

Программа «Структурная биология»

Курс « Оптическая спектроскопия»

Алексей Валерьевич Феофанов

**Кафедра биоинженерии
Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова**

**Лаборатория оптической микроскопии и спектроскопии
биомолекул
ИБХ РАН**

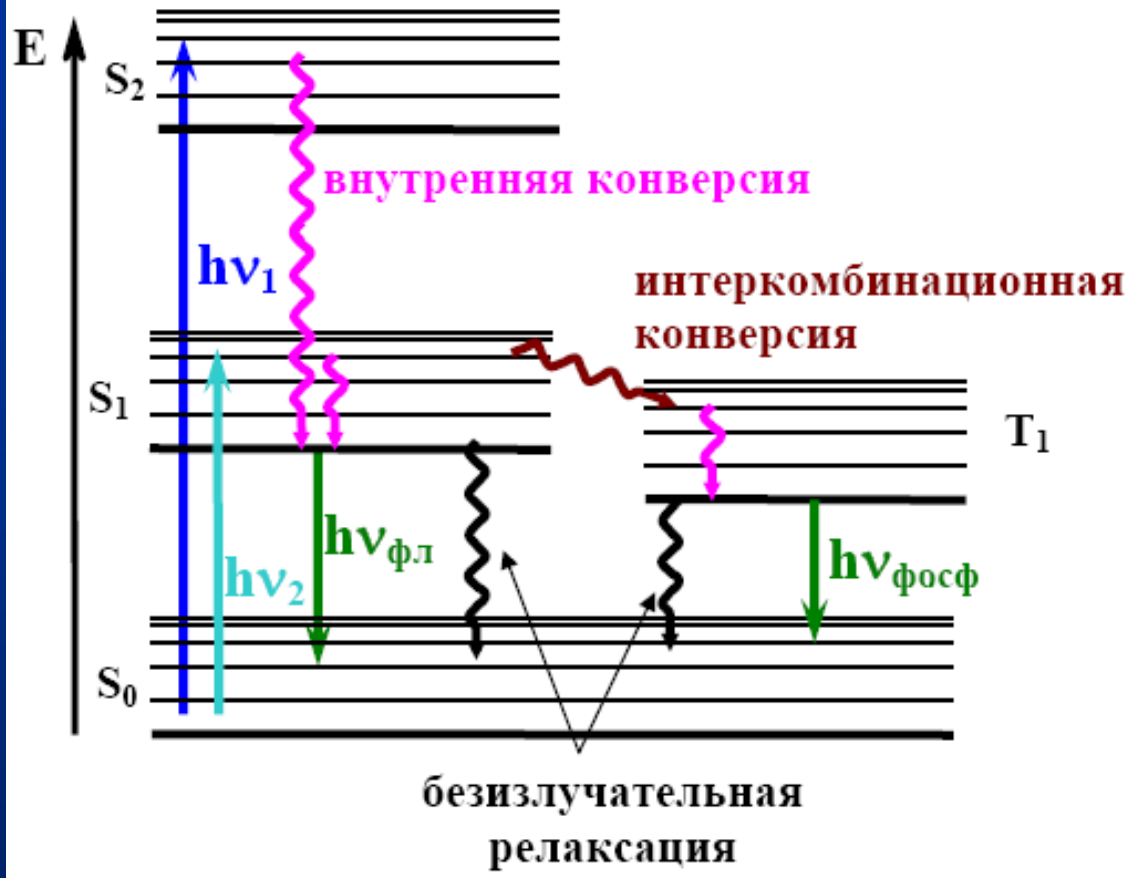
Лекция 5

Цель изучения дисциплины: получение базовых знаний о методах оптической спектроскопии, о возможностях и способах их применения к решению задач структурной биологии

Методы оптической спектроскопии:

- Молекулярная спектроскопия электронного поглощения света
- Молекулярная флуоресцентная спектроскопия
- Флуоресцентная спектроскопия с временным разрешением
- Поляризационная флуоресцентная спектроскопия
- Флуоресцентная спектроскопия на основе Фёрстеровского резонансного переноса энергии
- Флуоресцентная спектроскопия одиночных молекул
- Спектроскопия кругового дихроизма
- Инфракрасная (ИК) спектроскопия молекул
- Спектроскопия комбинационного рассеяния (КР) света и ее разновидности

Взаимодействия света с электронными уровнями молекул



Характерные времена

Поглощение кванта света -

10^{-15} с

Внутренняя конверсия и колебательная релаксация -

$10^{-14} - 10^{-11}$ с

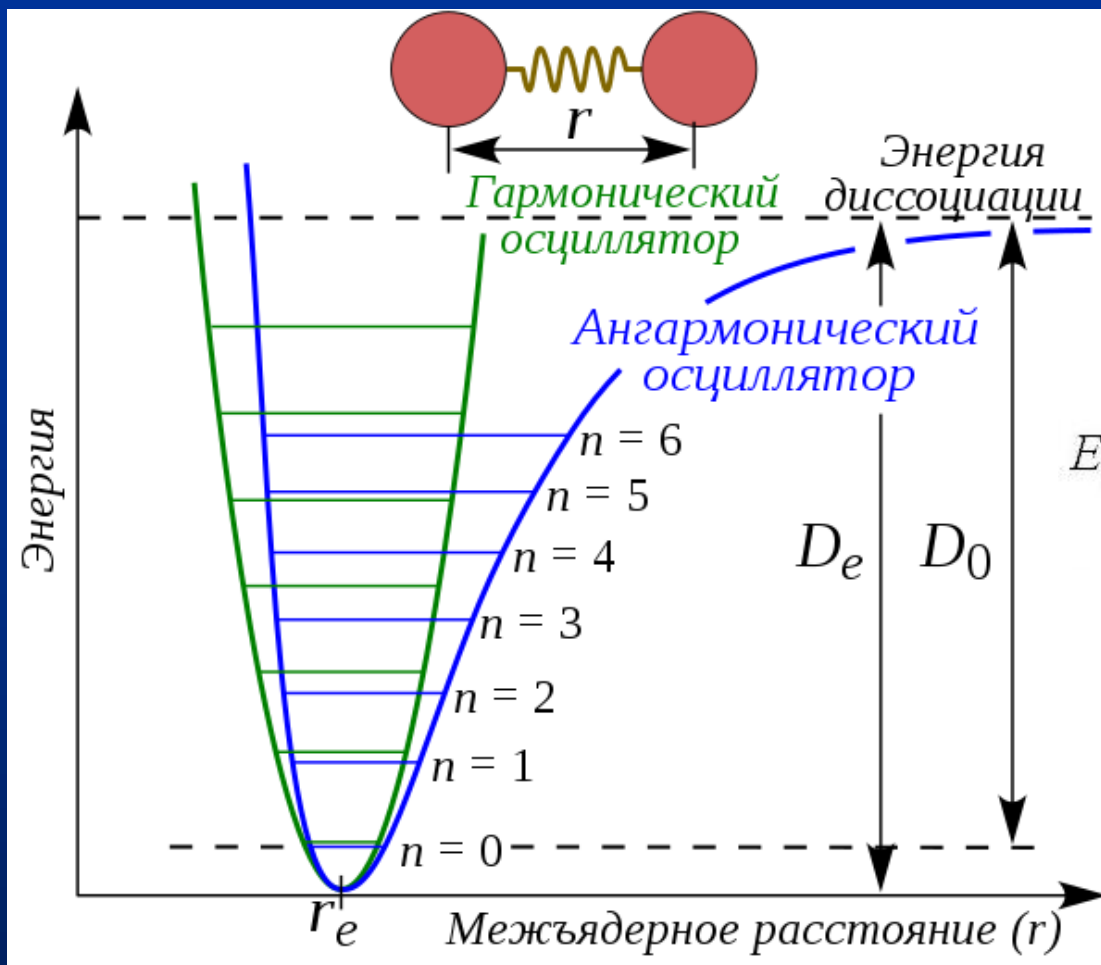
Испускание света:

Флуоресценция -

$10^{-9} - 10^{-7}$ с

Фосфоресценция -

$10^{-3} - 10^2$ с



$$E_n = \left(n + \frac{1}{2} \right) h\nu - \frac{(h\nu)^2}{4D_e} \left(n + \frac{1}{2} \right)^2$$

Колебательные переходы лежат в интервале длин волн 0,8-200 мкм, или в интервале частот 50- 12500 см⁻¹

В спектроскопии энергию колебаний характеризуют волновым числом - величиной обратной длине волны (1/λ). Измеряется в см⁻¹.

Типы колебаний молекул

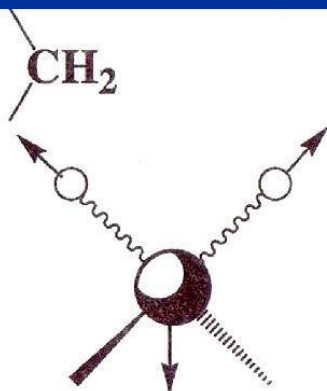
*Валентные колебания (ν) - изменения длин связей
симметричные и антисимметричные*

*Деформационные колебания (δ) - изменения углов между связями.
ножничные, маятниковые, веерные и крутильные*

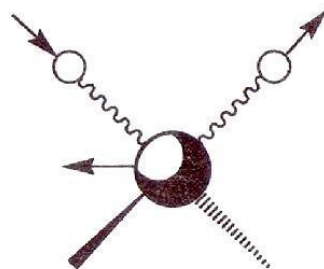
Для сложных молекул с массивными фрагментами деформационные колебания описывают как
плоскостные и внеплоскостные.

Скелетные колебания - одновременное изменении нескольких длин связей или валентных углов.

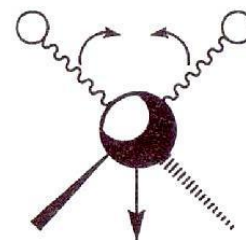
Число нормальных колебаний (колебательных степеней свободы) равно $(3n-5)$ для линейных и $(3n-6)$ для нелинейных молекул (n — число атомов в молекуле).



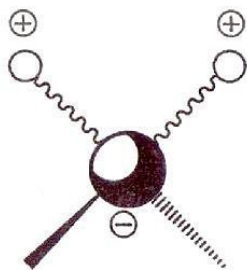
Симметричное
валентное, $\nu_s \text{CH}_2$,
 $\sim 2853 \text{ cm}^{-1}$



Антисимметричное
валентное, $\nu_{as} \text{CH}_2$,
 $\sim 2926 \text{ cm}^{-1}$



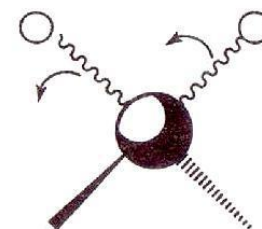
Плоскостное деформационное
или ножничное (scissoring), $\delta_s \text{CH}_2$,
 $\sim 1465 \text{ cm}^{-1}$



Внеплоскостное
деформационное
или веерное (wagging),
 ωCH_2 , $1350\text{--}1150 \text{ cm}^{-1}$



Внеплоскостное
деформационное
или крутильное (twisting),
 τCH_2 , $1350\text{--}1150 \text{ cm}^{-1}$



Плоскостное
деформационное
или маятниковое (rocking),
 ρCH_2 , $\sim 720 \text{ cm}^{-1}$

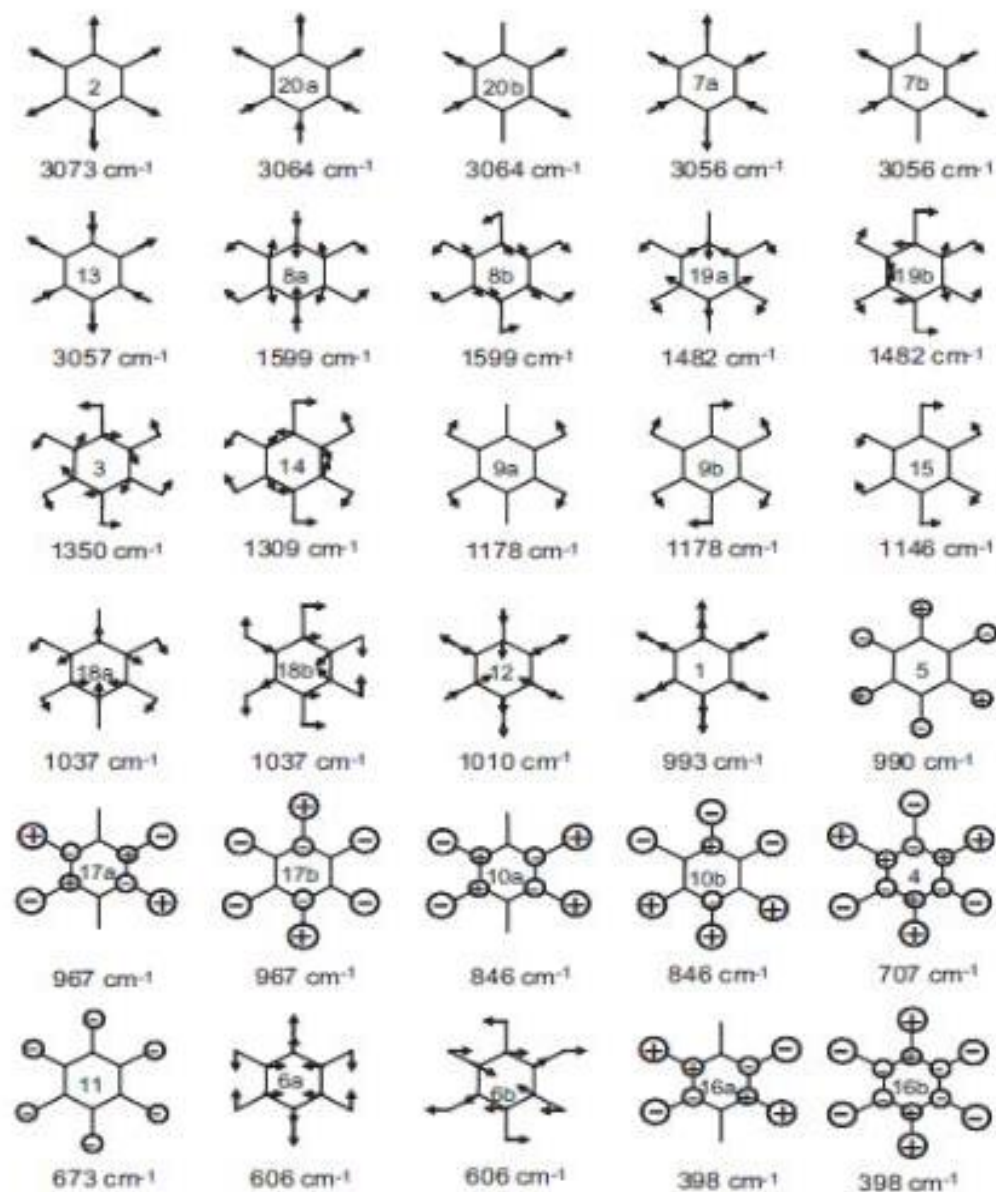


FIGURE 6.12 Approximate vibrational modes of benzene adapted from (M.A. Palafox, *Int. J. Quant. Chem.*, 77, 661–684, 2000). The electronic structure was determined using density functional method with a 6–31G* basis set. Out-of-plane molecular vibrations are depicted using + and – to indicate out of and into the page, respectively.

ИК-спектроскопия - это спектроскопия поглощения света колебательными уровнями молекул

Правила:

$$1. h\nu = E_1 - E_0$$

2. колебание должно вызывать изменение
дипольного момента молекулы

Молекулы, не имеющие дипольного момента (H_2 , N_2 , O_2 , соли без ковалентных связей, металлы), не поглощают ИК свет

В приближении гармонического осциллятора разрешены переходы с $\Delta\nu = \pm 1$ (на соседние уровни).

В приближении ангармоничного осциллятора разрешены также переходы с $\Delta\nu = \pm 2$ (обертоны) и комбинационные (составные) переходы $\nu_1 + \nu_2$ (при переходах из возбуждённых состояний)

Частота обертона - $2 \times \nu_1 - \Delta$, где $\Delta = 2-10 \text{ см}^{-1}$

$$E_n = \left(n + \frac{1}{2}\right) h\nu - \frac{(h\nu)^2}{4D_e} \left(n + \frac{1}{2}\right)^2$$

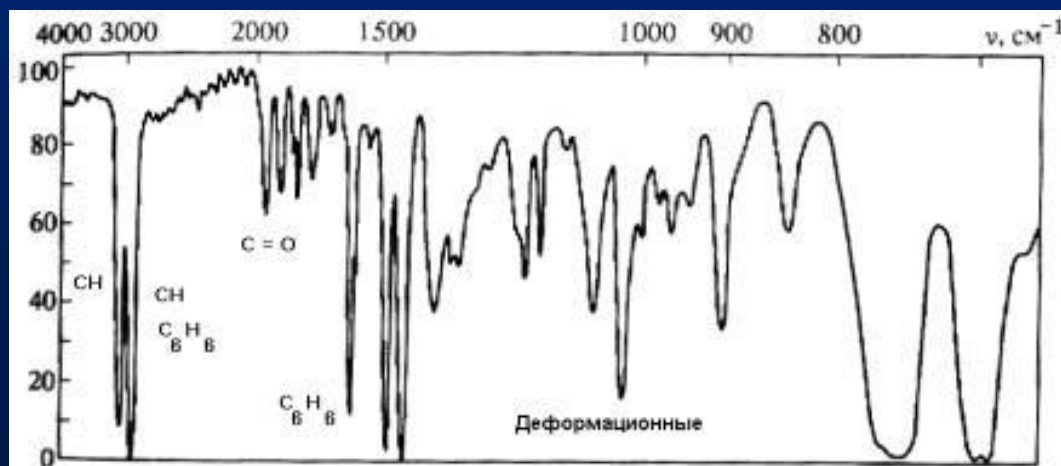
ИК спектр — зависимость интенсивности проходящего через образец инфракрасного излучения от его частоты (длины волны).

Поглощение ИК излучения образцом описывается законом Бугера — Ламберта — Бера:

$$D = \varepsilon c l,$$
$$I = I_0 \times 10^{-\varepsilon c l} = I_0 \times 10^{-D} \quad \varepsilon \sim 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$$

Таблицы характеристических частот — отнесение наблюдаемых полос поглощения к колебаниям определенных молекулярных групп.

Базы ИК-спектров (раньше — атласы спектров) некоторых классов соединений — автоматическое сравнение измеренного спектра вещества с известными спектрами для идентификации этого вещества.



$$\lambda(\text{см}^{-1}) = 10^7 / \lambda(\text{нм})$$

Колебательное поглощение:
2-50 мкм или 5000-200 см^{-1}

Рис. Колебательный ИК-спектр полистирола

Проявление различных колебаний в спектре:

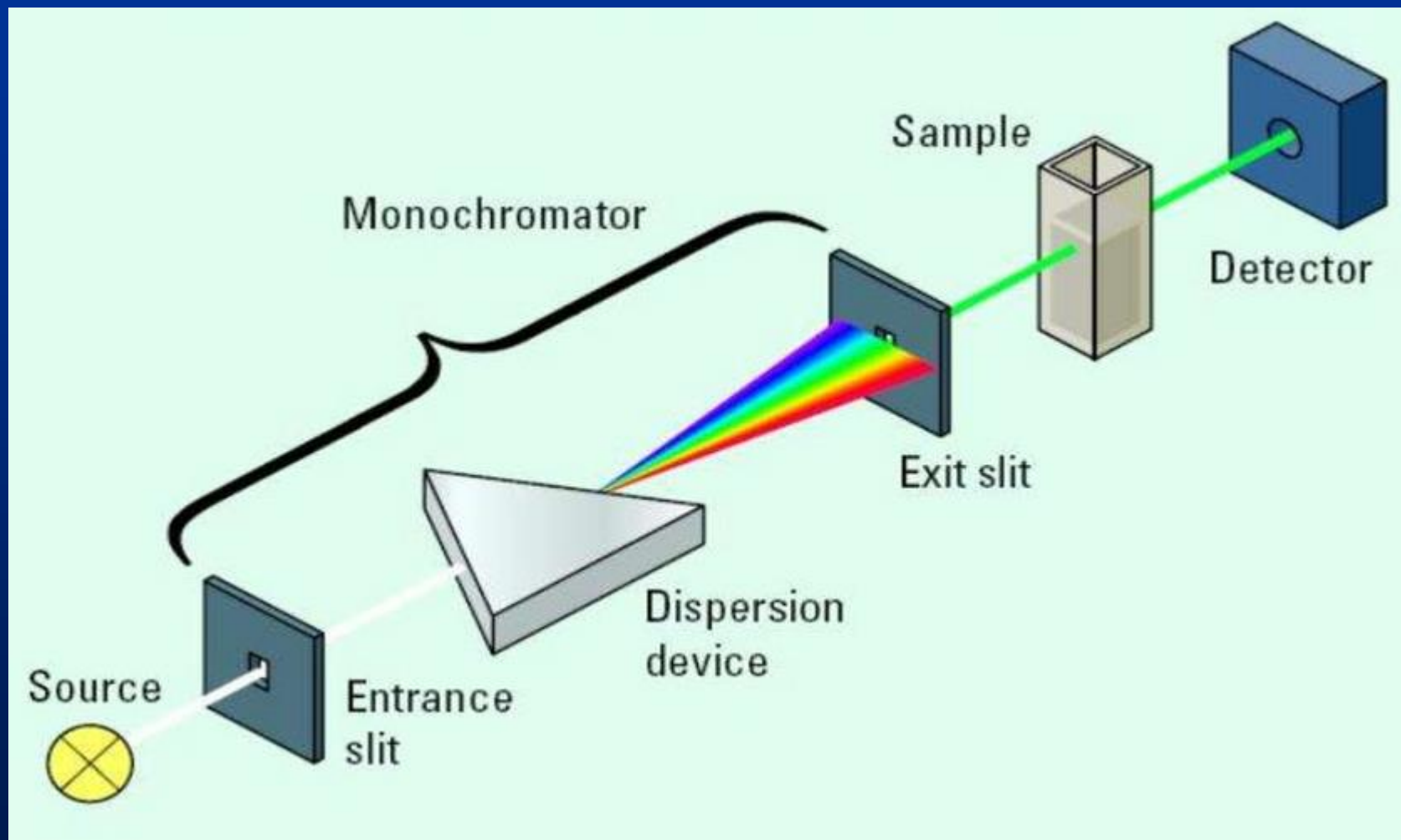
валентные колебания X-H: $3600\text{—}2800\text{ см}^{-1}$;

колебания тройных связей: $2800\text{—}1800\text{ см}^{-1}$;

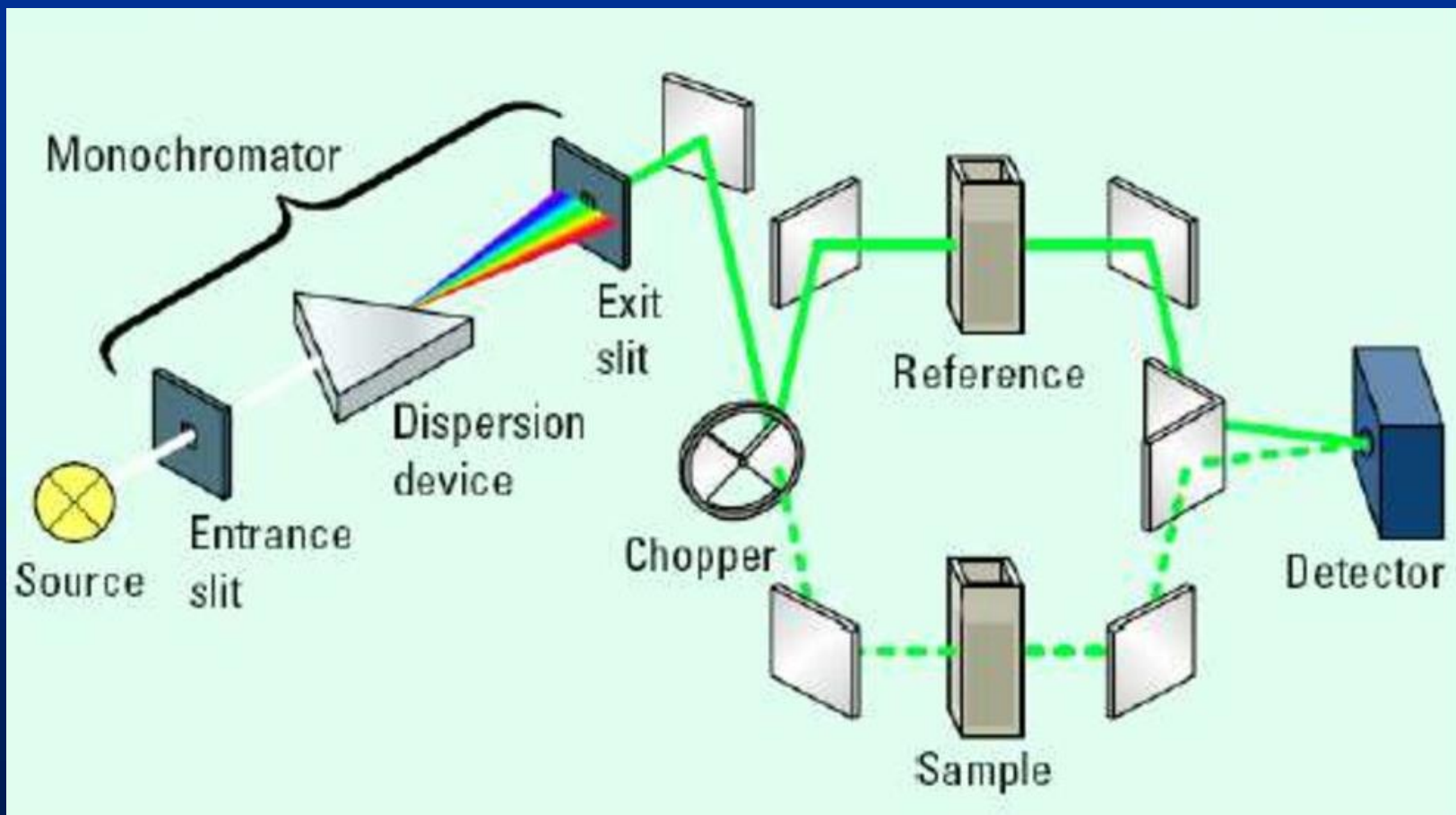
колебания двойных связей: $1800\text{—}1500\text{ см}^{-1}$;

область отпечатков пальцев $<1500\text{ см}^{-1}$

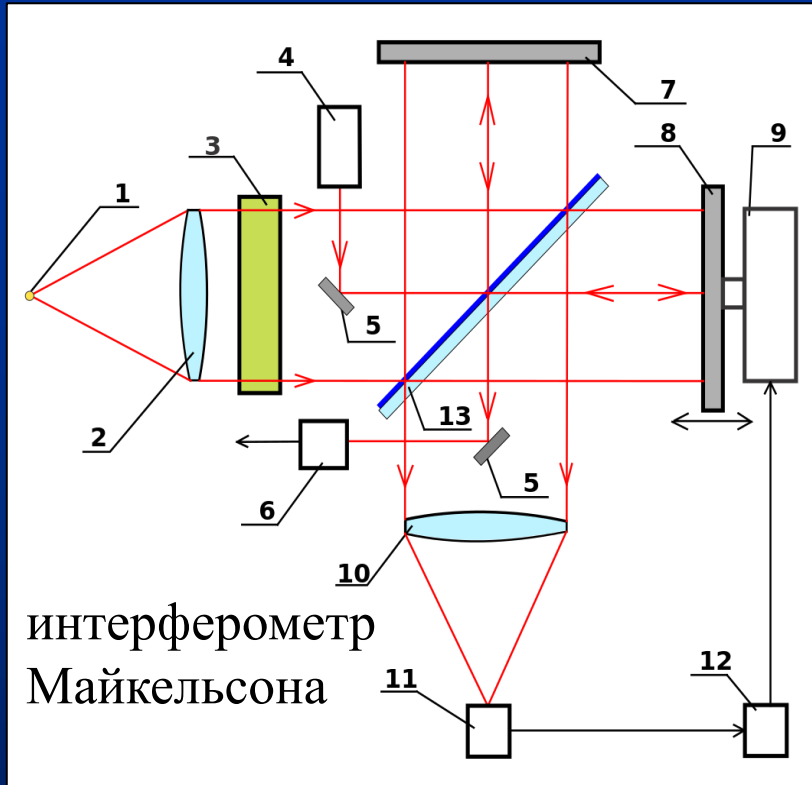
Оптическая схема однолучевого дисперсионного ИК спектрометра



Оптическая схема двухлучевого дисперсионного ИК -спектрометра



ИК –спектрометр на основе преобразования Фурье



$$E=E_0\cos(\omega t-kx+\varphi)$$

Преимущества:

одновременно регистрируются все длины волн;

большая интенсивность сигнала за счёт отсутствия монохроматора и щелей;

внутренний эталон длины волны - гелий-неоновый лазер;

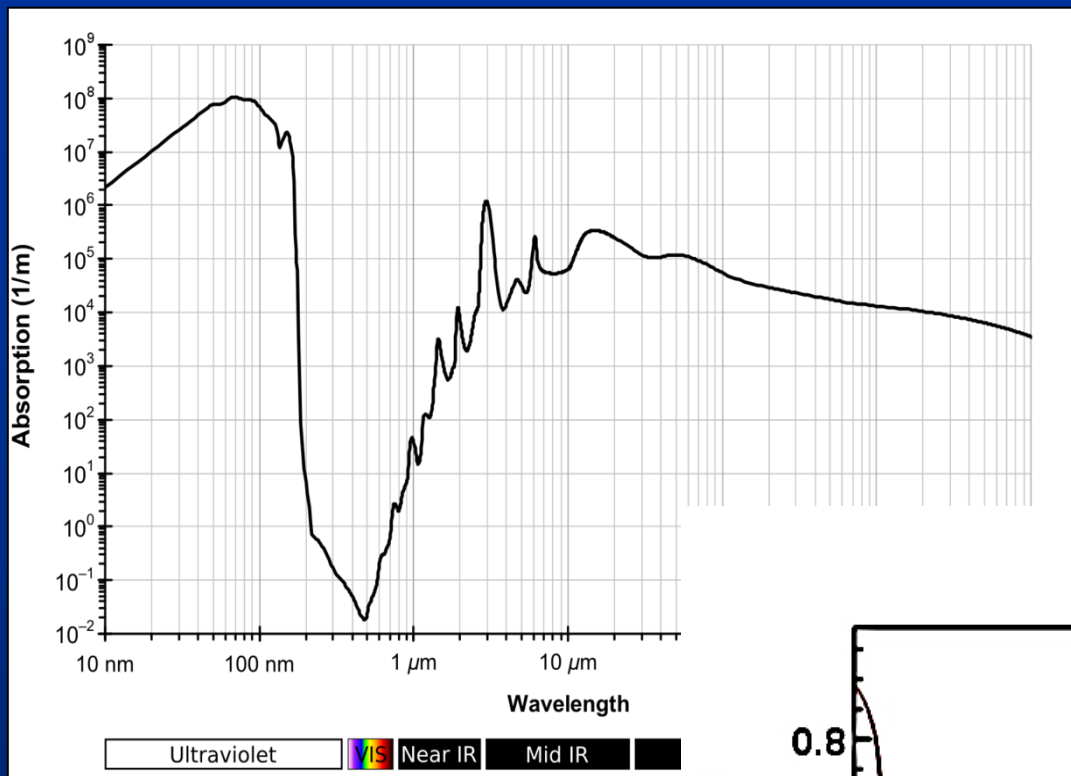
сигнал/шум и чувствительность повышаются за счёт записи спектров в режиме накопления.

Жидкие вещества измеряют в тонких плёнках между стёклами из материалов, пропускающих ИК-свет (бромид калия, фторид кальция или бария) или растворяют в сероуглероде или четырёххлористом углероде (дают минимальное число полос в ИК спектре)

Твёрдые вещества измеряют измельчив их и смешав с матрицей (KBr или вазелиновое масло).

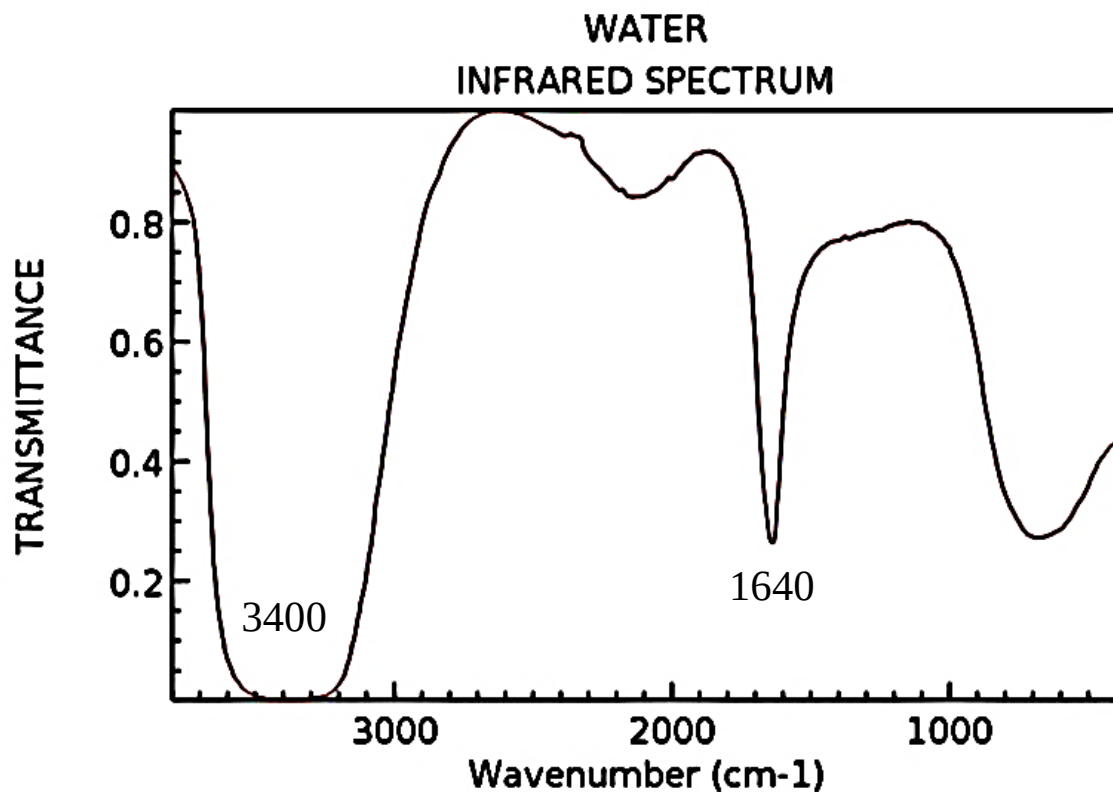
Смесь с KBr прессуется в тонкую (~1 мм) таблетку.

Смесь с вазелиновым маслом помещают в разборную кювету.



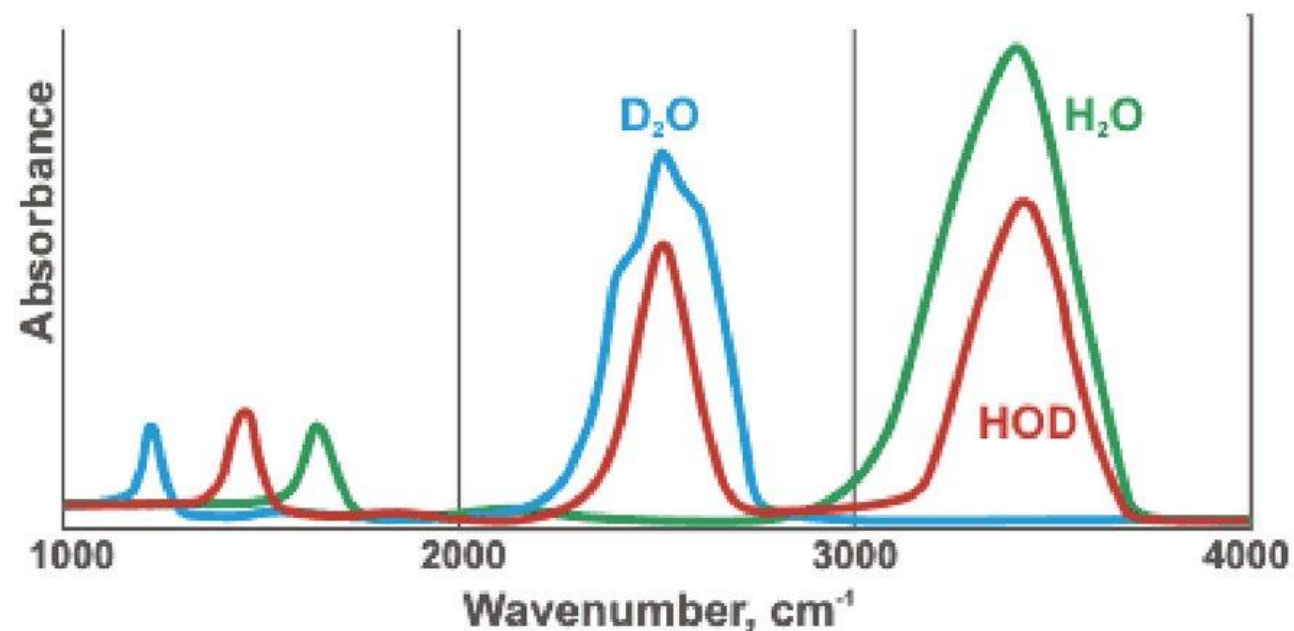
Толщина слоя водного образца,
при котором возможно
измерение ИК- спектра -
50 мкм

Биологические образцы
часто измеряют в D₂O



NIST Chemistry WebBook (<http://webbook.nist.gov/chemistry>)

Примеры ИК-спектров: молекула воды



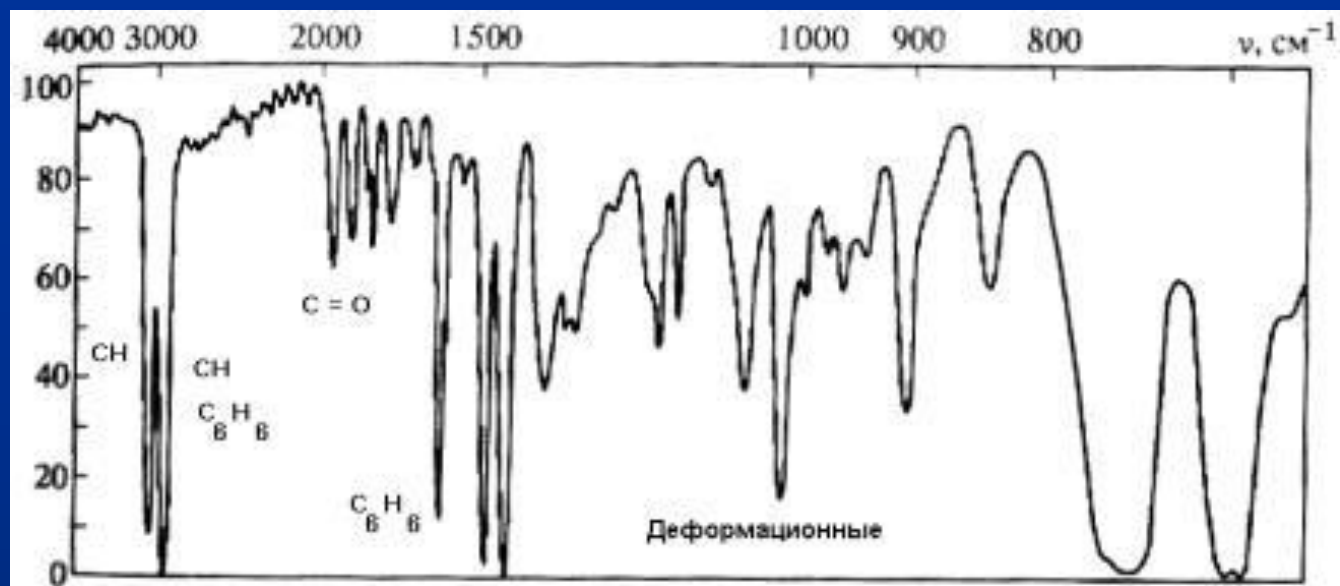
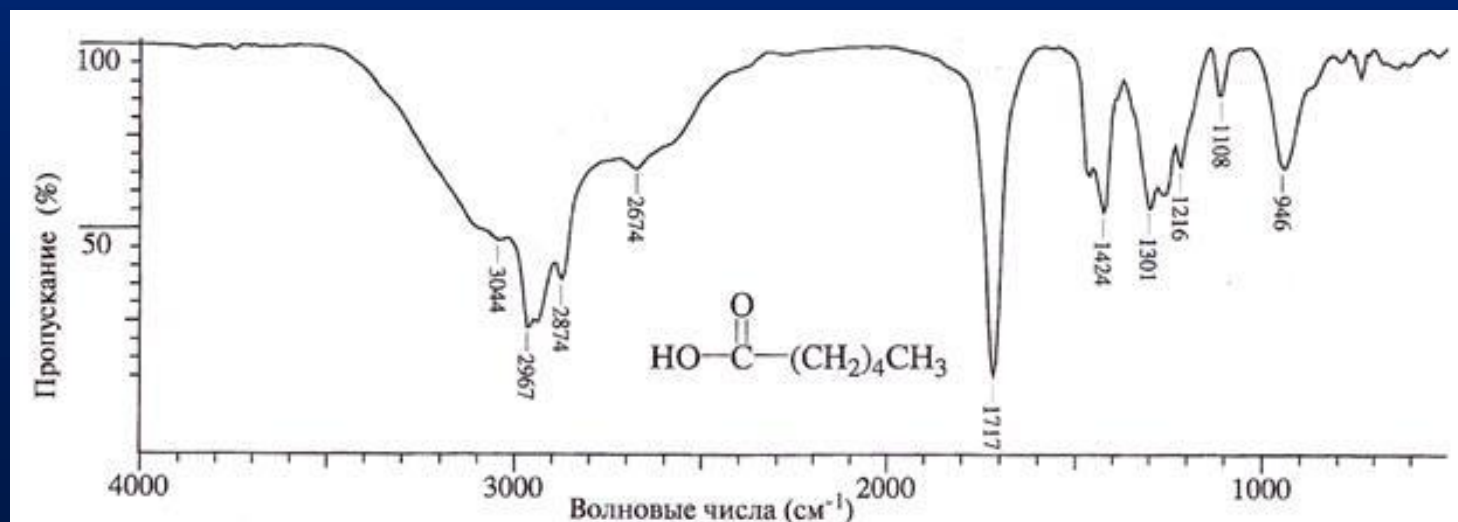
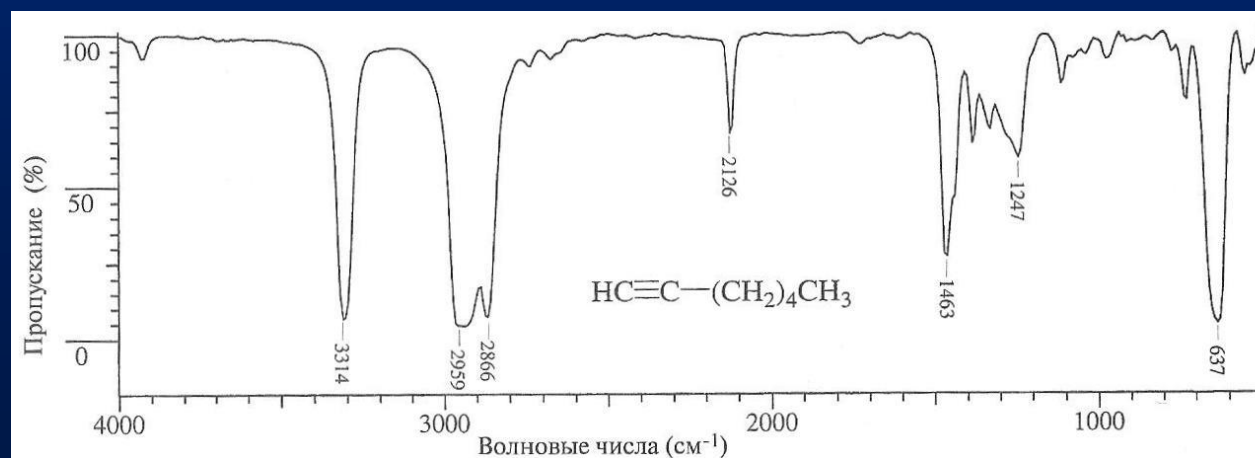
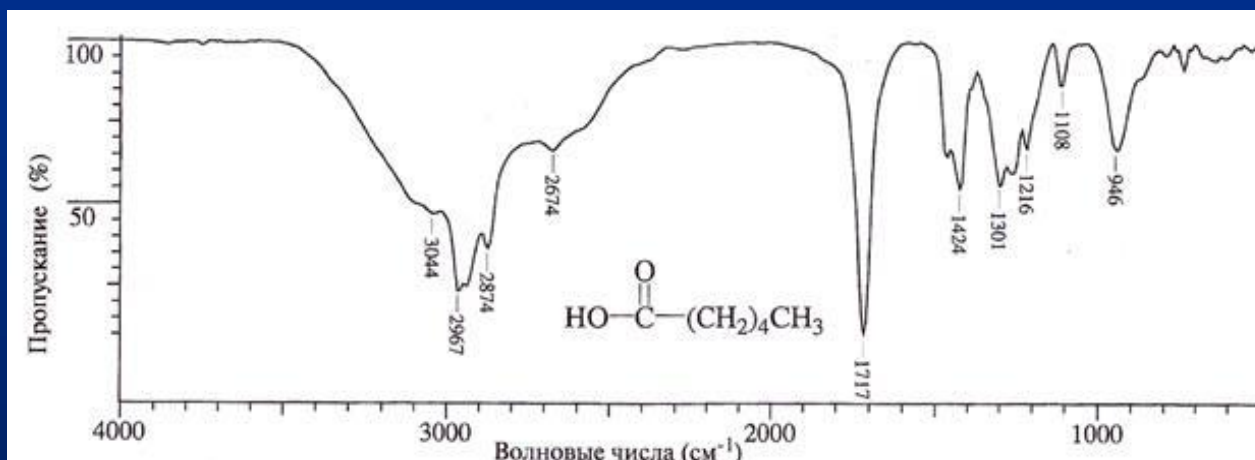
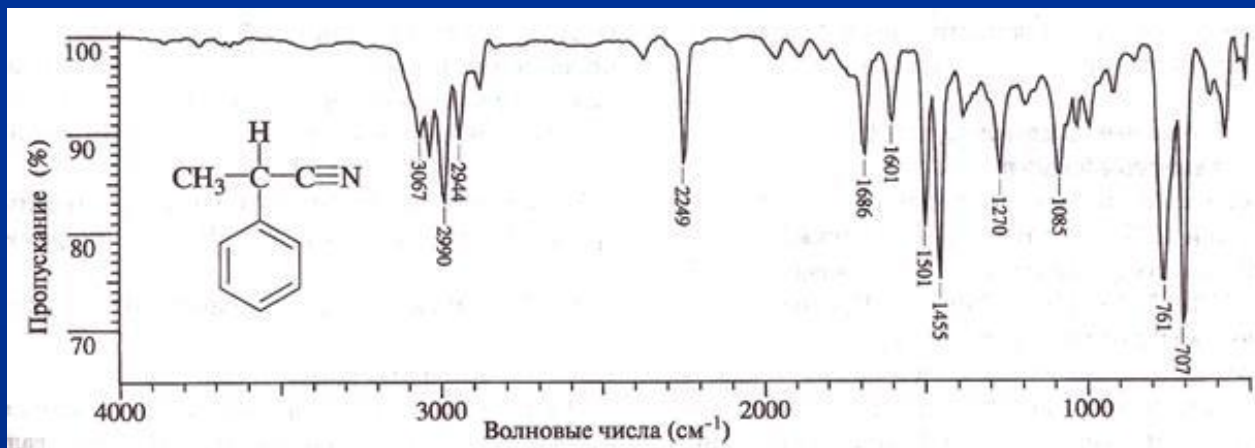


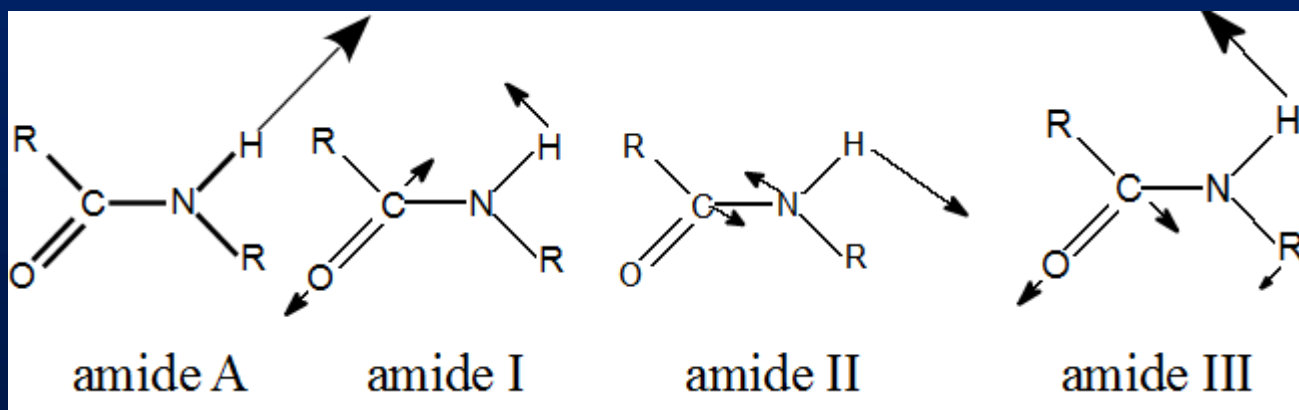
Рис. Колебательный ИК-спектр полистирола





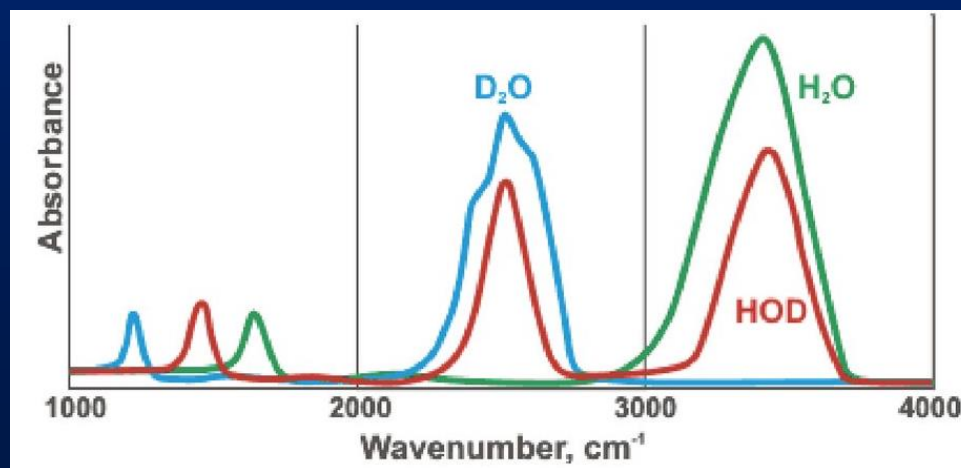
Анализ вторичной структуры белков методом ИК-спектроскопии

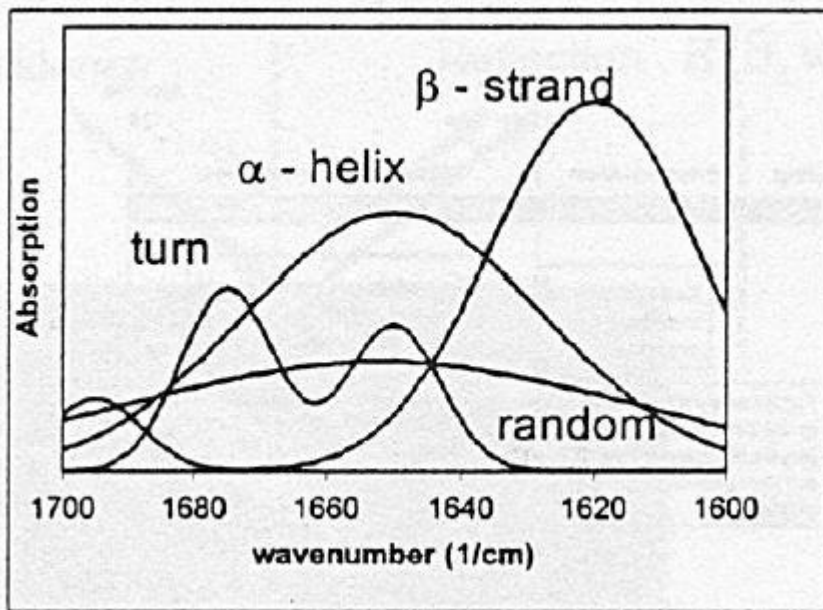
	α спираль	β -структура	Без водородных связей
Растяжение N-H	3290-3300 см ⁻¹	3280-3300 см ⁻¹	~3400 см ⁻¹
Амид I Растяжение C=O	1650-1660 см ⁻¹	1630 см ⁻¹	1680-1700 см ⁻¹
Амид II C-N-H	1540-1550 см ⁻¹	1520-1525 см ⁻¹	<1520 см ⁻¹ ?



Анализ вторичной структуры белков методом ИК-спектроскопии

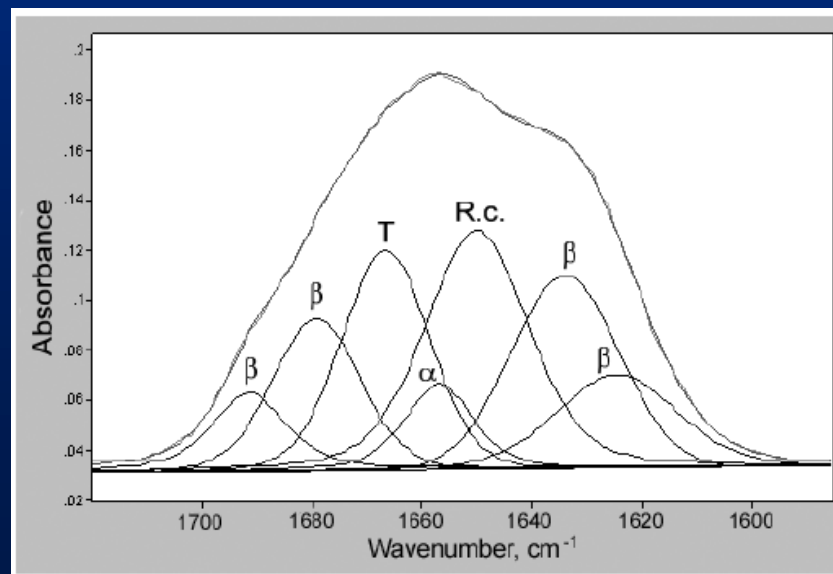
	α спираль	β -структура	Без водородных связей
Растяжение N-H	3290-3300 cm^{-1}	3280-3300 cm^{-1}	$\sim 3400 \text{ cm}^{-1}$
Амид I Растяжение C=O	1650-1660 cm^{-1}	1630 cm^{-1}	1680-1700 cm^{-1}
Амид II C-N-H	1540-1550 cm^{-1}	1520-1525 cm^{-1}	$< 1520 \text{ cm}^{-1}$?



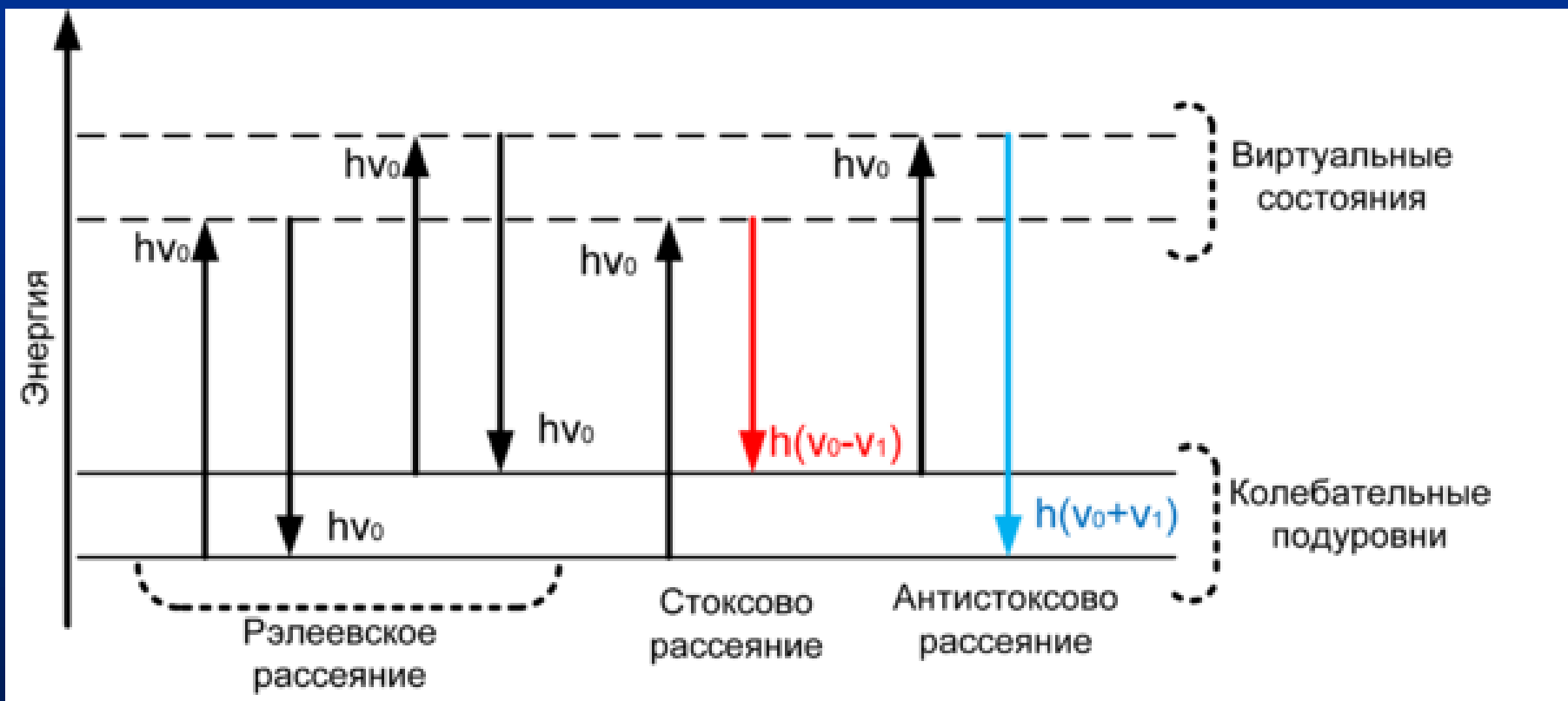


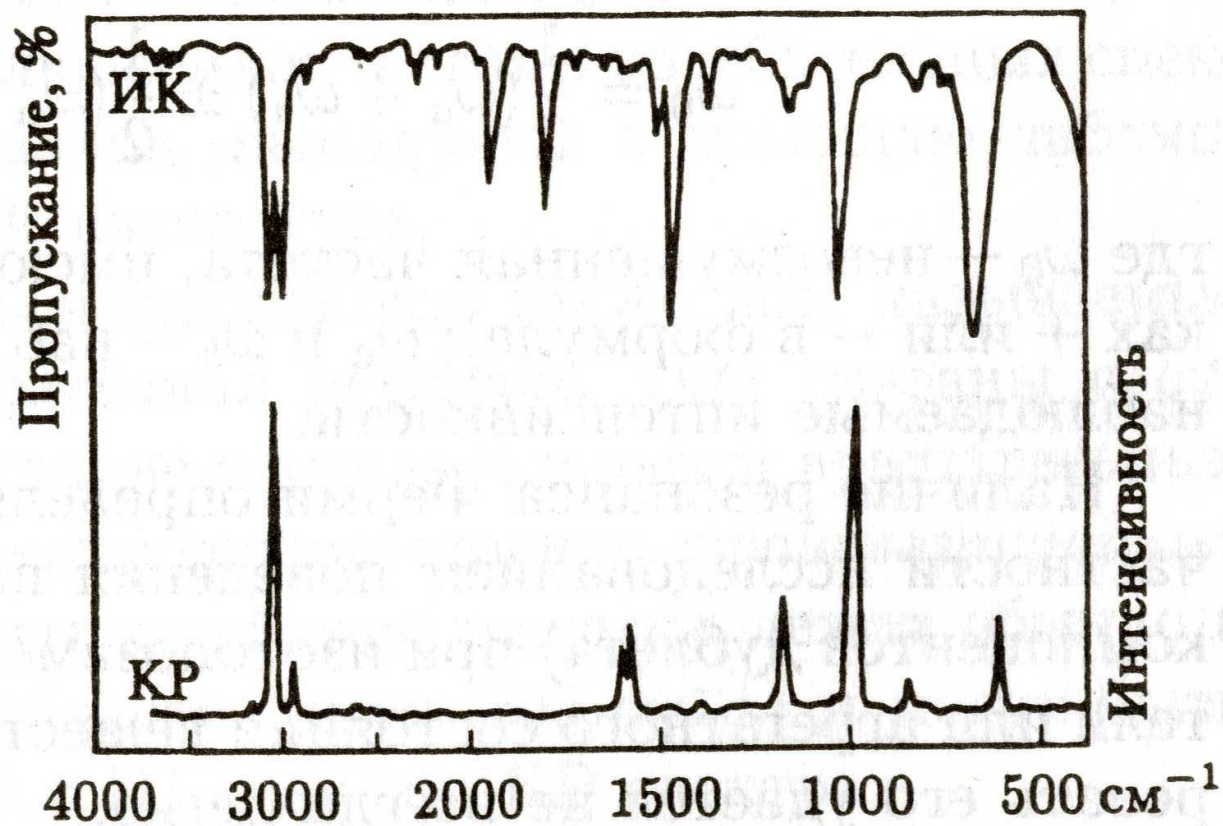
Соотнесение полос в ИК-спектрах белков с элементами вторичной структуры

Анализ «амид 1» области ИК-спектра рекомбинантного белка Sagalox



Спектроскопия комбинационного рассеяния



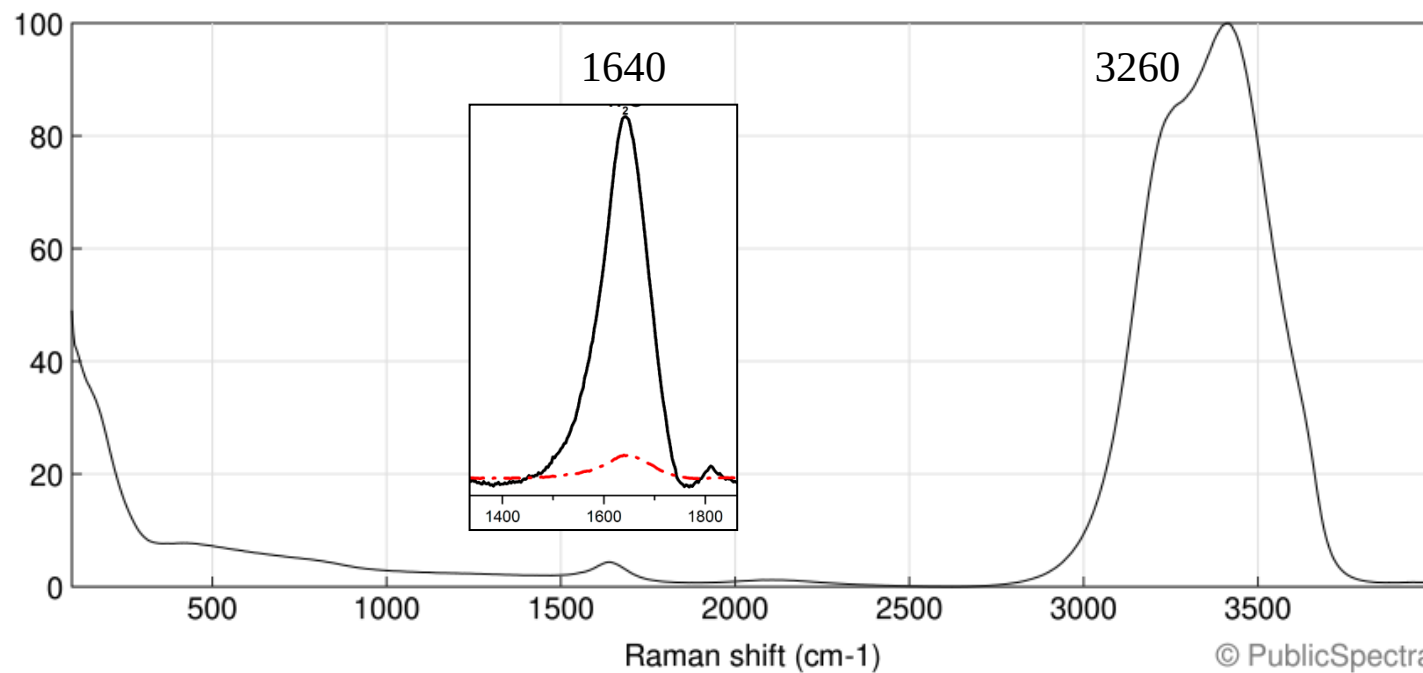


ИК (вверху) и КР- (внизу) спектры бензола C_6H_6

Raman Spectrum of Water

3260

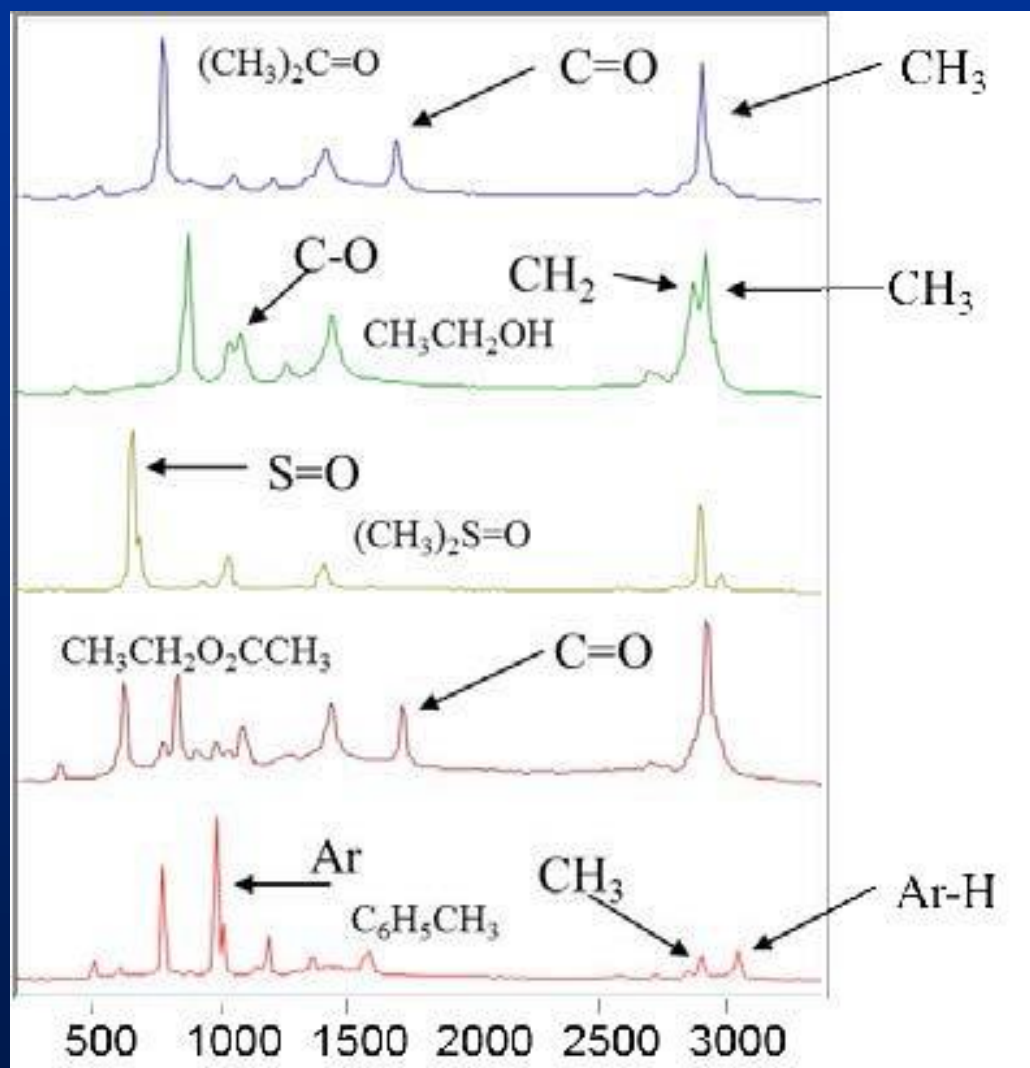
3425

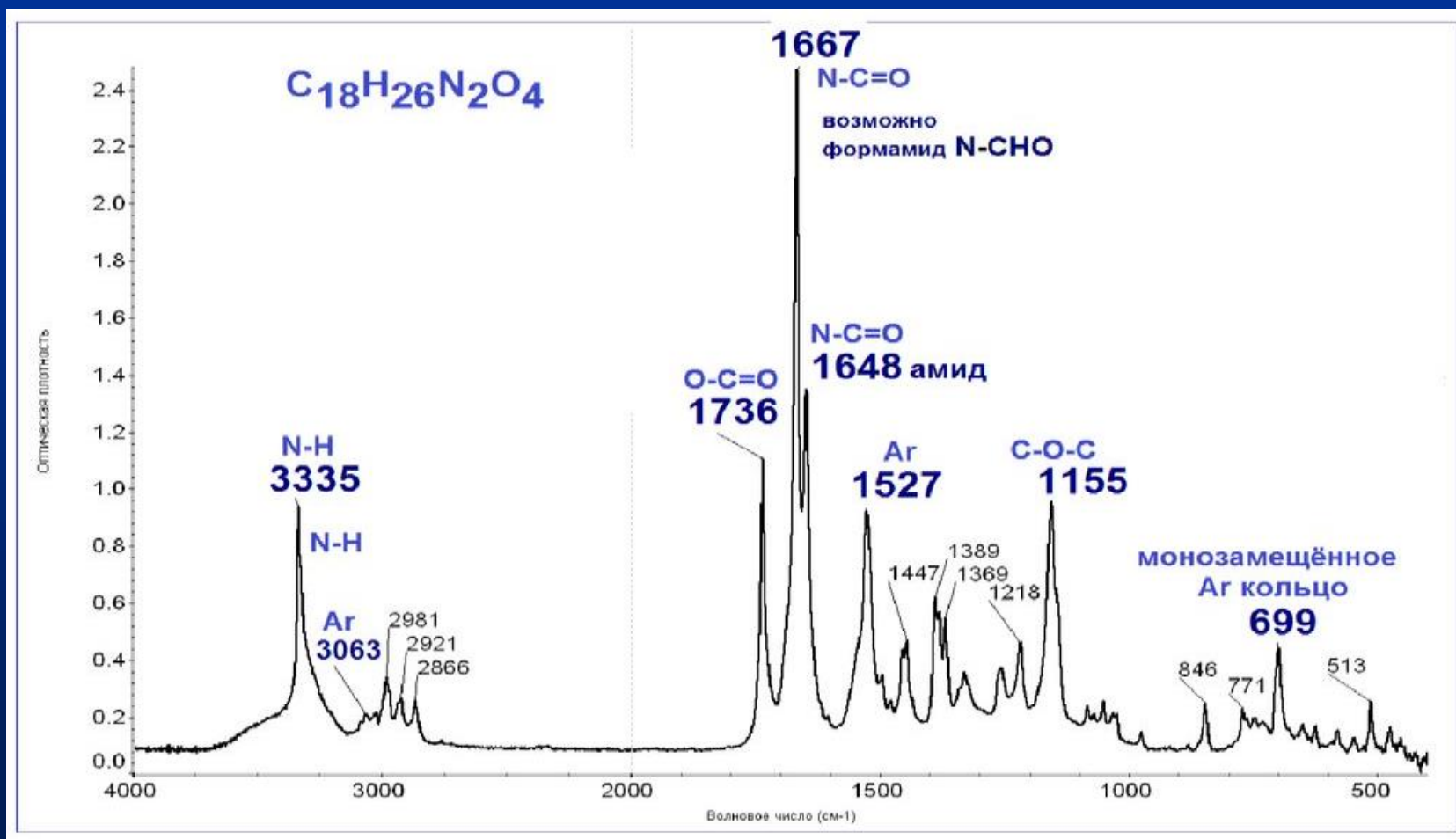


© PublicSpectra

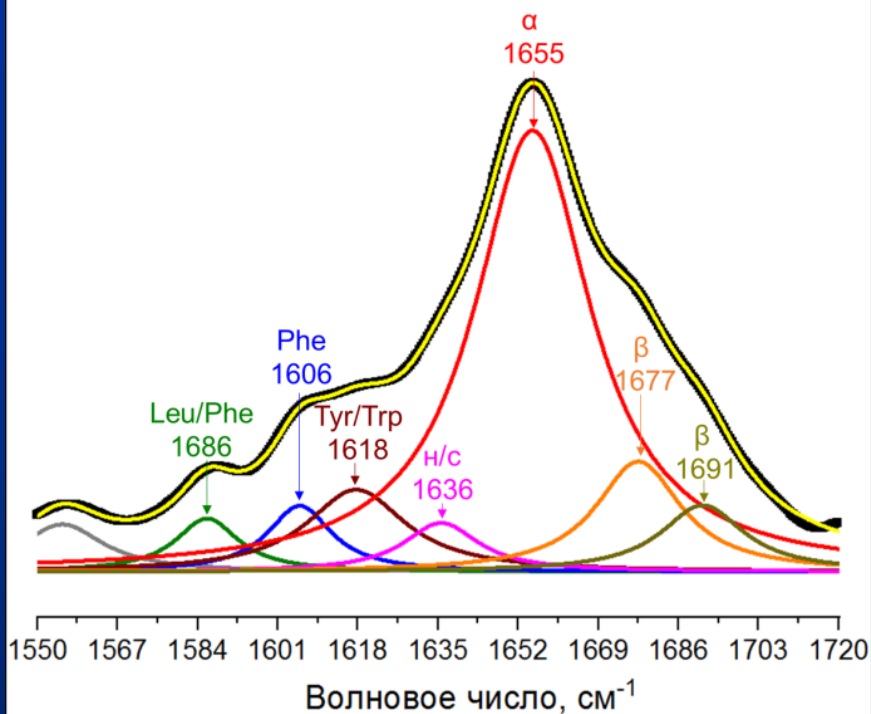
Характеристические частоты колебаний

Частота колебаний, см-1	Вид колебания
4400	Валентные Н—Н
3000– 2800	Валентные— С—Н
2125– 2118	Валентные — С $\equiv$ С—
2089	Валентные С $\equiv$ N
1820– 1650	Валентные =C =O
1680– 1640	Валентные =C =C= X=NO ₂
1550– 1520	Валентные для цепочки — С—С — C=S
1200 – 800	
1050	Колебания ароматического кольца
990	Валентные — С—N—
880	Деформационные С—Н
742– 716	

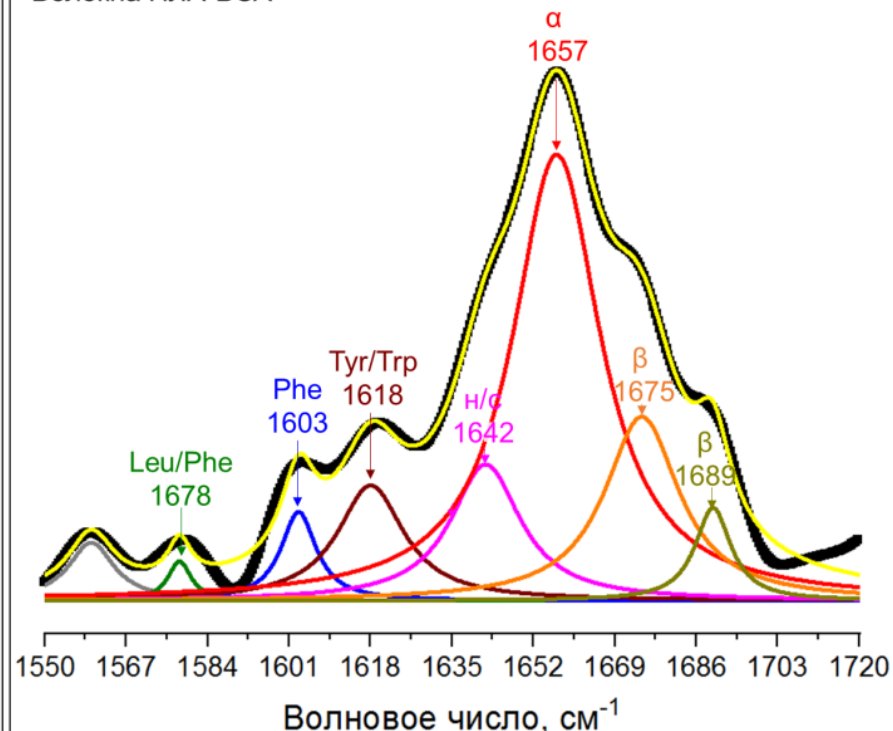




Волокна БСА



Волокна ПЛА-БСА



Из диссертации Павловой Е.Р.

Мультипиковое разложение функциями Лоренца полосы амид I спектров КР от волокон БСА и БСА-ПЛА

ПЛА - полилактид

Схема КР-спектрометра с двойным монохроматором

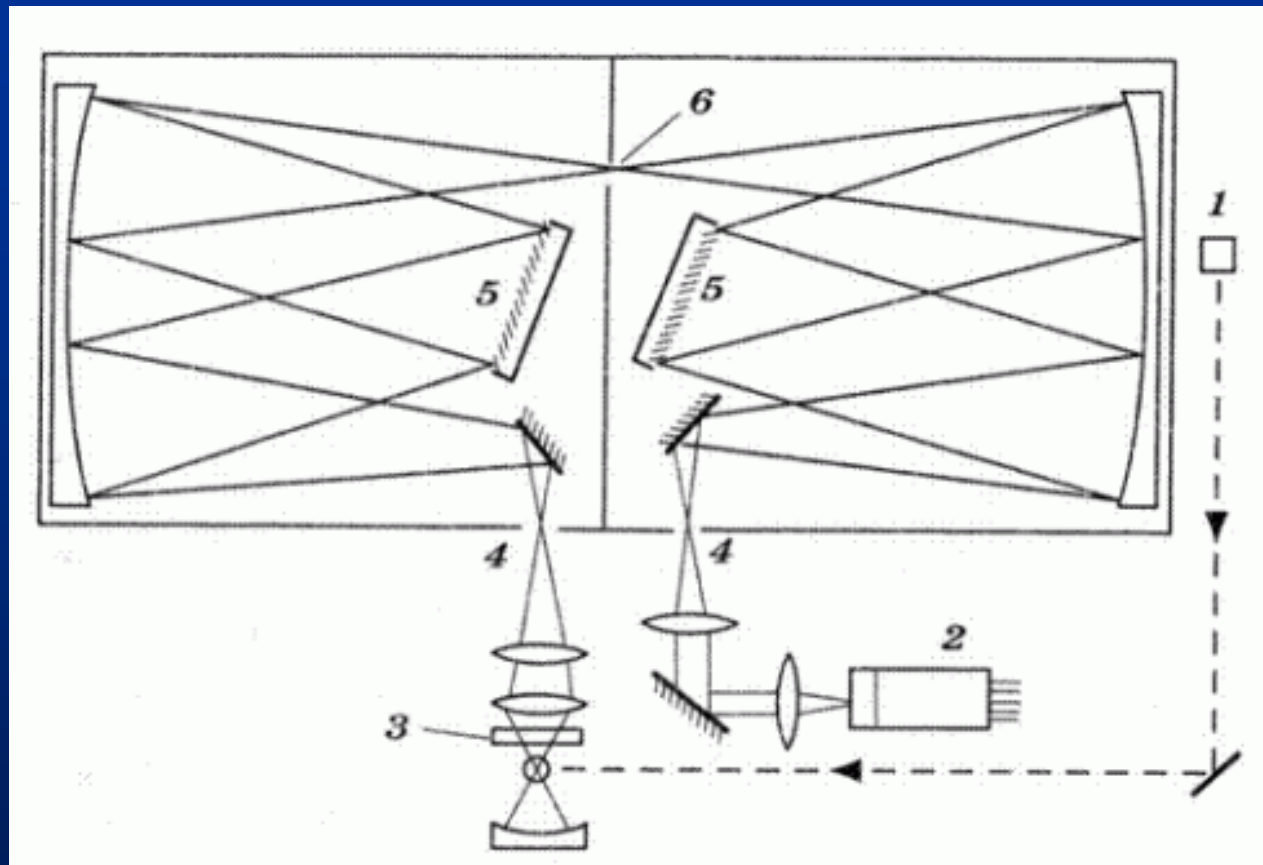
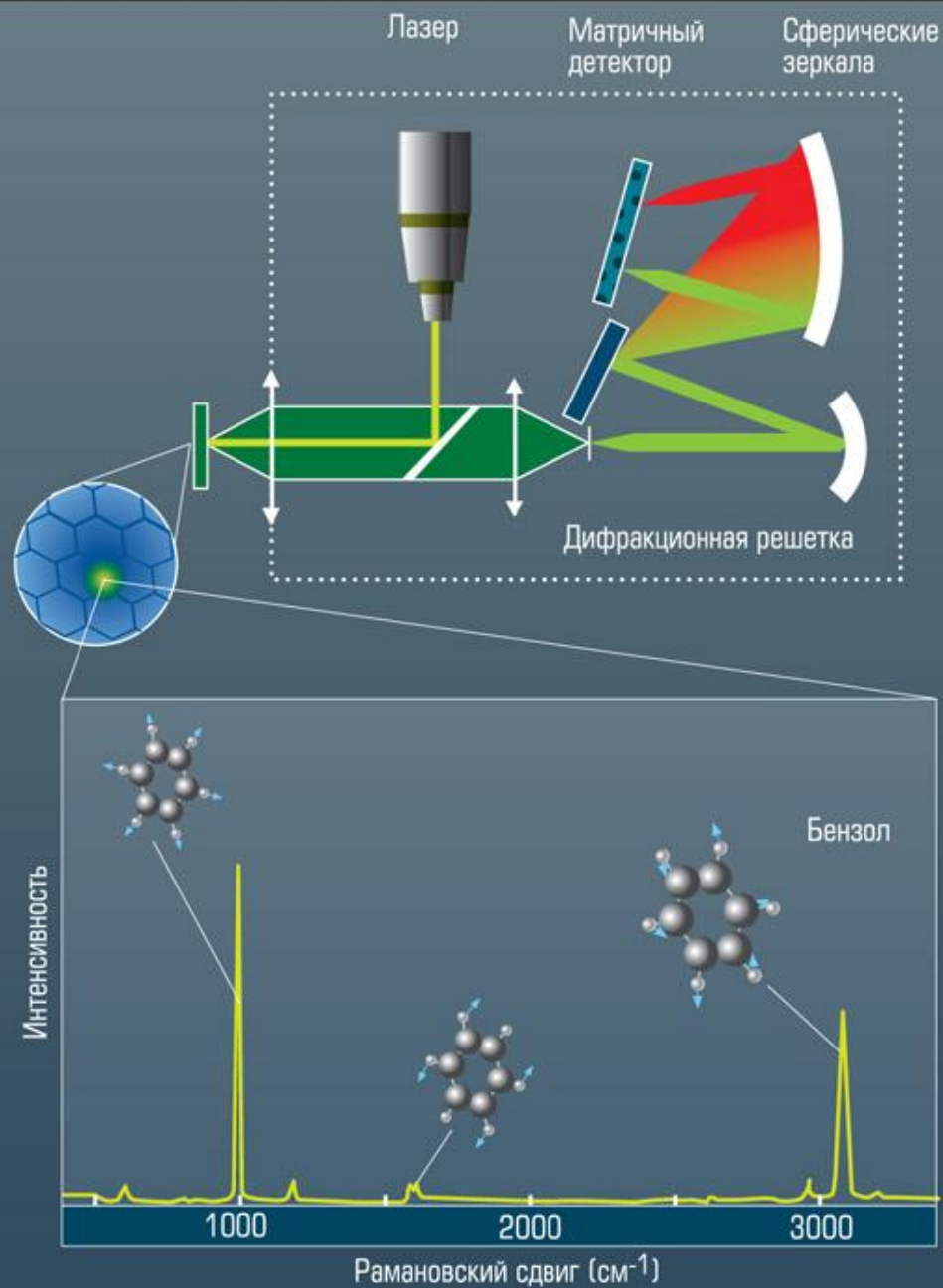
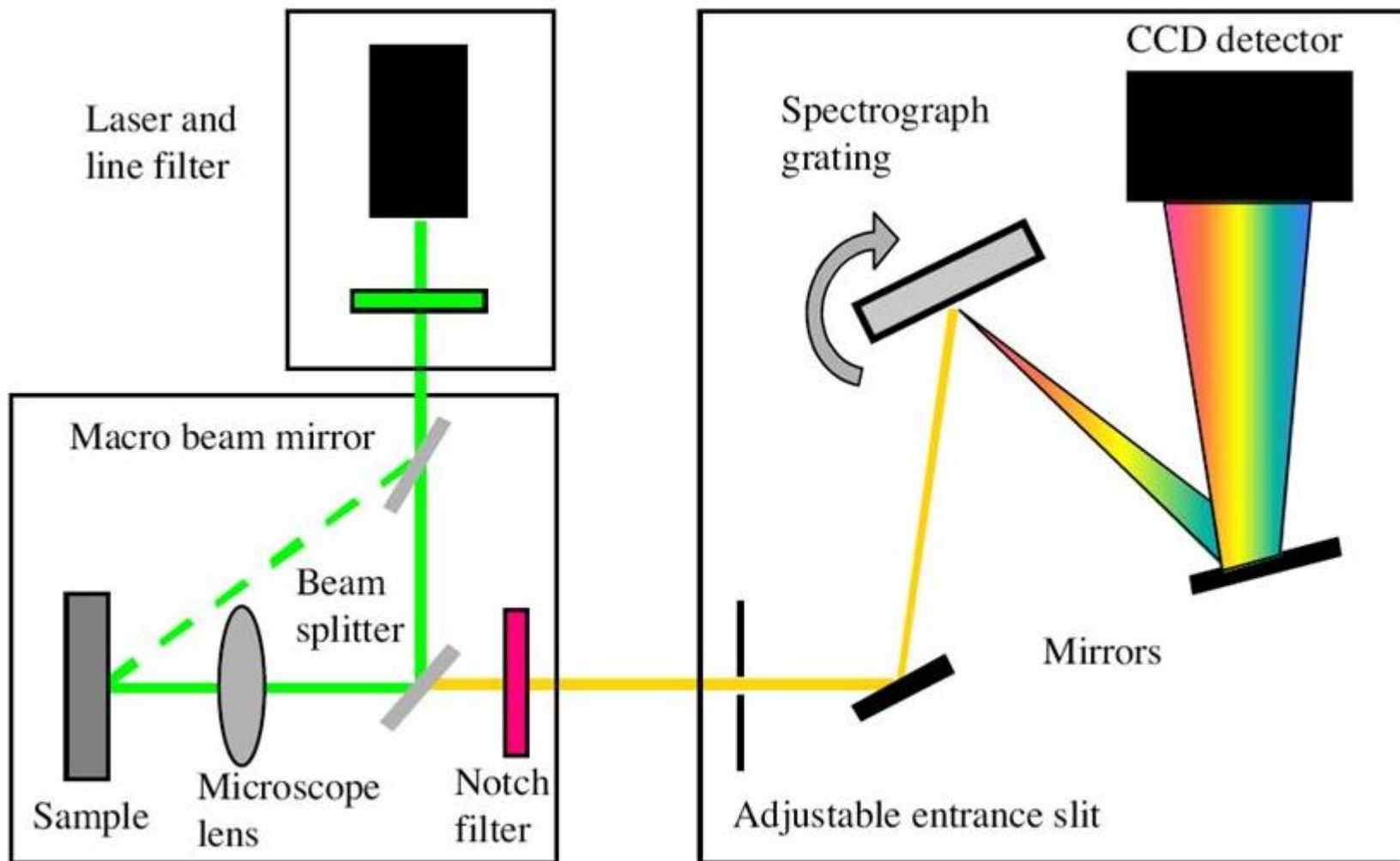
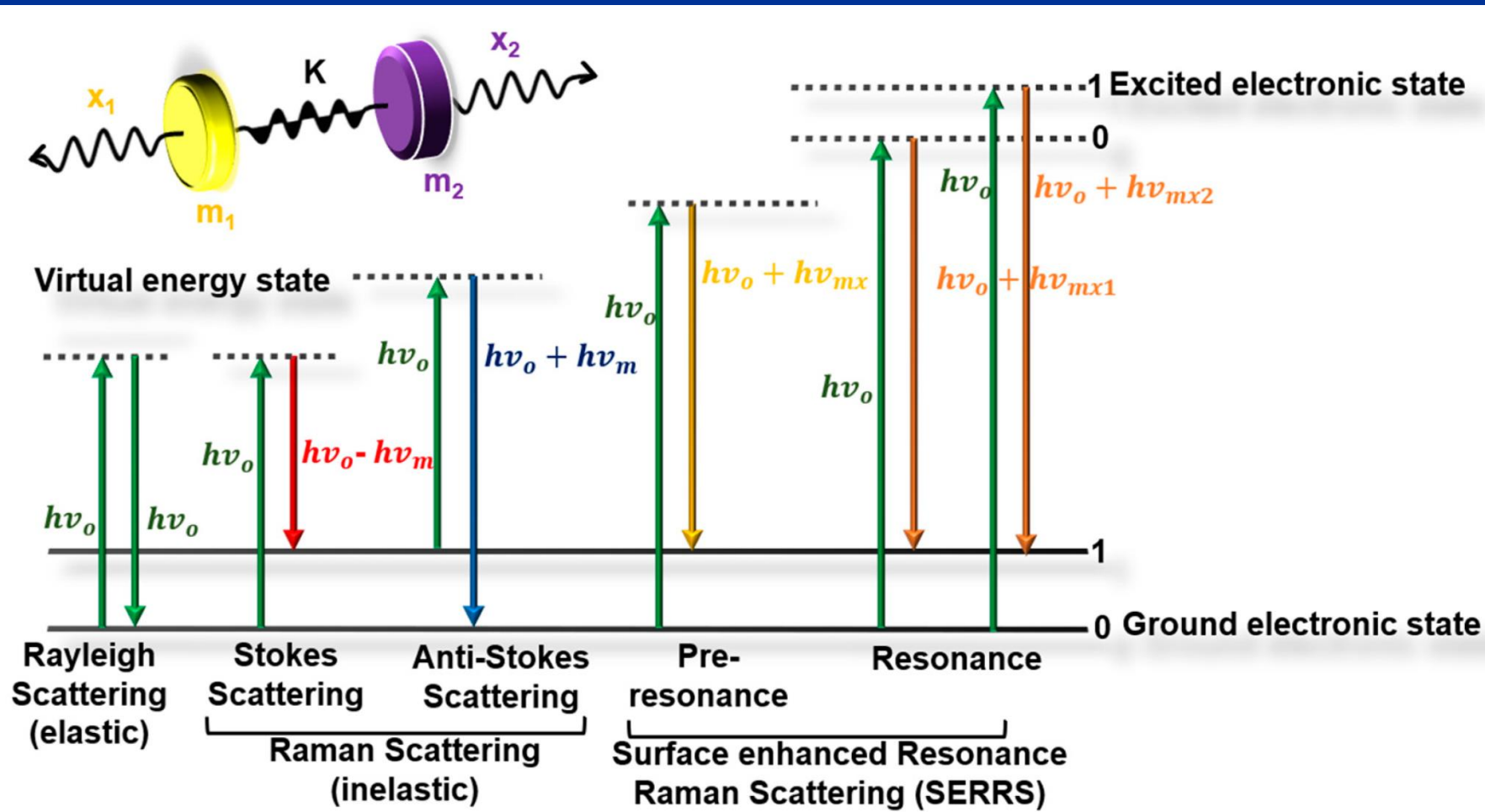
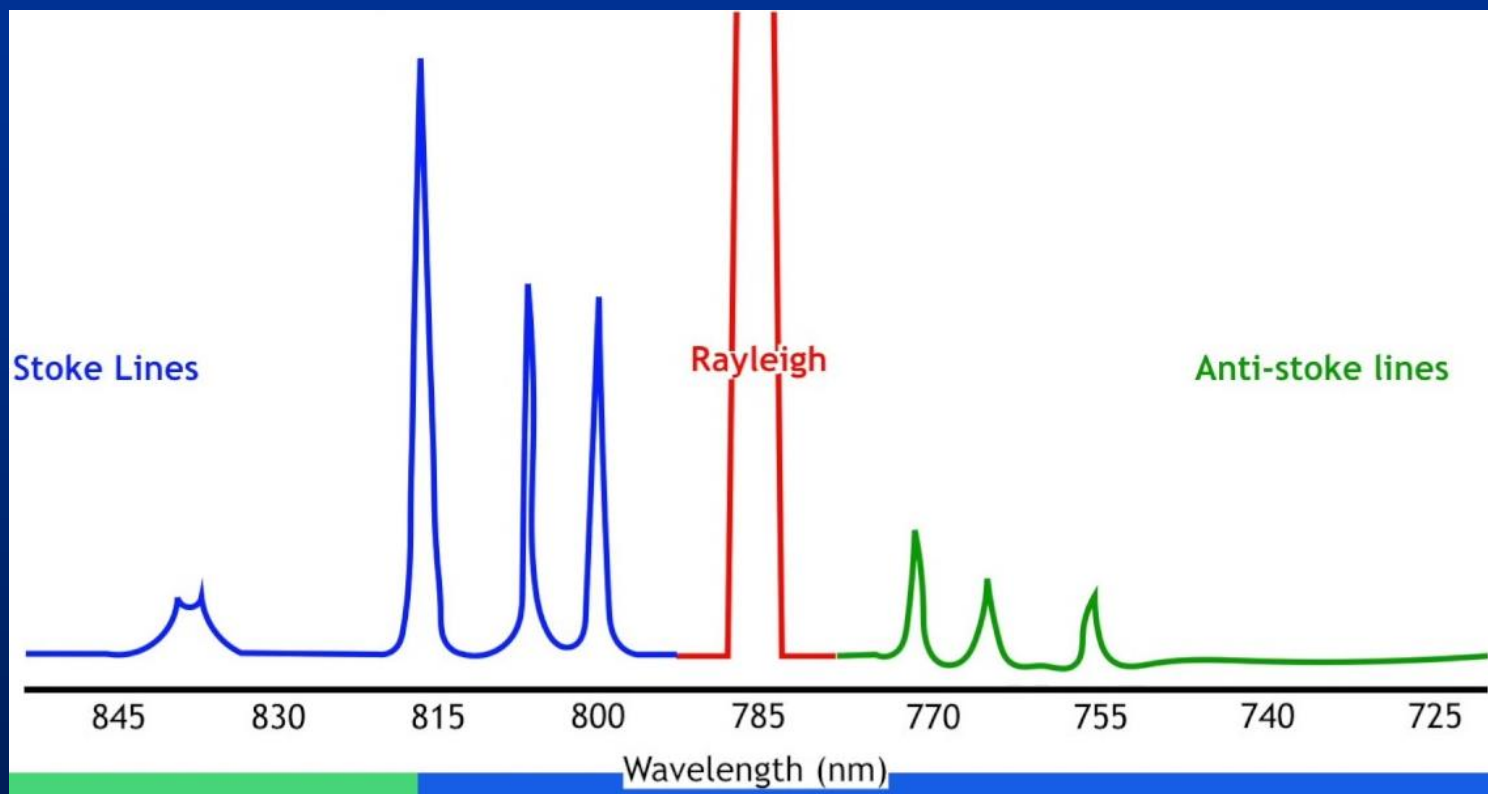


Схема рамановского спектрометра

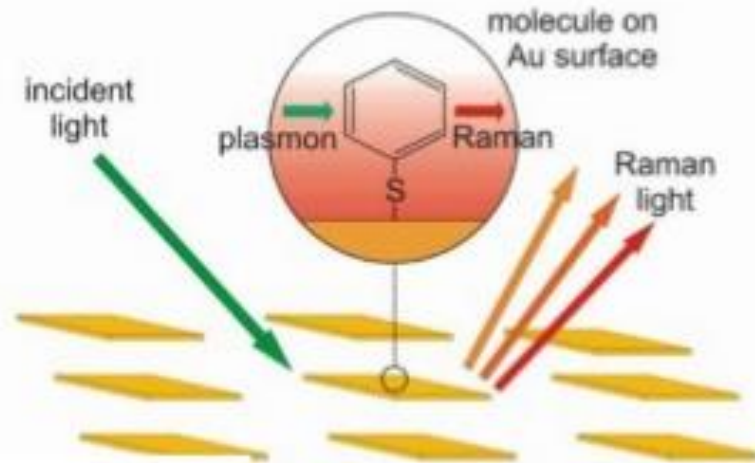




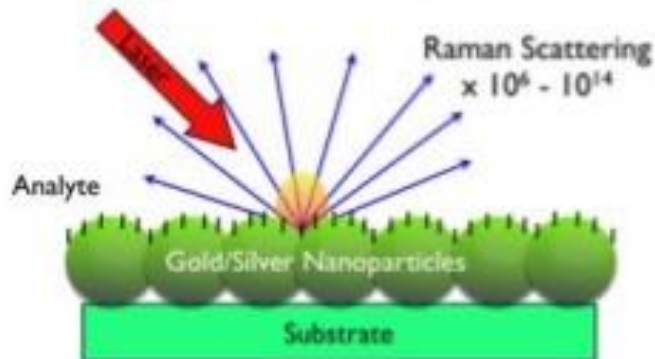




Surface enhanced Raman spectroscopy

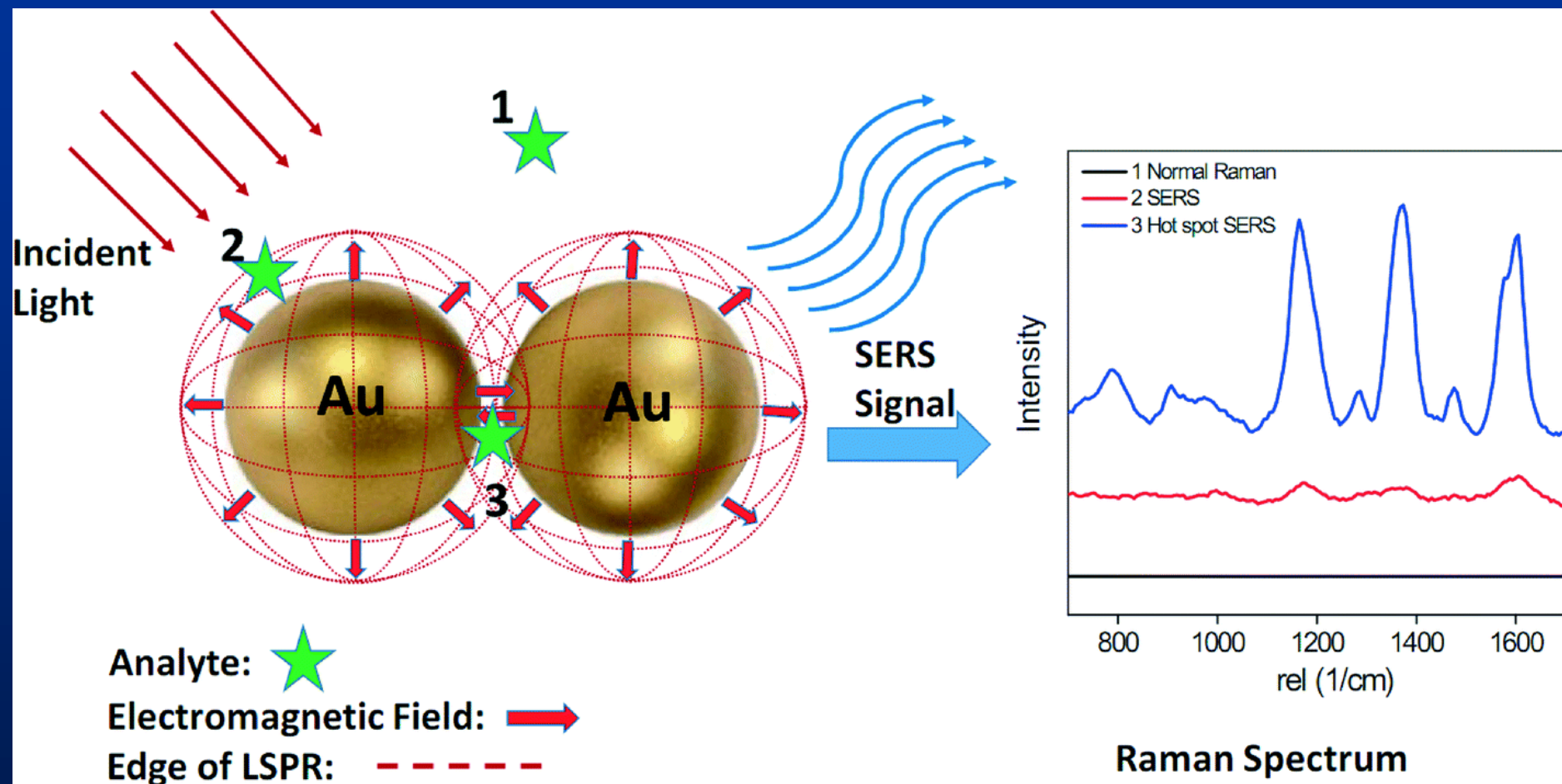


Nanoparticles = nano amplifier

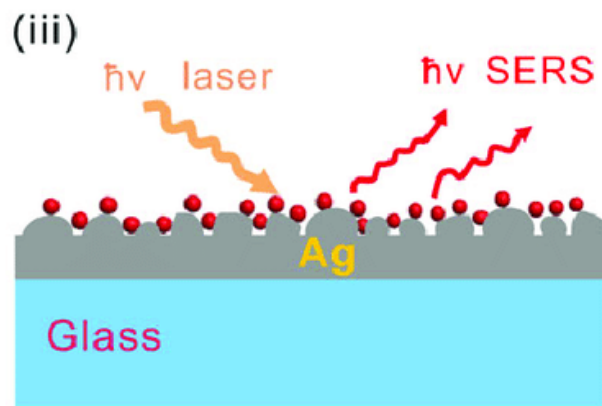
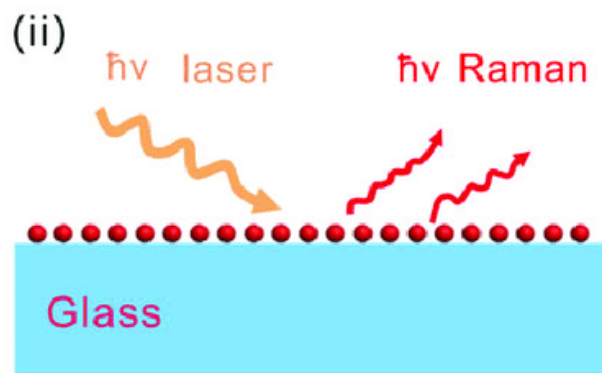
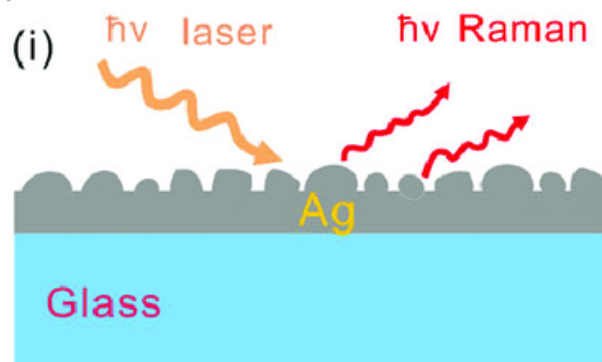


Au or Ag NPs

The enhancement mechanisms are roughly divided into chemical enhancement and electromagnetic enhancement



(a)



● Biomolecule in blood serum

(b)

