



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

**F1190 Úvod do biofyziky
Masarykova Univerzita
Podzimní semestr 2023
Přednáška z 5.10.2023: radioaktivita
Obsahuje cvičení**

Vyučující:

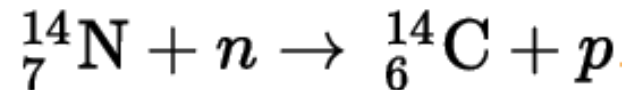
Prof. Jiří Kozelka, Biofyzikální Laboratoř, Ústav fyziky kondenzovaných látek, PŘF MU, Kotlářská 2

Doc. Mgr. Karel Kubíček, CEITEC, Kamenice 5

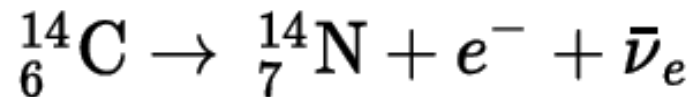
Využití radioaktivních nuklidů

1. Určování stáří organických látek metodou radioaktivního uhlíku

Do vnější atmosféry proniká z kosmu záření, které vede k jaderným reakcím, při nichž vznikají volné neutrony. Ty nárazem do molekul dusíku mohou vyvolat jadernou reakci, při níž se molekula rozpadne a jeden atom pohltí neutron a ztratí proton. Dojde k jakémusi „vyražení“ protonu neutronem. Z izotopu ^{14}N se tak stane izotop uhlíku ^{14}C . Tyto atomy jsou reakcí s kyslíkem zabudovány do molekul CO_2 .



Izotop ^{14}C však není stabilní. V jiné jaderné reakci se jeho jeden neutron přemění na proton, elektron a antineutrino. Elektron a antineutrino jsou vyzářeny do prostoru, zbyde izotop dusíku ^{14}N . Těmito dvěma jadernými reakcemi se postupem doby ustálila v atmosférickém CO_2 víceméně konstantní koncentrace izotopu ^{14}C , přibližně $10^{-6}\%$.



Poznámka: Všimněte si, že shora uvedený zápis jaderných reakcí, bohužel naprosto běžný, zcela ignoruje nábojovou bilanci.

Zelené rostliny používají CO_2 k fotosyntéze, samy jsou potravou živočichů. Je-li atmosférický CO_2 zabudován do živého organismu, udržuje se podíl izotopu ^{14}C na konstantní úrovni, neboť dochází ke stálé výměně uhlikatých látek s atmosférickým CO_2 . Tato výměna končí smrtí organismu, protože do vnitřní atmosféry neutronové záření neproniká a probíhá tedy pouze zpětná reakce (rozpad ^{14}C). U mrtvého organismu tedy podíl ^{14}C klesá, poločasem tohoto rozpadu je 5730 ± 40 y. Analýzou izotopů uhlíku v mrtvém organismu je tedy možno stanovit dobu uplynulou od jeho smrti.

Počet atomů, který se rozpadne za infinitesimální časovou jednotku, je přímo úměrný stávajícímu počtu atomů N :

$$\frac{dN}{dt} = -\lambda N$$

λ je rychlostní konstanta pro tuto reakci, tzv. rozpadová konstanta. Řešení této diferenciální rovnice je exponenciální funkce:

$$N(t) = N_0 e^{-\lambda t}$$

N_0 je počáteční počet atomů, $N_0 = N(t=0)$. Poločas rozpadu $t_{1/2}$ je čas, za který se rozpadne 50% materiálu. Je to parametr nepřímo úměrný rychlostní konstantě λ :

$$N(t=t_{1/2})/N_0 = 1/2 = \exp(-\lambda t_{1/2})$$

Cvičení 1 : odvoďte rovnici pro $t_{1/2}$

Poločasu rozpadu 5730 ± 40 y tedy odpovídá rychlostní konstanta

$$\lambda = ?$$

Cvičení 2: vypočítejte λ

Cvičení 3

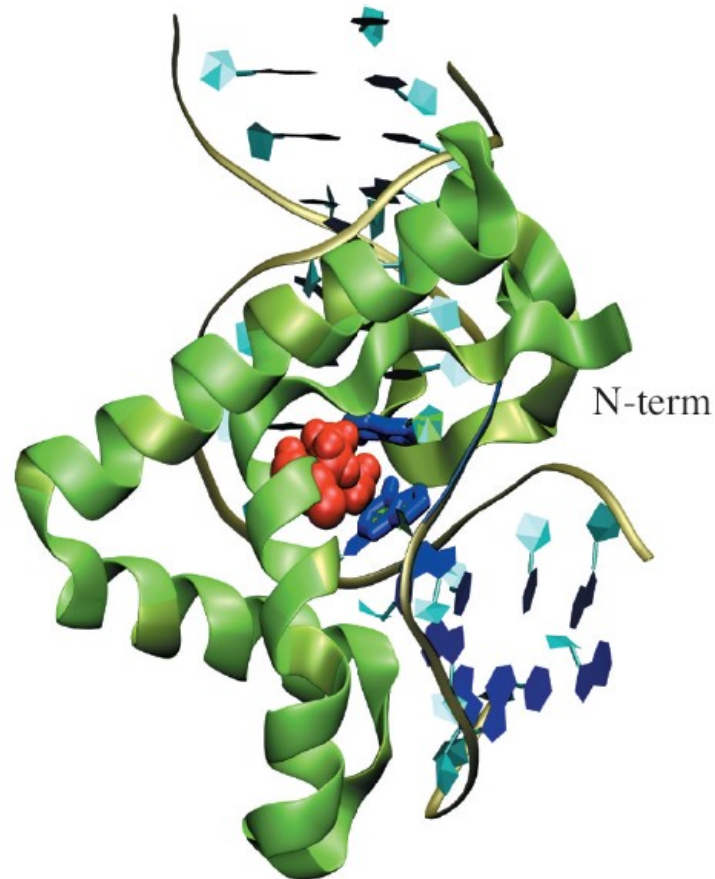
Analýzou kosti zvířete bylo zjištěno, že obsahuje 70% z původního množství izotopu ^{14}C . Určete stáří zvířete, když poločas rozpadu izotopu je 5730 ± 40 y. (Požadováno je řešení, výsledek a standardní odchylka.)

Využití radioaktivních nuklidů

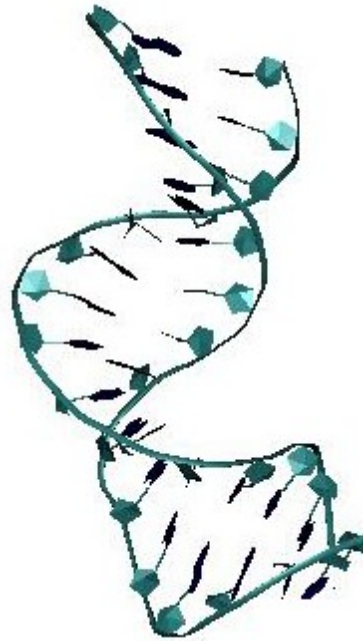
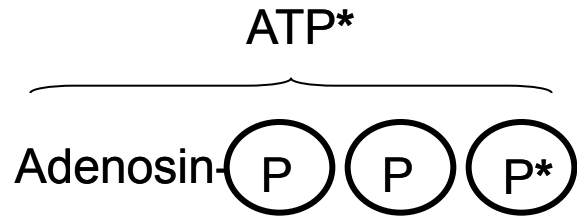
2. Detekce fragmentů nukleových kyselin (oligonukleotidů) označených radioaktivním izotopem fosforu ^{32}P

NEPOVINNÉ

Příklad: Protein LEF-1 je tzv. transkripční regulátor, který reguluje produkci (expresi) antigenových receptorů na povrchu lymfocytů T. Jeho funkcí je vázat DNA na specifické sekvenci 5'-CCTTTGAA a vytvořit v DNA ohyb, který je předpokladem k transkripci. **Je zajímavé zjistit, s jak velkou afinitou se váže doména HMG (zelená stuha) proteinu LEF-1 na DNA, která obsahuje sekvenci 5'-CCTTTGAA (modrá/zlatá).** Při vzniku komplexu mezi DNA a LEF-1 hraje důležitou úlohu aminokyselina methionin (hnědá), která se vklíní („interkaluje“) mezi dvě adeninové báze (tlusté modré čáry).

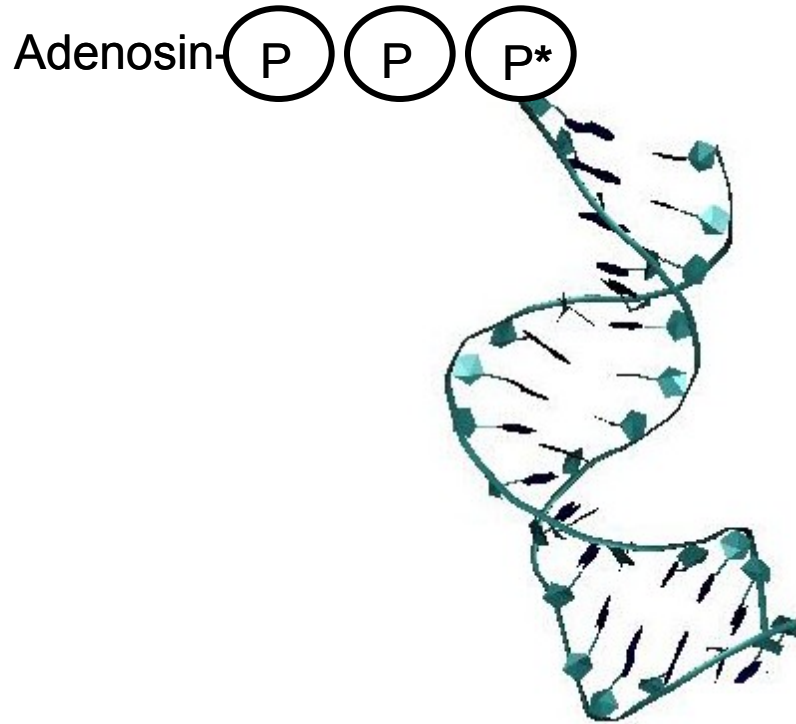


Zjištění afinitní konstanty: V první fázi připojíme na jeden řetězec DNA fosfátovou skupinu obsahující radioaktivní izotop ^{32}P pomocí radioaktivního adenosin-trifosfátu:

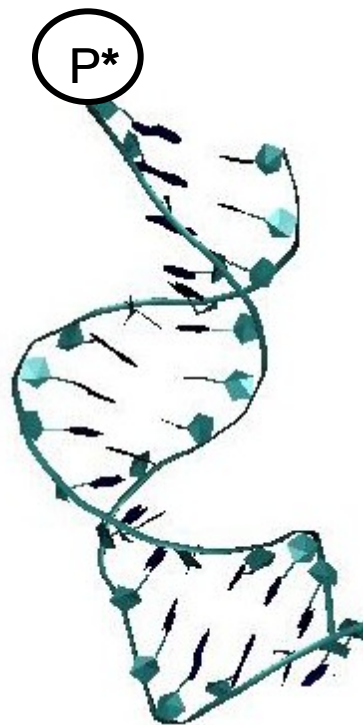


Zjištění afinitní konstanty: V první fázi připojíme na jeden řetězec DNA fosfátovou skupinu obsahující radioaktivní izotop ^{32}P pomocí radioaktivního adenosin-trifosfátu:

ADP^*



Značenou DNA necháme reagovat s proteinem, přičemž se vytvoří rovnováha:



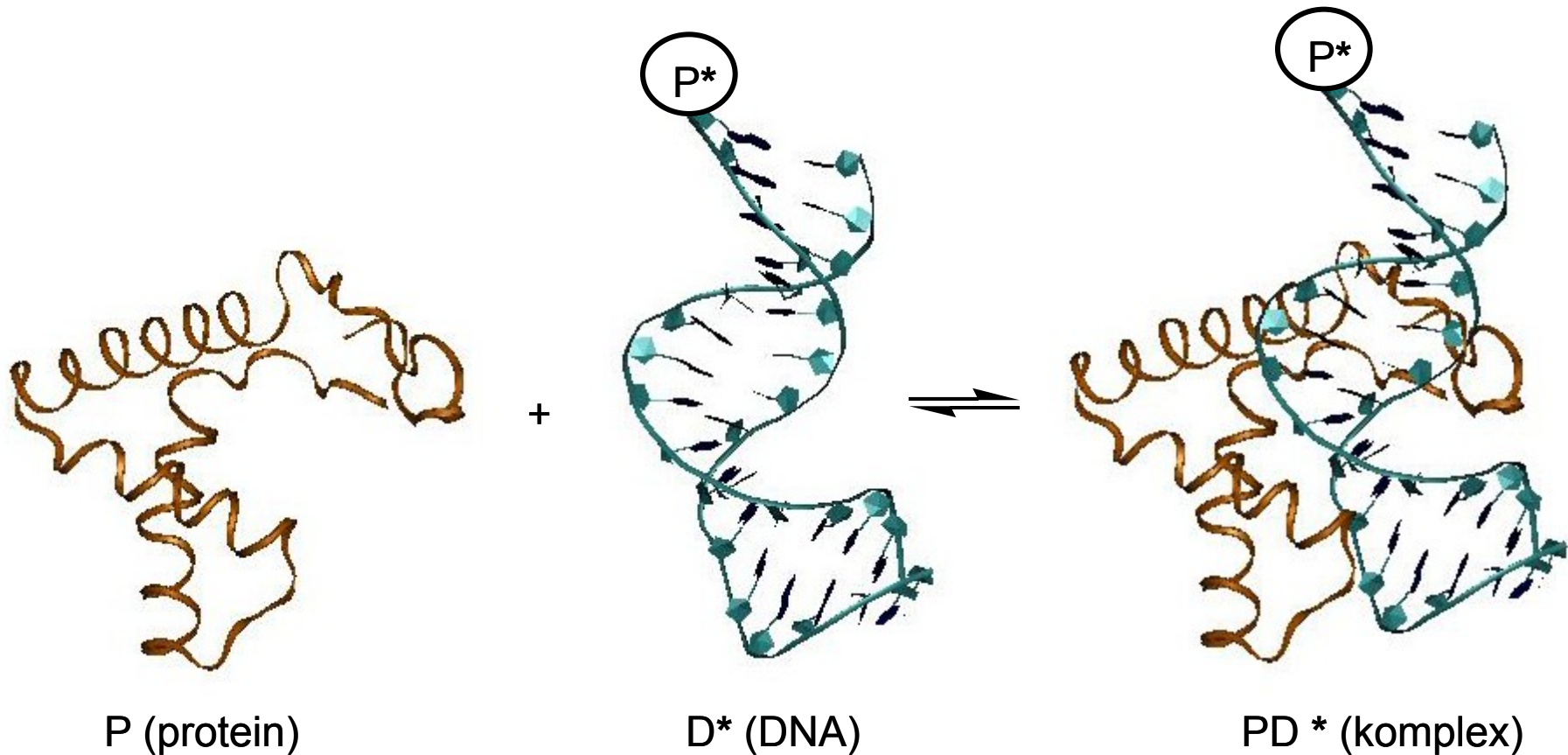
Značenou DNA necháme reagovat s proteinem, přičemž se vytvoří rovnováha:
O koncentracích v rovnováze platí:

$$K_a = \frac{[PD]}{[P] \cdot [D]}$$

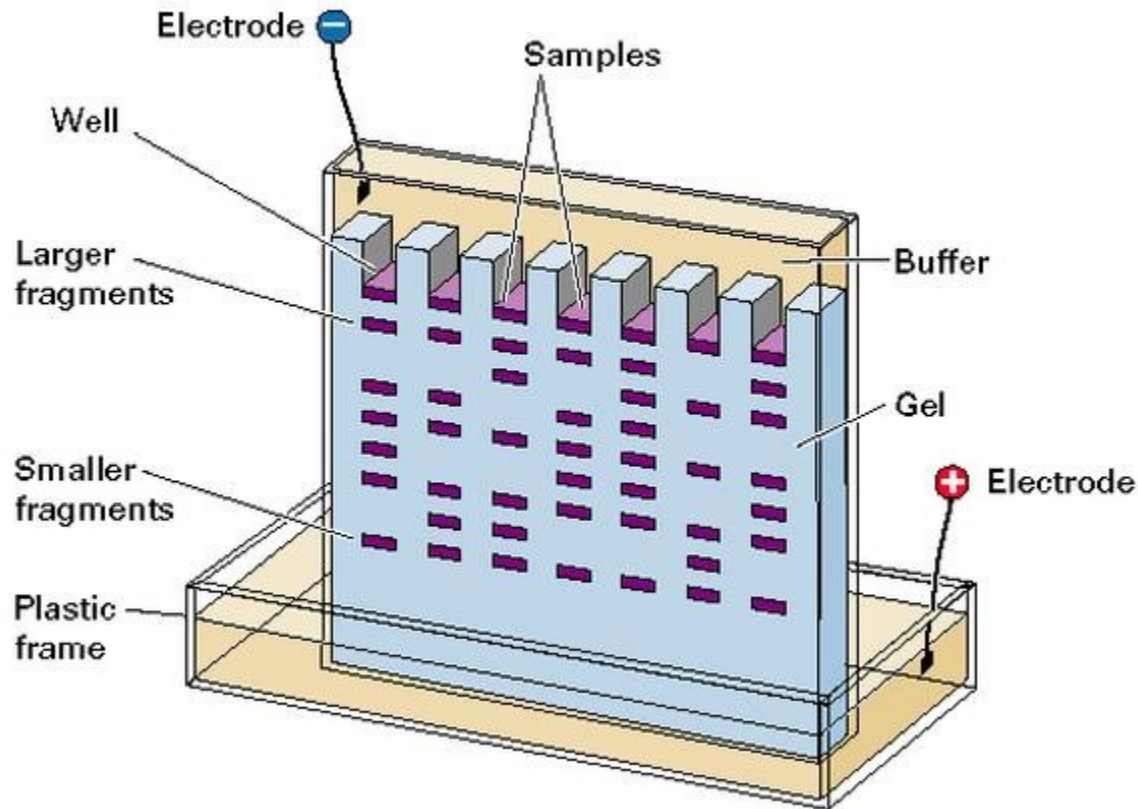
$$K_d = \frac{[P] \cdot [D]}{[PD]}$$

K_a : asociační konstanta

K_d : disociační konstanta

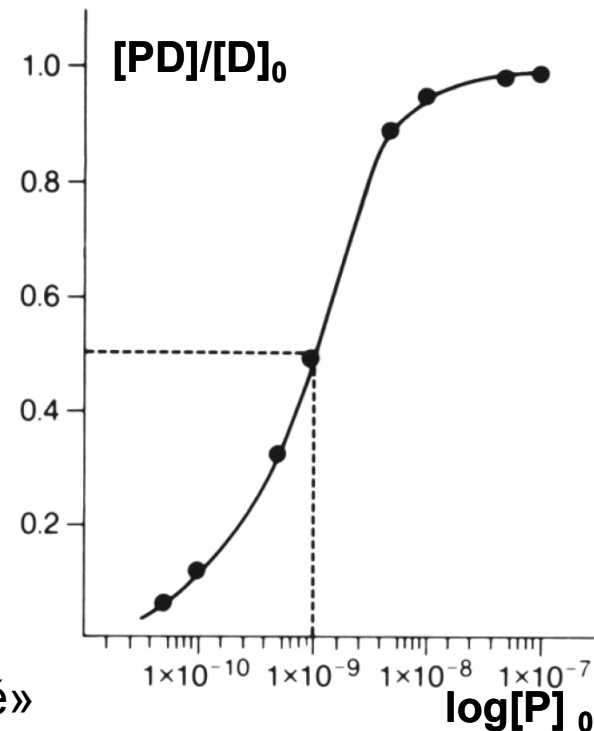
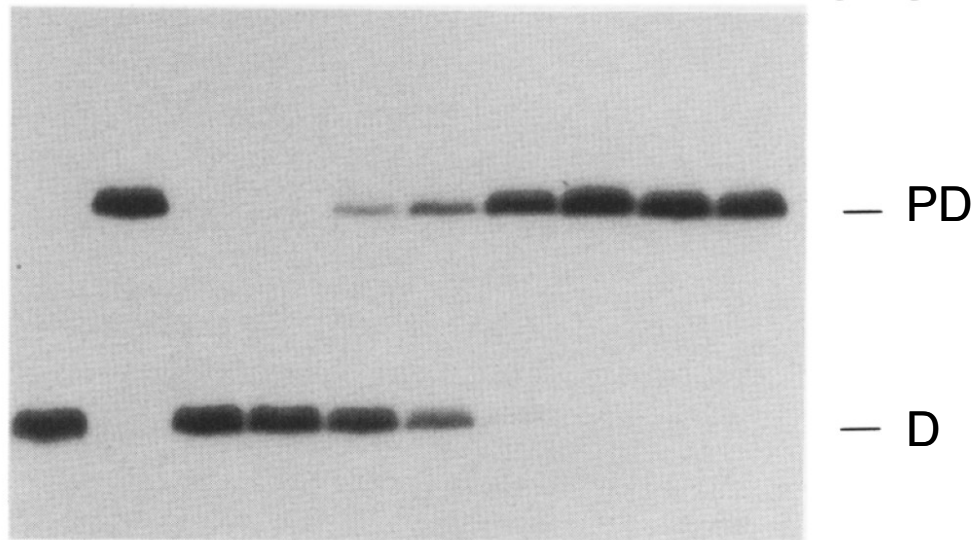


Reakční směs analyzujeme pomocí gelové elektroforézy:



Negativně nabitá DNA migruje k anodě, směrem dolů. Volná DNA migruje rychleji než vázaná v komplexu. Jednak kvůli větší hmotnosti ($a = F/m$), jednak větší komplex hůře prochází póry gelu. Navíc má komplex většinou menší negativní náboj, neboť proteiny vázající se na DNA mají většinou náboj pozitivní. Po určité době gel vyjmeme z pufru, vysušíme a v temné komoře na něj přiložíme fotografický papír. Ten na místech s radioaktivním vzorkem zčerná. Intenzitu skvrny je možno kvantifikovat a použít k určení množství radioaktivní látky.

$[P]_0$ 0 500 0.05 0.1 0.5 1 5 10 50 100 [nM]

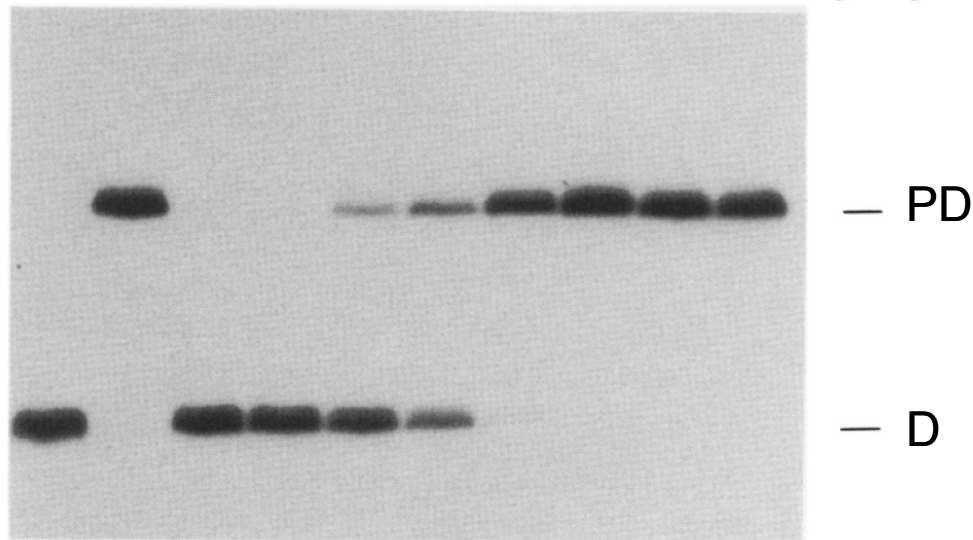


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ← č. «prohlubně»

Analýza gelovou elektroforézou titrace 10 pM roztoku D vzrůstajícími koncentracemi $[P]_0$. Nejpřesněji lze určit poměr $[PD]/[D]_0$ ($[D]_0$ = celková koncentrace DNA, $[P]_0$ = celková koncentrace proteinu).

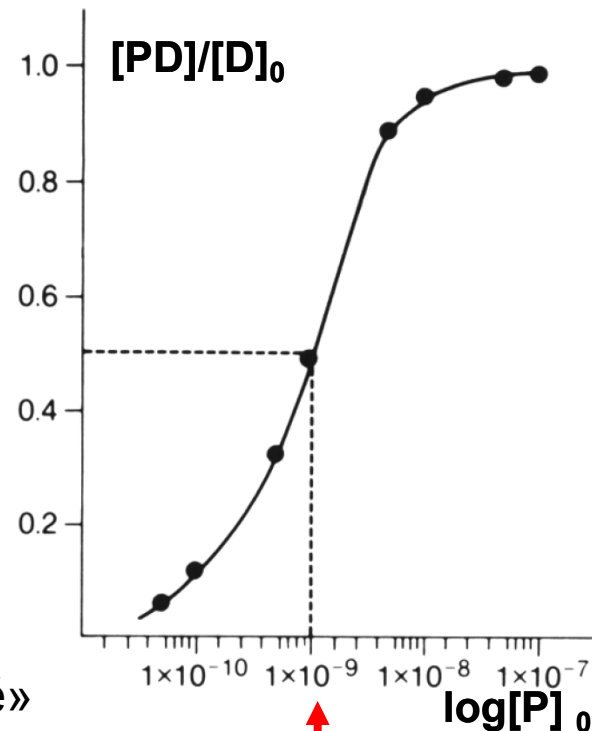


$[P]_0$ 0 500 0.05 0.1 0.5 1 5 10 50 100 [nM]



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ← č. «prohlubně»

Analýza gelovou elektroforézou titrace 10 pM roztoku D vzrůstajícími koncentracemi $[P]_0$. Nejpřesněji lze určit poměr $[PD]/[D]_0$ ($[D]_0$ = celková koncentrace DNA, $[P]_0$ = celková koncentrace proteinu).



Cvičení 4: Dokažte, že pokud platí $[P]_0 \gg [D]_0$, je K_d rovna koncentraci $[P]_0$, při které je $[PD]/[D]_0 = 0.5$

Nápověda: $[P]_0 = [P] + [PD]$; $[D]_0 = [D] + [PD]$. Dosad'te do rovnice pro K_d .