

Biofizyka II

Jakub J. Guzek

12 listopada 2019

Jak szukać tematów nano i sensors

Frazy klucze:

- Chemical gas sensors
- chemical bio sensors
- Biochemical sensors
- Optical fiber sensors
- Optical sensors
- Glucose sensors
- Cholesterol sensors
- Electrochemical sensors
- ATP sensors
- Infrared sensors

Zasady przy wybieraniu artykułu:

- Do publikacji płatnych można się dostać poprzez Bibliotekę Uczelnianą
- Należy sprawdzić czy artykuł opisuje metodę pomiaru, czy zawiera ładne rysunki, które można pokazać
- Nie należy wybierać artykułów przeglądowych
- Następnie należy go wysłać do akceptacji na *krzysztof_dolowy@sggw.pl*

1 Jony, elektrody, pomiary

Pomiar napięcia nazywa się pomiarem potencjometrycznym, a pomiar natężenia prądu nazywa się **pomiarem amperometrycznym**

Voltomierz ma duży opór wewnętrzny, który jest konieczny po to aby część prądu nie popłynęła bokiem obwodu elektrycznego. Amperomierz z kolei ma niewielki opór.

Przy dokładnych pomiarach, korzysta się z metody mostkowej, aby uniknąć przepływu prądu przez badany opornik. Jeżeli podłączy się kondensator do źródła prądu stałego, to prąd nie będzie płynął, tylko kondensator zostanie naładowany. Pojemność kondensatora zależy od tego co jest pomiędzy nakładkami kondensatora.

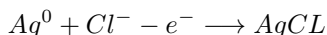
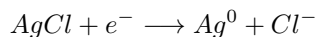
Pojemność kondensatora można zmierzyć metodą mostkową.

Przy pomiarach prądu elektrycznego lub różnicy potencjałów elektrycznych w roztworze wodnym musimy zastosować łącznik pomiędzy przewodnictwem elektronowym w przyrządzie pomiarowym i przodach oraz przewodnictwem jonowym w roztworze. Łącznikiem takim są elektrody.

Najczęściej spotykane są elektrody polaryzowalne. Są to metale szlachetne, zwłaszcza platyna, oraz elektrody grafitowe. Przez taką elektrodę prąd nie płynie chyba, że narzuci się tak wysoką różnicę potencjałów elektrycznych że na elektrodzie rozpocznie się reakcja chemiczna elektrolizy lub utleniania. Taką elektrodę można również stosować

do pomiarów przy szybko zmiennym potencjale – wówczas elektroda zachowuje się jak kondensator. Złoto nie jest tutaj tak optymalne jak platyna (czy grafit), gdyż wbrew powszechnej wiedzy nie jest w pełni metalem szlachetnym (reaguje na powierzchni)

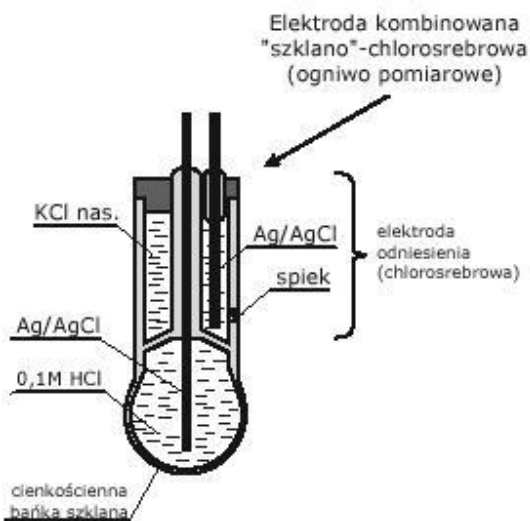
Najczęściej stosowaną elektrodą niepolaryzowalną jest elektroda chlorosrebrna. Elektroda ta utrzymuje stały potencjał pomimo przepuszczania przez nią prądu ponieważ cały czas mamy do czynienia ze srebrem pokrytym chlorkiem srebra. Srebro w takiej elektrodzie musi być ekstremalnie czyste, bez jakichkolwiek domieszek (99,99% srebra). W zależności od polaryzacji zachodzą reakcje:



Reakcja taka nie zachodzi w nieskończoność, lecz przy pomiarach potencjometrycznych nie ma dużego przepływu prądu, więc wyczerpanie reakcji nie jest problemem.

Na granicy dwóch roztworów (różniących się pH) powstaje różnica potencjałów zwana **potencjałem dyfuzyjnym** ponieważ jony poruszają się z różną prędkością. Jeżeli dwa roztwory są identyczne to nie powstanie potencjał dyfuzyjny, powstaje on w wypadku dwóch roztworów różniących się do siebie. Wynika to z różnej prędkości poruszania się różnych jonów np. Jony wodorowe (protony) i jony OH^- poruszają się o wiele szybciej niż inne jony, gdyż mechanizm ich ruchu jest inny niż innych jonów.

Pozbyć się tego można np. poprzez połączenie dwóch badanych roztworów **kluczem elektrolitycznym** np. chlorkiem potasu.



Rysunek 1: Schemat elektrody kombinowanej

Elektroda szklana to najczęściej stosowana elektroda jonoselektywna. Służy do pomiaru pH roztworu. Mierzy się napięcie – jest to metoda potencjometryczna.

Na wysoko-oporowej warstwie jonoselektywnej na skutek adsorpcji badanych jonów (proporcjonalnej do ich stężenia) powstaje różnica potencjałów – proporcjonalna do stosunku stężeń

Elektroda jonoselektywna jest bardzo dobrą i szybką metodą pomiaru zmiany stężenia, w przeciwieństwie do miareczkowania, które jest bardziej skłonne do produkowania błędów i wolniejsze. Elektroda szklana może być używana wielokrotnie.

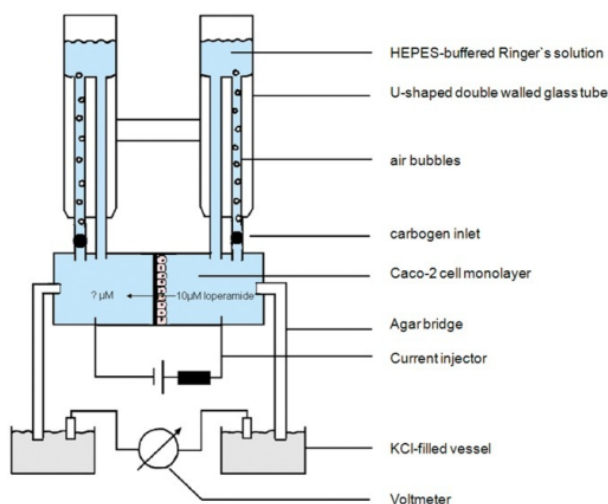
Zastosowanie metod potencjometrycznych do pomiarów biofizycznych:

- Komora Ussinga do pomiaru warstw komórek *in vitro*

Pomiar tą metodą pozwala badać jak szybko dana substancja przechodzi przez warstwę komórek nabłonkowych, w różnych warunkach.

- Metoda amperometryczna (nie potencjometryczna).

Elektroda jonoselektywna pozwala sprawdzić ilość jonów jak przepłynęła.



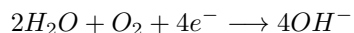
Rysunek 2: Schemat komory Ussinga

Metody pomiaru ilości jonów jakie przepływają przez pojedyncze białko kanałowe

- Metoda *patch clamp*
- *Black lipid membrane method*
 1. Na mały otwór oddzielający dwa naczynia nakładamy rozrwór lipidów który spontanicznie rozplywa się tworząc dwuwarstwę
 2. ...

To czy ma się do czynienia z kanałem przewodzącym kationy czy aniony można wyczytać z krzywej prąd-napięcie (badając do się dzieje przy zmianie potencjału)

- Pomiar amperometryczny. Elektroda tlenowa i jej odmiany – elektrody enzymatyczne. Bada się tutaj prąd płynący pomiędzy elektrodą odniesienia i elektrodą platynową przy napięciu przy którym zachodzi reakcja elektrodowa zużywająca tlen.



Do elektrody tlenowej można wstawić enzym np. glukozooksydazę, który katalizuje reakcję jakiejś substancji z tlenem – w ten sposób pośrednio można mierzyć zmiany stężenia.

Przykładowe pytania z tego tematu:

- Pytanie o elektrodę polaryzowalną i niepolaryzowalną
- Pytanie o elektrodę tlenową i enzymatyczną

2 Metody optyczne

Światło jako pierwszy rozszczepił Newton przy pomocy pryzmatu. Obecnie częściej używa się specjalnych siatek dyfrakcyjnych. Newton udowodnił w ten sposób, że światło białe jest mieszaniną wszystkich barw, oraz że jeżeli „wytnie się” z tego jeden promień światła i przepuści przez pryzmat to nie ulegnie on dalszemu rozszczepieniu. Należy przy tym pamiętać, że światło widzialne jest tylko drobnym wycinkiem spektrum promieniowania elektromagnetycznego. Fale promieniowania elektromagnetycznego o bardzo małej długości mogą mieć wirtualnie nieskończoną częstotliwość drgań. Im większa częstotliwość drgań fali elektromagnetycznej tym większą niesie ona ze sobą energię, już światło widzialne powoduje rozpad wrażliwych molekuł, a ultrafiolet może zniszczyć teoretycznie każdą cząsteczkę.

Związki chemiczne (organiczne) posiadające w cząsteczce dużą ilość wiązań podwójnych, mają wiele zachodzących na siebie orbitali *p*. Związki te mają zdolność silnego pochłaniania fal elektromagnetycznych. Im więcej sprzężonych wiązań wielokrotnych w cząsteczce tym pochłania ona fale o większej długości fali.

Prawo Lamberta-Beera Jeżeli przepuścimy fale elektromagnetyczną przez kuetę z roztworem barwnego związku chemicznego to, fale które przejdą przez kuetę będą osłabione

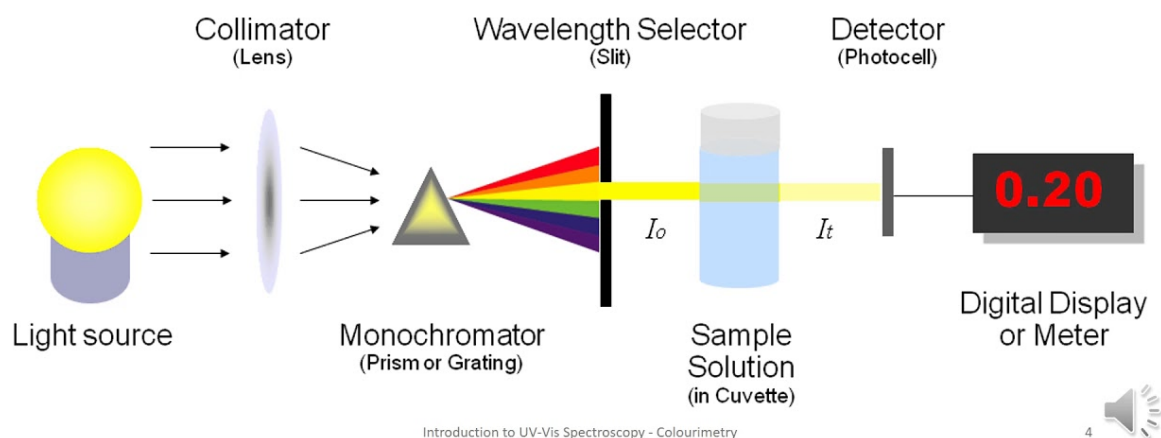
$$I = I_0 e^{-\alpha c x} \quad (1)$$

gdzie: I – natężenie promieniowania elektromagnetycznego po przejściu przez próbkę
 I_0 – natężenie promieniowania elektromagnetycznego przed przejściem przez próbkę

2.1 Metoda kolorymetryczna

Jest to metoda m. in. pomiaru stężenia substancji rozpuszczonej w roztworze, wykorzystująca prawo Lamberta-Beera

Components of a Basic Colorimeter



Rysunek 3: Schemat metody kolorymetrycznej

Przy pomiarach w ultrafiolecie nie używa się szkła (gdyż pochłania ono ultrafiolet) tylko kwarcu. Wiele substancji barwnych można badać przy użyciu metody kolorymetrycznej

2.2 Pomiar widma w podczerwieni IR

W zależności od budowy związku chemicznego pochłaniana jest fala elektromagnetyczna o różnej długości fali (w spektrum podczerwieni, fale elektromagnetyczne pochłaniane są przez grupy funkcyjne w związku)
Dana grupa funkcyjna pochłania światło w danej długości fali podczerwieni.

2.3 Nefelometria i turbidymetria – pomiar zmętnienia

Jeżeli próbka jest mętna to część światła jest zatrzymywana i rozpraszana. Co za tym idzie można badać ile światła przeszło przez próbkę, a ile uległo rozproszeniu.

Przy nefelometrii mierzy się ilość światła rozproszonego przez próbkę, a przy turbidymetrii ilość światła nierozproszonego.

Metod tych używa się np. do pomiaru czystości powietrza.

2.4 Metody luminescencyjne

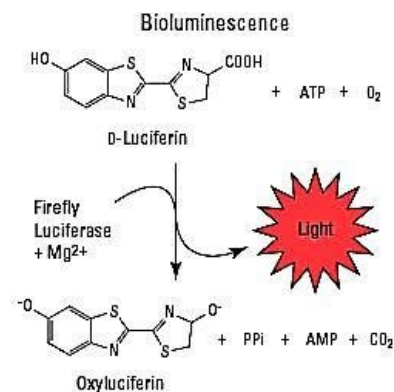
Światliki wypromieniowują światło dzięki reakcji lucyferyny i lucyferazy, do której zajścia konieczne jest ATP. Można określić ilość ATP w próbce dodając mieszaniny lucyferyny i lucyferazy i stosując bardzo czuły detektor światła.

2.5 Badanie skręcalności optycznej

W normalnym promieniu światła, światło jest *niespolaryzowane* (czyli drga we wszystkich płaszczyznach). Światło spolaryzowane to takie, którego płaszczyzna drgań ustawiona jest w jednej płaszczyźnie.

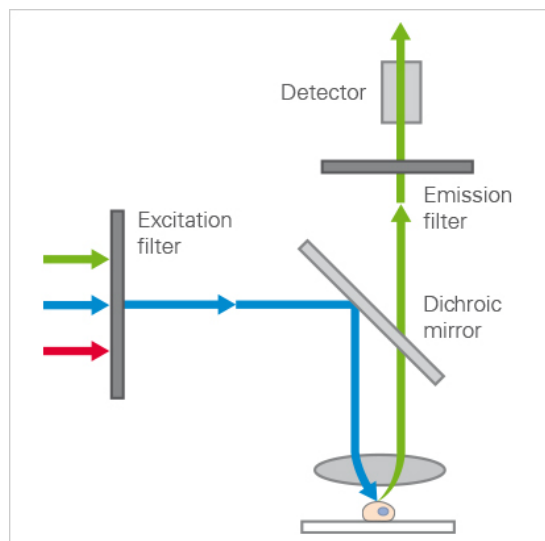
Niektóre substancje skręcają płaszczyznę polaryzacji światła. Związki takie mają w swoich cząsteczkach asymetryczne atomy węgla i mówi się o nich, że są optycznie czynne.

Jeżeli przez roztwór związku optycznie czynnego przepuści się promień światła spolaryzowanego, to płaszczyzna polaryzacji tego promienia ulegnie skręceniu. Skręcenie płaszczyzny światła spolaryzowanego jest proporcjonalne do długości próbki i stężenia próbki.



Rysunek 4: Przekształcenie lucyferyny w oksylucyferynę pod wpływem lucyferazy

2.6 Fluorescencja



Rysunek 5: Schemat działania mikroskopu fluorescencyjnego

Fluorescencja nie polega jak odbicie na odbiciu fali o tej samej długości tylko na pochłonięciu fali o jednej długości i wypromieniowaniu fali o większej długości (mniejszej energii) np. po pochłonięciu niebieskiego może zostać wypromieniowany zielony, czerwony, pomarańczowy etc., ale nie niebieski czy fioletowy.

Dopuszczalne przejścia pomiędzy długościami fal wskutek fluorescencji jest obliczone w postaci diagramów Jabłońskiego. Fluorescencja polega na pochłonięciu jednego kwantu i wypromieniowaniu pojedynczego kwantu o niższej energii (przynajmniej nie w wypadku próbek biologicznych). W przypadku większości roztworów wodnych ma się do czynienia z widmami fluorescencji.

2.6.1 Zasada działania mikroskopu fluorescencyjnego

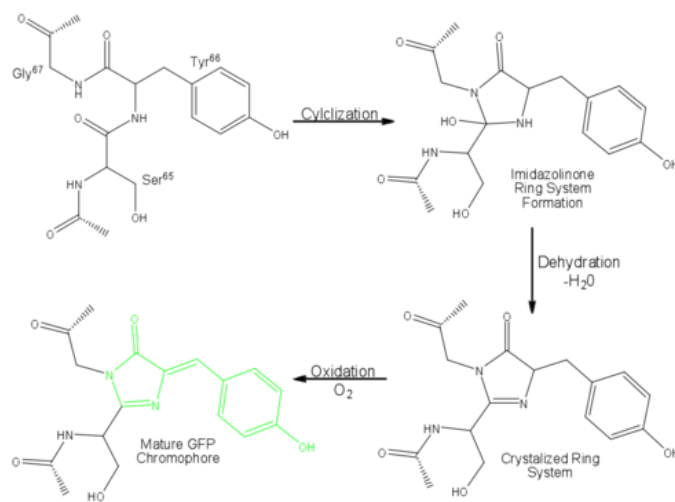
Lustro dichroiczne jest tak skonstruowane, że przepuszcza bardzo wąski zakres długości fali, a fale o innych długościach odbija.

2.7 Green fluorescent protein

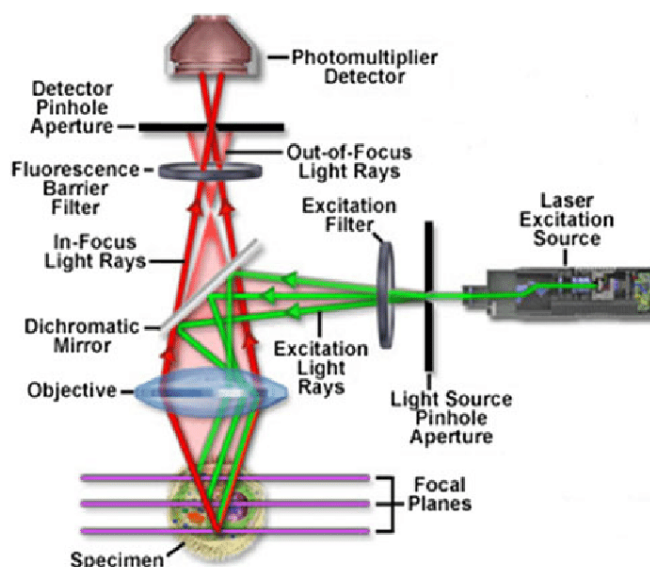
GFP używa się m. in. dołączając je do innych białek w celu wykrycia ich lokalizacji w komórce. GFP może być zmodyfikowane na wiele sposobów aby uzyskać inne barwy. Jest to przydatne jako kolorowy znacznik białka.

Przeważnie przy badaniu białek nie stosuje się jednak mikroskopów fluorescencyjnych i monochromatorów, tylko lasery. Nie jest to proste gdyż zbyt silne lasery uszkadzałyby próbkę, a niełatwo jest skonstruować laser o zmiennej długości fali. Stosuje się mikroskopy konfokalne, które nie stosują zwykłych promieni światła, tylko lasery. Nie można za ich pomocą przeprowadzać bezpośredniego pomiaru (przez obiektyw, oczami) tylko za pomocą generowanego komputerowo obrazu.

Obraz w mikroskopie fluorescencyjnym jest trochę rozproszony, co wynika z wypromieniowywania fluorescencyjnego z każdego oświetlonego miejsca próbki. W mikroskopie konfokalnym stosuje się bardzo małe dziurki (*pinhole*) aby zmierzyć bardzo mały fragment próbki, który generuje pojedynczy piksel obrazu. W ten sposób mierzony jest każdy fragment próbki aby wygenerować komputerowo pełen obraz próbki.



Rysunek 6: Reakcja dojrzewania białka zielonej fluorescencji



Rysunek 7: Budowa i działanie mikroskopu konfokalnego

Mikroskop konfokalny umożliwia relatywnie dokładne obserwacje ruchów wewnątrz próbki. Umożliwia też uzyskiwanie obrazów trójwymiarowych próbki.

2.8 Fluorescent resonance energy transfer – FRET

Jest to metoda pozwalająca zbadać czy dane białka stykają się ze sobą czy nie. Normalnie na skutek oświetlenia światłem niebieskim przy fluorescencji, emitowane jest światło zielone, jeżeli jednak dwie molekuly są w kontakcie, to nastąpi zmiana emitowanej fali na czerwoną. Warunkiem jest oczywiście oznaczenie obydwu białek odpowiednimi barwnikami fluorescencyjnymi.

Czynniki niezbędne dla FRET:

- Niewielka odległość między fluoroforami – 10-100 Angstrémów
- ...

Wykorzystanie FRET

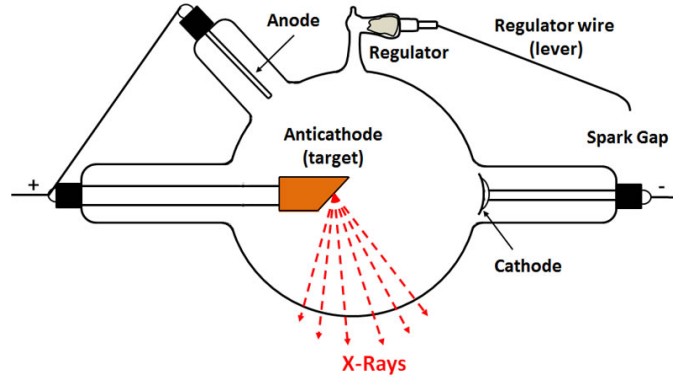
Rezonansowy transfer energii umożliwia monitorowanie odległości dwóch wyznakowanych fluorescencyjnie molekuł, poprzez obserwacje barwy fluorescencyjnej emisji światła.

3 Tomografia rentgenowska, PET i SPECT

3.1 Tomografia rentgenowska

Tomografia to sposób przestrzennego obrazowania.

Przy przepuszczaniu prądu o dużym napięciu przez rurkę z której wypompowano prawie całe powietrze, powstają aerojony (np N^2) i elektrony. Jony w takiej rurce płyną w jedną stronę, a elektrony w drugą. Jeżeli rurka jest zakrzywiona to przy zakrzywieniu szkło jest uderzane przez jony lub elektrony. Powoduje to świecenie w tym miejscu i powstawanie odkrytego przez Roentgena promieniowania X.



Rysunek 8: Schemat budowy prostej „lampy” rentgenowskiej

Elektrony przyspieszane w polu elektrycznym dzięki różnicy potencjałów ΔU osiągają energię E

$$E = \Delta U \cdot q = \frac{m_e \cdot v^2}{2} = h\nu_{max} = \frac{hc}{\lambda} \quad (2)$$

Elektron w momencie uderzenia w katodę przemienia swoją energię w energię promieniowania elektromagnetycznego. Uderzenie takie w katodę powoduje, że elektron z wysokiego poziomu energetycznego spada na o wiele niższy poziom energetyczny emitując promieniowanie elektromagnetyczne o znacznej mocy (np. Promieniowanie X). Stosuje się to m.in. do ustalania struktury atomów pierwiastków.

Pochłanianie promieni Roentgena

$$I = I_0 \cdot e^{-\frac{\mu}{\rho} \cdot x} \approx I_0 \cdot e^{-CZ^3 \lambda^3 x} \quad (3)$$

Tomografia polega na tym, że wokół skanowanego obiektu obracają się nadajniki i odbiorniki (niekoniecznie promieniowania Roentgenowskiego). W nowszych konstrukcjach zwiększano liczbę odbiorników, prędkość ich obrotu oraz sposób ich obrotu (np. obrót po spirali). Obliczenie współczynników pochłaniania czterech niezależnych elementów wymaga dokonania czterech pomiarów pochłaniania wiązki promieniowania padających i przechodzących przez dane elementy. Na podstawie rejestracji promieniowania pochłanianego przez konkretne elementy obiektu badanego tworzy się trójwymiarowy obraz obiektu.

3.2 SPECT

Tomografii można użyć do wizualizacji procesów przebiegających w organizmie po podaniu do organizmu badanego izotopu promieniotwórczego pierwiastka, który jest w organizmie kierowany do miejsca, które chce się zbadać.

$$\frac{dN}{dt} = -\lambda N; \quad N = N_0 e^{-\lambda t} \quad (4)$$

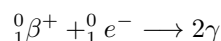
Okres połowicznego rozpadu jest to czas w którym rozpada się statystycznie połowa jąder izotopu. Przy małych ilościach jąder izotopu okres ten zawodzi, gdyż każde jądro ma daną szansę się rozpaść (nie jest to więc gwarantowane że dane jądro rozpadnie się w danym czasie)

$$\frac{N}{N_0} = e^{-\lambda \tau_{1/2}} = \frac{1}{2} \quad (5)$$

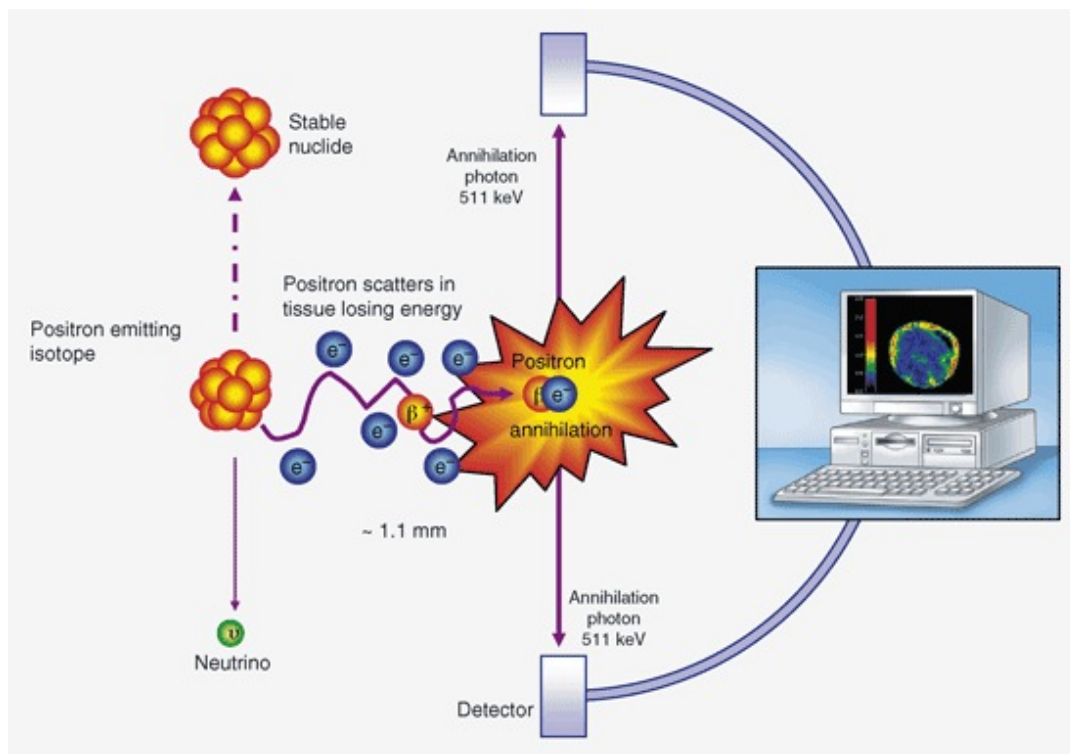
Scyntygrafia i technika SPECT (ang. *Single Photon Emission Computed Tomography*). Do technik pomiaru tomograficznego używa się izotopów o krótkim okresie połowicznego rozpadu. Do scyntynografii używa się izotopu ^{99}Tc , który posiada okres połowicznego rozpadu wynoszący 6 godzin. Oprócz technetu używa się jako źródła promieniowania także izotopy jodu. Izotop taki „doczepiany” jest do odpowiedniej substancji, która gromadzi się w pożądanym miejscu w organizmie (np. Technet związany z fosforanami lokalizuje się w złamanych kończynach). Przy takiej metodzie korzysta się z odbiorników promieniowania γ , umieszczonych naokoło badanej próbki (badanego organizmu)

3.3 Tomografia anihilacji pozytronów (PET)

Każdy pomiar metodą SPECT jest tak jakby lekko zamglony, co wynika z promieniowania dochodzącego z zewnątrz (np. promieniowanie kosmiczne, promieniowanie przedmiotów otaczających odbiorniki)



Przy anihilacji pozytronu i elektronu następuje emisja dwóch identycznych kwantów gamma skierowanych w przeciwne strony.



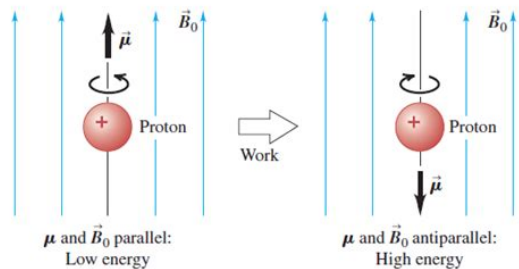
Rysunek 9: Zasada działania PET

Kluczowe dla tej metody jest to że w miejscu anihilacji elektronu i pozytronu emitowane są dwa identyczne kwanty gamma **skierowane w przeciwnych kierunkach**. Jeżeli w wąskim przedziale czasu, który nie starczy kwantowi światła na przelecenie całej komory dwa odbiorniki po przeciwnych stronach zostaną pobudzone kwantem gamma, wówczas uznaje się to za obraz z próbki, wszystko inne jest ignorowane. Dzięki temu można odfiltrować wszelkie zakłócenia wynikające z zewnętrznego promieniowania.

4 Nuclear Magnetic Resonance – NMR

Jądra atomowe (a także ich elementy) zachowuje się tak jakby miało moment magnetyczny. Nukleony mają różne momenty magnetyczne (dwa protony są sparowane gdyż mają przeciwne momenty magnetyczne). Wobec tego całe

jądro ma sumarycznie moment magnetyczny jeżeli posiada nieparzyste liczby nukleonów. Wynika z tego fakt ustawiania się jąder w dany sposób w przyłożonym zewnętrznym polu magnetycznym. Jądra pobudzone promieniowaniem elektromagnetycznym w spektrum fal radiowych zmienia swoje ustawienie w polu. Po zabraniu promieniowania elektromagnetycznego powracają do swojego poprzedniego ustawienia wydzielając kwanty promieniowania.



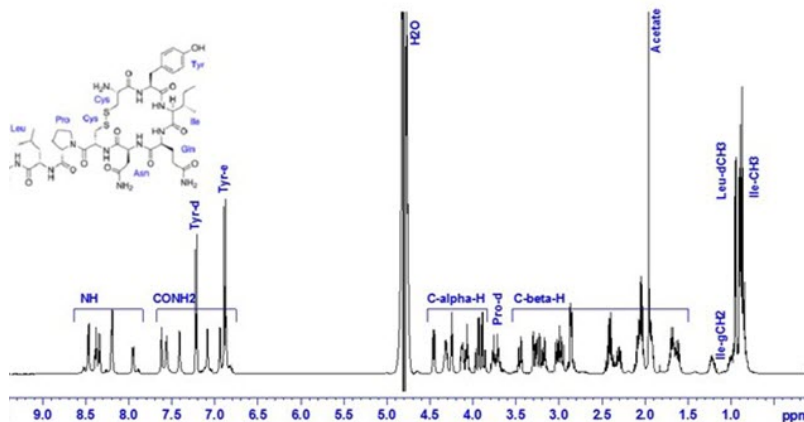
Rysunek 10: Ułożenie protonów w zewnętrznym polu magnetycznym

Wyemitowane kwanty występują w szerokim spektrum – ich energia zależy od tego jakie molekuły znajdują się w pobliżu pobudzonego jądra atomowego.

Jądrami atomowymi o największym znaczeniu dla NMR są: ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F , ^{31}P

Fakt, że w zależności od położenia w cząsteczce, jądra emitują kwanty fal radiowych o różnej długości wykorzystuje się do identyfikacji struktury związku chemicznego.

Przy pomocy NMR i odpowiednich programów komputerowych można określić strukturę II-rzędową białek.



Rysunek 11: Przykładowa krzywa będąca wynikiem spektroskopii NMR

4.1 MRI – Magnetic Resonance Imaging

W tej metodzie mierzona jest prędkość emisji w różnych obszarach. Mierzy wysyłane fale elektromagnetyczne metodą tomograficzną.

4.1.1 FMRI – Functional Magnetic Resonance Imaging

W metodzie tej bada się zmiany aktywności poszczególnych obszarów mózgu w czasie.

5 Mikroskopia elektronowa

Interferencja jest czynnikiem ograniczającym zdolność rozdzielczą mikroskopu. Kiedyś głównym ograniczeniem mikroskopów świetlnych była aberracja sferyczna i chromatyczna. Problemy te pokonano pod koniec XIXw. Na skutek interferencji nie można przy pomocy mikroskopu świetlnego oglądać obiektów mniejszych niż $0,5\text{--}0,25\mu\text{m}$.

Mikroskop elektronowy składa się z podobnych elementów co światłny. Ma on źródło elektronów, które w zależności od rodzaju mikroskopu albo przechodzą przez próbkę, albo się od niej odbijają. W soczewce elektromagnetycznej kondensora skupiane są elektrony. We wnętrzu mikroskopu elektronowego musi być głęboka próżnia. Obraz w takim mikroskopie albo zapisywany jest na komputerze albo wypalany na kliszy.

Rozpędzone elektrony uderzając w powierzchnię próbki mogą albo się odbić, albo spowodować wybite elektronów z powierzchni próbki na zewnątrz z powłoki zewnętrznej lub wewnętrznej. W ostatnim wypadku następuje emisja kwantów promieniowania elektromagnetycznego o charakterystycznej dla materiału długości. To zjawisko emisji fali o specyficznej dla danego związku długości można wykorzystać do analizy składu chemicznego danego obszaru próbki. Mikroskopia skaningowa tunelowa, polega na pomiarze elektronów za pomocą igiełki rozmiarów atomowych. Wodzenie tą igłą ponad próbką pozwala wykryć położenie i rodzaj atomów **a także przemieszczać pojedyncze atomy.**

6 Powtórzenie

Zasada działania najlepszej elektrody odniesienia – elektrody chlorosrebrowej Ag/AgCl/Cl-

Utrzymuje ona stały potencjał pomimo przepuszczania przez nią prądu ponieważ cały czas mamy do czynienia z srebrem pokrytym chlorkiem srebra. W zależności od polaryzacji zachodzą reakcje

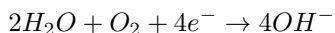
Ma ona cały czas stały potencjał, gdyż kompensuje przepływ prądu rozkładem chlorku srebra do odpowiednio chloru lub srebra.

Elektroda szklana to najczęściej stosowana elektroda jonoselektywna Służy ona do pomiaru pH roztworu. Posiada ona wewnątrz szklanej banieczki jedną elektrodę, a drugą na zewnątrz.

Po wewnętrznej i zewnętrznej stronie bańki przyczepiają się odpowiednie jony. Powoduje to powstanie różnicy potencjałów po obydwu stronach bańki. Jeżeli pomiędzy wewnętrzną stroną bańki a zewnętrzną stroną bańki występuje różnica stężeń danego jonu to powstaje niezerowe napięcie na podstawie którego można wyznaczyć stężenie jonów w roztworze.

Elektroda tlenowa i jej odmiany – elektrody enzymatyczne. Bada ona prąd płynący pomiędzy elektrodą odniesienia i elektrodą platynową przy napięciu przy którym zachodzi reakcja elektrodowa zużywająca tlen.

Przy przyłożeniu różnicy potencjału tlen jest zużywany do reakcji z wodą na skutek której powstają jony wodorotlenowe.



Na podstawie pomiaru zużywanego tlenu (którego dodatkowa ilość przechodzi do układu przez specjalną błonę) można dokonać pomiaru.

Na zewnątrz półprzepuszczalnej membrany (dopuszczającej tlen) jest kolejna membrana przepuszczająca większe cząsteczki. Między tymi błonami znajduje się enzym katalizujący reakcje substancji której stężenie chcemy zbadać z tlenem. Po wpuszczeniu do układu badanej substancji jest ona zużywana w reakcji i z tlenem. Zużywany jest przy tym tlen i powstaje gradient stężenia tlenu między obszarem poza wewnętrzną błoną i obszarem wewnątrz tej błony. Na podstawie tego gradientu mierzy się stężenie badanej substancji.

Prawo Lamberta-Beera

$$I = I_0 e^{-\alpha c x} \quad (6)$$

Prawo to ma zastosowanie do każdego układu, w którym przez dane ciało przechodzi wiązka fal elektromagnetycznych.

Spektroskopia IR

Naświetlanie próbki promieniowaniem elektromagnetycznym z zakresu podczerwieni, daje widmo adsorpcji tego promieniowania przez badaną substancję. Widmo takie jest unikalne dla danej substancji, gdyż każda grupa chemiczna danej substancji pochłania fale z innego zakresu.

Mikroskop fluorescencyjny

Bazuje on na fakcie, że niektóre substancje pochłaniają fale elektromagnetyczne o jednej długości fali, a następnie emitują fale o mniejszej długości. W takim mikroskopie naświetla się próbkę wiązką światła monochromatycznego o konkretnej długości odbitą od lustro dichroicznego. Jeżeli w próbce znajduje się substancja o właściwościach fluorescencyjnych wobec tej konkretnej długości fali, wyemituje ona fale o mniejszej częstotliwości, która przejdzie przez lustro dichroiczne do rejestratora.

Mikroskop fluorescencyjny konfokalny

Dodatkowymi cechami mikroskopu konfokalnego jest obecność dwóch luster posiadających tak zwane *pin holes*, dzięki którym preparat jest naświetlany tylko w jednym punkcie i zwraca promieniowanie tylko z jednego punktu. Dzięki temu z pojedynczego pomiaru otrzymuje się obraz tylko jednego piksela. Po wielu takich pomiarach otrzymuje się wygenerowany komputerowo obraz całej próbki.

Jest to więc zwyczajny mikroskop fluorescencyjny, który zawiera *pin holes*, które odpowiadają za odpowiednie naświetlenie próbki.

Oraz wygenerowany dzięki mikroskopii konfokalnej jest trójwymiarowy i bardzo dokładny.

Fluorescence resonance energy transfer

W metodzie tej używa się dwóch barwników fluorescencyjnych, z których drugi pobiera światło o dokładnie takiej długości fali jaką emituje pierwszy. Barwnikami takimi barwi się dwie molekuly (lub miejsca w jednej molekule) i następnie naświetla światłem o długości pochłanianej przez pierwszy barwnik. Jeżeli badane molekuly (lub miejsca) są przestrzennie umiejscowione blisko siebie to następuje transfer energii do drugiego barwnika i emitowane jest światło o długości charakterystycznej dla niego. Jeżeli nie znajdują się blisko siebie to obserwowana długość fali jest charakterystyczna dla pierwszego barwnika.

Tomografia rentgenowska

Promieniowanie rentgenowskie otrzymuje się dzięki uderzeniom rozprzeczonych elektronów w katodę.

Promieniowanie rentgenowskie bardzo łatwo przechodzi przez wszelkie substancje zbudowane z lekkich pierwiastków (do liczby atomowej równej około 17). Słabo natomiast przenika przez substancje zbudowane z pierwiastków cięższych.

Pochłanianie promieniowania rentgenowskiego opisane jest równaniem

$$I = I_0 \cdot e^{-\frac{\mu}{\rho} \cdot x} \quad (7)$$

Tomografia jest to matematyczna metoda przeliczania ilości promieniowania padającego na dane miejsce i pochłanianego w tym miejscu, na podstawie której można ocenić (dzięki rozwiązaniu wielu równań) intensywność pochłaniania światła przez określone miejsce w przestrzeni, a także ilość emitowanego z tego miejsca promieniowania.

SPECT

Jest to metoda w której używa się specjalnego izotopu (np. ^{99}Tc) dołączonego do konkretnej substancji, która odkłada się w określonym miejscu w organizmie. Na podstawie emisji promieniowania γ przez ten izotop można otrzymać obraz badanego organu. Metoda ta jest jednak podatna na zakłócenia z otoczenia.

PET – positron emission technique

Wykorzystuje się w tej metodzie fakt, że przy rozpadzie β^+ i emisji oraz anihilacji pozytronu, następuje jednoczesna emisja dwóch identycznych kwantów γ w przeciwnych kierunkach. Do obrazowania wykorzystuje się więc tylko te zarejestrowane kwanty, które zostały wyemitowane jednocześnie w przeciwnych kierunkach.

spektroskopia NMR – nuclear magnetic resonance

Jądra atomowe o nieparzystej liczbie atomowej mają określony spin. Pod wpływem pola magnetycznego jądra posiadające spin porządkują się w jednej pozycji względem przyłożonego pola. Takie uporządkowane w polu magnetycznym jądra atomowe naświetla się promieniowaniem radiowym, które zmienia orientację przestrzenną tych jąder na które natrafi. Następnie fala taka jest emitowana z powrotem i może być zarejestrowana.

Mikroskopia elektronowa

W mikroskopie elektronowym zamiast promieniowania elektromagnetycznego, do obserwacji próbki używa się rozprzeczonych elektronów.

W transmisyjnej mikroskopii elektronowej, elektrony przepuszczane są przez bardzo cienką próbkę i rejestrowane. Na podstawie tego otrzymuje się obraz.

W mikroskopii skaningowej natomiast mierzy się elektrony odbite od próbki i na podstawie tego tworzy się trójwymiarowy obraz powierzchni próbki.

Skaningowa mikroskopia tunelowa polega na pomiarze przepływu prądu, przez igłę, której końcówka ma grubość pojedynczego atomu, przy zmianie jej położenia nad powierzchnią próbki. Przepływ prądu jest najsilniejszy bezpośrednio nad danym atomem. Umożliwia to zobrazowanie powierzchni próbki co do atomu.

Kriomikroskopia elektronowa polega na spreparowaniu niezwykle cienkiej wodnej próbki roztworu białek i zmrożeniu jej w ciekłym metanie. Próbkę taką następnie obserwuje się pod mikroskopem elektronowym. Jeżeli próbka

została poprawnie przygotowana to obserwuje się w niej dwuwymiarowy obraz białek, na podstawie którego można komputerowo wygenerować trójwymiarowy, dokładny obraz struktury.

Cyclic voltametry – woltamperometria cykliczna

Polega to na cyklicznej zmianie potencjału prądu płynącego przez badaną próbkę i pomiarze jego natężenia

Surface plasmon resonance

Światło odbijając się od powierzchni szkła, przed odbiciem przechodzi minimalnie przez powierzchnię. Tak więc substancja po drugiej powierzchni szkła ma minimalny wpływ na kąt padania i polaryzację światła padającego. Co za tym idzie zmiana stężenia tej substancji minimalnie, lecz mierzalnie zmienia kąt i częstotliwość rezonansową tego światła.

Quartz crystal microbalance

Każda bryła ma swoje charakterystyczne drgania.

W metodzie tej wykorzystuje się fakt, że przyczepienie do danej bryły cząteczek zmienia częstotliwość drgań własnych tej bryły. Można to wyznaczyć i zmierzyć.

Quantum dots

Pewne kryształy, jeżeli są bardzo małe (wielkość porównywalna z długością światła) to naświetlone promieniowaniem elektromagnetycznym będą świecić. Jeżeli do tych kryształków coś się „doczepi” to zaczynają one świecić inną barwą. Można do takich kryształków doczepić np. przeciwciała i mierzyć zmiany.

Są to bardzo małe cząstki, które mają zdolność do pochłaniania jednej długości fali i wypromieniowania jednej konkretnej długości fali.