

České vysoké učení technické v Praze
Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE



Aleš Vlk

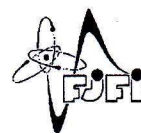
Experimentální studium elektrických a optických vlastností tubulinu a mikrotubulů in vitro a in vivo

Katedra fyziky

Vedoucí práce: doc. RNDr. Vojtěch Petráček, CSc.

Studijní obor: Experimentální jaderná a částicová fyzika

Praha 2017



Katedra: fyziky

Akademický rok: 2016/2017

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Student: Aleš Vlk

Studijní program: Aplikace přírodních věd

Obor: Experimentální jaderná a částicová fyzika

Název práce: Experimentální studium elektrických a optických vlastností tubulinu
(česky) a mikrotubulů in vitro a in vivo

Název práce: Experimental studies of electrical and optical properties of tubulin
(anglicky) and microtubulus in vitro and in vivo

Pokyny pro vypracování:

- 1) Seznámení s úlohou mikrotubulů v živých systémech
- 2) Seznámení s teoretickými modely funkce mikrotubulu
- 3) Sestavení měřicího systému pro měření vodivosti tubulinu
- 4) Provedení měření elektrické vodivosti molekul tubulinu a mikrotubulů
- 5) Analýza a interpretace získaných výsledků

Doporučená literatura:

- [1] D. Havelka: Elektromagnetické pole mikrotubulárního systému buňky, diplomová práce FEL ČVUT, 2010
- [2] D. Dehlinger, M. W. Mitchel.: Entangled photons, nonlocality and Bell inequalities in the undergraduate laboratory; arxiv: quant-ph/0205171
- [3] S. Kurokawa, A. Sakai: GAp dependence of the tip-sample capacitance; J. Appl. Phys. 83, 7416 (1998)
- [4] S. Hameroff, R. Penrose: Consciousness in the universe: A review of the "Orch Or" theory; Phys. Life Rev. 11, 39 (2014)


Jméno a pracoviště vedoucího bakalářské práce:

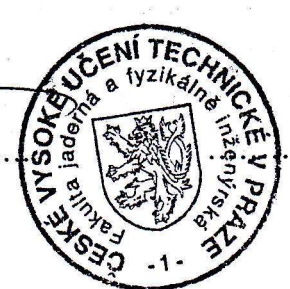
doc. RNDr. Vojtěch Petráček, CSc., Katedra fyziky, Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská, ČVUT v Praze


Datum zadání bakalářské práce: 20.10.2016

Termín odevzdání bakalářské práce: 10.07.2017

Doba platnosti zadání je dva roky od data zadání.


vedoucí katedry




děkan

V Praze dne 20.10.2016

Poděkování.

Tímto bych rád poděkoval mému vedoucímu bakalářské práce doc. RNDr. Vojtěchu Petráčkovi, CSc. za odborné vedení, cenné rady a připomínky. Dále bych chtěl poděkovat panu Ing. Michalu Cifrovi, Ph.D. a jeho týmu z Ústavu fotoniky a elektroniky, Akademie věd ČR, v.v.i. za poskytnutí vzorků a vybavení potřebného pro experimenty.

Prohlašuji, že jsem svou bakalářskou práci vypracoval samostatně a použil jsem pouze podklady (literaturu, projekty, SW atd.) uvedené v přiloženém seznamu.

Nemám závažný důvod proti použití tohoto školního díla ve smyslu §60 Zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon).

V Praze dne

.....

Aleš Vlk

Název práce:

Experimentální studium elektrických a optických vlastností tubulinu a mikrotubulů in vitro a in vivo

Autor: Aleš Vlk

Obor: Experimentální jaderná a částicová fyzika

Druh práce: Bakalářská práce

Vedoucí práce: doc. RNDr. Vojtěch Petráček, CSc., Katedra fyziky, Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská, České vysoké učení technické v Praze

Konzultant: —

Abstrakt: Cílem této práce je seznámení se s vlastnostmi a úlohou mikrotubulů v živých organismech a dále studium závislostí kapacity, odporu, impedance a fázového posuvu roztoků hovězího sérového albuminu a tubulinu na jejich koncentraci a vzdálenosti elektrod pro různé frekvence elektrického pole. Během měření těchto závislostí byl objeven a zkoumán další jev, a sice tvorba hydrogelových sraženin obou proteinů na elektrodě za použití elektrického pole generovaného stejnosměrným napětím. Dále též byla zkoumána a zároveň nepotvrzena reprodukovatelnost krystalizace hovězího sérového albuminu v proměnném elektrickém poli na hrotové elektrodě, jež byla pozorována při předchozích experimentech. Společně s krystalizačními pokusy byla změřena aktivní plocha dvou vyrobených hrotových elektrod. Všechna tato měření budou využita při našem dalším zkoumání vlastností tubulinu a také při měření vodivosti tubulinu a mikrotubulů odtrhávací metodou.

Klíčová slova: hovězí sérový albumin, tubulin, mikrotubuly, elektrické vlastnosti

Title:

Experimental study of electric and optic properties of tubulin and microtubules in vitro and in vivo

Author: Aleš Vlk

Abstract: The purpose of this work is to familiarize with the properties and role of microtubules in living organisms and to study the capacitance, resistance, impedance and phase difference of solutions of bovine serum albumin and tubulin with respect to their concentration and distance between electrodes for different frequencies of applied electric field. During the investigation of these dependencies, another phenomenon has been discovered and investigated, namely the formation of hydrogel precipitations of both proteins on the electrode using an electric field generated by DC voltage. In addition, the reproducibility of crystallization of bovine serum albumin in an alternating electric field on a tip electrode that was observed in previous experiments has been also studied and not confirmed. Together with the crystallization experiments, the active area of two produced tip electrode has been measured. All these measurements will be used in our further investigation of tubulin properties as well as in conductivity measurement of tubulin and microtubules by tear-off method.

Keywords: bovine serum albumin, tubulin, microtubules, electric properties

Obsah

Úvod	3
1 Hovězí sérový albumin	4
1.1 Krystalizace	5
1.1.1 Metoda sedící/visící kapky	5
1.1.2 Metoda sendvičové kapky	7
1.1.3 Krystalizace pod olejem (Microbatch)	7
1.1.4 Krystalizace v elektrickém poli	7
2 Mikrotubuly	10
2.1 Tubulin	10
2.2 Mikrotubuly jsou tvořeny vlákny tubulinu	11
2.3 Jsou rozlišovány dva typy mikrotubulárních mřížek	12
2.4 Rozlišitelné konce mikrotubulů a dynamická nestabilita	12
2.5 Funkce	14
2.6 Elektrické vlastnosti tubulinu a mikrotubulů	15
2.6.1 Mikrotubuly řadíme mezi feroelektrika	15
2.7 Speciální vlastnosti neuronových mikrotubulů	16
3 Vodivost	18
3.1 Vedení proudu v kapalinách	18
3.2 Vedení proudu v pevných látkách	18
3.2.1 Polovodiče	19
3.2.2 Odtrhávací metoda	20
4 Popis měřicí aparatury	21
4.1 Elektrody	21
5 Experimentální postupy a analýza dat	23
5.1 Měření vlastností BSA pomocí ploché elektrody	23
5.1.1 Závislost C_p , R_p , Z a Θ na koncentraci BSA	23
5.1.2 Závislost C_p a R_p na vzdálenosti elektrod	28
5.1.3 Závislost I_{DC} na čase a vzdálenosti elektrod	32
5.2 Měření s hrotovou elektrodou	39
5.2.1 Aktivní plocha hrotu	39
5.2.2 Krystalizace BSA v elektrickém poli	40
5.3 Měření vlastností tubulinu pomocí ploché elektrody	41
5.3.1 Závislost C_p , R_p , Z a Θ na koncentraci tubulinu	41
5.3.2 Frekvenční závislosti C_p a R_p tubulinu a puřovacího roztoku	48
5.3.3 Závislost I_{DC} na čase t	50
Závěr	52
Seznam použité literatury	53
Symbyly a zkratky	57

Přílohy	58
5.4 Tabulky hodnot	58
5.4.1 Aktivní plocha hrotu	58

Úvod

Mikrotubuly jsou velmi významné biomolekuly, které se vyskytují ve všech eukaryotních buňkách a některých bakteriích, kde plní nepřeberné množství funkcí, jako je například samotná stavba buňky, udržení jejího tvaru, transport látek a v neposlední řadě vytvoření mitotického vřetenka, které má za úkol rozdělit chromozomy při dělení buňky. Mimo tyto potvrzené funkce existují teorie, které považují mikrotubuly za médium, které je zodpovědné za šíření a ukládání informací v lidském mozku. Pro potvrzení či vyvrácení těchto teorií je nutné intenzivně zkoumat elektrické vlastnosti mikrotubulů i jejich stavební jednotky dimerního proteinu tubulinu.

Dlouhodobým cílem naší skupiny je výzkum vodivosti mikrotubulů pomocí odtrhávací metody a dále pak vliv, pakliže nějaký existuje, kvantového provázání dvou fotonů na její hodnotu a také vliv průchodu provázaných fotonů skrze strukturu mikrotubulu na samotné provázání.

Cíle této bakalářské práce jsou ovšem méně ambiciózní. V následujícím textu se tak čtenář seznámí především se základními vlastnostmi a funkcí mikrotubulů v živých organismech a také s vlastnostmi kalibrační molekuly hovězího sérového albumin (zkr. BSA).

V experimentální části byly prozkoumány zejména závislosti odporu R_p , kapacity C_p , impedance Z , fázového posuvu Θ a měrné vodivosti σ na koncentraci pro BSA a stavební jednotku mikrotubulů, tubulin. Dále byly zkoumány závislosti odporu R_p , kapacity C_p a stejnosměrného proudu I_{DC} na vzdálenosti elektrod pro BSA, schopnost tvorby sraženiny obou proteinů na kladně nabitě elektrodě za použití stejnosměrného proudu I_{DC} a také krystalizace BSA na hrotové elektrodě ve střídavém elektrickém poli. Pro tubulin a roztoky, ve kterých je rozpuštěn, byly proměřeny závislosti kapacity C_p a odporu R_p na frekvenci střídavého elektrického pole v rozsahu frekvencí $f \in (20 \text{ Hz} - 1 \text{ MHz})$. Mimo tyto jevy a závislosti byla též určena aktivní plocha vyrobených hrotových elektrod, neboť právě aktivní plocha hrotové elektrody hraje důležitou roli při určování vodivosti molekul pomocí odtrhávací metody.

1. Hovězí sérový albumin

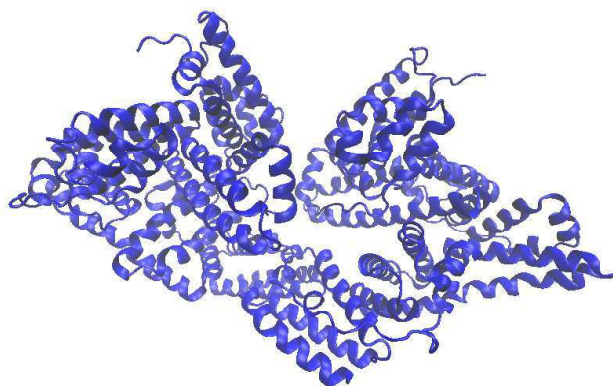
V této kapitole bude čtenáři představen hovězí sérový albumin (zkr. BSA z angl. Bovine Serum Albumin) a některé jeho vlastnosti.

BSA je v laboratořích hojně využívaný protein především kvůli jeho nízké ceně v porovnání s jinými proteiny a také kvůli jeho poměrně dobré rozpustnosti. Za použití pouze deionizované vody jako rozpouštědla lze dosáhnout koncentrace až $40 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ [1]. Právě z těchto důvodů je použit jako kalibrační molekula pro měření v této práci.

Jak již název napovídá, BSA je obsažen v krevním séru skotu, kde se vyskytuje v koncentraci okolo $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ [2] (platí pro albuminy obecně) a plní zde především transportní roli a roli regulátoru krevního tlaku. Jeho aminokyselinovou sekvenci poprvé v roce 1975 popsal J. R. Brown [3]. Struktura BSA je tvořena 582 aminokyselinovými rezidui propojenými kovalentní vazbou, které takto tvoří sekundární strukturu ¹ zvanou α -šroubovice (48,7 % proteinu) a náhodné struktury (41,3 % proteinu), viz Obrázek 1.1. ²

Poté, co byla rozluštěna aminokyselinová sekvence BSA, bylo možné vypočítat molekulovou hmotnost tohoto proteinu pouze z jeho složení. Tento postup dává výslednou hodnotu rovnou $M = 66,267 \text{ kDa}$ ³. Takto získaná hodnota byla ve velmi dobré shodě s tehdejšími experimentálními výsledky, např. s hodnotou $M = (66,700 \pm 0,400) \text{ kDa}$, jež byla získána při studiu sedimentační rovnováhy BSA. [4]

Nejčastěji využívanou veličinou pro popis rozložení náboje (celkový náboj BSA za normálního $pH = 7$ je roven $Q = -18e$ [5]) ⁴ v proteinech je dipólový moment $\mathbf{p} = q \cdot \mathbf{d}$, kde d je vzdálenost mezi dvěma odlišnými náboji q . Dipólový moment hovězího albuminu je roven přibližně $\|\mathbf{p}\| \approx 400 \text{ D}$ ^{5 6} [6, 7].



Obrázek 1.1: **Molekula BSA 4F5S**. Obrázek byl vytvořen v programu Visual Molecular Dynamics [8] za použití dat z [9] dostupné na [10] pod PDB ID: 4s5f.

¹Primární strukturou je nazýván aminokyselinový řetězec.

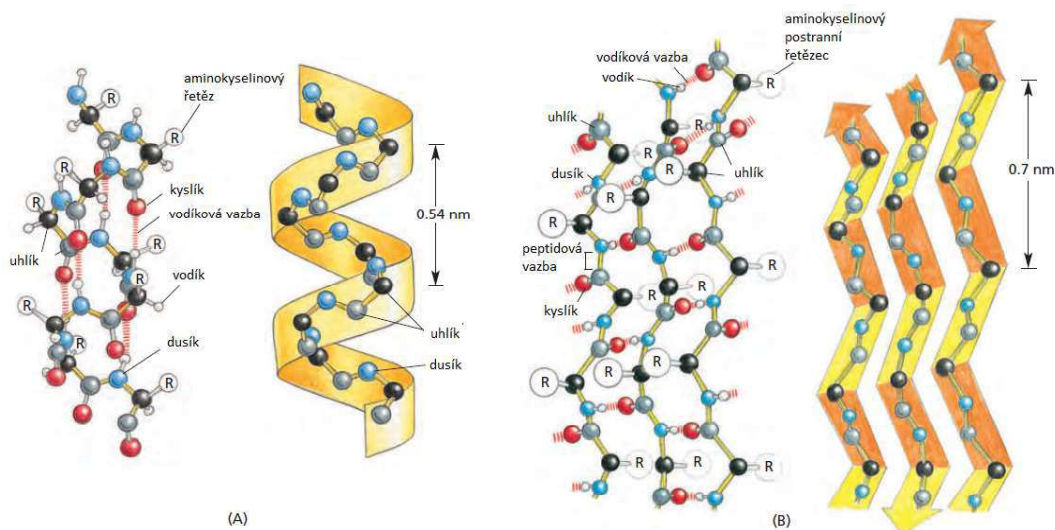
²Druhý typ sekundární struktury, β -skládaný list, se v tomto proteinu nevyskytuje.

³Dalton, nebo také atomová hmotnostní jednotka: $1 \text{ Da} = 1,660539040 \cdot 10^{-27} \text{ kg}$.

⁴Elementární náboj: $1e \approx 1,602 \cdot 10^{-19} \text{ C}$.

⁵Zápis $\|\mathbf{p}\|$ ztotožníme se zápisem p .

⁶ $1 \text{ D} = 1 \text{ Debye} = 3,33564 \cdot 10^{-30} \text{ C}\cdot\text{m}$.



Obrázek 1.2: **Sekundární struktury proteinů.** Na obrázku (A) je znázorněna tzv. α -šroubovice, β -skládaný list je na obrázku (B). [11]

1.1 Krystalizace

V této sekci bude stručně popsán proces krystalizace a uvedeny některé metody krystalizace proteinů a jejich výsledky pro BSA (pokud byly nalezeny). Tato kapitola se především zakládá na informacích získaných v pracích [12, 13].

Krystalizace biologických makromolekul, jako jsou např. nukleové kyseliny nebo proteiny, je velmi užitečným nástrojem při zkoumání jejich struktury a fyzikálních vlastností. Bohužel neexistuje jednotná teorie, která by popisovala přesný postup při krystalizaci. Z tohoto důvodu je krystalizace do velké míry empirický proces a je založena především na zkušenosti a trpělivosti krystalografa.

Procesem krystalizace, neboli vznikem krystalů, je myšlena fázová změna kapaliny nebo plynu na pevnou látku [13]. Celý proces se skládá ze tří hlavních fází - nukleace, růstu a ukončení růstu krystalů a probíhá obvykle velmi pomalu.

Ke vzniku krystalického jádra a následnému růstu krystalů je zapotřebí mimo jiné zvýšené koncentrace proteinu v roztoku a dále též dostatek času pro vytvoření pravidelně uspořádané krystalické struktury. Pokud je proces krystalizace příliš rychlý, např. následkem prudkého ochlazení, vzniklá struktura bude uspořádaná jen na velmi malé škále, zatímco na větší bude struktura uspořádána chaoticky, což je pro většinu experimentů nežádoucí.

Během nukleace dochází ke vzájemnému kontaktu vhodně orientovaných molekul/iontů, které se po překročení limitu nasycení (stav supersaturace) spojují pomocí nekovalentních vazeb ve stabilní krystalická jádra. Na tato jádra se dále připojují další molekuly či ionty a vytváří tak krystal. Růst krystalu je poté ukončen ve chvíli, kdy koncentrace krystalizované látky klesne pod limit rozpustnosti.

1.1.1 Metoda sedící/visící kapky

Obě tyto metody jsou oblíbené pro svou jednoduchost a finanční nenáročnost. Hlavním principem je difuze vodních par mezi kapkou a rezervoárem roztoku ob-

sahujícího srážecí činidlo. Kapka roztoku (o obvyklém objemu $V \approx (2 - 3) \mu\text{L}$) obsahující srážecí činidlo a protein má nižší koncentraci srážecího činidla než roztok v rezervoáru. Voda se tak z kapky vypařuje ve snaze vyrovnat koncentraci činidla mezi kapkou a rezervoárem. Toto má za následek pozvolné přesycení roztoku proteinu a následnou krystalizaci. Rozdíl mezi těmito metodami je pouze v umístění kapky, viz Obrázek 1.3.

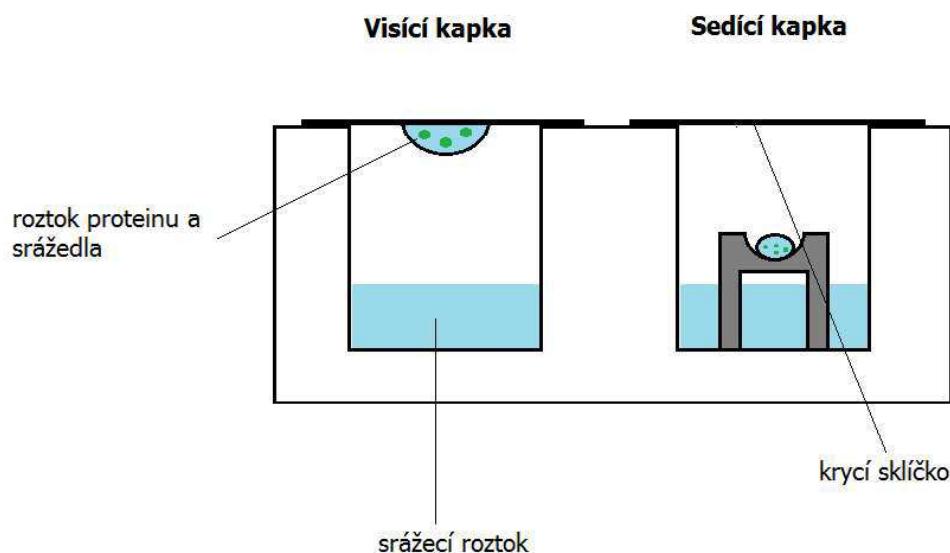
Metodu visící kapky pro krystalizaci BSA využili např. I. R. Krauss et al. [14]. Při použití koncentrace $30 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ vyrostly po sedmi dnech malé, křehké krystalky. Jejich kvalitu se jim poté podařilo vylepšit změnou koncentrace proteinu a optimalizací srážedel, kde nejlepší výsledky obdrželi při použití následujícího roztoku:

BSA: $c = 20 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$
 22-24 % *w/v* MPEG 5K
 0,2 M MgCl_2
 0,1 M Tris-HCl, ($\text{pH} \in \{7, 8; 8, 0; 8, 2\}$)

Tai [12] ve své diplomové práci obdržel nejlépe reprodukovatelné výsledky za použití následujících roztoků a teploty $T = 20^\circ\text{C}$.

BSA: $c = 50 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$
 48-50 % SAS (nasycený roztok síranu amonného)
 25 mM octan sodný (CH_3COONa), ($\text{pH} \in (5, 2; 5, 3)$)
 10 mM fosgen (CoCl_2), nebo bez dalších aditiv

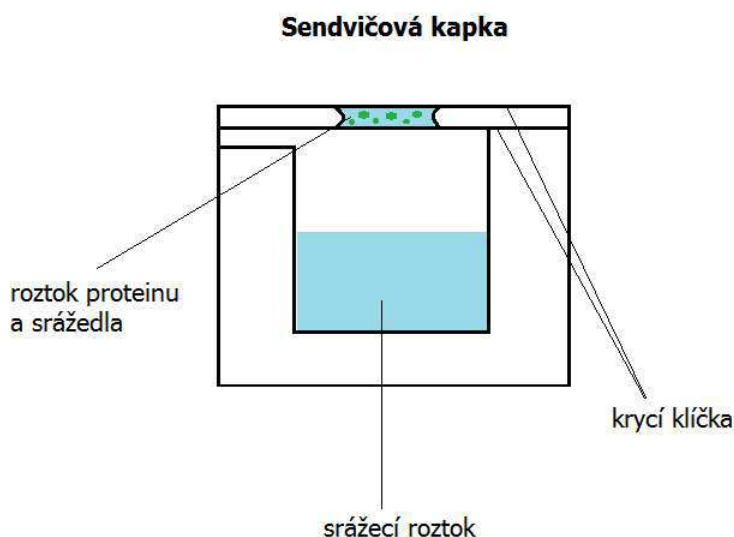
BSA: $c = 60 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$
 48-52 % SAS
 25 mM octan sodný (CH_3COONa), ($\text{pH} \in (5, 4; 5, 6)$)
 10 mM (fosgen CoCl_2), nebo bez dalších aditiv



Obrázek 1.3: Schématické znázornění krystalizačních metod visící a sedící kapky.

1.1.2 Metoda sendvičové kapky

Další metodou využívající difuze vody z kapky je metoda sendvičové kapky. Kapka je v tomto případě umístěna mezi dvě krycí sklíčka, viz Obrázek 1.4.



Obrázek 1.4: Schématické znázornění krystalizační metody sendvičové kapky.

1.1.3 Krystalizace pod olejem (Microbatch)

Tato metoda se zakládá na vstříknutí roztoku proteinu a srážecího roztoku pod vrstvu oleje, jež zabraňuje rychlé difuzi vody. Rychlost difuze a tím i rychlost krystalizace je poté možné jednoduše ovládat tloušťkou vrstvy či druhem použitého oleje.

I. R. Krauss et al. [14] ve své práci testoval, mimo již zmíněných metod sedící a visící kapky, i metodu krystalizace pod olejem. Avšak jejím použitím nebyly vytvořeny krystaly vyhovující požadavkům na difrakční analýzu o vysokém rozlišení.

1.1.4 Krystalizace v elektrickém poli

U krystalizace pod vlivem elektrického pole se rozlišují dvě hlavní kategorie metod. Do první kategorie spadají metody, ve kterých roztok není v kontaktu s elektrodami (external methods). Do druhé kategorie spadají naopak metody, ve kterých je roztok v přímém kontaktu s elektrodami (internal methods). [15]

Prvními, kdo použil ke krystalizaci elektrické pole, byli v roce 1976 Chin a spol. [16]. Jejich metodu nazývanou elektroporetická difuze (electrophoretic diffusion), použili na (do té doby velice obtížně krystalizovatelný) protein estradiol. Tato krystalizační metoda spadá do první kategorie, použité pole mělo intenzitu o velikosti $E \approx 20 - 40 \text{ V}\cdot\text{cm}^{-1}$ a růst vhodných krystalů trval 24-48 h.

H. Koizumi a spol. [17] použili pro krystalizaci střídavé elektrické pole o frekvenci $f = 1 \text{ MHz}$. Mezi dvě měděné elektrody vložili plastovou nádobku, která obsahovala roztok vaječného lysozymu o následujícím složení.

Lysozym: $c = 57 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$
100 mM octan sodný (CH_3COONa), (pH 4,3)
0,5 M chlorid sodný (NaCl)

Další metody patřící do první kategorie jsou např. metoda sedící a visící kapky. Na rozdíl od klasických variant těchto metod, je rezervoár s kapkou umístěn mezi elektrody. Tyto metody využili např. Taleb a spol. [18] ke krystalizaci vaječného lysozymu.

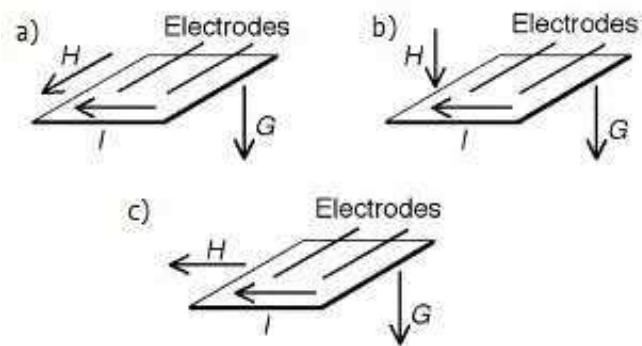
Průkopníky metod druhé kategorie, kde je roztok proteinu v přímém kontaktu s elektrodami, byli Mirkin a spol. [19]. Ke krystalizaci použili upravený Granada Crystallization Box, ke generaci elektrického pole použili stejnosměrný proud $I_{DC} = 1 \text{ }\mu\text{A}$ a elektrody byly vyhotoveny z platinového drátu. Růst krystalů vhodných k rentgenové krystalografii trval přibližně 24 hodin pro lysozym a 5 dní pro thaumatin a byly použity následující konfigurace roztoků.

Lysozym: $c = 100 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$
100 mM octan sodný (CH_3COONa), (pH 4,6)
20% (w/v) chlorid sodný (NaCl) ve vodě

Thaumatín: $c = 100 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$
100 mM fosforečnan sodný (Na_3PO_4), (pH 7,0)
25% (w/v) vinan sodno-draselný ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$) ve vodě

Sazaki a spol. [20] použili pro krystalizaci vaječného lysozymu kombinaci vnitřního elektrického pole (stejnosměrný proud $I_{DC} = 2 \text{ }\mu\text{A}$) a vnějšího magnetického pole o velikosti $B = 10 \text{ T}$. Na roztok o následujícím složení aplikovali tři různé konfigurace polí, viz Obrázek 1.5. Ve všech případech pokusy provedli pro zapnuté magnetické pole a vypnutý proud, zapnutý proud a vypnuté magnetické pole a také pro zároveň zapnutý proud a magnetické pole, přičemž nepozorovali rozdíl mezi výsledky se zapnutým proudem a vypnutým magnetickým polem a zapnutým proudem a magnetickým polem pro magnetické pole rovnoběžné se směrem procházejícího proudu, viz Obrázek 1.5-a).

Lysozym: koncentrace neuváděna
200 mM octan sodný (CH_3COONa), (pH 4,5)
40 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ chlorid sodný NaCl



Obrázek 1.5: Směry jednotlivých polí, kde G označuje gravitační pole, H magnetické pole a I proud v elektrodách.[20]

2. Mikrotubuly

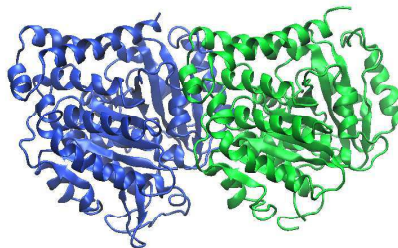
Mikrotubuly jsou velmi důležité biomolekuly vyskytující se v eukaryotních buňkách a také v některých bakteriích, kde mají nepřeberné množství funkcí. Jejich základní stavební jednotkou je heterodimerní protein tubulin spojující se v dlouhá vlákna (protofilamenta), která tvoří stěnu mikrotubulu.[21, 11, 22] ¹

2.1 Tubulin

Protein tubulin je heterodimer² tvořený dvěma globulárními proteiny nazývanými α -tubulin a β -tubulin (Obrázek 2.1), které jsou spolu pevně spojeny nekvalentními vazbami. Každý z monomerů, α i β , je tvořen dvěma β -skládanými listy obklopenými dvanácti α -šroubovicemi [23] a obsahuje vazebné místo s jednou molekulou GTP (guanodin-tri-fosfát). U α -tubulinu je tato molekula neměnná, tj. nemůže být hydrolyzována ani zaměněna za jinou. V případě β -tubulinu je situace odlišná, a sice molekula GTP může být hydrolyzována za vzniku GDP (guanodin-di-fosfát).

Uveďme nyní některé elektrické vlastnosti tubulinu. Izoelektrický bod ³ α - a β -tubulinu se pohybuje mezi hodnotami $pI=5,3$ a $pI=5,7$ [24]. Jak již bylo řečeno v předchozí kapitole, nejčastěji využívanou veličinou pro popis rozložení náboje v proteinech je dipólový moment $\mathbf{p} = q \cdot \mathbf{d}$.

Velikosti dipólového momentu obou monomerů i dimeru tubulinu určili pomocí počítačové simulace A. Mershin a spol. [25] a hodnoty jsou rovny $p_\alpha = 552$ D, $p_\beta = 1193$ D a $p_{dimer} = 1740$ D.

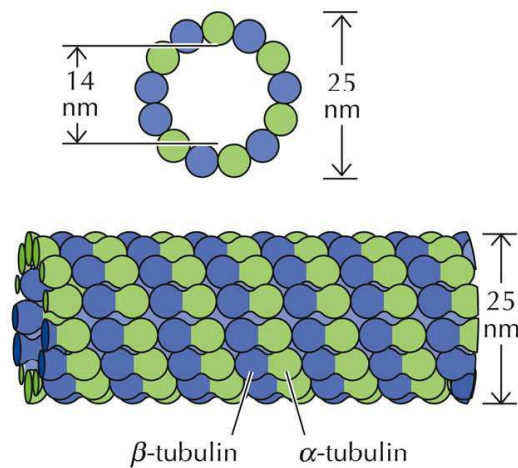


Obrázek 2.1: **Dimer tubulinu 1JFF**. Na obrázku je možné vidět mírně odlišnou strukturu α -tubulinu označeného zelenou barvou a β -tubulinu označeného barvou modrou. Oba monomery jsou tvořeny 450-ti aminokyselinami[26], které tvoří dvě základní struktury: dva β -skládané listy a dvanáct α -šroubovic. Obrázek byl vytvořen v programu Visual Molecular Dynamics [8] za použití dat [27] dostupných na [10] pod PDB ID: 1jff.

¹Informace v této kapitole jsou, pokud není uvedeno jinak, k nalezení v těchto zdrojích.

²Heterodimer je dimer, který se skládá ze dvou odlišných podjednotek.

³Je hodnota pH roztoku, při které se navenek neutrální látka nepohybuje v elektrickém poli.



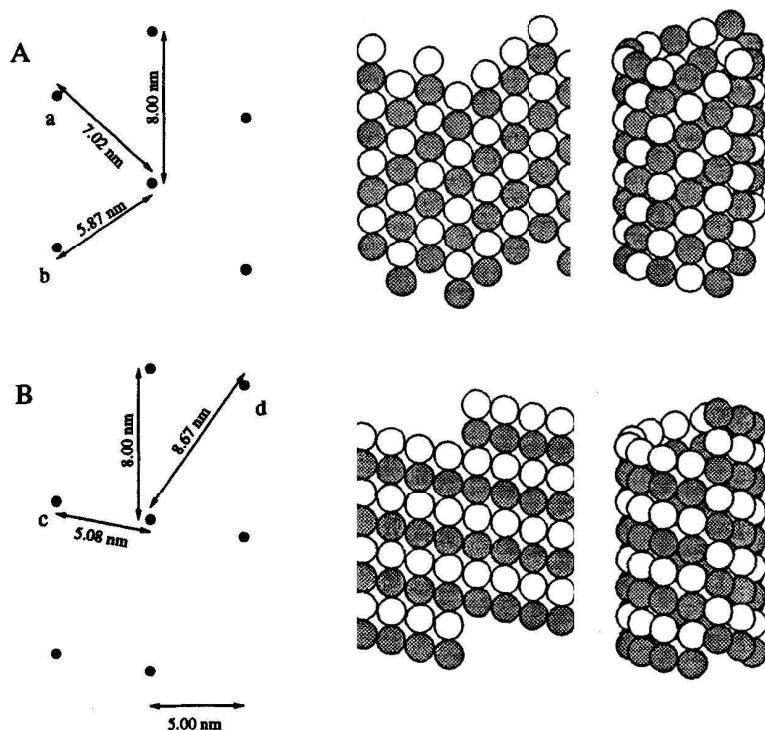
Obrázek 2.2: **Struktura mikrotubulu.** Počáteční kruh 13 tubulinových jednotek o vnějším poloměru 25 nm a vnitřním 14 nm (nahore) a boční pohled na mikrotubulus (dole). [30]

2.2 Mikrotubuly jsou tvořeny vlákny tubulinu

Mikrotubuly obvykle vznikají růstem z počátečního kruhu tvořeného tubulinovými jednotkami, neboli dimery α - a β -tubulinu, které se v živočišných buňkách obvykle pouze naváží na již existující kruh tvořený γ -tubulinem, neboli nukleační místo. Tyto kruhy tvořené γ -tubulinem jsou obsaženy v organizačním centru buňky, u živočišných buněk je jím centrosom. Počet jednotek tvořících mikrotubulus se může značně lišit a závisí na umístění mikrotubulu v buňce, na druhu buňky a také se může lišit u stejných buněk u různých živočišných druhů. Nejčastěji se vyskytují mikrotubuly, které vyrůstají z tubulinového kruhu obsahujícího 13 tubulinových jednotek, viz str. 24, 25 v [28]. Takovéto mikrotubuly mají vnější průměr okolo 25 nm a vnitřní okolo 14 nm [21]. Délky, kterých mikrotubuly dosahují, jsou mnohonásobně větší než jejich průměr. Například délka mikrotubulů v axonu se pohybuje mezi 6 a 27 μm [29].

Mikrotubuly tedy mají tvar dlouhých dutých válců, jejichž stěny jsou tvořeny vlákny tubulinu. Díky tomuto tvaru jsou poměrně málo ohebné a tuhé v porovnání s jinými vlákny buněčného cytoskeletu nazývanými aktinová a intermediální vlákna. Aktinová vlákna jsou šroubovitě polymery vznikající polymerací proteinu aktin. Díky jejich tvaru jsou velmi tenká (průměr okolo 7 nm, viz str. 514 v [22]) a také, oproti mikrotubulům, velice pružná. Intermediální vlákna mají z těchto tří typů vláken tvořících cytoskelet buňky největší pevnost v tahu, což je způsobeno jejich tvarem podobným lanu. Právě kvůli své pevnosti pomáhají buňkám vydržet mechanický stres, k němuž dochází při natažení buněk.

Poměrně dobrý náhled na elastické vlastnosti mikrotubulů, které jsou určeny např. hodnotami Youngova modulu pružnosti Y , modulu pružnosti ve smyku G a dalšími, dává teoretický model J.A. Tuszyńského [31], který mikrotubuly aproximuje soustavou kuliček spojených pružinami. Hodnoty těchto parametrů, jak naznačuje nedávná studie H. R. Saeidiho [32], která se zabývá vlivem elektrického pole na tubulinový dimer, se mohou měnit v závislosti na velikosti vnějšího elektrického pole, jež na mikrotubulus působí.



Obrázek 2.3: Dva typy mřížky mikrotubulů. V levé části obrázku můžeme vidět vzdálenosti mezi středy dimerů tubulinu (označené černými tečkami) umístěných v obou typech mikrotubulární mřížky (A-mřížka a B-mřížka). Vpravo od těchto schémat jsou poté vyobrazeny rozložené a také do mikrotubulu složené mřížky.[33]

2.3 Jsou rozlišovány dva typy mikrotubulárních mřížek

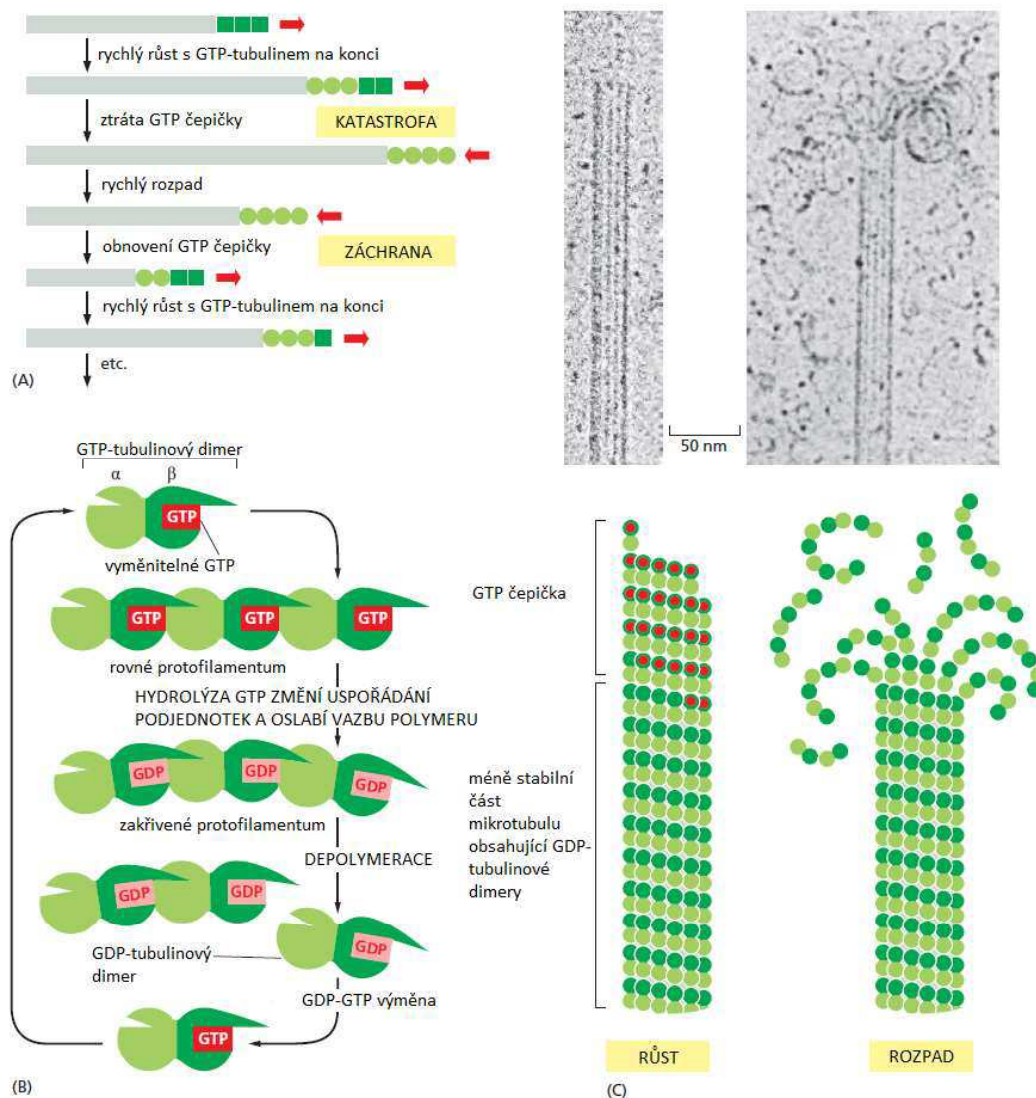
Tubulinové dimery se do protofilament vážou pouze jedním způsobem, a sice α -monomer k β -monomeru. Ovšem u podélné vazby mezi protofilamenty rozlišujeme dva druhy. Jednou z možností je vazba α - α , β - β . Mřížku (Obrázek 2.3) tvořenou takto svázanými protofilamenty označujeme jako B-mřížku. Druhou možností je vazba α - β , β - α , kterou označujeme jako A-mřížka.

U obou typů mřížek se vyskytuje podélný posun vzájemně sousedících protofilament. Hodnoty tohoto posunu se liší v závislosti na typu mřížky a jeho hodnoty jsou 4,92 nm pro B-mřížku a 0,92 nm pro A-mřížku. Na obrázku 2.3 jsou též uvedeny vzdálenosti středů nejbližších dimerů v obou typech mřížky.

2.4 Rozlišitelné konce mikrotubulů a dynamická nestabilita

Díky paralelní orientaci tubulinových dimerů mají mikrotubuly strukturní polaritu. Můžeme tedy rozlišovat jejich konce, kde konec, na kterém je vystaven α -tubulin, nazýváme mínus-konec a konec opačný, na kterém je vystaven β -tubulin, označujeme jako plus-konec.

Pokud mikrotubulus polymeruje z nukleačního místa, neboli γ -tubulinového kruhu uvnitř buňky, jeho plus-konec se prodlužuje směrem od organizačního centra příkládáním dalších jednotek tubulinu. Tento růst může trvat i několik minut, ale poté dojde k náhlé změně a mikrotubulus se začne zkracovat (Obrázek 2.4). V pokusech in vitro (vně buňky) polymerují mikrotubuly z obou konců, avšak na plus-konci dochází k rychlejšímu růstu a také rozpadu.



Obrázek 2.4: **Dynamická nestabilita mikrotubulu.** (A) Průběh polymerace a depolymerace mikrotubulů, jež je způsoben náhodnou hydrolýzou molekuly GTP před navázáním další podjednotky tubulinu. Tato hydrolýza způsobí ztrátu GTP-čepičky, což nazýváme též jako katastrofu, a následné znovuvytvoření GTP-čepičky nazýváme záchranou. (B) Schéma cyklu polymerace a depolymerace protofilament s naznačením strukturních změn, které vyústí v ohyb protofilament, jež má za následek vznik sil zapříčiňujících rozpad mikrotubulu. (C-vlevo) Červeně označené tubulinové dimery nesou navázanou molekulu GTP a vytváří tak tzv. GTP-čepičku. Takovýto mikrotubulus má tendenci pokračovat v polymeraci. (C-vpravo) Pokud je polymerace příliš pomalá, GTP navázané na tubulin hydrolyzuje dříve, než je na něj navázán další GTP-tubulin, a dochází tak ke ztrátě GTP-čepičky a následnému roztřepení konce mikrotubulu a jeho depolymeraci. (C-nahoře) Na tomto obrázku pořízeném na elektronovém mikrografu můžeme pozorovat obě fáze mikrotubulu. [11]

Toto chování, typické pro mikrotubuly, je nazýváno dynamickou nestabilitou. Původcem dynamické nestability mikrotubulů je schopnost tubulinových molekul hydrolyzovat GTP. Pokud je polymerace mikrotubulů rychlá, tubulinové dimery

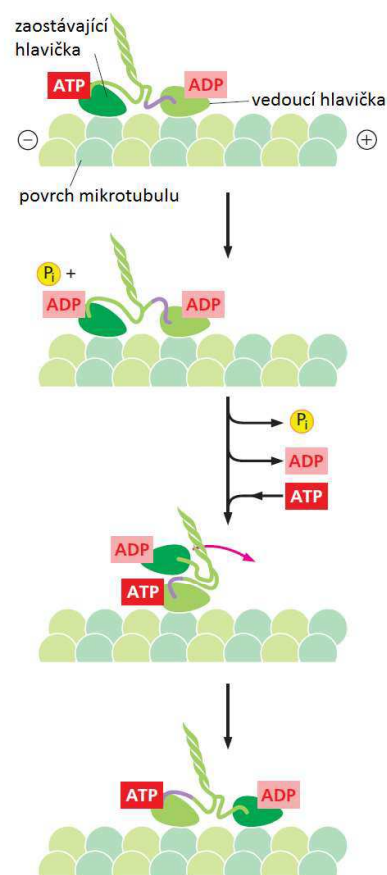
jsou přidávány na konec mnohem rychleji, než je GTP hydrolyzován. Takto vytvořený konec z výhradně GTP-tubulinových podjednotek je stabilní a nazýváme jej GTP-čepičkou. Jelikož jsou chemické jevy do jisté míry náhodné, tubulin na volném plus-konci příležitostně zhydrolyzuje navázanou molekulu GTP dříve, než se stihne navázat další podjednotka tubulinu. Tímto způsobem dochází k vytvoření konce z podjednotek GDP-tubulinu, což způsobí zakřivení jednotlivých protofilamentů a polymerace tak přechází v následnou depolymeraci mikrotubulu. Takto započatá depolymerace může pokračovat velkou rychlostí a může dojít až k úplnému zániku mikrotubulu. Uvolněné dimery tubulinu poté nahradí GDP za GTP a opět se zapojují do růstu nového mikrotubulu nebo se podílejí na záchraně již stávajícího.

2.5 Funkce

Mikrotubuly mají díky své dynamické nestabilitě, kterou jsou buňky schopny ovládat dle jejich potřeby, širokou škálu funkcí.

Zvýšená dynamická aktivita předchází jedné z nejdůležitějších funkcí mikrotubulů, a sice vytvoření mitotického vřeténka. Mitotické vřeténko je velmi důležité při dělení buňky a má za úkol spravedlivé rozdělení chromozomů mezi obě dceřiné buňky. Naopak pokud je buňka fixována v určitém stavu a pozici, dynamická nestabilita mikrotubulů je potlačena a ty mohou uspořádat orgány uvnitř buňky na jejich příslušné místo.

Mikrotubuly v živých buňkách nikdy nepracují samostatně. Jejich funkce závisí na velkém množství přídatných proteinů označovaných též jako MAPs (z angl. Microtubule-associated proteins). Z těchto MAPs zmiňme tzv. molekulové motory. Mezi molekulové motory asociované s mikrotubuly patří dvě skupiny. Do první skupiny se řadí kinesiny, jež se pohybují ve směru plus-konce mikrotubulu, a do druhé skupiny patří dyneiny, které se pohybují ve směru minus-konce. Proteiny z obou těchto skupin mají dvě globulární hlavičky, pomocí kterých interagují s povrchem mikrotubulů a opakovanou hydrolyzou molekul ATP (adenosin-tri-fosfát) přeměňují energii



Obrázek 2.5: **Pohyb kinesinu po povrchu mikrotubulu.** Kinesin-1 je motorický protein se dvěma globulárními hlavičkami, které slouží jako motorické domény. Na obrázku je znázorněn cyklus záměn ATP-ADP, které mají za následek "kráčivý" pohyb kinesinu podél povrchu mikrotubulu. [11]

na mechanický pohyb podél mikrotubulů (Obrázek 2.5).

Spojením dynamické nestability mikrotubulů a pohybu motorických proteinů podél mikrotubulů vznikají dopravní cesty, po kterých je přepravováno nepřeberné množství látek do různých částí buněk. Mimo látek důležitých pro život buňky jsou podél mikrotubulů za pomoci molekulových motorů přenášeny i orgány jako např. endoplazmatické retikulum či Golgiho aparát.

Další možné funkce mikrotubulů jsou stále předmětem zkoumání. V neuronech, kterým je věnována jedna z následujících sekcí, jsou mikrotubuly mimo výše zmíněných funkcí podezřelé z uchovávání a přenosu informace. Také z tohoto důvodu jsou právě mikrotubuly předmětem intenzivního výzkumu.

2.6 Elektrické vlastnosti tubulinu a mikrotubulů

Mikrotubuly jsou díky jejich stavbě nejen strukturně, ale i elektricky polární. Prvotní náznak toho, že mikrotubuly mají nenulový elektrický dipólový moment \mathbf{p} , poprvé objevili Vasilev a spol. [34], kteří za použití elektronové mikroskopie pozorovali natočení polymerujících se mikrotubulů pod vlivem elektrického ($25 \text{ mV}\cdot\text{cm}^{-1}$) i magnetického ($0,02 \text{ T}$) pole ve směru těchto polí. Později byl dipólový moment naměřen např. Ramalhem a spol. [35], kteří stejně jako Vasilev a spol. pozorovali natočení mikrotubulů pod vlivem elektrického pole. Z tohoto pozorování a měření úhlů natočení mikrotubulů vůči směru kolmém k elektrickému poli následně pomocí fitu dat Boltzmanovým rozdělením určili hodnotu velikosti průměrného dipólového momentu na $p = (22,661 \pm 0,036) \text{ D}$ pro mikrotubulus formován 13-ti protofilamenty o délce $\approx 5 \text{ }\mu\text{m}$.

Další hodnotou charakterizující elektrické vlastnosti mikrotubulů je jejich vodivost. Umnov a spol. určili horní hranici vodivosti mikrotubulů v řádu $90 \text{ }\Omega^{-1}\text{m}^{-1}$.

2.6.1 Mikrotubuly řadíme mezi feroelektrika

Povězme si nejprve něco o feroelektických látkách a jejich charakteristických vlastnostech [36].

Feroelektrickými látkami nazýváme dielektrické látky vykazující v jistém teplotním intervalu spontánní polarizaci P , jež je závislá na intenzitě vnějšího elektrického pole E . Pojem feroelektricitu ve své habilitační práci v roce 1912 poprvé použil Erwin Schrödinger. Ovšem tento jev spontánní polarizace byl experimentálně pozorován až Josephem Valaskem v roce 1920 u Seignettovy soli (v anglických textech spíše Rochelle salt)⁴.

Feroelektrickým chováním mikrotubulů se zabývá například J. Tuszyński. Společně se S. Hameroffem a spol. [37] vytvořili zjednodušený model mikrotubulární mřížky na základě 2D Isingova modelu. Na základě tohoto modelu poté provedli odhad Curieovy (kritické) teploty pro nekonečnou mřížku $T_c \simeq 402 \text{ K}$, přičemž pro konečně rozměrnou mřížku se tato teplota snižuje se snižující se velikostí mřížky.

Dále tento model rozšířili o popis feroelektrické signalizace [37]. Model popisuje představu, že energie uvolněná hydrolýzou GTP nebo dodaná vnějším polem

⁴Prvním, kdo tuto sůl připravil, byl lékárník a chemik Pierre Seignette, který pocházel z města La Rochelle. Odtud pramení názvy této soli, jejíž odborný český název je vian sodnodraselný.

je přenášena šířící se bariérou jinak natočených dipólových domén. Tato vlna nakonec předá svou energii molekule tubulinu, která je následně uvolněna.

V další své práci společně s J. Brownem [33] pomocí počítačové simulace vypočetli závislost polarizace P mikrotubulu na teplotě T pro několik typů mikrotubulární mřížky (13A, 13B, 12B a 14B)⁵.

V případě mřížky 13A se všechna protofilamenta v základním stavu polarizovala stejným směrem a kritická teplota je rovna $T_c \simeq 250$ K, naopak u mřížky 13B se sousední protofilamenta polarizovala navzájem opačně. Lichý počet protofilament měl ovšem za následek, že mikrotubulus byl v základním stavu maximálně polarizován. V tomto případě je kritická teplota přibližně rovna $T_c \simeq 300$ K. Mřížky se sudým počtem protofilament 12B a 14B vykazovaly tzv. antiferoelektrické chování, tj. při nízkých teplotách byl mikrotubulus kompletně depolarizován až do kritické teploty $T \simeq 550$ K.

Složitější kvantově-mechanické modely vytvořil např. E.E. Slyadnikov [38, 39, 40], jež pomocí nich určil např. kritickou teplotu pro nekonečně dlouhý mikrotubulus $T_c \simeq 317$ K, nebo také míru informace uložené v mřížce při dané teplotě.

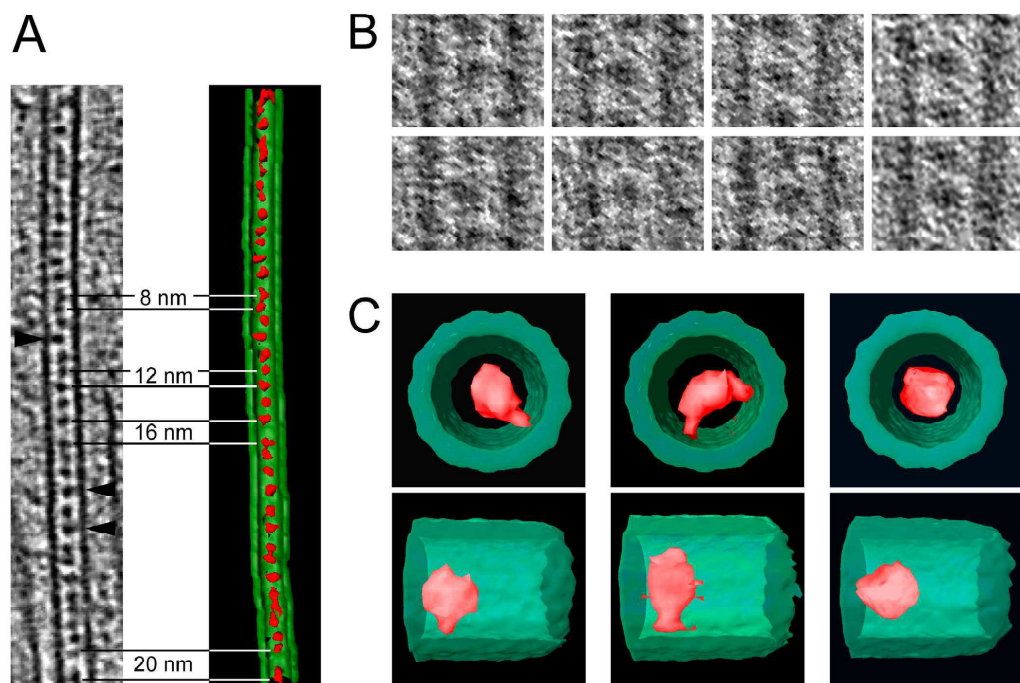
2.7 Speciální vlastnosti neuronových mikrotubulů

Neuronové mikrotubuly, mikrotubuly kmenových buněk a astrocyt na rozdíl od mikrotubulů v ostatních druzích buněk dle zjištění Garvalova a spol. [41] obsahují ve své dutině částičky o průměru $d = 7$ nm, které jsou od sebe vzdáleny od 8 nm do 20 nm. Větší množství těchto částiček, které měly mezi sebou menší rozestupy, bylo pozorováno na rozpadajícím se plus-konci mikrotubulu.

Podrobnější struktura těchto částiček nemohla být kvůli vysokému zašumění pořízených snímků určena. Navzdory tomu se autorům podařilo rozlišit tři typy částiček v závislosti na jejich interakci se stěnou mikrotubulu (Obrázek 2.6). Prvním typem je částička s pouze jednou stranou interagující s vnitřním povrchem mikrotubulu. Druhým pozorovaným typem je částička měsíčkovitého tvaru, jež se stěnou mikrotubulu interaguje na dvou místech. Tyto interagující výběžky mezi sebou svírají úhel $\approx 140^\circ$. Posledním typem částiček jsou takové, jež se stěnou mikrotubulu neinteragují vůbec⁶.

⁵Velké písmeno značí typ mřížky, viz Obrázek 2.3, a číslice před ním počet protofilament v mikrotubulu.

⁶Skutečný tvar všech typů částiček může být ještě trochu odlišný, neboť tomograf má v ose z slepé místo.



Obrázek 2.6: **Snímky z cryoelektronového tomografu.** A) Snímek mikrotubulu obsahujícího drobné částičky (vyznačeny šipkami), na kterém jsou označeny nejčastěji se vyskytující vzájemné vzdálenosti částiček. B) Přiblížený snímek mikrotubulu, na kterém jsou vidět tři typy částiček, které jsou počítačově vykresleny na obrázku C). [41]

3. Vodivost

Elektrická vodivost G je fyzikální veličinou popisující schopnost materiálu vést elektrický proud. Je definována vztahem (3.1), ze kterého je již patrná její jednotka Ω^{-1} nazývaná Siemens [S].

$$G = \frac{1}{R}, \quad (3.1)$$

kde R značí odpor látky.

Látky můžeme dle jejich vlastností rozdělovat do různých skupin. Podle schopnosti vést elektrický proud můžeme látky dělit na kovy (měrný odpor v rozmezí 10^{-6} až $10^{-4} \Omega \cdot \text{cm}$), polovodiče (10^{-4} až $10^{10} \Omega \cdot \text{cm}$) a izolanty (měrný odpor větší než $10^{10} \Omega \cdot \text{cm}$). [42] Další možností je rozlišovat látky dle nosičů náboje na látky s iontovou vodivostí a elektronovou vodivostí. Obecně se v látkách mohou vyskytovat oba typy vodivosti, kde obvykle jeden z nich převládá.

V následujících sekcích budou stručně popsány principy vedení proudu v kapalinách a polovodičích, jejichž kombinace se pravděpodobně vyskytuje v roztocích proteinů.

3.1 Vedení proudu v kapalinách

Pro roztoky se mnohem častěji než pojem vodivosti používá tzv. měrná vodivost σ [Sm^{-1}] definována vztahem 3.2.

$$\sigma = \frac{Gl}{A}, \quad (3.2)$$

kde A je plocha elektrod (plocha průřezu vzorku) a l jejich vzdálenost (délka vzorku).

Roztoky kyselin, zásad a solí, které vedou elektrický proud, se nazývají elektrolyty. Vodivost elektrolytů je způsobena volnými anionty (-) a kationty (+), mluvíme tedy u nich o iontové vodivosti¹.

Volné ionty vzniklé elektrolytickou disociací (ionizací) se v elektrickém poli pohybují směrem k opačně nabitým elektrodám, kde odevzdávají přebytečný náboj a stávají se elektricky neutrálními.

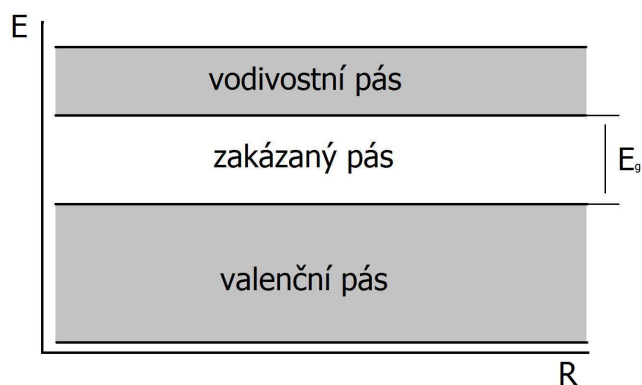
Elektrická vodivost roztoků závisí především na koncentraci látky v roztoku, množství iontů, mobilitě iontů a teplotě roztoku.

3.2 Vedení proudu v pevných látkách

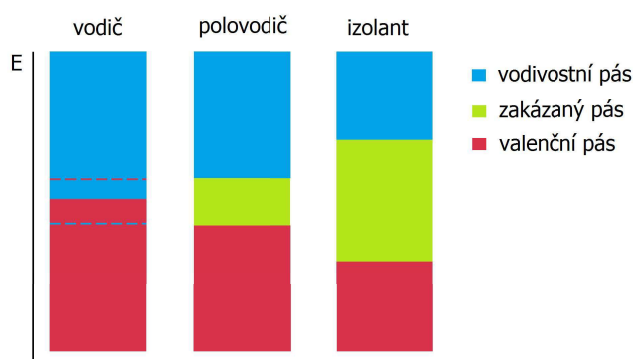
V pevných látkách je vedení proudu realizováno valenčními elektrony v tzv. vodivostních pásích. Mimo vodivostního pásu existují ještě povolené pásy (valenční) a pás zakázaný, který odděluje povolené pásy od vodivostního, viz Obrázek 3.1.

Energetické pásy pevné látky jsou obdobou energetických hladin atomu. V pevných látkách totiž dochází, důsledkem interakce mezi atomy, k rozštěpení energetických hladin, které tak tvoří velmi husté téměř spojitě energetické pásy.

¹V některých čistých látkách v kapalném skupenství (především kovy) je realizována především vodivost elektronová.



Obrázek 3.1: Schéma uspořádání energetických pásů v pevné látce, kde E je energie elektronu, R jeho poloha a E_g šířka zakázaného pásu, která je různá pro různé látky.



Obrázek 3.2: Schéma uspořádání energetických pásů ve vodiči, polovodiči a izolantu, kde přerušované čáry u schématu vodiče značí překrytí energetických pásů.

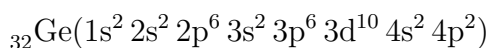
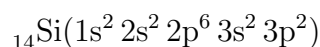
Pomocí šířky zakázaného pásu rozlišujeme vodiče (kovy), polovodiče a izolanty, viz Obrázek 3.2.

U vodičů existují dvě možnosti, první je, že se jejich vodivostní a valenční pás překrývají, a tudíž zakázaný pás nemají. Druhou možností je, že mají vodivostní pás zaplněn jen z části a zakázaný pás má šířku $E_g < 3$ eV. Díky takto úzkému zakázanému pásu stačí dodat velmi malou energii např. slabým elektrickým polem, aby elektrony přešly z valenčního pásu do pásu vodivostního.

3.2.1 Polovodiče

Polovodiče mají oddělený valenční pás od neobsazeného vodivostního pásu zakázaným pásem o šířce $E_g > 3$ eV.

Mechanismus vodivosti polovodičů je nejlepší vysvětlit na názorném příkladu typických polovodičů jako jsou křemík Si a germanium Ge. Elektronová konfigurace těchto atomů je následující:



V pevném skupenství se elektrony 3s a 3p stavů atomu křemíku (4s a 4p atomu germania) zúčastní kovalentní vazby. Celý krystal tvořený jedním druhem atomů je neutrální a v elektrickém poli za normálních okolností proud nevede. Pokud ale dojde k uvolnění elektronu z kovalentní vazby (přejde-li elektron z valenčního pásu do vodivostního, např. vlivem teploty), vzniká po něm tzv. díra, která se chová jako kladně nabitá částice. Tato díra může být zaplněna valenčním elektronem ze

sousední nasycené vazby. Následkem těchto výměn elektronů mezi atomy dochází k přesunu díry jakožto nosiče kladného náboje a záporně nabitého elektronu.[42]

3.2.2 Odtrhávací metoda

Jak již bylo řečeno v úvodu této práce, naším dlouhodobým cílem je měření vodivosti mikrotubulů odtrhávací metodou.

Tato metoda spočívá v uchycení jednoho konce měřené molekuly s vlastním dipólovým momentem k hrotové elektrodě a druhého k elektrodě ploché. Po přichycení molekuly oběma konci k elektrodám následuje pomalé oddalování těchto elektrod až do okamžiku, kdy se molekula od elektrod odtrhne. Při odtržení molekuly jsou elektrody rozpojeny a dochází tak k nárůstu odporu, a tudíž k poklesu vodivosti. Z velikosti tohoto rozdílu je následně možné vypočíst hodnotu vodivosti daného objektu.

K uskutečnění měření touto metodou jsou důležité především dvě věci. První z nich je dostatečně jemný posun elektrod, druhou z nich je velmi malá aktivní plocha hrotové elektrody. Tu lze, za předpokladu, že odpor klesá nepřímo úměrně s plochou elektrody S , odhadnout následujícím vztahem (3.3).

$$S_2 = S_1 \frac{R_1}{R_2} \quad (3.3)$$

4. Popis měřicí aparatury

V této kapitole bude čtenář seznámen s použitými přístroji, jejich zapojením a důležitými parametry.

Měřicí aparatura se skládá z několika částí: přibližně 1 cm tlusté železné desky, pryžových vaků s vodou, posuvného systému s možností upevnění elektrody a měřicí elektroniky.

Železná deska je umístěna na dvojici pryžových vaků s vodou, jež slouží k tlumení nežádoucích vibrací, na desce jsou umístěny jednotlivé komponenty: plastová kyveta se zlatou elektrodou (podrobnosti viz subsekcce *Elektrody*), systém zajišťující jemný posun (držák DCM 205 Series Precision Positioner od firmy Cascade Microtech) pomocí dvojice mikrometrických šroubů a také piezo (AE0203D08F od firmy Thorlabs), jehož implementace nebyla prozatím zcela dokončena.

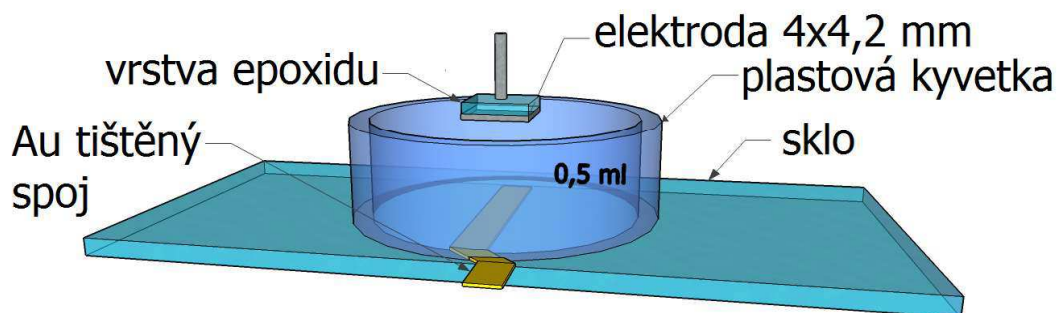
Piezo, horní a spodní elektroda jsou dále připojeny na přístroj Agilent E4980S Precision LHC Meter, jež byl použit k veškerým měřením uvedených v této práci.¹

4.1 Elektrody

Pro měření kapacity C_p , odporu R_p , impedance Z , fázového posunu Θ a stejnosměrného proudu I_{DC} roztoků byly použity následující dvě konfigurace měřicí aparatury.

Základ je v obou případech stejný. Jedná se o plastovou kyvetu vyrobenou z 15 ml zkumavky, jež je přilepena pomocí epoxidového lepidla ke sklíčku. Uvnitř této kyvety je zlatá elektroda vyrobená ze zlatého tištěného spoje, která je vyvedena pod jednou ze stěn kyvety ven.

První z elektrod (Obrázek 4.1) je plochá postříbřená fosfor-bronzová elektroda o rozměrech $(4,0 \pm 0,5) \times (4,2 \pm 0,5)$ mm, jež je připevněna k výškově nastavitelné hlavici pomocí cínového drátu. Celá elektroda je z vrchní strany odizolována vrstvou epoxidu, který je nanesen i na upevňovací drát.

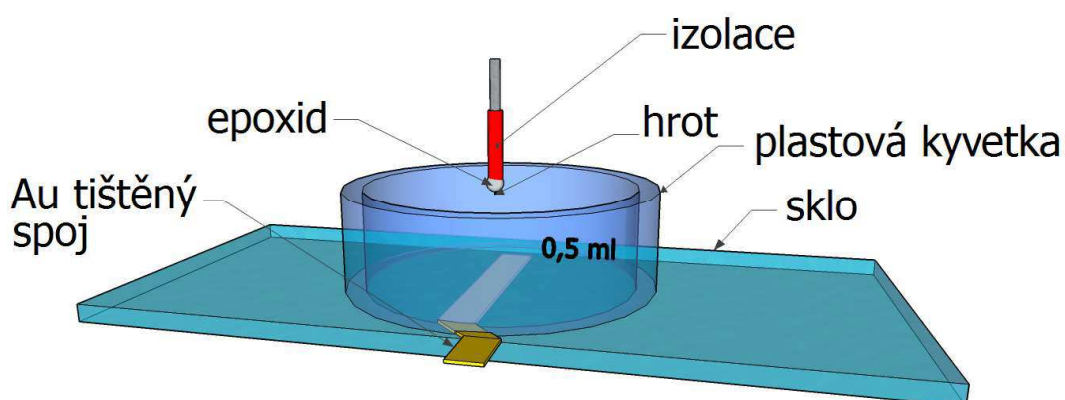


Obrázek 4.1: Schéma měřicí aparatury při použití ploché elektrody o ploše $(4,0 \pm 0,5) \times (4,2 \pm 0,5)$ mm.[44]

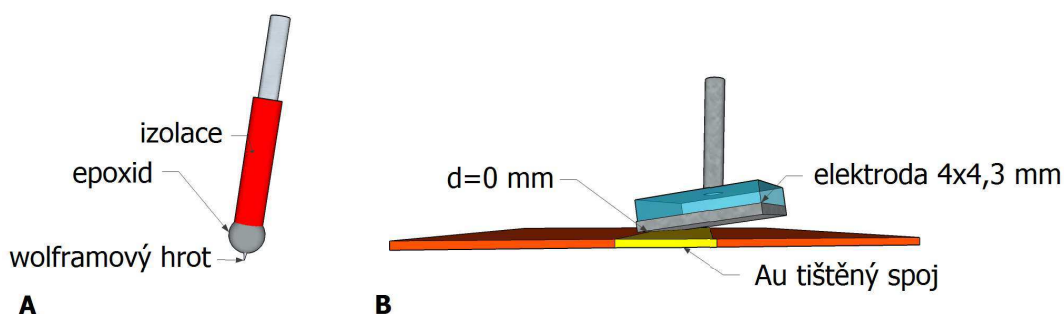
¹Pro podrobnější popis aparatury a jejího vývoje může čtenář nahlédnout do práce K. Koutové [43]

Měření s touto elektrodou v sobě skrývají mnoho nepřesností. Hlavní z nich je určení výšky $d = 0$ mm, ve které se elektrody vzájemně dotýkají. Tuto výšku nazýváme bodem dotyku a je určována jako výška, ve které je pozorována prudká změna měřených veličin (dochází ke zkratu). Bod dotyku určený takovýmto způsobem by bylo v ideálním případě možné určit až s přesností jednoho dílku mikrometrického šroubu, tj. $\sigma_d = 0,0222$ mm. Problém tkví především v různoběžnosti elektrod, viz Obrázek 4.3.

Druhou z elektrod (Obrázek 4.2) je wolframový hrot, jež je téměř po celé své délce izolovaný izolací ze silového kabelu. Na konci této izolace byla vytvořena epoxidová kulička, ze které pouze nepatrně vyčnívá hrot (Obrázek 4.3). Tímto způsobem byly co nejvíce eliminovány nežádoucí jevy, jako je vedení proudu mimo špičku hrotu.



Obrázek 4.2: Schéma měřicí aparatury při použití hrotu.[44]



Obrázek 4.3: Na obrázku A) je možné vidět detail hrotu. B) Znárodnění neplanarity elektrod.[44]

5. Experimentální postupy a analýza dat

V této kapitole budou popsány postupy jednotlivých měření, zpracování dat a budou zde též diskutovány výsledky měření a případné komplikace.

5.1 Měření vlastností BSA pomocí ploché elektrody

Jak již bylo zmíněno v kapitole *Hovězí sérový albumin*, následující měření slouží především k prvotnímu popisu chování aparatury a výsledky budou použity například k výpočtu aktivní plochy hrotu.

Pro měření s roztokem BSA byla použita koncentrační řada $c = (0; 0,1; 0,5; 1; 2; 5; 10) \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, jež byla získána rozpuštěním 100 mg BSA v 10 mL Millipore-Q watter (zkr. Q-voda). Z roztoku byla následně odebrána různá množství, jež poté byla naředěna Q-vodou na požadovanou koncentraci.

Vzorky byly do kyvety napipetovány pomocí 0,5 mililitrové injekční stříkačky, jež byla vždy několikrát pročištěna čistou Q-vodou.

Měření byla prováděna v rozmezích teplot $T \in (23; 26) \text{ }^\circ\text{C}$, jež byla určována pomocí bezkontaktního teploměru (Geratherm non Contact).

5.1.1 Závislost C_p , R_p , Z a Θ na koncentraci BSA

Měření kapacity C_p , odporu R_p , impedance Z a fázového posuvu Θ v konstantní vzdálenosti $d = (7,5 \pm 0,2) \text{ cm}$, jež byla určena pomocí posuvného měřítka, bylo provedeno za použití střídavého napětí o dvou amplitudách $U_1 = 10 \text{ mV}$ a $U_2 = 1 \text{ V}$ a třech různých frekvencích $f_1 = 20 \text{ Hz}$, $f_2 = 1 \text{ kHz}$ a $f_3 = 1 \text{ MHz}$.

Závislosti kapacity, odporu, impedance a fázového posuvu na koncentraci jsou vyobrazeny na grafech Obrázek 5.1 - Obrázek 5.6.

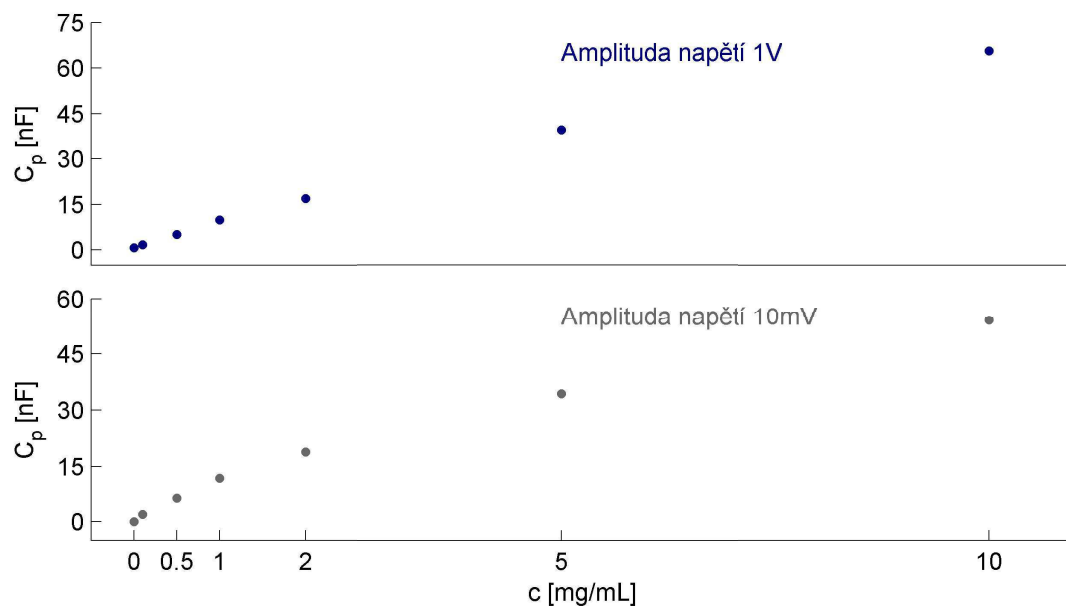
Z naměřeného odporu byla poté dle vzorce (5.1) vypočítána měrná vodivost, jejíž závislost na koncentraci je znázorněna v grafech Obrázek 5.7 - Obrázek 5.9.

$$\sigma = \frac{d}{S \cdot R_p}, \quad (5.1)$$

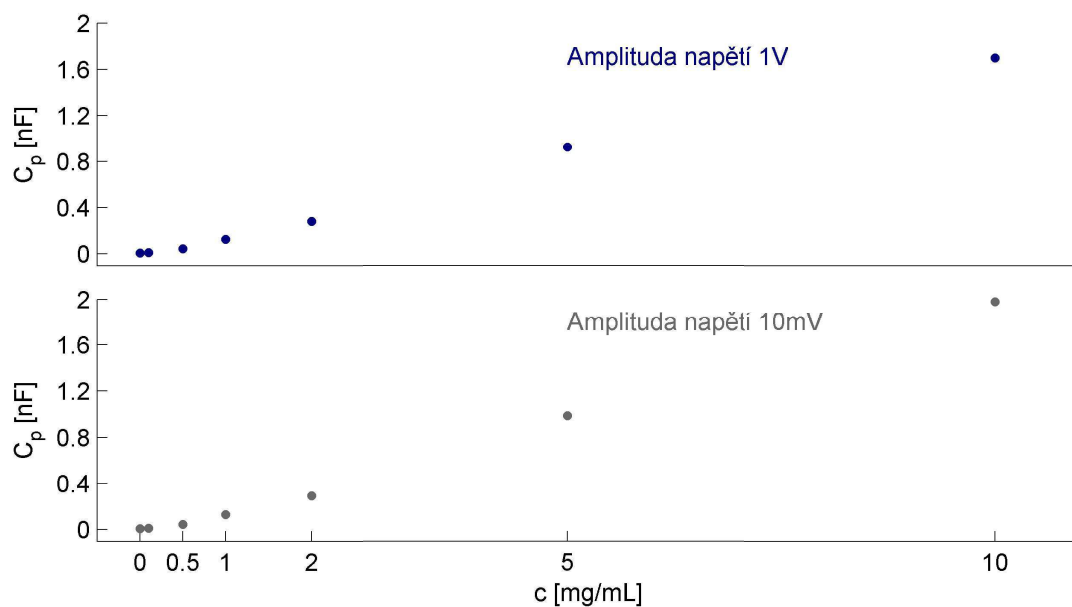
kde $S = (1,7 \pm 0,3) \cdot 10^{-5} \text{ m}^2$ je plocha vrchní elektrody, d vzdálenost mezi elektrodami a R_p měřený odpor.

Koncentrační závislosti jednotlivých veličin měly očekávaný průběh a současně se shodovaly s předchozími měřeními, viz práce K. Kohoutové[43].

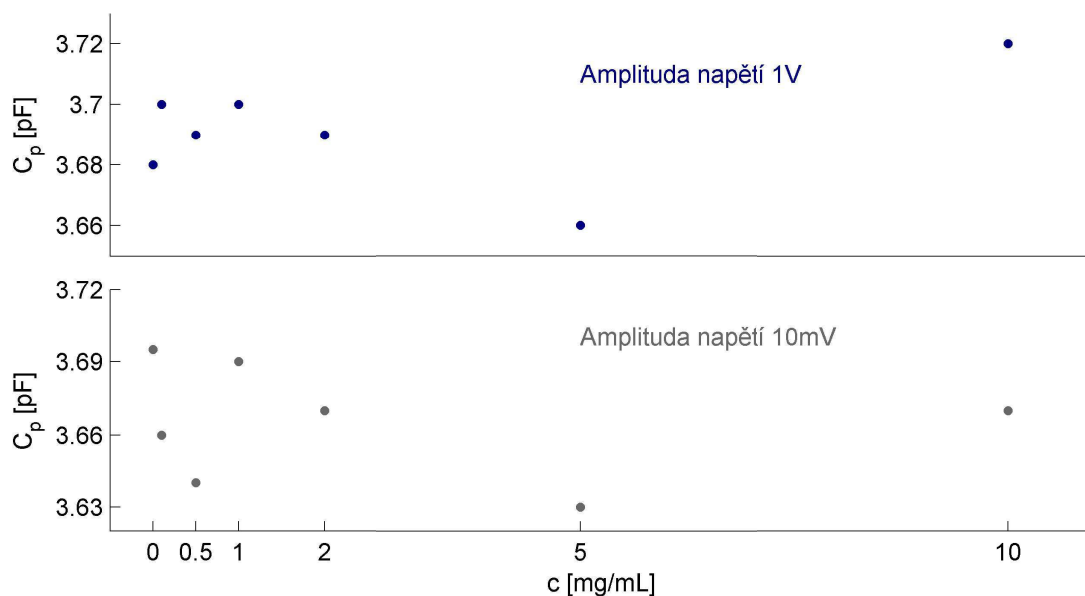
Fluktuace v závislostech kapacity C_p na koncentraci c měřených při frekvenci napětí $f_3 = 1 \text{ MHz}$ jsou pravděpodobně způsobeny pouze přesností měření.



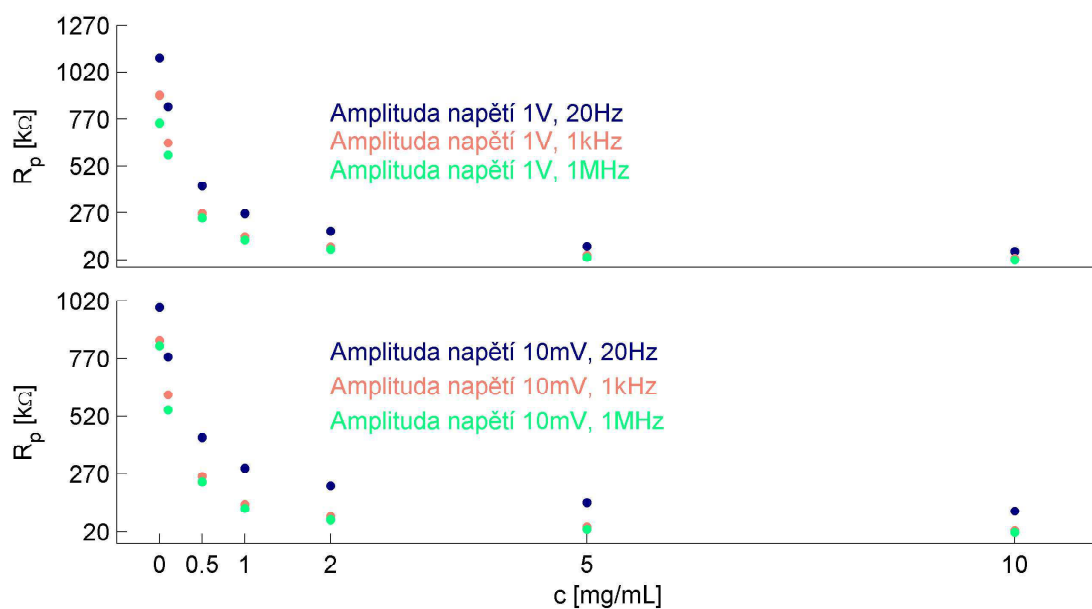
Obrázek 5.1: Závislost kapacity C_p kondenzátoru obsahující roztok BSA na koncentraci při amplitudě střídavého napětí $U_1 = 1$ V a $U_2 = 10$ mV a frekvenci $f_1 = 20$ Hz.



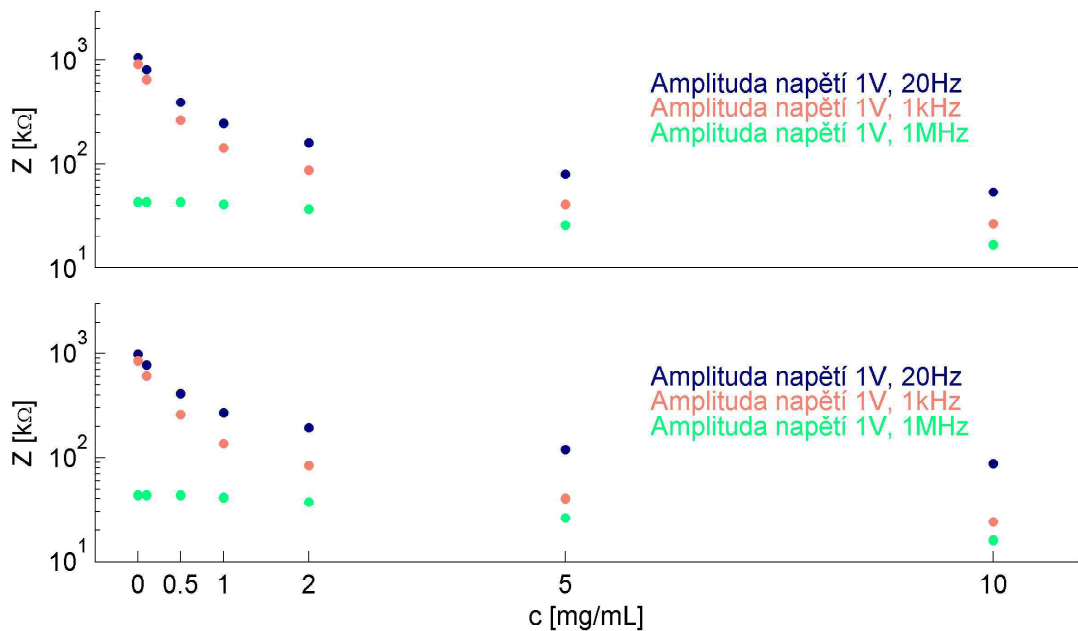
Obrázek 5.2: Závislost kapacity C_p kondenzátoru obsahující roztok BSA na koncentraci při amplitudě střídavého napětí $U_1 = 1$ V a $U_2 = 10$ mV a frekvenci $f_2 = 1$ kHz.



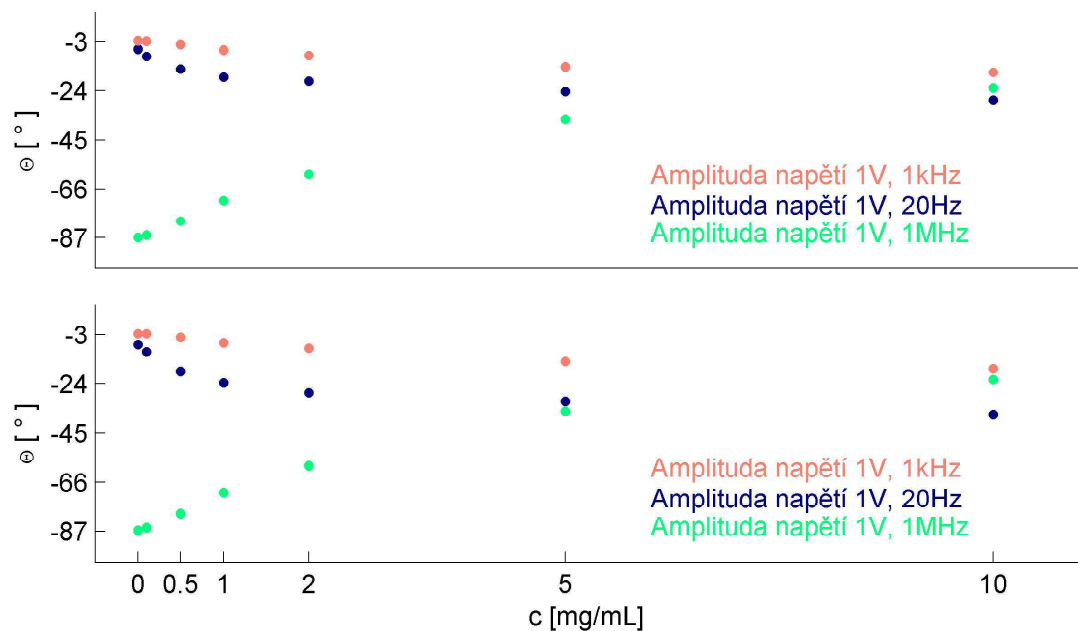
Obrázek 5.3: Závislost kapacity C_p kondenzátoru obsahující roztok BSA na koncentraci při amplitudě střídavého napětí $U_1 = 1$ V a $U_2 = 10$ mV a frekvenci $f_3 = 1$ MHz.



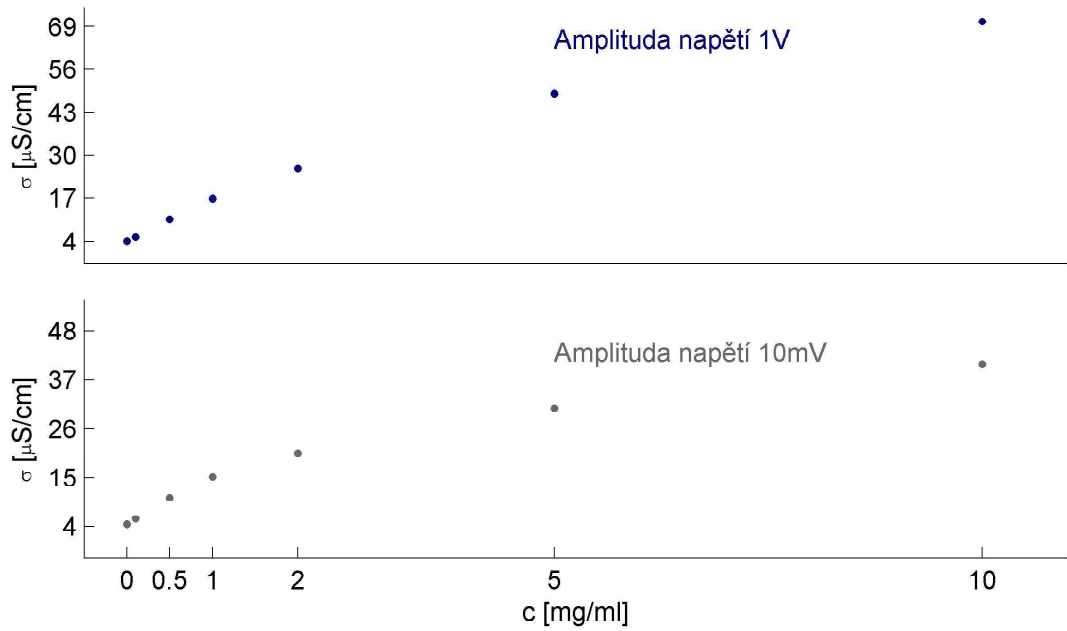
Obrázek 5.4: Závislost odporu R_p roztoku BSA na koncentraci při amplitudě střídavého napětí $U_1 = 1$ V a $U_2 = 10$ mV a frekvencích $f_1 = 20$ Hz, $f_2 = 1$ kHz a $f_3 = 1$ MHz.



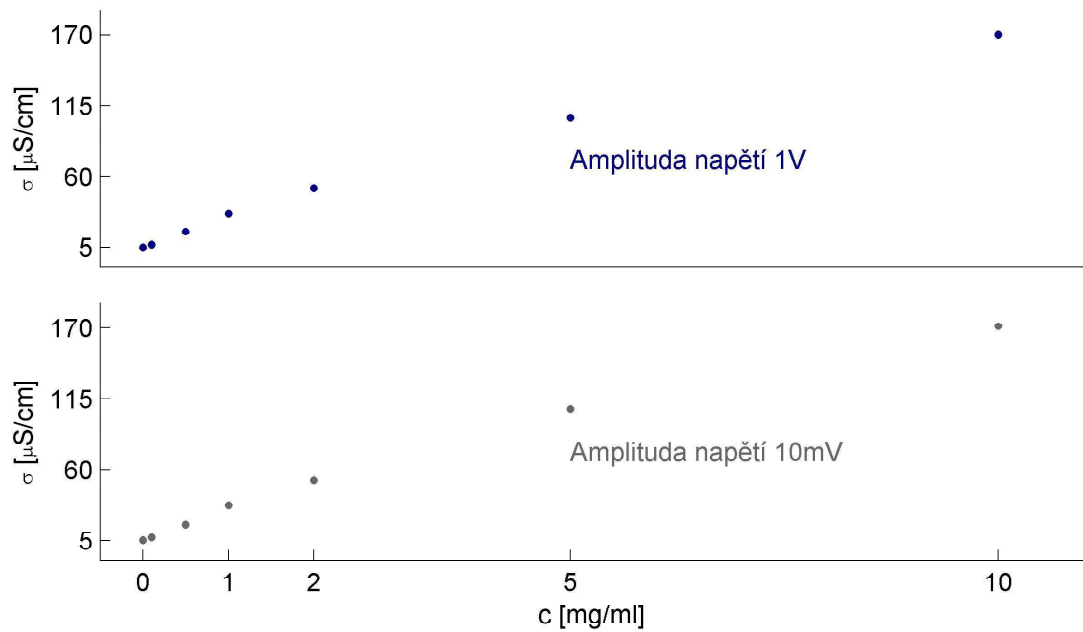
Obrázek 5.5: Závislost impedance Z roztoku BSA na koncentraci při amplitudě střídavého napětí $U_1 = 1$ V a $U_2 = 10$ mV a frekvencích $f_1 = 20$ Hz, $f_2 = 1$ kHz a $f_3 = 1$ MHz.



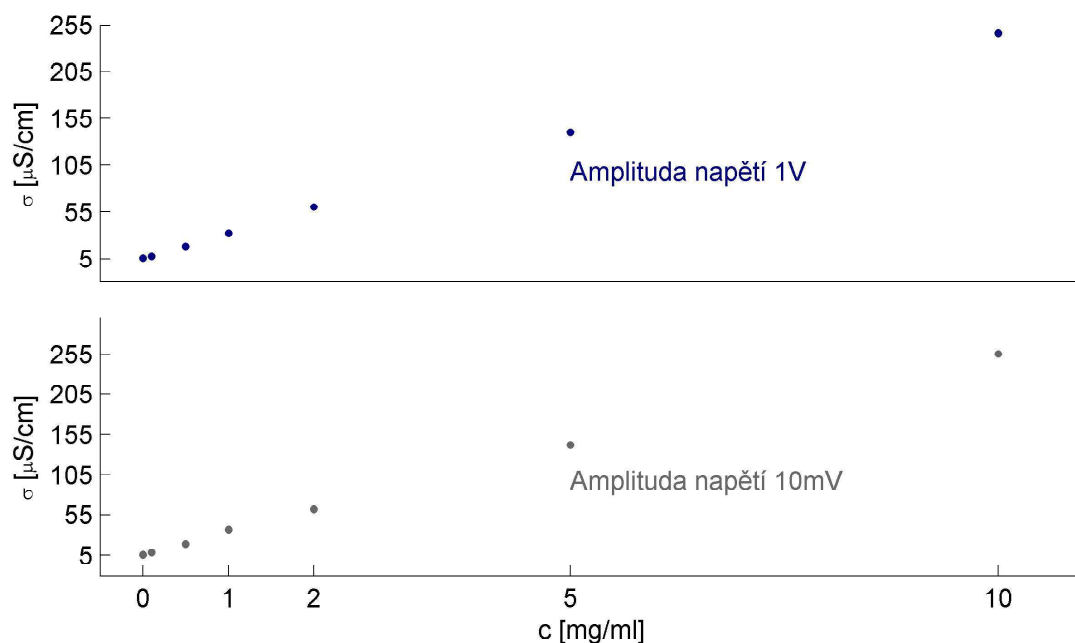
Obrázek 5.6: Závislost fázového posuvu Θ roztoku BSA na koncentraci při amplitudě střídavého napětí $U_1 = 1$ V a $U_2 = 10$ mV a frekvencích $f_1 = 20$ Hz, $f_2 = 1$ kHz a $f_3 = 1$ MHz.



Obrázek 5.7: Závislost vodivosti σ roztoku BSA na koncentraci při amplitudě střídavého napětí $U_1 = 1$ V a $U_2 = 10$ mV a frekvenci $f_1 = 20$ Hz.



Obrázek 5.8: Závislost vodivosti σ roztoku BSA na koncentraci při amplitudě střídavého napětí $U_1 = 1$ V a $U_2 = 10$ mV a frekvenci $f_2 = 1$ kHz.



Obrázek 5.9: Závislost vodivosti σ roztoku BSA na koncentraci při amplitudě střídavého napětí $U_1 = 1 \text{ V}$ a $U_2 = 10 \text{ mV}$ a frekvenci $f_3 = 1 \text{ MHz}$.

5.1.2 Závislost C_p a R_p na vzdálenosti elektrod

Měření vzdálenostní závislosti kapacity C_p a odporu R_p pro čistou Q-vodu bylo provedeno pro amplitudu napětí $U = 1 \text{ V}$ a dvě frekvence $f_1 = 20 \text{ Hz}$ a $f_2 = 1 \text{ MHz}$.

Závislosti veličin C_p a R_p byly měřeny od bodu dotyku elektrod a jejich vzdálenost byla dále zvětšována. Hodnoty příslušných veličin byly zaznamenávány zhruba po 3 vteřinovém čekání po zvětšení vzdálenosti elektrod.

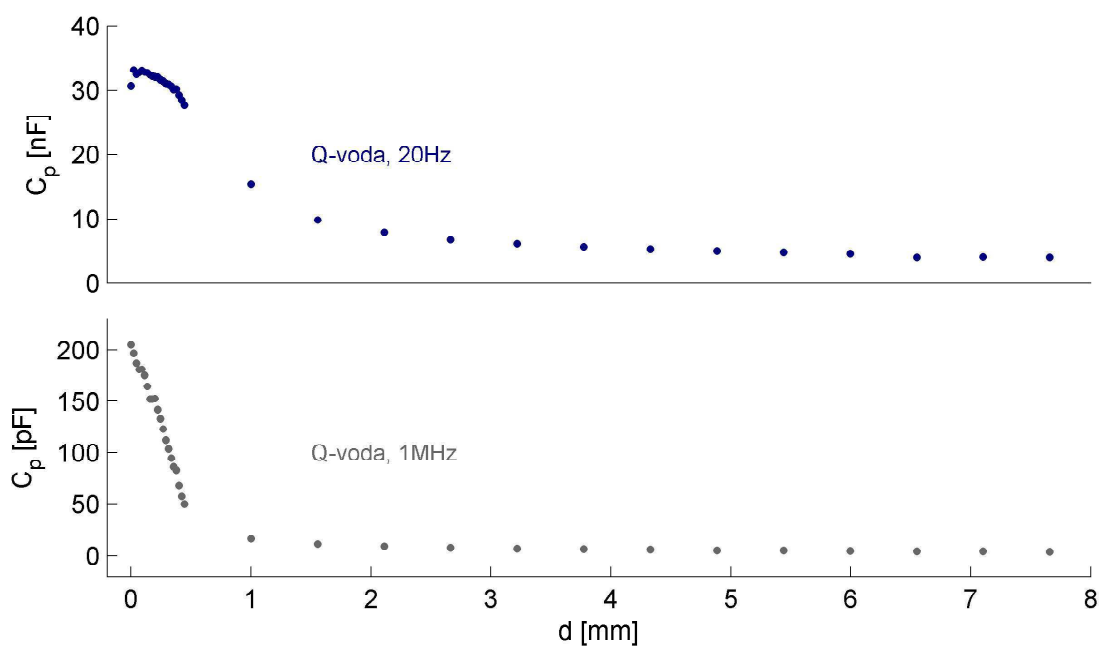
Bod dotyku byl, v tomto i v dalších měřeních, určován jako nastavení mikrometrického šroubu, při němž byl znatelně (i o několik řádů) snížen odpor (respektive zvýšen procházející proud). Tímto způsobem zjištěný bod dotyku není určen zcela přesně a to hned ze dvou důvodů. Zaprvé povrch elektrod není dokonale rovný a zadruhé elektrody k sobě nejsou zcela rovnoběžné, viz kapitola *Popis měřicích aparatur*. Z tohoto důvodu je do měření zavedena systematická chyba, kterou není jednoduché určit.

Za projev těchto nedokonalostí byly z počátku považovány i neočekávané tvary závislostí měřených veličin v regionu $d \in (0; 1) \text{ mm}$, viz Obrázek 5.10 a Obrázek 5.13. Později se ovšem ukázalo, že tyto zvláštní průběhy měřených závislostí jsou pravděpodobně způsobeny zasunutím již neodizolované části vodiče, na němž je upevněna horní elektroda, do roztoku. Při použití objemu roztoku $V = 500 \mu\text{L}$ sahá jeho hladina přibližně do výšky 8 mm, zatímco izolace vodiče končí ve výšce 7 mm¹. Z toho je patrné, že je-li horní elektroda právě ve vzdálenosti $d \approx 1 \text{ mm}$ od spodní elektrody, začne se do roztoku ponořovat již neodizolovaná část vodiče.

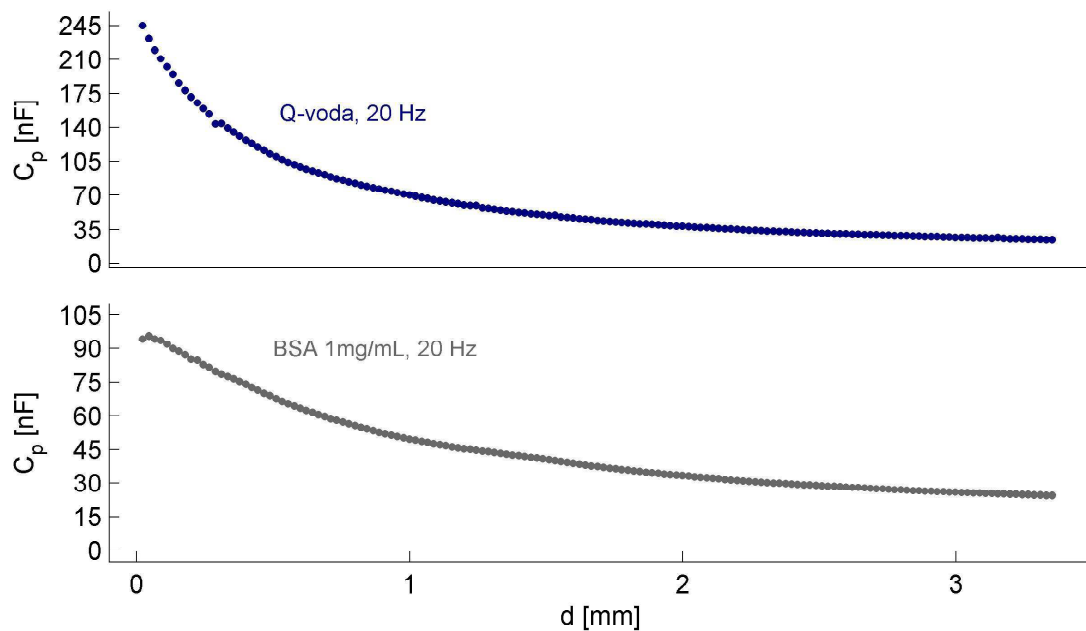
¹Měřeno od povrchu elektrody.

Závislosti kapacity C_p a odporu R_p byly proto opětovně změřeny za použití menšího objemu roztoku $V = 250 \mu\text{L}$. Při tomto objemu vzorku hladina není dostatečně vysoko, aby se neodizolovaná část vodiče ponořila do roztoku i při dotyku elektrod.

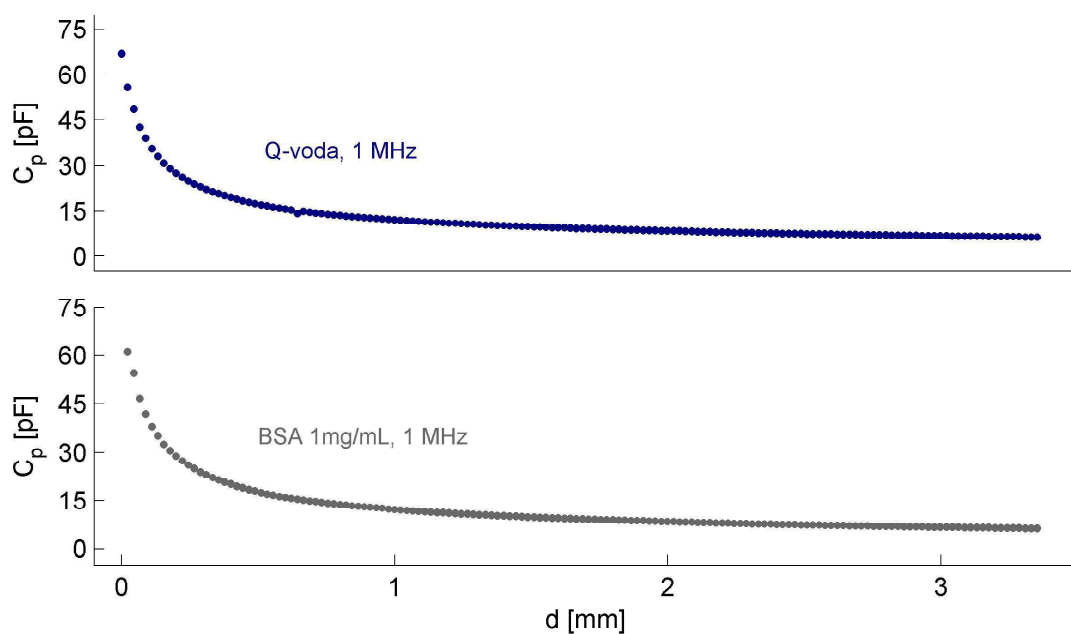
Výsledky tohoto měření, viz Obrázek 5.11, Obrázek 5.12, Obrázek 5.14 a Obrázek 5.15, podporují výše zmíněnou teorii o příčině zvláštních tvarů měřených závislostí.



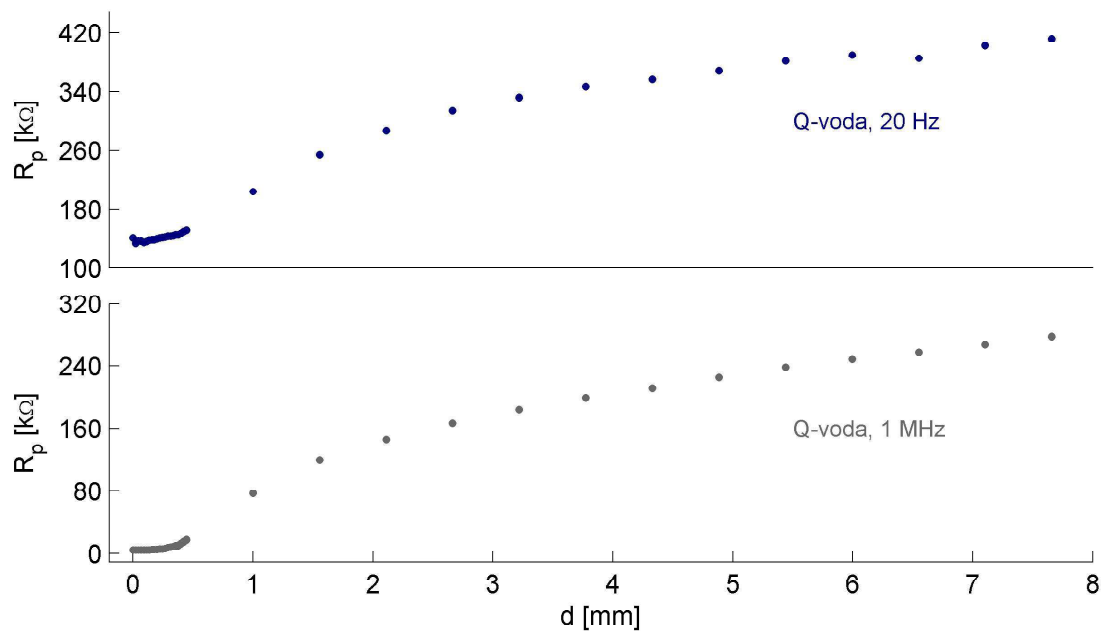
Obrázek 5.10: Závislost kapacity C_p kondenzátoru obsahujícího Q-vodu na vzdálenosti d elektrod při amplitudě střídavého napětí $U = 1 \text{ V}$ a frekvencích $f_1 = 20 \text{ Hz}$ a $f_2 = 1 \text{ MHz}$ pro objem vzorku $V = 500 \mu\text{L}$.



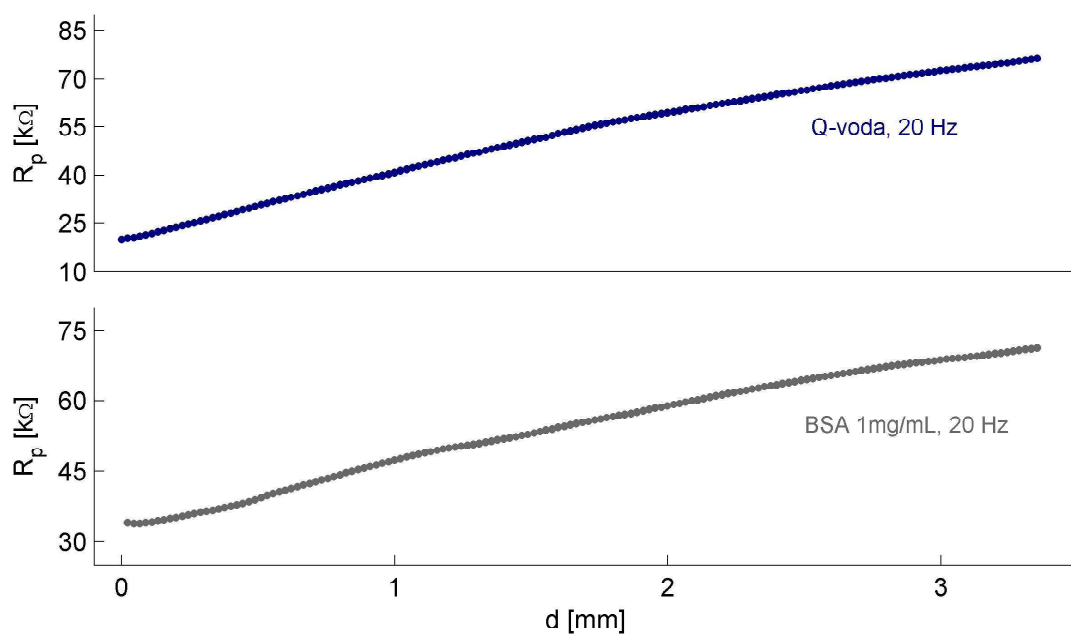
Obrázek 5.11: Závislost kapacity C_p kondenzátoru obsahujícího Q-vodu a BSA na vzdálenosti d elektrod při amplitudě střídavého napětí $U = 1$ V a frekvenci $f_1 = 20$ Hz pro objem vzorku $V = 250$ μ L.



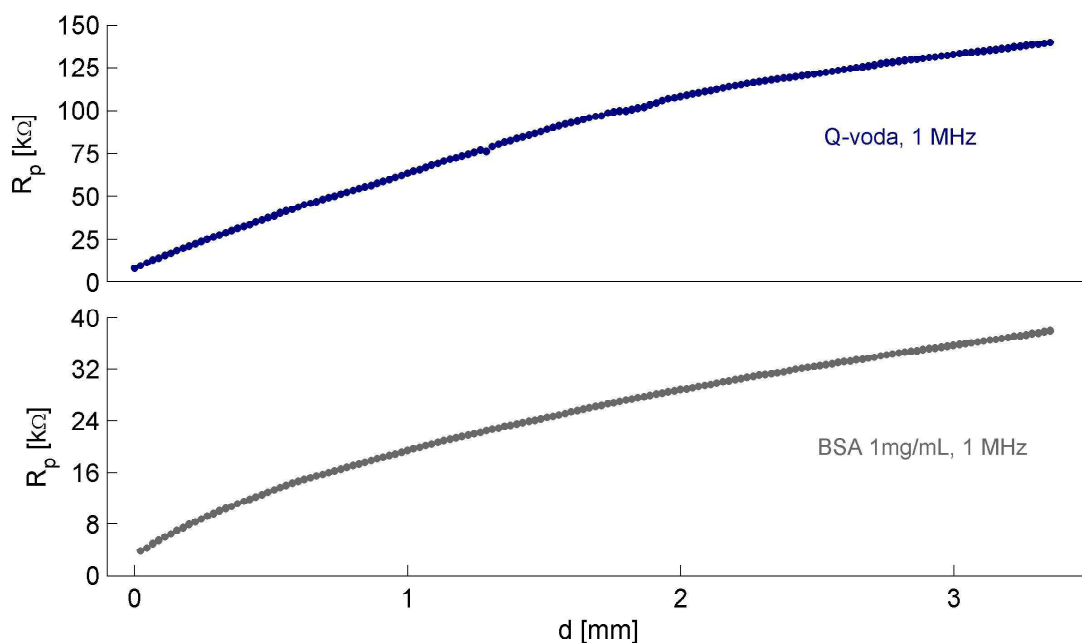
Obrázek 5.12: Závislost kapacity C_p kondenzátoru obsahujícího Q-vodu a BSA na vzdálenosti d elektrod při amplitudě střídavého napětí $U = 1$ V a frekvenci $f_1 = 1$ MHz pro objem vzorku $V = 250$ μ L.



Obrázek 5.13: Závislost odporu R_p Q-vody na vzdálenosti d elektrod při amplitudě střídavého napětí $U = 1$ V a frekvencích $f_1 = 20$ Hz a $f_2 = 1$ MHz pro objem vzorku $V = 500$ μ L.



Obrázek 5.14: Závislost odporu R_p Q-vody a BSA na vzdálenosti d elektrod při amplitudě střídavého napětí $U = 1$ V a frekvenci $f_1 = 20$ Hz pro objem vzorku $V = 250$ μ L.



Obrázek 5.15: Závislost odporu R_p Q-vody a BSA na vzdálenosti d elektrod při amplitudě střídavého napětí $U = 1$ V a frekvenci $f_2 = 1$ MHz pro objem vzorku $V = 250$ μ L.

5.1.3 Závislost I_{DC} na čase a vzdálenosti elektrod

Měření stejnosměrného proudu bylo provedeno za použití předpětí (Bias) o amplitudě $U = 1$ V a v některých případech i $U = 10$ mV².

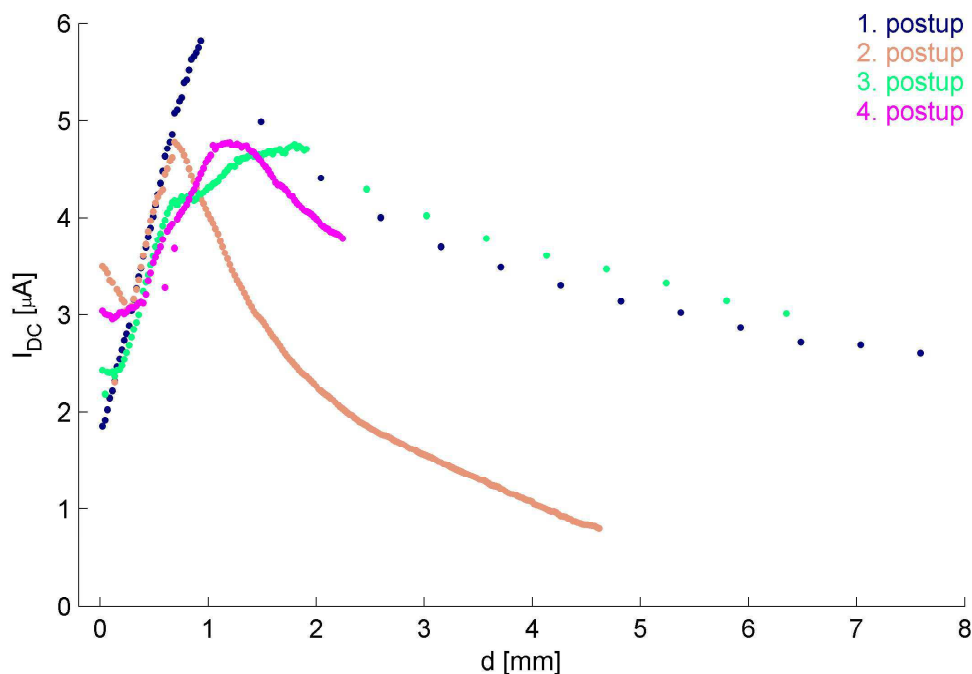
Závislost procházejícího proudu I_{DC} na vzdálenosti d pro Q-vodu byla měřena celkem čtyřmi různými postupy.

- První postup spočíval v nalezení bodu dotyku a následném oddalování elektrod. Hodnoty procházejícího proudu byly zapisovány po přibližně třívteřinovém čekání.
- Při druhém měření byl zvolen opačný postup, tedy přibližování vrchní elektrody až do bodu dotyku. Doba čekání před zaznamenáním hodnoty proudu byla stejná jako v předchozím případě.
- Třetí ze čtyř provedených postupů byl stejný jako postup první, s jediným rozdílem, totiž po otočení mikrometrickým šroubem byla hodnota proudu zapsána až po ustálení. Takto bylo postupováno do hodnoty $d = 0,0488$ mm a poté kvůli zdatelně zvýšené nestabilitě hodnot proudu byla zavedena třicetivteřinová doba čekání.
- Poslední postup se od prvního a třetího liší opět pouze v době mezi zvětšením vzdálenosti elektrod a zapsáním hodnoty procházejícího proudu. V tomto

²Pokud není zdůrazněno použití tohoto předpětí, je automaticky předpokládáno použití $U = 1$ V.

případě docházelo k zaznamenání hodnoty bezprostředně po otočení mikrometrickým šroubem.

Křivky vzešlé z těchto postupů je možné vidět na Obrázku 5.16. Z tohoto grafu je možné vidět, že všechny čtyři křivky vykazují, alespoň v nějaké části intervalu $d \in (0; 1)$ mm, lineární závislost s téměř totožnou směrnici. Jelikož se jedná o stejný region, jako v případě vzdálenostní závislosti kapacity a odporu, je toto chování připisováno stejnému jevu, viz sekce *Závislost C_p a R_p na vzdálenosti elektrod*.



Obrázek 5.16: Závislost stejnosměrného proudu I_{DC} protékajícího mezi elektrodami na vzdálenosti elektrod d . Měřeno pro čistou Q-vodu.

Měření závislosti I_{DC} na vzdálenosti bylo provedeno i pro koncentraci proteinu BSA $c = 5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Při tomto měření byly pozorovány poměrně velké fluktuace procházejícího proudu v závislosti na vzdálenosti elektrod, viz Obrázek 5.17. Toto chování bylo způsobeno viditelným vysrážením proteinu na kladně nabitě (horní) elektrodě. Z tohoto důvodu byla provedena další měření s koncentracemi $c = 2$ a $0,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ a dvěma předpětími $U_1 = 1 \text{ V}$ a $U_2 = 10 \text{ mV}$. U koncentrace $c = 2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ a předpětí U_1 byla opět pozorována tvořící se sraženina proteinu³ na horní elektrodě. Při stejném předpětí, ale koncentraci $c = 0,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ žádná sraženina pouhým okem pozorována nebyla, stejně tomu bylo i u obou předchozích koncentrací při použitím předpětí U_2 .

Toto chování proteinu bylo poměrně překvapivé, neboť nebylo pozorováno při předchozích měřeních, viz [43]⁴. Z tohoto důvodu byl tento jev podroben dalšímu

³Pravděpodobně se jedná o hydrogel.

⁴Později se ukázalo, že i u starých vzorků mohlo docházet ke tvorbě sraženiny, pouze jen podstatně pomaleji, a proto si tohoto jevu nikdo nevšiml.

zkoumání.

Ke studiu tvorby sraženiny byly použity tři koncentrace $c = 1, 2$ a $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ a předpětí $U = 1 \text{ V}$. Při těchto parametrech byl měřen časový vývoj I_{DC} v konstantní vzdálenosti elektrod d .

Nejprve byl nalezen bod dotyku za použití pouze Q-vody a od tohoto bodu byla vrchní elektroda umístěna do vzdálenosti $d = 3,33 \text{ mm}$ od spodní elektrody. Poté byla Q-voda odsáta a do kyvety byl injekční stříkačkou vpraven roztok proteinu. Následně byla v minutových intervalech zaznamenávána hodnota proudu I_{DC} a v některých případech byla pořízena fotografie elektrody⁵. Výsledné časové závislosti a vybrané fotografie je možné vidět na Obrázku 5.18 - Obrázku 5.21.

U nejnižší koncentrace $c = 1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ je patrný, z dlouhodobějšího hlediska, růst proudu I_{DC} v čase. Naproti tomu u dalších dvou koncentrací procházející proud mezi elektrodami s rostoucím časem klesá. Tento rozdíl je nejspíše způsobem tvarem narůstající sraženiny na elektrodě. Ve všech případech sraženina začala růst na hranách elektrody, kde je největší gradient elektrického pole, a poté se rozšiřovala po elektrodě. V případě koncentrace $c = 1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ sraženina po rozprostření se po elektrodě narůstala nerovnoměrně a tvořila uprostřed elektrody jakýsi kapkovitý útvar. Elektrody se tudíž skrze sraženinu přibližovaly rychleji, než ubýval protein v okolním roztoku. Naproti tomu u koncentrace $c = 2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ sraženina rostla téměř rovnoměrně po celé ploše elektrody. Sraženina vytvářela pouze velmi malý kopeček, který se rychle vyhlazoval, viz Obrázek 5.19 a Obrázek 5.21. Z tohoto důvodu se na přiblížení elektrod muselo spotřebovat mnohem více proteinu a procházející proud s časem klesal. U koncentrace $c = 5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ sraženina rostla především na hranách elektrody a pomalu se rozšiřovala do stran, z tohoto důvodu docházelo, stejně jako v případě koncentrace $c = 2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, k poklesu proudu v čase vlivem spotřebování velkého množství proteinu na přiblížení elektrod.

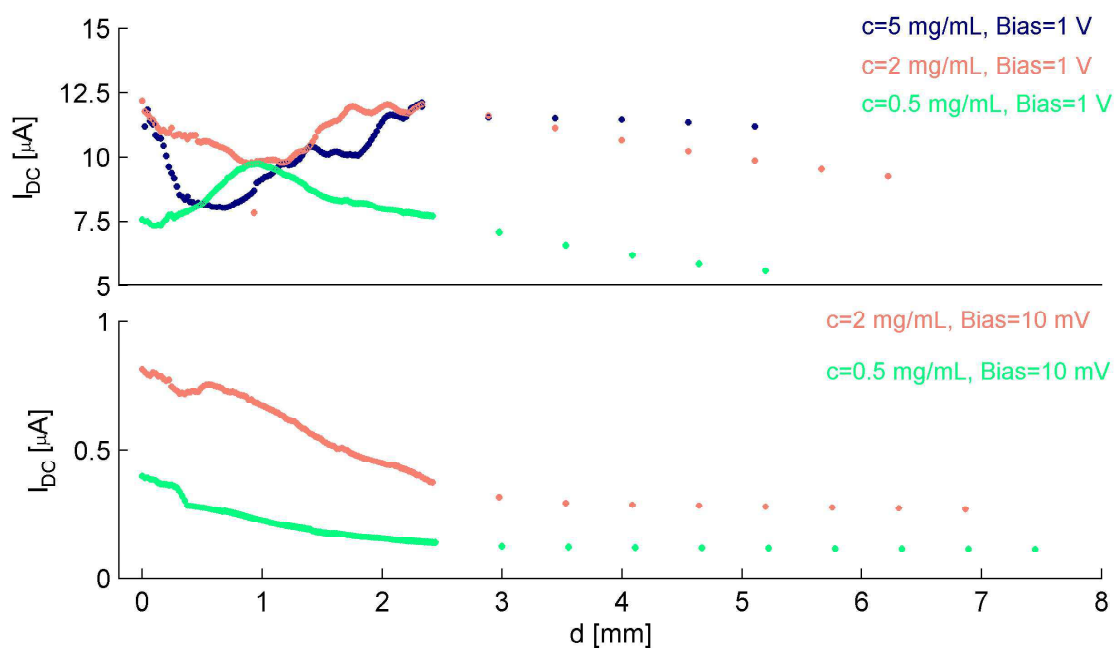
Fluktuace hodnot proudu I_{DC} jsou pravděpodobně způsobovány právě ne zcela rovnoměrným růstem sraženiny. Porovnáním vývoje růstu sraženiny pro koncentraci $c = 2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ zaznamenaným na fotografiích s příslušným grafem je vidno, že hodnota procházejícího proudu vzrostla, pokud se na elektrodě tvořil drobný kopeček (tzn. elektrody se přibližují rychle), a naopak klesla, když se tento kopeček zarovnával, tzn. elektrody se téměř nepřibližují a pouze se spotřebovává protein v roztoku.

Dále je zde nutné zmínit, že rychlost růstu viditelně závisela na koncentraci proteinu, a to tak, že v roztoku o větší koncentraci sraženina rostla pomaleji, ale byla odolnější. Toto pozorování bylo nejvíce patrné u nejvyšší použité koncentrace $c = 5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, kde měření muselo probíhat 40 minut, aby se utvořila poměrně dobře viditelná sraženina, kterou poté bylo obtížné z elektrody odstranit, neboť utvořila drobné krystalky na povrchu. Naopak u nižších koncentrací sraženina nebyla schopna překonat ani povrchové napětí roztoku.

Důvodem pomalejšího růstu sraženiny u vyšších koncentrací je kratší střední volná dráha molekuly BSA způsobená vyšší koncentrací molekul v roztoku a tím větší pravděpodobností srážky. Záporně nabitý protein se tedy bude směrem ke katodě pohybovat pomaleji. Vyšší pevnost sraženiny je pravděpodobně přímým důsledkem rychlosti růstu. Při pomalejším růstu mají molekuly proteinu více času se vůči sobě zorientovat tak, aby vytvořily více hustou a pevnou strukturu.

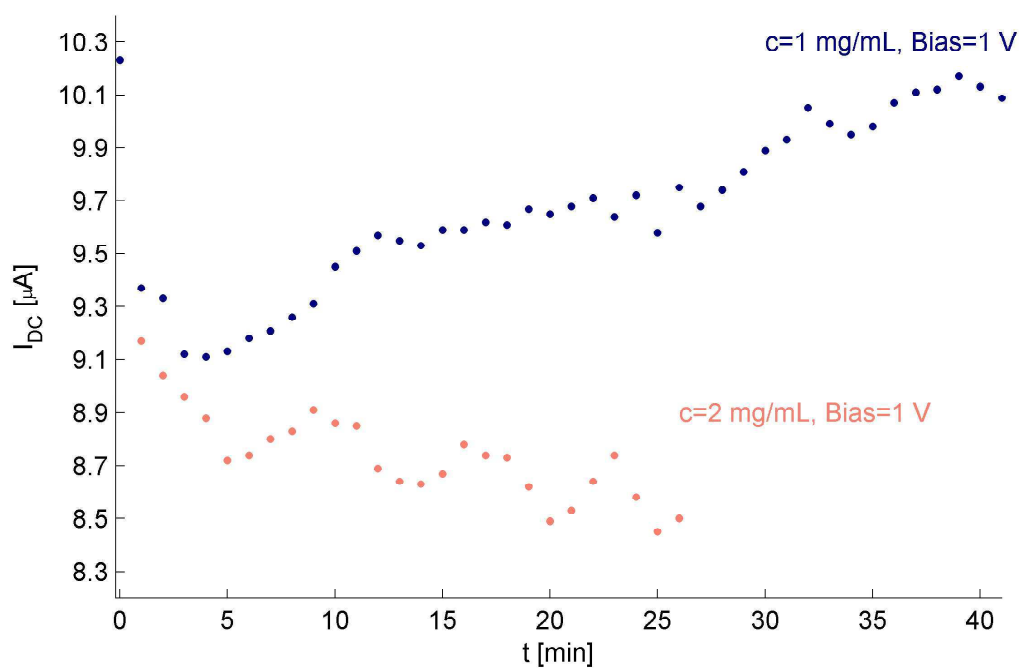
⁵Pouze u koncentrací $c = 2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ a $c = 5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Po nárůstu sraženiny byla měřena závislost proudu I_{DC} na vzdálenosti oběma směry (přibližování i oddalování elektrod). Naměřené závislosti je možné vidět na grafech Obrázek 5.22 - Obrázek 5.24 ⁶.

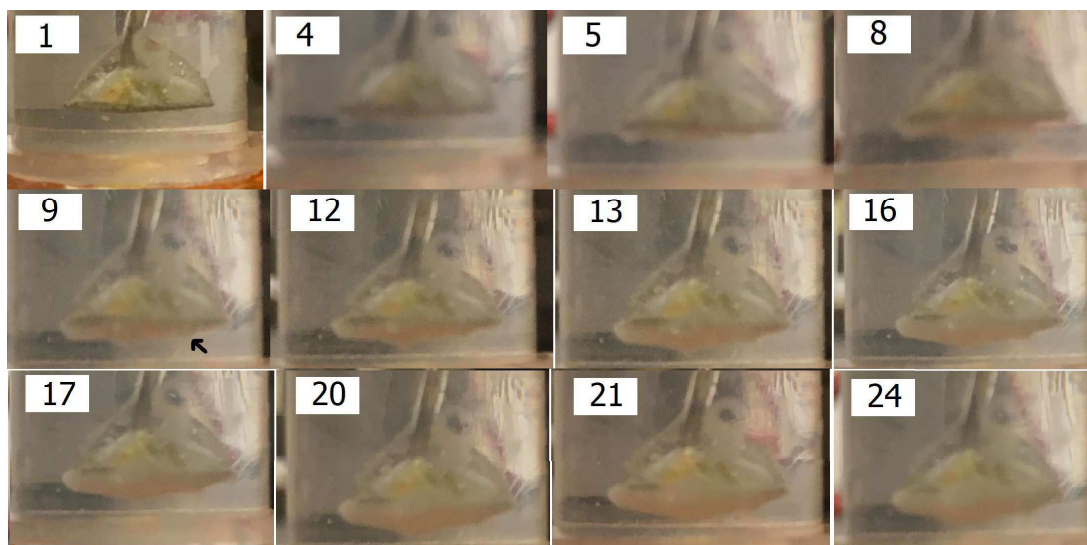


Obrázek 5.17: Závislost stejnosměrného proudu I_{DC} protékajícího mezi elektrodami na vzdálenosti elektrod d . Měřeno pro roztoky BSA.

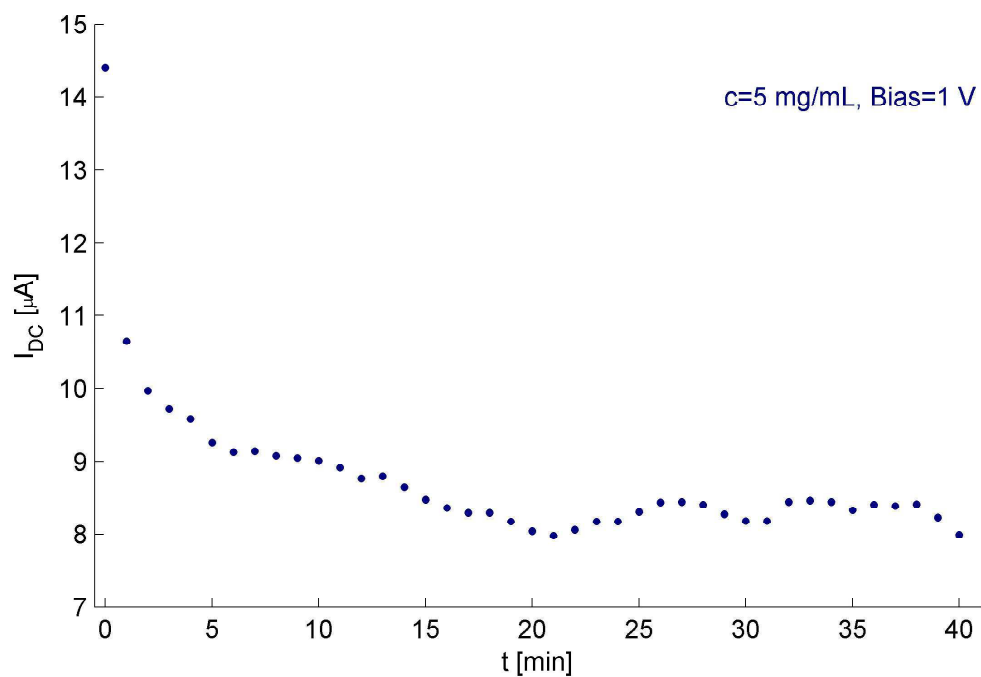
⁶Důvodem, proč křivka měřená pro oddalování elektrod pro koncentraci $c = 2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ končí ve vzdálenosti $d = 1,5 \text{ mm}$, je, že kvůli přílišnému přiblížení elektrod došlo k částečnému odtržení sraženiny a z tohoto důvodu bylo zbytečné pokračovat v měření.



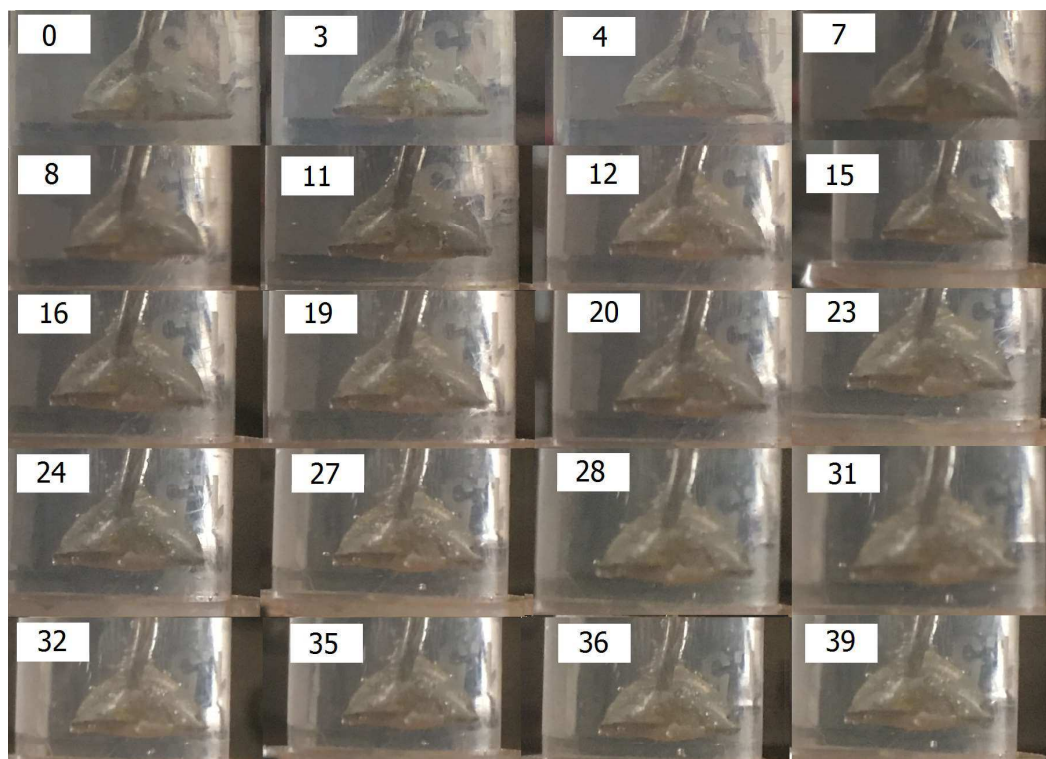
Obrázek 5.18: Závislost stejnosměrného proudu I_{DC} protékajícího mezi elektrodami na čase pro roztoky o koncentraci $c = 1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ a $c = 2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.



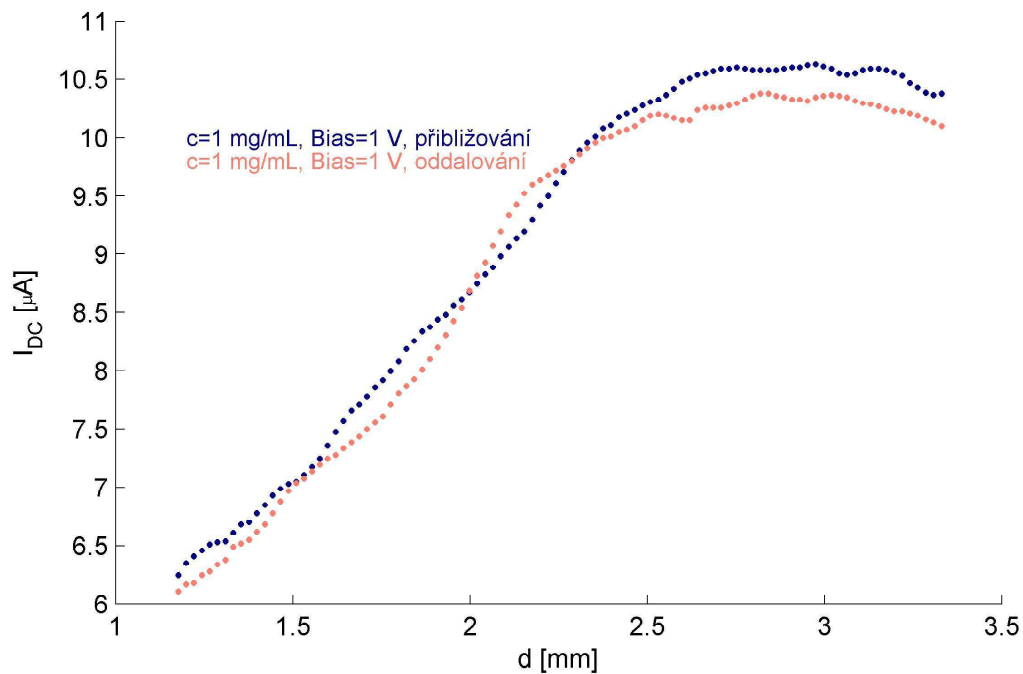
Obrázek 5.19: Fotografie růstu sraženiny při použití roztoku BSA o koncentraci $c = 2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Čísla na obrázku označují minutu, ve které byl snímek pořízen, šipka na obrázku z deváté minuty poukazuje na výše zmíněný malý rostoucí výběžek.



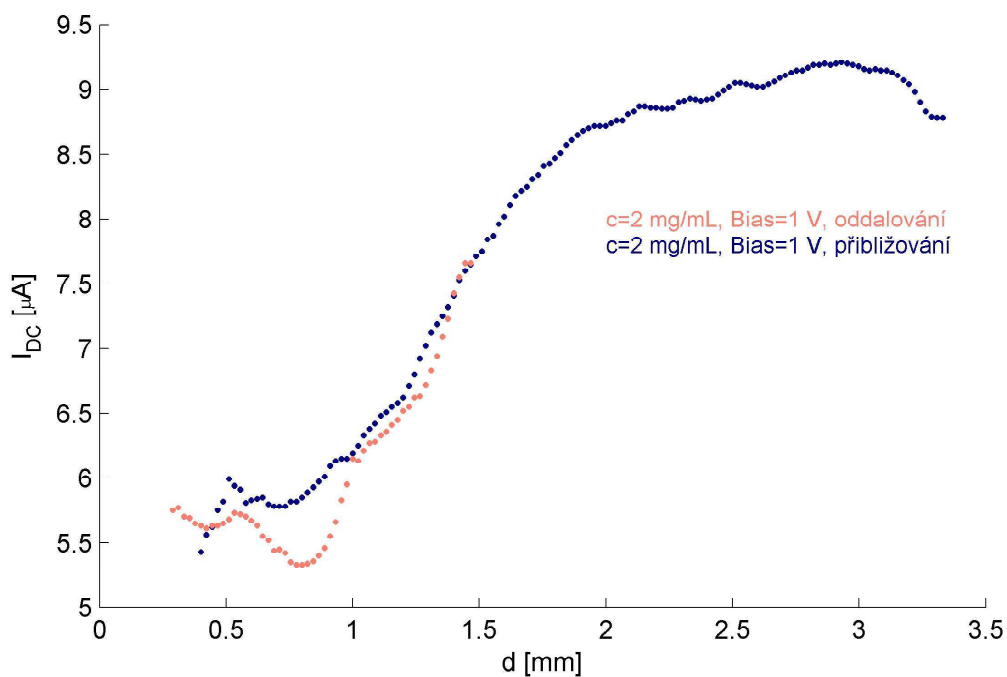
Obrázek 5.20: Závislost stejnosměrného proudu I_{DC} protékajícího mezi elektrodami na čase pro roztok o koncentraci $c = 5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.



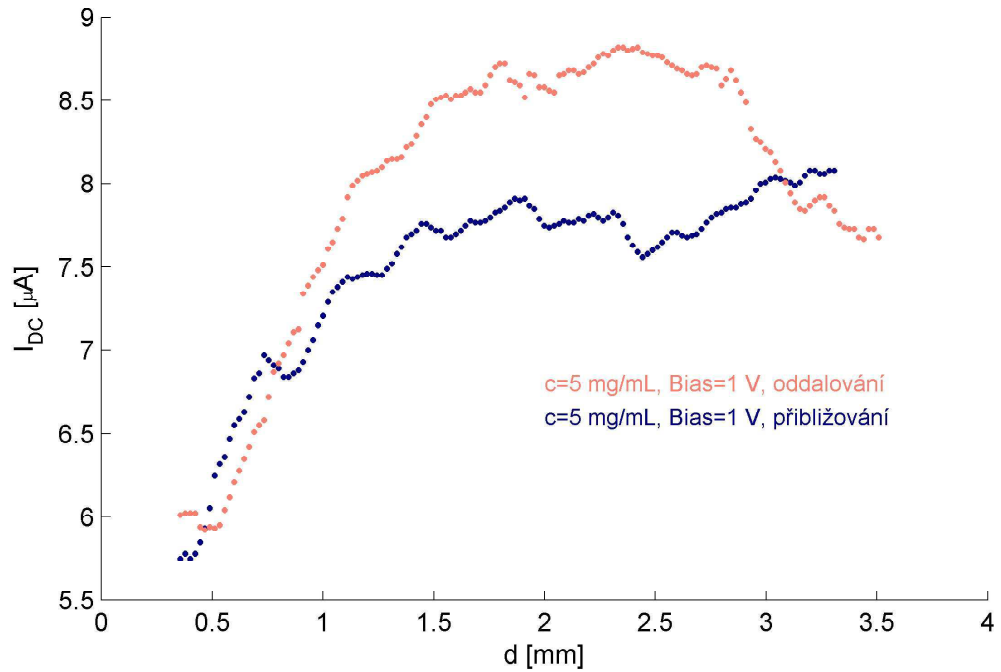
Obrázek 5.21: Fotografie růstu sraženiny při použití roztoku BSA o koncentraci $c = 5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.



Obrázek 5.22: Závislost stejnosměrného proudu I_{DC} protékajícího mezi elektrodami na vzdálenosti pro roztok o koncentraci $c = 1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, měřeno po vytvoření sraženiny.



Obrázek 5.23: Závislost stejnosměrného proudu I_{DC} protékajícího mezi elektrodami na vzdálenosti pro roztok o koncentraci $c = 2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, měřeno po vytvoření sraženiny.



Obrázek 5.24: Závislost stejnosměrného proudu I_{DC} protékajícího mezi elektrodami na vzdálenosti pro roztok o koncentraci $c = 5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, měřeno po vytvoření sraženiny.

5.2 Měření s hrotovou elektrodou

V této sekci budou popsána měření aktivní plochy hrotové elektrody a též pokusy o krystalizaci BSA na hrotu elektrody.

5.2.1 Aktivní plocha hrotu

Pro určení měrné vodivosti tubulinu a mikrotubulů měřením odtrhávací metodou je nutné znát, mimo jiné, aktivní plochu hrotu. K jejímu zjištění byla provedena měření odporu R_p v konstantní vzdálenosti d pro hrot a elektrodu o známé aktivní ploše. Odpor R_p byl měřen pro dvě amplitudy napětí $U_1 = 1 \text{ V}$ a $U_2 = 10 \text{ mV}$ a tři frekvence $f_1 = 20 \text{ Hz}$, $f_2 = 1 \text{ kHz}$ a $f_3 = 1 \text{ MHz}$ v čisté Q-vodě.

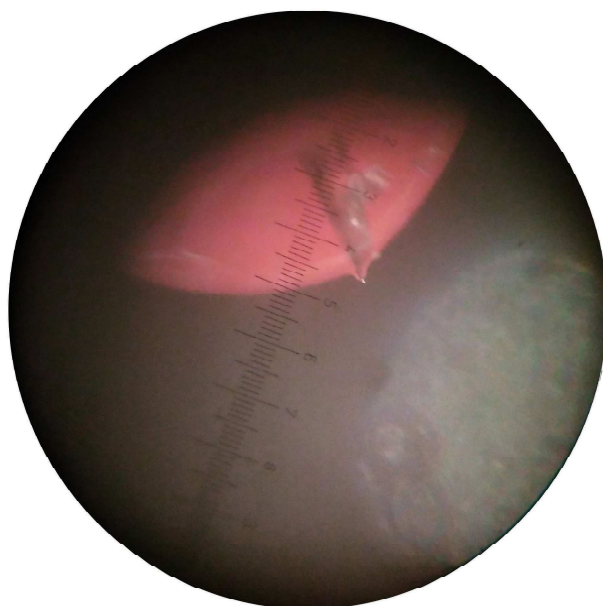
Aktivní plocha hrotu byla poté určena pomocí vzorce 5.2.

$$S_H = S_D \frac{R_{p,D}}{R_{p,H}}, \quad (5.2)$$

kde S_H je aktivní plocha hrotu, $S_D = 16,8 \text{ mm}^2$ aktivní plocha deskové elektrody, $R_{p,D}$ odpor naměřený s deskou a $R_{p,H}$ odpor naměřený s hrotem.

Toto měření bylo nejprve provedeno pro zahnutý hrot (označme A). Jeho aktivní plocha byla, v souladu s tímto faktem, větší než hodnota vypočtena v práci K. Kohoutové [43] za použití rovného hrotu.

Po tomto zjištění byl pro další měření připraven nový hrot, viz Obrázek 5.25 (označme B). Aktivní plocha hrotu B byla měřena ve vzdálenosti elektrod



Obrázek 5.25:
Fotografie hrotu B pořízená skrze okulár mikroskopu.

$d = (6,0 \pm 0,2)$ mm, ve které byl poté uskutečněn pokus o krystalizaci, a také ve vzdálenosti $d = (1,1 \pm 0,2)$ mm, kvůli porovnání aktivní plochy s hrotem A. Hodnoty aktivních ploch obou hrotů jsou uvedeny v tabulce Tabulka 5.2.1, hodnoty z nichž byly tyto aktivní plochy vypočteny je možné nalézt v tabulkách Tabulka 5.4.1 - Tabulka 5.4.1 v příloze.

	f [kHz]	0,02	1	1000	0,02	1	1000
	U [mV]	1000	1000	1000	10	10	10
A _{1,1}	S_H [mm ²]	0,0956	0,1297	0,9114	0,0208	0,0786	0,8942
B ₆	S_H [mm ²]	0,0405	0,0859	0,4456	X	X	X
B _{1,1}	S_H [mm ²]	0,0036	0,0061	0,2953	0,0053	0,0040	0,2941
K _{1,1} [43]	S_H [mm ²]	0,0145	X	0,4961	0,0648	X	0,5860

Tabulka 5.1: Vypočtené hodnoty aktivní plochy hrotů s označeními A a B, kde dolní index označuje vzdálenost elektrod.

5.2.2 Krystalizace BSA v elektrickém poli

Vzhledem k předešlému nečekanému úspěchu s krystalizací BSA [43] pod vlivem elektrického pole jsme se rozhodli prozkoumat podmínky a ověřit reprodukovatelnost výsledků. Motivací především bylo využití drobných krystalů na hrotu k dalším měřením.

První pokusy o krystalizaci byly provedeny s hrotem A, jenž byl použit v předchozích měřeních. Tento hrot, jak již bylo zmíněno v předchozí kapitole, byl zahnutý, a tudíž jeho aktivní plocha, jak dokládá i výpočet, byla větší než u hrotu, u kterého byla krystalizace úspěšná.

S tímto hrotem byly realizovány tři pokusy ve vzdálenosti $d = (7,0 \pm 0,2)$ mm, které bohužel nevedly k úspěšné krystalizaci. Z tohoto důvodu byl pro další pokusy použit nově vyrobený hrot B s menší aktivní plochou a vzdálenost byla snížena

na přibližně $d = (6,0 \pm 0,2)$ mm v prvním pokusu, $d = (5,0 \pm 0,2)$ mm v pokusu druhém a $d = (1,0 \pm 0,2)$ mm v dalších dvou pokusech.

Výsledky krystalizačních pokusů a jejich podmínky pro oba hroty jsou uvedeny v tabulce Tabulka 5.2.2.

hrot	c [mg·mL ⁻¹]	zdroj	napětí [V]	f [kHz]	t [h]	výsledek
A ₇	2	střídavý	1	1	1	NE
A ₇	2	střídavý	1	1000	1,5	NE
A ₇	2	stejnoseměrný	0,5	X	1	NE
B ₆	1	střídavý	1	1000	2	NE
B ₅	5	střídavý	1	1000	1	NE
B ₁	5	střídavý	1	1	2	NE
B ₁	0,5	střídavý	1	1	1	NE

Tabulka 5.2: Parametry pokusů krystalizace BSA, kde "NE" značí neúspěch a "ANO" úspěch.

5.3 Měření vlastností tubulinu pomocí ploché elektrody

Pro měření elektrických vlastností tubulinu byly připraveny dvě stejné koncentrační řady $c = (0, 0, 75; 1, 5; 3; 6)$ mg·mL⁻¹. Tyto koncentrační řady byly získány ze dvou nezávisle připravených vzorků (ozn. D1 a D2) téměř čistého roztoku tubulinu o koncentraci $c = 6$ mg·mL⁻¹.

Roztok tubulinu v téměř čisté vodě o malé vodivosti byl připraven dialýzou roztoku tubulinu a pufovacího roztoku BRB80 našimi kolegy z Ústavu fotoniky a elektroniky, Akademie věd ČR, v.v.i.

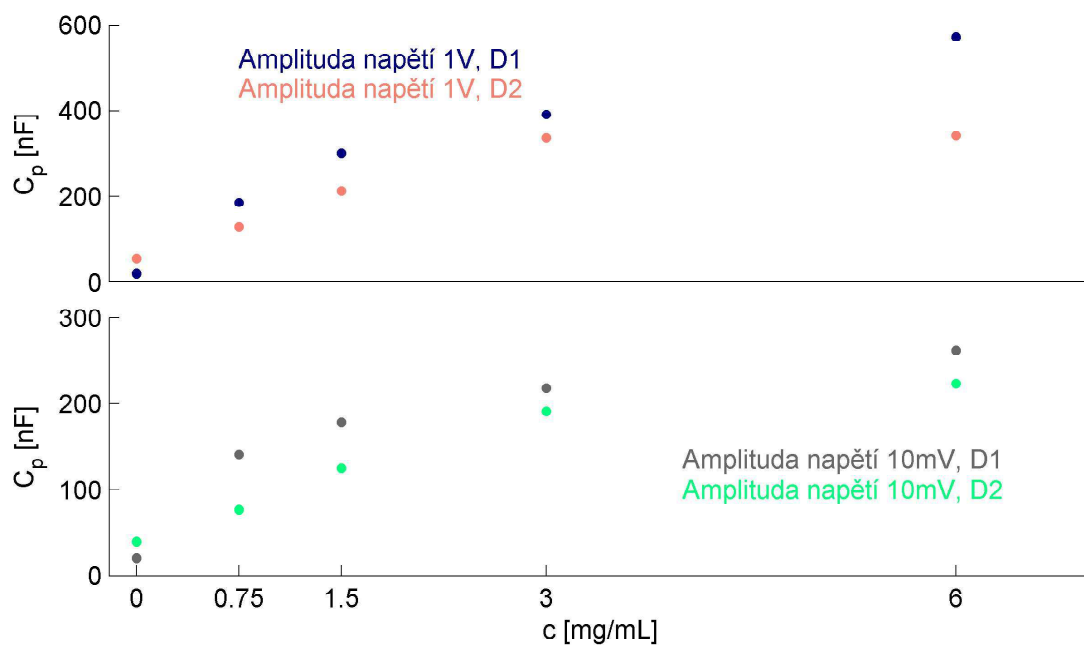
5.3.1 Závislost C_p , R_p , Z a Θ na koncentraci tubulinu

Z úsporných důvodů bylo měření s tubulinem provedeno, na rozdíl od ekvivalentního měření s BSA, za použití vzorku o polovičním objemu $V = 250$ μL a tudíž musela být upravena i vzdálenost, ve které byly hodnoty zaznamenávány $d = (2,22 \pm 0,02)$ mm (měřeno mikrometrickým šroubem od bodu dotyku).

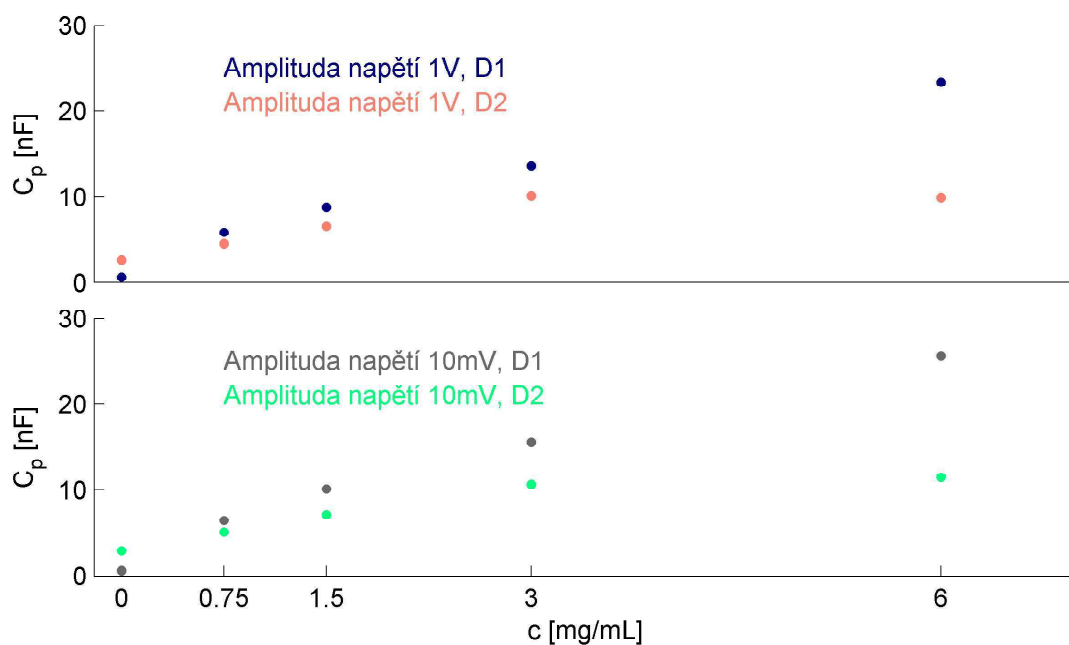
Měření bylo uskutečněno, stejně jako v případě BSA, za použití střídavého napětí o dvou amplitudách $U_1 = 10$ mV a $U_2 = 1$ V a třech různých frekvencích $f_1 = 20$ Hz, $f_2 = 1$ kHz a $f_3 = 1$ MHz.

Závislosti jednotlivých veličin jsou vyobrazeny na grafech Obrázek 5.26 - Obrázek 5.34. Porovnáním se stejnými závislostmi pro BSA je možné vidět, že jejich průběhy jsou téměř totožné, pouze s odlišnými hodnotami.

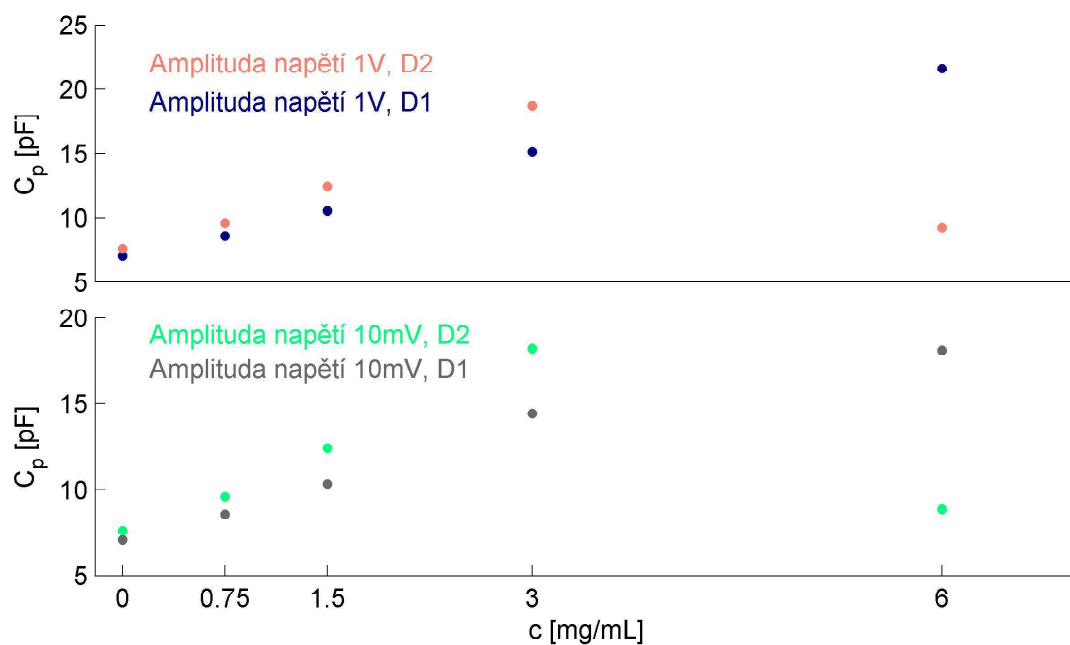
Ze vzorce 5.1 byla vypočtena měrná vodivost a její závislosti na koncentraci je možné vidět na Obrázek 5.35 - Obrázek 5.37.



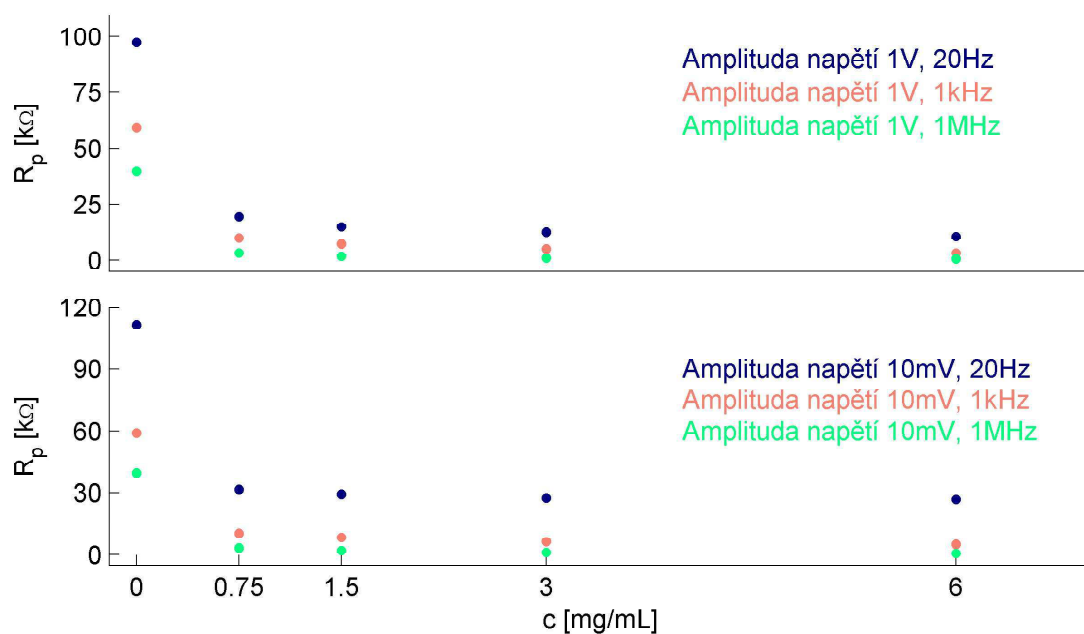
Obrázek 5.26: Závislost kapacity C_p kondenzátoru obsahující roztok tubulinu na koncentraci při amplitudě střídavého napětí $U_1 = 1 \text{ V}$ a $U_2 = 10 \text{ mV}$ a frekvenci $f_1 = 20 \text{ Hz}$.



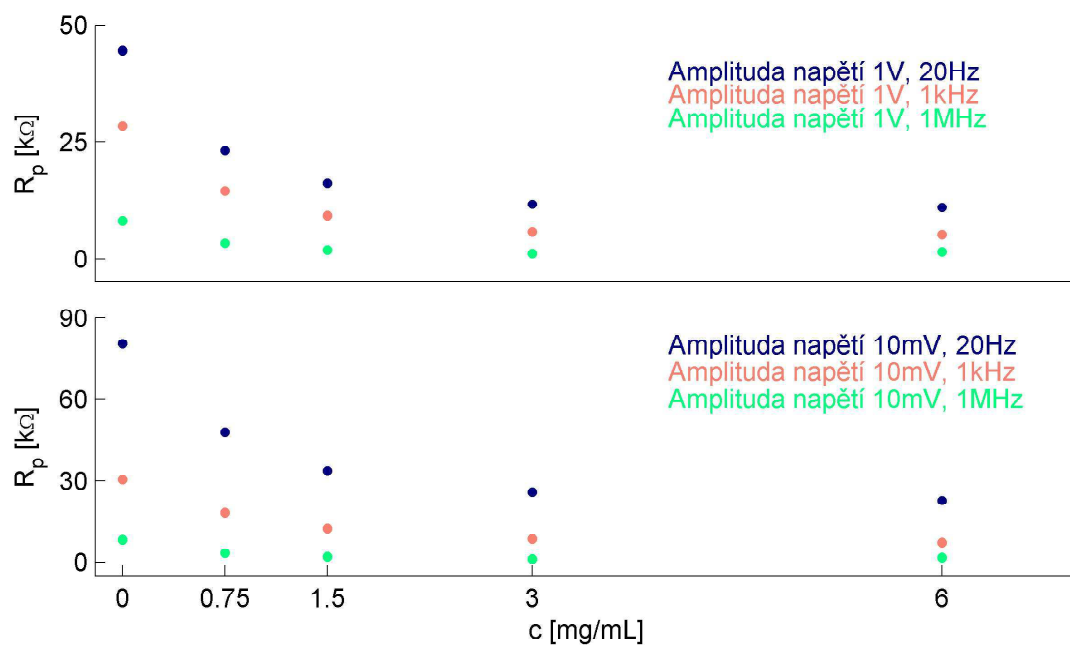
Obrázek 5.27: Závislost kapacity C_p kondenzátoru obsahující roztok tubulinu na koncentraci při amplitudě střídavého napětí $U_1 = 1 \text{ V}$ a $U_2 = 10 \text{ mV}$ a frekvenci $f_2 = 1 \text{ kHz}$.



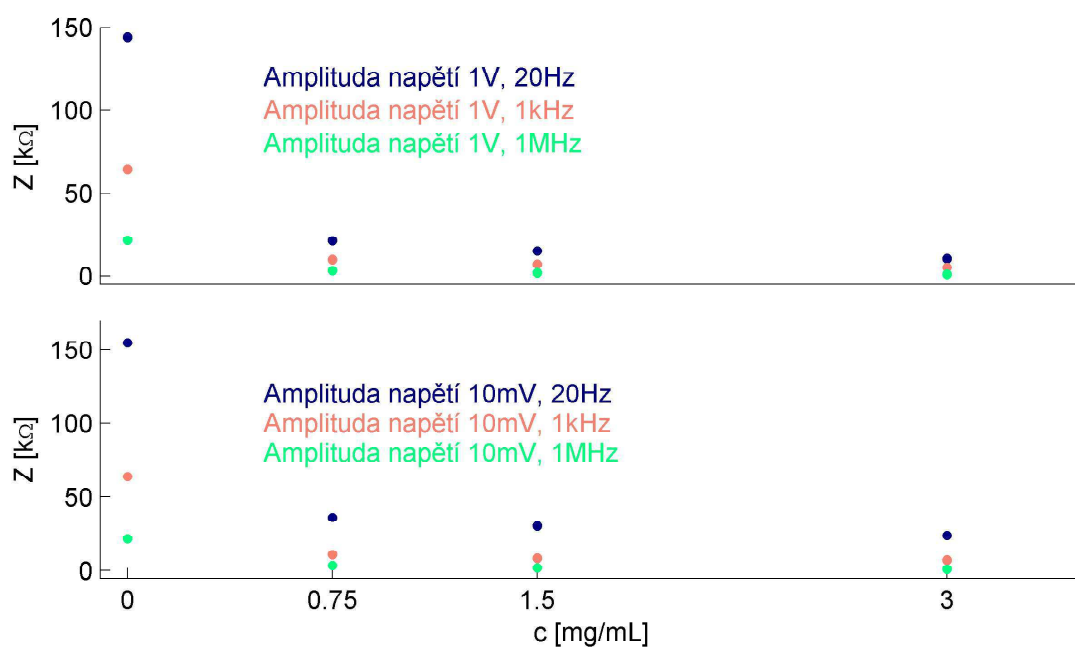
Obrázek 5.28: Závislost kapacity C_p kondenzátoru obsahující roztok tubulinu na koncentraci při amplitudě střídavého napětí $U_1 = 1$ V a $U_2 = 10$ mV a frekvenci $f_3 = 1$ MHz.



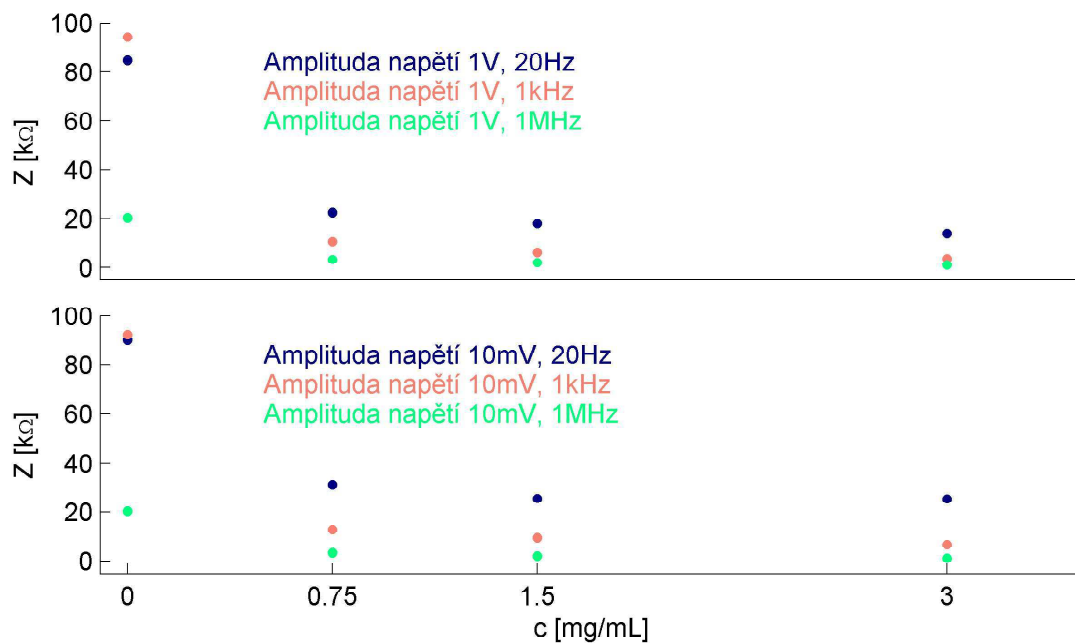
Obrázek 5.29: Závislost odporu R_p roztoku tubulinu D1 na koncentraci při amplitudě střídavého napětí $U_1 = 1$ V a $U_2 = 10$ mV a třech frekvencích $f_1 = 20$ Hz, $f_2 = 1$ kHz a $f_3 = 1$ MHz.



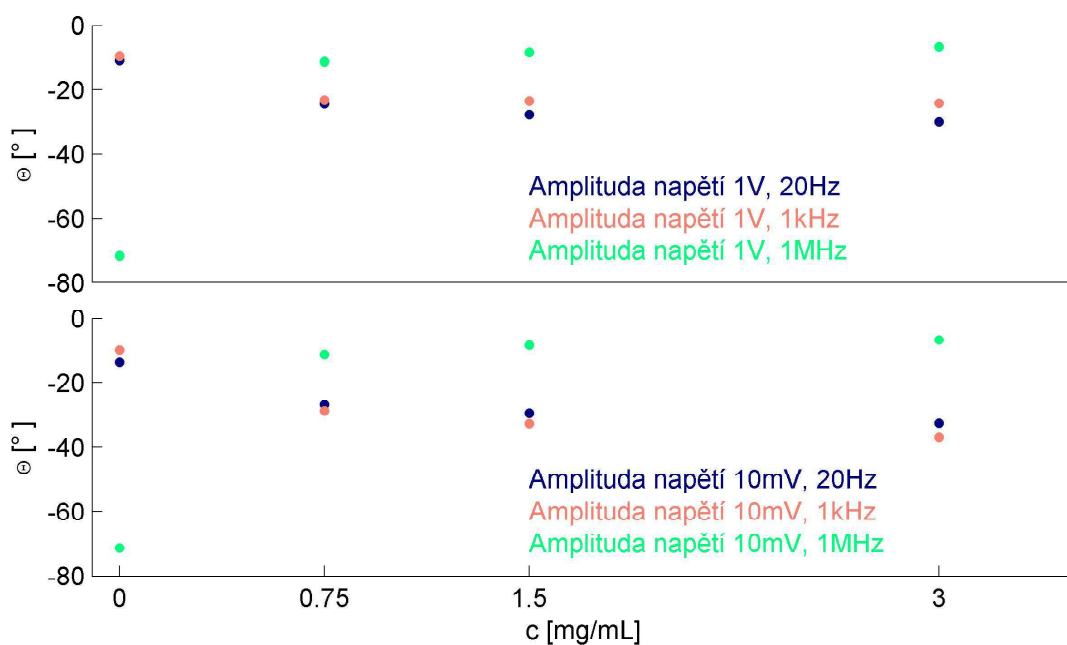
Obrázek 5.30: Závislost odporu R_p roztoku tubulinu D2 na koncentraci při amplitudě střídavého napětí $U_1 = 1$ V a $U_2 = 10$ mV a třech frekvencích $f_1 = 20$ Hz, $f_2 = 1$ kHz a $f_3 = 1$ MHz.



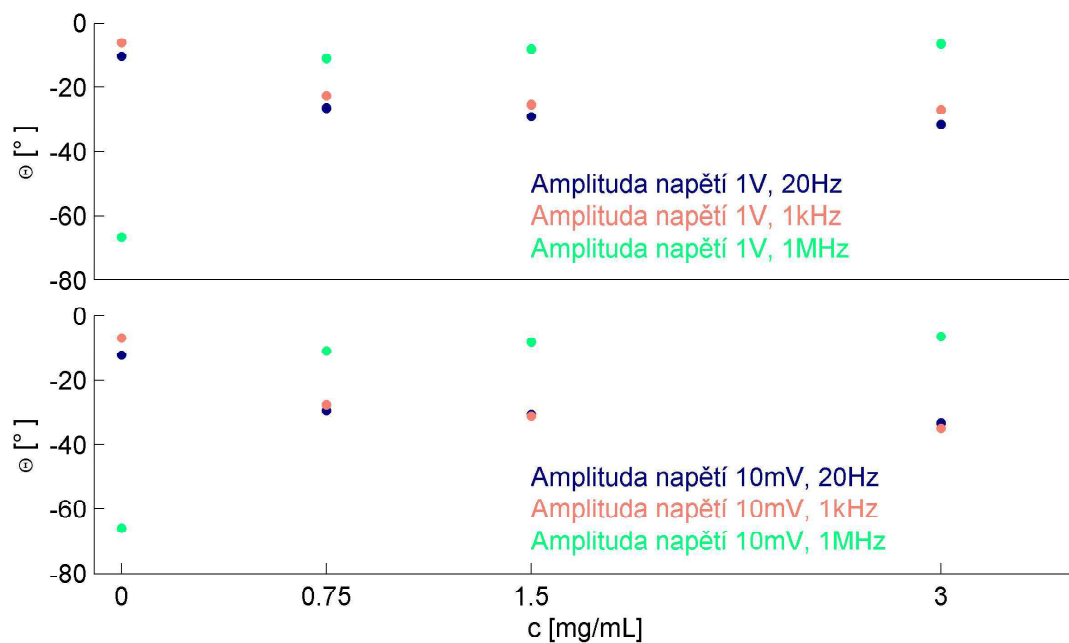
Obrázek 5.31: Závislost impedance Z roztoku tubulinu D1 na koncentraci za použití amplitudy střídavého napětí $U_1 = 1$ V a $U_2 = 10$ mV a třech frekvencí $f_1 = 20$ Hz, $f_2 = 1$ kHz a $f_3 = 1$ MHz.



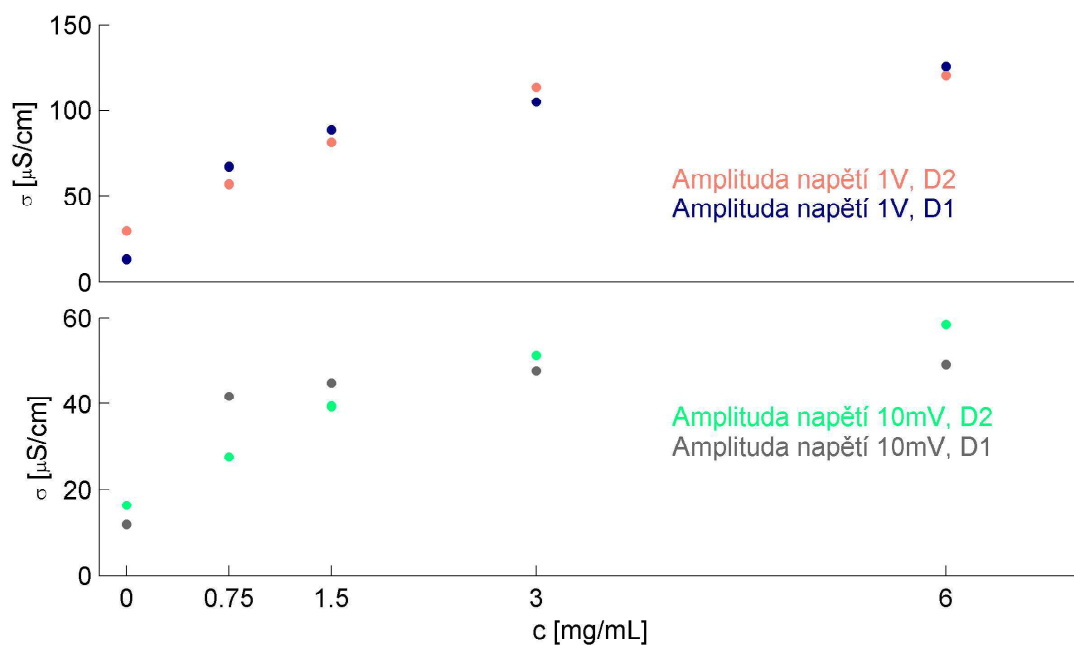
Obrázek 5.32: Závislost impedance Z roztoku tubulinu D2 na koncentraci za použití amplitudy střídavého napětí $U_1 = 1 \text{ V}$ a $U_2 = 10 \text{ mV}$ a třech frekvencí $f_1 = 20 \text{ Hz}$, $f_2 = 1 \text{ kHz}$ a $f_3 = 1 \text{ MHz}$.



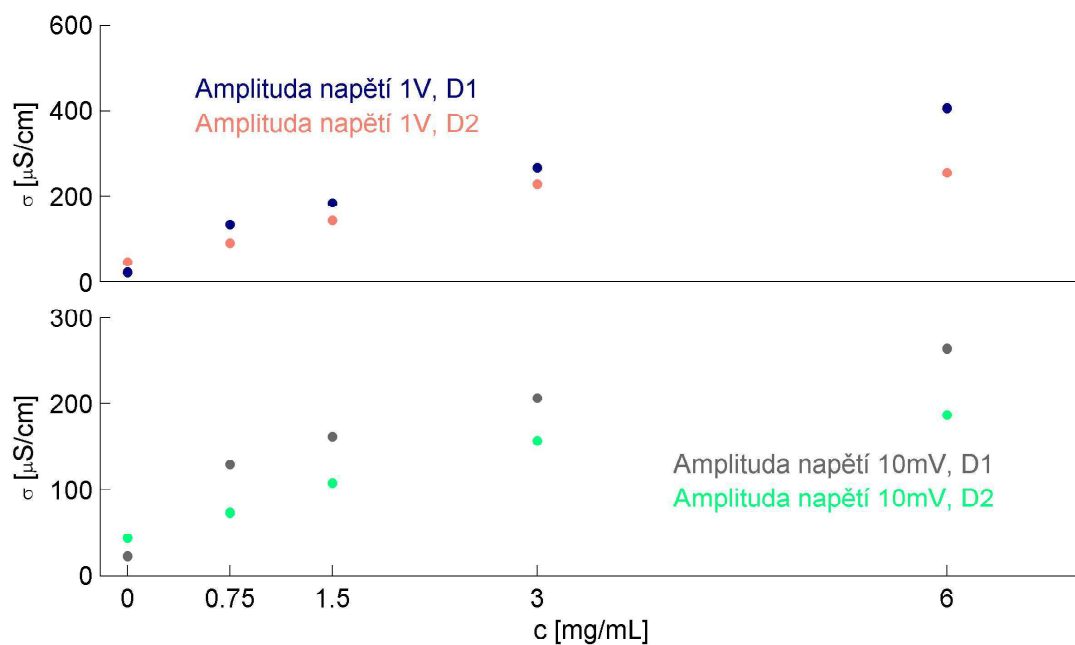
Obrázek 5.33: Závislost fázového posunu Θ roztoku tubulinu D1 na koncentraci za použití amplitudy střídavého napětí $U_1 = 1 \text{ V}$ a $U_2 = 10 \text{ mV}$ a třech frekvencí $f_1 = 20 \text{ Hz}$, $f_2 = 1 \text{ kHz}$ a $f_3 = 1 \text{ MHz}$.



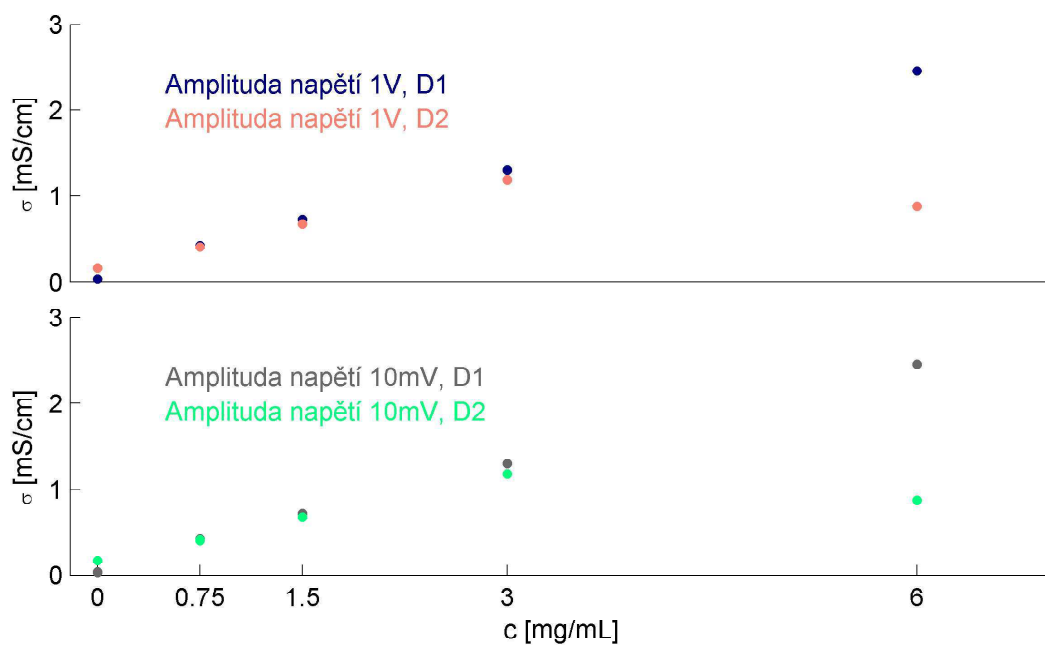
Obrázek 5.34: Závislost fázového posunu Θ roztoku tubulinu D2 na koncentraci za použití amplitudy střídavého napětí $U_1 = 1 \text{ V}$ a $U_2 = 10 \text{ mV}$ a třech frekvencí $f_1 = 20 \text{ Hz}$, $f_2 = 1 \text{ kHz}$ a $f_3 = 1 \text{ MHz}$.



Obrázek 5.35: Závislost měrné vodivosti σ roztoku tubulinu na koncentraci při amplitudě střídavého napětí $U_1 = 1 \text{ V}$ a $U_2 = 10 \text{ mV}$ a frekvenci $f_1 = 20 \text{ Hz}$.



Obrázek 5.36: Závislost měrné vodivosti σ roztoku tubulinu na koncentraci při amplitudě střídavého napětí $U_1 = 1 \text{ V}$ a $U_2 = 10 \text{ mV}$ a frekvenci $f_2 = 1 \text{ kHz}$.

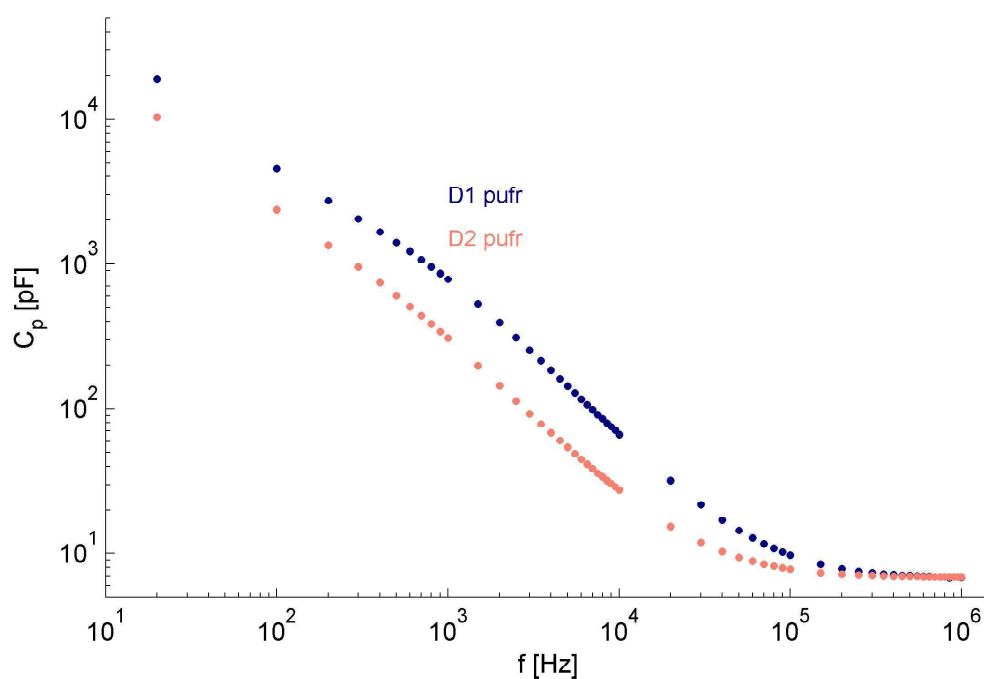


Obrázek 5.37: Závislost měrné vodivosti σ roztoku tubulinu na koncentraci při amplitudě střídavého napětí $U_1 = 1 \text{ V}$ a $U_2 = 10 \text{ mV}$ a frekvenci $f_3 = 1 \text{ MHz}$.

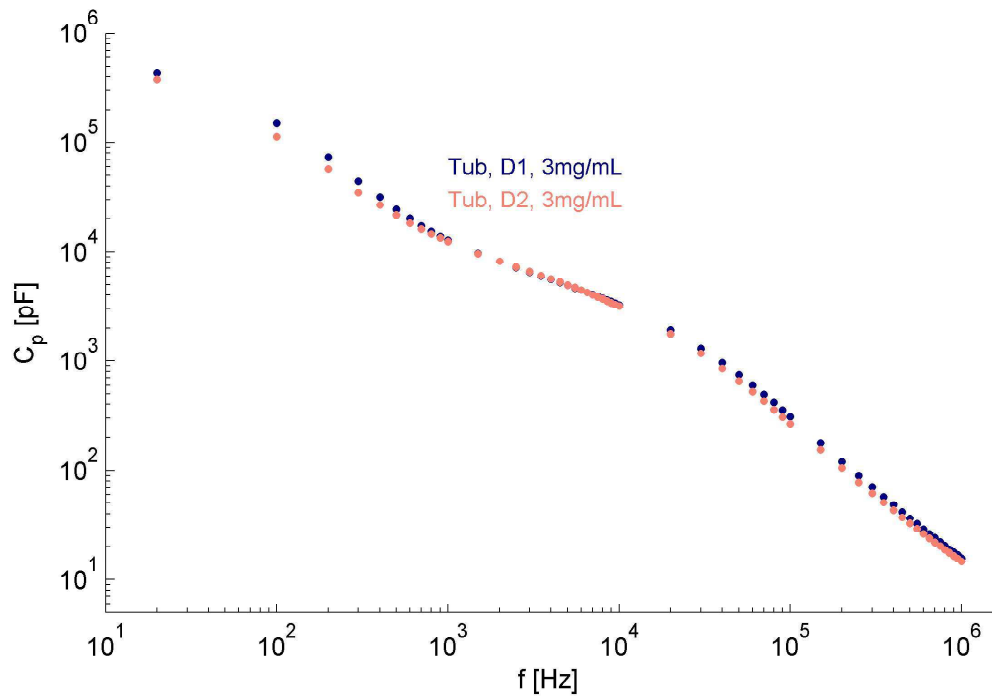
5.3.2 Frekvenční závislosti C_p a R_p tubulinu a puřovacího roztoku

Měření kapacity C_p a odporu R_p v závislosti na frekvenci bylo provedeno v rozsahu frekvencí od 20 Hz do 1 MHz při teplotě $T \in (26 - 28)^\circ\text{C}$. Závislosti byly měřeny pro oba vzorky (D1 a D2) dialýzou vyčištěných puřovacích roztoků bez tubulinu a také pro dva roztoky (D1 a D2) tubulinu o koncentraci $c = 3\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

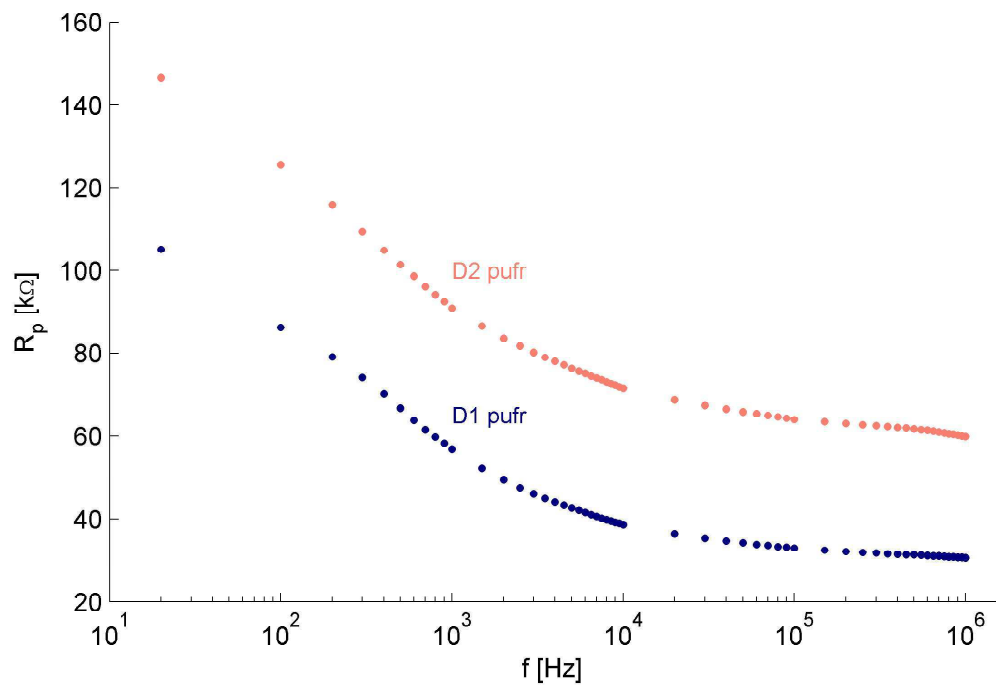
Výsledné závislosti jsou vykresleny v grafech Obrázek 5.38 - Obrázek 5.41. Na těchto křivkách si je možné povšimnout velkých rozdílů ve tvaru křivek mezi samotnými puřovacími roztoky a roztoky s tubulinem, a to především mezi frekvencemi 1 kHz až 10 kHz. Vezmeme-li k těmto závislostem v potaz i změnu chování fázového posunu Θ mezi frekvencemi $f_2 = 1\text{ kHz}$ a $f_3 = 1\text{ MHz}$, viz Obrázek 5.33 a Obrázek 5.34, je poměrně pravděpodobné, že právě v tomto frekvenčním rozsahu bude ležet hodnota rezonanční frekvence tubulinu.



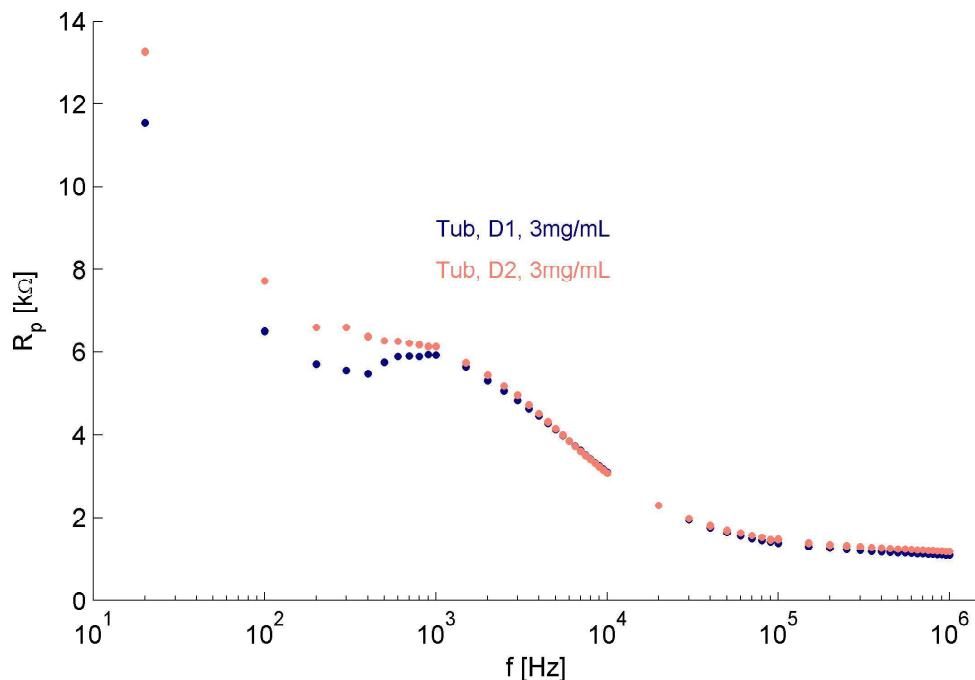
Obrázek 5.38: Závislost kapacity C_p puřovacích roztoků D1 a D2 na frekvenci.



Obrázek 5.39: Závislost kapacity C_p tubulinu v pufovacích roztocích D1 a D2 na frekvenci.



Obrázek 5.40: Závislost odporu R_p pufovacích roztoků D1 a D2 na frekvenci.



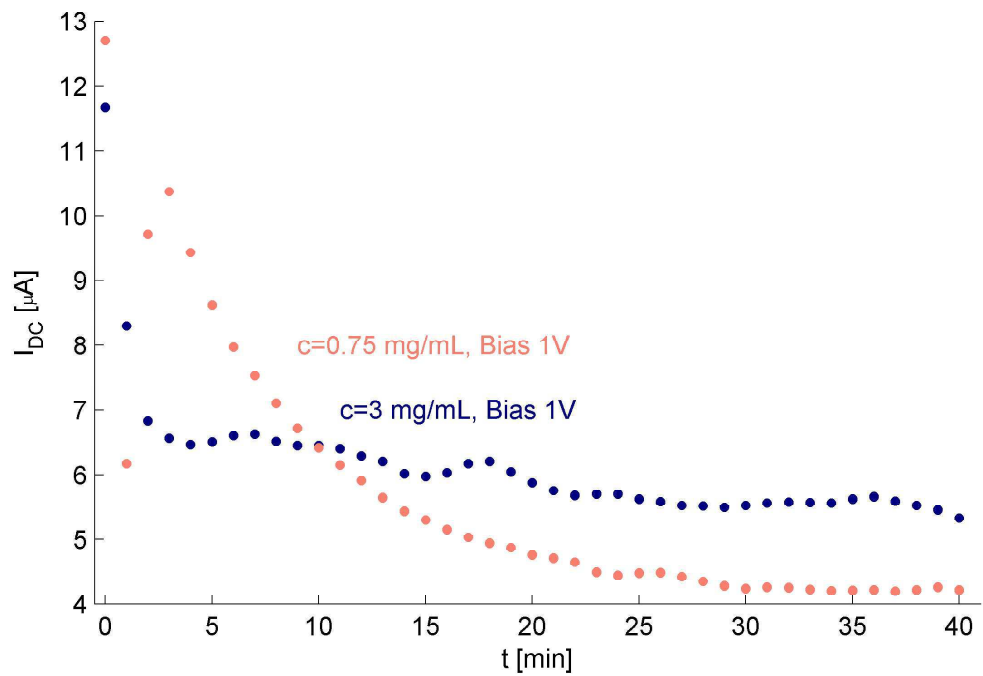
Obrázek 5.41: Závislost kapacity R_p tubulinu v pufovacích roztocích D1 a D2 na frekvenci.

5.3.3 Závislost I_{DC} na čase t

Měření závislosti stejnosměrného proudu I_{DC} na čase za konstantní vzdálenosti elektrod $d = (2,22 \pm 0,2)$ mm bylo provedeno pro dva roztoky o koncentracích $c = 0,75 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (ze vzorku D1) a $c = 3 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (ze vzorku D2) za použití předpětí $U = 1 \text{ V}$. Výsledky měření je možné vidět na grafu Obrázek 5.42.

V případě nižší z měřených koncentrací procházející proud od čtvrté minuty měření s drobnými fluktuacemi klesal. V tomto případě se ani po 40 minutách nevytvořila sraženina viditelná pouhým okem, tak jak tomu bylo u BSA. Z tohoto důvodu bylo měření opakováno pro vyšší koncentraci $c = 3 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Průběh proudu I_{DC} v závislosti na čase se pro koncentraci $c = 3 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ velmi podobá stejné závislosti naměřené pro BSA o koncentraci $c = 5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ viz Obrázek 5.20. V tomto případě byly zhruba již po 30 minutách viditelné velmi řídké sraženiny proteinu na rozích elektrody. Tyto sraženiny rostly, na rozdíl od BSA, velmi pomalu. Tento rozdíl v rychlosti růstu může být způsoben polovičním použitým objemem vzorku a tudíž menším počtem molekul, dále počet molekul tubulinu bude ve stejném vzorku méně než molekul BSA, neboť tubulinový dimer, ve kterých se protein přirozeně vyskytuje, je téměř dvakrát těžší než BSA. Vyšší hmotnost tubulinu může též ovlivnit jeho pohyblivost v roztoku.



Obrázek 5.42: Závislost stejnosměrného proudu I_{DC} na čase pro obě měřené koncentrace.

Závěr

V teoretické části této práce byl čtenář seznámen se základními vlastnostmi hovězího sérového albuminu (zkr. BSA) a vybranými krystalizačními metodami proteinů. Dále zde byly podrobněji popsány struktura, dynamická nestabilita, úloha v transportu látek a organel napříč buňkou a vybrané elektrické vlastnosti mikrotubulů a též některé vlastnosti jejich stavební jednotky dimerního proteinu tubulinu.

Hlavní experimentální náplní této práce bylo především měření závislosti kapacity C_p , odporu R_p , impedance Z , fázového posuvu Θ a měrné vodivosti σ na koncentraci proteinů BSA a tubulinu. Dále také určení závislosti kapacity C_p , odporu R_p a stejnosměrného proudu I_{DC} na vzdálenosti elektrod pro BSA a čistou Q-vodu. Při měření poslední jmenované závislosti byla pozorována tvorba sraženiny BSA na kladně nabitých elektrodě. Měření vzdálenostní závislosti stejnosměrného proudu bylo tímto růstem sraženiny velmi ovlivněno a z tohoto důvodu nebylo po zjištění růstu sraženiny i u tubulinu pro tubulin uskutečněno. Tvary závislosti kapacity C_p a odporu R_p na frekvenci společně se závislostí fázového posuvu Θ na koncentraci, měřené pro různé frekvence, poukazují na možný rozsah, ve kterém by mohla ležet hodnota rezonanční frekvence pro tubulinový dimer.

V předchozích experimentech naší skupiny bylo zjištěno, že při měření s hrotovou elektrodou došlo ke krystalizaci BSA na špičce hrotu. Jelikož by tato vrstva proteinu mohla být využita v dalších experimentech, byla krystalizace na hrotu a její reprodukovatelnost podrobena dalšímu zkoumání. Bohužel pokusy o krystalizaci skončily neúspěchem.

V souvislosti s krystalizačními pokusy a naším dlouhodobým cílem bylo provedeno měření aktivních ploch dvou hrotů. První z hrotů měl zahnutou špičku, a tudíž měl i poměrně velkou aktivní plochu, druhý hrot byl, dle pozorování pod mikroskopem, zatím nejlepším vyrobeným hrotem ve smyslu velikosti aktivní plochy, což bylo potvrzeno i následným měřením.

V budoucí experimentální činnosti by bylo vhodné se dále pokoušet o krystalizaci BSA na hrotové elektrodě a v případě úspěchu metodu otestovat i na dalších proteinech. Stejně tak by bylo vhodné podrobněji prozkoumat vlastnosti sraženiny proteinu na elektrodě, neboť se domnívám na základě pozorování pro koncentraci $c = 5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, že tento postup by mohl taktéž vést ke krystalizaci, bylo by ovšem zapotřebí ponechat formovat sraženinu podstatně déle. Avšak i pokud by tento postup nevedl ke krystalizaci, jsem si jist, že po lepším popsání vlastností sraženiny by tento jev našel uplatnění jako metoda pro zhuštění proteinu v určitém místě.

Seznam použité literatury

- [1] Sigma. Albumin from bovine serum (a4919) - product information sheet. https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/a4919pis.pdf, March 1997.
- [2] Daniel C Carter and Joseph X Ho. Structure of serum albumin. *Advances in protein chemistry*, 45:153–203, 1994.
- [3] JR Brown et al. Structure of bovine serum albumin. In *Fed. Proc*, volume 34, page b9, 1975.
- [4] Theodore Peters. Serum albumin. *Advances in protein chemistry*, 37:161–245, 1985.
- [5] Daniel Fologea, Bradley Ledden, David S McNabb, and Jiali Li. Electrical characterization of protein molecules by a solid-state nanopore. *Applied physics letters*, 91(5):053901, 2007.
- [6] Martin Alberto Masuelli. Study of bovine serum albumin solubility in aqueous solutions by intrinsic viscosity measurements. *Advances in Physical Chemistry*, 2013, 2013.
- [7] Phil G Squire, Peter Moser, and Chester T O’Konski. Hydrodynamic properties of bovine serum albumin monomer and dimer. *Biochemistry*, 7(12):4261–4272, 1968.
- [8] William Humphrey, Andrew Dalke, and Klaus Schulten. VMD – Visual Molecular Dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, 14:33–38, 1996.
- [9] Anna Bujacz. Structures of bovine, equine and leporine serum albumin. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 68(10):1278–1289, 2012.
- [10] Helen M. Berman, John Westbrook, Zukang Feng, Gary Gilliland, T. N. Bhat, Helge Weissig, Ilya N. Shindyalov, and Philip E. Bourne. The protein data bank. *Nucleic Acids Research*, 28(1):235, 2000.
- [11] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, D. Morgan, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter. *Molecular Biology of the Cell, Sixth Edition*:. Taylor & Francis Group, 2014.
- [12] Heng Chiat Tai. X-ray crystallographic studies of bovine serum albumin and helicobacter pylori thioredoxin-2. Master’s thesis, University of Saskatchewan, 2004.
- [13] Jakub Jung. Biodegradace environmentálních polutantů - krystalogeneze vybraného enzymu. Bakalářská práce, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, 2013.

- [14] Irene Russo Krauss, Filomena Sica, Carlo Andrea Mattia, and Antonello Merlino. Increasing the x-ray diffraction power of protein crystals by dehydration: the case of bovine serum albumin and a survey of literature data. *International journal of molecular sciences*, 13(3):3782–3800, 2012.
- [15] Muhammad Imran Al-haq, Eric Lebrasseur, Hidenori Tsuchiya, and Toru Torii. Protein crystallization under an electric field. *Crystallography Reviews*, 13(1):29–64, 2007.
- [16] CC Chin, JB Dence, and JC Warren. Crystallization of human placental estradiol 17beta-dehydrogenase. a new method for crystallizing labile enzymes. *Journal of Biological Chemistry*, 251(12):3700–3705, 1976.
- [17] Haruhiko Koizumi, Satoshi Uda, Kozo Fujiwara, Masaru Tachibana, K Kojima, and J Nozawa. Improvement of crystal quality for tetragonal hen egg white lysozyme crystals under application of an external alternating current electric field. *Journal of Applied Crystallography*, 46(1):25–29, 2013.
- [18] M Taleb, C Didierjean, C Jelsch, JP Mangeot, B Capelle, and A Aubry. Crystallization of proteins under an external electric field. *Journal of crystal growth*, 200(3):575–582, 1999.
- [19] N. Mirkin, B. A. Frontana-Uribe, A. Rodríguez-Romero, A. Hernández-Santoyo, and A. Moreno. The influence of an internal electric field upon protein crystallization using the gel-acupuncture method. *Acta Crystallographica Section D*, 59(9):1533–1538, Sep 2003.
- [20] Gen Sazaki, Abel Moreno, and Kazuo Nakajima. Novel coupling effects of the magnetic and electric fields on protein crystallization. *Journal of crystal growth*, 262(1):499–502, 2004.
- [21] Julian Lewis Martin Raff Keith Roberts Peter Walter Bruce Alberts, Alexander Johnson. *Molecular Biology of the Cell, 5th Editon*. New York : Garland Science, 2008.
- [22] B. l Alberts. *Základy buněčné biologie*. Espero Publishing, Ústí nad Labem, 1998.
- [23] Eva Nogales, Sharon G Wolf, and Kenneth H Downing. Structure of the $\alpha\beta$ tubulin dimer by electron crystallography. *Nature*, 391(6663):199–203, 1998.
- [24] Howard Stebbings and Cheryl Hunt. The nature of the clear zone around microtubules. *Cell and tissue research*, 227(3):609–617, 1982.
- [25] A. Mershin, A.A. Kolomenski, H.A. Schuessler, and D.V. Nanopoulos. Tubulin dipole moment, dielectric constant and quantum behavior: computer simulations, experimental results and suggestions. *Biosystems*, 77(13):73 – 85, 2004.
- [26] JA Tuszynski, JA Brown, EJ Carpenter, E Crawford, and MNA Nip. Electrostatic properties of tubulin and microtubules. In *Proceedings of ESA Conference*, 2002.

- [27] Jan Löwe, H Li, KH Downing, and E Nogales. Refined structure of $\alpha\beta$ -tubulin at 3.5 Å resolution. *Journal of molecular biology*, 313(5):1045–1057, 2001.
- [28] Pierre Dustin. *Microtubules*. Springer Science & Business Media, 2012.
- [29] Dennis Bray. Stops and starts in microtubules. *Nature*, 280:537, 1979.
- [30] Indira Rajagopal. The cytoskeleton. <http://oregonstate.edu/instruction/bi314/summer09/fig-12-42-0.jpg>, 2009.
- [31] JA Tuszyński, T Luchko, S Portet, and JM Dixon. Anisotropic elastic properties of microtubules. *The European Physical Journal E*, 17(1):29–35, 2005.
- [32] H. R. Saeidi, A. Lohrasebi, and K. Mahnam. External electric field effects on the mechanical properties of the $\alpha\beta$ -tubulin dimer of microtubules: a molecular dynamics study. *Journal of Molecular Modeling*, 20(8):1–7, 2014.
- [33] JA Brown and JA Tuszynski. A review of the ferroelectric model of microtubules. *Ferroelectrics*, 220(1):141–155, 1999.
- [34] Peter M. Vassilev, Reni T. Dronzine, Maria P. Vassileva, and Georgi A. Georgiev. Parallel arrays of microtubules formed in electric and magnetic fields. *Bioscience Reports*, 2(12):1025–1029, 1982.
- [35] R.R. Ramalho, H. Soares, and L.V. Melo. Microtubule behavior under strong electromagnetic fields. *Materials Science and Engineering: C*, 27(58):1207 – 1210, 2007. {EMRS} 2006 Symposium A: Current Trends in Nanoscience - from Materials to Applications.
- [36] Jan Fousek. Joseph valasek and the discovery of ferroelectricity. In *Applications of Ferroelectrics, 1994. ISAF'94., Proceedings of the Ninth IEEE International Symposium on*, pages 1–5. IEEE, 1991.
- [37] JA Tuszyński, S Hameroff, MV Satarić, B Trpisova, and MLA Nip. Ferroelectric behavior in microtubule dipole lattices: implications for information processing, signaling and assembly/disassembly. *Journal of Theoretical Biology*, 174(4):371–380, 1995.
- [38] EE Slyadnikov. Physical model and the associative memory of a cytoskeleton microtubule as a system of dipoles. *Technical Physics*, 52(7):898–906, 2007.
- [39] EE Slyadnikov. Interrelation between physical and information characteristics near the point of ferroelectric transition in the dipole system of a cytoskeleton microtubule. *Technical Physics*, 54(7):927–938, 2009.
- [40] EE Slyadnikov. Microscopic model and phase diagram of the dipole system of a cytoskeleton microtubule at finite temperatures. *Technical Physics*, 55(5):622–629, 2010.
- [41] Boyan K Garvalov, Benoît Zuber, Cédric Bouchet-Marquis, Mikhail Kudryashov, Manuela Gruska, Martin Beck, Andrew Leis, Friedrich Frischknecht, Frank Bradke, Wolfgang Baumeister, et al. Luminal particles within cellular microtubules. *The Journal of cell biology*, 174(6):759–765, 2006.

- [42] Klavdija Vasilievna Šalimovova. *Fyzika polovodičov*. Bratislava : Alfa, 1978.
- [43] Kristýna Kohoutová. Experimentální studium elektrických a optických vlastností mikrotubulů in vitro a in vivo a vliv elektrických, magnetických a optických polí na aktivitu neuronu. Bakalářská práce, České vysoké učení technické v Praze, 2017.
- [44] Last Software and Google. Sketchup, 15.2.685 64-bit. <https://www.sketchup.com>, 2014.

Symbols a zkratky

Důležité veličiny, konstanty a zkratky použité v textu. Některé z nich mohou mít více významů, proto je daný význam upřesněn na daném místě v textu.

Symbols

M	[Da]	molekulová hmotnost
Da		1Da (Dalton) = $1,66054 \cdot 10^{-27}$ kg
pI	[-]	izoelektrický bod
p	[C·m]	dipólový moment
D		1 D (debye) = $3,33564 \cdot 10^{-7}$ C·m
P	[C·m ⁻²]	elektrická polarizace
E	[V·m ⁻¹]	intenzita elektrického pole
T	[K]	teplota
σ	[S·m ⁻²]	měrná vodivost (1 S (Siemens) = $1 \Omega^{-1}$)
(w/v)	[%]	hmotnostní zlomek

Zkratky

BSA	-	Bovine Serum Albumin
MPEG	-	Methoxy Polyethylene Glycol
GTP	-	Guanosin-tri-fosfát
GDP	-	Guanosin-di-fosfát
MAPs	-	Microtubule-associated proteins
ATP	-	Adenosin-tri-fosfát
ADP	-	Adenosin-di-fosfát
HVT	-	Teorie skrytých proměnných
BBO	-	Beta baryum borat
Q-voda	-	Millipore-Q watter

Přílohy

5.4 Tabulky hodnot

5.4.1 Aktivní plocha hrotu

f [kHz]	0,02	1	1000	0,02	1	1000
U [mV]	1000	1000	1000	10	10	10
$R_{p,H}$ [M Ω]	26,9	17,6	2,1	124,0	28,9	2,2
$R_{p,D}$ [M Ω]	0,153	0,136	0,116	0,153	0,135	0,116
S_H [mm ²]	0,0956	0,1297	0,9114	0,0208	0,0786	0,8942

Tabulka 5.3: Vypočtené hodnoty aktivní plochy hrotu A pro dané parametry ve vzdálenosti $d = (1,0 \pm 0,2)$ mm.

f [kHz]	0,02	1	1000	0,02	1	1000
U [mV]	1000	1000	1000	10	10	10
$R_{p,H}$ [M Ω]	775,8	238,4	3,33	570,0	355,1	3,35
$R_{p,D}$ [M Ω]	0,167	0,086	0,058	0,181	0,085	0,059
S_H [mm ²]	0,0036	0,0061	0,2953	0,0053	0,0040	0,2942

Tabulka 5.4: Vypočtené hodnoty aktivní plochy hrotu B pro dané parametry ve vzdálenosti $d = (1,0 \pm 0,2)$ mm.

f [kHz]	0,02	1	1000
U [V]	1	1	1
$R_{p,H}$ [M Ω]	115,22	44,72	5,83
$R_{p,D}$ [M Ω]	0,28	0,23	0,15
S_H [mm ²]	0,0405	0,0859	0,4456

Tabulka 5.5: Vypočtené hodnoty aktivní plochy hrotu B pro dané parametry ve vzdálenosti $d = (6,0 \pm 0,2)$ mm.