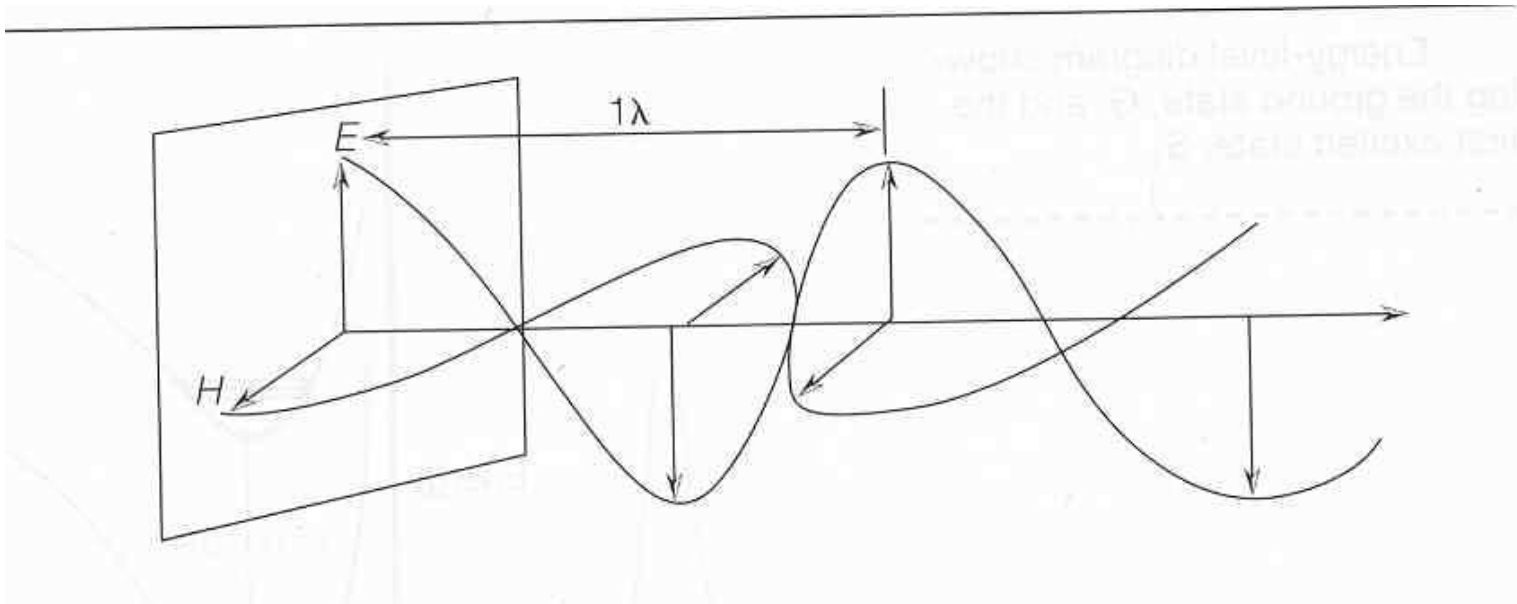


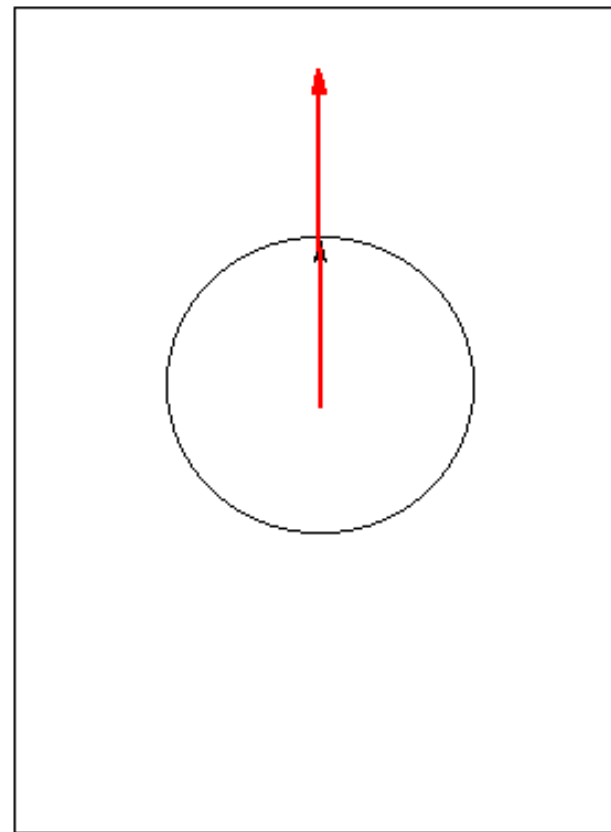
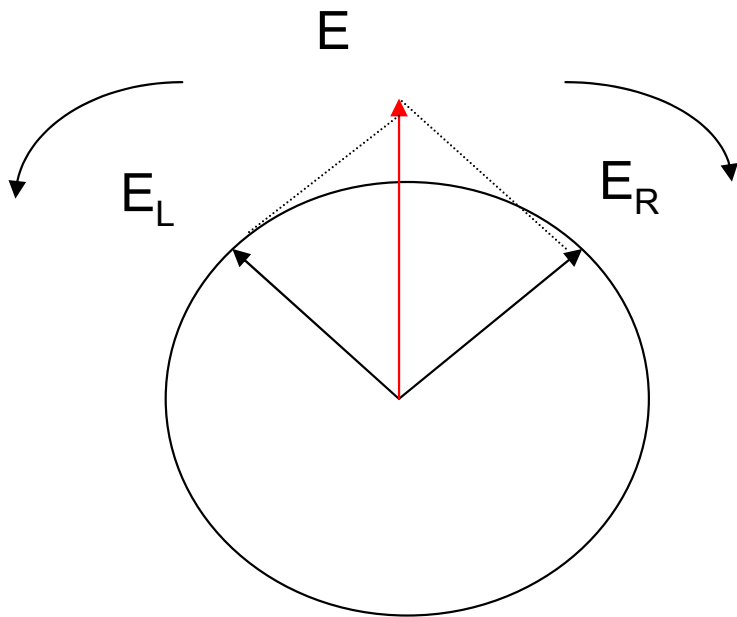
Chiroptické metody



E - vektor elektrického pole
H – vektor magnetického pole

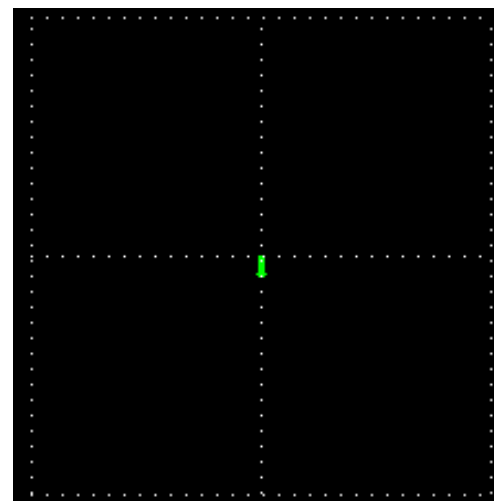
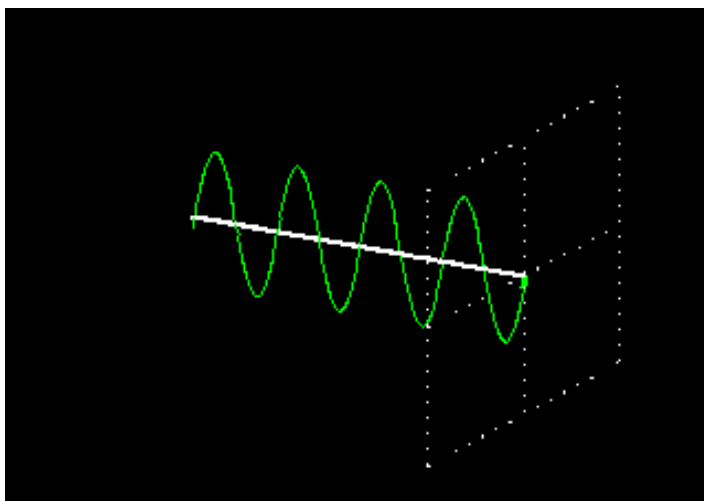
Chiroptické metody

Lineárně polarizované světlo



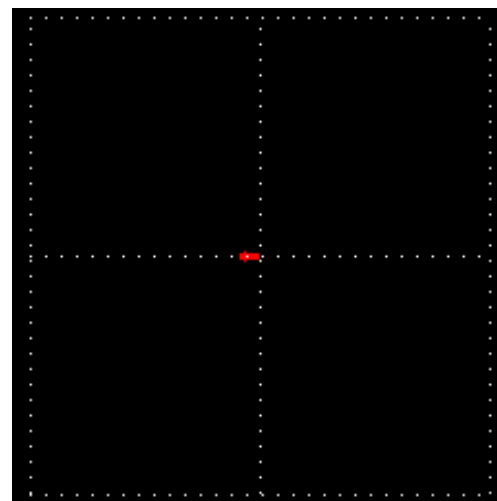
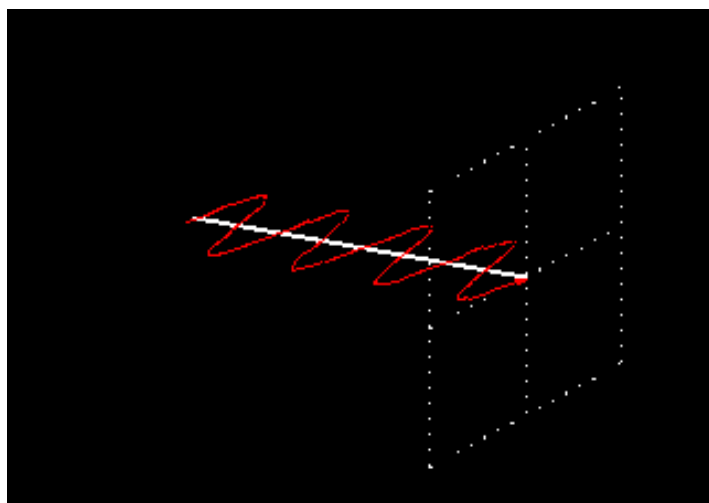
Chiroptické metody

Lineárně polarizované světlo - vertikální



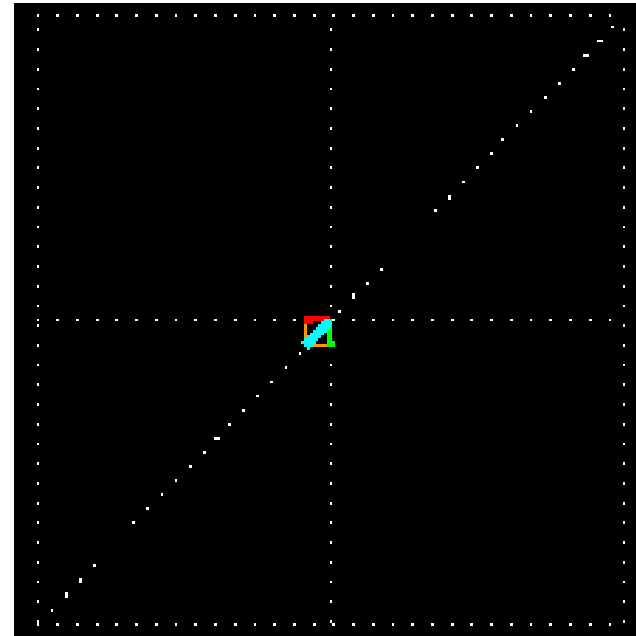
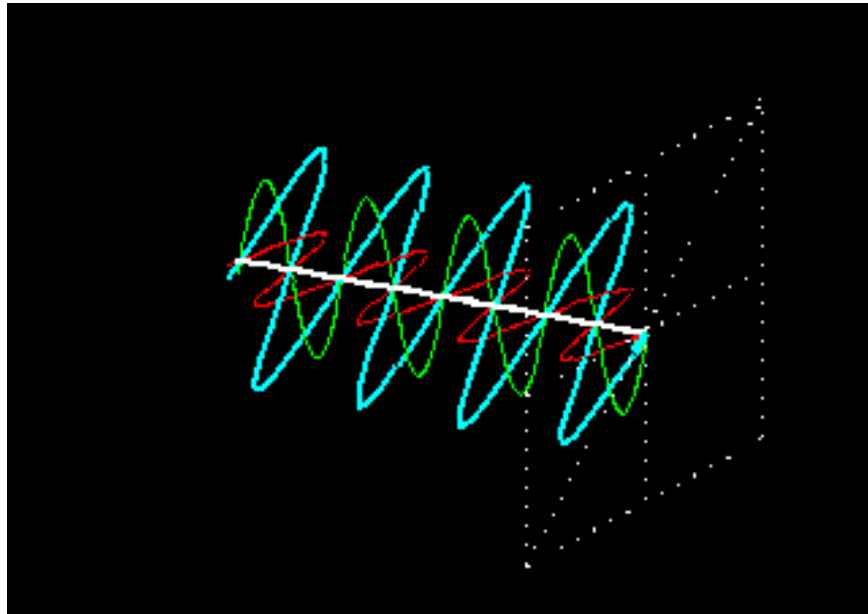
Chiroptické metody

Lineárně polarizované světlo - vertikální



Chiroptické metody

Superposice vertikální a horizontální složky oscilující ve stejné fázi



Chiroptické metody

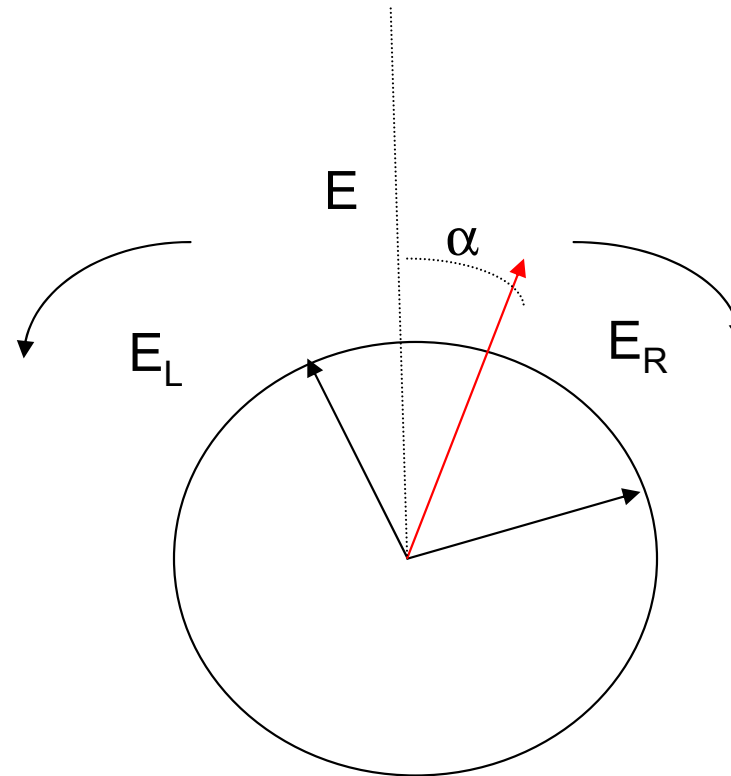
Opticky aktivní látka:

Rozdílný refraktivní index (n) pro E_R , E_L

Každá ze složek se pohybuje různou rychlostí

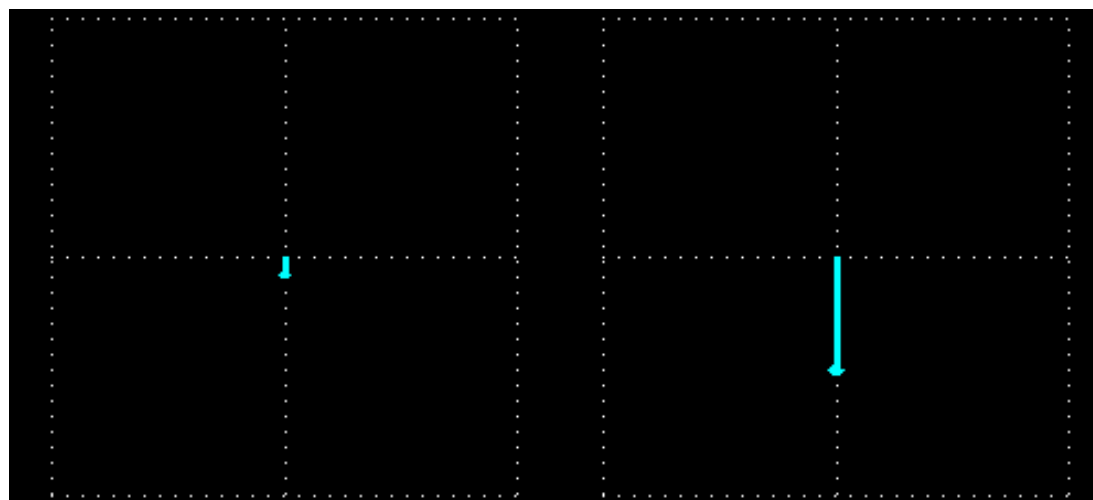
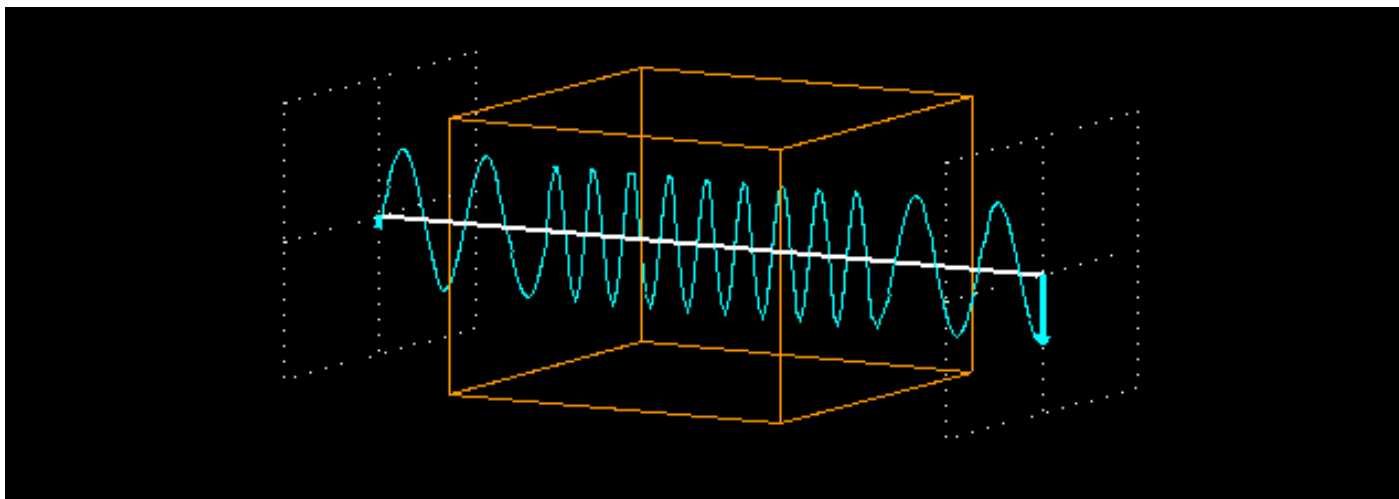
$$\alpha = \varphi_R - \varphi_L$$

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



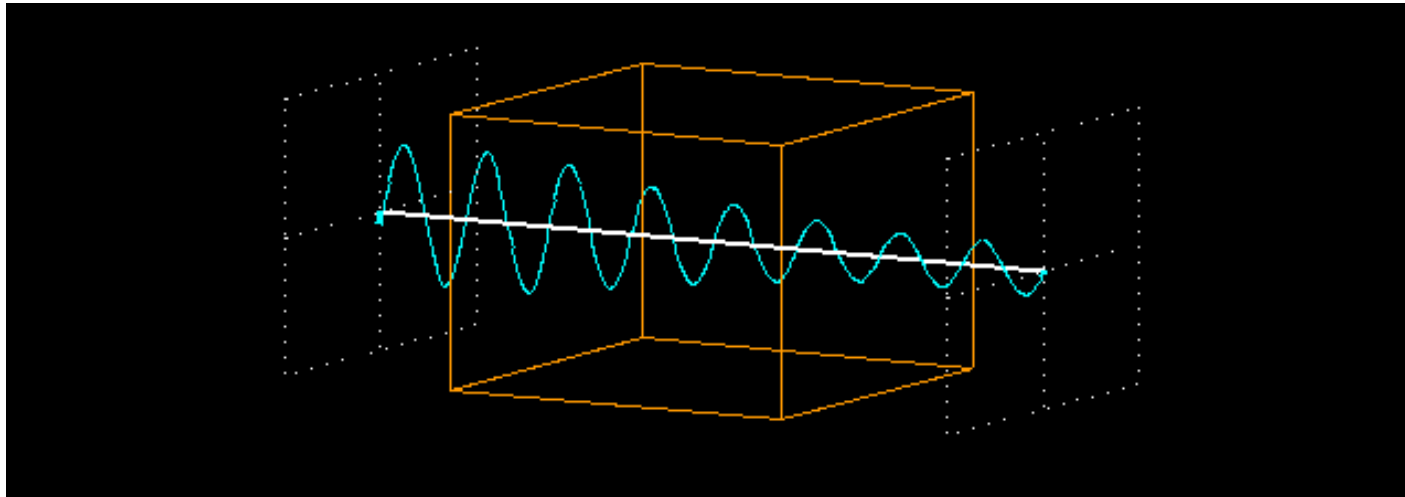
Chiroptické metody

Lineárně polar. světlo prochází prostředím o vyšším refraktivním indexu



Chiroptické metody

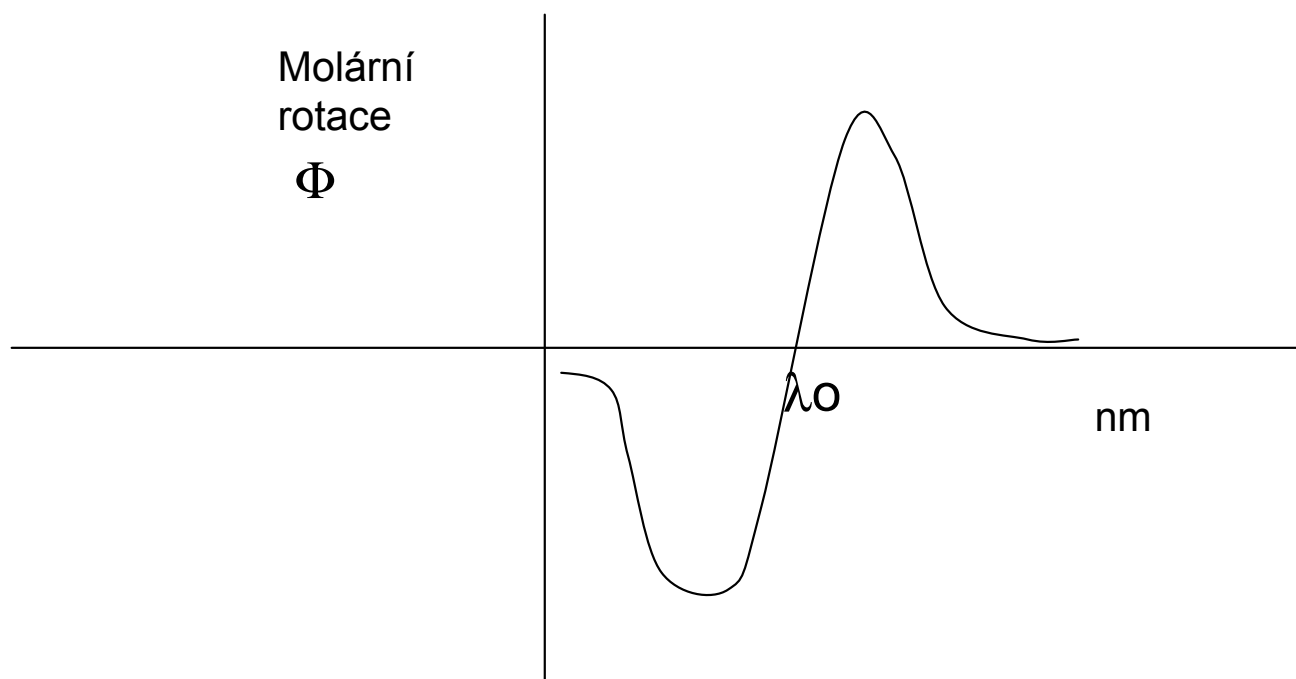
Lineárně polar. světlo prochází absorbujícím prostředím



Chiroptické metody

Spektra ORD (optická rotační disperze)

Pozitivní Cottonův efekt

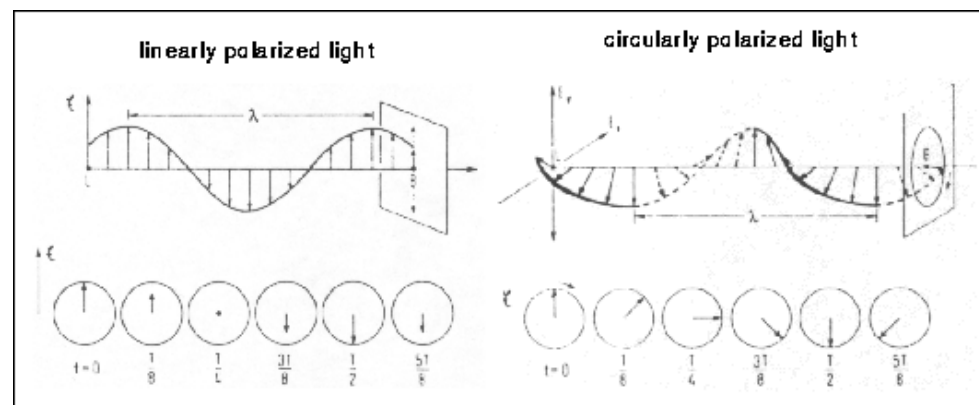
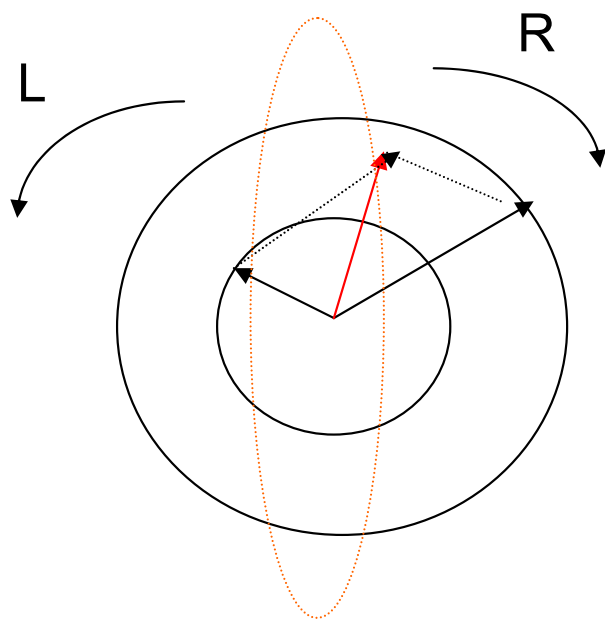


Chiroptické metody

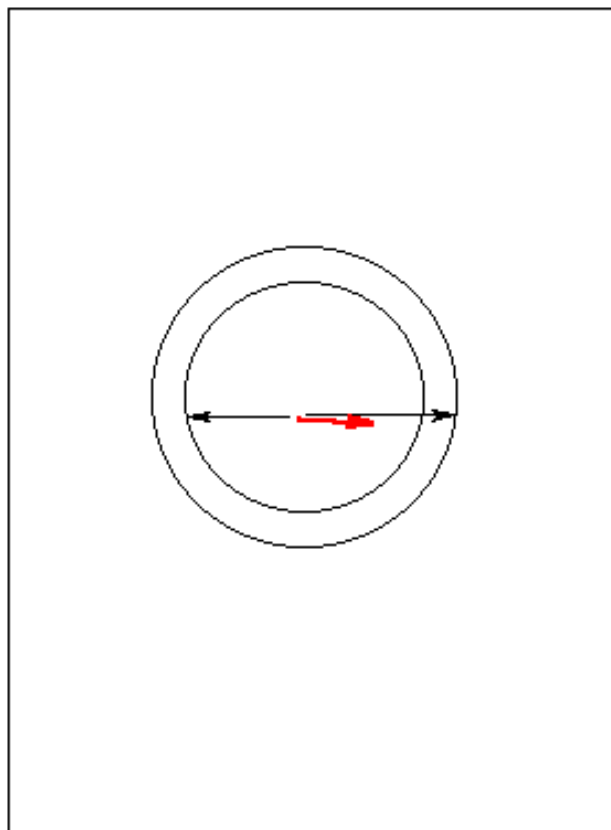
Cirkulárně polarizované světlo

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

$$\epsilon_R \neq \epsilon_L$$



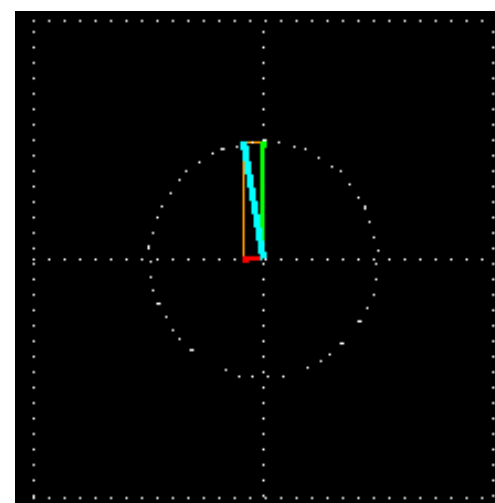
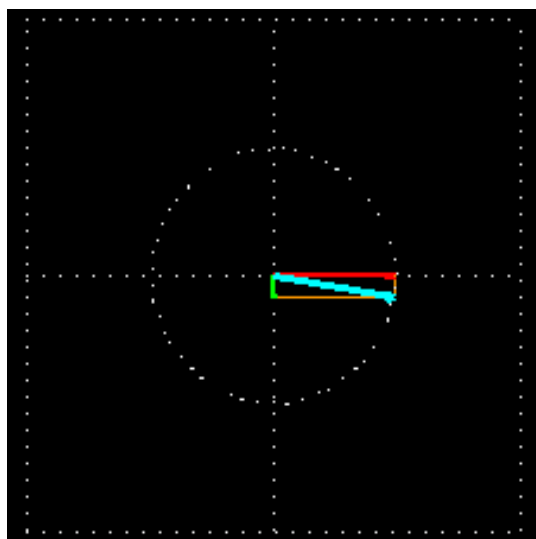
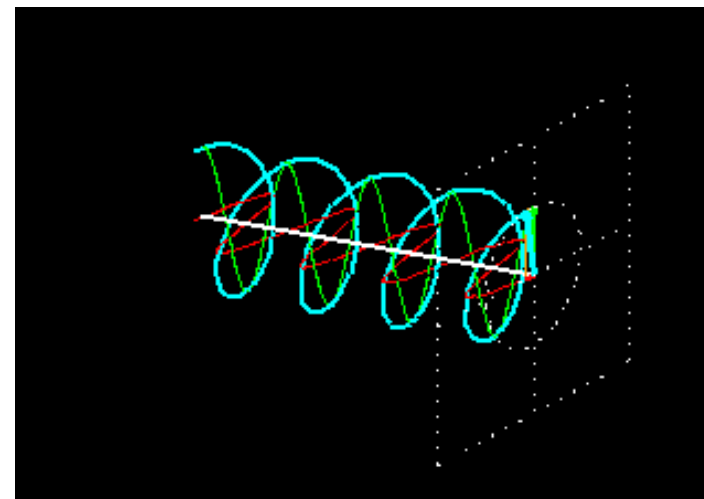
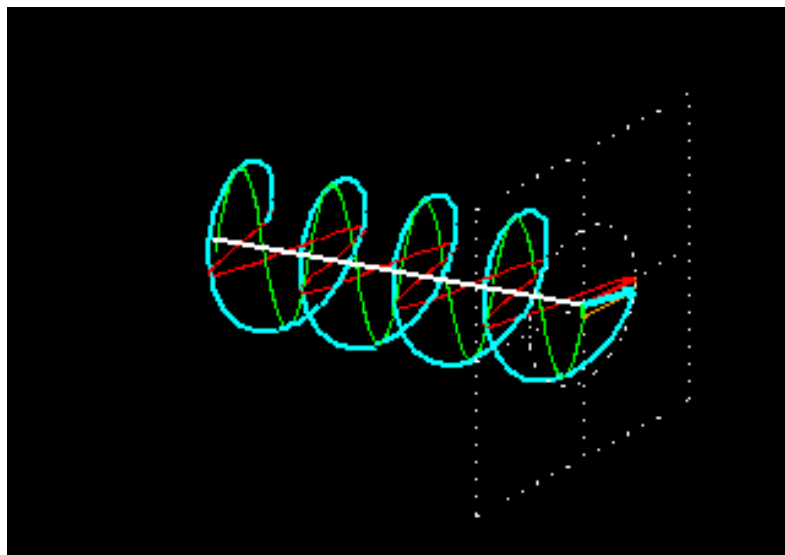
Chiroptické metody



Chiroptické metody

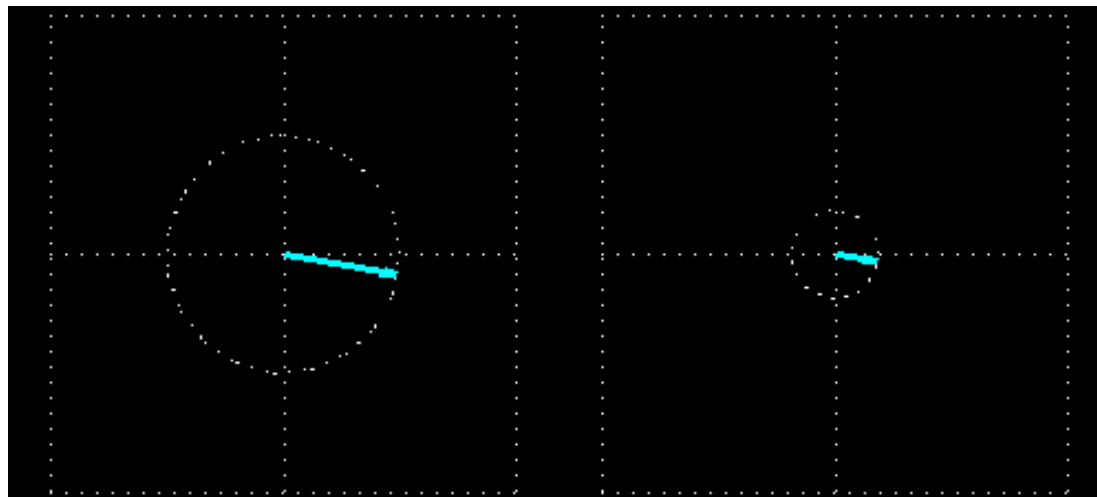
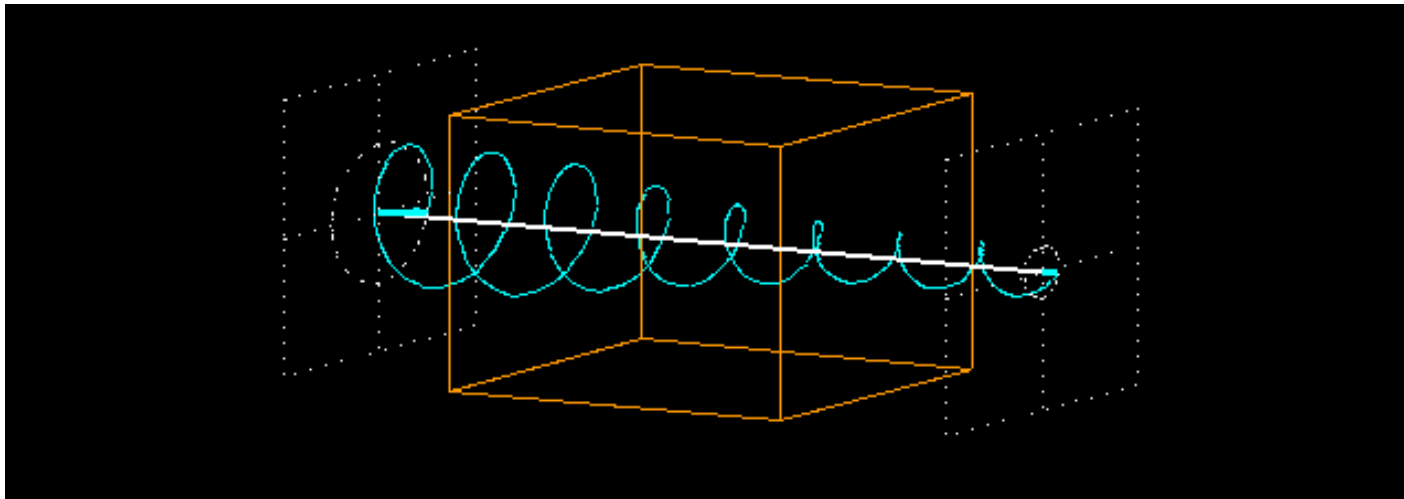
Pravá složka

Levá složka



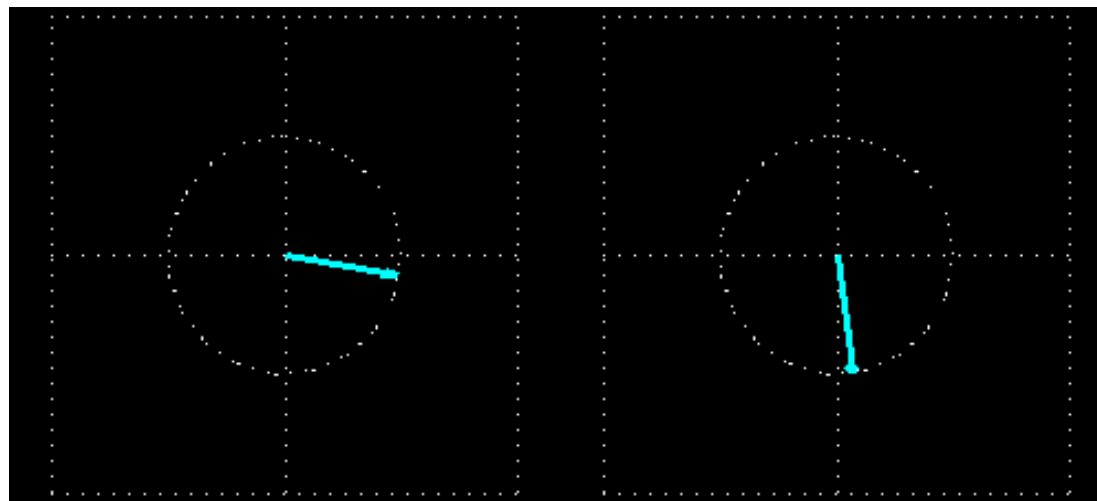
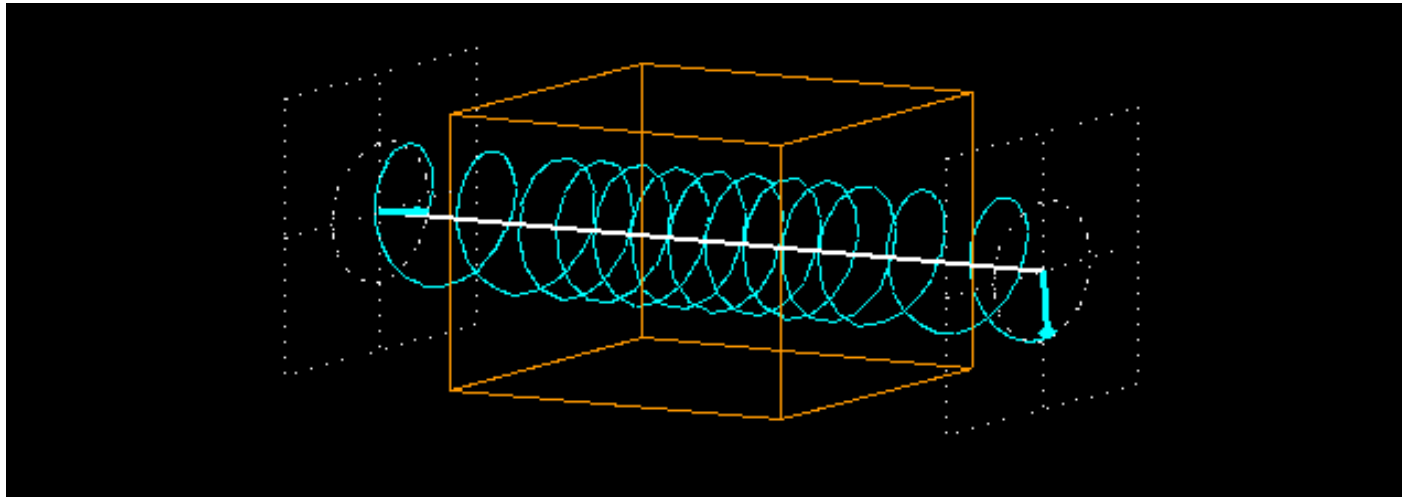
Chiroptické metody

Circulárně polar. světlo prochází absorbujícím prostředím



Chiroptické metody

Circulárně polar. světlo prochází prostředím v vyšším refraktivním indexem

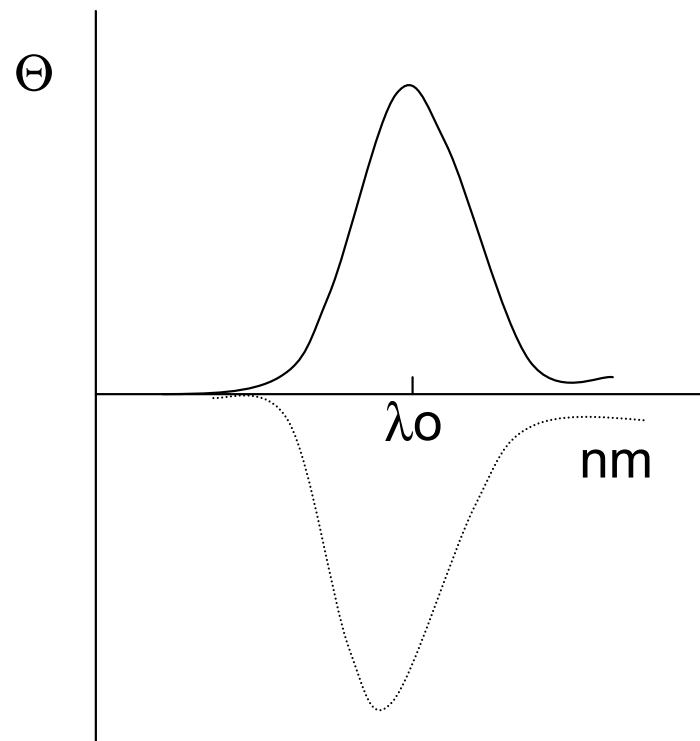


Chiroptické metody

Elipticita

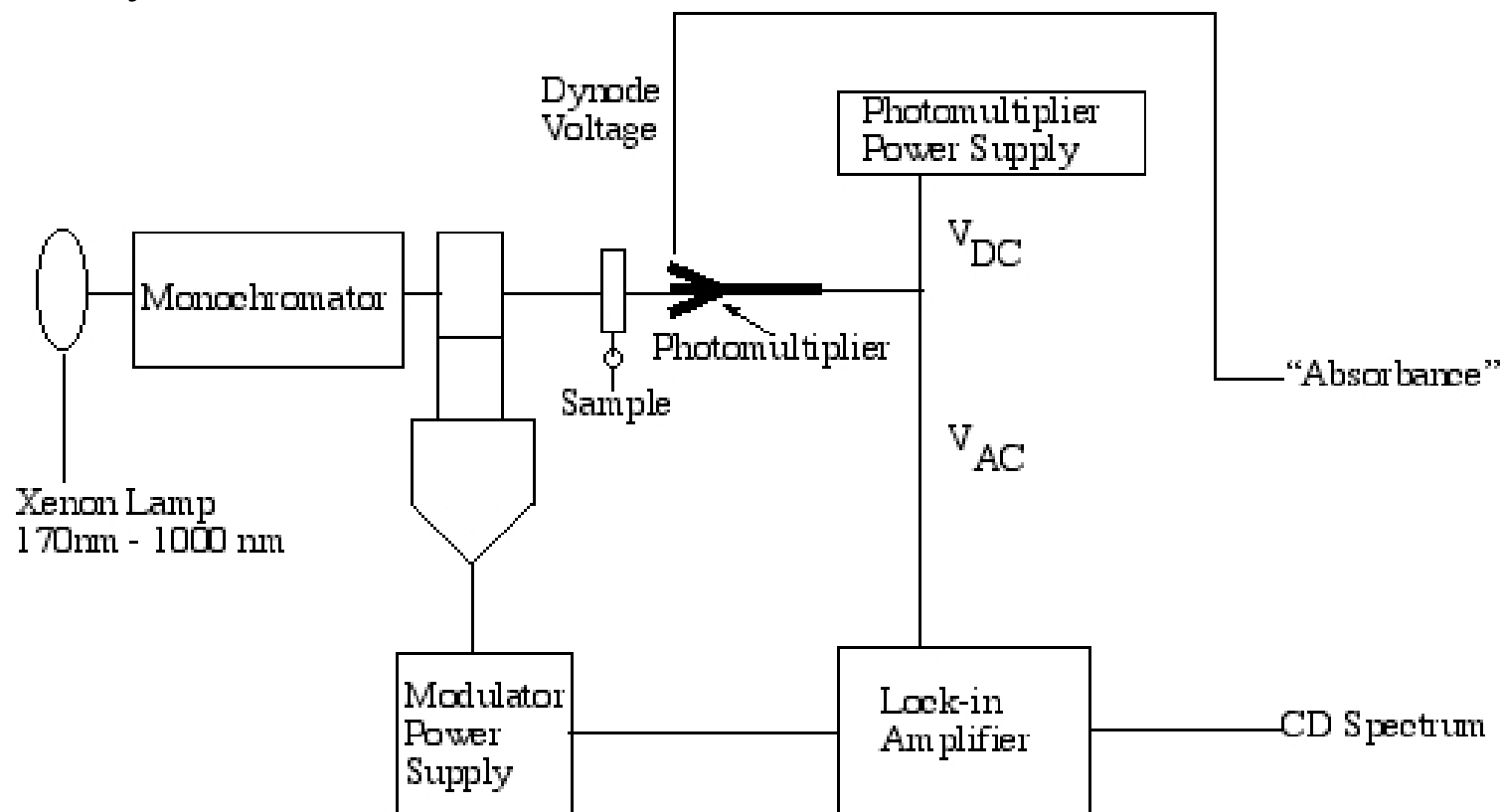
$$\Theta = 3298 (\varepsilon_L - \varepsilon_R) = 3298 \cdot \Delta\varepsilon$$

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



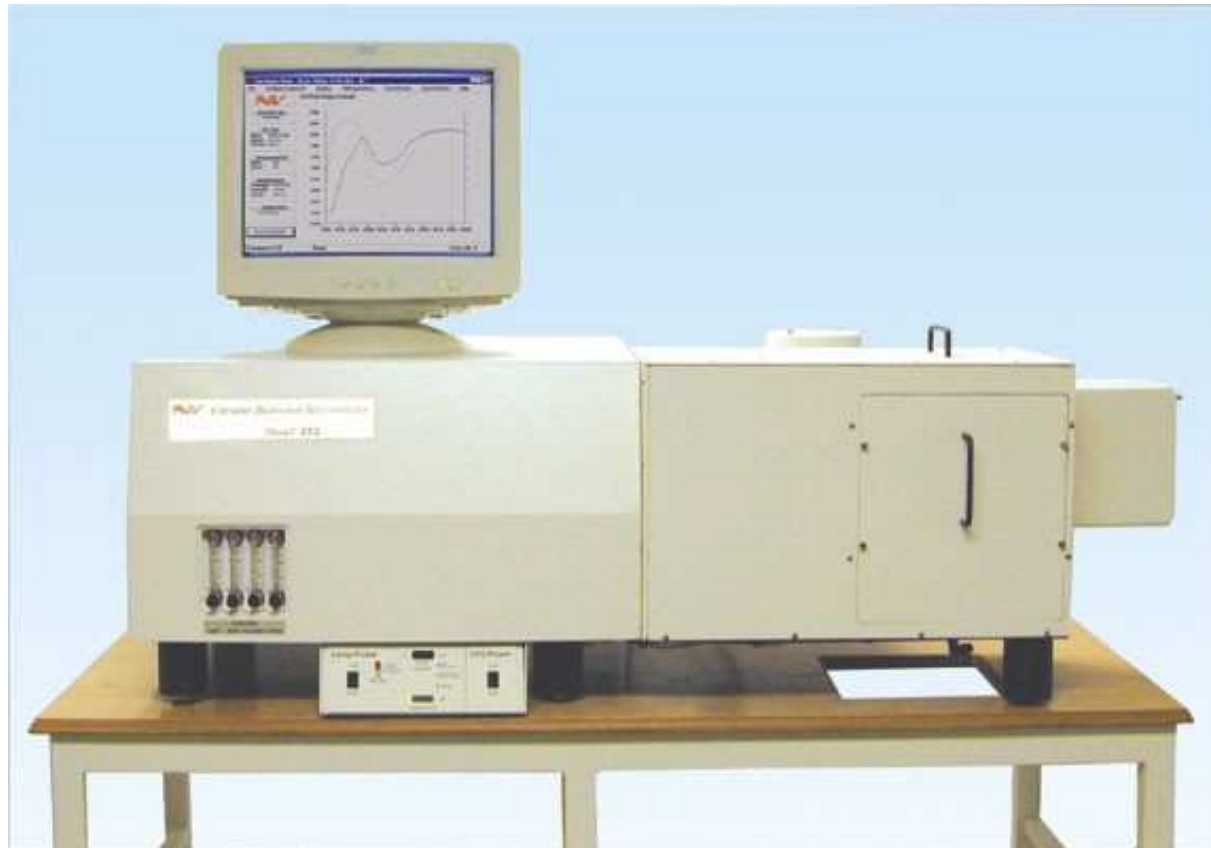
Chiroptické metody

Přístrojové vybavení - CD



The CD spectrometer

Chiroptické metody



Chiroptické metody

CD spektra proteinů – UV oblast

-**peptidová vazba** (190 – 230 nm)

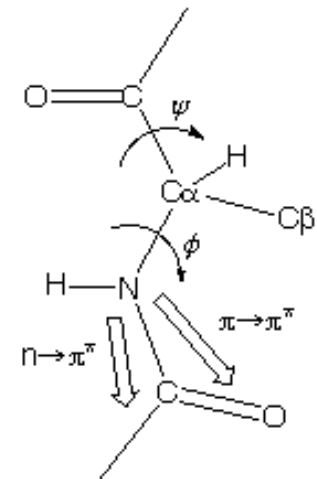
$n \rightarrow \pi$ nevazebné elektrony. karbonylu, 220 nm

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

Intenzita a energie přechodů závisí na úhlech

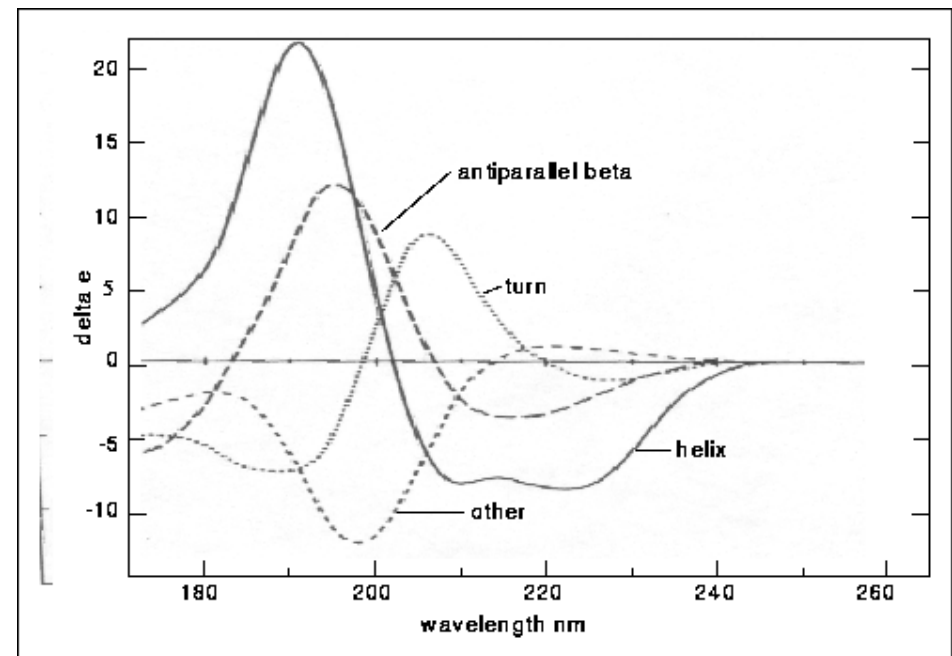
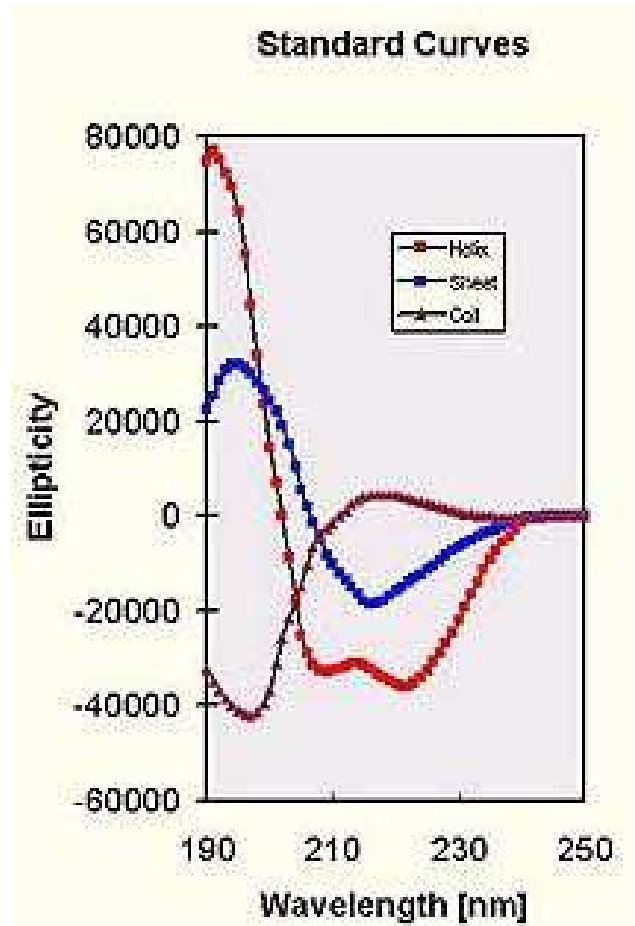
boční řetězce aminokyselin (Phe, Tyr, Trp, disulfidy
> 230 nm)

Podmínky: koncentrace 0.2 – 0.5 mg/ml



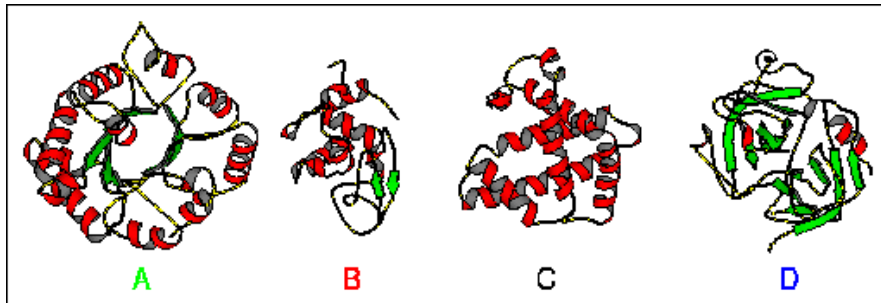
Chiroptické metody

CD spektra α -helixu. β -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

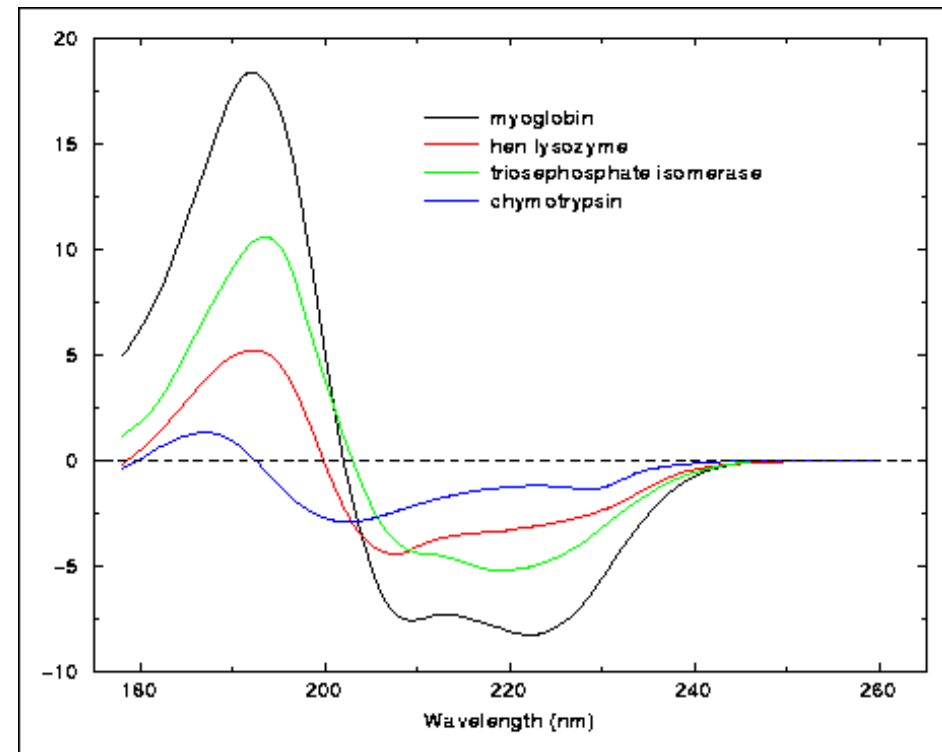
H:0.36, S:0.09, T:0.32, O: 0.23

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)_n, 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)_n v 0.1 M NaF při pH 7

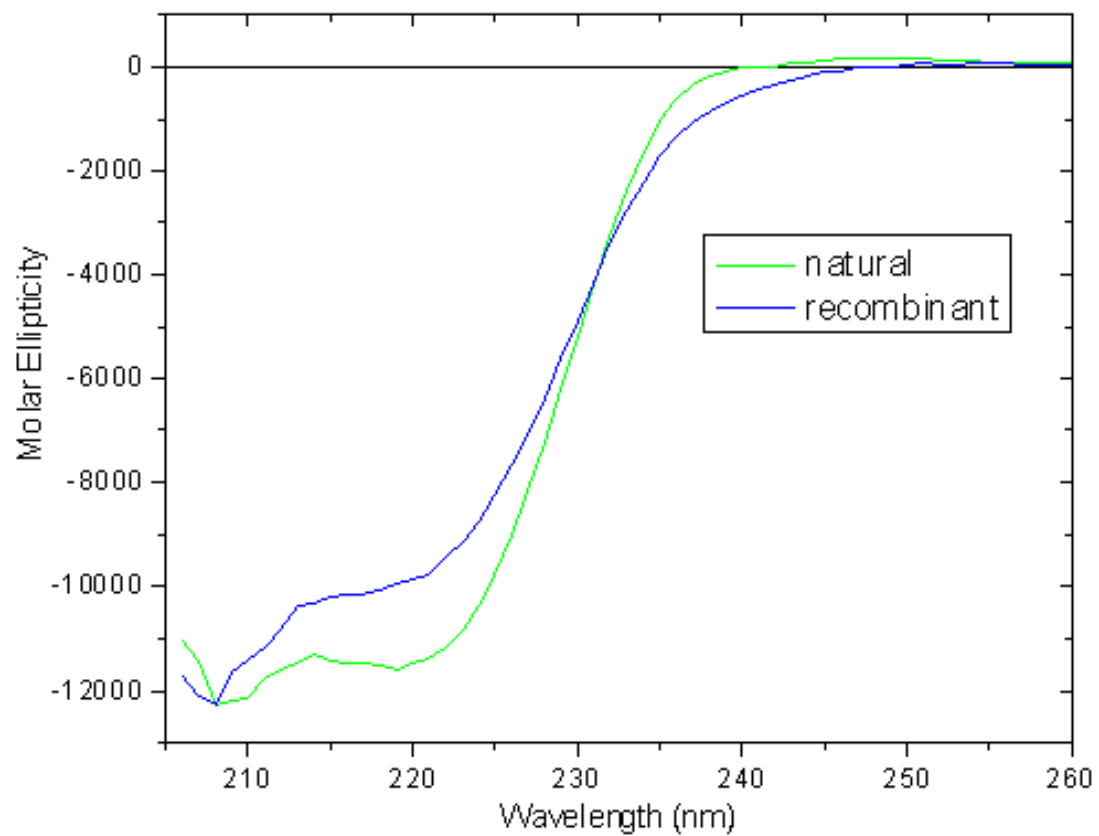
Spektrum neznámého proteinu

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

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

Chiroptické metody

Použití metody: CD spektrum mutantního proteinu



Chiroptické metody

Použití metody: CD spektrum mutantního proteinu

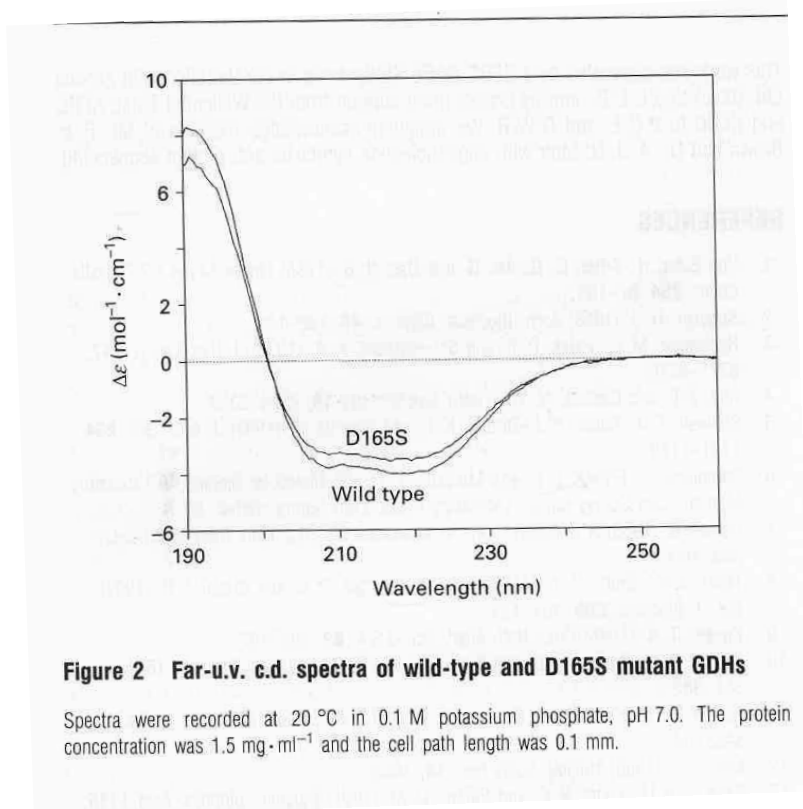


Table 1 Kinetic parameters of mutant and wild-type (WT) GDH

K_m and V_{max} are the apparent Michaelis constants and maximal velocities. Units for K_m for NADH are μM ; 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 ± 0.7	9.7 ± 2.2	125 ± 2	0.144 ± 0.008
2-Oxoglutarate	0.31 ± 0.05	0.29 ± 0.06	191 ± 10	0.141 ± 0.010
Ammonium	61.1 ± 11.9	ND	296 ± 21	ND

Asp165 náhrada za Ser

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