

Přístrojové metody molekulární biofyziky

doc. Mgr. Karel Kubíček, Ph.D.,

Ústav fyziky kondenzovaných látek,
CEITEC MU,

m: karelk77@gmail.com
20563@mail.muni.cz

t: +420 549 49 3253

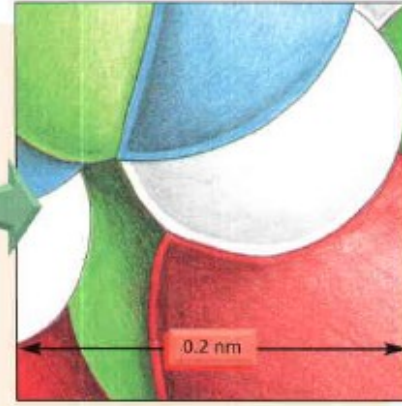
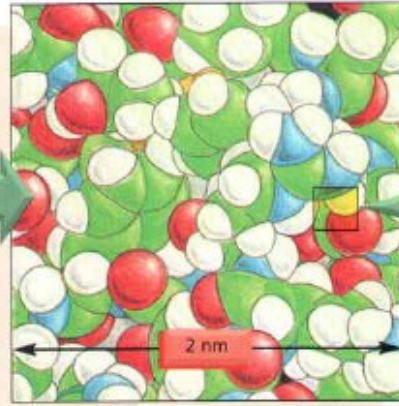
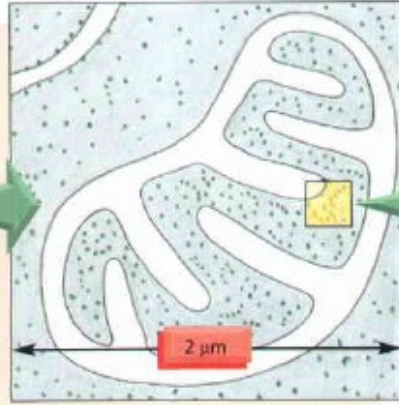
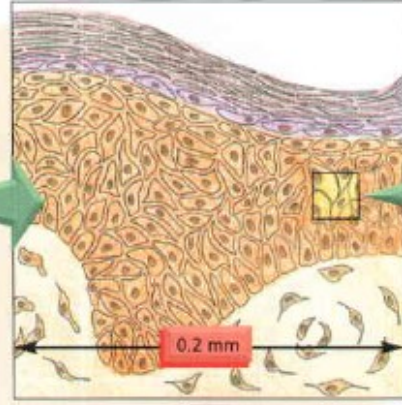
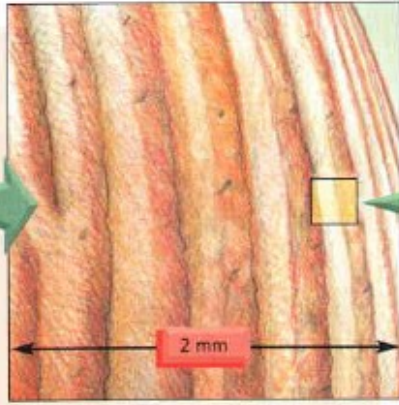
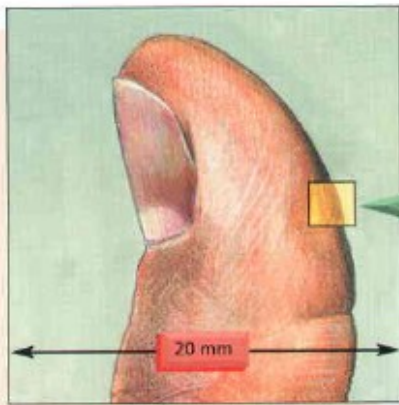
Pro potřebu školního roku **2024/25** zkrátil a doplnil komentáři V. Mornstein

- **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 rezonancí
 - Hmotnostní spektrometrie
 - Fluorescenční techniky
- Zařízení založená na jiných vlastnostech biomolekul (např. mechanických a elektrických)
 - Elektroforéza
- 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.:

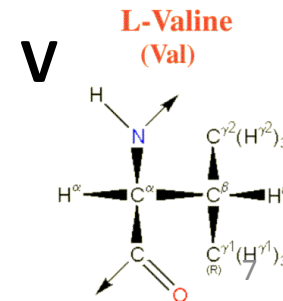
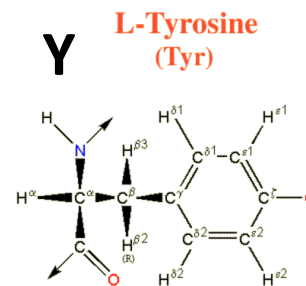
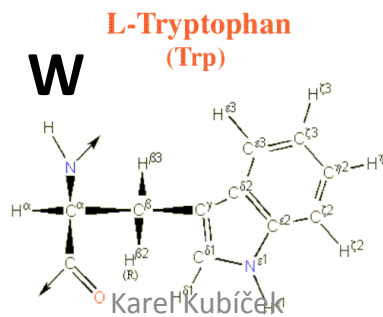
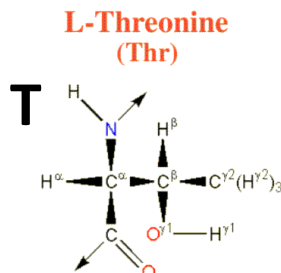
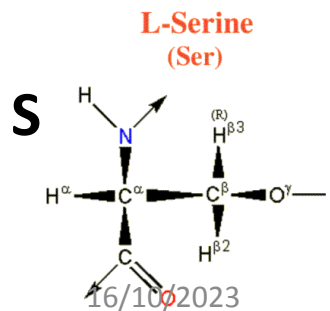
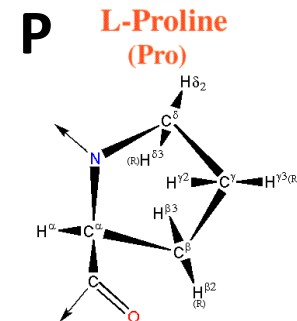
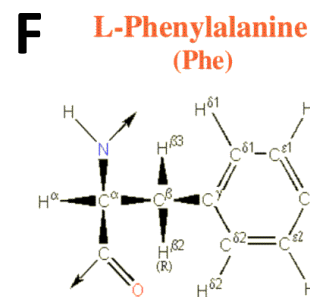
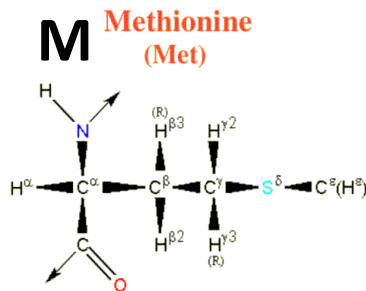
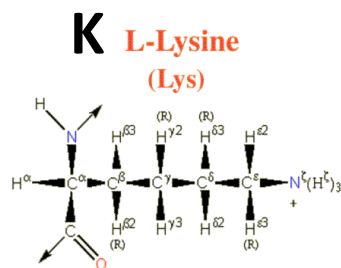
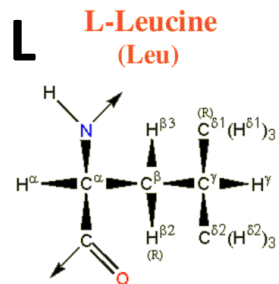
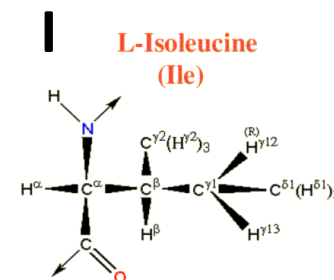
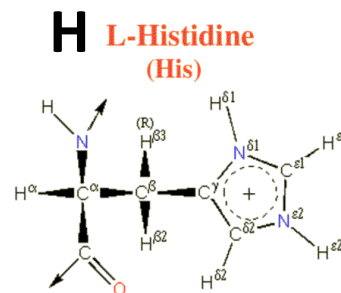
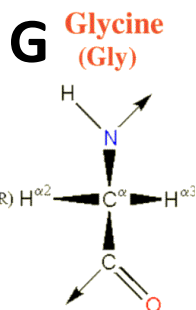
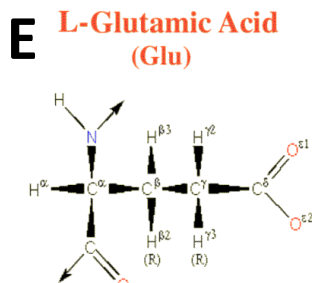
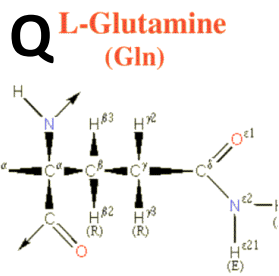
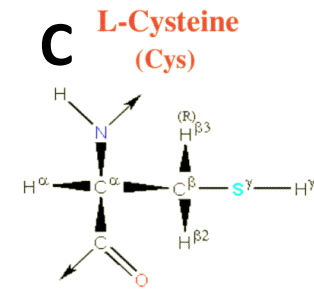
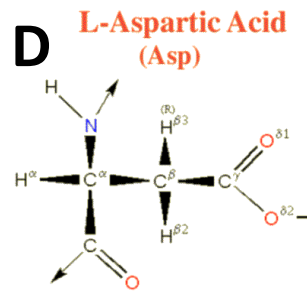
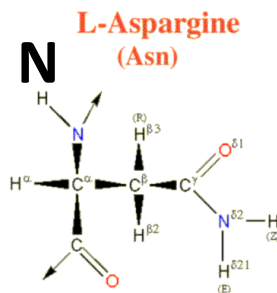
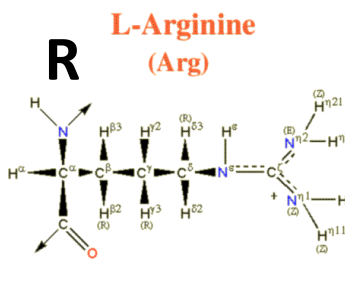
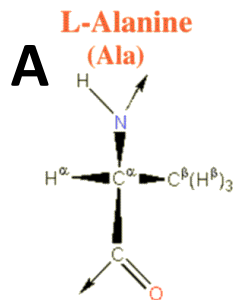
- Specifičnosti enzymatických a imunologických reakcí
- Účinkům některých léků (např. cytostatik) na molekulární úrovni.
- Mechanismům pasivního i aktivního transportu
- Buněčnému pohybu
-

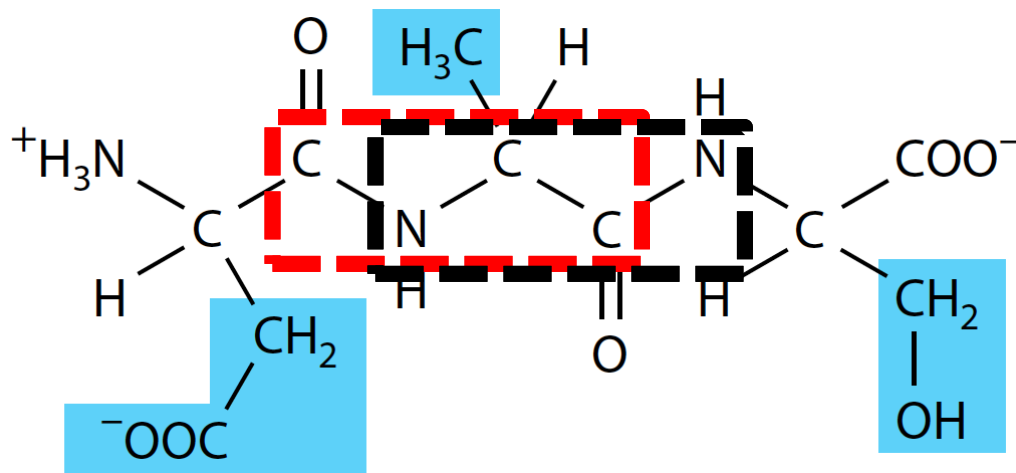
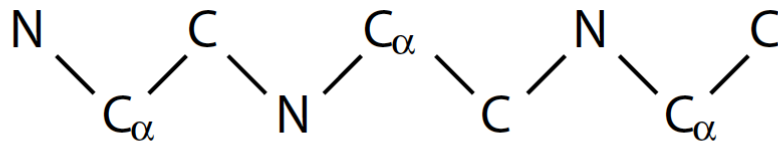


Chemické složení lidského těla

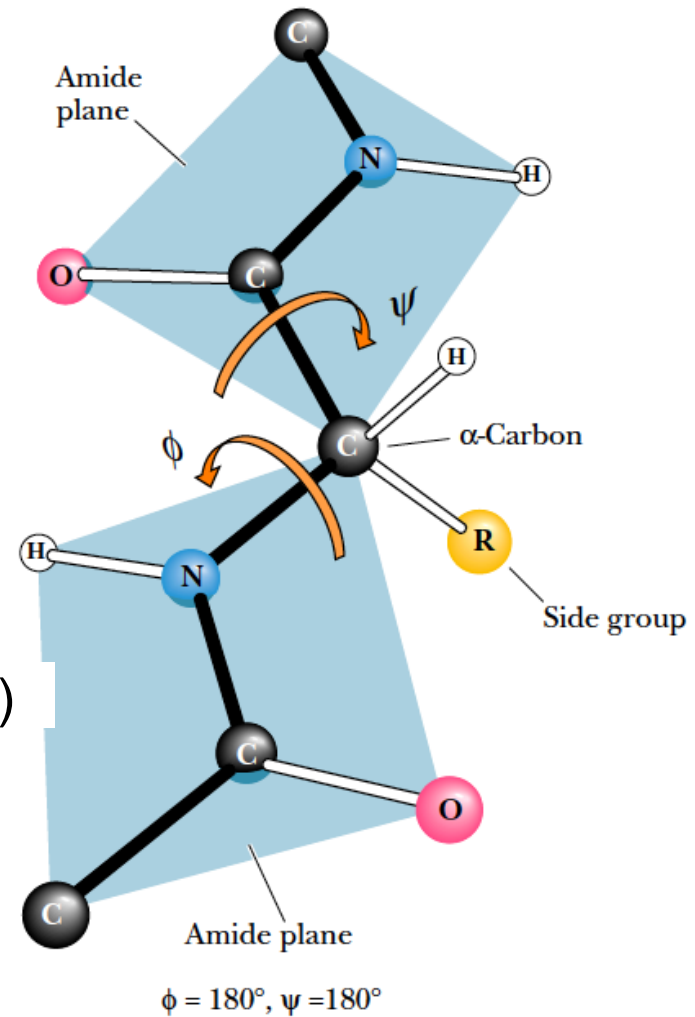
- a. (65 %) Voda
- b. (20 %) Proteiny
- c. (12 %) Lipidy (tuky)
- d. (1.1 %) Nukleové kyseliny
- e. Ionty (Na^+ , K^+ , Cl^- , PO_4^{3-} ...)
- f. Plyny (O_2 , CO_2 , ...), karbohydráty (glukóza), hydroxyapatit (forma vápníku a fosfátu – zuby, kosti), volné radikály, etc.

Proteiny





ϕ – **CO, N, C $_{\alpha}$, CO** (CO někdy značeno C')
 ψ – **N, C $_{\alpha}$, CO, N**



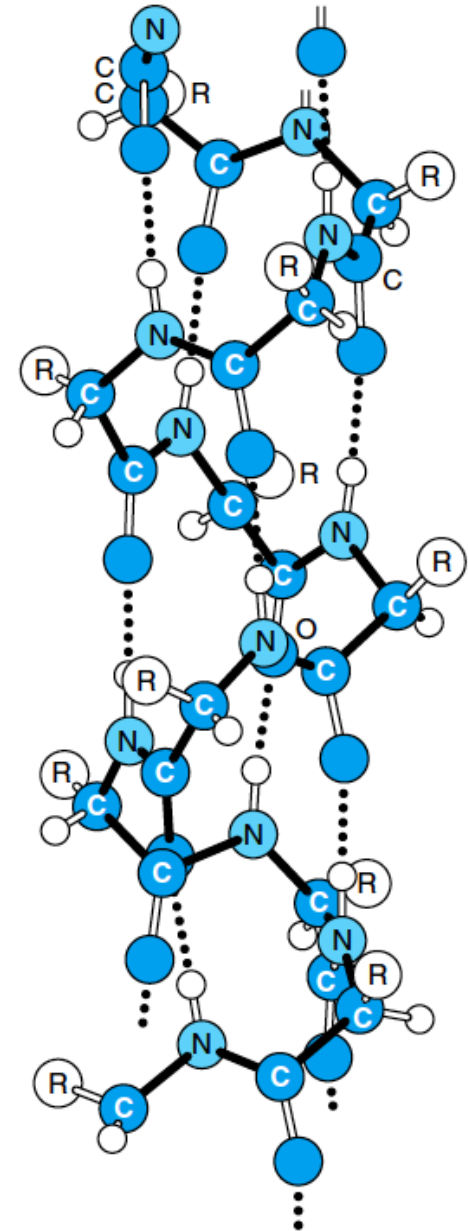
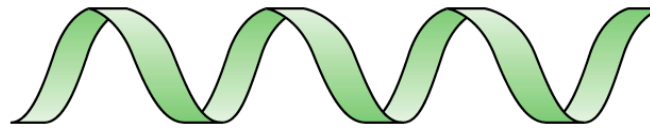
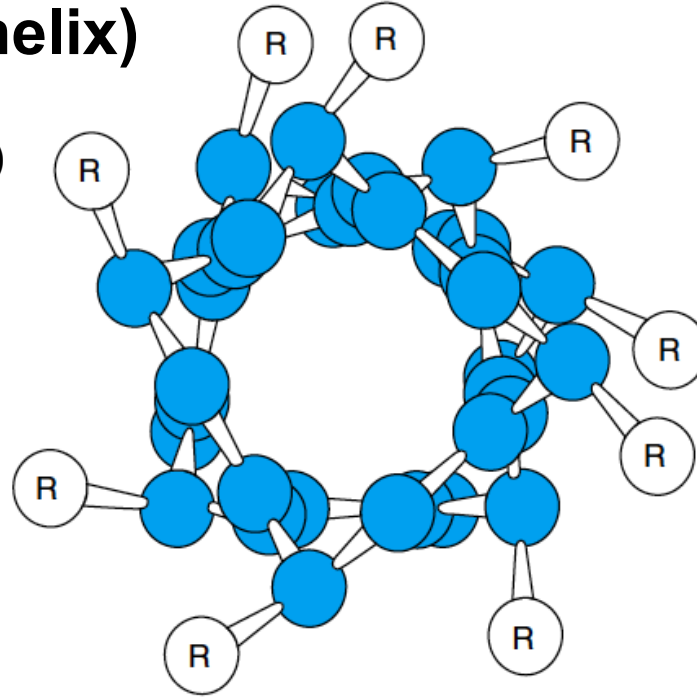
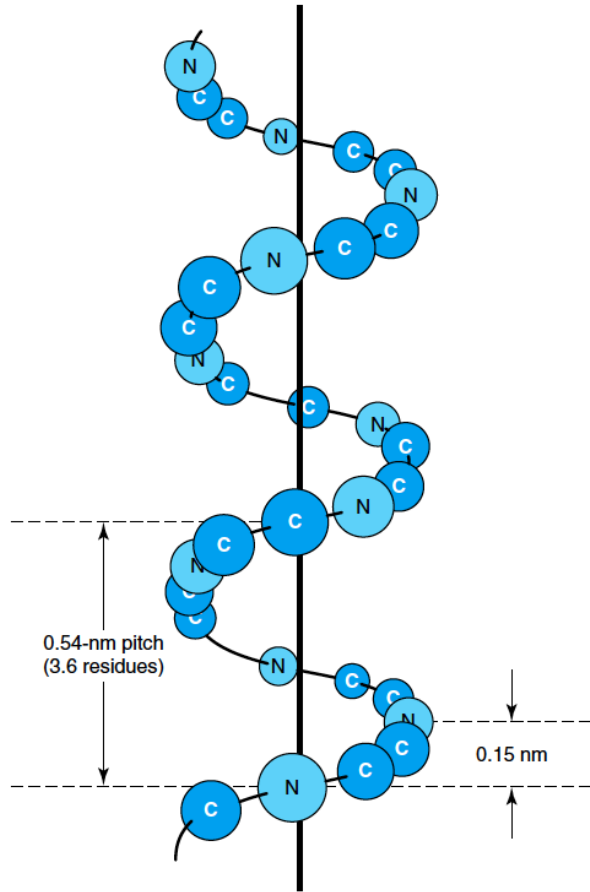
Pozn. Strukturní charakteristika peptidové vazby

VII] Sekundární struktura

1) α -šroubovice (α -helix)

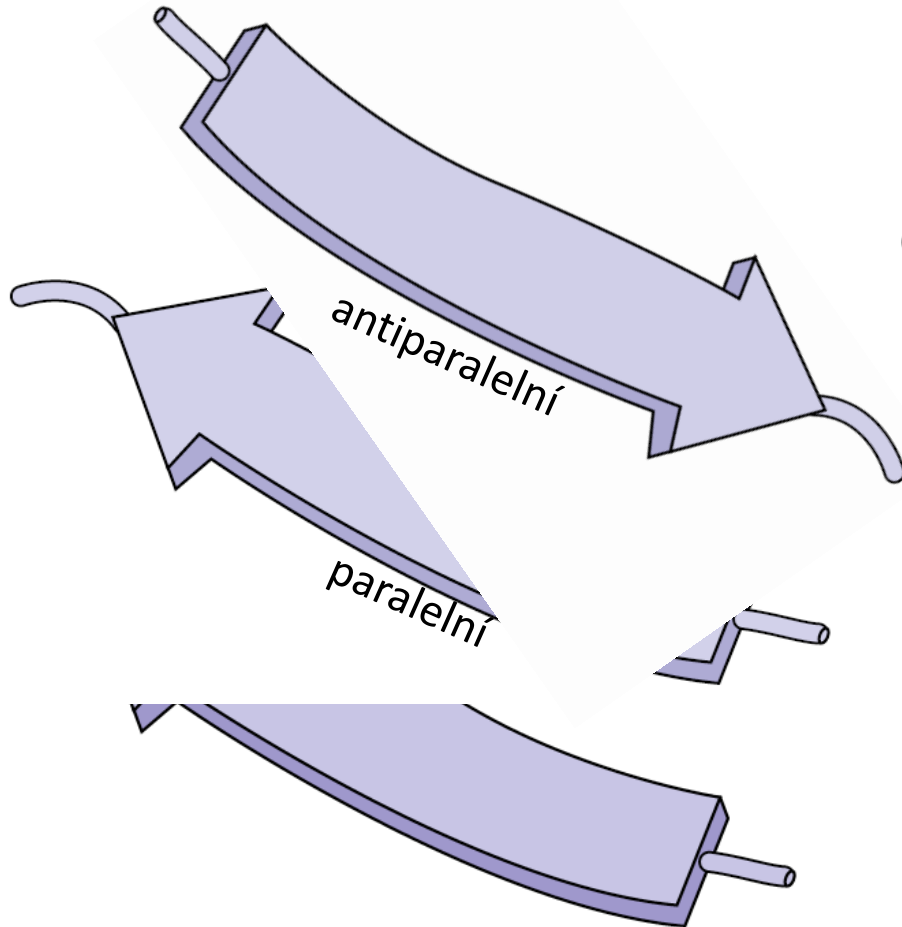
2) β -skládání list (beta-sheet)

3) Ohyb, smyčka (loop/turn)

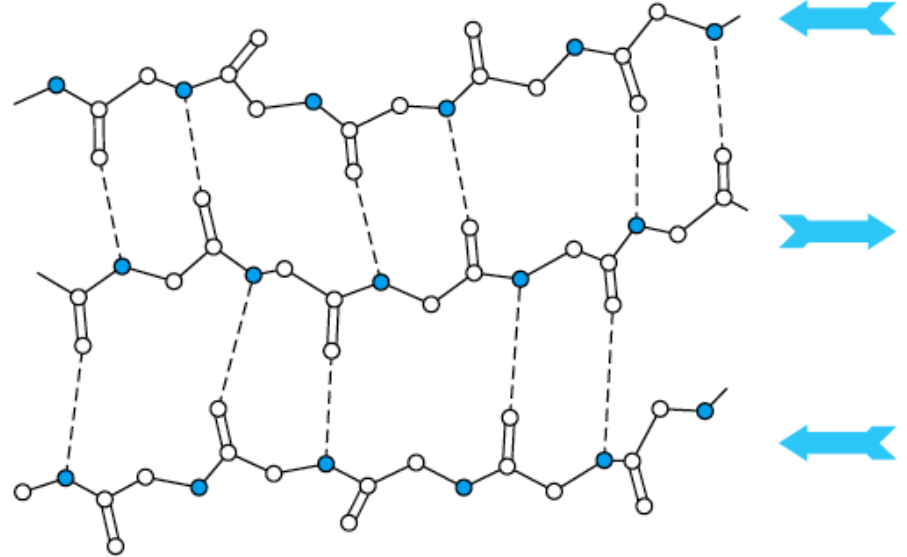


VII] Sekundární struktura

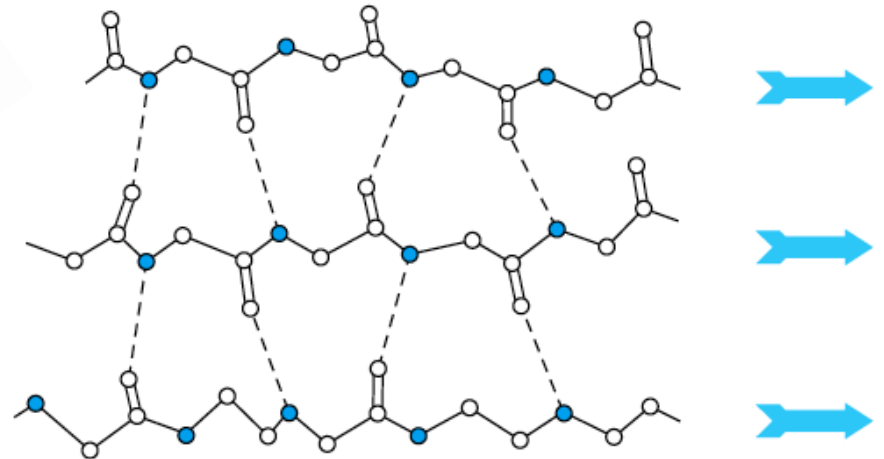
- 1) α -šroubovice (α -helix)
- 2) β -skládání list (β -sheet)
- 3) Ohyb, smyčka (turn)



antiparalelní uspořádání



paralelní uspořádání

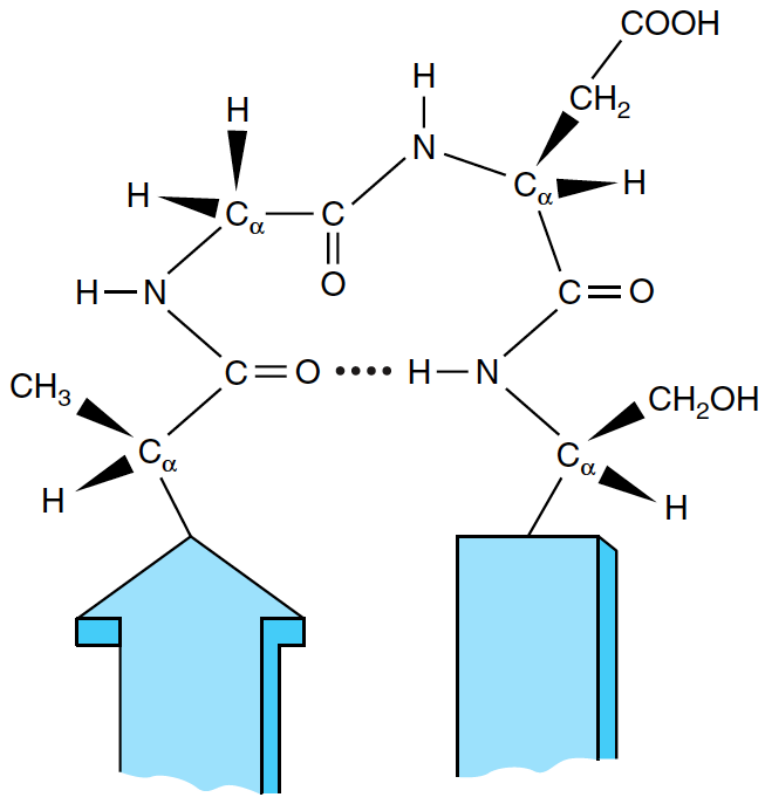


VII] Sekundární struktura

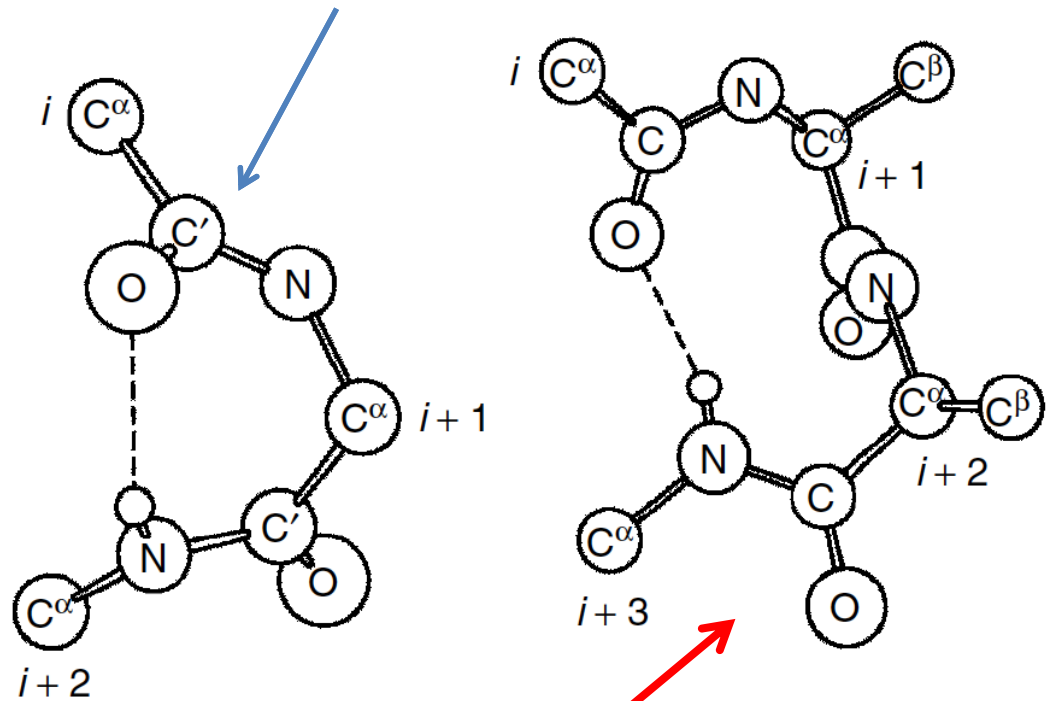
1) α -šroubovice (α -helix)

2) β -skládání list (β -sheet)

3) Ohyb, smyčka (loop/turn)

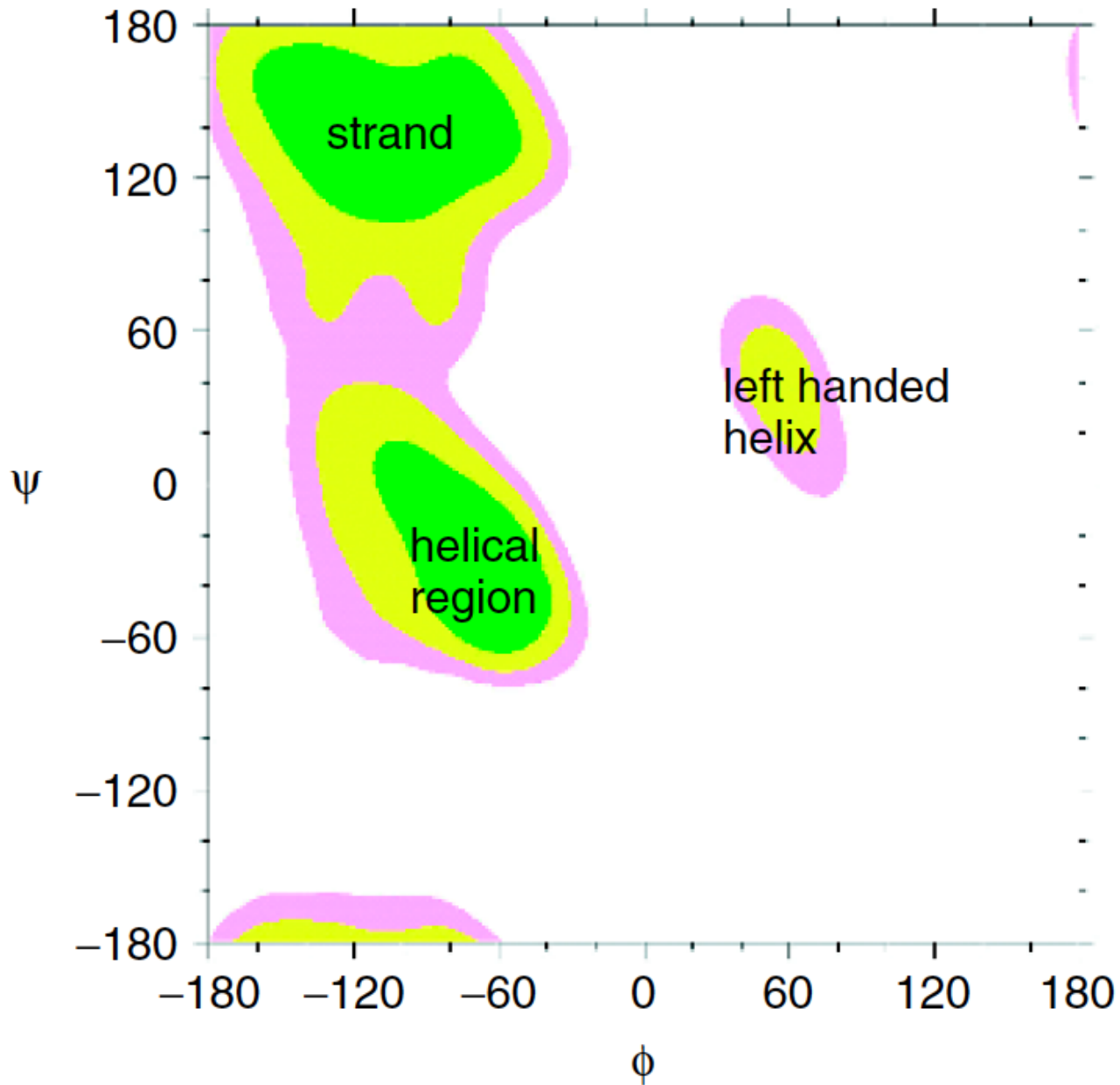


γ -smyčka/ohyb (3 residua)



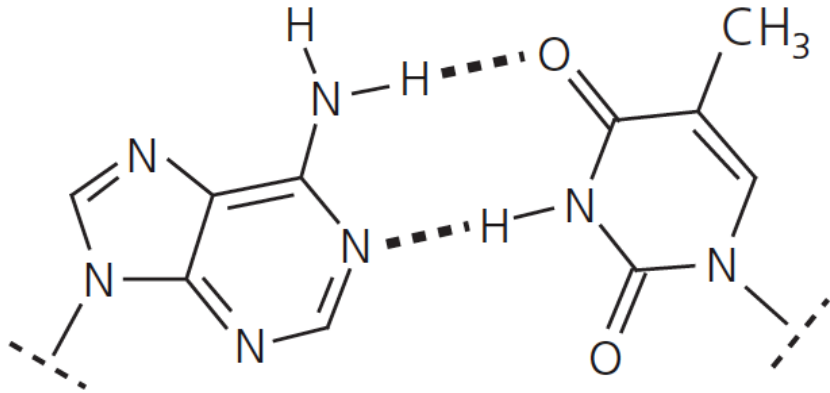
β -smyčka/ohyb (4 residua)

Ramachandranův diagram

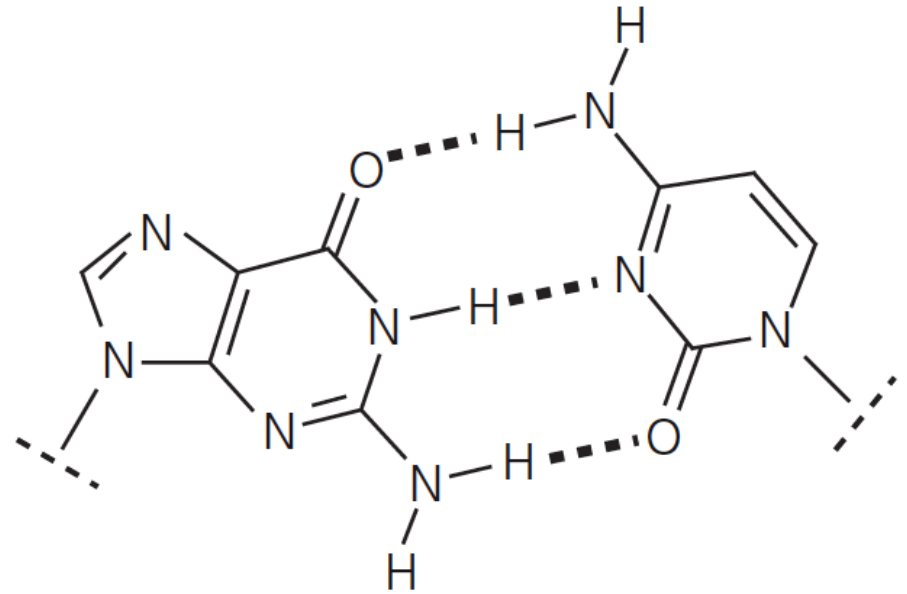


Nukleové kyseliny

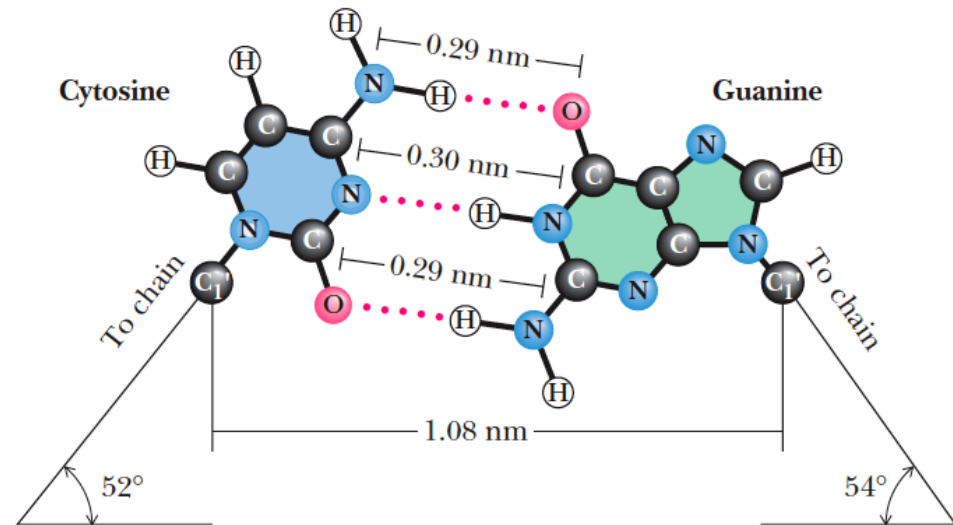
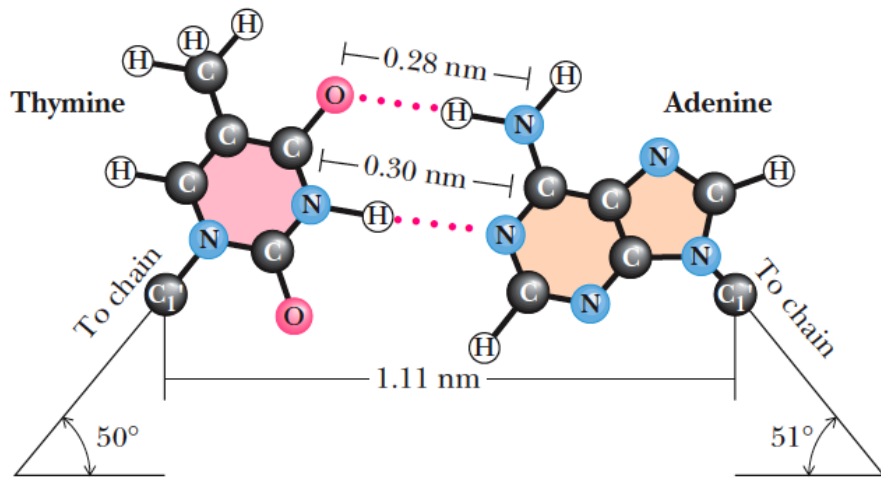
Watson-Crickovské párování bází



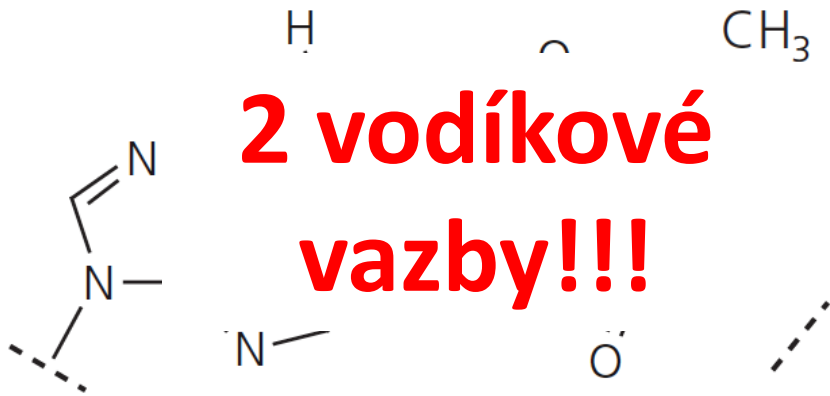
adenine : thymine



guanine : cytosine



Watson-Crickové párování bází



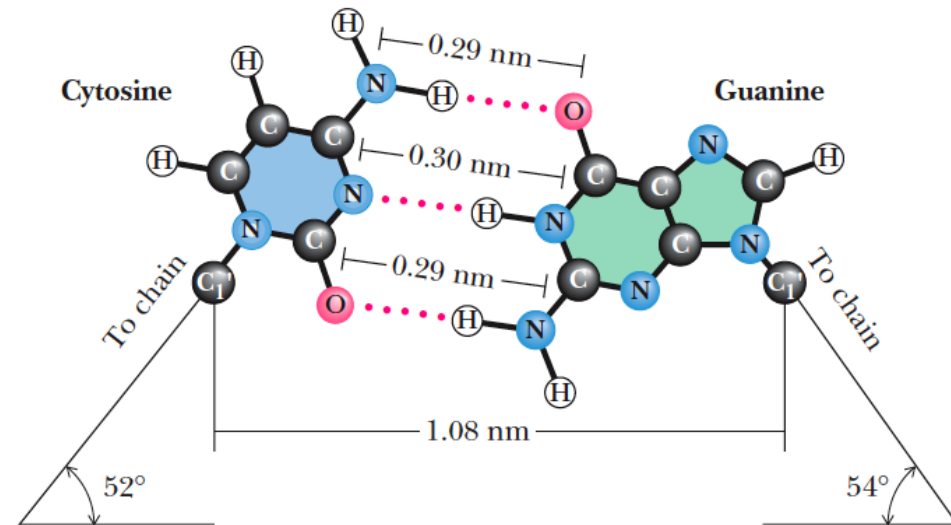
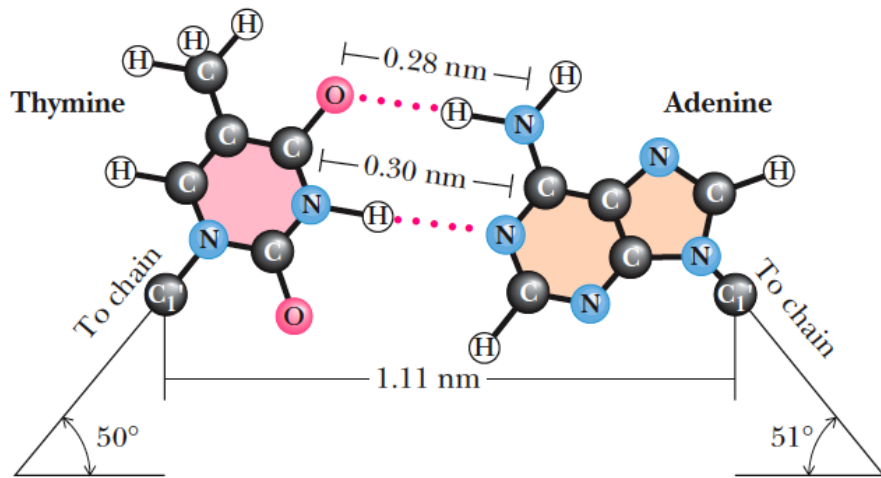
**2 vodíkové
vazby!!!**

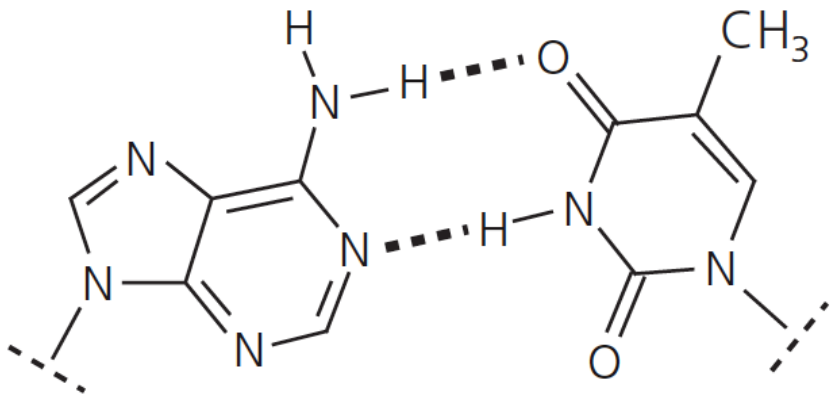
adenine : thymine



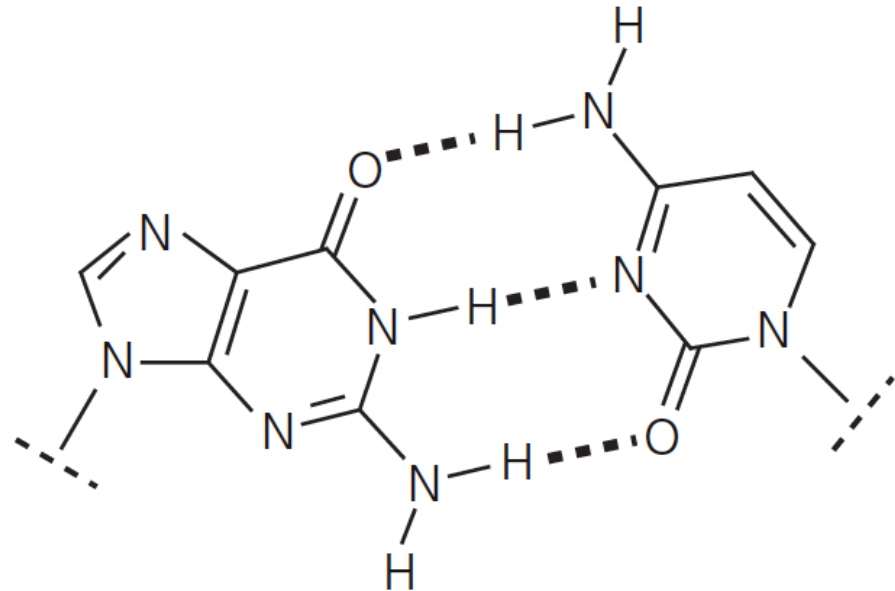
**3 vodíkové
vazby!!!**

guanine : cytosine

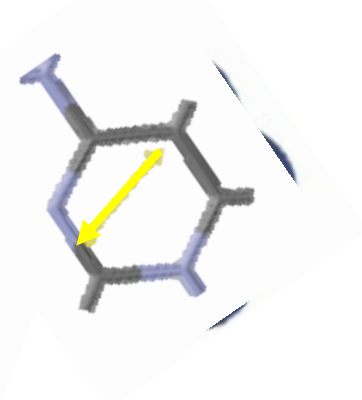
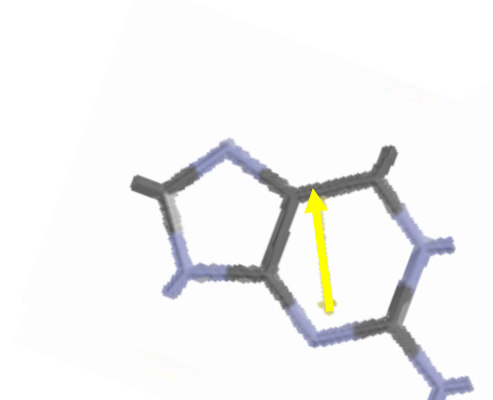
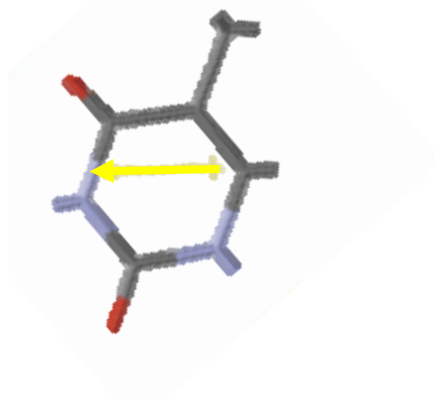
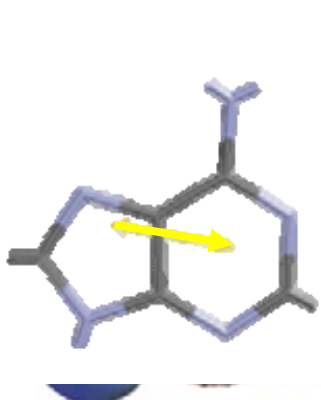




adenine : thymine

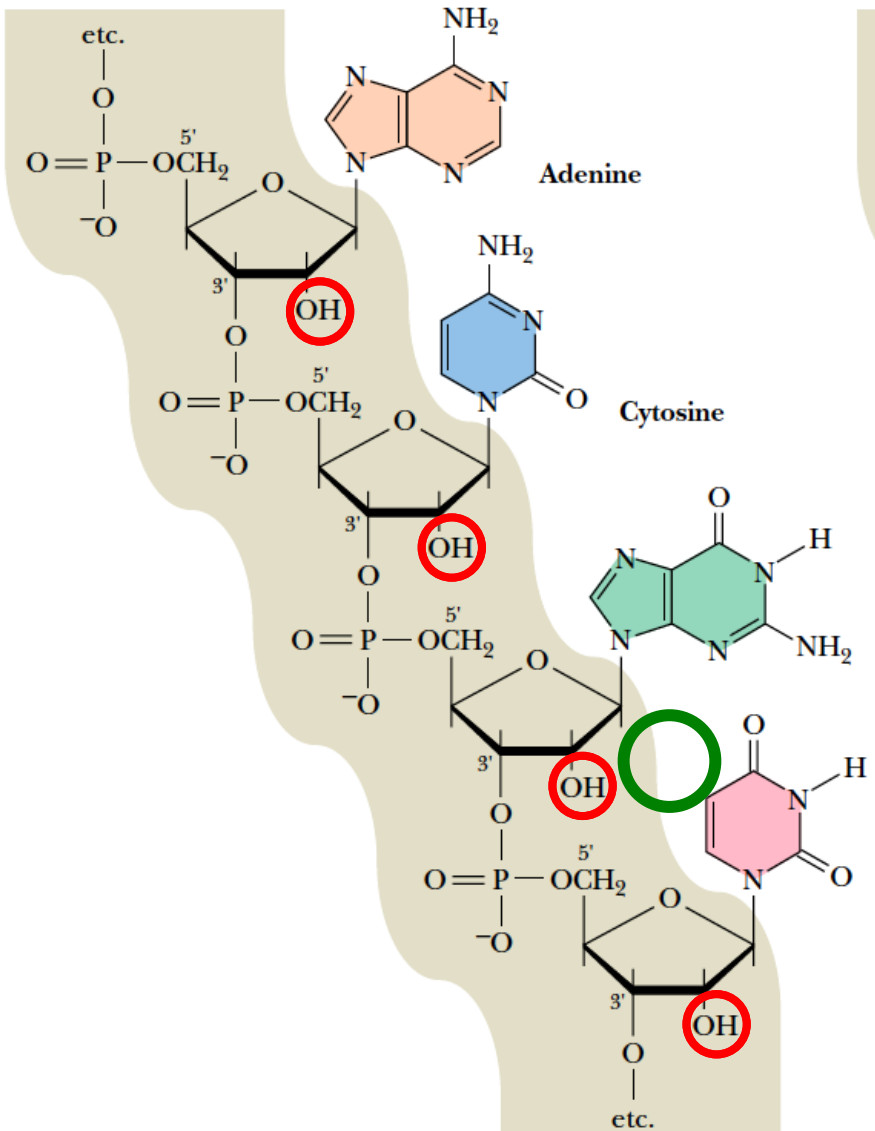


guanaine : cytosine

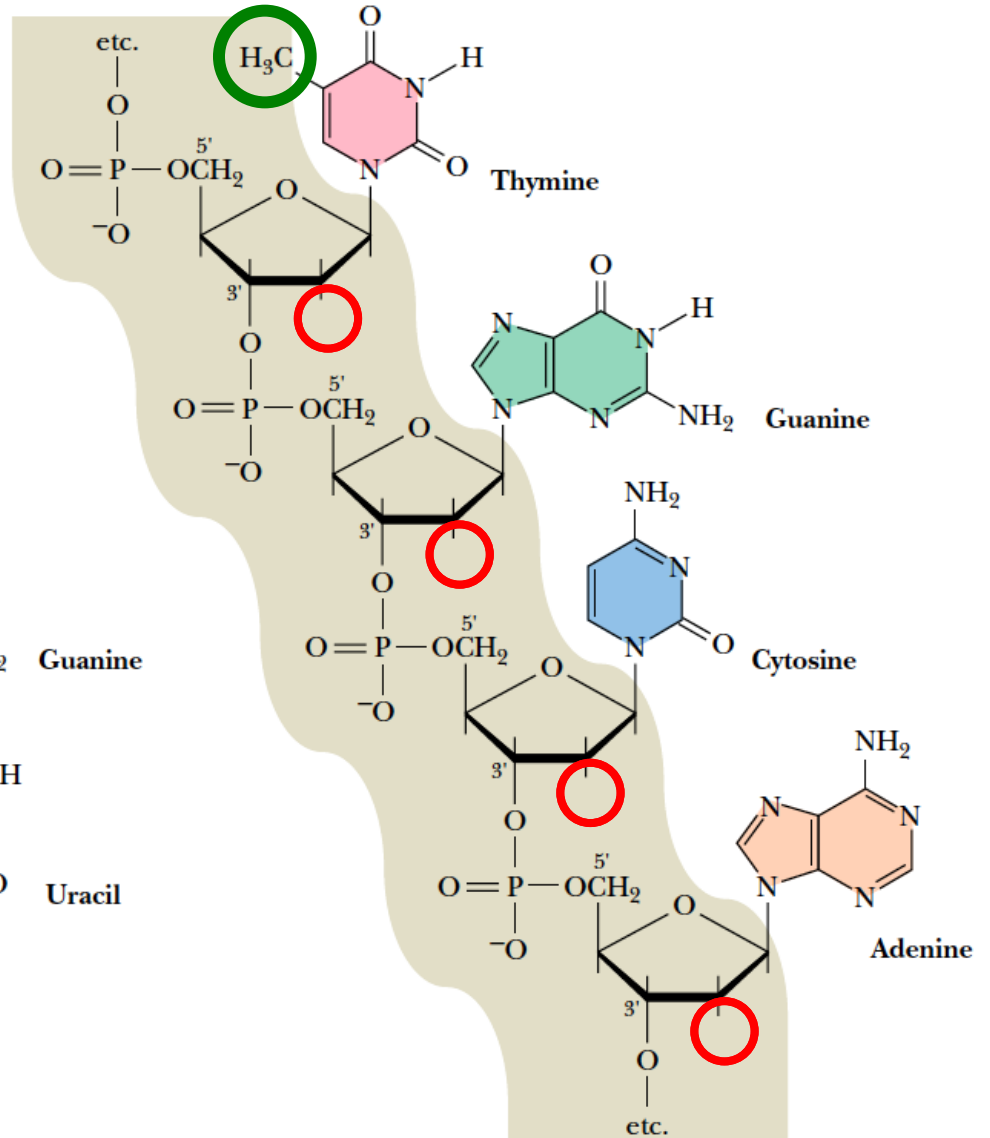


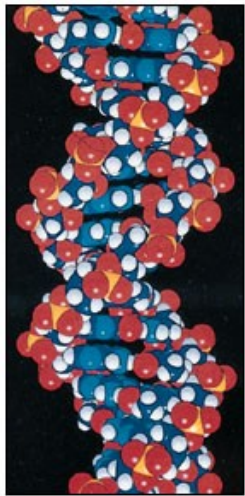
rozložení náboje v nukleobázích + 0 -, šipky označují dipólový moment

RNA



DNA



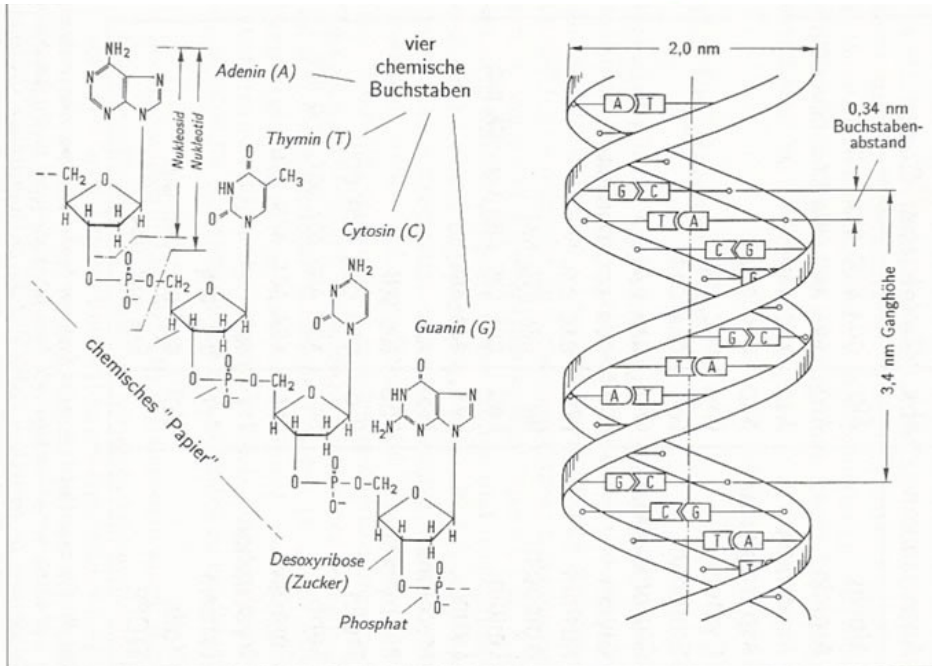
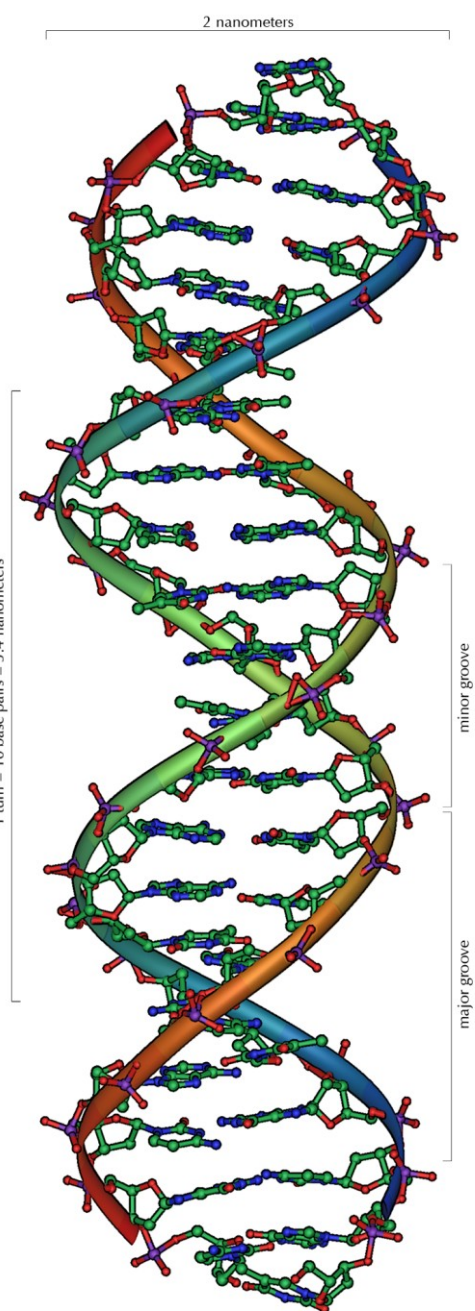
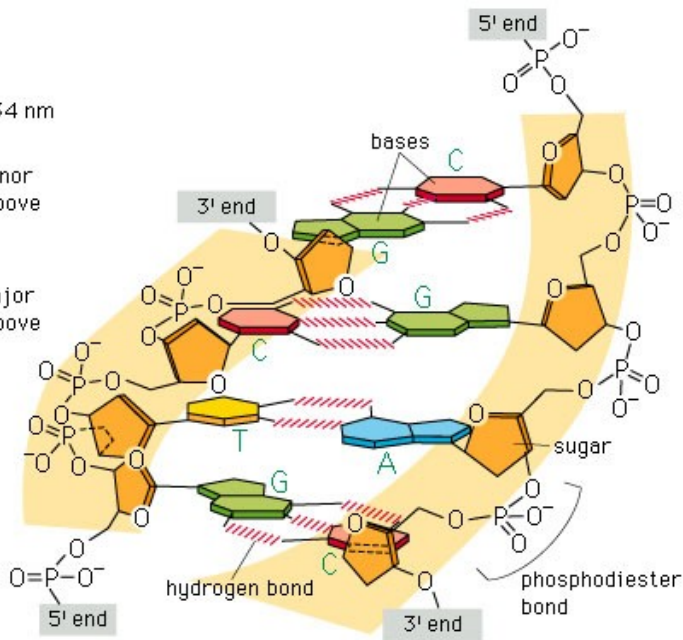


2 nm

0.34 nm

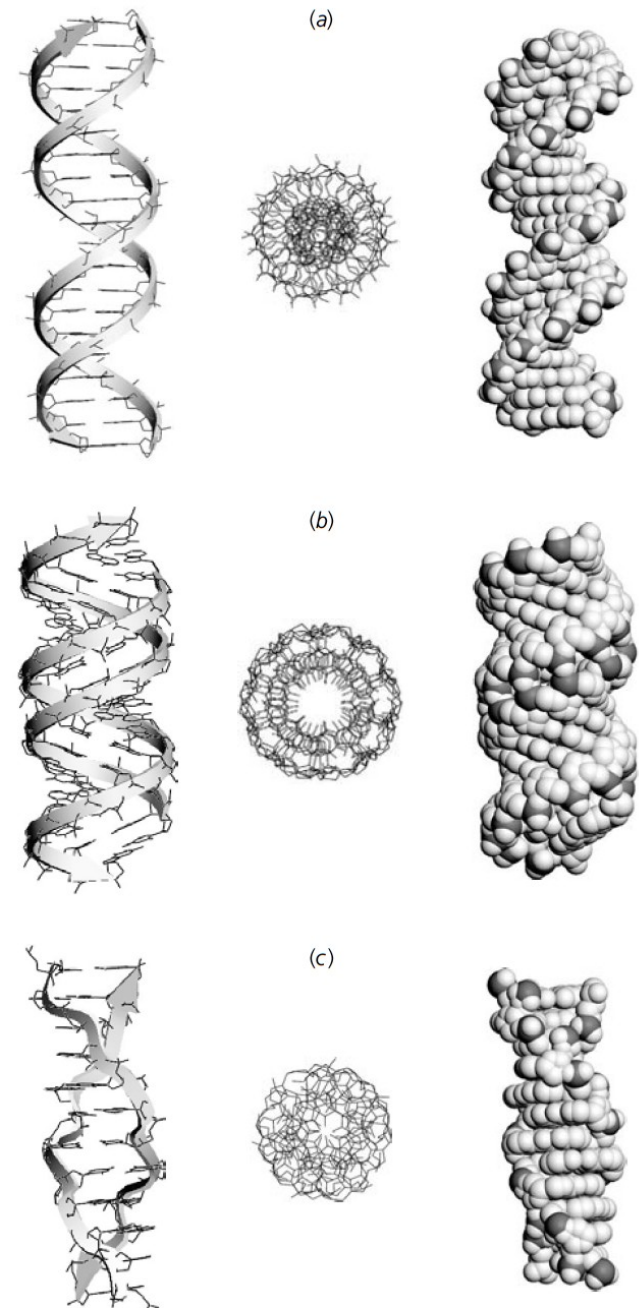
minor groove

major groove



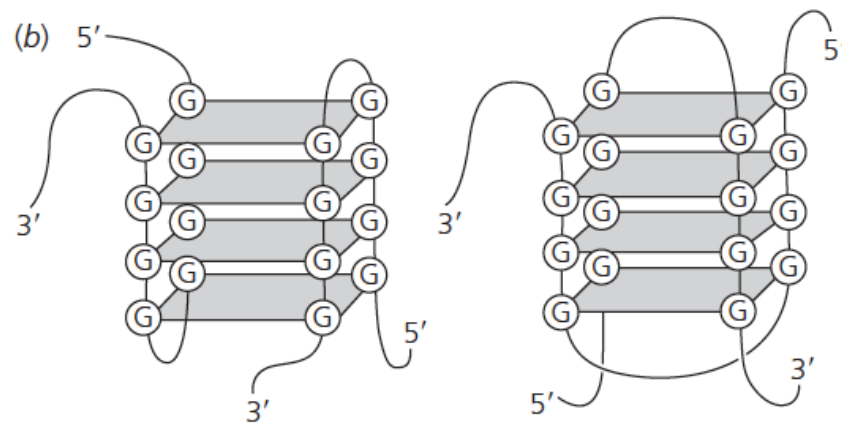
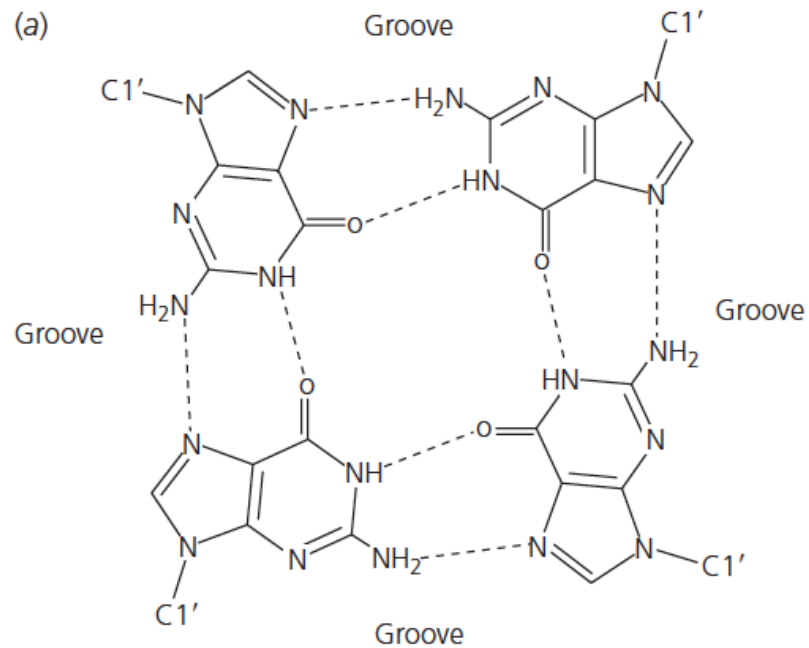
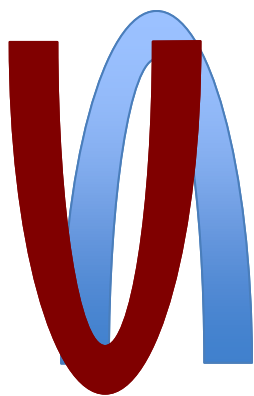
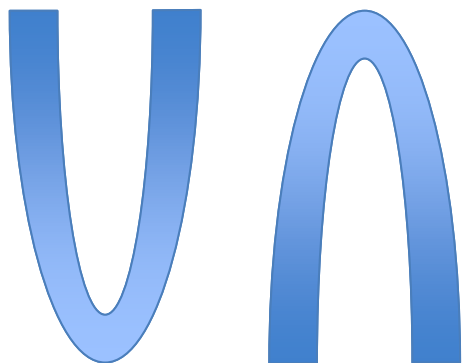
Nejběžnější typy DNA: **B-DNA** (a), **A-DNA** (b), **Z-DNA** (c)

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



Quadruplexové struktury

Pozn. Jeden z příkladů jiné než dvoušroubovicové struktury



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**:

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

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 $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$, hovoříme o **molárním absorpčním koeficientu**.

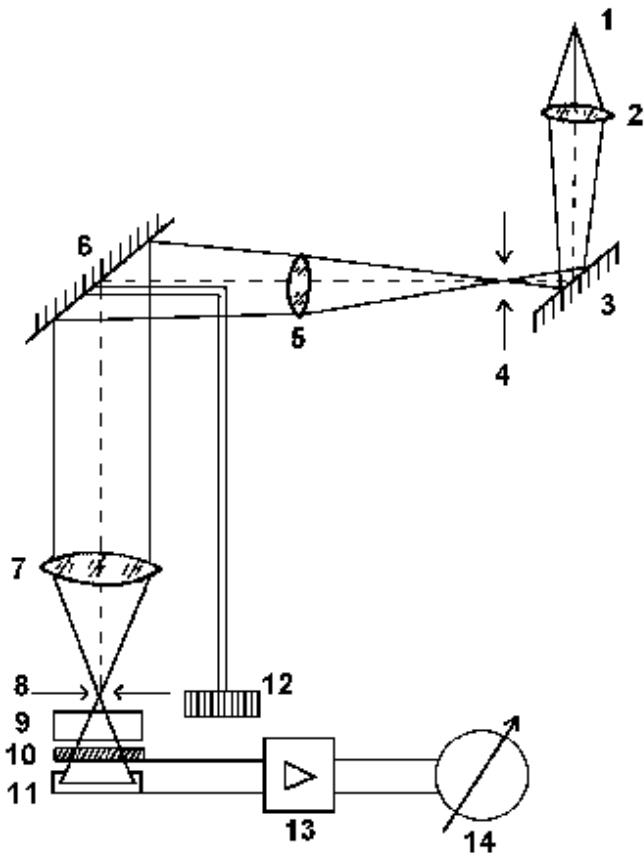
Poměr intenzit světla prošlého a dopadajícího se nazývá **transmittance** (dříve transparenence). Dekadický logaritmus převrácené hodnoty transmittance se nazývá **absorbance** A . S ohledem na L.-B. zákon je tedy absorbance přímo úměrná koncentraci rozpuštěné látky a tloušťce absorbující vrstvy roztoku.

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot x$$

Druhy absorpčních spektrofotometrů

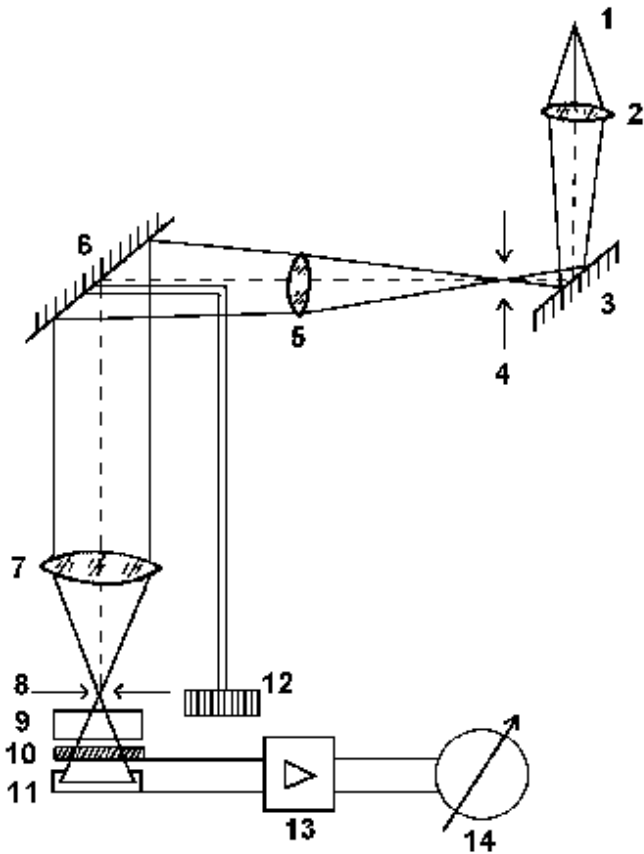
- Podle konstrukce rozdělujeme spektrofotometry na jednopaprskové a dvoupaprskové.
- U **jednopaprskových spektrofotometrů** jeden svazek světla prochází nejdříve srovnávacím a pak měřeným vzorkem (kyvety obsahující roztoky musí být pohyblivé). U **dvoupaprskových spektrofotometrů** jeden svazek světla 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.

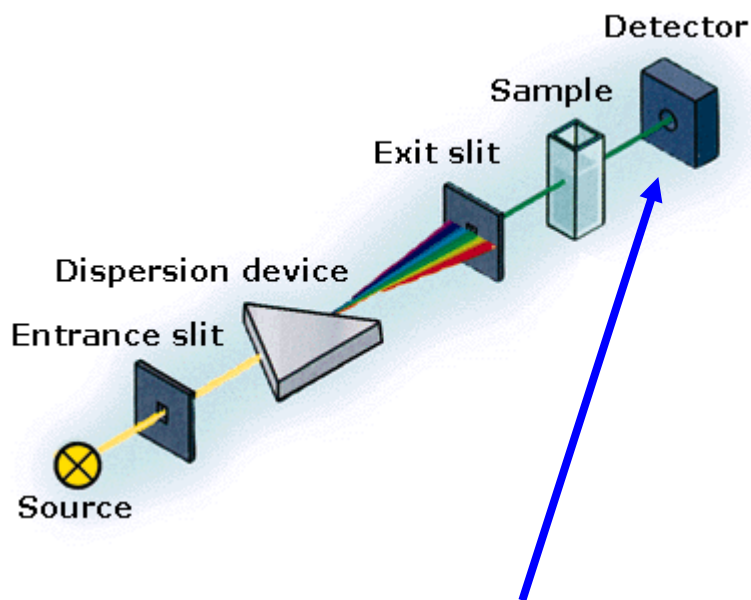
Jednopaprskový spektrofotometr



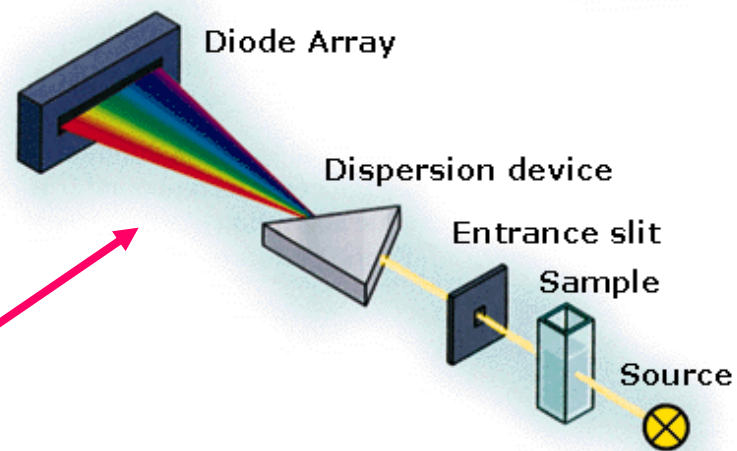
S mřížkou lze otáčet pomocí **ovladače vlnových délek** (12), čímž se zaměřuje světlo o určité vlnové délce na výstupní štěrbinu. Svazek světla pak prochází **kyvetou** (9) se vzorkem. Intenzita prošlého světla je měřena fotodetektorem (10, 11). Jeho signál je zesilován **zesilovačem** (13). Hodnota 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 **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.

UV/Vis spektroskopie proteinů

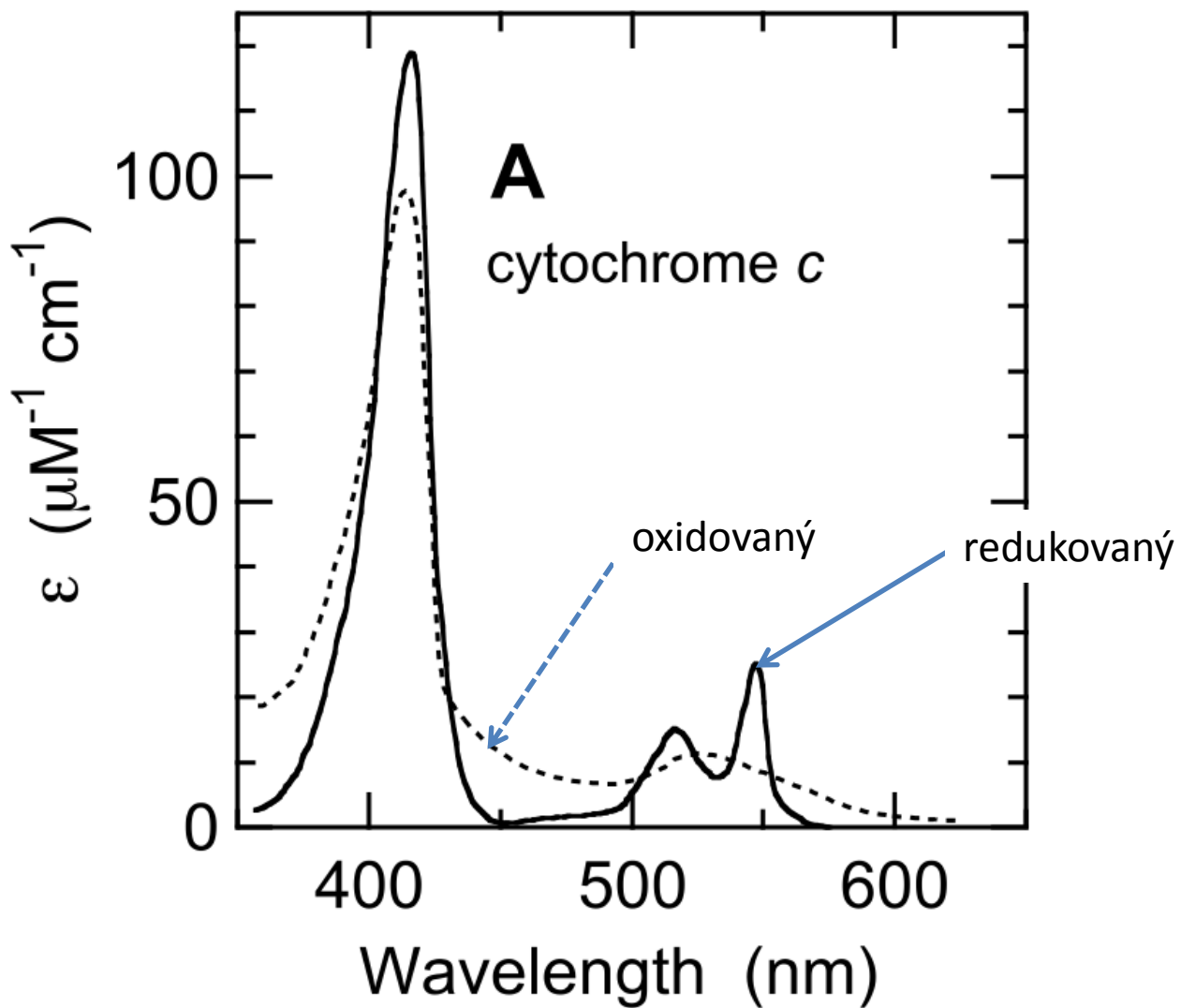
Absorpční spektrum volného fenylalaninu, tyrosinu a tryptofanu v UV oblast

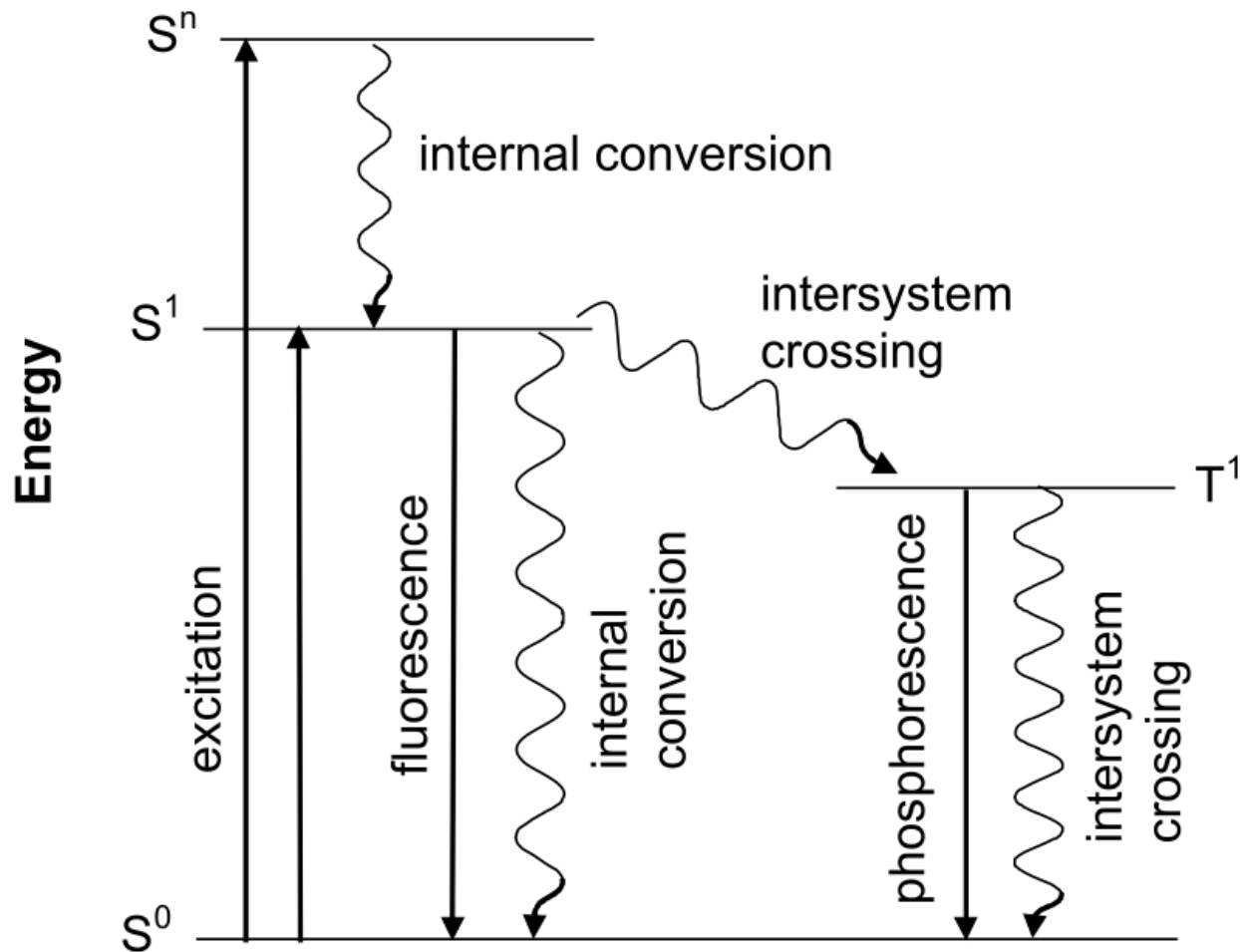
Podle:<http://www.fst.rdg.ac.uk/courses/fs460/lecture6/lecture6.htm>

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]

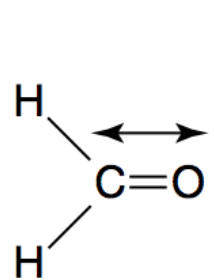




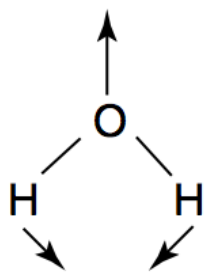
Zářivé procesy (absorpce, fluorescence, fosforescence) jsou indikovány rovnými šipkami. Nezářivé procesy jsou naznačeny zvlněnými šipkami. Diagramy tohoto typu byly zavedeny A. Jablonskim v jeho práci z r. 1935 na téma mechanismu fosforescence. Horizontální osa nemá fyzikální význam.

IR spektrofotometrie

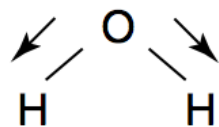
- Infračervené záření (IR) působí na rotační a vibrační stavy molekul. Složité molekuly mohou vibrovat nebo rotovat mnoha různými způsoby (módy). Různé chemické skupiny (-CH₃, -OH, -COOH, -NH₂ atd.) mají specifické vibrační a rotační frekvence, a proto absorbují IR světlo o specifických vlnových délkách.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



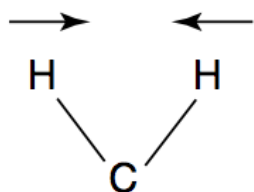
Stretching



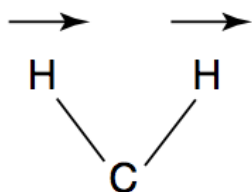
Bending



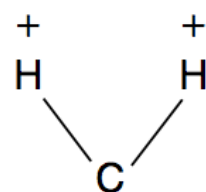
Stretching



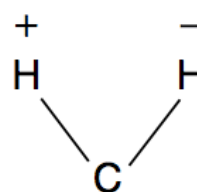
Deformation



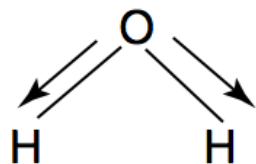
Rocking



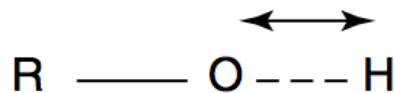
Wagging



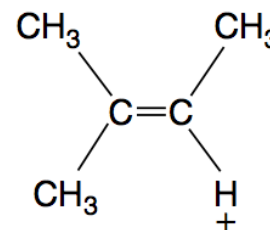
Twisting



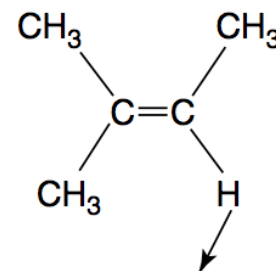
Symmetric stretching



Asymmetric stretching



Out-of-plane bending



In-plane bending

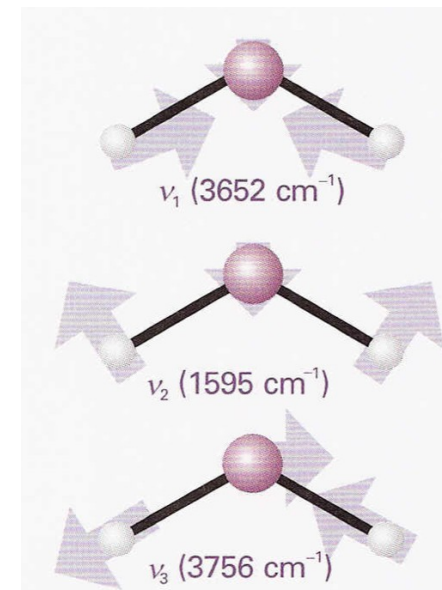
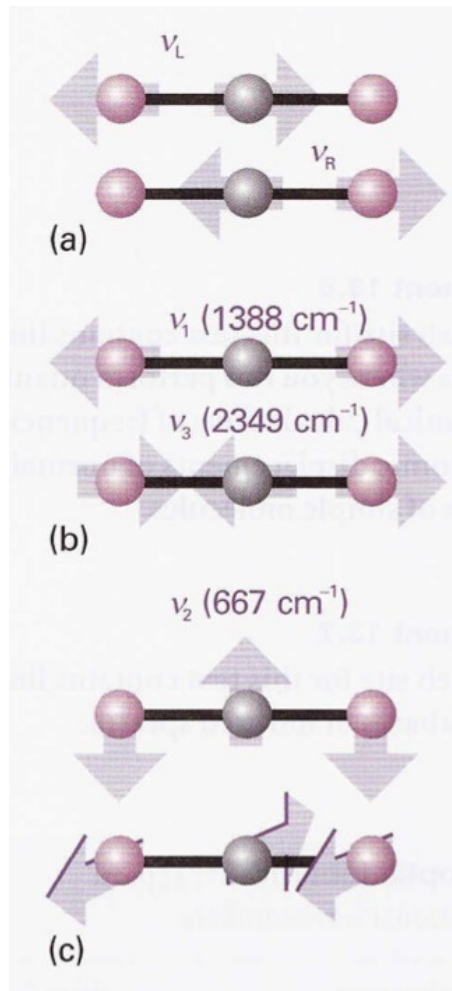
Vibrace

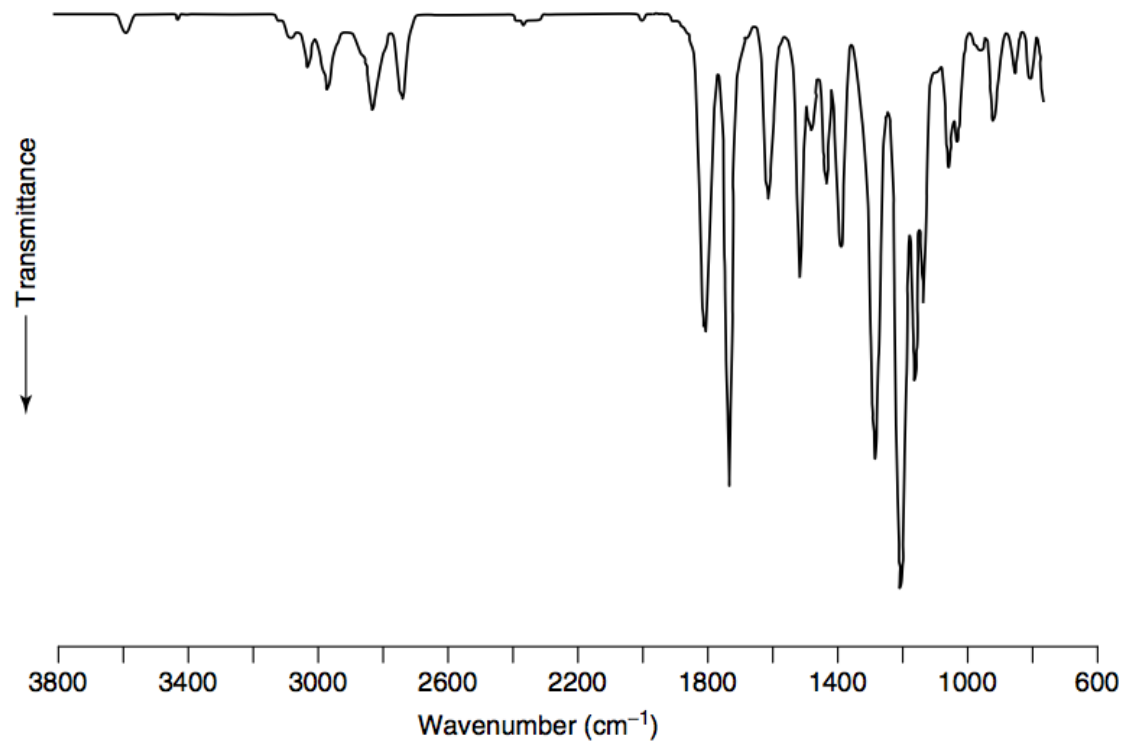
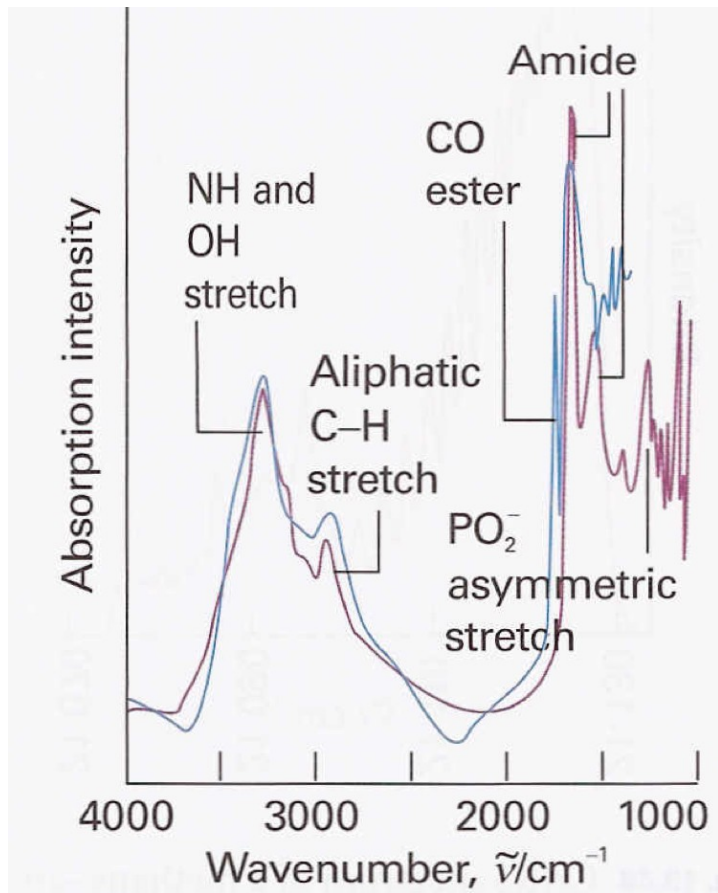
ν/cm^{-1}

C—H stretch	2850–2960
C—H bend	1340–1465
C—C stretch, bend	700–1250
C=C stretch	1620–1680
C≡C stretch	2100–2260
O—H stretch	3590–3650
H-bonds	3200–3570
C=O stretch	1640–1780
C≡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

CO_2

H_2O



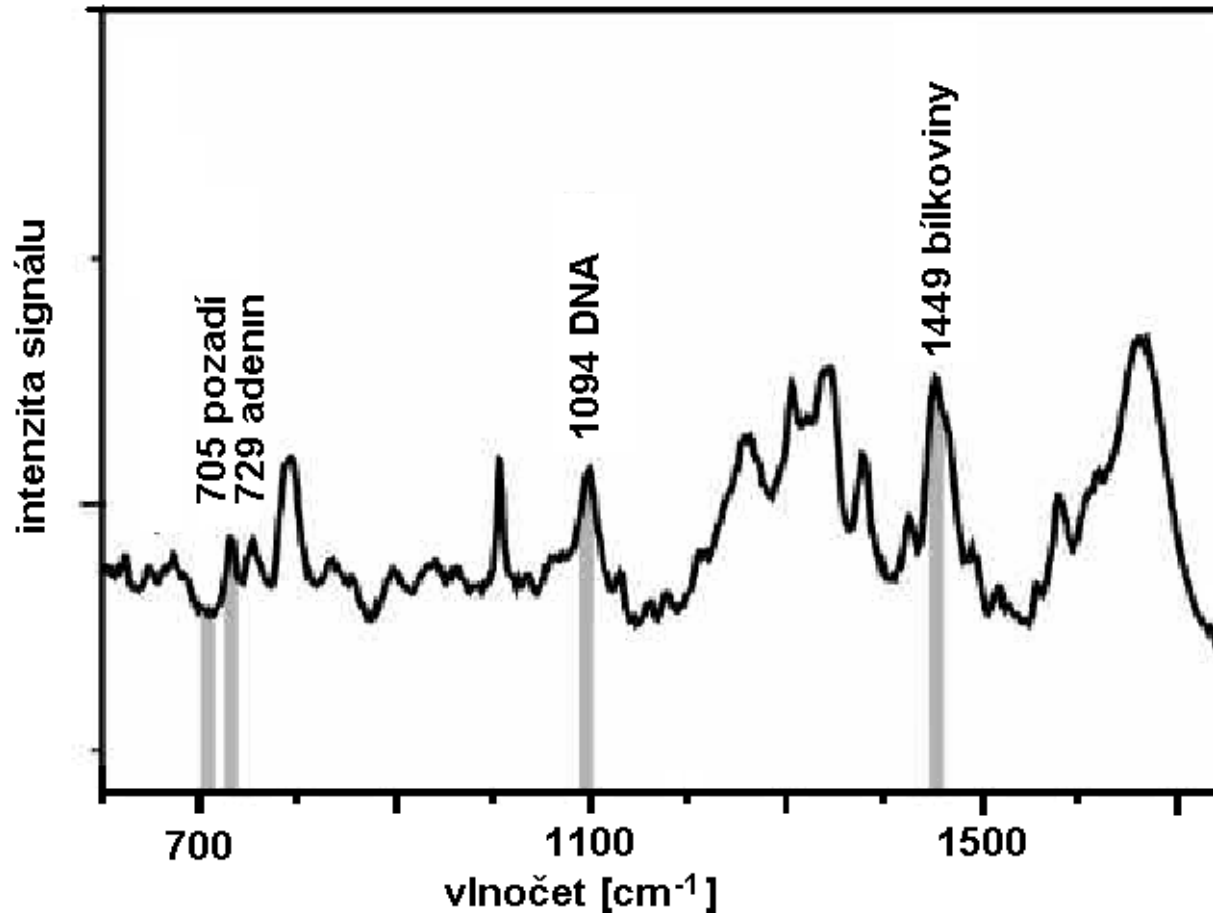


Ukázka IR spekter. Vlevo absorpční spektrum živé (fialově) a umírající (modře) buňky. Vpravo spektrum vanilinu.

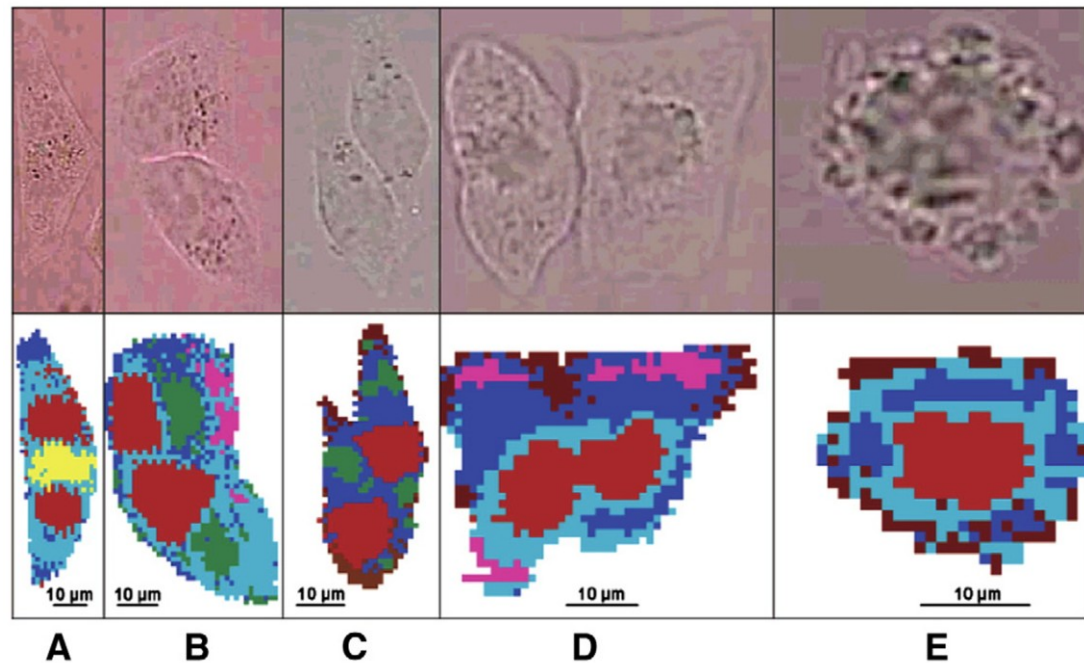
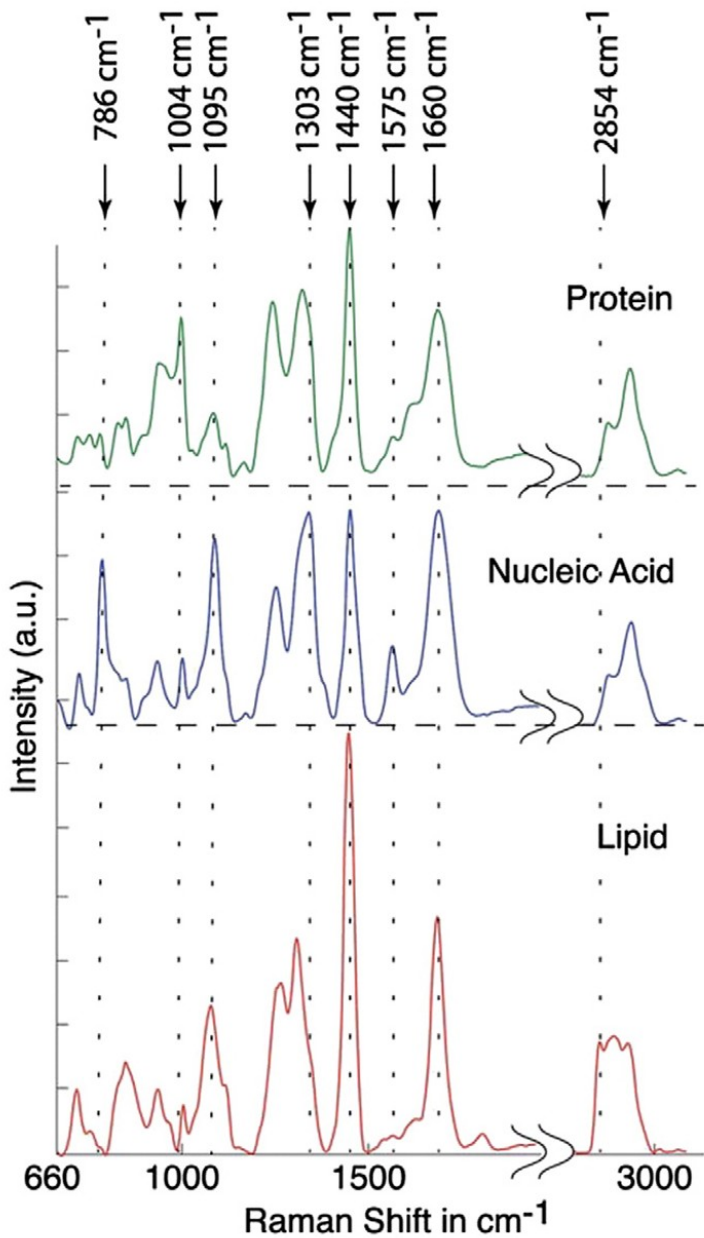
Ramanova spektroskopie

- **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 mikroskopií. Vybuzeo laserovým světlem o vlnové délce 647.1 nm.



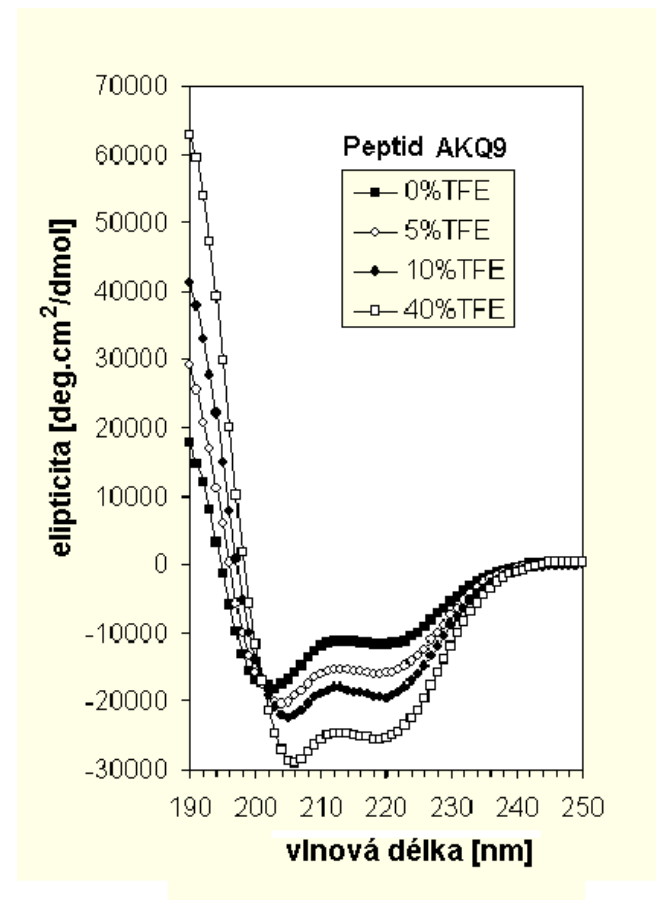
Colors assigned to different cluster memberships of the Raman spectra of:

- 1) nucleus (red),
- 2) cytoplasm (blue, cyan),
- 3) microtubule (yellow),
- 4) vesicles (green),
- 5) peripheral membrane (brown),
- 6) inclusion bodies (magenta).

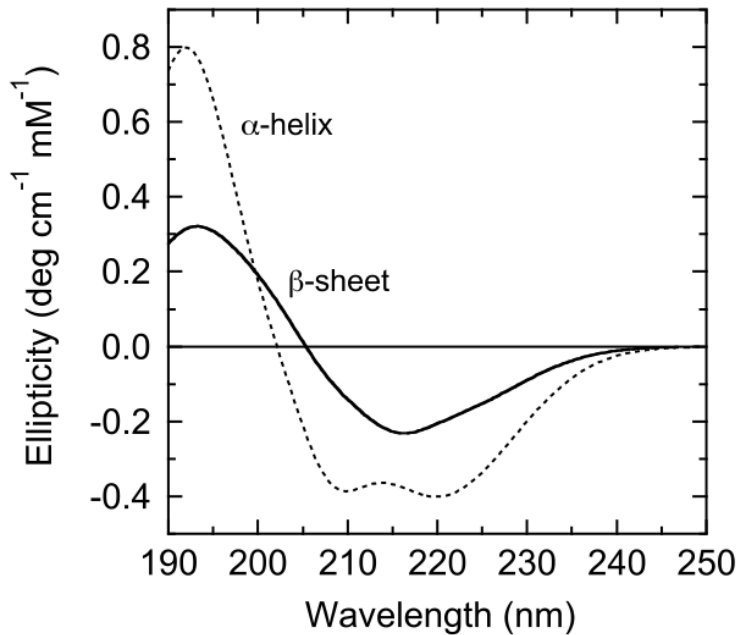
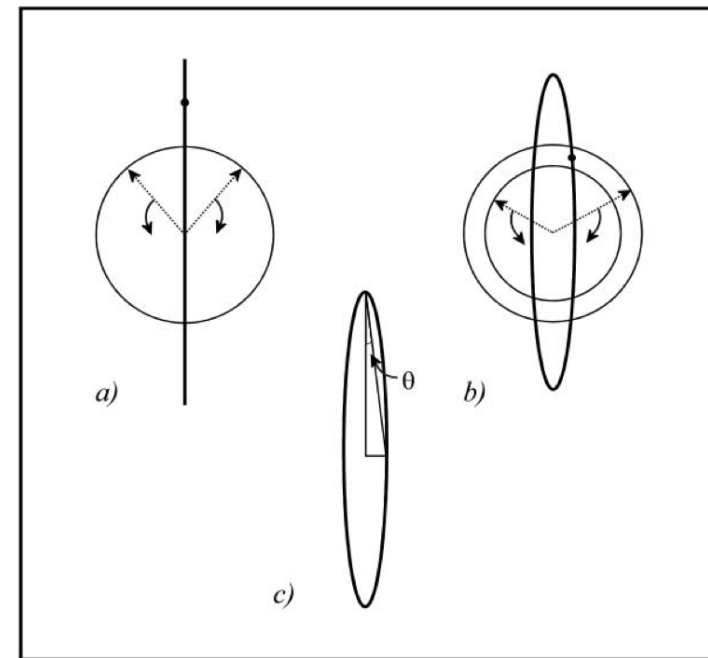
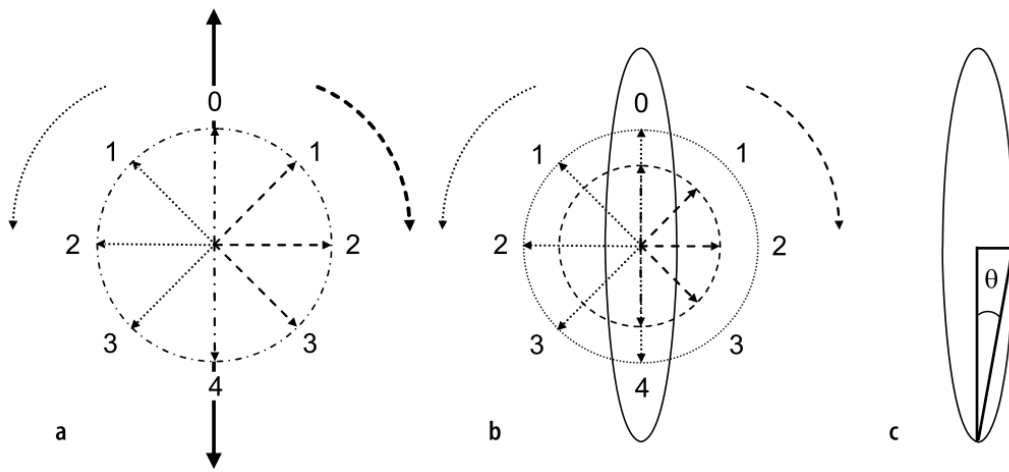
Cirkulární dichroismus (CD)

- 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 blízka 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/polyg.htm>



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



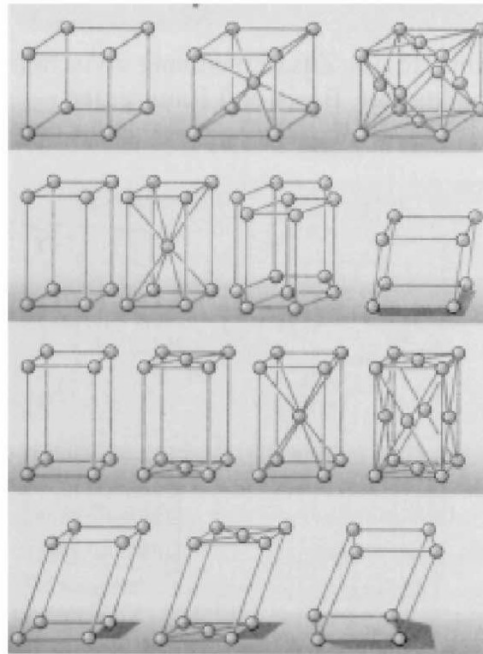
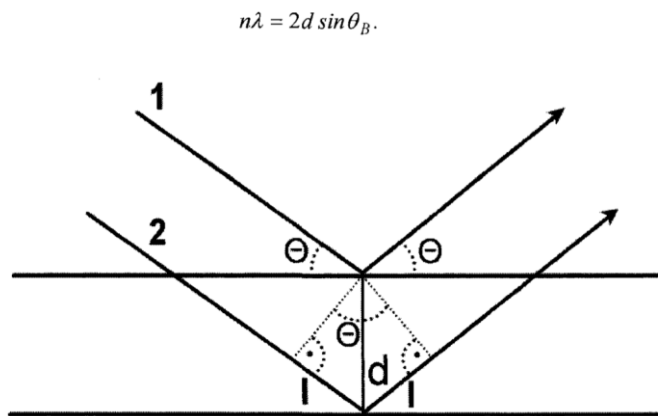
Nejčastěji se CD vyjadřuje jako závislost na Delta Epsilon.

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

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

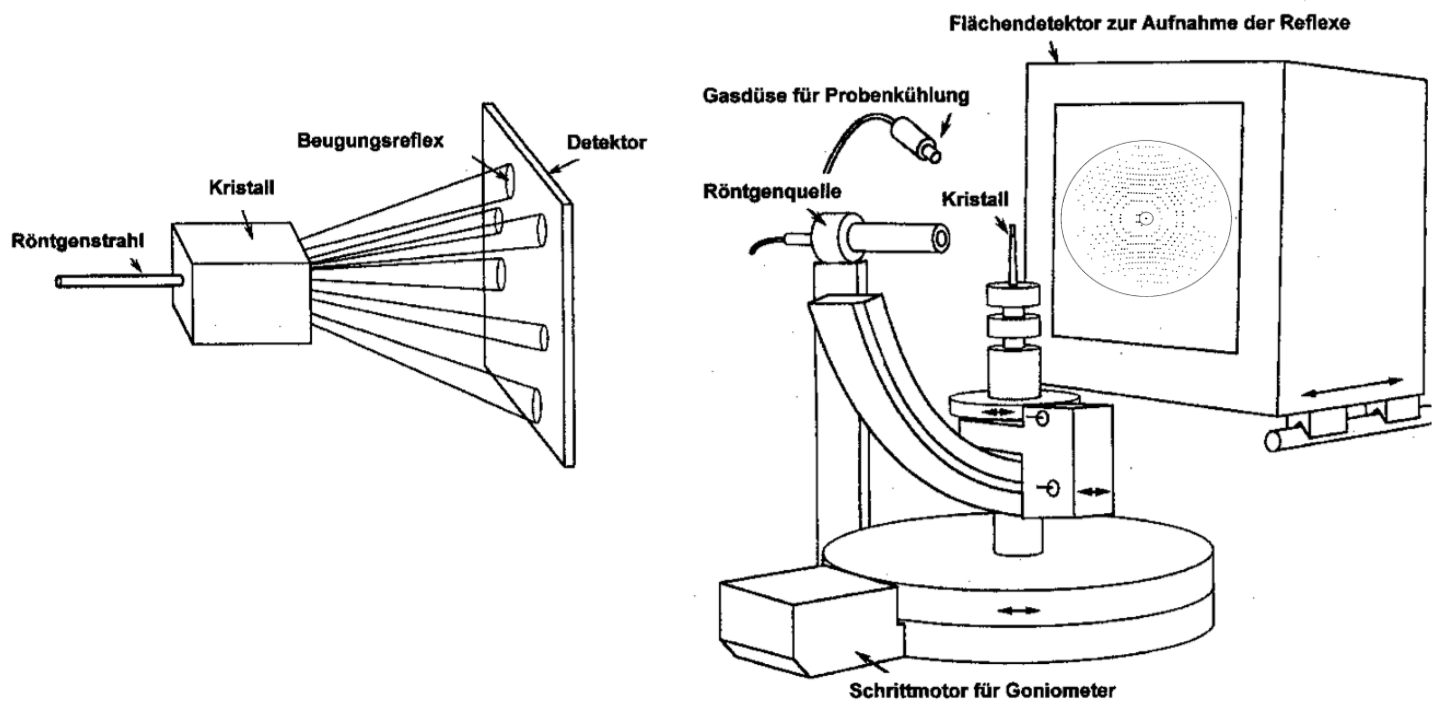
Rentgenstrukturní analýza

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.

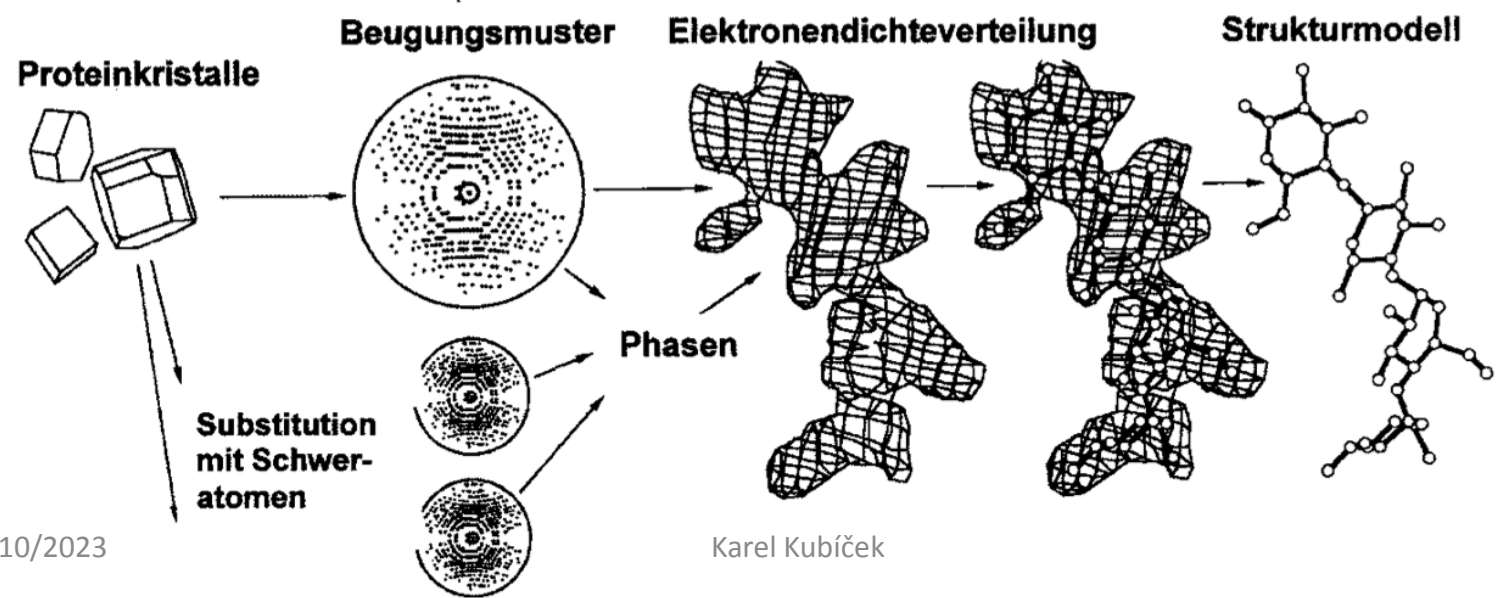


Raumgitter

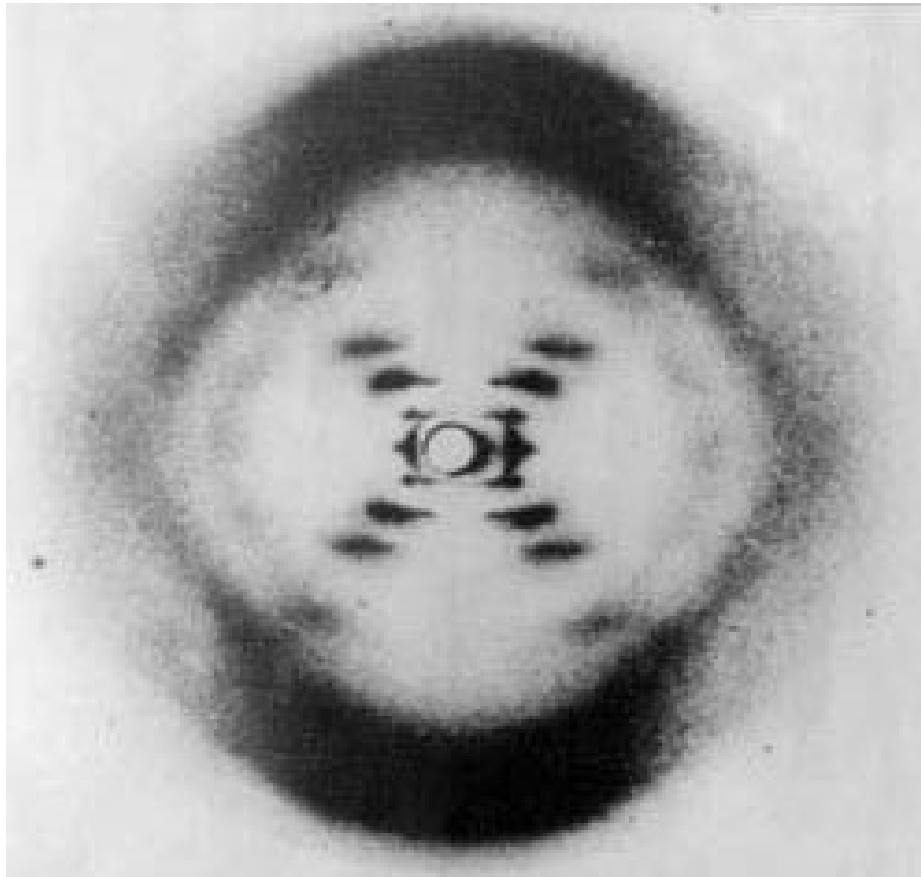
$\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3 \neq 90^\circ$:	triklin
$\alpha_1 = \alpha_2 = 90^\circ$, $\alpha_3 \neq 90^\circ$:	monoklin
$\alpha_1 = \alpha_2 = \alpha_3 = 90^\circ$, $a_0 \neq b_0 \neq c_0$:	orthorhombisch
$\alpha_2 = \alpha_3 = 90^\circ$, $\alpha_1 = 60^\circ$, $b_0 = c_0$:	hexagonal
$\alpha_1 = \alpha_2 = \alpha_3 \neq 90^\circ$, $a_0 = b_0 = c_0$:	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



Verfeinerung („refinement“) der Struktur



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

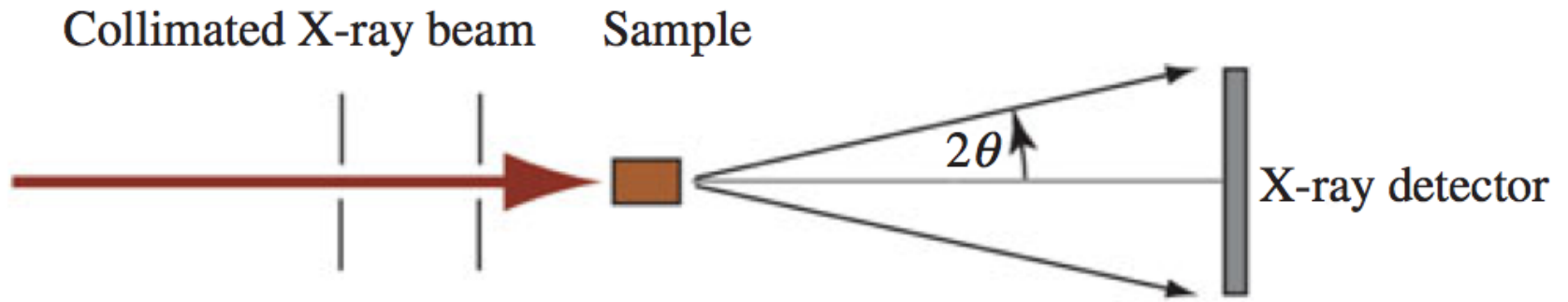


C



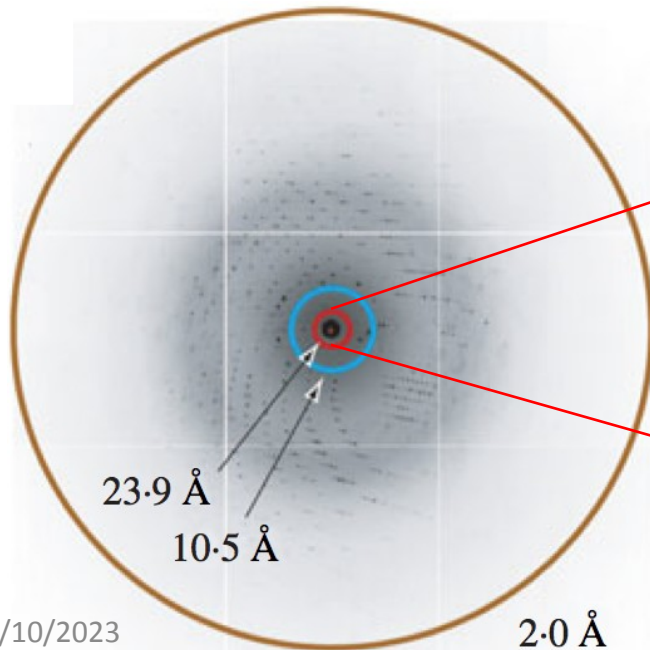
W

Experimental setup



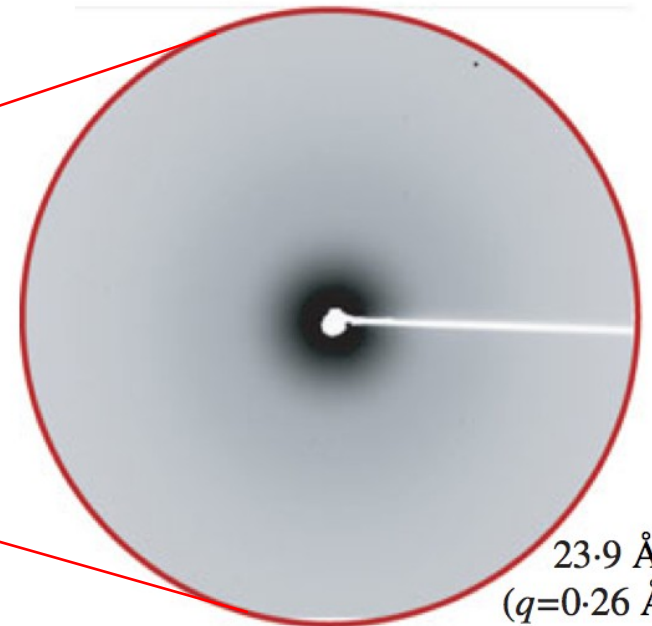
X-ray

SAXS

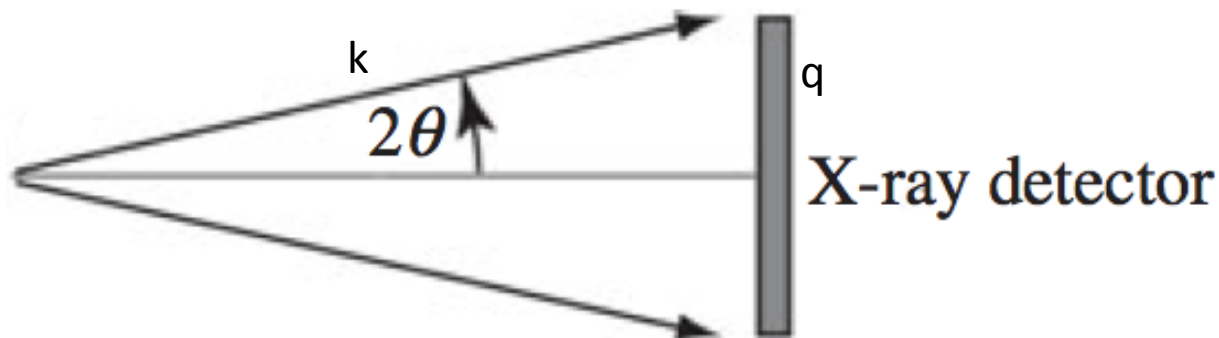


16/10/2023

Karel Kubíček



(very tiny) bit of theory

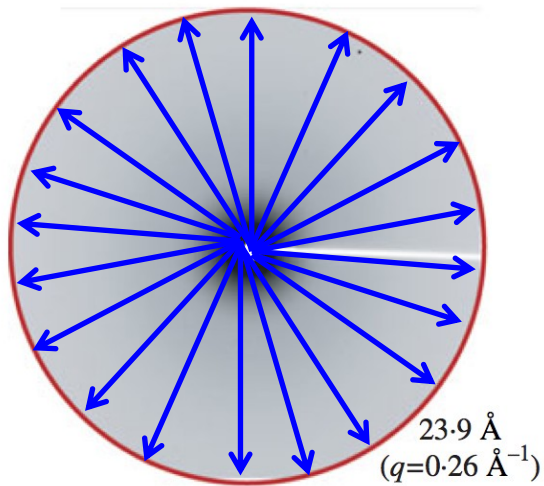


$$q=2k.\sin\theta \quad \Rightarrow \quad q/2/k=\sin\theta,$$

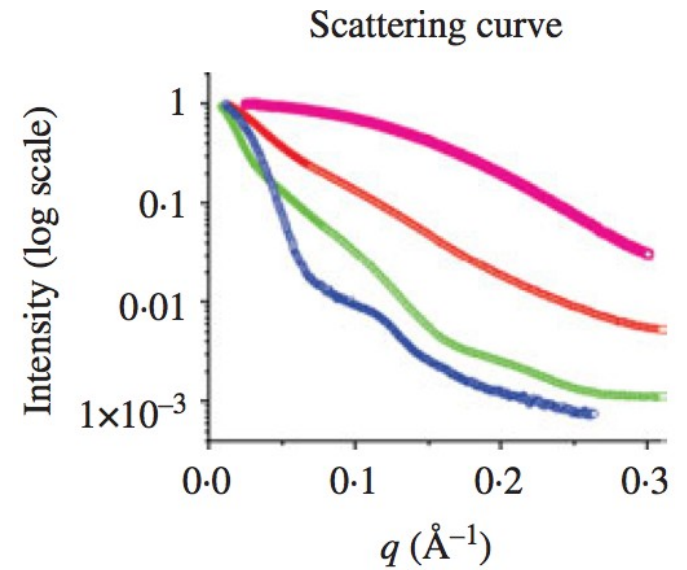
$$k=2\pi/\lambda \quad \Rightarrow \quad \mathbf{q=4\pi/\lambda.\sin\theta}$$

Often q is denoted as s

1st step: scattering to scattering curve

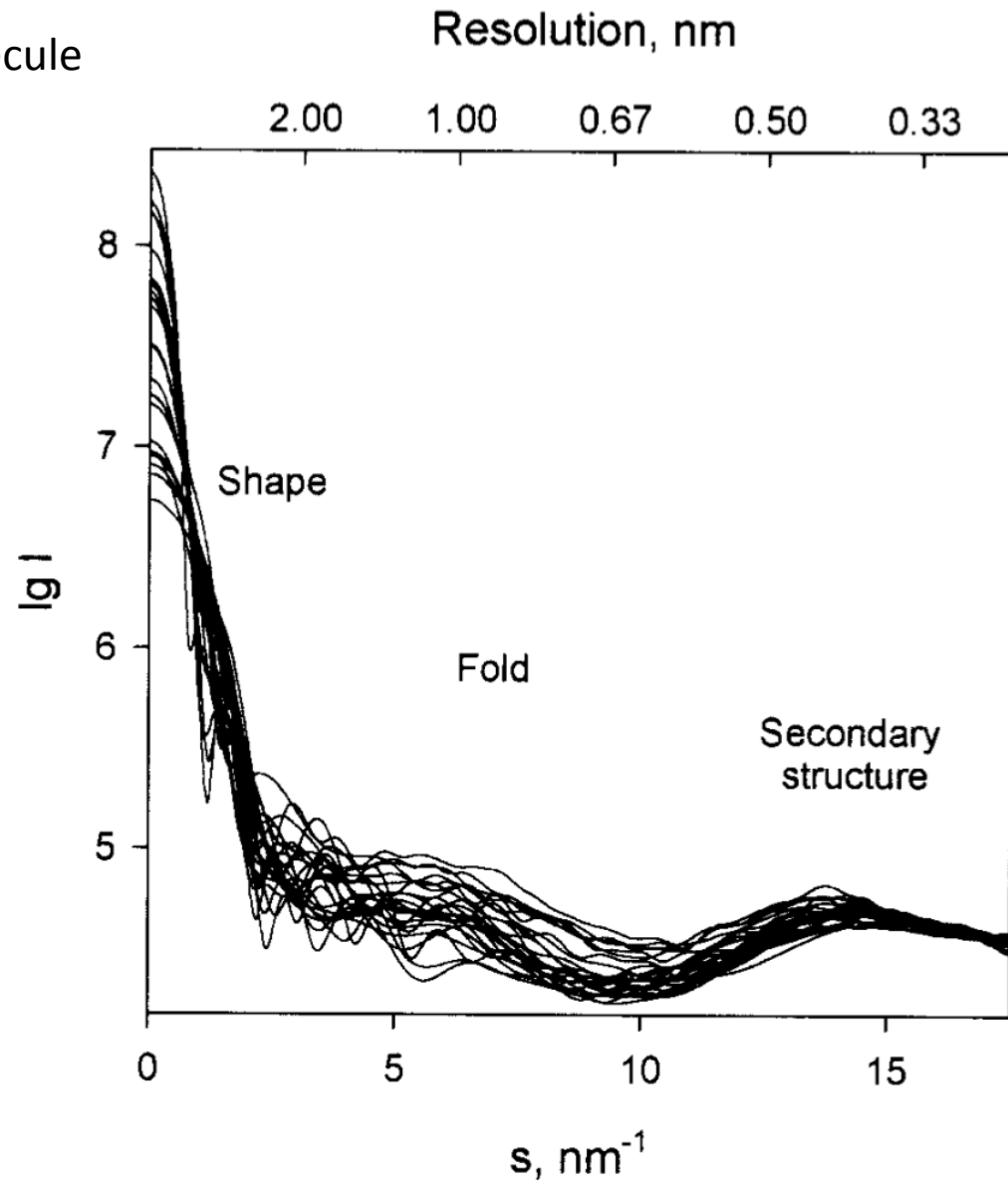


\Rightarrow



What can we learn from the scattering curve:

- 1) Shape of the studied molecule
- 2) Fold
- 3) Secondary structure



NMR (pozn. viz též přednáška o MRI)

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

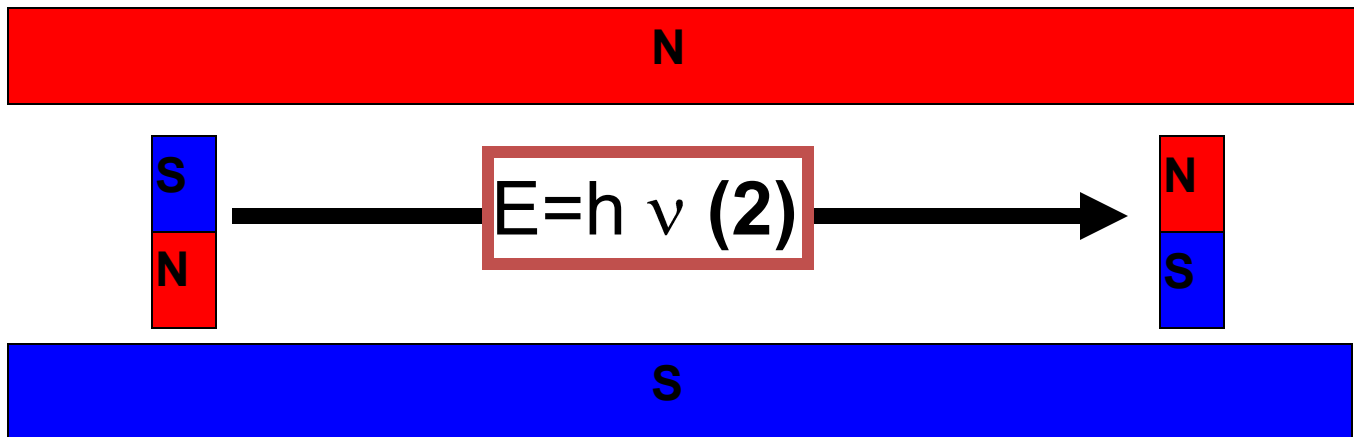
- počet neutronů **a** počet protonů jsou sudá čísla ($^{12}\text{C}=6\text{p}+6\text{n}$) \Rightarrow **nulový spin**

- 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. $1/2$, $3/2$, $5/2$)

- 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 intezity **B**, jádro mající nenulový spin může absorbovat foton frekvence ν . Frekvence ν závisí na gyromagnetickém poměru γ jader

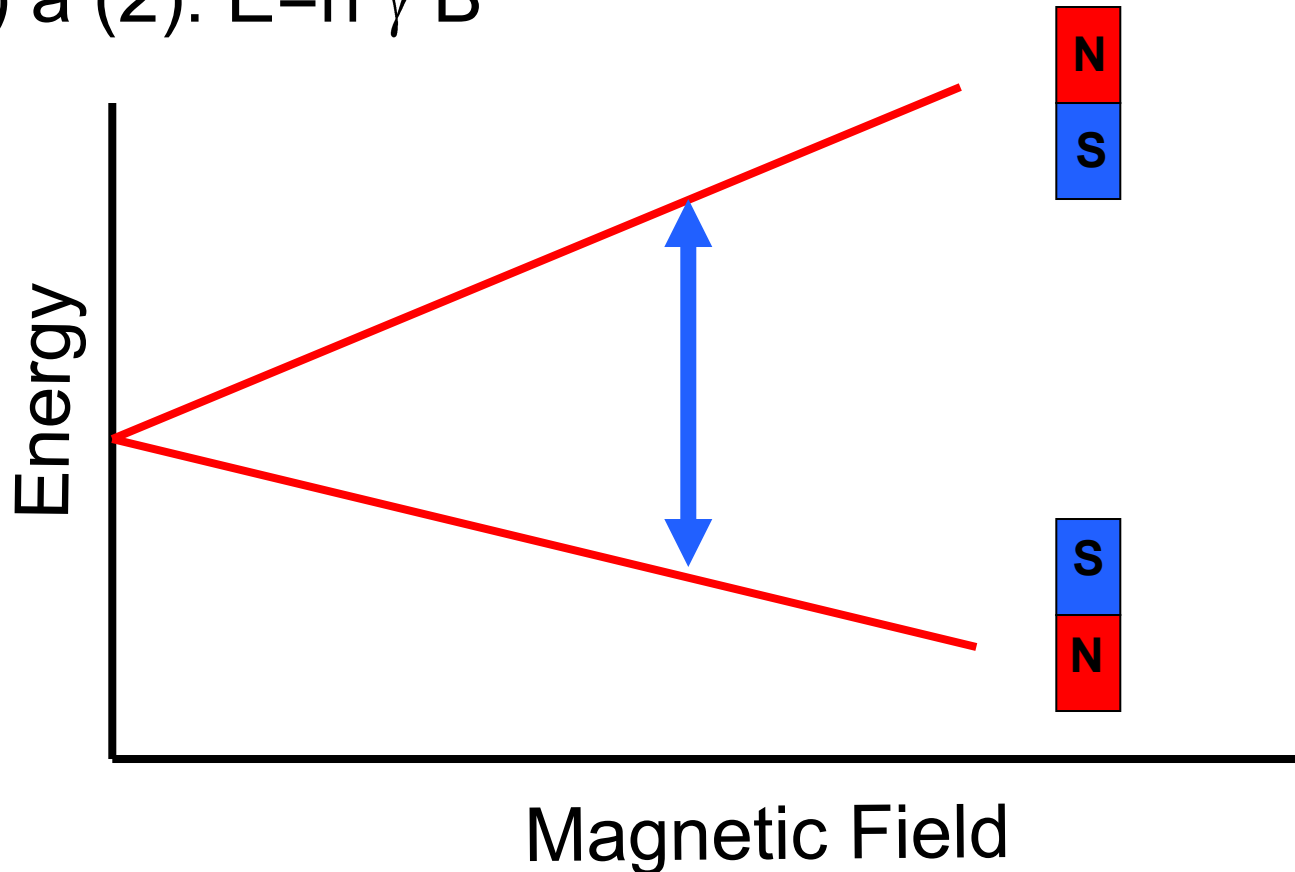
2) Z kvantové mechaniky víme, že spin I může nabývat $2I + 1$ orientací \Rightarrow **jádro se spinem $1/2$ může mít dvě orientace v externím magnetickém poli – nižší / vyšší energie**

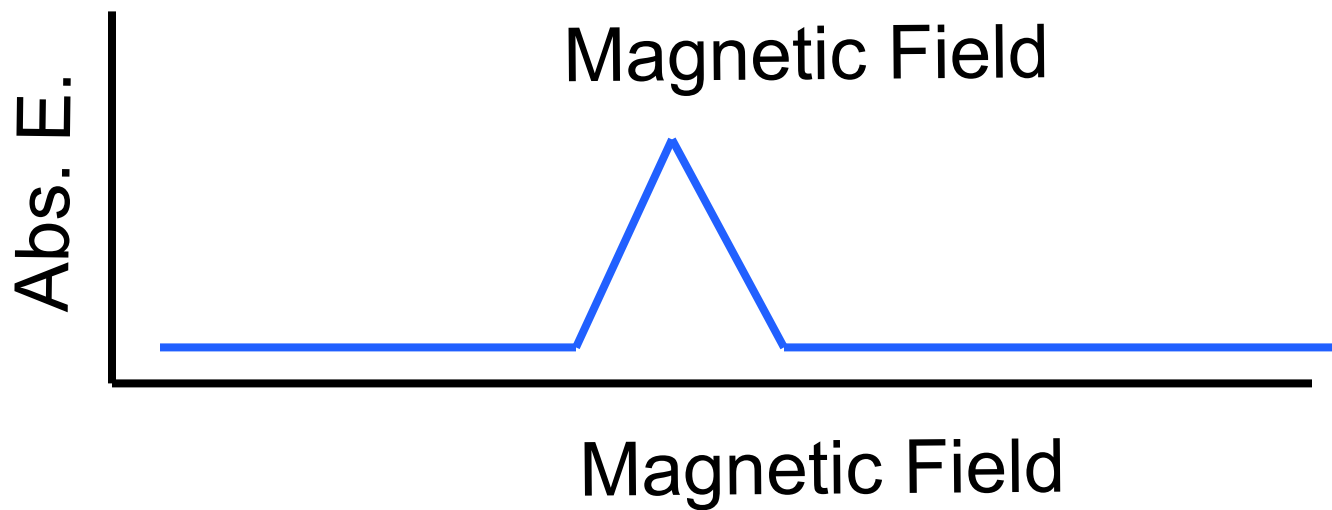
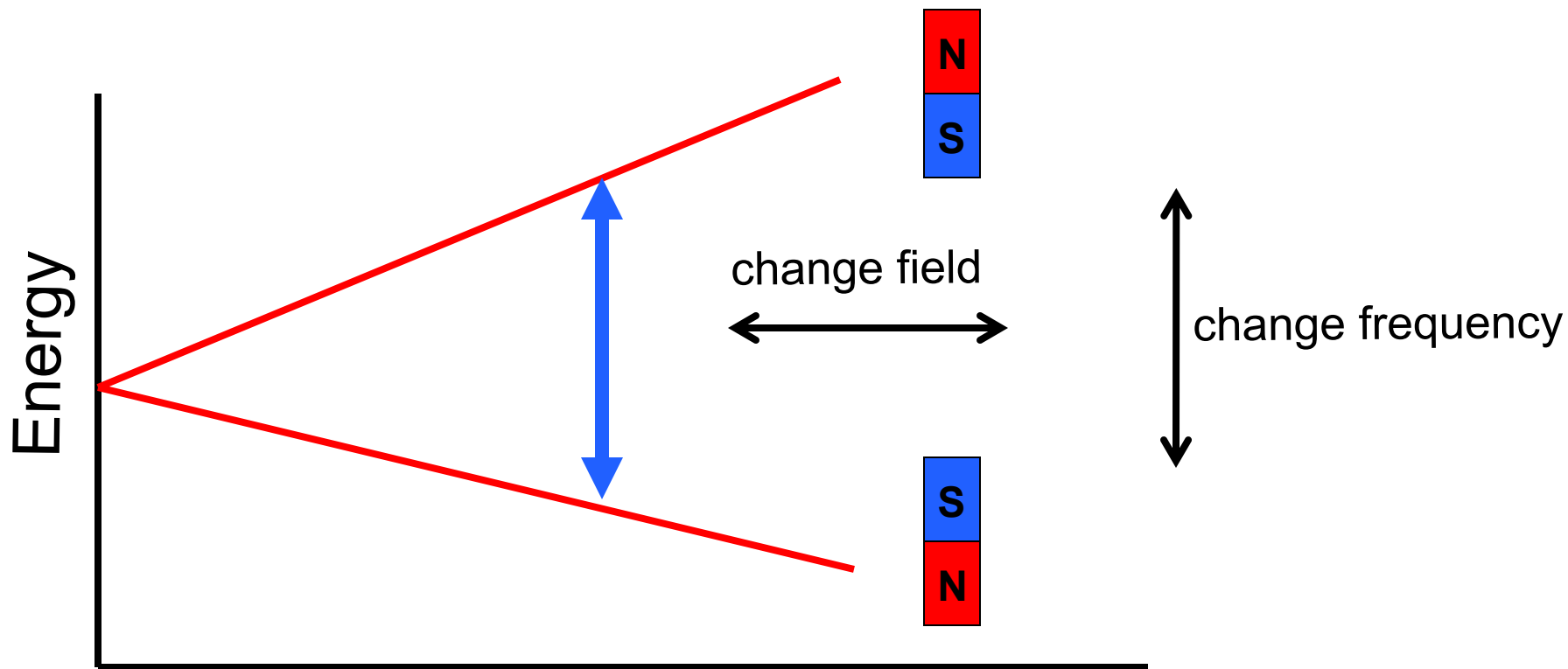


Nuclear Magnetic Resonance

Stručně

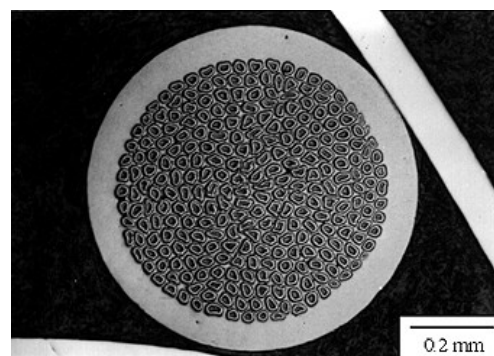
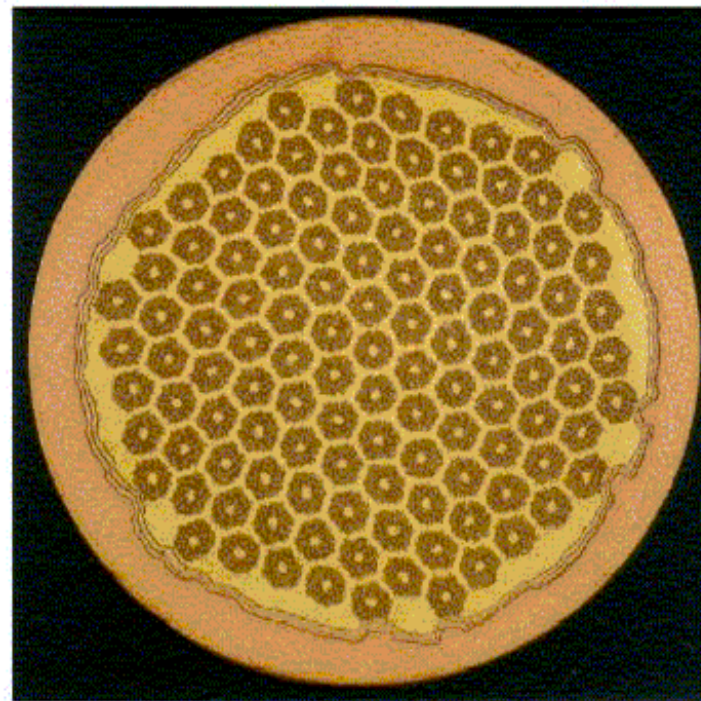
Z (1) a (2): $E = h \gamma B$



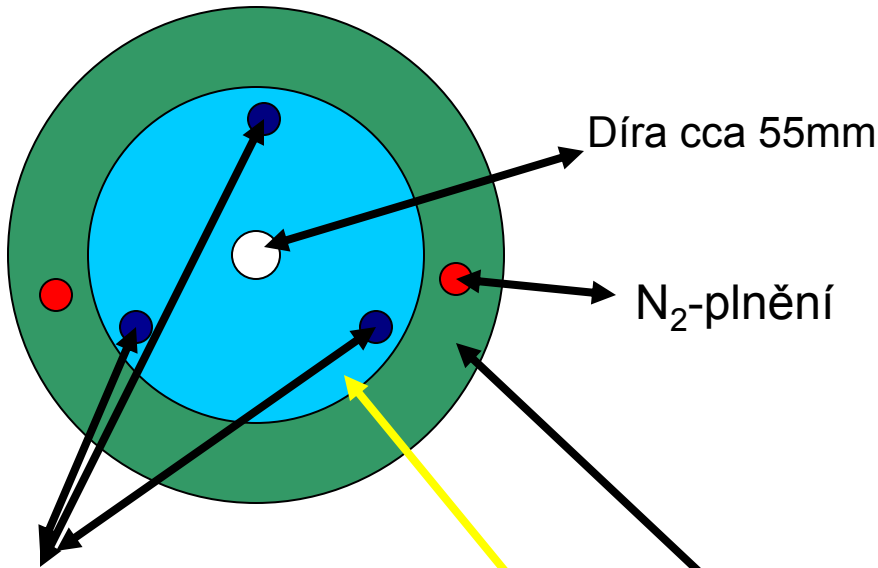


Magnet

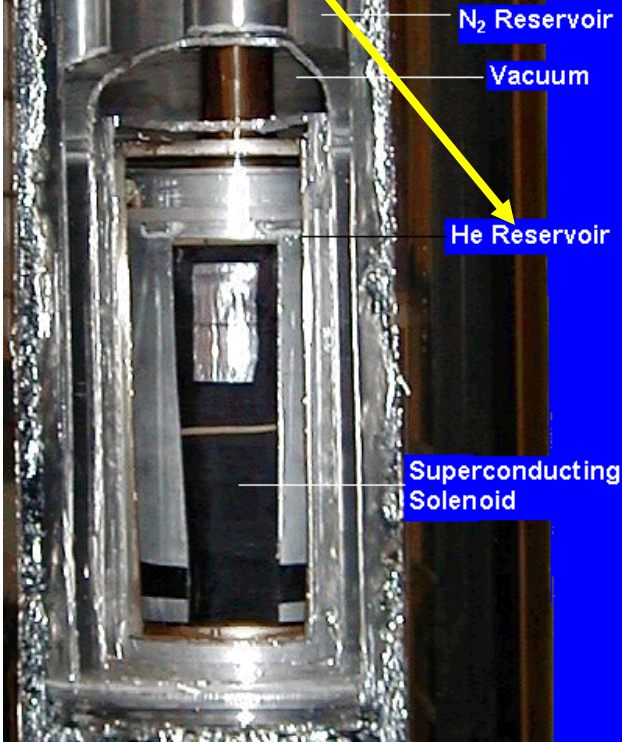
- supravodivé solenoidy na bázi
- Nb a Sn ponořené do heliové a dusíkové lázně
- He-lázeň **~4 K** dále snížena J-T
- pumpou na **~2.1 K**
- v současnosti až 22 Tesla
- magnetické pole země $\sim 50\mu\text{T}$



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



He-plnění



CW vs. Fourier transform NMR

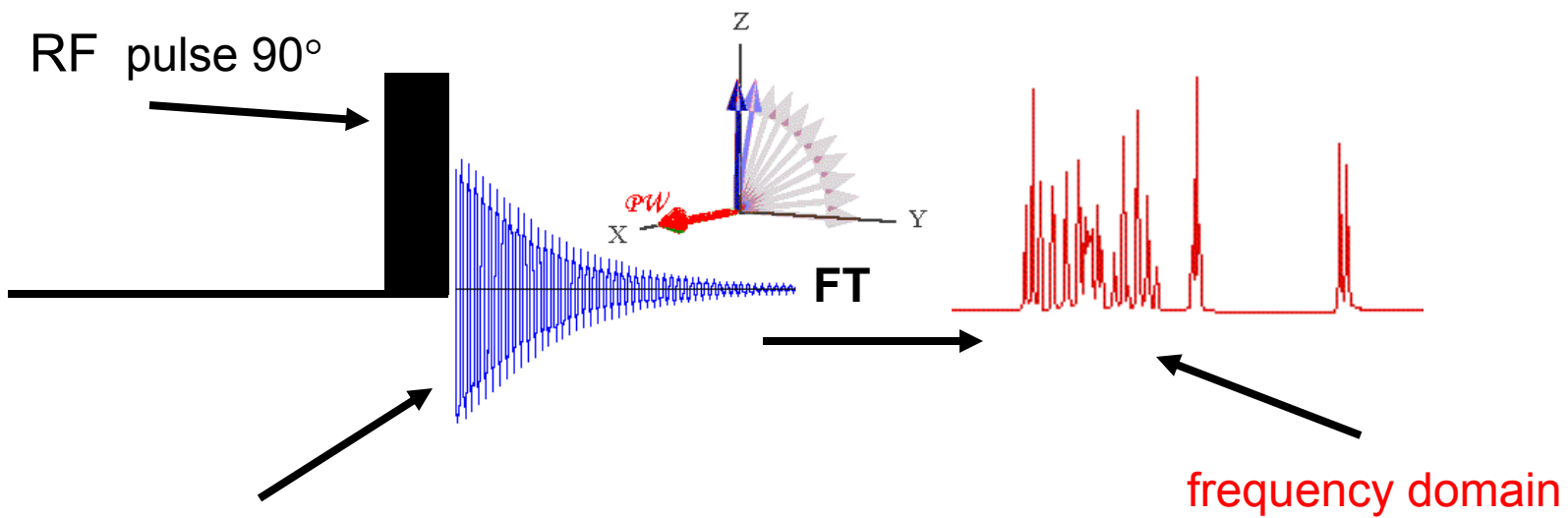
Solution II.

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 signal is recorded by the instrument as the nuclei relax.

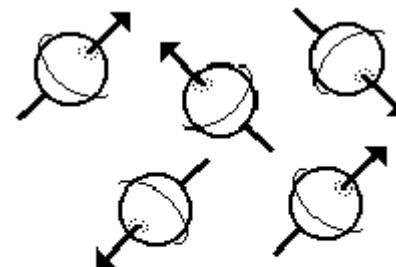
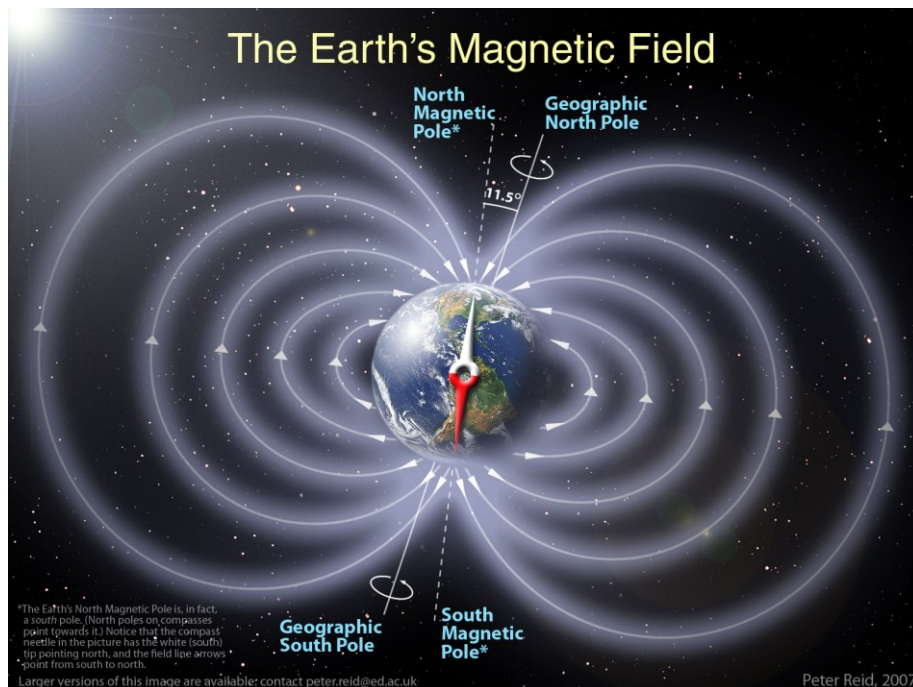
time domain emission

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



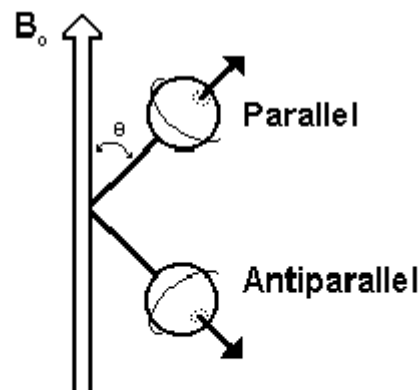
For NMR, nuclear spin is needed!!!

Spin analogy to a compass needle



magnetic field =
0

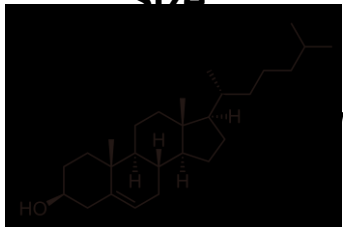
Randomly oriented
nuclear magnetic moments



magnetic field >
0

Nuclear magnetic moments
in the presence of an external field

Size



e.g. Cholesterol

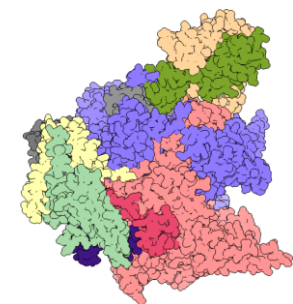
Relaxation

low (i.e. long t_2 time)



medium

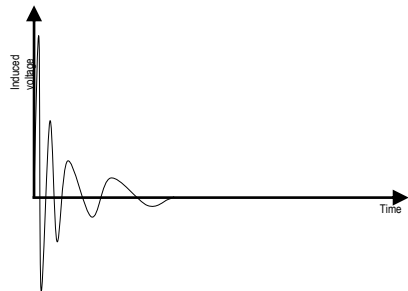
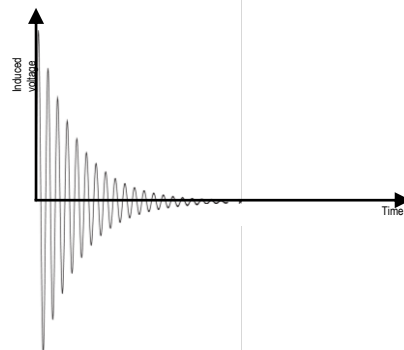
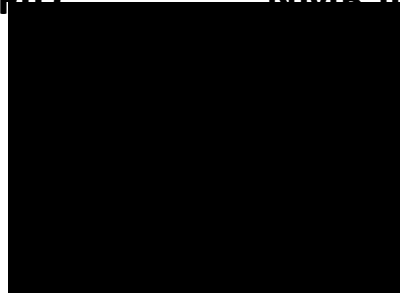
Biomolecules 5-30 kDa



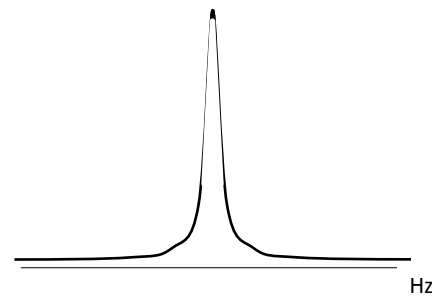
fast

Large molecules 50+ kDa

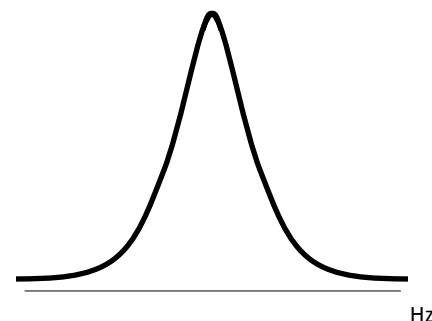
FID



NMR line(width) after FT



Hz



Hz



Hz

NMR as a tool for study **structure**, **dynamics** and **interactions** of biomolecules

1) Structure determination of NAs and proteins

2) **Protein – metal interaction**

3) **Protein – ligand interaction**

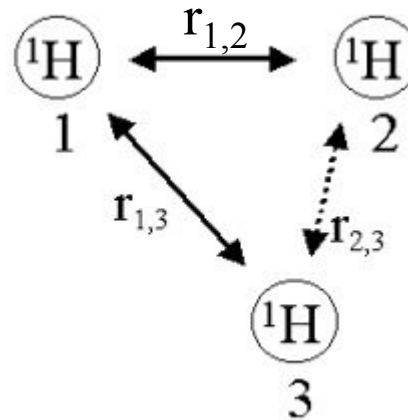
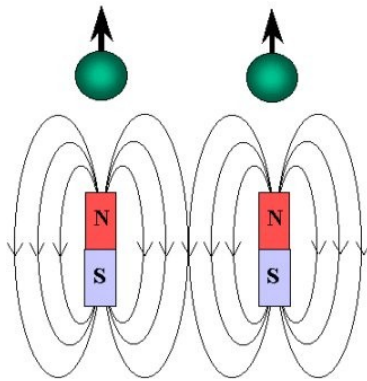
For most of the modern applications, enrichment by ^{13}C , ^{15}N and often ^2H needed!

Isotope	Ground state spin	Natural abundance [%]	Rel. Sensitivity
^1H	$\frac{1}{2}$	~100	$1.00 \times 10^{+0}$
^{13}C	$\frac{1}{2}$	1.10	1.59×10^{-2}
^{15}N	$\frac{1}{2}$	0.37	1.04×10^{-3}
^{19}F	$\frac{1}{2}$	100	8.30×10^{-1}
^{31}P	$\frac{1}{2}$	~100	6.63×10^{-2}
^{12}C	0	98.90	-
^{16}O	0	~100	-

NMR as a tool for study structure, dynamics and interactions of biomolecules

- 0) AA/NA sequence, resonance assignment, standard chemical shifts
- 1) Structure determination of proteins/NAs
- 2) NMR can provide detailed information about the structure at the atomic level resolution relying on the spatial proximity of two interacting protons – nuclear Overhauser enhancement (NOE)
- 3) Additional structural information can be obtained (residual dipolar couplings – RDCs, J -couplings, backbone chemical shifts - CSI)

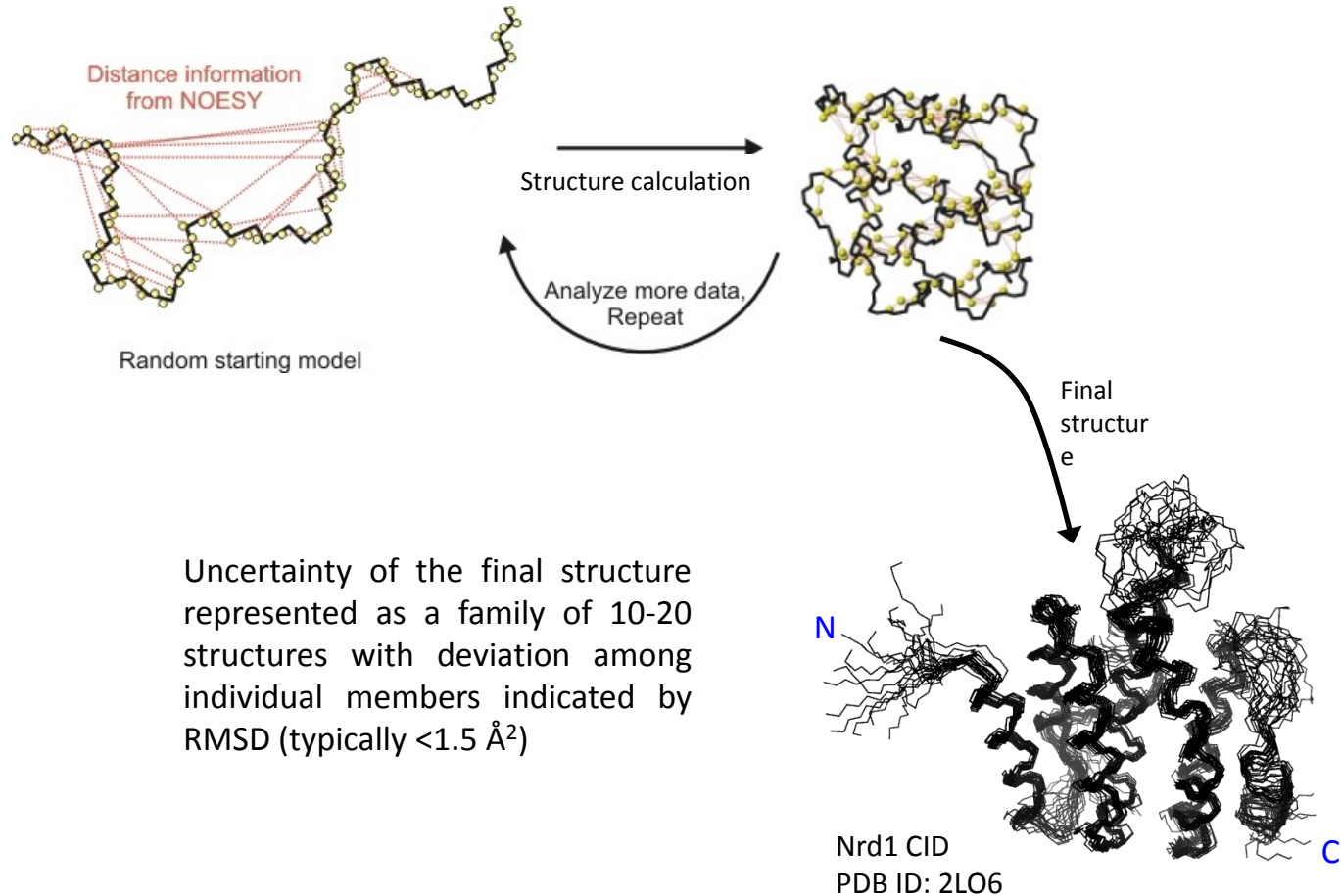
NOE:



$$r_{1,2}; r_{1,3}; r_{2,3} \leq 6 \text{ \AA}$$

$$1 \text{ \AA} = 1.10 \cdot 10^{-10} \text{ m}$$

Iterative procedure of structure determination by NMR

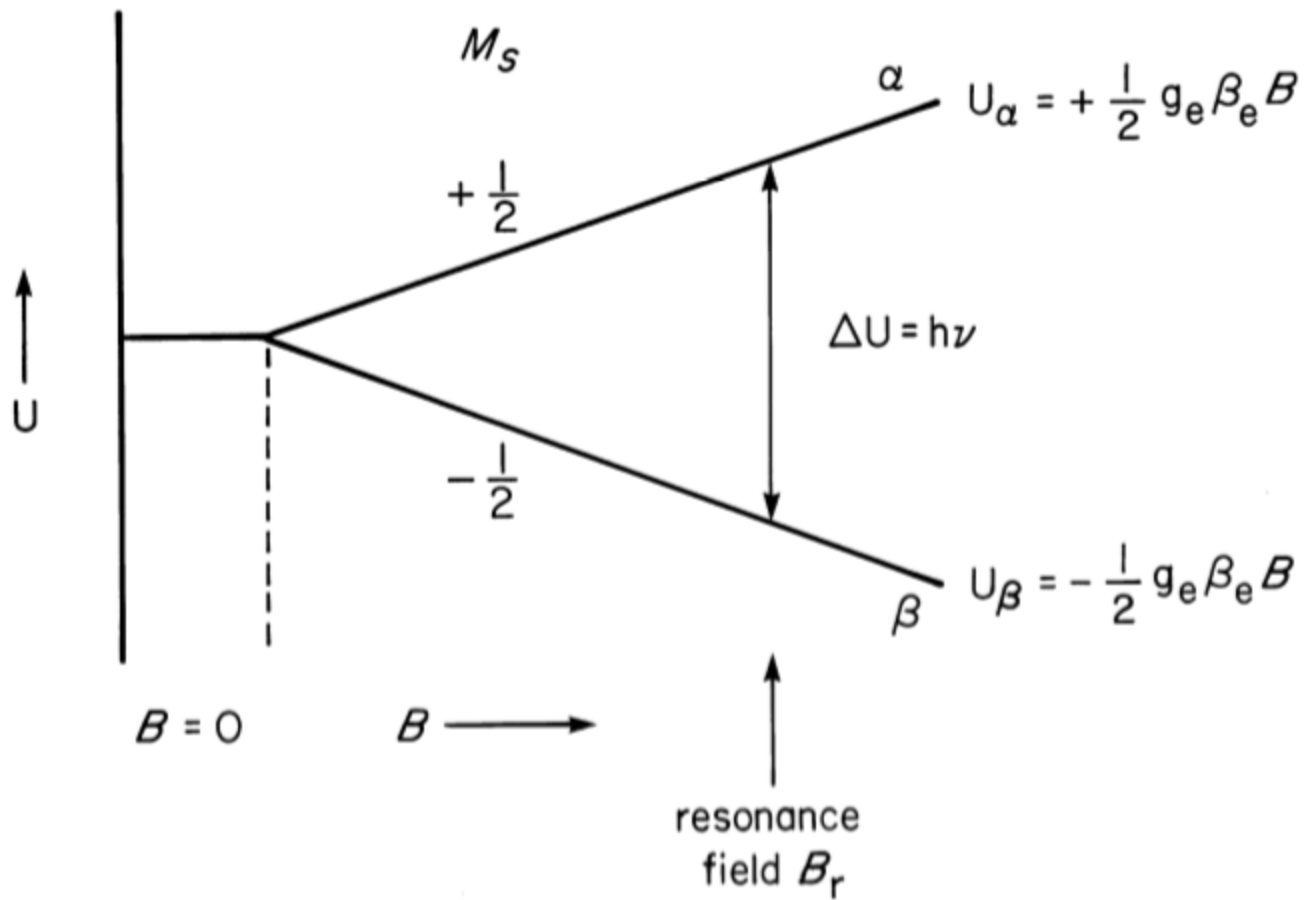


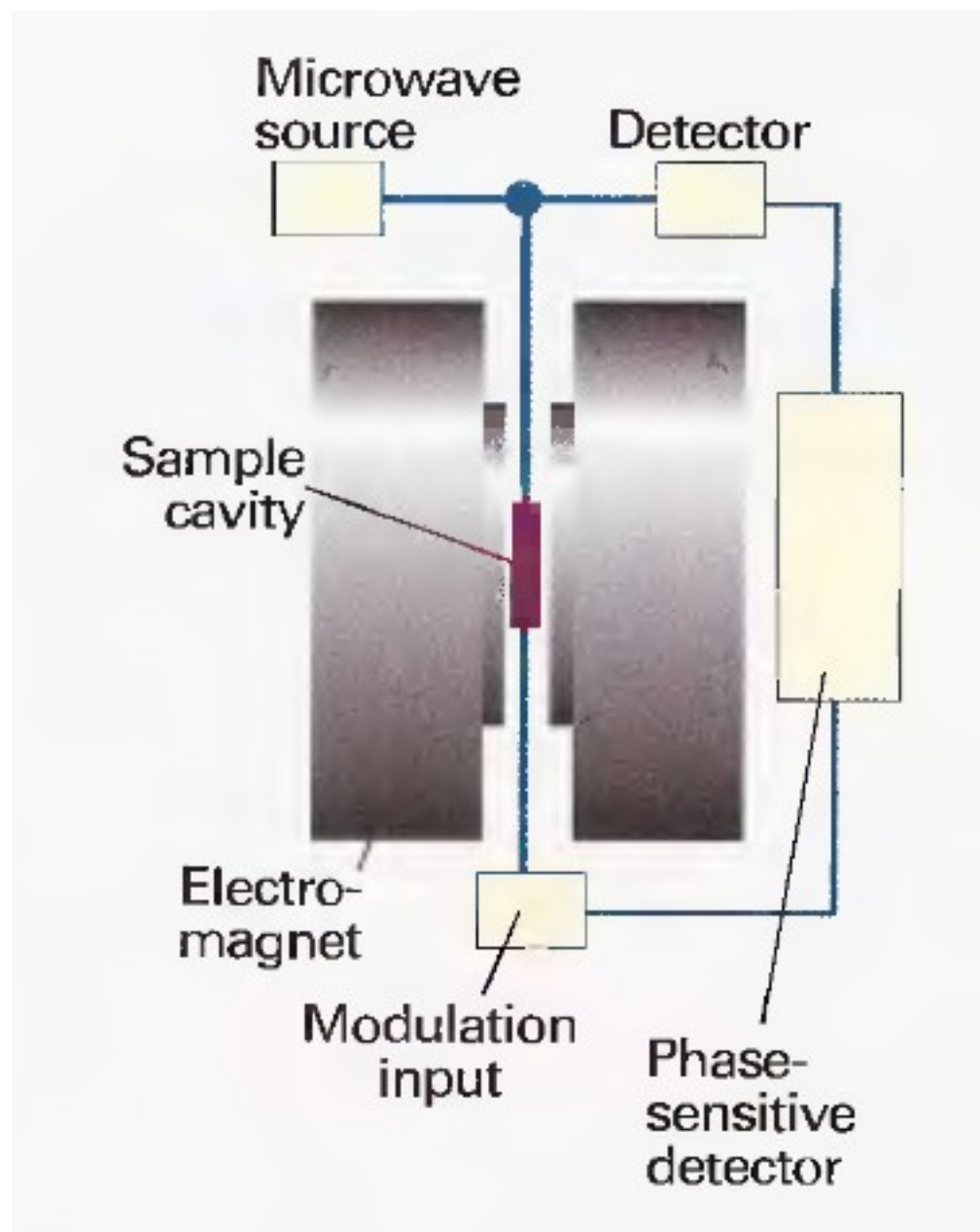
http://www.fbregents.com/basics_nmr/9proteins.htm

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**).

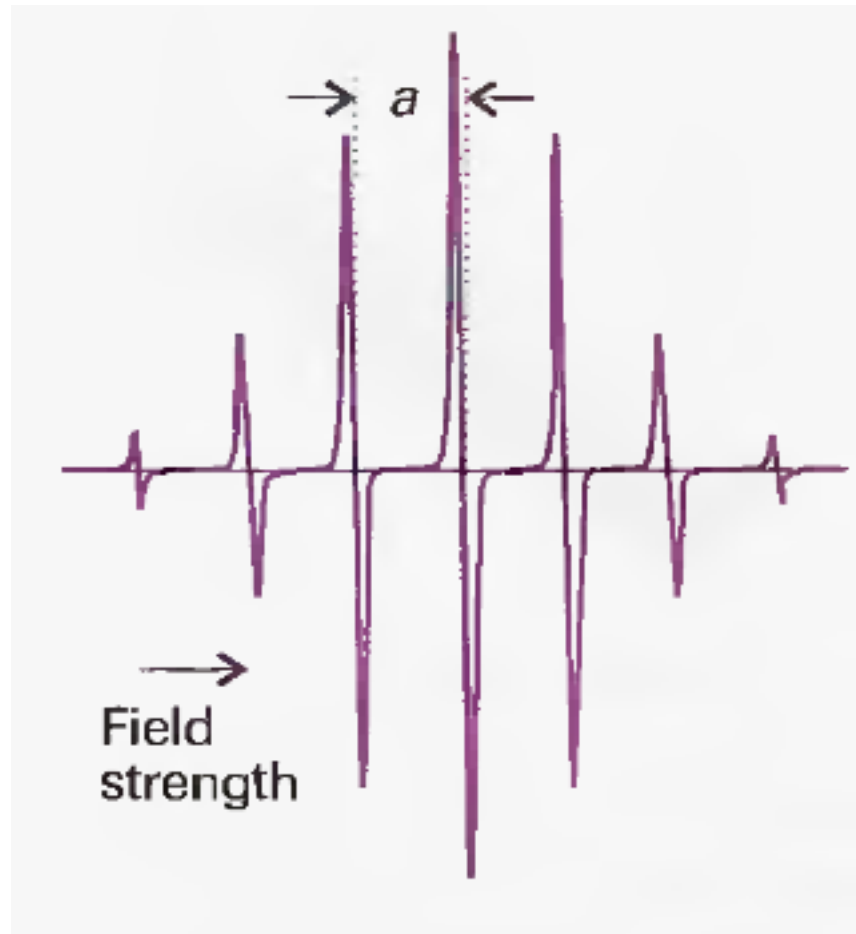
1st EPR experiment in Kazan (Tatarstan, USSR), E.K.Zavoisky on $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, rf source @133 MHz.

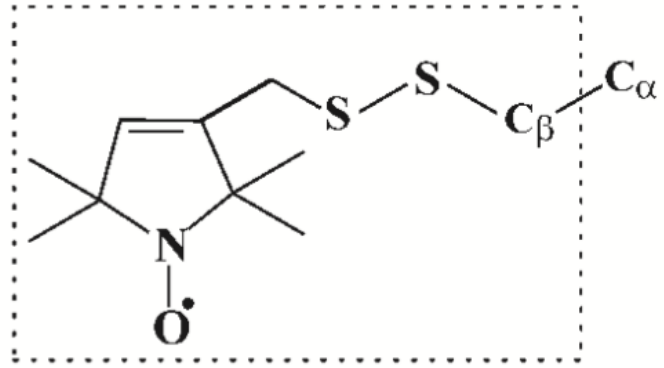
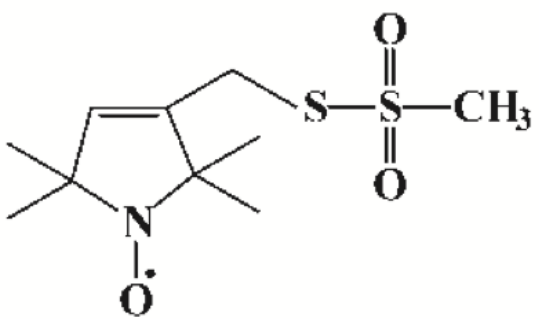




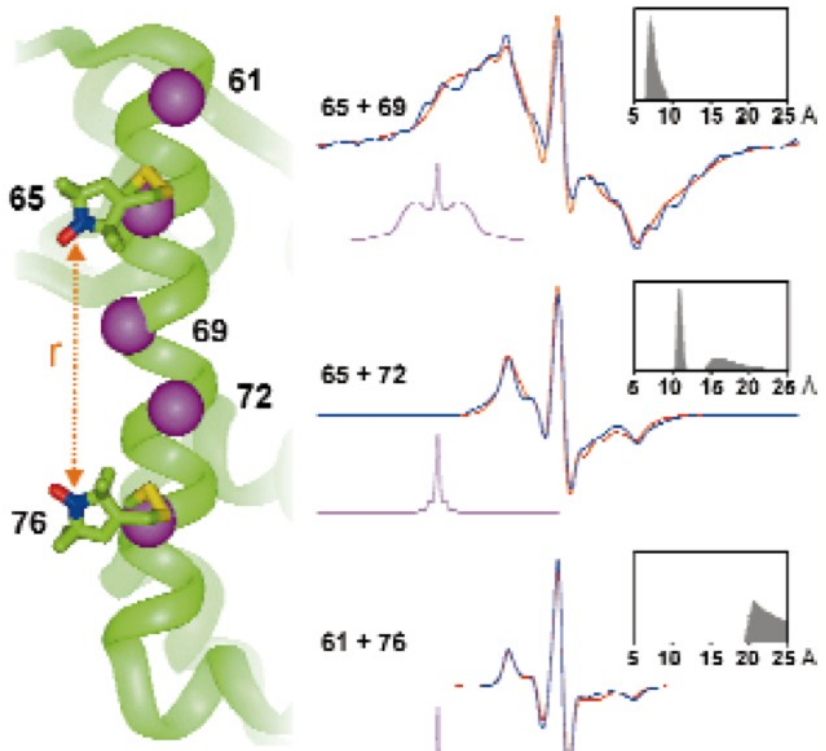
An unpaired electron can move between the two energy levels by either absorbing or emitting a photon of energy $h\nu$ such that the resonance condition, $h\nu = \Delta E$, is obeyed. This leads to the fundamental equation of EPR spectroscopy: $h\nu = g_e \mu_B B_0$.

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**.

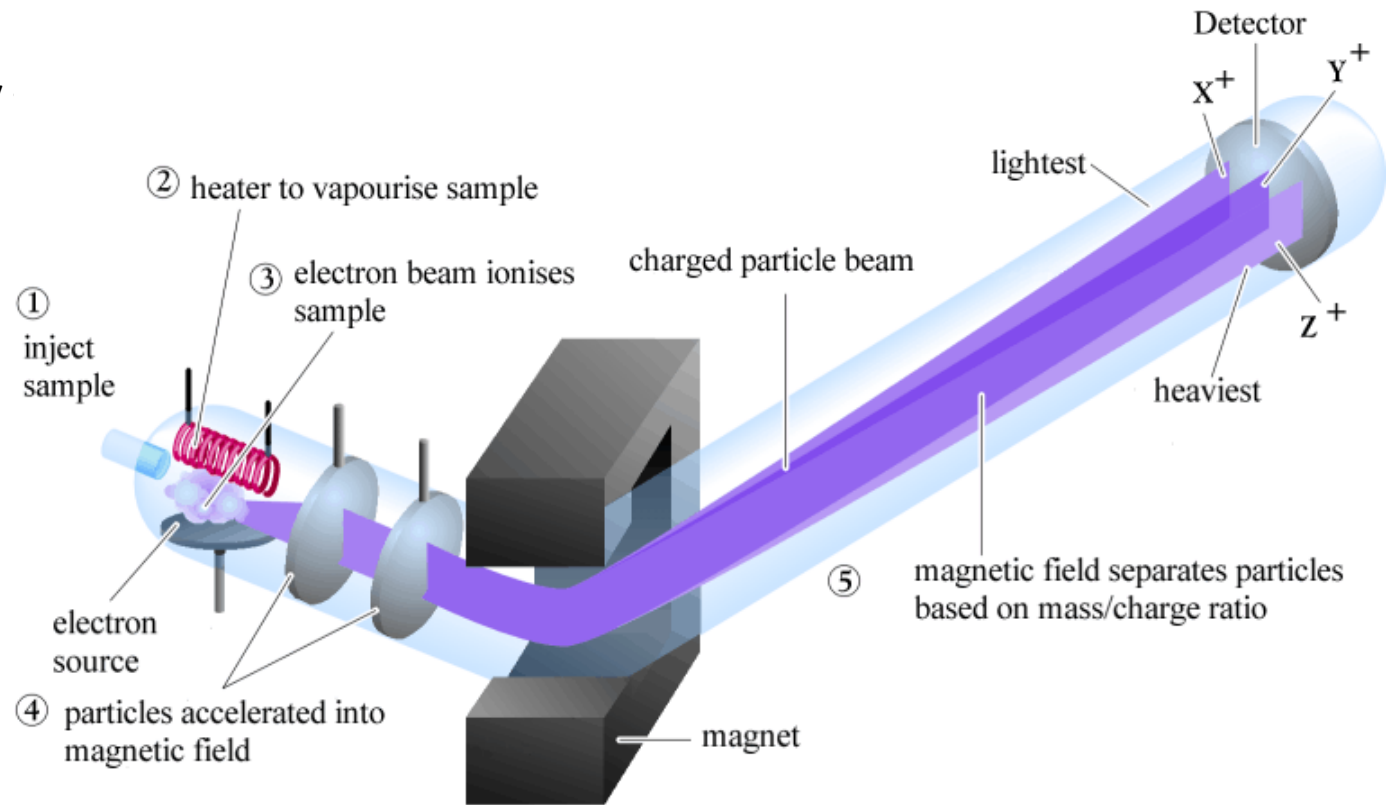




side-chain R1



Mass spektrometry



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.

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.

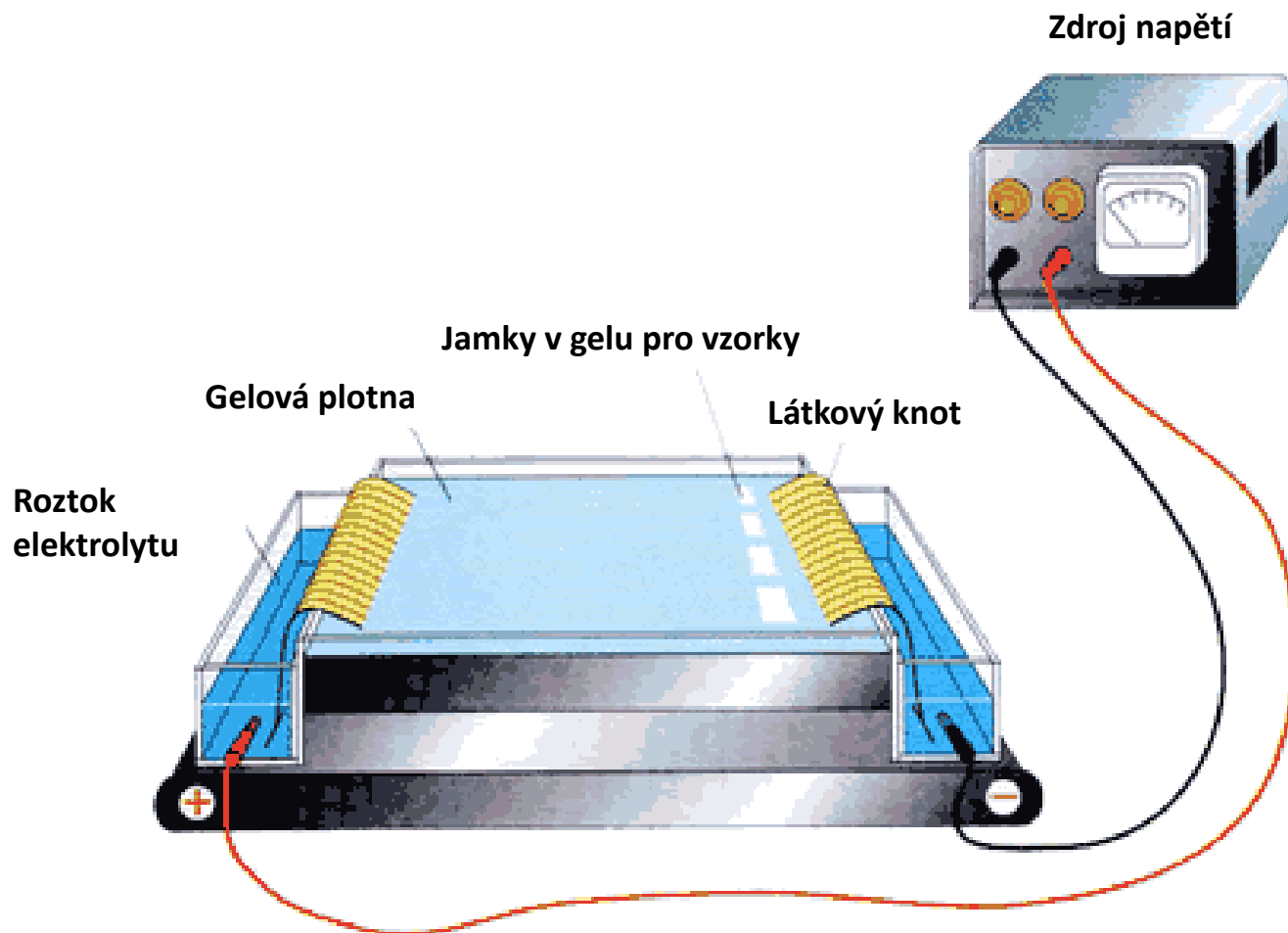
- Rychlost částice je pak v důsledku rovnosti obou sil:

Elektroforetická pohyblivost

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

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



- Nouzová ilustrativní verze přednášky pro rok 24/25