

Biofizyka

(1100-114BFIZ11)

Jan M. Antosiewicz

**Zakład Biofizyki
Instytut Fizyki Doświadczalnej
Wydział Fizyki**

Wykład 7

1 kwietnia, 2025

Kinetyka biomolekularna (cz. 3)

<http://www.fuw.edu.pl/~jantosi/>

jantosi@fuw.edu.pl

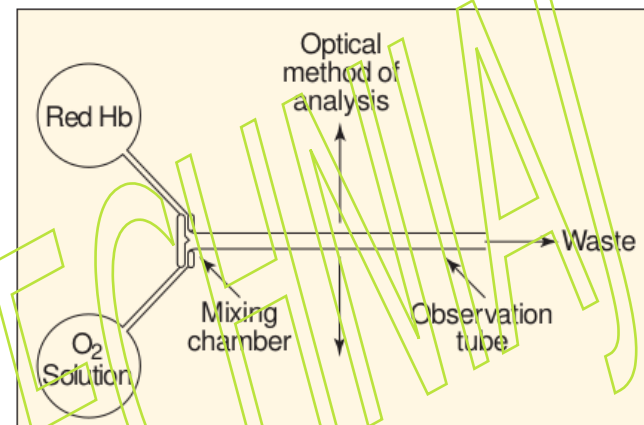
Metody kinetyczne z szybkim mieszaniem roztworów reagentów

PROCEEDINGS OF THE ROYAL SOCIETY A MATHEMATICAL, PHYSICAL & ENGINEERING SCIENCES

A Method of Measuring the Velocity of Very Rapid Chemical Reactions

H. Hartridge and F. J. W. Roughton

Proc. R. Soc. Lond. A 1923 **104**, doi: 10.1098/rspa.1923.0116, published 1 October 1923



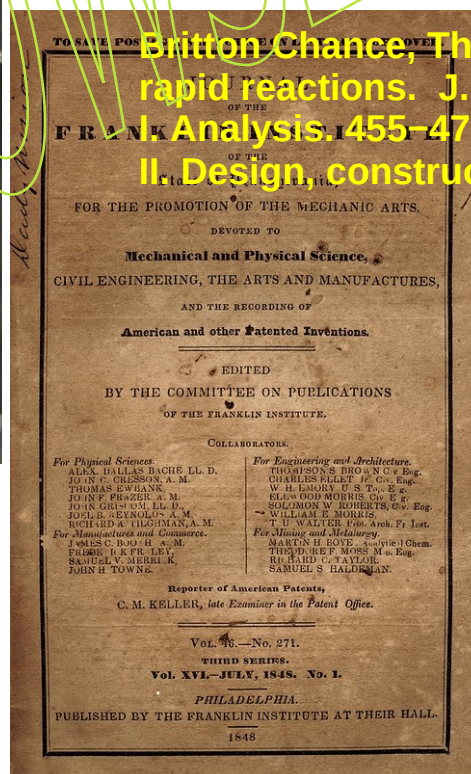
Schematyczna reprezentacja metody przepływu ciągłego Hartridge'a i Roughtona do pomiaru szybkich reakcji łączenia tlenu z hemoglobina (H. Gutfreund, TIBS 24:457-460, 1999).



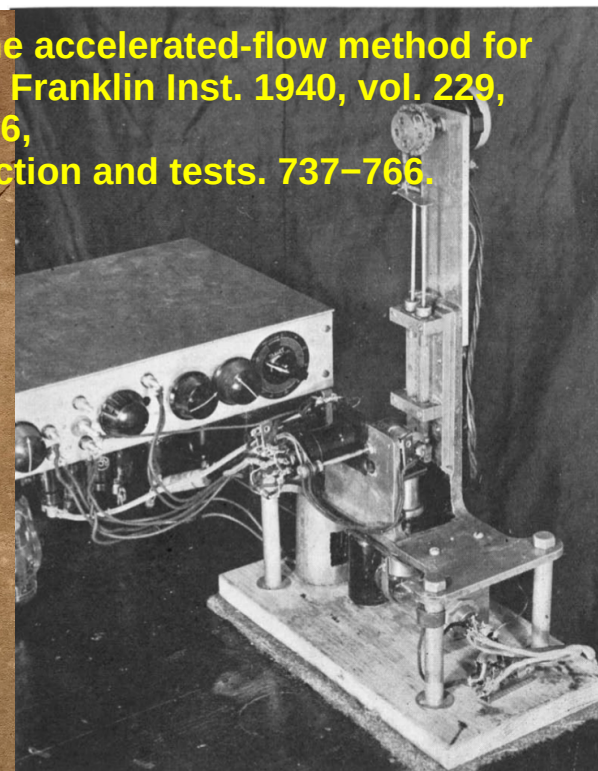
Hamilton Hartridge 1886-1976

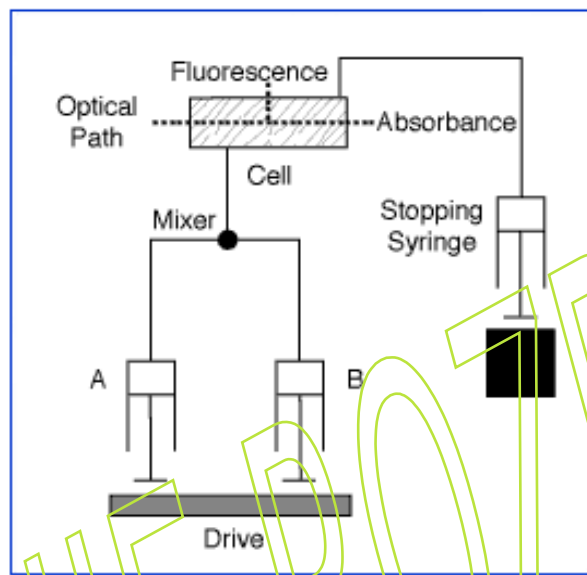
Francis John Worsley Roughton 1899-1972.

Britton Chance 1913-2010

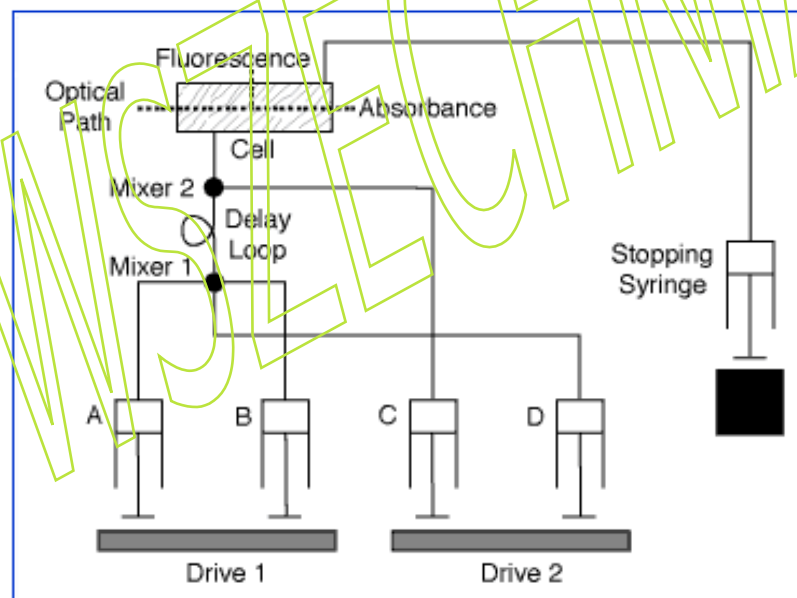


Britton Chance, The accelerated-flow method for rapid reactions. *J. Franklin Inst.* 1940, vol. 229, Analysis, 455-476, II. Design, construction and tests. 737-766.





Single Mixing Stopped-Flow



Double Mixing Stopped-Flow

SX20 (Applied Photophysics Ltd.)

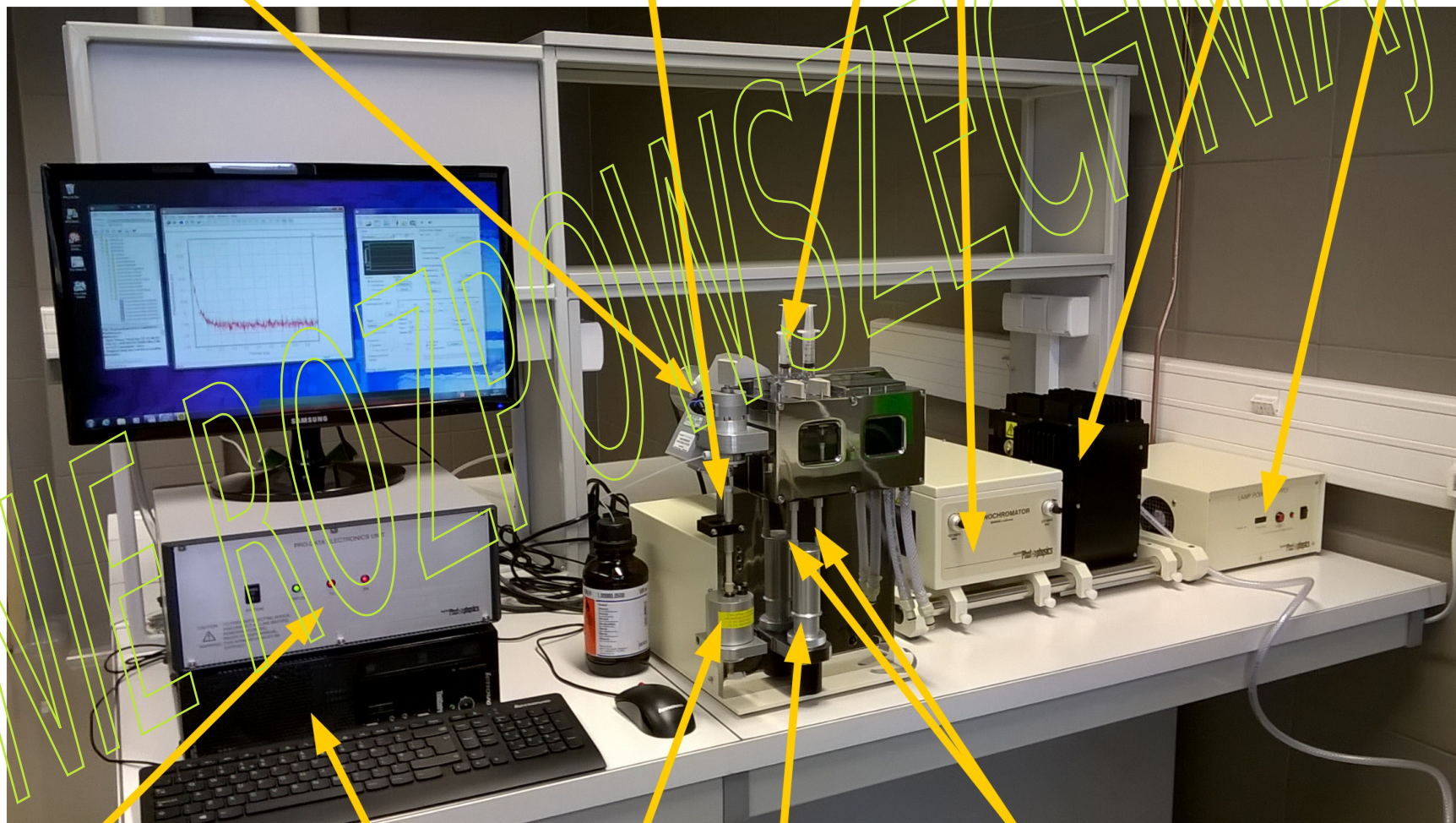
naczynie pomiarowe
i detektory

strzykawka odbiorcza

strzykawki zewnętrzne

monochromator

zasilacz lampy
lampa



kontroler spektrometru komputer

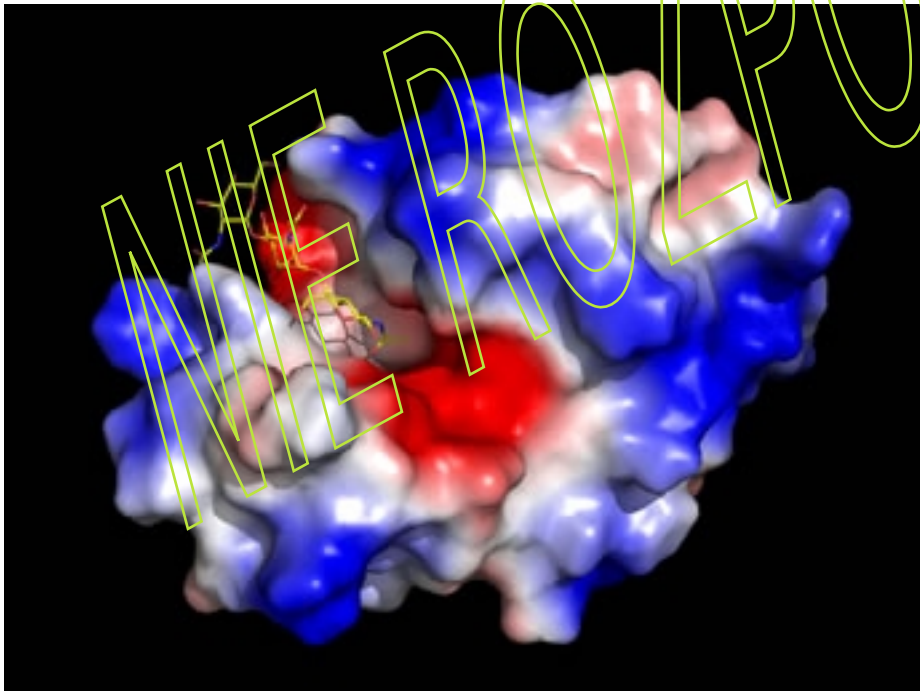
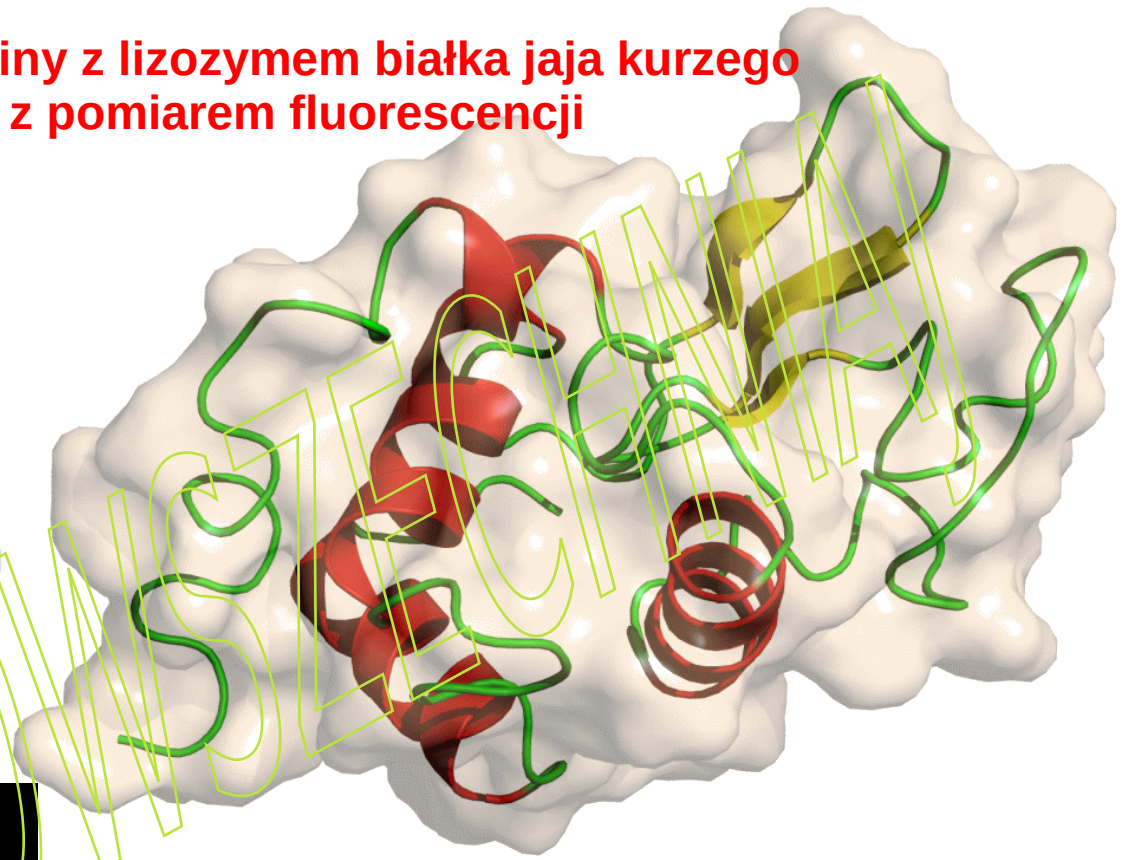
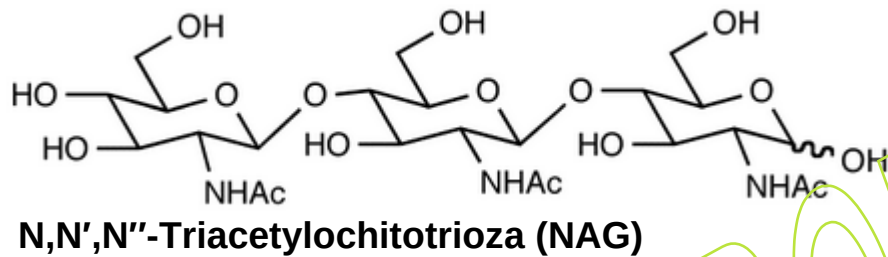
triger

tłok popychający

strzykawki termostatowane

czas martwy ok. 1 ms

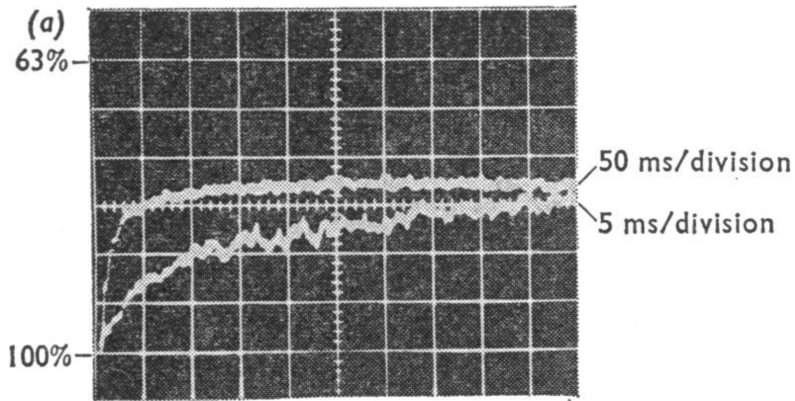
Wiązanie trimeru N-acetylo-D-glukozaminy z lizozymem białka jaja kurzego badane w spektrometrze stopped-flow z pomiarem fluorescencji tryptofanowej.



Model cząsteczki lizozymu z białka jaja kurzego (hen egg white lysozyme, HEWL) opracowany w oparciu o dane struktury atomowej określonej metodami dyfrakcji promieni X na kryształach (132L.pdb). Źródło rysunku: Wikipedia.

Kompleks lizozymu i N,N',N''-Triacetylchitotriozy. Białko przedstawione w postaci powierzchni dostępnej dla rozpuszczalnika, pokolorowanej zgodnie z potencjałem elektrycznym (ujemny na czerwono, dodatni na niebiesko i zerowy na białło). N,N',N''-Triacetylchitotriosa przedstawiona jest jako układ pałeczek obrazujących wiązania chemiczne.

Eksperymenty kinetyczne Halforda



pH 4.4, wzb. 290 nm, emisja przez filtr pasmowy 325-380 nm
Lizozym 15 μM , NAG₃ 50 μM

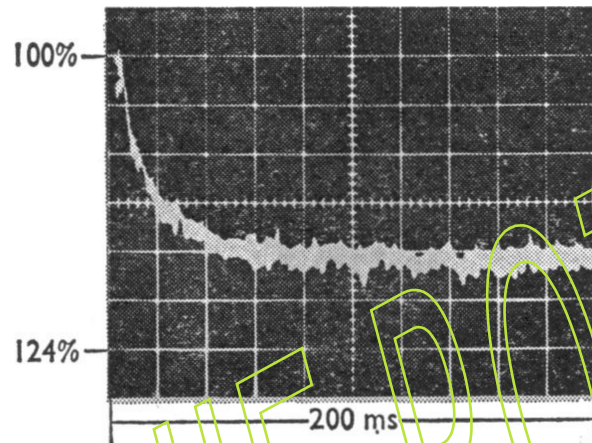
$$k_{+1} = 1.5 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$$

$$k_{-1} = 125 \text{ s}^{-1}$$

$$k_{+2} = 220 \text{ s}^{-1}$$

$$k_{-2} = 30 \text{ s}^{-1}$$

k_{+2} and k_{-2} z innych, pomocniczych eksperymentów



pH 7.4, wzb. 290 nm, emisja przez
filtr pasmowy 325-380 nm

Lizozym 15 μM , NAG₃ 50 μM

$$k_{+2} = 235 \text{ s}^{-1}$$

$$k_{-2} = 15 \text{ s}^{-1}$$



pH 5.9, wzb. 290 nm, emisja przez filtry interferencyjne* 369 nm (a)
i 323 nm (b)

Lizozym 10 μM , NAG₃ 250 μM

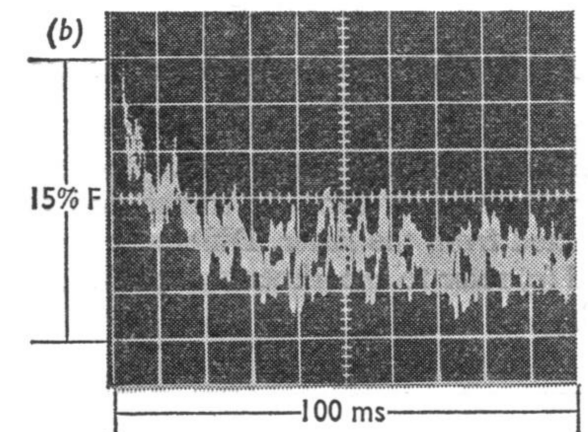
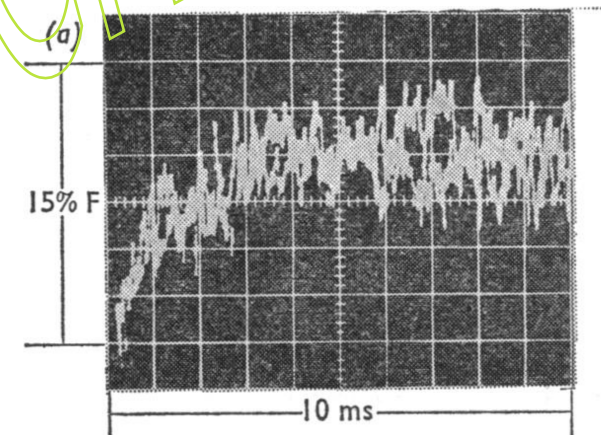
$$k_{+1} = 1.75 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$$

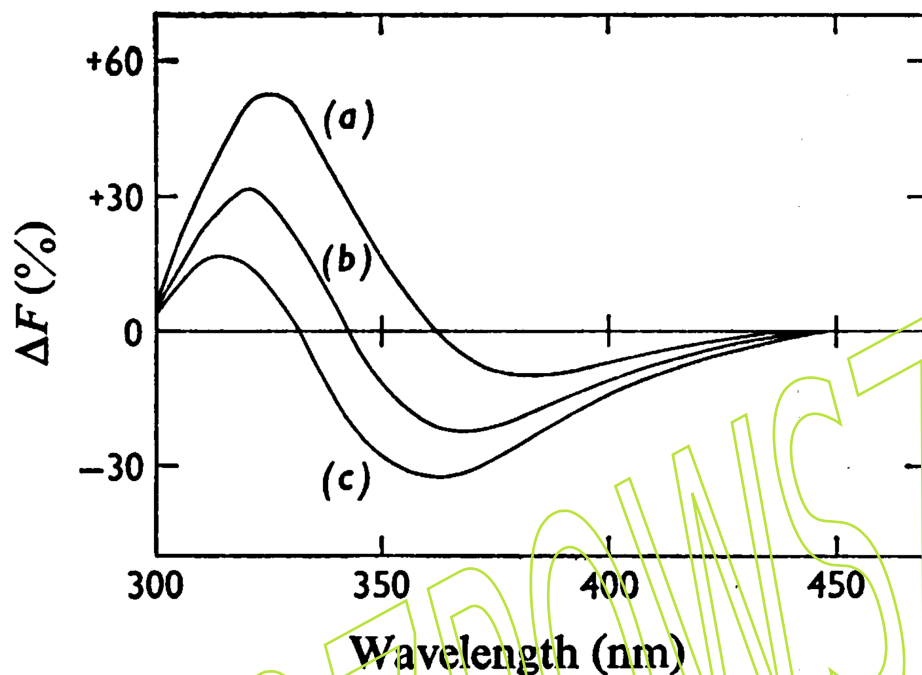
$$k_{-1} = 140 \text{ s}^{-1}$$

$$k_{+2} = 115 \text{ s}^{-1}$$

$$k_{-2} = 10 \text{ s}^{-1}$$

*Filtry interferencyjne wykorzystują efekt interferencji fal w celu otrzymania żądanej transmisji pożądanego, stosunkowo wąskiego przedziału widmowego.





LYS-NAG – LYS widma różnicowe:
(a) pH 7.4; (b) pH 5.9; (c) pH 4.4

Fig. 7. *Fluorescence-difference spectra*

Różnicowe widmo fluorescencji pomiędzy kompleksem lizozymu z trimerem GlcNAc a wolnym enzymem wykazuje dodatnie pasmo przy niskich długościach fal (około 325 nm) i ujemne pasmo przy dłuższych długościach fal (około 380 nm).

Przy pH 7,4 amplituda ujemnego pasma jest nieistotna w porównaniu z pasmem dodatnim, a zatem krzywe postępu reakcji w eksperymencie stopped-flow pokazują wzmocnienie fluorescencji. Odwrotnie, przy pH 4,4 nieistotność pasma dodatniego w porównaniu z ujemnym skutkują tym, że krzywe postępu reakcji pokazują wygaszanie fluorescencji w procesie tworenia kompleksów lizozymu z trimerem GlcNAc.

Dzięki takiemu rozróżnieniu widmowemu oraz propozycjom wyróżnienia dwóch reszt tryptofanu, Trp-62 i Trp-108, opisanemu w literaturze, jako najbardziej wydajnych źródeł fluorescencji, pozwoliły Halordowi przypisać wygaszanie fluorescencji obserwowanemu w dwucząsteczkowym etapie wiązania trimery GlcNAc przy pH 4.4 do tryptofanu-62, a wzmocnienie fluorescencji obserwowane podczas późniejszej rearanżacji kompleksu enzym-ligand przy pH 7.4 przypisać do tryptofanu-108.



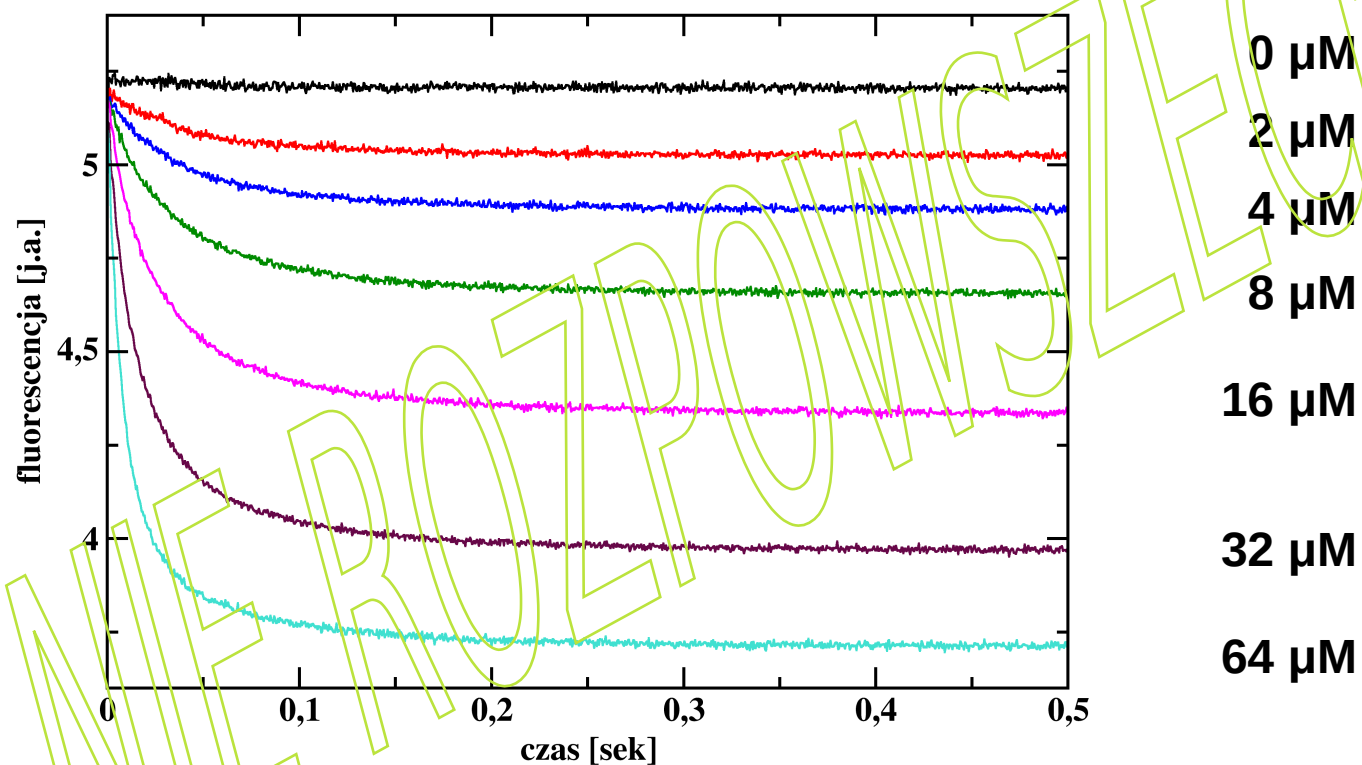
one-step mechanism



two-steps mechanism

Eksperymenty stopped-flow na układzie lizozym:NAG w spektrometrze SX20

Lizozym 8 μM mieszany z NAG₃ w 20 mM buforze glicyna-HCl pH 3.2 o stężeniu:
Temperatura pomiarów 20 °C



```
[task]
  task = fit
  data = progress
  model = one-step ?
[mechanism]
  PP + L <==> PC                : ka1 kd1
[constants]
  ka1 = 1.9055 ?
  kd1 = 10.0 ?
[concentrations]
  PP = 4.0
[responses]
  PP = 1.295522388
  PC = 1.00962 ?
  L = 0.0
[data]
  directory ./LIZOZYM-NAG3/DynaFit
  extension txt
  file chit02uM-lysozym8.0uM
  concentration L = 1.0
  offset 0.0 ?
  .
  .
  .
  file chit64uM-lysozym8.0uM
  concentration L = 32.0
  offset 0.0 ?
[output]
  directory ./LIZOZYM-NAG3/DynaFit/output-4-models
[settings]
  .
  .
  .
[task]
  task = fit
  data = progress
  model = two-steps ?
[mechanism]
  PP + L <==> PC                : ka1 kd1
  PC <==> PK                    : kf1 kb1
[constants]
  ka1 = 1.9055 ?
  kd1 = 20.0 ?
  kf1 = 20. ?
  kb1 = 20. ?
[responses]
  PP = 1.295522388
  PC = 1.00962 ?
  PK = 0.9 ?
```

Akaike Information Criterion

$$AIC_c = n \cdot \log \left(\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (v_i - \hat{v}_i)^2 \right) + 2p + \frac{2p(p+1)}{n-p-1}$$

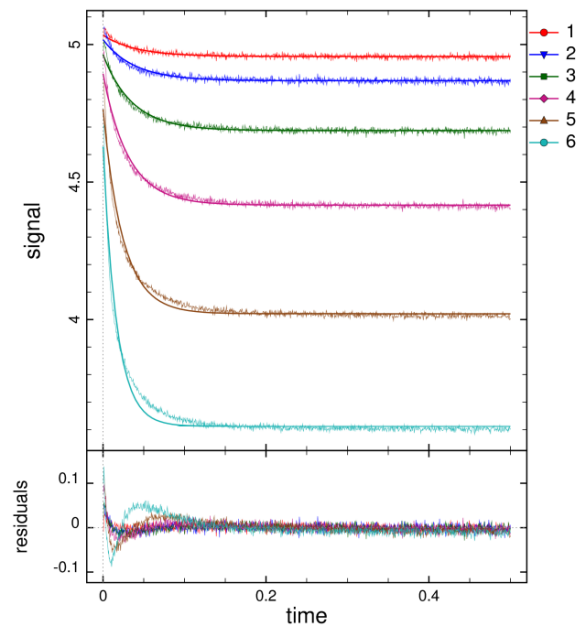
$$\Delta_i = AIC_c^i - AIC_c^{min}; \quad w_i = \frac{\exp(-\frac{1}{2} \Delta_i)}{\sum_{r=1}^R \exp(-\frac{1}{2} \Delta_r)}$$

Bayesian Information Criterion

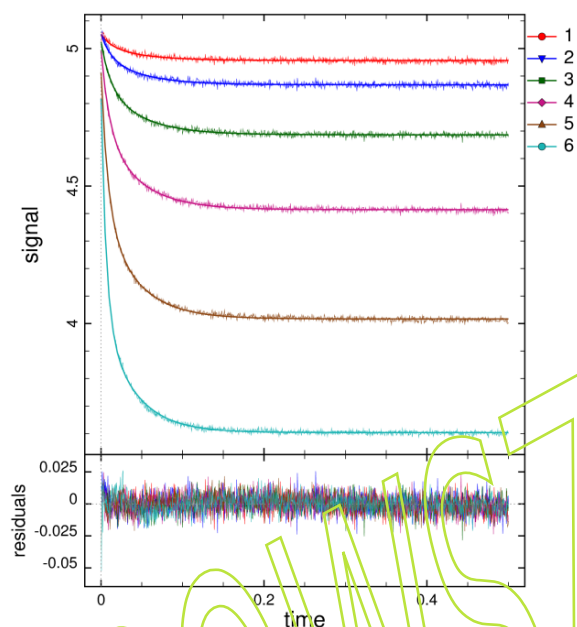
$$BIC_c = n \cdot \log \left(\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (v_i - \hat{v}_i)^2 \right) + p \log(n)$$

$$\Delta_i = BIC_c^i - BIC_c^{min}; \quad w_i = \frac{\exp(-\frac{1}{2} \Delta_i)}{\sum_{r=1}^R \exp(-\frac{1}{2} \Delta_r)}$$

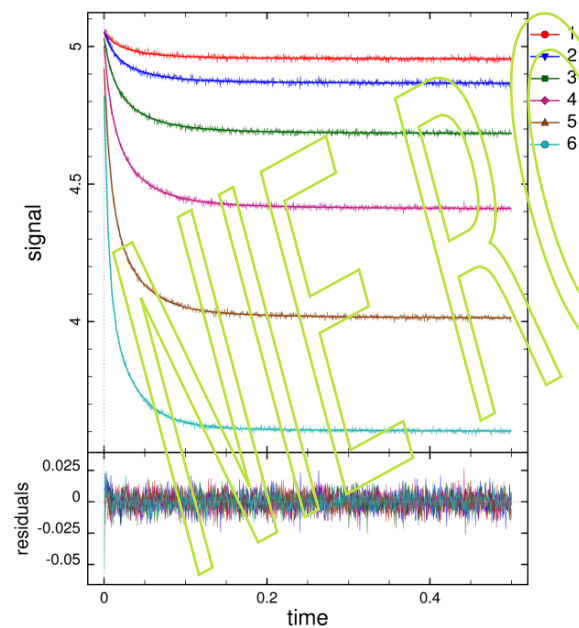
p = liczba parametrów; n = liczba punktów pomiarowych



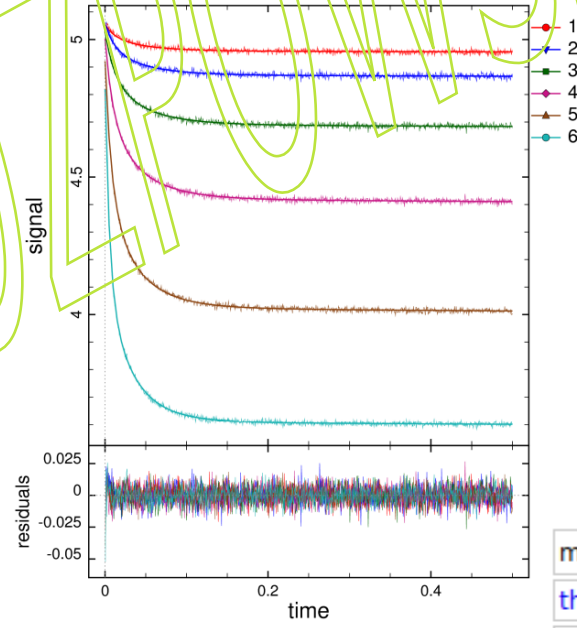
jeden etap



dwa etapy



trzy etapy



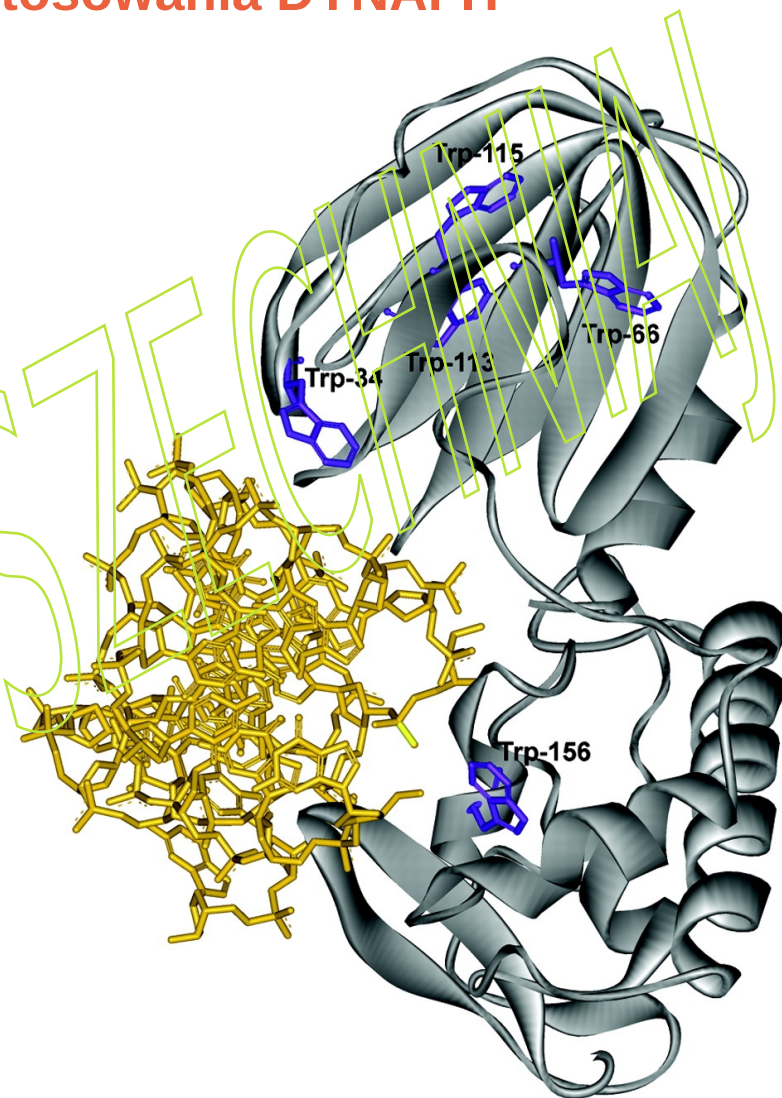
cztery etapy

Model	Parameter	Value	StdErr	CV %
one-step	ka1	1.69	0.0087	4.4
	kd1	10.3	0.078	6.5
	rPC	0.932	0.0015	1.4
two-steps	ka1	3	0.015	3.8
	kd1	25.3	0.26	7.8
	kf1	4.94	0.13	19.8
	kb1	13.1	0.082	4.6
	rPC	0.926	0.0014	1.1
	rPK	0.728	0.0044	4.5
three-steps	ka1	3.54	0.047	8.9
	kd1	56.8	2.7	31.4
	kf1	46.6	4.2	59.8
	kb1	39.9	1.6	26.9
	kf2	3.26	0.22	45.5
	kb2	11.7	0.2	11.5
	rPC	0.899	0.0053	3.9
	rPK	0.863	0.0048	3.7
	rPQ	0.641	0.013	13.3
	ka1	3.74	0.2	33.2
four-steps	kd1	66.6	13	118.8
	kf1	54.1	18	196.5
	kb1	38.5	17	275.6
	kf2	3.93	46	7070.4
	kb2	42.4	1.1e+003	15621.3
	kf3	70.3	1.4e+002	1213.5
	kb3	38.5	1e+003	15727.9
	rPC	0.917	0.021	13.7
	rPK	0.809	0.07	52.7
	rPQ	2.3	17	4558.5
	rPR	6.5e-007	29	27115981292.9

model ID	np	SSQ _r	ΔAIC	ΔBIC	WAIC	WBIC	parameters
three-steps	15	1.001	0.0	0.0	0.632	1.000	OK
four-steps	18	1.000	1.1	21.2	0.368	0.000	FAIL:CV
two-steps	12	1.122	680.0	659.9	0.000	0.000	OK
one-step	9	7.177	11796.1	11755.9	0.000	0.000	OK

Bardziej zaawansowane zastosowania DYNAFIT

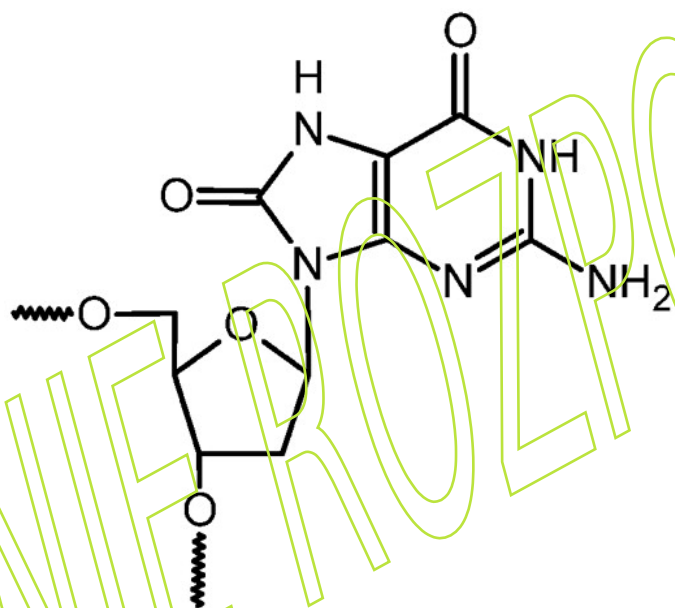
Glikozylazy DNA to rodzina enzymów biorących udział w naprawie wycięcia zasad. Formamidopirymidyna-DNA-glikozylaza (białko Fpg, MutM) katalizuje wycięcie 8-oksoguaniny (8-oksoG) i innych oksydacyjnie uszkodzonych puryn z DNA w reakcji glikozylazy/bez puryny/bez pirymidyny (miejsce „abasyczne”). W niniejszym artykule przedstawiono analizę kinetyczną działania Fpg w stanie przedustalonym na duplekсы oligonukleotydów zawierających 8-okso-2'-deoksyguanozynę, naturalne miejsce abasyczne lub tetrahydrofuran (nierozszczepialny analog miejsca abasycznego). Monitorowanie wewnętrznej fluorescencji tryptofanu Fpg w eksperymentach z zatrzymanym przepływem ujawnia liczne przejścia konformacyjne w cząsteczce białka podczas cyklu katalitycznego.



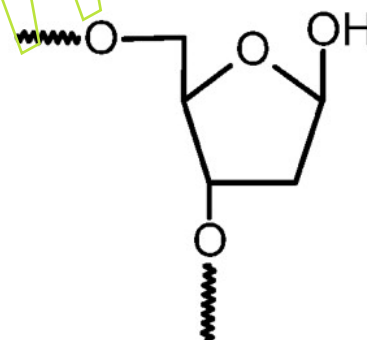
Reszty tryptofanu w strukturze Fpg. Wstęgowa reprezentacja białka jest pokazana z DNA w postaci żółtych patyczków. Łańcuchy boczne reszt tryptofanu są pokazane jako niebieskie patyczkach i opisane numerami.

Zastosowanie podejścia spektrofлуorymetrii stopped-flow do zbadania mechanizmu kinetycznego wycinania 8-oxoG z DNA przez Fpg, przy użyciu dupleksowego dodekameru zawierającego 8-oxoG jako substratu i śledzeniu wewnętrznej fluorescencji tryptofanu przez enzym, ujawniło liczne zmiany konformacyjne w białku Fpg podczas procesu katalitycznego (fitowania z użyciem DynaFit).

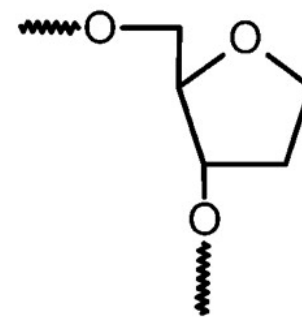
Aby lepiej zrozumieć naturę każdej fazy, badane są skutki zmian strukturalnych w miejscu uszkodzenia na kinetykę działania Fpg. Stosowane są specyficzne substraty i nierozszczepialne ligandy zawierające albo 8-oxoG, naturalne miejsce AP (apurynowy/apirymidynowy), albo reszty tetrahydrofuranu (F, nierozszczepialny analog miejsca AP).



8-oxoG



AP



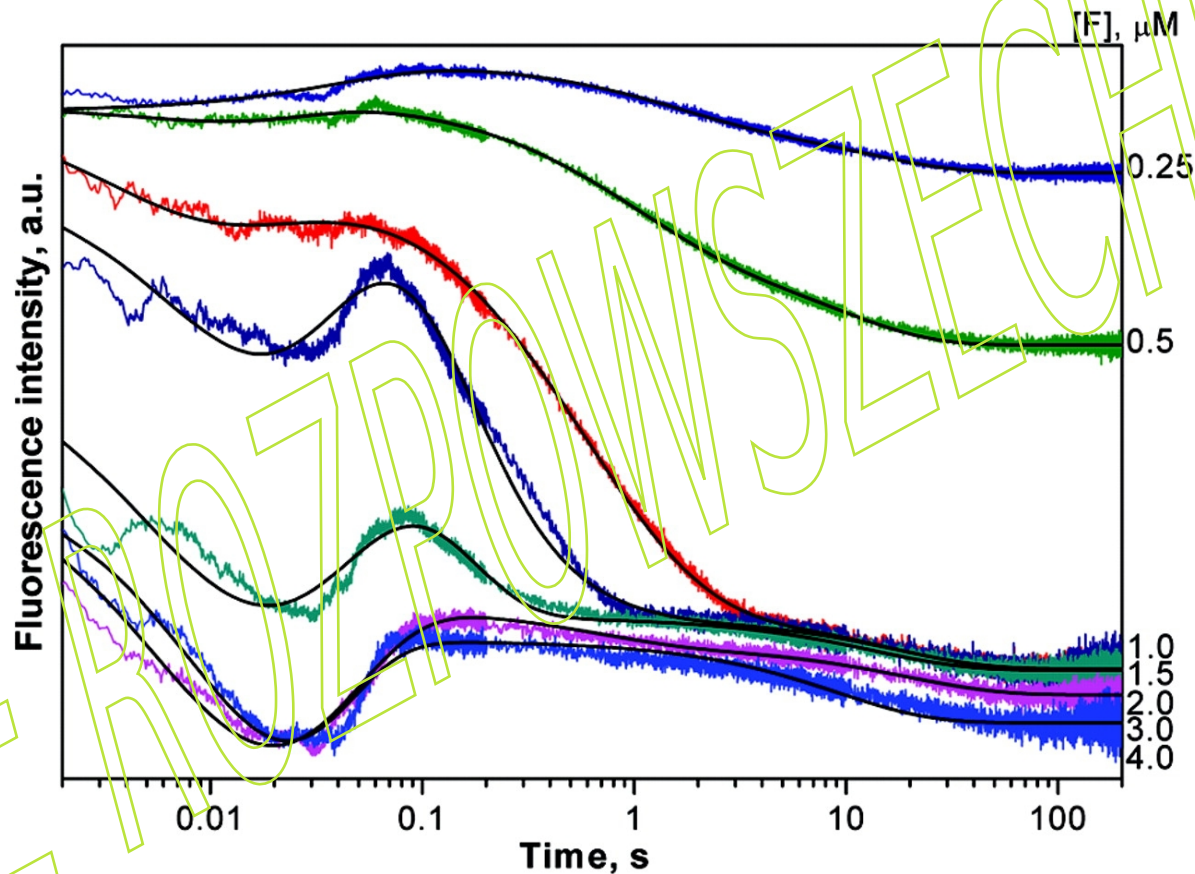
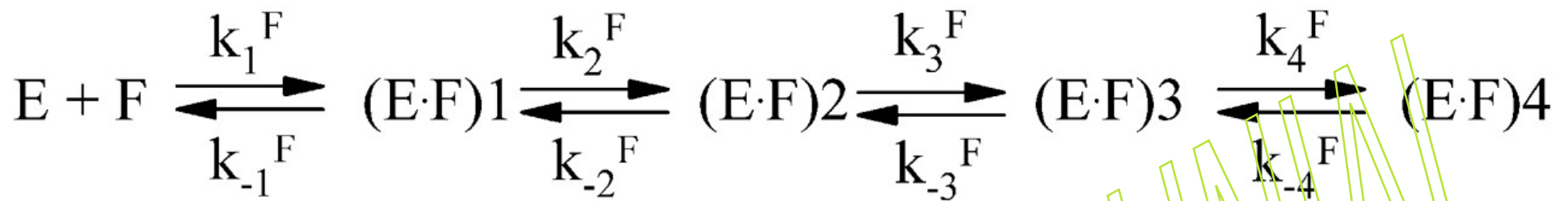
F

Struktury uszkodzeń DNA wykorzystane w tej pracy.

8-OxoG = 8-oxo-2'-deoxyguanozyna;

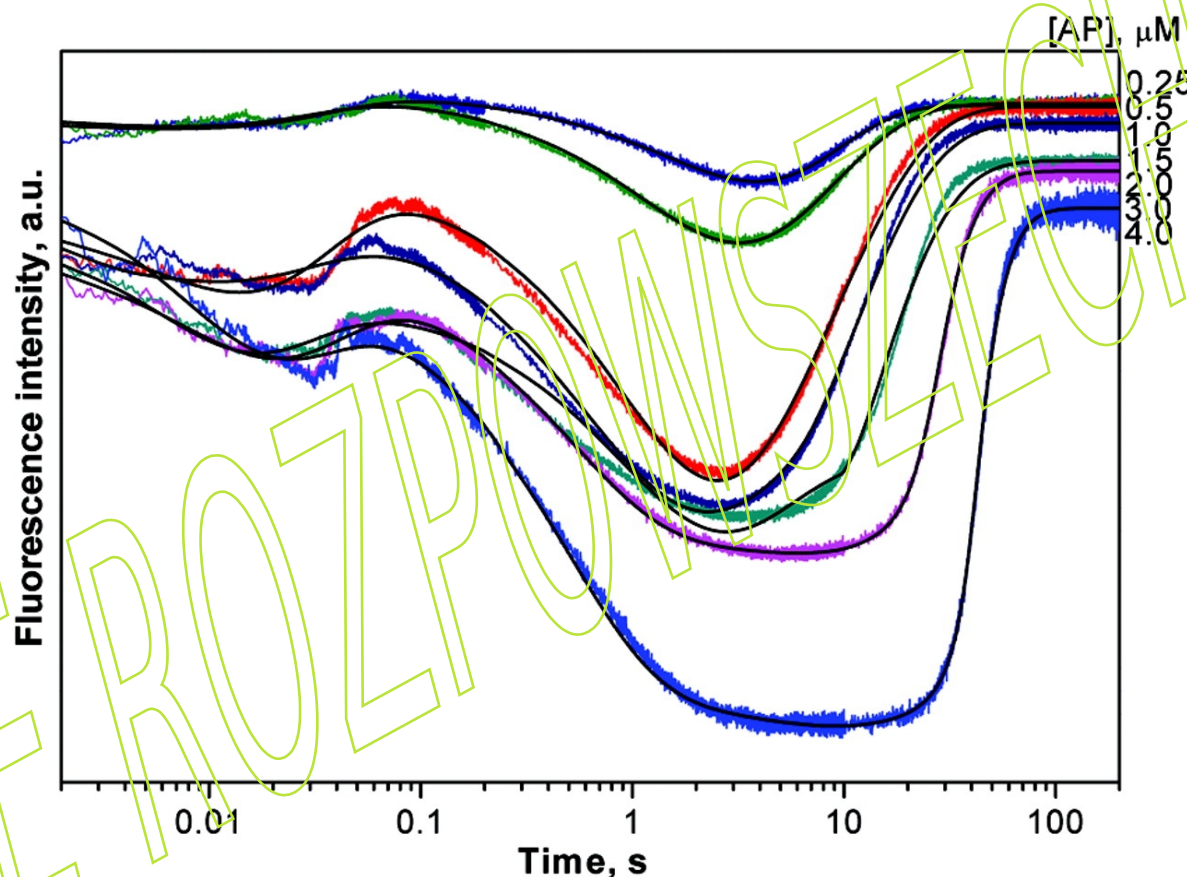
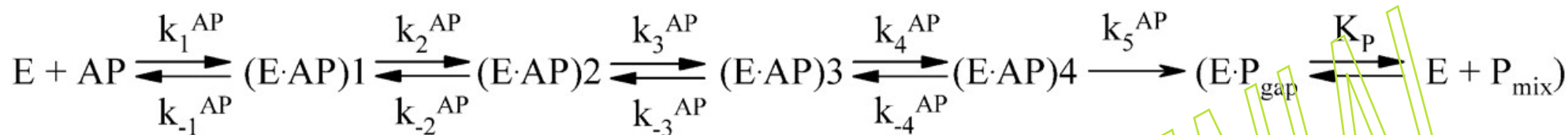
AP = miejsce bez zasady nukleinowej;

F = tetrahydrofuran jako analog miejsce bez zasady nukleinowej.



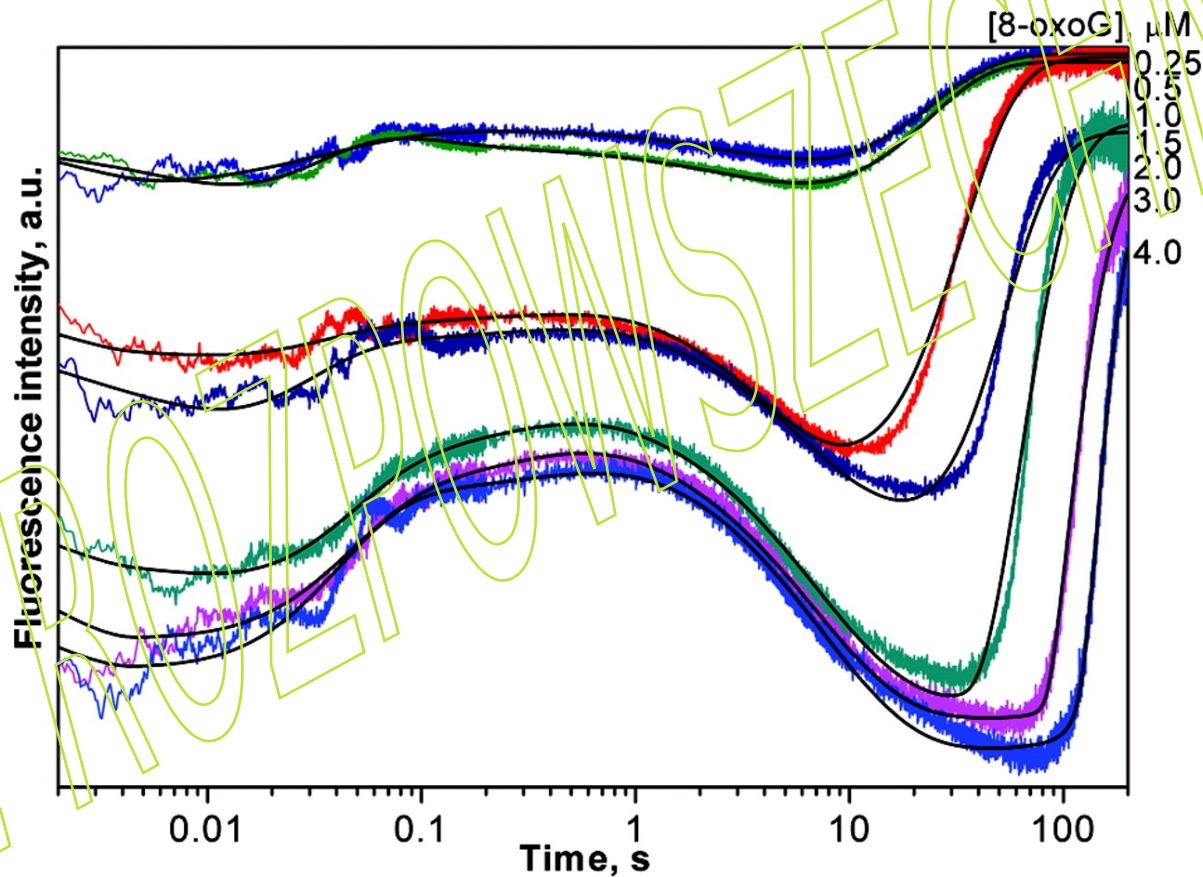
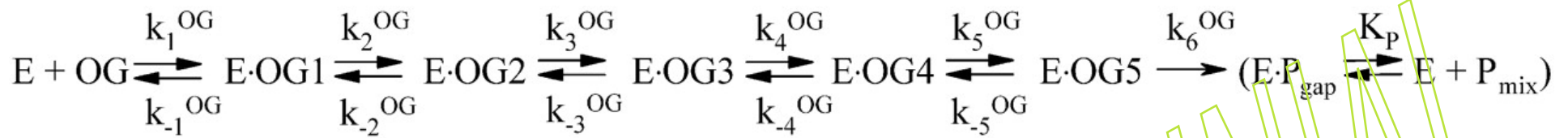
Wiązanie Fpg do dupleksu zawierającego F (tetrahydrofuran). F, = ligand zawierający F; (E·F)_i = różne kompleksy enzym-ligand.

Fluorescencyjne krzywe postępu reakcji z eksperymentu stopped-flow uzyskane dla nierozszczepialnego ligandu zawierającego F. Kolorowe ślady przedstawiają dane eksperymentalne; czarne krzywe są teoretycznie dopasowane (DynaFit).



Wiązanie i rozszczepianie substratu zawierającego AP przez Fpg. AP, substrat zawierający AP; $(E \cdot AP)_i$, różne kompleksy enzym-substrat; P_{gap} , bezpośredni produkt konwersji substratu, tj. dupleks DNA z przerwą; P_{mix} , P_{gap} zdysocjowany na trzy pojedyncze oligonukleotydy; K_p to łączna stała dysocjacji dla uwolnienia P_{gap} i jego dysocjacji do P_{mix} .

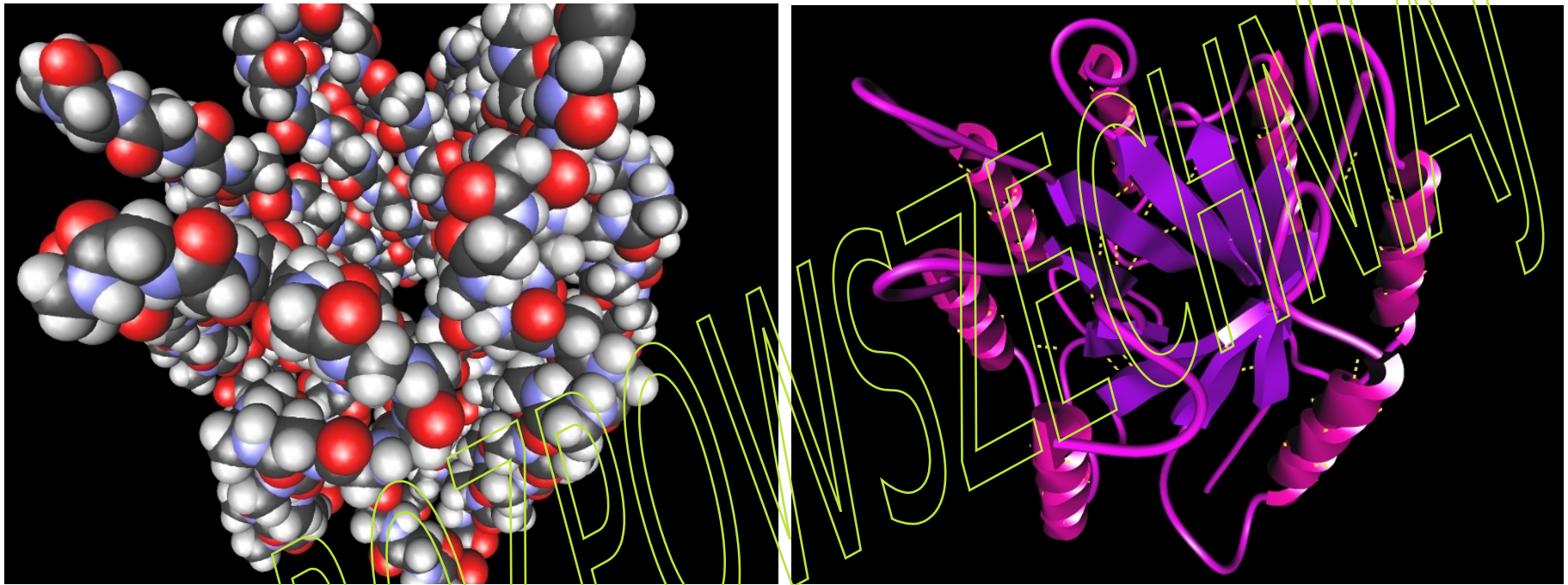
Fluorescencyjne krzywe postępu reakcji z eksperymentu stopped-flow uzyskane dla naturalnego (rozszczepialnego) substratu zawierającego AP. F. Kolorowe ślady przedstawiają dane eksperymentalne; czarne krzywe są teoretycznie dopasowane (DynaFit).



Wiązanie i rozszczepianie substratu zawierającego 8-oxoG przez Fpg. OG, substrat zawierający 8-oxoG, (E·OG) i to różne kompleksy enzym-substrat.

Fluorescencyjne krzywe postępu reakcji z eksperymentu stopped-flow uzyskane dla rozszczepialnego substratu zawierającego 8-oxoG. Kolorowe ślady przedstawiają dane eksperymentalne; czarne krzywe są teoretycznie dopasowane (DynaFit).

Zagadnienie zwijania białek ...



Poziomy organizacji strukturalnej białek:

Struktura pierwszorzędowa: kolejność aminokwasów w łańcuchu polipeptydowym;

Struktura drugorzędowa: struktury przyjmowane przez łańcuch polipeptydowy takie jak α -helisy, β -kartki i pętle;

Struktura trzeciorzędowa: wzajemne ułożenie elementów struktury drugorzędowej;

Białka składające się z pojedynczego łańcucha polipeptydowego posiadają wymienione trzy poziomy strukturalne;

Struktura czwartorzędowa: odnosi się do białek zbudowanych z dwóch lub więcej oddzielnych łańcuchów polipeptydowych tworzących połączone ze sobą podjednostki. Przestrzenne ułożenie tych podjednostek określa się nazwą struktury czwartorzędowej. Przykład: hemoglobina.

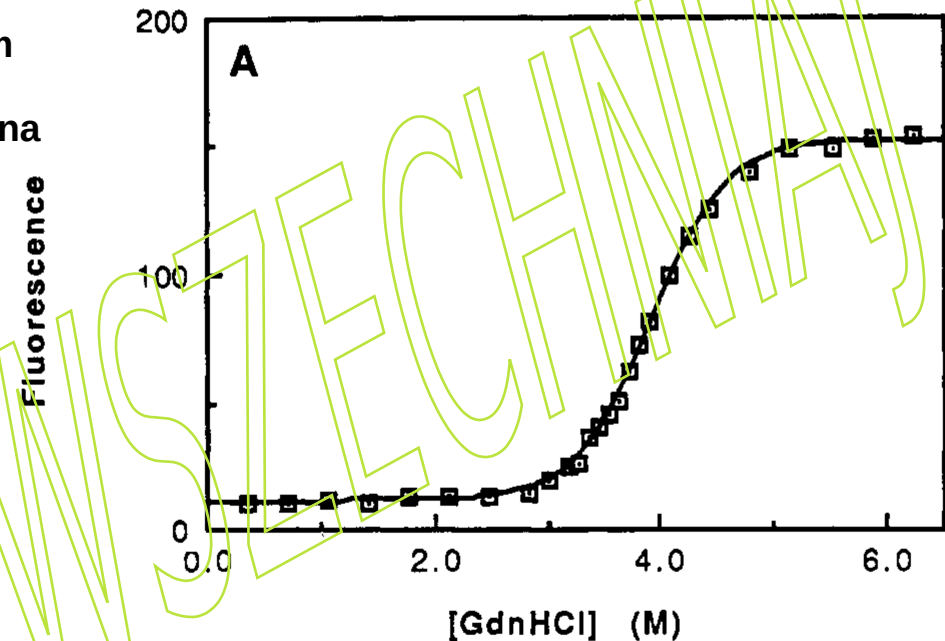
Problem zwijania białek badany metodą fluorescencji równowagowej

Jeżeli dwustanowy model denaturacji, w którym obsadzone są tylko stany natywne i zdenaturowany, jest prawidłowy, to obserwowana fluorescencja F

$$F = f_U F_U + (1 - f_U) F_N$$

stąd

$$f_U = \frac{F - F_N}{F_U - F_N}$$



Stała równowagi procesu denaturacji dla modelu dwustanowego:

$$K_U = \frac{f_U}{1 - f_U} = \frac{F - F_N}{F_U - F} = \exp(-\Delta G_U / RT)$$

Eksperymentalnie stwierdzono, że swobodna energia rozwijania się białek w obecności chlorku guanidyny i mocznika jest liniowo związana ze stężeniem czynnika denaturującego

$$\Delta G_U = \Delta G_U^{H_2O} - m[denaturant]$$

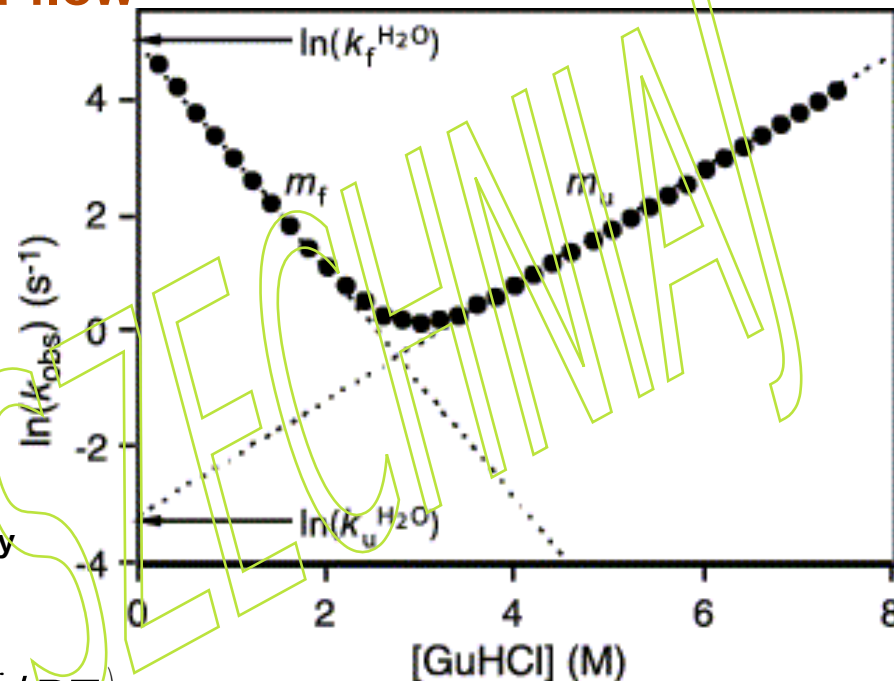
gdzie $\Delta G_U^{H_2O}$ jest wartością ΔG w nieobecności denaturanta, a m jest miarą zależności ΔG od stężenia denaturanta.

... i badany metodą spektroskopii stopped-flow

Rozwijanie rozpoczyna się przez rozcieńczenie w spektrometrze stopped-flow wodnego roztworu białka roztworami denaturanta o różnych stężeniach, przy czym stężenia końcowe wynoszą od 4,0 do 8 M. Ponowne związanie rozpoczyna się po wstępnym zrównoważeniu białka w 6,5 M denaturancie, przez rozcieńczenie go do niskich stężeń denaturanta

$$k_{obs} = k_f + k_u$$

Wykres Chevron przedstawiający fałdowanie i rozwijanie białek, który jest zgodny z modelem dwustanowym.



$$k_f = D \cdot \exp(-\Delta G_f^\ddagger / RT) \quad \wedge \quad k_u = D \cdot \exp(-\Delta G_u^\ddagger / RT)$$

$$\Delta G_f^\ddagger = \Delta G_f^{\ddagger, H_2O} - m_f \cdot c_D \quad \wedge \quad \Delta G_u^\ddagger = \Delta G_u^{\ddagger, H_2O} - m_u \cdot c_D$$

$$k_f = k_f^{H_2O} \cdot \exp(m_f c_D / RT) \quad \wedge \quad k_u = k_u^{H_2O} \cdot \exp(m_u c_D / RT)$$

$$\ln(k_{obs}) = \ln \left[k_f^{H_2O} \cdot \exp(m_f c_D / RT) + k_u^{H_2O} \cdot \exp(m_u c_D / RT) \right]$$

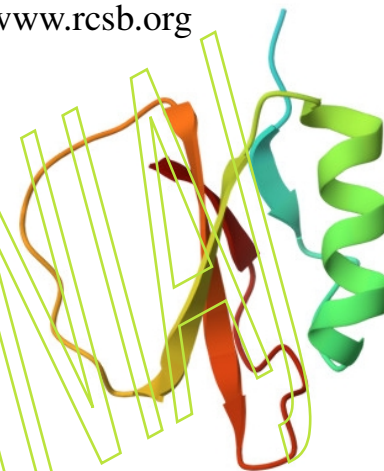
$$m = m_u - m_f$$



Przykłady Chevron plot

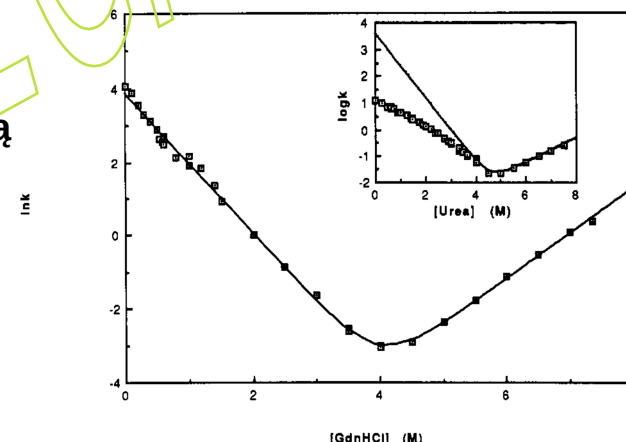
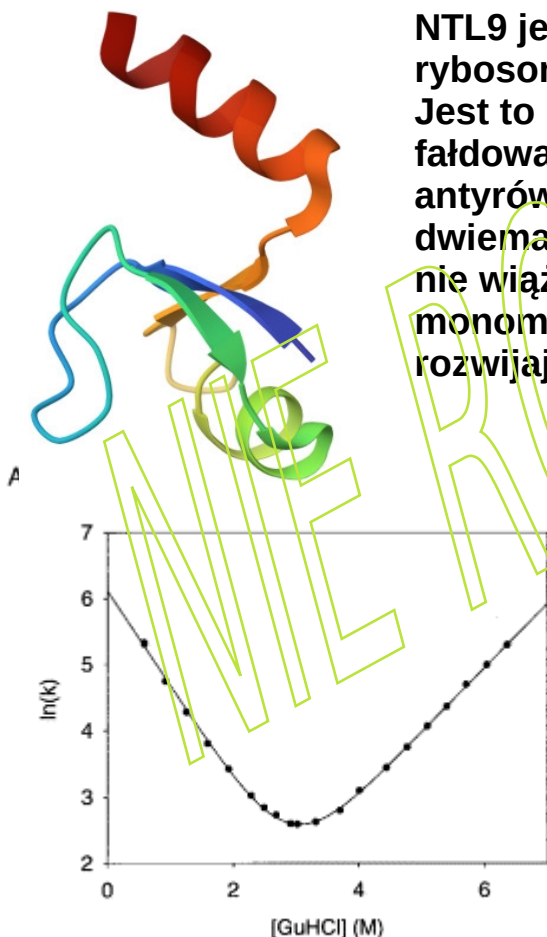
<https://www.rcsb.org>

Chymotrypsin inhibitor 2 jest inhibitorem proteazy serynowej. Jest to małe monomeryczne białko o 83 resztach. Jest to białko jednodomenowe zawierające zarówno elementy strukturalne α -helisy, jak i β -kartki. Trzeciorzędowa struktura CI2 składa się z czteroniciowej mieszanej równoległej i antyrównoległej β -kartki, na której α -helisa pakuje się, tworząc hydrofobowy rdzeń. CI2 ma jedną resztę tryptofanu, która jest zagrzebana w hydrofobowym rdzeniu i która odpowiada za dużą zmianę w widmie fluorescencji białka podczas denaturacji. Odwracalne fałdowanie i rozwijanie inhibitora chymotrypsyny jęczmienia 2 (CI2) wydaje się być rzadkim przykładem, w którym zarówno równowagi, jak i kinetyka są opisane przez model dwustanowy.



NTL9 jest domeną N-kończową, reszty 1-56, białka rybosomalnego L9 z *Bacillus stearothermophilus*. Jest to przydatny system modelowy do badania fałdowania białek. Domena zawiera małą trójniciową antyrównoległą β -kartkę umieszczoną pomiędzy dwiema helisami. Nie zawiera żadnych disulfidów i nie wiąże żadnych kofaktorów. NTL9 jest monomeryczna, a równowagowe przejście rozwijające jest dwustanowe.

Analiza kinetyki związania i rozwijania NTL9. Wykres $\ln(k)$ w funkcji stężenia GuDCl. Stała szybkości, k , pochodzi z pojedynczych fitów wykładniczych do eksperymentów fluorescencji przy zatrzymanym przepływie i jest równa stałej szybkości składania, k_f , plus stała szybkości rozwijania, k_u . Wykresy $\ln(k)$ w funkcji stężenia chlorku guanidyny pokazują klasyczny kształt litery v wskazujący na związanie dwustanowe.



Zależność od $[GdnHCl]$ logarytmu naturalnego stałych szybkości denaturacji i renaturacji CI2. Stałe szybkości mierzone w temperaturze 25 °C, w 50 mM MES pH 6,3. Wstawka pokazuje zależność stałych szybkości denaturacji i renaturacji dla barnazy typu dzikiego od stężenia mocznika.

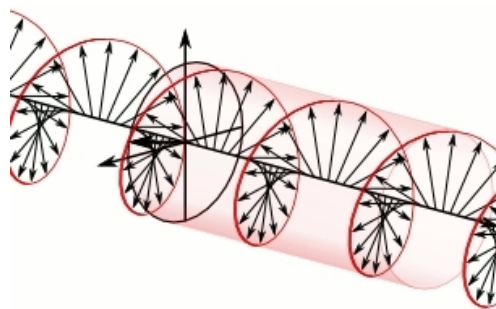
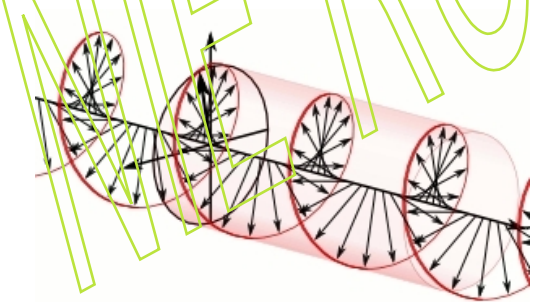
Badania struktury białek metodami spektroskopii dichroizmu kołowego



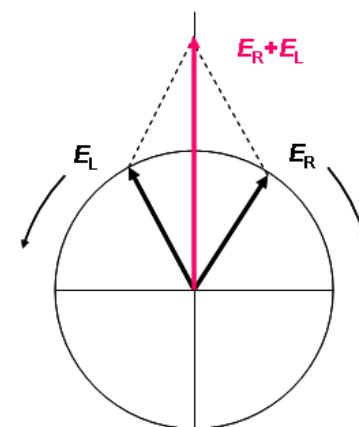
Spektrometr CD Chirascan-plus z przystawką stopped-flow

$$\vec{E}_1 = E_0 \cos(kz - \omega t) \vec{e}_x; \quad \vec{E}_2 = E_0 \cos(kz - \omega t \pm \pi/2) \vec{e}_y; \quad \vec{E}_1 + \vec{E}_2 = E_0 [\cos(kz - \omega t) \vec{e}_x \mp \sin(kz - \omega t)]$$

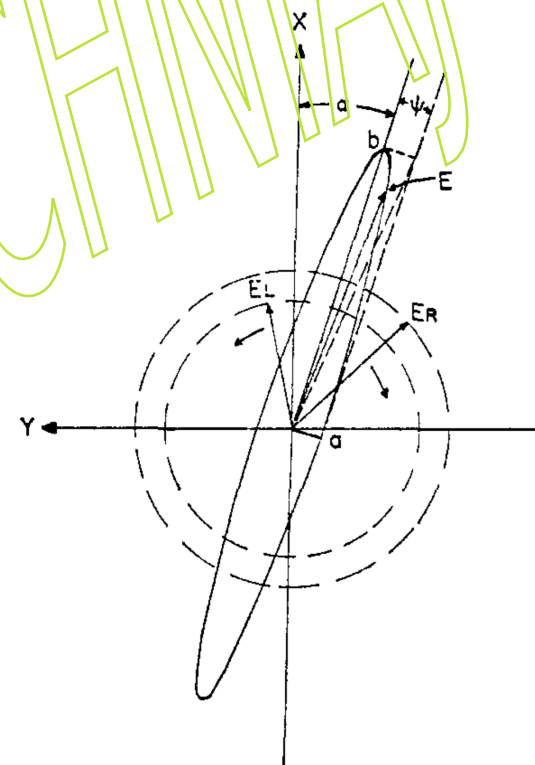
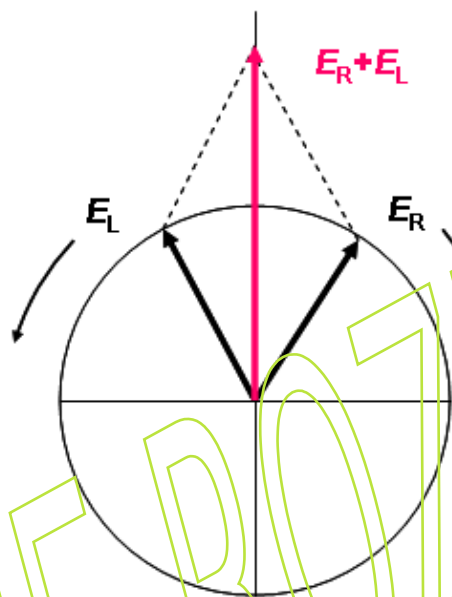
$$\vec{E}_l = E_0 [\cos(kz - \omega t) \vec{e}_x - \sin(kz - \omega t) \vec{e}_y]; \quad \vec{E}_r = E_0 [\cos(kz - \omega t) \vec{e}_x + \sin(kz - \omega t) \vec{e}_y];$$



$$\vec{E}_l + \vec{E}_r = 2 E_0 \cos(kz - \omega t) \vec{e}_x$$

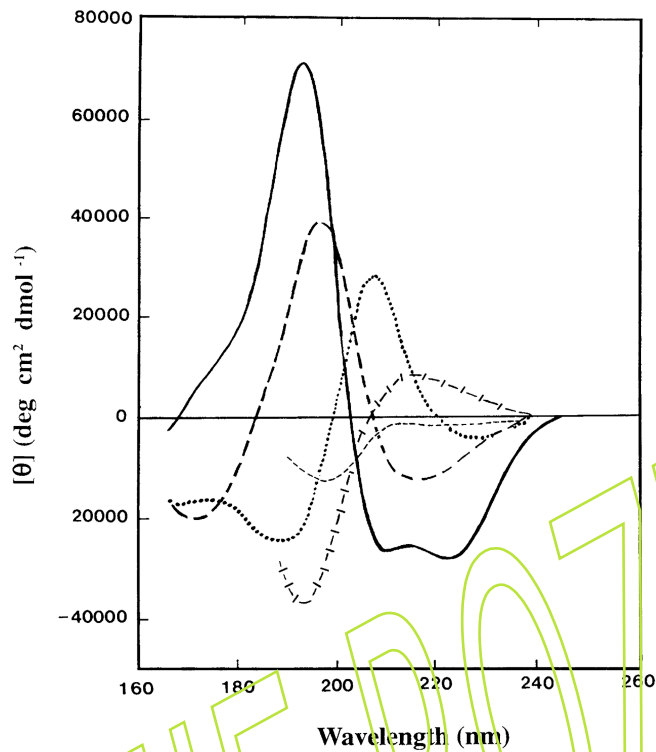


Światło spolaryzowane liniowo przemieszczając się przez nieabsorbujący ośrodek optycznie czynny doznaje obrotu płaszczyzny polaryzacji. Można to wytłumaczyć postrzegając to światło jako składające się z dwóch kołowo spolaryzowanych składowych o tej samej wielkości, z których jedna obraca się przeciwnie do ruchu wskazówek zegara (lewoskrętna, L), a druga zgodnie z ruchem wskazówek zegara (prawoskrętna, R). Obie składowe mają różne prędkości propagacji w ośrodku optycznie czynnym, ale zachowują wielkość wektora pola elektrycznego i magnetycznego. W miarę propagacji rośnie różnica faz pomiędzy obydwoma kołowo spolaryzowanymi wiązkami co skutkuje obrotem wypadkowej płaszczyzny polaryzacji.

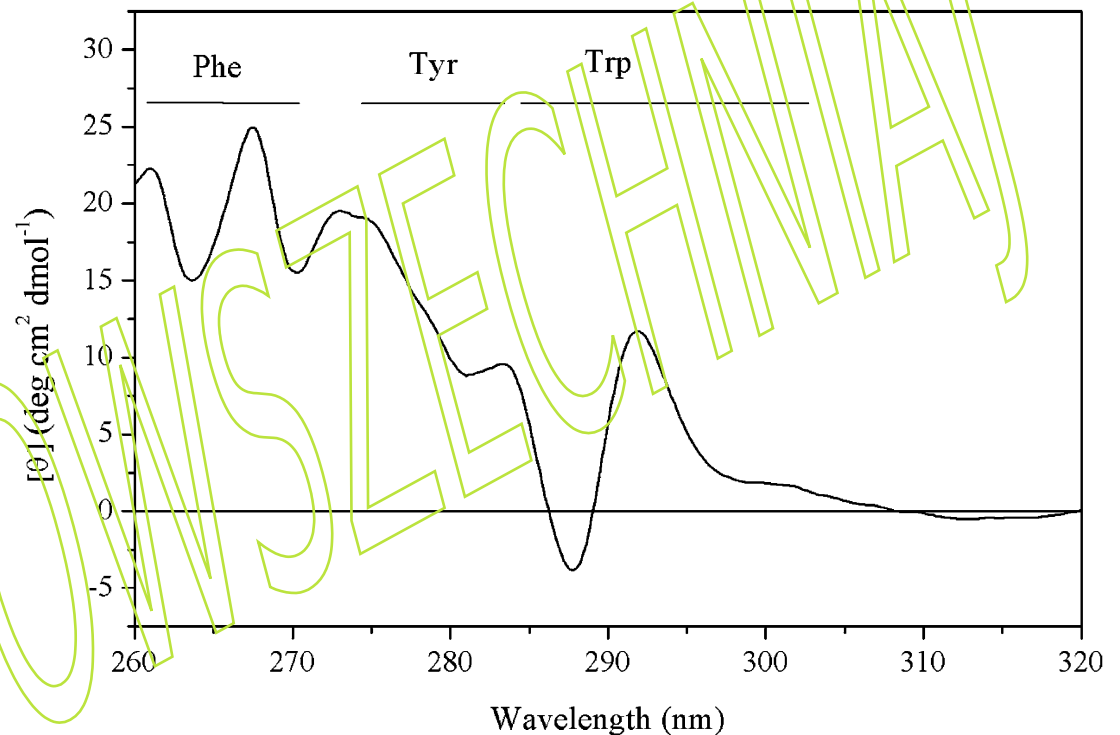


Światło spolaryzowane liniowo przemieszczając się przez absorbujący ośrodek optycznie czynny doznaje również zmniejszenia wielkości składowych elektrycznych i magnetycznych promieniowania, ale nie w tym samym stopniu. Zjawisko dichroizmu kołowego (ang. circular dichroism, CD) polega na różnej absorpcji przez substancje światła spolaryzowanego kołowo prawoskrętnie i lewoskrętnie. Tej nierównej absorpcji towarzyszy zmiana światła spolaryzowanego liniowo na światło spolaryzowane eliptycznie, które ma odchyloną oś długą elipsy od pierwotnego kierunku fali spolaryzowanej liniowo, jak to wyjaśnia Rysunek po prawej stronie slajdu. Eliptyczność, mierzona w spektrometrze dichroizmu kołowego jest zdefiniowana przez tangens kąta Ψ , pokazanego na tym Rysunku. Ponieważ zwykle dichroizm kołowy jest niewielki, tangens Ψ można przybliżyć przez Ψ i dichroizm podawać w radianach lub stopniach kątowych. Będą to w istocie milistopnie.

Spektroskopia dichroizmu kołowego jest metodą pozwalającą na ilościowe badania struktury drugorzędowej i jakościowe badania struktury trzeciorzędowej białek



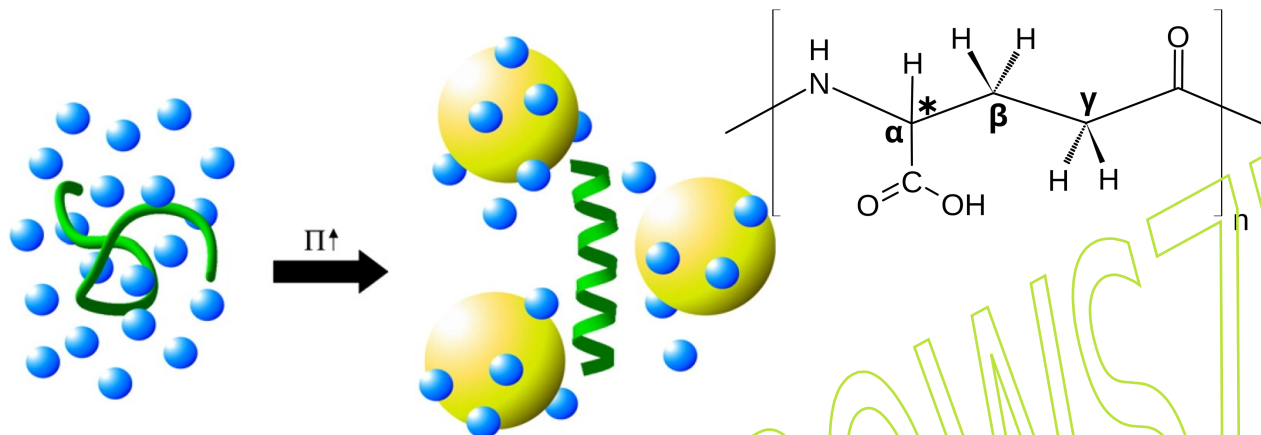
Widma CD w dalekim ultrafiolecie (160-260 nm) związane z różnymi typami struktury drugorzędowej białek. Linia ciągła: α -helisa; linia przerywana z długimi kreskami: anty-równoległe β -kartki; linia kropkowana: β -skręt rodzaju I; linia przerywana z poprzeczkami: helisa 3_1 ; linia kropkowana: obszary nieustrukturyowane. Opracowano wiele algorytmów, które w oparciu o te widma podają procentowy udział różnych struktur drugorzędowych w cząsteczce białka.



Widma CD białek w zakresie bliskiego UV (260-320 nm) są nazywane odciskiem palca struktury trzeciorzędowej. Ich źródłem są grupy boczne aminokwasów aromatycznych: tryptofany 290-305 nm, tyrozyny 275-282 nm, fenyloalaniny 255-270 nm. Każdy z tych aminokwasów wykazuje charakterystyczny kształt.

Pokazano widmo dehydrochinazy typu II w zakresie bliskiego UV.

Przejście kłębek-helisa indukowane w kwasie poliglutaminowym (PGlu) przez glikol polietylenowy

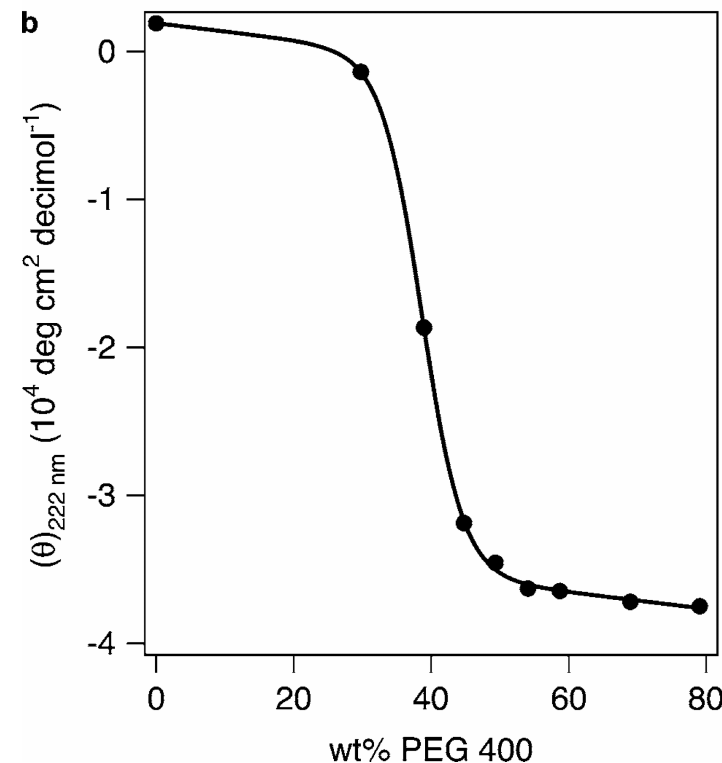
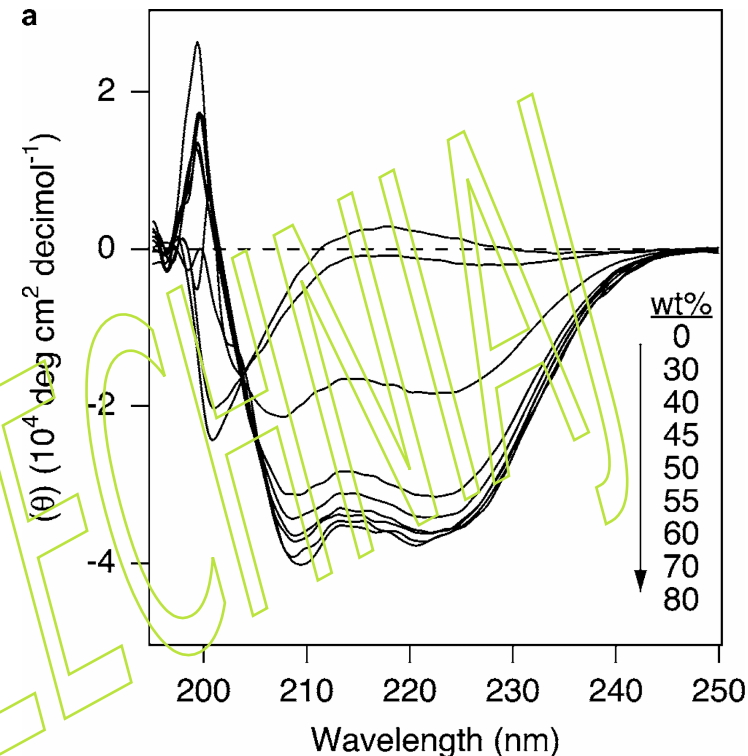


Natywną formą PGlu w wodzie, w pH 6 i wyższym, jest kłębek statystyczny. Dodanie poli(glikolu etylenowego) (PEG) o masie cząsteczkowej 400, obniża aktywność wody w roztworze i powoduje przejście do formy α -helisy. Proces dochodzenia do równowagi trwa 4 dni, w temperaturze 20°C.

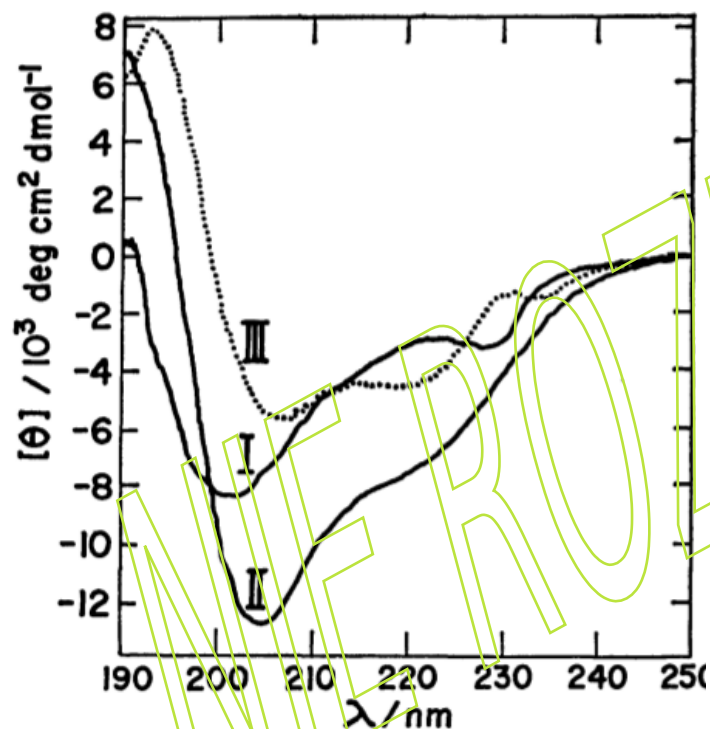
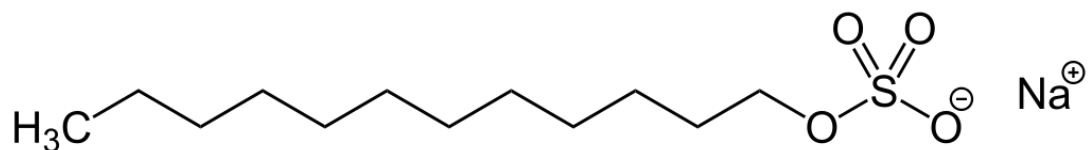
Proces przejścia śledzono wykonując widma CD w zakresie od 260 do 195 nm.

Wykres (a) Widma CD dla PGlu (M_n 61 200 g/mol) przy pH 5,8 pokazują przejście od kłębka losowego do α -helisy przy zwiększaniu stężenia PEG 400 od 0 do 80% wag.

Wykres (b) Sygnał CD przy 222 nm pokazuje, że przejście to jest sigmoidalne jako funkcja stężenia PEG 400.

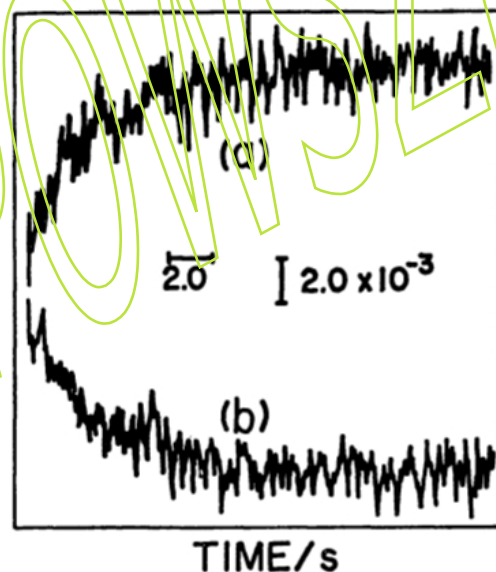


Kinetyczne aspekty zmian strukturalnych w α -chymotrypsynie indukowanych przez dodecylsiarczan sodu (SDS)

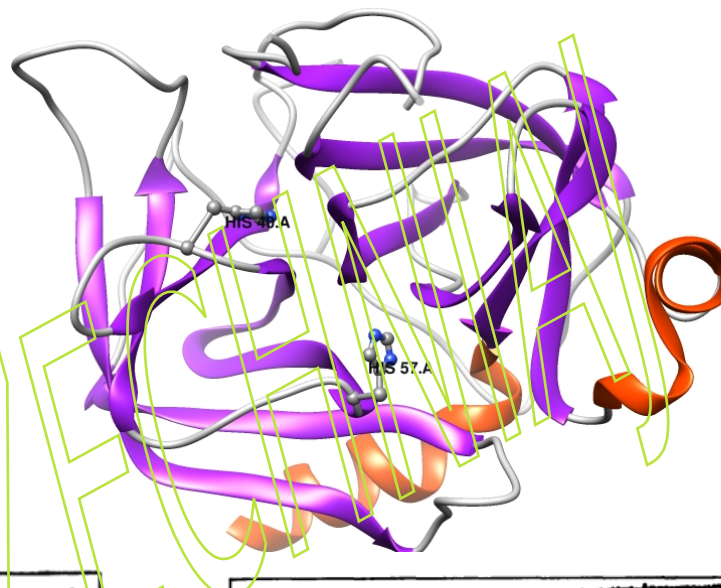
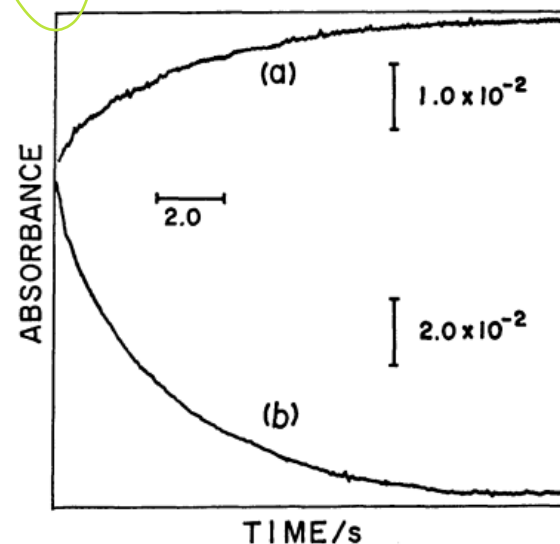


Typowe widma CD chymotrypsyny w przypadku braku (I) i obecności (II) 20 mM SDS oraz widmo CD różnicowe między nimi (III).

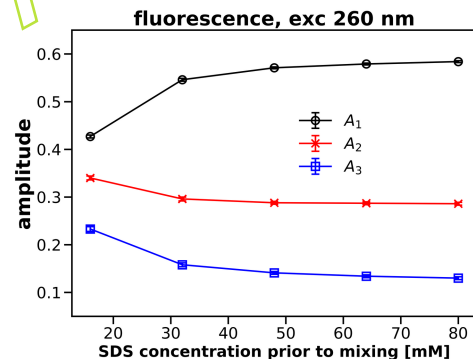
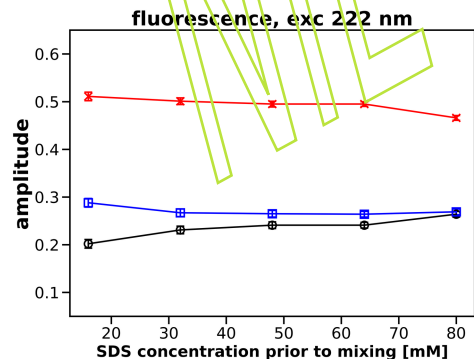
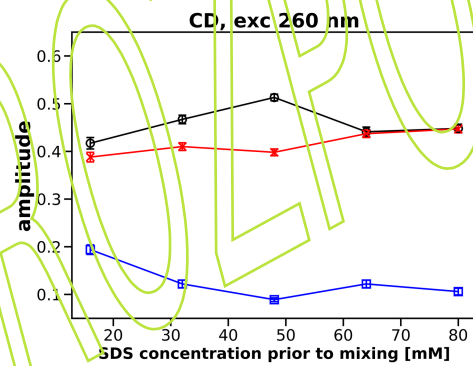
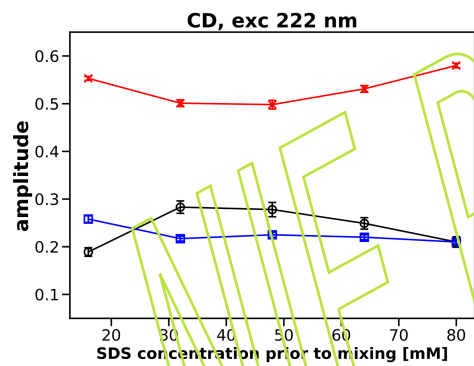
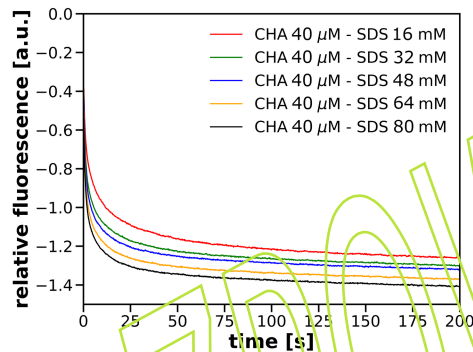
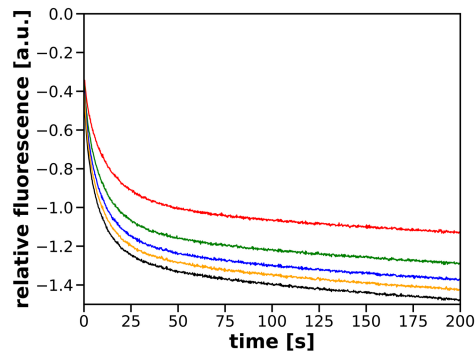
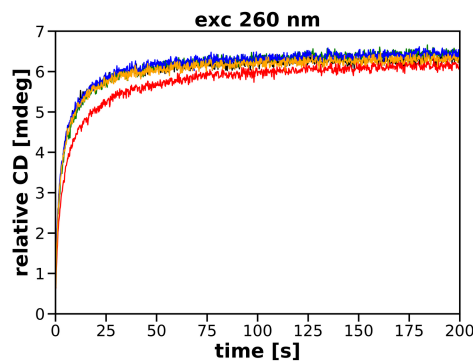
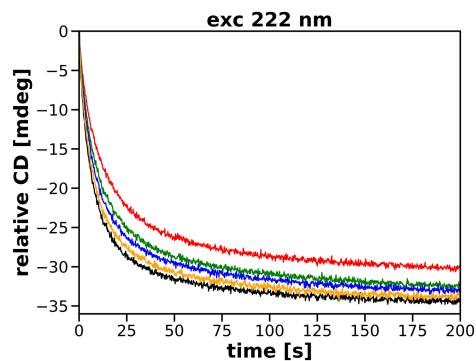
Krzywe postępu reakcji CD dla wzbudzenia przy 192 (a) i 206 (b) nm dla końcowych stężeń 20 mM SDS i 10 μM CHA. Temp. 25 $^{\circ}\text{C}$.



Przykładowe przebiegi czasowe zmian absorbancji przy 225 nm (a) i 295 nm (b) w temperaturze 25 $^{\circ}\text{C}$. Warunki eksperymentalne były identyczne, jak w przypadku eksperymentów CD.







Chymotrypsyna:SDS

Mieszanie w przystawce
stopped-flow spektrometru
Chirascan.

Jednoczesny pomiar
sygnałów DC i
fluorescencji.

CD222 raportuje kinetykę
przemian struktury
drugorzędowej.

CD260 i obie fluorescencje
raportują kinetykę
przemian w strukturze
trzeciorzędowej,
niekoniecznie tych samych
fragmentów.

Fitowanie krzywych
postępu reakcji wymaga
trzech eksponensów.

Stałe szybkości i amplitudy
zależą nieznacznie od
końcowego stężenia SDS.

Stałe szybkości i amplitudy
są różne dla struktury
drugo- i trzeciorzędowej
oraz są różne dla różnych
metod obserwacji kinetyki
struktury trzeciorzędowej.

