

Московский физико-технический институт
(Государственный университет)
Департамент молекулярной и биологической физики

Физические методы исследования

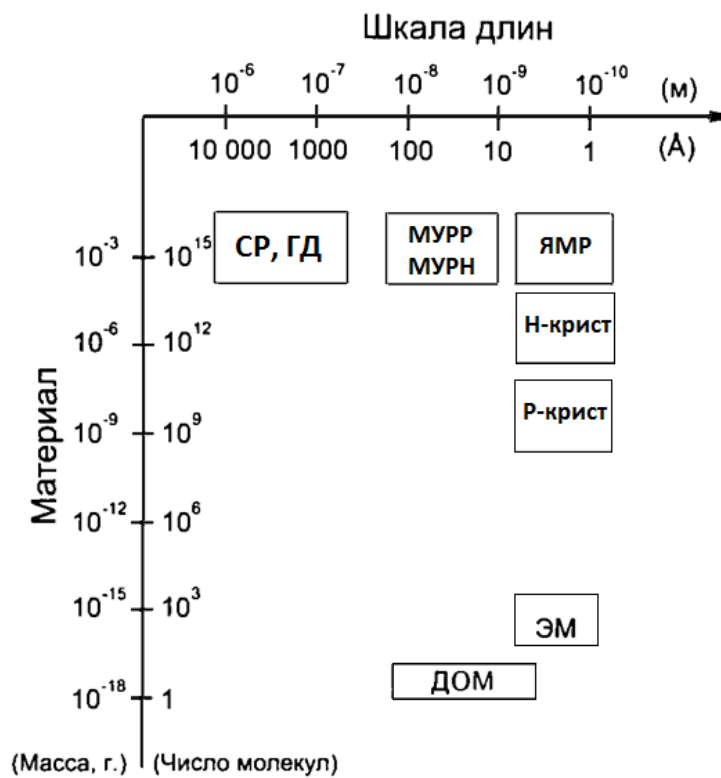
Весенний семестр

Попов Игорь Алексеевич

e-mail: popov.ia@mipt.ru

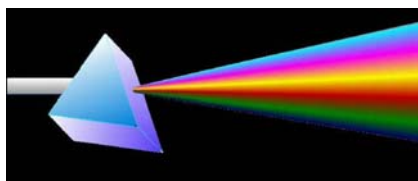
Физические методы исследования





Методы наблюдения

Детектирование и
исследование молекул



Детектирование
макроскопических
объектов

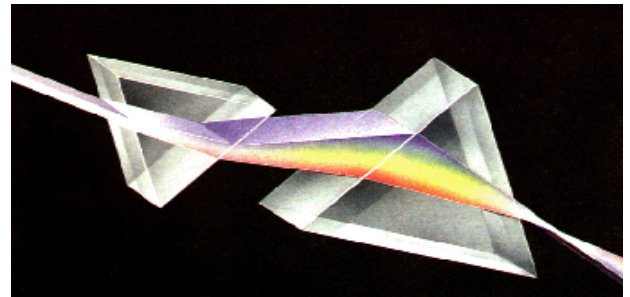
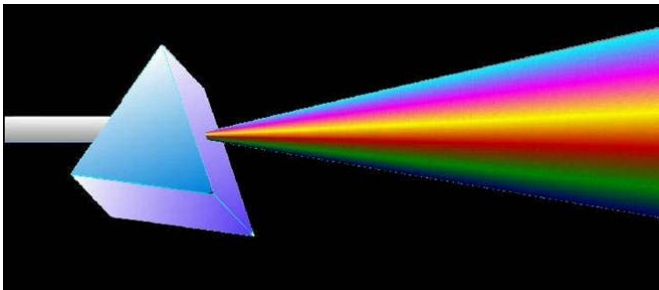
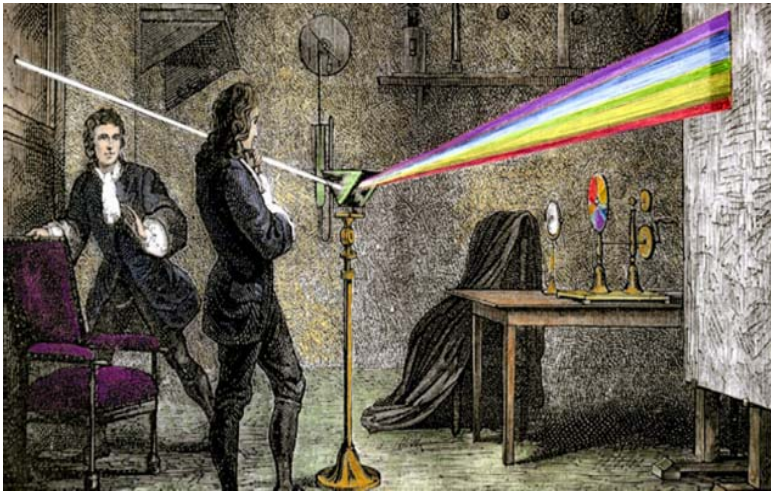


Микроскопия

- 1590 — Голландские изготовители очков Ганс Янсен и его сын Захарий Янсен изобрели составной оптический микроскоп
- 1609 — Галилео Галилей изобретает составной микроскоп с выпуклой и вогнутой линзами
- 1664 — Роберт Гук публикует свой труд «Микрография», собрание биологических гравюр микромира
- 1931 — Эрнст Руска начинает создание первого электронного микроскопа
- 1953 — Фриц Цернике, профессор теоретической физики, получает Нобелевскую премию по физике за своё изобретение фазово-контрастного микроскопа
- 1981 — Герд Бинниг и Генрих Рорер разрабатывают сканирующий туннельный микроскоп
- 1986 — Герд Бинниг, Куэйт (англ.)русск., и Гербер (англ.)русск. создают сканирующий атомно-силовой микроскоп

Рождение спектроскопии

Эксперименты Ньютона с солнечным светом –1666 г.



Инфракрасное излучение

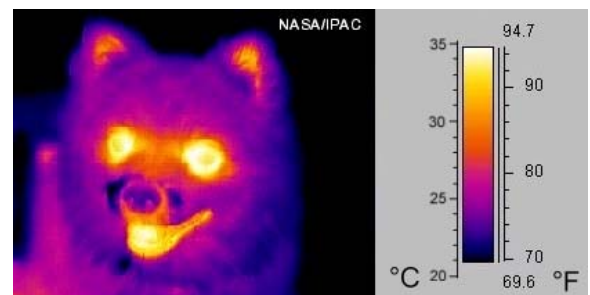
Уильям Гершель, 1800 г.



Коротковолновый поддиапазон
 $\lambda = 0,74-2,5$ мкм

Средневолновый поддиапазон
 $\lambda = 2,5-50$ мкм

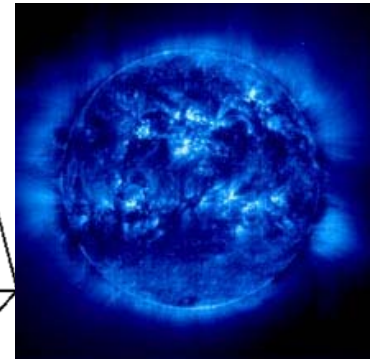
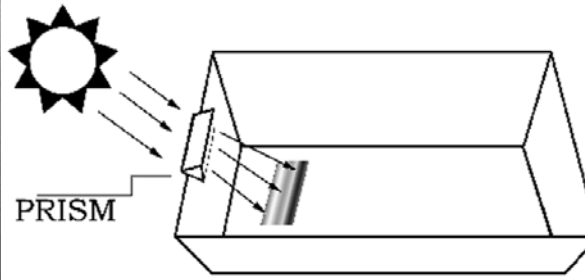
Длинноволновый поддиапазон
 $\lambda = 50-2000$ мкм





Ультрафиолетовое излучение

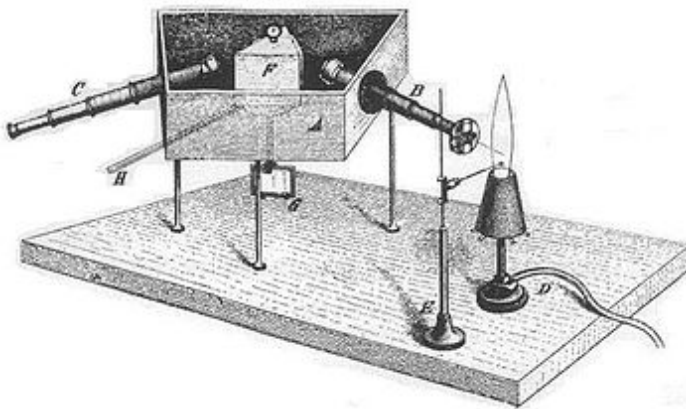
В. Риттер, 1801 г.



Наименование	Аббревиатура	Длина волны в нанометрах	Энергия фотонов
Ближний	NUV	400 нм — 300 нм	3.10 — 4.13 эВ
Средний	MUV	300 нм — 200 нм	4.13 — 6.20 эВ
Дальний	FUV	200 нм — 122 нм	6.20 — 10.2 эВ
Экстремальный	EUV, XUV	121 нм — 10 нм	10.2 — 124 эВ
Ультрафиолет А, длинноволновой	UVA	400 нм — 315 нм	3.10 — 3.94 эВ
Ультрафиолет В, средневолновой	UVB	315 нм — 280 нм	3.94 — 4.43 эВ
Ультрафиолет С, коротковолновой	UVC	280 нм — 100 нм	4.43 — 12.4 эВ

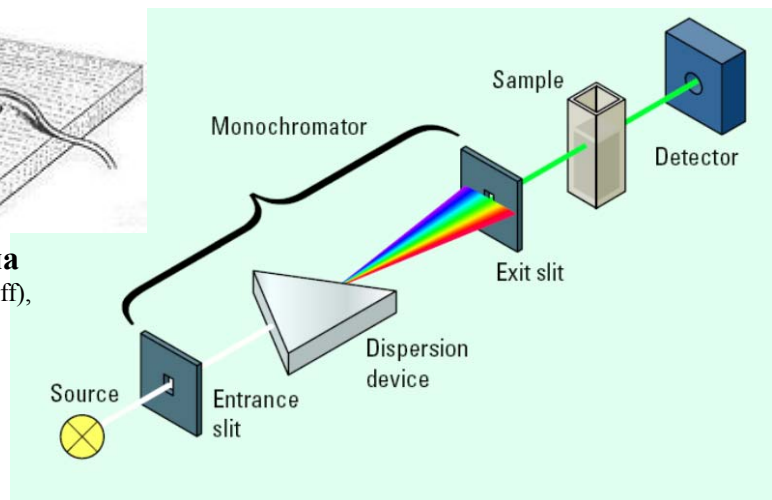
$10 \text{ нм} \leq \lambda \leq 200 \text{ нм}$
Вакуумный УФ

Спектроскопические исследования

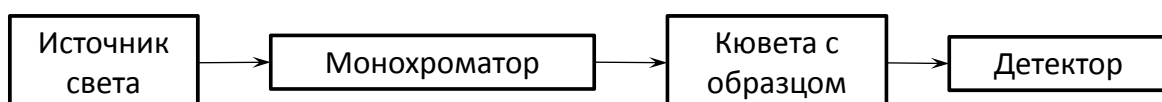


Спектроскоп Кирхгофа-Бунзена

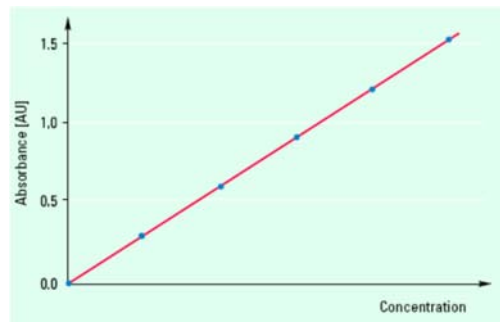
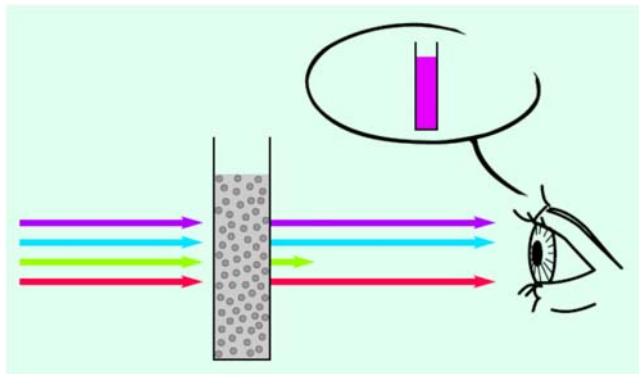
Annalen der Physik und der Chemie (Poggendorff),
Vol. 110 (1860)



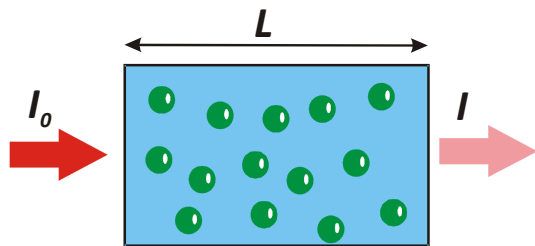
Устройство спектрофотометра в общем виде



Поглощение света веществом



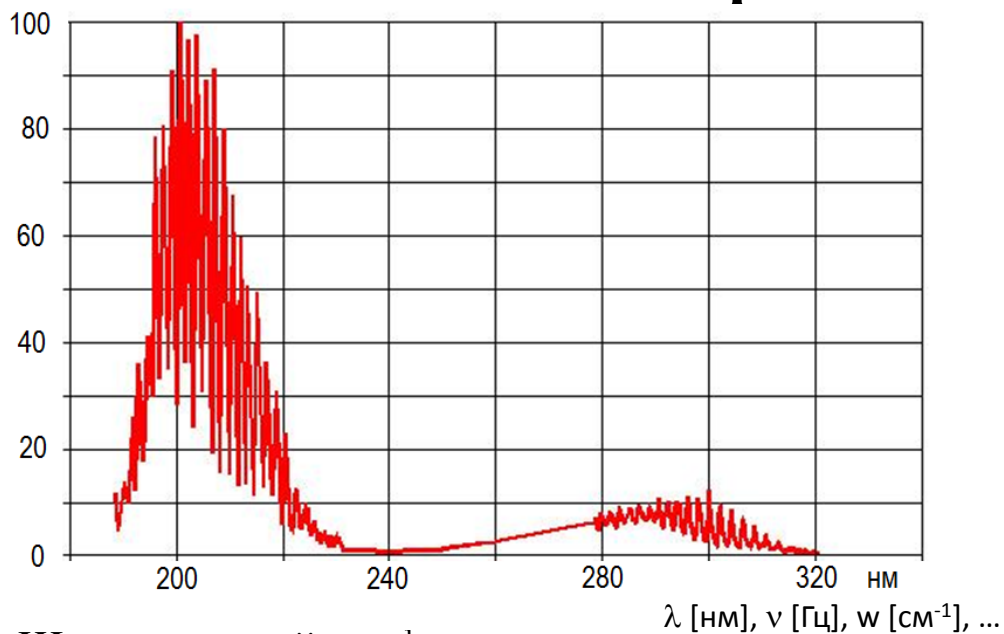
$$T = \frac{I}{I_0} = \exp\{-\alpha \cdot z\}$$



$$D = -\lg T = \varepsilon \cdot [A] \cdot L$$

Оптический спектр

$I,$
 $I/I_0,$
 $D,$
 ε, \dots

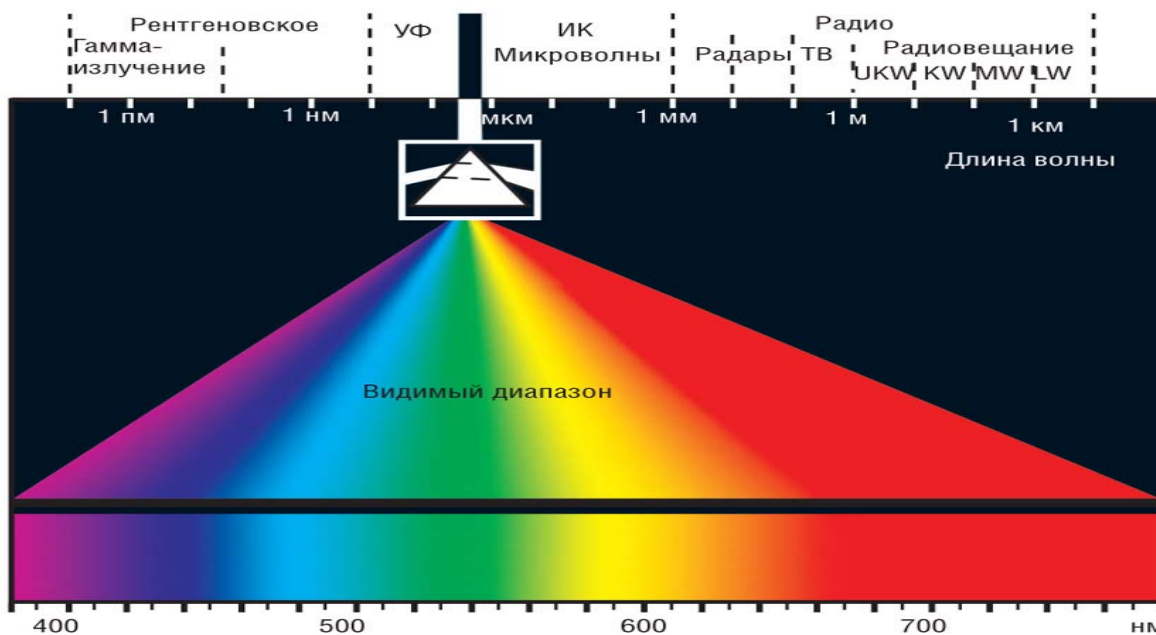


Шкала энергий: см⁻¹

$$E = h\nu = \frac{hc}{\lambda}$$

$$[hc] = 1; [E] = \text{cm}^{-1}$$

Шкала частот электромагнитных волн



УФ	Ф	С	Г	З	Ж	О	К	ИК
400 - 10 нм	400 - 440 нм	440 - 485 нм	485 - 500 нм	500 - 565 нм	565 - 590 нм	590 - 625 нм	625 - 740 нм	10 ³ - 0,74 мкм

Виды спектроскопии

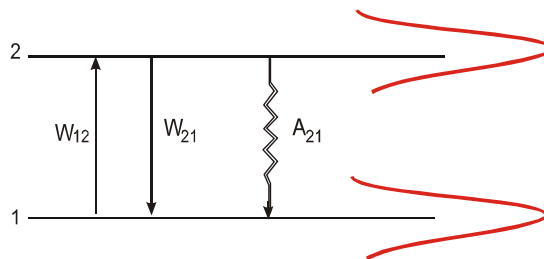
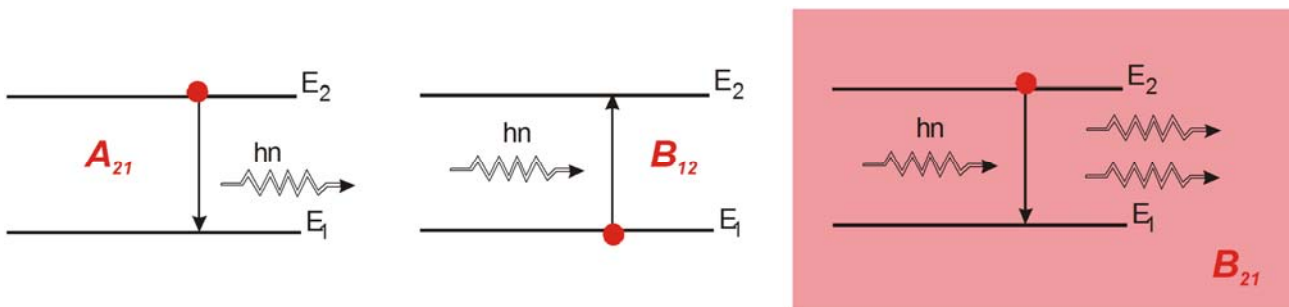
- Спектроскопия поглощения
- Спектроскопия испускания
- Спектроскопия рассеяния

Лазер

Light
Amplification
 by **S**timulated
Emission
 of **R**adiation

15

Квантовый оптический резонатор

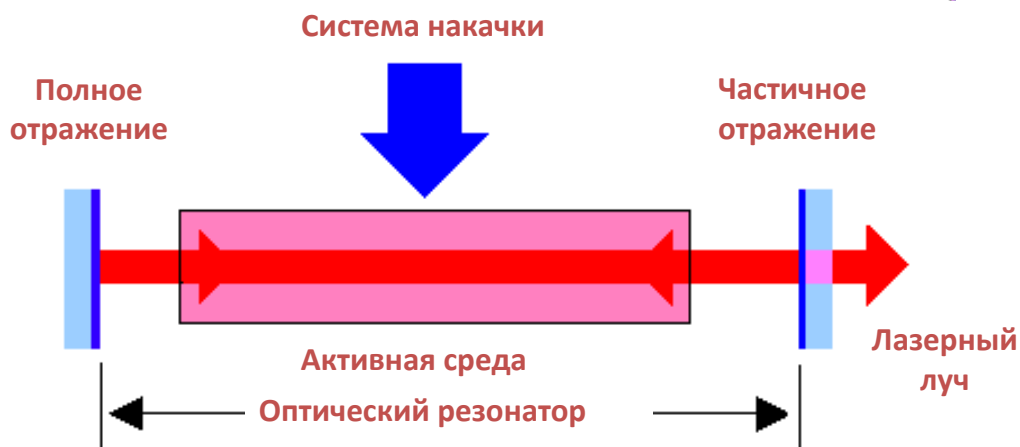


$$\Delta\omega_2 = \Delta\omega_1 = \Delta\omega$$

$$\omega \in [\omega_{21} - \Delta\omega; \omega_{21} + \Delta\omega]$$

16

Лазер. Основные элементы



Активная среда	Усиливает световой поток
Система накачки	Селективно накачивает энергию в активную среду
Оптический резонатор	Накапливает часть индуцированного излучения Создает положительную обратную связь

17

Лазер, как источник света в спектроскопии

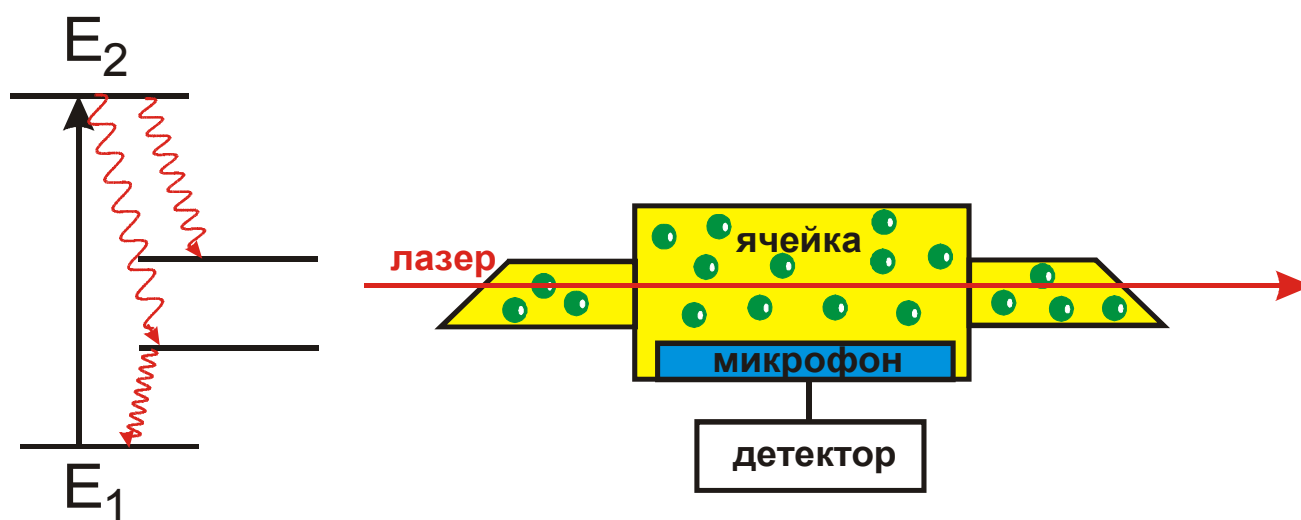
- Большая спектральная плотность мощности
- Малая расходимость коллимированных лазерных пучков
- Малая спектральная ширина линии излучения лазеров
- Одномодовый перестраиваемый лазер – комбинация интенсивного источника света и спектрометра сверхвысокого разрешения
- Способность импульсных лазеров или лазеров с синхронизацией мод генерировать интенсивные и короткие световые импульсы – возможность исследования сверхбыстрых процессов

18

Оптоакустическая спектроскопия

19

Принцип метода оптоакустической спектроскопии



20

Физическая суть метода оптоакустической спектроскопии

Накачка

$$M(\nu-1) + h\nu_{\text{las}} \rightarrow M(\nu)$$

ИК - лазер

Релаксация

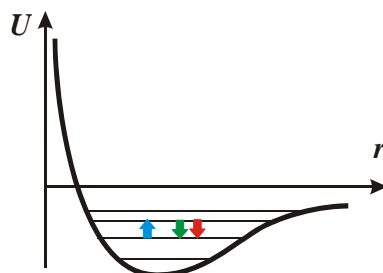
$$M(\nu) + M_1 \rightarrow M(\nu-1) + M_1$$

$$M(\nu) \rightarrow M(\nu-1) + h\nu$$

Регистрация



10^{-7} - 10^{-6} Тор



Электромагнитное излучение

λ (м)	10^{-15}	10^{-12}	10^{-9}	10^{-6}	10^{-3}	1	10^3	
ν (сек ⁻¹)	10^{24}	10^{21}	10^{18}	10^{15}	10^{12}	10^9	10^6	
	Космические лучи	Гамма-излучение	Рентген	Ультрафиолет	Видимый свет	Инфракрасный диапазон	Радио-диапазон	Нейтроны
								λ (м)
								ν (мсек ⁻¹)
								E (эВ)
E (эВ)	10^9	10^6	10^3	1	10^{-3}	10^{-6}	10^{-9}	E/k (°К)
E/k (°К)	10^{13}	10^{10}	10^7	10^4	10	10^{-2}	10^{-5}	

Длина волны, энергия и частота электромагнитного и нейтронного излучения. Шкалы на рисунке представляют приблизительные порядки значений. Точные значения констант получены из равенств: $\nu\lambda = c$, где ν и λ — частота и длина волны электромагнитного излучения, соответственно, и c — скорость света (3×10^8 м·сек⁻¹); $E = h\nu$ (где E — энергия и h — константа Планка ($6,626 \times 10^{-34}$ Дж·сек = $4,136 \times 10^{-15}$ эВ·сек)); температурный эквивалент энергии, $1 \text{ эВ}/k = 11604,5 \text{ К}$, где k — константа Больцмана. В случае нейтронного излучения, $\lambda = h/mu$ (где u мсек⁻¹ — скорость нейтрона), и $E = \frac{1}{2}mu^2$, где m — масса нейтрона ($1,6726 \times 10^{-27}$ кг)

Шкала сил для макромолекул

Разрыв ковалентных связей	1000–2000 пН
Деформация сахарного кольца	700 пН
Разрыв двойной спирали ДНК	400–580 пН
Сила связи между авидином и биотином	140–180 пН
Структурный переход в двуспиральной ДНК при растяжении	60–80 пН
Структурный переход двуспиральной ДНК при торзионном скручивании	~20 пН
Разрушение индивидуальных нуклеосом	20–40 пН
Разворачивание тройной спирали спектрина	25–35 пН
Сила, необходимая для остановки мотора РНК-полимеразы	14–27 пН
Структурный переход в рибозимной шпильке РНК при растяжении	~14 пН
Разделение комплементарных цепей ДНК (T = 20 °C, 150 mM NaCl) (зависит от конкретной нуклеотидной последовательности)	10–15 пН
Сила, необходимая для остановки мотора миозина	3–6 пН
Сила, генерируемая при полимеризации белка в растущих микротрубочках	3–4 пН

Задачи

- Детектирование объектов
- Идентификация объектов
- Измерение концентрации (количественное исследование)
- Исследование структуры (первичной, вторичной и пр.)
- Исследование комплексов
- Исследование динамики
- Исследование свойств веществ и сред

Все сложно...

1. Не существует универсального физического метода исследования, достаточного для исследования всех молекул.
2. Не существует физического метода исследования, при помощи которого можно было бы исследовать все свойства даже одной молекулы. Физические методы комплементарны (дополняют друг друга с точки зрения получаемой информации).
3. Молекулы, особенно биологические макромолекулы нельзя рассматривать отдельно от их окружения.
4. Наряду со структурной информацией важно рассматривать энергетические характеристики и наблюдать взаимодействие молекул и среды.
5. Первичная информация, получаемая физическим методом - сигнал. Информация о структуре молекулы - результат обработки сигнала с применением математических моделей. Интерпретация результата не менее важна для построения правильных выводов, чем процесс измерения.
6. Информация, получаемая в рамках физического эксперимента - лишь срез объектов и событий, наличествующих в биологическом объекте. Часто воссоздание полной картины невозможно только по результатам измерений, а это, в свою очередь, накладывает ограничения на общность выводов, которые делаются по результатам исследований, а может быть и поводом для констатации того что желаемые выводы и обобщения сделать невозможно.

Каждая задача исследования свойств молекулярных и надмолекулярных систем содержит стадии

- Анализ объекта исследований
- Анализ метода исследований
 - *Физики метода исследований*
 - *Техники метода исследований*
- Анализ физических моделей
- Анализ первичной информации
- Оценка результата с точки зрения метрологии
- Построение выводов

У нас есть план

№ недели	Дата лекции	Тема лекции
1	9 февраля	Введение. Современные физические методы исследований (обзор курса).
2	16 февраля	Ошибки измерений. Погрешности. Метрологические характеристики измерительных систем. Постоянная времени измерительной системы. Полоса пропускания. Спектральный анализ. Принцип неопределенности.
3	23 февраля	Праздник 23го февраля
4	2 марта	1. Шумы в измерительных системах. 2. Измерение давления: поддиапазоны вакуума, явления переноса, течение газа, взаимодействие газа с поверхностью.
5	9 марта	Измерение давления в различных поддиапазонах вакуума. Измерение высоких давлений. Откачка вакуумных систем. Конструирование вакуумных систем.
6	16 марта	Адсорбция на поверхности. Газовая хроматография. Техника газовой хроматографии.
7	23 марта	Детекторы в газовой хроматографии. Газовая хроматография с программируемым нагревом. Принципы жидкостной хроматографии.
8	30 марта	Техника жидкостной хроматографии. Детекторы в жидкостной хроматографии. Аналитические применения хроматографии.
9	6 апреля	Резерв (скорее всего что-то по давлению не уложится, поэтому все вместе с хроматографией съедет на одно занятие)
10	13 апреля	Введение в масс-спектрометрию. История и базовые принципы. Масс-спектрометр Астона с ионизацией электронным ударом.
11	20 апреля	Ионные источники: Электронный удар, фотоионизация, полевая ионизация, химическая ионизация. Химическая ионизация при атмосферном давлении.
12	27 апреля	Ионизация больших органических молекул. Ионные источники, работающие при атмосферном давлении
13	4 мая	Квадрупольные масс-анализаторы. Квадрупольные ионные ловушки. Атмосферный интерфейс для ввода ионов.
14	11 мая	Времяпролетный масс-спектрометр. MALDI TOF, ESI TOF. Детектирование ионов. Измерение тока ионов.
15	18 мая	Масс-спектрометрия сверхвысокого разрешения. Биологическая масс-спектрометрия. Аналитические применения масс-спектрометрии.
16	25 мая	Семестровая контрольная работа

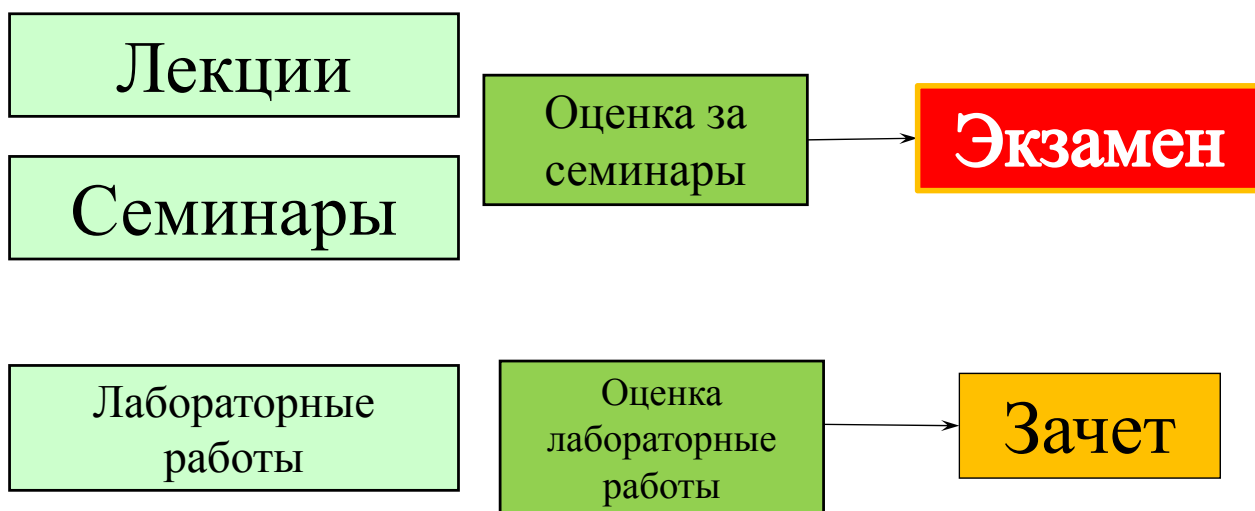
Весенний семестр, 3 курс

- Введение. Основы метрологии. Электрические элементы измерительных систем.
- Измерение давления. Газовые системы
- Разделение молекул. Хроматография
- Масс-спектрометрические методы



Осенний семестр, 4 курс

- Оптическая спектроскопия. Измерение температуры
- Техника лазеров и лазерная спектроскопия
- ЯМР и ЭПР



ОПЦИЯ! Для особо упорных!

- Оптическая спектроскопия. Измерение температуры
- Техника лазеров и лазерная спектроскопия
- ЯМР и ЭПР

