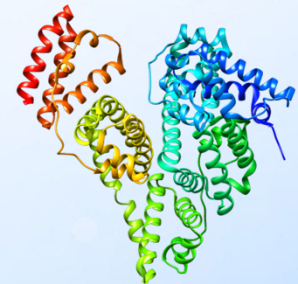
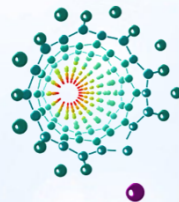


Методе и методологија у биофизичкој хемији

Др Александра Павићевић



Шта је биофизичка хемија?

Тешко је наћи прецизну дефиницију, пошто ова област науке обједињује биологију, физику, хемију, па чак и медицину у једну научну дисциплину.

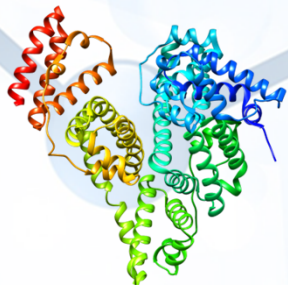
Могућа дефиниција: „Биофизичка хемија представља примену принципа познатих из физичке хемије, да би се нашли одговори на биохемијска и биомолекуларна питања.“ (P. J. Walla, *Modern Biophysical Chemistry*, 2014)

Садржај:

- ❖ Методологија истраживања у биофизичкој хемији
- ❖ Масена спектрометрија
- ❖ УВ-Вис спектрофотометрија
- ❖ Флуоресцентна спектроскопија и микроскопија
- ❖ Циркуларни дихроизам
- ❖ Вибрациона спектроскопија - инфрацрвена и раманска
- ❖ Дифракција X-зрачења
- ❖ Магнетно резонантне методе - НМР и ЕПР
- ❖ Микроскопија атомских сила
- ❖ Калориметријске методе

Шта је све предмет испитивања биофизичке хемије?

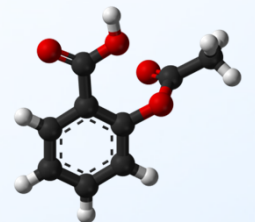
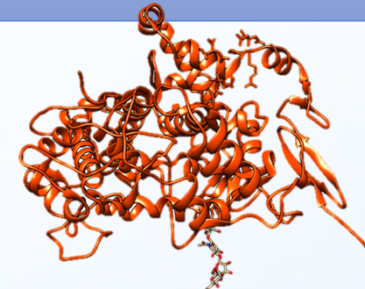
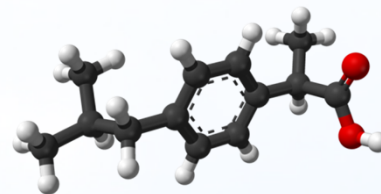
- ❖ Испитивање структуре макромолекула - важност због функције.
- ❖ Праћење међумолекулских интеракција и структурних промена (нпр. протеина са разним другим супстанцијама, испитивање конформационих промена).
- ❖ Идентификовање нефункционалног протеина - испитивање механизма болести.
- ❖ Проналажење лекова којима се специфично циља одређени протеин/ензим ради инхибиције или активације, а некада су сами протеини терапија - моноклоналана антитела, ензимска супституциона терапија.
- ❖ Пример: аспирин - иреверзибилна инхибиција циклооксигеназе, ензима који производи простагландине.
- ❖ Други пример: ибупрофен - реверзибилна инхибиција истог ензима.



Normal red blood cell

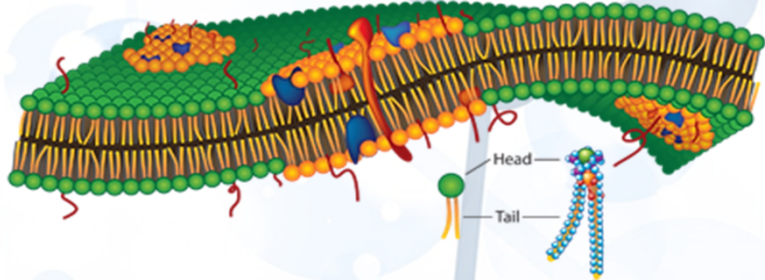


Sickle cell anemia



Шта је све предмет испитивања биофизичке хемије?

❖ Испитивање структуре и физичкохемијских својстава мембрана - важност због функције (флуидност утиче на функционалност), промета материје кроз мембрану и комуникације са другим ћелијама (сигнализације).

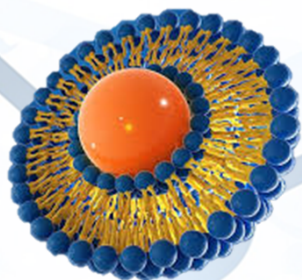


❖ Развијени су разни модели који oponaшају мембрану и служе између осталог за проучавање мембранских протеина.

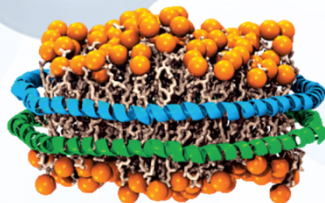
❖ Протeин - липид интеракције

❖ Носачи за испоруку лекова - наночестице (липидне, протеинске), наногелови и хидрогелови.

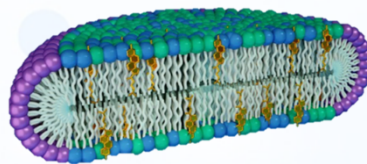
Липозоми



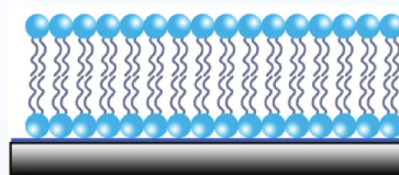
Нанодискови



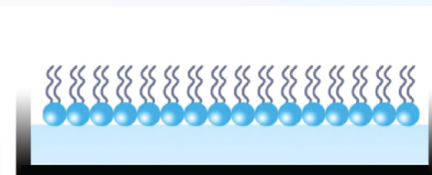
Бицеле



Двослој



Монослој



Истраживање у биофизичкој хемији

Формулисање
питања на које
треба дати
одговор



Одабир:

- Модел система
- Методе/технике

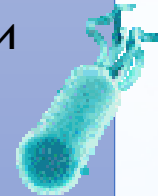
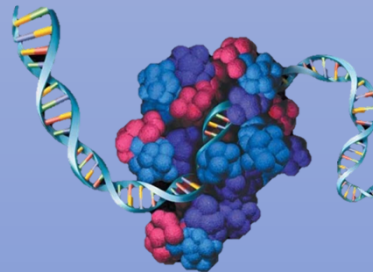
Извођење
експеримента

Неопходно познавање:

- Релевантних биолошких/биохемијских/физичкохемијских процеса,
- узорка
- принципа рада метода/техника које ће бити коришћене

Узорци могу да буду:

- Биолошки молекули
- Ћ. органеле или ћелија
- Ткива, органи
- Организми



Одабир модел система

❖ Кључни појмови:



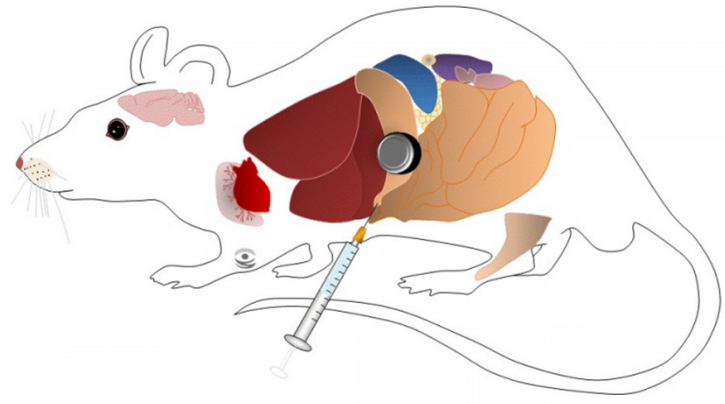
In vitro - експерименти са ћелијама које су изоловане, раздвојене и пречишћене од свог нормалног биолошког окружења.

Ex vivo - жива ткива која се испитују се не праве вештачки (*in vitro*), него се директно узимају из живог организма.

In vivo - у живом организму.



In silico - експеримент урађен компјутерском симулацијом





In vivo - етички принципи

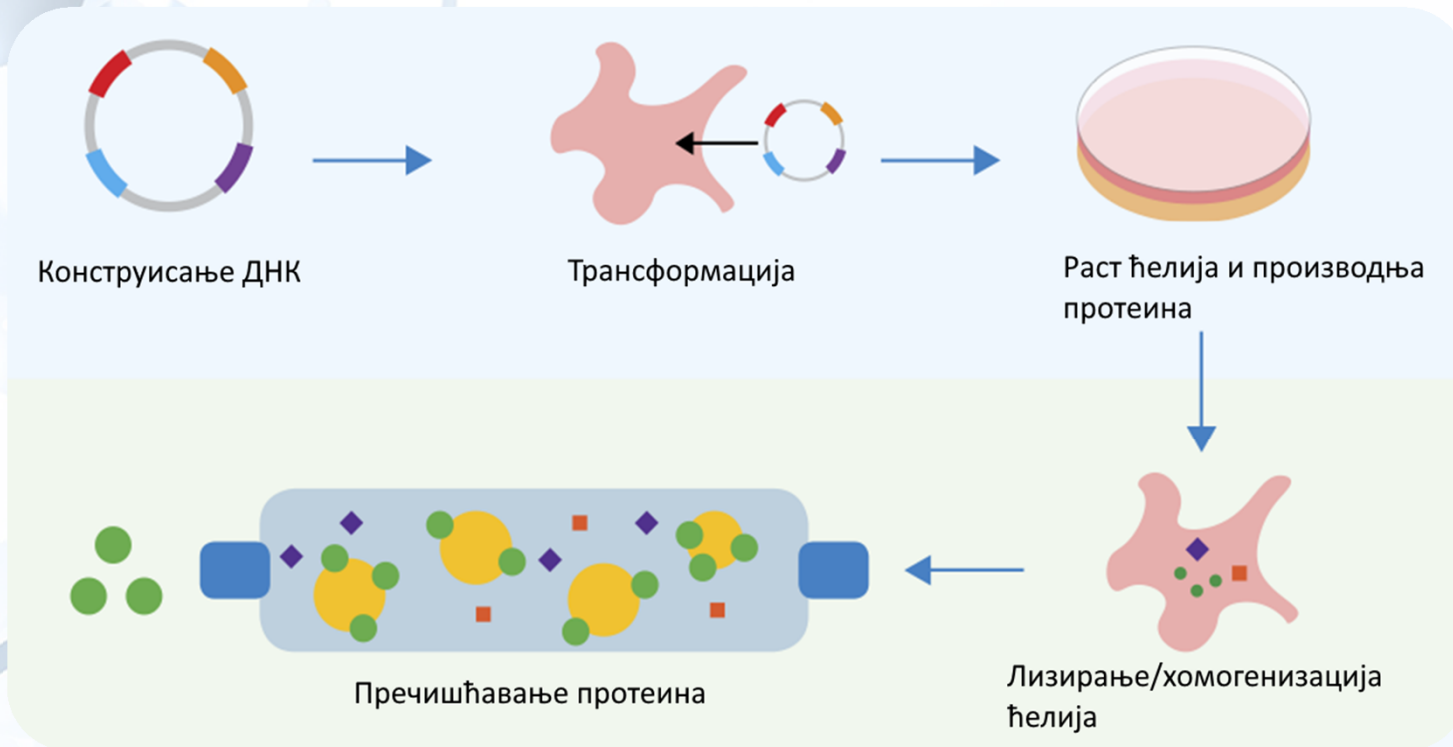
- У Великој Британији је настала 1875. прва организација за заштиту животиња: “The Victoria Street Society”.
- Први Закон о заштити експерименталних животиња донет 1876. - “Cruelty to animals act”
(<https://www.irishstatutebook.ie/eli/1876/act/77/enacted/en/print.html>)
- Принцип троструког „R”:
 - R**eplacement - замена - замена коришћења животиња неком другом техником када год је то могуће.
 - R**eduction - смањење - употреба што мањег броја животиња.
 - R**efinement - побољшање - побољшање и усавршавање процедура (избегавање/редуковање стреса и бола)



Новосибирск, Институт
за цитологију и генетику,
Руска академија наука

Пример истраживања у БФХ

❖ Експресија и изолација протеина



Пример истраживања у БФХ

- ❖ Експресија и изолација протеина - пречишћавање и идентификација

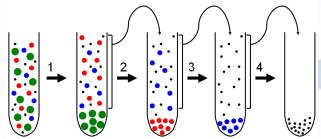
Лизат бактерија (ћелија)

Растворљиве компоненте:

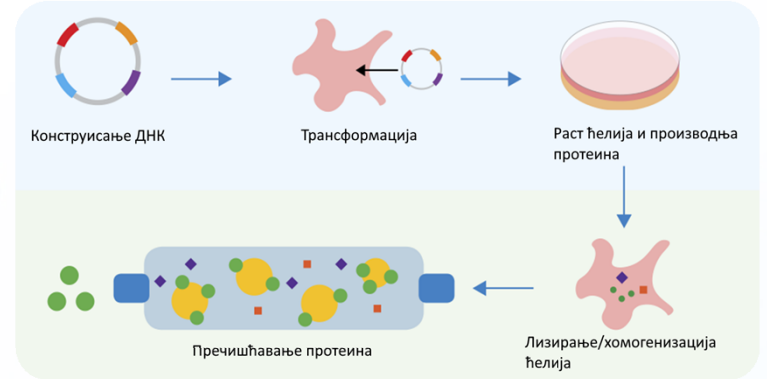
Цитосолни протеини
Нуклеинске киселине
Рибозоми

Нерастворљиве компоненте:

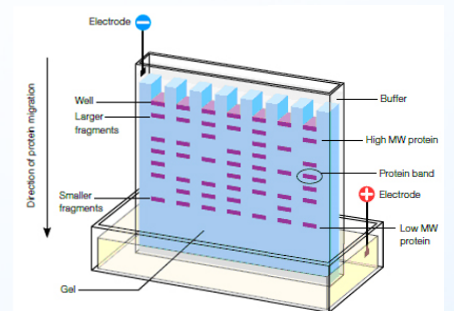
Неразбијене ћелије
Једра
Ћелијски зидови
Ћелијске мембране




Центрофугирање



Хроматографија



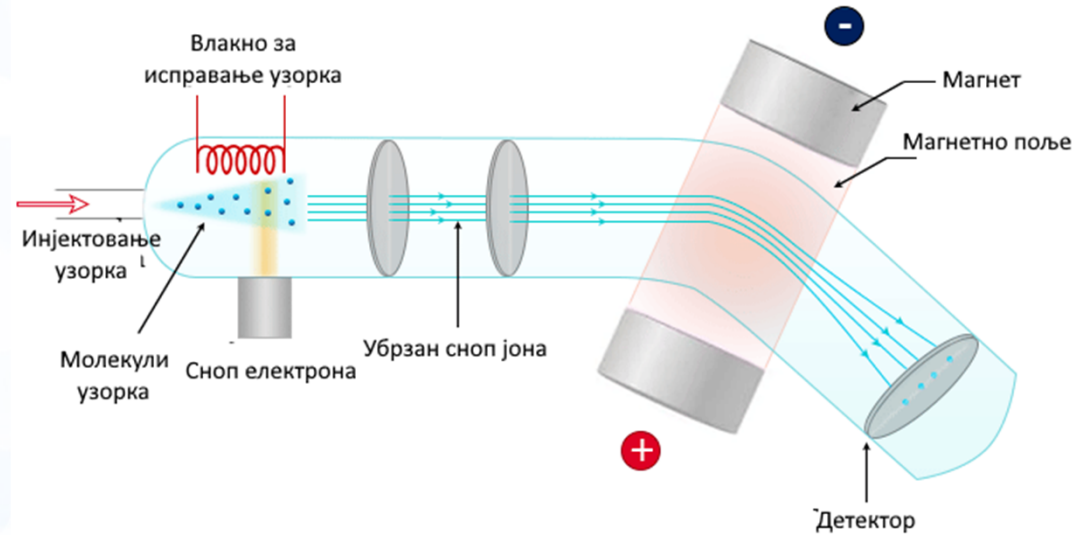
Електрофореза

The background features a light blue gradient with various molecular models. On the left, there are several ball-and-stick models of molecules, with atoms represented by blue spheres of varying sizes and connected by dark blue lines. On the right, a colorful DNA double helix is shown, with the sugar-phosphate backbone in blue and the base pairs in shades of green, purple, and red. The overall theme is scientific and related to biochemistry or biophysics.

Методе/технике у биофизичкој хемији

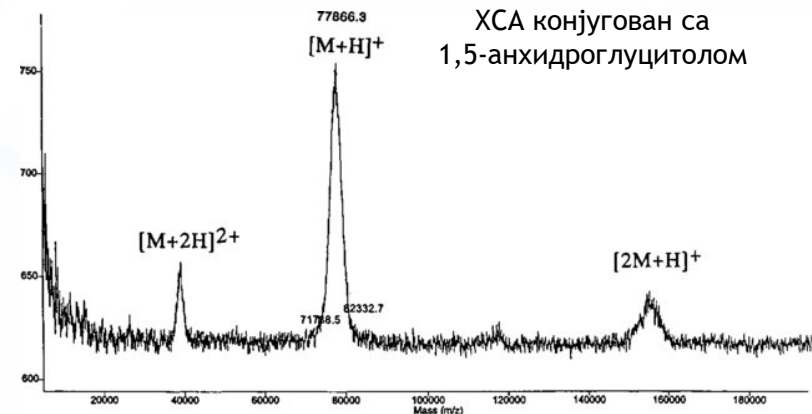
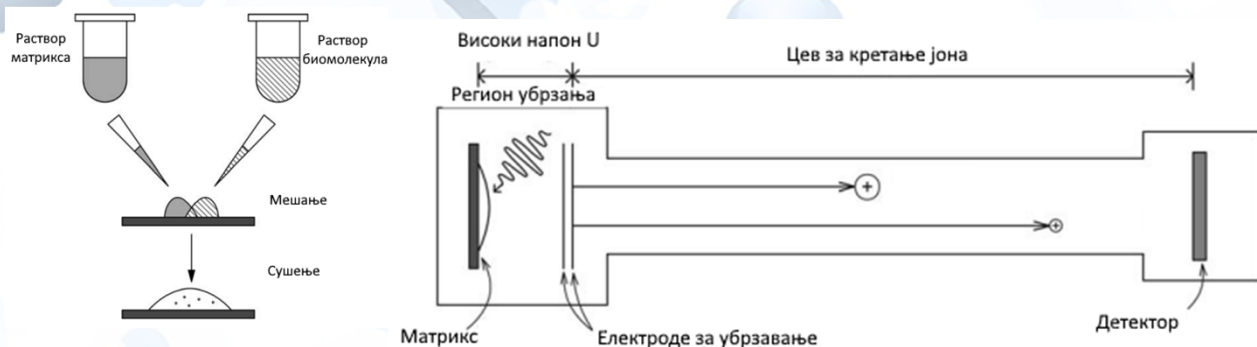
Масена спектрометрија

- ❖ Почива на различитом скретању и брзини наелектрисаних честица у магнетом/електричном пољу, што зависи од односа масе и наелектрисања - m/z .
- ❖ Кључни кораци у експерименту:
 - 1) испаравање и јонизација узорка;
 - 2) раздвајање на основу m/z у анализатору;
 - 3) детекција јонским детекторима.
- ❖ Проблем испраљивости биолошких макромолекула, као и њихове деградације јонизацијом која се користи за мање органске молекуле (*FAB-Fast Atom Bombardment*).
- ❖ За јонизацију и испаравање биомакромолекула се користе најчешће MALDI и ESI.



Масена спектрометрија - MALDI-TOF

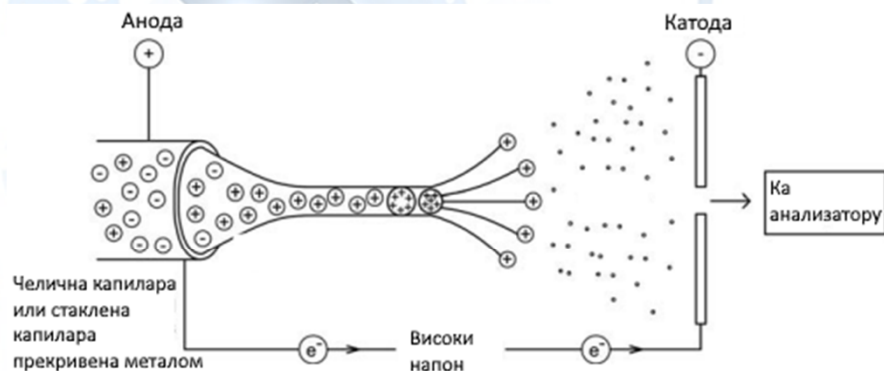
- ❖ MALDI - Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization
- ❖ TOF - Time of Flight



- ❖ Матрикс (мањи ароматични молекули) се бира тако да апсорбује јако у области таласне дужине ласера (обично УВ област).
- ❖ Јонизација се догађа услед преноса протона између матрикса и биомолекула.
- ❖ Настају молекули са једним или неколико позитивних наелектрисања, мада је могућа и селекција негативних јона (олигонукелтоиди и олигосахариди).

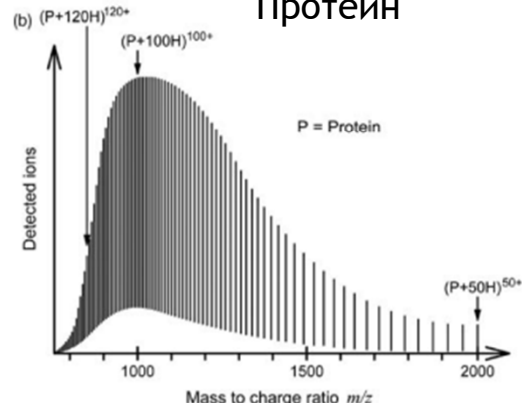
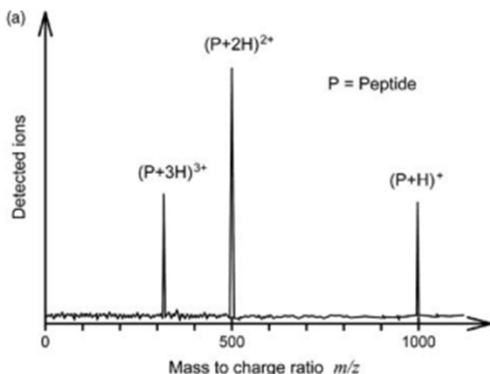
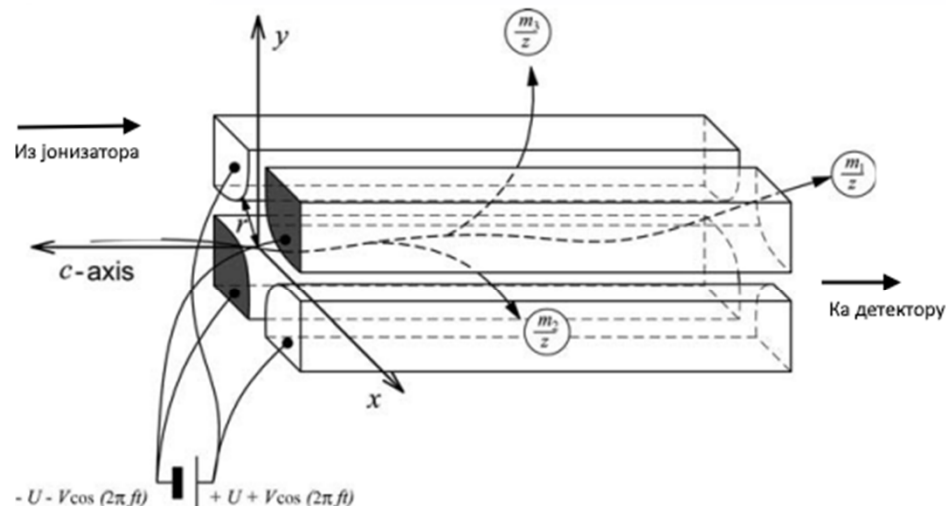
Масена спектрометрија - ESI

- ❖ ESI - ElectroSpray Ionization
- ❖ Обично се користи у спрези са квадруполним анализатором (не може TOF, због континуалног увођења узорка).



Пептид

Протеин



Потребна компјутерска анализа ради добијања тачне масе.

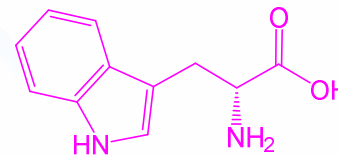
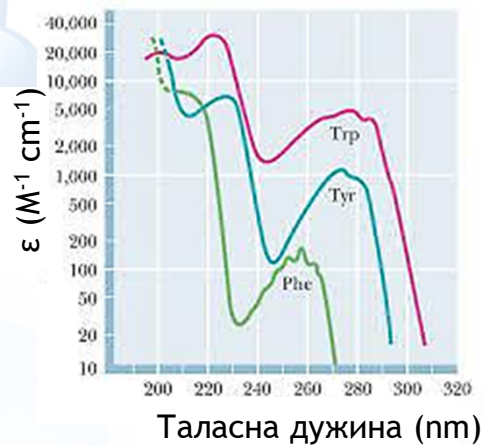
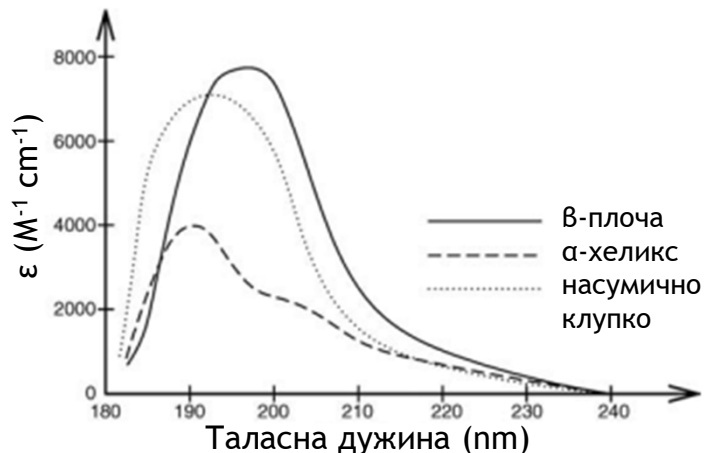
Због тога не може да се ради са смешом протеина - мана
Није потребна припрема узорка као за MALDI, могућ рад са протеином раствореним у води - предност.

Масена спектрометрија - секвенцирање протеина

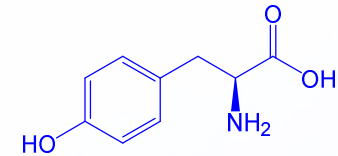
- ❖ Секвенцирање протеина - помоћу више квадруполних анализатора који се налазе један за другим (обично три), од којих се у једном (средњем) намерно врши фрагментација, помоћу инертних гасова (He, Ar, N₂).
- ❖ Често је потребно радити хемијску дигестију протеина (нпр. помоћу трипсина), па онда раздвојити фрагменте хроматографски и снимити MS-спектар за све фрагменте.
- ❖ MS-fingerprinting - поређење са базама пептида, ДНК секвенцијом.

УВ-Вис спектрофотометрија

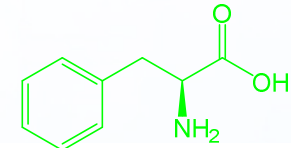
- ❖ Широко коришћена техника за одређивање концентрације разних молекула (нпр. протеина), праћење везивања лиганата за протеин и ензимске кинетике...разни есеји, дијагностичка примена...



Триптофан

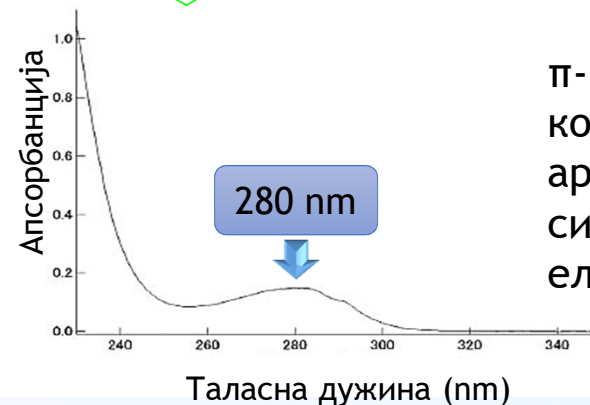


Тирозин



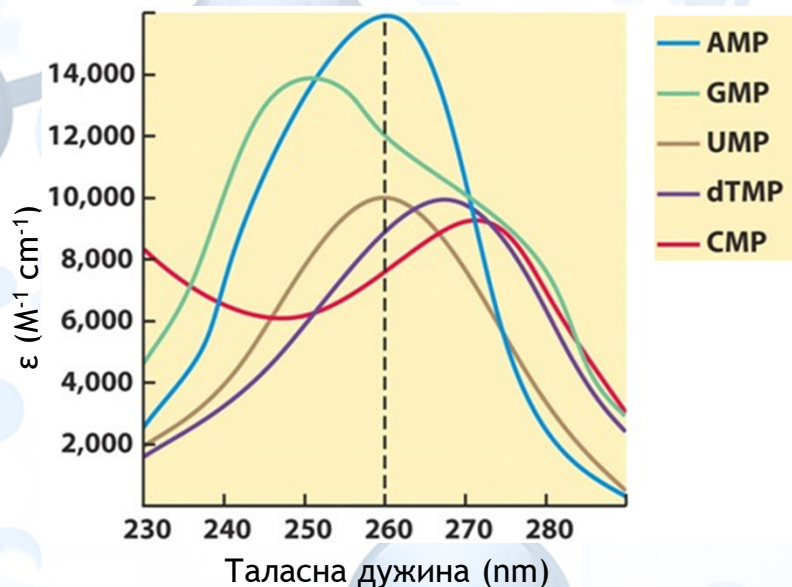
Фенилаланин

- ❖ Протеини - испод 240 nm прелази у пептидној вези; може доћи до дисоцијације везе; пикови зависе од секундарних структурних елемената (деталније касније).

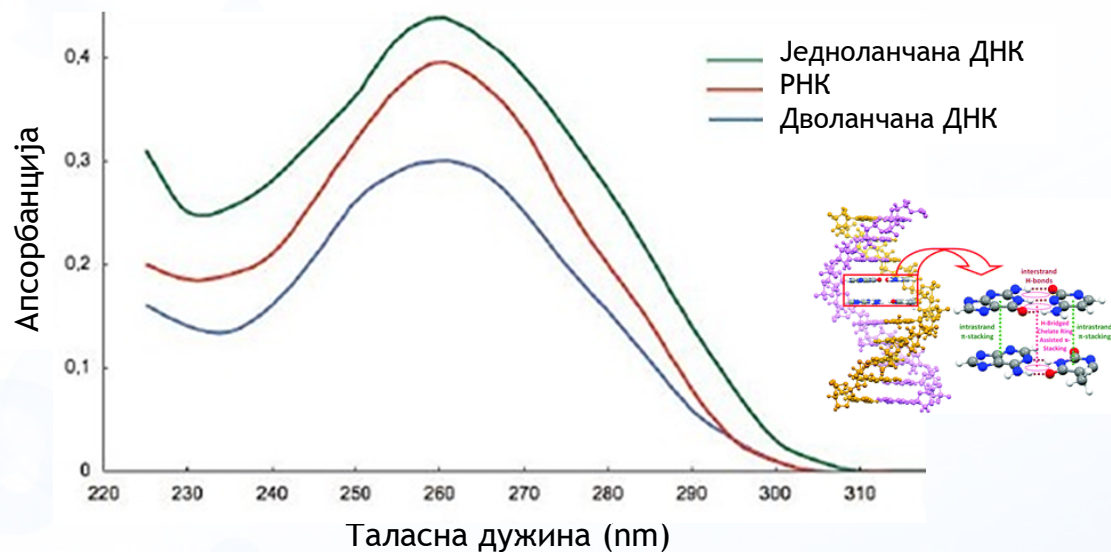


$\pi \rightarrow \pi^*$ прелази у конјугованим ароматичним системима електрона

УВ-Вис спектрофотометрија

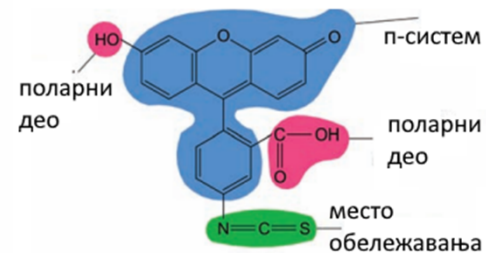
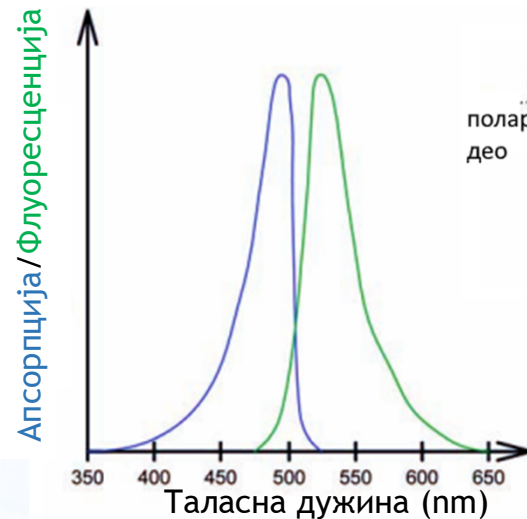
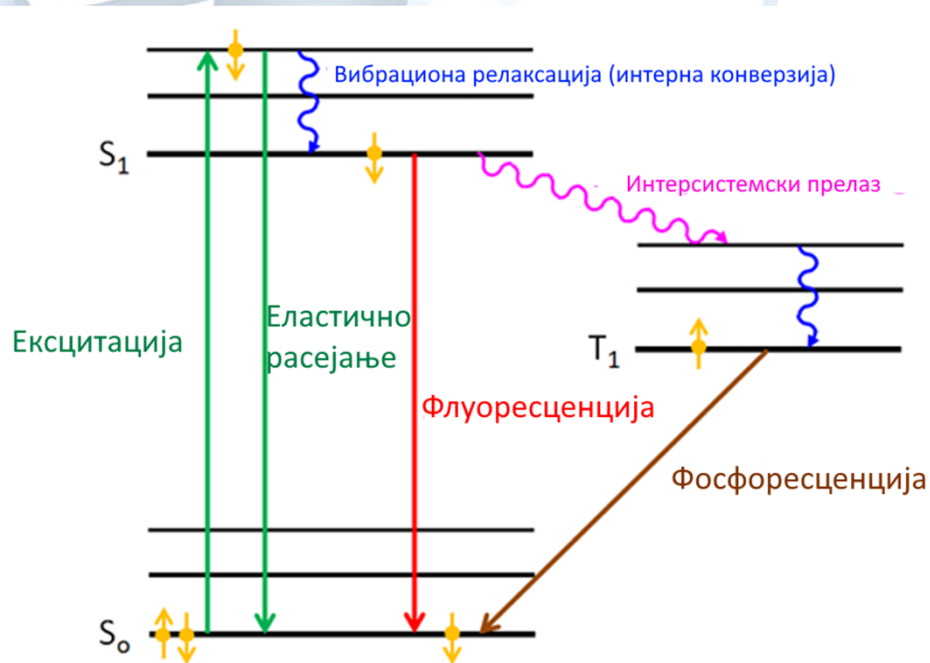


- ❖ Нуклеинске киселине - апсорпција на око 260 nm.
- ❖ Екстинкциони коефицијент опада у низу: појединачне базе > РНК > ДНК.
- ❖ Хипохромни ефекат у ДНК потиче од наслојавања базних парова - тзв. stacking



- ❖ Денатурација ДНК - у спектру се јавља као хиперхромни ефекат.
- ❖ Однос апсорбанција на 260 и 280 nm се користи за процену чистоће ДНК: када је >1,8 ДНК се сматра да је чист.

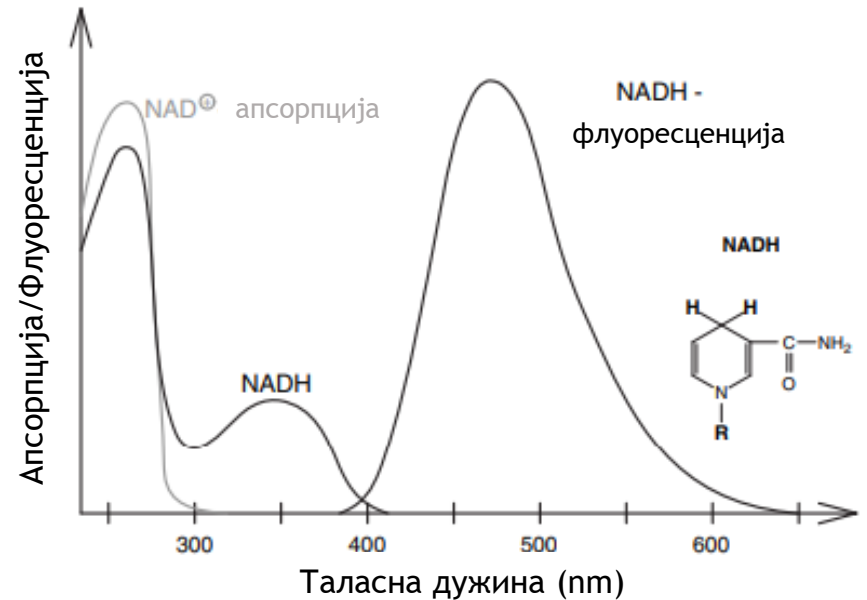
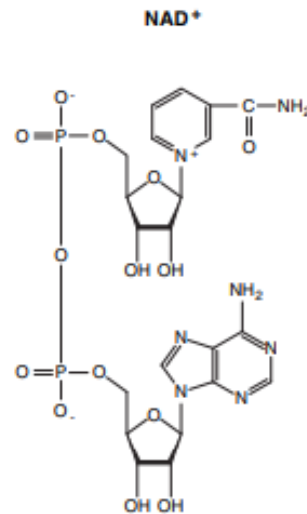
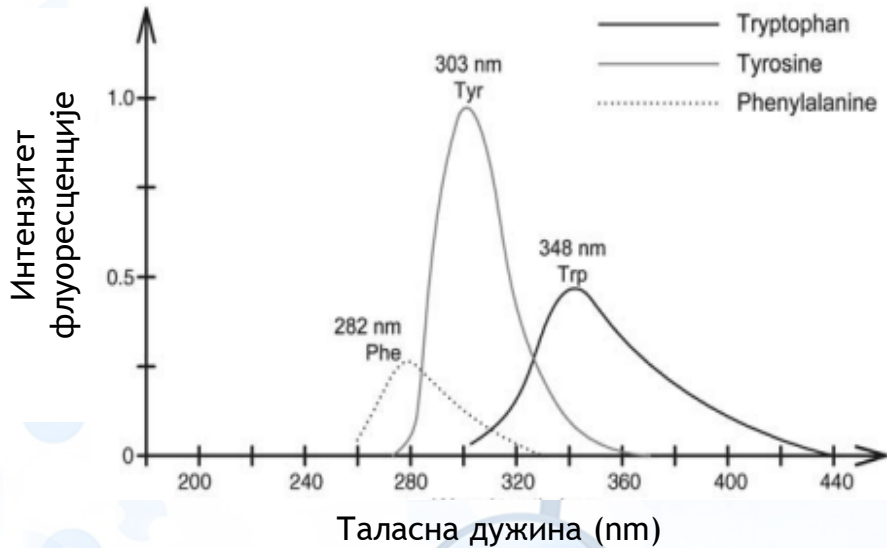
Флуоресценција



Флуоресцеин-5-изотиоцијанат

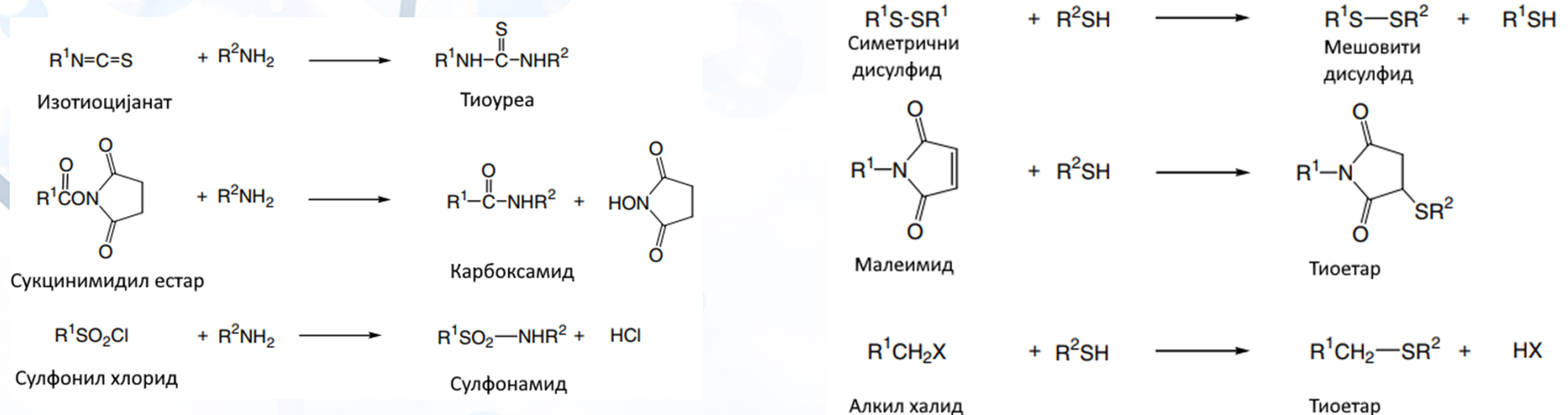
- ❖ Апсорпциони и спектри флуоресценције се међусобно односе као предмет и лик у огледалу.
- ❖ Карактерише се квантним приносом који је дат као однос константе брзине флуоресценције и збира свих константи брзина конкурентских процеса.

Флуоресценција - протеини и нукелинске киселине

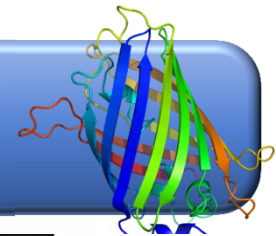


Флуоресцентно обележавање

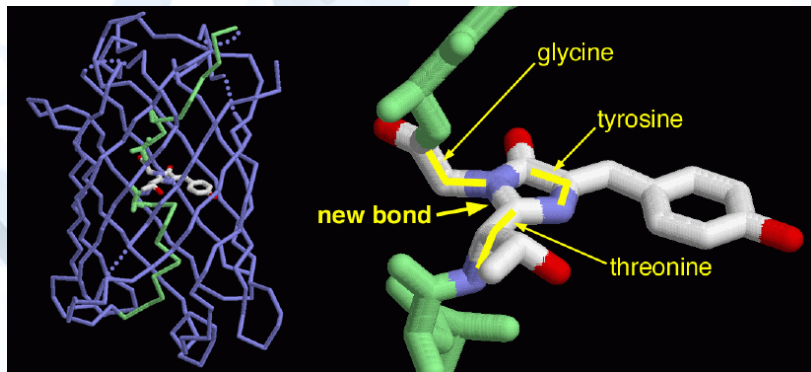
- ❖ У протеинима се обично ковалентно за примарне аминок- или суфлхидрилне групе везују флуоресенти обележивачи.
- ❖ Ако се ДНК модификује тако да има примарне аминок-групе, могу се користити исти обележивачи као за протеине.
- ❖ Мора да се води рачуна о рН средине.
- ❖ Мутагенезом специфичном за одређено место могу да се експримују протеини који имају цистеин било где (докле год не нарушава структуру испитиваног протеина и активно место ензима од интереса).



Флуоресцентно обележавање



Aequorea victoria

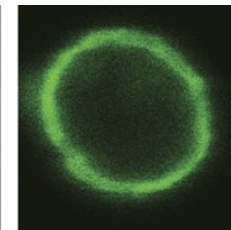


GFP - green fluorescent protein

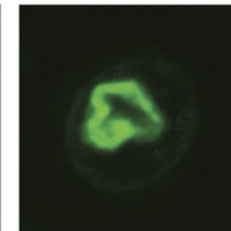
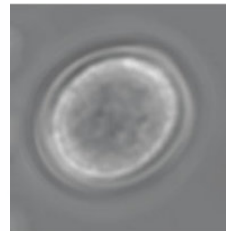
Хромофору чине серин, тирозин и глицин - три суседа у примарној структури - заштићени у средишту β -бурета.

Циклизација ове три АК се дешава аутокаталитички, па нису потребни кофактори.

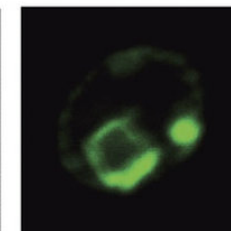
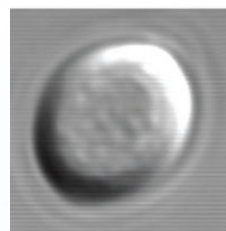
Фузионише се са протеинима чије праћење је од интереса за истраживања, пошто је нетоксичан и не ремети структуру циљаног протеина, лако се експримује, јер сам ген садржи све информације за посттранслационе модификације, а такође је хромофора отпорна на фото-избељивање.



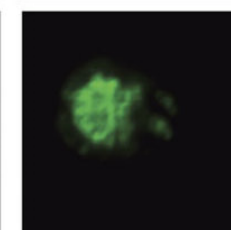
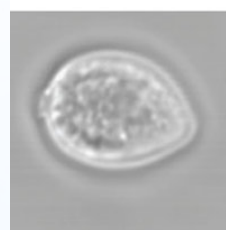
Plasma membrane protein



Golgi membrane protein



ER membrane protein



Vacuolar membrane protein

Флуоресцентна спектроскопија

- ❖ Код протеина који имају бар један триптофан, могу да се ексцитацијом на 295 nm прате конформационе промене протеина услед везивања лиганда, денатурације...
- ❖ Дешава се плави померај ако се повећава хидрофобност средине.
- ❖ Може доћи до гашења флуоресценције (квенчовања) у присуству неких супстанција које изазивају нерадијативне прелазе, услед тога што индолни прстен лако предаје електрон у побуђеном стању.

❖ Штерн-Фолмер:
$$\frac{I}{I_0} = 1 + k \cdot \tau \cdot [Q]$$

I - интензитет флуоресценције у присуству квенчера

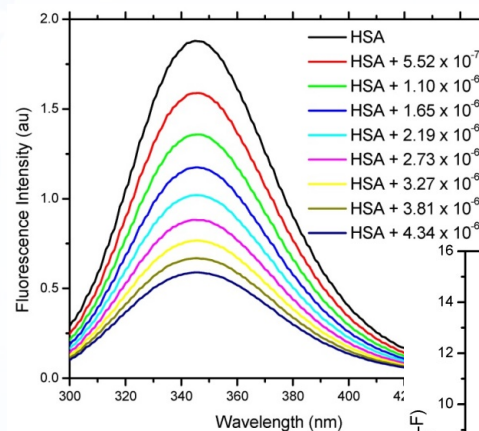
I_0 - интензитет флуоресценције у одсуству квенчера

τ - време живота флуорофоре без квенчера

k - константа брзине квенчовања биомолекула

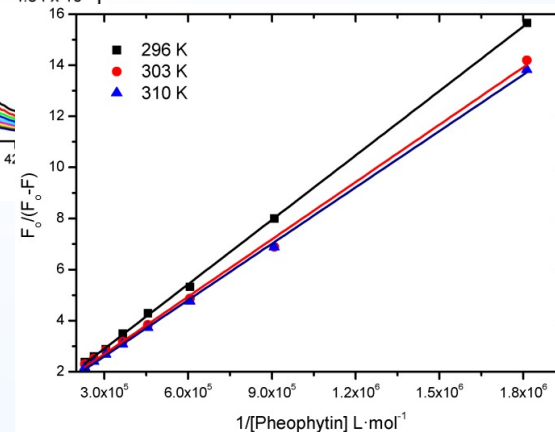
$[Q]$ - концентрација квенчера

- ❖ Гашење флуоресценције услед близине молекула воде.



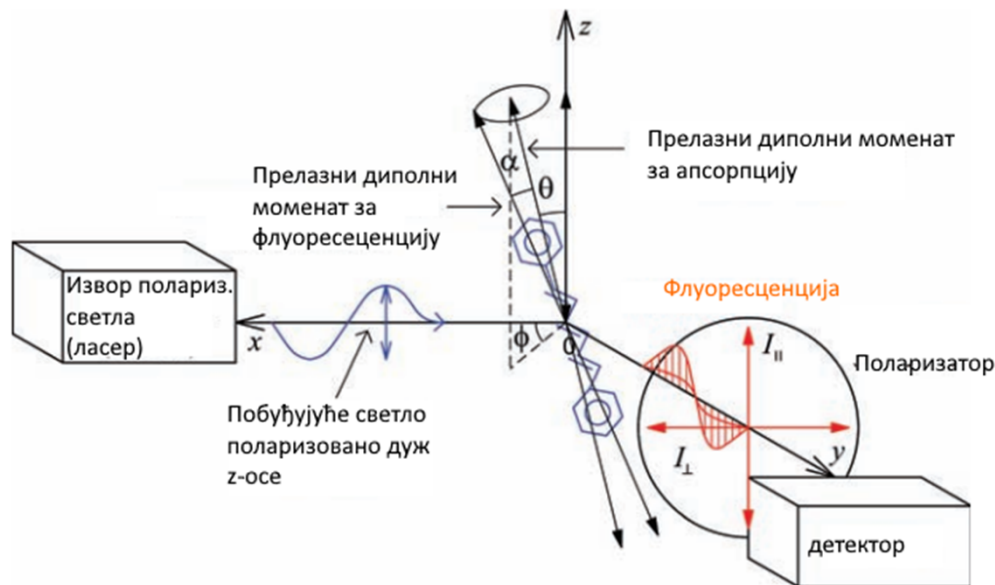
$$\frac{I}{I_0 - I} = \frac{1}{f_a K_a [Q]} + \frac{1}{f_a}$$

f_a - фракција доступних флуорофора
 K_a - константа афинитета



Рачуна се константа афинитета

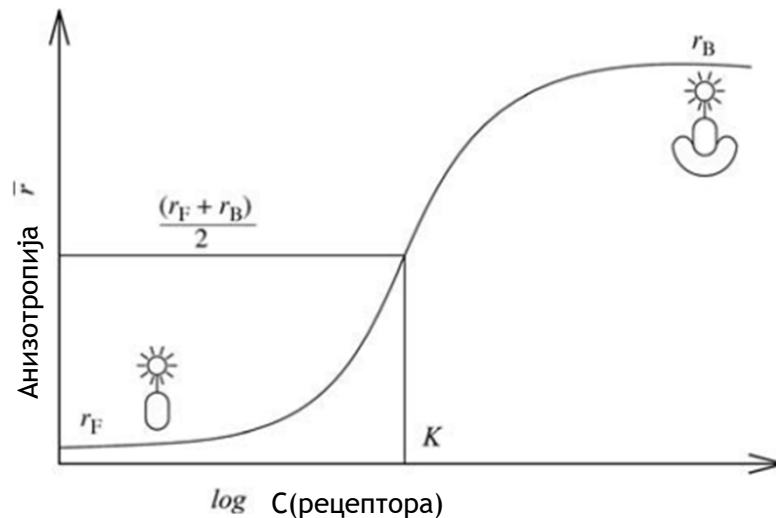
Флуоресцентна спектроскопија



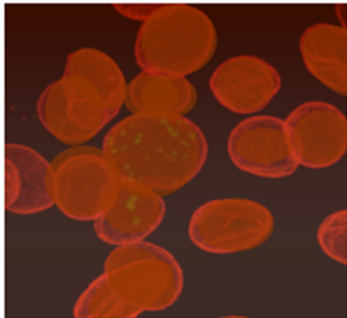
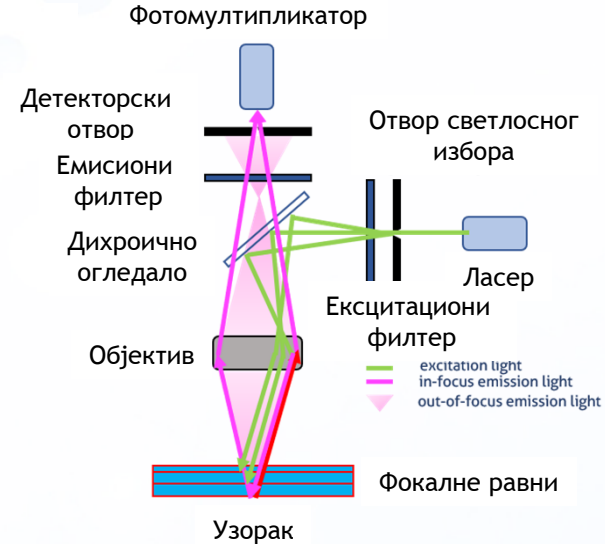
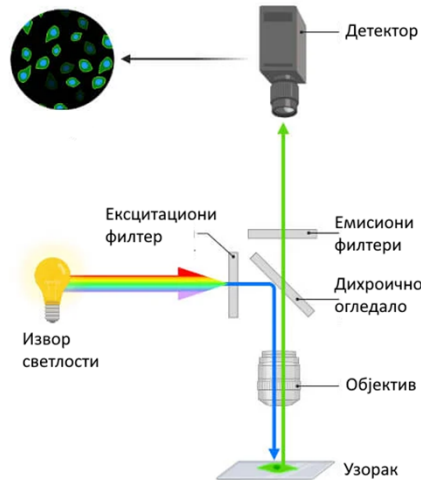
Може се одредити количина везаног молекула и последично одредити константа везивања. На сличан начин се може пратити ензимска кинетика, ако се анизотропија прати са временом.

- ❖ Долази до анизотропије поларизације услед споре ротације флуоресцентних макромолекула, тако да је раван поларизације емитоване светлости, слична равни поларизације ексцитационе светлости.

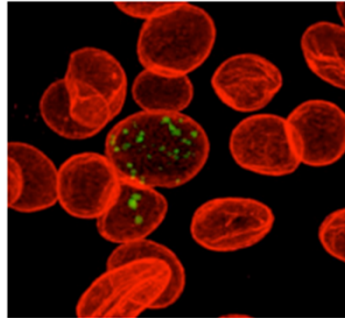
$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad \bar{r} = \sum_i f_i r_i \quad f_i \text{ удео сваке компоненте у укупној анизотропији}$$



Флуоресцентна микроскопија

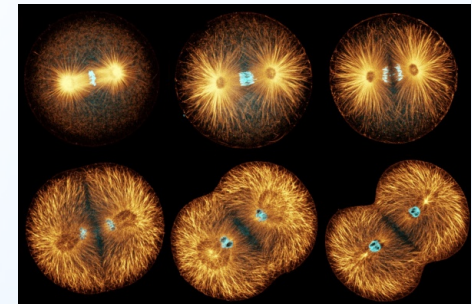


Флуоресцентна микроскопија



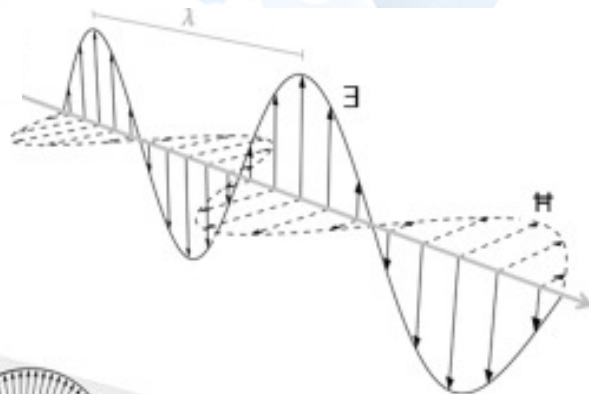
Конфокална микроскопија

❖ Конфокална микроскопија - употреба ласера; фокусирање зрака тако да слика може да се добије из различитих слојева узорка - много боља резолуција.

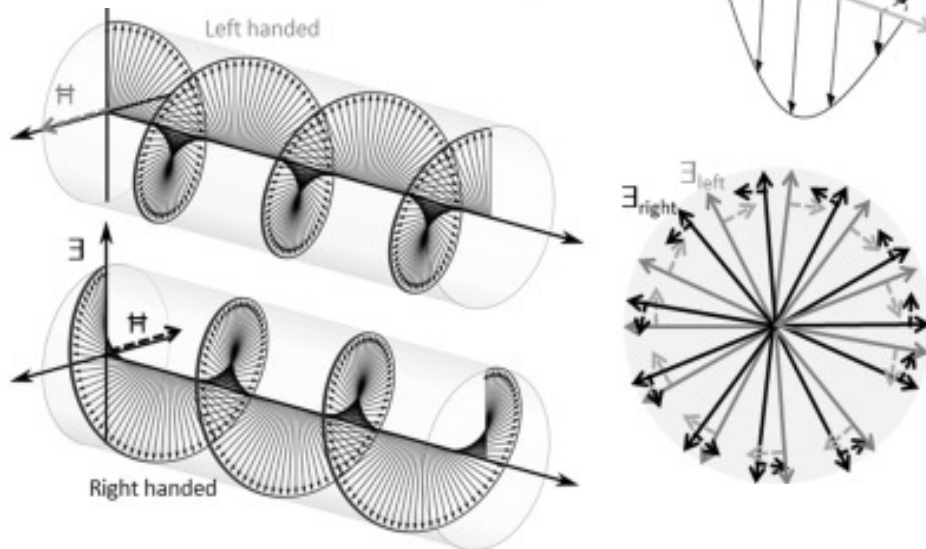


Циркуларни дихроизам

Линеарно поларизован талас



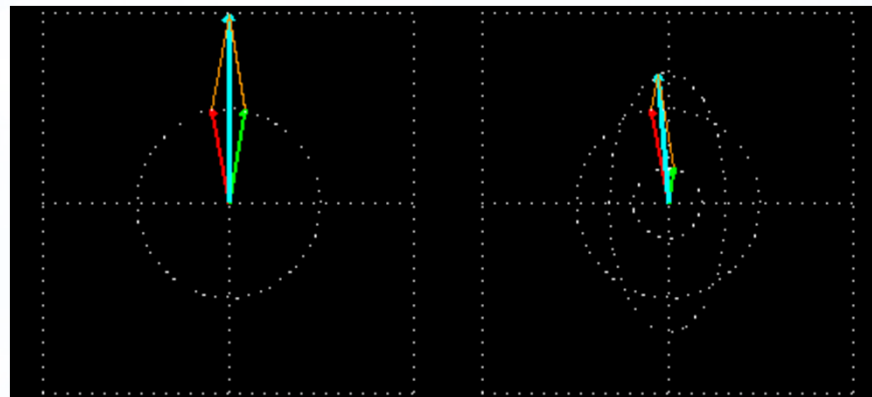
Циркуларно поларизован талас



- ❖ Структурно асиметрични молекули (хирални) у различитој мери апсорбују лево и десно поларизовану светлост.

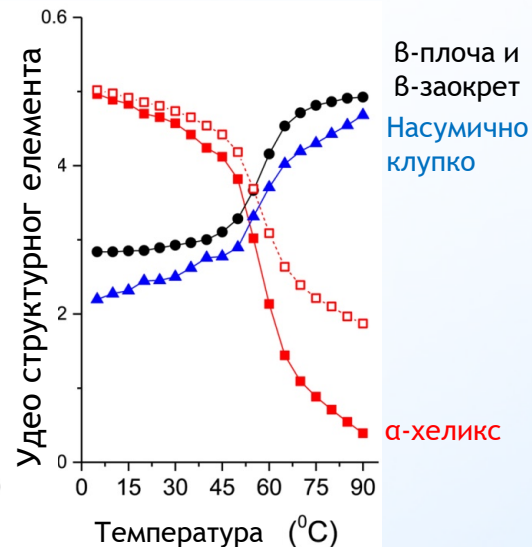
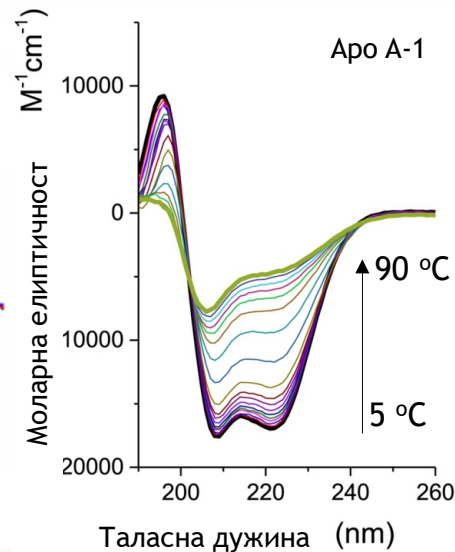
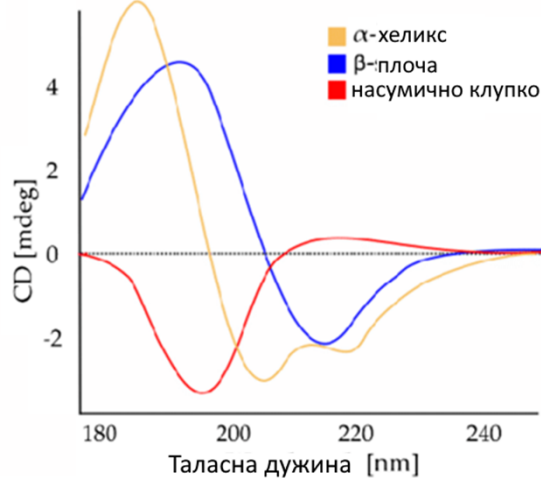
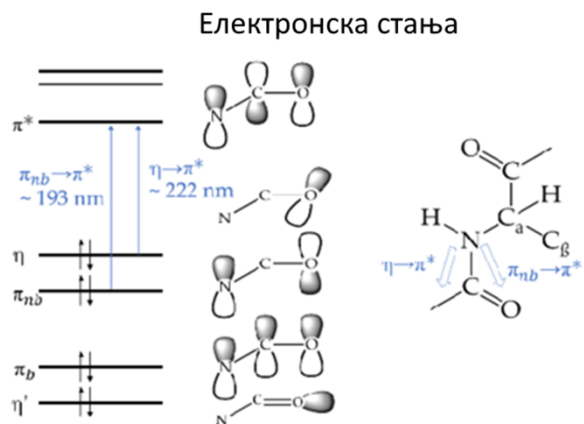
$$\Delta A = A_l - A_r \quad A = (\epsilon_l - \epsilon_r)cl \quad \Delta \epsilon = \epsilon_l - \epsilon_r$$

- ❖ Елиптичност зависи од таласне дужине, конформације молекула, концентрације, температуре и хемијског окружења.



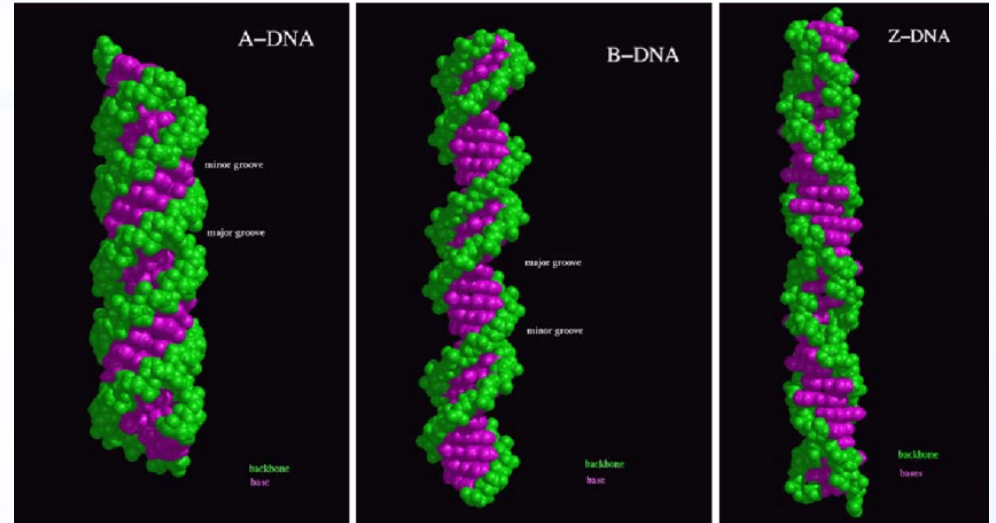
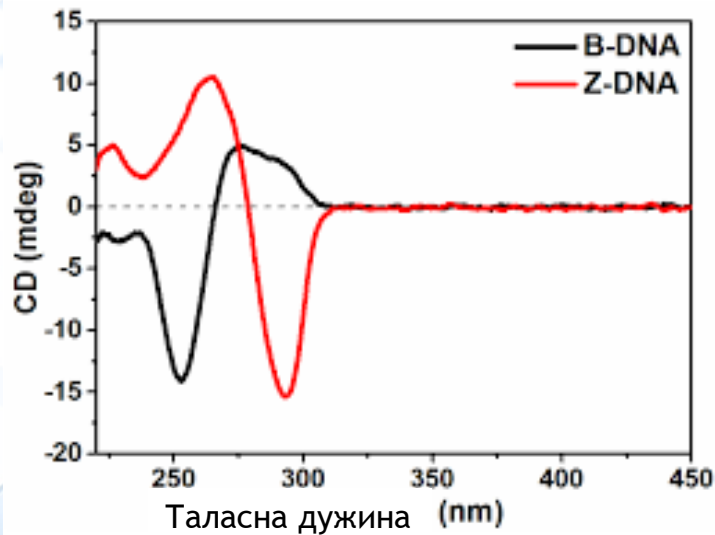
Циркуларни дихроизам - протеини

- ❖ Пептидне везе апсорбују у области 190-230 nm.
- ❖ Јака трака на 190 nm ($\pi \rightarrow \pi^*$) и слаба на око 210-220 nm ($n \rightarrow \pi^*$)
- ❖ ЦД у далекој УВ области (190-250 nm) даје информације о пептидној вези и последично секундарној структури.
- ❖ ЦД у блиској УВ области (250-300 nm) потиче од ароматичних аминокиселина и цистеина у дисулфидним везама - терцијарна структура.



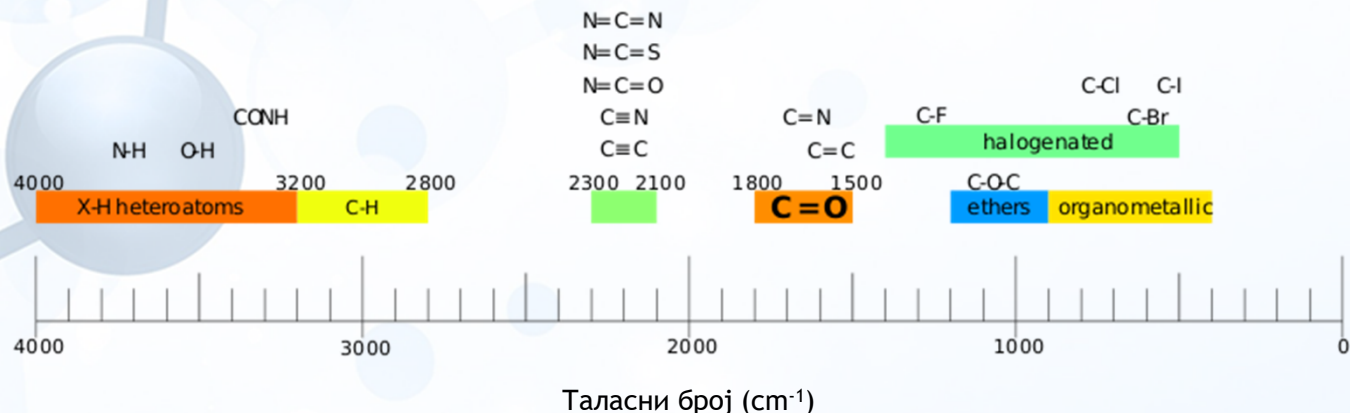
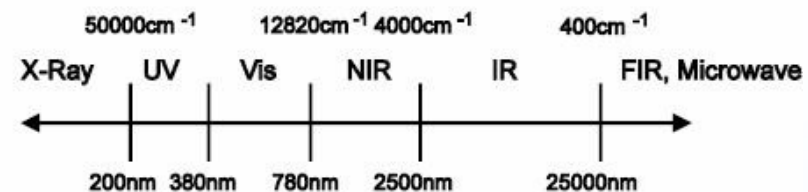
Циркуларни дихроизам - нуклеинске киселине

- ❖ Теоријска основа ЦД-а ДНК је веома комплексна, па не може да пружи структурне информације на атомском нивоу.
- ❖ Углавном се користи емпиријски.
- ❖ Потребна мала концентрација ДНК - 25 $\mu\text{g/ml}$



Вибрациона спектроскопија - инфрацрвена

- ❖ Блиска ИЦ област - овертонови, комбинационе траке слабог интензитета; траке су широке и преклапају се. Користи се за квантификацију алкохола, амина и свих једињења који садрже C-H, N-H или O-H групе.
- ❖ Средња ИЦ област - основни модови вибрација, најчешће коришћена област за биофизичка испитивања.
- ❖ Далека ИЦ област - није од значаја за испитивање биолошких узорака.

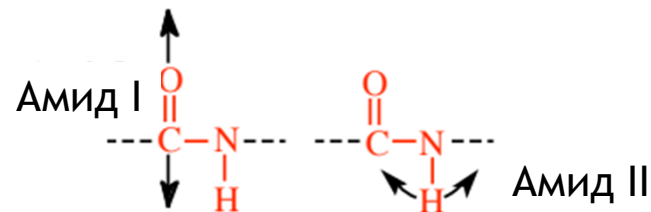


Инфрацрвена спектроскопија (ФТ-ИЦ)

- ❖ За проучавање протеина најважније маркиране три траке које потичу од пептидне везе.
- ❖ У интервалу $1500-1800\text{ cm}^{-1}$ вибрације бочних група.

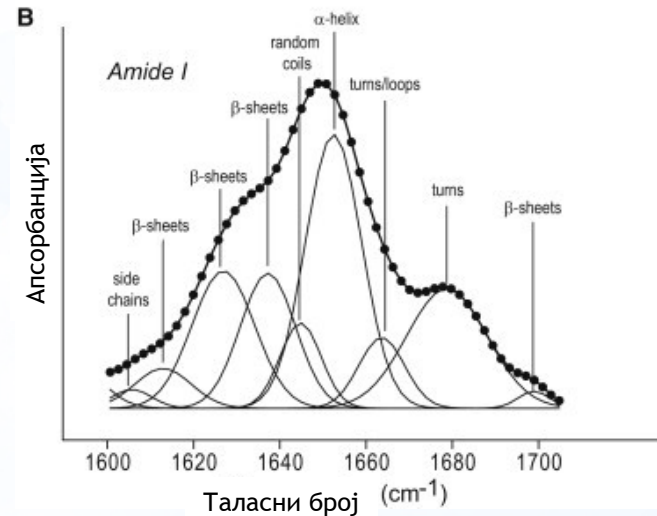
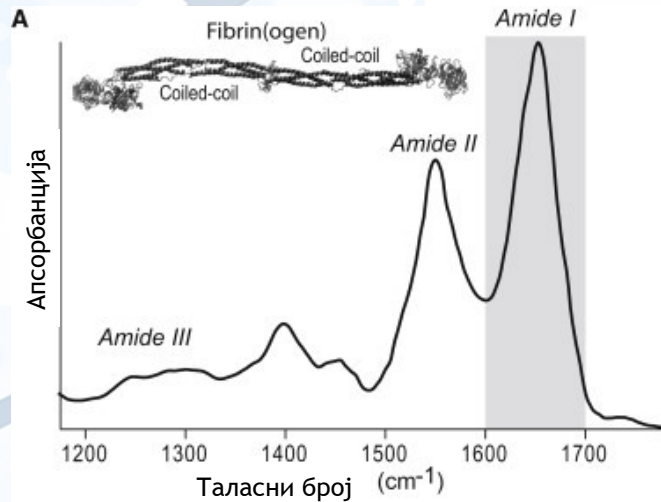
Вибрација	Таласни број (cm^{-1})	Опис
Амид А	3270-3310	N-H истезање (80%), C-N истезање
Амид Б	3030-3100	N-H истезање
Амид I	1600-1700	C=O истезање
Амид II	1510-1580	C-N истезање, N-H савијање
Амид III	1200-1400	C-N истезање, N-H савијање
Амид IV	625-767	O=C-N савијање
Амид V	640-800	N-H савијање ван равни
Амид VI	537-606	C=O савијање ван равни
Амид VII	200	Торзија протеинског скелета

- ❖ Амид А - осетљива на промене у јачини водоничних веза.
- ❖ Због учешћа пептидне везе у формирању секундарне структуре, Амид I и II траке су осетљиве на промене у секундарној структури.
- ❖ Тачан положај зависи од структурног елемента.



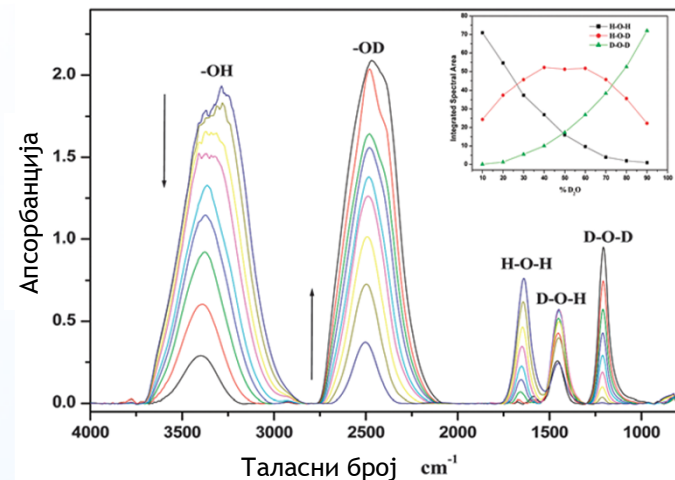
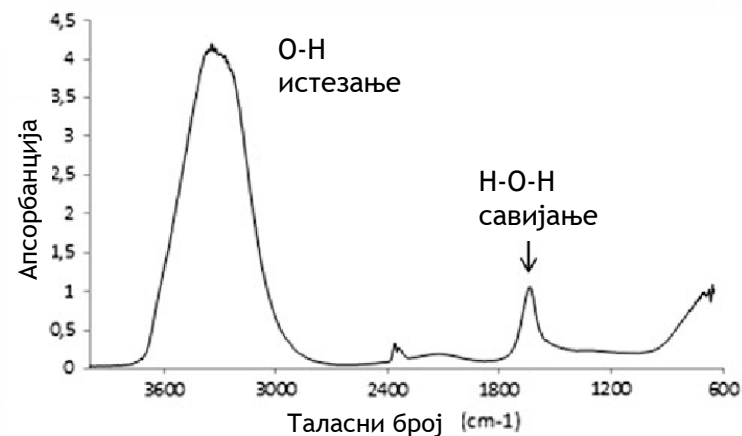
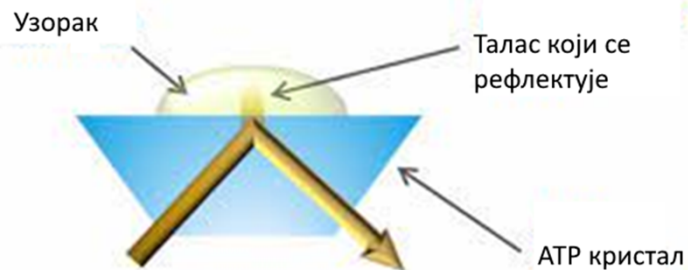
Инфрацрвена спектроскопија (ФТ-ИЦ)

Структурни елемент	Амид I	Амид II
α -хеликс	1650-1660 cm^{-1}	1550 cm^{-1}
β -плоча	1615-1637 cm^{-1} и око 1700 cm^{-1}	1520 cm^{-1}



Инфрацрвена спектроскопија (ФТ-ИЦ)

- ❖ Проблем снимања биолошких узорака због присуства воде.
- ❖ Мора да се одузима спектар воде или да се користи тешка вода, велика концентрација протеина.
- ❖ Алтернатива је АТР (Attenuated Total Reflectance)
- ❖ Лака припрема, нема оштећења узорка, пошто зрак продире у узорак само неколико микрона.

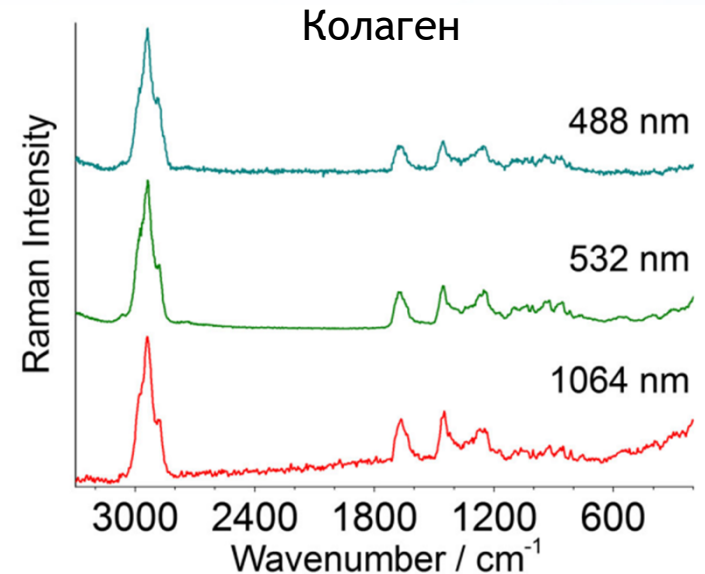


Раманска спектроскопија

- ❖ ИЦ - потребно је да се у току вибрације мења електрични диполни момент
- ❖ Раман - потребно је да се у току вибрације мења поларизабилност
- ❖ Последица је да су углавном везе са већим диполним моментом активне у ИЦ, а са мањим у Раманској спекторскопији.
- ❖ Пептидна група исто има 9 трака као у ИЦ.
- ❖ Најважније за одређивања конформације:
 - Амид I (C=O истезање, 1600-1690 cm^{-1}),
 - Амид II (C-N истезање, N-H савијање, 1480-1580 cm^{-1})
 - Амид III (C-N истезање, N-H савијање, 1230-1300 cm^{-1})

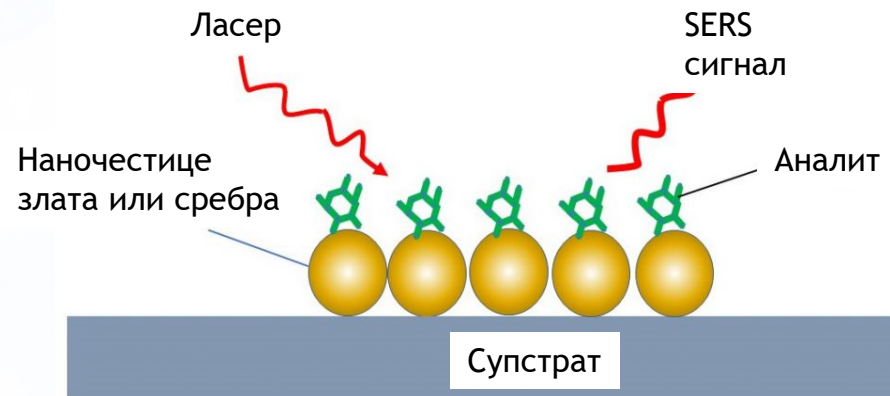
Рађена су истраживања у којима је тражена корелација између положаја Амид I и Амид III и удела α -хеликса и β -плоча добијених кристалографски.

Структурни елемент	Амид I	Амид III
α -хеликс	1662-1655 cm^{-1}	1272-1264 cm^{-1}
β -плоча	1674-1672 cm^{-1}	1242-1227 cm^{-1}



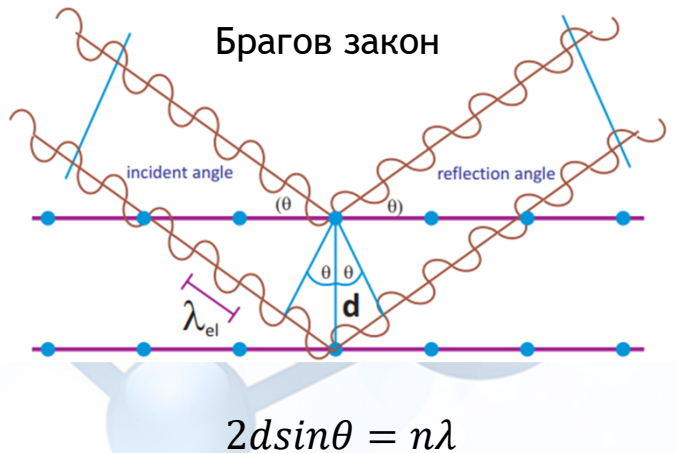
Раманска спектроскопија

- ❖ Предност у односу на ИЦ - лакши је рад са воденим растворима, није потребна посебна припрема узорка.
- ❖ Треба водити рачуна о таласној дужини ласера и примењеној снази.
- ❖ Превелико λ - слабија осетљивост пошто је интензитет Раманског расејања пропорционалан са $1/\lambda^4$
- ❖ Мање λ - могућа појава флуоресценције и деградација узорка.
- ❖ За биолошке узорке је често оптималан избор ласера из блиске ИЦ области.
- ❖ Осетљивост се може повећати коришћењем SERS-а (Surface-Enhanced Raman Spectroscopy)
- ❖ Појачање Раманског расејања између 10^6 и 10^{14} пута



Кристалологија X-зрацима

- ❖ Проучавање атомске, тј. тродимензионалне структуре
- ❖ Почива на дифракцији рендгенских зрака на електронском облаку, пошто је њихова таласна дужина реда величине међуатомских растојања.
- ❖ Добија се 3Д слика електронске густине на основу положаја и угла дифрактиваних зрака.



$$F(h, k, l) = \sum_{j=1}^N f_j e^{2\pi i(hx_j + ky_j + lz_j)}$$

$$I(h, k, l) \sim |F(h, k, l)|^2$$

Структурни фактор представља збир свих расејаних зрака на свим атомима.

$$\rho(h, k, l) = \frac{1}{V} \sum_{h,k,l} F(h, k, l) e^{2\pi i(hX + kY + lZ)} - \text{електронска густина}$$

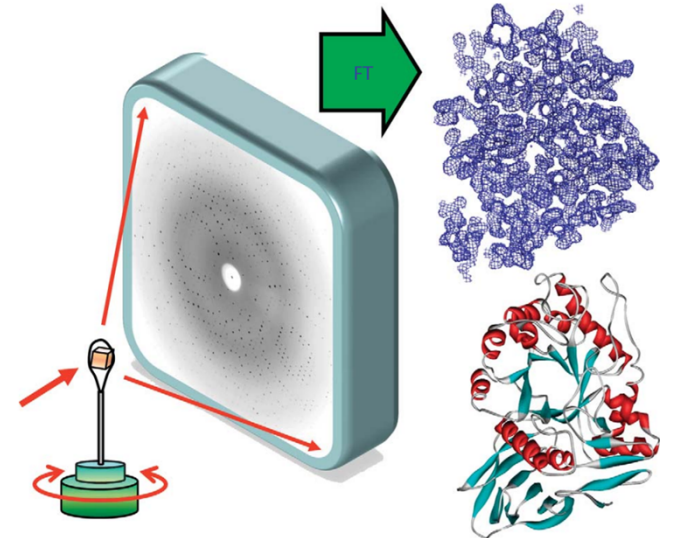
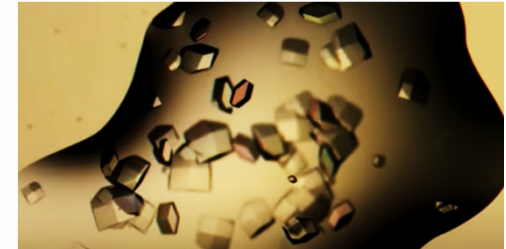


Rosalind Franklin

Кристалологија X-зрацима

- ❖ Експресија протеина, пречишћавање, кристализација.
- ❖ Неки протеини не могу да кристалишу!!!
- ❖ Проблем мембранских протеина
- ❖ Протеини нису у нативној конформацији

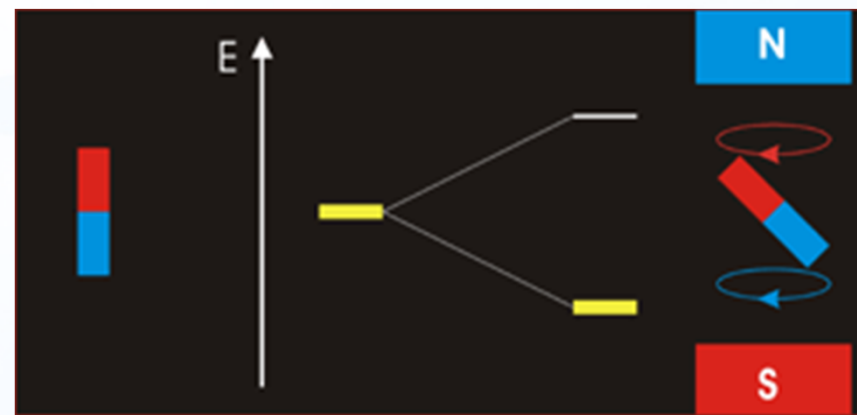
- ❖ Добијање дифрактограма, па анализа Фуријеовом трансформацијом, међутим недостаје информација о фази дифрактованог зрачења - фазни проблем.
- ❖ Експериментално тражење фаза - изоморфне замене везивањем металних јона за протеине.
- ❖ У случају постојања атома који апсорбују X-зраке, мењањем таласне дужине X-зрака могу се добити информације о фази.
- ❖ Ако су познате структуре других сличних молекула, рачунају се структурни фактори за сваку оријентацију познатог молекула. Поређењем се добија оријентација познатог молекула, која најбоље осликава испитивани. Затим се посматра слагање при транслацији у јединичној ћелији.



Магнетно-резонантне технике

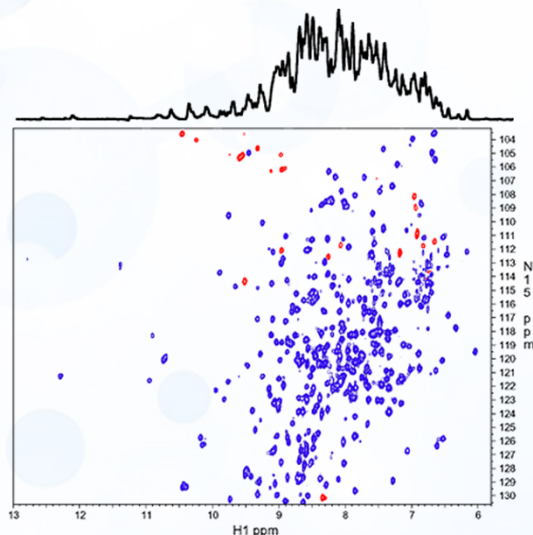
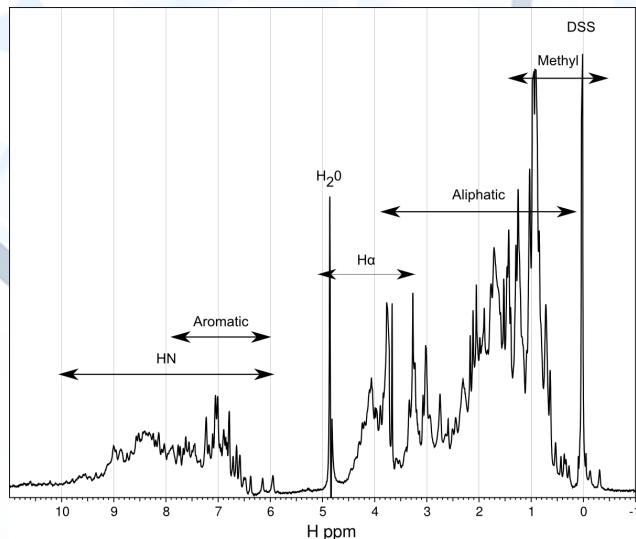


Потребно да постоји укупни спин (електронски или нуклеарни) различит од нуле.



Нуклеарна магнетна резонанција

- ❖ Налажење атомске структуре испитиваних молекула.
- ❖ При проучавању протеина, служи за испитивање терцијарне структуре.
- ❖ Хемијски помераји говоре о структури молекула.
- ❖ Мултиплетност даје информације о томе на који начин су атоми повезани.
- ❖ Нуклеарни Оверхаузеров ефекат (НОЕ) - раздаљине између спинова кроз простор (не кроз везе), ако су оне 1-5 Å.
- ❖ Коришћењем посебних пулсних секвенција добијају се 2Д, 3Д, 4Д спектри на основу којих се израчунава структура протеина.



- ❖ Предност у односу на кристалографију је испитивање протеина у раствору у нативном облику, значајно лакша припрема узорка.
- ❖ Мана - мањи протеини, до 35000 Da

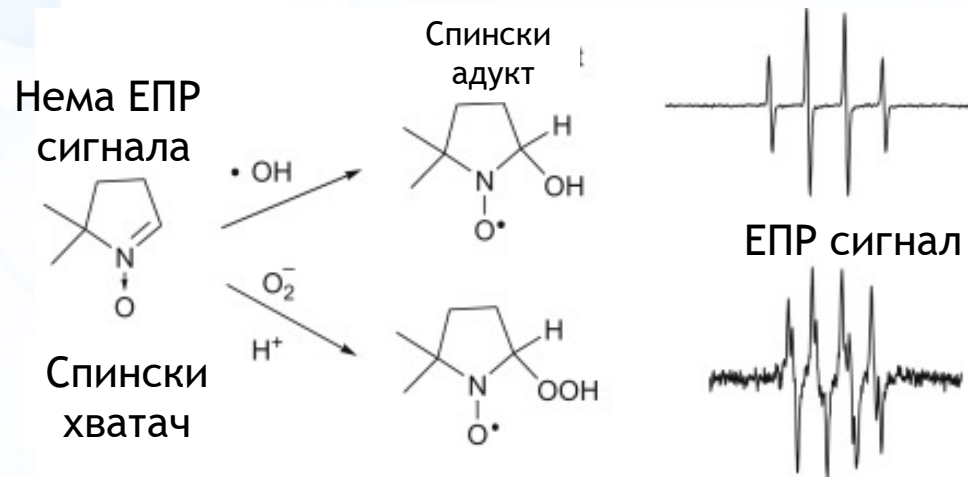
Електронска парамагнетна резонанција

- ❖ Детекција хемијских врста са бар једним неспареним електроном - слободни радикали и прелазни метали у различитим оксидационим стањима - нека нису ЕПР активна (могуће одређивање координације метала у комплексу).
- ❖ Физиолошки присутни радикали нису стабилни (10^{-9} s) да се посредно детектују:
 - ❖ супероксидни анјонски радикал - $O_2^{\bullet-}$
 - ❖ хидроксил радикал - OH^{\bullet}
 - ❖ азот-моноксид - NO



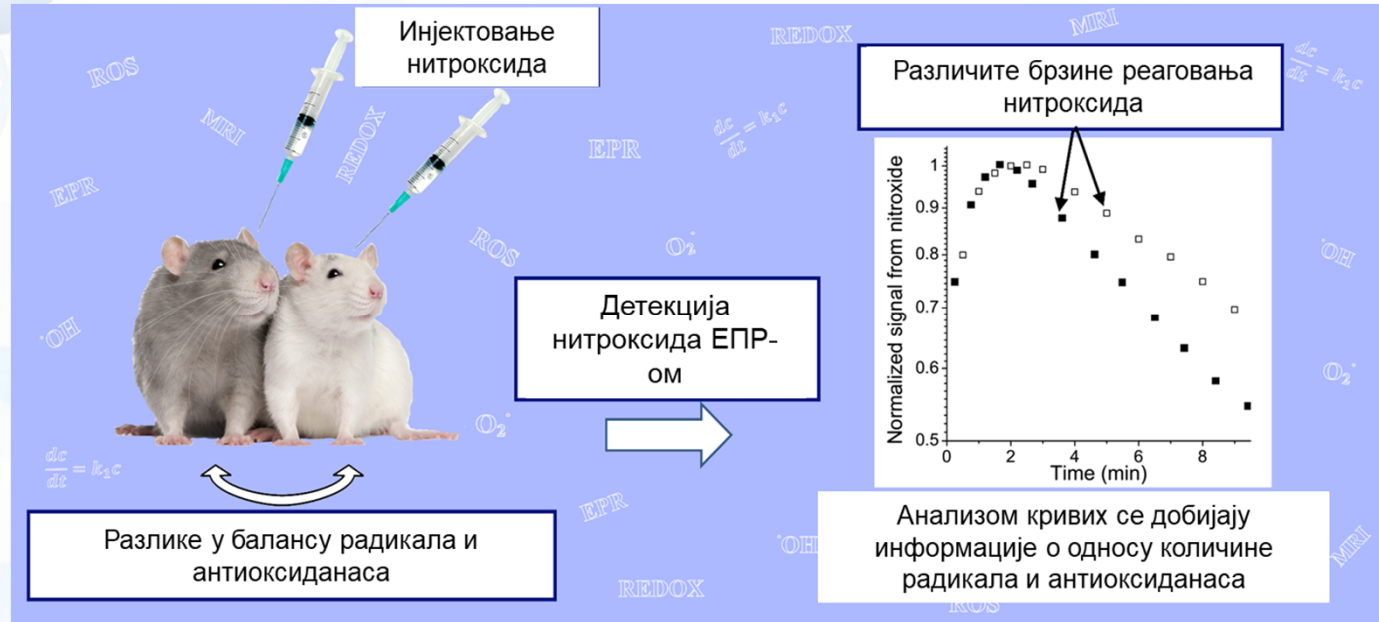
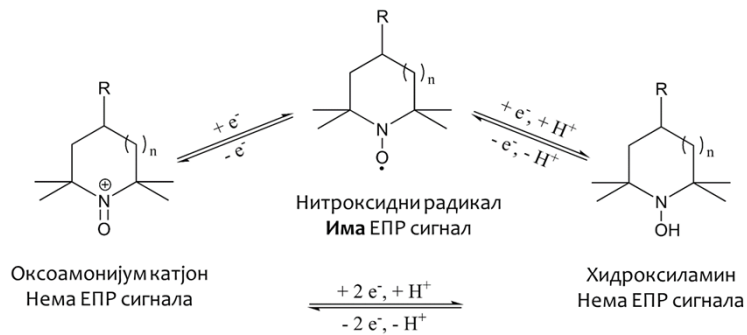
Спински хватачи (Spin-trap) - једињења која реагују са слободним радикалима дајући као производ релативно стабилан радикал (спински адукт)

Не могу да се користе *in vivo*, али могу за ћелијске културе, хомогенате ткива...

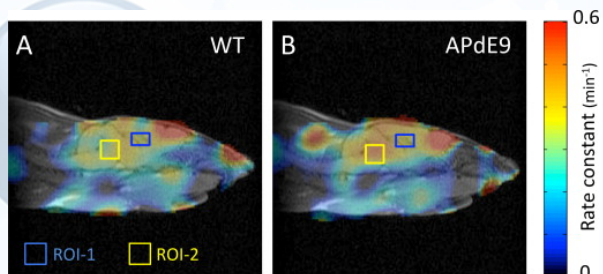
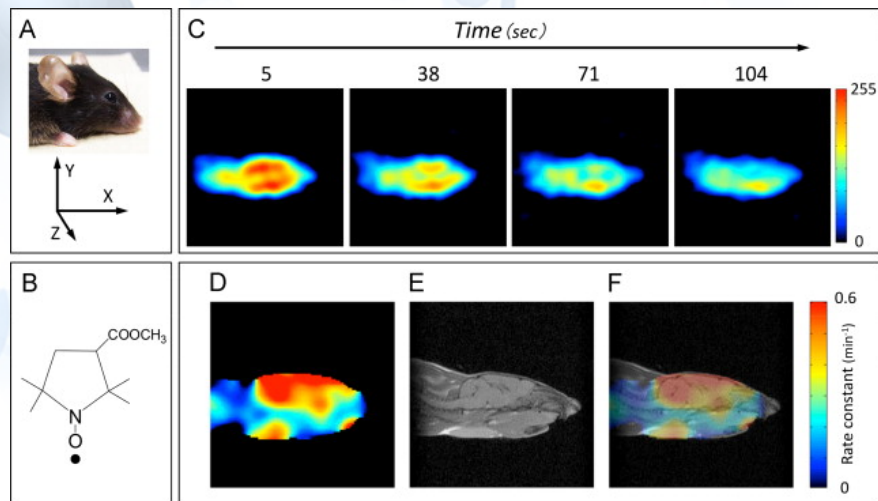


Електронска парамагнетна резонанција

- ❖ Детекција радикала, или боље редокс статуса, спинским пробама
- ❖ Редокс статус говори о односу концентрација реактивних кисеоничних врста (слободних радикала) са једне стране и антиоксидативних врста са друге.



ЕПР - Алцхајмерова болест



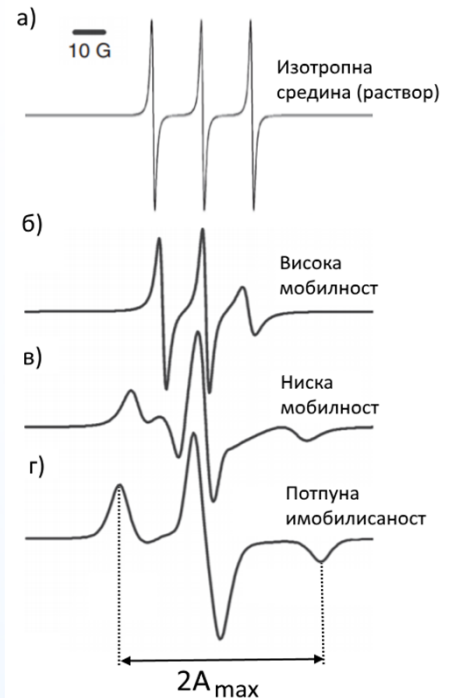
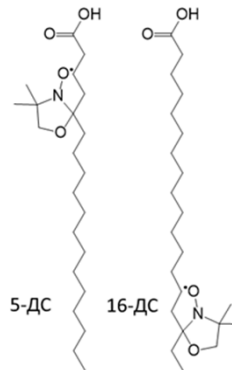
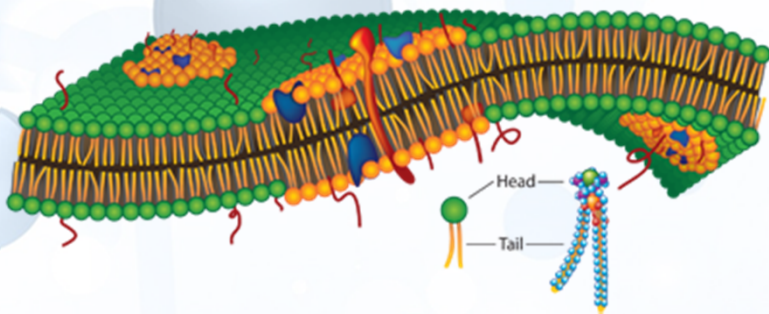
*Matsumura et al., 2015, Free Rad. Biol. Med., 85, 165-173

Закључци:

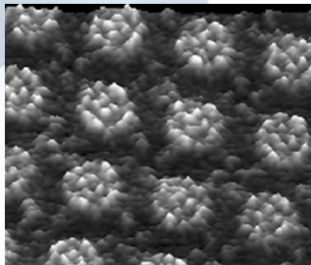
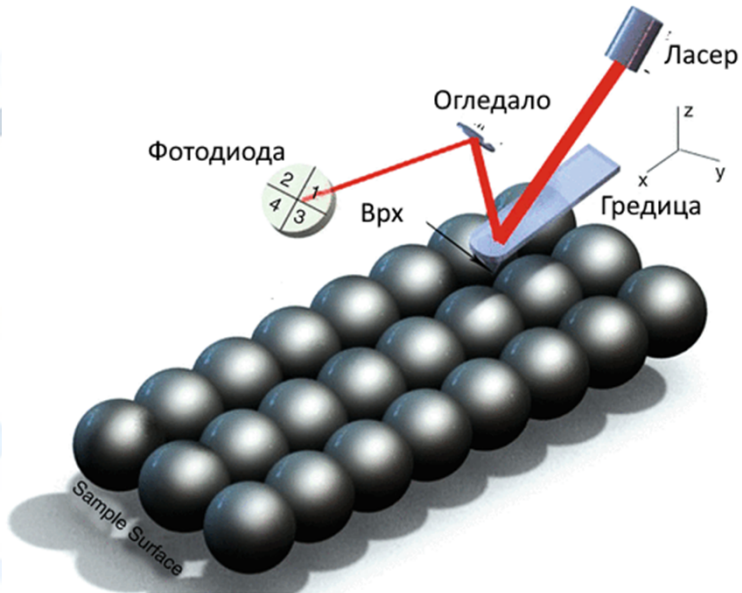
- Постојање оксидативног стреса у хипокампусу испитиваних мишева
- Драстичном порасту количине Аβ-плакова претходи промена у редокс статусу.

ЕПР/спинско обележавање - протеини и мембране

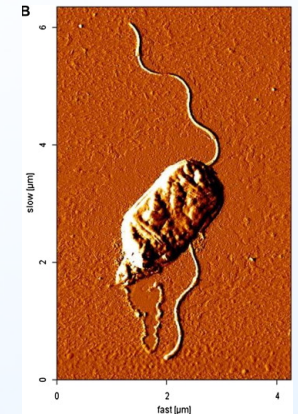
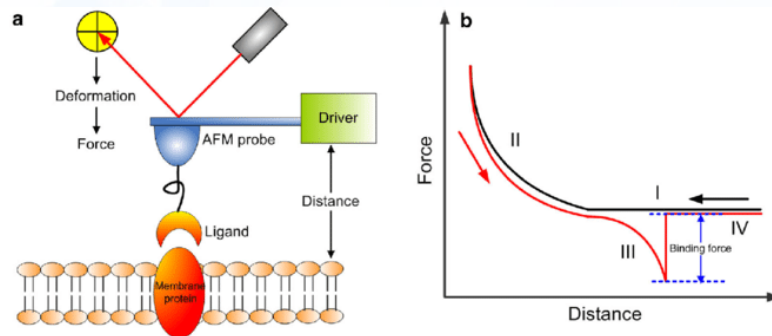
- ❖ Метода којом се стабилни радикал (нитроксид), спински обележивач, везује за протеине или уграђује у мембране одакле обликом свог ЕПР спектра даје информацију о својој околини.
- ❖ Спински обележивачи су својеврсни „шпијуни“ - у зависности од свог окружења дају различите сигнале.
- ❖ Неке информације које се могу добити спинским обележавањем:
 - ❖ изложеност обележивача води
 - ❖ „чврстина“ или флексибилност места где се налази обележивач
 - ❖ растојања између појединих делова протеина, чиме се разоткрива структура протеина....



Микроскопија атомске силе

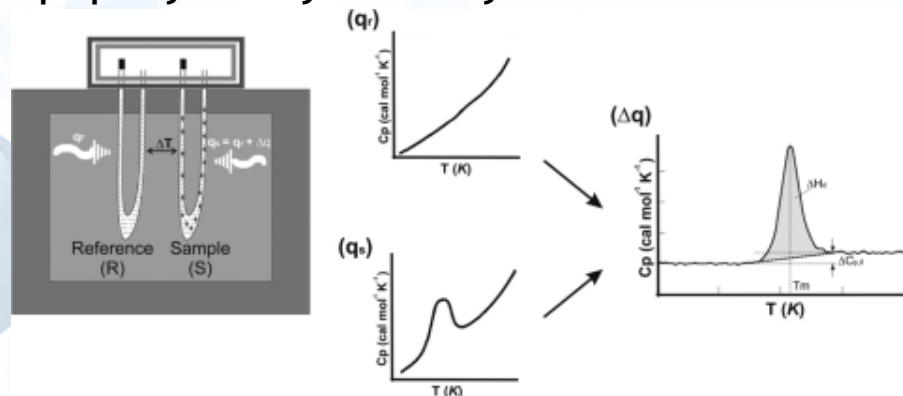


- ❖ Доступне информације на нанометарској скали
- ❖ Могућ рад са чврстим и течним узорцима
- ❖ Снимање живих ћелија, вируса, бактерија - бесконтактни мод
- ❖ Визуелизација мембрана
- ❖ Јачина везе између протеина и лиганда
- ❖ Одређивање крутости/еластичности ћелија



Диференцијална скенирајућа калориметрија

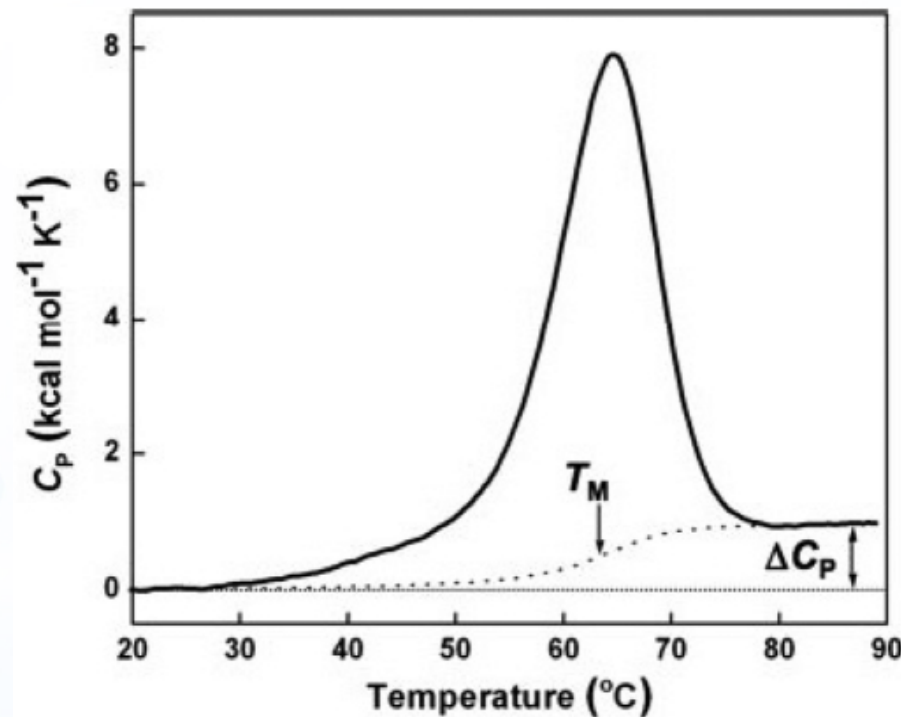
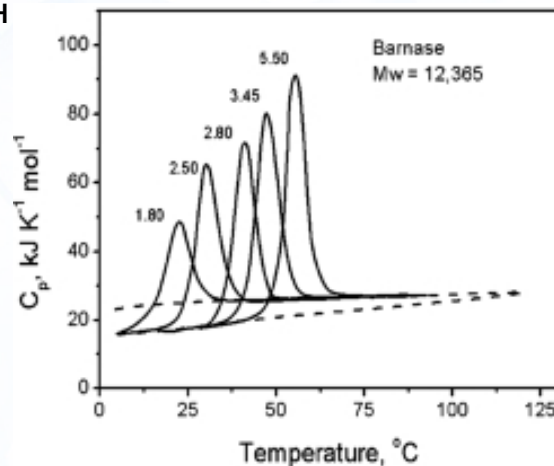
- ❖ Мерење термалних својстава материјала, како би се установила веза између температуре и специфичних физичких својстава супстанције.
- ❖ Директно мерење енталпије које су последица процеса од интереса.
- ❖ Две врсте: базиране на топлотном флуксу и на компензацији снаге.
- ❖ Код прве - узорак и еталон се греју истовремено једнаком линеарном брзином загревања, али због топлотног капацитета C_p узорка, постоји температурска разлика између узорка и еталона која се мери и прерачунава у топлоту.



- ❖ Код друге врсте - узорак и еталон се држе на истој температури, а мери се разлика у топлоти потребна да температура буде једнака у узорку и еталону.

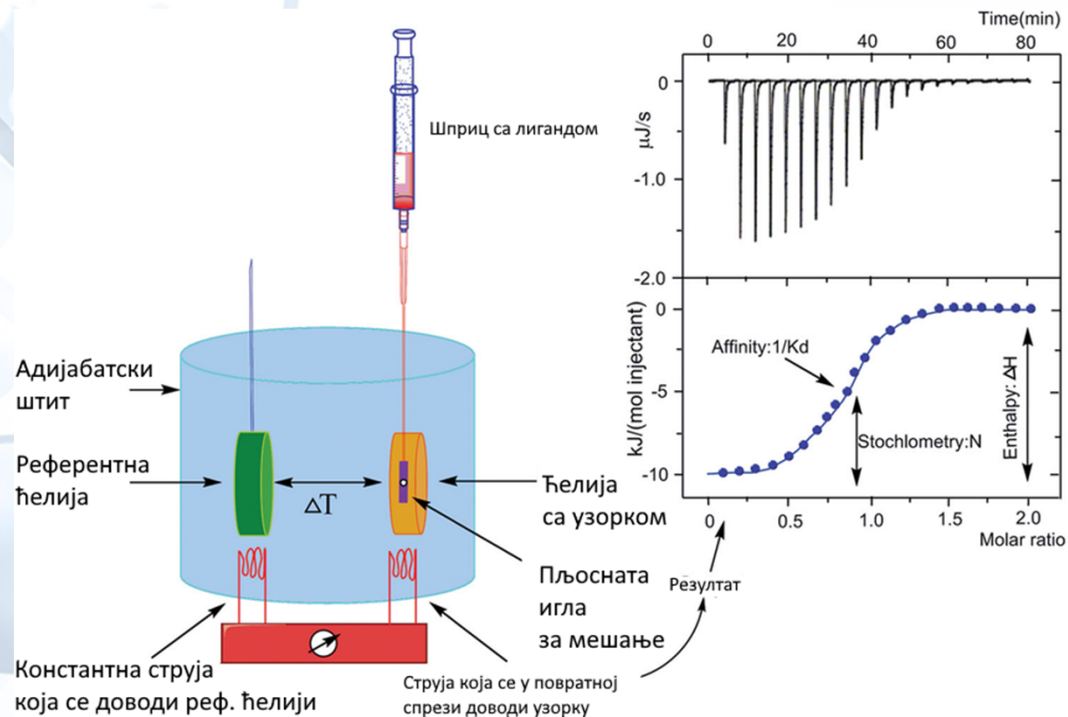
Диференцијална скенирајућа калориметрија

- ❖ Рачунање термодинамичких параметара - температура прелаза T_M (нпр. денатурације)
- ❖ Интеграљењем површине испод криве (уз претходно одузимање базне линије) - ΔH_{cal}
- ❖ Интеграљењем $C_p/T=f(T)$ ΔS , па из тога ΔG и K
- ❖ Проучавају се:
 - ❖ Конформационе промене протеина и нуклеинских киселина
 - ❖ Фазни прелази у мембранама, липозомима...
 - ❖ Интеракције лиганд/протеин



Изотермална титрациона калориметрија

❖ Рачунање термодинамичких параметара, константе везивања лиганда за протеин



Литература

P. J. Walla, *Modern Biophysical Chemistry*, 2014