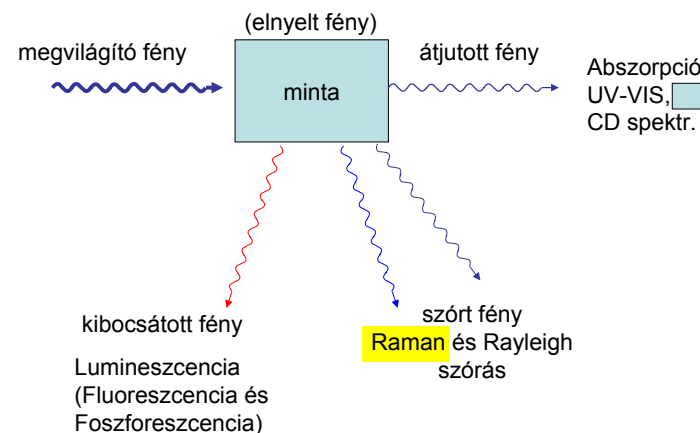


Infravörös és Raman spektroszkópia a fehérjeszerkezet vizsgálatában

Smeller László

Mi történhet, ha egy mintát fénnel világítunk meg?

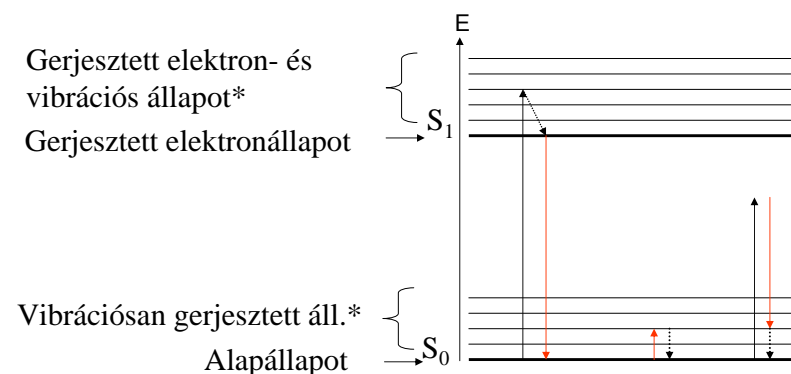


Abszorpciós és emissziós spektroszkópia

- Az átjutott vagy kibocsátott fény
analizálása a hullámhossz függvényében.
- Információ:
 - atomok, molekulák azonosítása,
 - molekuláris szintű szerkezetváltozások
(konformációváltozások) detektálása,
 - koncentráció meghatározás

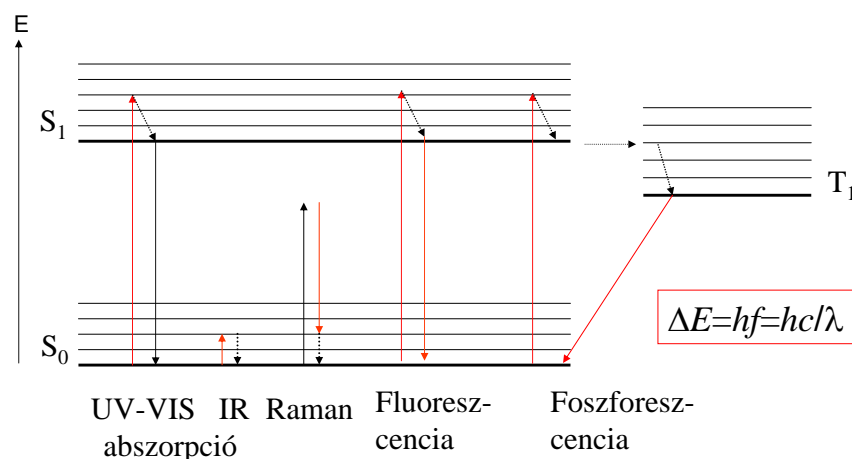
Miért nyel el ill. bocsát ki fényt egy atom v. molekula?

- Energiaátmenet: ld. Jablonski diagram

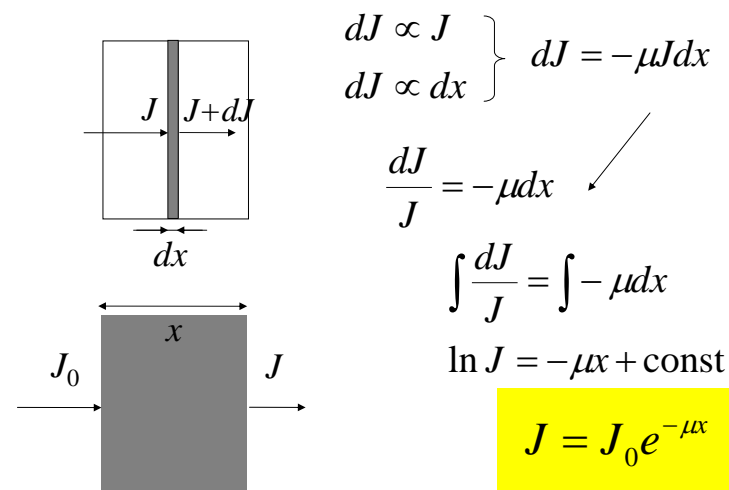


*csak molekuláknál!

Miért nyel el ill. bocsát ki fényt egy atom v. molekula?



Abszorpciós spektroszkópia Abszorpciós törvény



Abszorpciós spektroszkópia Lambert-Beer törvény

Elvi alapja: abszorpciós törvény: $J = J_0 \cdot e^{-\mu x}$
ahol $\mu(\text{anyag}, c, \lambda)$

• Lambert-Beer törvény:

$$A = \lg \frac{J_0}{J} = \varepsilon(\lambda) c x$$

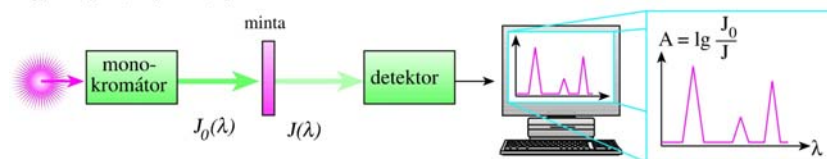
- spektrum: $A(\lambda)$
- mérés: spektrofotométer
- referencia oldat (J_0)
- információ: azonosítás
koncentráció.

Infravörös spektroszkópia

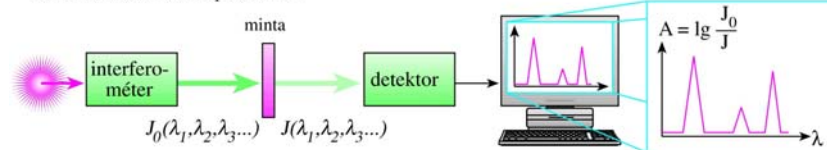
- Infravörös fény: $\lambda = 800 \text{ nm} - 1 \text{ mm}$
közép infra tartomány: $2,5 - 50 \mu\text{m}$
- abszorpciós spektroszkópia
- az elnyelt infravörös sugárzás
molekularezgéseket kelt
- érzékeny a molekulaszervezetre
- speciális detektálás: FT spektrométer
(FTIR spektroszkópia)

Az infravörös spektrum mérése: Fourier transzformációs spektrométer

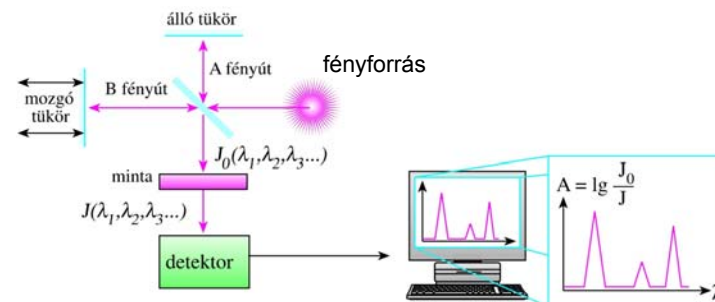
hagyományos (diszperziós) spektrométer



Fourier transzformációs spektrométer

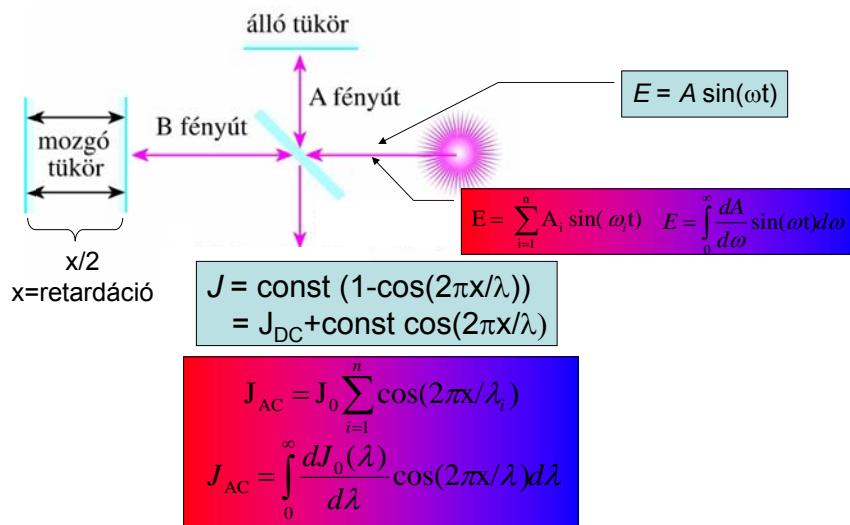


tk 6.17 ábra



tk 6.18 ábra

Az FT spektroszkópia elve részletesen



Fourier transzformáció

Egy $f(x)$ függvény Fourier transzformáltja a $g(v)$ függvény:

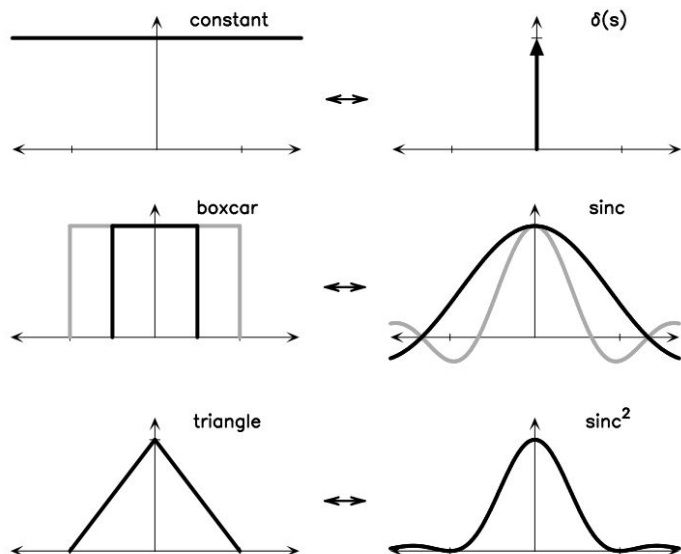
$$F(f(x)) = \int_{-\infty}^{\infty} f(x) e^{-2\pi i v x} dx = g(v)$$

A Fourier transzformáció inverze:

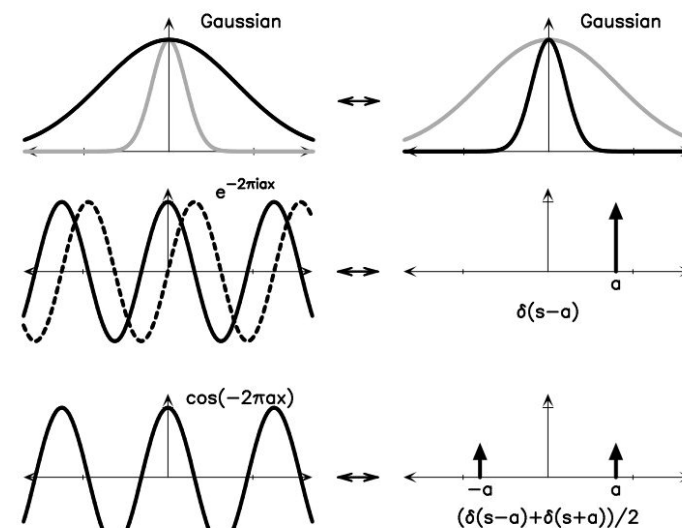
$$F^{-1}(g(v)) = \int_{-\infty}^{\infty} g(v) e^{2\pi i x v} dv = f(x)$$

$$e^{i\phi} = \cos \phi + i \sin \phi$$

Tipikus Fourier transzformáltak



Tipikus Fourier transzformáltak

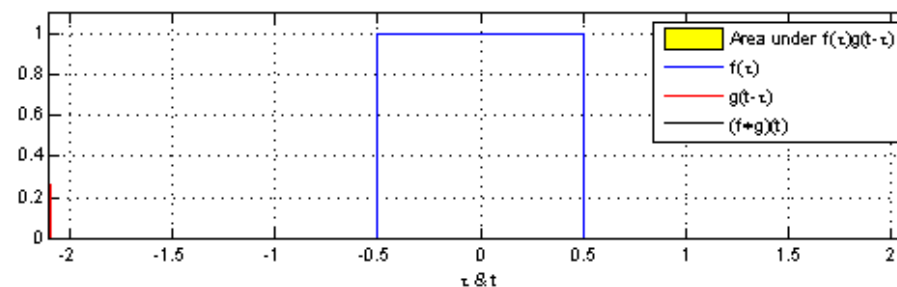


FT tulajdonságai

$F(x)$	$\underline{G(y)}$
valós	hermitikus (valós=páros, imag=páratlan)
imaginárius	anti-hermitikus (valós=páratlan, imag=páros)
páros	páros
páratlan	páratlan
valós és páros	valós és páros(cosinus transformáció)
valós és páratlan	imaginárius és páratlan (sinus transzformáció)
imaginárius és páros	imaginárius és páros
imaginárius és páratlan	valós és páratlan

Konvolúció

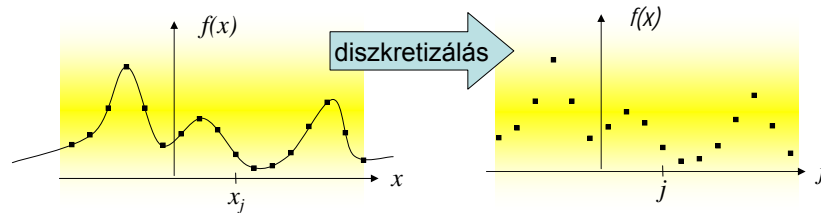
Def:
$$(f \otimes g)(t) = \int_{-\infty}^{\infty} f(\tau)g(t-\tau)d\tau$$



forrás: Wikipédia

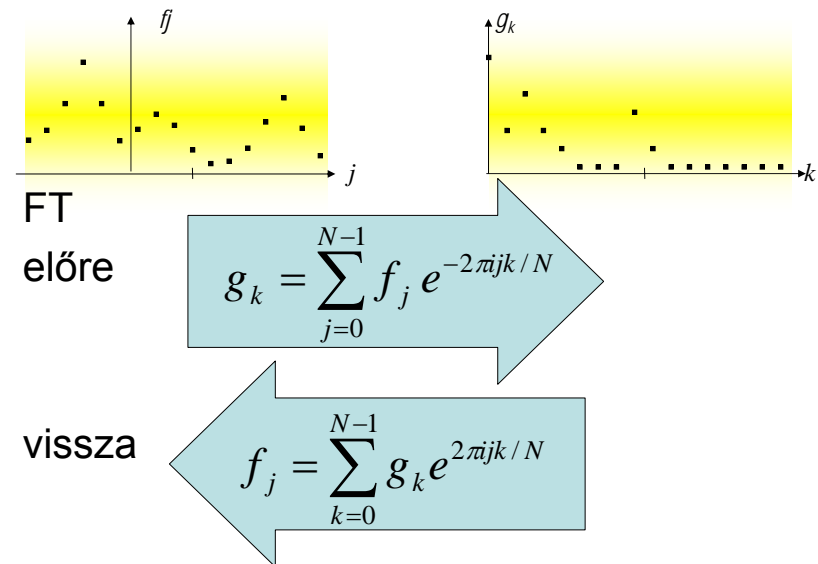
Konvolúciós tétel:
$$F(f \otimes g) = F(f)F(g)$$

Diszkrét FT



Kettős diszkrétizálás:
véges lépések (Δx)
véges számú adat (L)

Diszkrét FT



A spektrum számolása a Fourier transzformációs spektrométerben

Az interferométeren keresztüljutott sugárzás:

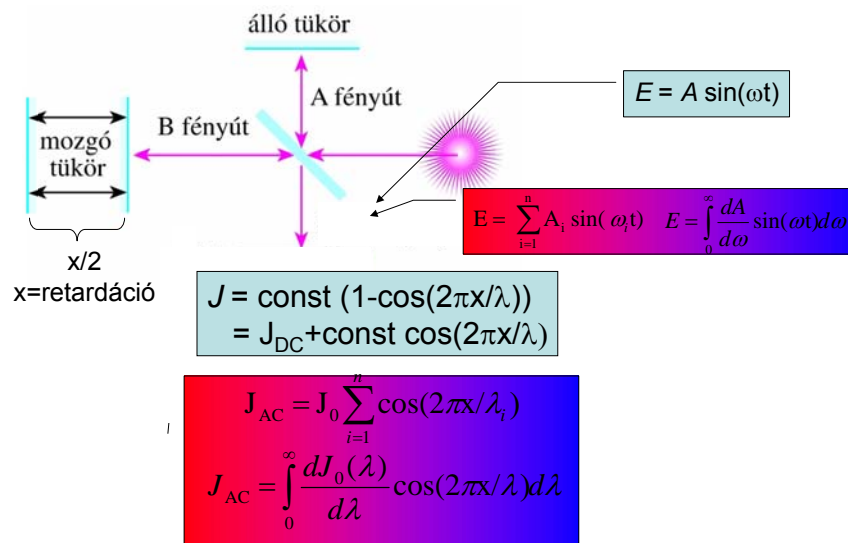
$$J_{AC} = \int_0^{\infty} \frac{dJ_0(\lambda)}{d\lambda} \cos(2\pi x/\lambda) d\lambda$$

éppen a $\frac{dJ_0(\lambda)}{d\lambda}$ mennyiség *cosinus* transzformáltja

A spektrum a $\frac{dJ_0(\lambda)}{d\lambda}$ -nek a mintán való

áthaladása után megmaradt részének és a

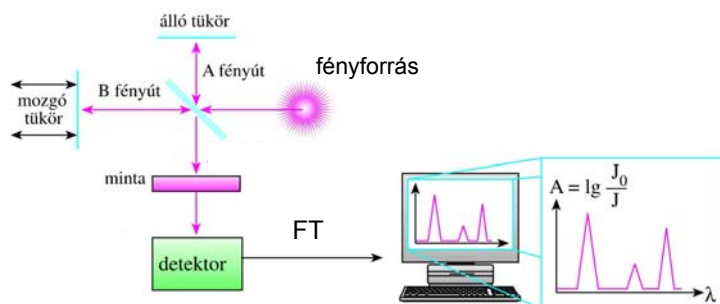
$\frac{dJ_0(\lambda)}{d\lambda}$ -nak a hányadosa (transzmissziós spektrum)



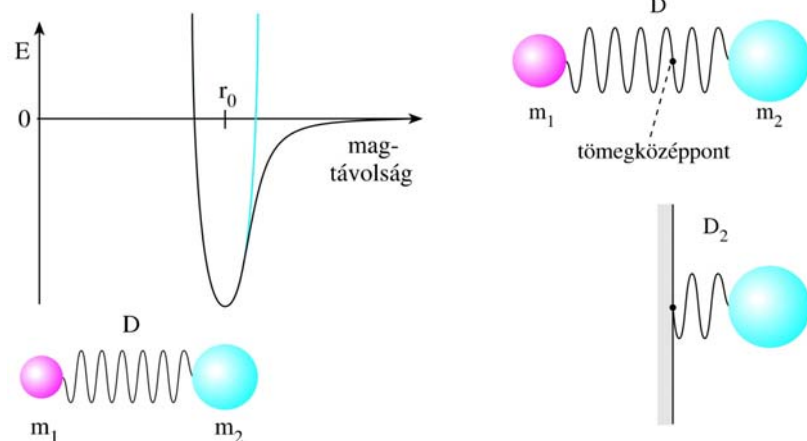
Molekularezgések

Az elektronok könnyűek, gyorsan követik az atommag mozgását, ezért az atommagok rezgéseit az elektronok nem befolyásolják.

A klasszikus fizikai leírásban az atommagok közti kötést, egy rugóval vesszük figyelembe.



Molekularezgések: kétatomos molekula

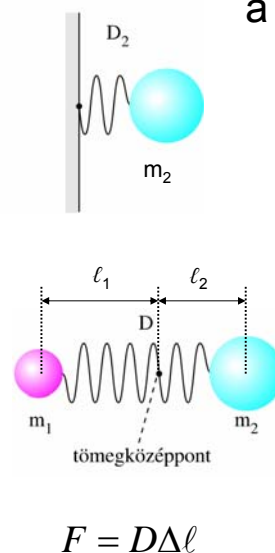


a középiskolából ismert:

$$f = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{D_2}{m_2}}$$

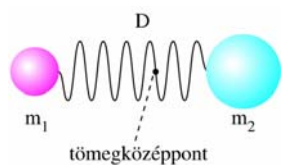
$$\frac{m_2}{m_1} = \frac{\ell_1}{\ell_2} = \frac{\Delta \ell_1}{\Delta \ell_2}$$

$$\begin{aligned} \frac{m_1 + m_2}{m_1} &= \frac{\ell_1 + \ell_2}{\ell_2} = \frac{\ell}{\ell_2} = \frac{\Delta \ell}{\Delta \ell_2} = \\ &= \frac{F/D}{F/D_2} = \frac{D_2}{D} \end{aligned}$$



$$F = D\Delta \ell$$

tehát: $\frac{m_1 + m_2}{m_1} = \frac{D_2}{D}$, amit az $f = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{D_2}{m_2}}$



egyenletbe helyettesítve
a rezgési frekvencia:

$$f = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{D(m_1 + m_2)}{m_1 m_2}}$$

az $m_{\text{redukált}} = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2}$ mennyiséget redukált

tömegnek is nevezik, ezzel a frekvencia:

$$f = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{D}{m_{\text{redukált}}}}$$

A hullámhossz: $\lambda = \frac{c}{f} = 2\pi c \sqrt{\frac{m_{\text{redukált}}}{D}}$

Az infravörös spektroszkópiában a λ
reciprokát, a hullámszámot (ν) használják:

$$\nu = \frac{1}{\lambda} = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{D}{m_{\text{redukált}}}}$$

ν : hány hullám fér
el egységnyi
hosszúságon? [cm^{-1}]

Példa: CO

A mért rezgési hullámszám: $\nu = 2143 \text{ cm}^{-1}$

$$\Rightarrow \lambda = 4,67 \mu\text{m} \Rightarrow f = 6,43 \cdot 10^{13} \text{ Hz}$$

$$m_C = 2 \cdot 10^{-26} \text{ kg}, m_O = 2,7 \cdot 10^{-26} \text{ kg} \Rightarrow D = 1875 \text{ N/m}$$

Ha ν ismert, D számolható

ha D ismert, ν számolható

Kvantummechanikai leírás

Kvantummechanikai oszcillátor:

Tömegpont parabolikus erőterben.

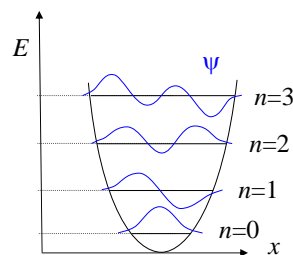
Hamilton operátor:

$$H = T + V$$

Schrödinger egyenlet:

$$-\frac{\hbar^2}{2m} \frac{\partial^2 \psi}{\partial x^2} + V(x) \psi = E \psi$$

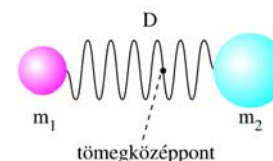
$$E_n = hf \left(n + \frac{1}{2}\right) \quad n = 0, 1, 2, \dots$$



Klasszikus fizikai rezgések és energianívók kapcsolata

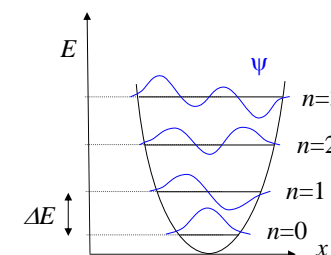
• Klasszikus kép

Energianívók



$$f = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{D}{m_{\text{redukált}}}}$$

rezonancia az f frekvenciájú fénnel



$$\Delta E = hf$$

u.a.!!!

A rezgési frekvencia függése a tömegtől és a kötéserősségtől

Tömeg ↓ kötéserősség →

Infravörös rezgési frekvenciák (cm⁻¹)				
B-H 2400	C-H 3000	N-H 3400	O-H 3600	F-H 4000
Al-H 1750	Si-H 2150	P-H 2350	S-H 2570	Cl-H 2890
	Ge-H 2070	As-H 2150	Se-H 2300	Br-H 2650

Víz (O-H): 3600 => nehézvíz: 2600 cm⁻¹

Kötéserősség:

C-N: 1100 cm⁻¹,
C=N: 1660 cm⁻¹,
C≡N: 2220 cm⁻¹.

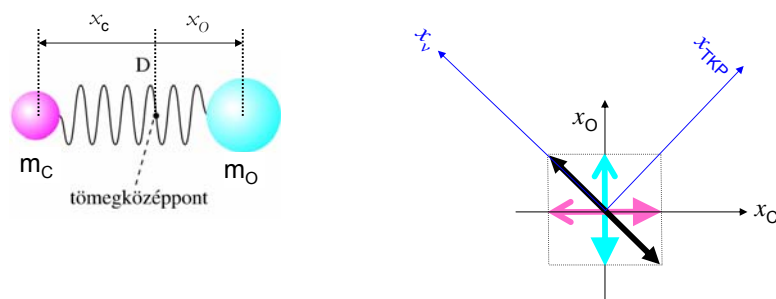
Sokatomos molekulák rezgései

N atomos molekula:

- 3N szabadsági fok, 3-3 a teljes molekula translációja ill. rotációja
- 3N-6 rezgési szabadsági fok (lineáris molekuláknál csak 3N-5)
- normálrezgések
- normálkoordináták

Normálkoordináták

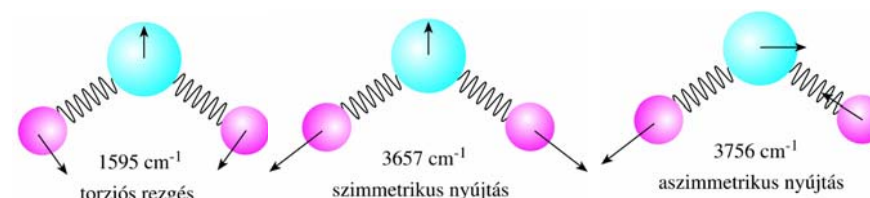
A kétatomos molekula példáján bemutatva:



Általános esetben 3N dimenziós koordináta-rendszer forgatása
Lineáris transzformáció (mátrixművelet)

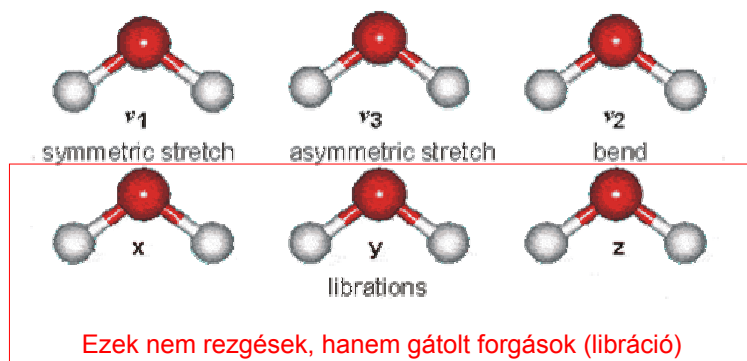
Normálrezgések

- Minden atom ugyanazzal a frekvenciával, fázissal, de különböző amplitúdóval és irányban rezeg.
- Pl. víz:

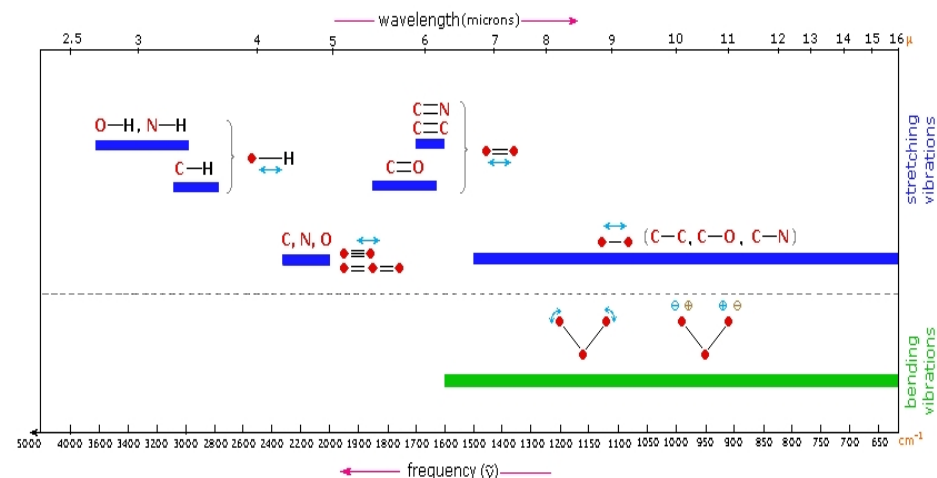


A normál módusok nem hatnak kölcsön egymással.

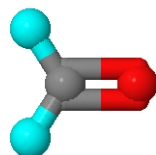
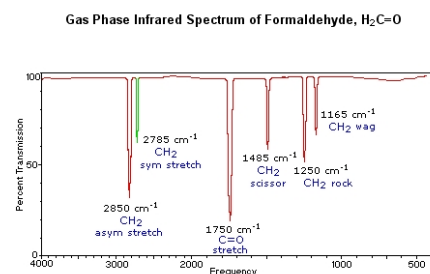
A víz normálrezgései



Néhány tipikus rezgési frekvencia



Példa: Formaldehid



- ☐ View CH₂ Asymmetric Stretch
- ☐ View CH₂ Symmetric Stretch
- ☐ View C=O Stretch
- ☐ View CH₂ Scissoring
- ☐ View CH₂ Rocking
- ☒ View CH₂ Wagging

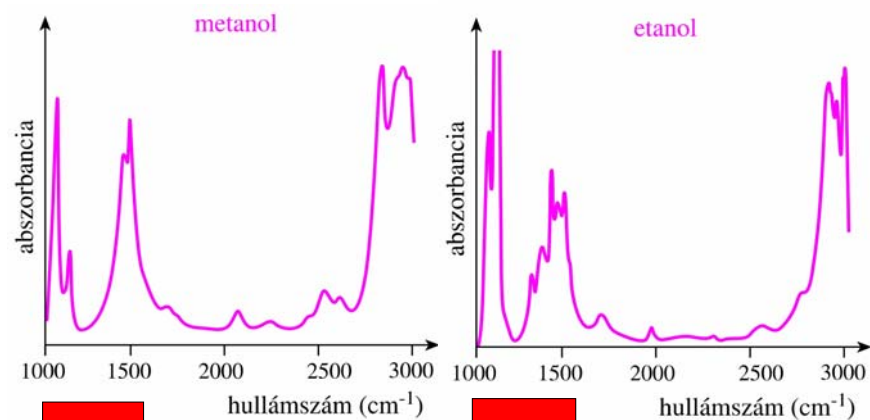
- ☐ Ball&Stick Model
- ☐ Spacefill Model
- ☐ Stick Model
- ☒ Motion Off

forrás: www.Spectroscopynow.com

Analitikai alkalmazások

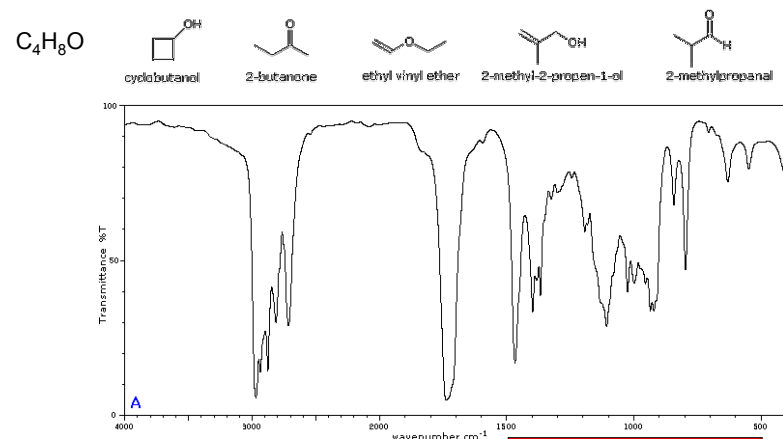
- szintézis: közti és végtermék azonosítás
- szerkezet bizonyítás
- metabolit kimutatás
- gyógyszerellenőrzés (tisztaság vizsgálat)
- Megj.: Lambert-Beer tv. itt is igaz, koncentráció meghatározás is lehetséges.

Molekula azonosítás



Fingerprint (ujlenyomat) tartomány

molekula azonosítás



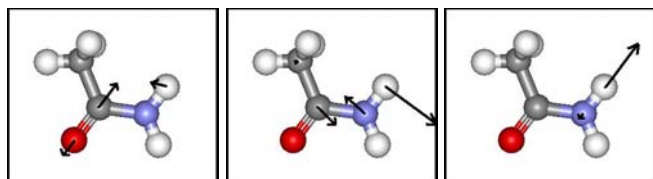
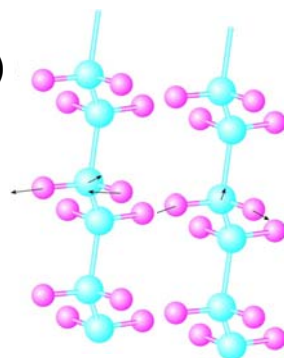
forrás: www.Spectroscopynow.com

Makromolekulák rezgései

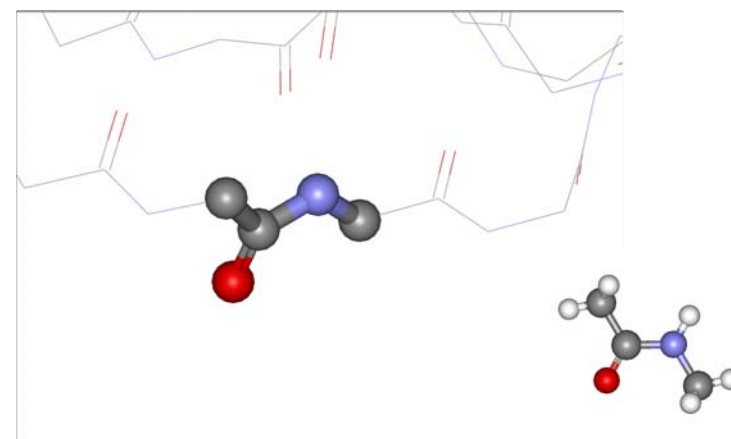
Globális rezgések (bonyolultak)

Lokalizált rezgések, pl:

- CH₂ rezgések a lipidekben
- amid rezgések a fehérjékben (acetamid rezgések)



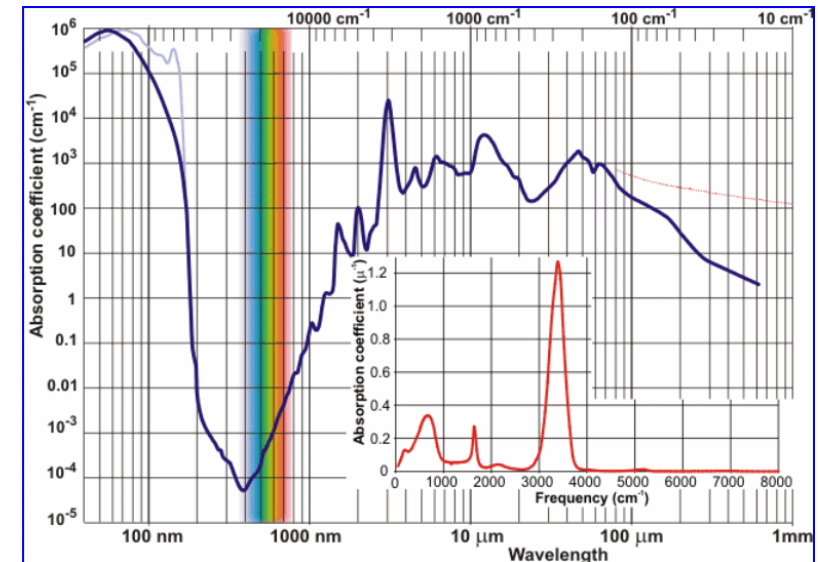
Az N-metilacetamid mint a fehérjelánc gerincének modellje



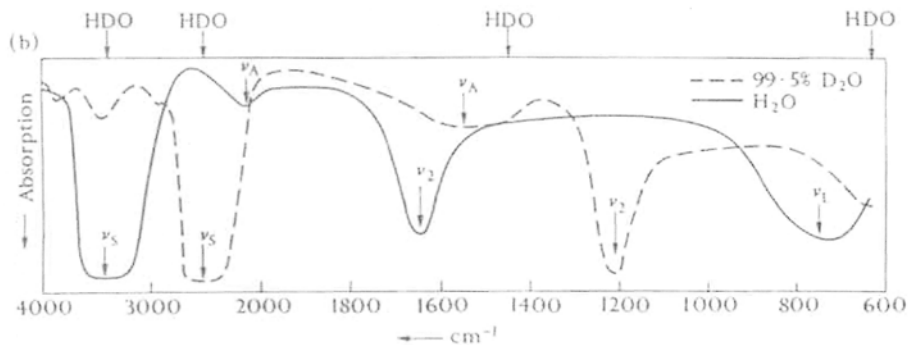
Fehérjék rezgési spektroszkópiája

- Gerinc: amid rezgések
 - konformáció (másodlagos szerkezet)
 - H/D csere, (harmadlagos szerkezet)
- Oldalláncok
 - kölcsönhatások más molekulákkal
 - pl Ca^{2+} kötés
- Fontos technikai megj.: nehézvíz (D_2O)

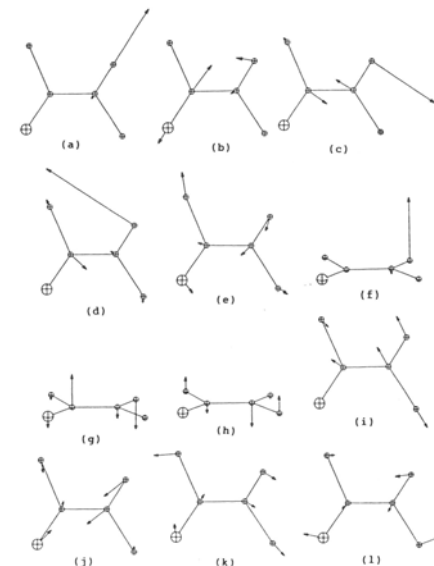
A víz abszorpciós spektruma



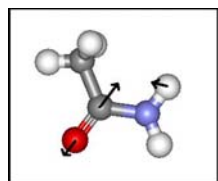
Víz és nehézvíz spektrumok



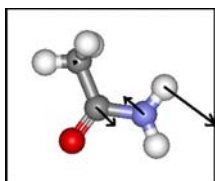
A fehérjék amid rezgései



A fehérjék amid rezgései

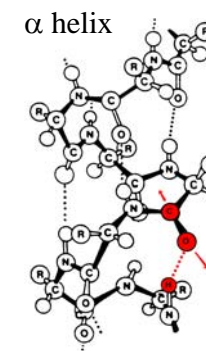
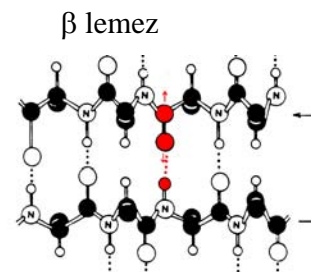
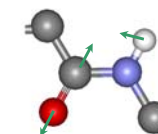


amid I
C=O rezgés
H-híd miatt
konformáció-
érzékeny

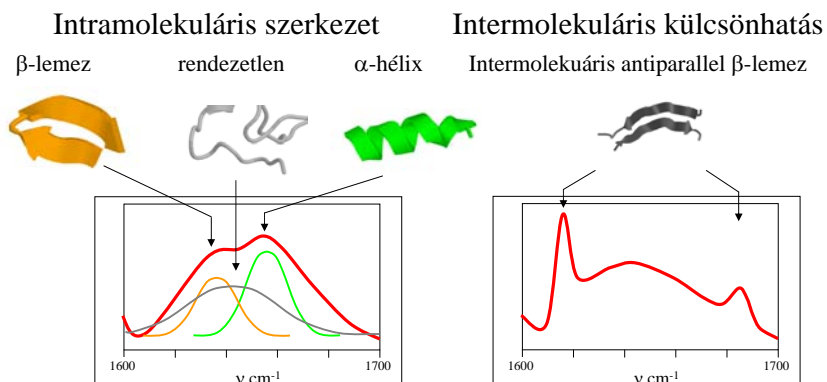


amid II
N-H nyújtási rezgés
H-D cserére érzékeny
Szerkezet kompaktsága
(harmadlagos szerk.)

Az amid I vibráció és a másodlagos szerkezet



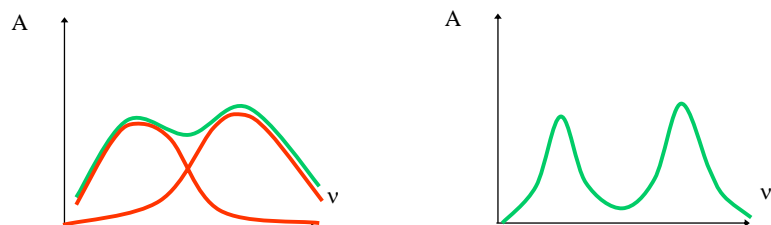
A másodlagos szerkezeti elemekhez tartozó jellegzetes amid I jel



Az amid I sáv komponenseinek hozzárendelése a másodlagos szerkezeti elemekhez (¹Byler és Susi (1986), ²Haris és Chapman, 1988, ³Ismail és mtsai, 1992 alapján)

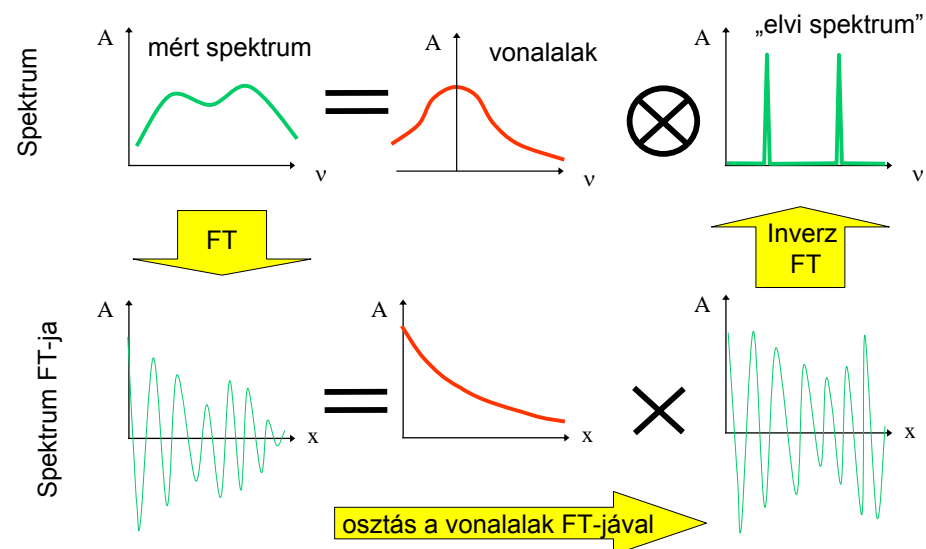
hullámszám [cm^{-1}]	másodlagos szerkezet
1616	intermolekuláris béta szerkezet ³
1624-1637	kinyújtott láncok (béta szerkezet) ¹
1645	rendezetlen ¹
1654	alfa hélix ¹
1662	3_{10} hélix ²
1663-1670	hajlatok, hurkok ¹
1675	kinyújtott láncok (béta szerkezet) ¹
1683-1694	hajlatok, hurkok ¹
1685	intermolekuláris béta szerkezet ³

Az amid I sáv átlapoló komponensek összege: dekonvolúció



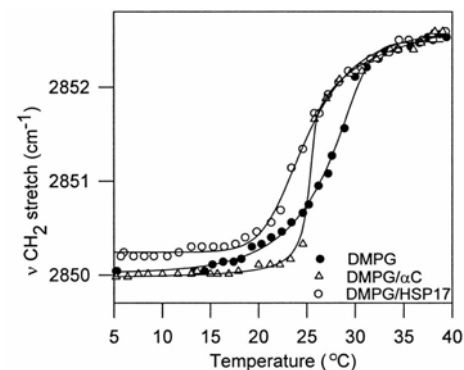
Fourier öndeconvolúció
Vonalak szétválasztása vonalkeskenyítéssel

Fourier öndeconvolúció elve



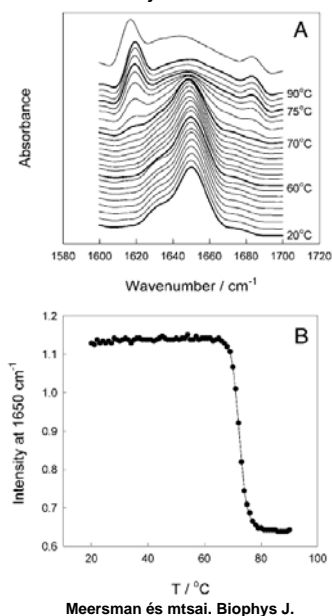
Alkalmazások

lipid fázisátalakulás



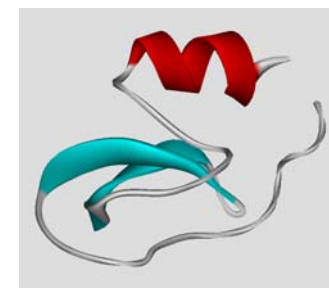
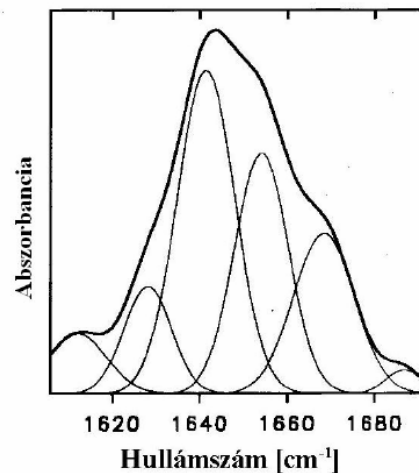
Tsvetkova és mtsai PNAS 2002 | vol. 99 | no. 21 | 13504-13509

fehérjedenaturáció

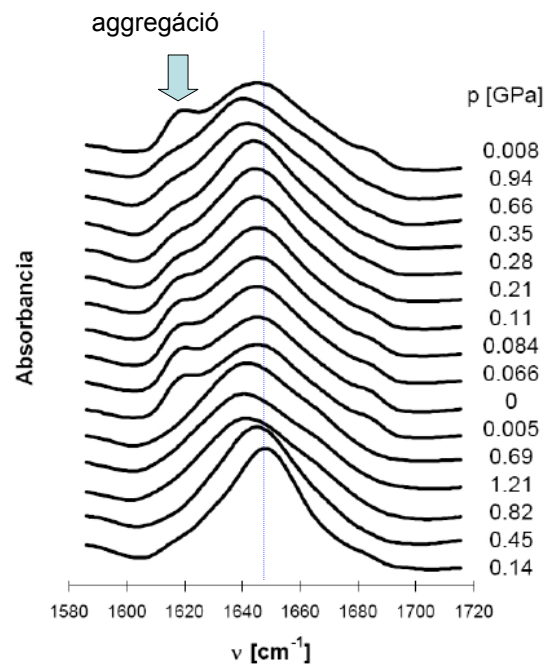


Meersman és mtsai. Biophys J.

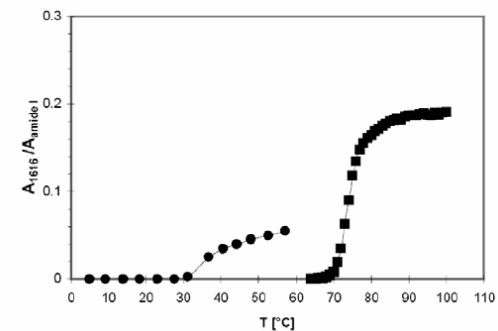
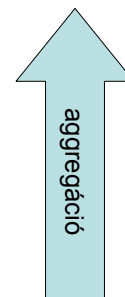
BPTI bovine pancreatic trypsin inhibitor



13. ábra. A BPTI atmoszferikus nyomáson mért spektrumának dekonvolvált amid I sávja az illesztett Gauss komponensekkel.

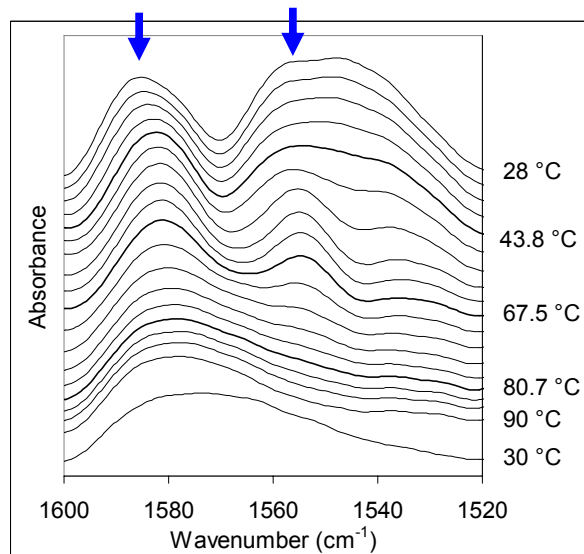


Mioglobin (Nyomásciklus)

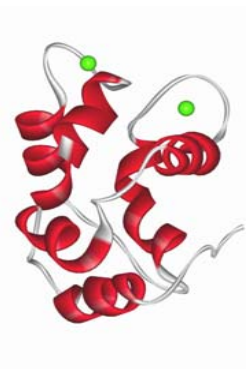


25. ábra. A mioglobin 1616 cm⁻¹-es sávjának relatív területe nyomásciklust követő (●) és a nyomáscikluson át nem esett (■) fehérje melegítése során.

Ca²⁺ kötés



Parvalbumin



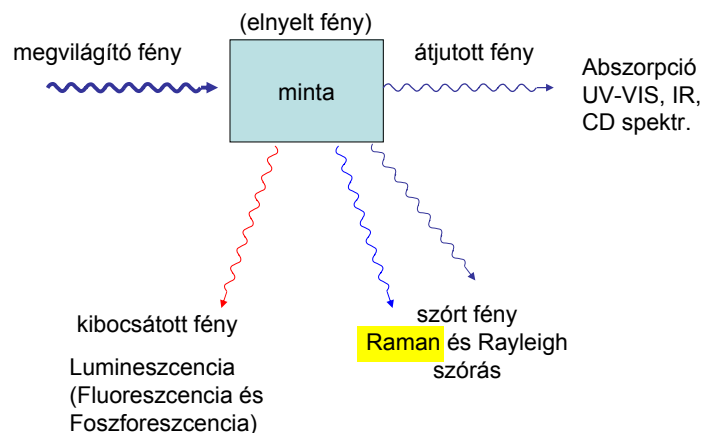
Raman szórás

Raman spektroszkópia

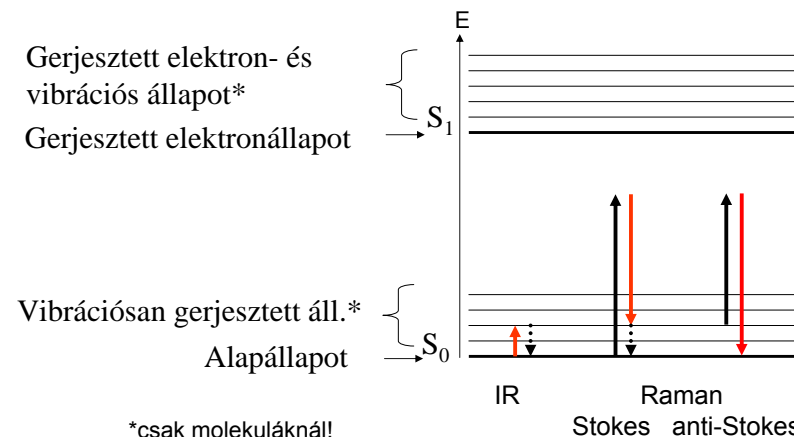
Sir Chandrasekhara Venkata Raman
Nobel Nobel-díj díj 1930



Mi történhet, ha egy mintát fénnyel világítunk meg?



Energiaátmenetek a vibrációs spektroszkópiában



Raman szórás: a klasszikus leírás

a beeső fény frekvenciája

A beeső fény elektromos térerőssége: $E = E_0 \sin 2\pi\nu_0 t$

A szóró molekula polarizálhatósága: $\alpha' = \alpha + A \sin 2\pi\nu_i t$

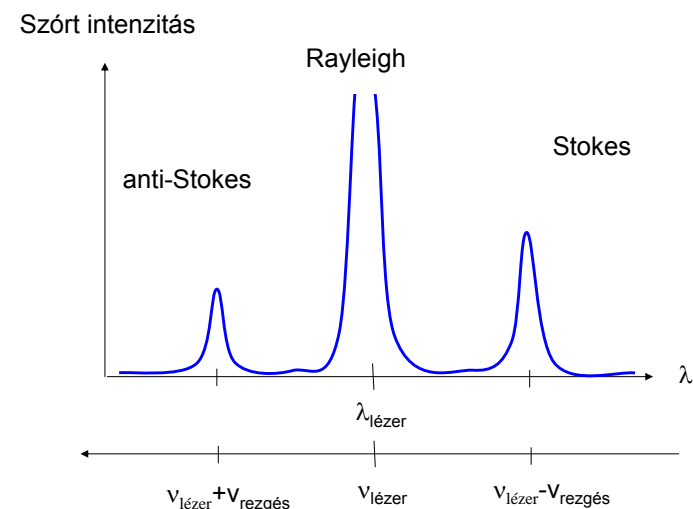
A rezgés frekvenciája

A polarizálhatóság változik a rezgés során!

A polarizáció során előálló dipól:

$$\mu_i = \alpha' E = E_0 (\alpha + A \sin 2\pi\nu_i t) \sin 2\pi\nu_0 t =$$

$$= \alpha E_0 \sin 2\pi\nu_0 t + \frac{1}{2} A E_0 \cos 2\pi(\nu_0 + \nu_i) t + \frac{1}{2} A E_0 \cos 2\pi(\nu_0 - \nu_i) t$$



Raman és infravörös

Raman

infravörös

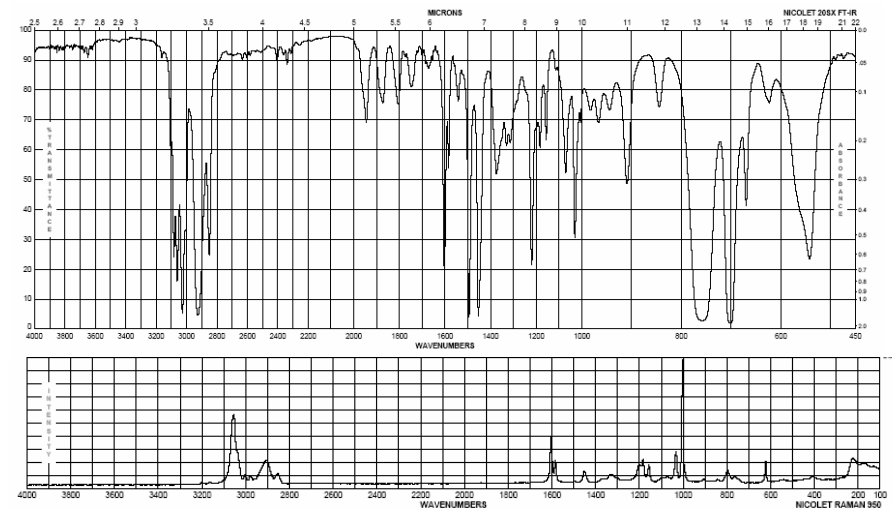
Fényszórás

abszorpció

A molekula rezgése során változik a molekula polarizálhatósága

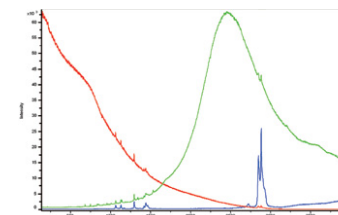
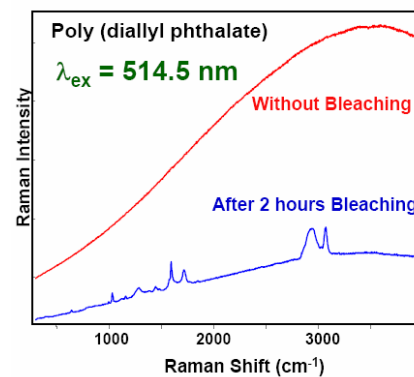
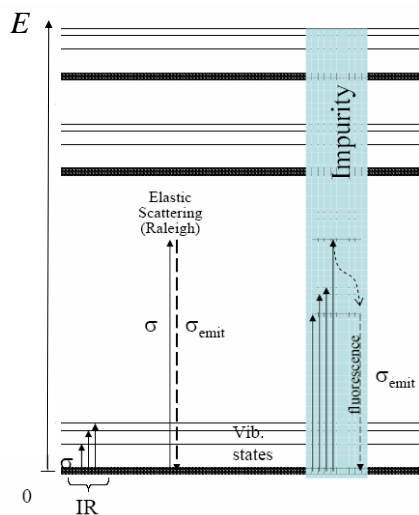
dipólusmomentuma

Raman és infravörös



forrás: <http://www.sigmaaldrich.com>

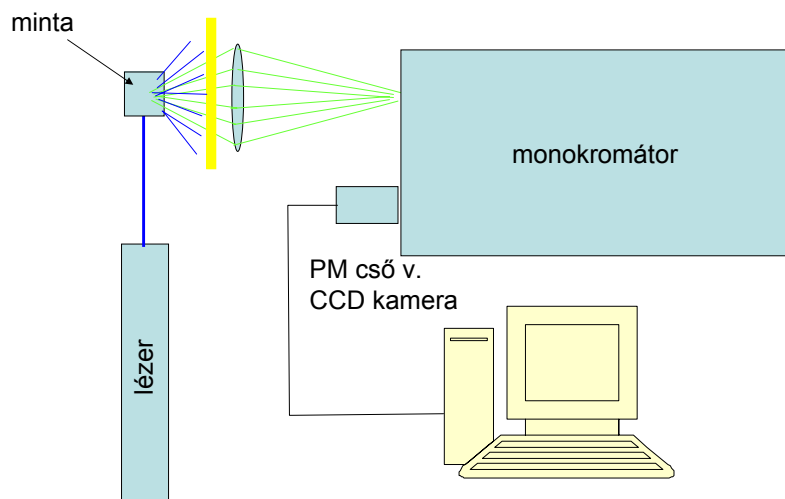
Zavaró tényező: fluoreszcencia



gerjesztés:

zöld
piros
infravörös lézerrel

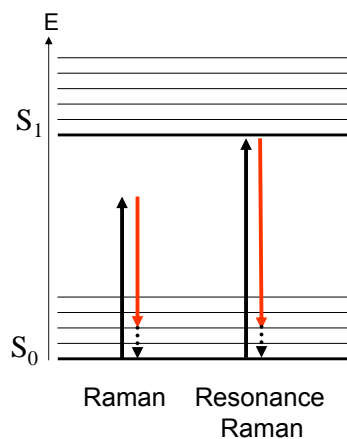
Mérési összeállítás



Speciális technikák

Resonance Raman
Surface Enhanced Raman
Tip-Enhanced Raman
Raman Microscopy
Confocal Raman Microscopy

Resonance Raman

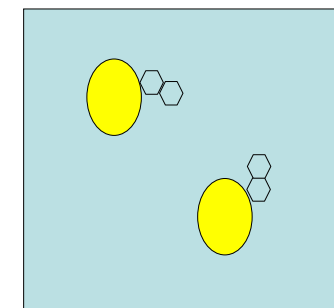
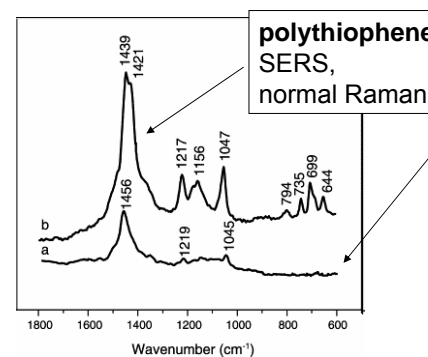


Ha a virtuális nívó megközelít egy valódi elektrongerjesztési nívót az intenzitás megsokszorozódik.

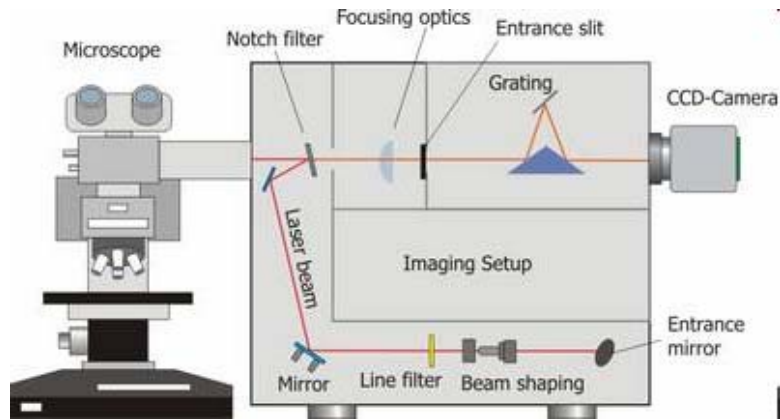
10^3 - 10^5

Surface Enhanced Raman

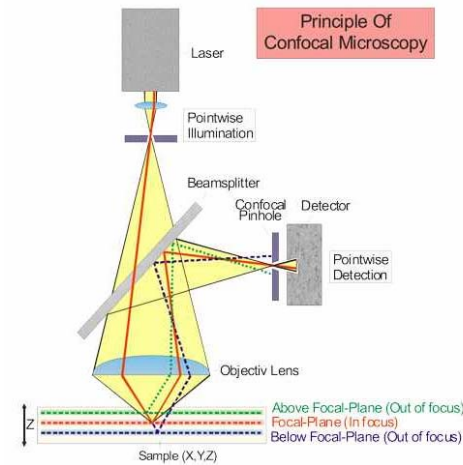
Fém (Ag, Au) koloidokban fellépő felületi plazmonok erősítik a beeső fény elektromos terét



Raman mikroszkóp

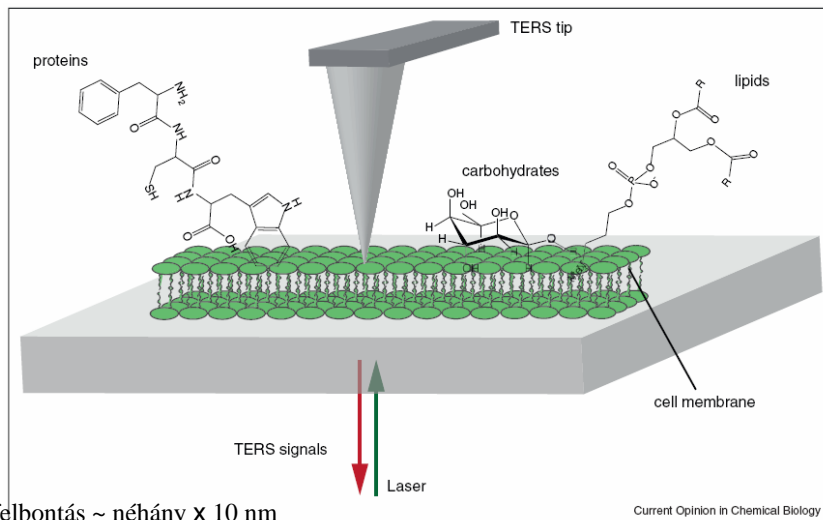


A konfokális elv



Előny: nagyobb térbeli felbontás, fluoreszcencia elnyomás

Tip-Enhanced Raman



Irodalom: források, ill. további olvasnivaló

- http://en.wikipedia.org/wiki/Discrete-time_Fourier_transform
- <http://www.cv.nrao.edu/course/ast534/FourierTransforms.html>
- <https://ccrma.stanford.edu/~jos/mdft/mdft.html>
- Raman Spectroscopy: Introductory Tutorial by: Daniel T. Schwartz Department of Chemical Engineering University of Washington
- Nanoscale structural analysis using tip-enhanced Raman spectroscopy by: Tanja Deckert-Gaudig and Volker Deckert, Current Opinion in Chemical Biology 2011, 15:719–724
- www.horiba.com/scientific/products/raman-spectroscopy/tutorial-faqs/raman-tutorial/
- www.spectroscopynow.com
- Bandekar BBA 1120 (1992) 123
- <http://www.lsbu.ac.uk/water/vibrat.html>
- D. Eisenberg and W. Kauzmann, The structure and properties of water (Oxford University Press, London, 1969)
- Byler & Susi (Biopolymers 1986 Mar;25(3):469-87)
- F. Meersmann, L. Smeller, K. Heremans (2002) A comparative study of cold-, pressure- and heat-induced unfolding and aggregation of myoglobin Biophys. J. 82 2635-2644.
- L. Smeller, P. Rubens, K. Heremans (1999) Pressure effect on the temperature induced unfolding and tendency to aggregate of myoglobin Biochemistry 38 3816-3820.
- L. Smeller (2002) Pressure-temperature phase diagram of biomolecules Biophys. Biochim. Acta 1595 11-29.
- <http://www.sigmaaldrich.com> (sok anyafról található IR vagy Raman spektrum itt)
- Szöllősi, Fidy: Orvosi Biofizika