

Biomolekulių spektroskopija: Įvadas

Kas ta spektroskopija?

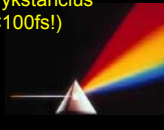
Spektroskopija – tai mokslas, kuris tiria medžiagą, panaudodamas EM spinduliuotės sąveiką su ja.

Pavyzdys – matomos (VIS) srities spektroskopija – tai tiesiog biomolekulių spalvų stebėjimas:

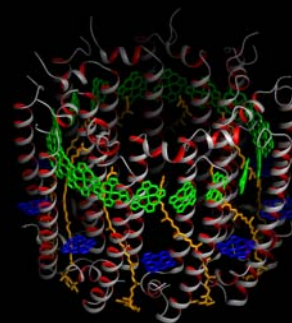


Kodėl spektroskopija?

- Šviesa – nežalojantis įrankis (svarbu biomolekulėms)
- Vienintelis "paprastas" būdas pažinti kvantines sistemas
- Metodai leidžia pasiekti didelį tikslumą, pamatyti labai nedidelius skirtumus tarp molekulių
- Yra galimybė matyti sistemų dinamiką, t.y. 'realiam laike' stebėti biologiniuose objektuose vykstančius procesus (charakteringi laikai gali būti <100fs!)

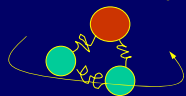


Mėgstama molekulė

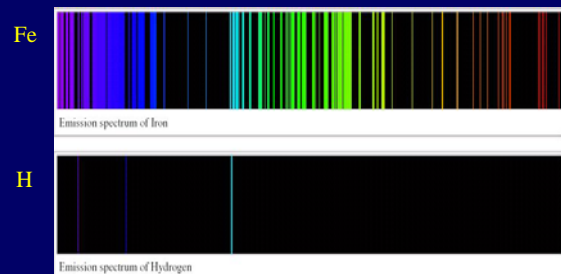


Molekulių energijos lygmenys

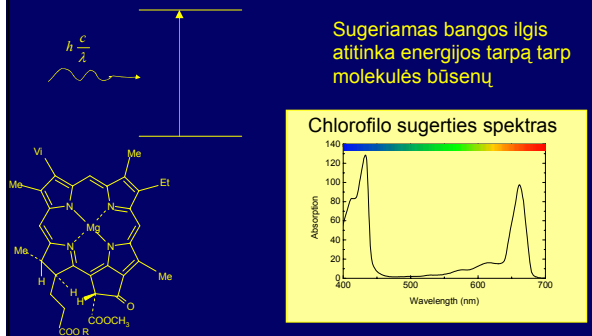
- Molekulės – tai kvantiniai objektai, todėl joms, kaip ir atomams, būdingi *diskretiniai energijos lygmenys*.
- Tačiau, skirtingai nuo atomų, molekulių energetiką veikia
 - Branduolinės pasistemės virpesiai
 - Rotacijos (sukimasis dujų fazėje)
 - Sąveikos su aplinka (pavyzdžiui, tirpikliu, baltymu, kitomis molekulėmis)
 - Cheminė struktūra



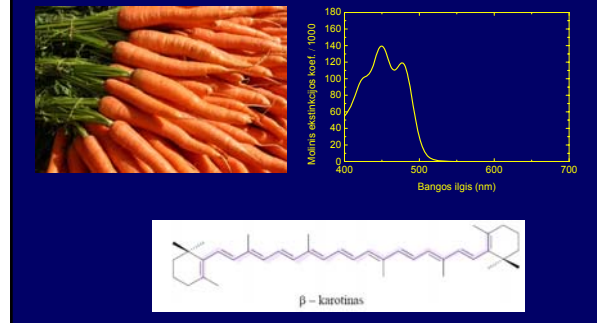
Atomų Spektrai



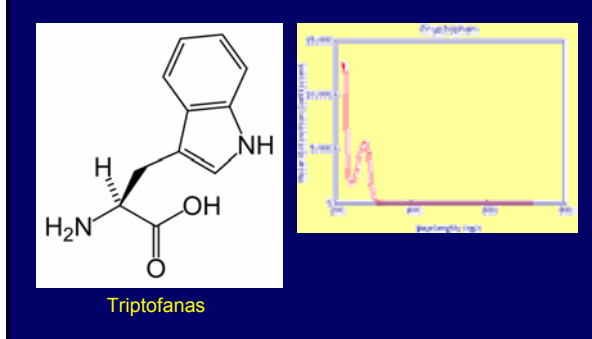
Molekulių energijos lygmenys ir spektrai



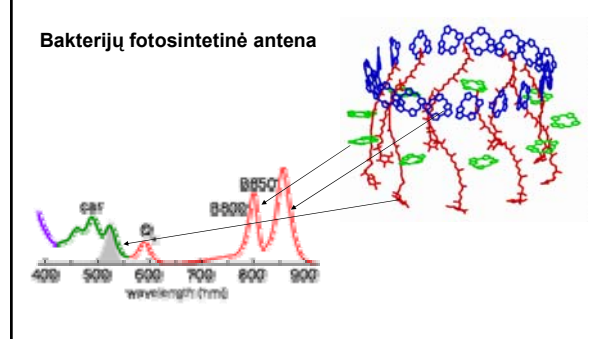
Molekulių energijos lygmenys ir spektrai



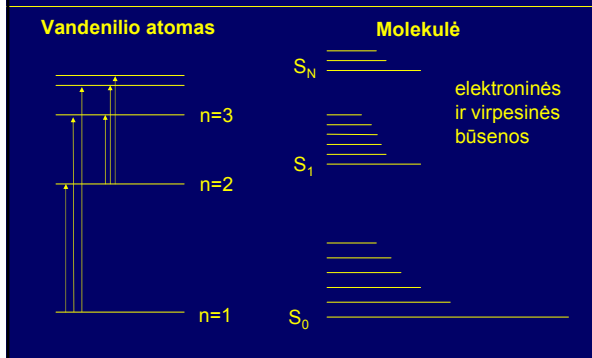
Molekulių energijos lygmenys ir spektrai



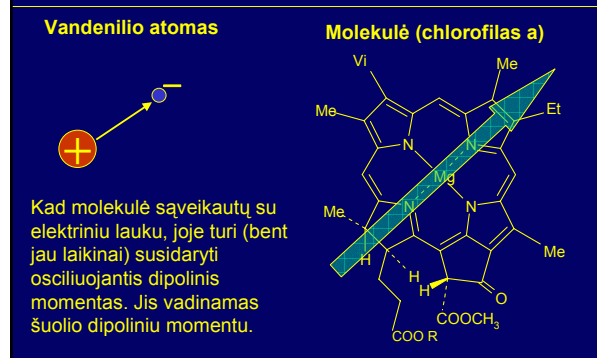
Molekulių energijos lygmenys ir spektrai



Molekulių energijos lygmenys



Molekulė – tai dipolis



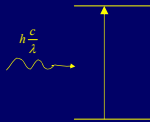
Molekulė – tai dipolis

Dipolinio momento didumas nusako spektrinės linijos intensyvumą.

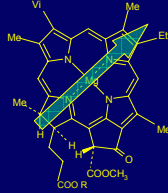
$$\mu_{fi} = \int \varphi_f^* \hat{\mu} \varphi_i dr$$

Šuolio tikimybė (dar vadinama Einšteino koeficientu)

$$P_{fi} \sim |\mu_{fi}|^2$$



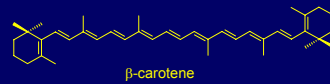
Molekulė (chlorofilas a)



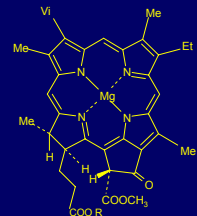
VIS/nIR srities spektrai ir π elektronų sistemos

Jei molekulės elektronai lokalizuoti (nėra konjuguotų dvigubų jungčių), tai tokia molekulė sugers tik UV šviesą. Matomoje srityje sugeria molekulės, turinčios konjuguotų jungčių:

beta-karotinas

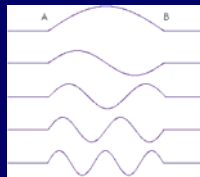


Chlorofilas



VIS/nIR srities spektrai ir π elektronų sistemos

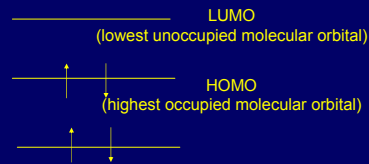
Fizikinė priežastis suprantama iš paprasto kvantinės mechanikos uždavinio su dalele potencialo duobėje. Analogija galima, nes konjuguotoje sistemoje elektronai yra delokalizuoti.



Kuo didesnė duobė, tuo mažesni tarpai tarp leistinų energijų, tuo raudonesni sugeriami bangų ilgiai.

Molekulių energijos lygmenys

Paprastai elektronai orbitales užpildo taip, kad energija būtų kuo mažesnė – į kiekvieną orbitale telpa du elektronai su priešingais sukiniams taip, kad bendras sistemos sukiny būtų lygus nuliui (Hundo taisyklė).



tokios būsenos, kurių sukiny lygus nuliui, vadinamos singletinėmis

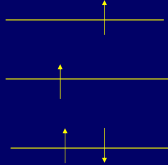
Molekulių energijos lygmenys

Tačiau sužadinus molekulę šviesa, egzistuoja tikimybė, kad sužadinto elektrono sukiny apsivers ir gausime tripletinę būseną:

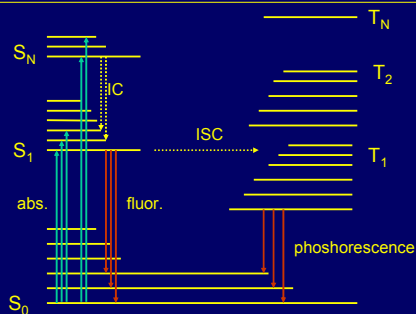
Singletinė sužadinta būseną, sukini antilygiagretūs



Tripletinė sužadinta būseną, sukini lygiagretūs



Molekulių energijos lygmenys: Jablonskio diagrama



kiekvienas šuolis tarp bet kurių 2 būsenų turi savo dipolinį momentą

Molekulių energijos lygmenys: Jablonskio diagrama

Jablonskio diagrama leidžia kokybiškai paaikškinti molekulių sugerties ir švytėjimo spektrus

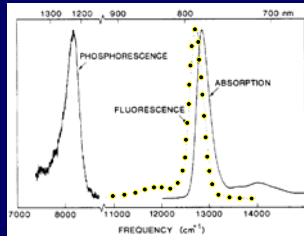


Figure 1. Absorption, fluorescence, and phosphorescence spectra of bacteriochlorophyll *a* in 10% pyridine/2-methyltetrahydrofuran (v/v) at 77 K (6-coordinate). The bacteriochlorophyll *a* concentrations were about 40, 2, and 100 μ M, respectively. The spectra have been scaled for convenient presentation; the phosphorescence intensity is about 10^6 times weaker than the fluorescence. Excitation wavelengths were 605 nm for phosphorescence and 610 nm for fluorescence (Q_y excitation). The emission spectra are corrected for the spectral response of the detection system (note the break in the horizontal scale).

Larry Takiff and Steven G. Boxer*
J. Am. Chem. Soc. **1988**, *110*, 4425–4426

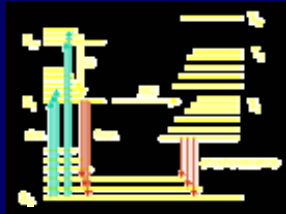
Molekulių energijos lygmenys: ir spektrus lemiantys procesai

1. Sugertis: šuoliai iš pagrindinės būsenos į sužadintas singletines būsenas, sugeriamas fotonas;
2. Fluorescencija: šuoliai iš singletinės sužadintos būsenos į pagrindinę, išspinduliuojamas fotonas;
3. Fosforescencija: šuoliai iš tripletinės sužadintos būsenos į pagrindinę, išspinduliuojamas fotonas.



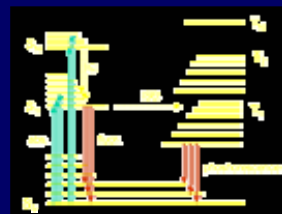
Procesai, nesusiję su šviesa, bet netiesiogiai veikiantys spektrus

1. Vidinė konversija (angl. *internal conversion*): energijos relaksacija tarp vibracinių (o per vibracinius – ir tarp elektroninių) lygmenų;
2. Interkombinacinė konversija (angl. *intersystem crossing*) sužadintos būsenos elektrono sukinio pasikeitimas – šuolis iš singletinės į tripletinę būseną

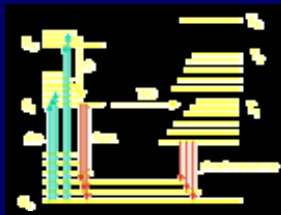


Keletas negriežtų taisyklių apie spektrus

1. Molekulės sugeria iš pagrindinės būsenos apatinio vibracinio lygmens (visuotinio tingėjimo principas ☺)
2. Molekulės spinduliuoja iš pirmosios sužadintos būsenos apatinio vibracinio lygmens (Kasha taisyklė)



Keletas negriežtų taisyklių apie spektrus



Iš visuotinio tingėjimo principo ☺ ir Kasha taisyklės gauname veidrodinės simetrijos taisyklę: fluorescencijos spektras – tai veidrodinis sugerties spektro atspindys. Atstumas tarp sugerties ir fluorescencijos spektrų maksimumų vadinamas **Stokso poslinkiu**

Stokso poslinkis

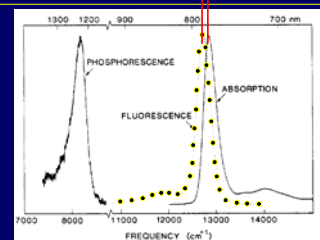


Figure 1. Absorption, fluorescence, and phosphorescence spectra of bacteriochlorophyll *a* in 10% pyridine/2-methyltetrahydrofuran (v/v) at 77 K (6-coordinate). The bacteriochlorophyll *a* concentrations were about 40, 2, and 100 μ M, respectively. The spectra have been scaled for convenient presentation; the phosphorescence intensity is about 10^6 times weaker than the fluorescence. Excitation wavelengths were 605 nm for phosphorescence and 610 nm for fluorescence (Q_y excitation). The emission spectra are corrected for the spectral response of the detection system (note the break in the horizontal scale).

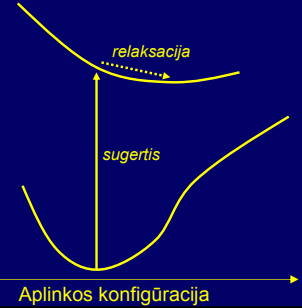
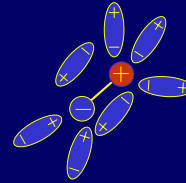
Iš kur atsiranda Stokso poslinkis?..

Prisimename Štarko efektą iš kvantinės mechanikos: patalpinus atomus (ir molekules) į elektrinį lauką, jų energijos lygmenys pasislenka:



Iš kur atsiranda Stokso poslinkis?..

Stokso poslinkis atsiranda dėl to, kad aplinkos (tirpiklio, baltymo) molekulės prisitaiko prie molekules konfigūracijos sužadintoje būsenoje



Iš kur atsiranda Stokso poslinkis?..



Tarpmolekulinių sąveikų sąlygotas Stokso poslinkis atsiranda dėl to, kad aplinkos (tirpiklio ar baltymo) molekulės prisitaiko prie molekules dipolinio momento ir poliarizuojamumo sužadintoje būsenoje

Poliarizuojamumas

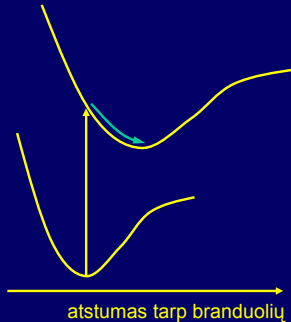
Tai molekules sugebėjimas įgyti dipolinį momentą išoriniame elektriniame lauke (laukus kuria, pvz., tirpiklio molekulės).

$$\vec{\mu} = \alpha \vec{E}$$



Iš kur atsiranda Stokso poslinkis?..

Dalis Stokso poslinkio atsiranda ir dėl to, kad molekules atomų branduoliai prisitaiko prie naujos elektronų debesėlio konfigūracijos sužadintoje būsenoje (pvz., keičiasi kovalentinio ryšio stiprumas)



Iš kur atsiranda Stokso poslinkis?..

Taigi, Stokso poslinkis atsiranda dėl to, kad pačios molekules branduoliai ir aplinkos molekulės prisitaiko prie molekules elektronų konfigūracijos sužadintoje būsenoje.

Kadangi sistema molekulė+tirpiklis visada stengiasi *minimizuoti* savo energiją, fluorescencijos spektras visada pasislenka į mažesnių energijų (ilgesnių bangų) pusę nuo sugerties spektro.

Spektroskopijos būna įvairios, pvz:

- Sugerties
 - elektroninė
 - virpesinė
- Fluorescencijos
 - Fluorescencijos
 - Fluorescencijos žadinimo

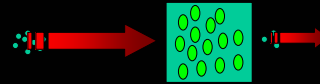


Sugerties spektroskopija

Šviesos intensyvumas praėjus pro l storio bandinį (sugerties dėsnis)

$$I = I_0 10^{-Al}$$

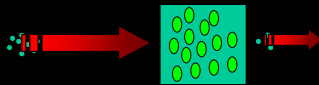
Taip apibėžus, eksponentės rodiklis vadinamas bandinio *optiniu tankiu*. Jei optinis tankis lygus vienetui, bandinys praleidžia 10% į jį krintančios šviesos (spindulys susilpnėja 10 kartų).



$$OD = Al = \epsilon cl$$

Tai Bugerio-Lamberto-Bero dėsnis (Beer's law)

Šviesos sugertis



Jei medžiaga (tirpalas) šviesą praleidžia, o sugeria tik ištirpę molekules, optinis tankis proporcingas molekulių molinei koncentracijai:

$$OD = Al = \epsilon cl$$

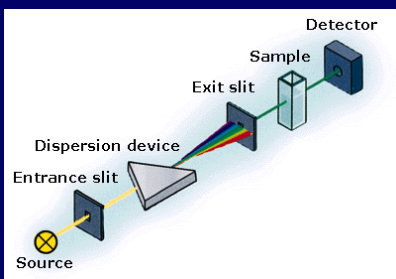
Tai Bugerio-Lamberto-Bero dėsnis (Beer's law), ϵ vadinamas moliniu ekstinkcijos koeficientu. Jis priklauso nuo bangos ilgio ir aprašo molekulių gebėjimą sugerti to bangos ilgio šviesą.

Klausimas, kad nemiegotumėt:

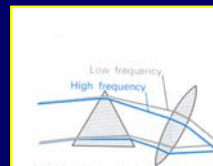


Koks turi būti bandinio optinis tankis, kad jį galėtume išmatuoti kuo tiksliau?

Molekulių sugerties spektrai: matavimas



Spektrometrų komponentai



16.4 The simple dispersing element is a prism, which separates frequencies spatially by making use of the higher refractive index of matter for high-frequency radiation. The shortest wavelength for which a glass prism can be used is about 400 nm, but quartz can be used down to 180 nm.



16.5 A diffraction grating is 'blazed' as shown here in order to enhance the intensity of the diffracted radiation in each direction. A diffraction grating works on the principle of interference between waves reflected from the grating, as indicated schematically by the spherical wave fronts. Waves from different facets interfere with one another, and the direction of the resulting wave front depends on the wavelength of the radiation.

Molekulių spektrai: matavimas



Reikia pamatuoti intensyvumą su bandiniu ir be bandinio, todėl arba naudojami du spinduliai (tiksliau), arba atliekami du eksperimentai – su ir be bandinio, o tada imamas santykio logaritmas.

Realūs spektrofotometrai



Skenuojantis

Šviesolaidinis



Spektrofotometrai

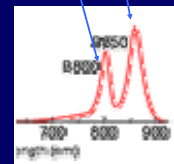
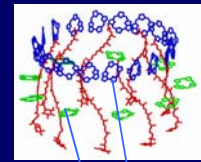
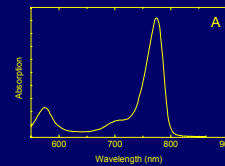
Firmos, gaminančios spektrofotometrus:

Shimadzu
Perkin Elmer
Beckman
Avantes
Ocean Optics
Cary

Sugerties spektrų informacija

Koncentracijos
Grynumas
Aplinka (tirpiklis, baltymas)
Molekulių tarpusavio sąveikos

Bakteriochlorofilas tirpale



Fluorescencijos spektroskopija

Molekulės sužadintos šviesa, detektuojami jų išspinduliuoti fotonai.

Metodui būdinga:

- Didelis selektyvumas
- Didelis jautrumas
- Yra informacija apie procesus sužadintoje būsenoje relaksaciją

Fluorescencijos spektroskopija

Fluorescencijos kvantinis našumas:

$$\phi = \frac{k_f}{k_f + k_{ic} + k_{isc} + k_{other}}$$

- other gali būti:
- energijos pernaša,
 - fotoreakcijos
 - fluorescencijos gesinimas...



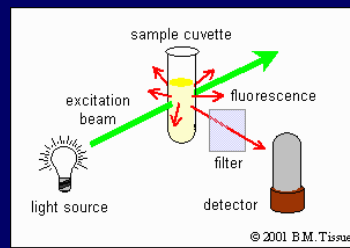
Fluorescencijos spektroskopija

Išmatuotas fluorescencijos intensyvumas molekulei

$$I \sim \phi |\mu_f|^2$$

Priklauso tiek nuo pačios molekulės savybių (šiuo dipolinio momento), tiek dėl procesų sužadintoje būsenoje, kurie lemia kvantinį našumą

Principinė spektrofluorimetro schema



Fluorimetrai

Firmos, gaminančios spektrofluorimetrus:

Shimadzu
Perkin Elmer
Beckman
Spex

Ocean Optics, Avantes
(šviesolaidiniai)



Fluorescencijos žadinimo spektroskopija

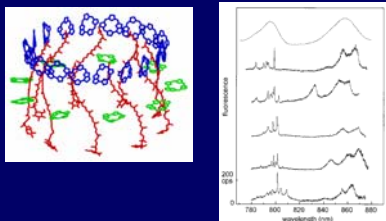
Detektuojame fluorescenciją ties vienu (maksimumo) bangos ilgiu ir žiūrime, kaip intensyvumas priklauso nuo žadinimo bangos ilgio.

“Normaliose” molekulėse, kurios tiesiog perspinduliuoja sugertą šviesą šis spektras turėtų sutapti su sugerties spektru.

Kam tada jį matuoti?

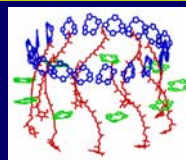
Fluorescencijos žadinimo spektroskopija: galimybės

Galima pamatuoti pavienių molekulių 'sugerties' spektrą

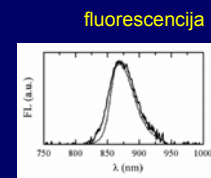
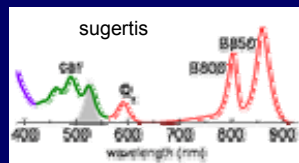


Kai molekulės toli viena nuo kitos, jų spektrai – atskiros linijos, o kai jas kartu laiko sąveikos, gaunam vieną ar kelias plačias. Tai rodo, kad sąveikaujančios molekulės sudaro vieną 'supermolekulę'

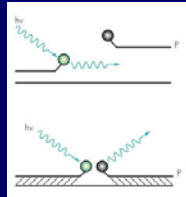
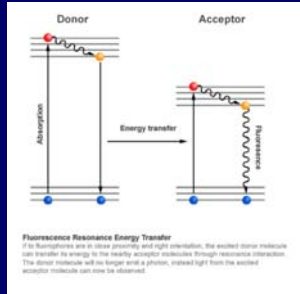
Fluorescencijos spektras



O kur kitos juostos, kurias matome sugerties spektre?

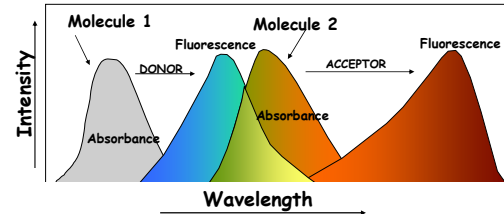


FRET



Fluorescence Resonance Energy Transfer

$$k_{DA} \sim \frac{1}{R^6} \kappa \int \frac{F_D(\omega) A_A(\omega)}{\omega^4} d\omega$$



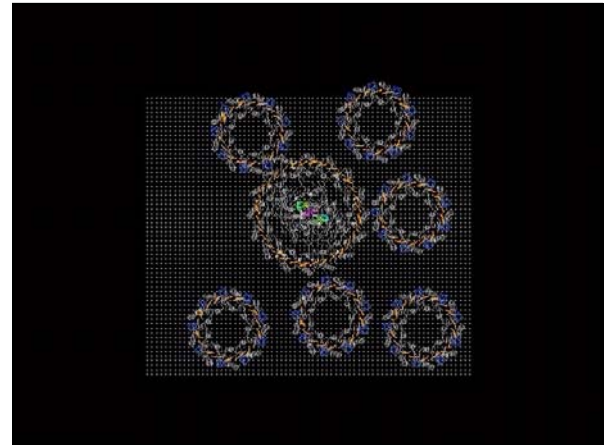
FRET

Dėl energijos pernašos veikia šviesą surenkančios antenos: jos sugeria fotonus ir perduoda juos į reakcinį centrą...

Pernašos efektyvumą galime nustatyti išmatavę fluorescencijos žadinimo spektrą ir palyginę jį su sugerties spektru (jei pernaša 100%, abu spektrai sutaps).

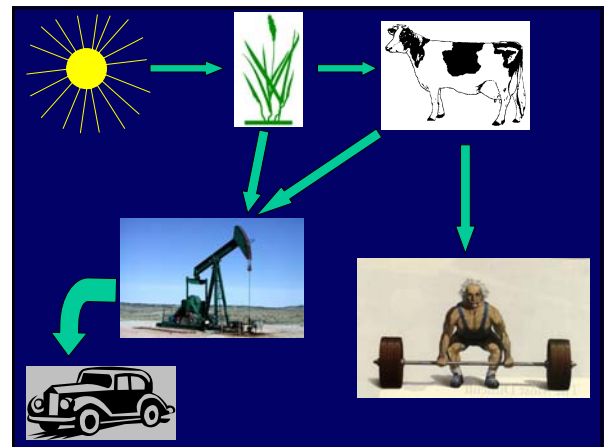
Pernašos eksperimentai leidžia matyti sąveikas tarp šviečiančių molekulių:

- FRET mikroskopija
- FRET spektroskopija

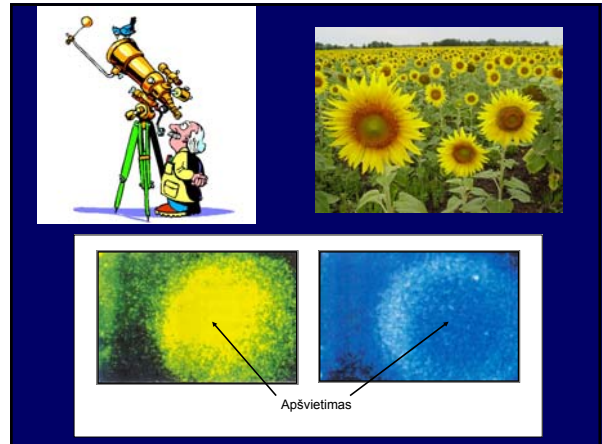


Kinetinė (laikinė) spektroskopija

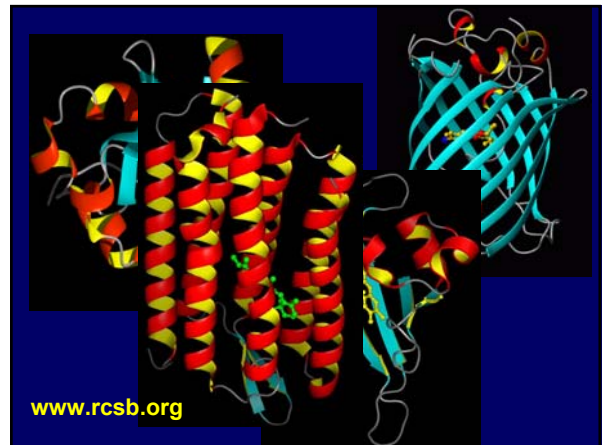
Šviesa suteikia energiją



Šviesa perduoda informaciją...



Šviesos sukeltos reakcijos prasideda nuo fotono sugerties, kuri vyksta baltymuose...

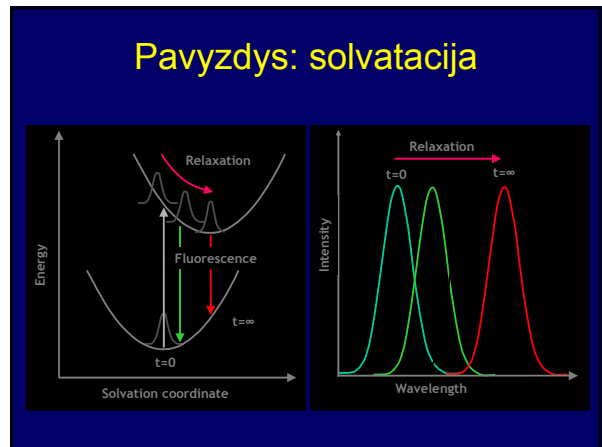
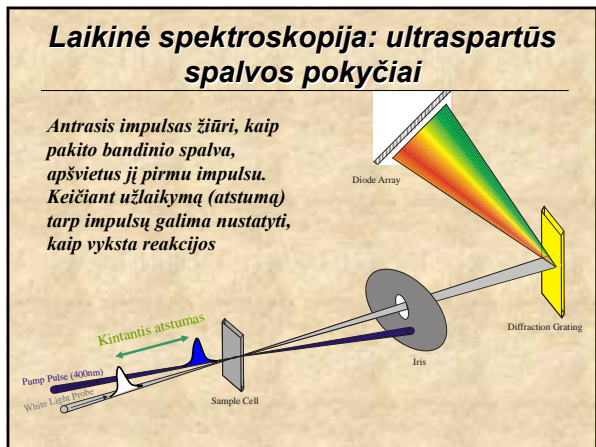
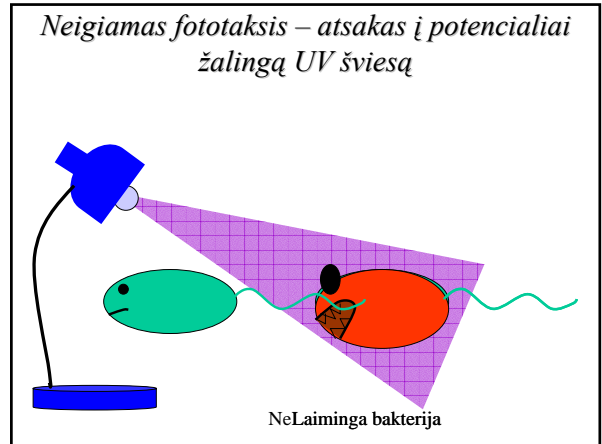
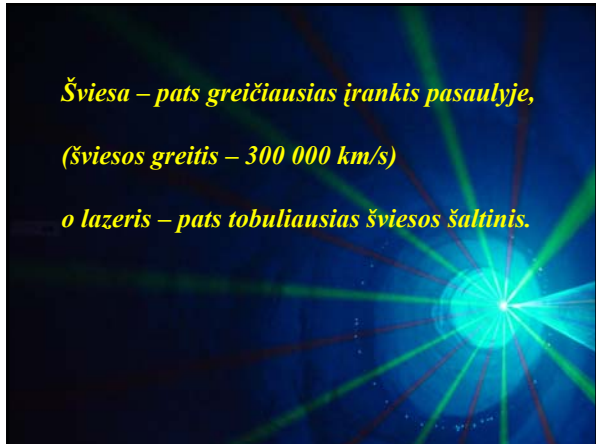


• *Šviesos dalelės energiją baltymas panaudoja per*

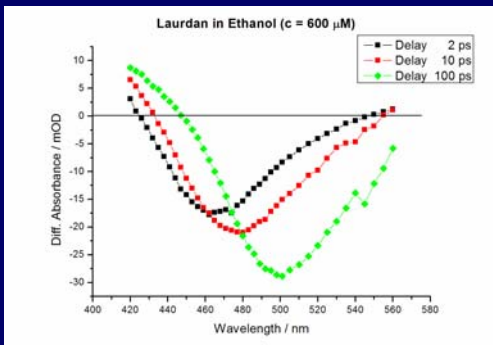
$$1\text{ps} = \sim 0.000'000'000'001\text{ s}$$

(vieną milijoninę vienos milijoninės sekundės dalį)



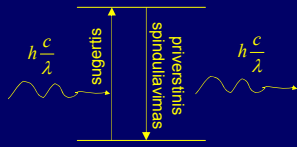
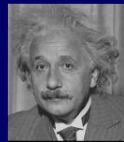


Laurdan'as – dažas naudojamas biologinių membranų mikroskopijoje



Einšteino koeficientai

Pabandysime aprašyti sugertį ir priverstinį spinduliavimą molekulėje turinčioje dvi – pagrindinę ir sužadintą būseną:



1. Atėjęs elektrinio lauko fotonas gali būti sugertas ir molekulė atsidurs sužadintoje būsenoje;
2. Ji taip pat gali priversti sužadintos būsenos molekulę išspinduliuoti fotoną ir grįžti į pagrindinę būseną

Einšteino koeficientai

- Sužadintos būsenos molekulių koncentraciją pavadinkime n_1 , o pagrindinės – n_0 .

Užrašome lygtis koncentracijoms:

$$\frac{dn_0}{dt} = -I(t)An_0 + I(t)Bn_1$$

- Sugerties ir priverstinio spinduliavimo koeficientus pavadinkime A ir B. Jie vadinami Einšteino koeficientais ir **aprašo tikimybę, kad atėjęs į molekulę fotonas bus sugertas (sukels spinduliavimą).**

$$\frac{dn_1}{dt} = I(t)An_0 - I(t)Bn_1$$

Einšteino koeficientai

Tarkime, kad ateinantis fotonų srautas $I(t)$ yra pastovus $I(t)=const.$ ir sistemoje nusistovėjo pusiausvyra, t.y.

$$\frac{d}{dt} \equiv 0$$

Surandame pusiausvyrą sužadintos ir pagrindinės būsenos užpildas (koncentracijas)

$$0 = -IAn_0 + IBn_1$$

$$n_0 = \frac{B}{A} n_1$$

“normaliems” atomams $B=A$ ir gauname, kad

$$n_0 = n_1$$

Einšteino koeficientai

Kadangi molekulė visuomet bus arba sužadintoje, arba pagrindinėje būsenoje, tai

$$n_0 + n_1 = 1$$

ir

$$n_0 = n_1 = \frac{1}{2}$$

Išvada: jokiu fotonų srautu negalima sukurti inversinės užpildos $n_1 > n_0$ dviejų lygmenų sistemoje!

Einšteino koeficientai

Einšteino koeficientai spektroskopijai svarbūs tuo, kad lemia sugerties (ir fluorescencijos) juostų intensyvumus. Juos galima apibrėžti kiekvienam spektre stebimam šuoliui.

