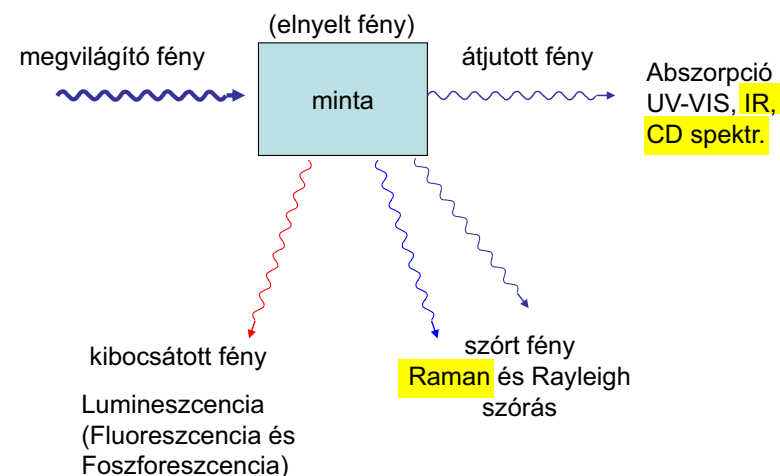


Makromolekulák szerkezetvizsgálati módszerei: IR, CD

Smeller László

2017

Mi történhet, ha egy mintát fénnel világítunk meg?

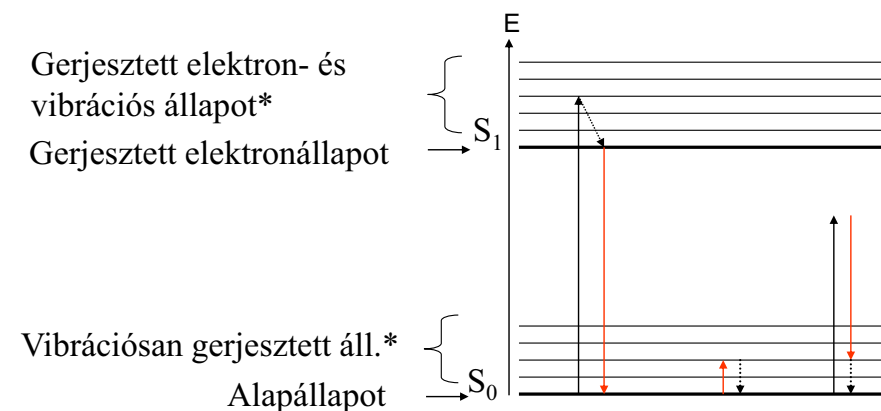


Abszorpciós és emissziós spektroszkópia

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

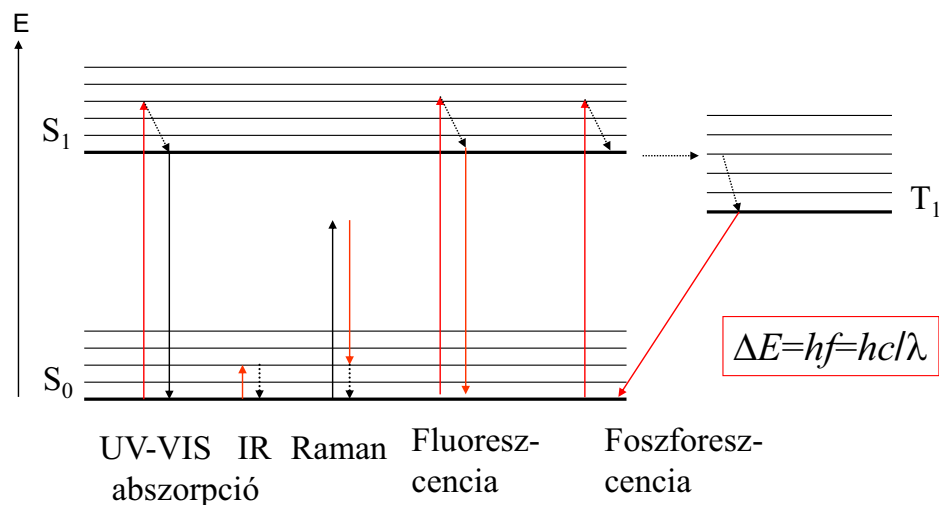
Miért nyel el ill. bocsát ki fényt egy atom v. molekula?

- Energiaátmenet: ld. Jablonski diagram

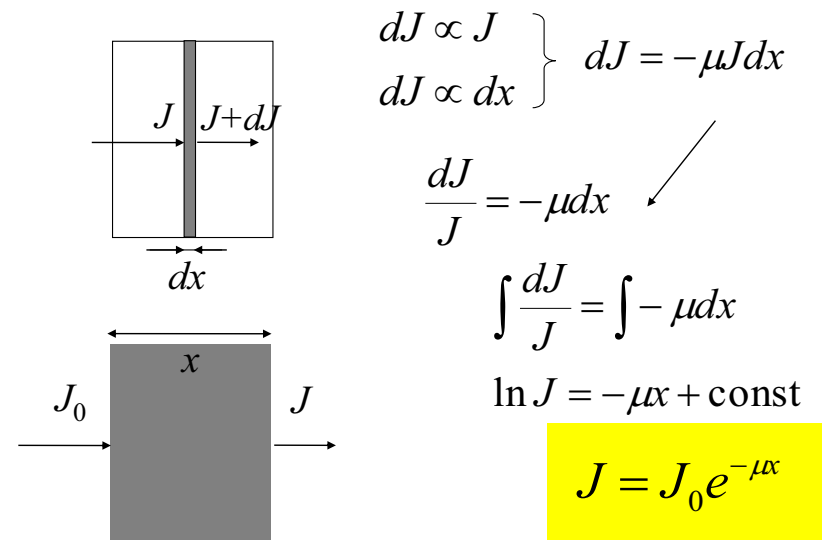


*csak molekuláknál!

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.

UV-VIS abszorpciós spektroszkópia

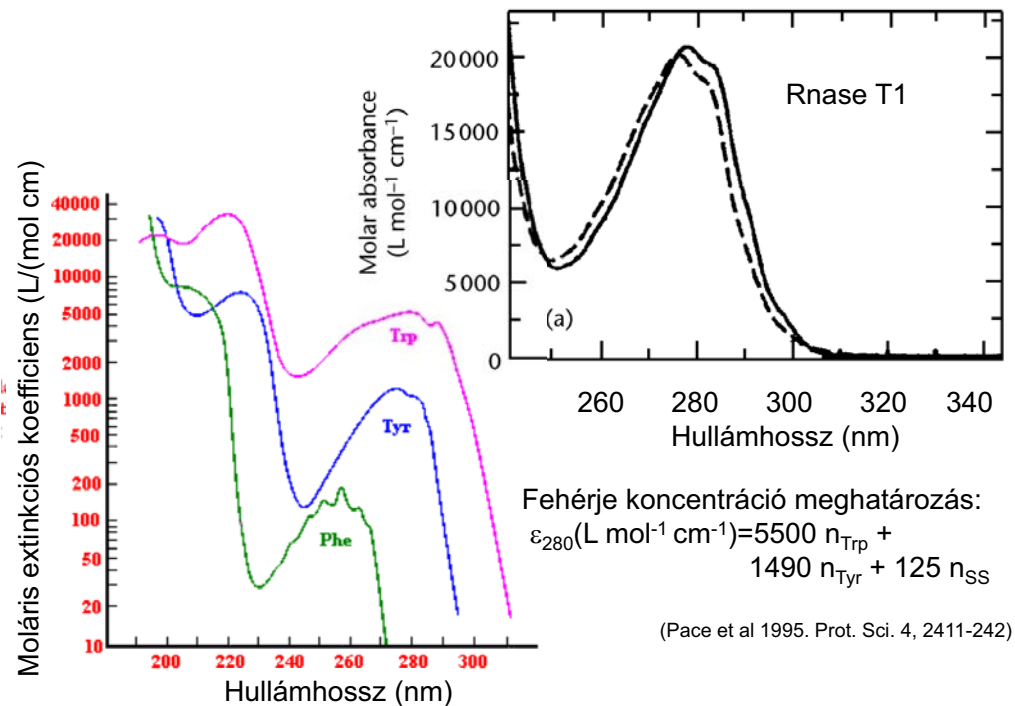
Mi abszorbeál a fehérjékben?

Molekularész	$\lambda_{\max}(\text{nm})$	$\varepsilon(\text{L/cm mol})$
Trp	280	5600
Tyr	274	1400
Phe	257	200
Diszulfid híd	250-270	300
Peptidkötés	190-230	

Fehérje koncentráció meghatározás:

$$\varepsilon_{280}(\text{L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}) = 5500 n_{\text{Trp}} + 1490 n_{\text{Tyr}} + 125 n_{\text{SS}}$$

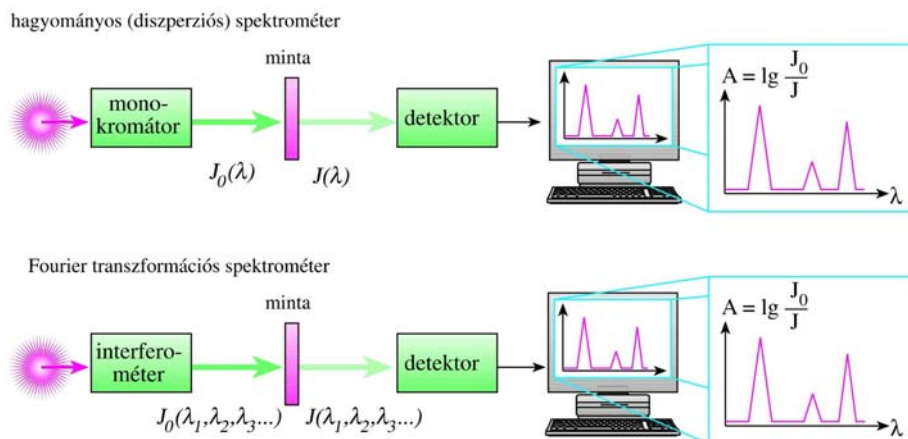
(Pace et al 1995. Prot. Sci. 4, 2411-242)



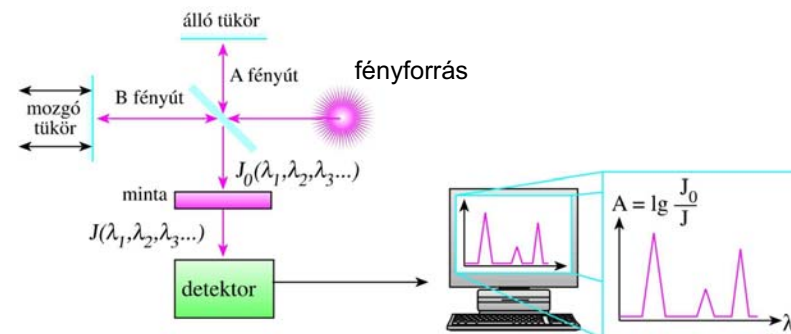
Infravörös spektroszkópia

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

Az infravörös spektrum mérése: Fourier transzformációs spektrométer

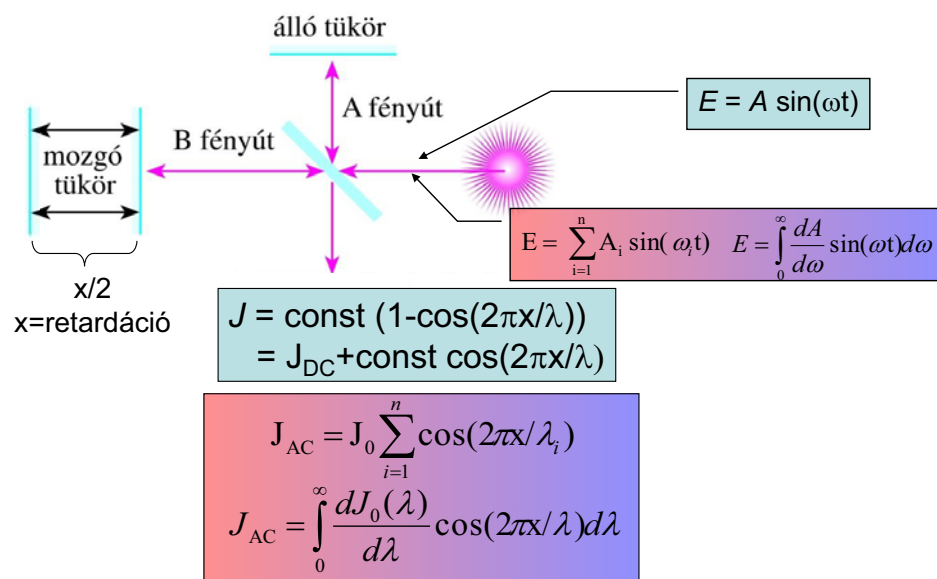


tk 6.17 ábra



tk 6.18 ábra

FTIR elve részletesen



Fourier transzformáció

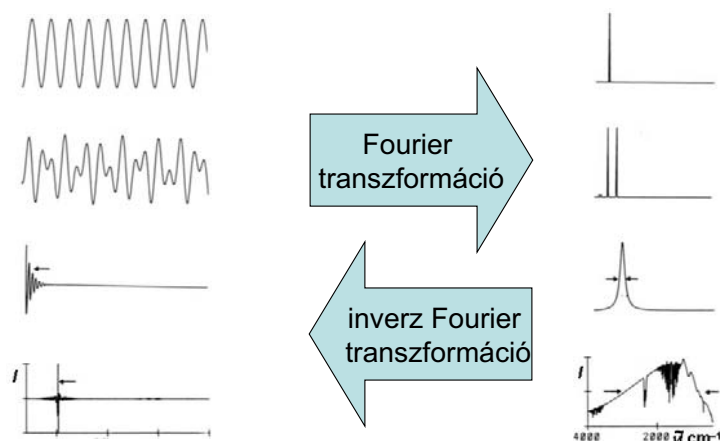
Egy $f(t)$ függvény Fourier transzformáltja a $g(x)$ függvény:

$$F(f(t)) = \int_{-\infty}^{\infty} f(t) e^{-2\pi i \nu t} dt = g(\nu)$$

A Fourier transzformáció inverze:

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

A Fourier transzformáció szemléltetése



A spektrum számolása a Fourier transzformációs spektrométerben

Az interferométeren keresztüljutott sugárzás:

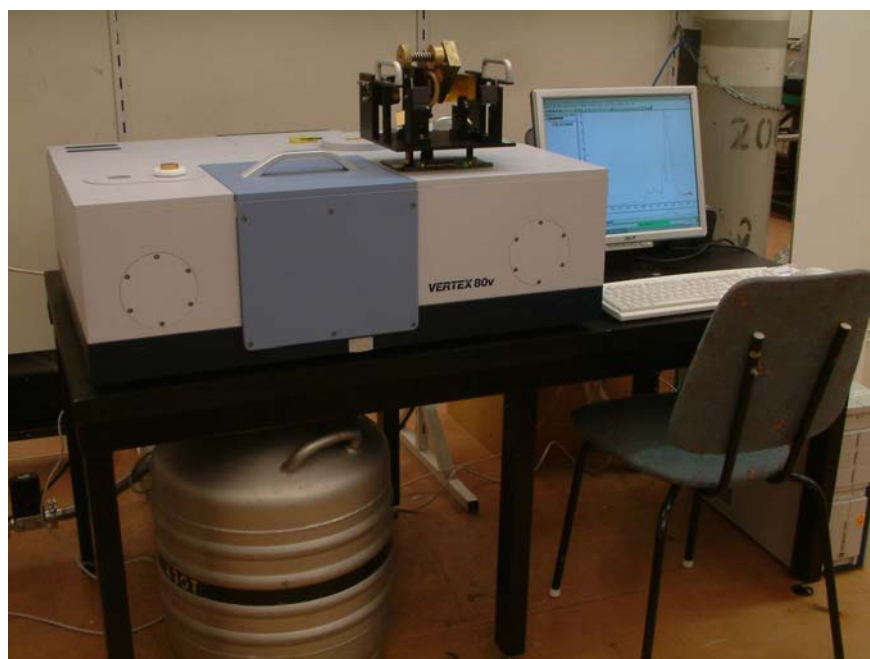
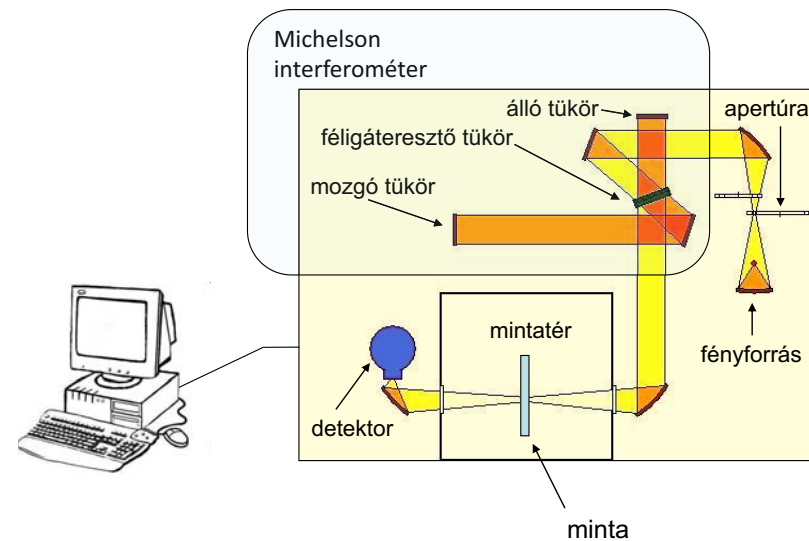
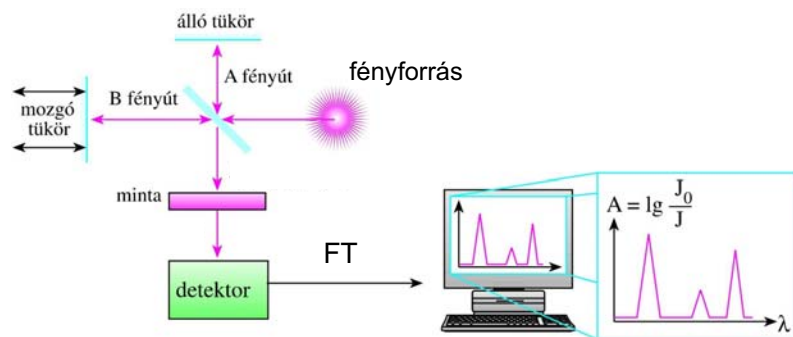
$$J_{\text{AC}} = \int_0^{\infty} \frac{dJ_0(\lambda)}{d\lambda} \cos(2\pi x / \lambda) d\lambda$$

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)

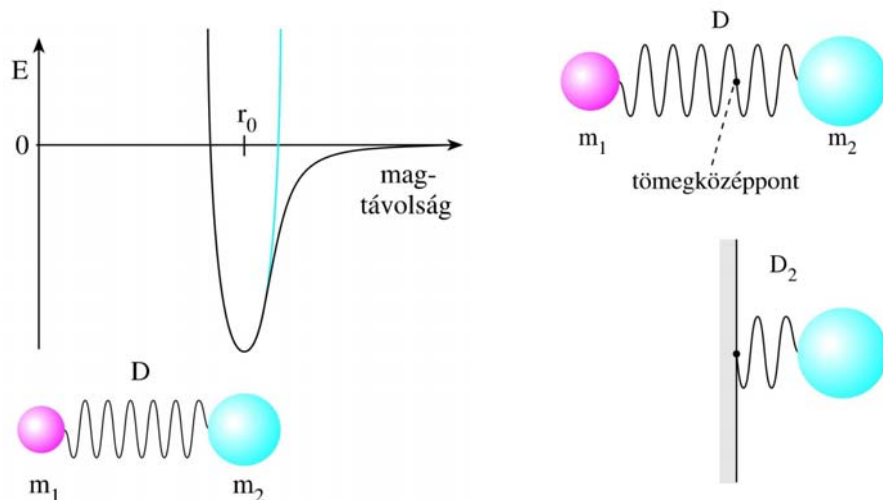


Molekularezgések

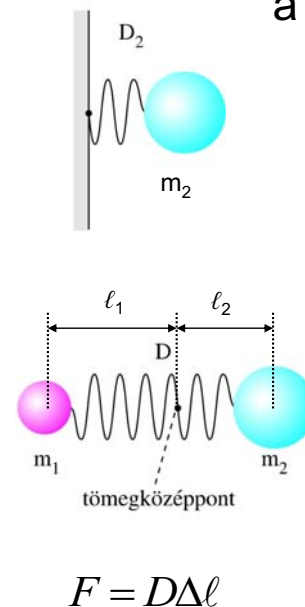
Az elektronok könnyűek, gyorsan követik az atommag mozgását, ezért az atommagok rezgéseit az elektronok nem befolyásolják.

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

Molekularezgések: kétatomos molekula



a középiskolából ismert:



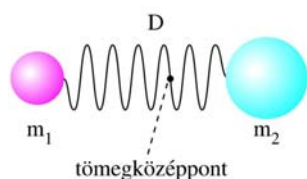
$$f = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{D_2}{m_2}}$$

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

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

$$F = D\Delta \ell$$

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: $\nu = 2143 \text{ cm}^{-1}$

$$\Rightarrow \lambda = 4,67 \mu\text{m} \Rightarrow f = 6,43 \cdot 10^{13} \text{ Hz} \left. \begin{array}{l} m_C = 2 \cdot 10^{-26} \text{ kg}, m_O = 2,7 \cdot 10^{-26} \text{ kg} \end{array} \right\} \Rightarrow D = 1875 \text{ N/m}$$

Ha ν ismert, D számolható
ha D ismert, ν számolható

Kvantummechanikai leírás

Kvantummechanikai oszcillátor:

Tömegpont parabolikus erőterben.

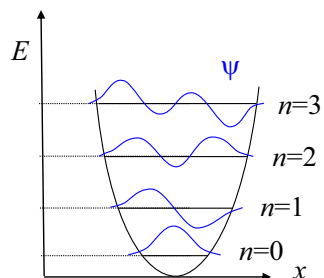
Hamilton operátor:

$$H = T + V$$

Schrödinger egyenlet:

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

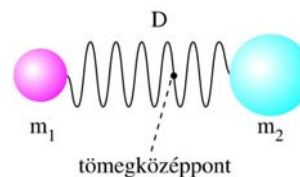
$$E_n = hf(n + \frac{1}{2}) \quad n = 0, 1, 2, \dots$$



Klasszikus fizikai rezgések és energianívók kapcsolata

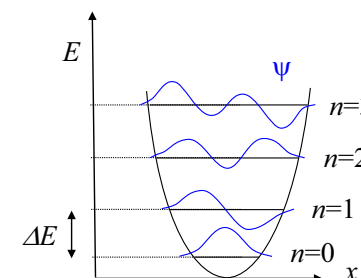
• Klasszikus kép

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: ↓

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.

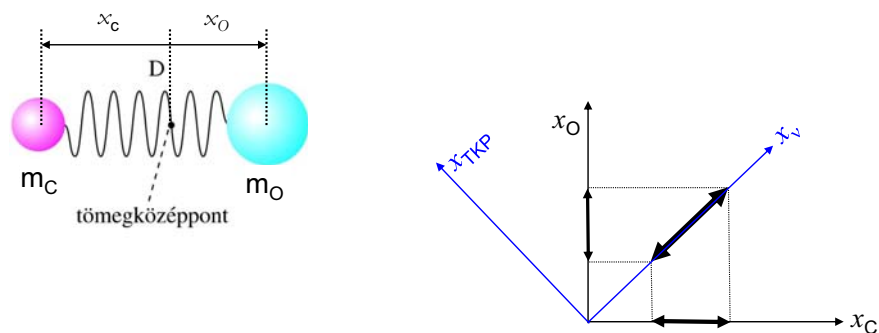
Sokatomos molekulák rezgései

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

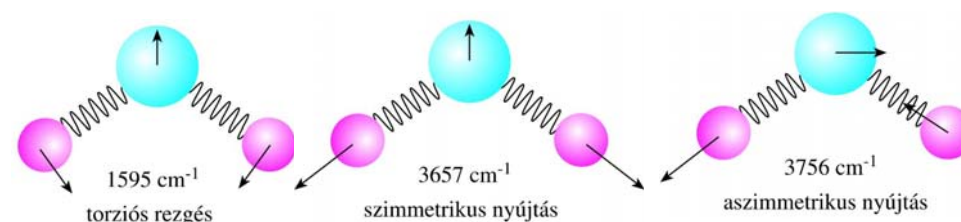
A kétatomos molekula példáján bemutatva:



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

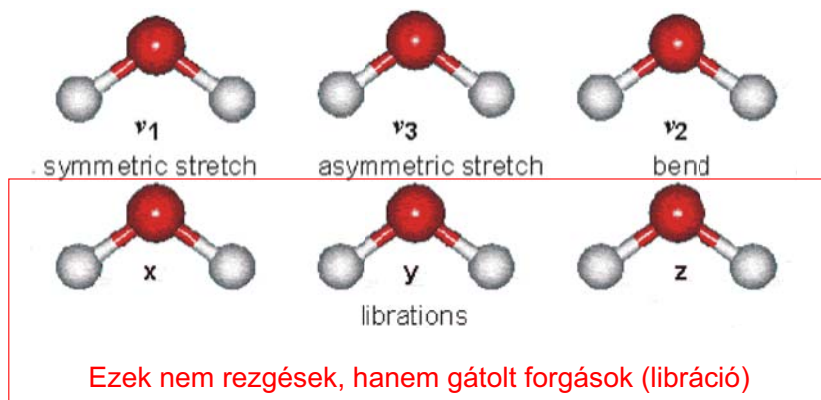
Normálrezgések

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

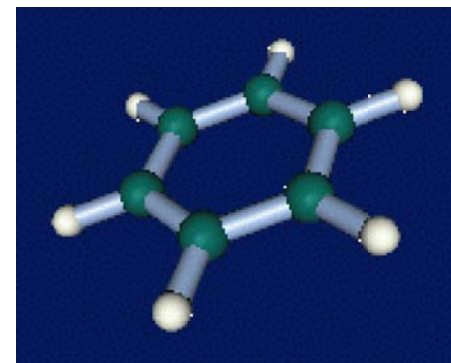


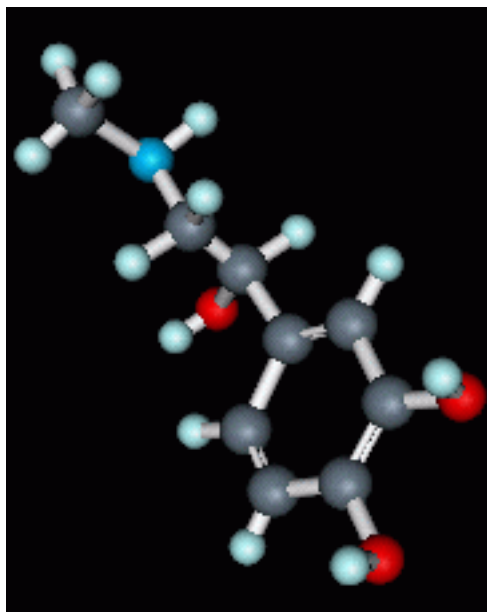
A normál módusok nem hatnak kölcsön egymással.

A víz normálrezgései

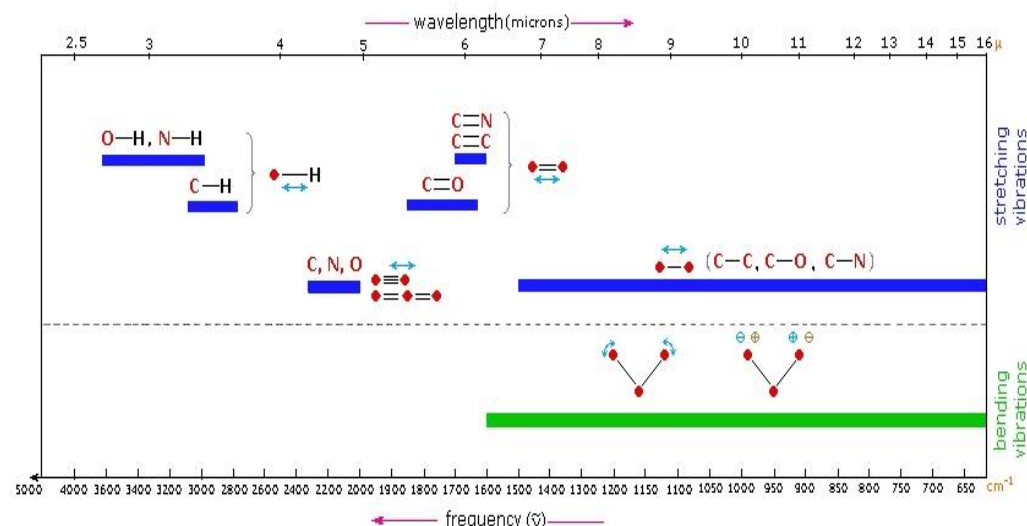


Benzol



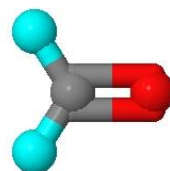
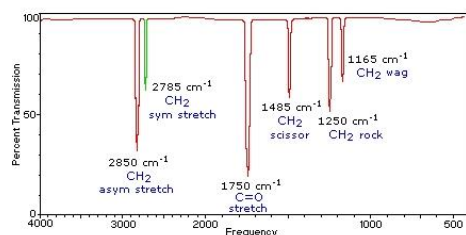


Néhány tipikus rezgési frekvencia



Példa: Formaldehid

Gas Phase Infrared Spectrum of Formaldehyde, $\text{H}_2\text{C=O}$



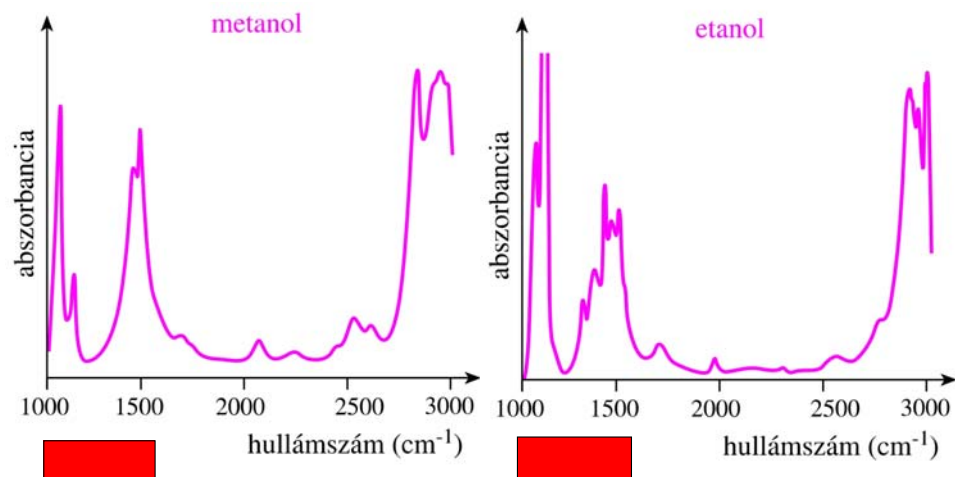
- ☐ View CH₂ Asymmetric Stretch
- ☐ View CH₂ Symmetric Stretch
- ☐ View C=O Stretch
- ☐ View CH₂ Scissoring
- ☐ View CH₂ Rocking
- ☐ View CH₂ Wagging

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

Analitikai alkalmazások

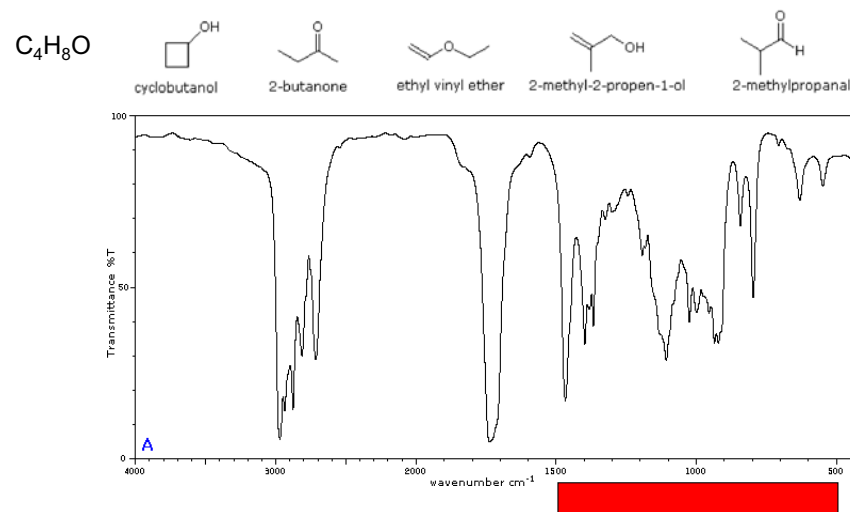
- szintézis: közti és végtermék azonosítás
 - szerkezet bizonyítás
 - metabolit kimutatás
 - gyógyszerellenőrzés (tisztaság vizsgálat)
-
- Megj.: Lambert-Beer tv. itt is igaz, koncentráció meghatározás is lehetséges.

Molekula azonosítás



Fingerprint (ujjlenyomat) tartomány

molekula azonosítás



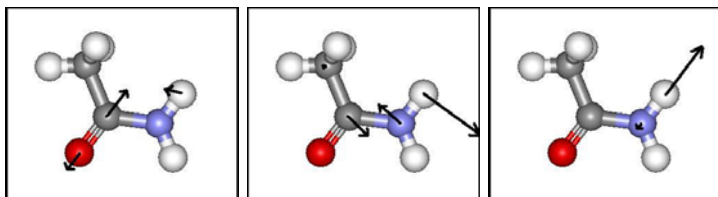
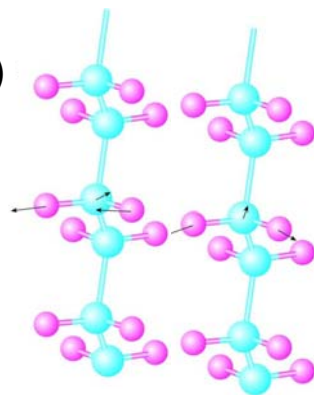
forrás: <http://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/VirtTxtJml/Spectrpy/InfraRed/infrared.htm>

Makromolekulák rezgései

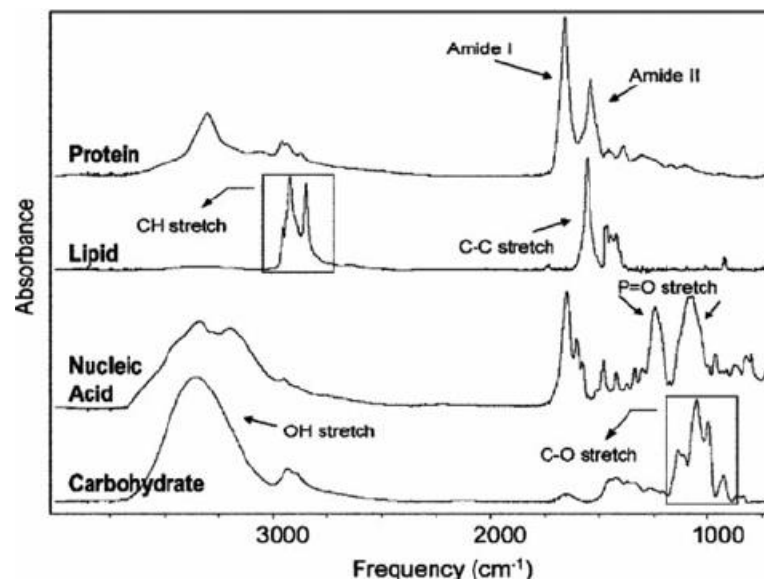
Globális rezgések (bonyolultak)

Lokalizált rezgések, pl:

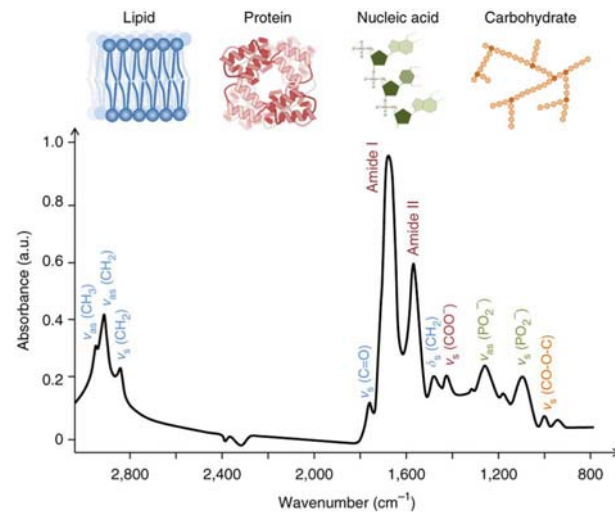
- CH₂ rezgések a lipidekben
- amid rezgések a fehérjékben (acetamid rezgések)



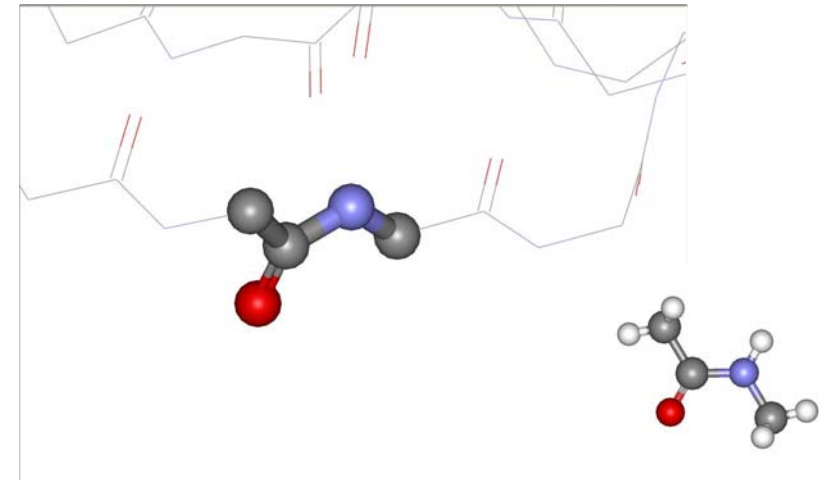
A biológiai makromolekulák tipikus infravörös spektrumai



A sejt infravörös spektruma



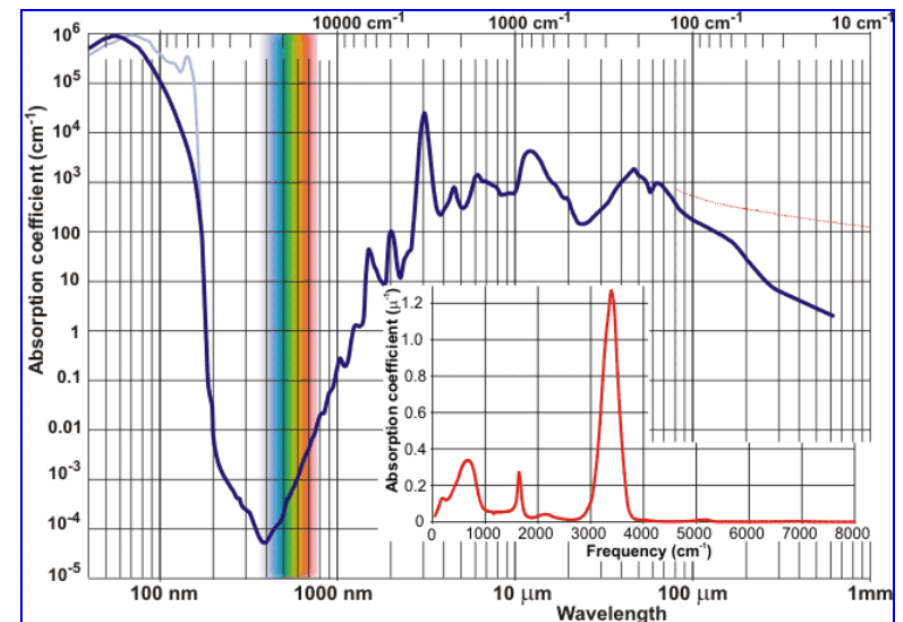
Fehérjék: Az N-metilacetamid mint a fehérjelánc gerincének modellje



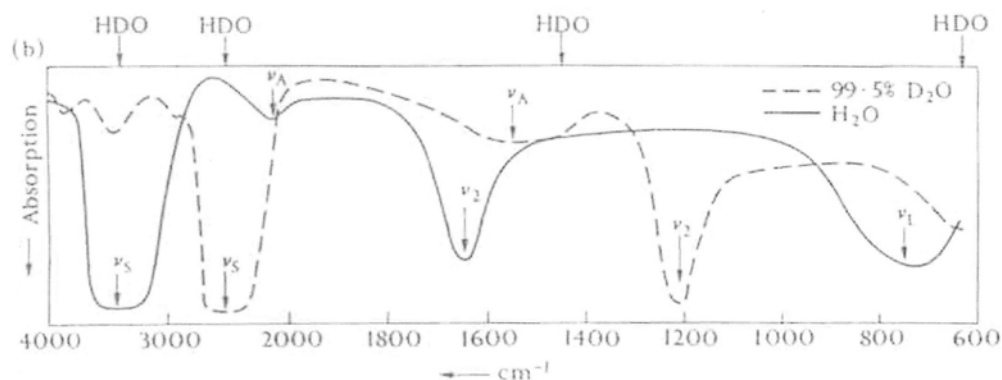
Fehérjék rezgési spektroszkópiája

- Gerinc: amid rezgések
 - konformáció (másodlagos szerkezet)
 - H/D csere, (harmadlagos szerkezet)
- Oldalláncok
 - kölcsönhatások más molekulákkal
 - pl Ca²⁺ kötés
- Fontos technikai megj.: nehézvíz (D₂O)

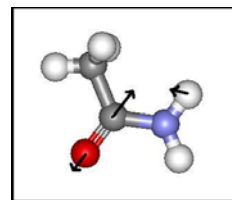
A víz abszorpciós spektruma



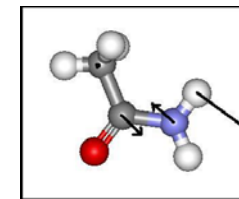
Víz és nehézvíz spektrumok



A fehérjék amid rezgései

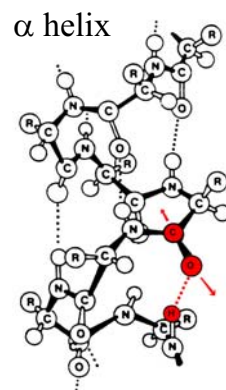
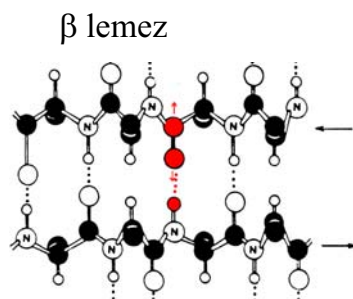
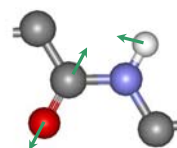


amid I
C=O rezgés
H-híd miatt
konformáció-
érzékeny



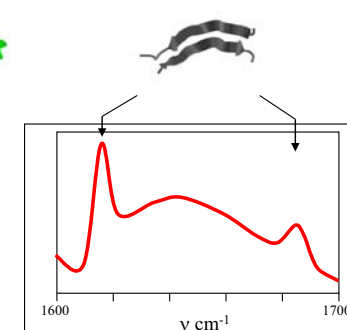
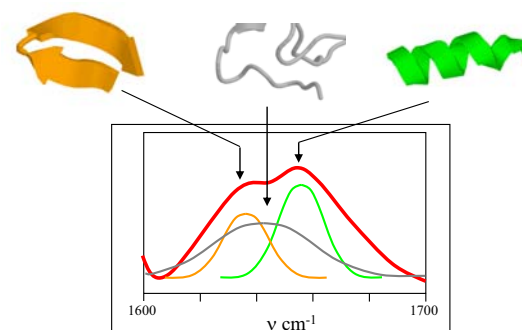
amid II
N-H deformációs rezgés
(síkbeli hajlítás)
H-D cserére érzékeny
Szerkezet kompaktsága
(harmadlagos szerk.)

Az amid I vibráció és a másodlagos szerkezet



A másodlagos szerkezeti elemekhez tartozó jellegzetes amid I jel

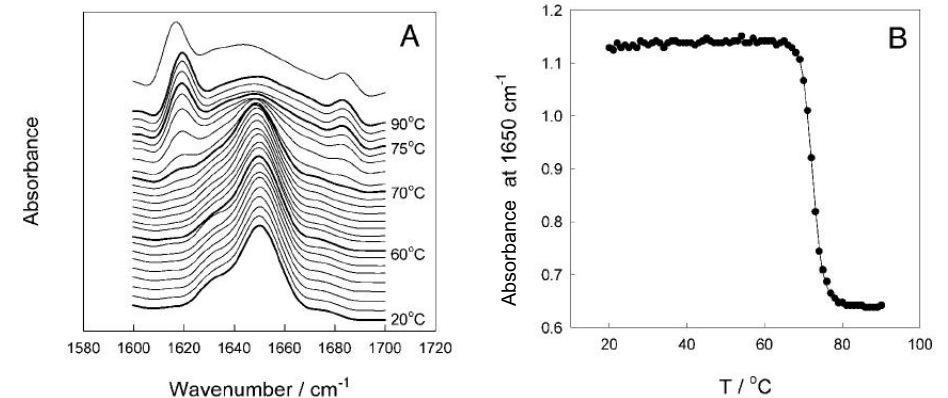
Intramolekuláris szerkezet Intermolekuláris kölcsönhatás
β-lemez rendezetlen α-hélix Intermolekuláris antiparallel β-lemez



Alkalmazások: Fehérjedenaturáció

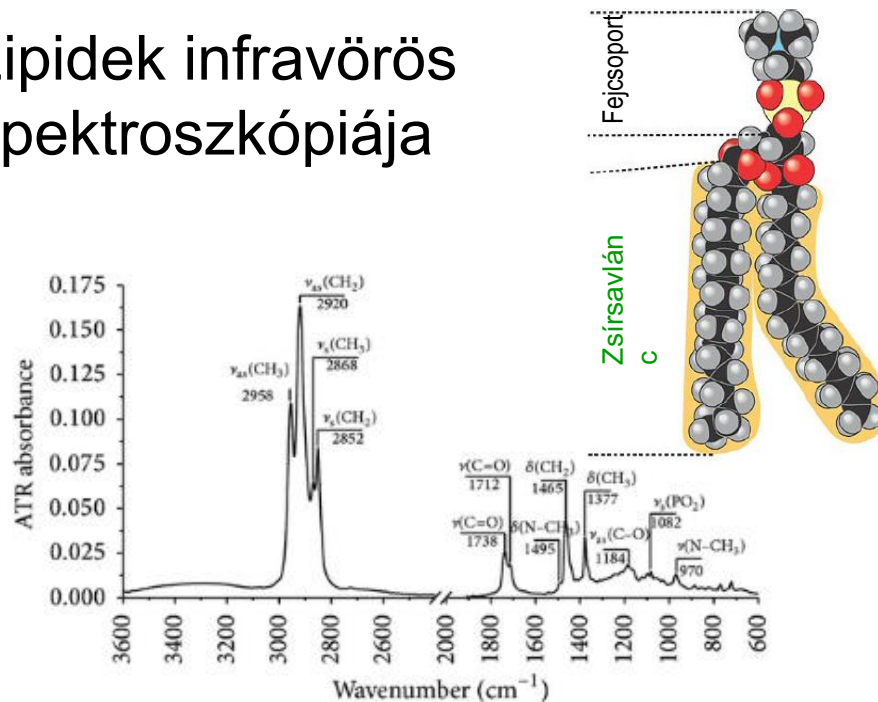
Az amid I sáv komponenseinek hozzárendelése a másodlagos szerkezeti elemekhez (¹Byler és Susi (1986), ² Haris és Chapman, 1988, ³ Ismail és mtsai, 1992 alapján)

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

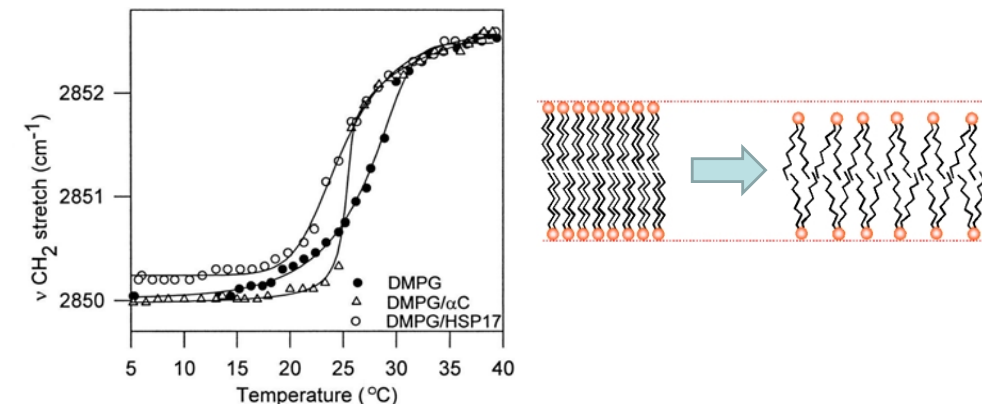


Meersman és mtsai. Biophys J.

Lipidek infravörös spektroszkópiája

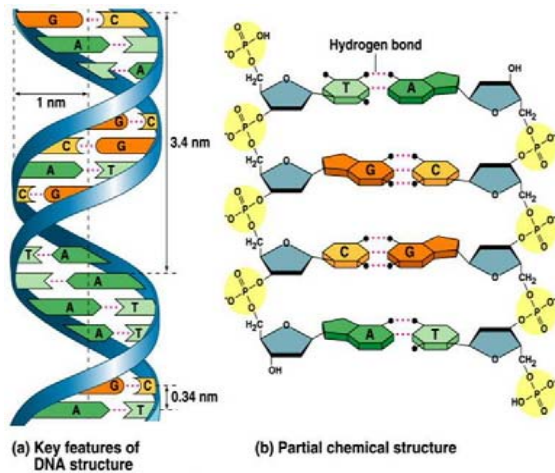


Alkalmazások: lipid fázisátalakulás



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

Nukleinsavak



Bázisok (H hid)
Foszfát csop. (PO_2^-)
Cukor

DNS

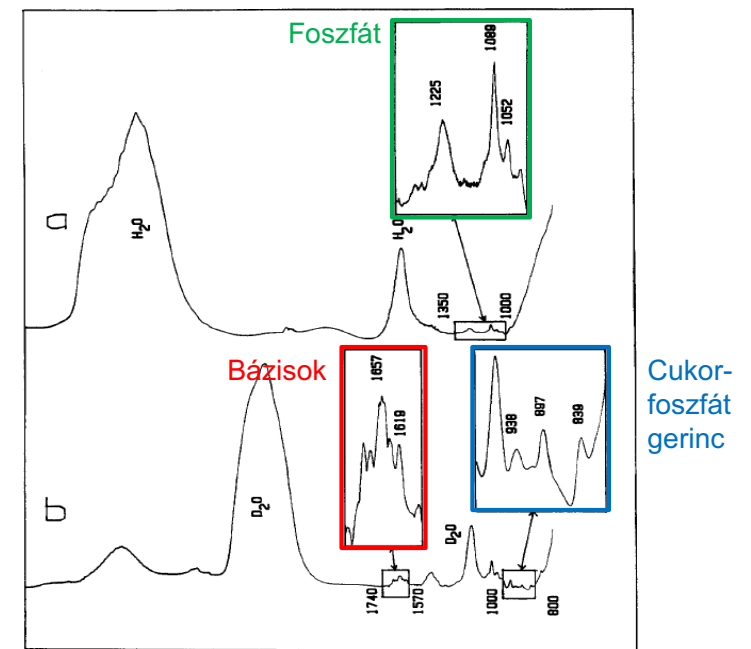


FIG. 1. FT-IR spectra of DNA in solution. (a) H_2O solution; (b) D_2O solution. Enlarged parts of the spectra present the absorptions involving mainly the vibrations of the phosphate groups (top), the double bonds of the bases in their plane (bottom left), and the sugar-phosphate backbone (bottom right).

DNA, RNA A és B szerkezetek

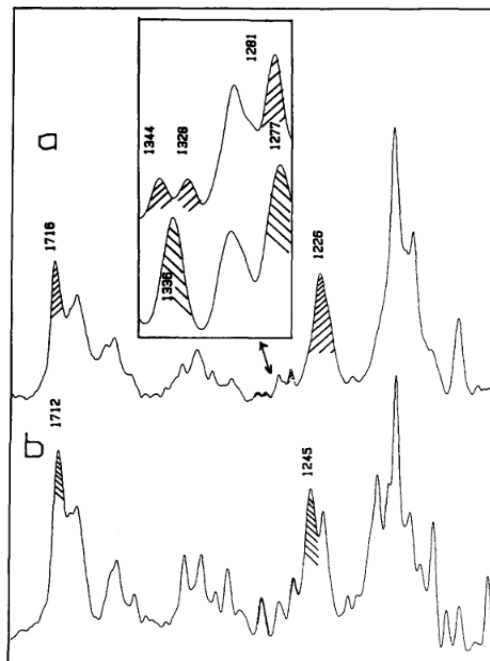
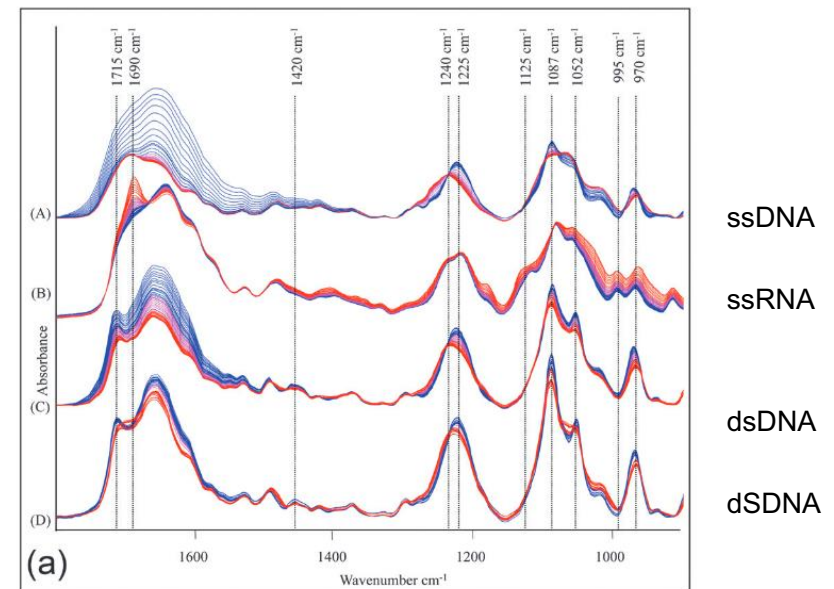
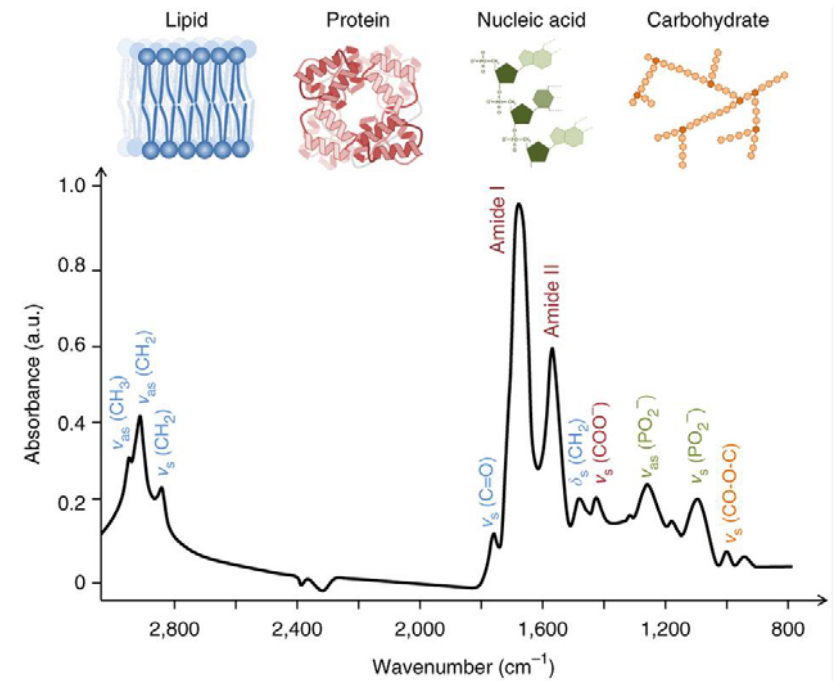


FIG. 3. FT-IR spectra of H_2O solutions of d(A-U)_4 (a) and r(A-U)_4 (b). The enlarged area between 1350 and 1270 cm^{-1} shows absorptions characteristic of A (~~~~~) and B (////) geometries.

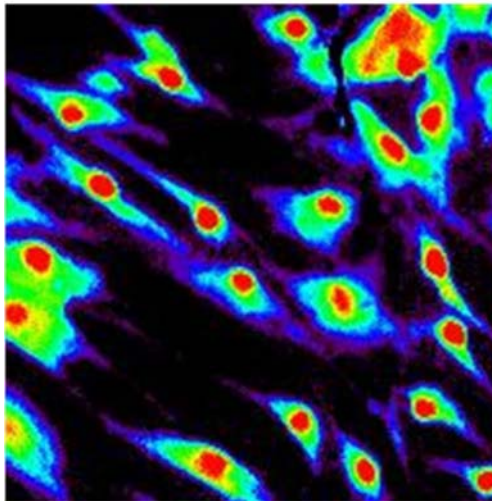
Nukleinsavak:



Speciális IR módszerek: IR Mikroszkóp



Nature Protocols 9, 1771–1791 (2014) | doi:10.1038/nprot.2014.110

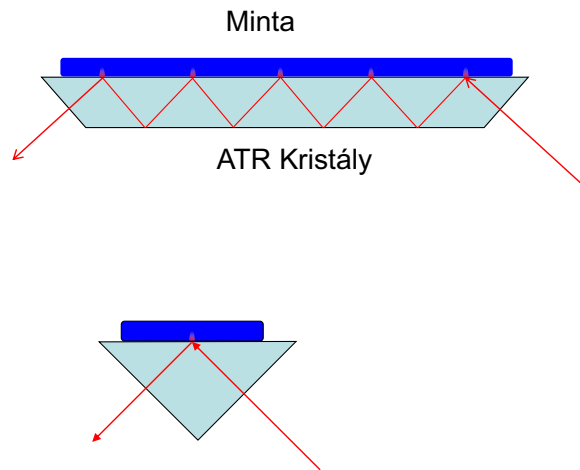


dermal fibroblasts imaged at
1224 cm⁻¹

Hordozható FTIR spektrométer



ATR technika (Attenuated Total Reflection)

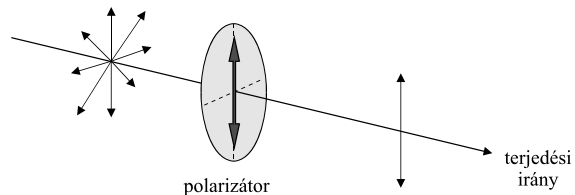


CD

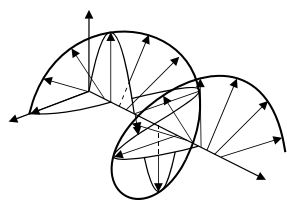
- Cirkuláris dikroizmus spektroszkópia

Poláros fény

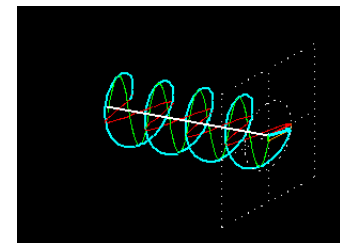
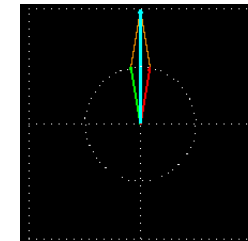
Síkban poláros:



Cirkulárisan poláros



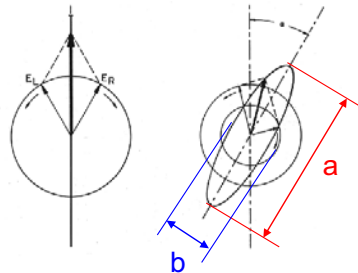
lin. pol =
jobbra+
balra cirk. pol.



mozgó animációk: <http://www.enzim.hu/~szia/cddemo/demo0.htm>

A CD spektrométer vázlata

A jobbra és balra forgó cirkulárisan polarizált fénysugarakkal a királis molekulák különbözőképpen hatnak kölcsön:



$$\Delta A = A_L - A_R = \Delta \epsilon \cdot c \cdot x$$

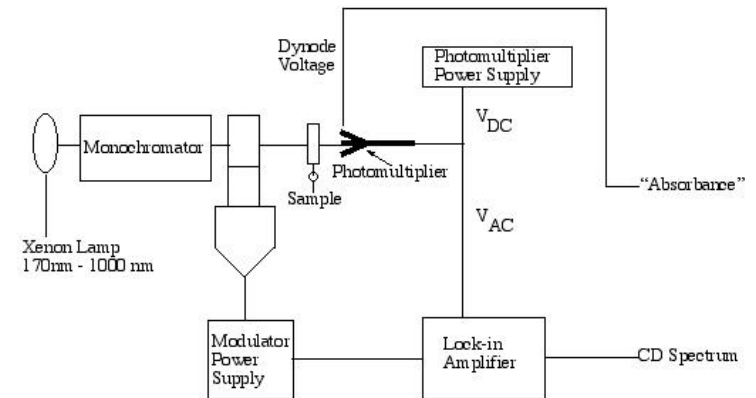
$$\Delta \epsilon = \epsilon_L - \epsilon_R$$

$$\text{Ellipticitás: } \theta \quad \text{tg } \theta = b/a$$

$$\theta = \frac{2.303}{4} \cdot (A_L - A_R) \cdot \frac{180}{\pi} \quad [\text{deg}]$$

$$\text{Lambert-Beer tv.: } \theta = c \cdot l \cdot \theta_m$$

(θ_m : moláris ellipticitás)



CD és a fehérjeszerkezet

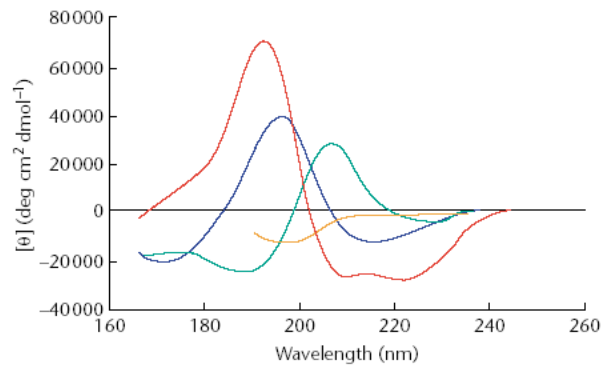
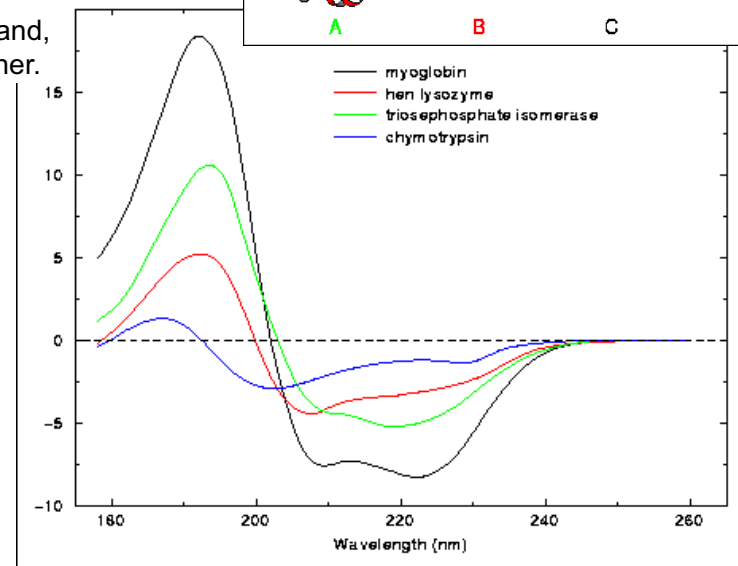
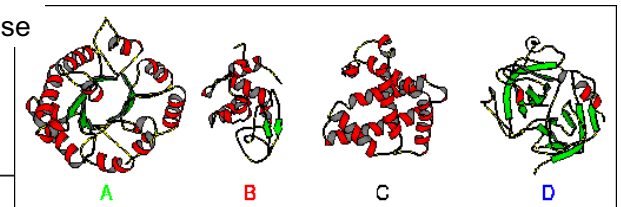
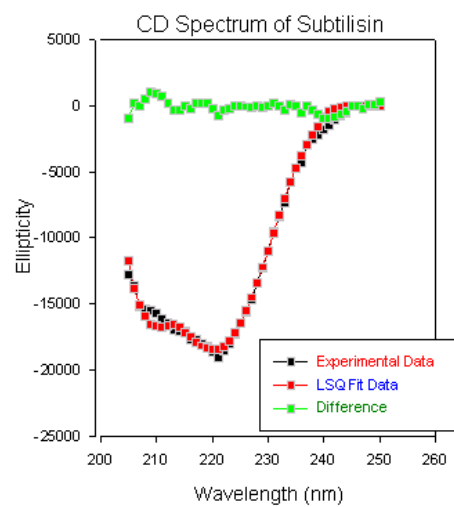


Figure 4 The far-UV CD spectra associated with various types of secondary structure elements in proteins. Red: α -helix; blue: antiparallel β -sheet; green: type I β -turn; orange: irregular structure. (Data taken from the Encyclopedia of Life Sciences)

- A) triosephosphate isomerase
- B) hen egg lysozyme
- C) myoglobin
- D) chymotrypsin
- red: helix.
- green: strand,
- yellow: other.



The Structure and CD spectrum of Subtilisin



helix	sheet	coil
57.92	26.22	15.85

Vége