

C6200–Biochemické metody

^{14}D _IZOTOPOVÁ VÝMĚNA

Petr Zbořil

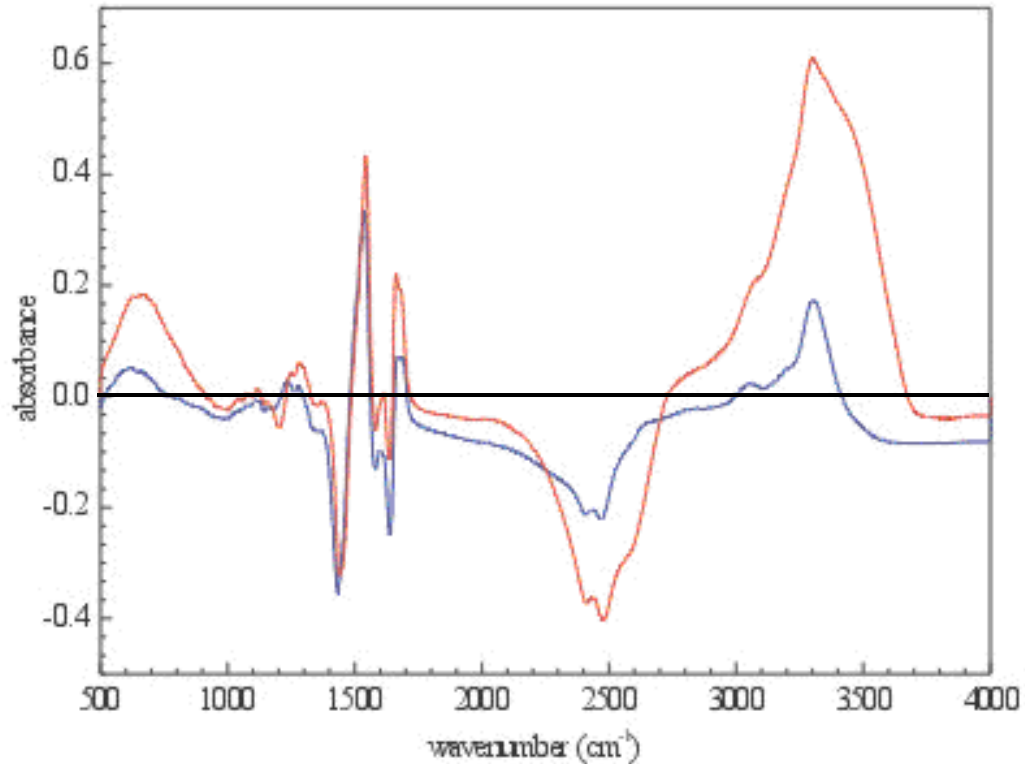
Isotopová výměna

- Dynamika molekul, interakce s okolím – uvnitř molekuly
 - Výměna stejných atomů s okolím – nutnost odlišení
 - V biochemii téměř výhradně H, těž kovy (Zn)
 - Záměna za D nebo ^3H – možnost sledování
- Rychlost mírou neuspořádanosti – vliv struktury
 - Celá molekula – skupiny
 - Vysoká u malých molekul x velkých
 - Menší pro H ve vodíkových můstcích (α -helix)
 - Vliv elektronegativity centrálního atomu skupiny
 - -COOH, -SH, -OH, =NH
 - Vliv T, pH aj.
 - Dlouhodobý proces

Metody sledování

- Spektrální
 - IR, $\nu_H > \nu_D$ – pík se posouvá, rozlišení skupiny
 - NMR – D v jiné oblasti, pík H mizí
- MS
- Ostatní
 - Radioisotopové
 - Změna hustoty rozpouštědla (pyknometr)

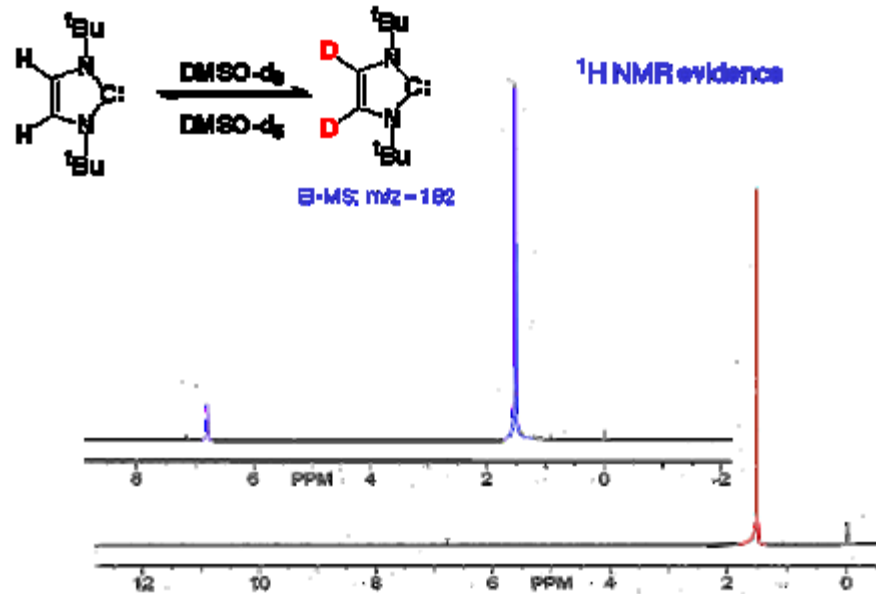
Sledování pomocí IR



- Diferenční IR spektra nativního a deuteriovaného BSA
 - (modrá – částečná, červeně uplná)
 - + těžší, - lehčí jádra, různá rychlost

Sledování pomocí NMR

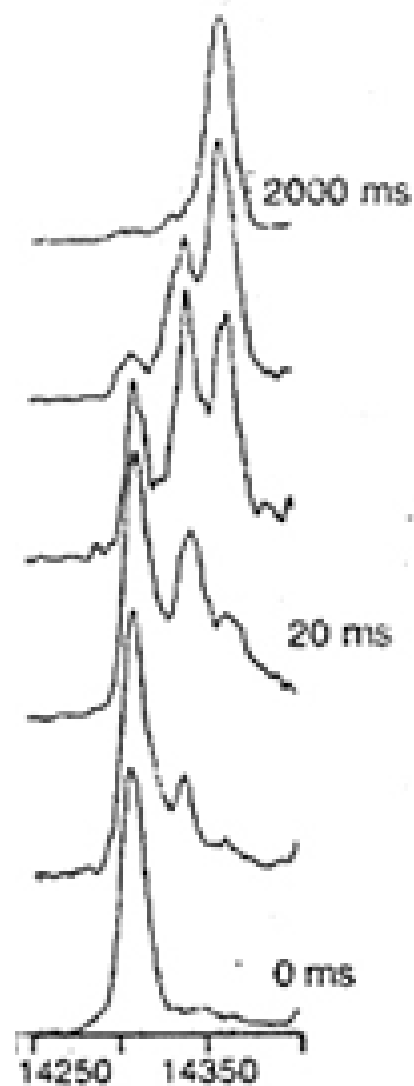
H/D Exchange in 1,3- di-*tert*-butylimidazole-2-ylidene



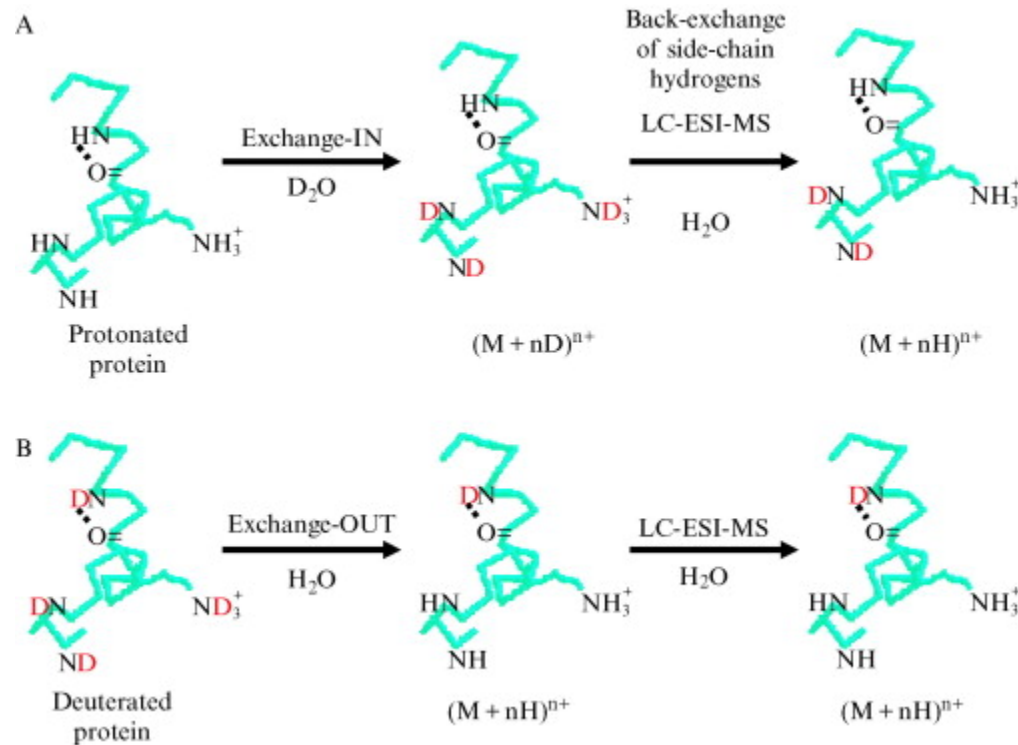
- H-D výměna

Sledování pomocí MS

Časový průběh
H-D výměny
u lysozymu
pomocí ESI-MS

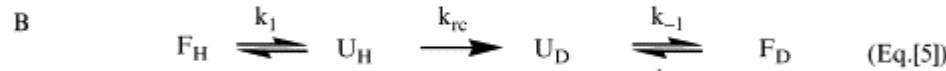
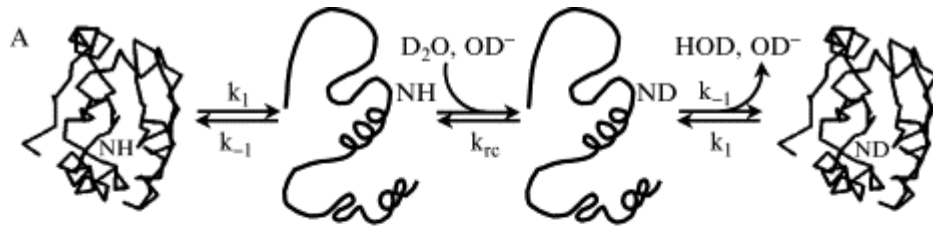


Izotopová výměna



- Dva přístupy
 - Různé rychlosti výměny – vliv interakcí – konformace

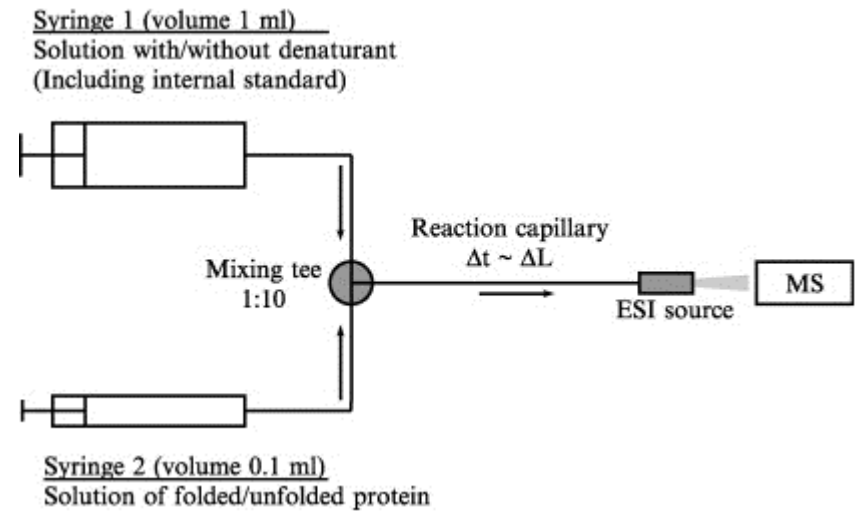
Monitorování skládání proteinů



$$k_{\text{obs}} = \frac{k_1 k_{rc}}{k_{-1} + k_{rc}}$$

EX2-type exchange: $k_{\text{obs}} = K_{\text{eq}} k_{rc}$ if $k_{-1} \gg k_{rc}$

EX1-type exchange: $k_{\text{obs}} = k_1$ if $k_{-1} \ll k_{rc}$



- Schema a experimentální provedení

DĚKUJI ZA POZORNOST