

# Laboratórne cvičenia z biofyziky

Július Cirák, Marianna Sohová, Soňa Halászová, Tomáš Váry, Juraj Chlpík

Ústav jadrového a fyzikálneho inžinierstva FEI STU v Bratislave, 2017

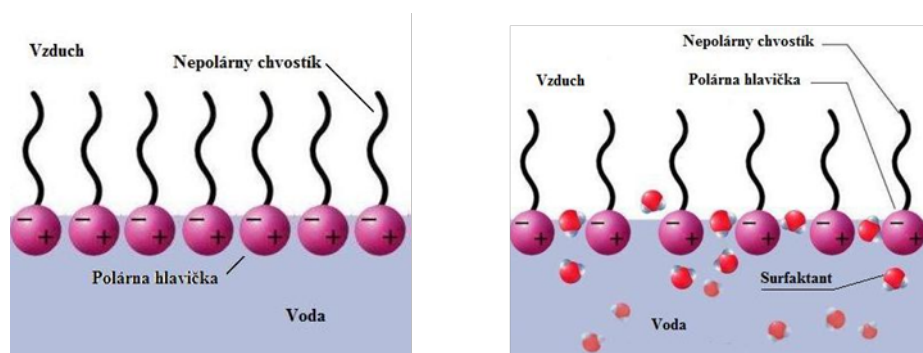
## **Obsah**

1. Meranie vlastností lipidových monovrstiev na hladine vody	1
2. Transport vody cez biomembrány	6
3. Určenie hrúbky membrány z kapacitných meraní	10
4. Meranie povrchového napätia v biologických roztokoch	14
5. Papierová chromatografia	19
6. Meranie bioelektrických signálov v nerve	22
7. Štúdium absorpčných spektier rastlinných pigmentov	30
8. Využitie elipsometrie v biosenzorových aplikáciách	35
Literatúra	41

## Meranie vlastností lipidových monovrstiev na hladine vody

### Teoretická časť

Molekuly povrchovo aktívnych látok, ktoré sa nachádzajú na fázovom rozhraní, môžu za určitých podmienok vytvoriť nasýtenú adsorbovanú vrstvu. Už roku 1773 si Benjamin Franklin všimol, že sa vlny na hladine rybníka upokojujú po vyliatí čajovej lyžičky oleja. Vtedy si Franklin ešte neuvedomil, že olej (kyselina olejová) vytvorila na vodnej hladine monomolekulovú vrstvu. Až o storočie neskôr lord Rayleigh vypočítal, že kyselina olejová vytvorila vrstvu s hrúbkou 1,6 nm. Ak poznal objem kvapnutého oleja a veľkosť pokrytej plochy, vedel z objemu určiť hrúbku monovrstvy.



Obr. 1.1: Vytvorená monovrstva z lipidu bez prítomnosti a v prítomnosti surfaktantu [2].

Pre tento typ experimentov je dôležitý výber vhodných molekúl. V závislosti od štruktúry a elektrických vlastností rozdeľujeme molekuly na dve skupiny: polárne a nepolárne. Polárne molekuly majú vysokú relatívnu permitivitu ( $\epsilon_r$ ) a dobre sa rozpúšťajú v polárnych rozpúšťadlách (vo vode). Naproti tomu, nepolárne molekuly sú vo vode takmer nerozpustné [1]. Molekuly látok vytvárajúce typické monovrstvy na povrchu rozhrania voda-vzduch majú tzv. *amfifilný* charakter. Pre amfifilné molekuly, napr. lipidy, je typické, že sa dajú rozlíšiť polárne (hydrofilné) aj nepolárne (hydrofóbne) časti molekuly. Na fázovom rozhraní voda-vzduch sa molekuly orientujú tak, ako je znázornené na obrázku obr. 1.1. Hydrofilné časti molekuly (karboxylové, hydroxylové, aminové skupiny) sú v kontakte s vodou a dlhé uhľovodíkové reťazce sú obrátené kolmo na rozhranie do vzduchu. Každý lipid sa skladá z polárnej hlavičky a nepolárneho konca. Takéto usporiadanie umožňuje molekulám vo vodnom prostredí vytvorenie aj tzv. lipidovej dvojvrstvy, ktorá je základnou stavebnou jednotkou biologických membrán.

Systematickým výskumom monovrstiev sa medzi prvými zaoberali Irvin Langmuir a Katherine Blodgettová, ktorý zistili, že plocha, ktorú zaberajú amfifilné molekuly, nezá-

visí od dĺžky hydrofóbneho reťazca molekuly, keďže tieto sa orientujú vertikálne k rovine hladiny vody. Taktiež vyvinuli metódu na depozíciu monovrstiev molekúl na pevný substrát. Zariadenie na meranie vlastností organických monovrstiev a ich depozíciu (vanička Langmuira-Blodgettovej) umožňuje z nameraných závislostí povrchového tlaku na ploche na jednu molekulu materiálu (izoterma pre dvojrozmerný systém) určiť, ako sa správajú rozličné molekuly v membránach a modelovať tak biologické vrstvy.

Hydrofóbna vrstva je relatívne homogénna oblasť uhľovodíkových reťazcov, ktoré vzájomne interagujú prostredníctvom van der Waalsových síl. V polárnej oblasti sú interakcie rôznorodejšie, nakoľko sa tu vyskytujú aj dipólové a elektrostatické sily, pevne viazaná voda a vodíkové väzby [1]. Pokiaľ molekuly tvoria kompaktnú monovrstvu, hydrofóbne reťazce sú orientované spravidla v smere normály k rozhraniu voda-vzduch.

Skúmanie štruktúry a vlastností monomolekulárnych vrstiev je dôležité, nakoľko pomáha lepšie pochopiť procesy na biologických membránach spojené s ich mechanickými a transportnými vlastnosťami. Ide o prenos excitácií nervom, vplyv farmakoterapie na činnosť bunkových orgánov, narkózu a pod. Rovnako využívame štúdium monomolekulárnych vrstiev v základnom výskume na simulovanie interakcií chemických látok s membránami buniek.

## Experimentálna časť

### Úlohy

1. Pomocou LB vaničky odmerajte izotermu monovrstvy lipidu DPPC a opíšte jednotlivé fázy vznikajúcej monovrstvy.
2. Zo získaných parametrov určte plochu monovrstvy pripadajúcu na jednu molekulu v tuhej fáze.

### Prístroje a pomôcky

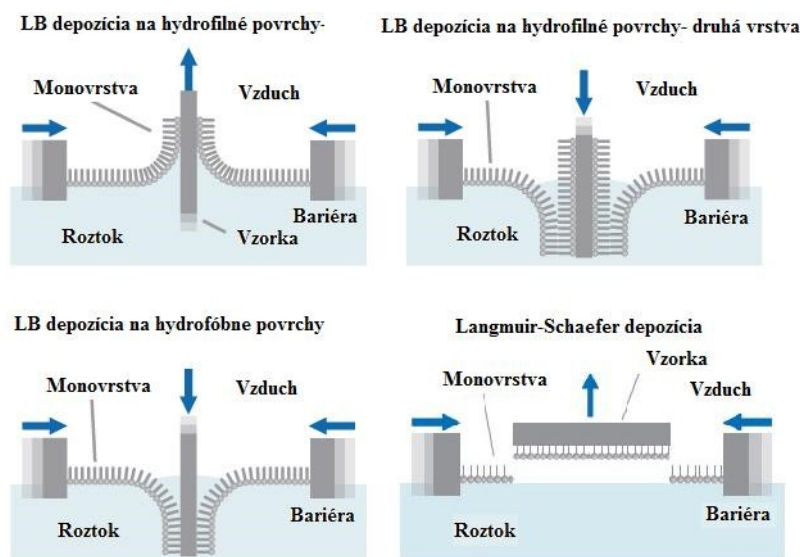
LB vanička, rukavice, Wilhelmov pásik, počítač, kadičky, odsávačka, striekačka s pevnou ihlou (typu Hamilton).

### Chemikálie

Destilovaná voda, lipid – dipalmitoyl fosfatidylcholín DPPC, chloroform.

### Opis zariadenia a metóda merania

LB vanička je užitočná pri vytváraní tzv. SAM (self-assambled monolayer) samousporiadaných povrchov na rozhraní subfáza (v našom prípade voda) – vzduch. Takto vytvorené



Obr. 1.2: Možnosti depozície monovrstiev na tuhé substráty [3].

vrstvy následne môžu byť prenesené (deponované) na povrchy v dvoch konfiguráciách: otočené polárnou alebo nepolárnou časťou nahor a v jednej alebo viacerých vrstvách (obr. 1.2).

Základné meracie zariadenie sa skladá z vaničky s jednou alebo dvoma bariérami, Wilhelmovho pásika a nosného rámu (obr. 1.3). Vanička je vyrobená z vodou nezmáčavého materiálu – teflónu. Do vaničky sa po vyčistení naplní destilovanou vodou do výšky tak, aby vytvorila meniskus nad jej okrajom. Následne sa niekoľkokrát stlačia bariéry, aby prípadné nečistoty zostali v strede (na kraji) a mohli byť pomocou odsávačky odstránené. Wilhelmov pásik je pásik filtračného papiera zavesený na citlivom mechanizme, umožňujúci merať povrchový tlak, ktorý vzniká na rozhraní. Tlak sa mení v závislosti od vzájomnej vzdialenosti a teda silových interakcií molekúl materiálu na rozhraní. Ešte pred začatím merania je potrebné pásik namočiť do vody, aby bol rovnomerne nasiaknutý vodou.

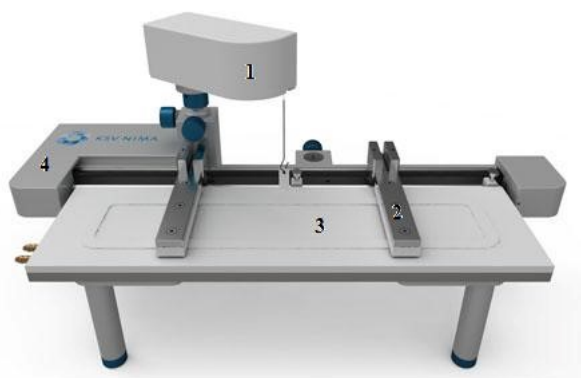
Meranie je založené na rovnomernom stláčaní amfifilnej vrstvy bariérou tak, aby sa vrstva nepoškodila. Pritom sledujeme izotermu, t. j. závislosť povrchového tlaku od plochy pripadajúcej na jednu molekulu materiálu. Ide o dvojrozmernú analógiu izotermy plynu, kedy sa zaujímate o závislosť tlaku od objemu. Priebeh tejto krivky opisuje jednotlivé fázové stavy a môžeme z nej určiť termodynamické a mechanické vlastnosti vrstvy.

Stláčané molekuly lipidov prechádzajú pri tvorení monovrstiev viacerými fázami (obr. 1.4): plynnou (G), tekuto-expandovanou (Le), tekuto-kondenzovanou (Lc), tuhou (S). Následne nastáva kolaps vrstvy (C). V závislosti od druhu molekuly a teploty majú izotermy rozličný priebeh a jednotlivé fázy sa vyskytujú pri rozličných povrchových tlakoch.

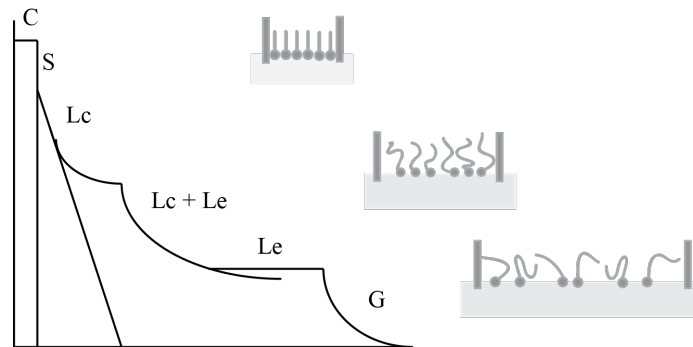
Použitý DPPC je jeden z druhov fosfolipidu, ktorý sa nachádza v biomembránach buniek živých organizmov. Na rozhraniach buniek tieto molekuly tvoria dvojvrstvu, ktorá oddeľuje vnútorné cytoplazmatické prostredie od okolia. Meraním vlastností takýchto vrstiev sa dá odhadnúť správanie biomembrán za prítomnosti rôznych surfaktantov, prípadne zmeny ich vlastností pri zmene okolitých podmienok.

### Postup merania a vyhodnotenie

1. LB vaničku dokonale vyčistíme pomocou chloroformu a špeciálnych bezvláknových obrúskov. Každá nečistota môže viesť k problémom s vytvorením vrstvy. Pozor! Chloroform je veľmi prchavá látka, vystavujme sa jej pôsobeniu len na čas nevyhnutný na vyčistenie povrchu.
2. Otvoríme bariéru a postupne nalievame vodu do vaničky tak, aby vytvorila meniskus nad úrovňou okraja vaničky. Bariéru zatvoríme a z povrchu hladiny odstránime prítomné nečistoty pomocou odsávačky.
3. Bariéru necháme otvorenú a pomocou hamiltonky aplikujeme pripravený roztok DPPC v chloroforme ( $c = 1 \text{ mmol/l}$ ) v malých kvapkách na hladinu v objeme asi  $100 \mu\text{l}$ . Malé kvapky lipidu jemne ukladáme na hladinu vody. Pokúšame sa zabrániť vniknutiu roztoku do subfázy.
4. Počkáme 10 min na úplné odparenie chloroformu.
5. Nastavíme rýchlosť stláčania bariéry na hodnotu  $20 \text{ cm}^2/\text{min}$ .
6. Sledujeme vytvorenú krivku fázových prechodov lipidu až po kolaps vrstvy, kedy meranie zastavíme.



Obr. 1.3: LB vaňa: 1 – senzor povrchového tlaku (Wilhelmova platnička/pásik), 2 – pohyblivé bariéry, 3 – vanička, 4 – rám [3].



Obr. 1.4: Priebeh izotermy, G – gas, Le – liquid expanded, Lc – liquid condensed, S – solid, C – collapse [4].

7. Získanú krivku vyhodnotíme z hľadiska vznikajúcich fázových prechodov.
8. Zo získaných parametrov určíme plochu monovrstvy pripadajúcu na jednu molekulu v tuhej fáze a porovnáme s hodnotou pre DPPC uvádzanou v literatúre.

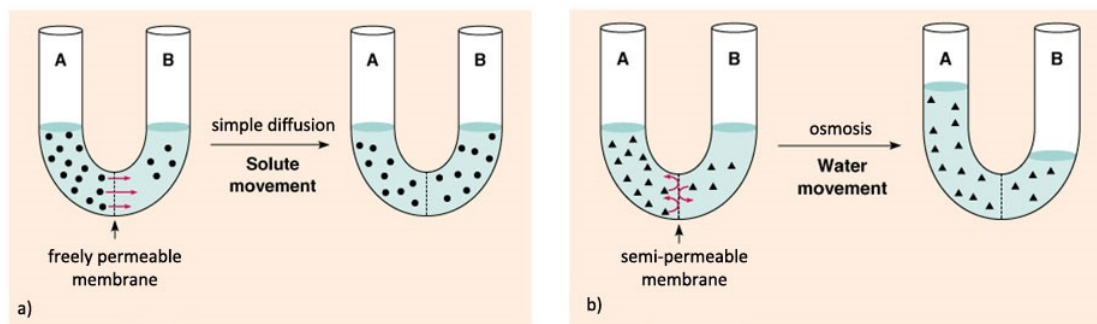
## Transport vody cez biomembrány

### Teoretická časť

Každá bunka je obklopená bunkovou membránou, ktorá udržiava komponenty bunky izolované od vonkajšieho prostredia. Služi tiež ako komunikačné rozhranie medzi bunkou a jej prostredím, podieľa sa na regulácii toku látok z a do bunky. Transport látok môže byť realizovaný aktívne (prostredníctvom molekúl alebo častíc) a pasívne (difúzia, osmóza). Difúzia je samovoľné prenikanie častíc jednej látky medzi častice druhej látky v smere koncentračného spádu, napr. transport iónov  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  cez bielkovinový kanál uložený v membráne. Osmóza je selektívny transport molekúl rozpúšťadla cez pórovitú (semipermeabilnú) membránu do roztoku s vyššou koncentráciou. Počas tohto procesu dochádza k zvýšeniu tlaku na tej strane membrány, do ktorej preniká rozpúšťadlo. Vzniknutý tlak sa nazýva osmotický tlak a je definovaný

$$\pi = cRT \quad (2.1)$$

kde  $c$  je koncentrácia roztoku,  $R = 8,314 \text{ J/K} \cdot \text{mol}$  je univerzálna plynová konštanta a  $T$  je termodynamická teplota.



Obr. 2.5: Transport molekúl pri a) difúzii a b) osmóze.

Objem kvapaliny, ktorý prejde cez membránu za časovú jednotku cez jednotku plochy sa nazýva objemový tok materiálu  $J_V$  a je definovaný

$$J_V = J_1 V_1 + J_s V_s \quad (2.2)$$

kde  $V_1$  je parciálny molárny objem rozpúšťadla,  $V_s$  je parciálny molárny objem rozpustenej látky,  $J_1$  je tok rozpúšťadla a  $J_s$  je tok rozpustenej látky. Rozdiel rýchlostí pohybu látky  $v_s$



a rozpúšťadla  $v_s$  sa nazýva *výmenný* alebo *difúzny tok*  $J_D$ :

$$J_D = v_s - v_l = \frac{J_s}{c_s} \quad (2.3)$$

pričom  $c_s$  je aritmetický priemer koncentrácií oboch fáz. *Hydraulický koeficient vodivosti*  $L_v$ , nazývaný aj mechanický filtračný koeficient, patrí k dôležitým charakteristikám membrán. Možno ho vypočítať nasledujúcim spôsobom:

$$L_v = \frac{J_V}{\Delta p - \Delta \pi} \quad (2.4)$$

Ak sa meranie uskutočňuje pri izobarických podmienkach ( $\Delta p = 0$ ) a na získanie rozdielu osmotických tlakov použijeme semipermeabilnú látku, rovnica sa zjednoduší:

$$L_v = \frac{J_V}{\Delta \pi} \quad (2.5)$$

Na základe rovnice (2.5) možno hydraulický koeficient vodivosti definovať ako pomer medzi objemovým tokom  $J_V$  a rozdielom osmotických tlakov  $\Delta \pi$ .

V tomto laboratórnom cvičení sa na určenie termodynamických transportných parametrov membrány používa špeciálne navrhnutá meracia aparátúra s kapilármi. Pre objemový tok kvapaliny  $J_V$  v kapiláre a vzdialenosť  $\Delta l$ , ktorú v nej kvapalina prejde, platí

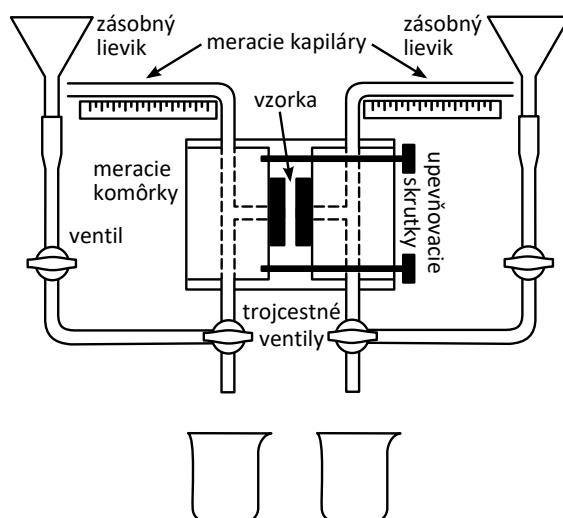
$$J_V = \frac{\Delta l S_k}{\Delta t S_m} \quad (2.6)$$

kde  $S_k$  je plocha vnútorného prierezu kapiláry a  $S_m$  je plocha membrány. Ak je rozpúšťadlom voda a sú zachované izobarické podmienky, platí vzťah

$$J_V = \pi_2 L_v \quad (2.7)$$

kde  $\pi_2$  je osmotický tlak roztoku určený vzťahom (2.1).

Základnou podmienkou prežitia buniek je udržanie rovnováhy v organizme, tento stav možno udržať pomocou regulácie iónovej rovnováhy a príjmu a výdaju vody. V ľudskom tele pomocou osmózy dochádza k odstráneniu škodlivých látok z krvi v obličkách, k vstrebávaniu vody žalúdkom a tenkým črevom. Zmenou vonkajších podmienok v okolí bunky môže dôjsť k narušeniu jej rovnováhy. Ak je bunka vystavená hypertonickým podmienkam (napr. morská voda), bunka zvyčajne odovzdáva vodu a dochádza k jej scvrknutiu. Naopak, pri hypotonických podmienkach (napr. riečna voda), bunka spravidla prijíma vodu z okolia a môže dôjsť k jej prasknutiu. V rastlinách je osmóza čiastočne zodpovedná za vstrebávanie pôdnej vody koreňovou sústavou.



Obr. 2.6: Schéma meracej aparátúry.

## Experimentálna časť

### Úlohy

Experimentálne určenie transportných parametrov membrán.

### Prístroje a pomôcky

Meracia aparátúra, membrána – plátok zemiaka, jablka, cibule ( $\phi = 10 \text{ mm}$ ).

### Chemikálie

Destilovaná voda, roztok sacharózy v koncentračnej oblasti  $0,1 - 0,5 \text{ mol/l}$

### Opis zariadenia a metóda merania

Meracia aparátúra je na obr. 2.6. Membrána je umiestnená medzi meracími komôrkami, ktoré sú spojené spojovacími dielmi s horizontálnymi meracími kapilárkami a trojcestnými kohútikmi s rezervoármi príslušných roztokov.

Meranie využíva rozdiel osmotických tlakov medzi meracími komôrkami. Aparátúra zviditeľňuje objemový tok  $J_V$ , ktorý možno pozorovať prostredníctvom posunu menisku v meracích kapilárkach. Posun menisku (okraj kvapaliny) sa určuje odčítaním hodnoty na pripojenom milimetrovom pravítku. Časti zariadenia sú na oboch stranách symetrické a upevnené v rovnakej výške, aby bola splnená podmienka izobarického deja. V tomto laboratórnom cvičení sú ako membrány použité plátky zemiaka, jablka alebo cibule. Tieto

biologické objekty nepredstavujú membrány v pravom zmysle slova, ale ide o plošné tkanivové vzorky, ktoré majú sériovo zapojené membránové systémy.

### Postup merania a vyhodnotenie

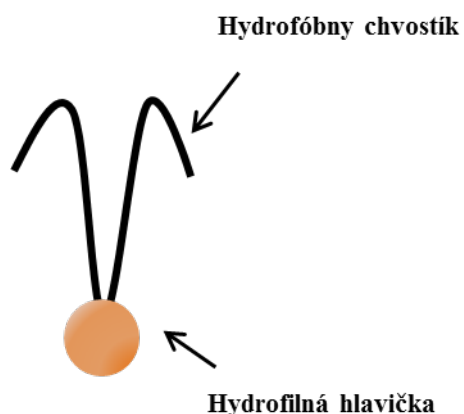
1. Membránu umiestnite na príslušné miesto meracej aparatury (obr. 2.6) a obe meracie komôrky naplňte rovnakými množstvami roztokov I (voda) a II (roztok sacharózy).
2. Komôrky naplňte príslušnými roztokmi tak, aby roztoky v kapilárach dosiahli asi  $1/3$  až  $1/2$  dĺžky meracích kapilár. Dbajte o to, aby sa tvorilo čo najmenej bubliniek a kontrolujte približnú rovnosť objemových zmien v oboch kapilárach.
3. Zvoľte si časový interval (napr. každú 1 min.), v ktorom zmeriate posun menisku v kapiláre.
4. Meranie opakujte 3-krát.
5. Okamžite po skončení merania celú meraciu aparaturu premyte destilovanou vodou.
6. Získanú časovú závislosť znázornite graficky a výsledok zhodnoťte. Údaje potrebné na určenie  $J_V$  (rovnica 2.6): plocha vnútorného prierezu kapiláry  $S_k = 1 \text{ mm}^2$ , priemer kruhovej membrány  $\phi_m = 10 \text{ mm}$ ,  $\Delta l$  je smernica závislosti  $l = f(t)$ .
7. Hydraulický koeficient vodivosti  $L_v$  kvantifikujte pomocou hodnoty objemového toku  $J_V$  a osmotického tlaku  $\pi$  (rovnica 2.7).

## Určenie hrúbky membrány z kapacitných meraní

### Teoretická časť

Bunka je najmenšou stavebnou a funkčnou jednotkou všetkých živých organizmov. Ide o samoreprodukčnú sústavu molekúl prietorovo ohraničenú tenkou plazmatickou membránou – vrstvou tuku. Stavba membrány je jednoduchá: ide o dvojvrstvu lipidových molekúl s hrúbkou asi 5 nm, t. j. 50 atómov. Svojimi vlastnosťami sa nepodobá žiadnemu materiálu, ktorý je známy z bežného života. Zodpovedá za veľké množstvo funkcií. Keď bunka rastie, alebo mení tvar, membrána zväčšuje svoj povrch pridávaním nových membránových zložiek bez straty celistvosti a môže sa deformovať bez toho, aby sa potrhala. Lipidová dvojvrstva je základ štruktúry bunkových membrán [6].

Lipidy spájajú v každej svojej molekule dve úplne odlišné vlastnosti: majú hydrofilnú hlavičku a dva hydrofóbne konce (obr. 3.7). Molekuly, ktoré majú hydrofilné aj hydrofóbne vlastnosti, sa nazývajú amfipatické alebo amfilné.



Obr. 3.7: Štruktúra molekuly lipidu.

Najviac zastúpenými lipidmi v bunkovej membráne sú fosfolipidy a z nich je najrozšírenejší fosfatidylcholín. Fosfolipidy sa v rámci dvojvrstvy dokážu pohybovať, môžu podliehať laterálnej difúzii, rotácii alebo preklápaniu. V živočíšnych membránach je tekutosť membrány znižovaná prítomnosťou cholesterolu, ktorý u rastlín alebo kvasiniek chýba. Cholesterol vyplňa medzery medzi susednými fosfolipidovými molekulami, čím ju spevňuje a robí z nej vrstvu menej tekutú a menej priepustnú. Aj keď je lipidová dvojvrstva základnou štruktúrou všetkých bunkových membrán a slúži ako nepriepustná zložka, väčšinu špecifických funkcií plnia membránové proteíny. U živočíchov predstavujú asi 50 % hmotnosti väčšiny plazmatických membrán, pričom zvyšok tvoria lipidy a pomerne malý podiel uhľo-

vodíky [6]. Proteíny sú do dvojvrstvy buď zabudované (integrálne) alebo adsorbované na povrch membrány (pripojené periférne). Každý z prítomných proteínov zohráva v membráne inú úlohu (receptory, kanály. . .). Správna činnosť membrán je nevyhnutná pri reprodukcii a mnohých fyziologických procesoch. Kontrolujú chemické zloženie a koncentráciu molekúl v jednotlivých bunkových štruktúrach a podieľajú sa na prenose informácie.

Správanie sa biologických membrán je možné testovať pomocou umelo vytvorených štruktúr simulujúcich bunkový obal. V prípade vloženia lipidov do vodnej fázy dochádza k formovaniu rozličných agregátov, ako napr. micely alebo lipozómy. Ide o skupinu guľových lipidových vrstiev/dvojvrstiev, na ktorých možno následne testovať napríklad prechod či zabudovávanie nanoštruktúr do buniek. Vezikuly (lipozómy, micely) sa pripravujú rozličnými spôsobmi. Lipozómy je možné pripraviť tzv. Banghamovou alebo pH gradientovou metódou.

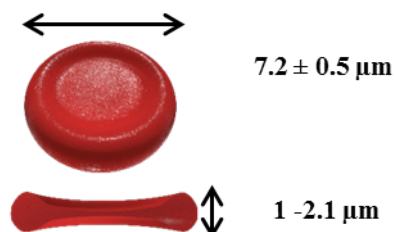
Na meranie fyzikálnych charakteristík a rozličných interakcií membrán s látkami môžeme teda použiť syntetickú náhradu biologických membrán (lipozómy) alebo prirodzený materiál, bunky, (napr. erytrocyty).

Zrelé červené krvinky (erytrocyty) zaraďujeme medzi najšpecializovanejšie bunky ľudského organizmu. Ich hlavnou funkciou je transport krvných plynov – kyslíka  $O_2$  a oxidu uhličitého  $CO_2$ . Nejde o pravé bunky, pretože v čase dozrievania stratili jadro a aj ostatné bunkové organely [7]. Ich tvorba prebieha v kostnej dreni. Kostná dreň je mäkké tkanivo vyplňajúce všetky vnútorné dutiny kostí. Podľa farby rozoznávame červenú a žltú dreň. Červená dreň je hematopoeticky aktívna a jej farba je daná vysokým obsahom červených krviniek. Všetky krvinky sa odvodzujú z jednej populácie multipotentých hemopoetických kmeňových buniek v kostnej dreni. V procese erytropoézy sa bunky diferencujú. Výsledným štádiom diferenciácie je retikulocyt, bezjadrová bunka so zvyškami bunkových organel. Retikulocyt musí ešte tri dni dozrieť, aby sa ako *normocyt* – zrelý erytrocyt mohol uvoľniť do cirkulujúcej krvi. Erytropoéza trvá približne 8 dní [8].

Erytrocyty sú bunky tvaru bikonkávneho disku, ktoré majú v priereze *piškótový* tvar (obr. 3.8). Priemer erytrocytu je  $7,2 \pm 0,5 \mu\text{m}$ , maximálna hrúbka je  $2,1 \mu\text{m}$  a minimálna  $1 \mu\text{m}$  [7].

Erytrocyt tvorí zo 65 % až 70 % voda a na sušinu pripadá 30 % až 35 %, z čoho až 95 % predstavuje červené farbivo hemoglobín. Počet červených krviniek sa pohybuje u žien v rozmedzí od  $3,8 \cdot 10^{12}$  do  $4,8 \cdot 10^{12} \ell^{-1}$  a u mužov od  $4,3 \cdot 10^{12}$  do  $5,3 \cdot 10^{12} \ell^{-1}$ . Rozdielne počty erytrocytov medzi pohlaviami spôsobujú pohlavné hormóny. Androgény (testosterón) vo všeobecnosti erytropoézu stimuluje. Estrogény, naopak, produkciu erytropoetínu inhibujú, z tohto dôvodu je počet erytrocytov u žien nižší [7]. Životnosť červených krviniek je približne 120 dní, po ktorých zanikajú v pečeni alebo slezine.

V tomto laboratórnom cvičení budeme na charakterizáciu lipidovej dvojvrstvy používať práve červené krvinky. Hrúbku lipidovej dvojvrstvy membrán môžeme merať pomocou



Obr. 3.8: Erytrocyt

elektrickej kapacity erythrocytovej suspenzie. Membránovú kapacitu určíme zo vzťahu:

$$c_m = \frac{C_k}{12\pi D^2} \quad (3.8)$$

kde  $D$  je priemer bunky,  $c_m$  je kapacita dvojvrstvy na jednotku plochy a  $C_k$  je kapacita červených krviniek. Hrúbku membrány  $h$  určíme z nasledujúceho vzťahu:

$$c_m = \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_r}{h} \quad (3.9)$$

$\varepsilon_0$  je elektrická konštanta a  $\varepsilon_r \approx 5$  je relatívna permitivita vnútra membrány.

## Experimentálna časť

### Úlohy

1. Odmerajte priemer erythrocytu a získanú hodnotu porovnajte s tabuľkovou hodnotou.
2. Vypočítajte hrúbku membrány erythrocytu pomocou merania plošnej kapacity membrány.

### Prístroje a pomôcky

Q-meter, komôrka na meranie kapacity, prípojné káble, rukavice, podložné a krycie sklíčka, mikroskop s digitálnou kamerou, papierové obrúsky.

### Chemikálie

Suspenzia červených krviniek – erythrocytov, etanol, destilovaná voda.

**Postup merania a vyhodnotenie**

1. Zmerajte priemer červených krviniek pomocou mikroskopu a digitálnej kamery.
2. Z niekoľkých získaných priemerov erytrocytov určte priemernú hodnotu.
3. Pripravte suspenziu erytrocytovej zmesi na meranie v kapacitnej komôrke.
4. Odmeriame závislosť kapacity erytrocytovej zmesi od frekvencie pre rozsah od 18 MHz do 35 MHz.
5. Extrapoláciou závislosti  $C(1/f)$  odhadnite  $C_0$ .
6. Vypočítajte kapacitu vody  $C_v$  a určte  $C_k = C_0 - C_v$ , kde  $C_v = \varepsilon_0 \varepsilon_{rv} S/d$ .
7. Vypočítajte plošnú kapacitu membrány  $c_m$  podľa vzťahu (3.8).
8. Vypočítame hrúbku membrány erytrocytu  $h$  podľa vzťahu (3.9).
9. Získané výsledky zosumarizujte a porovnajte ich s teoretickými hodnotami.

**Spracovanie výsledkov**

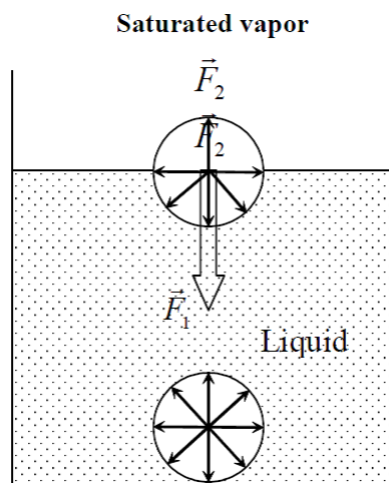
Tabuľka 3.1: Závislosť kapacity od frekvencie

	Suspenzia erytrocytov				
č. merania	1	2	3	4	5
$f$ (MHz)					
$C$ (pF)					

## Meranie povrchového napätia v biologických roztokoch

### Teoretická časť

Povrchové napätie je vlastnosť kvapaliny, s ktorou sa stretávame v našom každodennom živote. Mnohé procesy v organizmoch a v prírode, pri ktorých prebiehajú chemické a biochemické reakcie na rozhraní, možno vysvetliť práve existenciou povrchového napätia, ako napr. pitie vtákov a včiel, tok látok cez xylém v rastlinách, dýchanie u ľudí a prenos chorôb medzi organizmami. Na základe štruktúry sa povrch kvapaliny správa ako pružná blana, čo umožňuje napr. pohyb hmyzu po jej hladine. Vlastnosti povrchovej vrstvy možno vysvetliť pomocou silového pôsobenia medzi molekulami kvapaliny. Keďže vzdialenosti susedných molekúl v kvapaline sú veľmi malé ( $\approx 10^{-10}$  m), molekuly navzájom silno interagujú. Z tohto dôvodu je potrebné rozlišovať molekuly na povrchu a v objeme kvapaliny (obr. 4.9). Molekula nachádzajúca sa v objeme kvapaliny je obklopená rovnakými molekulami, ktoré sú rozmiestnené symetricky. Výslednica príťažlivých síl, ktorými molekuly pôsobia na uvažovanú molekulu, sa rovná nule. Na rozdiel od toho, molekula na povrchu je v kontakte nielen s molekulami kvapaliny, ale aj s molekulami plynu, ktoré na ňu pôsobia povrchovou silou  $F_2$ .



Obr. 4.9: Silové pôsobenie molekúl v kvapaline a na rozhraní kvapalina-plyn.

Pretože koncentrácia molekúl plynu je menšia ako koncentrácia molekúl kvapaliny, výslednica síl pôsobiacich na molekulu kvapaliny smeruje do vnútra kvapaliny. Vrstva, ktorá tvorí rozhranie medzi vnútorným objemom kvapaliny a druhým prostredím, sa nazýva povrchová vrstva. Nadbytok voľnej energie molekúl na rozhraní kvapaliny s druhým pro-

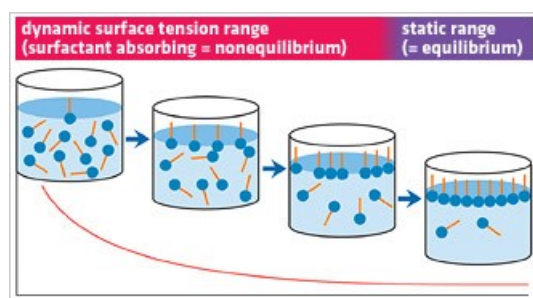


stredím, vzhľadom na molekuly v objeme kvapaliny, spôsobujú nevykompenzované molekulárne sily v povrchovej vrstve. Povrchová energia, ktorá pripadá na jednotkovú plochu rozhrania sa nazýva povrchové napätie. Povrchové napätie sa rovná práci, ktorú musíme vykonať, aby sme zväčšili povrch  $S$  rozhrania kvapalina-plyn o  $1 \text{ m}^2$ :

$$\sigma = \frac{A}{S} \quad (4.10)$$

kde  $\sigma$  je povrchové napätie s jednotkou  $\text{J/m}^2$ , po úprave  $\text{N/m}$ . Z jednotky vyplýva, že napätie môžeme vyjadriť tiež ako silu, ktorou musíme pôsobiť na obvod plochy rozhrania tak, aby sa zväčšil o 1 meter. Existuje niekoľko štandardných metód merania povrchového napätia: metóda maximálneho tlaku bublinky, metóda váženia kvapiek, kapilárna metóda a iné.

Podľa stavu, v ktorom sa kvapalina nachádza, vzniká na jej povrchu dynamické alebo statické napätie. Ak je kvapalina v pohybe, charakterizuje ju dynamické povrchové napätie  $\sigma_{\text{dyn}}$  a na jej povrchu vzniká okamžité vytvorené rozhranie, ktoré má rovnaké zloženie ako celý objem kvapaliny. Statické povrchové napätie  $\sigma_{\text{stat}}$  opisuje rozhranie po ustálení kvapaliny, čiže v stave adsorpčnej rovnováhy. Čisté kvapaliny (napr. voda, alkohol, acetón) sa vyznačujú rovnakým zložením povrchovej vrstvy a celého objemu, preto platí  $\sigma_{\text{dyn}} = \sigma_{\text{stat}}$ . Naopak, roztoky povrchovo aktívnych látok, ktorých molekuly sa skladajú z hydrofilnej polárnej časti a hydrofóbnej nepolárnej časti, majú zloženie rozhrania zhodné s ostatným objemom kvapaliny iba ak sa vytvára plocha rozhrania. Je to preto, lebo adsorpcia povrchovo aktívnych látok prebieha od začiatku na povrchu rozhrania prostredníctvom prenosu ich molekúl z objemu roztoku a končí sa za určitú dobu adsorpčnou rovnováhou. V roztokoch povrchovo aktívnych látok, ktoré znižujú povrchové napätie, platí:  $\sigma_{\text{dyn}} < \sigma_{\text{stat}}$  (obr. 4.10).



Obr. 4.10: Formovanie adsorpčnej rovnováhy po pridaní povrchovo aktívnej látky do roztoku.

Povrchové javy sa uplatňujú aj pri procesoch v ľudskom organizme. Telové tekutiny (napr. krv, moč, žalúdočné šťavy, plodová voda) obsahujú veľké množstvo povrchovo ak-

tívnych látok, proteínov a lipidov, ktoré ovplyvňujú ich povrchové napätie. Úroveň povrchového napätia na druhej strane výrazne vplýva na prietokové vlastnosti tekutín zúženými cestami, napr. v prípade krvnej plazmy jej prietok krvnými kapilármi a tým výrazne mení aj tlakové pomery v krvnom riečišti. Krvná plazma má schopnosť znovu obnoviť pôvodné povrchové napätie, ak nastalo jeho zníženie pridaním povrchovo aktívnej látky. Táto vlastnosť krvnej plazmy je podmienená prítomnosťou bielkovín a iónov  $\text{Ca}^{2+}$ . Po reakcii s povrchovo aktívnymi mastnými kyselinami vytvárajú uvedené ióny nerozpustné soli, ktoré povrchovú aktivitu strácajú. Tento mechanizmus dokonale udržiava prakticky konštantnú hodnotu povrchového napätia krvnej plazmy. K zmenám povrchového napätia dochádza iba v prípade vážnych ochorení. Z tohto dôvodu má meranie povrchového napätia krvnej plazmy veľký význam v klinickej praxi a určovaní diagnóz.

## Experimentálna časť

### Úlohy

1. Určenie povrchového napätia destilovanej vody.
2. Vyšetrenie časovej závislosti vplyvu povrchovo aktívnej látky na povrchové napätie destilovanej vody.
3. Vyšetrenie časovej závislosti vplyvu povrchovo aktívnej látky na povrchové napätie krvnej plazmy.

### Opis zariadenia a metóda merania

Na meranie povrchového napätia kvapalín je vhodné použiť doštičkovú Wilhelmyho metódu. Táto metóda umožňuje určiť povrchové napätie na základe silového pôsobenia kvapaliny na tenký filtračný papier presne definovaných rozmerov (obr. 4.11).

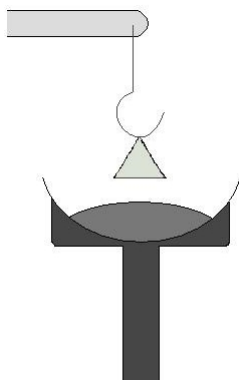
Na filtračný papier ponorený do kvapaliny, ktorej povrchové napätie sa určuje, pôsobia nasledovné sily: tiažová ( $F_g$ ), vztlaková ( $F_{vz}$ ) a povrchová ( $F_p$ ). Vzťah

$$F = F_g - F_{vz} + F_p \quad (4.11)$$

určuje veľkosť výslednej sily pôsobiacej na filtračný papier. Pri dodržaní odporúčaného postupu v priebehu merania možno sily  $F_g$  a  $F_{vz}$  eliminovať a priamo určiť povrchové napätie kvapaliny

$$\sigma = \frac{F}{2(l + h)} \quad (4.12)$$

kde  $l$  a  $h$  sú presne definované parametre filtračného papiera.



Obr. 4.11: Schéma zariadenia na meranie povrchového napätia: 1 – rameno silomera, 2 – filtračný papier, 3 – hodinové sklo, 4 – meraná kvapalina.

### Prístroje a pomôcky

Tenzometer NIMA ST9000, hodinové sklo, filtračný papier, pinzeta, mikropipeta, mikros-triekačka

### Chemikálie

Destilovaná voda, kyselina stearová, chloroform, krvná plazma

### Postup merania a vyhodnotenie

Meranie na tenzometri

1. Zaveste filtračný papier na háčik a umiestnite ho na rameno.
2. Filtračný papier ponorte do kvapaliny a nechajte úplne nasiaknuť.
3. Po nasiaknutí vytiahnite filtračný papier mimo kvapalinu.
4. Vynulujte prístroj pomocou tlačidla ZERO.
5. Opätovne ponorte filtračný papier do kvapaliny a pomaly ho zdvíhajte, kým nie je spodná hrana filtračného papiera v rovine s povrchom kvapaliny.
6. Odčítajte hodnotu povrchového napätia.

Úloha 1: Určenie povrchového napätia destilovanej vody

1. Na hodinové sklo napipetujte destilovanú vodu.

2. Podľa priloženého postupu odmerajte povrchové napätie.
3. Meranie opakujte 3-krát.
4. Aritmetický priemer získaných hodnôt povrchového napätia destilovanej vody porovnajte s tabuľkovou hodnotou. Prípadné odchýlky odôvodnite.

Úloha 2: Vyšetrenie časovej závislosti vplyvu povrchovo aktívnej látky na povrchové napätie destilovanej vody

1. Na hodinové sklo napipetujte destilovanú vodu a pridajte 1 kvapku kyseliny stearovej (príp. inej vyššej karboxylovej kyseliny).
2. Počkajte 5 minút a odmerajte povrchové napätie reakčnej zmesi.
3. Zvoľte si časový interval (napr. každé 2 minúty), v ktorom vyšetrite závislosť vplyvu povrchovo aktívnej látky na povrchové napätie destilovanej vody.
4. Získanú časovú závislosť znázorníte graficky a výsledok zhodnoťte.

Úloha 3: Vyšetrenie časovej závislosti vplyvu povrchovo aktívnej látky na povrchové napätie krvnej plazmy

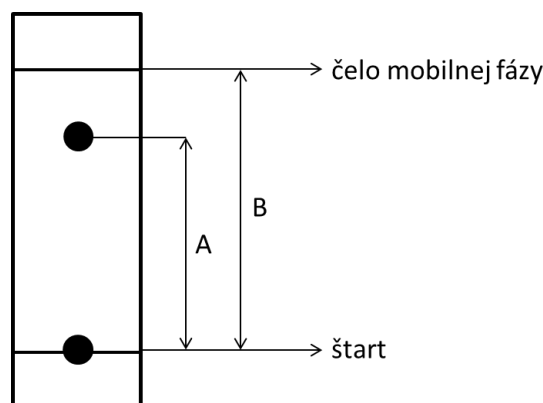
1. Na hodinové sklo napipetujte krvnú plazmu.
2. Odmerajte povrchové napätie.
3. Meranie opakujte 3-krát.
4. Na hodinové sklo s krvnou plazmou pridajte 2 kvapky kyseliny stearovej.
5. Počkajte 1 min. a odmerajte povrchové napätie reakčnej zmesi.
6. Zvoľte si časový interval (napr. každé 2 min.), v ktorom vyšetrite závislosť vplyvu povrchovo aktívnej látky na povrchové napätie krvnej plazmy.
7. Získanú časovú závislosť znázorníte graficky a výsledok zhodnoťte.

## Papierová chromatografia

### Teoretická časť

Listy rastlín obsahujú množstvo rozmanitých pigmentov. Delia sa na plastidové a vakuolové. Plastidové pigmenty sú chlorofyly a karotenoidy. Tieto pigmenty sú rozpustné v nepolárnych organických rozpúšťadlách, čo umožňuje ich pomerne jednoduchú extrakciu. Rastlinné pigmenty boli po prvý krát separované v roku 1903 ruským vedcom M. S. Cvetom, objaviteľom chromatografie. Princípom tejto metódy je adsorpcia a separácia zložiek zmesi medzi stacionárnou a mobilnou fázou. Zložky migrujú rôznou rýchlosťou na základe rozdielnej rozpustnosti v mobilnej fáze (rozpúšťadlo) a rozdielnej afinity k stacionárnej fáze, čo vedie k ich separácii.

V tomto laboratórnom cvičení použijeme na separáciu rastlinných pigmentov *papierovú chromatografiu*. Ako vyplýva z názvu, stacionárnou fázou je chromatografický papier (môže byť nahradený filtračným papierom). Mobilná fáza je rozpúšťadlo, poprípade zmes rozpúšťadiel, zvolená tak, aby sa dosiahla najúčinnnejšia separácia. Táto fáza vplyvom kapilárnych síl postupne vzlína po papieri, na ktorom sú v jednej línii (tzv. štart) nanesené separovaná zmes a štandardy (t. j. zložky, ktoré v zmesi očakávame). Po určitom čase sa zmes rozdelí na zložky, ktoré sa nachádzajú v rôznej vzdialenosti od štartu (obr.1).



Obr. 5.12: Schematické znázornenie chromatogramu.

Jednotlivé zložky zmesi možno identifikovať na základe retardačného faktora  $R_f$ , ktorý je charakteristický pre každú separovanú zložku v závislosti od zvolenej mobilnej fázy. Definujeme ho ako pomer vzdialenosti  $A$  stredu škvrny separovanej zložky od štartu k vzdialenosti  $B$  čela mobilnej fázy od štartu:

$$R_f = \frac{A}{B} \quad (5.13)$$

Môže nadobúdať hodnoty z intervalu  $(0, 1)$ . Ak  $R_f = 0$ , zložka nemigruje a ostáva na štarte. Ak  $R_f = 1$ , tak zložka migruje s čelom mobilnej fázy.

Rozpúšťadlá používané v chromatografii zoraďujeme podľa rastúcej permitivity do *elutropického* radu: petroléter, izohexán, cyklohexán, tetrachlórmetán, benzén, chloroform, dietyléter, octan etylový, acetón, butanol, etanol, metanol, voda, kyselina octová, pyridín. Pri výbere činidla sa postupuje od stredu radu a postupne sa hľadá najvhodnejšie [11]. Ak sú separované zložky bezfarebné, chromatogram musíme najprv usušiť a potom nasprejovať príslušnou selektívne reagujúcou látkou, ktorá zložky zafarbí.

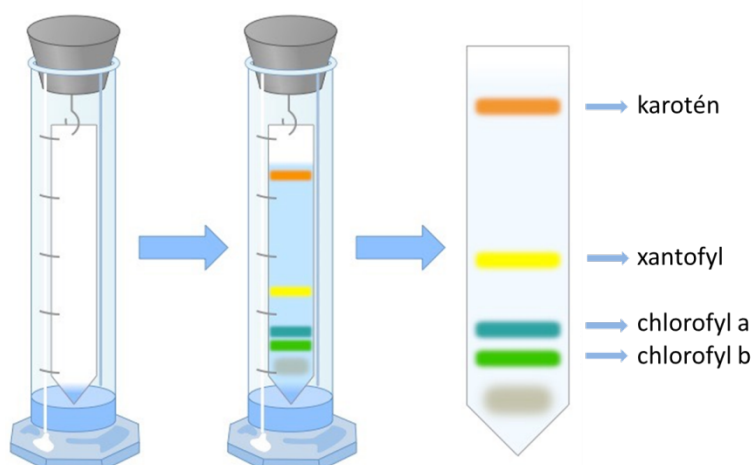
## Experimentálna časť

### Úloha

Separácia rastlinných pigmentov pomocou papierovej chromatografie.

### Opis zariadenia a metóda merania

Pri separácii rastlinných pigmentov metódou papierovej chromatografie sa využíva rozdielna pohyblivosť jednotlivých pigmentov (chlorofyl a, chlorofyl b, xantofyl, karotén). Malý objemu roztoku nanesieme na štartovaciu líniu chromatogramu, ktorý následne ponoríme do mobilnej fázy (správne zvolené rozpúšťadlo). Chromatogram necháme vyvíjať, až dovtedy, kým čelo mobilnej fázy nedosiahne požadovanú vzdialenosť od štartu.



Obr. 5.13: Papierová chromatografia.

### Prístroje a pomôcky

Listy ľubovoľnej zelenej rastliny, porcelánová trecia miska, tlčik, chromatografický/filtračný papier, nožnice, mikropipety, skúmavky, parafilm, kadičky.

### Chemikálie

Acetón, petroléter, benzín, benzén, etanol, destilovaná voda, chloroform

### Postup merania a vyhodnotenie

1. Extrakcia rastlinných pigmentov: listy nastrihajte do trecej misky, pridajte 2,5 ml acetónu a rozotrite. Po dôkladnej homogenizácii pridajte asi 7,5 ml acetónu. Zmes nechajte lúhovať 15 min. Homogenát následne prefiltrujte.
2. Chromatografický/filtračný papier nastrihajte. Rozmery prispôbte použitej skúmavke. Asi 1,5 cm od dolného okraja chromatografického/filtračného papiera ceruzkou naznačte štart.
3. Mikropipetou naneste na štartovaciu líniu vzorku rastlinného pigmentu v niekoľkých vrstvách (viac ako 6). Každú vrstvu nechajte zaschnúť a až potom nanášajte ďalšiu.
4. Do skúmaviek pripravte jednotlivé mobilné fázy s objemom cca 1 ml.
5. Ponorte chromatografické prúžky do skúmaviek s rozpúšťadlom, tak aby sa miesto so vzorkou neponorilo do mobilnej fázy. Skúmavku uzavrite, aby sa predišlo vyparovaniu rozpúšťadla.
6. Chromatografiu ukončíte, keď čelo rozpúšťadla dosiahne 2/3 papiera.
7. Ceruzkou zakreslite profil jednotlivých zložiek a čela mobilnej fázy. Odmerajte vzdialenosť stredu škvŕny separovanej zložky od štartu a vzdialenosť čela mobilnej fázy od štartu.
8. Vypočítajte hodnoty  $R_f$  a porovnajte jednotlivé výsledky s tabulkovými hodnotami v závislosti od použitého rozpúšťadla. Identifikujte príslušné pigmenty.

## Meranie bioelektrických signálov v nerve

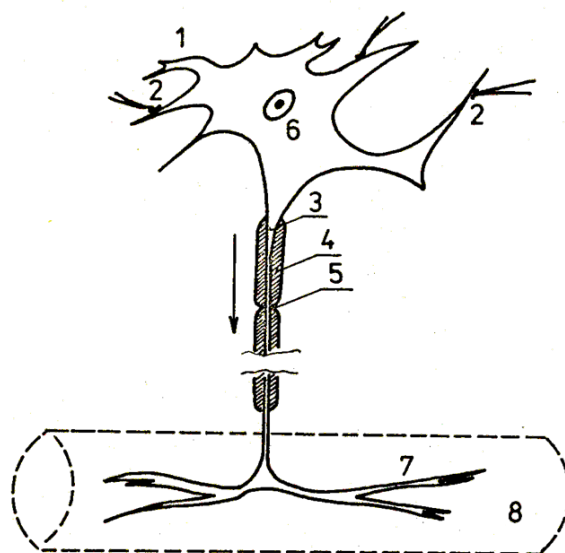
### Teoretická časť

Generácia a šírenie nervových vzruchov (signálov v telách živočíchov), excitácia nervových a svalových buniek patria k najdôležitejším prejavom živých systémov.

Nervový vzruch sa šíri nervovými vláknami – axónmi. Nervovú sústavu vyšších organizmov možno všeobecne rozdeliť na centrálnu a periférnu. Práve periférnu časť nervovej sústavy, ktorá zahrňuje aj axóny, sprostredkúva vzájomný prenos informácií medzi zmyslovými orgánmi a svalmi na jednej strane a centrálnou nervovou sústavou na strane druhej.

Signály sa môžu axónmi šíriť jednak v smere zmyslové orgány → centrálna nervová sústava; v tomto prípade hovoríme o aferentných signáloch. Eferentné signály postupujú axónmi od centrálnej nervovej sústavy k svalom.

Z anatomického hľadiska axóny sú dlhé výrastky nervových buniek – neurónov. Schematický pohľad na neurón je na obrázku 6.14. V nervovej bunke sa schádzajú informácie vo forme elektrických signálov prichádzajúcich od mnohých susedných neurónov cez spojenia – synapsy – do jej kratších výbežkov – dendritov.



Obr. 6.14: Štruktúra nervovej bunky – neurónu (smer prenosu eferentných signálov do svalových motorických jednotiek je vyznačený šípkou) 1 – dendrit, 2 – synaptické spojenie, 3 – axón, 4 – myelínový obal, 5 – Ranvierove prstence, 6 – jadro neurónu, 7 – zakončenie motorického nervu, 8 – svalové vlákno.



Výskum generácie nervového impulzu a jeho šírenia v axóne je v biofyzike stará a tradičná úloha. Membránovú teóriu excitácie sformuloval v roku 1902 Bernstein. Podľa tejto teórie vzruch (excitácia) vzniká v dôsledku elektrochemických procesov lokalizovaných v membráne nervových a svalových buniek. Tieto procesy sú viazané na prenos malých iónov  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  (čiastočne  $\text{Ca}^{2+}$ ).

Už dávno vedci pozorovali, že nervy a svaly sú schopné generovať elektromotorické napätia – biopotenciály. Elektrická aktivita buniek sa prejavuje vo forme krátkych impulzov ( $\sim 1$  ms) s opakovanou frekvenciou od 10 ms. Vo frekvencii a charaktere postupnosti impulzov je zakódovaná prenášaná informácia.

Vnútro nervového vlákna sa nazýva axoplazma. Jej merný odpor je zhruba  $0,1 - 1,0 \Omega\text{m}$ , t. j. pri vlákne s priemerom  $1 \mu\text{m}$  vychádza odpor na  $1$  m dĺžky  $10^{11}$  až  $10^{12} \Omega$ , čo je napr. v porovnaní s medeným drôtom zhodných rozmerov hodnota  $10^8$ -krát väčšia. Z toho vyplýva, že prenos elektrického signálu axoplazmou bez uváženia aktívnej úlohy membrány nervového vlákna by nebol možný.

Pre živé bunky je charakteristický rozdiel v koncentrácii iónov  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  na oboch stranách ich membrán. Tieto koncentračné gradienty jednotlivých iónov sú udržiavané v ustálenom stave membrány pomocou mechanizmov aktívneho transportu, pri ktorom dochádza k prenosu iónov proti elektrochemickému gradientu na úkor väzbovej energie fosfátových zlúčenín (adenozíntrifosfát – ATP) prítomných v blízkosti membrány.

Elektrické napätie merané ako rozdiel potenciálov na vonkajšej a vnútornej strane membrány možno vyjadriť Hodgkin-Katzovým vzťahom

$$\Delta\varphi = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_{\text{K}}C_{\text{K}}^i + P_{\text{Na}}C_{\text{Na}}^i + P_{\text{Cl}}C_{\text{Cl}}^e}{P_{\text{K}}C_{\text{K}}^e + P_{\text{Na}}C_{\text{Na}}^e + P_{\text{Cl}}C_{\text{Cl}}^i} \quad (6.14)$$

kde  $F$  je Faradayov náboj,  $C_{\text{X}}^i$ ,  $C_{\text{X}}^e$  sú koncentrácie príslušných iónov  $X$  zvnútra membrány (v axoplazme) a zvonka membrány,  $P_{\text{X}}$  je permeabilita membrány pre ión  $X$ , daná výrazom  $P_{\text{X}} = u_{\text{X}}RT/(F\Delta x)$ , pričom  $u_{\text{X}}$  je pohyblivosť iónov  $X$ ,  $\Delta x$  je hrúbka membrány.

V ustálenom stave je pomer permeabilit pre ióny  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  nasledovný:

$$P_{\text{K}} : P_{\text{Na}} : P_{\text{Cl}} = 1 : 0,04 : 0,45 \quad (6.15)$$

Po dosadení hodnôt koncentrácií z tabuľky 6.2 typických pre nervové vlákno membránové napätie je

$$\Delta\varphi_{\text{pokojuvé}} = +67 \text{ mV} \quad (6.16)$$

Pri excitácii axónu dôjde k lokálnej zmene permeability membrány voči iónom  $\text{Na}^+$

Tabuľka 6.2: Koncentrácie iónov v rôznych roztokoch

ión	koncentrácia (mmol/kg)		
	axoplazma	krv	morská voda
K <sup>+</sup>	400	20	10
Na <sup>+</sup>	50	440	460
Cl <sup>-</sup>	40 – 150	560	540

(vzrastie až 500-krát). Pomer permeabilit v tomto prípade je

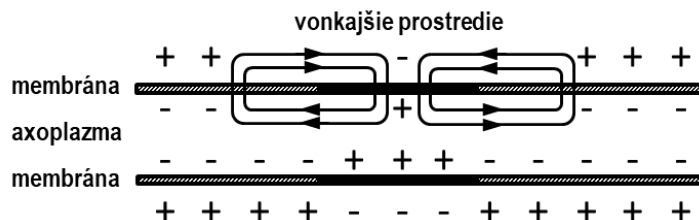
$$P_K : P_{Na} : P_{Cl} = 1 : 20 : 0,45 \quad (6.17)$$

a membránové napätie

$$\varphi_{exc} = -43 \text{ mV} \quad (6.18)$$

Rozdiel medzi napätím membrány v pokoji a pri excitácii sa v literatúre často uvádza ako akčný potenciál a jeho hodnota pre rôzne axóny sa pohybuje v rozmedzí 90 – 120 mV.

Pri depolarizácii úseku membrány vznikajú elektrické prúdy, ktoré pretekajú okolitým prostredím (obr. 6.15). Tieto prúdy excitujú susedné úseky membrány.

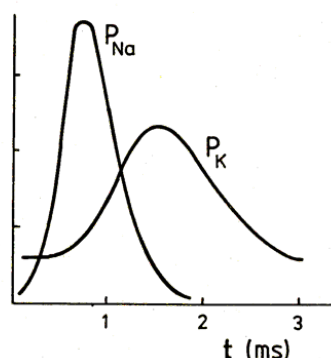


Obr. 6.15: Elektrické prúdy vznikajúce pri depolarizácii úseku axónu

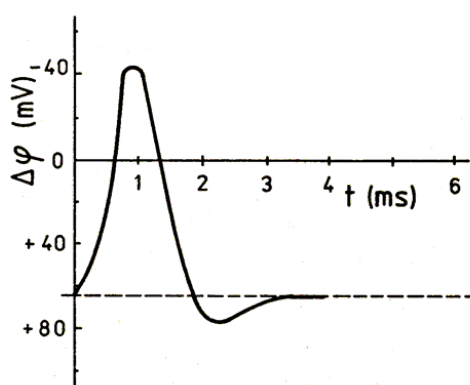
Pri tvorbe potenciálu participujú 2 druhy kanálov, selektívne priepustných pre ióny sodíka a draslíka. Ich *otváranie* sa deje po sebe. V prvej fáze excitácie vzrastá permeabilita sodíka, v druhej fáze (s časovým oneskorením asi 1 ms) permeabilita draslíka. Časové priebehy  $P_K$  a  $P_{Na}$  sú znázornené na obrázku 6.16.

Priebeh membránového napätia (vonkajšok voči vnútru) s vyznačenými etapami je na obrázku 6.17. Schéma šírenia excitácie nervovým vláknom je na obrázku 6.18.

Ak teda snímame potenciál jednej elektródy umiestnenej v blízkosti vonkajšieho povrchu membrány axónu vzhľadom na elektródu zasunutú do vnútra axónu, snímaný priebeh bude zodpovedať priebehu na obr. 6.17 (tzv. jednofázová registrácia akčného potenciálu). Ak snímame elektrické napätie dvoma elektródami uloženými na povrchu membrány vo



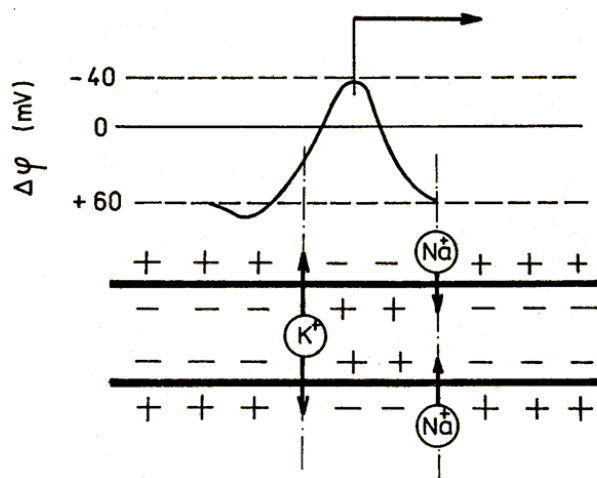
Obr. 6.16: Časová závislosť permeabilití iónov sodíka a draslíka v procese excitácie úseku nervového vlákna



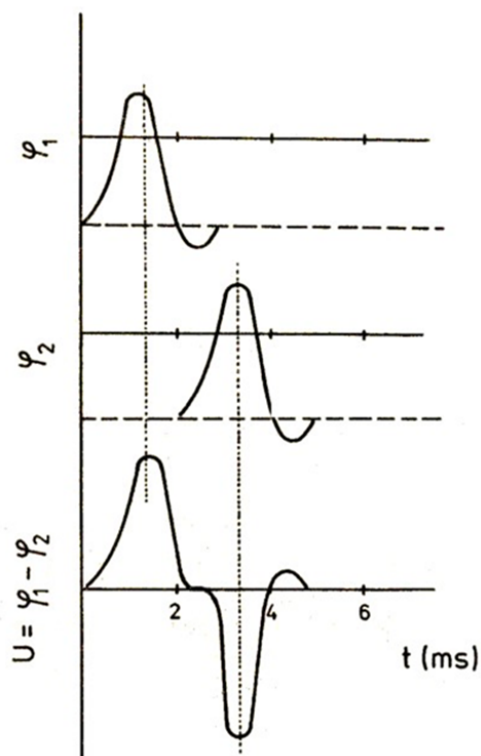
Obr. 6.17: Časová závislosť membránového napätia pri excitácii

vzájomnej vzdialenosti  $\Delta\ell$ , výsledný priebeh dostaneme podľa konštrukcie na obr. 6.19 ako rozdiel vzájomne posunutých časových priebehov z obr. 6.17. Interval  $\Delta t = \Delta\ell/v$ , kde  $v$  je rýchlosť šírenia sa vzruchu. V tomto prípade hovoríme o snímaní dvojfázového akčného potenciálu.

Excitáciu v určitom úseku nervového vlákna (axónu) možno generovať znížením jeho membránového napätia. Pri znížení pokojovej hodnoty o menej ako 20 mV (tzv. podprahová excitácia) membránový potenciál sa vráti na svoju pôvodnú hodnotu. No pri prekročení tejto hranice dochádza k depolarizácii membrány spojenej so všetkými dejmi opísanými v predchádzajúcom texte. Veľkosť depolarizačného napätia už nezávisí od veľkosti primárnej nadprahovej excitácie na danom úseku axónu.



Obr. 6.18: Mechanizmus šírenia excitácie axónom



Obr. 6.19: Časový priebeh potenciálov a meraného napätia pri aplikácii dvoch meracích elektród na povrch axónu

## Experimentálna časť

### Úloha

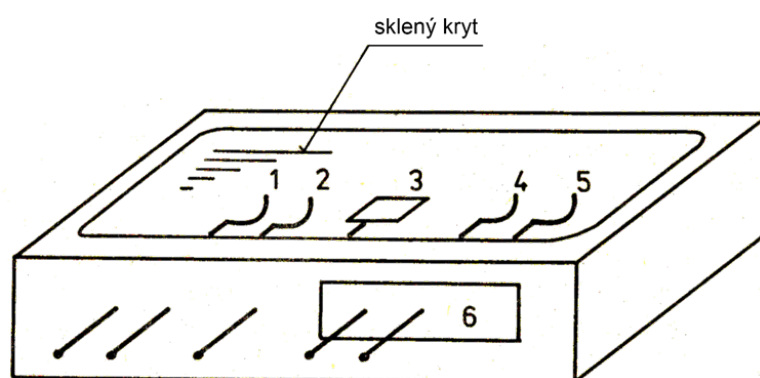
Pre vypreparovaný nerv skokana zeleného meraním stanovte rýchlosť šírenia sa excitácie, závislosť prahovej hodnoty amplitúdy stimulácií od frekvencie a z frekvenčných meraní

odhadnite dobu refrakternosti nervu. Pri registrácii jednofázového akčného potenciálu určte jeho amplitúdu pomocou kalibračných impulzov.

### Opis zariadenia a metóda merania

Merania akčných potenciálov v laboratórnej práci vykonávame na nerve izolovanom zo skokana zeleného. Z anatomického hľadiska nerv sa skladá zo zväzku súbežných axónov niekoľkých nervových buniek obalených vonkajšou membránou. Merané elektrické veličiny budú teda zodpovedať kolektívnemu správaniu spojených nervových vlákien v rámci daného nervu.

Vlastná meracia komôrka je znázornená na obr. 6.20. Je vyrobená z plexiskla, elektródy sú platinové. Generáciu impulzu (akčného potenciálu) vykonáme dvojicou elektród 1 a 2 (tzv. stimulačné elektródy), na ktoré sú privedené impulzy z impulzového generátora. Druhý pár meracích elektród (4 a 5) umožňuje dvojfázové snímanie akčného potenciálu nervu. Umiestnenie dvojice 4 a 5 možno meniť posunom doštičky vo vodiacich drážkach, a tým možno prispôbiť vzájomnú vzdialenosť dvojíc elektród podľa dĺžky biologického preparátu. Medzi dvojicou dráždiacich sa meracích elektród je uzemnená platnička. Jej úlohou je odstránenie artefaktu dráždenia, ktorý sa pri elektrickej stimulácii šíri povrchom vlhkého nervu a mení odozvu registrovanú na elektródach 4 a 5.



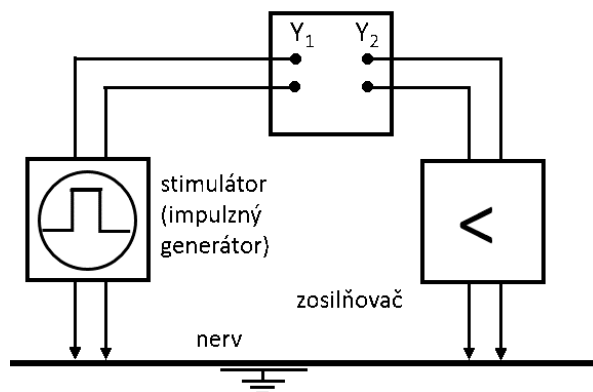
Obr. 6.20: Meracia komôrka na snímanie akčných potenciálov nervov (opis prvkov 1 – 6 je uvedený v texte)

### Prístroje a pomôcky

Dvojľúčový osciloskop, impulzový generátor, meracia komôrka na snímanie akčných potenciálov nervov, zosilňovač, Ringerov roztok, vypreparovaný nerv

## Postup merania a vyhodnotenie

Dvojfázový akčný potenciál nervu meriame v zapojení podľa schémy na obr. 6.21.



Obr. 6.21: Schéma zapojenia pre meranie akčných potenciálov

Preparát umiestnime na elektródy, pričom polohu dvojice meracích elektród volíme podľa jeho dĺžky. Dbáme na dobrý styk nervu s uzemnenou platničkou, aby sme pri registrácii odstránili artefakt stimulácie.

Stimuláciu uskutočňujeme vhodným impulzovým generátorom pravouhlých impulzov s nastavenou opakovacou frekvenciou  $f = 50$  Hz, amplitúdou  $A = 0,5$  V, šírkou impulzov do  $\Delta = 1$  ms. Zvyšujeme amplitúdu stimulačných impulzov a zapíšeme prahovú amplitúdu stimulácie, keď zaregistrujeme prvý signál na meracích elektródach. Pri ďalšom zvyšovaní amplitúdy veľkosť odozvy narastá (dochádza k *zapájaníu* do činnosti ďalších nervových vlákien zo zväzku v nerve) až po maximálnu hodnotu. Pri vyšších amplitúdach stimulačných impulzov odozva zostáva konštantná. Pre ďalšie merania nastavíme najmenšiu amplitúdu stimulácie, keď pozorujeme maximálny akčný potenciál.

Časovo zosynchronizuje, oba priebehy na osciloskope (privedením identických impulzov na oba vstupy  $Y_1$  a  $Y_2$ ) a zmeriame odstup medzi stimuláciou a odozvou v horizontálnom smere. Na základe známej frekvencie stimulácie (50 Hz) urobíme prepočet zmeraného odstup (S) na časový interval ( $\tau$ ).

Rýchlosť šírenia vzruchu nervom vypočítame zo vzťahu

$$v = \frac{d}{\tau} \quad (6.19)$$

kde  $d$  je vzdialenosť stredov stimulačnej a meracej dvojice elektród.

Meranie opakujeme 10-krát pri zvyšujúcej sa amplitúde stimulačných impulzov až po dvojnásobnú hodnotu pôvodnej.

Namerané hodnoty zapíšeme do tabuľky a určíme priemernú hodnotu rýchlosti. V ďal-

šom meraní pri nastavenej hodnote šírky stimulačných impulzov  $\Delta$  zistíme frekvenčnú závislosť prahovej hodnoty amplitúdy stimulácií. Uskutočníme 15 meraní pre frekvencie do 100 Hz. Uvedenú závislosť znázorníme graficky. Pri ďalšom zvyšovaní frekvencie stimulácií nad hranicu 100 Hz odhadneme dobu refrakterity nervu.

Porušením nervu medzi meracími elektródami (rozrezaním, priložením rozžeravenej ihly) zaregistrujeme pri štandardných podmienkach stimulácie (prvá časť merania) jednofázový akčný potenciál. Na základe privedených kalibračných impulzov určíme amplitúdu takto registrovaného akčného potenciálu.

## Štúdium absorpčných spektier rastlinných pigmentov

### Teoretická časť

Najdôležitejším predpokladom pre správny priebeh životných funkcií organizmov je premena chemickej resp. slnečnej energie na energiu organizmu vlastnú. Väčšina rastlín a niektoré baktérie majú fotosyntetický systém, pomocou ktorého sú schopné prijímať a premieňať energiu zo slnečného žiarenia. Fotosyntetický systém musí zahŕňať molekuly schopné absorbovať svetelné kvantá, prenášať energiu na iné molekuly a vedieť sa navrátiť do základného stavu tak, aby molekuly boli znovu schopné absorpcie. Pri zelených rastlinách plní túto funkciu chlorofyl. Chlorofyl sa vyskytuje v piatich mierne odlišných formách. Jedna rastlina najčastejšie obsahuje niekoľko jeho foriem [1]. Farbivá absorbujúce viditeľné spektrum sú dôležité aj pre správnu funkcionalitu zraku živočíchov.

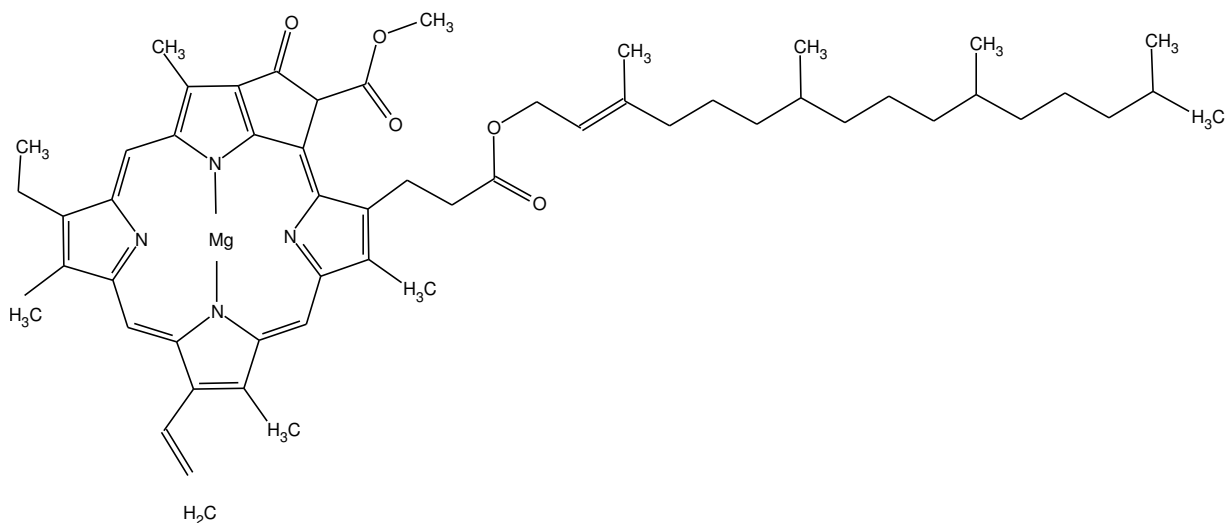
Rastlinné farbivá sú látky obsiahnuté v rastlinách, ktoré majú schopnosť absorbovať elektromagnetické spektrum z ultrafialovej a viditeľnej oblasti. Podľa typu rozpúšťadla delíme rastlinné farbivá na hydrochrómy a lipochrómy. Hydrochrómy sú pigmenty bunkovej šťavy a vyznačujú sa rozpustnosťou vo vode alebo v polárnych rozpúšťadlách. Lipochrómy sú pigmenty plastidov, preto sú rozpustné len v tukoch [16].

Hydrochrómy sú lokalizované vo vakuolách rastlinných buniek. Nachádzajú sa v plodoch, listoch a kvetoch. Jedná sa o chalkóny, flavóny, aeuróny a antokyány, ktoré spôsobujú ich červené, modré alebo fialové zafarbenie. Farbu určuje pH prostredia, v ktorom sa nachádzajú [16].

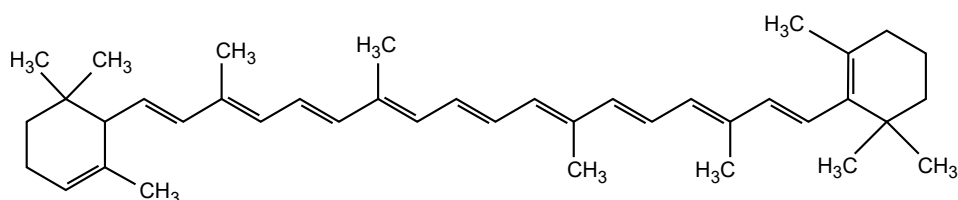
Do skupiny lipochrómov zaraďujeme chlorofyly, fykobyliny a karotenoidy. Chlorofyly sa nachádzajú v chloroplastoch rastlín a sú to horčíkové deriváty porfyrínu. Hrajú dôležitú úlohu vo fotosyntéze. Fykobyliny sa vyskytujú pri nižších vývojových štádiách rastlín napr. machy a lišajníky. Karotenoidy sú nenasýtené uhľovodíky, ktoré obsahujú chromoplasty. Do tejto skupiny patria karotény, pre ktoré je typická oranžová farba a xantofyly s typickou žltou farbou. Na obrázku obr. 7.22 sú chemické vzorce chlorofylu, karotenoidu a antokyanu [16].

Molekula chlorofylu (obr. 7.22) pozostáva zo 4 pyrolových jadier, umiestnených okolo centrálného atómu kovu horčíka. Takáto štruktúra má podobu molekuly hemoglobínu. Horčík môžeme z väzby uvoľniť opatrne hydrolýzou napríklad kyselinou oxálovou a vznikne feofytín. Štyri pyrolové jadrá majú konjugovaný  $\pi$ -elektrónový systém vďaka striedajúcim sa jednoduchým a dvojitým väzbám. Práve tento systém je možné vzbudiť pomerne nízkymi dávkami energie. Z tohto dôvodu má chlorofyl schopnosť absorbovať kvantá dlhovlnného žiarenia viditeľného svetla a na čas  $t \sim 5 \cdot 10^{-4}$  s tieto kvantá akumulovať. Ak by nedošlo k zadržaniu energie, uvoľnila by sa vo forme žiarenia alebo tepla. V prípade fotosyntézy

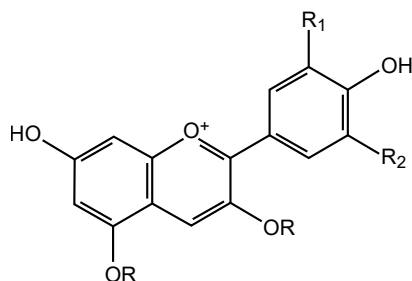




Obr. 7.22: Chlorofyl [17].



Obr. 7.23: Karotenoid [18].



Obr. 7.24: Antokyán [19].

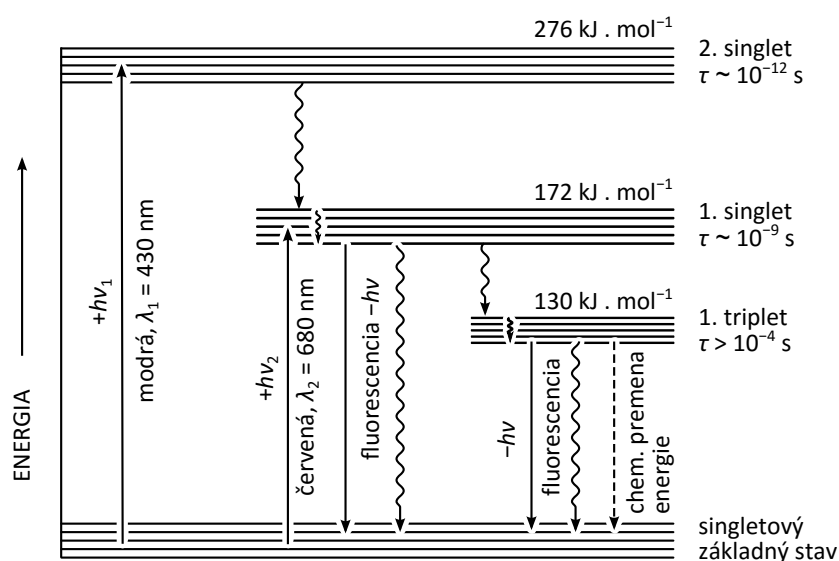
by to bolo nevýhodné, lebo nahromadená energia sa využíva ako hnacia sila chemických procesov syntézy (napr. syntéza ATP) [16].

Karotenoidy (obr. 7.23) zohrávajú úlohu vo fotosyntéze ako zachytávače energie. Pomocou fotosystému II ju odovzdávajú chlorofylu, kde sa využije v primárnej fáze fotosyntézy. Karotenoidy okrem ochrany buniek pred nadmerným ožiarením zvyšujú aj spektrum vlnových dĺžok, pri ktorých je systém schopný fotosyntetizovať, majú fotosyntetickú funkciu [1].

Antokyán (obr. 7.24) je vo vode rozpustný pigment. Patrí k flavonoidom a vyskytuje

sa vo forme glykozidov. Ich farba sa mení v závislosti od pH prostredia, v ktorom sa nachádzajú. Kyslé roztoky majú červenú farbu, v neutrálnom prostredí sú sfarbené na fialovo a v zásaditom prostredí sa vyfarbujú na modro. Tieto zlúčeniny sa môžu použiť na identifikáciu základných typov pH. Toto farbivo sa vyskytuje v listoch červenej kapusty a v plodoch čiernych ríbezlí [1].

Absorpciou svetelného žiarenia sa molekula dostáva do vzbuđeného stavu. Každému vzbuđenému stavu zodpovedá diskretná energetická hladina, pričom suma energetických hladín jednej molekuly tvorí tzv. energetickú štruktúru molekuly (obr. 7.25).



Obr. 7.25: Energetická pásová štruktúra molekuly chlorofylu a znázorňujúca energiu a priemernú dobu života najdôležitejších vzbuđených stavov (priame šípky reprezentujú žiarivé procesy, vlnovky nežiarivé procesy) [1].

V tejto štruktúre sa udáva energia každého vzbuđeného stavu a stredná doba jeho života. Informácie o vlnových dĺžkach kvanta absorbovaného daným typom molekúl možno získať štúdiom absorpčného spektra [16].

Vo všeobecnosti platí, že elektromagnetické vlnenie, ktoré prechádza určitým objektom sa zoslabuje absorpciou a rozptylom. Ak svetlo prechádza homogénnym prostredím, rozptyl je prakticky zanedbateľný a zoslabenie svetla je spôsobené iba absorpciou. Podľa Lambertovho-Beerovho zákona je pri homogénnom zložení média zoslabenie svetla dané hrúbkou prežiarenej vrstvy  $\ell$ , koncentráciou absorbujúcich molekúl  $c$  a príslušnými konštantami úmernosti  $a_\lambda$  a  $b_\lambda$  pre tieto dva príspevky. Konštanty slúžia na charakterizáciu veľkosti svetelnej absorpcie pri určitej vlnovej dĺžke. Matematicky je možné vzťahy vyjadriť

rovnícami:

$$-dI = I_0 a_\lambda d\ell \quad (7.20)$$

$$-dI = I_0 b_\lambda d\ell \quad (7.21)$$

kde  $I_0$  je intenzita dopadajúceho monochromatického svetla,  $dI$  je zmena intenzity monochromatického svetla, ktoré prešlo cez homogénnu absorbujúcu vrstvu. Separáciou premenných a integráciou oboch diferenciálnych rovníc v hraniciach od 0 do  $\ell$  pre hrúbku vrstvy a v hraniciach od 0 do  $c$  pre koncentráciu dostaneme:

$$\ln \frac{I_0}{I} = a_\lambda \ell, \quad \ln \frac{I_0}{I} = b_\lambda c \quad (7.22)$$

Zlúčením rovníc do jednej zavedením konštanty úmernosti  $\varepsilon$  je matematickým vyjadrením Lambert-Beerovho zákona.

$$I = I_0 e^{-\varepsilon c \ell} \quad (7.23)$$

Konštantu úmernosti  $\varepsilon$ , ktorá sa nazýva molárny extinkčný koeficient (molárna absorptivita, alebo extinkčný koeficient), je pre každý druh molekúl charakteristická a závisí od štruktúry molekuly, od fyzikálno-chemických podmienok okolia a od vlnovej dĺžky žiarenia.

Dekadický logaritmus pomeru intenzít sa označuje ako *absorbancia*:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = -\log T = \varepsilon c \ell \quad (7.24)$$

Lambertov-Beerov zákon platí iba pre monochromatické svetlo a veľmi zriedené roztoky, v ktorých nie sú absorbujúce molekuly ovplyvnené medzimolekulárnymi interakciami napr. tvorbou komplexov.

Pomer  $I/I_0$  sa označuje tiež ako *priepustnosť*, *transparentnosť* alebo *transmitancia*  $T$ .

## Experimentálna časť

### Úlohy

1. Zaznamenajte absorpčné spektrá chlorofylu a karoténu.
2. Analýzou získaných absorpčných spektier určte koncentrácie extrahovaného farbiva z jednotlivých látok.

### Prístroje a pomôcky

Transmisný spektrofotometer, mažiar, tlčík, filtračný papier, nôž, kremenné kyvety na meranie transmsie v UV-VIS oblasti, pipety, špičky, kadičky.

### Chemikálie

Mrkva, zelené listy rastlín, chloroform (acetón), etanol, destilovaná voda.

### Opis zariadenia a metóda merania

Na meranie intenzity absorbovaného svetla v roztokoch sa používa spektrálny fotometer, ktorý pracuje vo viditeľnej oblasti. V spektrofotometri je žiarenie vhodného svetelného zdroja rozložené hranolom alebo difrakčnou mriežkou. Ďalej sa vedie cez skúmanú vzorku až do detektora žiarenia. Natočením hranola alebo mriežky sa dá nastaviť požadovaná vlnová dĺžka svetla. Na záznam žiarenia sa používa fotodetektor. Vychádzajúci fotoprúd je mierou výstupnej intenzity svetla.

### Postup merania a vyhodnotenie

1. Materiál (mrkvu, listy) pripravíme a rozdrvíme v mažiari. Rozdrvené zmesi zalejeme roztokom chloroformu (acetónu) s objemom 10 ml.
2. Extrakt prefiltrujeme cez filtračný papier. V roztoku sa nachádzajú rôzne molekulárne formy chlorofylu.
3. Extrahované farbivo zriedime na minimálnu hodnotu tak, aby roztok bol slabo zafarbený.
4. V spektrofotometri najskôr zmeriame signál prechádzajúci kyvetou, ktorá obsahuje čisté rozpúšťadlo. Odčítaním tohto spektra od hodnôt nameraných pre roztok farbiva získame absorpčné spektrum rozpusteného materiálu v roztoku. Získané výsledky zaznamenáme do grafu. Z hodnôt maxima absorpcie určíme koncentráciu farbív v roztokoch použitím Lambert-Beerovho zákona. Hodnoty absorpčných koeficientov pre dané molekuly pre jednotlivé vlnové dĺžky sa dajú nájsť v tabuľkách. Pre chlorofyl *a* je to okolo  $\varepsilon_{\text{ch}} = 111\,700 \text{ cm}^2/\text{mol}$  pre maximum absorpcie pri vlnovej dĺžke  $\lambda = 430 \text{ nm}$ . Pre karotén je  $\varepsilon_{\text{k}} = 139\,500 \text{ cm}^2/\text{mol}$  pre maximum v okolí  $\lambda = 450 \text{ nm}$ .

## Využitie elipsometrie v biosenzorových aplikáciách

### Teoretická časť

Spektroskopická elipsometria s využitím plazmónovej rezonancie (SPR – *surface plasmon resonance*) je veľmi citlivá metóda vhodná na meranie adsorpčných povrchových procesov, pri ktorých dochádza k naväzovaniu meraných molekúl na povrchovo upravený senzor. Z optického hľadiska hovoríme o zmene hrúbky vrstvy na úrovni zlomkov nanometrov, prípadne ide o nepatrnú zmenu indexu lomu, rádovo  $10^{-5}$ . Táto metóda sa v literatúre často uvádza pod názvom elipsometria úplného vnútorného odrazu (TIRE – *total internal reflection ellipsometry*).

### Povrchový plazmón

Povrchový plazmón (*surface plasmon polariton* – SPP) je typ elektromagnetickej vlny, ktorá môže za určitých podmienok vzniknúť na rozhraní kovu a dielektrika. Vlna sa pohybuje po ploche rozhrania a nešíri sa do okolitého prostredia. Jej amplitúda exponenciálne klesá so vzdialenosťou od rozhrania, pričom logaritmický dekrement je na úrovni niekoľkých desiatok nanometrov. Takéto vlnenie je viazané na rozhranie a okolo neho má charakter *evanescentnej vlny*. Je dôsledkom interakcie elektromagnetického žiarenia s vodivostnými elektrónmi kovu v tesnej blízkosti rozhrania. Ak tieto elektróny kmitajú prične vzhľadom na rozhranie, nachádzajú sa časť periódy v priestore kovu a ďalšiu časť periódy v priestore dielektrika. Lord Rayleigh koncom 19. storočia ukázal, že takáto zmena prostredia umožňuje vznik stabilnej vlny viazanej na rozhranie. Povrchový plazmón môžeme vybudíť elektromagnetickým žiarením (napr. svetlom), ak splníme rezonančnú podmienku

$$k_{\parallel} = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\varepsilon_m \varepsilon_d}{\varepsilon_m + \varepsilon_d}} \quad (8.25)$$

kde  $k_{\parallel}$  je priemet vlnového vektora budiacej elektromagnetickej vlny do roviny rozhrania a zároveň je to vlnový vektor povrchového plazmónu. Vzťah (8.25) je disperzný vzťah plazmónovej vlny skomplikovaný tým, že relatívna permitivita kovu  $\varepsilon_m$  silne závisí od frekvencie  $\omega$  a v prípade generácie plazmónu musí byť záporná. Relatívna permitivita dielektrika  $\varepsilon_d$  závisí od frekvencie len málo, môžeme ju považovať za reálnu kladnú konštantu.

Nakoľko je  $k_{\parallel}$  väčšie ako vlnový vektor dopadajúcej vlny, nie sme schopní povrchový plazmón priamo vybudíť. Experimentálna realizácia si vyžaduje použitie vhodného väzbového prvku, napr. optického hranola alebo mriežky.

## Spektroskopická elipsometria

Elipsometer ako optické zariadenie zaznamenáva zmenu stavu polarizovaného svetla po odraze od meraného povrchu. Výsledkom jedného elipsometrického merania je pomer amplitúdových odrazností  $p$  a  $s$  polarizovanej vlny, ktorý je vo všeobecnosti komplexné číslo. Môžeme ho vyjadriť v exponenciálnom tvare

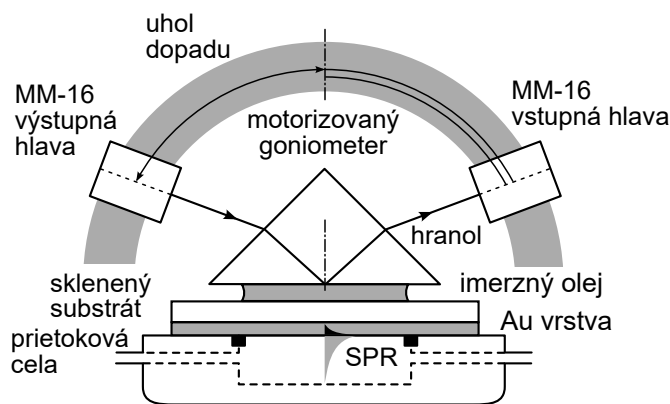
$$\frac{r_p}{r_s} = \tan \psi \exp(i\Delta) \quad (8.26)$$

kde  $\psi$  a  $\Delta$  sú elipsometrické uhly. Vzťah (8.26) sa nazýva *elipsometrická rovnica*. Spektroskopický elipsometer poskytuje závislosť elipsometrických uhlov od vlnovej dĺžky dopadajúceho svetla,  $\psi(\lambda)$  a  $\Delta(\lambda)$ . Analýzou týchto spektrálnych závislostí a riešením inverznej úlohy dokážeme zistiť štruktúru objektu, od ktorého sa svetlo pri meraní odrážalo. Takto sa určujú hrúbky tenkých vrstiev a ich komplexné indexy lomu alebo permitivity. Metóda je natoľko citlivá, že dokáže zaznamenať hrúbky tenkých vrstiev rádovo desiatin nanometra.

Existuje niekoľko konštrukčných typov spektroskopických elipsometrov. V tomto meraní budeme pracovať so spektroskopickým elipsometrom Horiba Jobin Yvon MM-16, ktorý zabezpečuje premenlivú polarizáciu dopadajúceho svetla a jeho detekciu pomocou elektricky ovládaných polarizátorov na báze tekutých kryštálov.

## Elipsometria povrchových plazmónov

Spojenie spektroskopického elipsometra a povrchových plazmónov má názov elipsometria úplného vnútorného odrazu (TIRE). Využitím elipsometrie a SPR dostávame experimentálnu metódu schopnú zaznamenávať veľmi malé zmeny na povrchu meranej vzorky, ktoré sa dejú napríklad pri adsorpčných procesoch v biosenzoroch. Schéma merania je na obrázku 8.26. Biele svetlo dopadá na väzbový hranol, pričom na rozhraní sklo a kov dochádza k

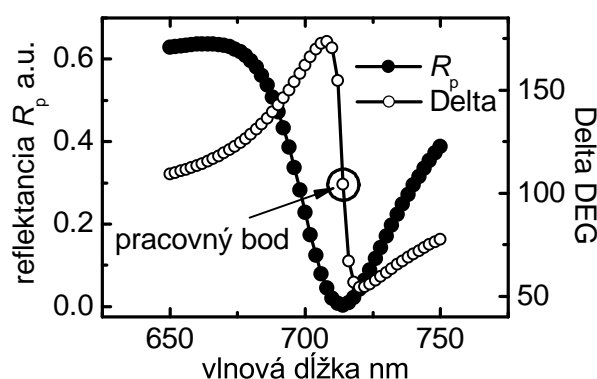


Obr. 8.26: Schéma elipsometrie úplného vnútorného odrazu – TIRE

úplnému odrazu. Zaznamenávame odrazivosť len o niečo menšiu ako 1 a to v oboch polarizáciách. V časti spektra, kde je splnená podmienka plazmónovej rezonancie, dostávame v odrazivosti  $p$  polarizovaného svetla  $R_p = r_p^* r_p$  výrazné minimum, pretože veľká časť energie sa preliala do povrchového plazmónu. Elipsometrickú rovnicu vzhľadom na úplný odraz v  $s$  polarizácii ( $|r_s| \doteq 1$ ) možno v tomto prípade zjednodušiť na tvar

$$r_p \approx \tan \psi \exp(i\Delta) \quad (8.27)$$

Ak dôjde k plazmónovej rezonancii, amplitúda  $\tan \psi$  dosiahne minimum a v spektre fázy  $\Delta$  sa objaví výrazná zmena. Na obr. 8.27 je príklad TIRE merania.



Obr. 8.27: Reflektancia  $p$  polarizovaného svetla  $R_p$  a elipsometrický parameter  $\Delta$  pri TIRE. K excitácii povrchového plazmónu dochádza v tomto prípade pri vlnovej dĺžke 712 nm. Rezonancia dopadajúceho svetla s SPP je sprevádzaná minimumom v spektre odrazivosti  $R_p$ , nakoľko sa všetka energia dopadajúceho svetla preleje do SPP. Rezonančný charakter tohto javu je sprevádzaný výraznou zmenou vo fáze  $\Delta$ . Pracovný bod leží na lineárnej časti fázovej krivky.

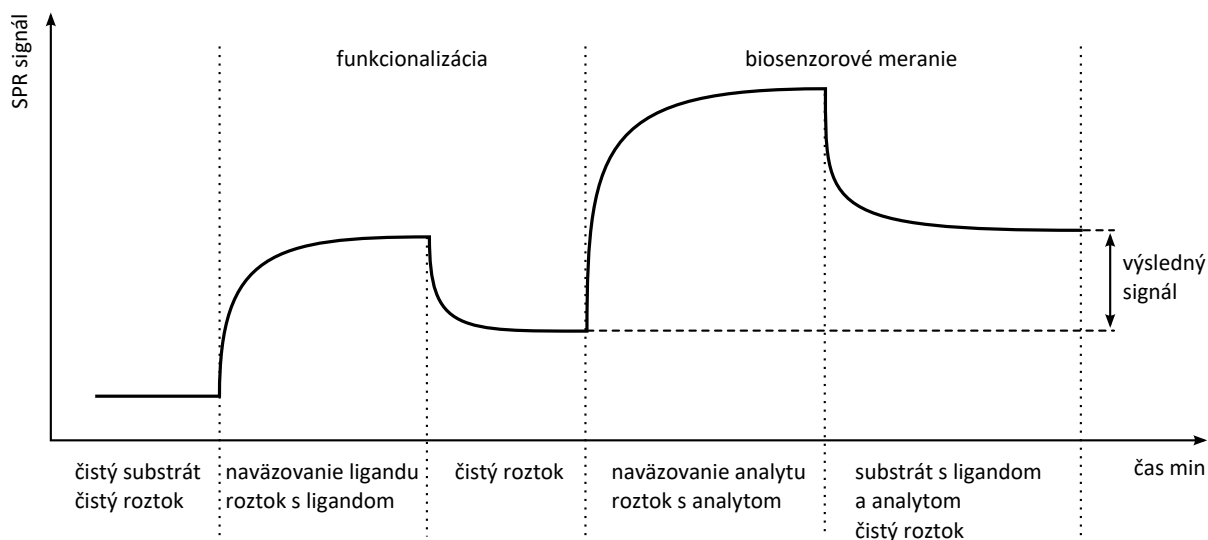
Ak sa čokoľvek udeje v blízkosti rozhrania kovu a kvapaliny, dochádza k zmene rezonančnej podmienky a plazmónové minimum sa posunie, prípadne sa zmení hodnota parametra  $\Delta$ . Keďže elipsometrické uhly predstavujú amplitúdu a fázu komplexnej veličiny  $r_p$  v rezonancii, spektrum fázy  $\Delta$  je úmerné derivácii amplitúdy  $\tan \psi$  podľa frekvencie. Zmeny fázy sú preto omnoho výraznejšie než zmeny amplitúdy a na zvýšenie citlivosti merania je potom možné namiesto posunu minima odrazivosti pozorovať posun hodnoty  $\Delta$  v pracovnom bode.

## Biosenzory

Princíp činnosti biosenzorov je založený na selektívnom zachytávaní špecifických molekúl z roztoku. Na substrát sa najprv naviaže senzorická molekula, tzv. *ligand*, ktorá môže byť

napr. sekvencia báz molekúl DNA alebo RNA (adenín, guanín, cytozín, tymín alebo uracil). Takto pripravené senzory reagujú iba so špecifickými biologickými molekulami v roztokoch. Naviazanie senzorickej molekuly na substrát, tzv. *funkcionalizácia*, sa v prípade zlatých substrátov realizuje pomocou tiolovej SH skupiny, ktorú musia obsahovať molekuly ligandu. Síra vytvára so zlatom kovalentnú väzbu. Substrát sa môže ponoriť do roztoku, prípadne sa vystaví parám, alebo sa roztok s ligandom nechá pretekať priamo v komore biosenzora. Následne sa očistí čistým rozpúšťadlom, čo zabezpečí depozíciu senzorickej monovrstvy.

Na začiatku zaznamenáme signál na pripravenom biosenzore s čistým rozpúšťadlom. Potom do prietokovej cely rovnomerne vpúšťame analyzovaný roztok, v ktorom chceme zistiť prítomnosť konkrétnej biologicky aktívnej látky, tzv. *analytu*. Ak sa v roztoku takéto molekuly nachádzajú, naväzujú sa postupne na senzoricke molekuly a dochádza k zmene podmienok generácie povrchového plazmónu. Po nasýtení a ustálení signálu necháme systémom pretekať opäť čisté rozpúšťadlo, aby sa odstránili analyty, ktoré nie sú naviazané na senzoricke molekuly, ale držia na substráte pomocou slabších Van der Waalsových síl, či prostredníctvom vodíkových mostíkov. Po určitej dobe sa signál ustáli na konečnej hodnote. Získame časový záznam signálu, tzv. *senzogram* ako na obrázku 8.28.



Obr. 8.28: Príklad časového senzogramu s počiatočnou fázou prípravy funkcionalizovaného substrátu. Vyhodnocuje sa rozdiel signálu po naviazaní analyzovanej látky voči signálu s funkcionalizovaným substrátom. SPR signál môže byť vlnová dĺžka minima odrazivosti  $R_p$  alebo hodnota elipsometrického parametra  $\Delta$  v pracovnom bode.



## Experimentálna časť

### Úlohy

1. Odmerajte a vyhodnoťte závislosť rezonančnej vlnovej dĺžky SPR od uhla dopadu na rozhraní zlato-voda alebo etanol.
2. Vyhodnoťte závislosť parametra  $\Delta$  v prcovnom bode od uhla dopadu.
3. Nájdite kalibračnú krivku senzora pre rôzne koncentrácie etanolu vo vode.
4. Vyhodnoťte citlivosť metódy vzhľadom na zmenu uhla dopadu a zmenu indexu lomu kvapaliny v prietokovej cele.

### Prístroje a pomôcky

Spektroskopický elipsometer Horiba Jobin-Yvon MM-16, prietoková cela, SPR substrát, optický hranol, imerzný olej, elektricky ovládaná pumpa so striekačkou, hadičky, ampulky, pipeta.

### Chemikálie

Destilovaná voda, čistý etanol.

### Opis zariadenia a metóda merania

Schéma merania sa nachádza na obrázku 8.26. Hlavné meracie zariadenie je spektroskopický elipsometer Horiba Jobin-Yvon MM-16 so spektrálnym rozsahom 430 nm až 850 nm s rozlíšením  $\Delta\lambda = 2$  nm. Presné nastavenie uhlov dopadu zabezpečuje motorizovaný goniometer elipsometra, ktorý pracuje v rozsahu  $45^\circ - 90^\circ$  s krokom  $0,01^\circ$ . Činnosť elipsometra je plne automatická, nastavenie jednotlivých prvkov, riadenie merania a analýzu výsledkov zabezpečuje softvér DeltaPsi2.

SPR senzor je homogénna vrstva zlata s hrúbkou 42 nm na sklenenom substráte. Úlohu väzbového prvku plní pravouhlý hranol so štvorcovou základňou so stranou 10 mm. Materiál substrátu a hranolu je optické sklo BK-7.

Rovnomerný prietok analyzovanej kvapaliny zabezpečuje pumpa s mikroposuvným kontinuálnym motorom, do ktorej sa prichytí injekčná striekačka. Motor pumpy ťahá piest striekačky požadovanou rýchlosťou. Hodnota rýchlosti sa nastavuje na ovládacom paneli zariadenia od  $1 \mu\text{l}/\text{min}$ . Kvapalina sa do prietokovej cely dostáva cez hadičku ponorenú v ampulke. Počas merania treba zabezpečiť, aby sa pod substrátom nevytvárala stabilná vzduchová bublina, ktorá zabraňuje pretekaniu, ale najmä zamedzuje kontaktu kvapaliny s povrchom senzora. Odstránenie bubliny predstavuje nemalý experimentálny problém.

Niekedy pomôže dočasná zmena rýchlosti prietoku. Ak nie, je potrebné celu otvoriť, prvky vyčistiť a experiment zopakovať.

### Postup merania a vyhodnotenie

1. Väzbový hranol položte na tú stranu substrátu, ktorá nie je pokrytá kovovou vrstvou. Medzi hranol a substrát kvapnite malé množstvo imerzného oleja.
2. Do prietokovej cely vložte tesniaci gumový krúžok a umiestnite naň substrát s hranolom. Hranol upevnite pomocou fixačného ramienka.
3. Prietokovú celu položte na stolček elipsometra a nastavte maximálny signál. Uhol dopadu elipsometra zvolte  $82^\circ$ .
4. Zapojte prietokový systém: Do pumpy umiestnite striekačku a pripojte k nej výstupnú hadičku z prietokovej cely.
5. Ampulku s roztokom umiestnite do držiaka a ponorte do nej vstupnú hadičku prietokovej cely.
6. Na pumpe nastavte rýchlosť prietoku 20 ml/min a spustite motor v režime spätného ťahu.
7. Sledujte signál v elipsometri. Keď kvapalina zaplní prietokovú celu, v spektre signálu sa objaví pokles intenzity.
8. Po ustálení signálu zaznamenajte elipsometrické meranie.
9. Meňte uhol dopadu po malých krokoch –  $0,01^\circ$  a zaznamenajte sériu meraní.
10. Pripravte roztoky s rôznymi koncentraciami etanolu vo vode, merajte pri jednom uhle dopadu.

### Spracovanie výsledkov

Pomocou softvéru DeltaPsi2, ktorý je súčasťou elipsometra MM-16 exportujte spektrá  $R_p(\lambda)$  a  $\Delta(\lambda)$ . Identifikujte minimá v spektrách odrazivosti fitovaním extrémálnou funkciou (napr. parabolou). Vyneste grafy závislostí  $\lambda_{\text{SPR}}$  od uhla dopadu a od koncentrácie. Pri uhloch dopadu spracujte posun paramtera  $\Delta$  v pracovnom bode a zaznačte hodnoty do grafu závislosti od uhla dopadu.

Kvalitatívne porovnajte závislosť vlnovej dĺžky excitácie SPR od koncentrácie kvapaliny s priebehom indexu lomu roztoku etanolu vo vode.

## Literatúra

- [1] Cirák, J., Ottova, A.: Bioelektronika – Návody na cvičenia. Skriptá. 1984. SVŠT v Bratislave
- [2] <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Surfactant.jpg> – upravené
- [3] <http://www.nordtest.it/scheda2uk.asp?id=20111125165634&primo=Chemical&secondo=Interfacial%20and%20surface%20science&setto=Monolayer%20study%20and%20deposition> – upravené
- [4] <http://www.lot-qd.de/fr/fr/home/surfacechemistry/> – upravené
- [5] Sackmann, E.: Biological membranes architecture and function. Structure and Dynamics of Membranes 1. 1995
- [6] Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Walter, P., Roberts, K., Raff, M. Základy bunecnej biologie: Úvod do molekularnej biologie bunky. 1998. Garland Publishing, Inc. New York. Espero Publishing, s.r.o. Ústí nad Labem. ISBN 80-902906-0-4. s. 630
- [7] Javorka, K. a kol. Lekárska fyziológia učebnica pre Lekárske fakulty, tretie, prepracované a doplnené vydanie. 2009. Vydavateľstvo Osveta, spol. s.r.o. Martin, Slovenská republika. ISBN 978-80-8063-291-5. s. 742
- [8] Renate Lullmann-Rauch. Histologie, Preklad 3. vydání, 2012, Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, Germany, ISBN 978-3-13-129243-8, ISBN 978-80-247-3729-4. s. 576
- [9] Dillon P. F.: Biophysics – A Physiological Approach. Cambridge University Press. ISBN 978-0-521-17216-5, New York, 2012
- [10] NIMA Technology, Surface Tensiometers, Operating manual
- [11] Šikurová, L., Špeciálne praktikum z biomedicínskej fyziky a biofyziky, FMFI UK, Bratislava 2008
- [12] Beier, W.: Biofyzika – Úvod do fyzikální analýsy biologických systémů a soustav, Academia, Praha 1974
- [13] Burlakova, E.V.: Praktikum po pbshej biofizike 3–4, Issledovaniya bioelektričeskich javlenij v tkanjach i kletkach, Vyššaja škola, Moskva 1981
- [14] Hille, B.: Membrany – jonnyje kanaly, ed. Ju. A. Čizmadžev, Mir, Moskva 1981

- [15] Volkenštejn, M.V.: Biofizika, Izd. fiz. – mat. lit. Nauka, Moskva 1981
- [16] [http://www.chtf.stuba.sk/kbcht/rozne/biol/BIOL\\_Cv3.pdf](http://www.chtf.stuba.sk/kbcht/rozne/biol/BIOL_Cv3.pdf)
- [17] <http://www.studiumbiochemie.cz/fotosynteza/3a.jpg>
- [18] [http://www.sinicearasy.cz/files/alfa\\_karoten.gif](http://www.sinicearasy.cz/files/alfa_karoten.gif)
- [19] <http://kekule.science.upjs.sk/chemia/expert/demonstracne/chkazdzi/fyzchem/3/celky.htm>
- [20] [http://old.lf3.cuni.cz/chemie/english/practical\\_trainings/task\\_B1.htm](http://old.lf3.cuni.cz/chemie/english/practical_trainings/task_B1.htm) – upravené
- [21] <http://omlc.org/spectra/PhotochemCAD/>