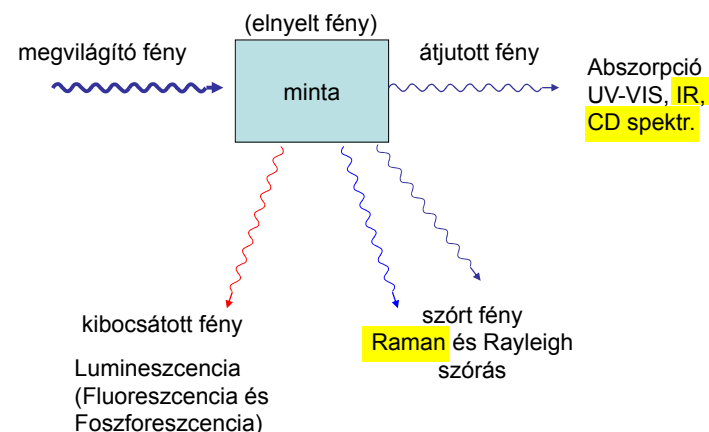


# UV-VIS, Infravörös és CD spektroszkópia a fehérjeszerkezet vizsgálatában

Smeller László

## Mi történhet, ha egy mintát fénnel világítunk meg?

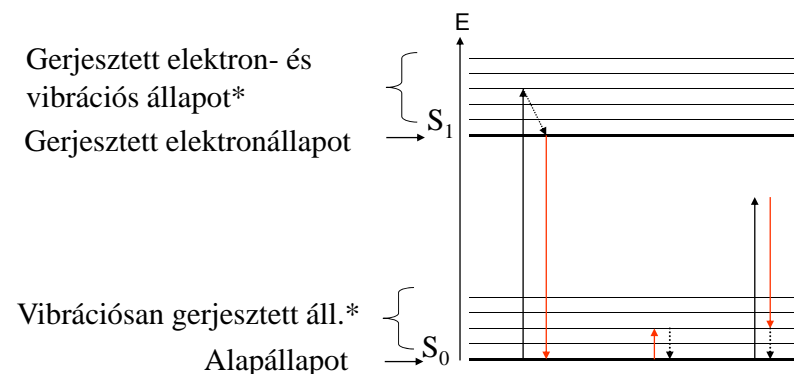


## Abszorpciós és emissziós spektroszkópia

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

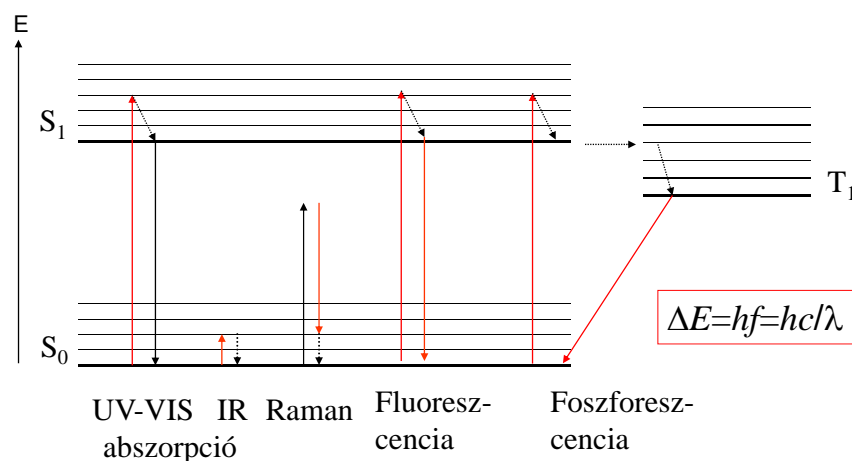
## Miért nyel el ill. bocsát ki fényt egy atom v. molekula?

- Energiaátmenet: ld. Jablonski diagram

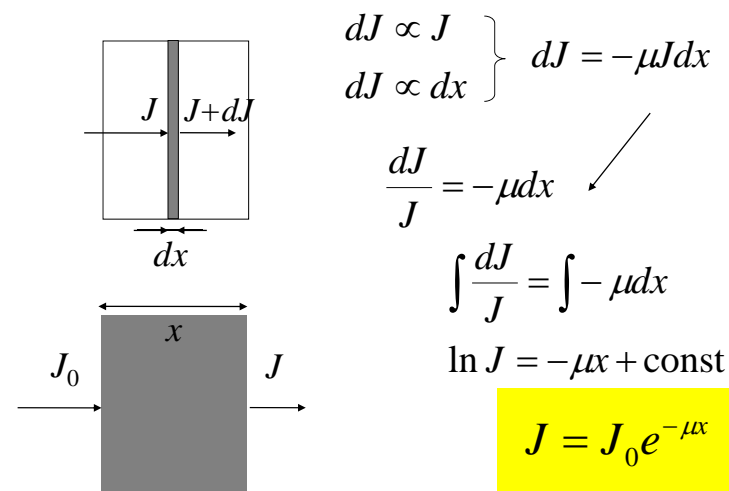


\*csak molekuláknál!

## 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.

## UV-VIS abszorpciós spektroszkópia

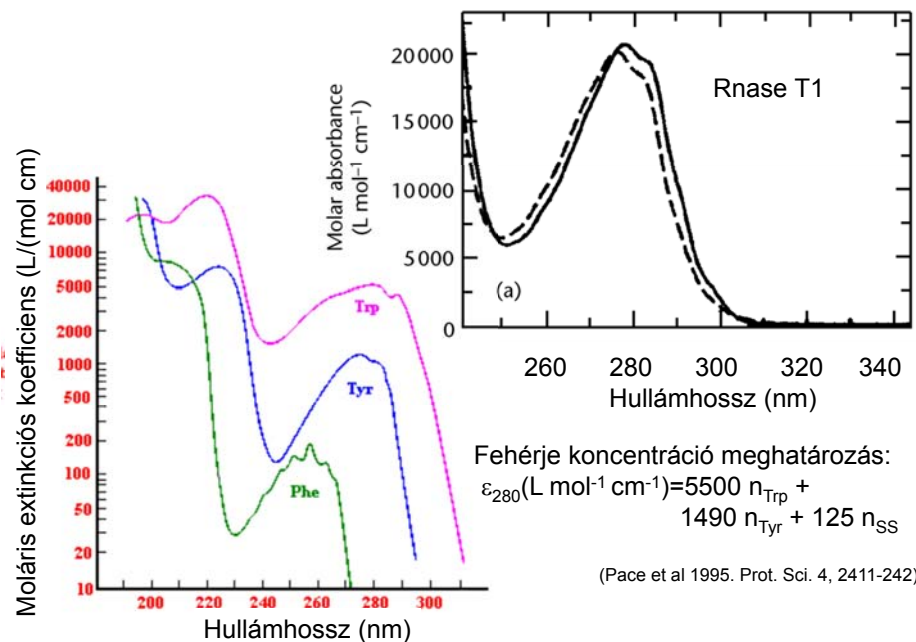
Mi abszorbeál a fehérjékben?

Molekularész	$\lambda_{\text{max}}(\text{nm})$	$\varepsilon(\text{L/cm mol})$
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)

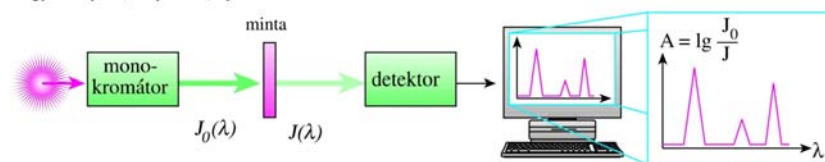


## Infravörös spektroszkópia

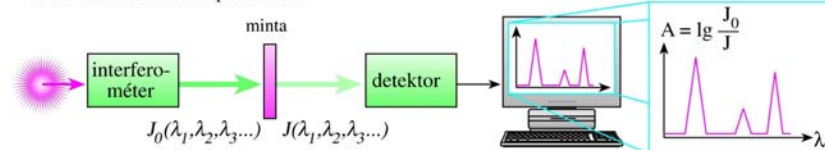
- Infravörös fény:  $\lambda = 800 \text{ nm} - 1 \text{ mm}$   
közép infra tartomány:  $2,5 - 50 \mu\text{m}$
- abszorpciós spektroszkópia
- az elnyelt infravörös sugárzás molekularezgéseket kelt
- érzékeny a molekulaszervezetre
- speciális detektálás: FT spektrométer (FTIR spektroszkópia)

## Az infravörös spektrum mérése: Fourier transzformációs spektrométer

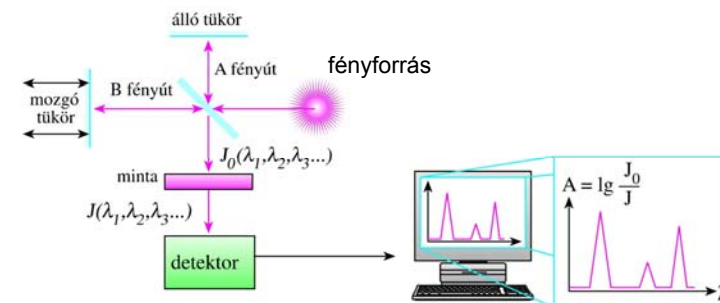
hagyományos (diszperziós) spektrométer



Fourier transzformációs spektrométer

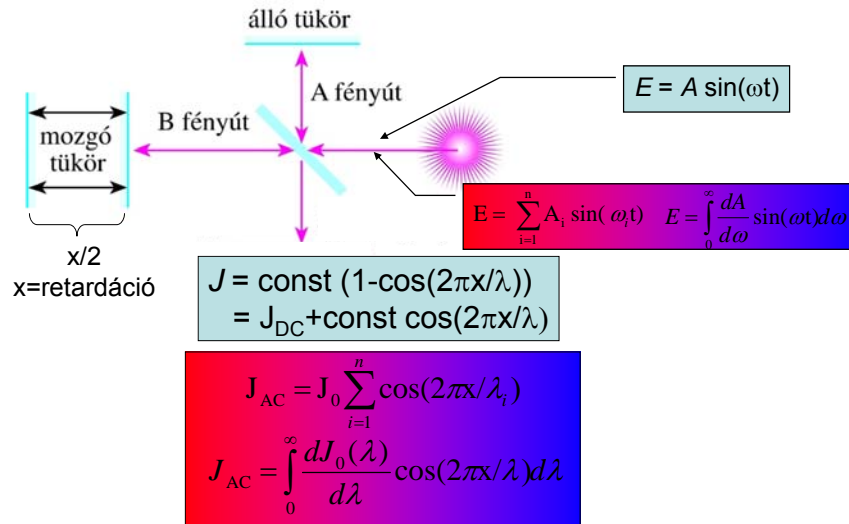


tk 6.17 ábra



tk 6.18 ábra

# FTIR elve részletesen



# Fourier transzformáció

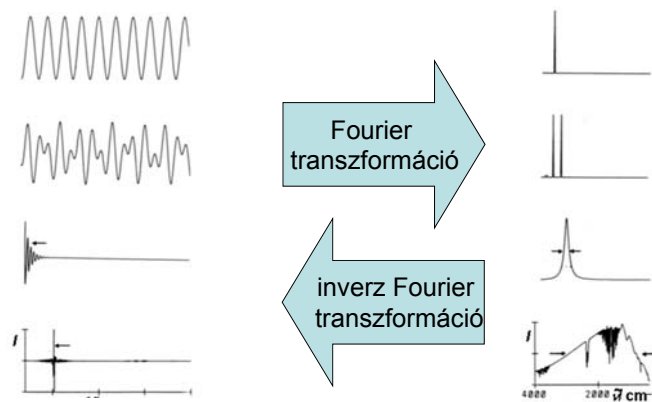
Egy  $f(t)$  függvény Fourier transzformáltja a  $g(x)$  függvény:

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

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:

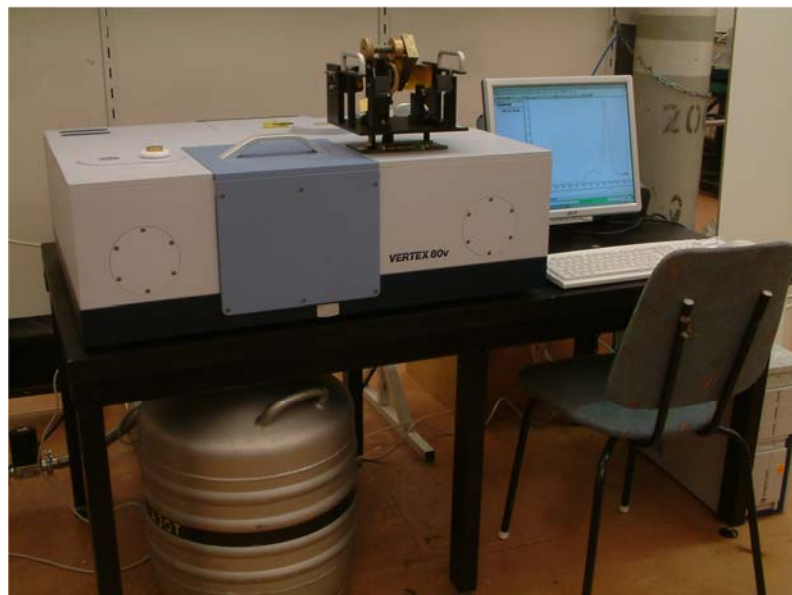
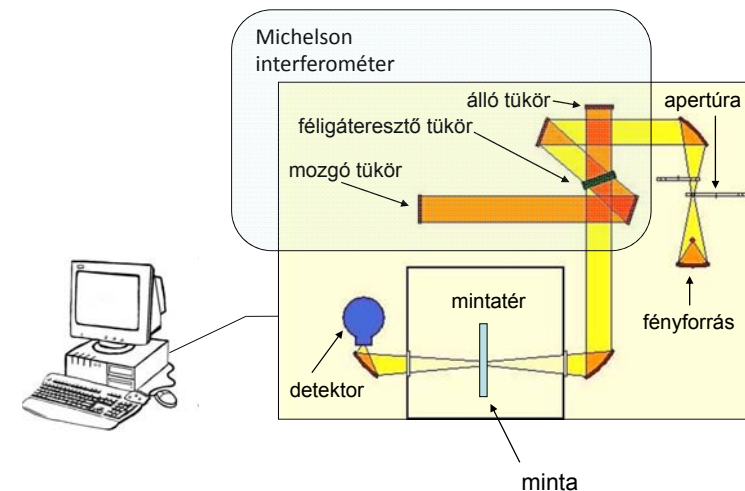
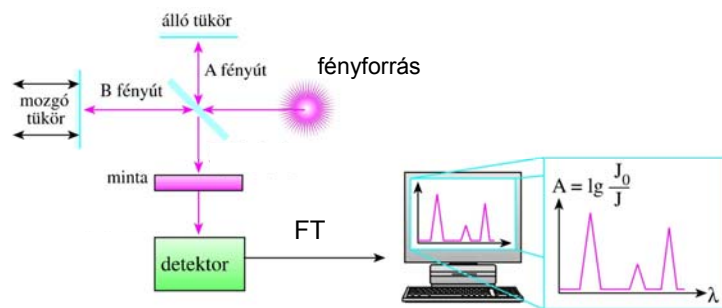
$$J_{\text{AC}} = \int_0^\infty \frac{dJ_0(\lambda)}{d\lambda} \cos(2\pi x/\lambda) d\lambda$$

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)

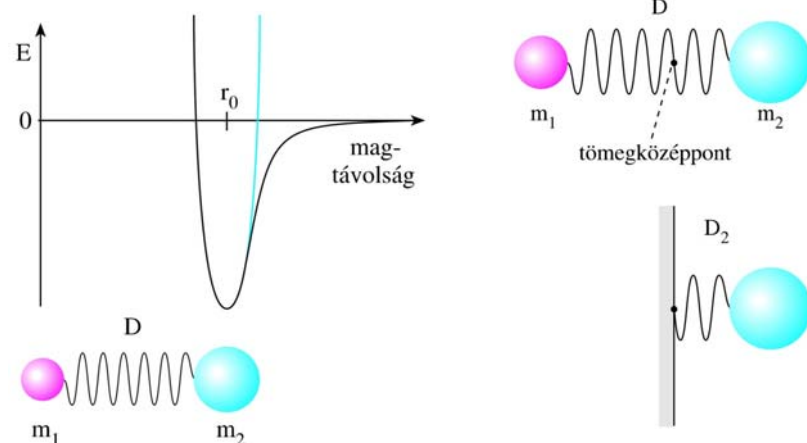


## Molekularezgések

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:

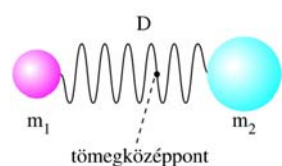
$$f = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{D_2}{m_2}}$$

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

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

$$F = D\Delta \ell$$

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  $\lambda$  reciprokát, a hullámszámot ( $\nu$ ) használják:

$\nu$ : hány hullám fér el egységnyi hosszúságon? [ $\text{cm}^{-1}$ ]

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

Példa: CO

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

$$\left. \begin{aligned} \Rightarrow \lambda &= 4,67 \mu\text{m} \Rightarrow f = 6,43 \cdot 10^{13} \text{ Hz} \\ m_{\text{C}} &= 2 \cdot 10^{-26} \text{ kg}, m_{\text{O}} = 2,7 \cdot 10^{-26} \text{ kg} \end{aligned} \right\} \Rightarrow D = 1875 \text{ N/m}$$

Ha  $\nu$  ismert,  $D$  számolható

ha  $D$  ismert,  $\nu$  számolható

# Kvantummechanikai leírás

Kvantummechanikai oszcillátor:

Tömegpont parabolikus erőterben.

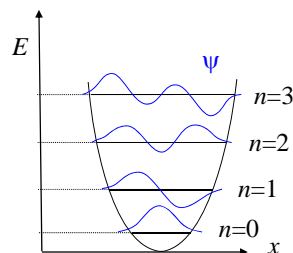
Hamilton operátor:

$$H = T + V$$

Schrödinger egyenlet:

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

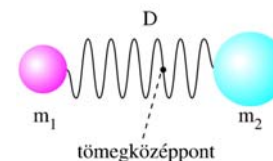
$$E_n = hf(n + \frac{1}{2}) \quad n = 0, 1, 2, \dots$$



# Klasszikus fizikai rezgések és energianívók kapcsolata

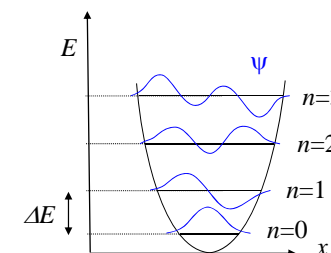
• Klasszikus kép

Energianívók



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

rezonancia az  $f$  frekvenciájú fénnyel



$$\Delta E = hf$$

u.a.!!!

## A rezgési frekvencia függése a tömegtől és a kötéserősségtől

Tömeg:

Infravörös rezgési frekvenciák (cm<sup>-1</sup>)

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<sup>-1</sup>

Kötéserősség:

C-N: 1100 cm<sup>-1</sup>,  
C=N: 1660 cm<sup>-1</sup>,  
C≡N: 2220 cm<sup>-1</sup>.

## Sokatomos molekulák rezgései

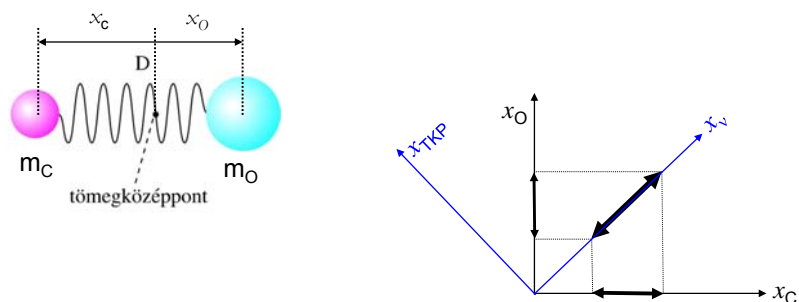
N atomos molekula:

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



## Normálkoordináták

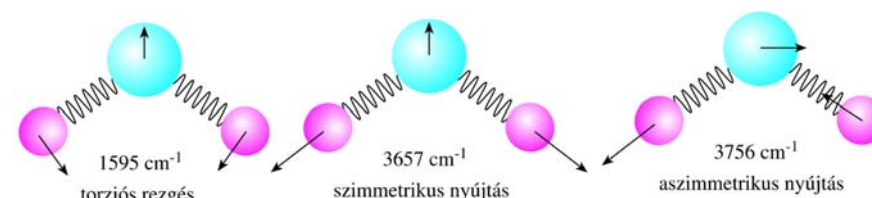
A kétatomos molekula példáján bemutatva:



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

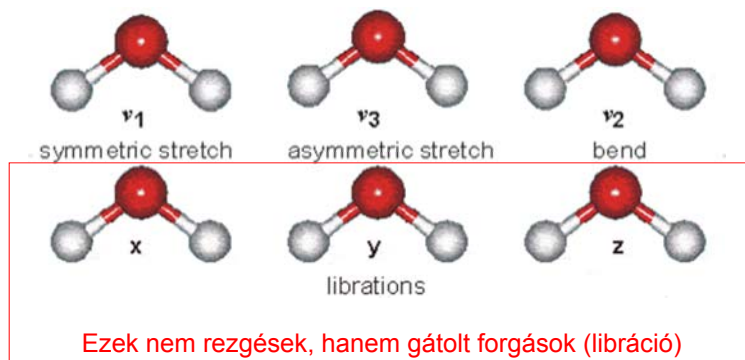
## Normálrezgések

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

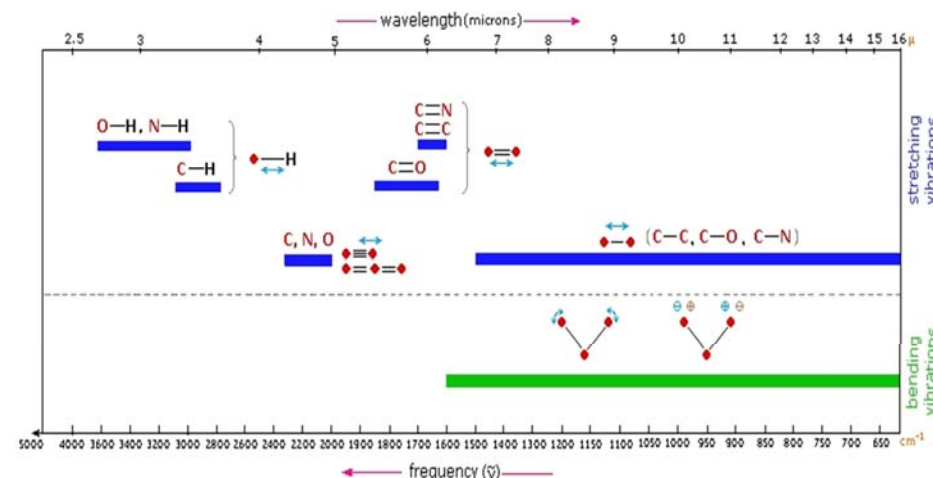


A normál módusok nem hatnak kölcsön egymással.

## A víz normálrezgései

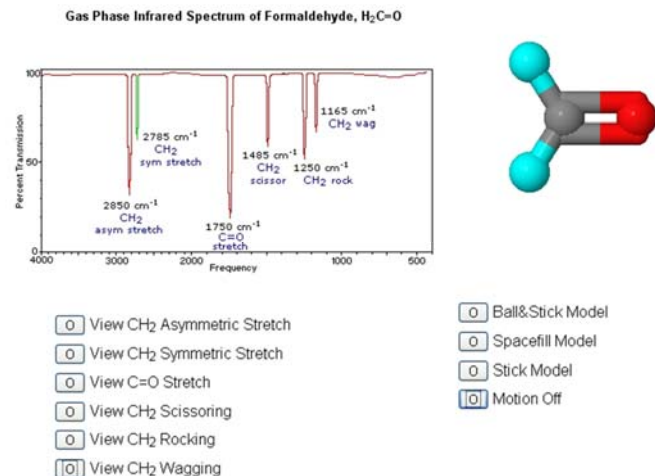


## Néhány tipikus rezgési frekvencia





## Példa: Formaldehid

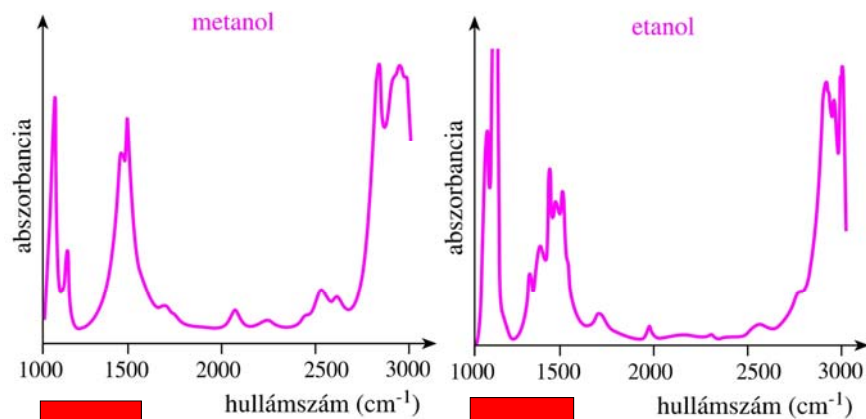


forrás: [www.Spectroscopynow.com](http://www.Spectroscopynow.com)

## Analitikai alkalmazások

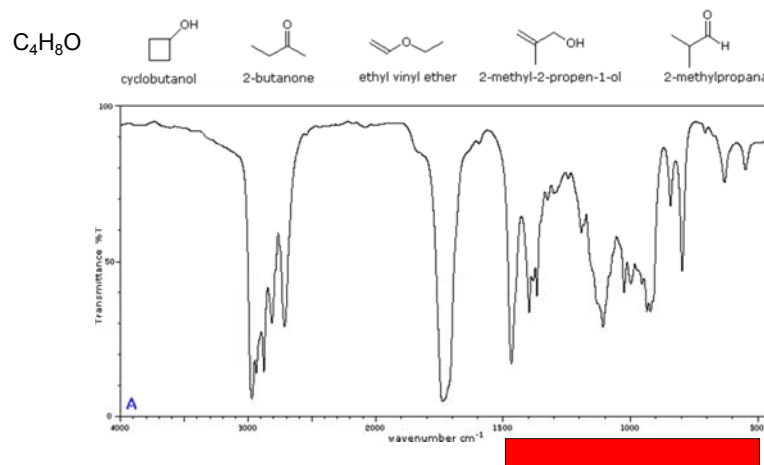
- szintézis: közti és végtermék azonosítás
  - szerkezet bizonyítás
  - metabolit kimutatás
  - gyógyszerellenőrzés (tisztaság vizsgálat)
- Megj.: Lambert-Beer tv. itt is igaz, koncentráció meghatározás is lehetséges.

## Molekula azonosítás



Fingerprint (ujlenyomat) tartomány

## molekula azonosítás



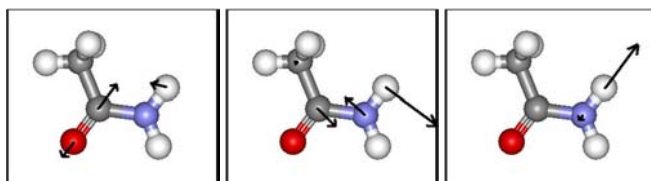
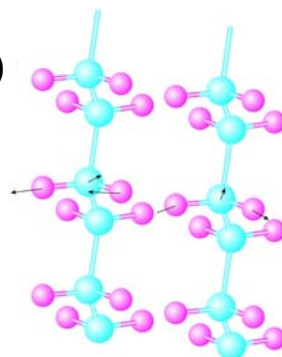
forrás: <http://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/VirtTxtJml/Spectrpy/InfraRed/infrared.htm>

# Makromolekulák rezgései

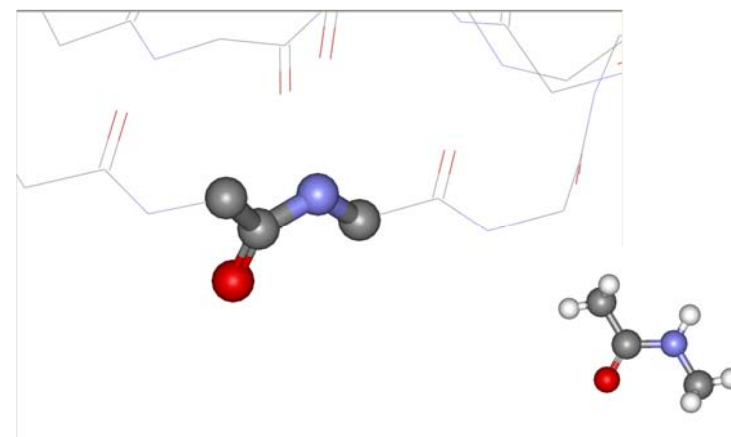
Globális rezgések (bonyolultak)

Lokalizált rezgések, pl:

- $\text{CH}_2$  rezgések a lipidekben
- amid rezgések a fehérjékben (acetamid rezgések)



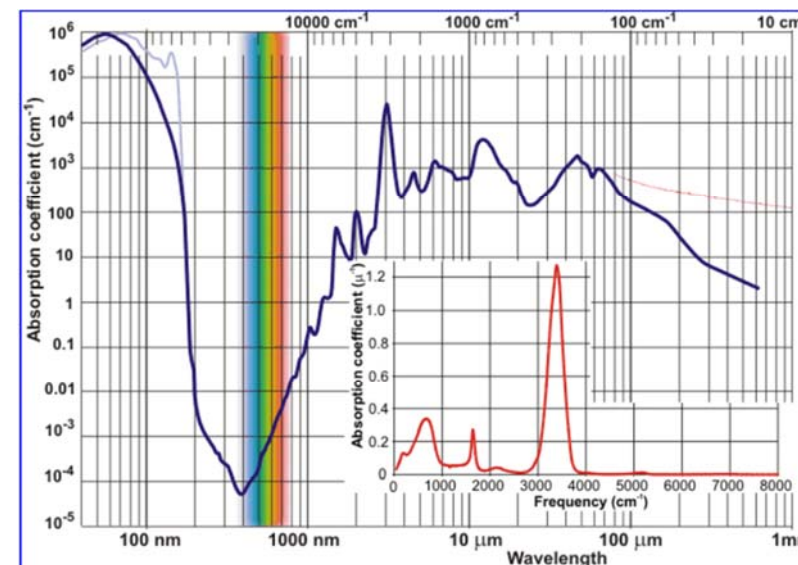
## Az N-metilacetamid mint a fehérjelánc gerincének modellje



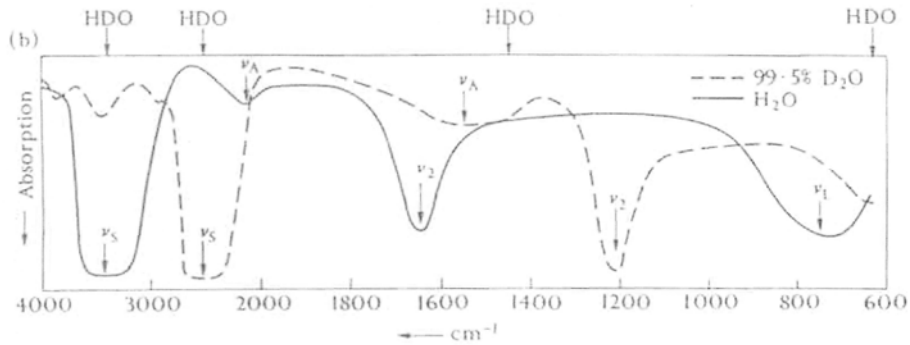
## Fehérjék rezgési spektroszkópiája

- Gerinc: amid rezgések
  - konformáció (másodlagos szerkezet)
  - H/D csere, (harmadlagos szerkezet)
- Oldalláncok
  - kölcsönhatások más molekulákkal
  - pl  $\text{Ca}^{2+}$  kötés
- Fontos technikai megj.: nehézvíz ( $\text{D}_2\text{O}$ )

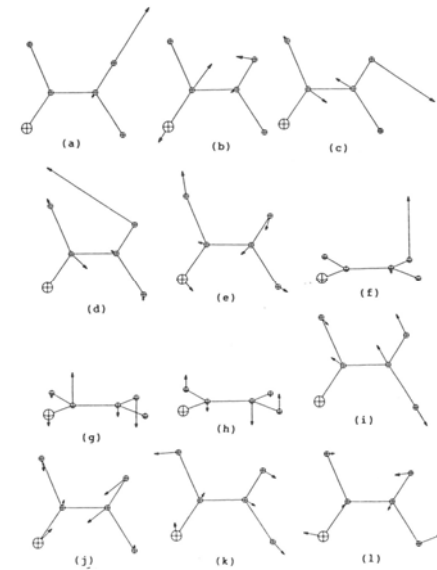
## A víz abszorpciós spektruma



## Víz és nehézvíz spektrumok

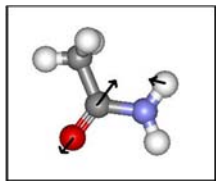


## A fehérjék amid rezgései

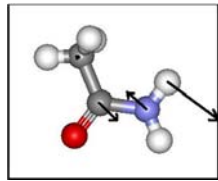


Bandekar BBA 1120 (1992) 123

## A fehérjék amid rezgései

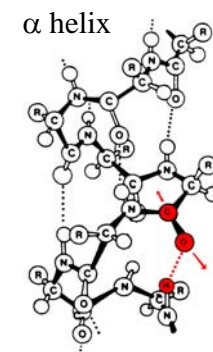
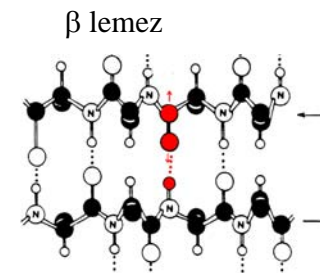
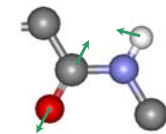


amid I  
C=O rezgés  
H-híd miatt  
konformáció-  
érzékeny

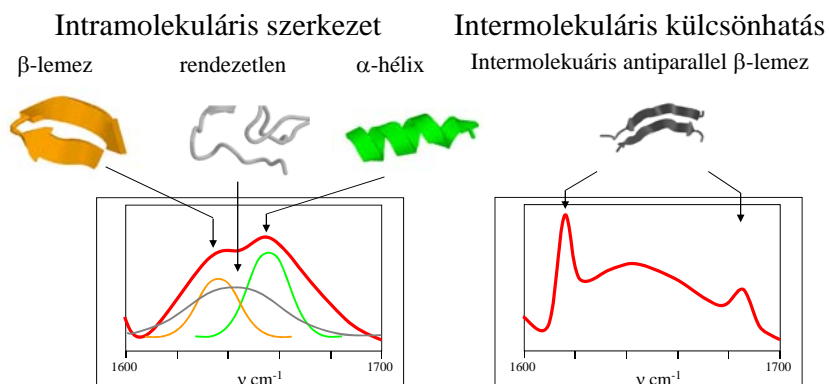


amid II  
N-H nyújtási rezgés  
H-D cserére érzékeny  
Szerkezet kompaktasága  
(harmadlagos szerk.)

## Az amid I vibráció és a másodlagos szerkezet



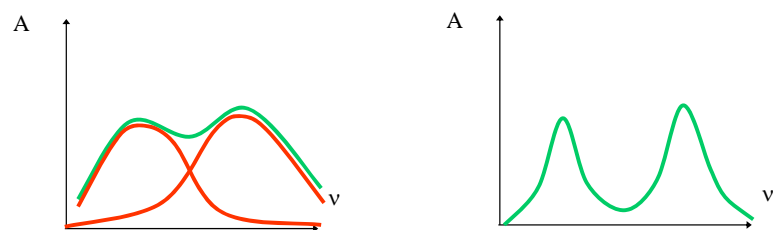
# A másodlagos szerkezeti elemekhez tartozó jellegzetes amid I jel



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

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

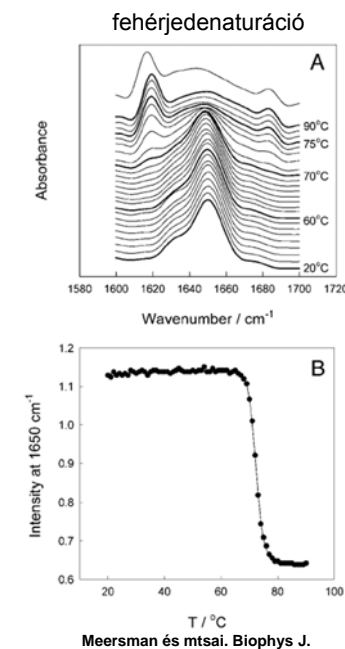
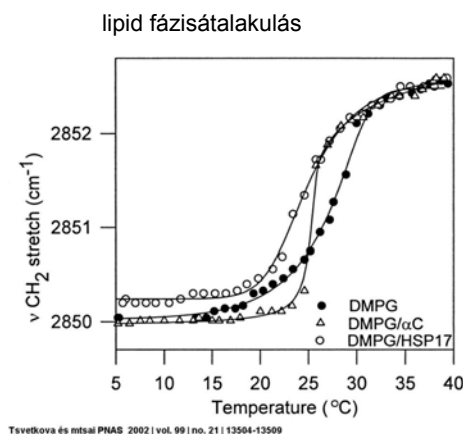
## Az amid I sáv átlapoló komponensek összege: dekonvolúció



Fourier öndekonvolúció

Vonalak szétválasztása vonalkeskenyítéssel

## Alkalmazások

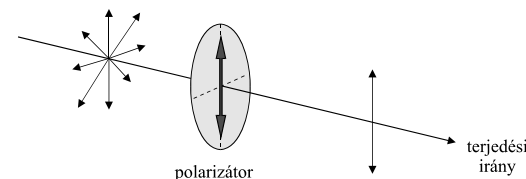


## CD

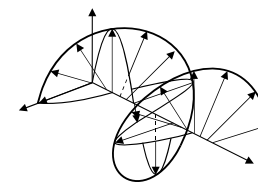
- Cirkuláris dikroizmus spektroszkópia

## Poláros fény

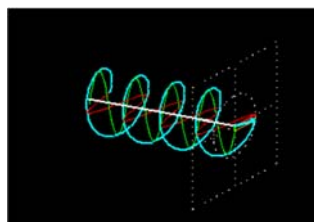
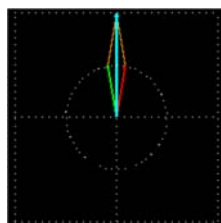
Síkban poláros:



Cirkulárisan poláros



lin. pol =  
jobbra+  
balra cirk. pol.



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

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

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

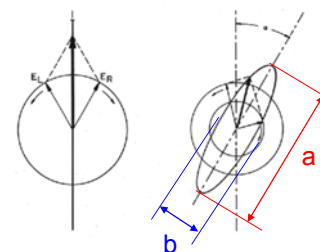
$$\Delta \varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R$$

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

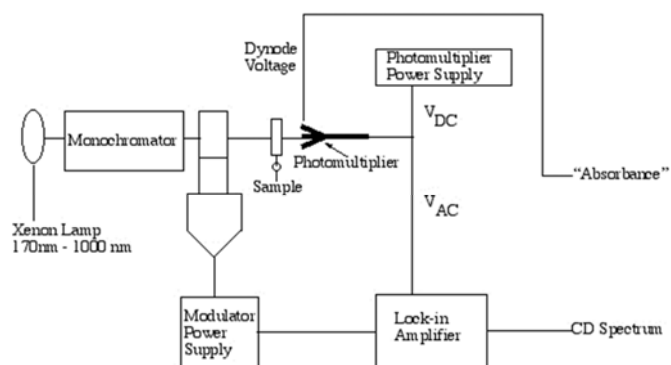
$$\theta = \frac{2.303}{4} \cdot (A_L - A_R) \cdot \frac{180}{\pi} \text{ [deg]}$$

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

( $\theta_m$ : moláris ellipticitás)



## A CD spektrométer vázlata



## CD és a fehérjeszerkezet

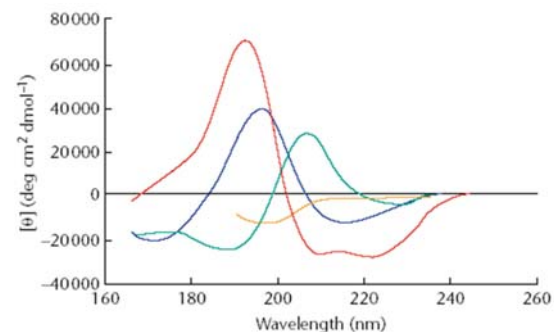
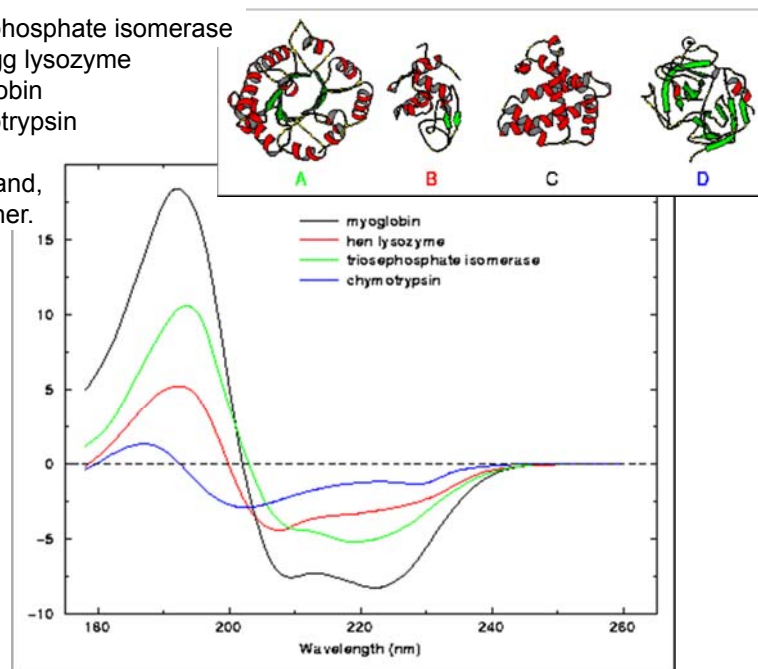
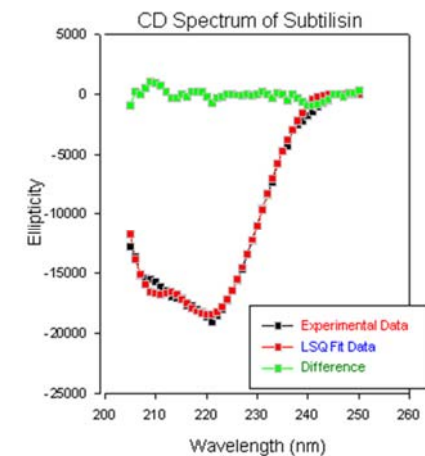


Figure 4 The far-UV CD spectra associated with various types of secondary structure elements in proteins. Red:  $\alpha$ -helix; blue: antiparallel  $\beta$ -sheet; green: type I  $\beta$ -turn; orange: irregular structure. (Data taken from the Encyclopedia of Life Sciences)

- 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