

Wybrane Zagadnienia Biofizyki Molekularnej

(1100-5BM15)

Jan M. Antosiewicz

**Zakład Biofizyki
Instytut Fizyki Doświadczalnej
Wydział Fizyki**

WKŁAD 9

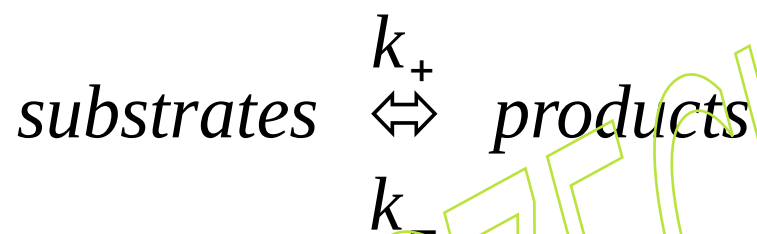
5 listopada, 2024

**Kinetyka biomolekularna
(metody relaksacyjne, T-jump - część 1)**

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

jantosi@fuw.edu.pl

Spektrometria T-jump



$$K = \frac{k_+}{k_-}$$

$$\frac{\partial \ln K}{\partial T} = \frac{\Delta H^\ominus}{RT^2}; \quad \frac{\partial \ln K}{\partial T} = \frac{1}{K} \frac{\partial K}{\partial T}; \quad \Rightarrow \quad \frac{\Delta K}{K} = \frac{\Delta H^\ominus}{RT^2} \Delta T$$

Kanoniczna funkcja podziału i prawo Boltzmann

Funkcje podziału opisują statystyczne właściwości układu w równowadze termodynamicznej. W rzeczywistości istnieje kilka różnych typów funkcji podziału, z których każdy odpowiada różnym typom zespołów statystycznych (lub, równoważnie, różnym rodzajom energii swobodnej).

Kanoniczna funkcja podziału ma zastosowanie do zespołu kanonicznego, w którym system może wymieniać ciepło z środowiskiem o stałej temperaturze, objętości i liczbie cząstek.

$$Z = \sum_s \exp\left(-\frac{E_s}{k_B T}\right)$$

W przypadku zdegenerowanych poziomów energii funkcję podziału możemy zapisać pod względem udziału poziomów energii (indeksowanych przez j) w następujący sposób:

$$Z = \sum_j g_j \exp\left(-\frac{E_j}{k_B T}\right)$$

gdzie g_j jest współczynnikiem degeneracji, czyli liczbą stanów kwantowych s , które mają ten sam poziom energii określony przez $E_j = E_s$.

Prawo Boltzmann:

$$\frac{p_{s_A}}{p_{s_B}} = e^{-\frac{(E_{s_A} - E_{s_B})}{k_B T}} = e^{-\frac{\Delta E}{k_B T}}; \quad \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{p_{s_A}}{p_{s_B}} = 1$$

Równowaga $A \rightleftharpoons B$ z perspektywy mechaniki statystycznej

Stała równowagi dla reakcji $A \rightleftharpoons B$ może być zapisana jako:

$$K = \frac{\bar{c}_B}{\bar{c}_A}$$

z warunkiem zachowania masy:

$$\bar{c}_A + \bar{c}_B = c_0$$

Wprowadzając ułamki molowe

$$f_A = \frac{\bar{c}_A}{c_0} \quad f_B = \frac{\bar{c}_B}{c_0}$$

otrzymujemy:

$$K = \frac{f_B}{f_A} \quad f_A = \frac{1}{1+K} \quad f_B = \frac{K}{1+K}$$

Ze standardowej termodynamiki mamy: $K = \exp\left(-\frac{\Delta G^\circ}{RT}\right)$

gdzie $\Delta G^\circ = g_B^\circ - g_A^\circ$, a g_X° jest standardową energią Gibbs'a na mol X.

zatem:

$$f_A = \frac{1}{1 + \exp\left(-\frac{\Delta G^\circ}{RT}\right)} = \frac{\exp\left(-\frac{g_A^\circ}{RT}\right)}{\exp\left(-\frac{g_A^\circ}{RT}\right) + \exp\left(-\frac{g_B^\circ}{RT}\right)}$$

i:

$$f_B = \frac{\exp\left(-\frac{\Delta G^\circ}{RT}\right)}{1 + \exp\left(-\frac{\Delta G^\circ}{RT}\right)} = \frac{\exp\left(-\frac{g_B^\circ}{RT}\right)}{\exp\left(-\frac{g_A^\circ}{RT}\right) + \exp\left(-\frac{g_B^\circ}{RT}\right)}$$

Zatem standardowe swobodne energie Gibbsa można traktować jak poziomy energii w mechanice kwantowej.

Prawo Boltzmann dla substratów i produktów reakcji

$$\ln K = -\frac{\Delta G^\ominus}{RT} = -\frac{\Delta H^\ominus - T\Delta S^\ominus}{RT}$$

$$\ln K = -\frac{G_A^\ominus - G_B^\ominus}{RT} = -\frac{(H_A^\ominus - TS_A^\ominus) - (H_B^\ominus - TS_B^\ominus)}{RT}$$

$$\frac{p_A}{p_B} = e^{-\frac{G_A^\ominus - G_B^\ominus}{RT}} = e^{-\frac{(H_A^\ominus - TS_A^\ominus) - (H_B^\ominus - TS_B^\ominus)}{RT}} = e^{-\frac{H_A^\ominus - H_B^\ominus}{RT}} \cdot e^{-\frac{(-S_A^\ominus) - (-S_B^\ominus)}{R}}; \quad \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{p_A}{p_B} = e^{-\frac{S_B^\ominus - S_A^\ominus}{R}}$$



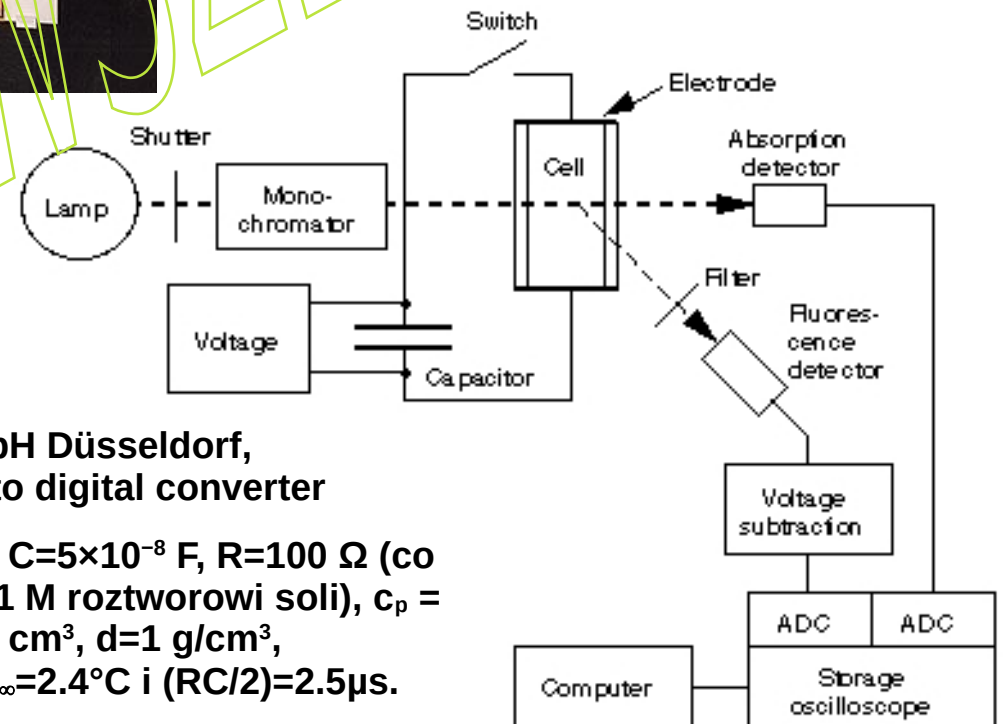
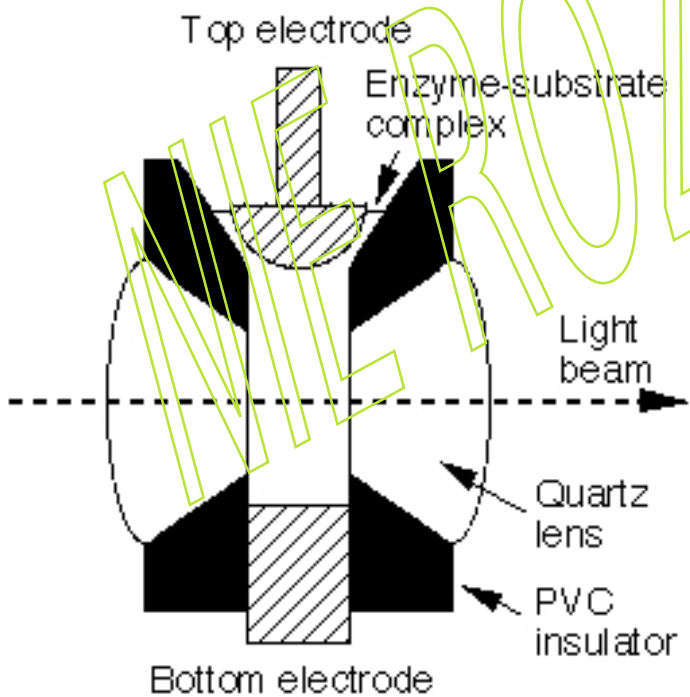
$$U = \frac{1}{2} \frac{Q_0^2}{C} = \frac{1}{2} C V_0^2$$

$$i(t) = \frac{V_0}{R} \exp\left(-\frac{t}{RC}\right)$$

$$\Delta T(t) = \int_0^t \frac{[i(t')]^2 R}{c_p v d} dt'$$

$$\Delta T_\infty = \frac{C V_0^2}{2} \frac{1}{c_p v d}$$

$$\Delta T(t) = \Delta T_\infty (1 - \exp(-2t/RC))$$



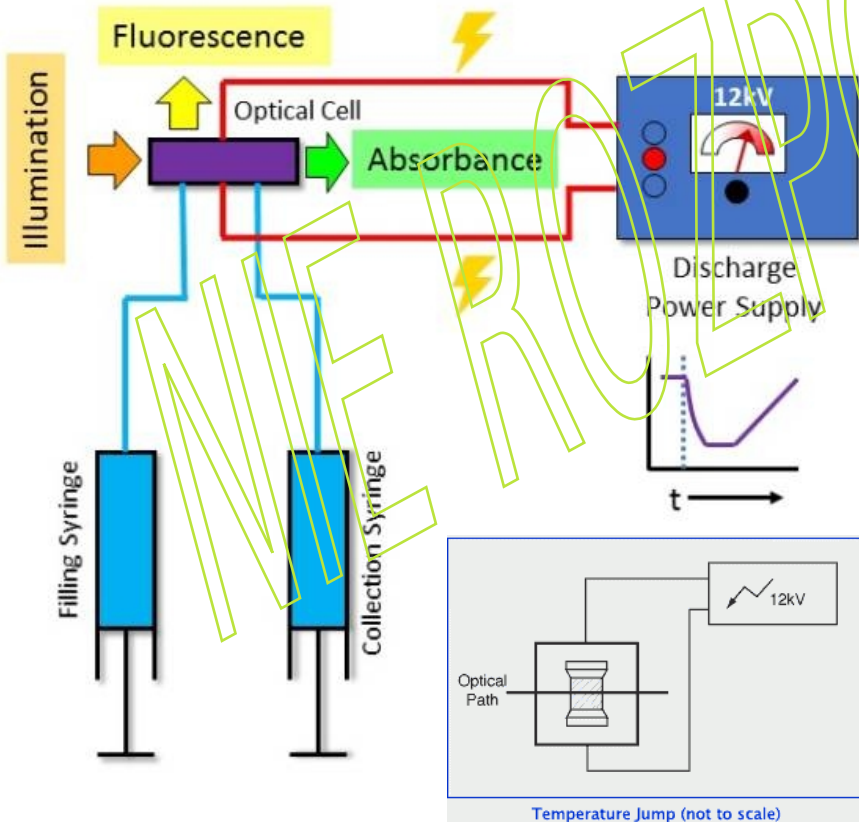
**DIA-LOG GmbH Düsseldorf,
ADC=analog to digital converter**

$Z V_0 = 2 \times 10^4 \text{ V}$, $C = 5 \times 10^{-8} \text{ F}$, $R = 100 \Omega$ (co
odpowiada 0.1 M roztworowi soli), $c_p =$
 $4.2 \text{ J/g} \cdot \text{K}$, $v = 1 \text{ cm}^3$, $d = 1 \text{ g/cm}^3$,
dostajemy $\Delta T_\infty = 2.4^\circ \text{C}$ i $(RC/2) = 2.5 \mu\text{s}$.

$$dW = V dQ = V I dt = (IR) I dt = I^2 R dt \Rightarrow W = \int_0^t [i(t')]^2 R dt'$$

TgK Scientific, 7 Long's Yard St Margaret's
Street, Bradford on Avon BA15 1DH
United Kingdom

Temperature-Jump System, TJ-64



System skoku temperatury TJ-64 firmy TgK Scientific to przyrząd wykorzystujący metodę ogrzewania Joule'a, w której wyładowanie elektryczne powoduje szybką zmianę temperatury 100 μ l objętości reakcji, zaburzając w ten sposób jej równowagę. Przyrząd ten umożliwia skoki temperatury do 10°C w ciągu kilku mikrosekund.

System składa się z termostatu naczynka połączonego bezpośrednio z układem optycznym z możliwością detekcji absorpcji i fluorescencji. System wykorzystuje zasilacze magazynujące energię pod wysokim napięciem w kondensatorach. Energia kondensatorów jest szybko rozładowywana poprzez badaną próbkę.

A Nanosecond Temperature-Jump Apparatus (z ogrzewaniem Joule'a, za pomocą kabla koncentrycznego*)

G. W. Hoffman

Charakterystyka rozładowania kabla koncentrycznego nie jest taka sama jak w przypadku zwykłego kondensatora, ponieważ kabel ma zarówno właściwości indukcyjne, jak i pojemnościowe. W przypadku kabla bezstratnego najważniejszymi parametrami jest impedancja Z , określona przez

$$Z = (L/C)^{1/2}$$

oraz prędkość propagacji v , dana wzorem

$$v = (LC)^{-1/2}$$

gdzie L to indukcyjność kabla na jednostkę długości, a C to pojemność na jednostkę długości. Dla kabla koncentrycznego

$$L = (\mu/2\pi) \cdot \ln(b/a) \quad \text{and} \quad C = (2\pi\epsilon) [\ln(b/a)]^{-1}$$

gdzie a i b to promienie odpowiednio wewnętrznego i zewnętrznego przewodnika oraz gdzie μ to przenikalność magnetyczna, a ϵ to stała dielektryczna izolatora. Zatem

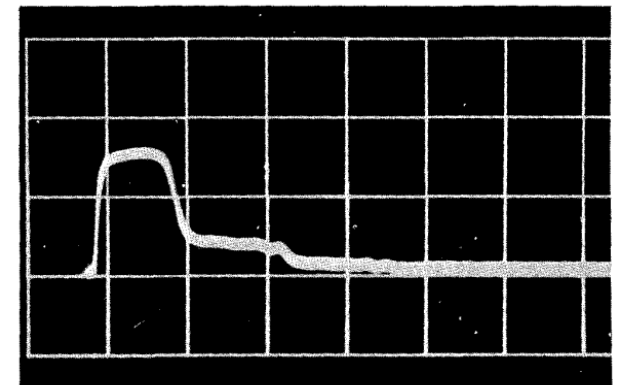
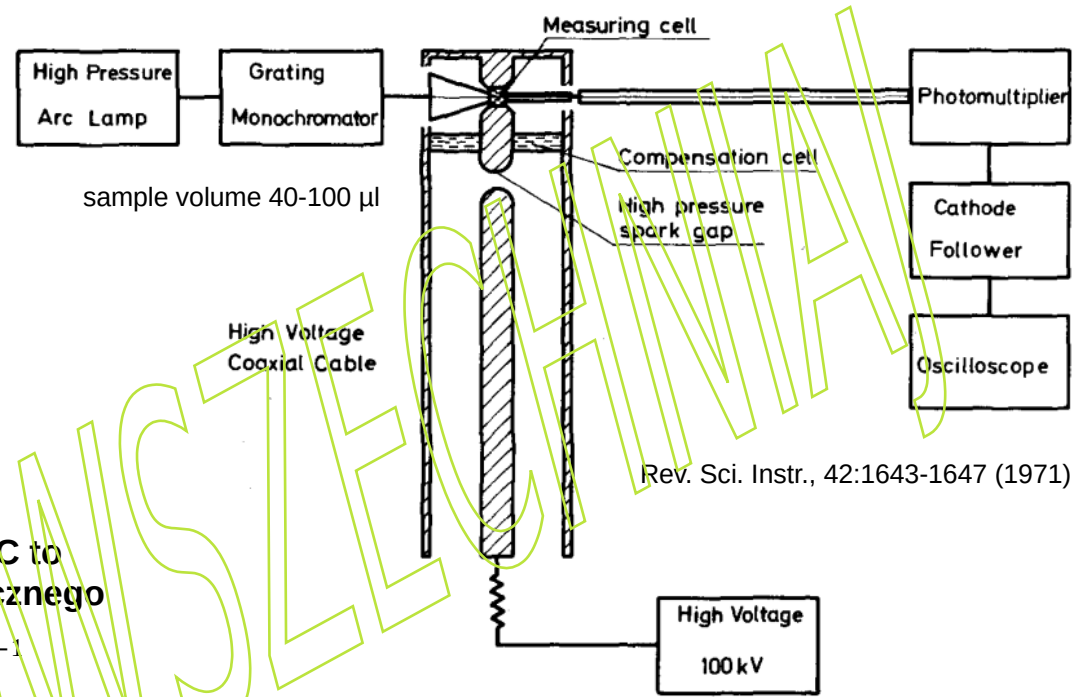
$$Z = (1/2\pi)(\mu/\epsilon)^{1/2} \ln(b/a) \quad \text{i} \quad v = (\mu\epsilon)^{-1/2}$$

Czas t_0 przesłania fali elektromagnetycznej wzdłuż kabla o długości s wyraża się wzorem $t_0 = s/v$.

Gdy jeden koniec kabla jest obciążony rezystancją R , współczynnik odbicia r na tym końcu jest określony wzorem

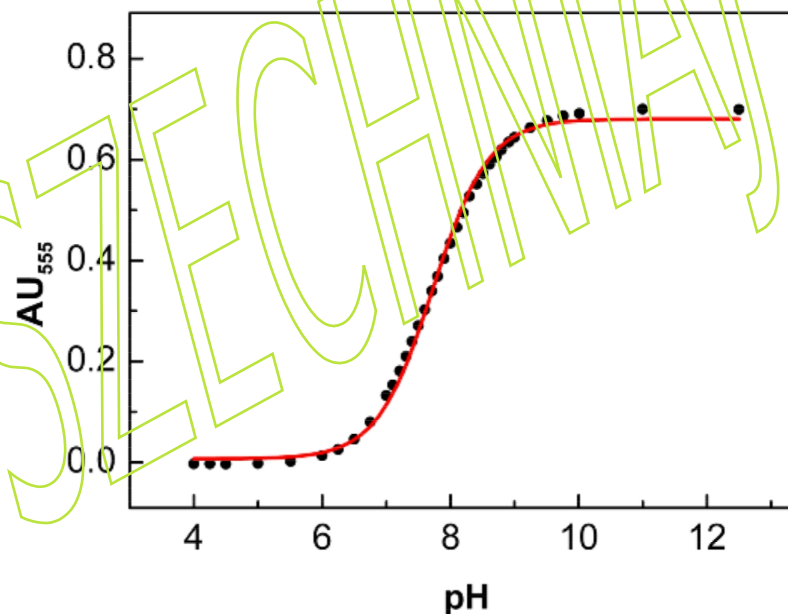
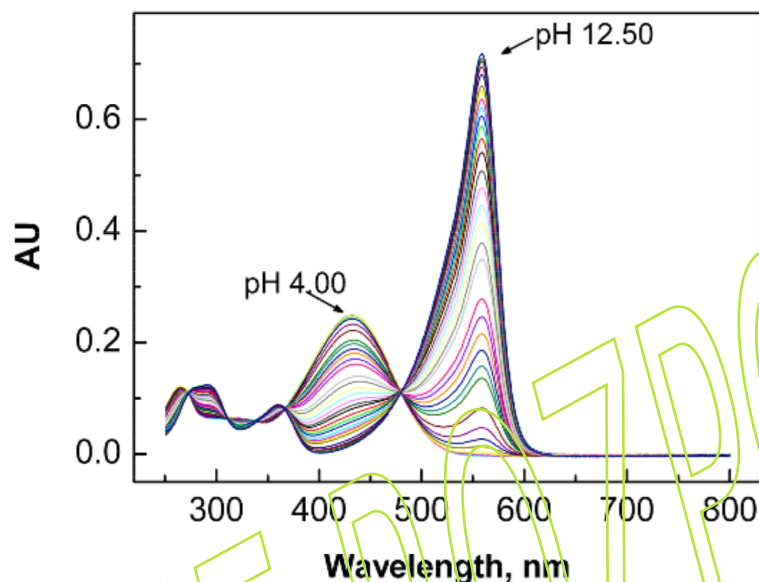
$$r = (R - Z)/(R + Z)$$

Zatem, gdy $R > Z$, odbicie następuje z tą samą fazą ($r > 0$), a gdy $R < Z$ następuje z odwróceniem fazy ($r < 0$). Dla $R = Z$, $r = 0$ i nie ma odbicia. Jest to stan pozwalający na najszybsze rozładowanie kabla o danej długości. Warunek dopasowania $R = Z$ nie jest krytyczny.



Forma impulsu prądu rozładowania ($R = 50 \Omega$, $Z = 28 \Omega$). Skala pozioma 50 ns/dz. Zatem wymóg dopasowania nie jest bardzo krytyczny. Wewnętrzny przewodnik jest ładowany do napięcia do 100 kV. Jest on odizolowany od naczynka próbki za pomocą iskiernika wysokociśnieniowego. Wyładowanie następuje poprzez zawór magnetyczny uwalniający to ciśnienie (około 10 atm).

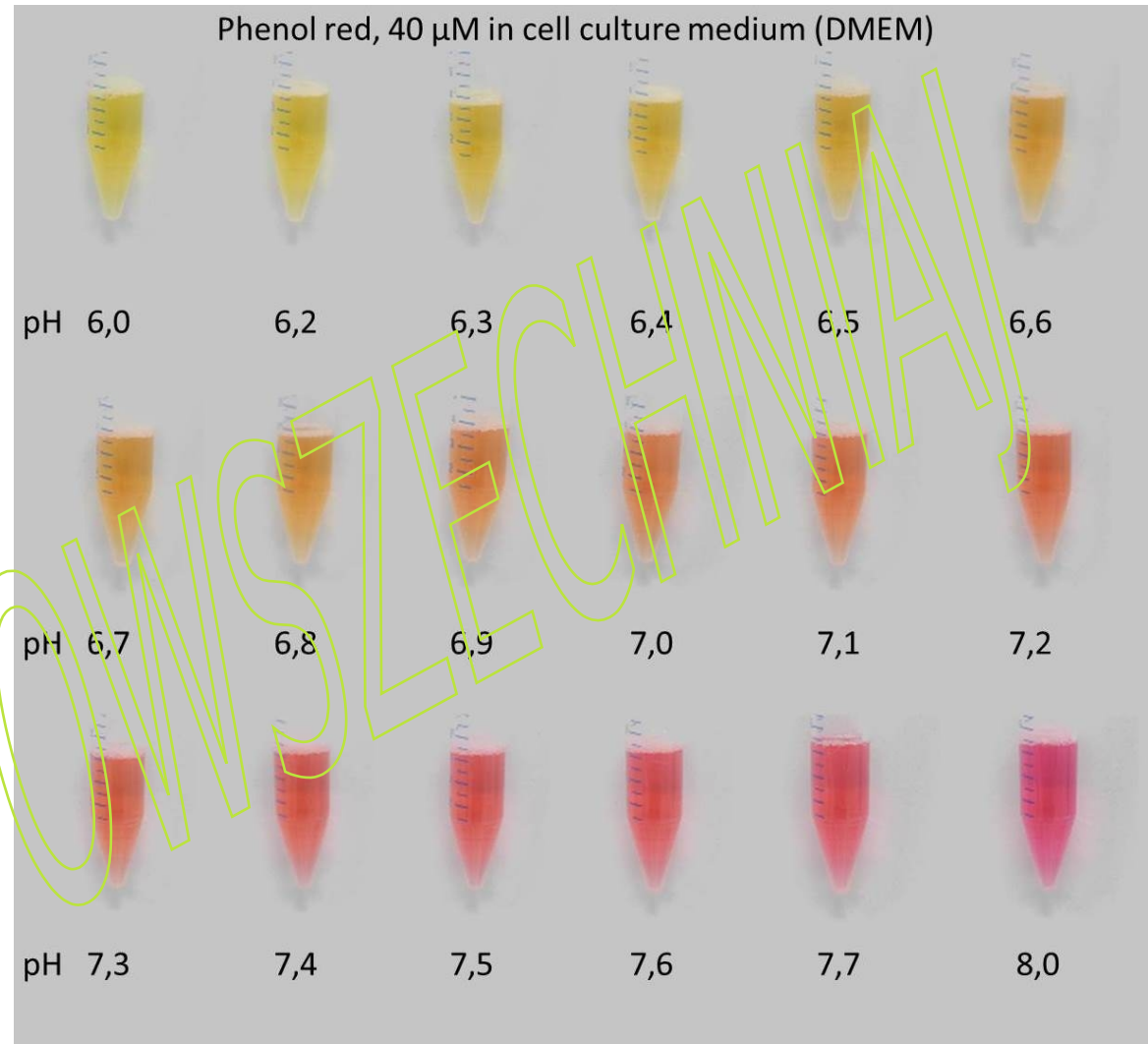
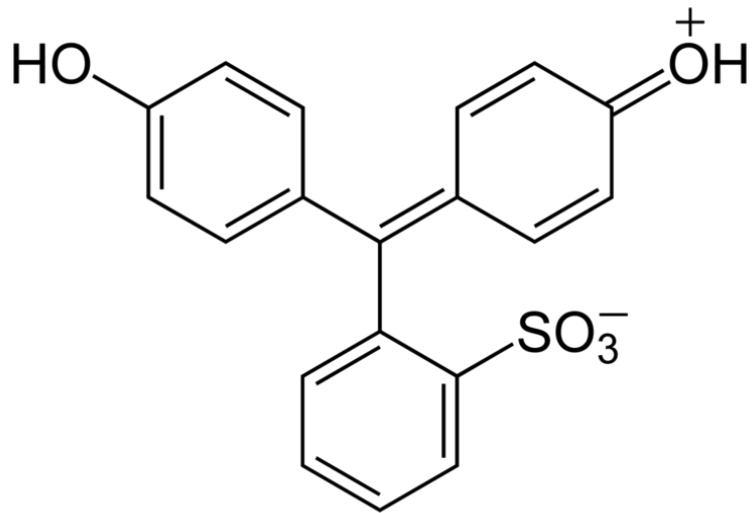
*Kabel koncentryczny składa się z wewnętrznego przewodnika otoczonego koncentryczną osłoną przewodzącą, przy czym oba te elementy są oddzielone dielektrykiem (materiałem izolacyjnym). Prędkość propagacji, z jaką sygnał elektryczny może roszodzić się w kablu jest porównywalna z prędkością światła.



W celu skalibrowania obserwowanych zmian temperatury odpowiadających przyłożonym napięciom wyładowania zbadano sprzężoną reakcję Tris/czerwień fenolowa za pomocą analizy amplitudy relaksacji. Czerwień fenolowa jest powszechnie stosowanym wskaźnikiem pH z dobrze określoną zmianą koloru podczas protonowania/deprotonowania. Tris jest buforem o działaniu znacząco zależnym od temperatury, z pK_a równym 8.21 w 21 °C (Tris: $\Delta pK_a/\Delta T = -0.027/^\circ\text{C}$; czerwień fenolowa: $\Delta pK_a/\Delta T = -0.006/^\circ\text{C}$). **Lewa:** Zależność pH absorbancji czerwieni fenolowej w 100 mM roztworze Tris w temperaturze 25 °C. **Prawa:** Absorbancja przy 555 nm wykreślona w funkcji dopasowania pH (czerwona linia) do:

$$AU_{555} = AU_{max} + \frac{AU_{min} - AU_{max}}{1 + 10^{pH - pK_a}}$$

z $pK_a = 7.73 \pm 0.01$ pomiary z użyciem spektrometru Varian's Cary 50.



Jako wskaźnik pH stosuje się roztwór czerwieni fenolowej: jej barwa wykazuje stopniowe przejście od żółtego do czerwonego w zakresie pH 6,8 do 8,2. Powyżej pH 8,2 czerwień fenolowa zmienia kolor na jasnorożowy (fuksja). W postaci krystalicznej oraz w roztworze w bardzo kwaśnych warunkach (niskie pH) związek występuje w postaci jonu obojnaczego, jak w strukturze pokazanej powyżej, z grupą siarczanową naładowaną ujemnie i grupą ketonową niosącą dodatkowy proton. Jeśli pH wzrośnie ($\text{pK}_a = 1.2$), proton z grupy ketonowej zostaje utracony, w wyniku czego powstaje żółty, ujemnie naładowany jon. Przy jeszcze wyższym pH ($\text{pK}_a = 7.7$), grupa wodorotlenkowa fenolu traci swój proton, w wyniku czego powstaje czerwony jon.

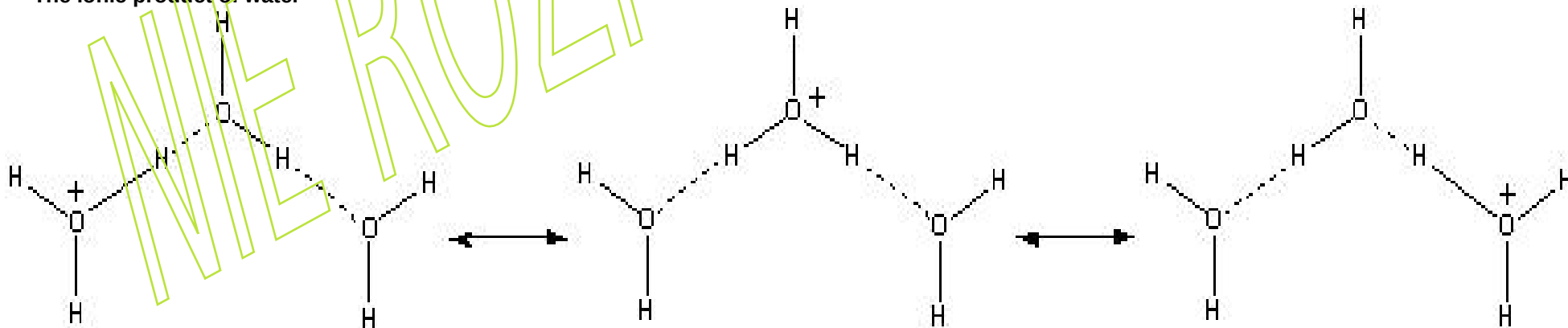
Autojonizacja (autodysocjacja) wody ...

... to reakcja jonizacji w czystej wodzie lub roztworze wodnym, podczas której cząsteczka wody, H_2O , traci jądro jednego ze swoich atomów wodoru, stając się jonem wodorotlenkowym, OH^- . Jądro wodoru, H^+ , natychmiast protonuje inną cząsteczkę wody, tworząc jon hydroniowy, H_3O^+ . W 1 dm wody obojętnej znajduje się średnio $2,5 \cdot 10^{16}$ jonów H^+ i tyle samo jonów OH^- . Każda cząsteczka wody dysocjuje raz na 11 godzin.



$$K_w = [H^+][OH^-] \quad K_w^{25^\circ C} = 10^{-14} \quad pH = -\log_{10}[H^+]$$

The ionic product of water



W przybliżeniu co 0,5 ms cząsteczka wody w rozpuszczalniku „łapie” proton, „zatrzymuje” go przez 1 ps, a następnie „przekazuje” go sąsiedniej cząsteczce wody (mechanizm Grotthusa, publikacja z 1806 r. „Teoria rozkładu cieczy przez prąd elektryczny”).

równowagi kwasowo-zasadowe



$$K_a = \frac{[A^-][H^+]}{[AH]}$$

$$pH = -\log_{10}[H^+]$$

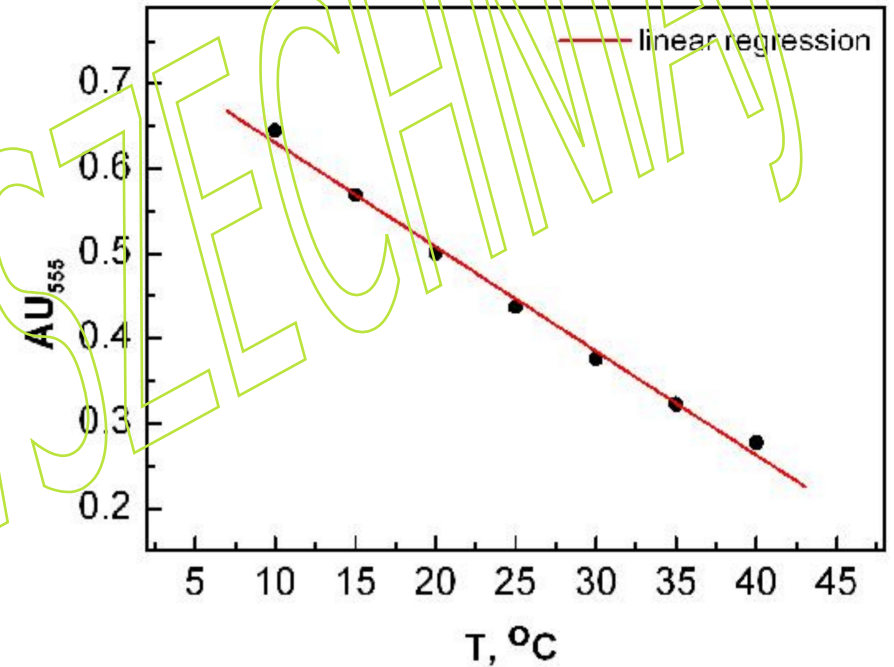
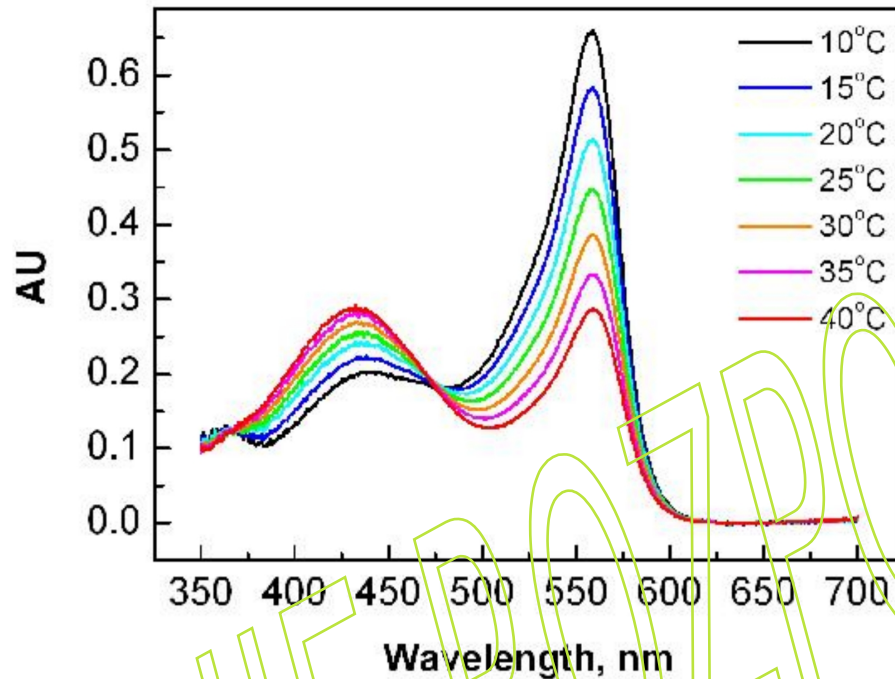
$$pK_a = -\log_{10}[K_a]$$

$$pH = pK_a + \log_{10} \frac{[A^-]}{[AH]} \equiv pK_a + \log_{10} \left(\exp\left(\frac{\Delta G^\ominus}{RT}\right) \right)$$

ΔG^\ominus wywiedzione z powyższego równania jest funkcją pH.

Równanie Henderson'a-Hasselbach'a.

TEMPERATURE CALIBRATION OF T-JUMP INSTRUMENT TJ-64 USING TRIS/PHENOL RED

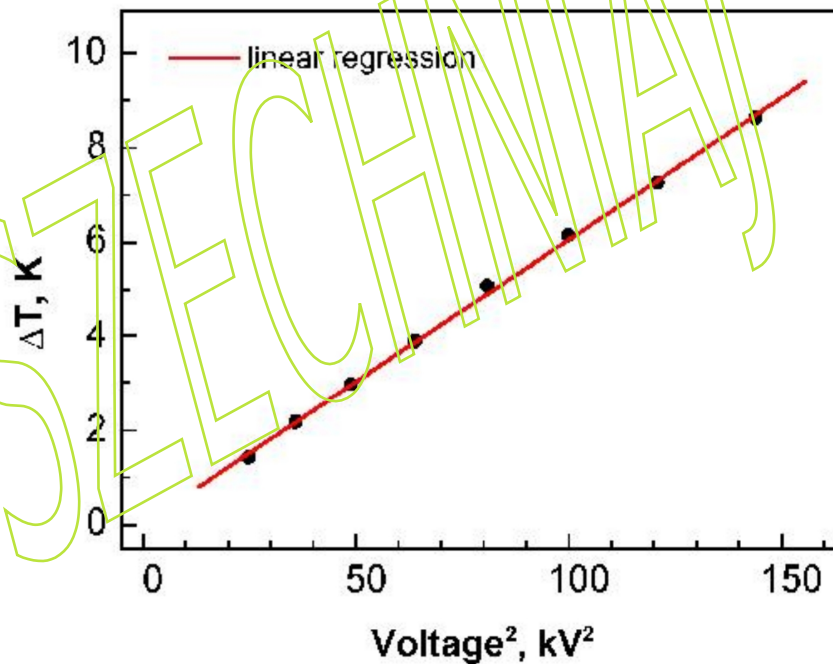
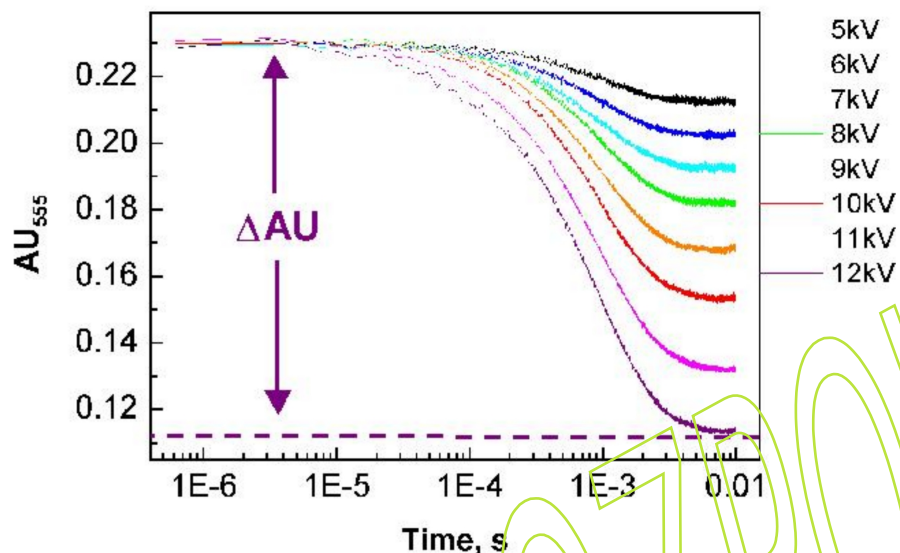


Lewa: Widma absorbancji czerwieni fenolowej w 100 mM Tris, pH 7,7 (w 25 °C) mierzone w różnych temperaturach.

Prawa: Zależność temperaturowa absorbancji deprotonowanej formy czerwieni fenolowej przy 555 nm. Nachylenie, dAU_{555}/dT , wynosi $-0.0123 \pm 0.0004 AU_{555}/^{\circ}C$

$$AU_{555}(T) = \frac{d AU_{555}}{dT} \cdot T + AU_o$$

TEMPERATURE CALIBRATION OF T-JUMP INSTRUMENT TJ-64 USING TRIS/PHENOL RED



Pomiary zmian absorbancji roztworu Tris/fenol przy skoku temperatury przeprowadzonego przy rozładowaniu napięć w zakresie od 5 do 12 kV.

Lewy: Krzywe relaksacji T-Jump czerwieni fenolowej w 100 mM Tris, pH 7,7, od 20 °C, mierzone przy różnych napięciach rozładowania w TJ-64. Zmiany absorbancji przekształcono na zmiany temperatury, korzystając z nachylenia wykresu z poprzedniego slajdu.

Prawy: Zależność pomiędzy wielkością skoku temperatury (ΔT) a napięciem rozładowania. Nachylenie określone metodą regresji liniowej wynosi $+0.0603 \pm 0.0008$ °C/kV²

Pomiar amplitudy relaksacji w doświadczeniu skoku T

Napięcie fotopowielacza jest proporcjonalne do natężenia światła padającego: $P \propto I$.

$$A = \sum_j \epsilon_j c_j l; \quad A = \log_{10}(I_0/I); \quad I = I_0 \cdot 10^{-A} = I_0 \cdot \exp(-2.303 A)$$

$$\bar{P} \equiv P^f; \quad \bar{I} \equiv I^f; \quad \bar{A} \equiv A^f; \quad \bar{c}_j \equiv c_j^f$$

$$\Delta P \equiv P - \bar{P}; \quad \Delta I \equiv I - \bar{I}; \quad \Delta A \equiv A - \bar{A}; \quad \Delta c_j \equiv c_j - \bar{c}_j$$

$$A = \sum_j \epsilon_j c_j l = \sum_j \epsilon_j (\bar{c}_j + \Delta c_j) l = \sum_j \epsilon_j \bar{c}_j l + \sum_j \epsilon_j \Delta c_j l \equiv \bar{A} + \Delta A$$

$$I = I_0 \cdot \exp(-2.303 A) = I_0 \cdot \exp[-2.303(\bar{A} + \Delta A)] = I_0 \cdot \exp(-2.303 \bar{A}) \cdot \exp(-2.303 \Delta A)$$

$$I = \bar{I} \cdot \exp(-2.303 \Delta A) \quad \text{ale również:} \quad I = \bar{I} + \Delta I$$

$$\frac{\bar{I} + \Delta I}{\bar{I}} = \exp(-2.303 \Delta A) \Rightarrow \ln\left(1 + \frac{\Delta I}{\bar{I}}\right) = -2.303 \Delta A$$

$$\ln\left(1 + \frac{\Delta I}{\bar{I}}\right) \approx \frac{\Delta I}{\bar{I}} \Rightarrow \frac{\Delta I}{\bar{I}} \approx -2.303 \Delta A$$

$$P \propto I; \quad \bar{P} \propto \bar{I}; \quad \Delta P \propto \Delta I;$$

$$\frac{\Delta P}{\bar{P}} \approx -2.303 \Delta A = -2.303 \sum_j \epsilon_j \Delta c_j l$$

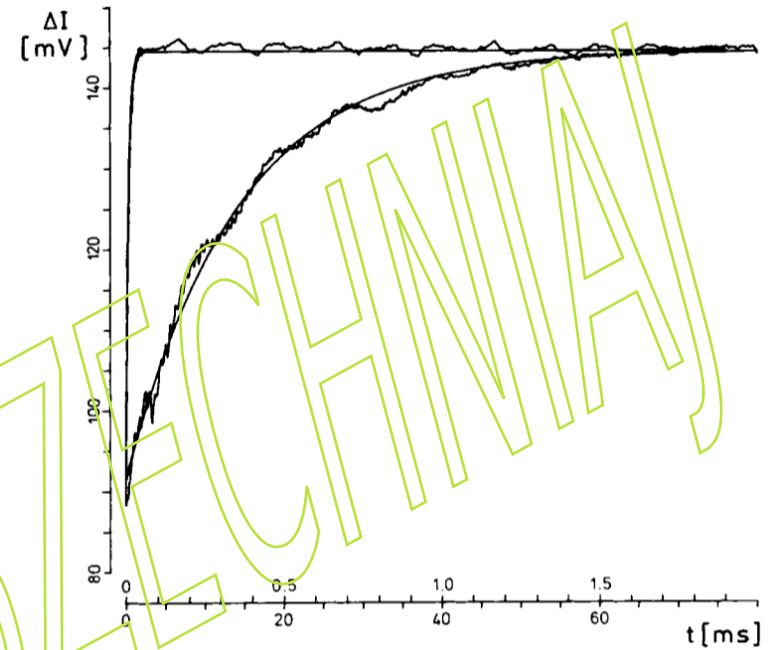
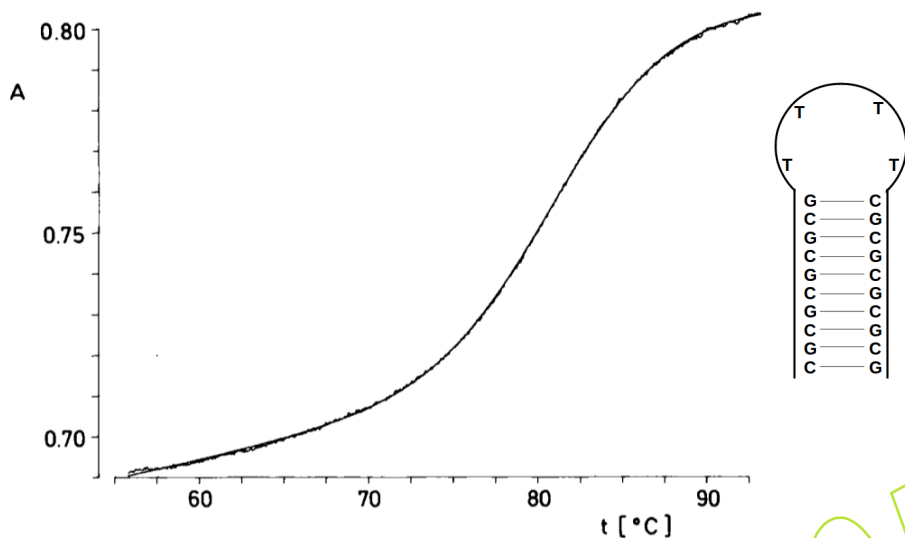
Wprowadzimy zmianę temperatury do ostatniego wyrażenia ...

$$P^i \propto I^i; \quad P^f \propto I^f; \quad \Delta P^o = P^f - P^i \propto I^f - I^i = \Delta I^o;$$

$$\frac{\Delta P^o}{P^f} = \frac{\Delta I^o}{I^f} \Rightarrow \frac{\Delta P^o}{\bar{P}} = \frac{\Delta I^o}{\bar{I}} \approx -2.303 \Delta A^o \Rightarrow \Delta A^o = -\frac{\Delta P^o}{2.303 \bar{P}}$$

$$A = f(T) \Rightarrow dA = \left(\frac{dA}{dT} \right) dT \Rightarrow \Delta A^o = \left(\frac{dA}{dT} \right) \Delta T^o$$

$$\Delta T^o = -\frac{\Delta P^o}{2.303 \cdot (dA/dT) \cdot \bar{P}}$$

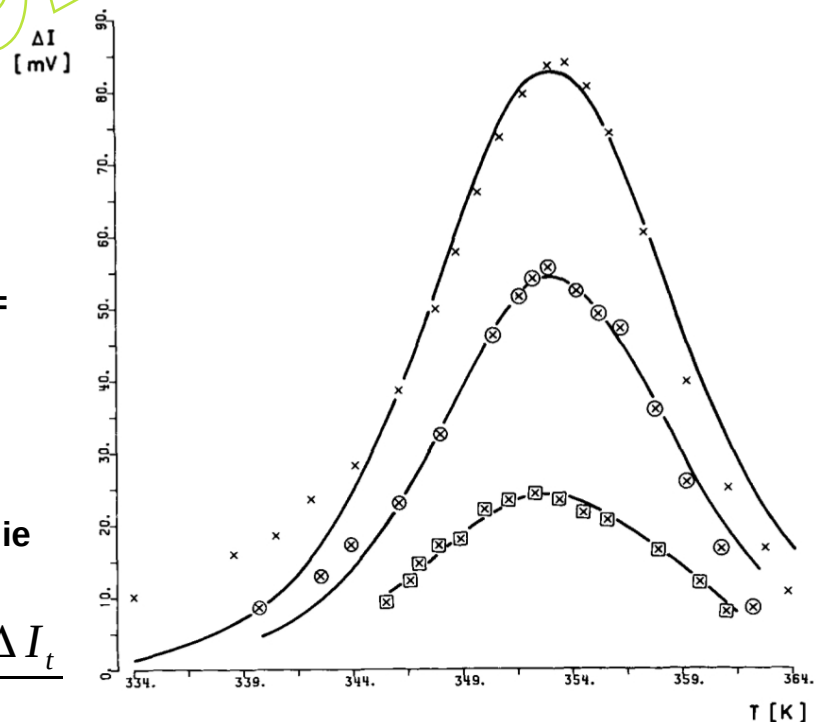


Wpływ temperatury na absorpcję UV d(C-G)₅T₄(C-G)₅ w buforze. Zmiany absorpcji wynikają z przejścia uporządkowanej struktury spinki do włosów o podwójnej helisie do stanu zdenaturowanego lub losowych, niesparowanych pasm spinki do włosów. Pochodzenie wzrostu absorpcji nazywa się efektem hiperchromicznym. Zaobserwowane zmiany absorpcji są zgodne z zależnością amplitud skoków T od temperatury, pokazaną na prawym dolnym rysunku.

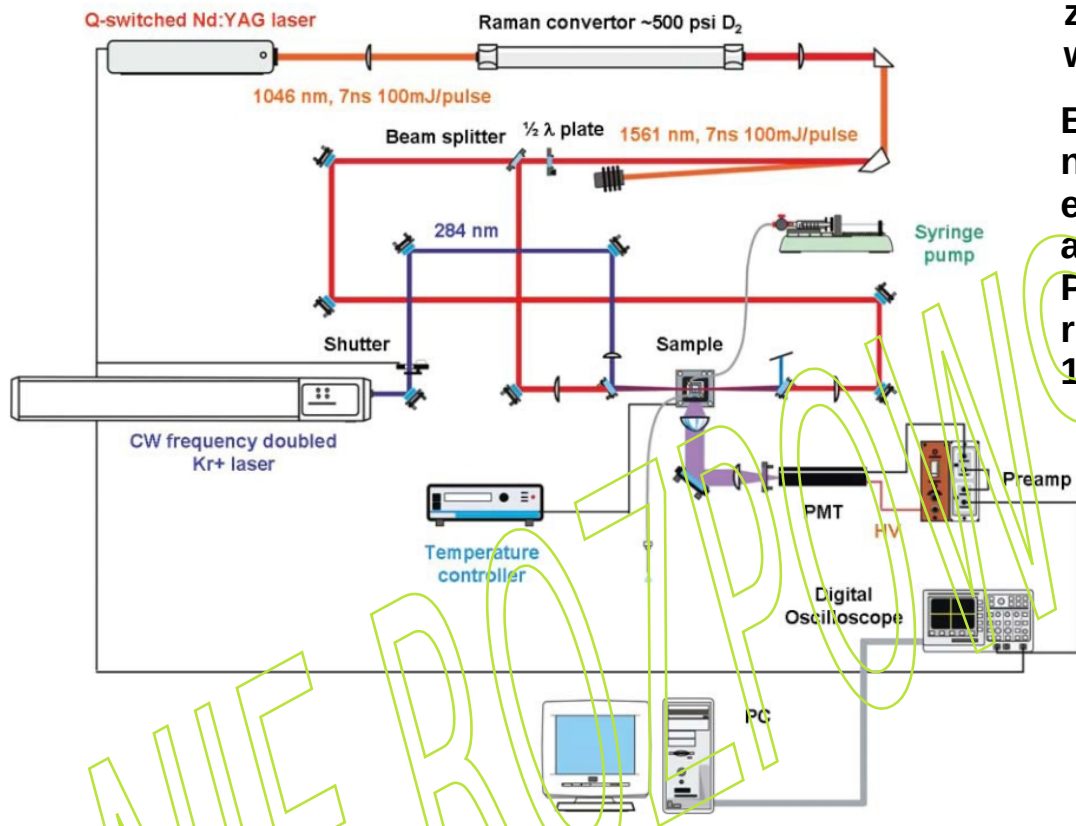
Prawy górny: Relaksacji T-jump dla d(C-G)₅T₄(C-G)₅ w buforze, pokazana dla dwóch skal czasu (skok od 81.1 to 81.9°C, 265 nm, A₂₆₅ = 0.96). Linia ciągła przedstawia dopasowanie funkcji monoeksponencjalnej metodą najmniejszych kwadratów z czasem relaksacji 351 μs. Prawy dolny: Amplitudy relaksacji ΔI dla skoków temperatury w funkcji temperatury T dla trzech różnych stężeń nukleotydów [absorbancja (265 nm, 1 cm, 21°C) 0.45, 0.96, and 1.53]. Linie ciągłe przedstawiają dopasowanie metodą najmniejszych kwadratów zgodnie z równaniem:

zmiana natężenia światła ΔI jako funkcja zmiany entalpii ΔH, stałej stabilności K, zmiany temperatury ΔT, całkowitej zmiany natężenia światła odpowiadającej 100% przejściu ΔI_t oraz temperatury bezwzględnej T (R= stała gazowa).

$$\Delta I = \frac{\Delta H^\ominus \cdot K \cdot \Delta T \cdot \Delta I_t}{R \cdot T^2 \cdot (1 + K)^2}$$



Time-resolved methods in biophysics. 9. Laser temperature-jump methods for investigating biomolecular dynamics, Photochem. Photobiol. Sci., 2009, 8, 499-512; Jan Kubelka



Schematyczny układ laserowego instrumentu do pomiaru skoku temperatury Narodowego Instytutu Zdrowia (NIH). Photochem. Photobiol. Sci., 8:499-512 (2009)

Laserowy aparat T-jump (przedstawiony powyżej), został zaprojektowany do pomiarów kinetyki fałdowania białek przy użyciu fluorescencji tryptofanu (Trp) jako sondy. Skok temperatury jest generowany przez laser Nd:YAG z przełączaniem Q (Continuum Surelite I), który wytwarza impulsy 7 ns, 300 mJ przy 1064 nm. Moc wyjściowa lasera Nd:YAG jest przesuwana przez komórkę Ramana (Light Age, Inc.) wypełnioną D₂ pod ciśnieniem 500 psi, wytwarzającą ~15 mJ na impuls przy 1562 nm. Impuls jest rozdzielany na dwie przeciwbieżne wiązki, skupiane na kuwecie próbki, powodując skoki temperatury od 15 K (przy ~293 K) do 10 K (przy ~333 K). Fluorescencję Trp wzbudza się przy 284 nm przy użyciu lasera kryptonowego CW (Lexel). Lasery kryptonowe mogą emitować światło widzialne w pobliżu kilku różnych długości fal, zwykle 406,7 nm, 413,1 nm, 415,4 nm, 468,0 nm, 476,2 nm, 482,5 nm, 520,8 nm, 530,9 nm, 568,2 nm, 647,1 nm i 676,4 nm.

Użycie lasera w eksperymentach T-jump zaproponowano już w latach 60-tych XX wieku, wkrótce po pojawieniu się laserów impulsowych.

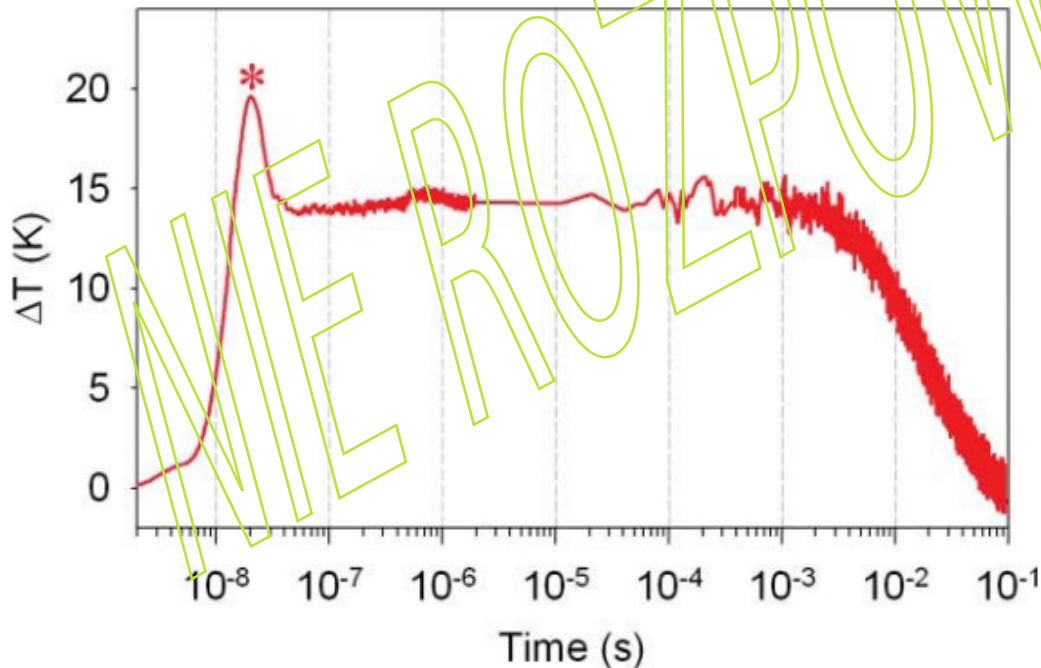
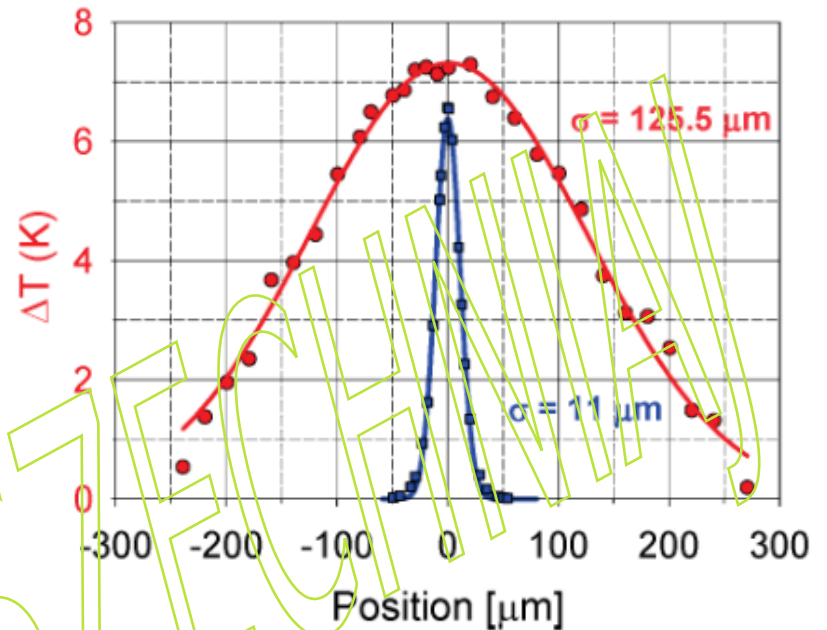
Bezpośrednie ogrzewanie wodnego rozpuszczalnika wymaga impulsów bliskiej podczerwieni o energii kilku mJ w zakresie od 1300 do 2100 nm, aby wzbudzić nadton rozciągającego pasma OH. Podobnie dla D₂O, wzbudzenie nadtonu drgania rozciągającego OD wymaga impulsów w zakresie 1900–2200 nm.

Intensywne impulsy laserowe o pożądanych długościach fal można uzyskać poprzez konwersję Ramana łatwo dostępnych laserów z przełączaniem Q.

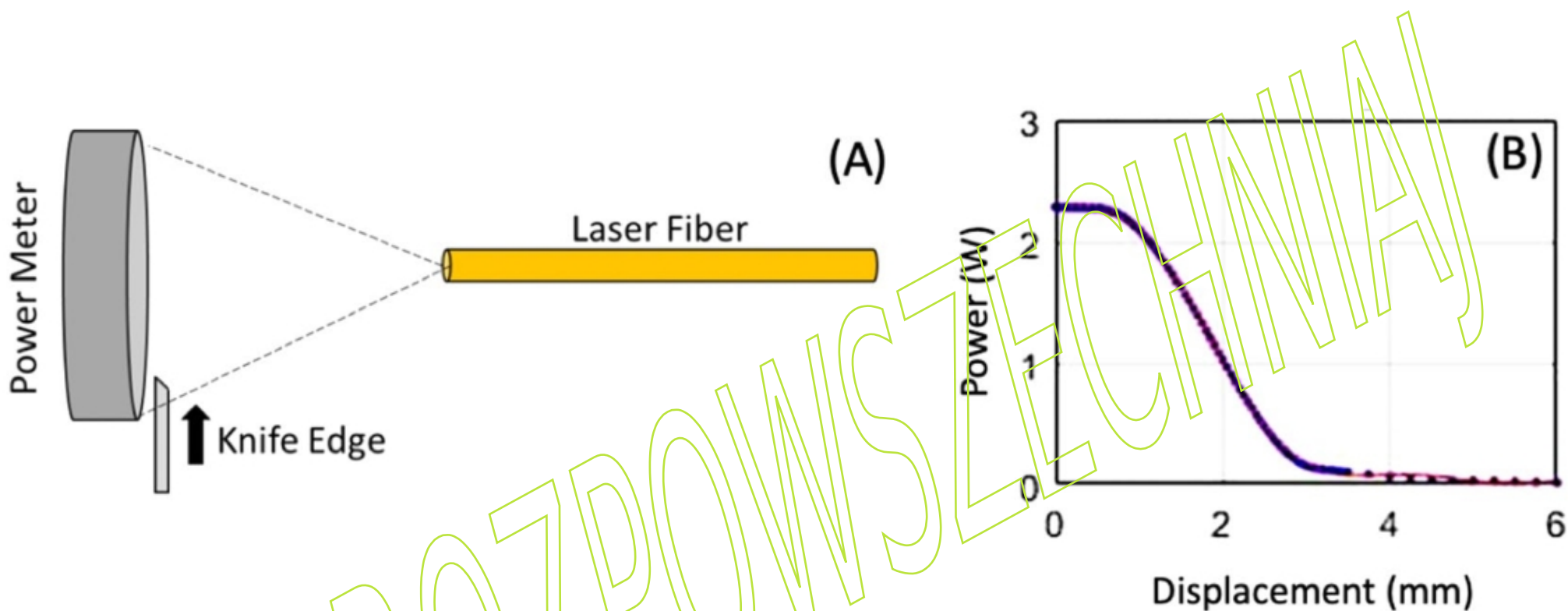
W ciągu ostatniej dekady opracowano około tuzina laserowych przyrządów do wykonywania skoków temperatury. Układy te są podobne do siebie, różnice dotyczą głównie rejestracji zmian zachodzących w roztworze po skoku temperatury.

Eksperymentalne profile wiązek bliskiej podczerwieni (ogrzewanie) i UV (sonda) w spektrometrze T-jump z poprzedniego slajdu. Skok temperatury w H₂O mierzono za pomocą zależnej od temperatury fluorescencji N-acetylotryptofanu (NATA).

Profil UV mierzono techniką krawędzi noża, profil bliskiej podczerwieni mierzono jako skok temperatury w NATA poprzez skanowanie wiązki UV przez profil bliskiej podczerwieni. Symbole to punkty danych eksperymentalnych, linie ciągłe odpowiadają funkcjom Gaussa o połowie szerokości σ . Skok temperatury odpowiada pojedynczemu ramieniu przeciwbieżnej geometrii wiązki bliskiej podczerwieni na rysunku.



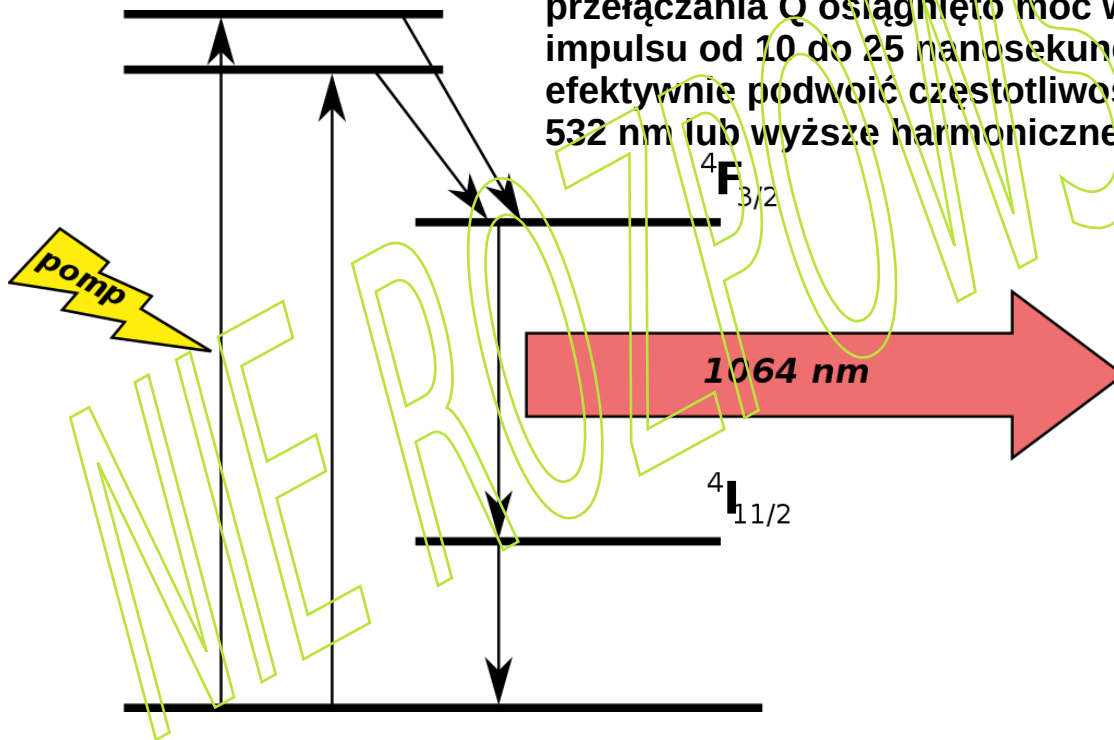
Czasowy profil zmian temperatury w spektrometrze T-jump pokazany na poprzednim slajdzie. Temperaturę kalibrowano za pomocą fluorescencji NATA. Gwiazdka oznacza eksperymentalny artefakt („kolec”). Temperatura pozostaje w przybliżeniu stała przez około 3 ms, a próbka jest skutecznie schładzana do temperatury początkowej przez ~100 ms. Aby zapewnić całkowitą relaksację termiczną, jak również optymalną wydajność ogniwa Ramana, doświadczenie przeprowadza się z częstotliwością 1,67 Hz. Aby zredukować fotouszkodzenie Trp przez promieniowanie UV, stosuje się szybką migawkę, która blokuje wiązkę UV pomiędzy rejestracjami dla kolejnych skoków temperatury. Aby jednak całkowicie wyeliminować utratę sygnału na skutek fotowybielania, pomiary prowadzi się ze specjalnie opracowaną kuetwą przepływową.



Wyznaczanie profilu wiązki laserowej metodą ostrza noża. (A) Schemat techniki krawędzi noża; (B) Zmierzona moc napromieniowania w funkcji przemieszczenia krawędzi noża przy odległości szczeliny szczeliny pomiędzy włóknem lasera a miernikiem mocy wynoszącej 2 cm, wraz z dopasowaniem wielomianowym;

Lasery Nd:YAG

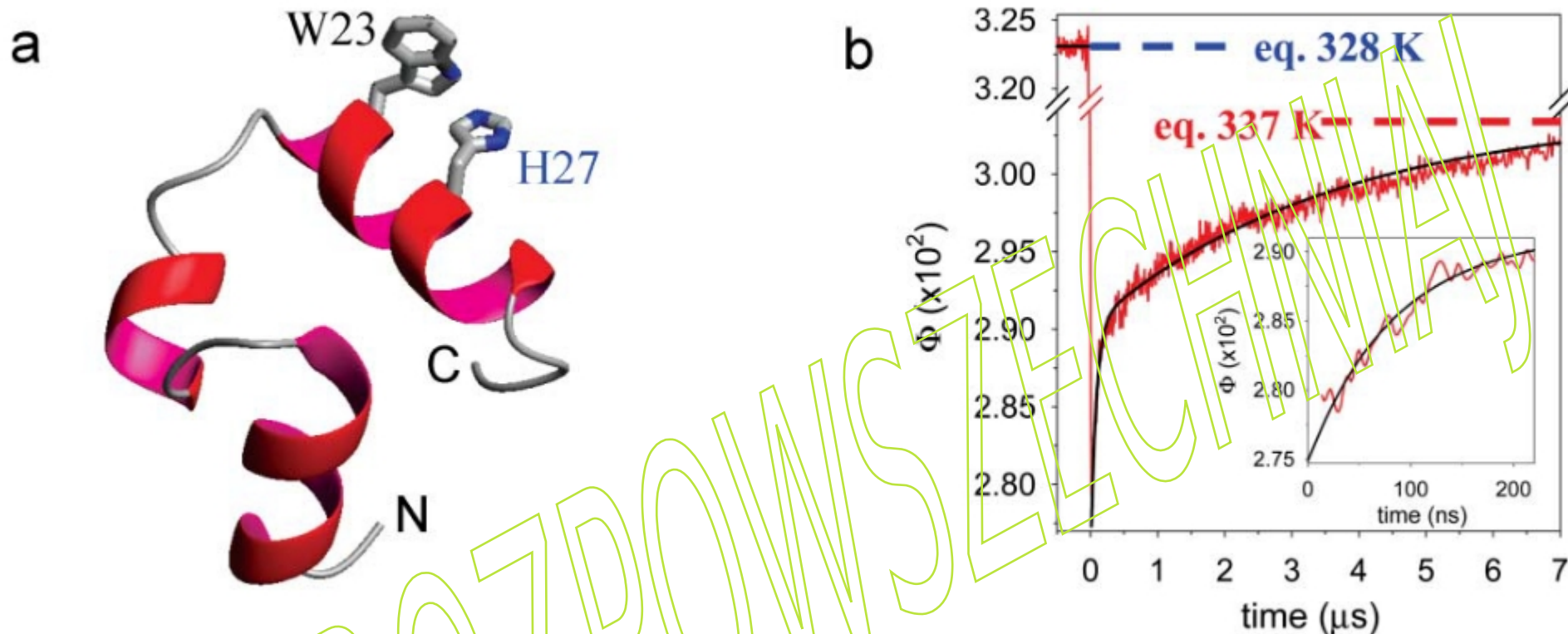
Nd:YAG (granat itrowo-aluminiowy domieszkowany neodymem; Nd:Y₃Al₅O₁₂) to kryształ stosowany jako ośrodek laserowy w laserach na ciele stałym. Domieszka, potrójnie zjonizowany neodym, Nd(III), zazwyczaj zastępuje niewielką frakcję (1%) jonów itru w strukturze krystalicznej macierzystego granatu itrowo-glinowego (YAG), ponieważ oba jony mają podobną wielkość. To jon neodymu zapewnia aktywność laserową w kryształach. Działanie lasera Nd:YAG po raz pierwszy zademonstrowali JE Geusic i in. w Bell Laboratories w 1964 r. Impulsowe lasery Nd:YAG są zwykle obsługiwane w tak zwanym trybie przełączania Q: przełącznik optyczny jest wkładany do wnęki lasera i czeka na maksymalną inwersję obsadzeń jonów neodymu, zanim się otworzy. Następnie fala świetlna może przejść przez wnękę, wyludniając wzbudzony ośrodek laserowy przy maksymalnej inwersji obsadzeń. W tym trybie przełączania Q osiągnięto moc wyjściową 250 megawatów i czas trwania impulsu od 10 do 25 nanosekund. Impulsy o wysokiej intensywności można efektywnie podwoić częstotliwość, aby wygenerować światło laserowe przy 532 nm lub wyższe harmoniczne przy 355, 266 i 213 nm.



Jony neodymu w różnych typach kryształów jonowych, a także w szklach, działają jako ośrodek wzmocnienia lasera, zazwyczaj emitując światło o długości fali 1064 nm z określonego przejścia atomowego w jonie neodymu, po „wpompowaniu” do wzbudzenia ze źródła zewnętrznego. Neodym jest pierwiastkiem chemicznym o symbolu Nd i liczbie atomowej 60.



Granat itrowo-aluminiowy (diamondair, cyrolit, YAG)

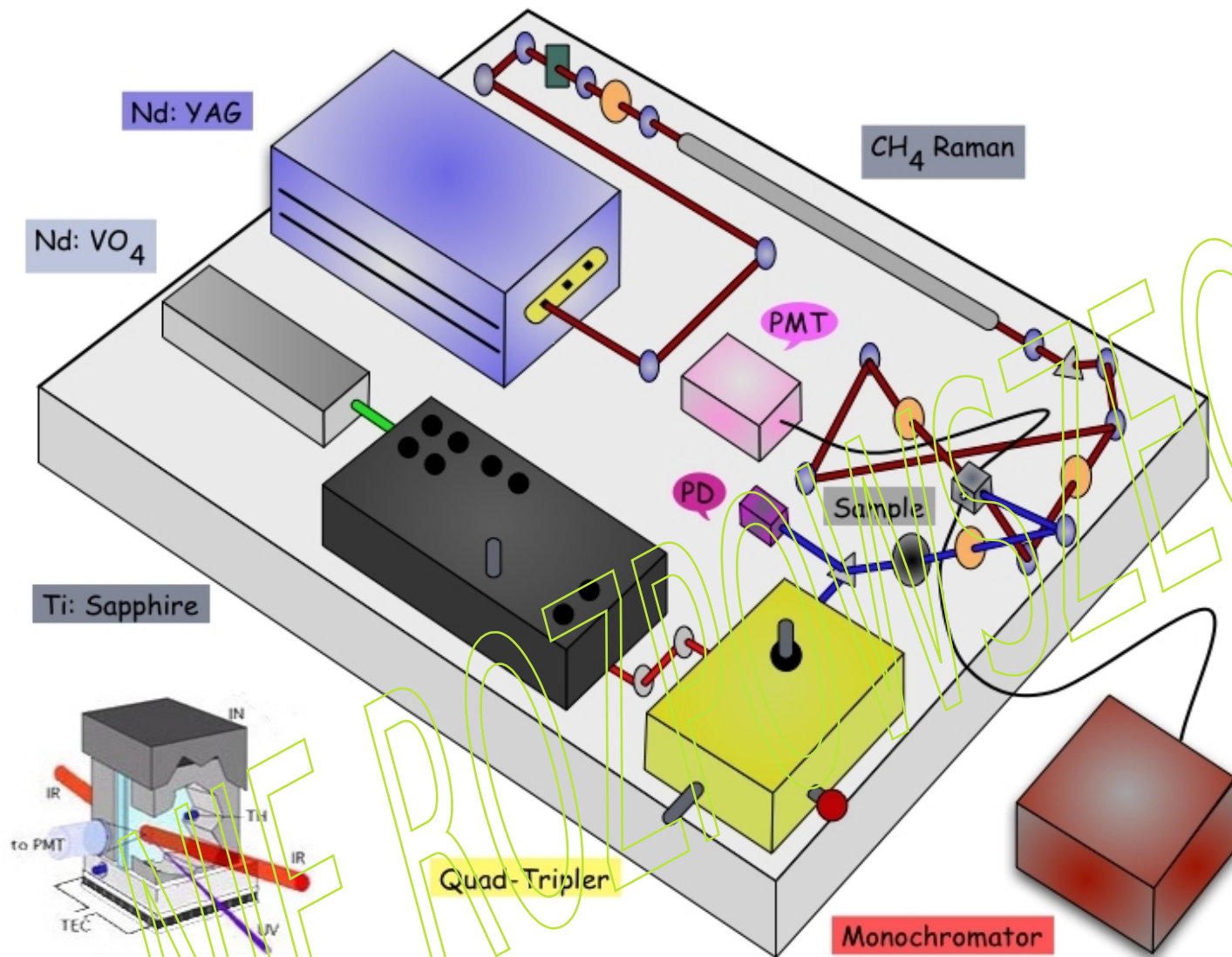


36 aminokwasze białko Villin Headpiece HP35 oraz kinetyka relaksacyjna jego rozwijania/zwijania w spektrometrze T-jump opisanym przez Kubelkę (slajd 20).

(a) Model wstęgowy HP35 (PDB 1yrf) z wyróżnionym Trp23 (sonda fluorescencyjna) i wygaszaczem (His27), wprowadzonym do sekwencji, aby fluorescencja Trp monitorowała proces zwijania.

(b) Relaksacja fluorescencji Trp po skoku T z 328 do 337 K. Chwilowy spadek intensywności fluorescencji wynika z wewnętrznej zależności wydajności kwantowej Trp od temperatury.

Późniejszy wzrost wynika z przerwania kontaktu pomiędzy Trp23 i wygaszaczem His27, monitorując ogólne rozwinięcie struktury białka w odpowiedzi na podwyższoną temperaturę. Czarna krzywa jest dwuwykładniczym dopasowaniem do danych. Wstawka pokazuje szczegóły szybkiej (~ 70 ns) fazy kinetycznej.



Spektrometr T-jump opracowany przez M. Gruebele i współ. z Uniwersytetu Illinoisz, z detekcją fluorescencji. Wykorzystuje konwersję Ramana podstawowego modu Nd:YAG (1064 nm) do 1542 nm, co umożliwia podgrzanie wody. Wzbudza fluorescencję Trp za pomocą ciągu impulsów o długości fali 280 nm i 62,5 MHz z lasera Ti:Sapphire o potrójnej częstotliwości z synchronizacją modów. Po każdym impulsie mierzony jest pełny zanik fluorescencji Trp za pomocą szybkiego wzmacniacza PMT z czasem narastania 0,6 ns i analizowany jest ślad czasowy poszczególnych zaników fluorescencji.

Spektrometr skoku T zbudowany z wielomodowego lasera Nd:YAG z przełączaniem Q, który jest używany do pompowania ogniwa Ramana o długości 2 m zawierającego metan pod wysokim ciśnieniem, samosynchronizującego się lasera tytanowo-szafirowego w nieliniowych kryształach boranu baru i naczynka pomiarowego.

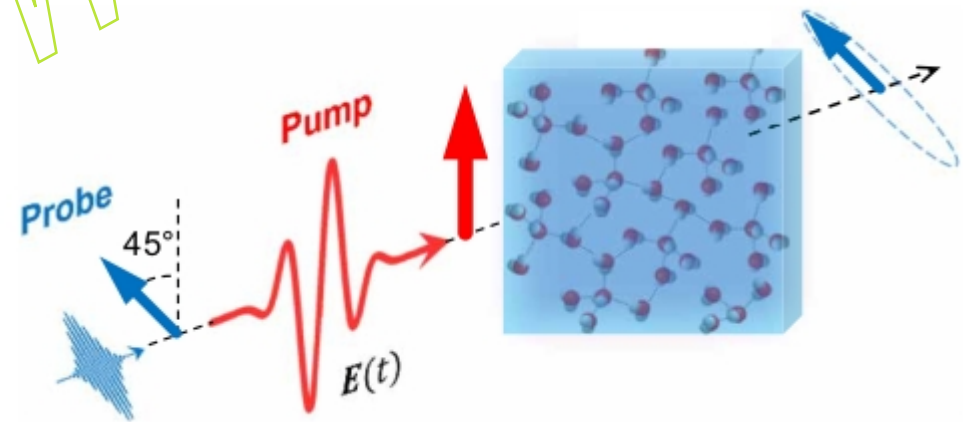
Twierdzenie o ekwipartycji

W klasycznej mechanice statystycznej twierdzenie o ekwipartycji wiąże temperaturę układu z jego średnimi energiami. Twierdzenie o ekwipartycji jest również znane jako prawo ekwipartycji, ekwipartycji energii lub po prostu ekwipartycji. Pierwotna koncepcja ekwipartycji zakładała, że w równowadze termicznej energia jest rozdzielana równomiernie pomiędzy wszystkie jej różne formy; na przykład średnia energia kinetyczna na stopień swobody w ruchu translacyjnym cząsteczki powinna być równa energii kinetycznej w ruchu obrotowym.

Energy transfer within the hydrogen bonding network of water following resonant terahertz excitation,

H. Elgabarty et al., Sci. Adv., 6:eaay7074/1-8 (2020): W tej pracy rezonansowo wzbudzamy kolektywne obrotowe stopnie swobody wody intensywnymi impulsami THz* i badamy wynikającą z tego anizotropię optyczną w konfiguracji efektu THz Kerra** (TKE).

Schemat eksperymentu TKE. Intensywne, liniowo spolaryzowane pole elektryczne THz wzbudza wodę podwójnie destylowaną. Następnie mierzona jest indukowana przez pompę dwójłomność optyczna $\Delta n(t)$ za pomocą impulsu sondy (800 nm, 2 nJ, 8 fs), którego polaryzacja liniowa nabiera eliptyczności w wyniku przejścia przez próbkę. Z powodu działania pola pompy, spolaryzowanego wzdłuż x, impuls sondy, spolaryzowany pod kątem 45° względem x, napotyka przejściową różnicę $\Delta n = n_x - n_y$ pomiędzy współczynnikami załamania światła w kierunkach x i y. W rezultacie polaryzacja liniowa nabiera eliptyczności poprzez przechodzenie przez próbkę.



*Promieniowanie terahercowe mieści się pomiędzy promieniowaniem podczerwonym a promieniowaniem mikrofalowym w widmie elektromagnetycznym, $330\text{-}3.3\text{ cm}^{-1}$

**Efekt Kerra to zmiana współczynnika załamania światła materiału w odpowiedzi na przyłożone pole elektryczne.

***Dwójłomność to właściwość optyczna materiału o współczynniku załamania światła zależnym od polaryzacji i kierunku propagacji światła.

$$\vec{E} = E_0 \cos(kz - \omega t) \vec{e}_{45^\circ} = E_0 \cos\left(2\pi \frac{n}{\lambda_0} z - \omega t\right) \vec{e}_{45^\circ} = \vec{E}_x + \vec{E}_y$$

brak dwójłomności

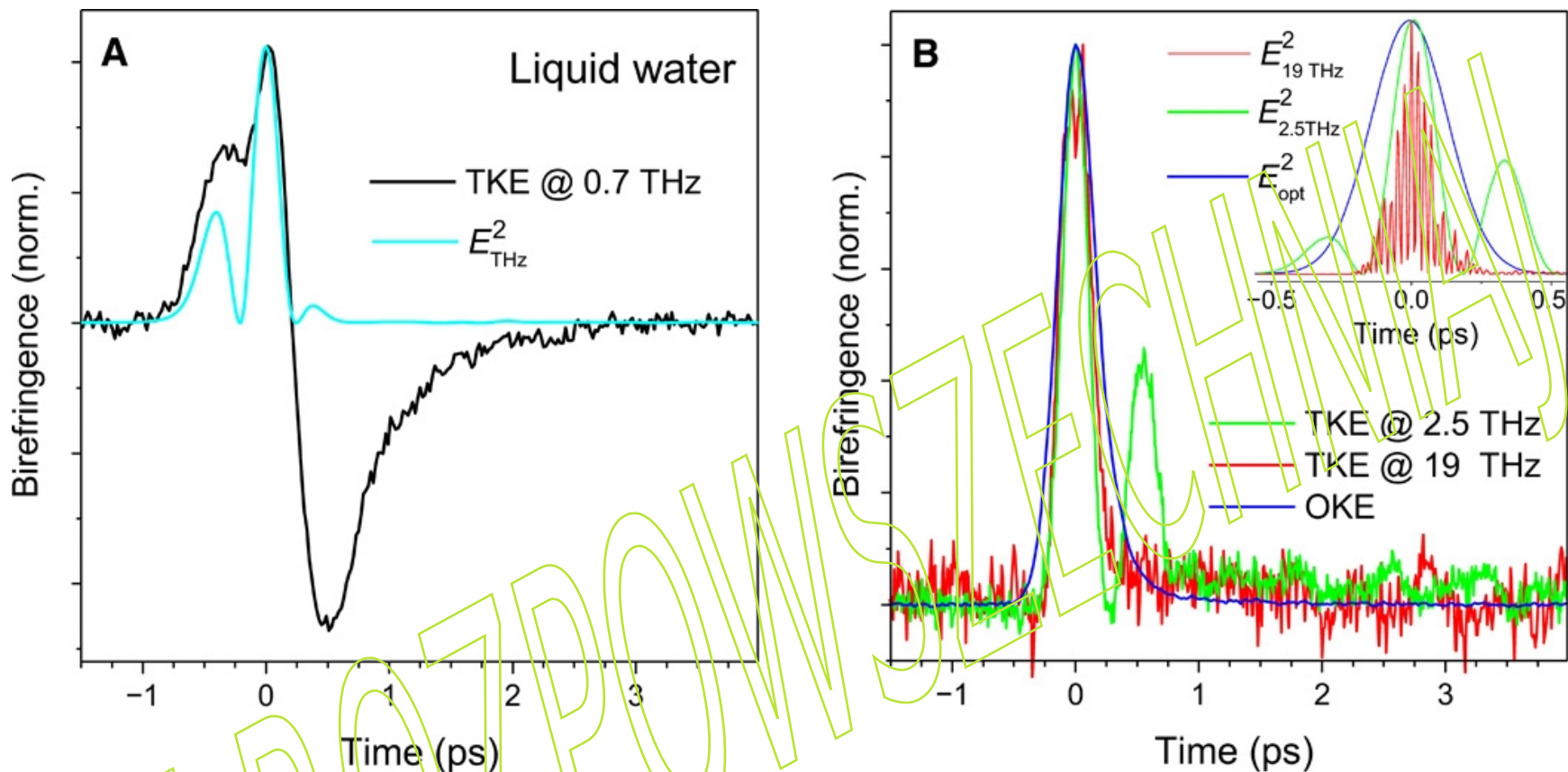
$$\vec{E}_x = E_{x,0} \cos(k_x z - \omega t) \vec{e}_x = E_{x,0} \cos\left(2\pi \frac{n}{\lambda_0} z - \omega t\right) \vec{e}_x$$

$$\vec{E}_y = E_{y,0} \cos(k_y z - \omega t) \vec{e}_y = E_{y,0} \cos\left(2\pi \frac{n}{\lambda_0} z - \omega t\right) \vec{e}_y$$

z dwójłomnością

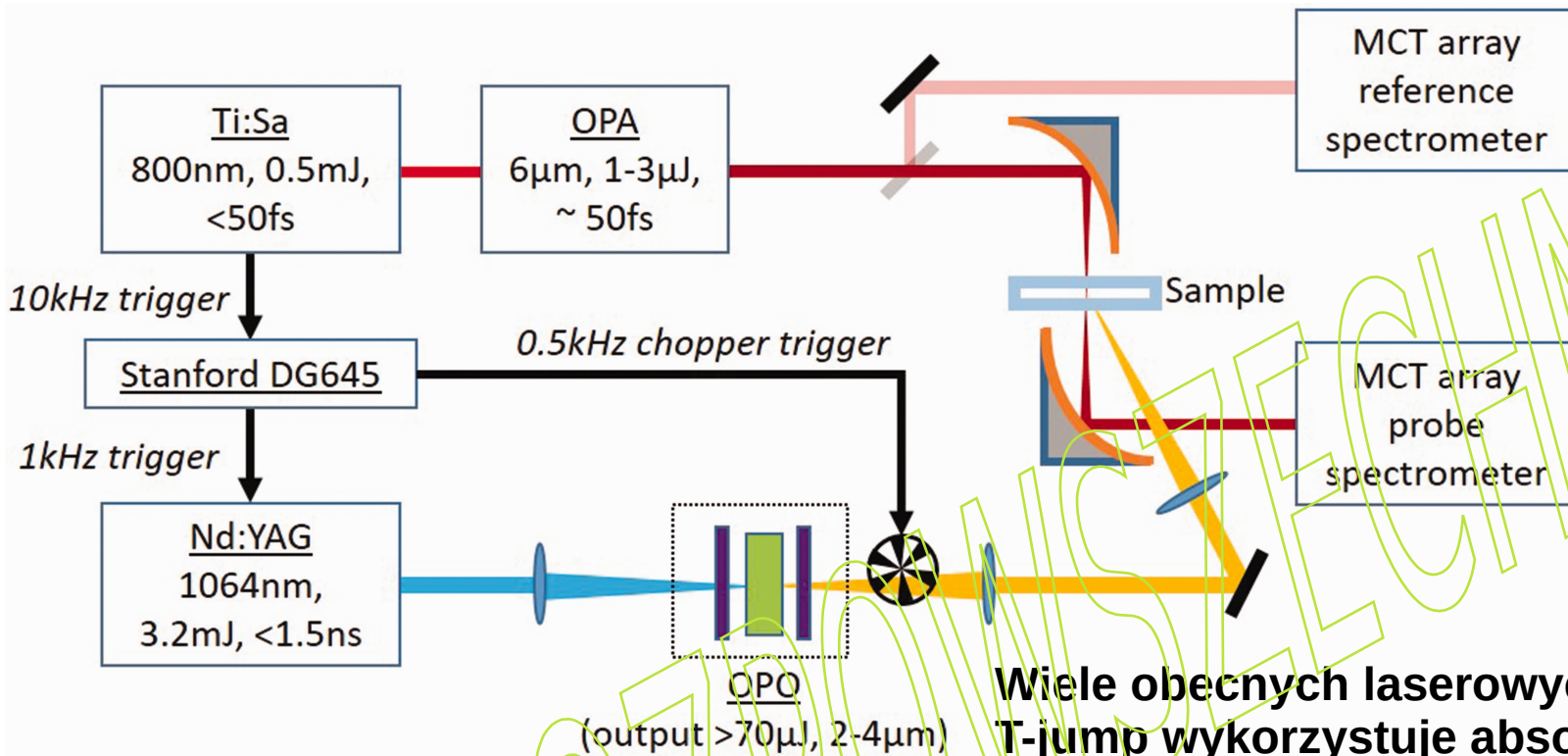
$$\vec{E}_x = E_{x,0} \cos(k_x z - \omega t) \vec{e}_x = E_{x,0} \cos\left(2\pi \frac{n_x}{\lambda_0} z - \omega t\right) \vec{e}_x$$

$$\vec{E}_y = E_{y,0} \cos(k_y z - \omega t) \vec{e}_y = E_{y,0} \cos\left(2\pi \frac{n_y}{\lambda_0} z - \omega t\right) \vec{e}_y$$



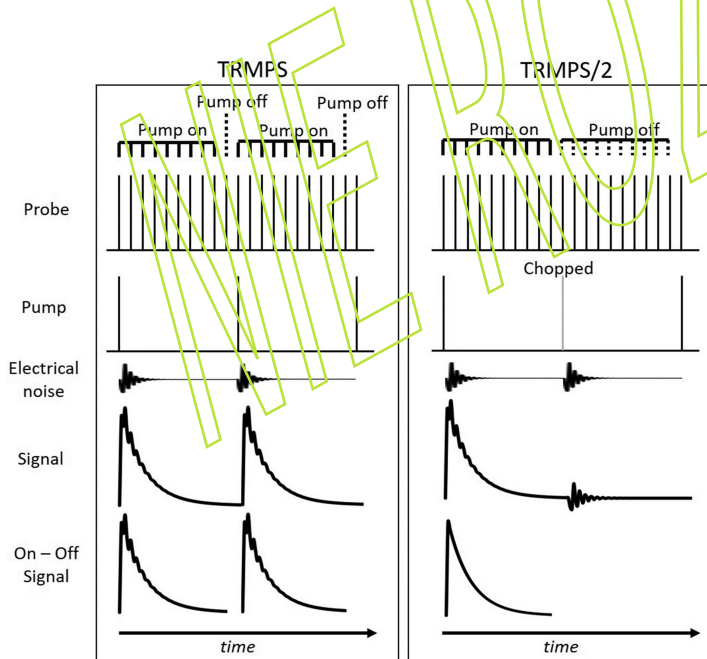
A: Zmierzony sygnał TKE wody (pompowanej z częstotliwością ~1 THz) w naczynku pomiarowym, w temperaturze pokojowej. Jest to sygnał dwubiegunowy, którego ogon relaksuje się z częstotliwością 500 ± 20 fs. Kwadrat pola THz jest określony przez cyjanową linię.

B: Przejściowa dwójłomność wody po wzbudzeniu optycznym, a także wzbudzeniach przy ~19 i ~3 THz. Wszystkie sygnały TKE wody i jej optyczny sygnał efektu Kerra mają kształt jednobiegunowy ze względnie słabym "ogonem relaksacyjnym". Wszystkie sygnały uzyskiwane są w temperaturze pokojowej, gdzie pomiędzy tylną szklaną ścianką naczynka a membraną z azotku krzemu o grubości 150 nm stanowiącą okno wejściowe utrzymywana jest warstewka ciekłej wody o grubości 100 μm . Chociaż rotacje pojedynczych cząsteczek wody, takie jak w fazie gazowej, są w stanie ciekłym całkowicie wytłumione, to istnieją one w postaci utrudnionego obrotu przy częstotliwościach powyżej ~10 THz. W ten sposób jednobiegunowy sygnał TKE wody z pompy THz przy ~19 THz (ryc. B) bezpośrednio odnosi się do dodatniego znaku anizotropii polaryzowalności wody w fazie ciekłej. OKE = optyczny efekt Kerra.



Wiele obecnych laserowych spektrometrów T-jump wykorzystuje absorpcję podczerwieni jako sondę

Ten spektrometr T-jump wykorzystuje laser sondujący o częstotliwości 10 kHz i zsynchronizowany z nim laser pompujący o częstotliwości 1 kHz, przycięty przez "chopper" do 500 Hz. Laser pompujący to układ OPO (optyczny oscylator parametryczny) pompowany przez granat itrowo-aluminiowy domieszkowany neodymem (Nd:YAG). Laser sondy to tytanowo-szafirowy wzmacniacz impulsowy o mocy 20 W, o częstotliwości powtarzania 10 kHz i czasie trwania impulsu <50 fs. Światło sondy skupia się na pompowanym obszarze próbki w plamce o średnicy 50 μm (znacznie mniejszej niż wiązka T-jump). Rejestrowane jest widmo dla każdego impulsu lasera sondy. Ponieważ częstotliwość powtarzania sondy do pompy wynosi 20:1, na każdy skok temperatury uzyskuje się grupę 20 widm. Dla każdej grupy ustalony jest czas impulsu pompy w stosunku do początkowego impulsu sondy i rejestrowany jest grzebień impulsów sondy. Pierwsza sonda podążająca za impulsem pompy jest rejestrowana z opóźnieniem x ns, a widma kolejnej sondy rejestrowane są z $x + 100 \mu\text{s}$, $x + 200 \mu\text{s}$, $x + 300 \mu\text{s}$ itd. Po uśrednieniu przez kilka sekund, pompa-sonda opóźnienie jest zmieniane. Daje to zestaw danych z pomiarów od nanosekund do milisekund po skoku temperatury. Pierwsze 19 impulsów sondy jest wykorzystane jako dane opóźnienia czasowego od 0,0 do 1,9 ms, a końcowy impuls sondy (1,9–2,0 ms) jest użyty do obliczenia znormalizowanych widm różnicowych. Nazywamy to metodą spektroskopii wielosondowej z rozdzielczością czasową (TRMPS). Redukcja częstotliwości wiązki pompy pozwala na dłuższy czas odzyskiwania próbki (2 zamiast 1 ms) i stwarza ważną możliwość usuwania szumów. Nazwane to jest TRMPS/2.

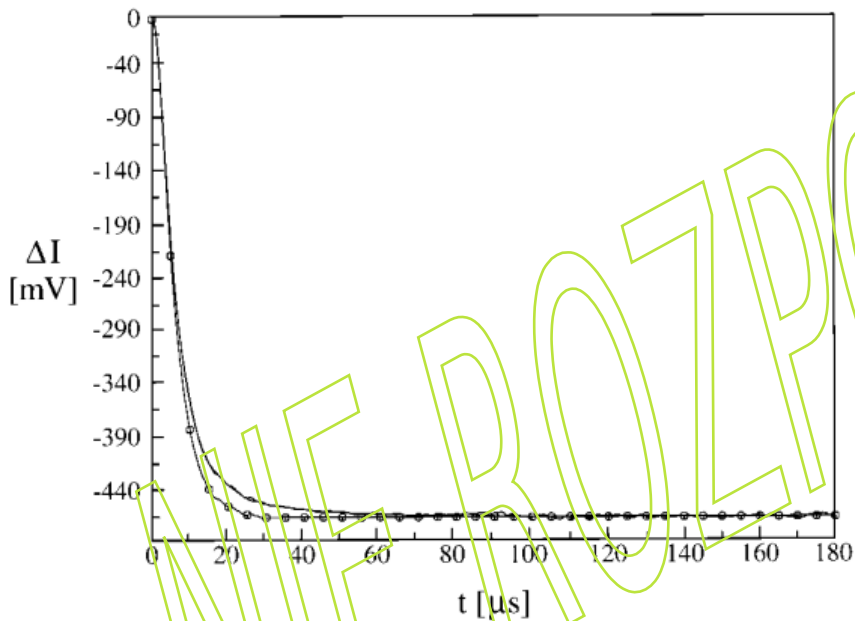


Dynamics of the RNA Hairpin GNRA Tetraloop

M. Menger, F. Eckstein, and D. Porschke

(dekonwolucja funkcji odpowiedzi instrumentu)

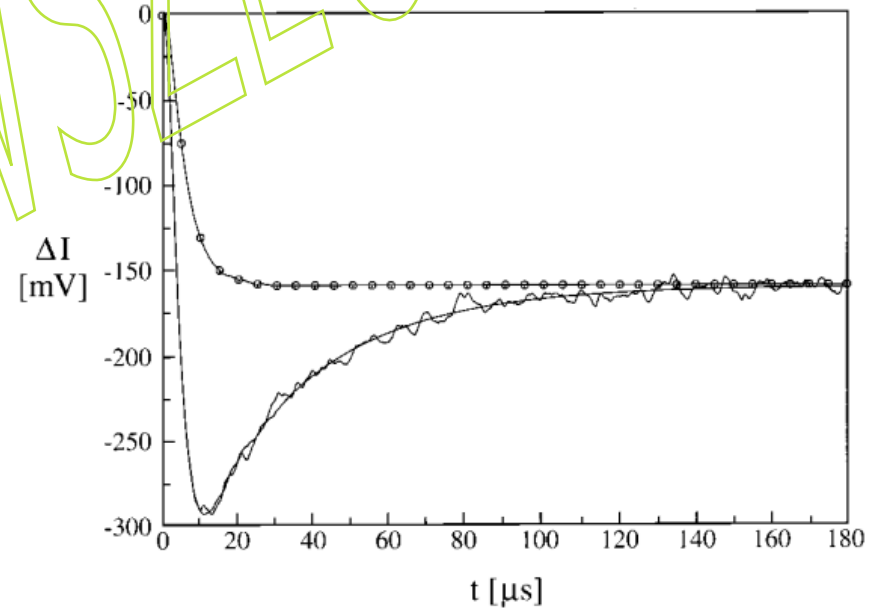
Dynamikę tetrapętli RNA o strukturze spinki do włosów typu GNRA [sekwencja G – dowolny rybonukleotyd (N)-puryna (R)-A] analizowano metodą spektroskopii fluorescencyjnej oraz metodą relaksacji skoku temperatury wykrywaną przez fluorescencję, stosując oligomery RNA z 2-aminopuryną (2AP) podstawiony w dwóch różnych pozycjach sekwencji pętli, Gp2APpApA (HP1) i GpAp2APpA (HP2), jako wskaźnik.



Relaksacja HP1 po skoku temperatury rejestrowana przez pomiar fluorescencji. Skok temperatury od 2 do 8,1°C (7,1 μM HP1). Linia oznaczona kółkami reprezentuje sygnał referencyjny do dekonwolucji. Dopasowania wykładniczego ($\tau_c = 22,1 \mu s$) nie można odróżnić od danych eksperymentalnych. (bufor = 0,1 M NaClO₄ i 50 mM kwas kakodylowy/Tris, pH 7,2)

HP1

HP2



Relaksacja HP2 po skoku temperatury rejestrowana przez pomiar fluorescencji. Skok temperatury od 2 do 8,1°C (7,1 μM HP2). Linia oznaczona kółkami reprezentuje sygnał referencyjny do dekonwolucji. Eksponecjalny fit ($\tau_1 = 5.2 \mu s$, $\tau_2 = 41.3 \mu s$) nie może być odróżniony od krzywej doświadczalnej.

Analysis of transient emission curves by a convolved autoregressive model

Keiji Sasaki and Hiroshi Masuhara

Zjawiska następujące po zaburzeniu równowagi w eksperymencie relaksacyjnym zwykle podlegają prostym równaniom różniczkowym, tak że ich profile czasowe można wyrazić jako krzywą wielowykładniczą:

$$x_0(t) = \sum_{i=1}^M A_i \exp(-t/\tau_i)$$

where gdzie τ_i i A_i to i -ty czas relaksacji i odpowiadająca mu amplituda relaksacyjna. Wartości tych parametrów wyznacza się aby scharakteryzować ilościowo dynamikę obserwowanej reakcji. Niestety, krzywej $x_0(t)$ nie można zmierzyć bezpośrednio, ponieważ wzbudzający impuls świetlny ma skończoną szerokość impulsu, a odpowiedź detektora nie jest natychmiastowa. Obserwowana krzywa zaniku $x(t)$ jest dana przez spłot $x_0(t)$ z funkcją odpowiedzi instrumentalnej $y(t)$ ($x*y$) w następujący sposób:

$$x(t) = \int_0^{\infty} x_0(t') y(t-t') dt' \equiv x * y$$

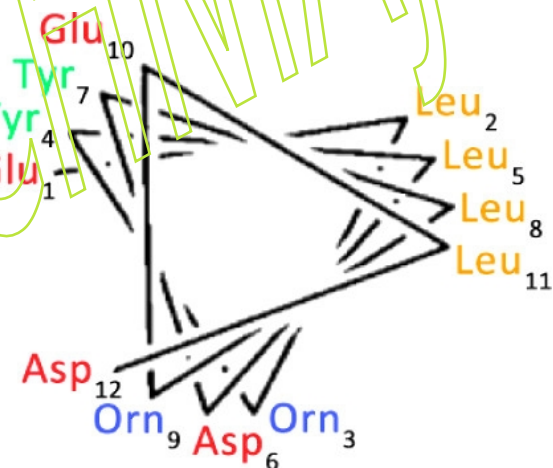
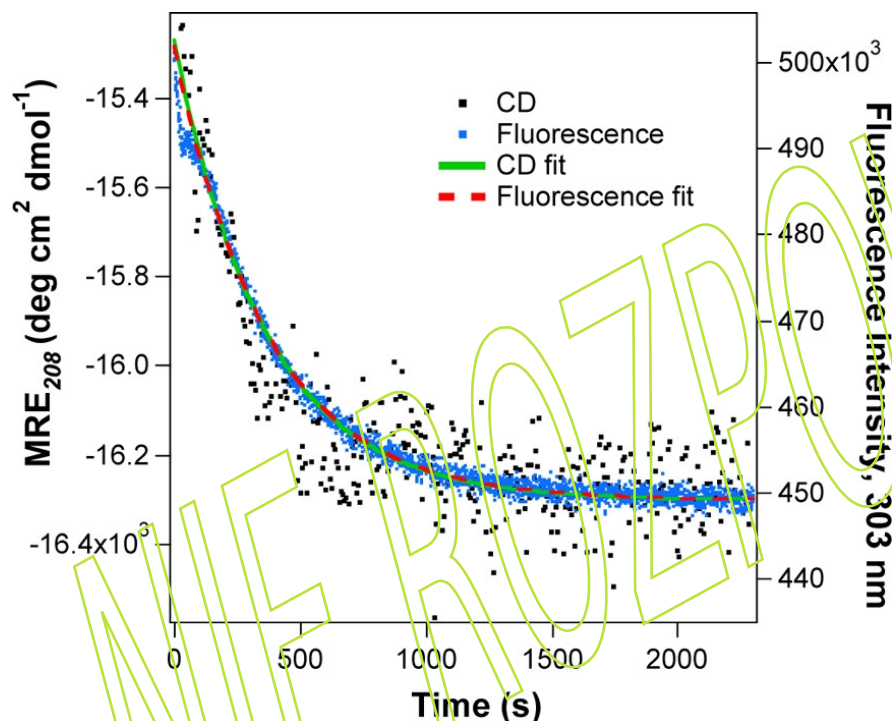
Krzywą $y(t)$ można wyznaczyć oddzielnie, na przykład mierząc profil czasowy światła rozproszonego na rozpuszczalniku lub dwójłomność rozpuszczalnika. Następnie problem sprowadza się do oszacowania τ_i i A_i na podstawie danych $x(t)$ i $y(t)$.

Wikipedia: W matematyce (w szczególności w analizie funkcjonalnej) spłot jest operacją matematyczną na dwóch funkcjach (f i g), w wyniku której powstaje trzecia funkcja ($f*g$), która wyraża, w jaki sposób kształt jednej jest modyfikowany przez drugą.

Slow Folding–Unfolding Kinetics of an Octameric β -Peptide Bundle

G. L. Montalvo, F. Gai, H. Roder, and W. F. DeGrado

Badano kinetykę zwiwania i rozwijania 12-aminokwasowego β^3 -peptydu, Acid-1Y, który w roztworze wodnym tworzy oktameryczną wiązkę peptydów w konformacji znanej jako 14-helisa. Ponieważ stabilność Acid-1Y zależy od stężenia i temperatury, wykorzystano obie te zmienne do zmiany frakcji foldameru* w stanie oktamerycznym i scharakteryzowania jego asocjacji/fałdowania oraz dysocjacji/rozwinęcia, a także użyto konwencjonalnych spektroskopii CD i fluorescencji do pomiaru kinetyki zwiwania i rozwijania tego peptydu.



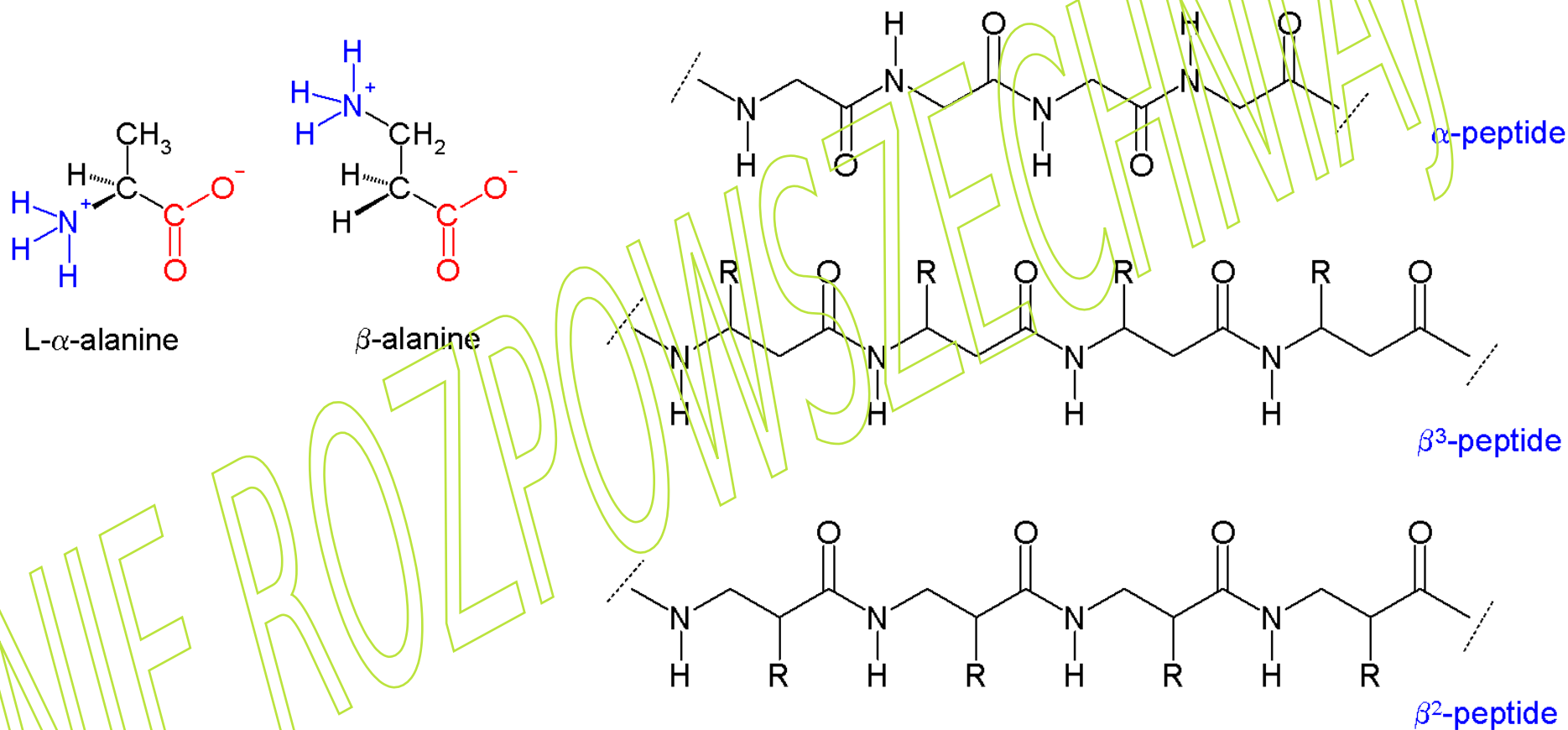
Sekwencja Acid-1Y jako 3-helikalnego koła. Wszystkie reszty to β^3 -aminokwasy, a kolory niebieski, czerwony, zielony i pomarańczowy wskazują odpowiednio aminokwasy kationowe, anionowe, aromatyczne i hydrofobowe.

Roztwór oktameru Acid-1Y, o stężeniu 60 μM , ogrzano do 90°C, powodując jego dysocjację i rozwinięcie struktury. Pozostawiono zdestabilizowany β -peptyd do szybkiego ochłodzenia do 12°C, co spowodowało reasocjację i zwiwanie do formy natywnej. Zachodzenie tych procesów monitorowano za pomocą pomiaru CD (czarne kropki) i fluorescencji Tyr (niebieskie kropki). Do każdej krzywej postępu reakcji dopasowano funkcję monoeksponencjalną. Otrzymane stałe szybkości (k) ustalono na równe 0,00275 s⁻¹ (czas relaksacji τ wynosi 364 s lub 6 min). Dopasowania do CD i fluorescencji Tyr przedstawiają, odpowiednio, zielona linia ciągła i czerwona przerywana.

ACS Chem. Biol., 9:276-281 (2014)

*Foldamery – syntetyczne oligomery wykazujące silną tendencję do przyjmowania określonej struktury trójwymiarowej (wikipedia)

Wikipedia: Beta-peptydy (β -peptydy) to peptydy pochodzące z β -aminokwasów, w których grupa aminowa jest przyłączona do węgla β (tj. węgla oddalonego o dwa atomy od grupy karboksylanowej). Macierzystym β -aminokwasem jest β -alanina ($\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$), powszechnie występująca substancja naturalna. β -peptydy zwykle nie występują w organizmach żywych. Badane są antybiotyki na bazie β -peptydów jako sposoby na uniknięcie oporności na antybiotyki.



Wikipedia: Ponieważ dostępne są dwa atomy węgla do podstawienia, β -aminokwasy mają cztery miejsca do przyłączenia organicznej grupy reszt, w porównaniu do dwóch w α -aminokwasach. Odpowiednio, istnieją dwa główne typy β -aminokwasów różniących się w zależności od tego, do jakiego węgla jest przyłączona reszta: te z resztą organiczną (R) obok aminy nazywane są β^3 , a te z pozycją obok grupy karbonylowej nazywane są β^2 . β -peptyd może składać się tylko z jednego rodzaju tych aminokwasów (β^2 -peptydy i β^3 -peptydy) lub może stanowić kombinację tych dwóch. Ponadto β -aminokwas może tworzyć pierścień, wykorzystując oba swoje miejsca, a także może zostać włączony do peptydu.