

# **Wybrane Zagadnienia Biofizyki Molekularnej**

(1100-5BM15)

**Jan M. Antosiewicz**

**Zakład Biofizyki  
Instytut Fizyki Doświadczalnej  
Wydział Fizyki**

**WKŁAD 3**

**15 października, 2024**

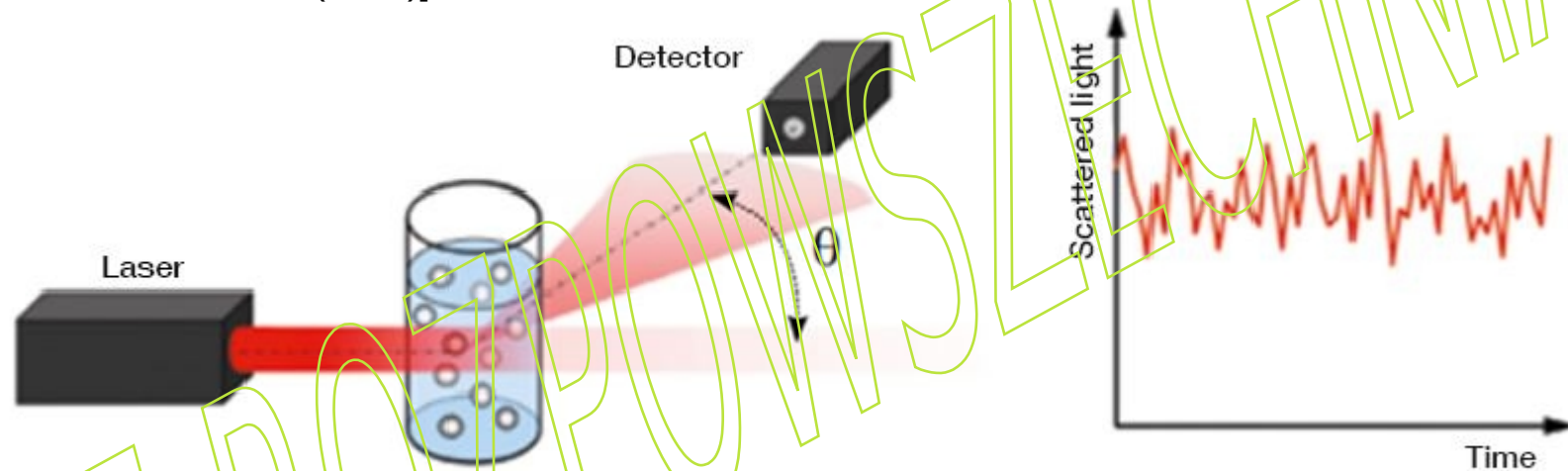
**Błądzenie losowe w procesach biomolekularnych  
(część 2)**

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

**[jantosi@fuw.edu.pl](mailto:jantosi@fuw.edu.pl)**

## Pomiary dyfuzji w roztworach

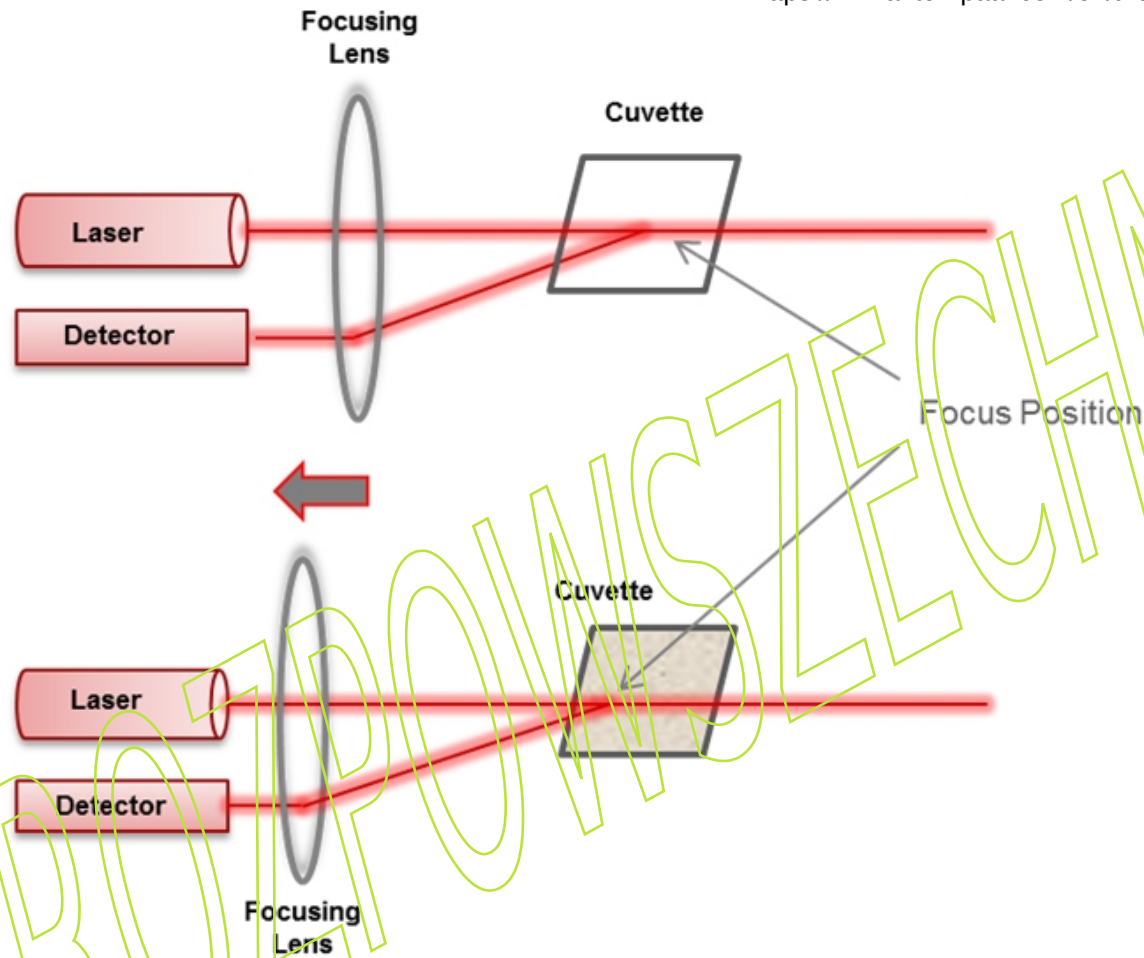
Najpowszechniej stosowaną metodą wyznaczania współczynników dyfuzji polimerów jest dynamiczne rozpraszanie światła (DLS), znane również jako quasielastyczne rozpraszanie światła (QELS). Inne, rzadziej stosowane metody, to dyfuzyjny jądrowy rezonans magnetyczny (d-NMR), wymuszone rozpraszanie Rayleigha przez dyfuzję termiczną (TDFRS), analiza dyspersji Taylora (TDA) oraz metody chromatograficzne, takie jak chromatografia hydrodynamiczna (HDC), frakcjonowanie przepływowe w polu przepływu (FFFF) i chromatografia wykluczania (SEC) [Journal of Polymer Science: Part B: Polymer Physics, Vol. 37, 593– 603 (1999)].



Dynamiczne rozpraszanie światła (DLS) opiera się na ruchach Browna rozproszonych cząstek. W podstawowej konfiguracji instrumentu DLS laser o pojedynczej częstotliwości jest kierowany na próbkę znajdującą się w kuwecie. Jeśli w próbce znajdują się cząstki, padające światło lasera zostaje rozproszone we wszystkich kierunkach. Rozproszone światło jest wykrywane pod pewnym kątem w czasie i sygnał ten służy do określenia współczynnika dyfuzji i wielkości cząstek za pomocą równania Stokesa-Einsteina:

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta\sigma_H}$$

$\sigma_H$  = promień hydrodynamiczny dyfundujących cząstek



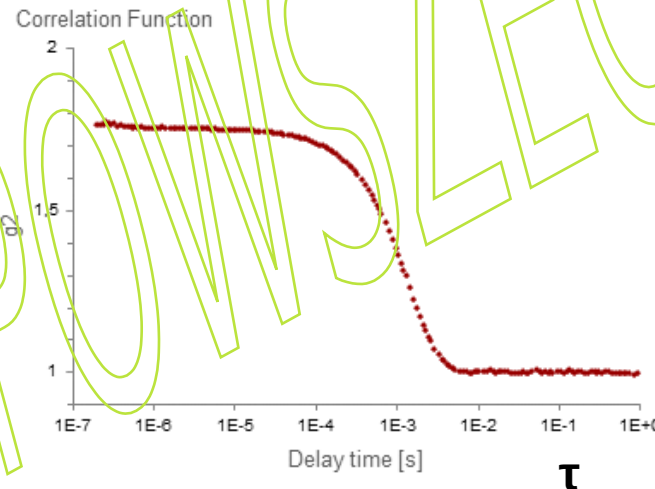
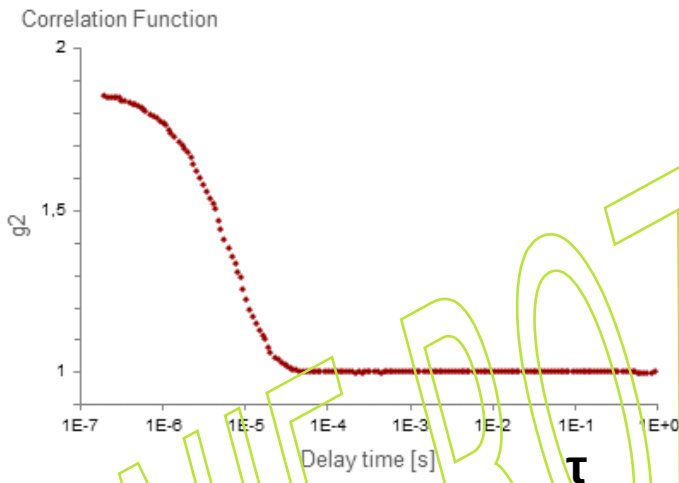
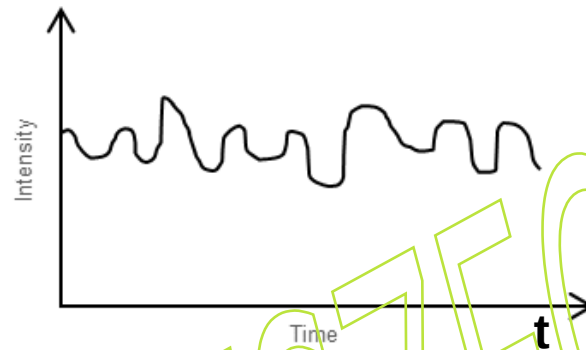
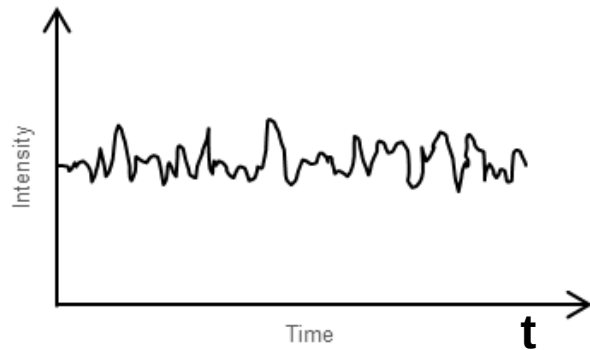
Nowoczesne przyrządy DLS zapewniają różne kąty detekcji pomiarów wielkości cząstek (zazwyczaj  $15^\circ$ ,  $90^\circ$  i  $175^\circ$ ).

Jeśli pomiar jest wykonywany pod kątem  $175^\circ$ , jest to rozpraszanie wsteczne. Pod tym kątem objętość rozpraszania (objętość, w której padająca wiązka lasera i wykryte światło nakładają się na siebie) znajduje się w pobliżu przedniej ścianki kuwety. Oznacza to, że długość ścieżki lasera w próbce jest bardzo krótka. Stanowi to idealną konfigurację dla bardzo stężonych i mętnych próbek, ponieważ minimalizuje efekt wielokrotnego rozpraszania. Rozpraszanie wielokrotne oznacza, że światło jest rozproszone na więcej niż jednej cząstce, co może zakłócać sygnał pomiarowy. Aby jeszcze bardziej zminimalizować długość ścieżki lasera, można również dostosować położenie ogniska (rysunek).

Rozpraszanie boczne pod kątem  $90^\circ$  wybieranym w przypadku słabo rozpraszających próbek małych cząstek, ponieważ odbłask wytworzony przez laser na ścianie kuwety jest blokowany przed wejściem do układu optycznego detekcji, co prowadzi do czystszej wyniku. Dzięki temu pomiary wykonane pod kątem są mniej wrażliwe na zabrudzenia i zarysowania ścianek kuwety.

Typowy korelogram z próbki zawierające małe cząstki, w których korelacja sygnału zanika szybciej

Typowy korelogram z próbki zawierające duże cząstki, w których zanik korelacji sygnału zajmuje dużo czasu



$$G_2(\tau) = \langle I(t)I(t+\tau) \rangle$$

$$g_2(\tau) = \frac{\langle I(t)I(t+\tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2}$$

**Intensywność rozproszonego światła fluktuuje w czasie.** Mniejsze cząstki, które poruszają się z większą prędkością, wykazują częstsze zmiany niż większe cząstki. Większe cząstki dają większe amplitudy pomiędzy maksymalną i minimalną intensywnością rozpraszania.

**Funkcja korelacji opisuje, jak długo cząstka znajduje się w tym samym miejscu próbki.** Na początku funkcja korelacji jest liniowa i prawie stała, co wskazuje, że cząstka nadal znajduje się w tym samym położeniu, co przed chwilą. Później widać wykładniczy zanik funkcji korelacji, co oznacza, że cząstka się porusza. Jeśli nie ma podobieństwa do punktu początkowego, funkcja korelacji ponownie wykazuje zachowanie liniowe. Ta część funkcji korelacji nazywana jest linią bazową. Informacja o ruchu zależnym od wielkości jest zawarta w zaniku funkcji korelacji. Szybkość zaniku stanowi pośrednią miarę czasu potrzebnego cząstkom do zmiany swojego względnego położenia. Małe cząstki poruszają się szybko, więc zanik jest szybki. Większe cząstki poruszają się wolniej, przez co zanik funkcji korelacji jest opóźniony.

$$g_2(\tau) = \frac{\langle I(t) \cdot I(t+\tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} = \frac{\langle [\langle I(t) \rangle + \delta I(t)] \cdot [\langle I(t) \rangle + \delta I(t+\tau)] \rangle}{\langle I(t) \rangle^2}$$

$$g_2(\tau) = \frac{\langle \langle I(t) \rangle^2 + \langle I(t) \rangle \cdot \delta I(t) + \delta I(t+\tau) \cdot \langle I(t) \rangle + \delta I(t) \cdot \delta I(t+\tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2}$$

$$g_2(\tau) = \frac{\langle I(t) \rangle^2 + \langle I(t) \rangle \cdot \langle \delta I(t) \rangle + \langle \delta I(t+\tau) \rangle \cdot \langle I(t) \rangle + \langle \delta I(t) \cdot \delta I(t+\tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2}$$

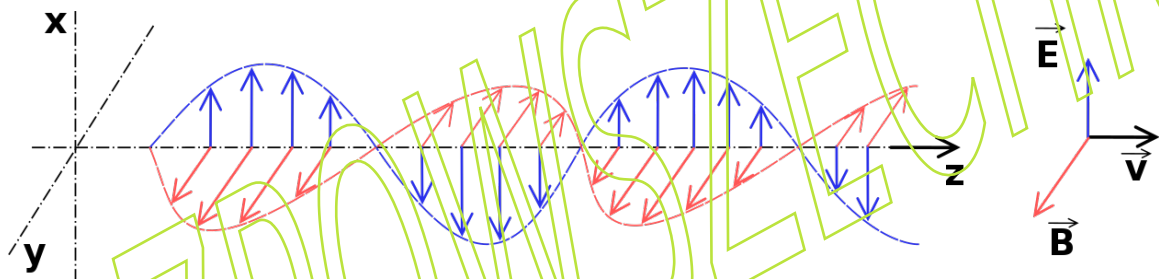
$$g_2(\tau) = \frac{\langle I(t) \rangle^2 + \langle \delta I(t) \cdot \delta I(t+\tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} = 1 + g'_2(\tau)$$

Ponieważ nie jest możliwe określenie, w jaki sposób każda cząstka porusza się w wyniku fluktuacji, zamiast tego do korelowania ruchu cząstek względem siebie wykorzystuje się funkcję korelacji pola elektrycznego, którą definiuje się jako:

$$G_1(\tau) = \langle \vec{E}(t) \vec{E}(t+\tau) \rangle; \quad g_1(\tau) = \frac{\langle \vec{E}(t) \vec{E}(t+\tau) \rangle}{\langle \vec{E}(t) \rangle^2}; \quad I \sim \langle \vec{E}^2 \rangle$$

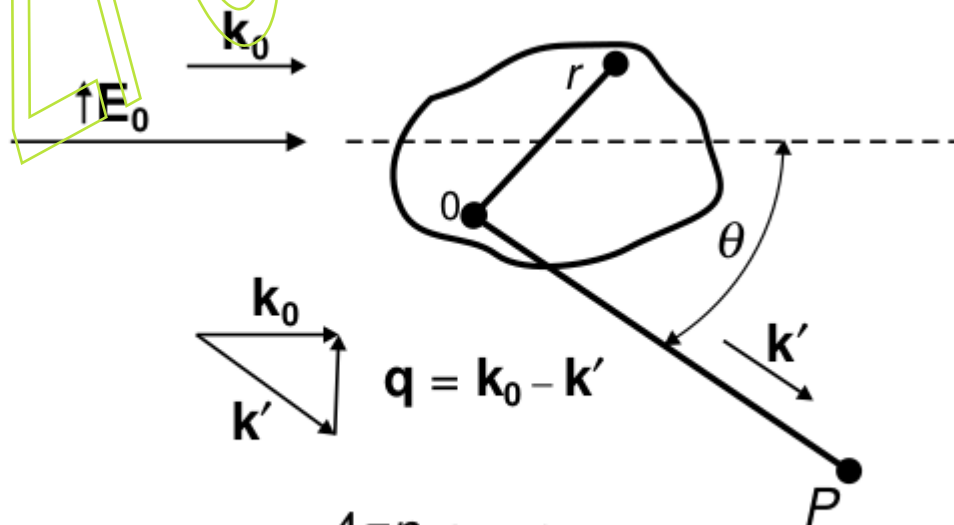
gdzie  $\mathbf{E}(t)$  i  $\mathbf{E}(t+\tau)$  to rozproszone pola elektryczne w chwilach  $t$  i  $t+\tau$ .

PMV Raja and AR Barron, Physical Methods in Chemistry and Nano Science, Libre Texts, 2022, chapter 2.4



wikipedia

$$\vec{E}(\vec{r}, t) = \vec{E}_{max} \cos(\vec{k} \cdot \vec{r} - \omega t + \phi); \quad k = |\vec{k}| = \frac{2\pi}{\lambda}$$



$\mathbf{q}$  jest wektorem fali rozpraszania  
 $n$  jest współczynnikiem załamania roztworu  
 $\theta$  to kąt, pod którym znajduje się detektor

$$|q| = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin \theta/2$$

Dla układu monodispersyjnego podlegającego ruchom Browna,  $g_1(\tau)$  będzie zanikać wykładniczo z szybkością zaniku  $\Gamma$ , która jest powiązana ruchami Browna z dyfuzywnością przez:

$$g_1(\tau) = e^{-\Gamma\tau} \quad \Gamma = D_t q^2 \quad q = \frac{4\pi n}{\lambda} \cdot \sin \frac{\theta}{2}$$

gdzie  $q$  jest wielkością wektora fali rozpraszania, a  $q^2$  odzwierciedla odległość, jaką przebywa cząstka,  $n$  jest współczynnikiem załamania światła roztworu, a  $\theta$  jest kątem, pod którym znajduje się detektor.

Jednakże w przypadku układu polidispersyjnego  $g_1(\tau)$  nie można już przedstawiać jako pojedynczego rozpadu wykładniczego i należy go przedstawić jako całkę ważoną intensywnością po rozkładzie szybkości zaniku  $G(\Gamma)$  przez:

$$g_1(\tau) = \int_0^{\infty} G(\Gamma) e^{-\Gamma\tau} d\Gamma$$

gdzie  $G(\Gamma)$  jest znormalizowane:

$$\int_0^{\infty} G(\Gamma) d\Gamma = 1$$



Dwie funkcje korelacji,  $g_1(\tau)$  i  $g_2(\tau)$ , można zrównać za pomocą zależności Seigerta opartej na zasadach losowych procesów Gaussa (którymi zwykle jest światło rozpraszające) i można je wyrazić jako

$$g_2(\tau) = B + \beta [g_1(\tau)]^2$$

gdzie  $\beta$  jest współczynnikiem zależnym od geometrii eksperymentu, a  $B$  jest długoterminową wartością  $g_2(\tau)$ , określaną jako linia bazowa i zwykle równą 1.



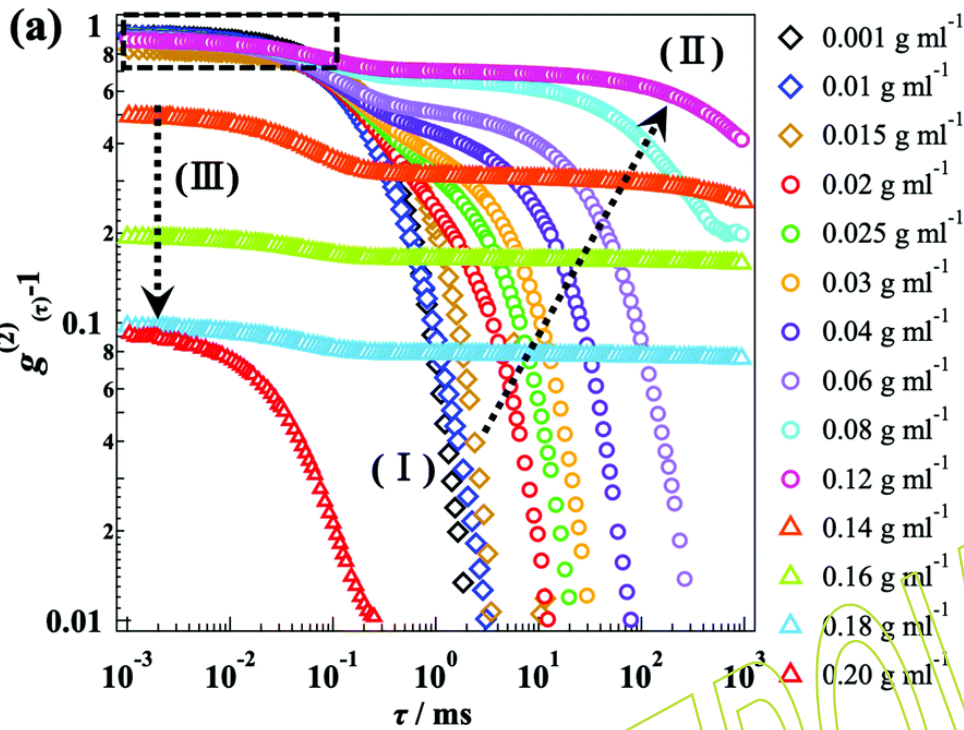
Dla systemu monodispersyjnego:

$$g_2(\tau) = 1 + \beta \exp(-2 D_t q^2 \tau)$$

Dla układu polidispersyjnego z  $N$  cząsteczkami o współczynnikach dyfuzji  $D_i$ :

$$g_2(\tau) = \beta_\infty + \left[ \sum_{i=1}^N \beta_i \exp(-D_i q^2 \tau) \right]^2$$

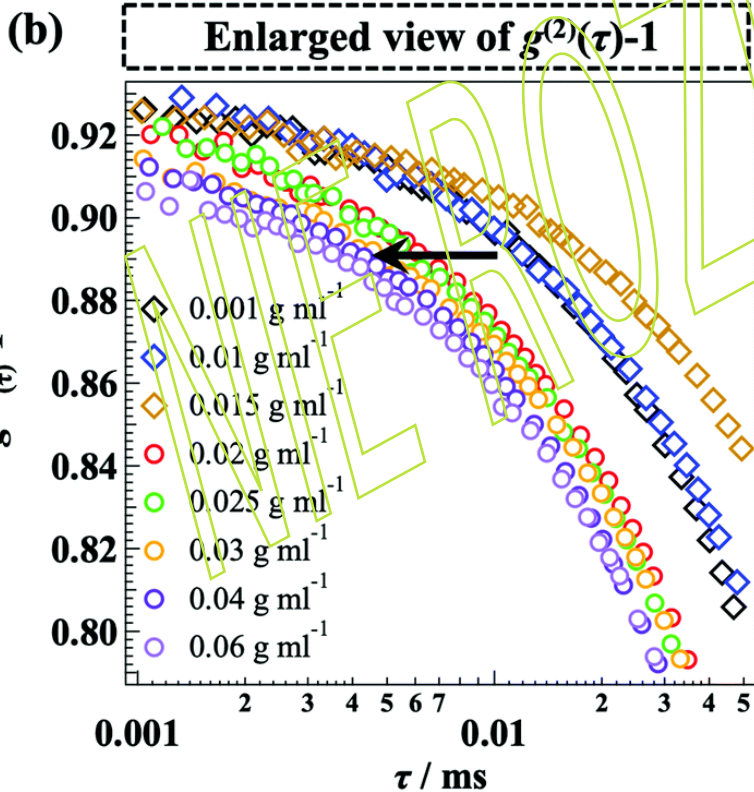




## Zależność stężeniowa dynamiki zawiesin mikrożelowych badana metodą dynamicznego rozpraszania światła:

Zawiesiny mikrożelu (cząsteczki żelu o wielkości od kilkuset nanometrów do mikrometrów) wykazują wyjątkowe zachowanie koloidalne. Oznacza to, że mikrożele mają zarówno właściwości żelu, jak i koloidu.

Funkcja korelacji intensywności (ICF) mikrożeli wykazuje charakterystyczne zachowania w różnych obszarach stężeń: (I) obszar rozcieńczonego stężenia ( $C \leq 0,01 \text{ g ml}^{-1}$ ), (II) stężenie pośrednie ( $0,02 \leq C < 0,12 \text{ g ml}^{-1}$ ) region, w którym zaobserwowano dwa tryby relaksacji, oraz (III) obszar wysokiego stężenia ( $C \geq 0,12 \text{ g ml}^{-1}$ ), gdzie początkowa amplituda ICF znacznie spadła od jedności.



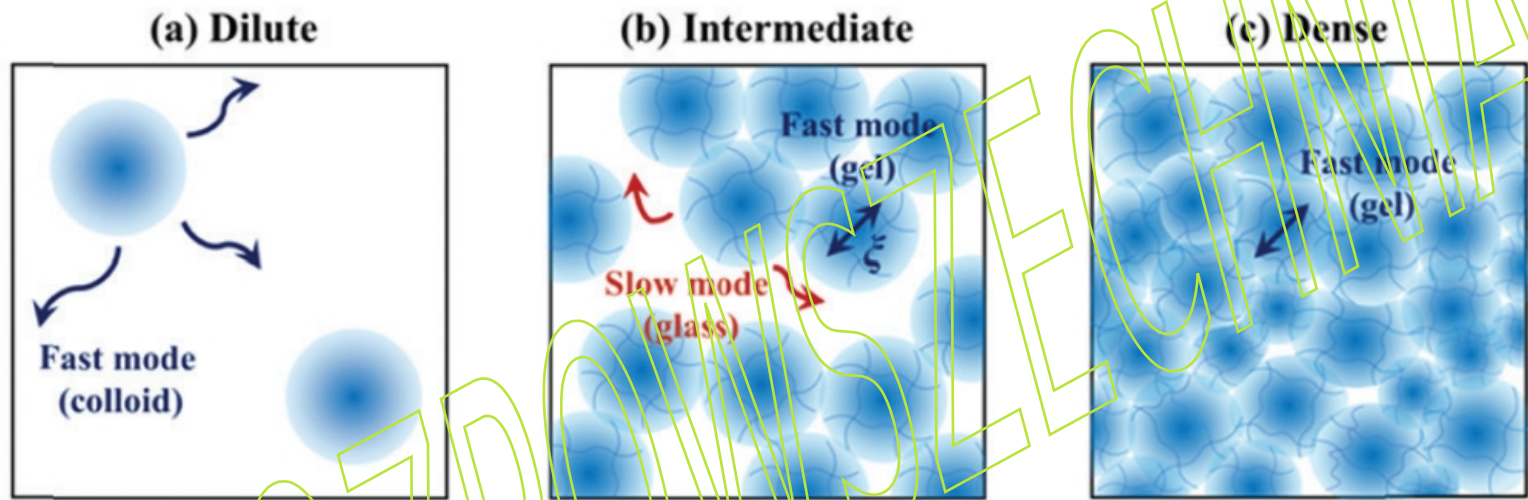
Najpierw scharakteryzowano poszczególne mikrożele przy rozcieńczonych stężeniach ( $C = 0,001$  i  $0,01 \text{ g ml}^{-1}$ , udział objętościowy  $\phi_{\text{eif}} \sim 0,04$  i  $0,4$ ). W celu analizy eksperymentalnych funkcji korelacji (Rys. a) wykorzystano równanie:

$$g^{(2)}(\tau) - 1 = \sigma_1^2 \exp(-2 D_{\text{Fast}} q^2 \tau)$$

ICF mikrożeli przy  $C = 0,001 \text{ g ml}^{-1}$  jest dobrze opisany przez pojedynczą funkcję wykładniczą, wskazującą mikrożele o jednakowej wielkości. Promień hydrodynamiczny ( $R_h$ ) obliczono z prawa Stokesa – Einsteina.

Oczekiwano, że translacyjna dyfuzja mikrożeli będzie spowolniona poprzez zwiększenie  $C$ , tj. wzrost efektywnej lepkości rozpuszczalnika. Jednakże szybki tryb ICF przesunął się w stronę krótszych czasów zaniku wraz ze wzrostem  $C$  (Rys. b, widok w powiększeniu).

(a) Funkcja korelacji czasowej intensywności rozpraszania,  $g^{(2)}(\tau)-1$ , mikrożeli w każdym stężeniu oraz (b) powiększony widok  $g^{(2)}(\tau)-1$ . Kąt rozproszenia wynosił  $\theta = 90^\circ$ .



Schematyczna ilustracja zawiesin mikrożelu w trzech zakresach stężeń

Funkcja korelacji czas-intensywność wykazywała wyraźną zmianę wraz ze wzrostem udziału objętościowego cząstek żelu w zawieszynie,  $\phi$ . W obszarze rozcieńczonego stężenia zaobserwowano dyfuzję translacyjną mikrożeli podobną do konwencjonalnych cząstek koloidalnych. Przy stężeniu pośrednim ich dynamika zmieniła się z trybu pojedynczego na tryb podwójny (tj. tryb szybki i wolny). W obszarze wysokich stężeń pastę mikrożelową uznano za makrożele, ponieważ na skalach czasu pomiaru ( $\tau < 1000$  ms) nie zaobserwowano już zaniku trybu wolnego w  $g^{(2)}(\tau) - 1$ .

## Dyfuzyjność lizozymu w wodnych roztworach MgCl<sub>2</sub> na podstawie danych dotyczących dynamicznego rozpraszania światła: wpływ stężeń białek i soli

Opisano pomiary DLS dla wodnych roztworów lizozymu z białka jaj kurzych o stężeniach do 30 g/L, zawierających MgCl<sub>2</sub>, dla zakresu temperatur 10-30°C, z pH roztworu utrzymywanym na poziomie pH 4,0. Takie pH zapewnia, że dimeryzacja czy też agregacja lizozymu nie zachodzi jako połączenie "głowy do ogona" (head-to-tail\*).

Wzór na pozorny współczynnik dyfuzji

$$D_o^{ap} = \frac{\Gamma}{q^2}$$

J. Phys. Chem. B 2000, 104, 3645-3650

\*Kontakt między cząsteczkami w reakcji autoasocjacji białek może być symetryczny (połączenie typu głowa do głowy) lub asymetryczny (połączenie typu głowa do ogona).

J. Biol. Chem. 1975, 250, 8260-8266

Poniżej pH 4,5 dimeryzacja lizozymu nie zachodzi, ponieważ kwas karboksylowy Glu-35 pozostaje uprotonowany. Agregacja lizozymu jest wynikiem przyciągającego oddziaływania pomiędzy zdeprotonowanym kwasem karboksylowym Glu-35 i uprotonowanym azotem w łańcuchu bocznym Trp-62 w drugiej cząsteczce lizozymu. Prowadzi to do dimeru typu "głowy-do-ogona".

J. Phys. Chem. B 2000, 104, 3645-3650



J. Molec. Modelling 2005, 12, 34-41



## Dyfuzyjność zależna od stężenia:

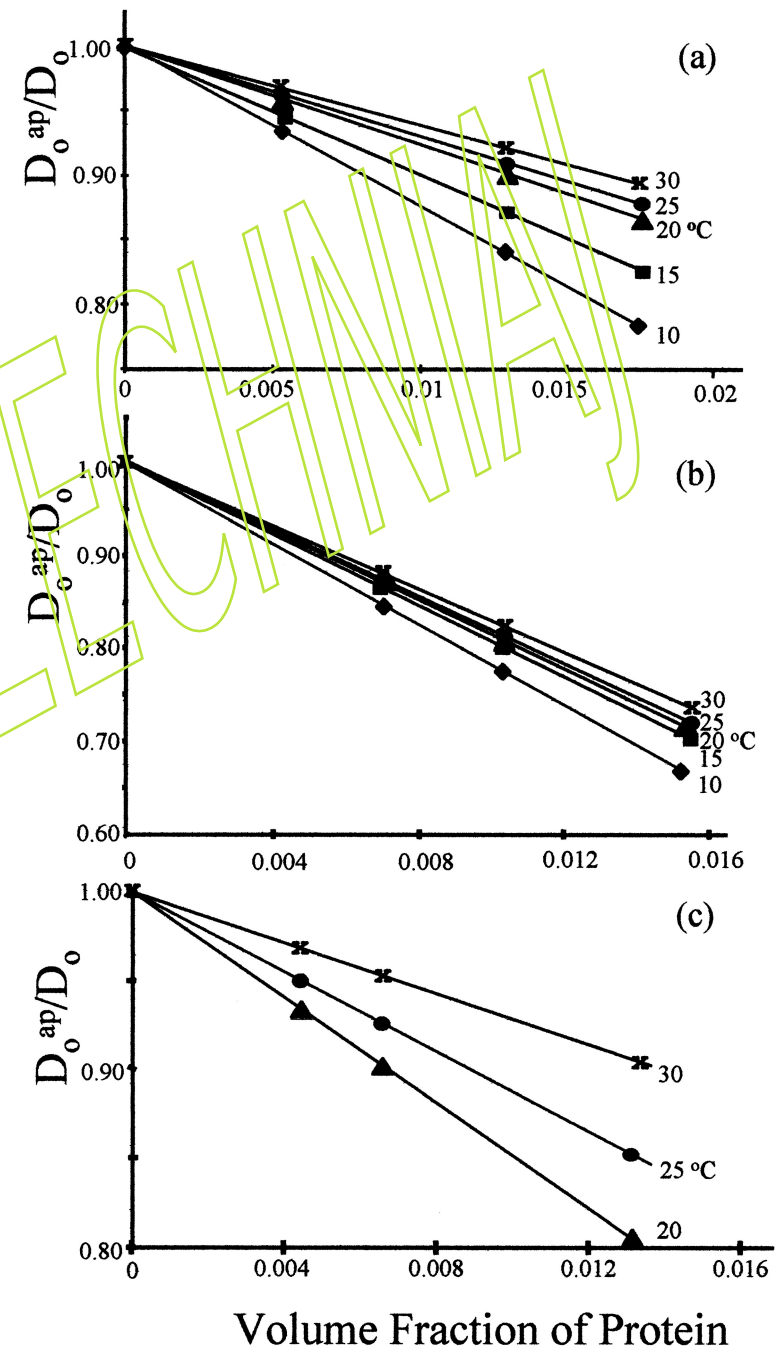
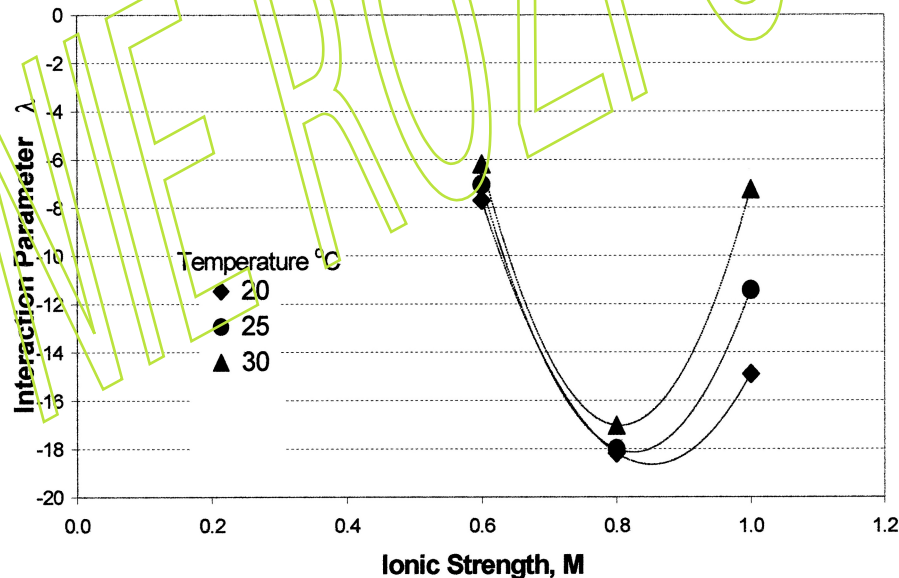
Rysunek po prawej: unormowany pozorny współczynnik dyfuzji  $D_o^{ap}/D_o$  w funkcji ułamka objętościowego białka w roztworze  $\phi$ , dla ustalonej siły jonowej (roztwory wodne z dodatkiem  $MgCl_2$ , pH 4, siły jonowe (a) 0,60, (b) 0,80 i (c) 1,00 M) i temperatury

$$D_o^{ap} = D_o(1 + \lambda \phi)$$

$D_o$  to wartość  $D$  przy nieskończonym rozcieńczeniu,  $\lambda$  parametr interakcji, ujemne wartości wskazują na oddziaływania przyciągające netto.  $\lambda$  staje się bardziej ujemne w miarę spadku temperatury przy ustalonej sile jonowej, co wskazuje na rosnące oddziaływanie przyciągające, zgodnie z oczekiwaniami.

Poniżej:

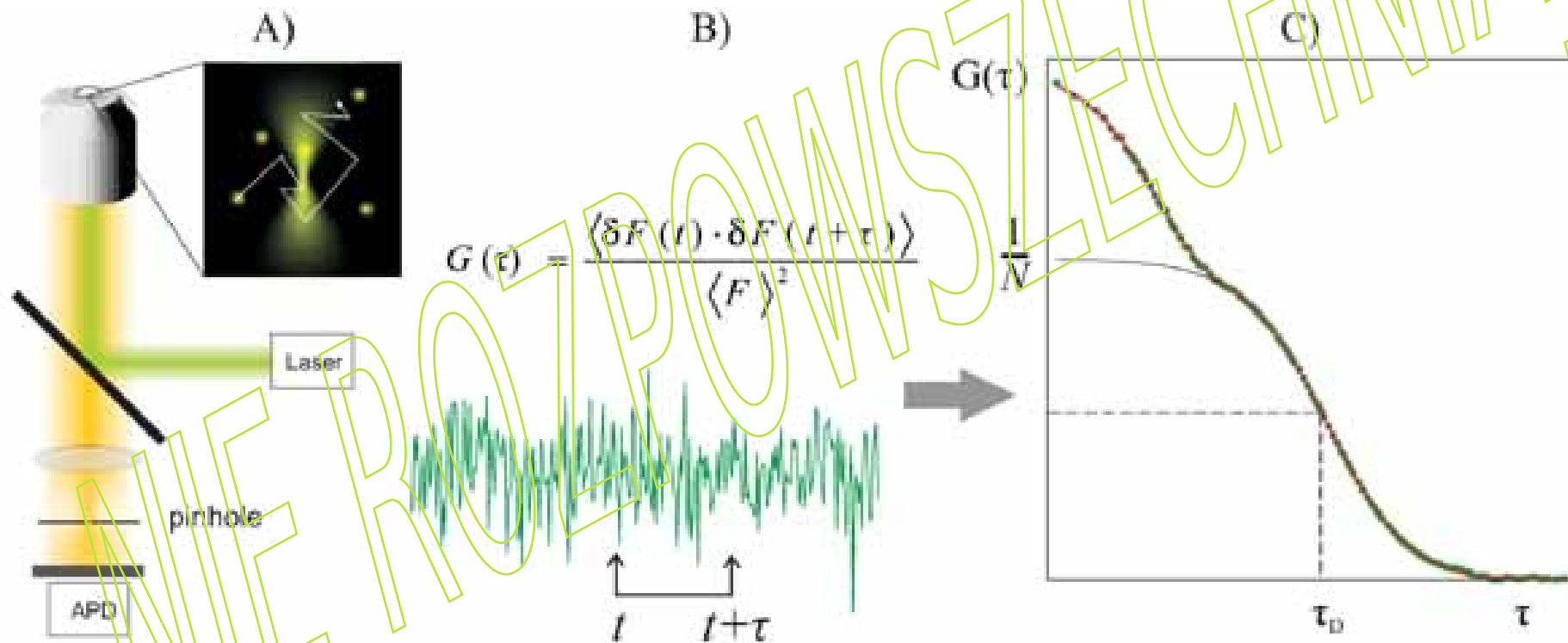
Parametr oddziaływania  $\lambda$  jako funkcję jako funkcja siły jonowej ( $MgCl_2$ ) w różnych temperaturach. Parametr interakcji osiąga minimum w pobliżu siły jonowej 0,80 M, co wskazuje na maksymalne przyciąganie.



# Spektroskopia korelacyjna fluorescencji

(Fluorescence Correlation Spectroscopy)

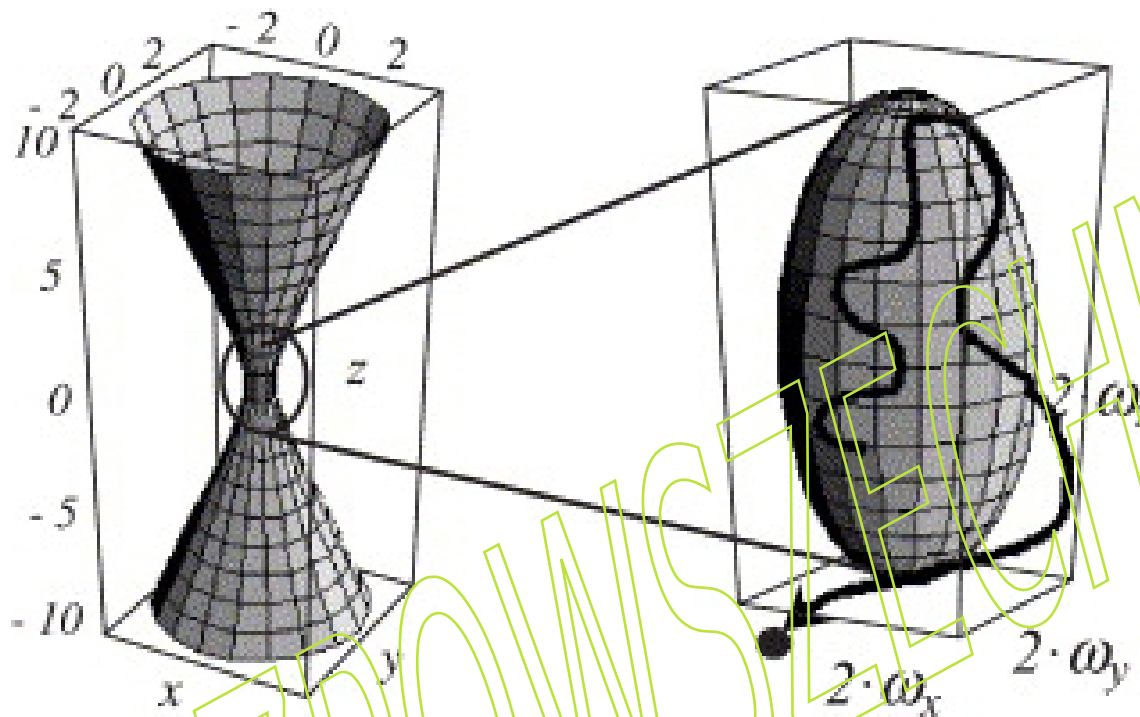
FCS to metoda analizy, która umożliwia pomiar dynamiki procesów molekularnych na podstawie obserwacji spontanicznych mikroskopowych fluktuacji stężenia cząsteczek. Pomiaru te są powszechnie wykonywane w równowadze termicznej, gdzie spontaniczne wahania cząsteczek wynikają z ruchów Browna.



Zasada FCS:

A) Cząsteczki fluorescencyjne dyfundujące przez obszar detekcji mikroskopu konfokalnego powodują wahania intensywności, pokazane w B).

C) Krzywą korelacji oblicza się jako autokorelację wahań intensywności i mierzy samopodobieństwo sygnału.  $N$  = liczba zaobserwowanych cząsteczek w FCS.



**Left: Profil wzbudzenia lasera Gaussa. Po prawej: konfokalna objętość obserwacji. Wymiar elementu objętości obserwacji jest określony przez długość półosi ( $\omega_z$ ) oraz szerokość ( $\omega_{xy}$ ). Stosunek  $R = \omega_z / \omega_{xy}$  obu osi jest rzędu 5, a  $\omega_{xy}$  ma typowo poniżej  $1 \mu\text{m}$ . Objętość konfokalna ma zatem  $\sim 0.6$  femtolitrów. Przy stężeniu rzędu  $1 \text{ nM}$  mamy więc średnią liczbę molekuł  $\sim 0.4$**

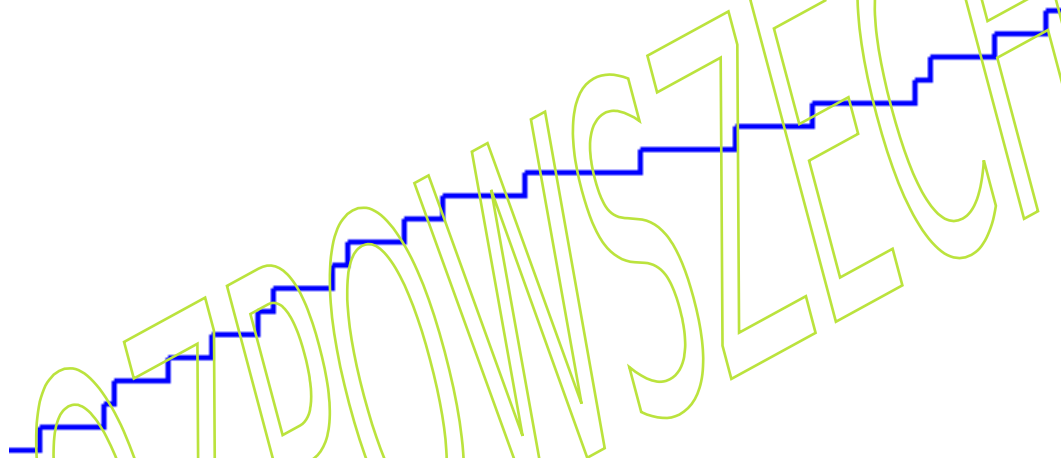
**Liczba cząsteczek zawartych w objętości ogniskowej w dowolnym momencie podlega rozkładowi Poissona.**

**Proces Poissona jest zbiorem  $\{N(t) : t \geq 0\}$  zmiennych losowych, gdzie  $N(t)$  to liczba zdarzeń, które miały miejsce do chwili  $t$  (począwszy od chwili 0).**

**Liczbę zdarzeń pomiędzy czasem  $a$  i czasem  $b$  podaje się jako  $N(b) - N(a)$ . Ma ona rozkład Poissona. Proces Poissona jest procesem ciągłym.**

# Proces Poissona i rozkład Poissona

W teorii prawdopodobieństwa proces Poissona jest procesem stochastycznym, który zlicza liczbę zdarzeń i czas ich wystąpienia w danym przedziale czasu (patrz rysunek, gdzie oś x to czas, a y to liczba zdarzeń).



Homogeniczny proces Poissona zlicza zdarzenia, które zachodzą ze stałą szybkością. Proces ten charakteryzuje się parametrem szybkości  $\lambda$ , znanym również jako intensywność, tak że liczba zdarzeń w przedziale czasu  $(t, t + \tau]$  jest zgodna z rozkładem Poissona z powiązaniem parametrem  $\lambda\tau$ . Zależność tę wyraża się jako

$$P\{[N(t + \tau) - N(t)] = k\} = \frac{(\lambda \tau)^k}{k!} e^{-\lambda \tau} \quad (k = 0, 1, 2, \dots)$$

gdzie  $N(t + \tau) - N(t) = k$  to liczba zdarzeń w przedziale czasu  $(t, t + \tau]$ . W procesie Poissona liczba zaobserwowanych zdarzeń oscyluje wokół średniej  $\lambda$  z odchyleniem standardowym równym pierwiastkowi kwadratowemu z  $\lambda$ . Dodatnia liczba rzeczywista  $\lambda$  jest równa oczekiwanej wartości  $X$ , a także jej wariancji. Wariancja zmiennej losowej  $X$  jest oczekiwaną wartością kwadratu odchylenia od średniej  $X$ .



## Analiza statystyczna, próby Bernoulliego:

Powtarzane niezależne badania, w których istnieją tylko dwa możliwe wyniki, nazywane są próbami Bernoulliego (od Jacoba Bernoulliego), jeśli prawdopodobieństwa wyników pozostają stałe.

$$p + q = 1$$

W ciągu  $n$  takich prób i przy założeniu, że interesuje nas jedynie całkowita liczba obserwacji, które nazwiemy "sukcesem", a nie to kiedy wystąpią one w ciągu sekwencji, prawdopodobieństwo  $b(k; n, p)$  tylko  $k$  sukcesów jest określone przez

$$b(k; n, p) = \binom{n}{k} p^k q^{n-k} = \frac{n!}{k!(n-k)!} p^k q^{n-k}$$

Nazywa się to rozkładem dwumianowym, ponieważ prawa strona jest  $k$ -tym wyrazem dwumianowego rozwinięcia  $(q + p)^n$ , zbadanego po raz pierwszy przez Izaaka Newtona.

**Rozkład geometryczny:**

jest dyskretnym rozkładem prawdopodobieństwa opisującym prawdopodobieństwo zdarzenia, że proces Bernoulliego zakończy się sukcesem dokładnie w  $k$ -tej próbie.

$$p(k; p) = p q^k \equiv p(1-p)^k$$

## Rozkład Poisson'a (podejście bardziej zaawansowane):

Jeżeli prawdopodobieństwo  $p$  jest małe, ale liczba prób  $n$  jest duża, tak że ich iloczyn  $\lambda = np$  nie jest zanedbywalnie mały, wygodnie jest zastosować przybliżenie dla  $b(k; n, p)$  opisane po raz pierwszy przez Siméona Poissona. Aby wyprowadzić jego wyrażenie, zaczniemy od zauważenia, że dla  $k = 0$  mamy:

$$b(0; n, p) = (1-p)^n = \left(1 - \frac{\lambda}{n}\right)^n$$

$$\ln(b(0; n, p)) = n \ln\left(1 - \frac{\lambda}{n}\right) \approx -\lambda - \frac{\lambda^2}{2n} - \dots \Rightarrow b(0; n, p) \approx e^{-\lambda}$$

słuszne dla dużych  $n$ .

$$\frac{b(k; n, p)}{b(k-1; n, p)} = \frac{\frac{n!}{k!(n-k)!} p^k q^{n-k}}{\frac{n!}{(k-1)!(n-k+1)!} p^{k-1} q^{n-k+1}} = \frac{n-k+1}{k} \frac{p}{q} = \frac{\lambda - (k-1)p}{kq} = \frac{\lambda}{k} \left( \frac{1 - \frac{(k-1)p}{pn}}{q} \right) \approx \frac{\lambda}{k}$$

$$b(1; n, p) = b(0; n, p) \frac{\lambda}{1} = \lambda e^{-\lambda}$$

$$b(2; n, p) = b(1; n, p) \frac{\lambda}{2} = \lambda e^{-\lambda} \frac{\lambda}{2} = \frac{\lambda^2}{2} e^{-\lambda}$$

i w ogólności:

$$b(k; n, p) = \frac{\lambda^k}{k!} e^{-\lambda}$$

Jest to przybliżenie Poissona rozkładu dwumianowego. Gdy  $n$  jest wystarczająco duże, możemy uznać  $b(k; n, \lambda/n)$  zasadniczo za  $p(k; \lambda)$ :

$$p(k; \lambda) = \frac{\lambda^k}{k!} e^{-\lambda}$$

Ostatnie równanie jest znane jako rozkład Poissona.

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \cdot \delta F(t+\tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2}$$

Równanie dla  $G(\tau)$  nie ogranicza się do dyfuzji i może być użyte do wyprowadzenia funkcji korelacji dla dowolnego procesu, który skutkuje wahaniami intensywności. Kiedy można założyć, że tylko dyfuzja fluoroforów daje wkład do  $G(\tau)$ , to:

$$\langle \delta C(\vec{r}, 0) \cdot \delta C(\vec{r}', \tau) \rangle = C_{av} (4\pi D\tau)^{3/2} \exp\left(-\frac{|\vec{r} - \vec{r}'|^2}{4D\tau}\right)$$

$C_{av}$  – średnie stężenie fluoroforów;  $r$  – położenie fluoroforu w chwili 0;  $r'$  – położenie fluoroforu w chwili  $\tau$ ; wtedy

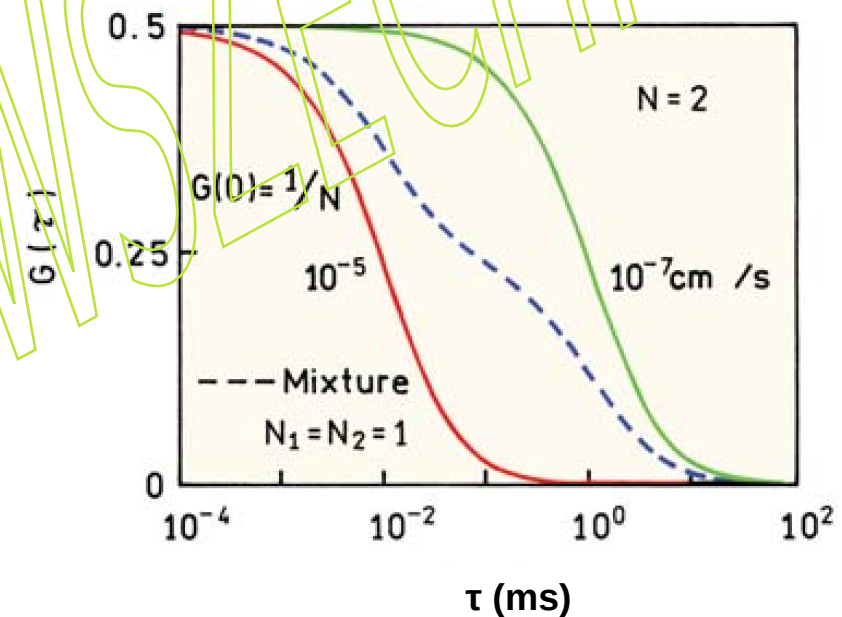
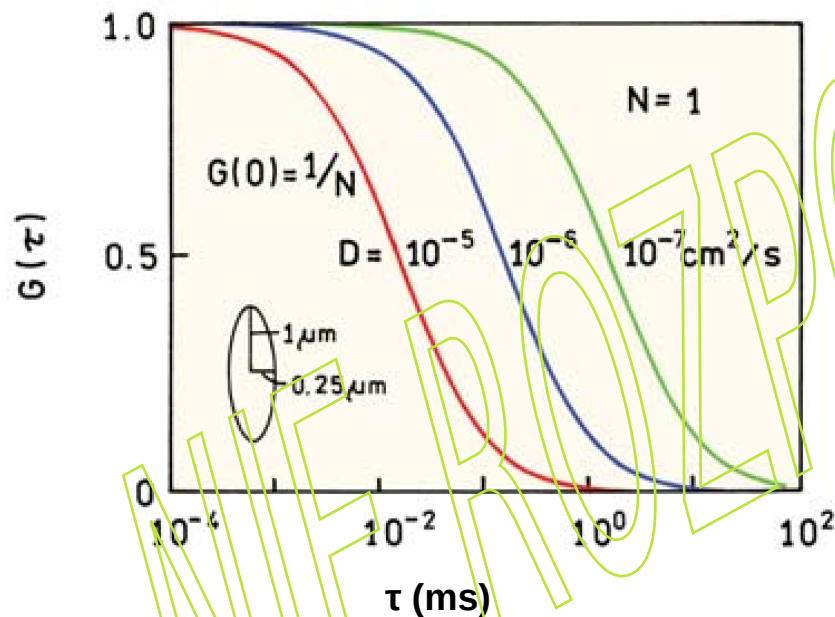
$$G(\tau) = G(0) \left(1 + \frac{4D\tau}{\omega_{xy}^2}\right)^{-1} \cdot \left(1 + \frac{4D\tau}{\omega_z^2}\right)^{-1/2}$$

gdzie  $G(0)$  jest amplitudą w chwili  $\tau = 0$ .

$$G(0) = \frac{1}{\langle N \rangle} = \frac{1}{V_{eff} C_{av}}$$

$$G(\tau) = G(0) \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1} \cdot \left[1 + \left(\frac{\omega_{xy}}{\omega_z}\right)^2 \frac{\tau}{\tau_D}\right]^{-1/2} \equiv G(0) \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1} \cdot \left(1 + S^2 \cdot \frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1/2}$$

$$\tau_D \equiv \frac{\omega_{xy}^2}{4D}$$



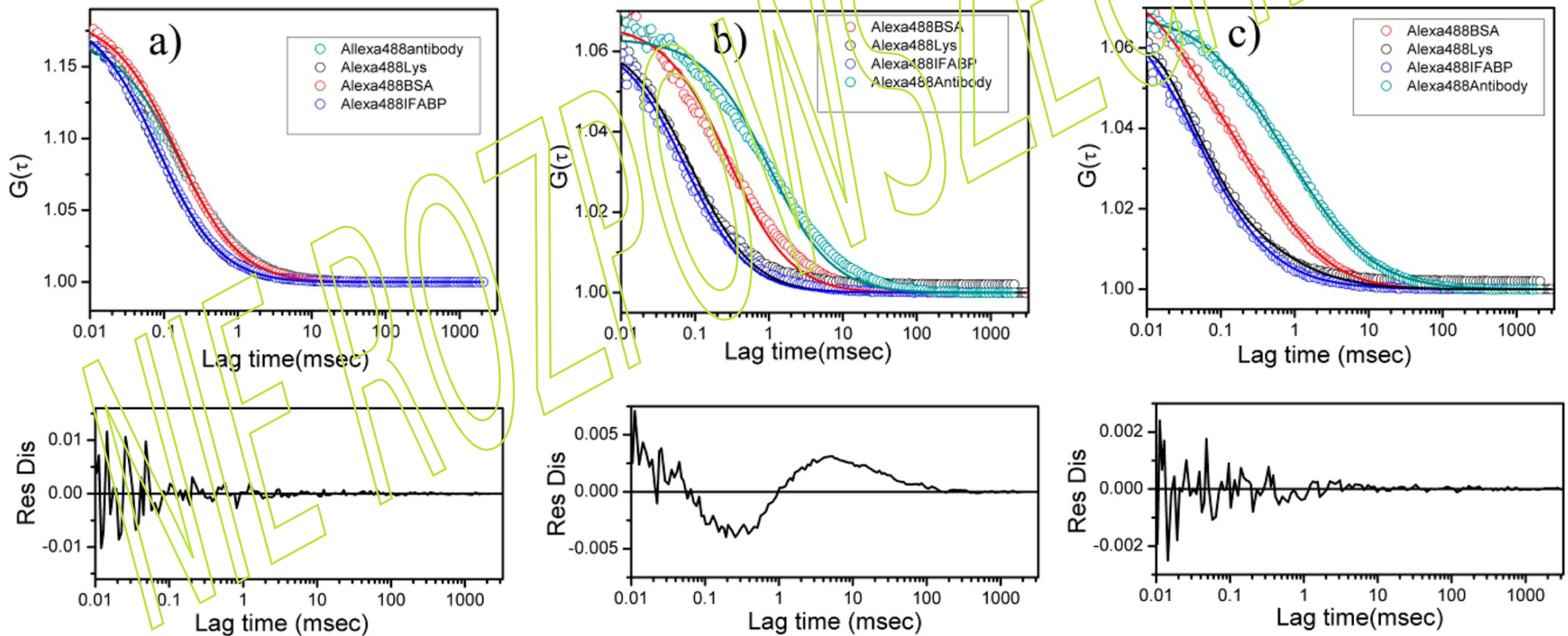
Symulowane funkcje autokorelacji dla dyfuzji w trzech wymiarach dla współczynników dyfuzji od  $10^{-5}$  do  $10^{-7}$   $\text{cm}^2/\text{s}$  (po lewej) oraz dla mieszaniny dwóch rodzajów cząsteczek o różnych współczynnikach dyfuzji (po prawej). Założono, że obserwowana objętość jest elipsoidą o wymiarach  $\omega_{xy} = 0.25 \mu\text{m}$  i  $\omega_z = 1 \mu\text{m}$ .

Źródło: Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*.

# Badanie wpływu kształtu i wielkości białka na jego dyfuzję w zatłoczonym środowisku metodą FCS

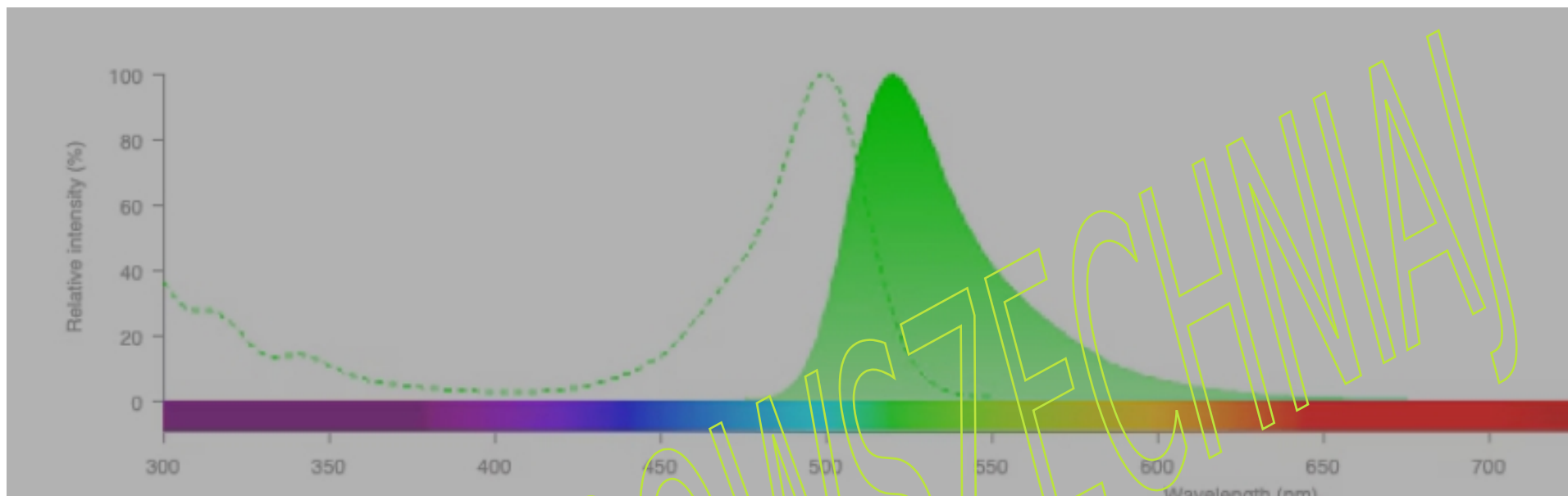
Langmuir 29:14709-14717 (2013)

Albumina surowicy bydlęcej (BSA), lizozym, ośle przeciwciało anty-kozie klasy IgG, pojedynczy mutant cysteinowy jelitowego białka wiążącego kwasy tłuszczowe (IFABP);  
Białka wyznakowano Malemidową pochodną Alexa488;  
Dyfuzję badano w 20-mM buforze fosforanowym, pH 7.4, oraz w żelu poliakrylamidowym przygotowanym na bazie tego samego buforu;



Znormalizowane funkcje korelacji uzyskane w eksperymentach FCS w buforze fosforanowym (a) i w 10% żelu poliakrylamidowym [analiza modelem dyfuzji jednoskładnikowej b) i dwuskładnikowej c)].





**Alexa Fluor 488: jasny, zielony barwnik fluorescencyjny o wzbudzeniu 488 nm. Wykorzystywany do stabilnego generowania sygnału w obrazowaniu i cytometrii przepływowej. Rozpuszczalny w wodzie i niewrażliwy na pH w zakresie od pH 4 do pH 10.**

**Maleimidowa pochodna Alexa Fluor 488 jest najpopularniejszym narzędziem do sprzęgania barwnika z grupą tiolową w białku, tiofosforanie oligonukleotydu lub ligandzie o niskiej masie cząsteczkowej. Powstałe koniugaty Alexa Fluor 488 wykazują jaśniejszą fluorescencję i większą fotostabilność niż koniugaty innych fluoroforów o podobnym widmie.**

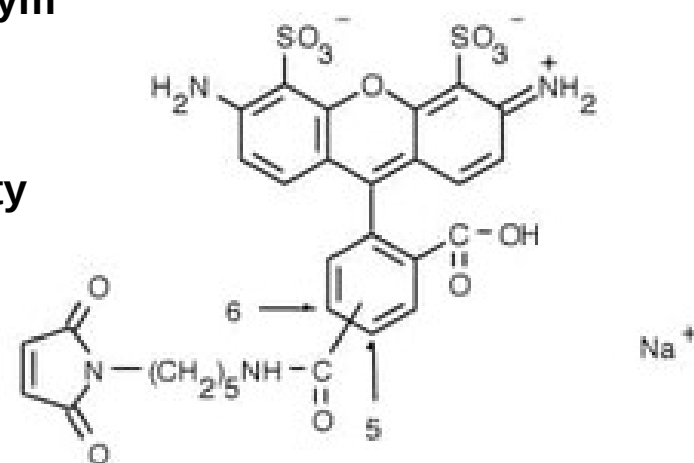
Grupa reaktywna: maleimid

Reaktywność: grupy tiolowe białek i ligandów, tiofosforany oligonukleotydu

Ex/Em koniugatu: 493/516 nm

Współczynnik ekstynkcji: 72,000 cm<sup>-1</sup>M<sup>-1</sup>

Masa cząsteczkowa: 720.66



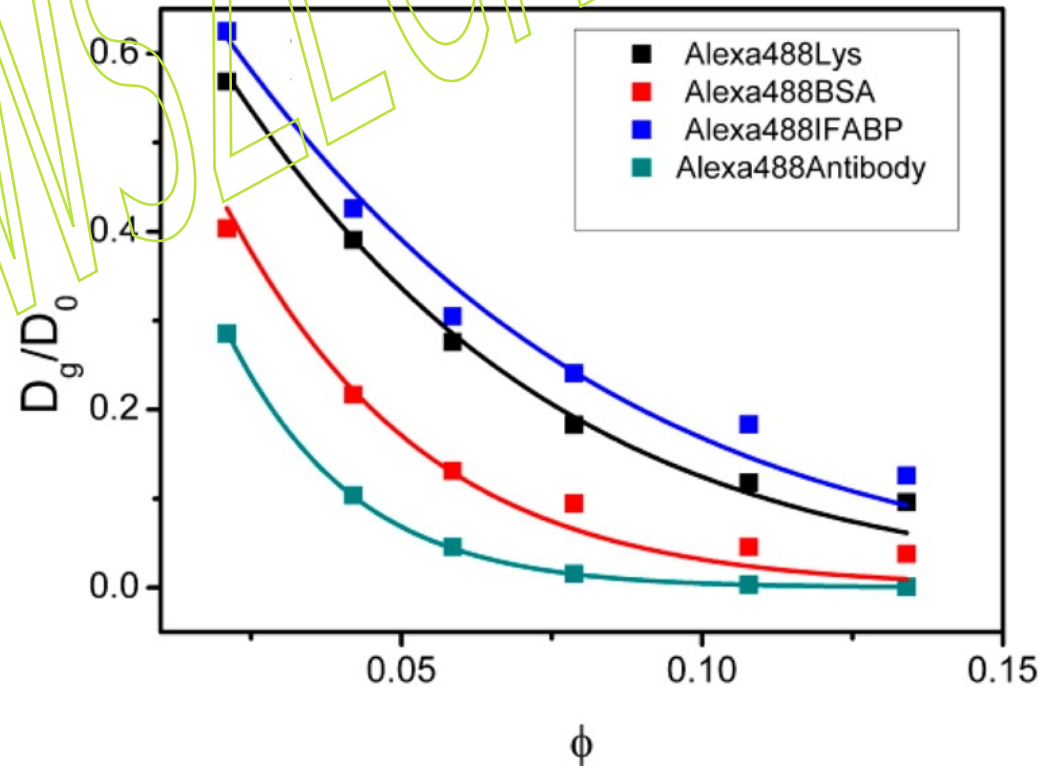
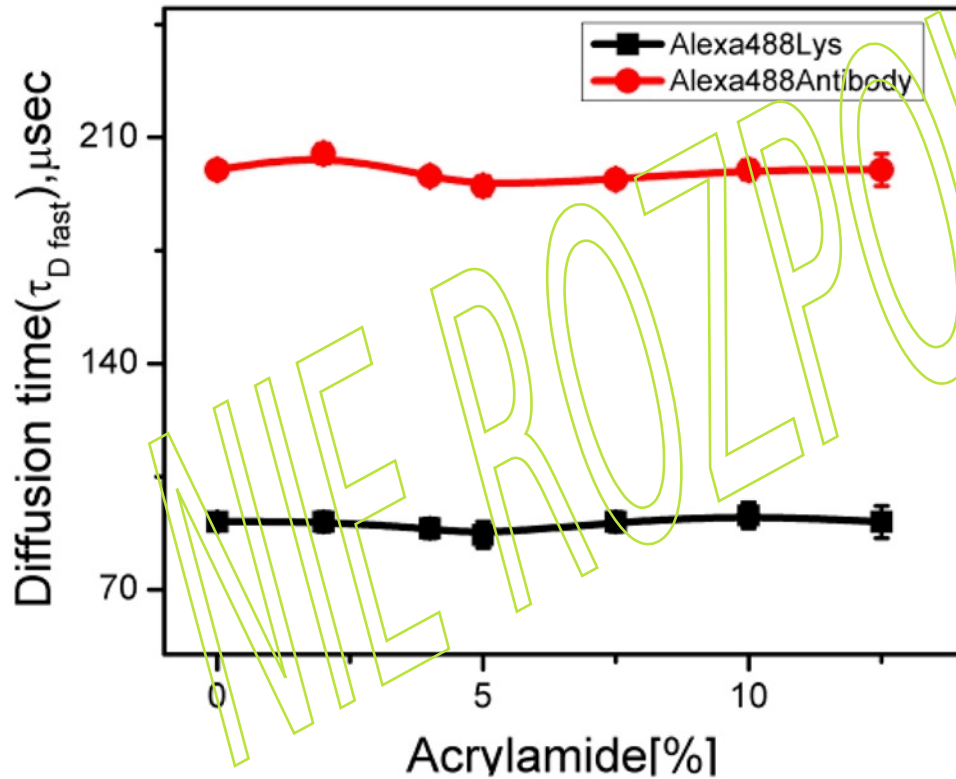
In buforze fosforanowym:

$$G(\tau) = \frac{1}{N} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1} \cdot \left(1 + S^2 \cdot \frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1/2};$$

Wartość S została określona w eksperymentach FCS z wolnym barwnikiem (Alexa488), a jej wartości (zazwyczaj około 5 i zawsze mniej niż 10 we wszystkich opisanych tutaj pomiarach) zostały ustalone na potrzeby analiz danych dotyczących białka.

$$D_{\text{FAPB}} = 1.16; \quad D_{\text{Lys}} = 1.08; \quad D_{\text{BSA}} = 0.62; \quad D_{\text{Antibody}} = 0.49 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$$

$$\text{In gel: } G(\tau) = \frac{1}{N} \sum_i A_i \left(1 + \frac{\tau}{\tau_{D_i}}\right)^{-1} \cdot \left(1 + S^2 \cdot \frac{\tau}{\tau_{D_i}}\right)^{-1/2}; \quad \sum_i A_i = 1; \quad \tau_{D_i} \equiv \frac{\omega_{xy}^2}{4D_i}$$



**Po lewej:** Zmiany  $\tau_{D, \text{fast}}$  dla Alexa488Lys i Alexa488Antibody w funkcji stężenia akryloamidu w żelu.  
**Po prawej:** Zmiany wartości współczynników dyfuzji ( $D_g/D_0$ ) w funkcji ułamka objętości żelu poliakryloamidowego ( $D_g/D_0 = z/\text{bez żelu}$ ,  $D_g$  otrzymno z  $\tau_{D, \text{slow}}$ ).



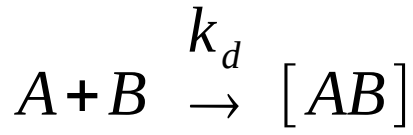
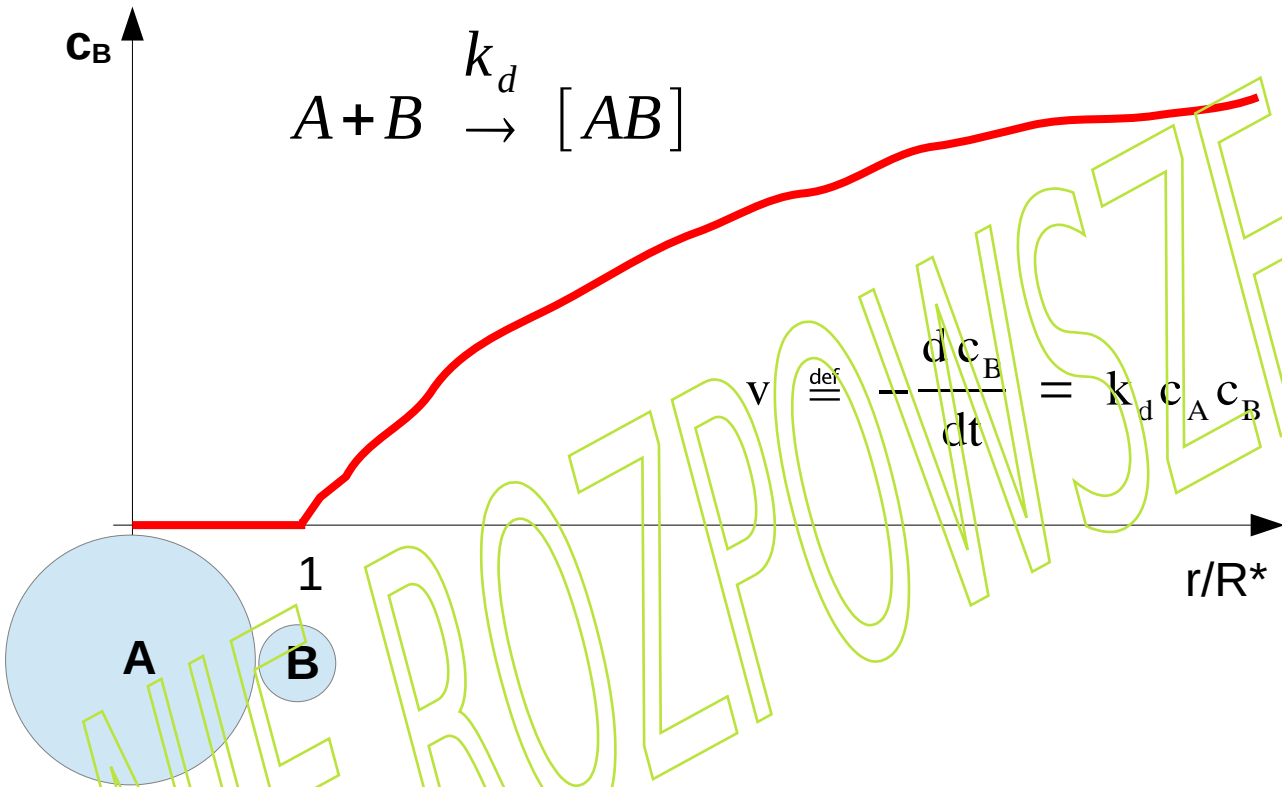
	One diffusion fit in solution	Two diffusion fit in 10% polyacrylamide gel	
Proteins	<sup>†</sup> Diffusion time ( $\tau_D$ ), $\mu\text{sec}$ in solution	<sup>!!</sup> Fast component ( $\tau_{D\text{fast}}$ ), $\mu\text{sec}^{**}$	<sup>!†</sup> Slow Component ( $\tau_{D\text{slow}}$ ), $\mu\text{sec}^{**}$
Alexa488IFABP	85	81	335
Alexa488Lys	91	90	355
Alexa488BSA	160	154	1490
Alexa488Antibody	200	214	1920

\*\* All the data were obtained using the two diffusion fits of autocorrelation functions of proteins in 10% polyacrylamide gel.

<sup>†</sup> The values of diffusion time of four proteins in free solution were determined using single diffusion fits of the experimental autocorrelation functions in solution.

<sup>!!</sup> These values of diffusion time were obtained using the two component diffusion fits of autocorrelation functions of proteins inside 10% polyacrylamide gel.

Smoluchowski 1917

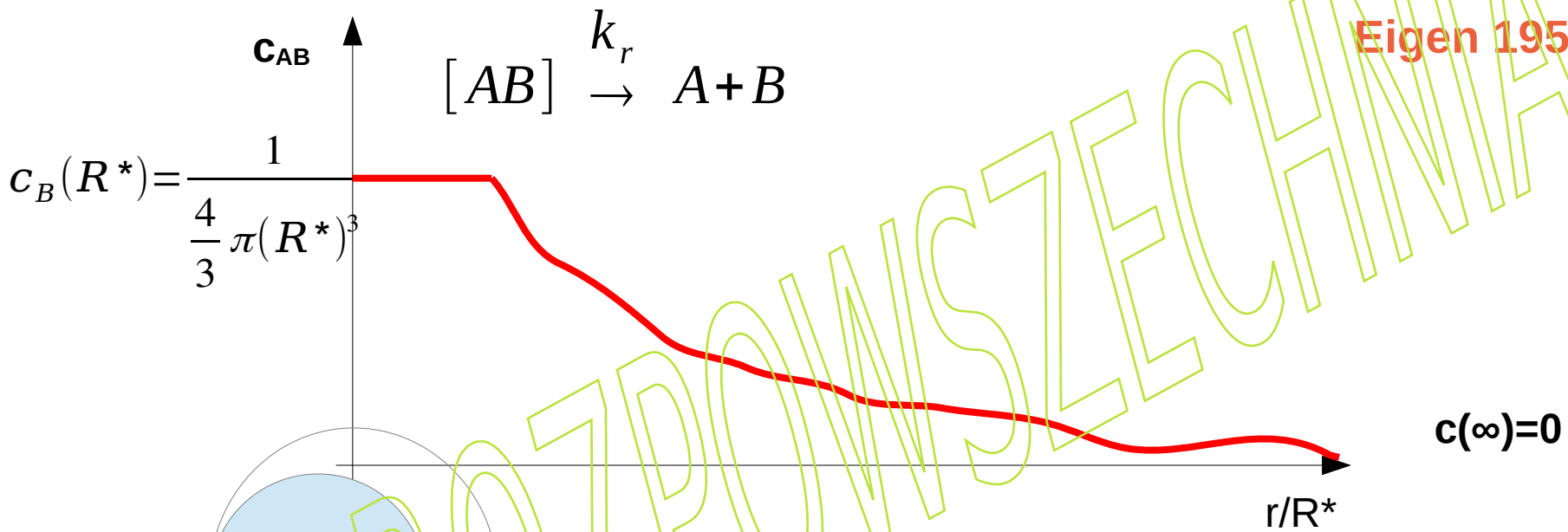


$$c(\infty) = c_{B0}$$

$$v \stackrel{\text{def}}{=} - \frac{dc_B}{dt} = k_d c_A c_B$$

$$k_d = 4\pi(D_A + D_B)(R_A + R_B)$$

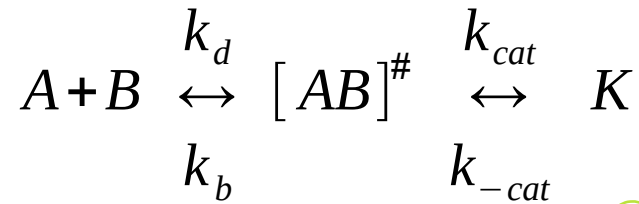
[liczba molekuł na ml na sek]; aby zmienić na jednostki  $[M^{-1} \text{ sec}^{-1}]$  trzeba pomnożyć przez  $10^{-3} N_A$



$$k_r = \frac{3(D_A + D_B)}{(R^*)^2}$$

$$K_{ass} = \frac{k_d}{k_r} = \frac{4}{3} \pi (R^*)^3$$

## Reakcje i dyfuzja



$k_d$  stała szybkości tworzenia kompleksu spotkaniowego poprzez dyfuzję;

$k_b$  stała szybkości dysocjacji kompleksu spotkaniowego poprzez dyfuzję;

$k_{cat}$  katalityczna stała szybkości tworzenia wiązania;

$k_{-cat}$  katalityczna stała szybkości zerwania wiązania;



$$\frac{dc_K}{dt} = k_{cat} c_{[AB]^\#} - k_{-cat} c_K$$

$$\frac{dc_K}{dt} = k_R c_A c_B - k_D c_K$$

## Reakcje kontrolowane przez dyfuzję

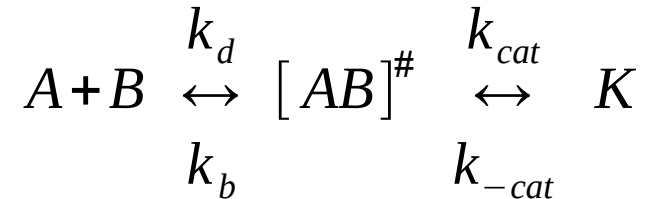
$$\frac{dc_{[AB]^\#}}{dt} = k_d c_A c_B - (k_b + k_{cat}) c_{[AB]^\#} + k_{-cat} c_K \equiv 0$$

$$c_{[AB]^\#} = \frac{k_d c_A c_B + k_{-cat} c_K}{k_b + k_{cat}}$$

$$\frac{dc_K}{dt} = k_{cat} \frac{k_d c_A c_B + k_{-cat} c_K}{k_b + k_{cat}} - k_{-cat} c_K \equiv \frac{k_d k_{cat}}{k_b + k_{cat}} c_A c_B + \frac{k_{cat} k_{-cat}}{k_b + k_{cat}} c_K - k_{-cat} c_K$$



$$k_D = \frac{k_b k_{-cat}}{k_b + k_{cat}}$$



Gdy  $k_b \ll k_{cat}$ , wtedy  $k_R = k_d$ , a reakcję nazywa się kontrolowaną przez dyfuzję.