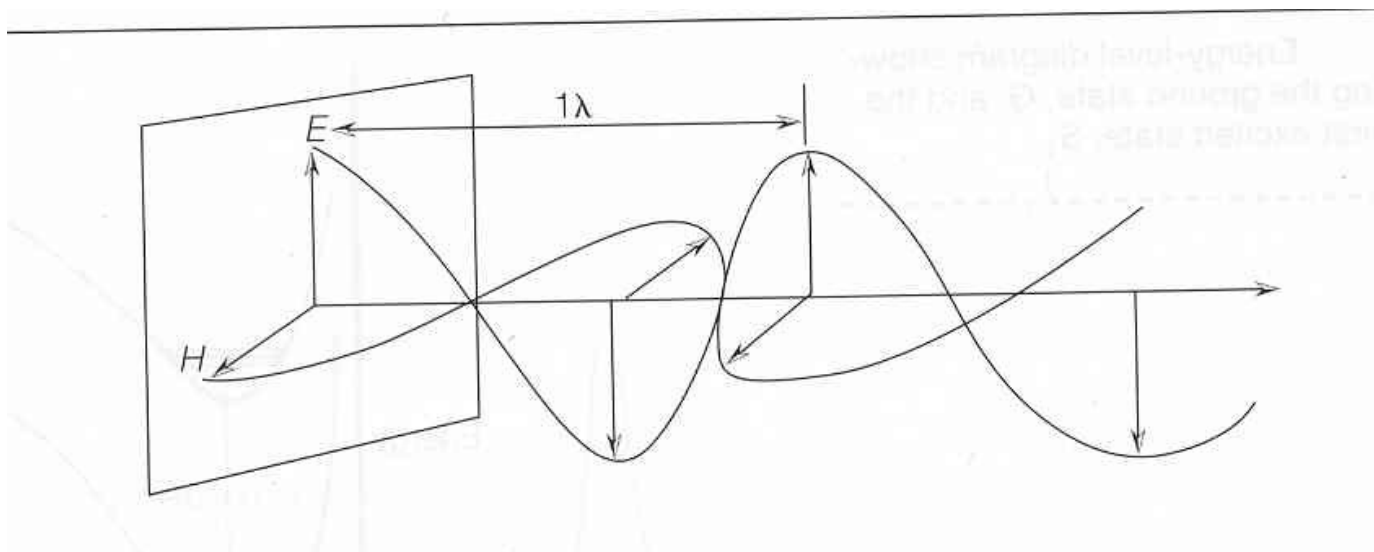


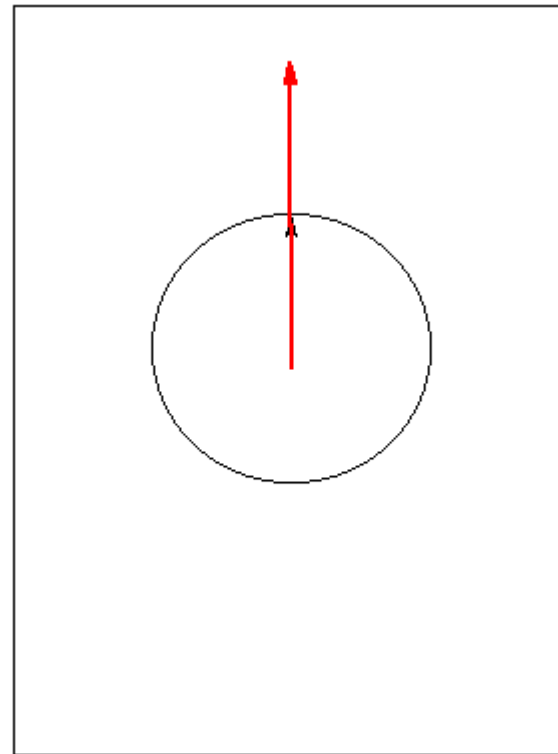
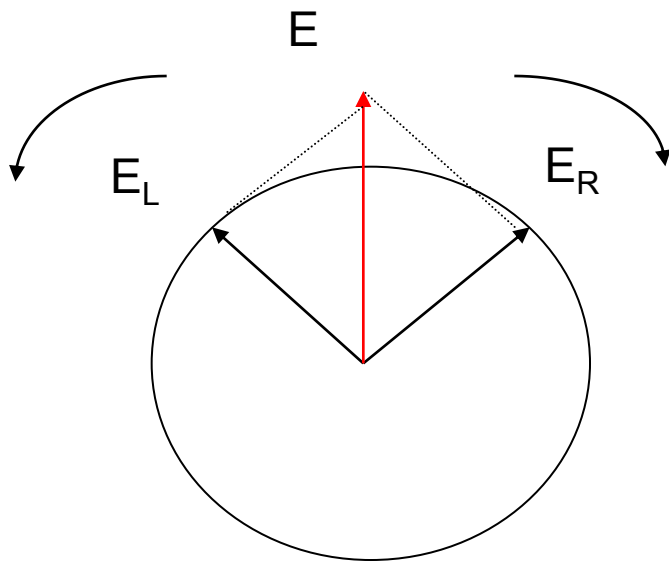
# Chiroptické metody



E - vektor elektrického pole  
H – vektor magnetického pole

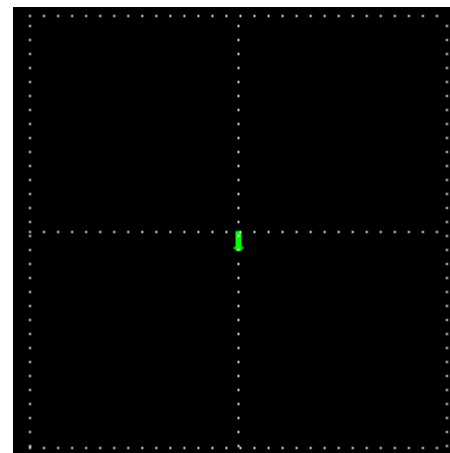
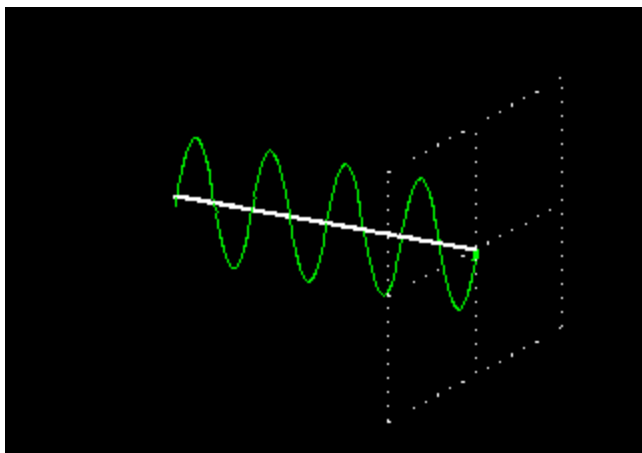
# Chiroptické metody

Lineárně polarizované světlo



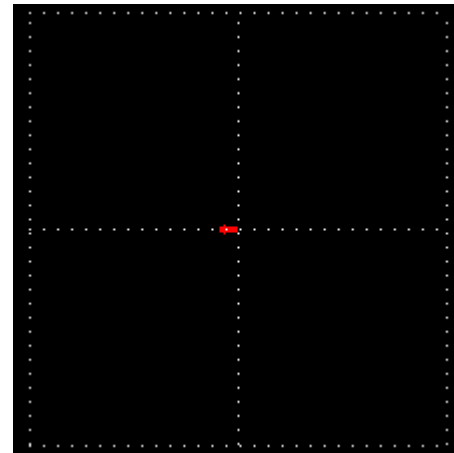
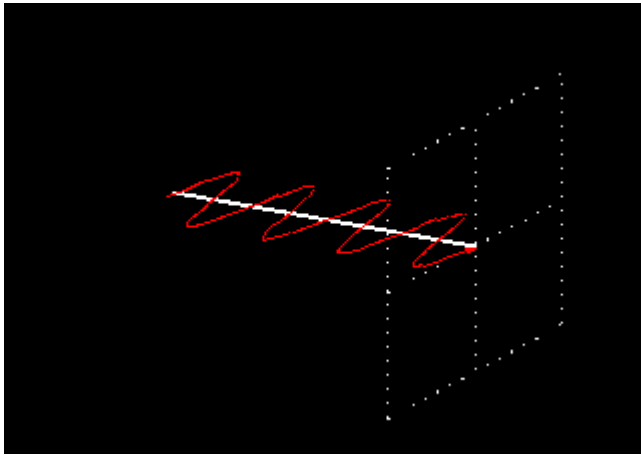
# Chiroptické metody

Lineárně polarizované světlo - vertikální



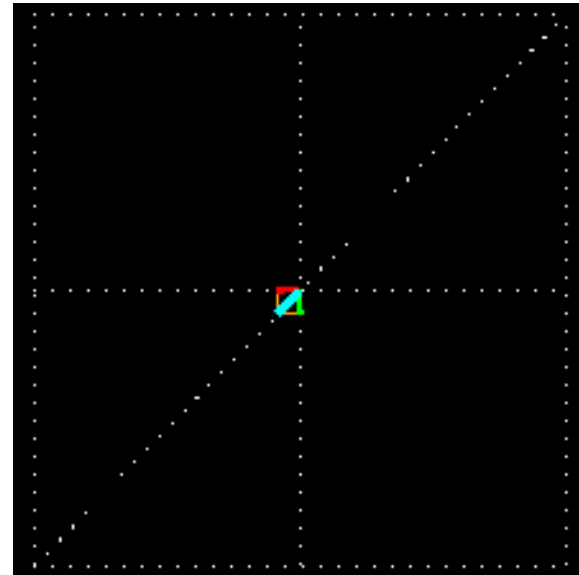
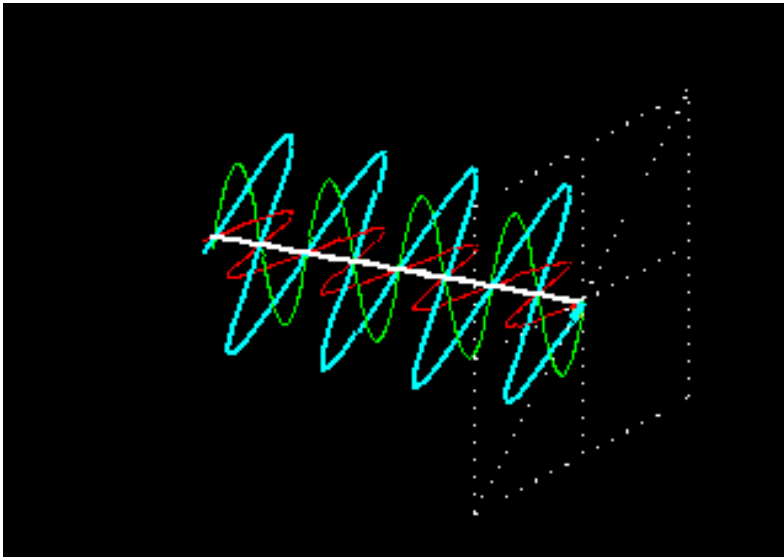
# Chiroptické metody

Lineárně polarizované světlo - vertikální



# Chiroptické metody

Superposice vertikální a horizontální složky oscilující ve stejné fázi



# Chiroptické metody

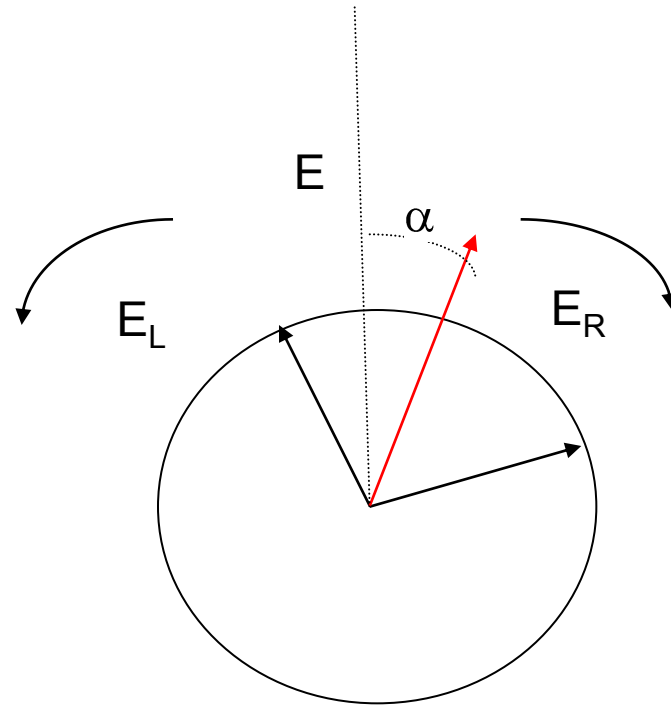
Opticky aktivní látka:

Rozdílný refraktivní index ( $n$ ) pro  $E_R$ ,  $E_L$

Každá ze složek se pohybuje různou rychlostí

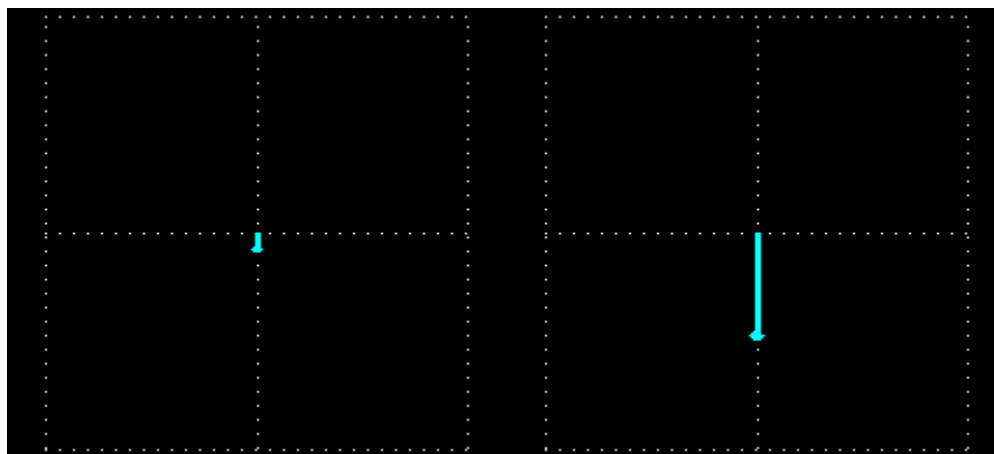
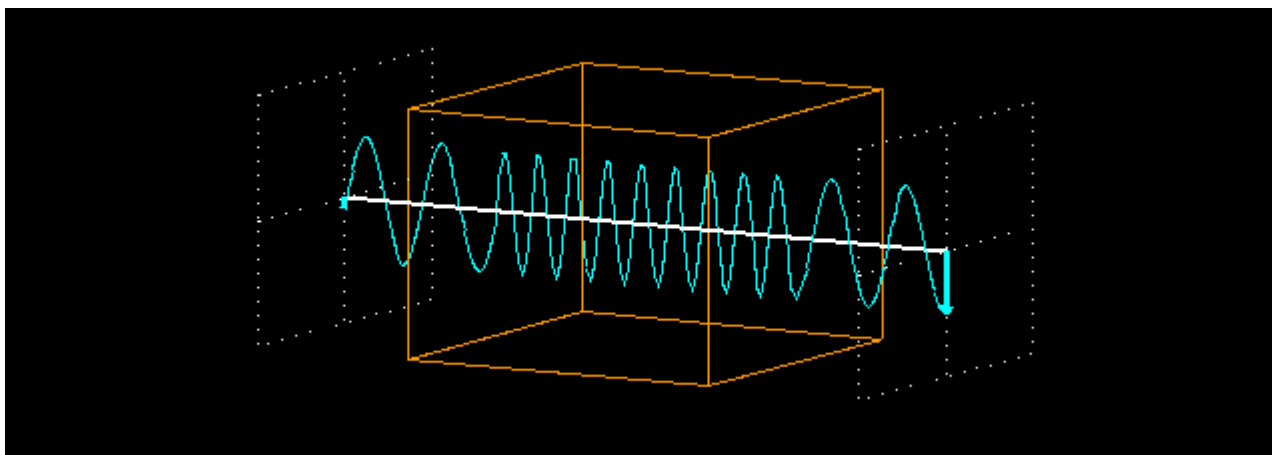
$$\alpha = \varphi_R - \varphi_L$$

$$\alpha = (n_L - n_R)\pi/\lambda$$



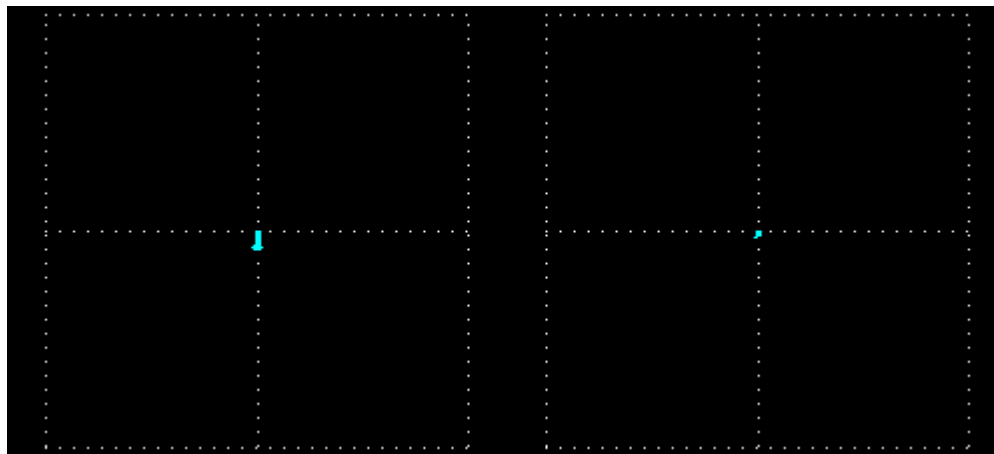
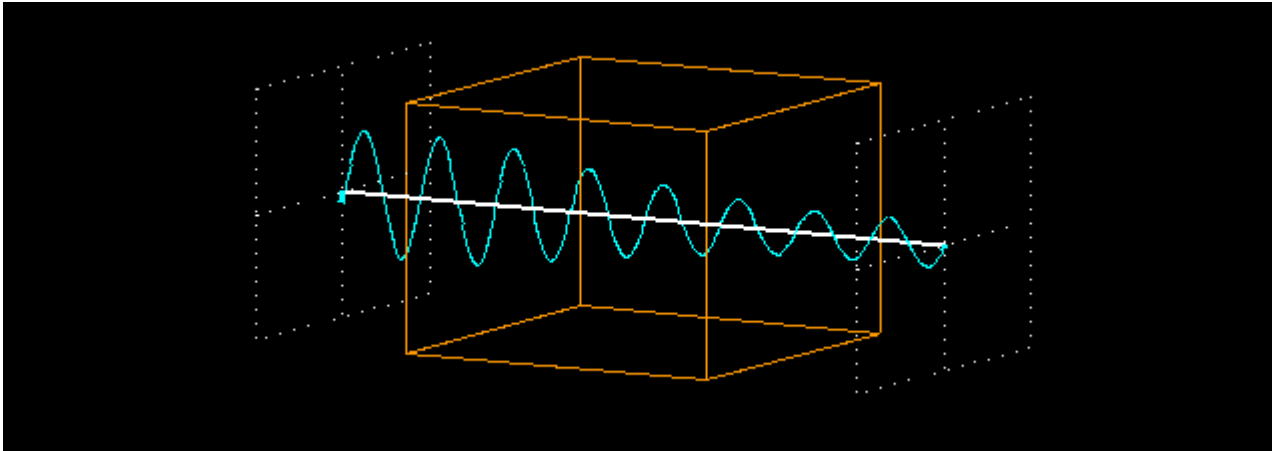
# Chiroptické metody

Lineárně polar. světlo prochází prostředím o vyšším refraktivním indexu



# Chiroptické metody

Lineárně polar. světlo prochází absorbujícím prostředím

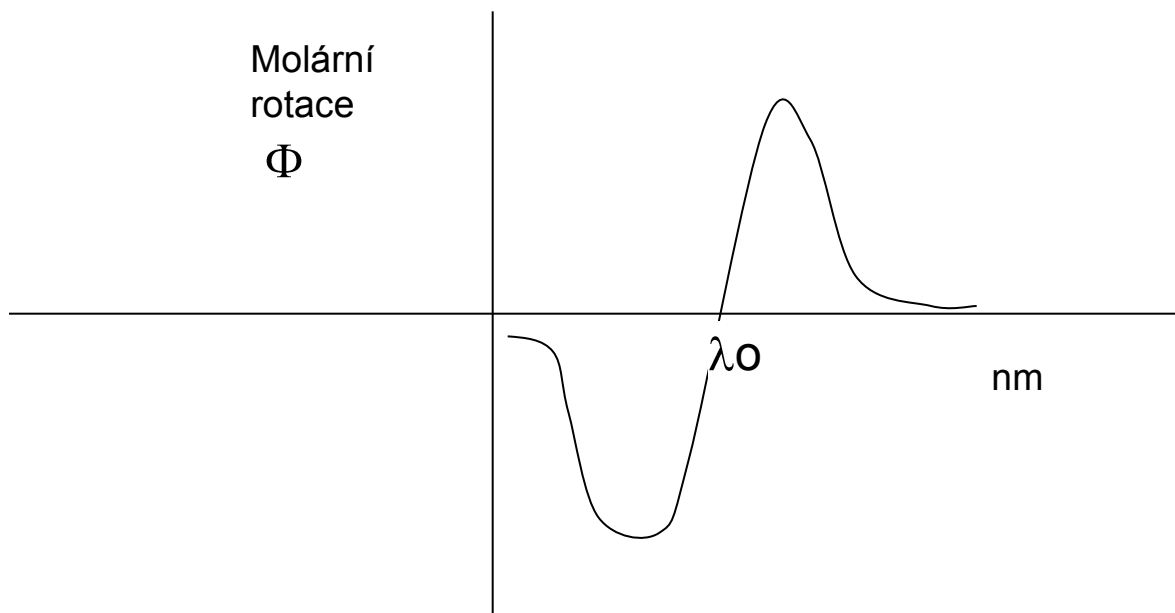




# Chiroptické metody

Spektra ORD (optická rotační disperze)

Pozitivní Cottonův efekt

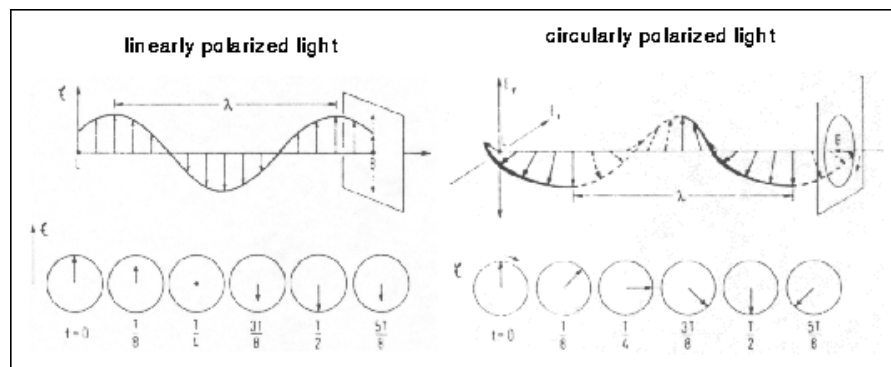
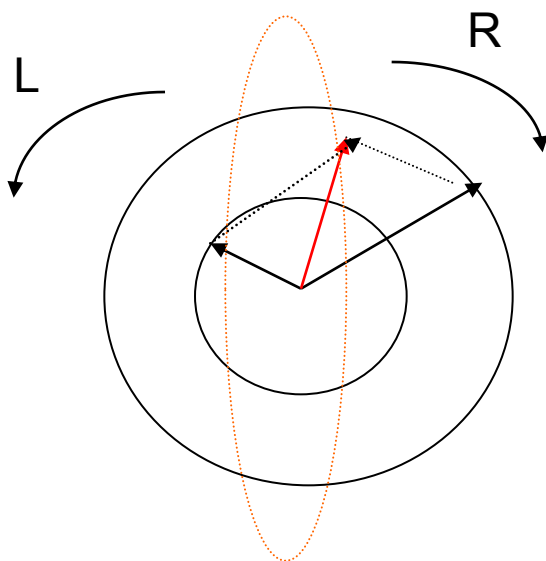


# Chiroptické metody

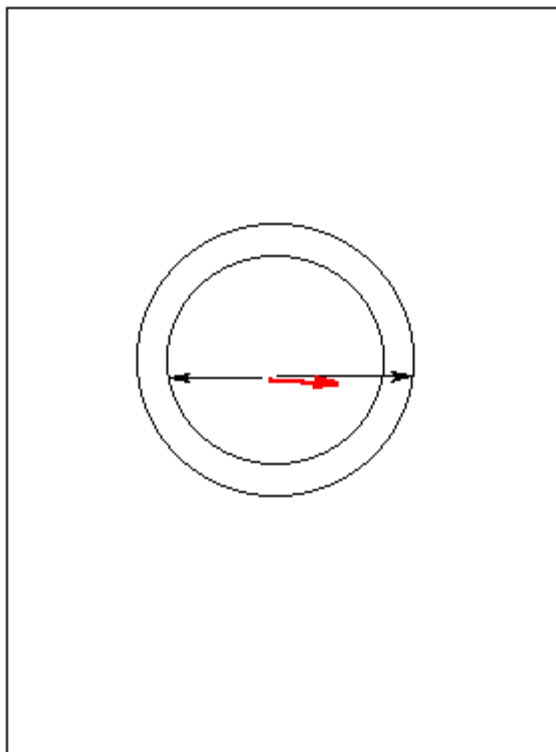
Cirkulárně polarizované světlo

Různá absorpance pro levou a pravou složku (opticky aktivní chromofor)

$$\epsilon_R \neq \epsilon_L$$



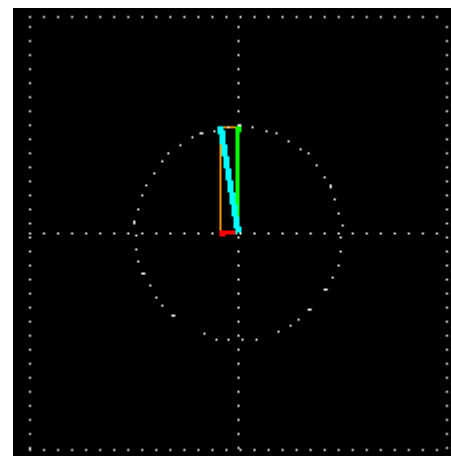
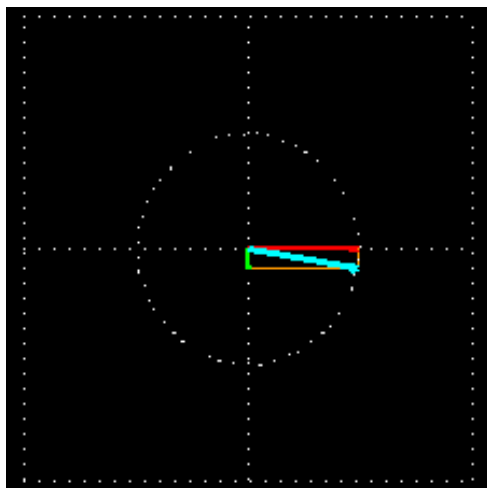
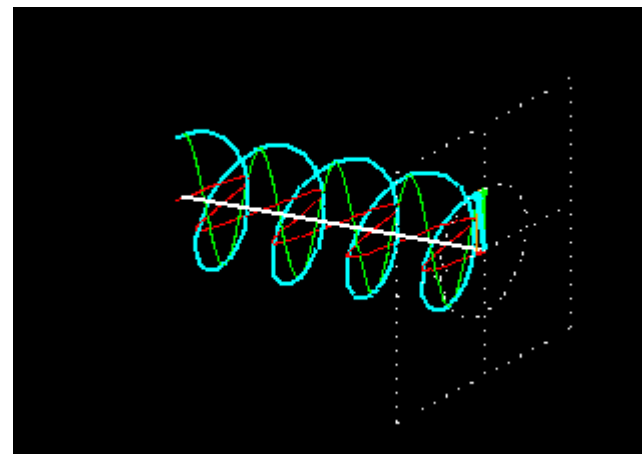
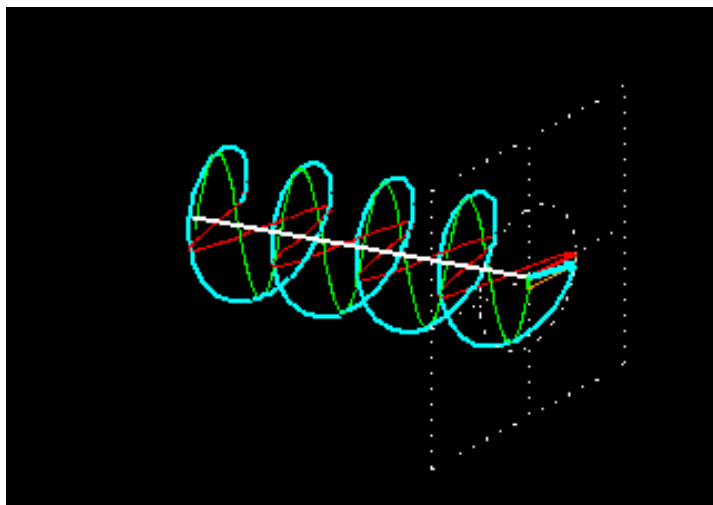
# Chiroptické metody



# Chiroptické metody

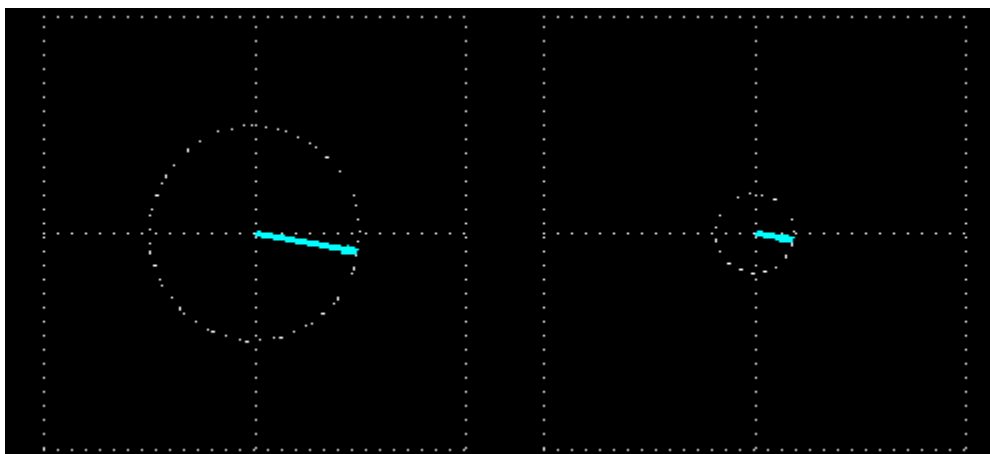
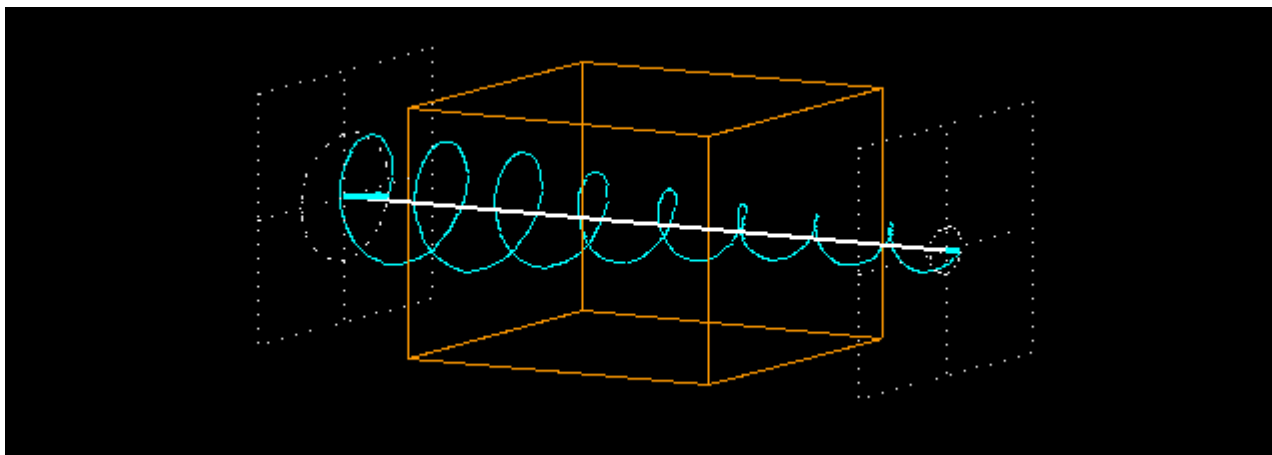
Pravá složka

Levá složka



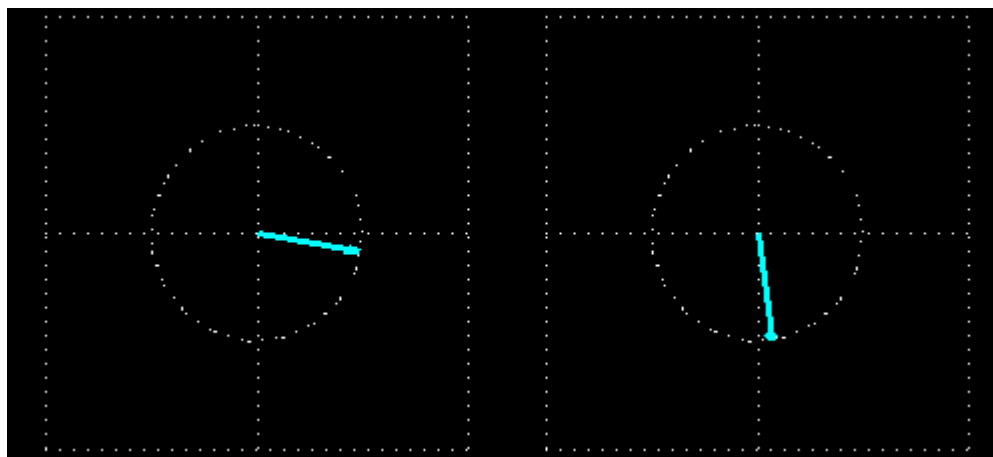
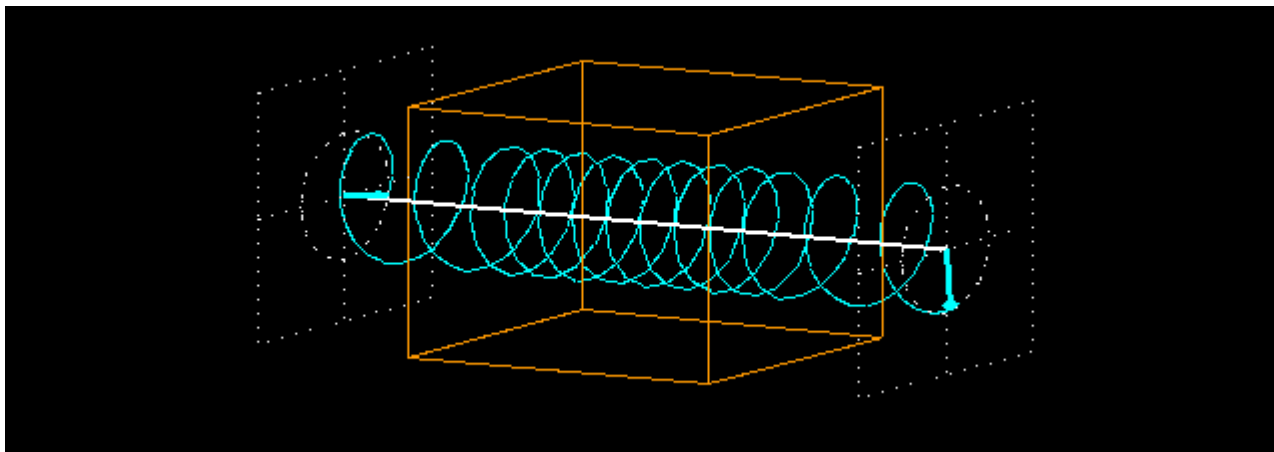
# Chiroptické metody

Circulárně polar. světlo prochází absorbuujícím prostředím



# Chiroptické metody

Circulárně polar. světlo prochází prostředím v vyšším refraktivním indexem

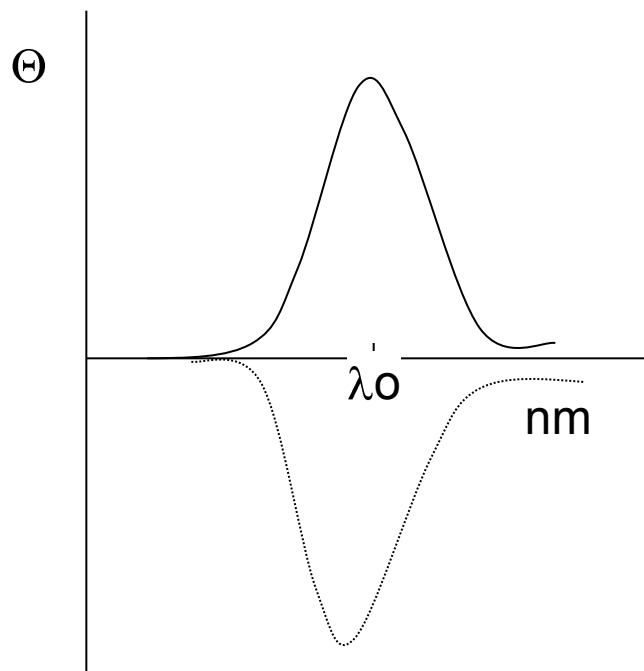


# Chiroptické metody

Elipticita

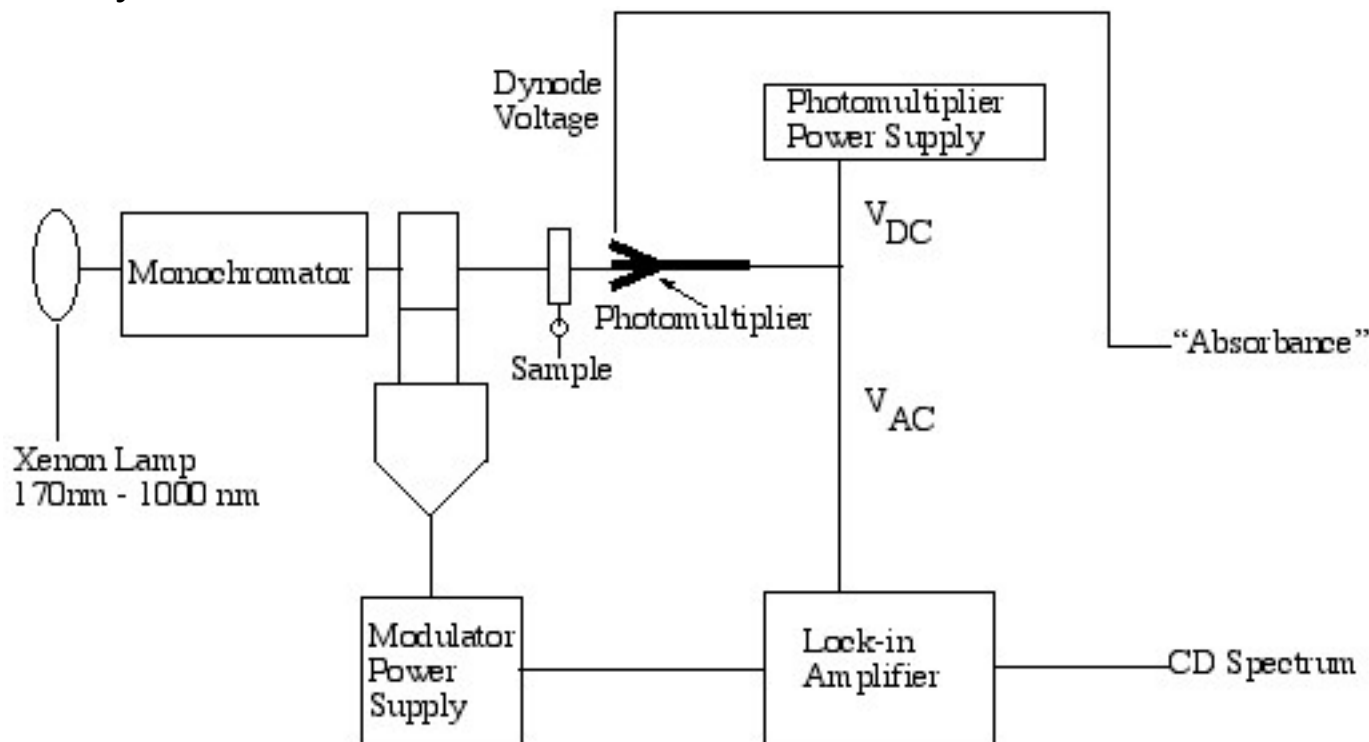
$$\Theta = 3298 (\epsilon_L - \epsilon_R) = 3298 \cdot \Delta\epsilon$$

Spektrum CD:  $\Theta = f \Delta\epsilon$



# Chiroptické metody

## Přístrojové vybavení - CD



The CD spectrometer



# Chiroptické metody



# Chiroptické metody

CD spektra proteinů – UV oblast

-**peptidová vazba** (190 – 230 nm)

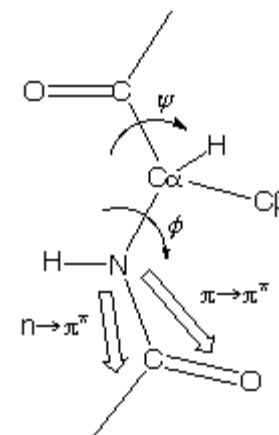
$n \rightarrow \pi$  nevazebné elektrony. karbonylu, 220 nm

$p \rightarrow \pi$ ,  $\pi$  elektrony karbonylu, 190 nm)

Intenzita a energie přechodů závisí na úhlech

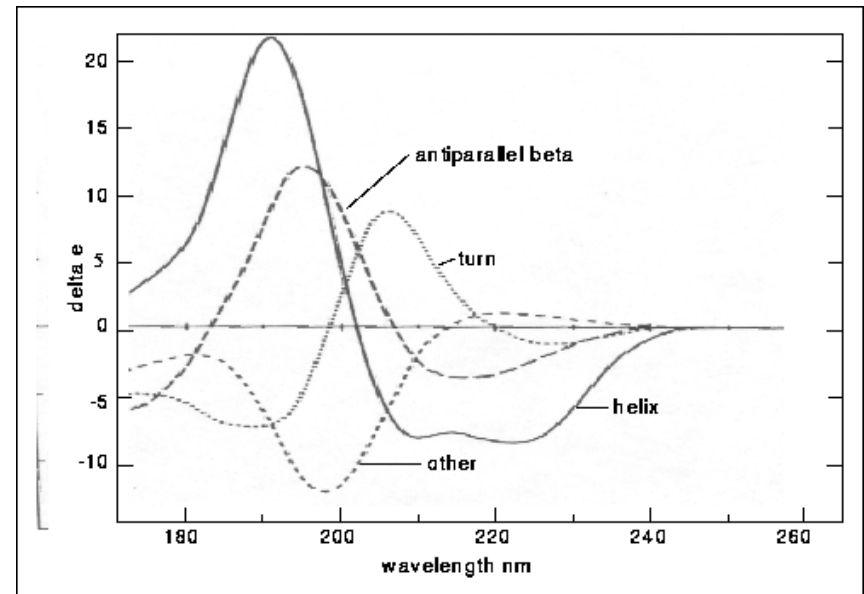
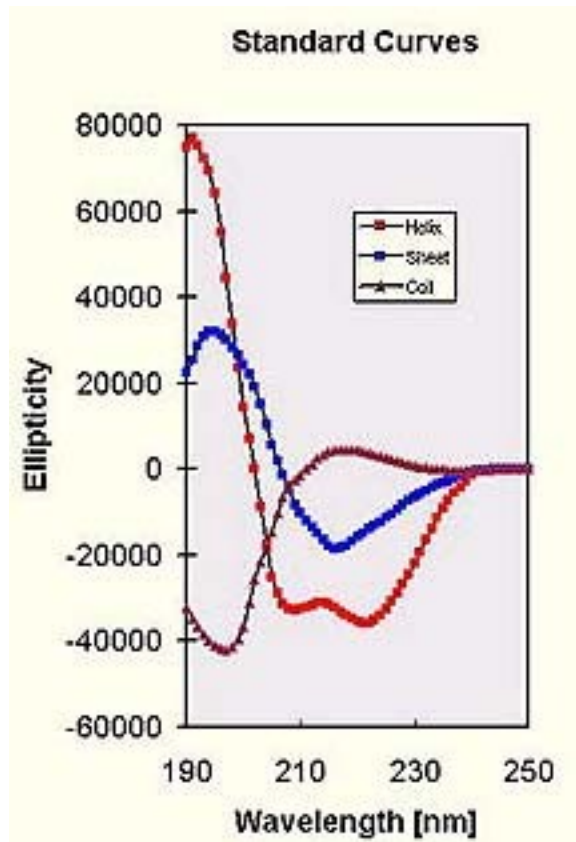
**boční řetězce aminokyselin** (Phe, Tyr, Trp, disulfidy  
> 230 nm)

Podmínky: koncentrace 0.2 – 0.5 mg/ml



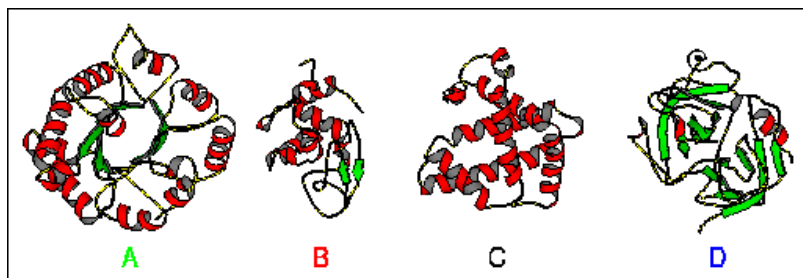
# Chiroptické metody

CD spektra  $\alpha$ -helixu.  $\beta$ -skl.listu, smyčky, náhodného klubka



# Chiroptické metody

## Spektra reálných proteinů



A triosofosfátisomerasa:

H:0.52, S:0.14, T:0.11, O:0.23

B: lysozym

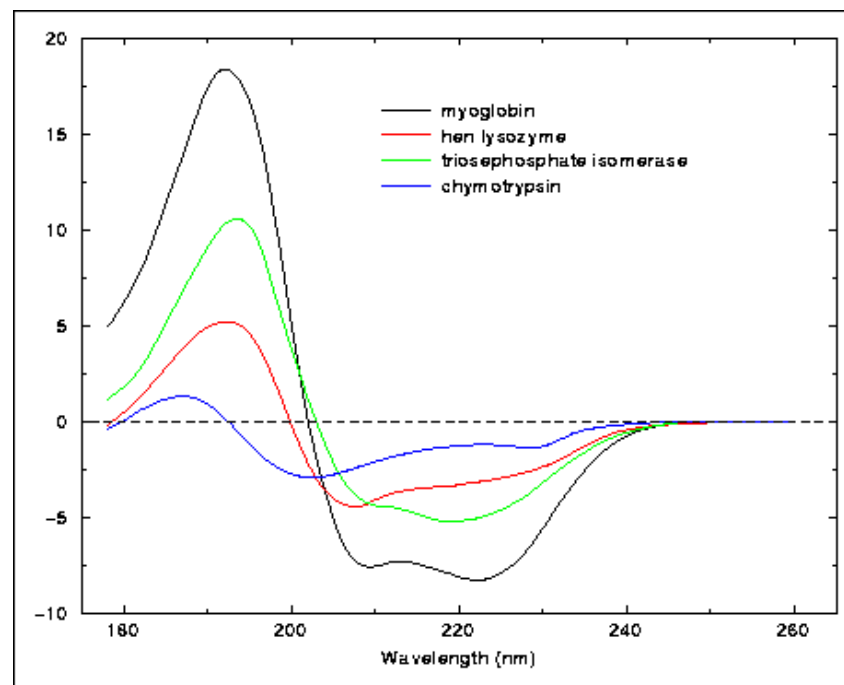
H:0.36, S:0.09, T:0.32, O: 0.23

C: myoglobin

H:0.78, S:0, T:0.12, O:0.10

D: chymotrypsin

H:0.10, S:0.34, T:0.20, O:0,36



# Chiroptické metody

## Měření CD spekter proteinů

### náhodné klubko

poly-L-lysin při pH 7.0, (Pro-Lys-Leu-Lys-Leu)<sub>n</sub>, slabá iontová síla

### α-helix

poly-L-lysin při pH 10.2, nebo myoglobin

### β-skl. list

poly-L-lysin při pH 11.2 , zahřátí na 50°C, ochlazení, nebo (Lys-Leu)<sub>n</sub> v 0.1 M NaF při pH 7

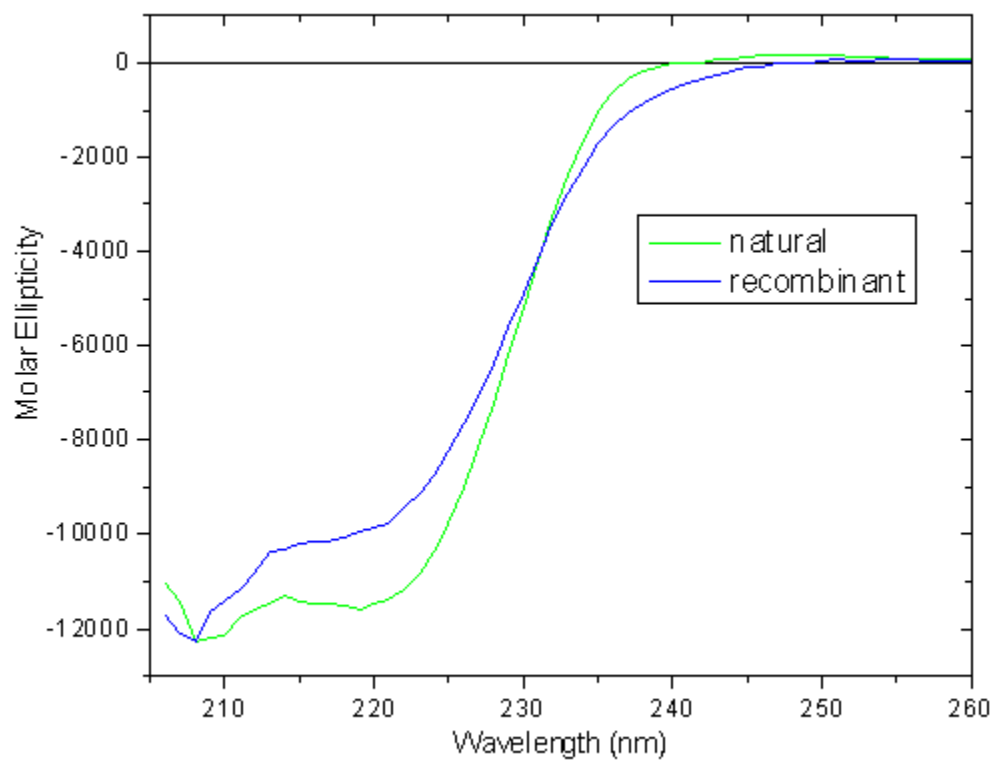
Spektrum neznámého proteinu

$$\Theta(\lambda) = f_{\alpha} \Theta_{\alpha}(\lambda) + f_{\beta} \Theta_{\beta}(\lambda) + f_{RC} \Theta_{RC}(\lambda)$$

kde  $\Theta_{\alpha}(\lambda)$ ,  $\Theta_{\beta}(\lambda)$  a  $\Theta_{RC}(\lambda)$  jsou hodnoty získané z referenčních bílkovina f frakce.

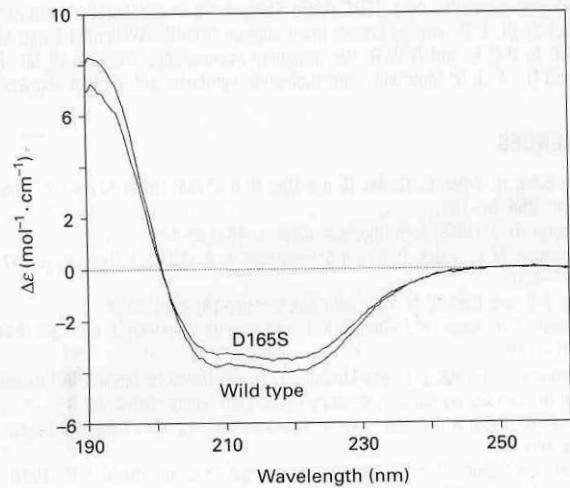
# Chiroptické metody

Použití metody: CD spektrum mutantního proteinu



# Chiroptické metody

Použití metody: CD spektrum mutantního proteinu



**Figure 2** Far-uv. c.d. spectra of wild-type and D165S mutant GDHs

Spectra were recorded at 20 °C in 0.1 M potassium phosphate, pH 7.0. The protein concentration was 1.5 mg·ml<sup>-1</sup> and the cell path length was 0.1 mm.

**Table 1** Kinetic parameters of mutant and wild-type (WT) GDH

$K_m$  and  $V_{max}$  are the apparent Michaelis constants and maximal velocities. Units for  $K_m$  for NADH are  $\mu\text{M}$ ; for 2-oxoglutarate and ammonium they are mM. ND, could not be determined.

	$K_m$		$V_{max}$ ( $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ )	
	WT	D165S	WT	D165S
NADH	$10.8 \pm 0.7$	$9.7 \pm 2.2$	$125 \pm 2$	$0.144 \pm 0.008$
2-Oxoglutarate	$0.31 \pm 0.05$	$0.29 \pm 0.06$	$191 \pm 10$	$0.141 \pm 0.010$
Ammonium	$61.1 \pm 11.9$	ND	$296 \pm 21$	ND

Asp165 náhrada za Ser

Spektra velmi podobná – při mutaci nedochází k podstatné změně struktury proteinu