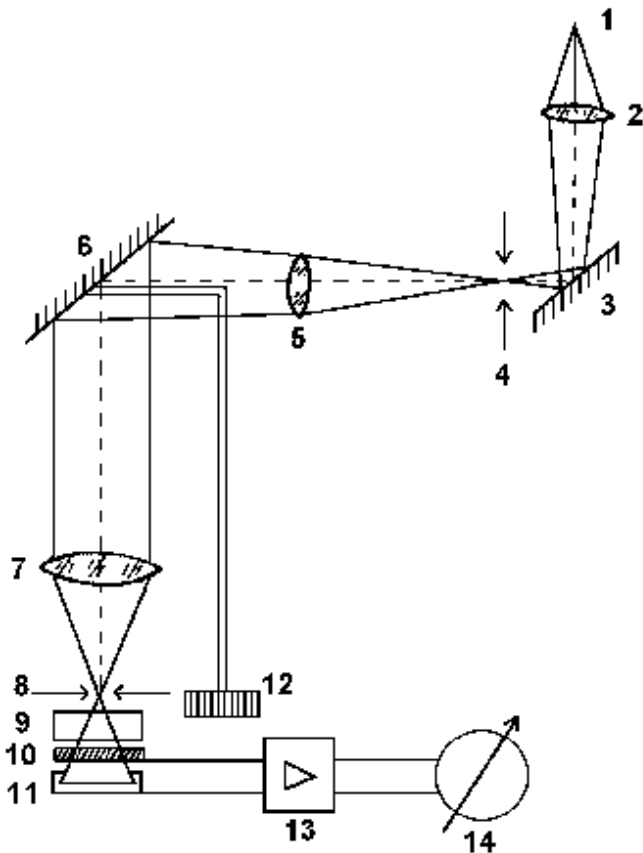
Poměr intenzit světla prošlého a dopadajícího se nazývá **transmittance** (dříve transparence). Dekadický logaritmus převrácené hodnoty transmittance se nazývá **absorbance** A . S ohledem na L.-B. zákon je tedy absorbance přímo úměrná koncentraci rozpuštěné látky a tloušťce absorbující vrstvy roztoku.

$$T = \frac{I}{I_0} \quad A = \log \frac{1}{T} \quad A = \varepsilon \cdot c \cdot x$$

Druhy absorpčních spektrofotometrů

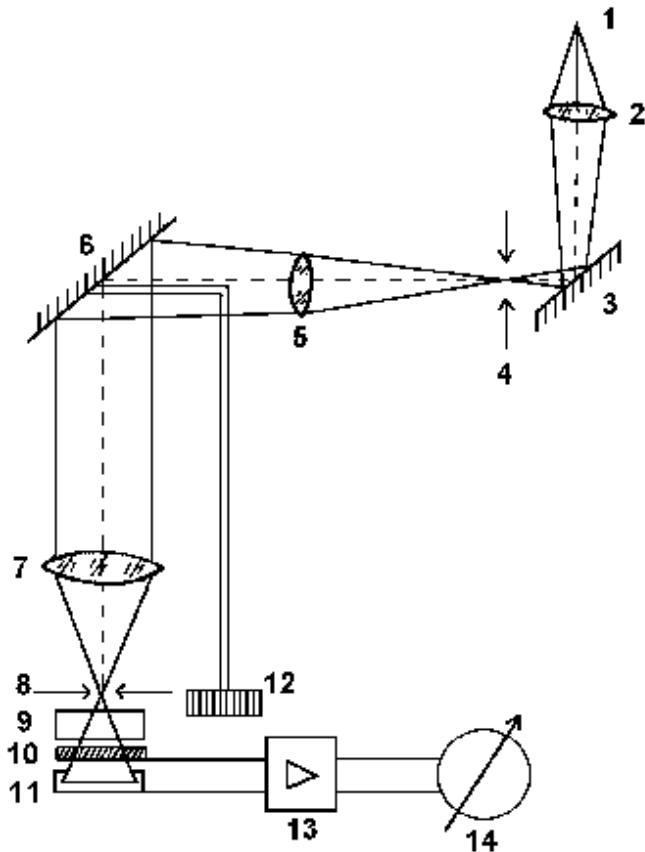
- Podle konstrukce rozdělujeme spektrofotometry na jednopaprskové a dvoupaprskové.
- U **jednopaprskových spektrofotometrů** jeden svazek světla prochází nejdříve srovnávacím a pak měřeným vzorkem (kyvety obsahující roztoky musí být pohyblivé). U **dvoupaprskových spektrofotometrů** jeden svazek světla prochází měřeným vzorkem a druhý srovnávacím vzorkem (blankem). Dvoupaprskové přístroje umožňují podstatně rychlejší měření, avšak jsou dražší. U jednoduchých přístrojů je nastavování vlnové délky světla ruční. U pokročilejších přístrojů se toto nastavování děje automaticky, což umožňuje přímo získávat **absorpční křivky**, tj. grafy závislosti absorbance na vlnové délce světla.

Jednopaprskový spektrofotometr



Zdrojem světla (1) je žárovka s wolframovým vláknem. Její polychromatické světlo prochází kondenzorem (2) a odráží se od zrcadla (3) na vstupní štěrbinu (4) **monochromátoru** (části 4 až 8, plus 12). Světlo je soustředěováno čočkou (5) na **odrazovou optickou mřížku** (6), která tvoří barevné spektrum. Téměř monochromatické světlo je promítáno objektivem (7) na **výstupní štěrbinu** (8) monochromátoru.

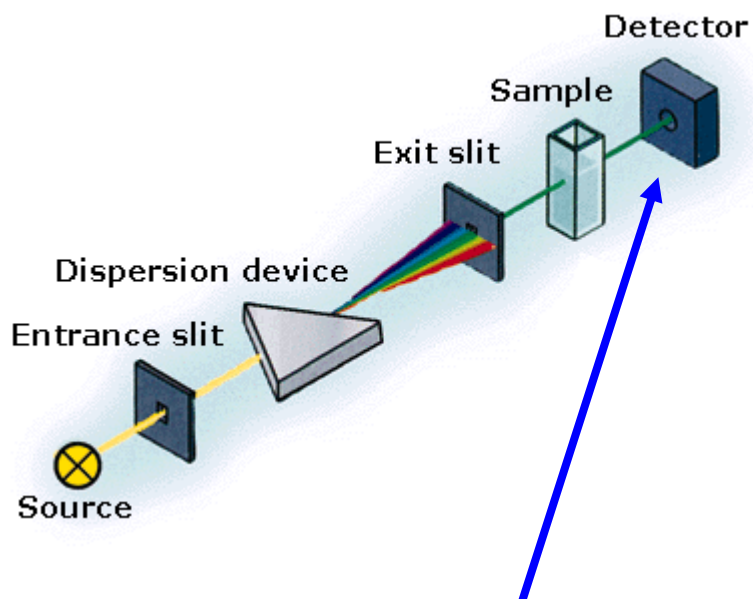
Jednopaprskový spektrofotometr



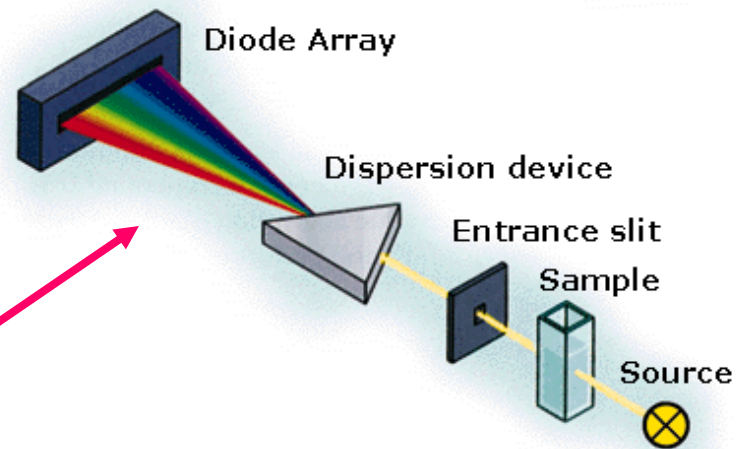
S mřížkou lze otáčet pomocí **ovladače vlnových délek** (12), čímž se zaměřuje světlo o určité vlnové délce na výstupní štěrbinu. Svazek světla pak prochází **kyvetou** (9) se vzorkem. Intenzita prošlého světla je měřena fotodetektorem (10, 11). Jeho signál je zesilován **zesilovačem** (13). Hodnota absorbance je zobrazena na displeji (14). Intenzita světla prošlého srovnávacím roztokem je vždy srovnávána s intenzitou téhož svazku světla prošlého měřeným vzorkem.

Moderní UV/VIS/NIR spektrofotometr

NIR = near infrared = blízká infračervená oblast



Světlo **jedné vybrané vlnové délky** nebo **celé prošlé spektrum** může být měřeno



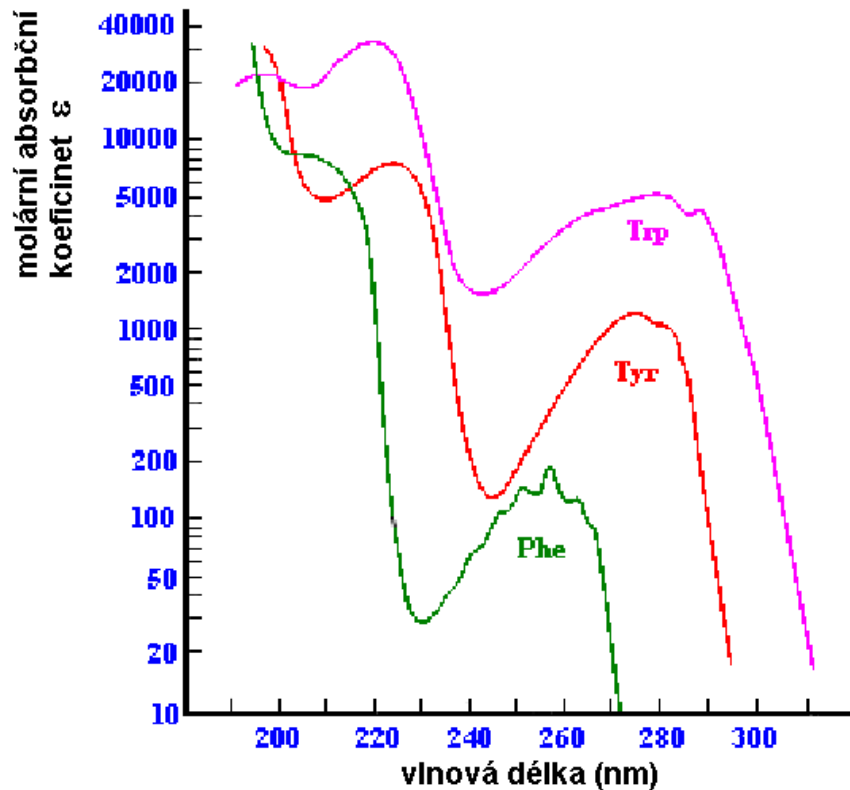
Absorpční UV spektrofotometrie

- Ultrafialové (UV) světlo je absorbováno různými sloučeninami, zejména těmi, které mají konjugované dvojné vazby. Jak bílkoviny, tak nukleové kyseliny silně absorbují UV světlo, což lze využít pro jejich zkoumání.
 - Aminokyseliny tryptofan a tyrosin mají absorpční maxima při přibližně 280 nm. Fenylalanin při 255 nm.
 - Nukleotidy (dusíkaté báze) mají absorpční maxima v oblasti 260 - 270 nm.
 - **Chromofory** – jejich absorpční vlastnosti se mění podle chemického složení prostředí.

Struktura bílkovin

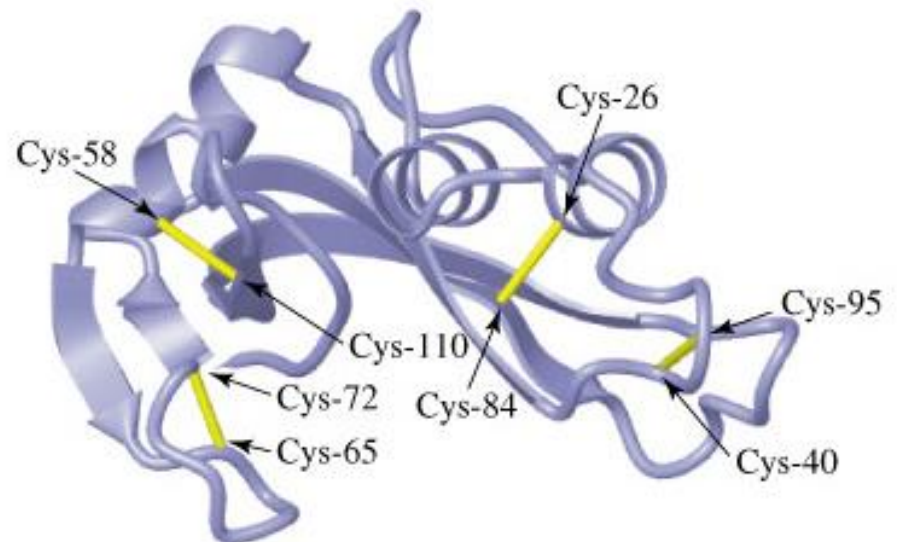
Disulfidické můstky stabilizují strukturu bílkoviny (hovězí ribonukleáza A)

http://cwx.prenhall.com/horton/medialib/media_portfolio/text_images/FG04_28a-b.JPG



Absorpční spektrum volného fenylalaninu, tyrosinu a tryptofanu v UV oblast

Podle: <http://www.fst.rdg.ac.uk/courses/fs460/lecture6/lecture6.htm>



Bathochromní efekt (červený posun)



Hypsochromní efekt (modrý posun)



Hypochromní efekt – snížení intenzity

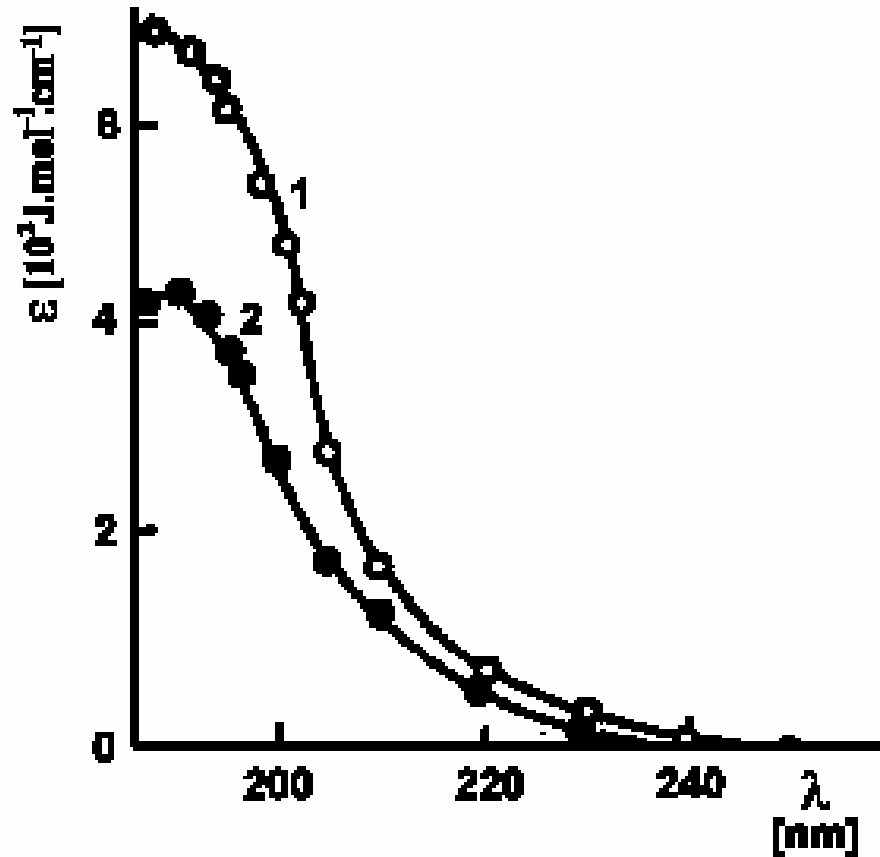


Hyperchromní efekt – zvýšení intenzity

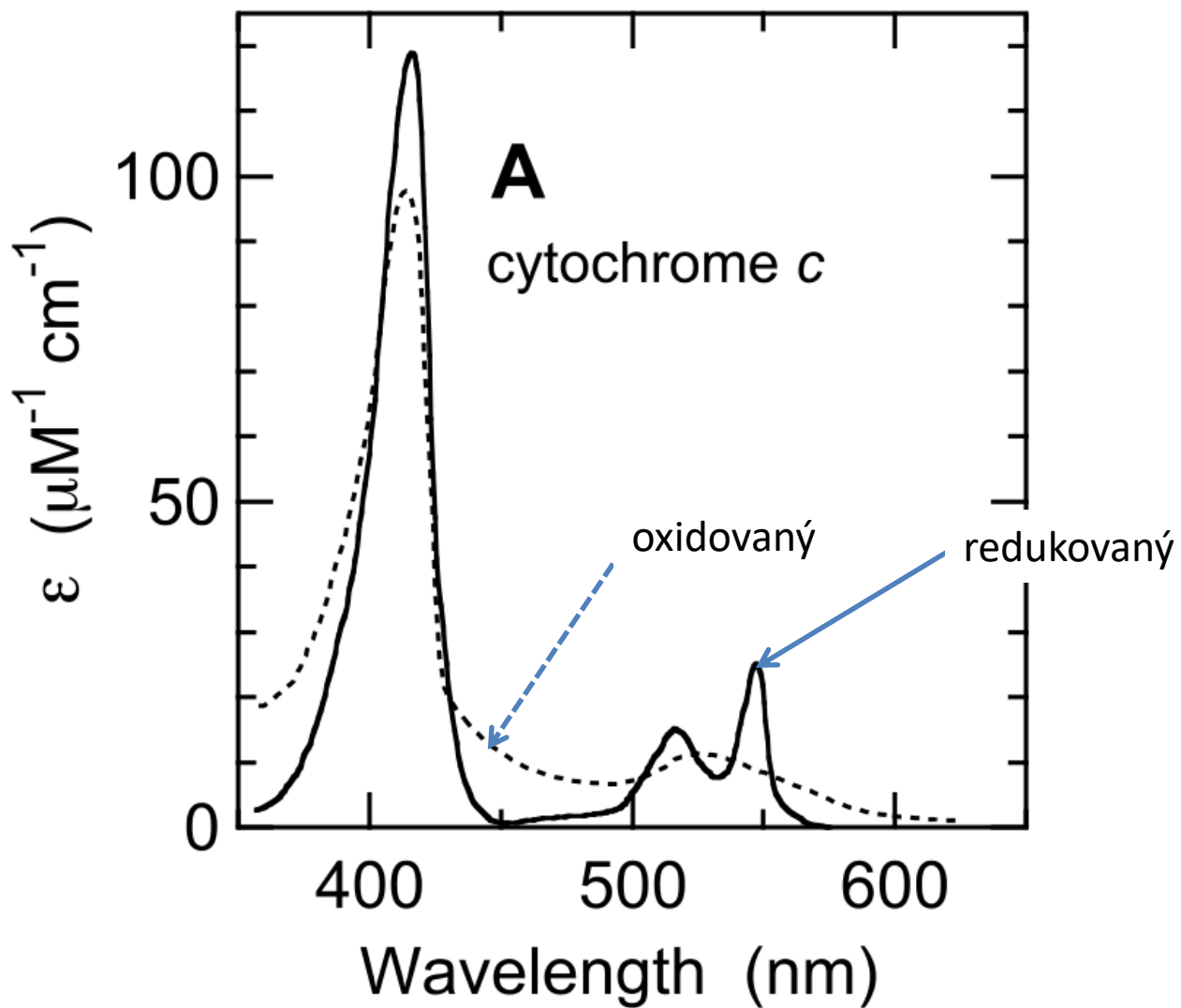


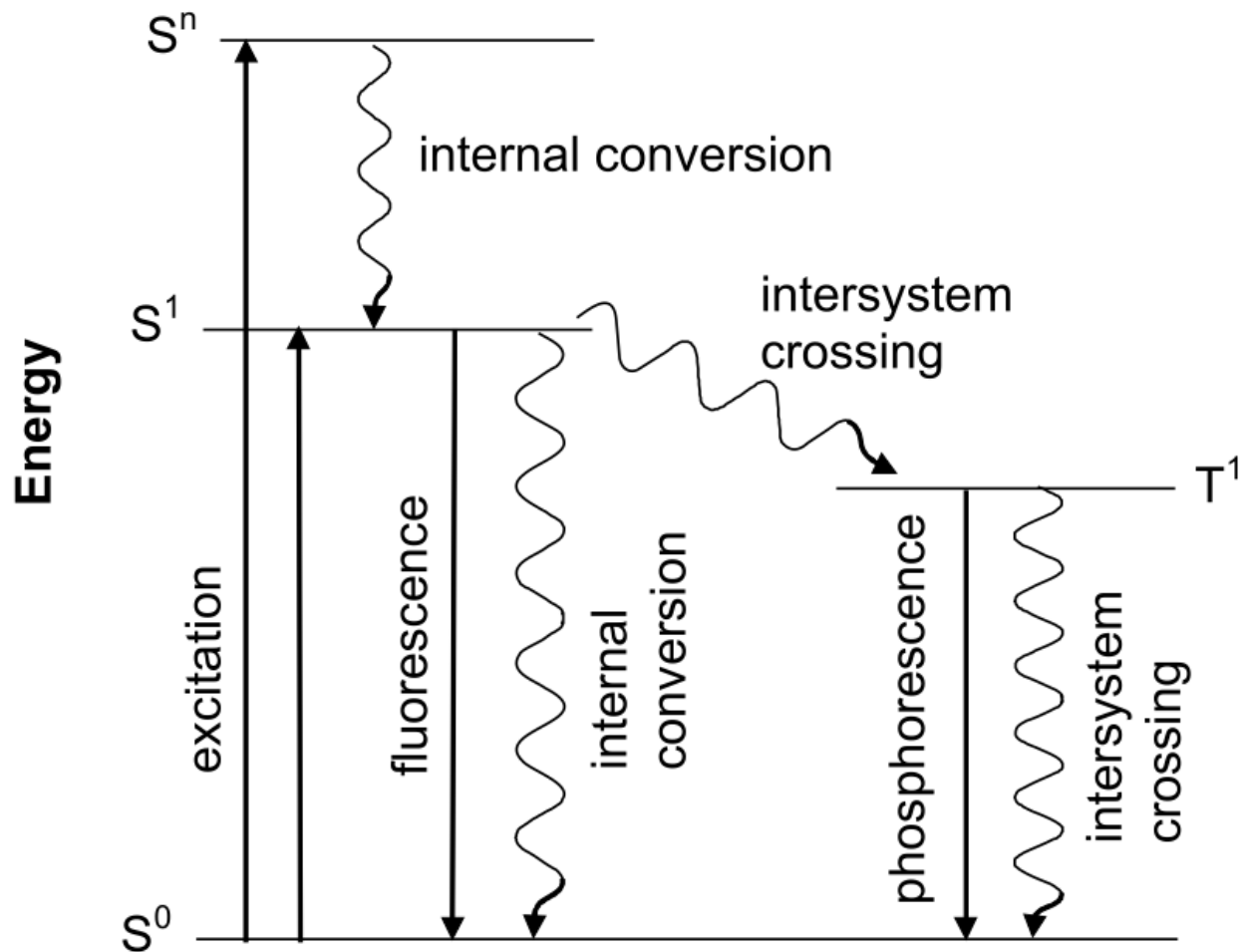
Hypochromní efekt (HE)

- Absorpce světla je ovlivňována dipólovými momenty chemických vazeb, které interagují s fotony. Stochasticky (náhodně) orientované dipólové momenty (denaturovaná bílkovina) absorbují světlo lépe než ve stavu uspořádaném (šroubovice). U **bílkovin** je HE způsoben peptidovými vazbami, které mají UV absorpční maximum kolem 190 nm.
- Dvoušroubovice **DNA** absorbuje UV světlo hůře vlivem patrových a vodíkových interakcí než jednořetězcová (denaturovaná/neuspořádaná). $A_{\text{DNA}260\text{nm}}$ v horké vodě > ve studené vodě
- **Helicita** – relativní zastoupení uspořádaných částí makromolekuly



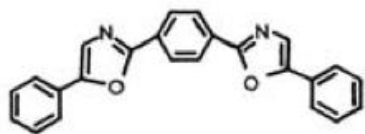
Hypochromní efekt u kys. polyglutamové. Při pH 7 tento polypeptid tvoří stochastické (neuspořádané) klubko (1), při pH 4 získává šroubovicovou strukturu (2). Absorpční maximum peptidových vazeb je sníženo vlivem jejich prostorového uspořádání. ϵ je molární absorpční koeficient a λ je vlnová délka UV světla. [dle: Kalous a Pavlíček, 1980]



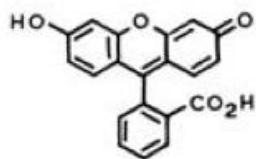


Zářivé procesy (absorpce, fluorescence, fosforescence) jsou indikovány rovnými šipkami. Nezářivé procesy jsou naznačeny zvlněnými šipkami. Diagramy tohoto typu byly zavedeny A. Jablonskim v jeho práci z r. 1935 na téma mechanismu fosforescence. Horizontální osa nemá fyzikální význam.

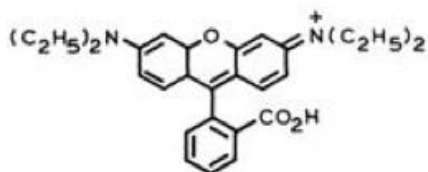
Fluorescenční (Försterův) přenos energie



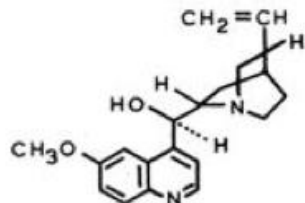
POPOP



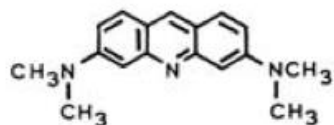
Fluorescein



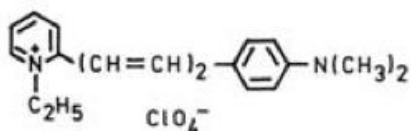
Rhodamine B



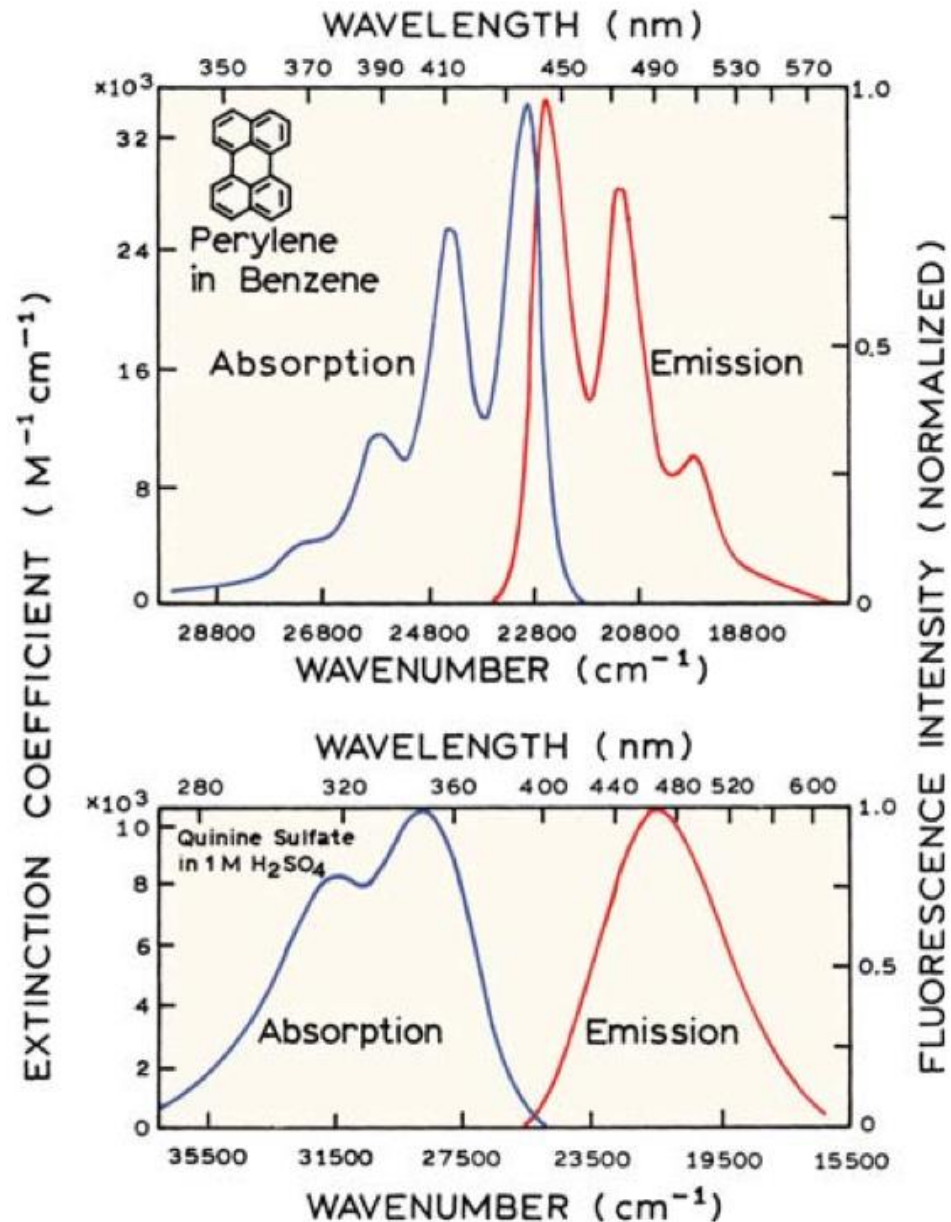
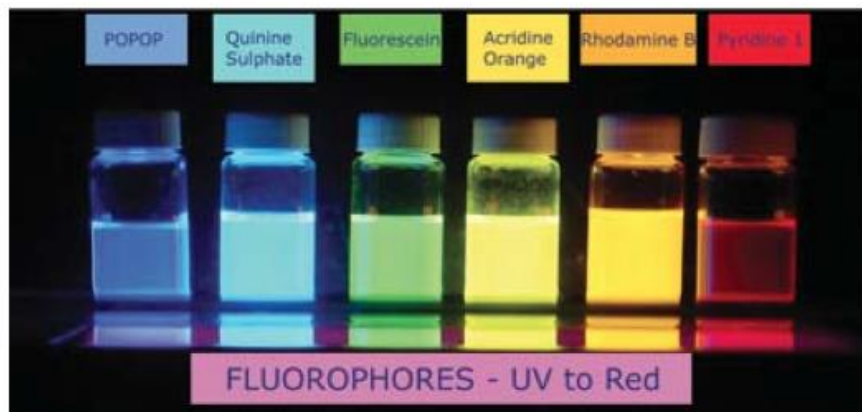
Quinine



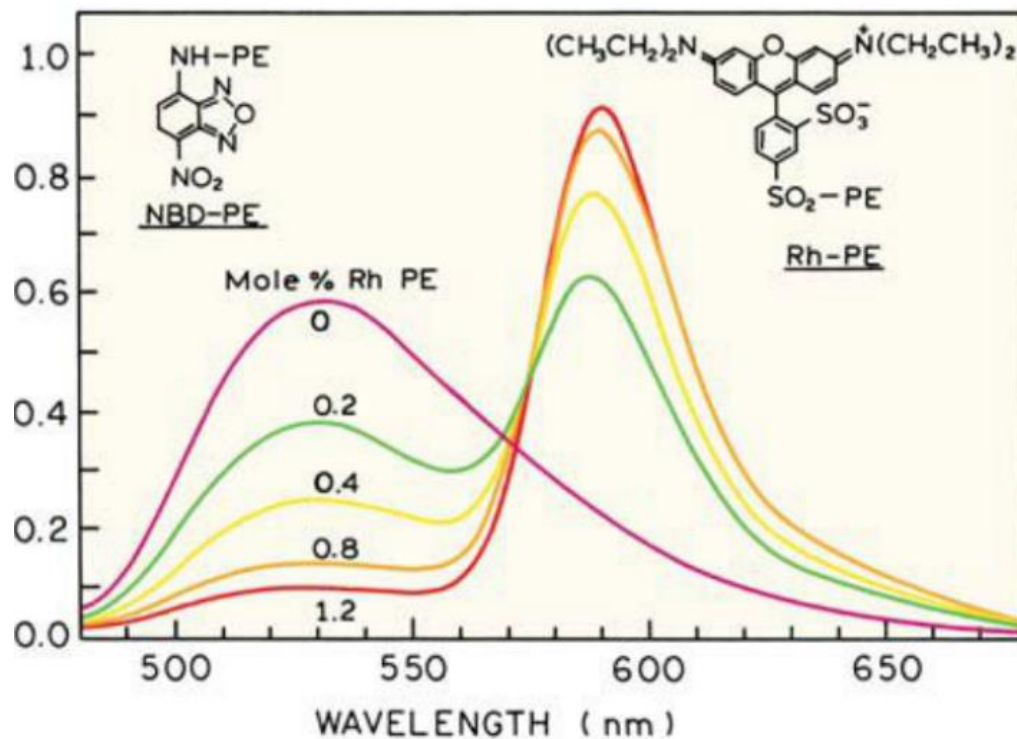
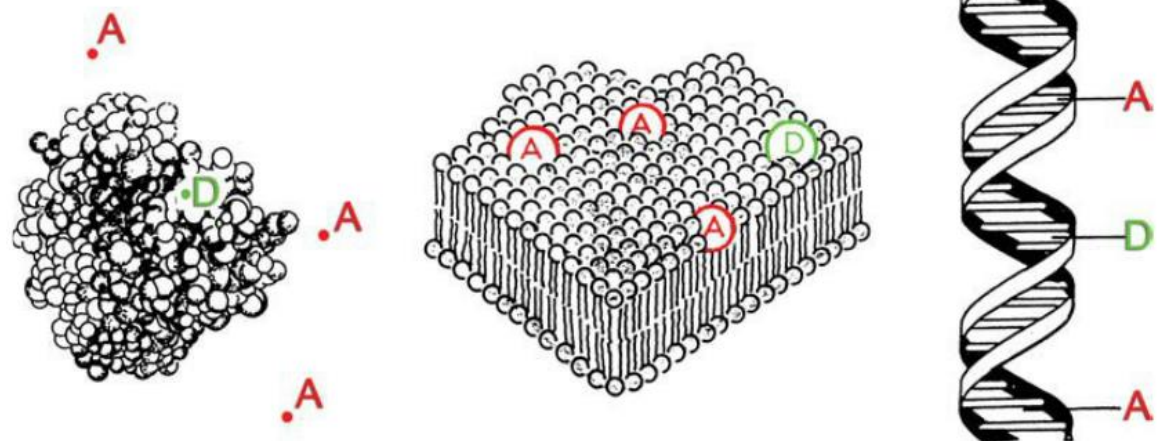
Acridine Orange

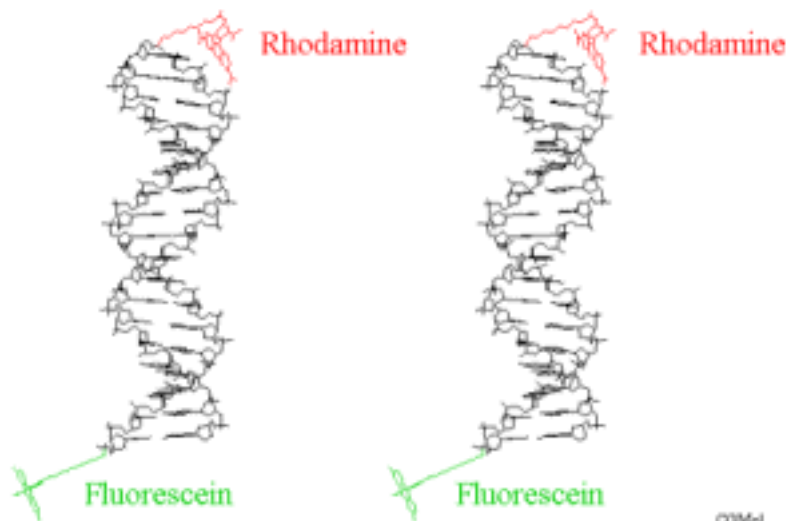


Pyridine 1

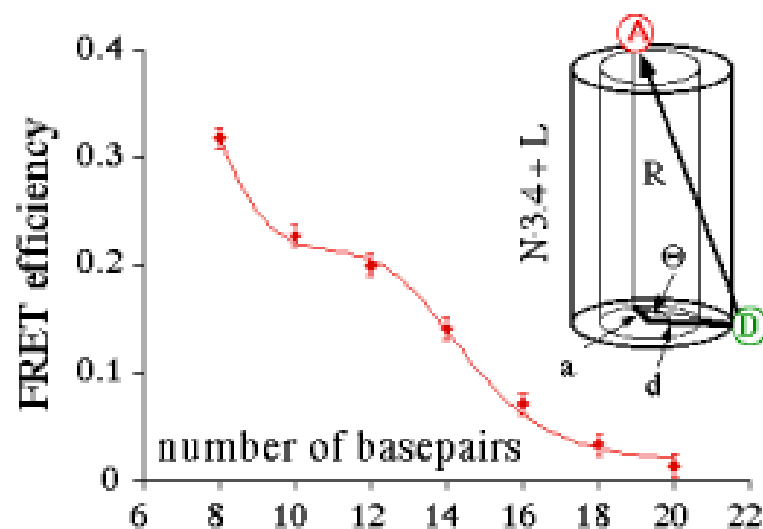
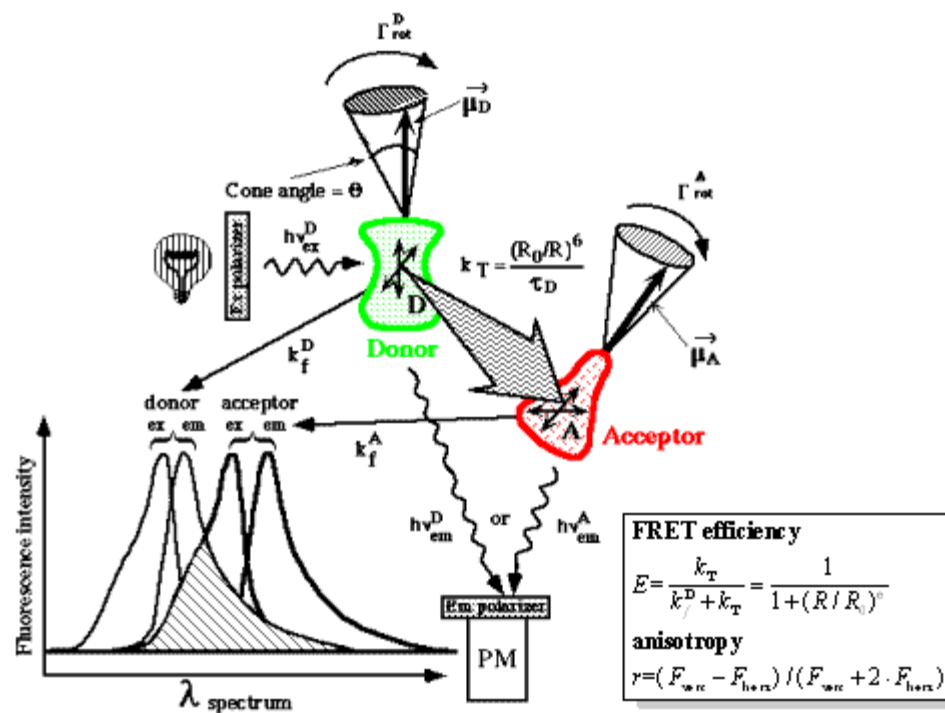


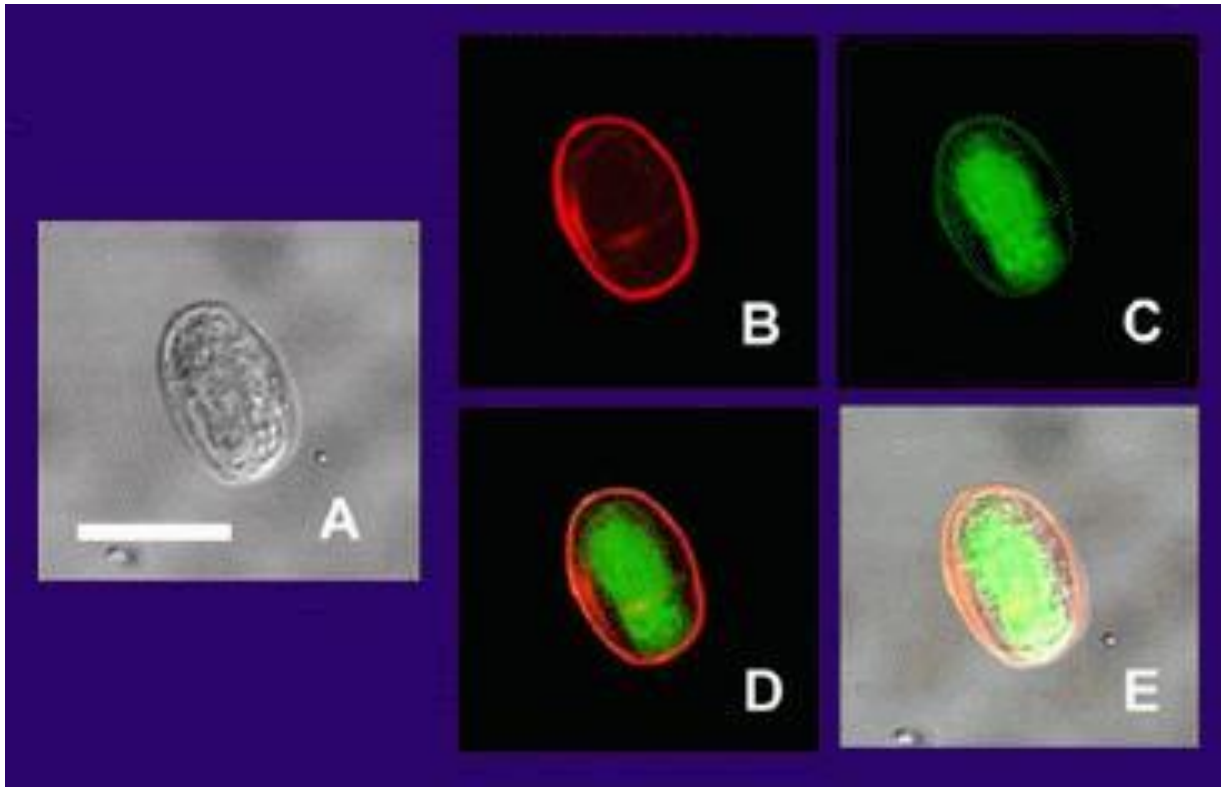
Fluorescenční (Försterův) přenos energie



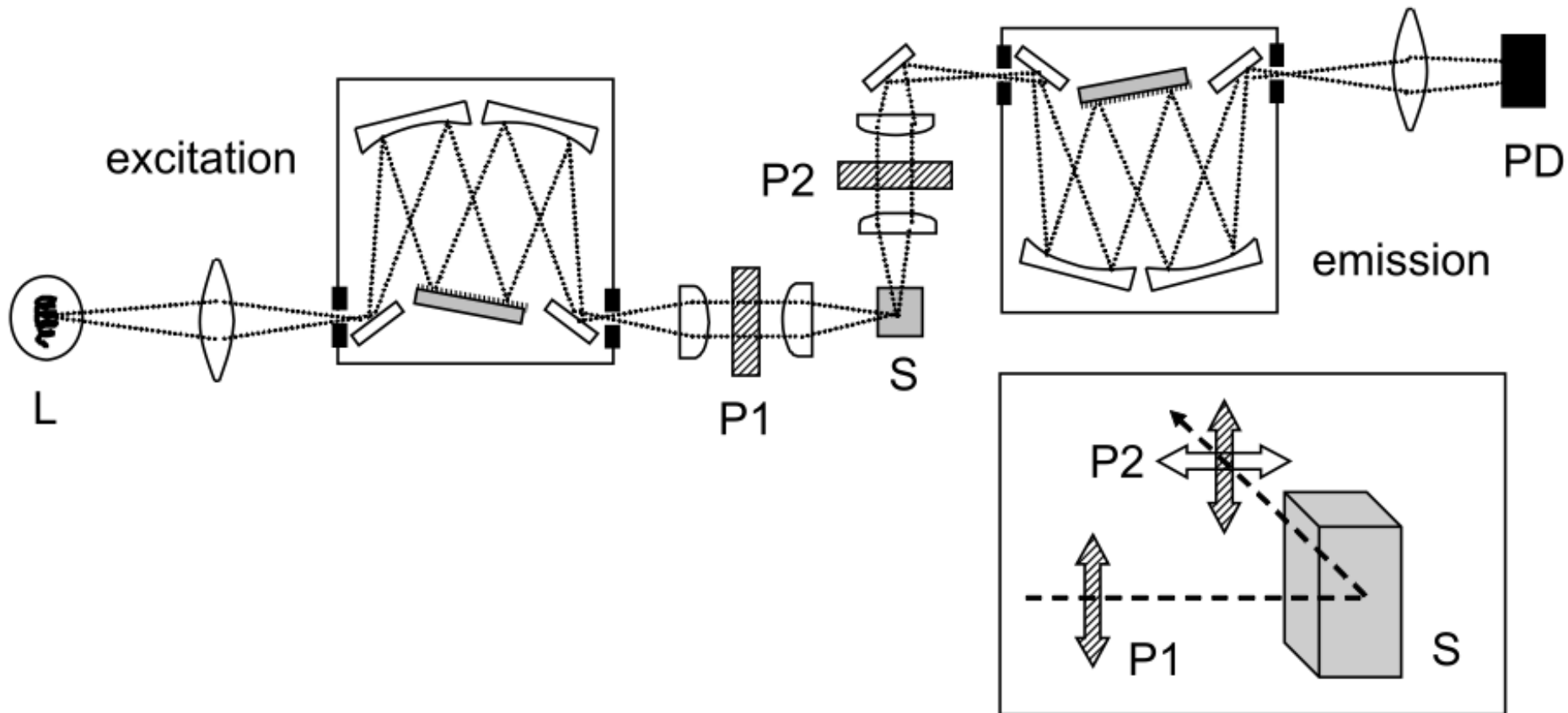


COMSOL





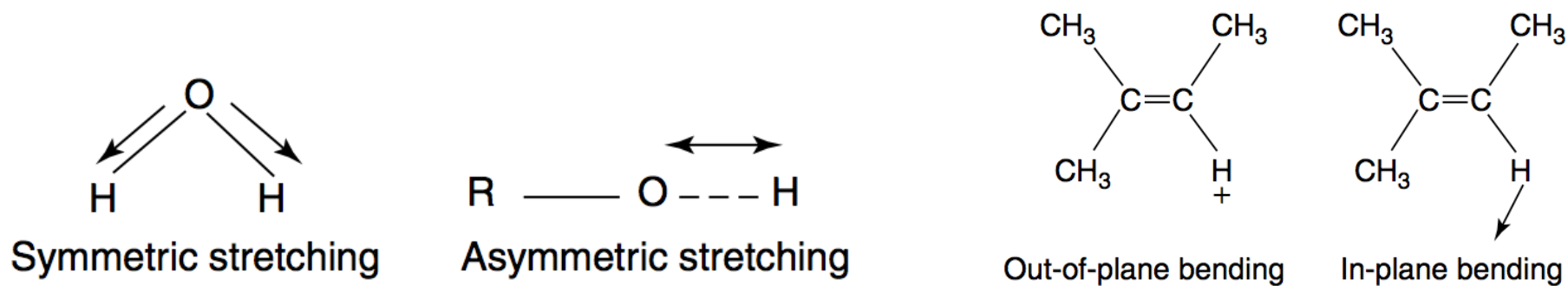
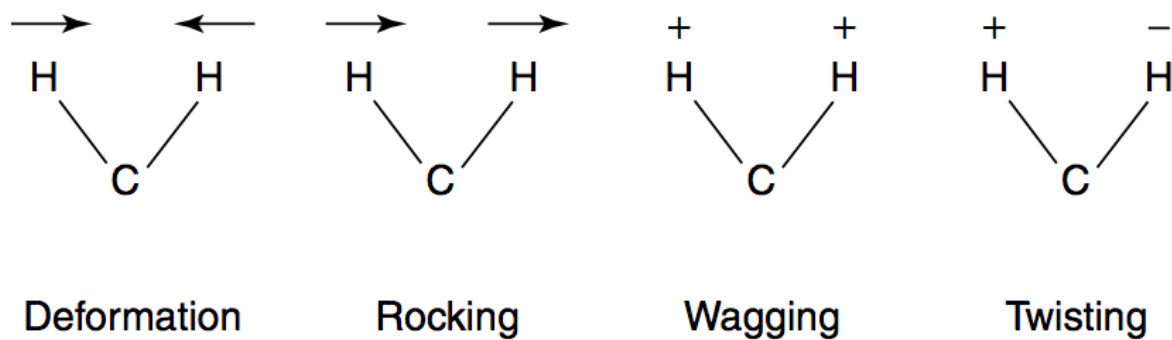
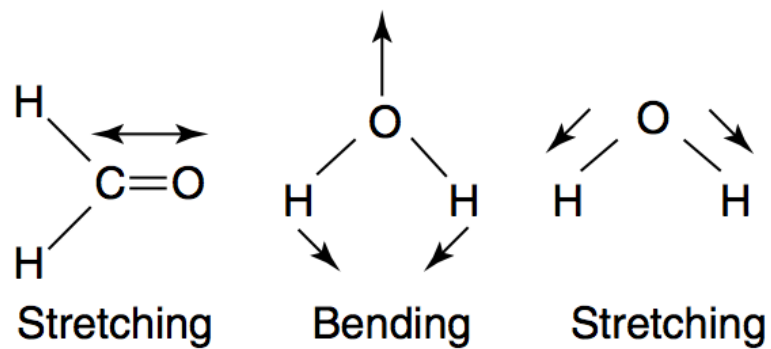
Giardia lamblia (intestinalis) (**A**) is the cyst imaged by transmission (differential interference contrast), only. (**B**) is the cyst wall selectively imaged through use of fluorescent-labelled (TRITC) antibody that is cyst wall specific. (**C**) is the cyst imaged through use of carboxy fluorescein diacetate, a viability stain. (**D**) is a composite image of (**B**) and (**C**). (**E**) is a composite image of (**A**), (**B**), and (**C**). Bar = 10 microns; sample from gerbil feces. Image courtesy of US EPA.



Zařízení pro měření fluorescenční anisotropie. V hlavním schematu polarizační filtr nebo hranol (P1) polarizuje dopadající světlo. Intenzita fluorescence je měřena druhým polarizátorem (P2), který může být kolmý nebo paralelní k P1. L – lampa, S – vzorek, PD – fotodetektor.

IR spektrofotometrie

- Infračervené záření (IR) působí na rotační a vibrační stavy molekul. Složité molekuly mohou vibrovat nebo rotovat mnoha různými způsoby (módy). Různé chemické skupiny (-CH₃, -OH, -COOH, -NH₂ atd.) mají specifické vibrační a rotační frekvence, a proto absorbují IR světlo o specifických vlnových délkách.
- Z tohoto důvodu mají infračervená absorpční spektra mnoho maxim. Změna chemické struktury se projevuje jako změna polohy těchto maxim ve spektru.



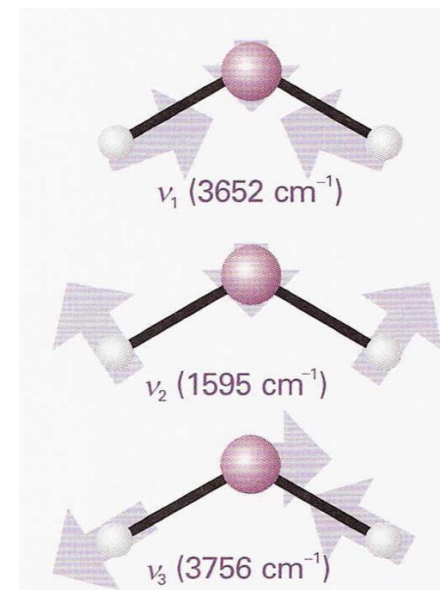
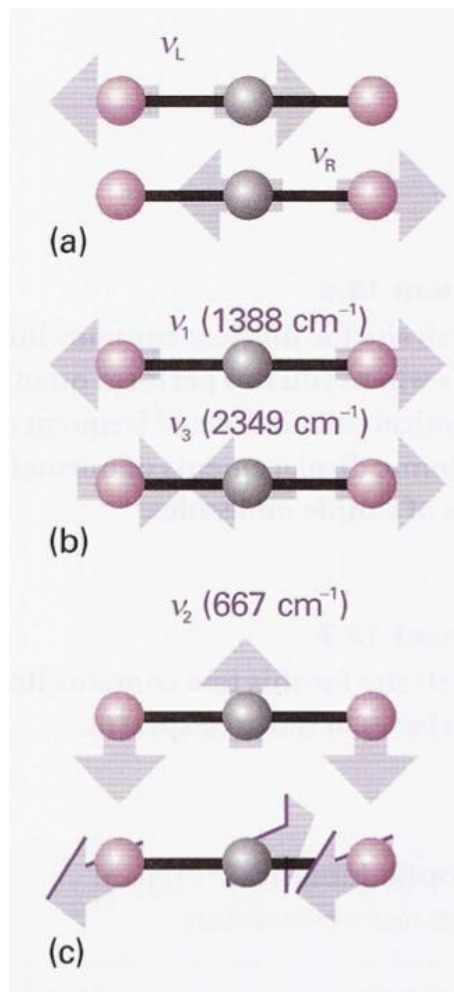
Vibrace

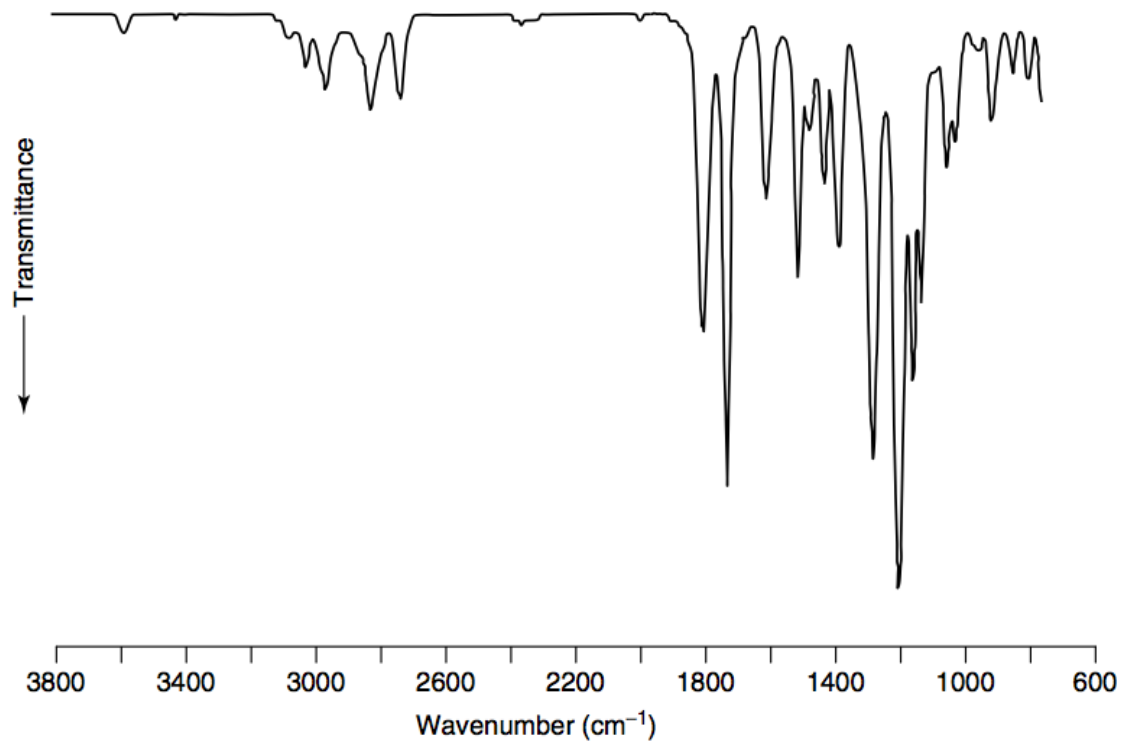
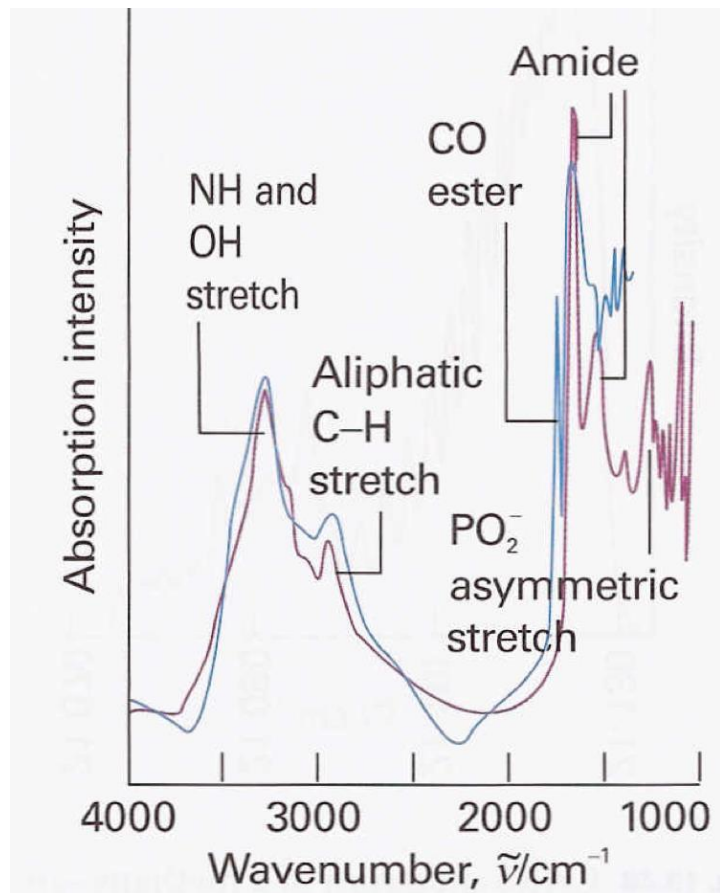
ν/cm^{-1}

C—H stretch	2850–2960
C—H bend	1340–1465
C—C stretch, bend	700–1250
C=C stretch	1620–1680
C $\equiv$ C stretch	2100–2260
O—H stretch	3590–3650
H-bonds	3200–3570
C=O stretch	1640–1780
C $\equiv$ N stretch	2215–2275
N—H stretch	3200–3500
C—F stretch	1000–1400
C—Cl stretch	600–800
C—Br stretch	500–600
C—I stretch	500
CO ₃ ²⁻	1410–1450
NO ₃ ⁻	1350–1420
NO ₂ ⁻	1230–1250
SO ₄ ²⁻	1080–1130
Silicates	900–1100

CO₂

H₂O



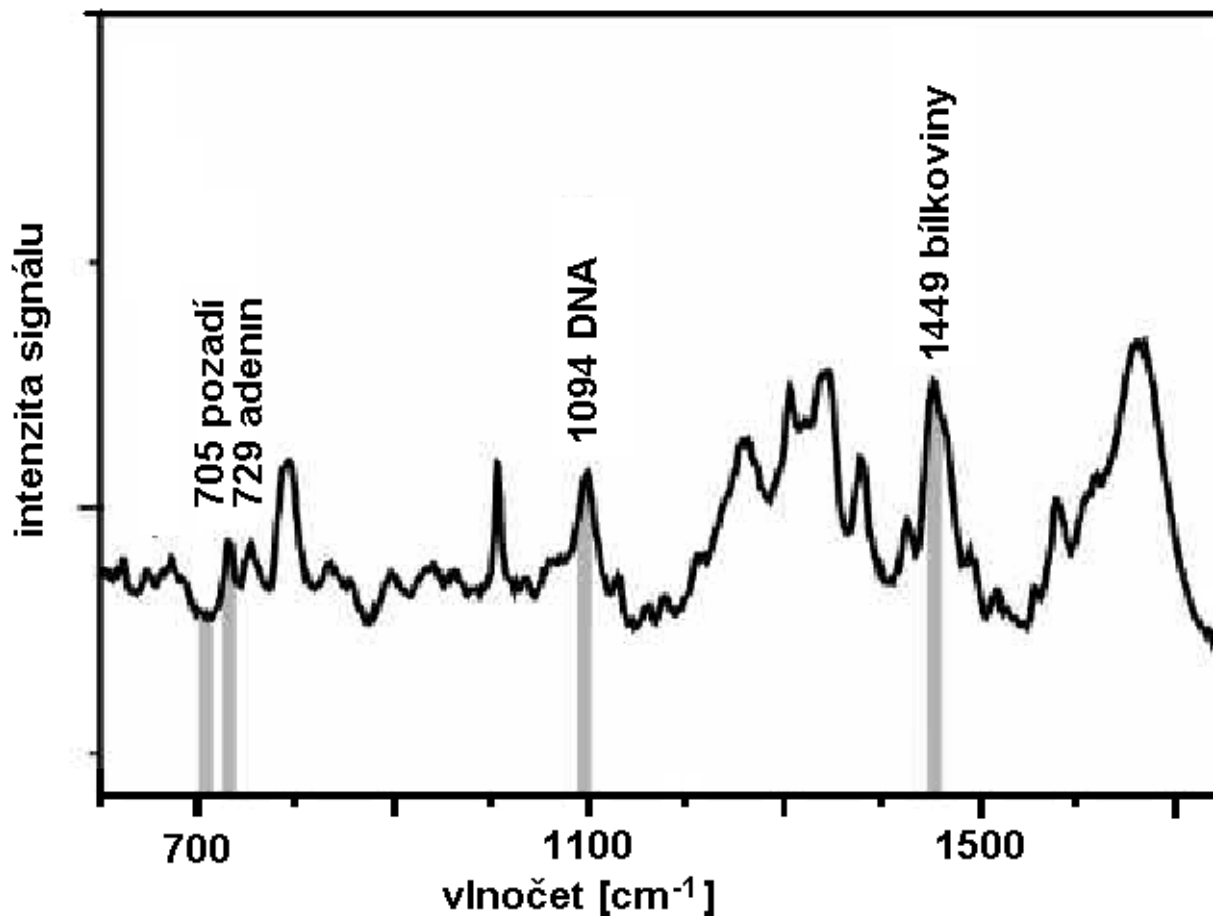


Ukázka IR spekter. Vlevo absorpční spektrum živé (fialově) a umírající (modře) buňky. Vpravo spektrum vanilinu.

Ramanova spektroskopie

- **Sir Chandrasekhara Venkata Raman** – NC 1930 za fyziku „za jeho práci o rozptylu světla a objevu efektu pojmenovaném po něm“
- **Rayleighův rozptyl světla.** Nastává interakce fotonů s molekulami, jež se projevuje jen velmi malou nebo žádnou změnou vlnové délky. Intenzita rozptýleného světla závisí na molekulové hmotnosti a také na úhlu rozptylu, což lze využít pro odhad tvaru makromolekul.
- **Ramanova spektrometrie.** Při rozptylu fotonů nastává malá změna (posun) vlnové délky, způsobená malým poklesem nebo zvýšením energie rozptýlených fotonů během přechodu z původního do změněného vibračního nebo rotačního stavu interagující molekuly. Tyto stavy se mohou měnit v důsledku strukturálních změn molekul.
- Proto změny v Ramanových spektrech (intenzita signálu v závislosti na posunu vlnové délky) odrážejí konformační změny molekul.

Ramanova spektroskopie

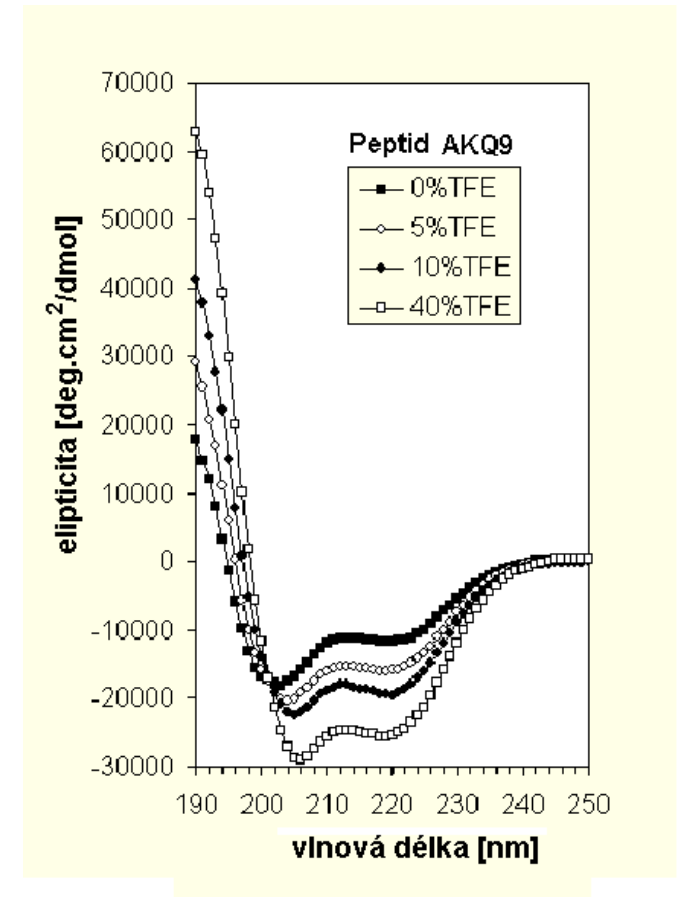


Ramanovo spektrum polytenního chromosomu pakomára *Chironomus*.
Při zvolených vlnočtech lze uskutečnit ramanovskou mikroskopii. Vybuzeno laserovým světlem o vlnové délce 647.1 nm.

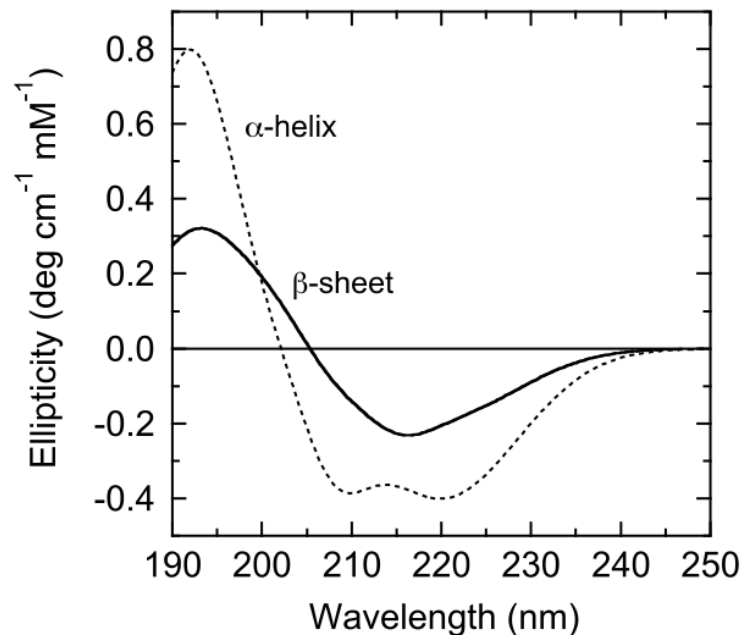
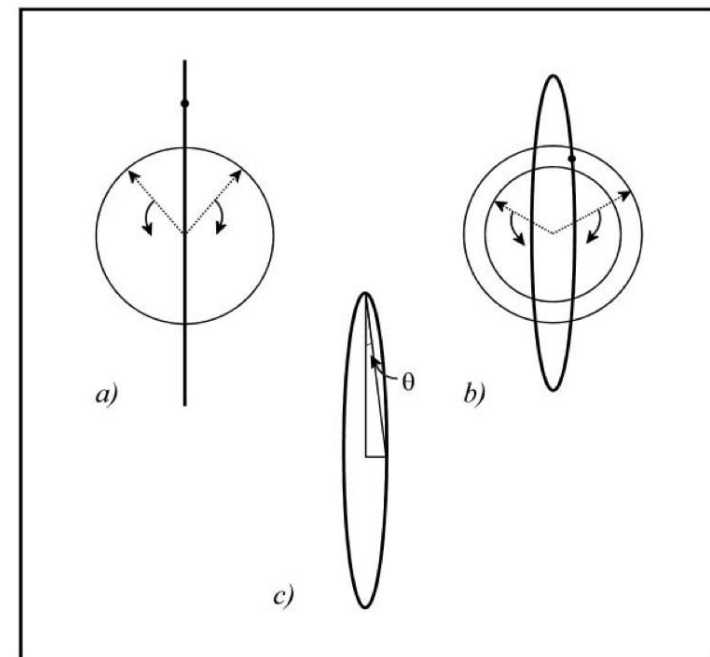
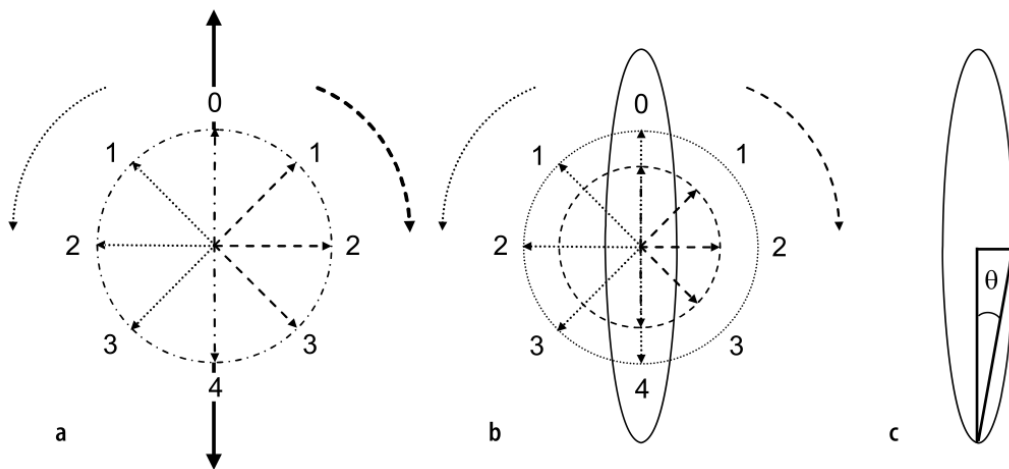
Cirkulární dichroismus (CD)

- Měření **optické aktivity** (schopnosti stáčet rovinu polarizovaného světla). Konformační změny molekul mohou být sledovány jako změny optické aktivity při použití speciálního polarimetru.
- U metody CD srovnáváme absorbance levotočivě a pravotočivě cirkulárně polarizovaného světla, jehož vlnová délka je blízká absorpčnímu maximu bílkoviny.
- CD lze využít též pro studium struktury nukleových kyselin.

Obrázek ukazuje změny **elipticity** syntetického polypeptidu, obsahujícího dlouhé sekvence poly-glu, po přidavku trifluoroethanolu (TFE), který zvyšuje podíl α -šroubovice. <http://www-structure.llnl.gov/cd/polyq.htm>



$$\theta_r = \frac{2.303}{4} \cdot (A_L - A_R) \cdot [\text{rad}]$$



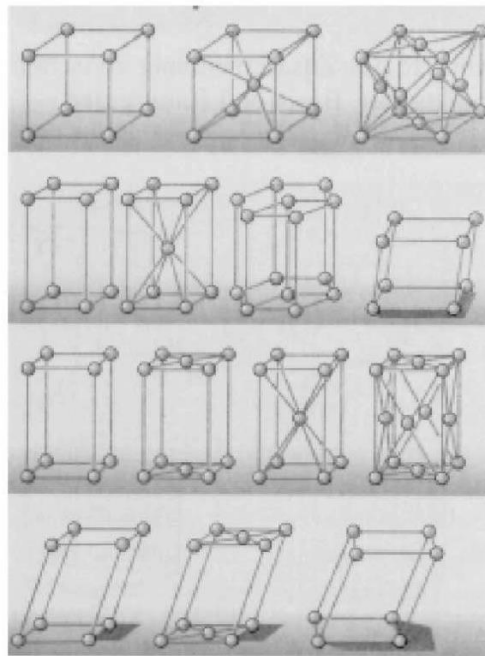
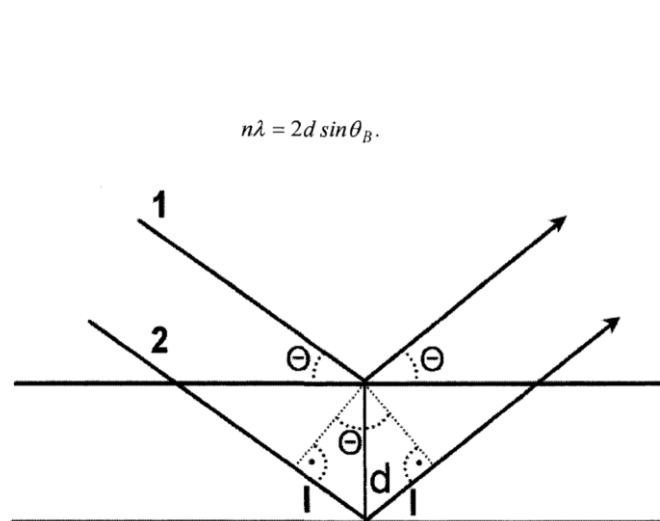
Nejčastěji se CD vyjadřuje jako závislost na Delta Epsilon.

$$\Delta \epsilon = \epsilon_L - \epsilon_R = (A_L - A_R) / (dl)$$

ϵ_L a ϵ_R jsou definované levo-a pravo-točivé extinkční koeficienty, l je délka dráhy a d je molární koncentrace vzorku.

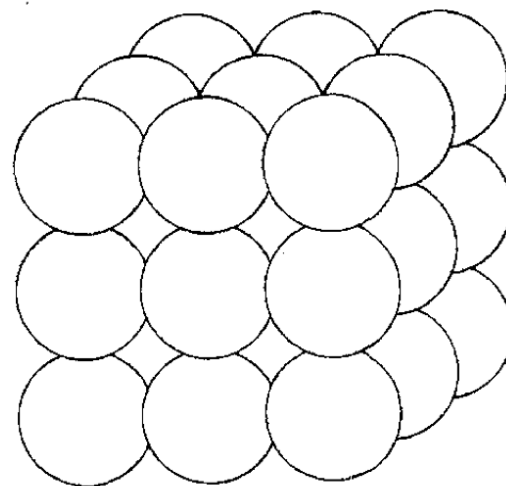
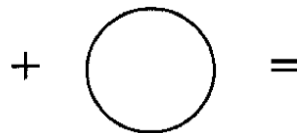
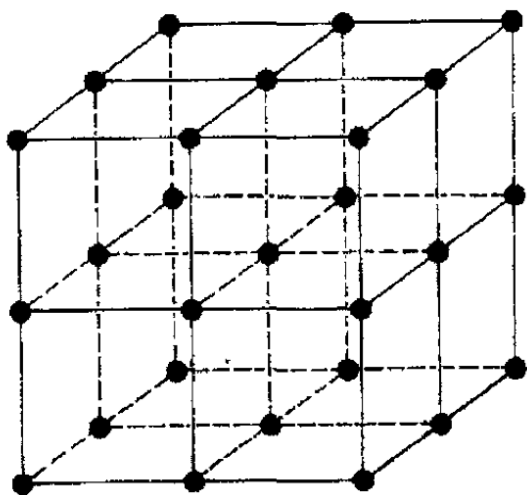
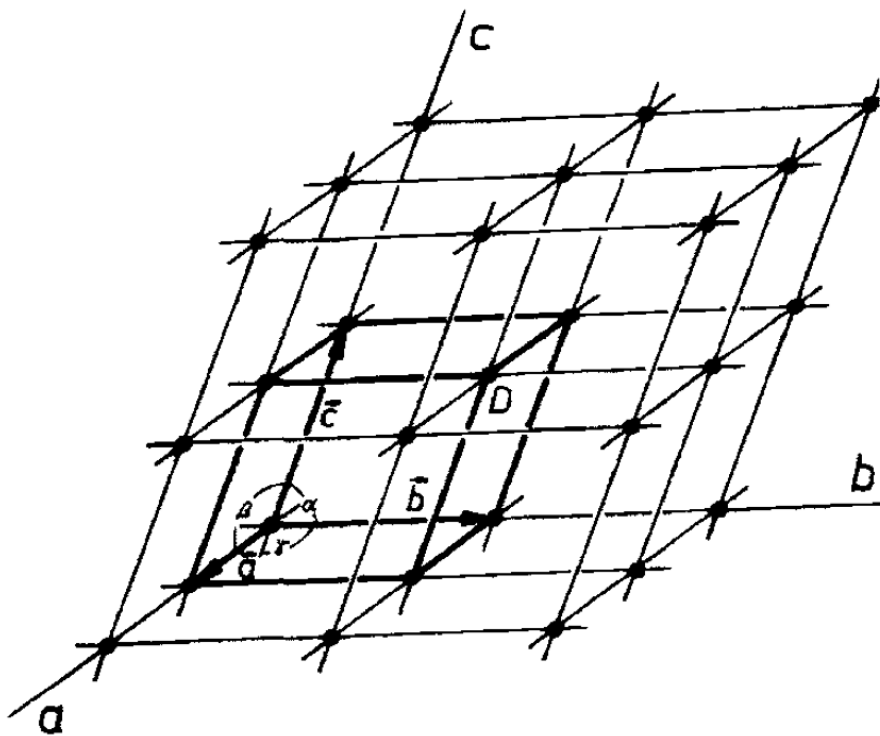
Rentgenstrukturní analýza

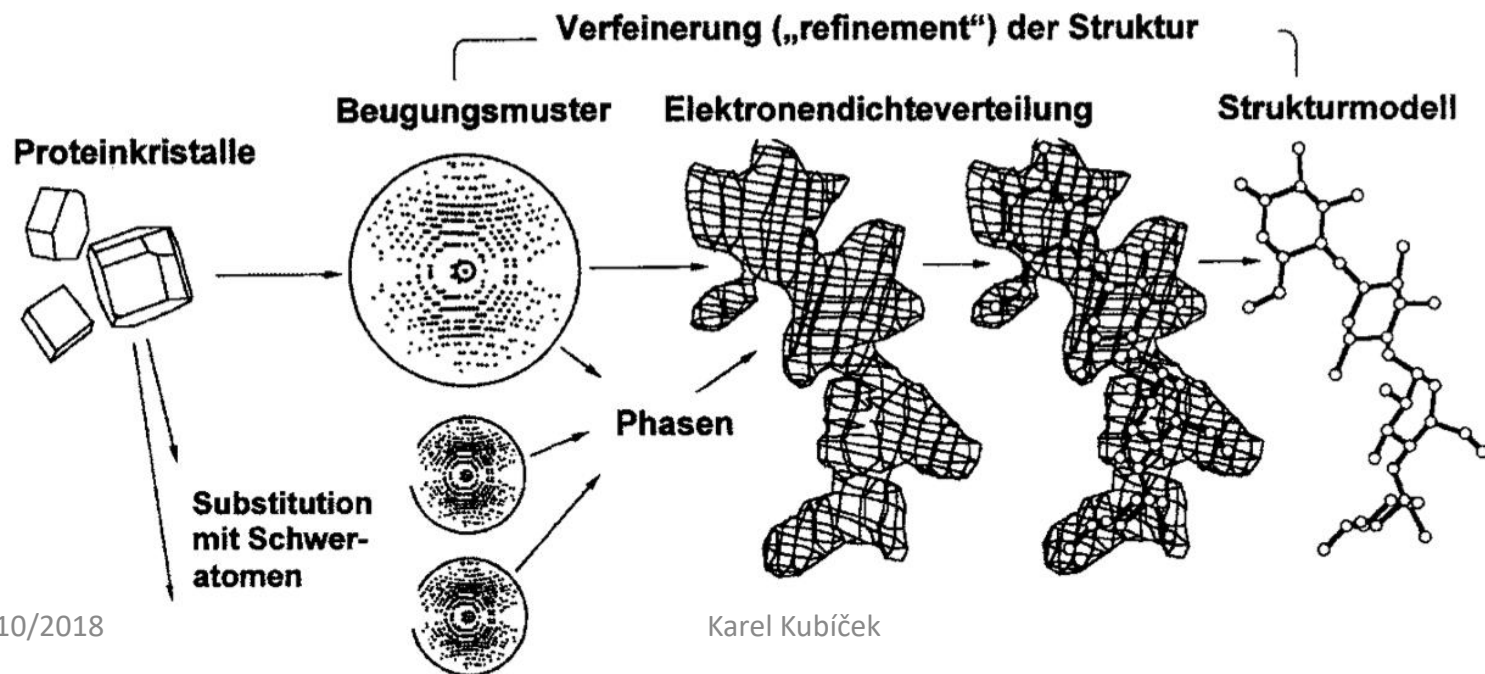
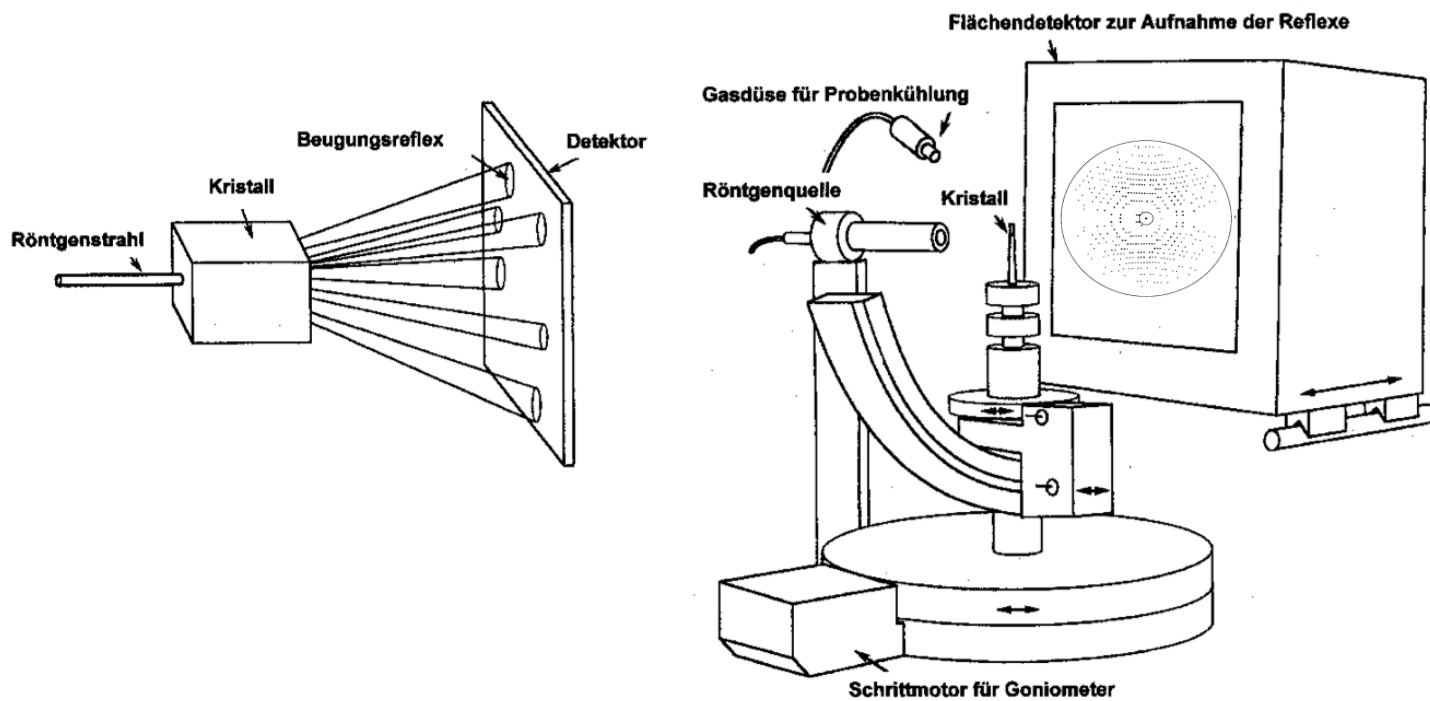
Krystalová mřížka působí na rentgenové záření jako optická mřížka na viditelné světlo. Nastávají ohybové jevy a na stínítku se objevuje difrakční obrazec. Tyto obrazce mohou být matematicky analyzovány, aby se získala informace o rozložení elektronů v molekulách tvořících krystal.



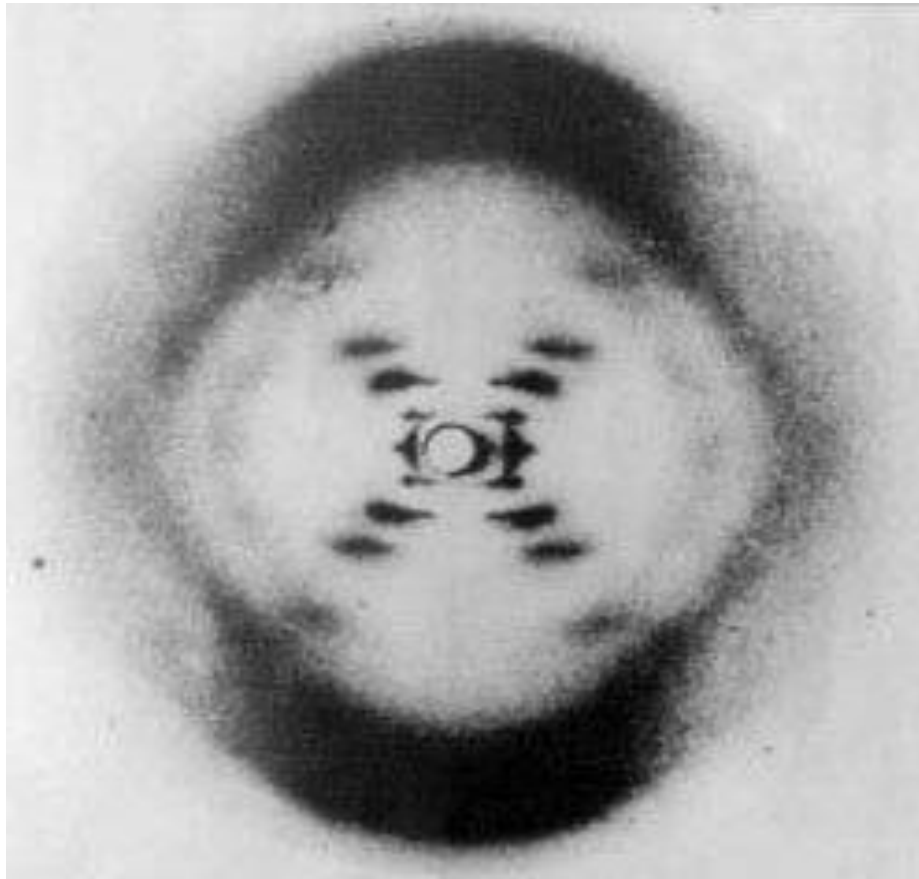
Raumgitter

$\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3 \neq 90^\circ$	triklin
$\alpha_1 = \alpha_2 = 90^\circ, \alpha_3 \neq 90^\circ$	monoklin
$\alpha_1 = \alpha_2 = \alpha_3 = 90^\circ, a_0 \neq b_0 \neq c_0$	orthorhombisch
$\alpha_2 = \alpha_3 = 90^\circ, \alpha_1 = 60^\circ, b_0 = c_0$	hexagonal
$\alpha_1 = \alpha_2 = \alpha_3 \neq 90^\circ, a_0 = b_0 = c_0$	trigonal (rhomboedrisch)
$\alpha_1 = \alpha_2 = \alpha_3 = 90^\circ, a_0 = b_0 \neq c_0$	tetragonal
$\alpha_1 = \alpha_2 = \alpha_3 = 90^\circ, a_0 = b_0 = c_0$	kubisch





Krystalogram **B-DNA** získaný v r. **1952** Rosalindou E. **Franklinovou**, na jehož základě **Watson** a **Crick** navrhli dvoušroubovicový model struktury DNA. **C. & W.** dostali v r.**1962** společně s Mauricem Hugh Frederick Wilkinsem NC za fyziologii a medicínu „za jejich objevy týkající se molekulární struktury nukleových kyselin a jejich významu při přenosu informací v živých organizmech“



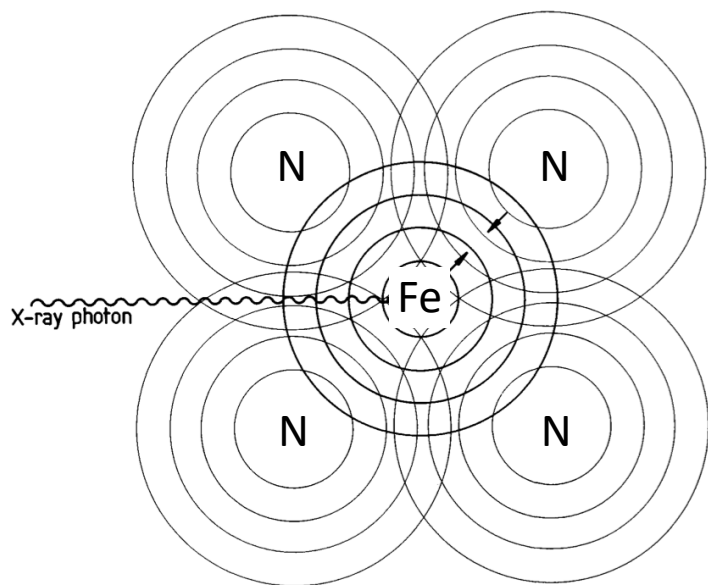
F



C

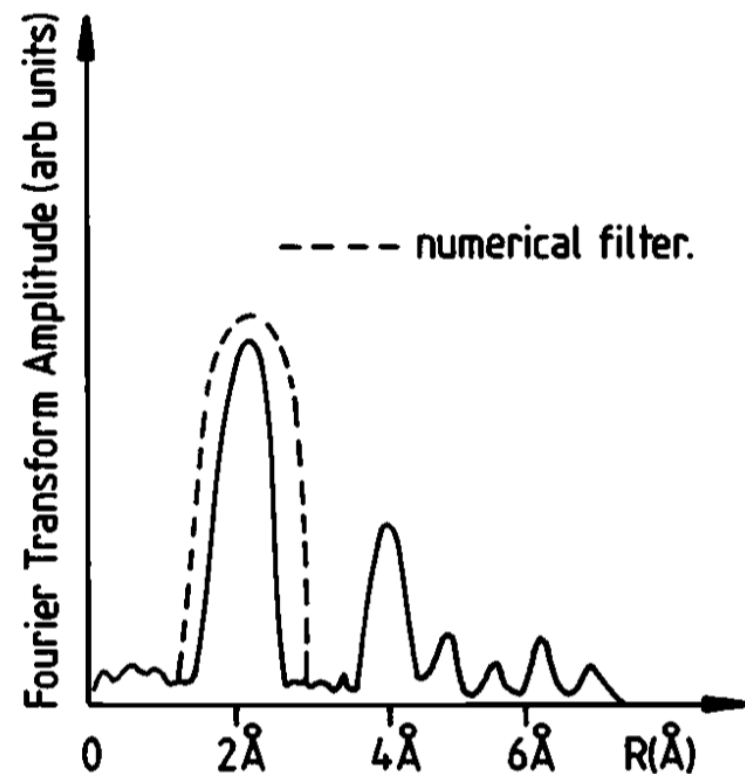
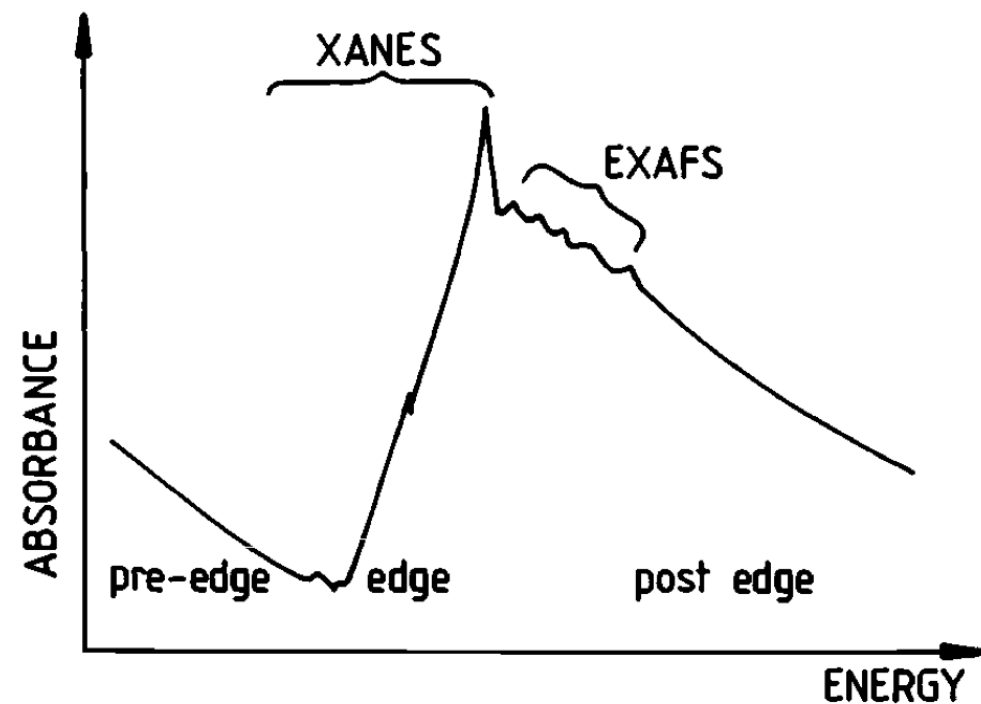


W

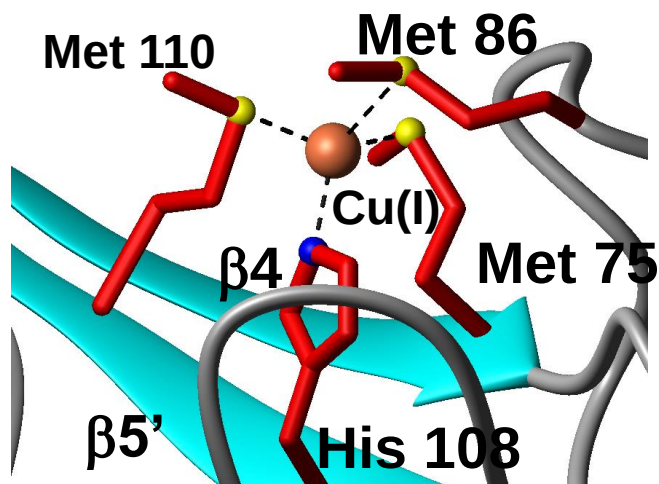


$$I = I_0 \exp(-\mu x)$$

EXAFS poskytuje informace o nejbližších slupkách atomů sousedících s absorbujícím atomem



X-Ray Absorption Spectroscopy

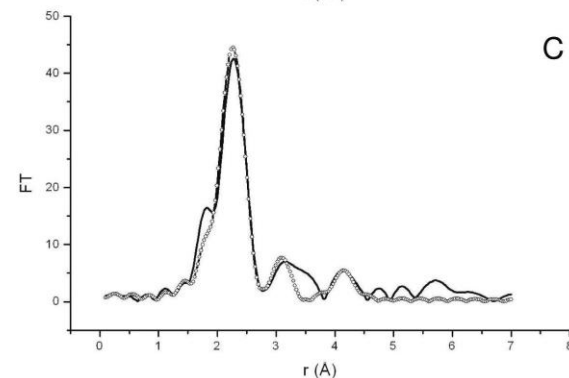
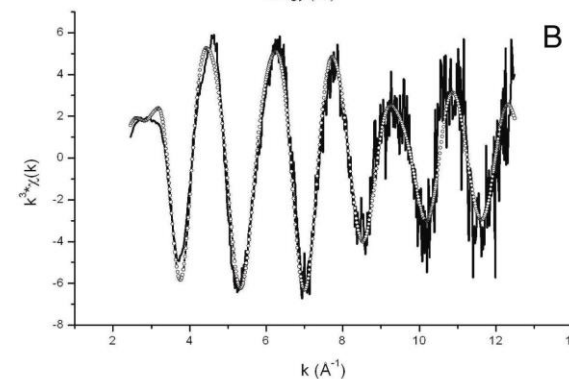
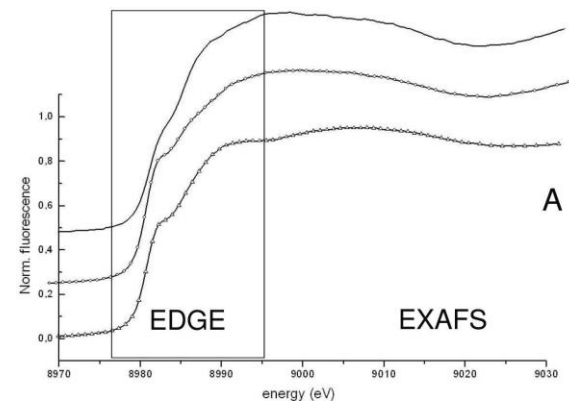


Cu(I)DR1885 $\Delta E = -10.3$ eV

	Ligand	r(Å)	$2\sigma^2 \cdot 10^3 (\text{\AA}^2)$	R-exafs	ϵ (fit index)
Fit1 (1shell)	2S	2.299	4(1)	0.446	0.49
Fit2 (1shell)	3S	2.301	9(1)	0.403	0.41
Fit3 (2shells)	3S	2.300	8(1)	0.334	0.29
	1N [§]	1.982	4(1)		
Fit4 (2shells)	3S	2.303	8(1)	0.305	0.27
	1N*	1.999	7(2)		

§ no MS

*His, MS



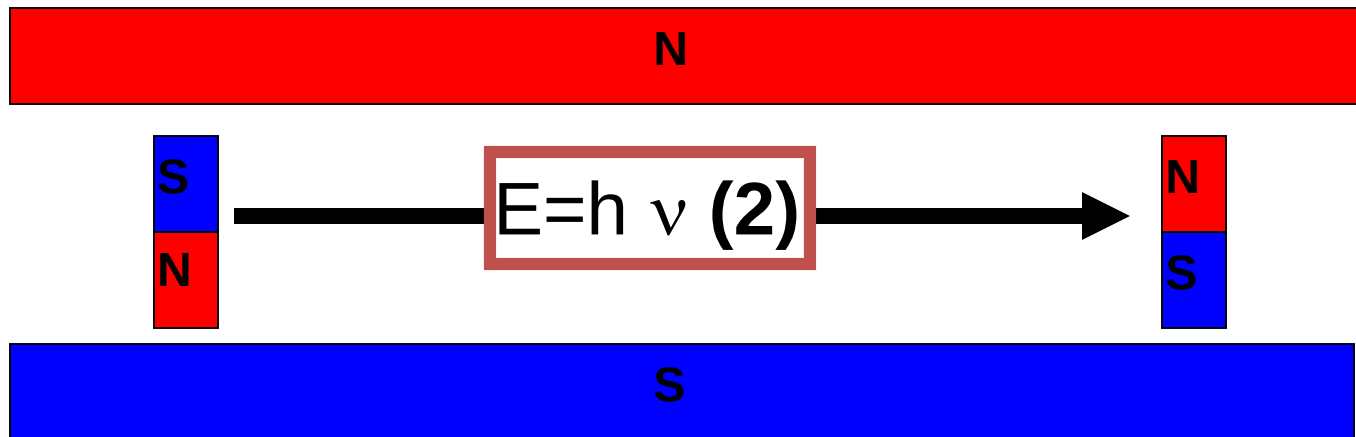
NMR

1) Jaderný spin $\neq 0$ (^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{31}P)

- počet neutronů **a** počet protonů jsou sudá čísla ($^{12}\text{C}=6\text{p}+6\text{n}$) $\Rightarrow$ **nulový spin**
- počet neutronů **plus** počet protonů je liché číslo ($^1\text{H}=\text{p}$, $^{13}\text{C}=6\text{p}+7\text{n}$) $\Rightarrow$ **neceločíselný spin** (i.e. $\frac{1}{2}$, $\frac{3}{2}$, $\frac{5}{2}$)
- počet neutronů **a** počet protonů jsou lichá čísla ($^2\text{H}=\text{p}+\text{n}$) $\Rightarrow$ **celočíselný spin** (i.e. 1, 2, 3)

1) $\nu = \gamma \cdot B$ (1) – pokud vložíme do magnetického pole intenzity **B**, jádro mající nenulový spin může absorbovat foton frekvence ν . Frekvence ν závisí na gyromagnetickém poměru γ jader

2) Z kvantové mechaniky víme, že spin **I** může nabývat **2I + 1** orientací $\Rightarrow$ **jádro se spinem $\frac{1}{2}$ může mít dvě orientace v externím magnetickém poli – nižší / vyšší energie**



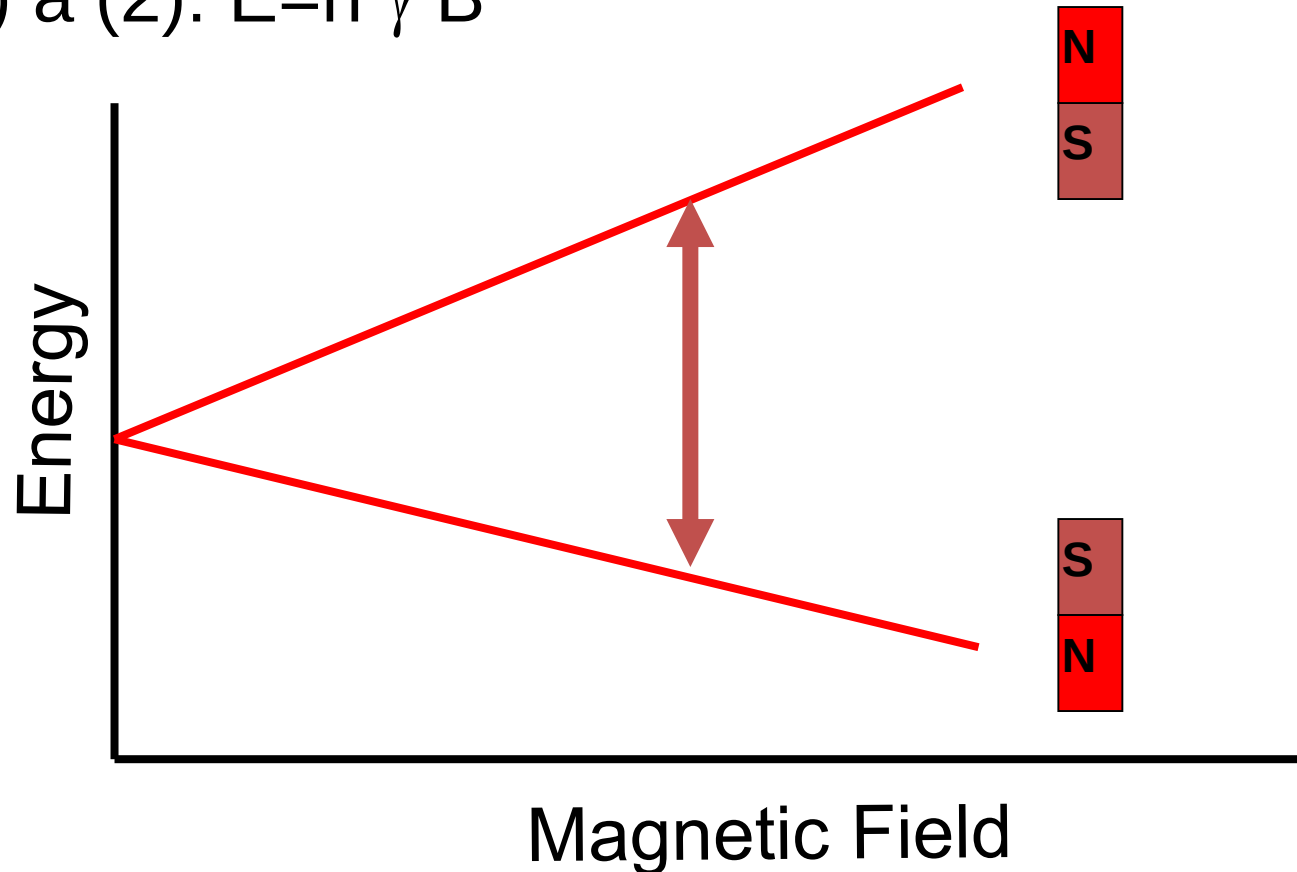
Resonanční podmínka $\omega_0 = -\gamma B_0$

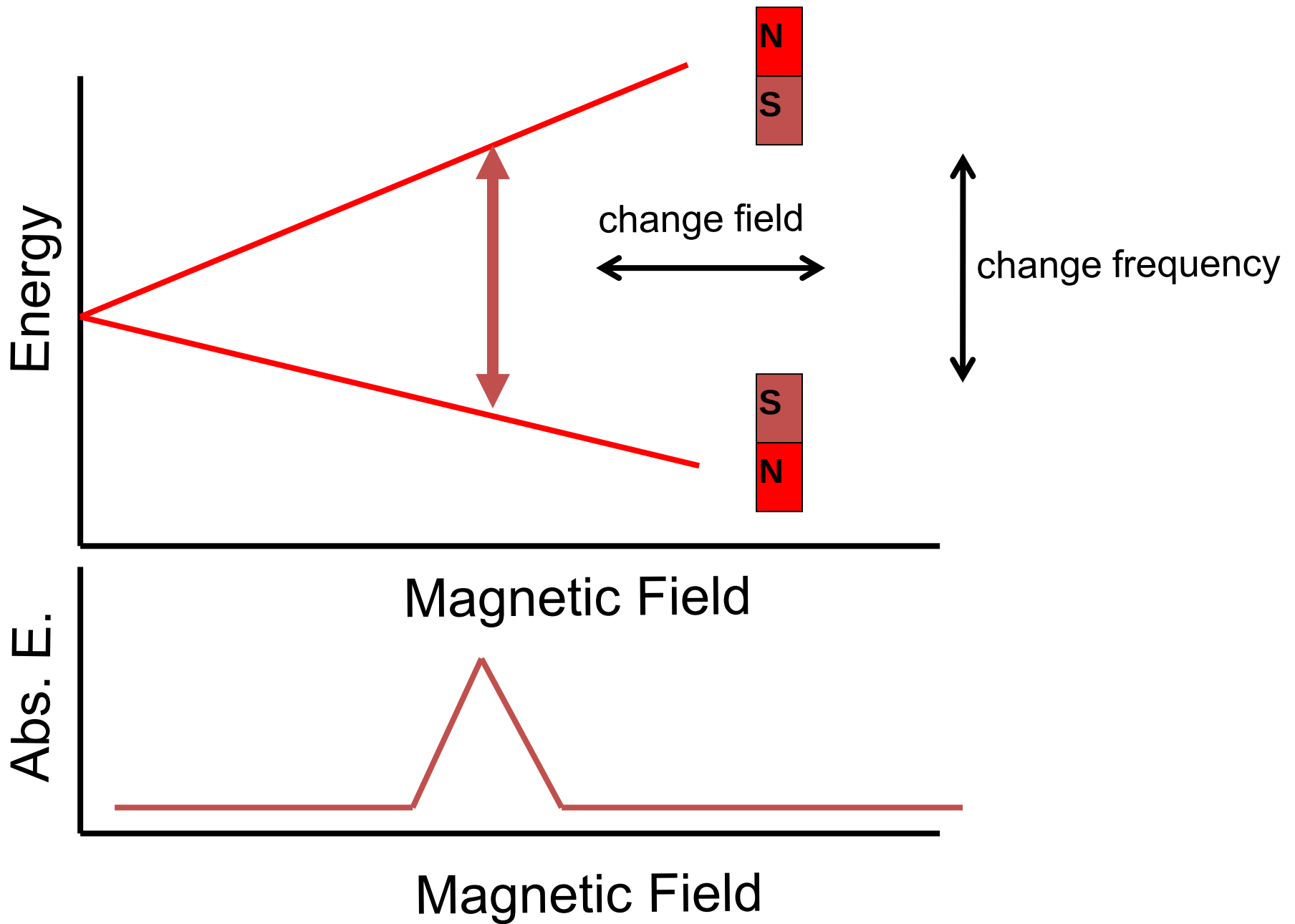
Isotope	Ground state spin	Natural abundance	Magnetogyric ratio $\gamma/\text{rad s}^{-1} \text{T}^{-1}$	NMR frequency at 11.7433 T ($\omega_0/2\pi$)/MHz
^1H	1/2	~100	267.522×10^6	500.000
^2H	1	0.015%	$41\,066 \times 10^6$	76.753
^3H	1/2	0	$285\,349 \times 10^6$	533 370
^{10}B	3	19.9	$28\,747 \times 10^6$	53 718
^{11}B	3/2	80.1%	85.847×10^6	-160 420
^{13}C	1/2	1.1%	67.283×10^6	125.725
^{14}N	1	99.6%	19.338×10^6	36 132
^{15}N	1/2	0.37%	$-27\,26 \times 10^6$	50.684
^{17}O	5/2	0.04%	-36.281×10^6	+67 782
^{19}F	1/2	~100%	251.815×10^6	-470.470
^{23}Na	3/2	~100%	70.808×10^6	-132 259
^{27}Al	5/2	~100%	69.763×10^6	- 30 285
^{29}Si	1/2	4.7%	-53.190×10^6	99.336
^{31}P	1/2	~100%	108.394×10^6	-202.606
^{35}Cl	3/2	75.77%	10.610×10^6	-48 990
^{37}Cl	3/2	24.23%	8.832×10^6	-40.779
^{63}Cu	3/2	69.17%	71.118×10^6	132 577
^{65}Cu	3/2	30.83%	76.044×10^6	-142.018
^{107}Ag	1/2	51.84%	-10.889×10^6	+ 20.239
^{109}Ag	1/2	48.16%	12.518×10^6	+23.268
^{129}Xe	1/2	24.4%	74.521×10^6	+ 139.045
^{207}Pb	1/2	22.1%	55.805×10^6	-104 603
^{12}C	0	98.9%		
^{16}O	0	~100%		

Nuclear Magnetic Resonance

Stručně

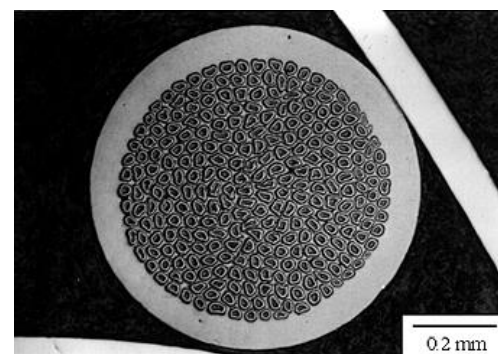
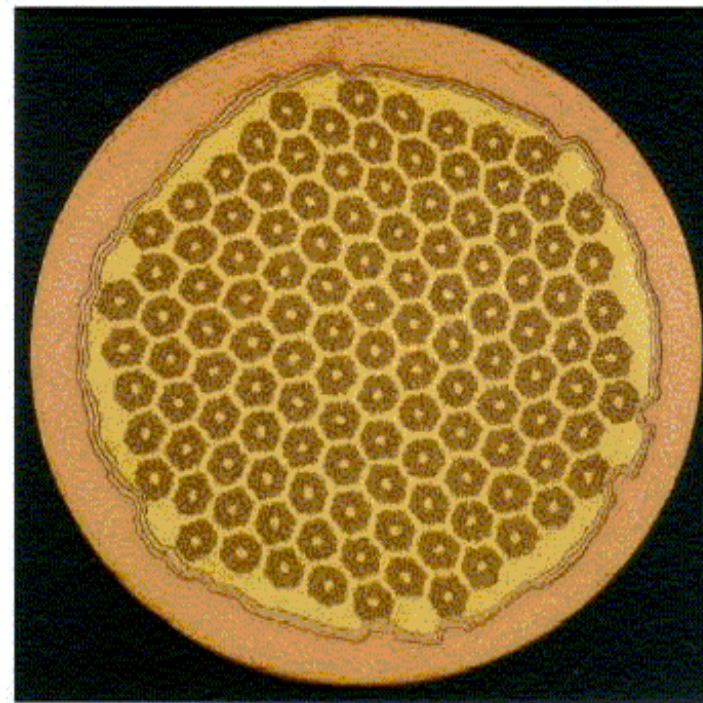
Z (1) a (2): $E = h \gamma B$



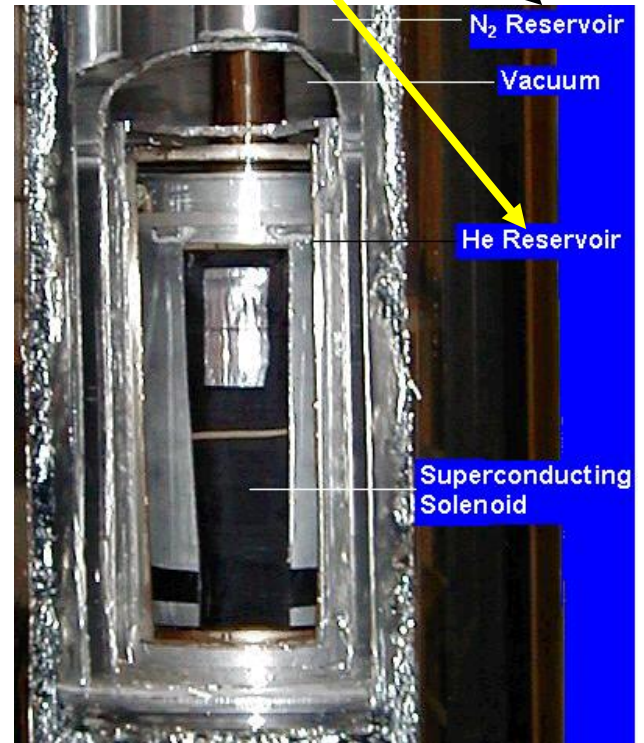
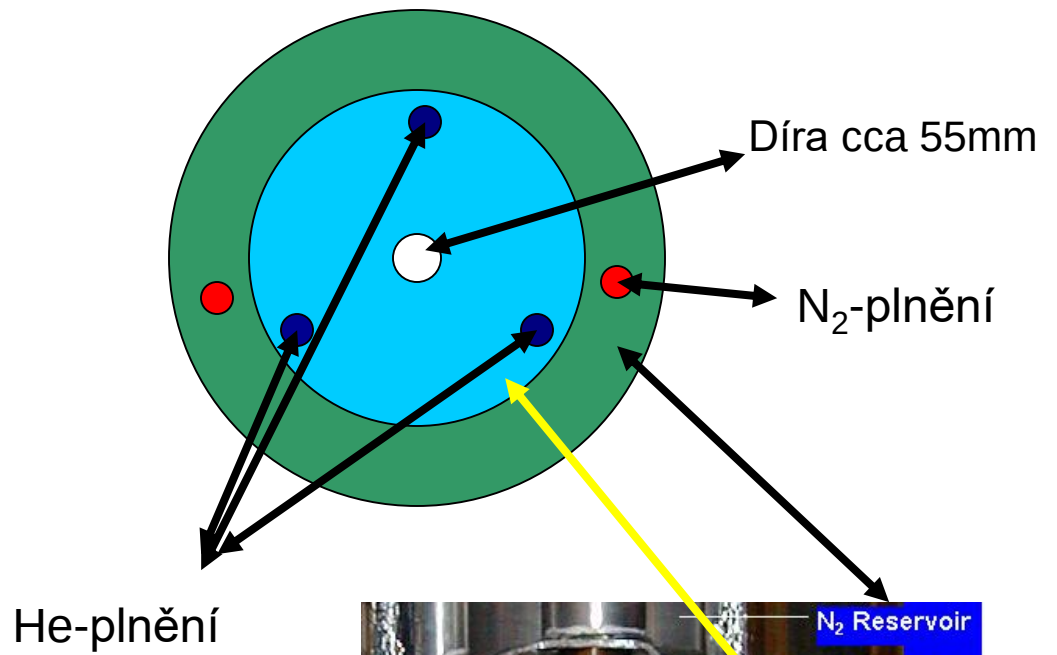


Magnet

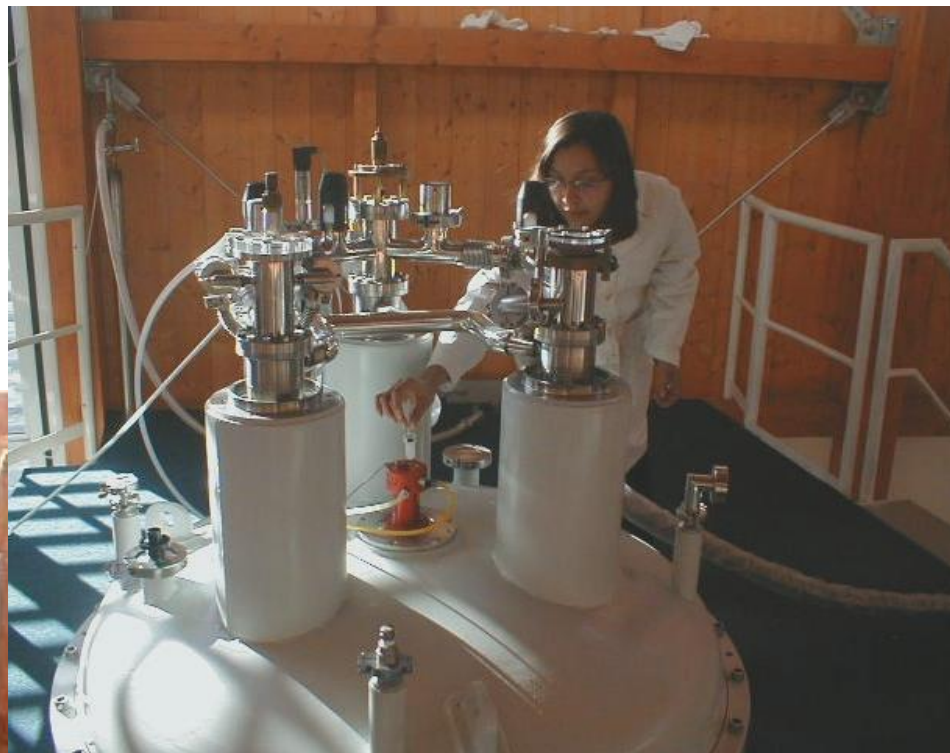
- supravodivé solenoidy na bázi Nb a Sn ponořené do heliové a dusíkové lázně
- He-lázeň **$\sim 4\text{ K}$** dále snížena J-T pumpou na **$\sim 2.1\text{ K}$**
- v současnosti až 22 Tesla



$(\text{Nb}, \text{Ta})_3\text{Sn}$ supravodič o šířce 0.81 mm s 271 vlákny vnořenými do OFHC měděné matrice



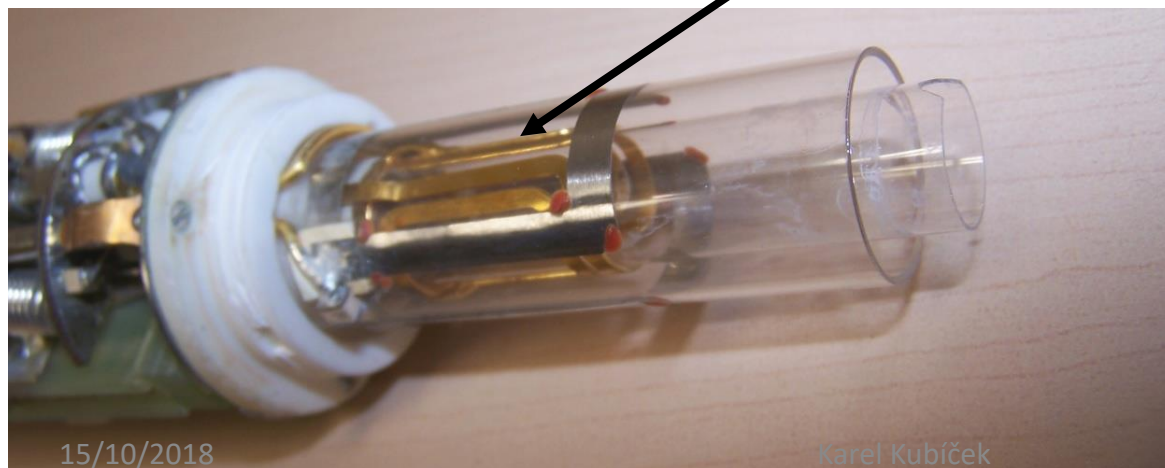
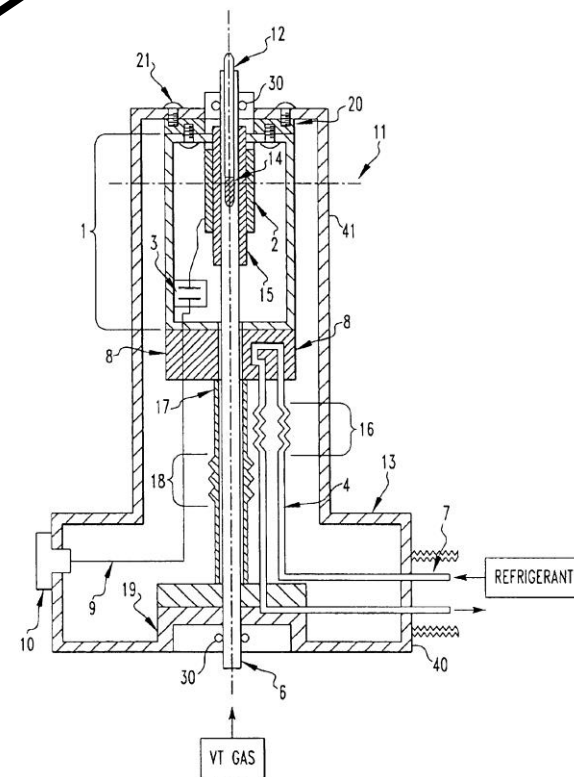
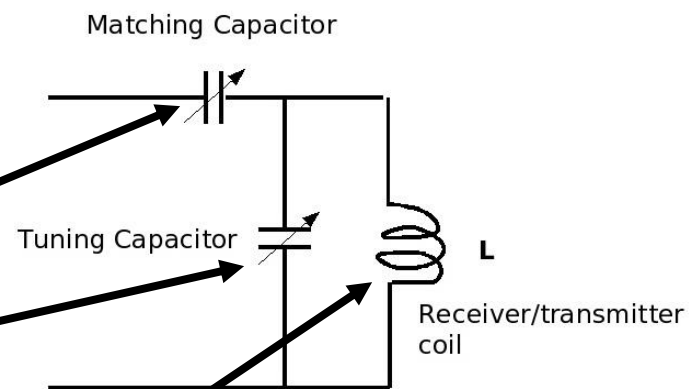
NMR spektrometr



Magnetické pole země

$\sim 50\mu\text{T}$

NMR měřicí sonda



Spektrometr

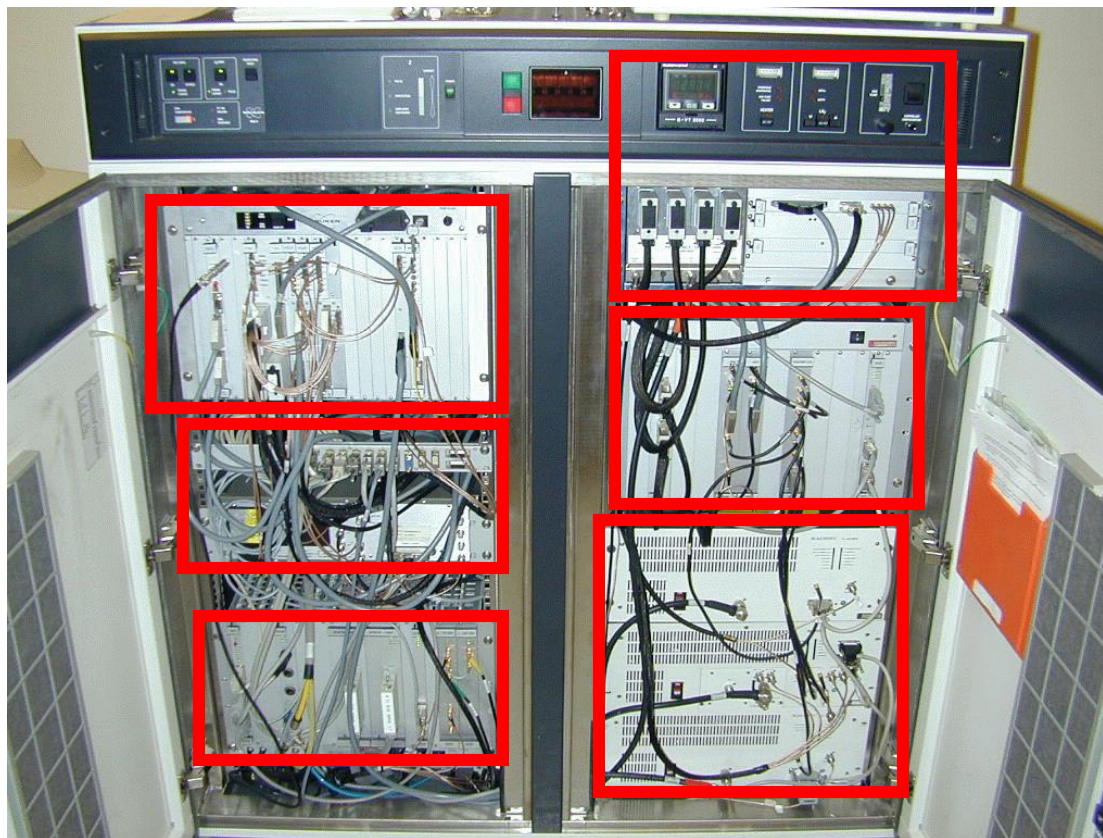
CBU

**Control board
unit**

FGU

**Frequency
gen. u.**

Shimms

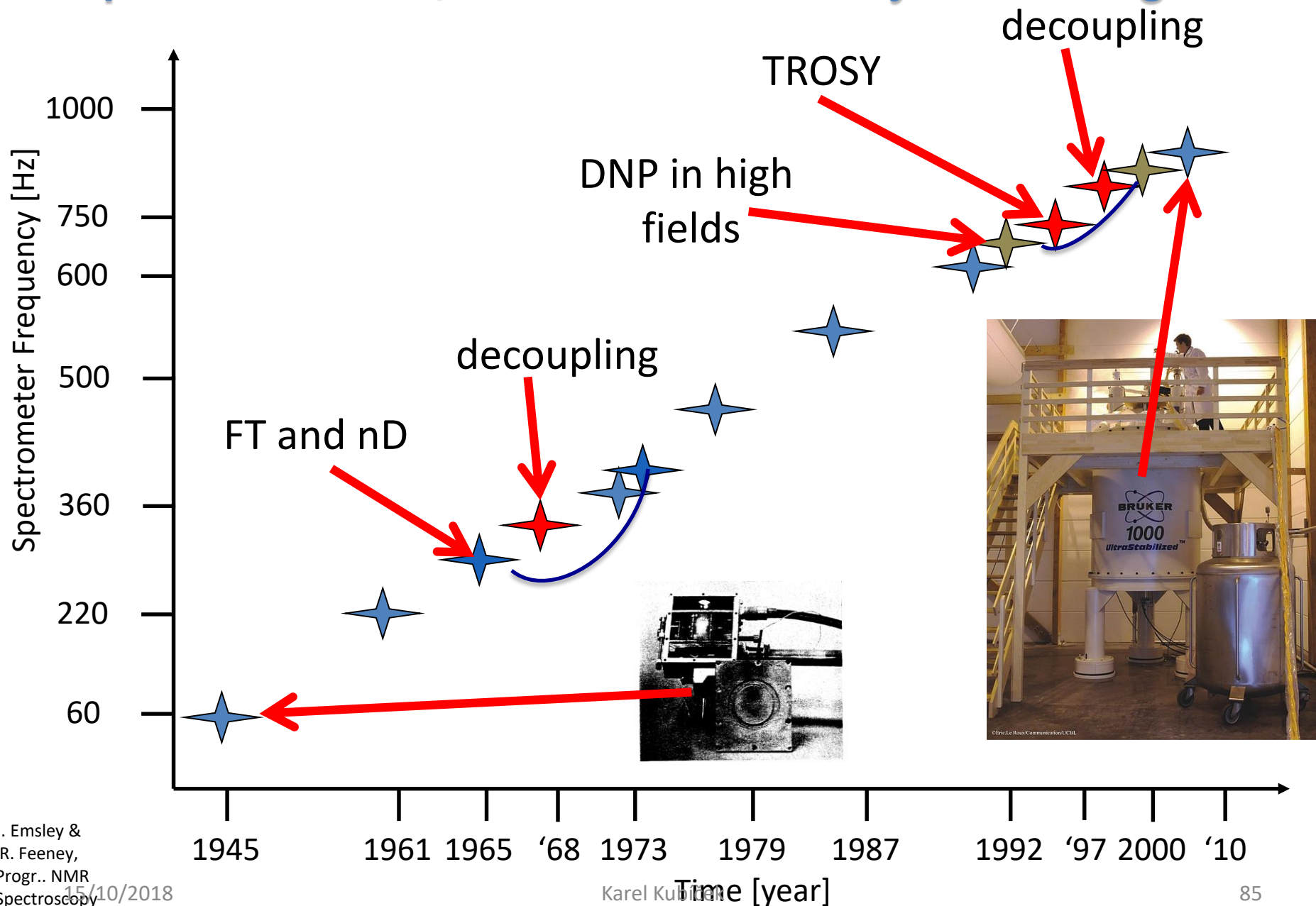


**Temperature
Unit**

**AcquisitionCon
troller**

Transmitter

Zlepšení citlivosti, rozlišení a intenzity NMR magnetů



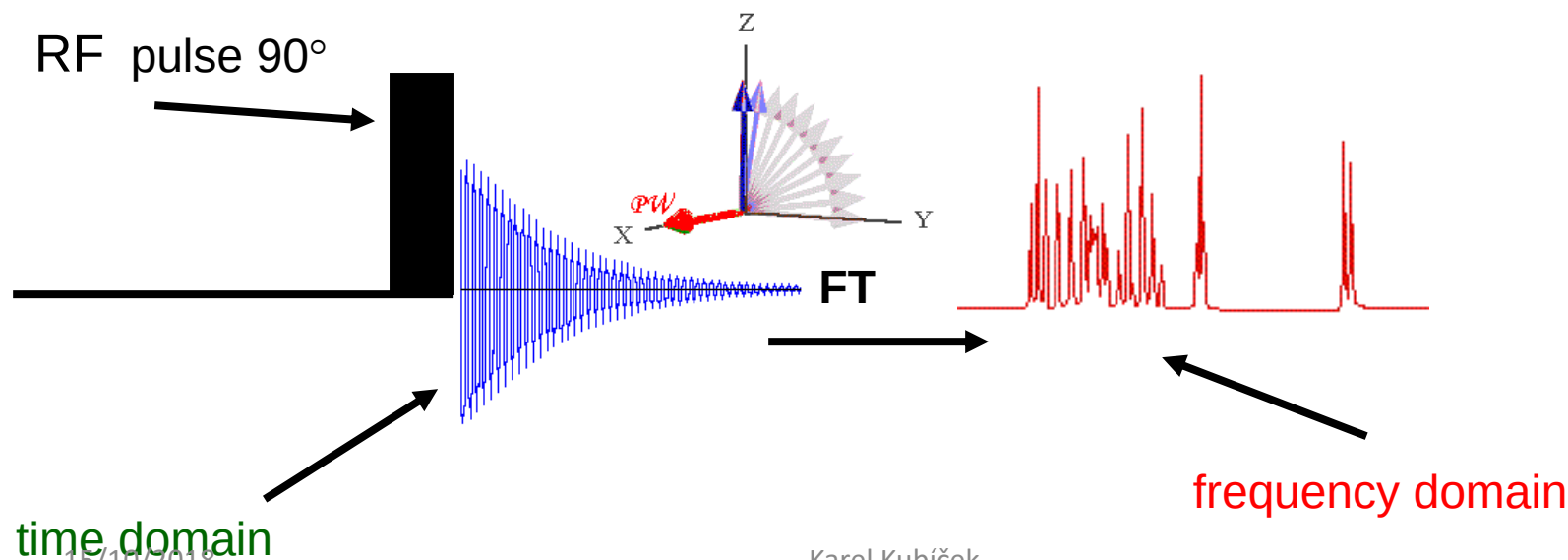
CW vs. Fourier transform NMR

Solution II.

FT-NMR $\Rightarrow$ *all frequencies* in a spectrum are *irradiated simultaneously* with a radio frequency pulse.

Following the pulse, the nuclei return to thermal equilibrium. A *time domain* emission signal is recorded by the instrument as the nuclei relax.

A *frequency domain* spectrum is *obtained by Fourier transformation*.





Isidor Isaac Rabi

Nobelova cena za *fyziku* v r. **1944**

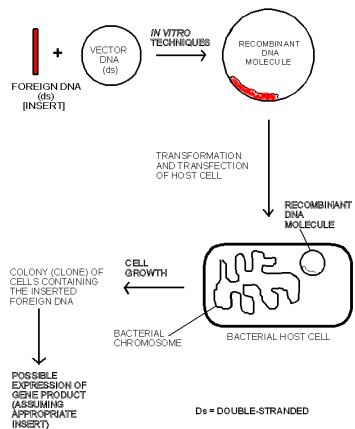
“for his resonance method for recording the magnetic properties of atomic nuclei”

Bloch & Purcell *fyzika* **1952** “for their development of new methods for nuclear magnetic precision measurements and discoveries in connection therewith”

Ernst *chemie* **1991** “for his contributions to the development of the methodology of high resolution nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy”

Wüthrich *chemie* **2002** “for his development of nuclear magnetic resonance spectroscopy for determining the three-dimensional structure of biological macromolecules in solution”



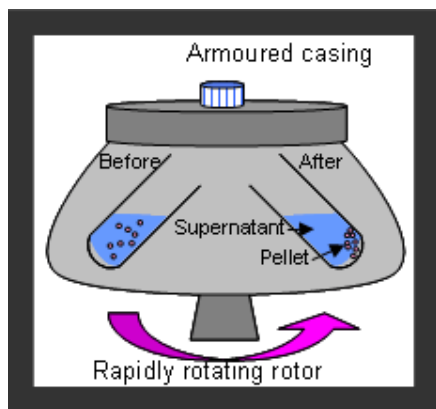


NH_4Cl , 37°C

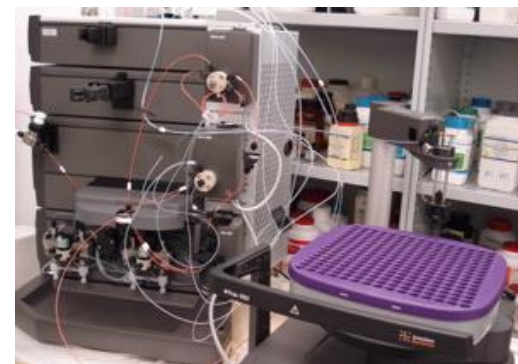
^{13}C -glukosa



supernatant odstraníme odstředěním

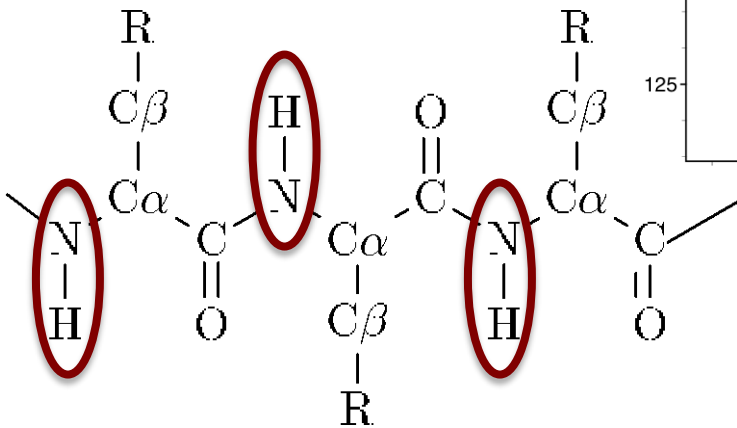
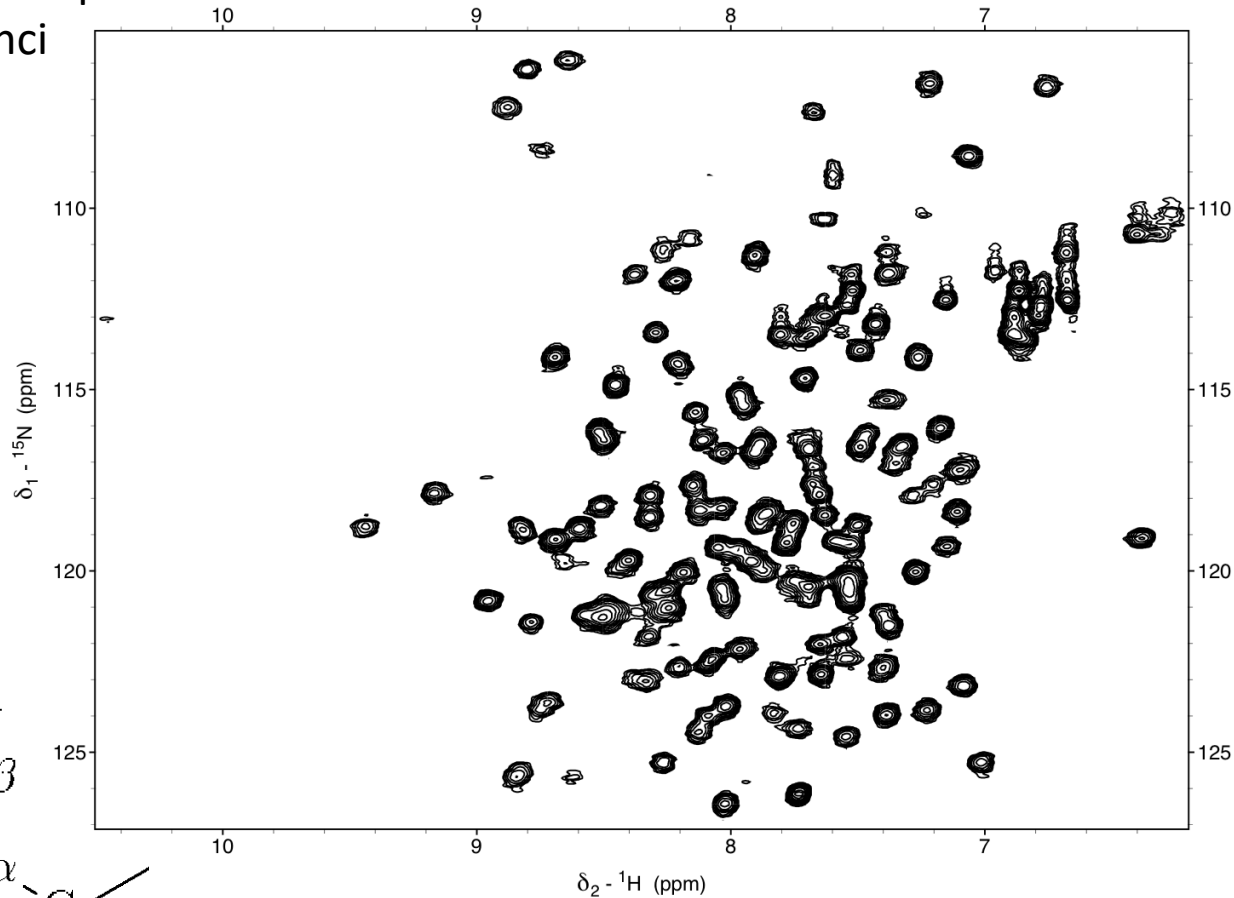


ultra-centrifugace



^{15}N - ^1H HSQC

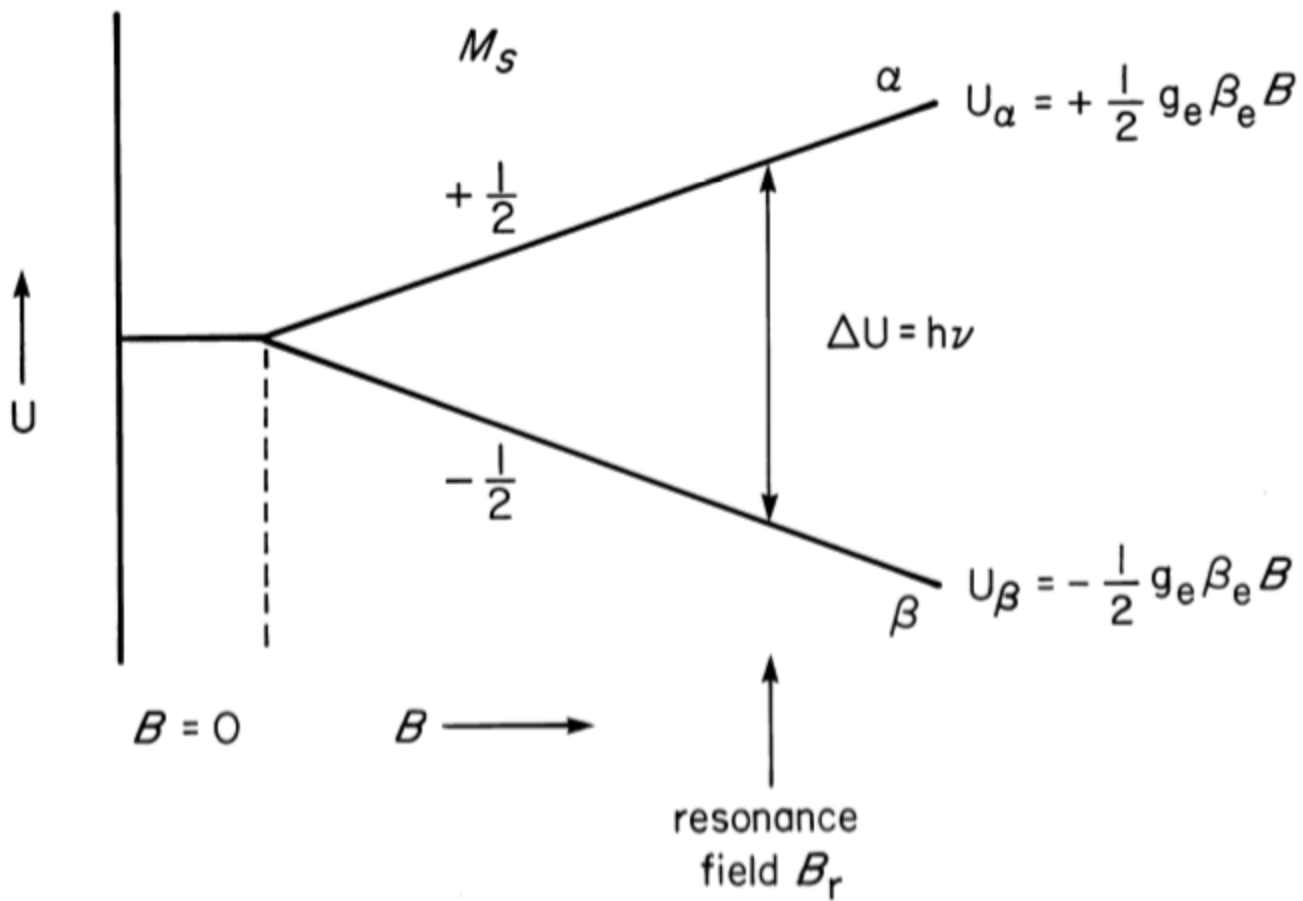
- 1) 1 peak $\cong$ 1 amino kyselina
- 2) Excelent info o strukturovanosti protein
- 3) Žádné info o primární sekvenci



EPR - Electron Paramagnetic Resonance

When the molecules exhibit **paramagnetism** as a result of **unpaired electron** spins, transitions can be induced between spin states by applying a **magnetic field** and then supplying **electromagnetic energy**, usually in the **microwave range** of frequencies. The **resulting absorption spectra** are described as electron spin resonance (**ESR**) or electron paramagnetic resonance (**EPR**).

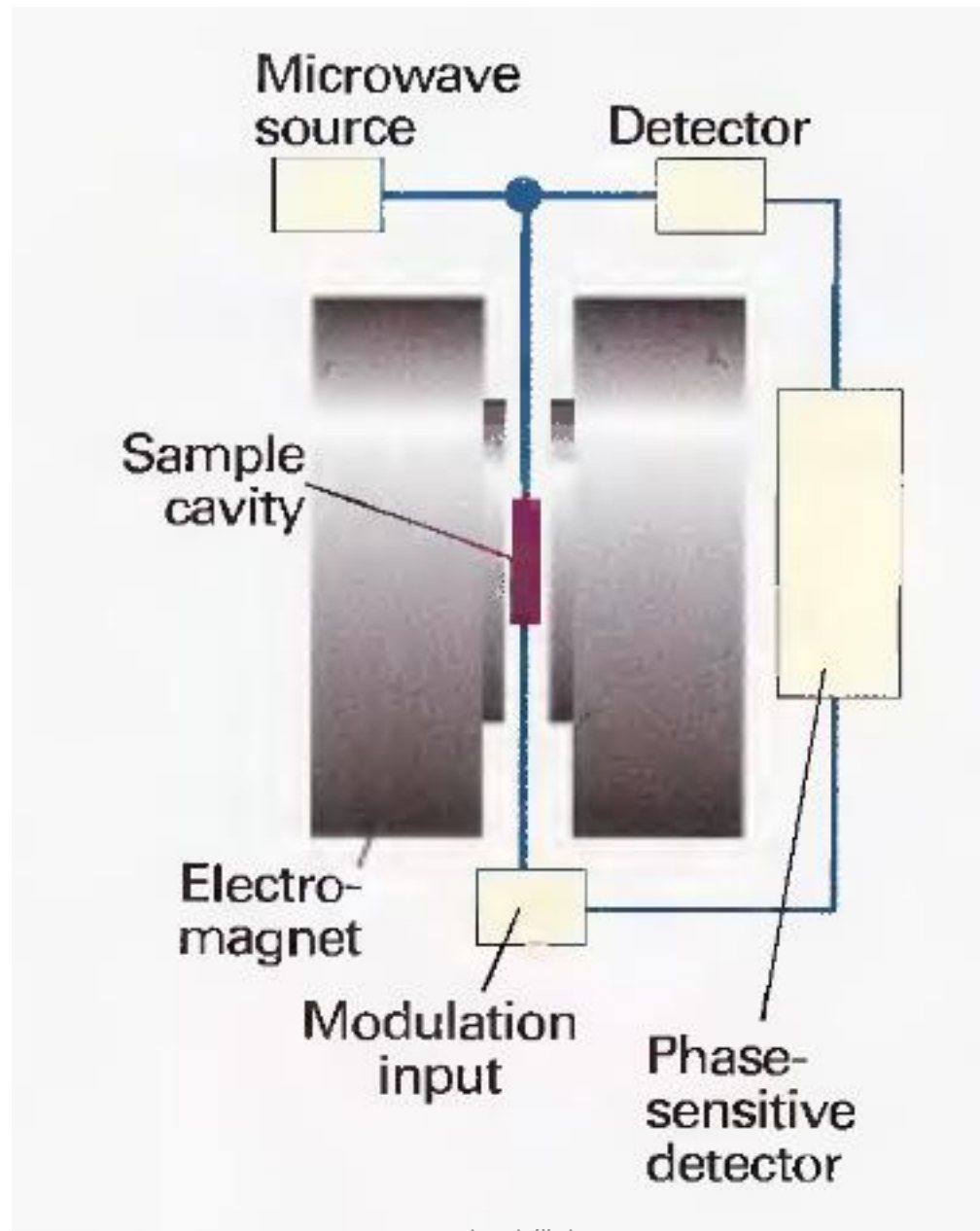
1st EPR experiment in Kazan (Tatarstan, USSR), E.K.Zavoisky on $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, rf source @133 MHz.



$$\mathcal{B}_{\text{loc}} = \mathcal{B} + am_I \quad m_I = \pm \frac{1}{2}$$

$$h\nu = g\mu_B(\mathcal{B} - \frac{1}{2}a) \quad \mathcal{B} = \frac{h\nu}{g\mu_B} - \frac{1}{2}a$$

$$h\nu = g\mu_B(\mathcal{B} + \frac{1}{2}a) \quad \mathcal{B} = \frac{h\nu}{g\mu_B} + \frac{1}{2}a$$



Waveband	L	S	C	X	P	K	Q	U	V	E	W	F	D	—	J	—
λ/mm	300	100	75	30	20	12.5	8.5	6	4.6	4	3.2	2.7	2.1	1.6	1.1	0.83
ν/GHz	1	3	4	10	15	24	35	50	65	75	95	111	140	190	285	360
B_0/T	0.03	0.11	0.14	0.33	0.54	0.86	1.25	1.8	2.3	2.7	3.5	3.9	4.9	6.8	10.2	12.8

L band	1 to 2 GHz
S band	2 to 4 GHz
C band	4 to 8 GHz
X band	8 to 12 GHz
K _u band	12 to 18 GHz
K band	18 to 26.5 GHz
K _a band	26.5 to 40 GHz
Q band	30 to 50 GHz
U band	40 to 60 GHz
V band	50 to 75 GHz
E band	60 to 90 GHz
W band	75 to 110 GHz
F band	90 to 140 GHz
D band	110 to 170 GHz

Common Electromagnets for EPR Spectroscopy

Interfaced to high-class, matched power supplies with superior linear current output

Bruker Biospin supplies a range of electromagnets and a choice of power supplies and [heat exchangers](#).

The electromagnets are specifically designed for the needs of EPR, i.e. high field homogeneity over a large volume. They are interfaced to high-class, matched power supplies with superior linear current output. To further boost the specifications, each magnet system is fully remote controlled by Bruker BioSpin's proprietary field controllers and optional Teslameters. Key highlight is the full sweep capability combined with virtually unlimited digital resolution.



Special Magnet systems

- 13? with 15 kW, 13? with 22.5 kW
- L-Band magnet with 120 mm air gap ([ELEXSYS E540 EPR-Imaging](#))
- W-Band super conducting magnet ([ELEXSYS E600/680 System](#))

	ER 070 6" / 15 cm 3 Ω 500 kg	ER 075 9.5" / 24 cm 3 Ω 800 kg	ER 073W 10" / 25 cm 3 Ω 1780 kg	ER 073 10" / 25 cm 3 Ω 1780 kg	
	60 mm	62 mm	100 mm	72 mm	56 mm
ER 080 1 kW / 45 kg	6.0 kG				
ER 081 2.7 kW / 55 kg		9.0 kG	7.0 kG	10 kG	13 kG
ER 083 12 kW / 210kg		13.0 kG	11.0 kG	14.5 kG	17 kG

L-, S-, and X-Band

L-, S-, and X-Band

All (not W-Band)

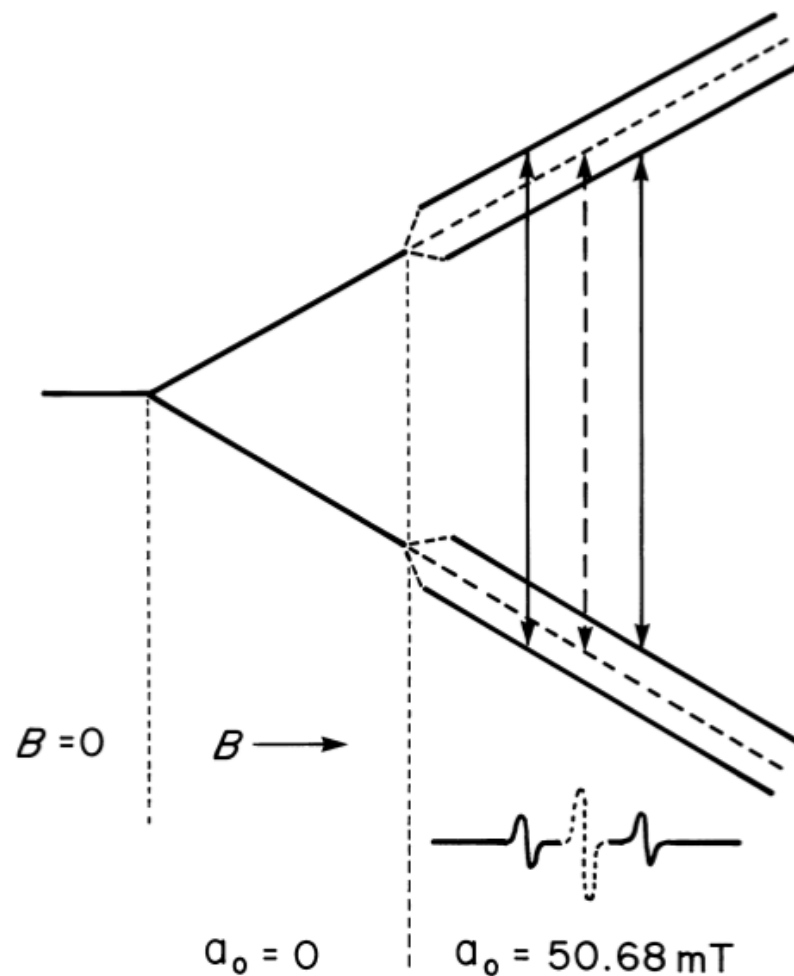
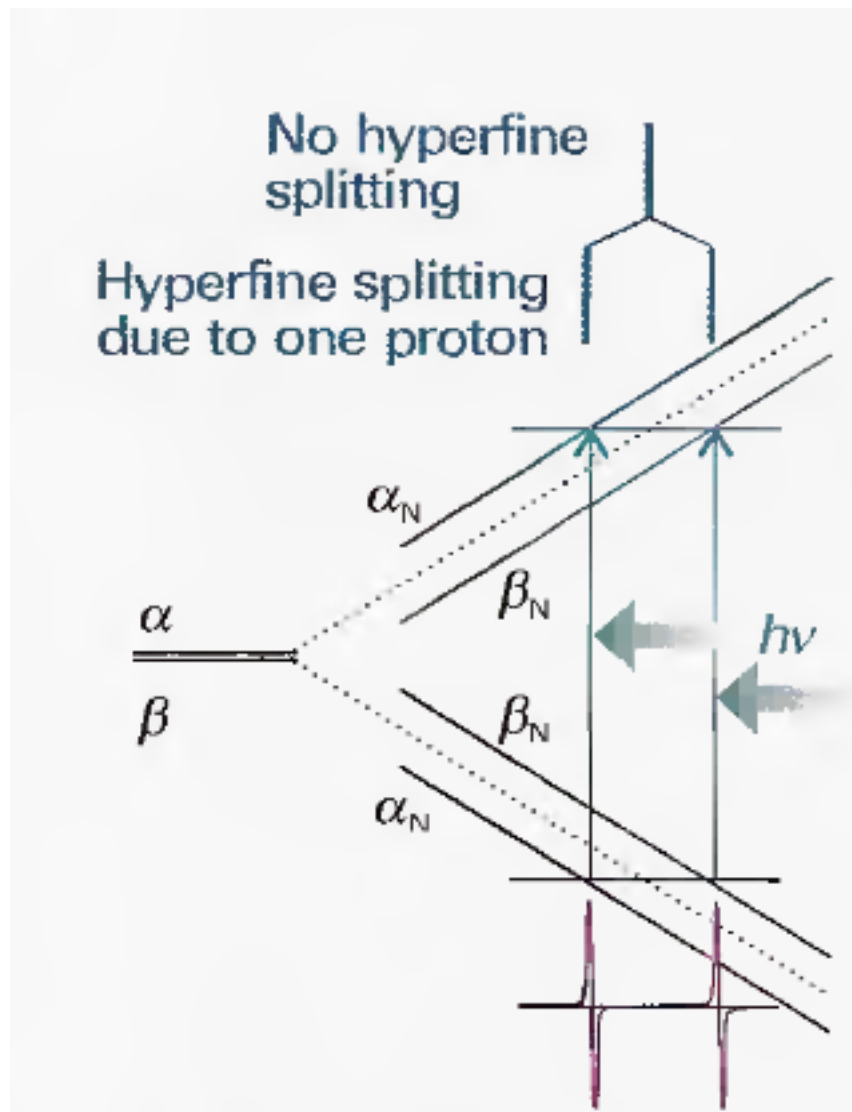
Magnet Systems: Magnet & Power Supply

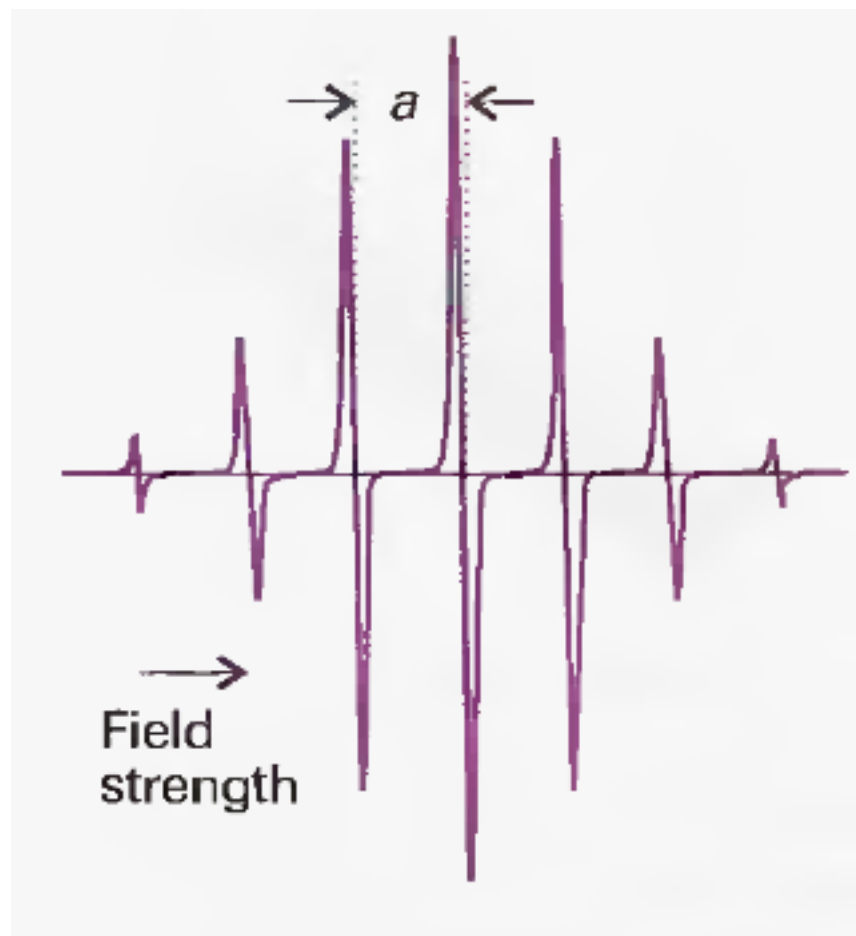
Our range of magnet systems allow a perfect match to your budget as well as your performance requirements today and in the future. Just two examples:

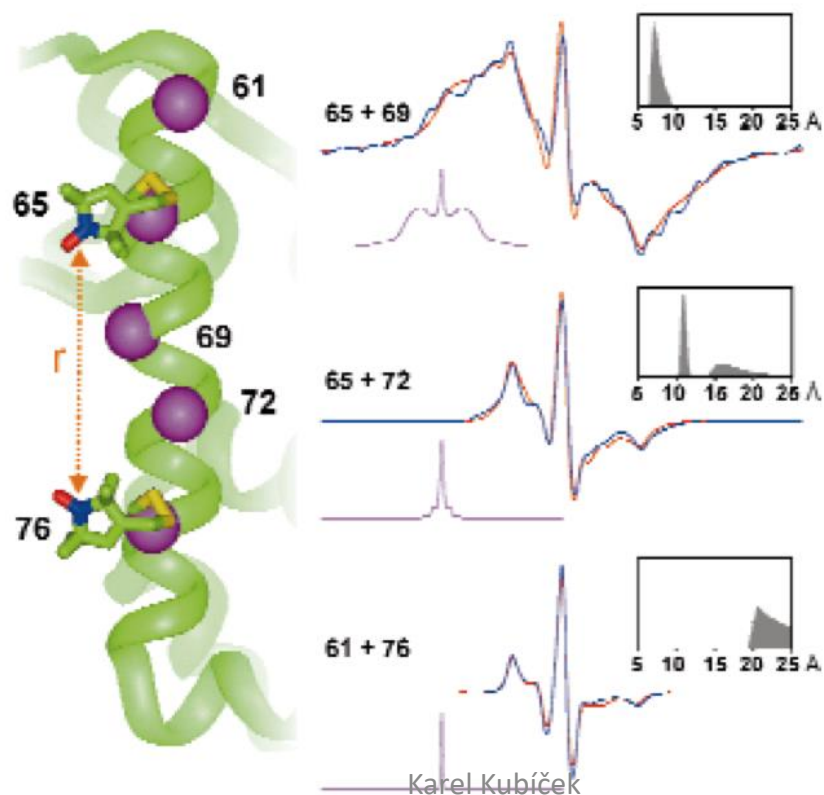
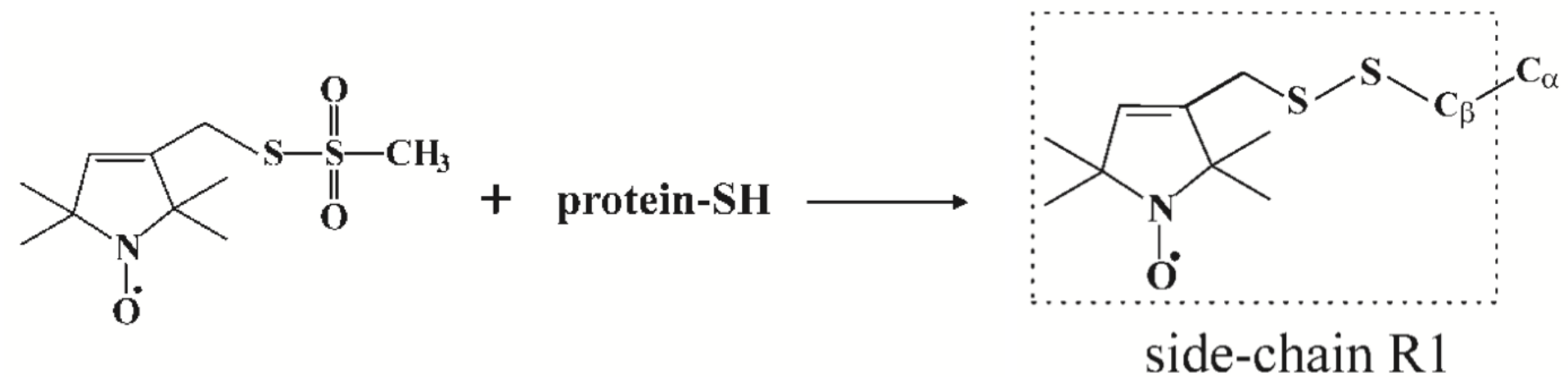
- A 6" magnet (ER 070) interfaced to a 1 kW power supply (ER/EMX 080) is the choice for routine X-Band EPR spectroscopy.
- A 10" magnet (ER 073) with 12 kW power supply (ER 083) enables X-Band and up to Q-Band operation providing [multifrequency EPR](#) capabilities.

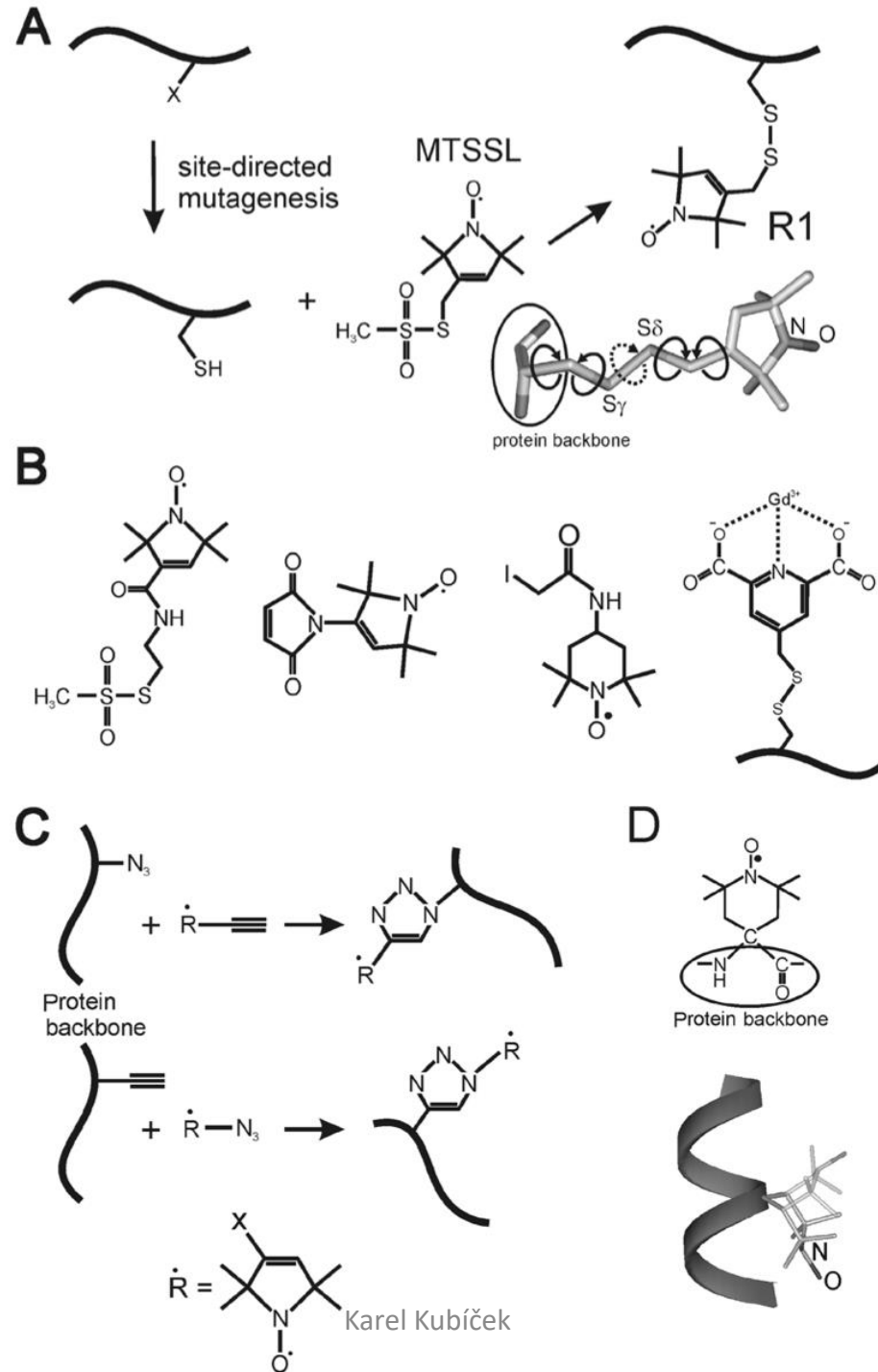
An unpaired electron can move between the two energy levels by either absorbing or emitting a photon of energy $h\nu$ such that the resonance condition, $h\nu = \Delta E$, is obeyed. This leads to the fundamental equation of EPR spectroscopy: $h\nu = g_e \mu_B B_0$.

Experimentally, this equation permits a large combination of frequency and magnetic field values, but the great majority of EPR measurements are made with microwaves in the **9000–10000 MHz** (9–10 GHz) region, with fields corresponding to about 3500 G (0.35 T). Furthermore, EPR spectra can be generated by **either varying the photon frequency** incident on a sample **while holding the magnetic field constant or doing the reverse**. In practice, it is **usually the frequency that is kept fixed**.

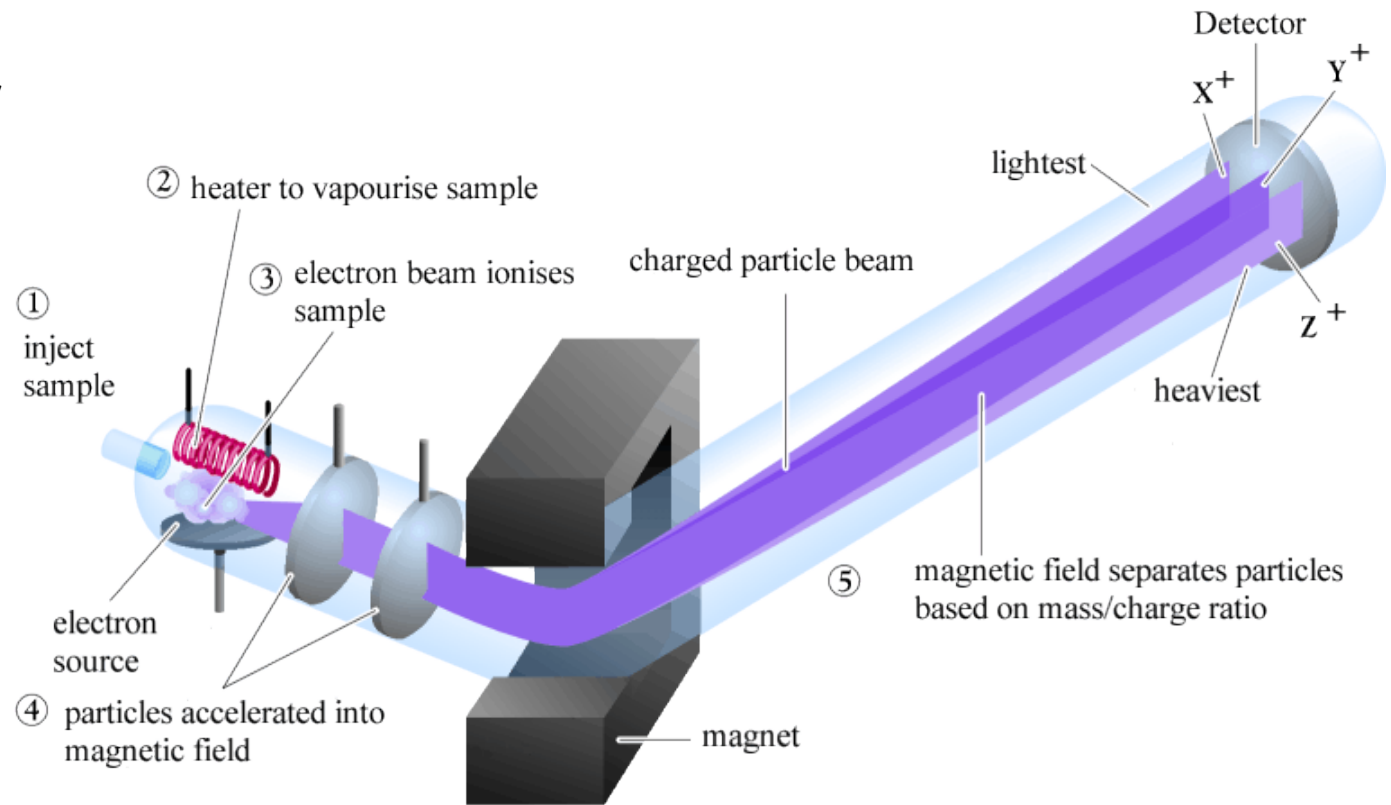








Mass spectrometry

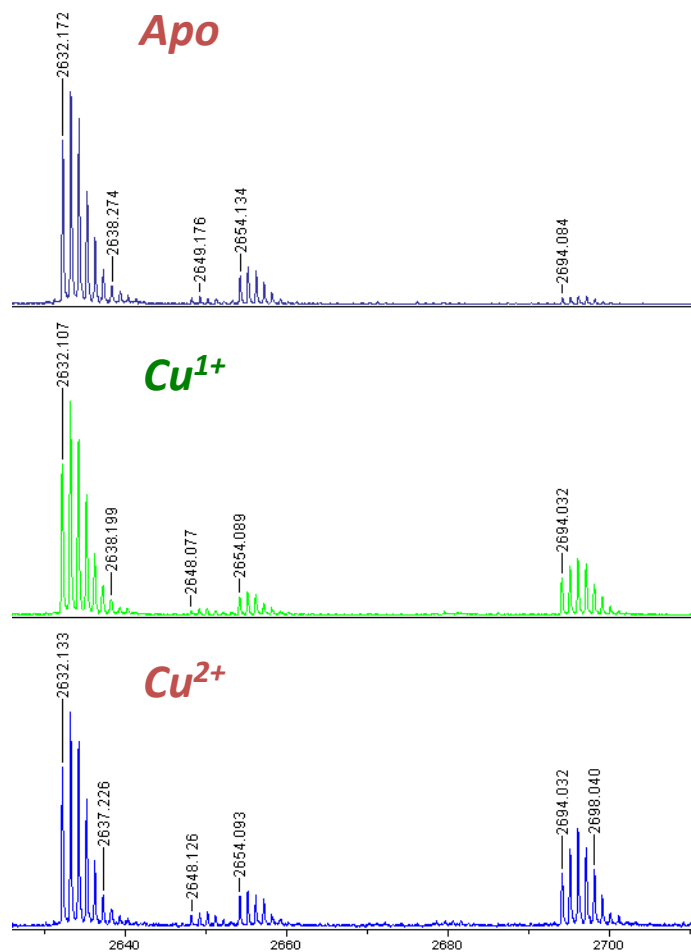


Mass spectrometry is among the most accurate techniques for the determination of molar masses. The procedure consists of ionizing the sample in the gas phase and then measuring the mass-to-charge number ratio (m/z) of all ions. Macromolecules present a challenge because it is difficult to produce gaseous ions of large species without fragmentation. However, two new techniques have emerged that circumvent this problem: **matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI)** and **electrospray ionization**. We shall discuss **MALDI-TOF mass spectrometry**, so called because the MALDI technique is coupled to a time-of-flight (TOF) ion detector.

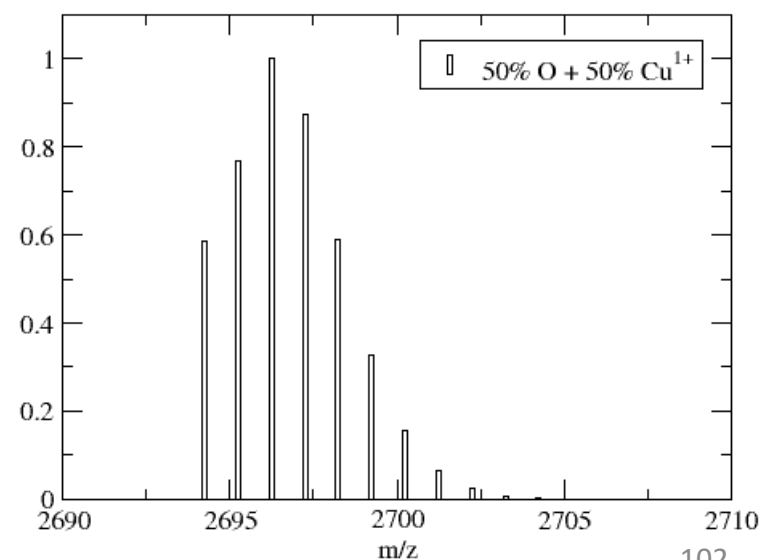
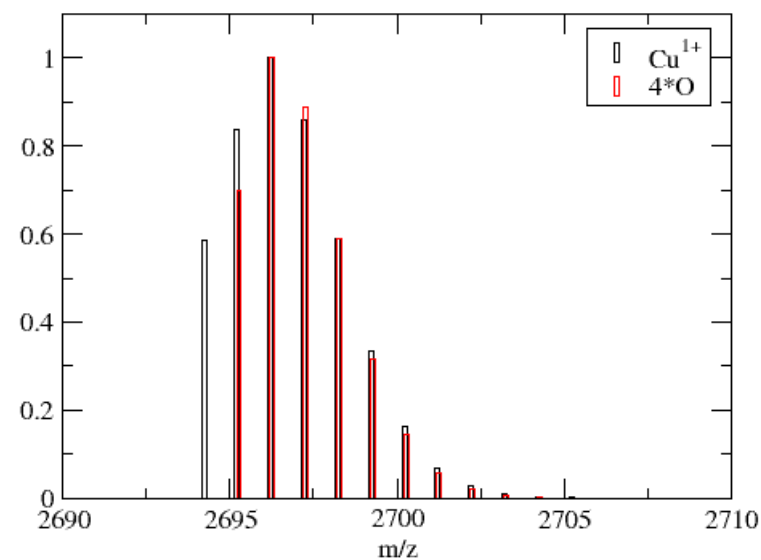
Peptide Mapping with MALDI TOF

Tryptic digestion o/n 1:30-50 (trypsin:protein)

Analysis with PAWS (Genomic Solutions, Inc.)



L61-K87



Metody založené na měření mechanických a elektrických vlastností makromolekul

Velikost a tvar makromolekul můžeme studovat na základě měření:

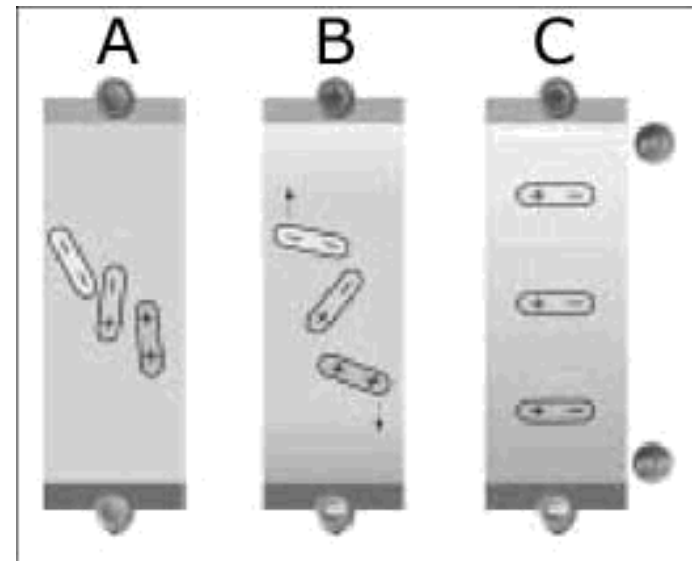
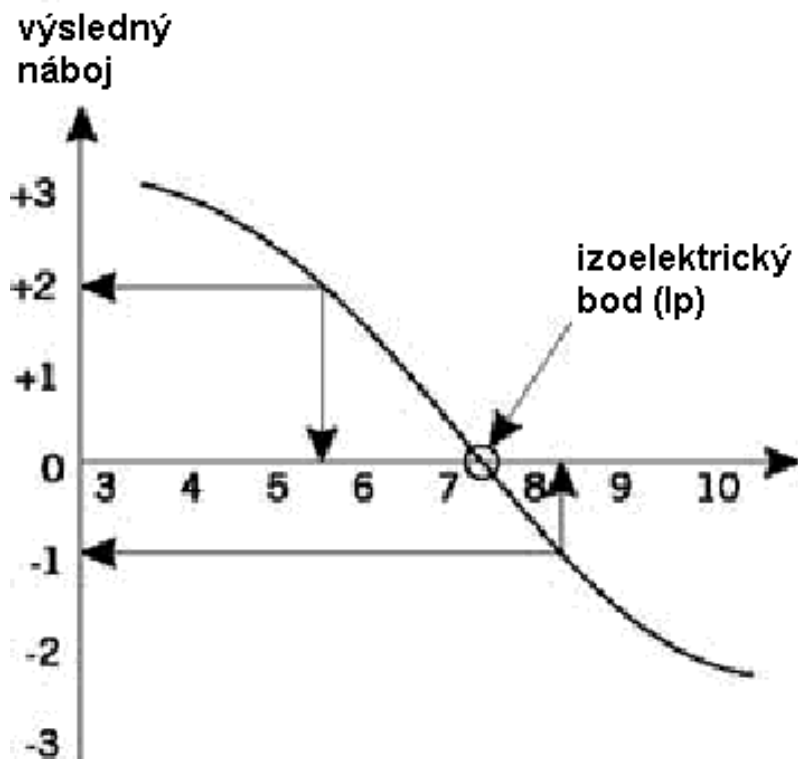
- Osmotického tlaku (velikost, přednáška "Termodynamika a život")
- Difuzního koeficientu (velikost, přednáška "Termodynamika a život")
- Viskozita (tvar, praktická cvičení)
- Sedimentace (velikost, přednáška "Zařízení pro elektrochemickou analýzu. Pomocné laboratorní přístroje "

Dále můžeme použít:

- Elektronovou mikroskopii (velikost a tvar, přednáška "Mikroskopie")
- Chromatografii – molekulárně síťový efekt u gelové permeační chromatografie (chemie)
- Elektroforézu (konec této části přednášky)

Elektrochemické vlastnosti koloidů

Koloidy jsou roztoky, které obsahují částice o velikosti 10 – 1000 nm. Některé molekulární i micelární koloidy jsou polyelektrolyty s amfoterními vlastnostmi. Tyto amfolyty se chovají buď jako zásady nebo kyseliny v závislosti na pH prostředí.



U bílkovin se mění počet skupin $-\text{NH}_3^+$ a $-\text{COO}^-$.

Vznik elektrické dvojvrstvy na povrchu koloidní částice

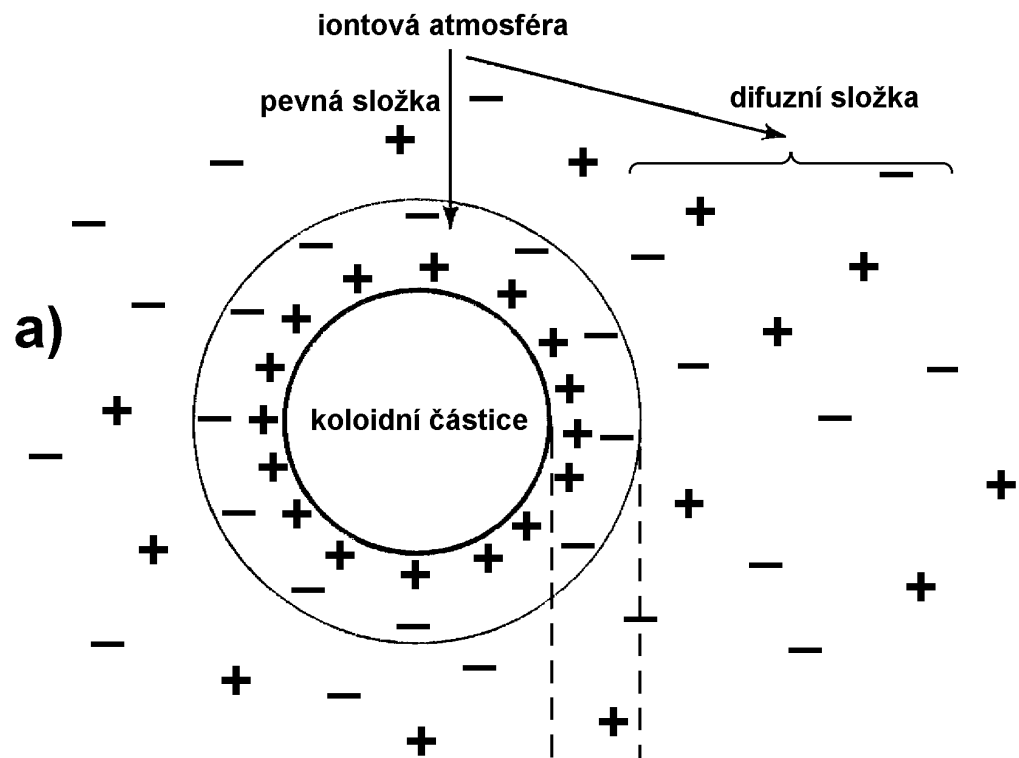
Dva mechanismy:

- Adsorpce iontů (i u hydrofobních koloidů)
- Elektrolytická disociace (převažuje u hydrofilních koloidů)

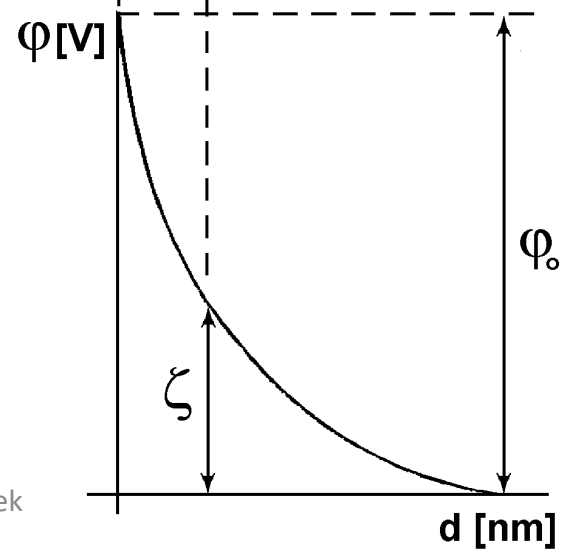
Dvojvrstva na povrchu částice se liší v koncentrovaných a zředěných elektrolytech.

U zředěných elektrolytů můžeme v celé iontové atmosféře částice rozlišit stabilní, difuzní a elektroneutrální oblast.

Elektrokinetický potenciál – ζ (zeta)-potenciál



b)



Elektroforéza

- Elektroforéza – pohyb nabitých molekul v elektrickém poli. Při rovnoměrném přímočarém pohybu **sférické** částice o poloměru r , je elektrostatická síla působící na částici v rovnováze se silou tření, jež je dána viskozitou. Sílu tření lze vypočítat dle **Stokesova vzorce**:

$$F = 6 \cdot \pi \cdot r \cdot \eta \cdot v$$

kde v je rychlost částice a η je dynamická viskozita prostředí.

- Elektrické pole působí na částici silou:

$$F = z \cdot e \cdot E$$

kde z je počet elementárních nábojů nesených částicí, e je elementární náboj ($1,602 \cdot 10^{-19}$ C) a E [$V \cdot m^{-1}$] je intenzita elektrického pole v daném místě.

- Rychlost částice je pak v důsledku rovnosti obou sil:

$$v = \frac{z \cdot e \cdot E}{6\pi \cdot r \cdot \eta}$$

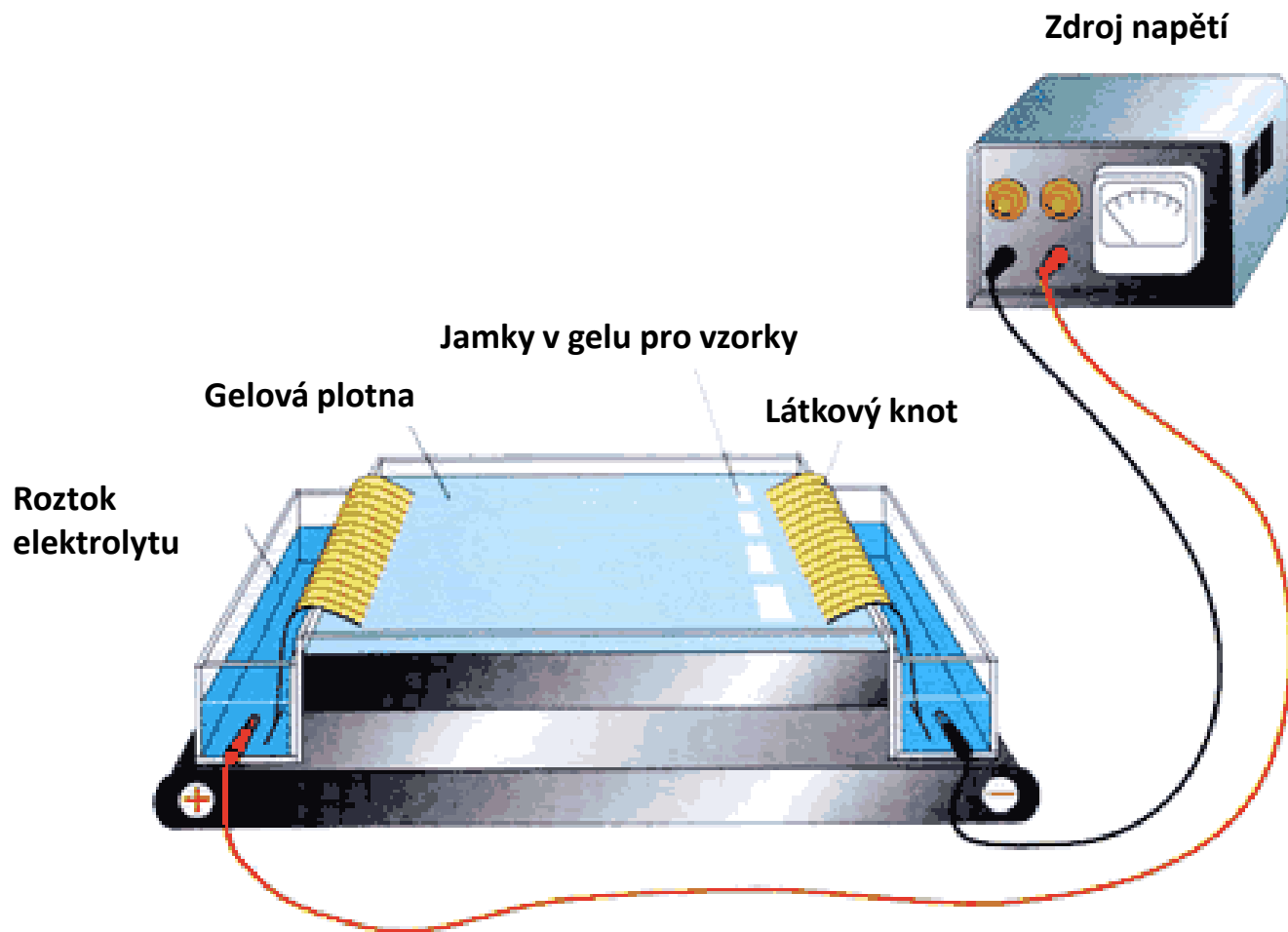
Elektroforetická pohyblivost

- Elektroforetická pohyblivost u nezávisí na intenzitě elektrického pole. Je definována jako podíl rychlosti částice a intenzity elektrického pole. Platí:

$$u = \frac{v}{E} = \frac{z \cdot e}{6\pi \cdot r \cdot \eta}$$

Poznámka. Elektroforéza s dodecylsulfátem sodným. Tato sloučenina, která nese jeden negativní elementární náboj, se váže definovaným způsobem k bílkovinám a eliminuje jejich vlastní elektrický náboj. Molekuly bílkovin se pak pohybují s různou rychlostí jen proto, že mají různou velikost (poloměr).

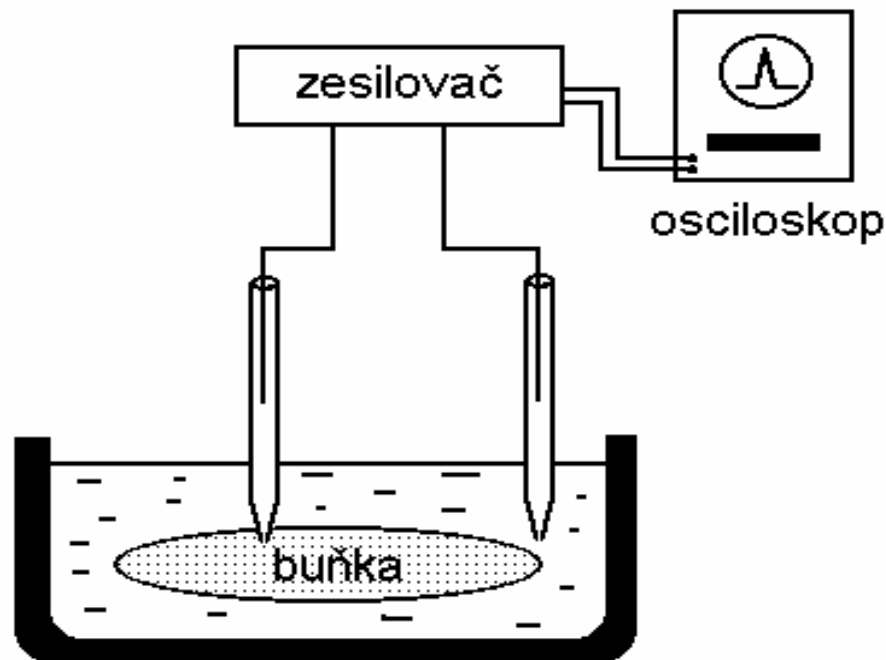
Zařízení pro elektroforézu



Měření membránových potenciálů

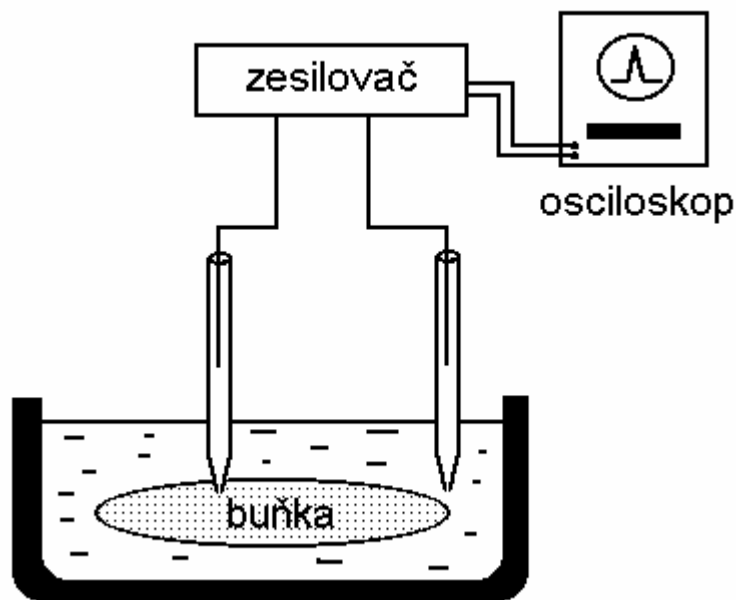
- Membránové potenciály se měří s pomocí **skleněných mikroelektrod**, tj. skleněných kapilár s velmi jemnou úzkou špičkou. Průměr otvoru na konci špičky musí být menší než 1 μm , aby nedošlo při zavádění do buňky k jejímu významnému poškození. Vnitřní prostor špičky kapiláry je naplněn roztokem KCl o koncentraci 3 mol.l^{-1} . Jako elektroda srovnávací se používá elektroda stříbrochloridová umístěná do mimobuněčného prostoru.
- Pro skleněné mikroelektrody je charakteristický vysoký vnitřní odpor (kolem 10 $\text{M}\Omega$), takže potřebujeme pro měření vysoce kvalitní zesilovače, abychom zamezili zkreslení měřeného napětí.

Experimentální uspořádání pro měření membránových potenciálů kapilárními mikroelektrodami



Pomocí skleněných mikroelektrod lze také měřit jiné elektrochemické parametry buněk a membrán, např. koncentraci některých iontů. Mohou být připraveny jako elektrody iontově selektivní pro Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , H^+ ...

Metoda patch-clamp („terčíkový zámek“)



Tupá skleněná mikroelektroda se přiloží k povrchu buňky nebo k části biologické či umělé membrány. Otvor na konci mikroelektrody je zcela uzavřen „terčíkem“ membrány a měřená elektrická napětí nebo proudy se proto týkají jen malého okrsku membrány, v němž se nalézá jen malý počet iontových kanálů.

Některé iontové kanály mohou být předem uzavřeny nebo otevřeny, náplň mikroelektrody může obsahovat ligandy, schopné interagovat s iontovými kanály, a všeobecně jakékoliv látky, jež mohou ovlivňovat funkci membrány. Tato metoda umožňuje studium aktivity jednotlivých iontových kanálů nebo jejich malých skupin.

Mikroskopie skenující sondou

AFM, atomic force microscopy

BEEM, ballistic electron emission microscopy

EFM, electrostatic force microscope

ESTM electrochemical scanning tunneling microscope

FMM, force modulation microscopy

KPFM, kelvin probe force microscopy

MFM, magnetic force microscopy

MRFM, magnetic resonance force microscopy

NSOM, near-field scanning optical microscopy (or SNOM, scanning near-field optical microscopy)

PSTM, photon scanning tunneling microscopy

PTMS, photothermal microspectroscopy/microscopy

SECM, scanning electrochemical microscopy

SCM, scanning capacitance microscopy

SGM, scanning gate microscopy

SICM, scanning ion-conductance microscopy

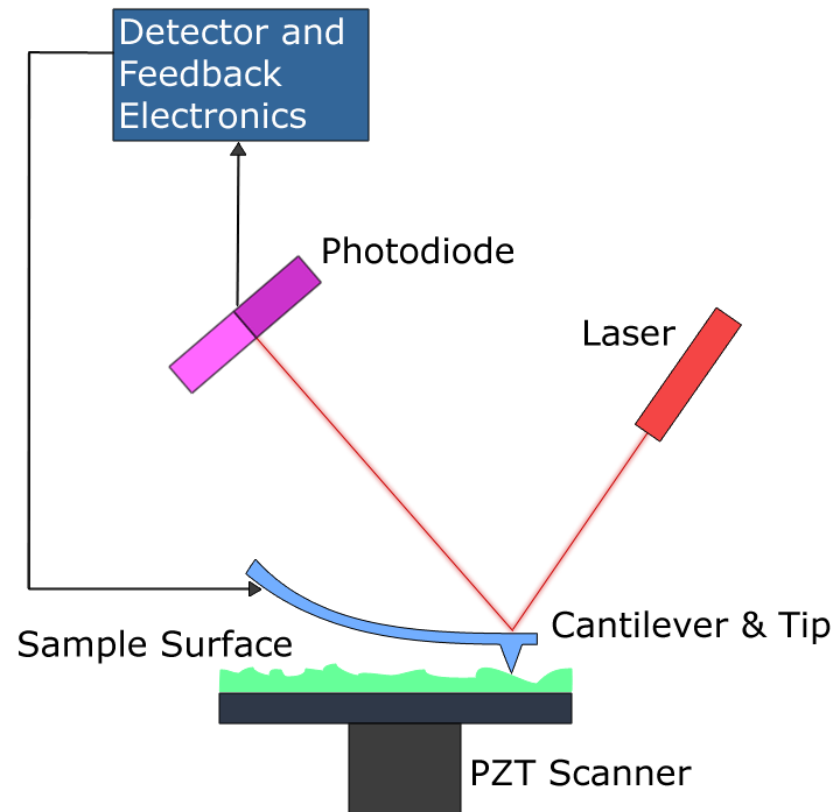
SPSM spin polarized scanning tunneling microscopy

Mikroskopie atomových sil

- scanning tunneling microscope (STM), vyvinutý Gerdem Binnigem a Heinrichem Rohrerem na začátku 80-tých let (Nobelova cena za fyziku 1986)
- první AFM 1986 (Binnig, Quate a Gerber)
- AFM je jedna z hlavních metod pro zobrazování, měření a manipulaci předmětů v oblasti nanometrů
- AFM (atomic force microscopy, někdy SFM scanning force microscopy)

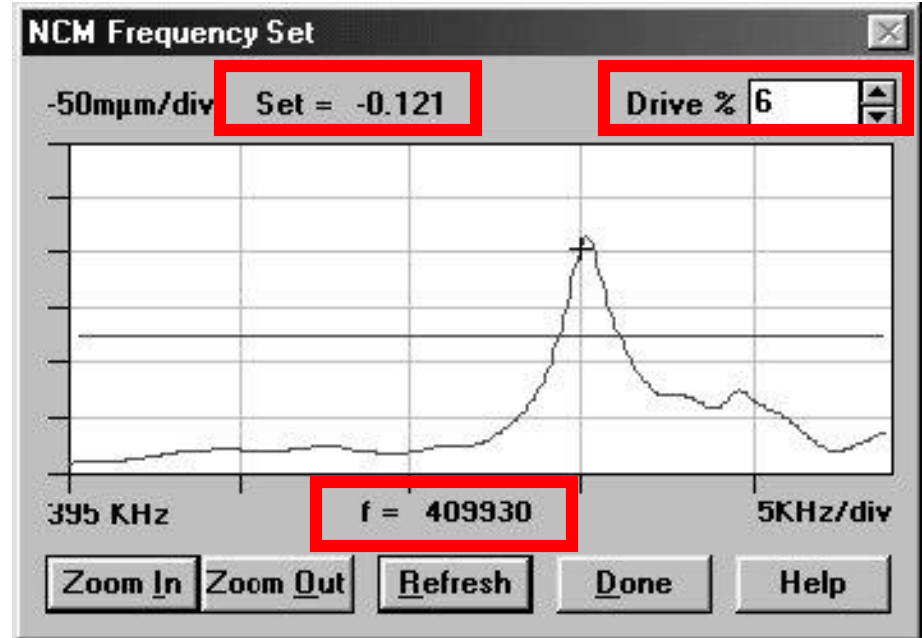
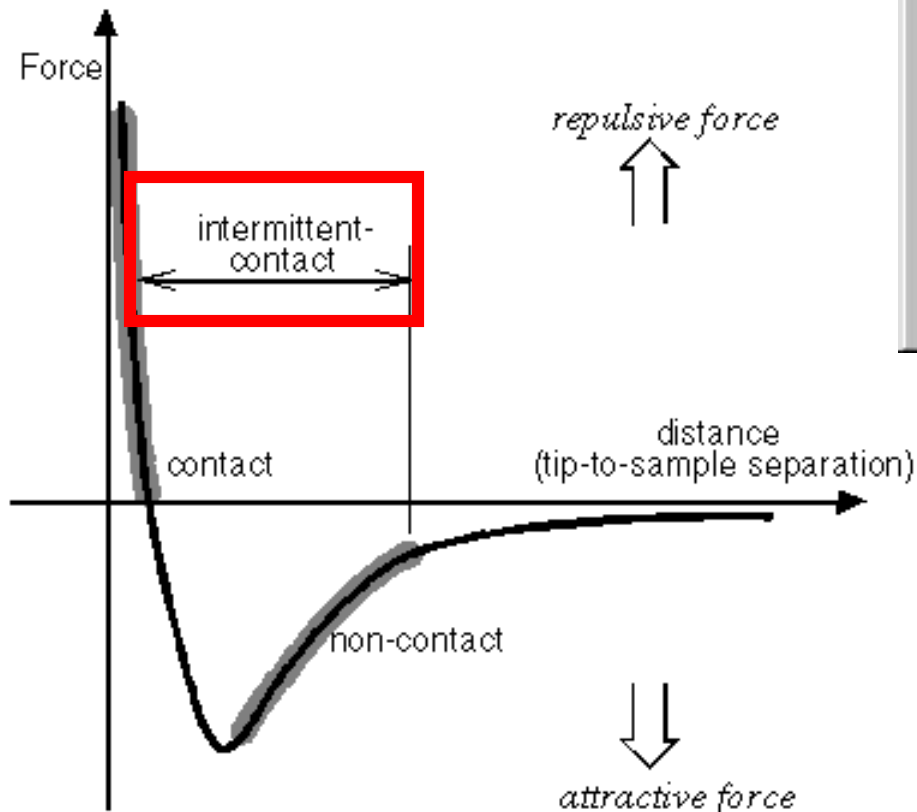
Režimy měření

- kontaktní
- ne-kontaktní
- dynamický
(aka tapping®, intermittent)



IC-AFM

- 1) nastavit frekvenci
- 2) nastavit "set point"



- 1) každý hrot má jinou frekvenci (od 70kHz - 500kHz)
- 2) "set point" je závislý na vzorku

Lineární DNA, 2kbp, skenovací rychlost 1.5Hz

(teor. délka 680nm, naměřená cca 700, šířka 20-25nm)

