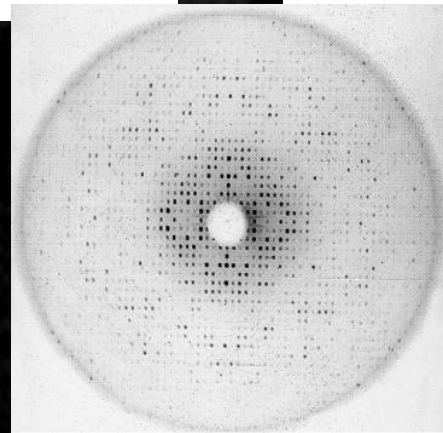
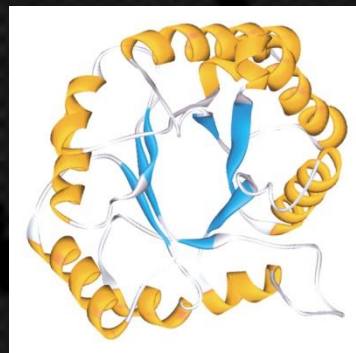
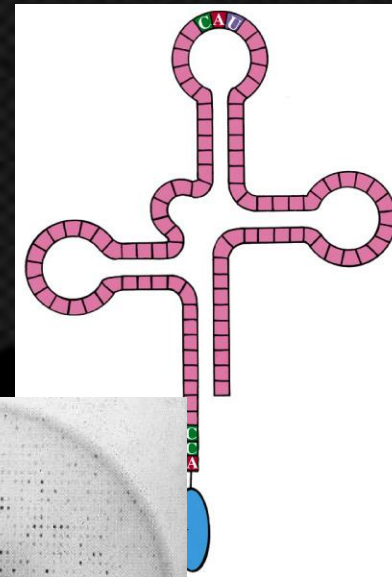
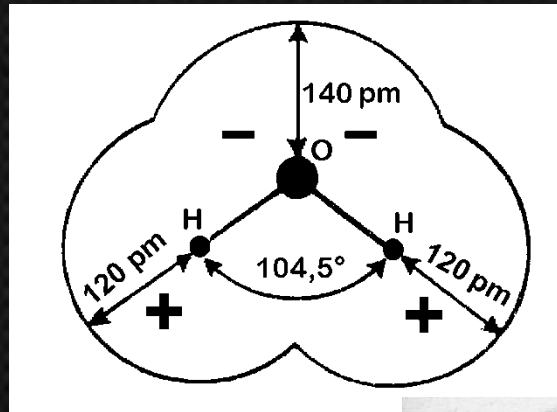


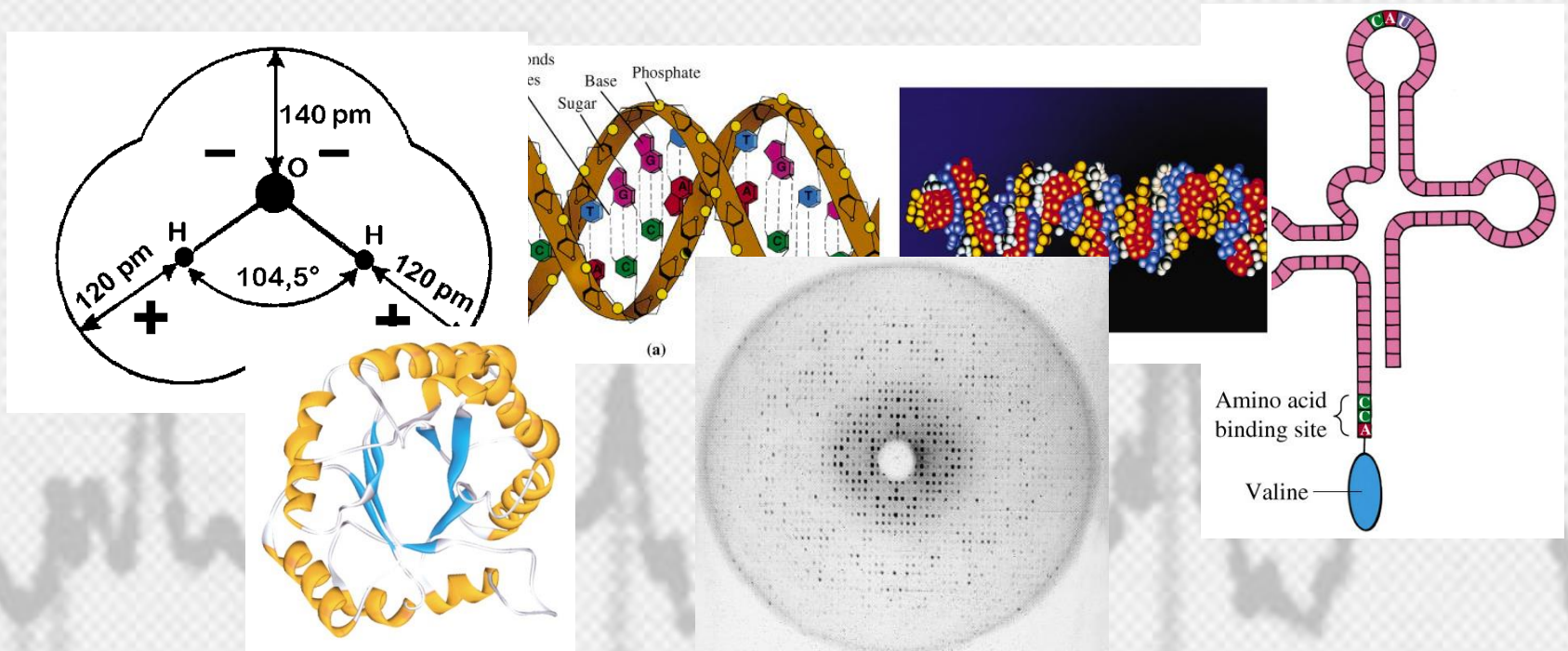
Přednášky z lékařské biofyziky

Biofyzikální ústav Lékařské fakulty
Masarykovy univerzity, Brno



Přednášky z lékařské biofyziky

Biofyzikální ústav Lékařské fakulty
Masarykovy univerzity, Brno



Přístrojové metody molekulární biofyziky

Obsah přednášky

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

Nebudeme se zabývat....

- Zařízeními pro měření
 - Osmolární koncentrace (měření je založeno na kryoskopii),
 - Rychlosti difuze
 - Viskozity (praktická cvičení)
- Přístroji pro stanovení sekundární a terciární struktury bílkovin a nukleových kyselin pracujícími na elektrochemickém základě (je studována interakce makromolekul s elektrodami)
- Nukleární magnetickou rezonancí (umožňuje např. zjistit, jak je v molekule chemicky vázaný vodík – zmíněno v přednášce o MRI)
- Elektronovou spinovou rezonancí,
- Centrifugami (jiná přednáška) atd.

Biofyzika a biomolekulární výzkum

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

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

Zařízení založená na interakci elektromagnetického záření s makromolekulami

Druhy spektrofotometrů

- **Spektrofotometry** jsou laboratorní přístroje používané pro studium látek absorbujících nebo emitujících infračervené, viditelné nebo ultrafialové světlo, včetně studia 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 látky pohlcující světlo. 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 i 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 závisejí 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.

$$T = \frac{I}{I_0}$$

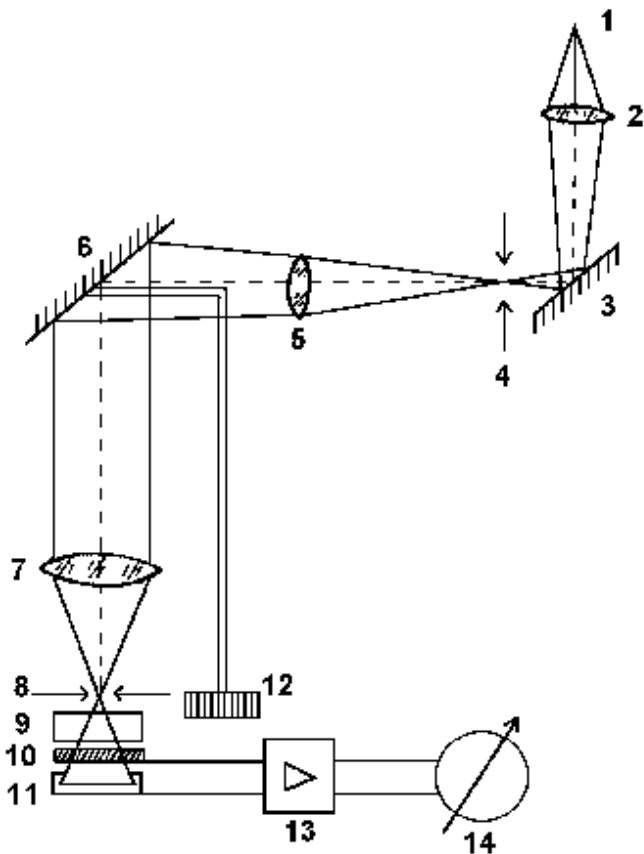
$$A = \log \frac{1}{T}$$

$$A = \varepsilon \cdot C \cdot X$$

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.

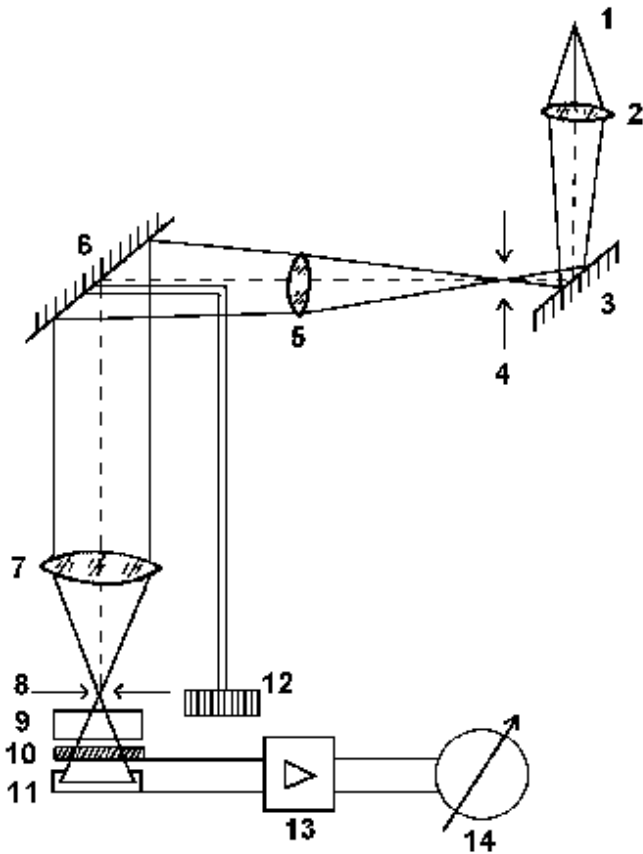
Jednopaprskový spektrofotometr



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 soustředováno čočkou (5) na **odrazovou optickou mřížku (6)**, která tvoří barevné spektrum. Téměř monochromatické světlo je promítáno objektivem (7) na **výstupní štěrbinu (8)** monochromátoru.

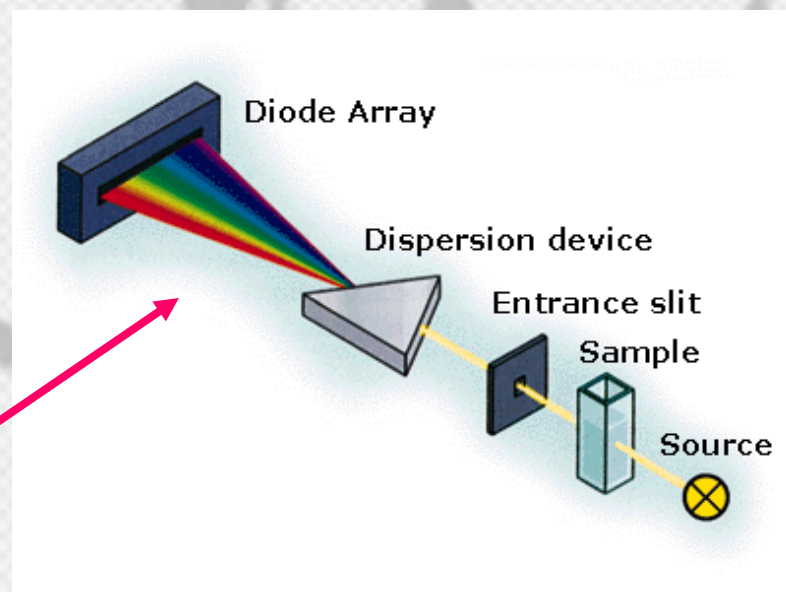
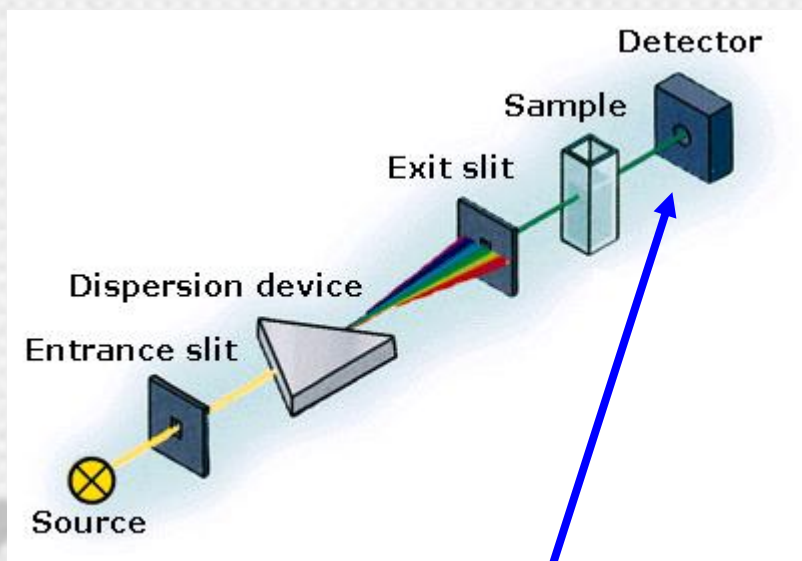
Jednopaprskový spektrofotometr

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

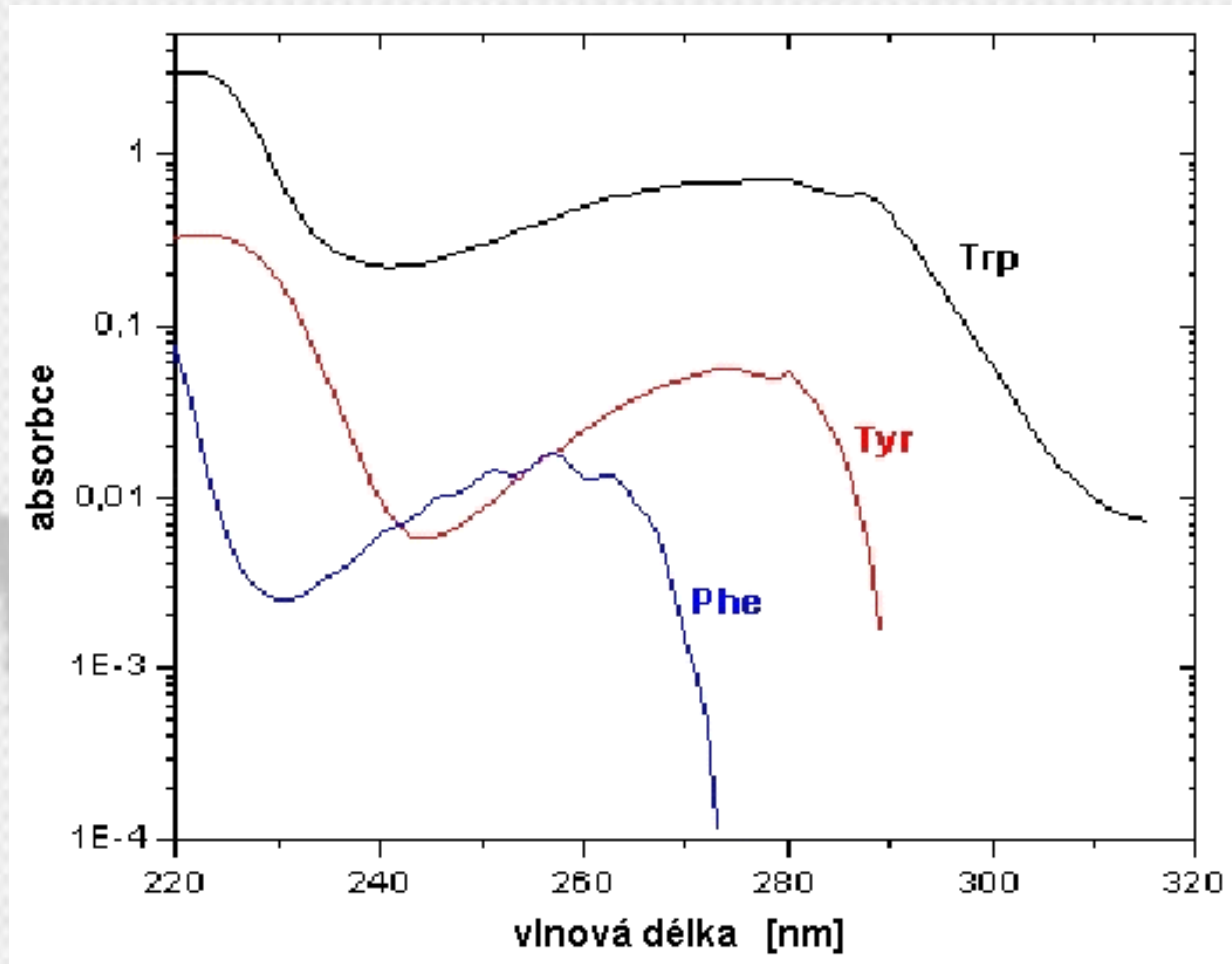


Světlo jedné vybrané vlnové délky nebo i celé prošlé spektrum může být měřeno

Absorpční UV spektrofotometrie

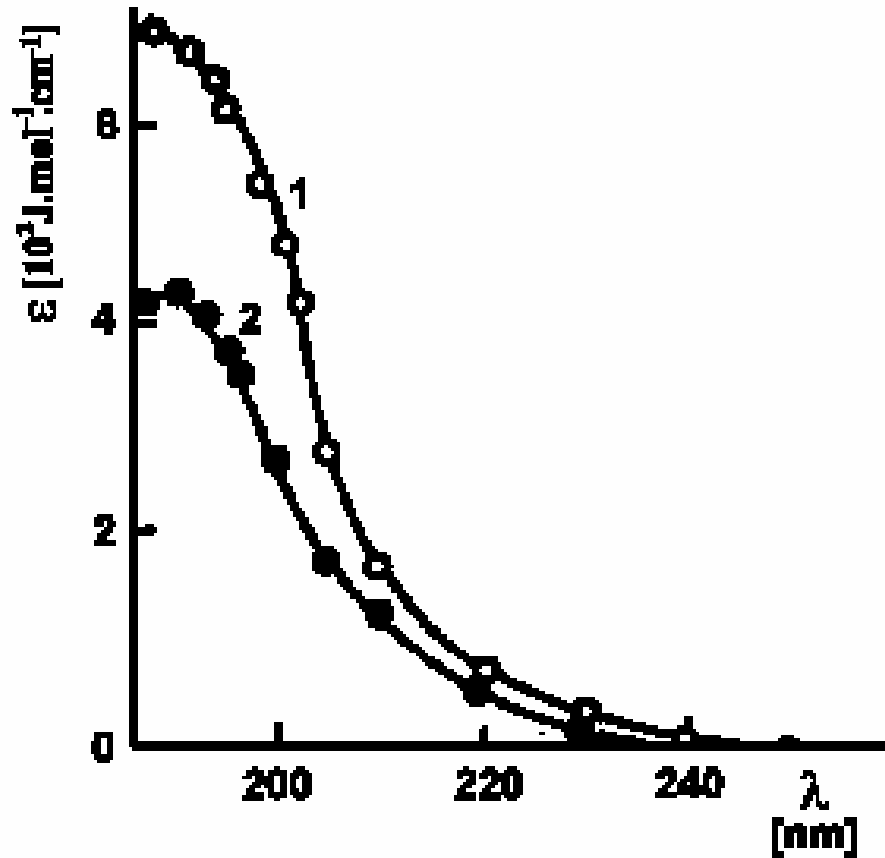
- Ultrafialové (UV) světlo je absorbováno různými sloučeninami, zejména těmi, které mají konjugované dvojně vazby. Jak bílkoviny, tak nukleové kyseliny silně absorbují UV světlo, což lze využít pro jejich zkoumání.
 - Aminokyseliny tryptofan a tyrosin mají absorpční maxima při přibližně 280 nm. Fenylalanin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

Absorpční spektra aminokyselin



Hypochromní efekt (HE)

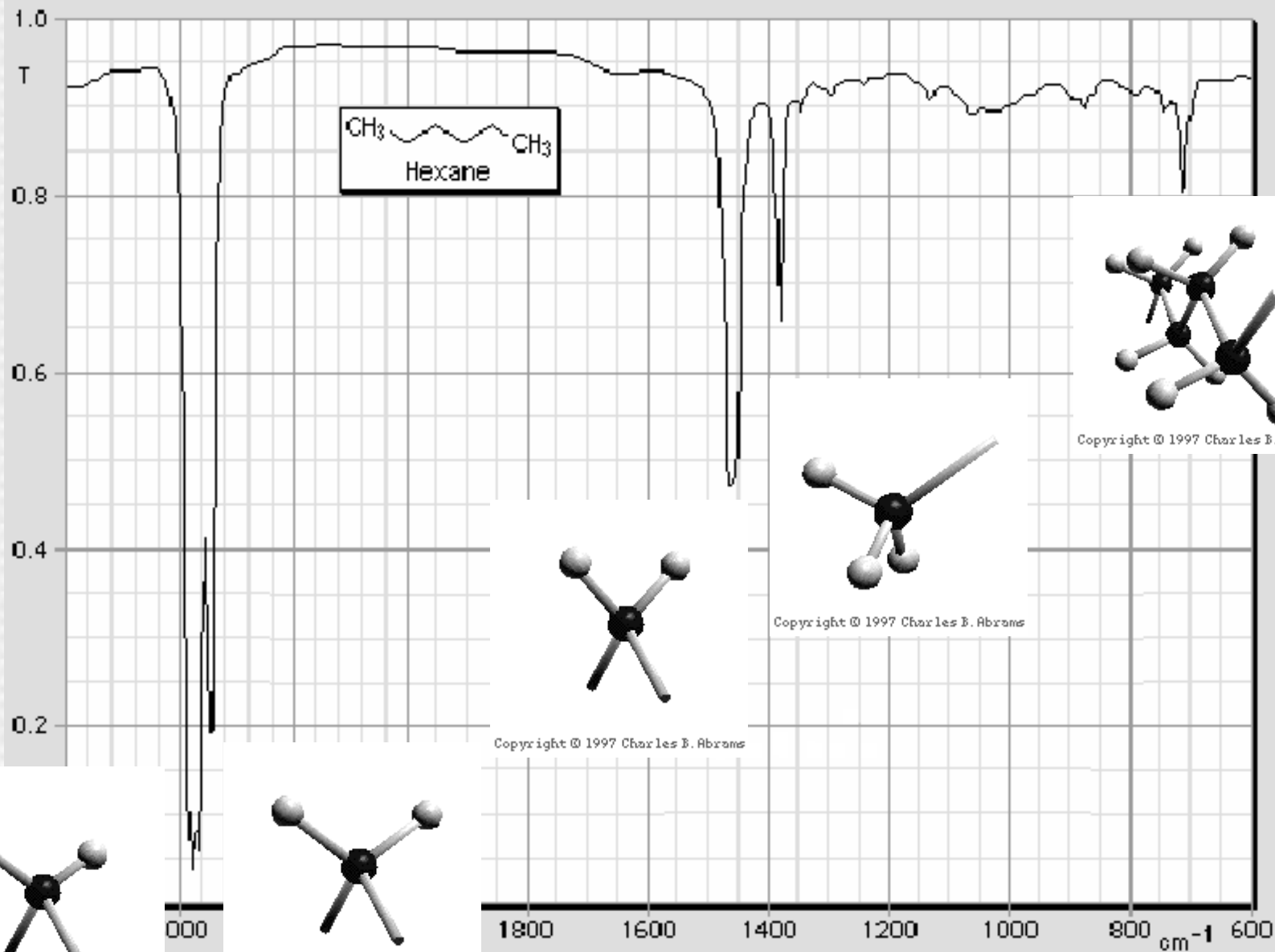
- Absorpce světla je ovlivňována dipólovými momenty chemických vazeb, které interagují s fotony. Stochasticky (náhodně) orientované dipólové momenty (denaturovaná bílkovina) absorbují světlo lépe než ve stavu uspořádaném (šroubovice). U **bílkovin** je HE způsoben peptidovými vazbami, které mají UV absorpční maximum kolem 190 nm.
- Dvoušroubovice **DNA** absorbuje UV světlo lépe než DNA denaturovaná (neuspořádaná).
- **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]

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.

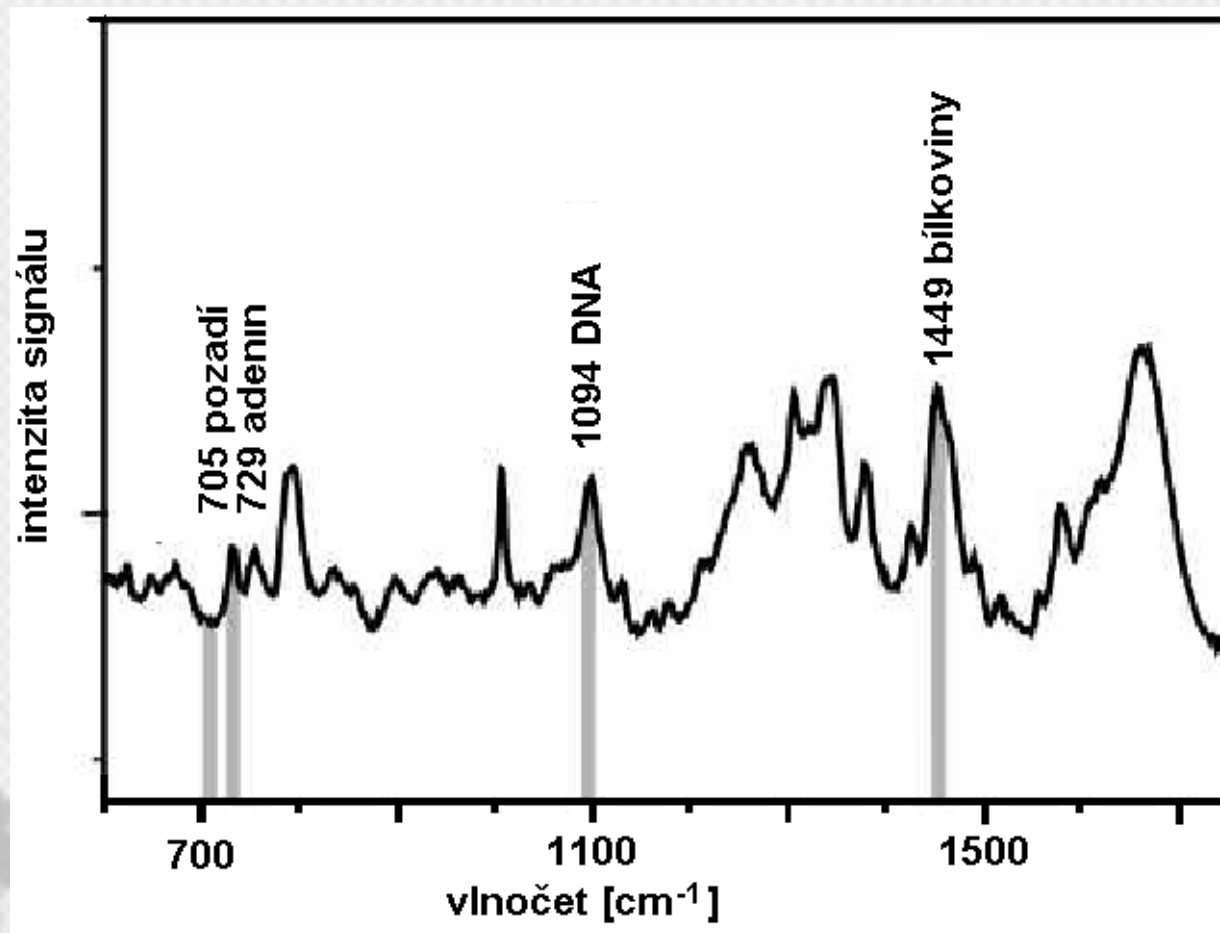


Infračervené spektrum hexanu vyjádřené jako závislost transmittance na vlnočtu <http://www.columbia.edu/cu/chemistry/edison/IRTutor.html>

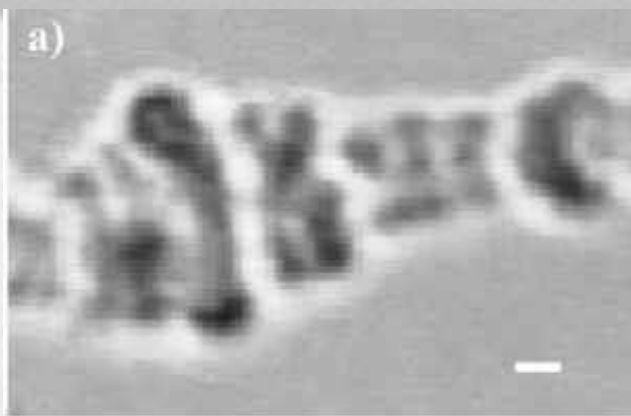
Ramanova spektrometrie

- **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 nebo odpovídajícímu vlnočtu) odrážejí konformační změny molekul.

Ramanova spektrometrie

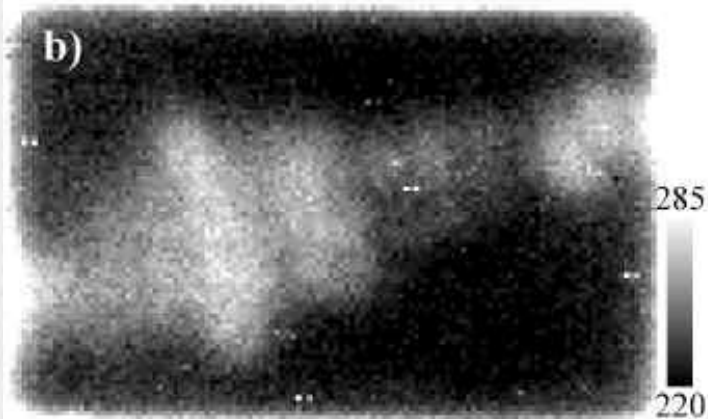


Ramanovo spektrum polytenního chromosomu pakomára *Chironomus*. Při zvolených vlnočtech lze uskutečnit ramanovskou mikroskopií. Vybuzeáno laserovým světlem o vlnové délce 647.1 nm.

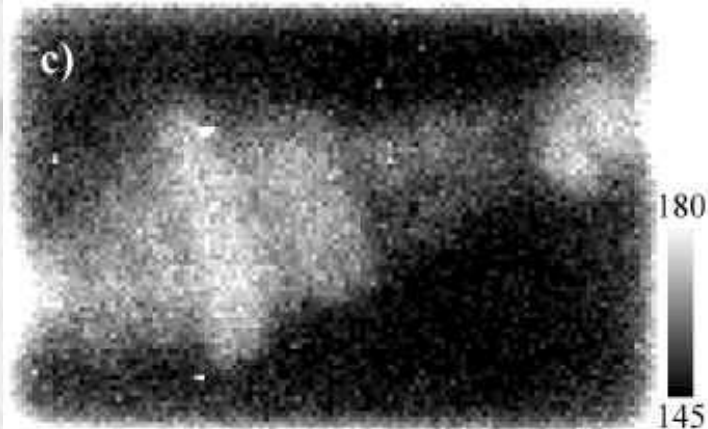


Mikrofotografie v normálním bílém světle

(chromozom *Chironomus Thummi Thummi*)



Konfokální ramanovská mikrofotografie zobrazující páteř DNA (vibrace při 1094 cm^{-1})



Konfokální ramanovská mikrofotografie zobrazující alifatické řetězce v bílkovinách při 1449 cm^{-1}

podle: <http://www.ijvs.com/volume2/edition3/section4.htm>

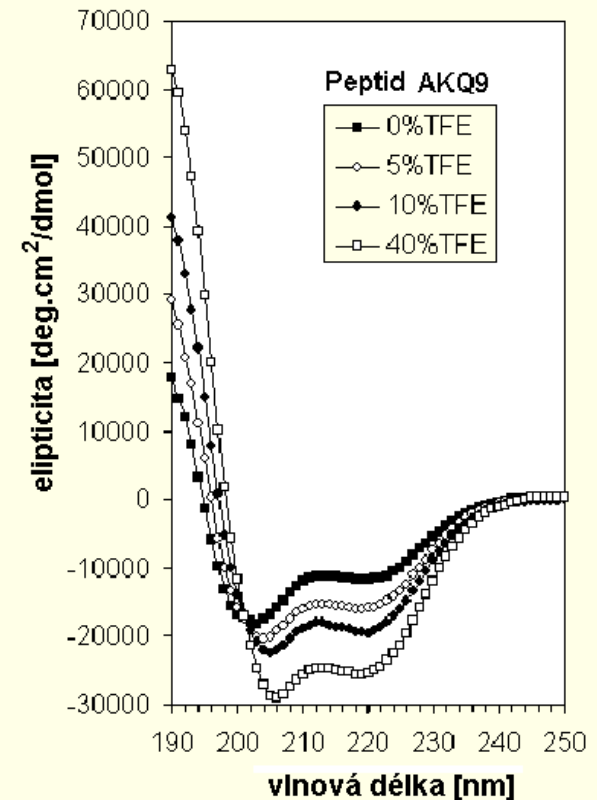
Optická rotační disperze

Metodou **optické rotační disperze (ORD)** měříme závislost optické aktivity na vlnové délce světla. Tato metoda však byla nahrazena citlivější metodou **cirkulárního dichroismu (CD)**, která poskytuje podobné informace.

Cirkulární dichroismus (CD) - nepovinné

- 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.

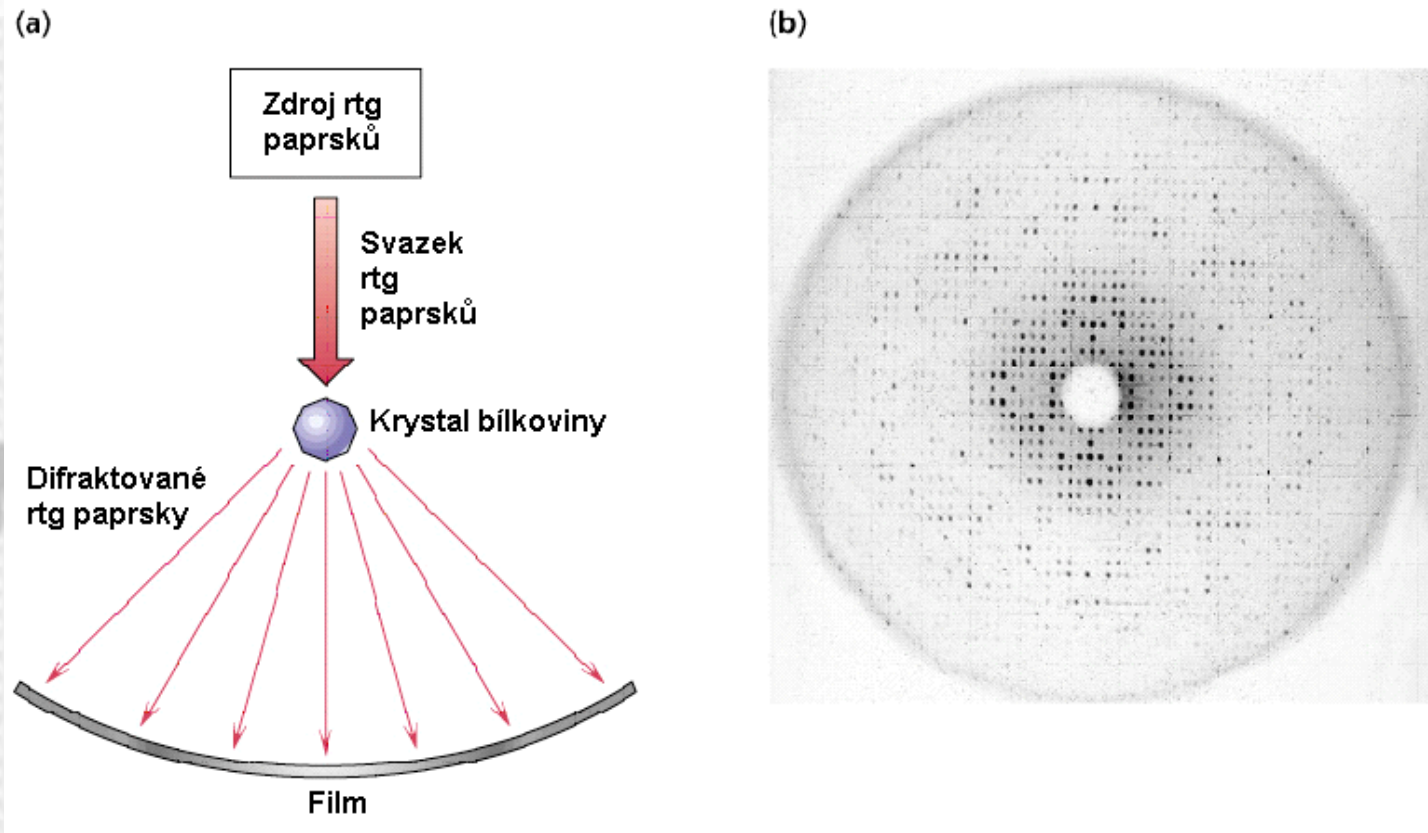
Obrázek ukazuje změny **elipticity** syntetického polypeptidu, obsahujícího dlouhé sekvence polyglu, po přidavku trifluoroethanolu (TFE), který zvyšuje podíl α -šroubovice. <http://www-structure.llnl.gov/cd/polyg.htm>



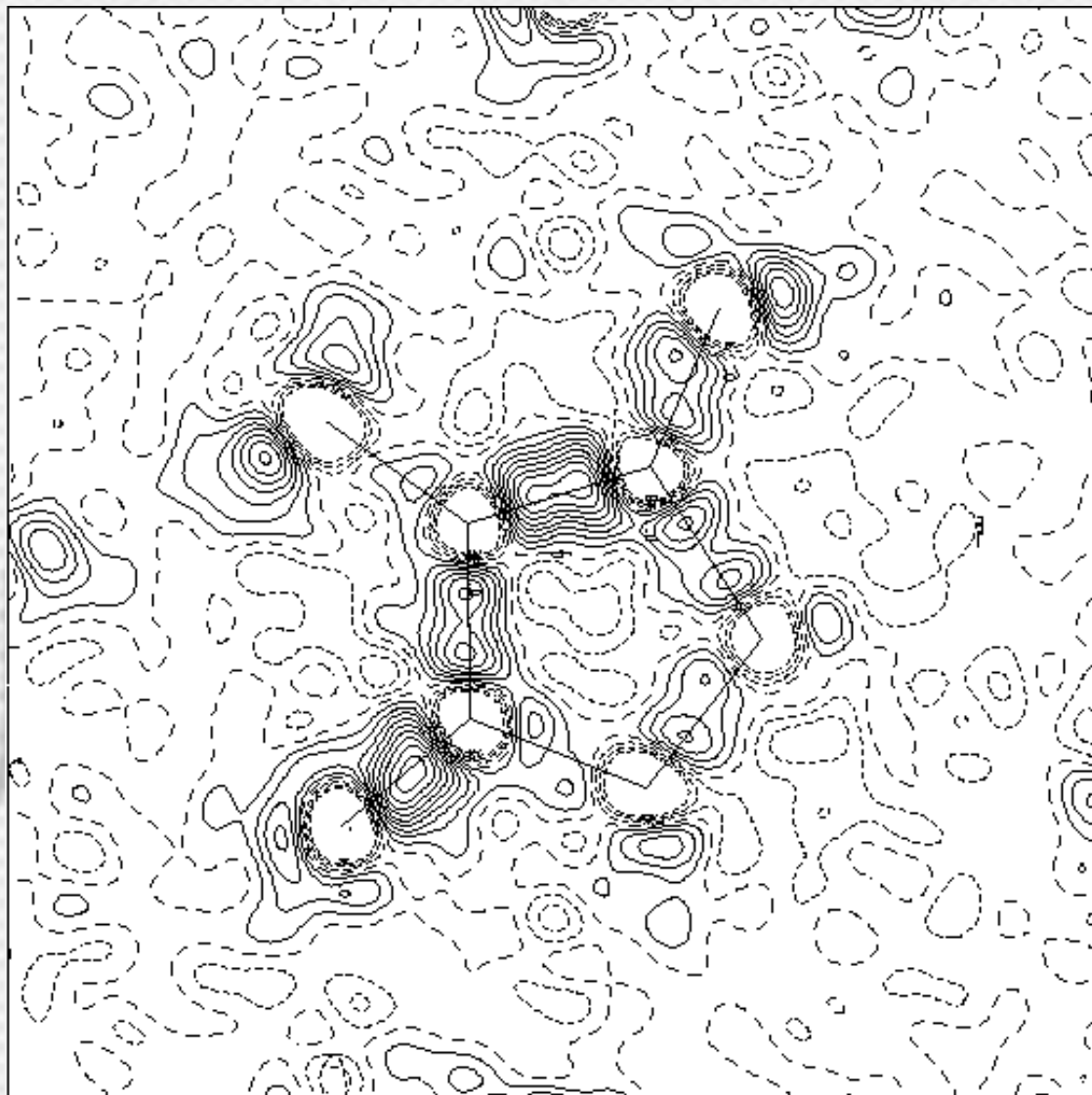
$$\theta_r = \frac{2.303}{4} \cdot (A_L - A_R) \cdot [rad]$$

Rentgenstrukturní analýza

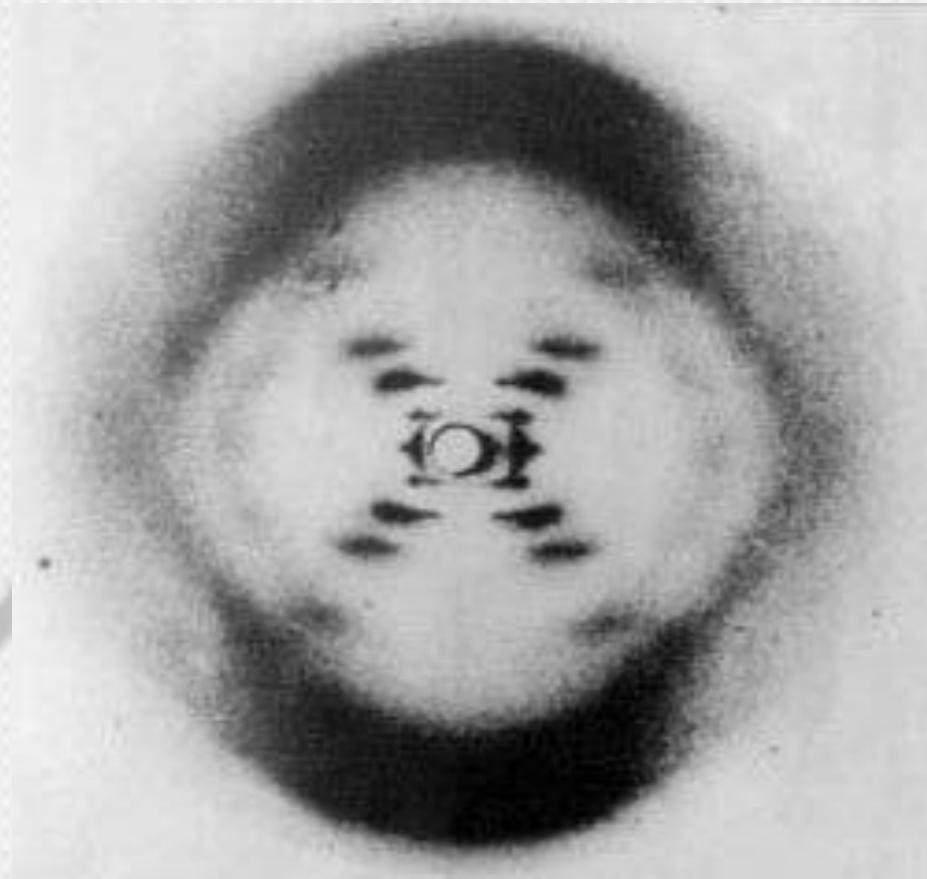
Krystalová mřížka působí na rentgenové záření jako optická mřížka na viditelné světlo. Nastávají ohybové jevy a na stínítku se objevuje difrakční obrazec. Tyto obrazce mohou být matematicky analyzovány, aby se získala informace o rozložení elektronů v molekulách tvořících krystal.



Mapa elektronové hustoty organické sloučeniny vypočtená z rentgenového krystalogramu



Krystalogram B-DNA získaný v r. 1952 Rosalindou E. Franklinovou, na jehož základě Watson a Crick navrhli dvoušroubovicový model struktury DNA.



F



C



W

Metody založené na měření mechanických a elektrických vlastností makromolekul

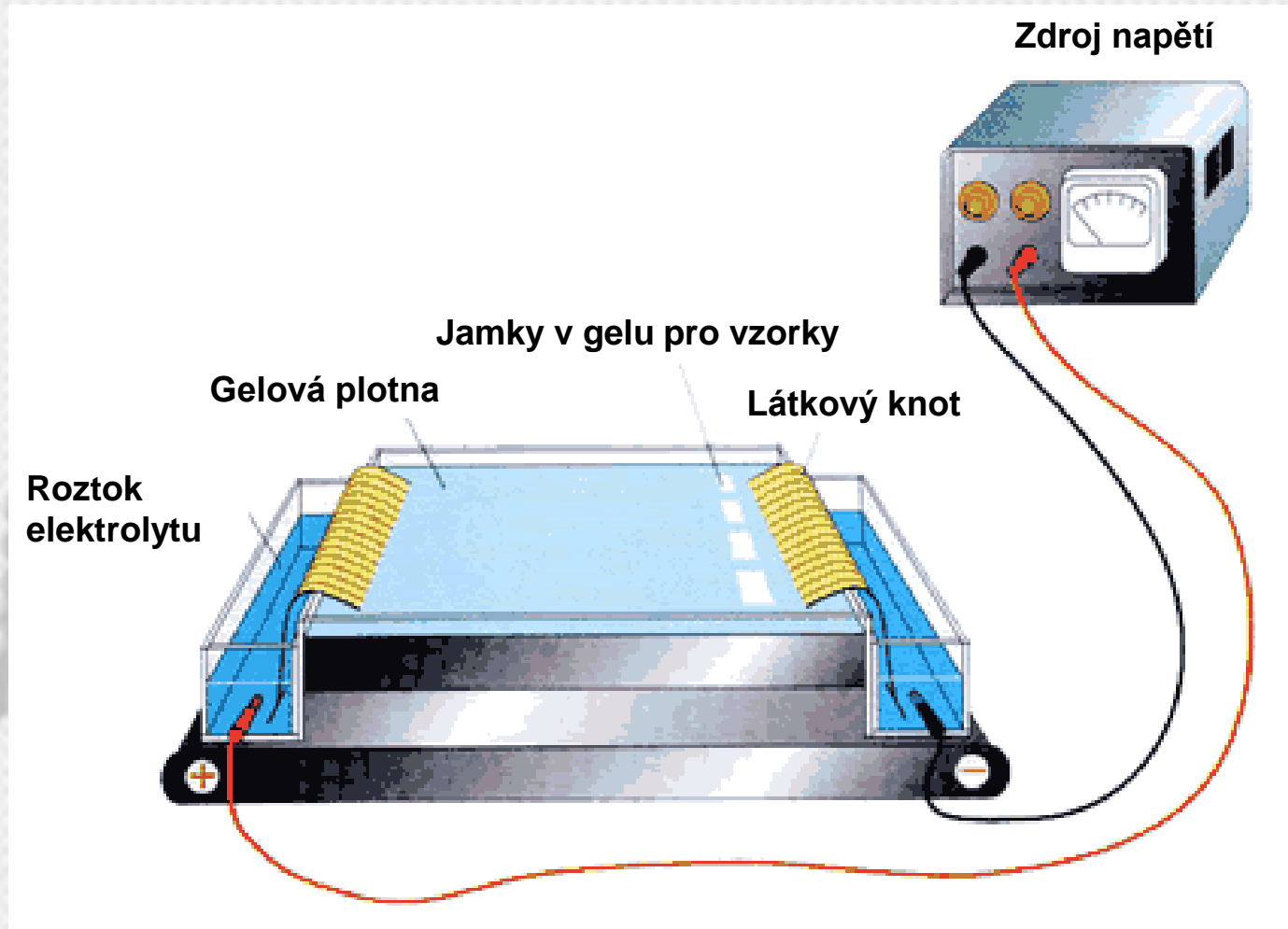
Velikost a tvar makromolekul můžeme studovat na základě měření:

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

Dále můžeme použít:

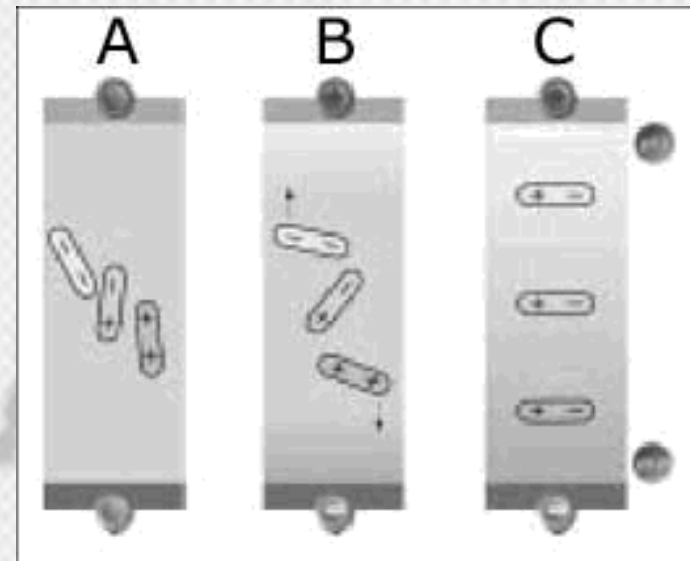
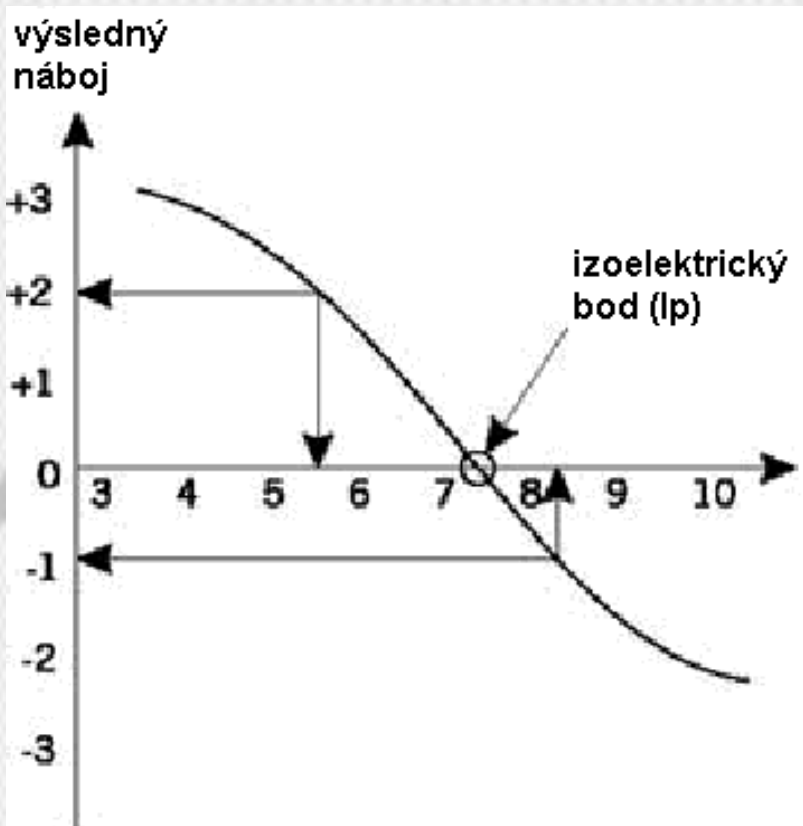
- Elektronovou mikroskopii a metody příbuzné, včetně AFM (velikost a tvar, přednáška "Mikroskopie")
- Chromatografii – molekulárně síťový efekt u gelové permeační chromatografie (chemie)
- Elektroforézu (konec této části přednášky)

Zařízení pro elektroforézu



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

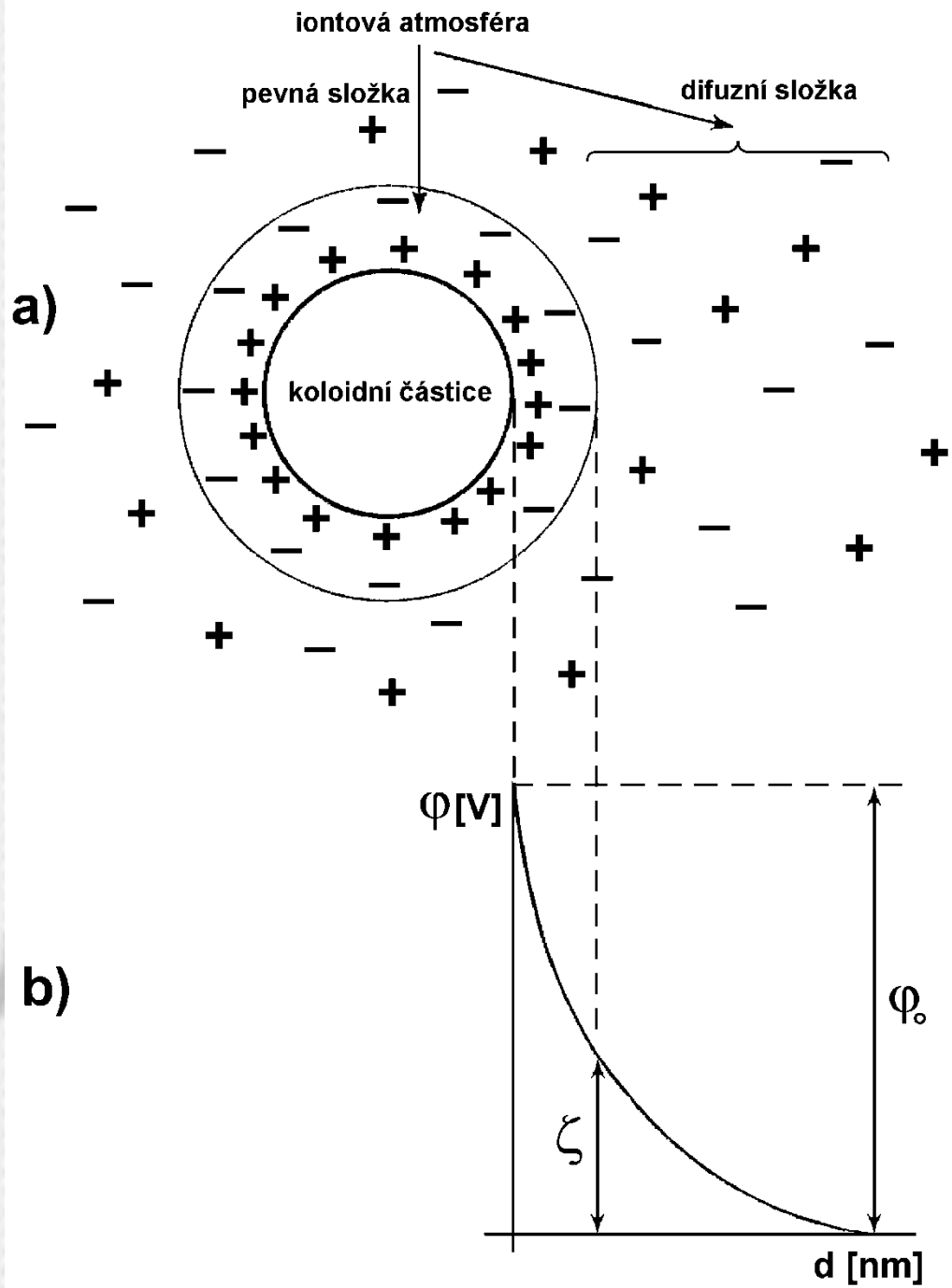
Dva mechanismy:

- 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



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:

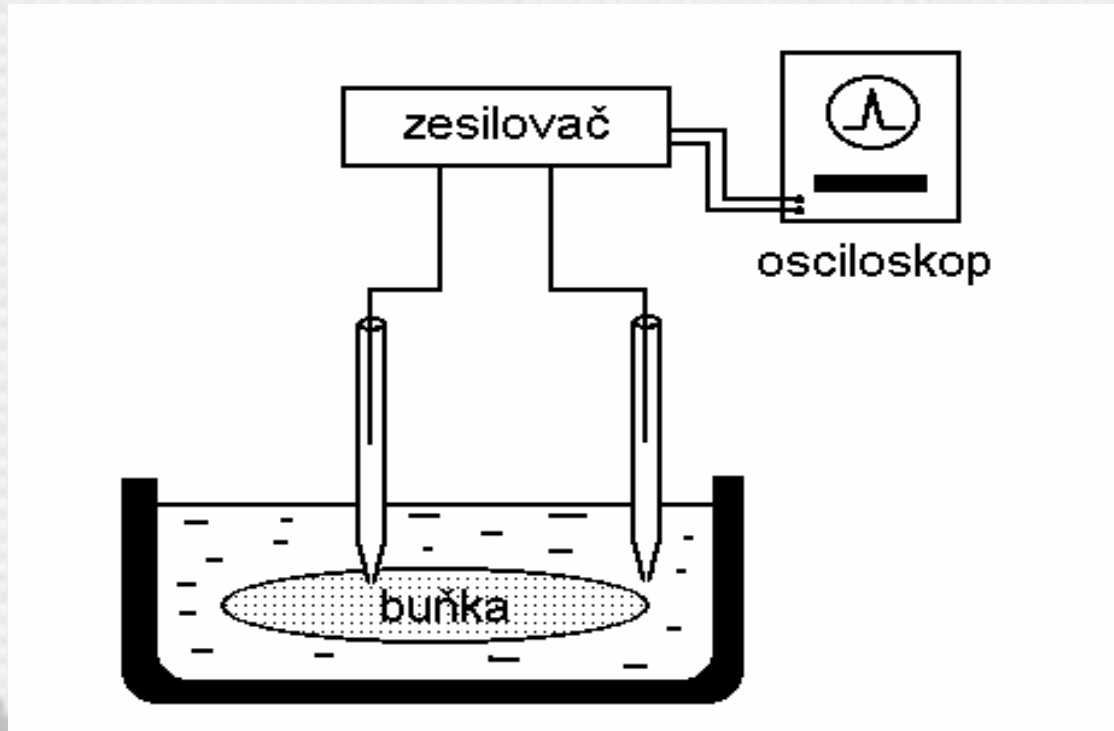
$$u = \frac{v}{E} = \frac{z \cdot e}{6\pi \cdot r \cdot \eta}$$

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).

Měření membránových potenciálů

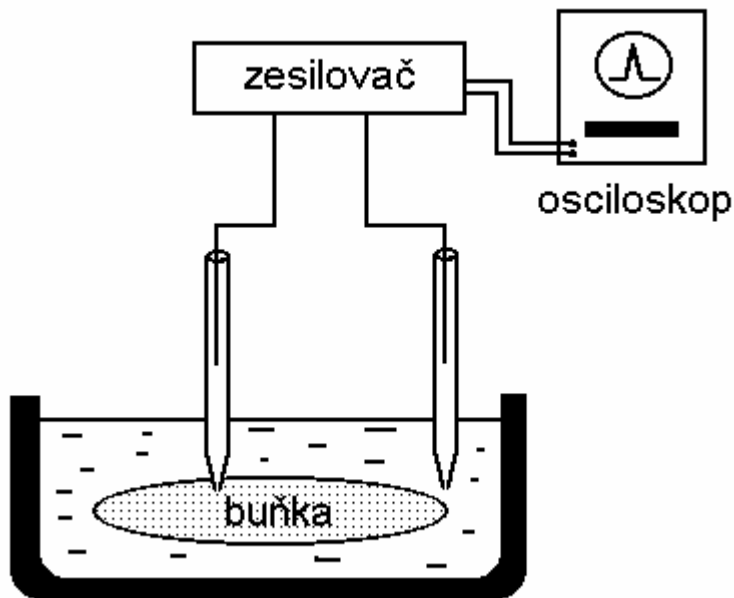
- Membránové potenciály se měří s pomocí **skleněných mikroelektrod**, tj. skleněných kapilár s velmi jemnou úzkou špičkou. Průměr otvoru na konci špičky musí být menší než $1 \mu\text{m}$, aby nedošlo při zavádění do buňky k jejímu významnému poškození. Vnitřní prostor špičky kapiláry je naplněn roztokem 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.

Autor:

Vojtěch Mornstein

Obsahová spolupráce:

Viktor Brabec, Carmel J. Caruana

Grafika:

Lucie Mornsteinová

Poslední revize: září 2015