

# Biofizyka II

Jakub J. Guzek

8 października 2019

6 Wykładów 01.10.2019 – 05.11.2019

Kolokwium – 12.11.2019

Seminaria – od 19.11.2019

Należy dobrać się w pary wg. grup

**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 (pomiar potencjometryczny) i pomiar natężenia prądu (amperometryczny).

Voltomierz ma duży opór wewnętrzny, który jest konieczny po to aby część prądu nie popłynęła bokiem obwodu elektrycznego/

Amperomierz z kolei ma niewielki opór.

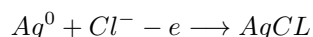
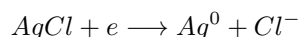
Przy dokładnych pomiarach, korzysta się z metody mostkowej, aby uniknąć przepływu prądu przez badany opornik. Jeżeli podłączy się kondensator do źródła prądu stałego, to prąd nie będzie płynął, tylko kondensator zostanie naładowany. Pojemność kondensatora zależy od tego co jest pomiędzy nakładkami kondensatora.

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 prądach 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 duża różnica 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 od 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.

[elektroda jonoselektywna]

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:

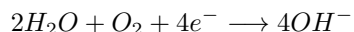
- Komora Ussinga do pomiaru warstw komórek *in vitro* [schemat]  
Pomiar tą metodą pozwala badać jak szybko przechodzi dana substancja przez warstwę komórek nabłonkowych, w różnych warunkach.
- Metoda amperometryczna (nie potencjometryczna).  
Elektroda jonoselektywna pozwala sprawdzić ilość jonów jak przepłynęła.

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 przeodzącym 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 rozszedził 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 kuwetę z roztworem barwnego związku chemicznego to, fale które przejdą przez kuwetę będą osłabione

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

$I$  – 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 [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

[Przekształcenie lucyferyny w oksylucyferynę]

Świetliki 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.

## 2.6 Fluorescencja

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 nie 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

[schemat 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

[schemat reakcji białka zielonej fluorescencji]

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.

[schemat działania mikroskopu konfokalnego]

[zdjęcia z 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, emitowane jest zielone, jeżeli jednak dwie molekuly są w kontakcie, to nastąpi zmiana emitowanej fali na czerwoną.

Czynniki niezbędne dla FRET:

- Niewielka odległość między fluoroforami – 10-100 Angströmów
- Spektrum absorpcji akceptora mie...

**Wykorzystanie FRET**

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