

Wybrane Zagadnienia Biofizyki Molekularnej

(1100-5BM15)

Jan M. Antosiewicz

**Zakład Biofizyki
Instytut Fizyki Doświadczalnej
Wydział Fizyki**

WKŁAD 14

21 listopada, 2024

**Kinetyka biomolekularna
(metody relaksacyjne, fotoliza błyskowa)**

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

jantosi@fuw.edu.pl

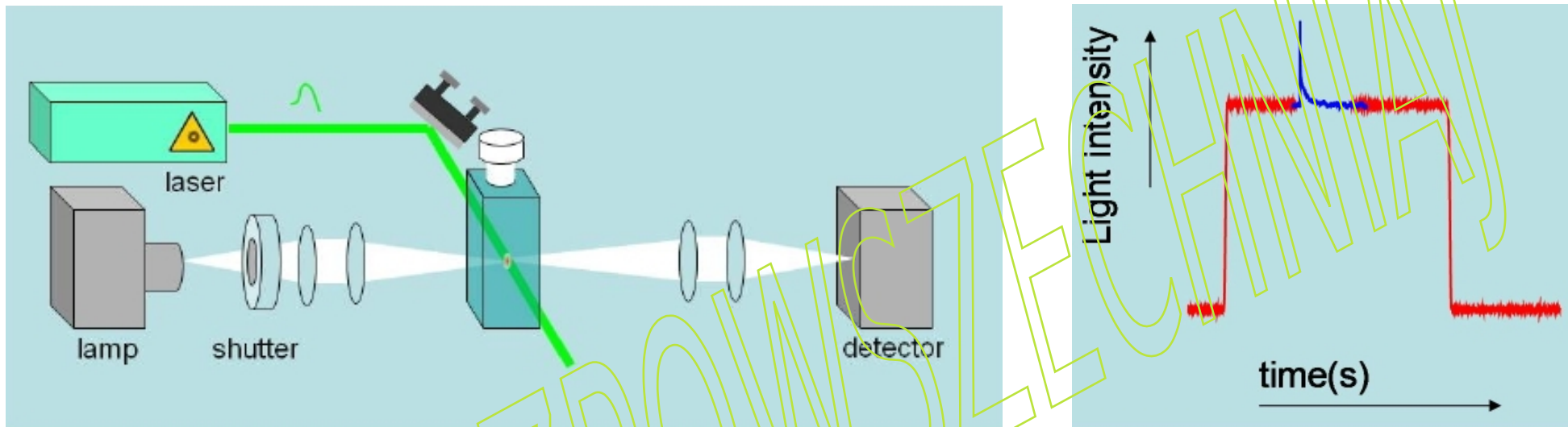
Fotoliza błyskowa

jako sposób na szybkie zainicjowanie niektórych reakcji za pomocą krótkich impulsów świetlnych,
(metoda opracowana przez Ronalda G.W. Norrisha w Cambridge i George'a Portera w Londynie)



Każdy impuls może zapoczątkować reakcję chemiczną lub prowadzić do zwiększonej populacji poziomów energii innych niż stan podstawowy w próbce atomów lub cząsteczek.

- Transfer energii triple-triplet.
- Uwolnienie związku w klatce inicjującego proces molekularny
- Reakcja chemiczna w stanie wzbudzonym

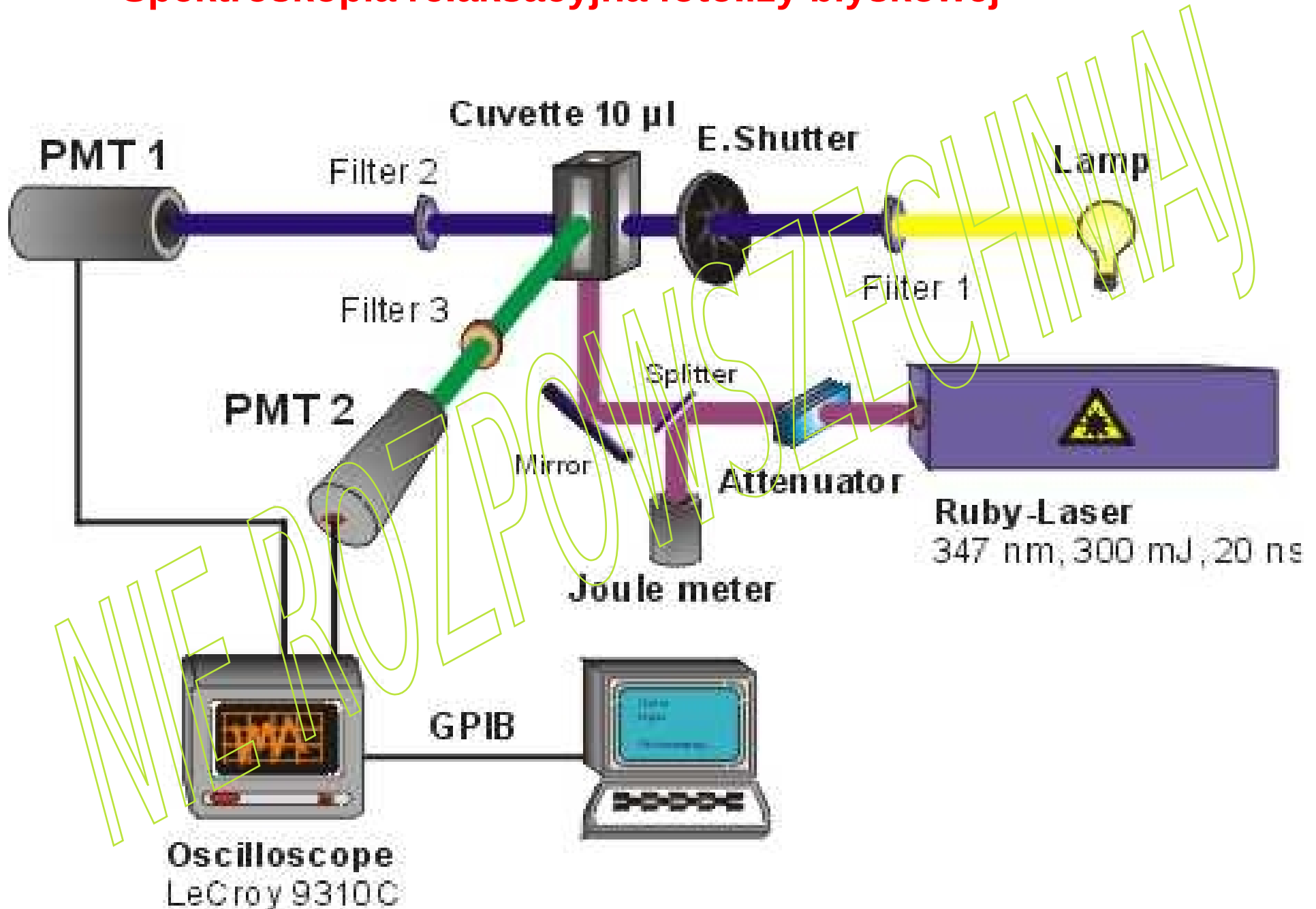


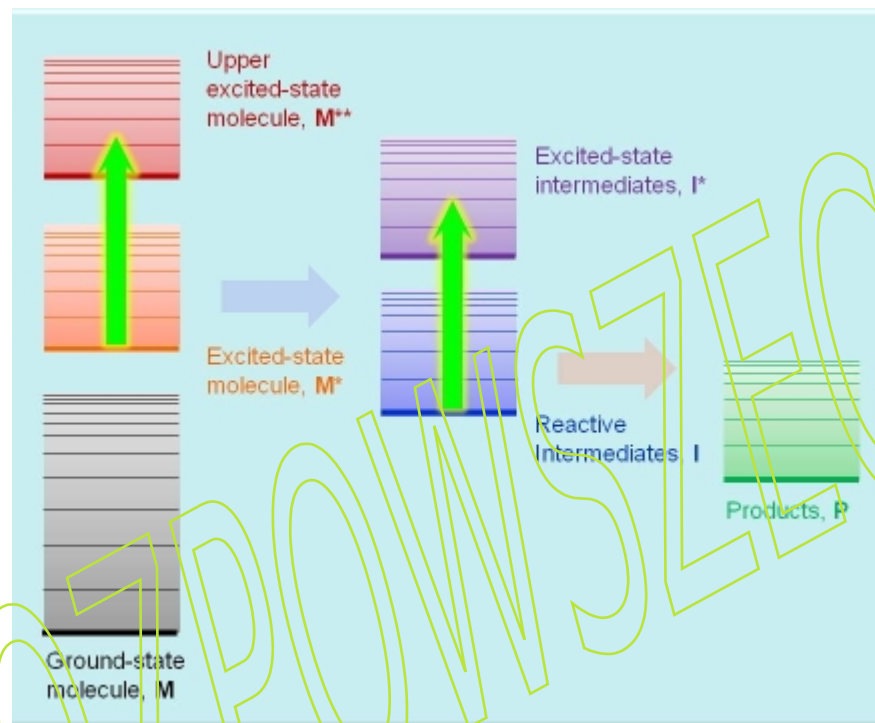
Podstawowy układ optyczny układu fotolizy z nanosekundową lampą błyskową lasera. Zmiany absorbancji, od milisekund do nanosekund, po wzbudzeniu za pomocą nanosekundowego lasera impulsowego monitoruje się za pomocą źródła światła ciągłego, takiego jak lampa łukowa Xe.

Szybka migawka wystawia próbkę na działanie wiązki sondy na krótko przed dotarciem impulsu lasera do próbki i zamyka się po zakończeniu zbierania danych, aby zapobiec jej fotowysielaniu.

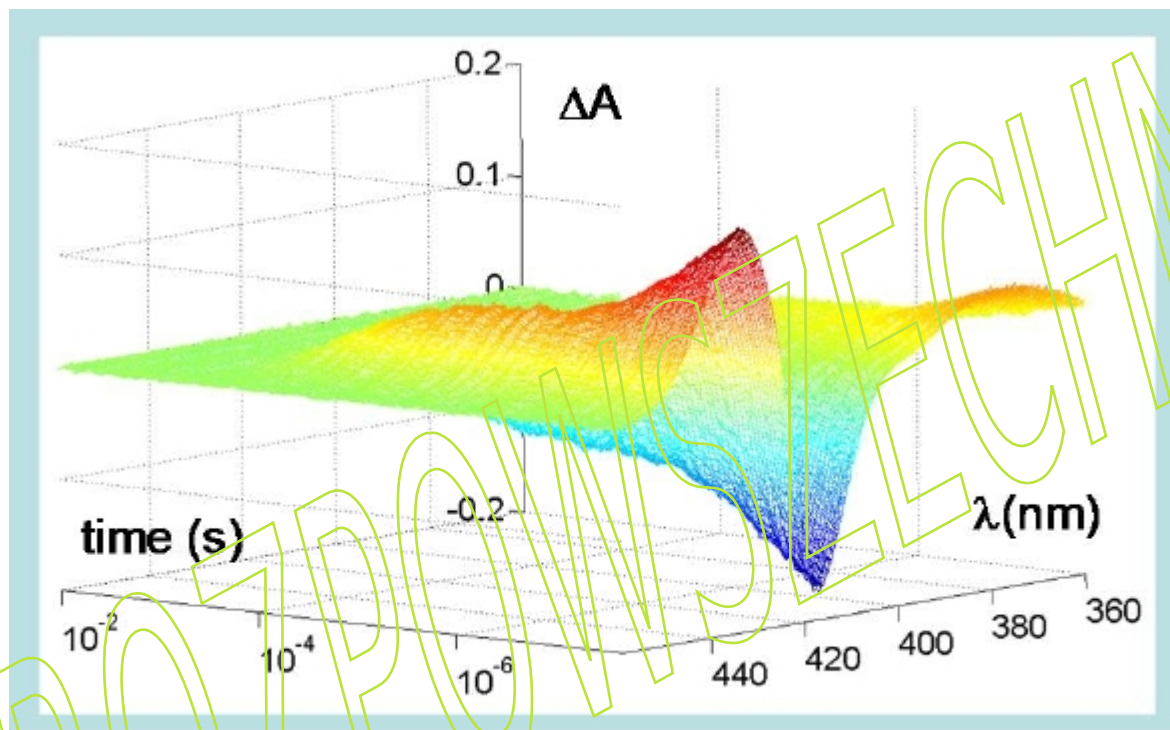
W czasie zero przesłona jest zamknięta i detektor nie widzi światła. Po otwarciu przesłony światło przechodzące przez próbkę jest widziane przez detektor. Zmiany intensywności indukowane przez laser impulsowy są podświetlane niebieskim sygnałem. Pod koniec eksperymentu przesłona jest ponownie zamknięta.

Spektroskopia relaksacyjna fotolizy błyskowej

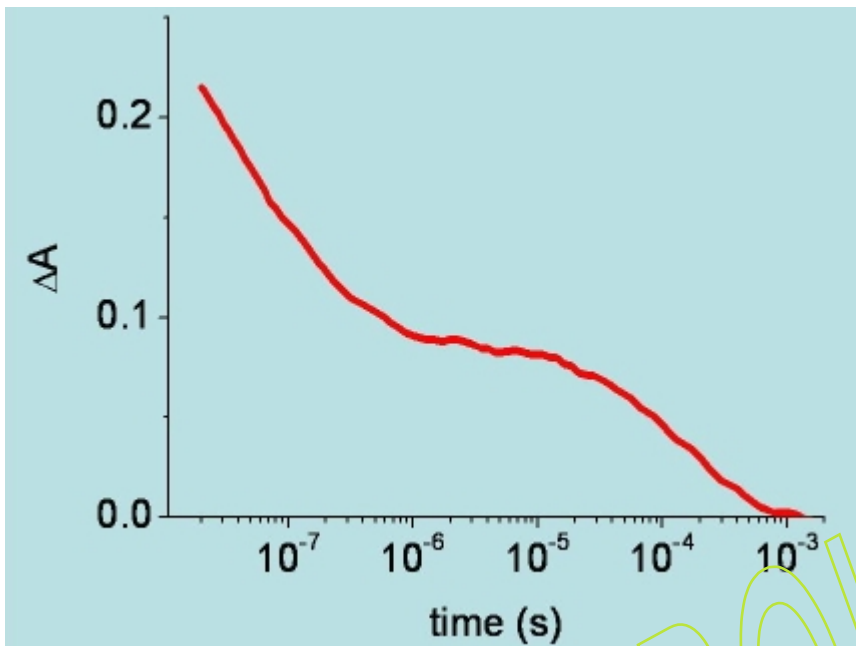




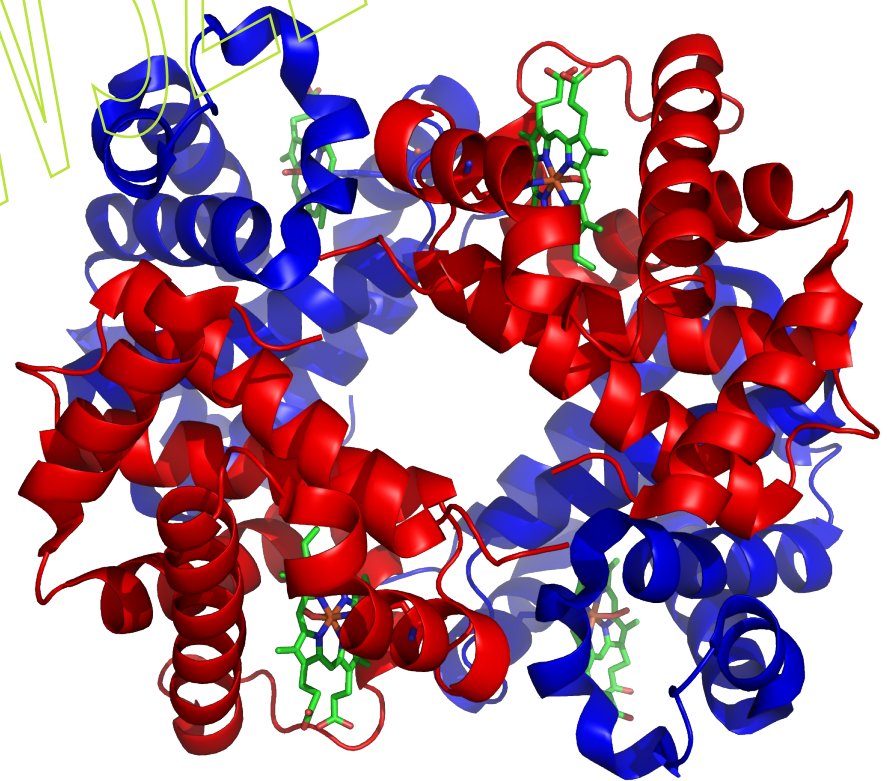
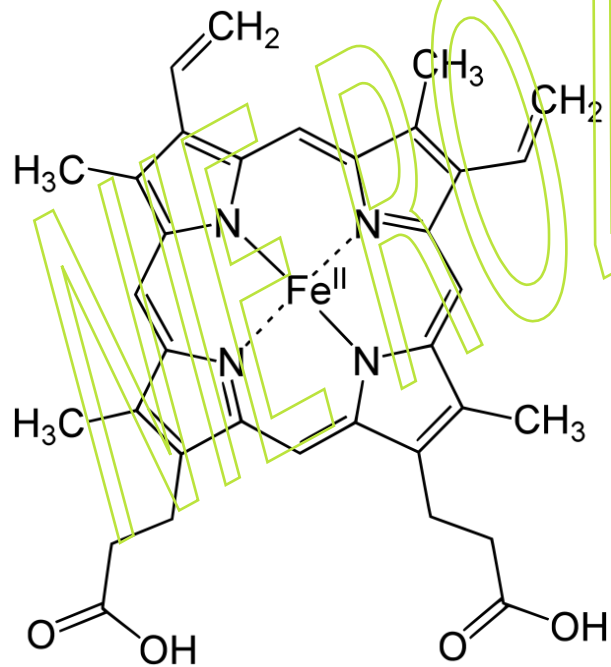
Pomiary absorpcji przejściowej: badane obiekty to metastabilne (tj. przejściowe) stany wzbudzone molekuł i produkty pośrednie reakcji, których czas życia może wahać się od femtosekund w przypadku pierwotnych stanów wzbudzonych do tysięcy sekund w przypadku półproduktów o powolnej reakcji. Molekuły są tymczasowo przenoszone do górnego stanu wzbudzonego. Pomiar widma absorpcyjnego substancji przejściowych wymaga użycia laserów impulsowych do generowania mierzalnego stężenia stanów wzbudzonych oraz drugiej wiązki światła, CW lub impulsowej, do badania ich absorpcji. Oprócz widm absorpcyjnych techniki absorpcji przejściowej pozwalają również uzyskać stałe szybkości procesów, w których uczestniczą te substancje.

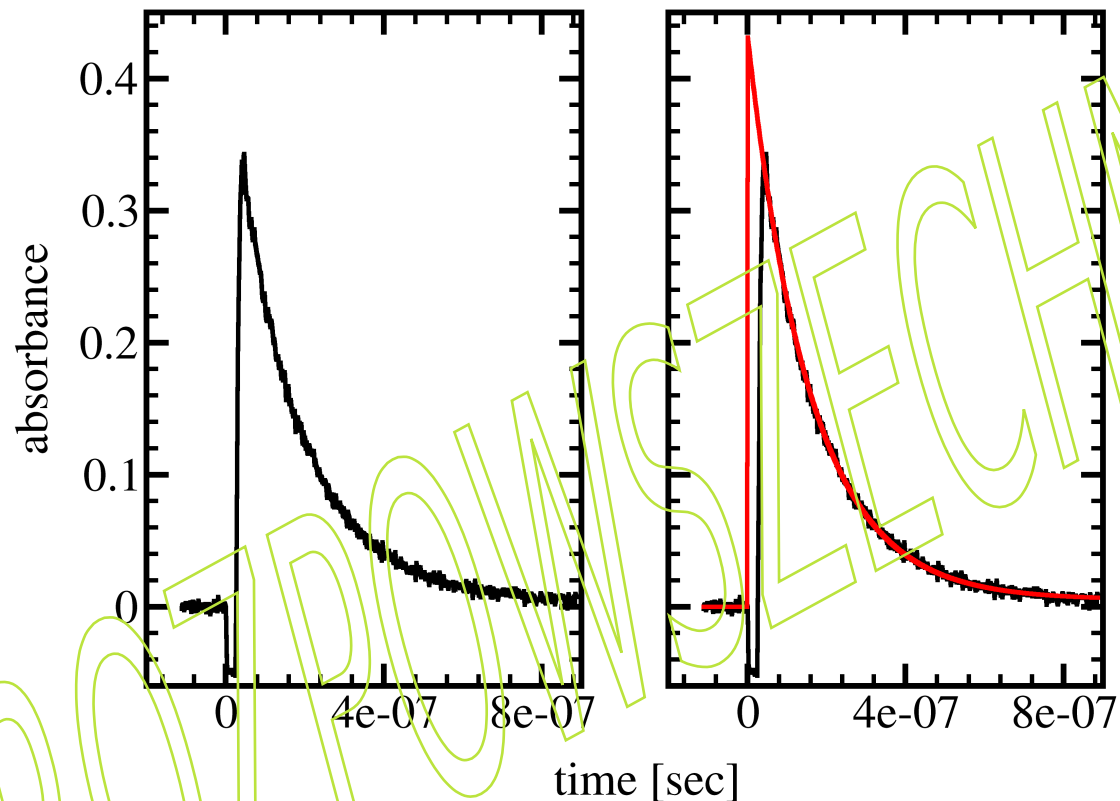


Przykład widm czasowo-rozdzielczych uzyskanych w eksperymencie fotolizy błyskawicznej.

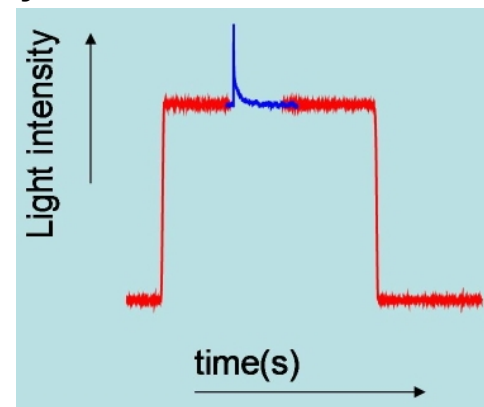
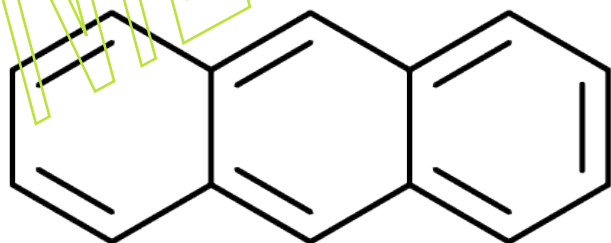


Przebieg w czasie zmiany absorbancji przy 436 nm, po nanosekundowej fotodysocjacji karboksyhemoglobiny. Zmiana absorbancji odzwierciedla kinetykę ponownego wiązania tlenu węgla z Fe grupy hemowej.





Zanik stanu trypletowego antracenu rozpuszczonego w metanolu obserwowany na podstawie pomiarów absorpcji przy 420 nm. Wzbudzenie impulsem o długości 355 nm. Eksperyment przeprowadzony przy użyciu spektrometru LKS60 firmy Applied Photophysics Ltd.

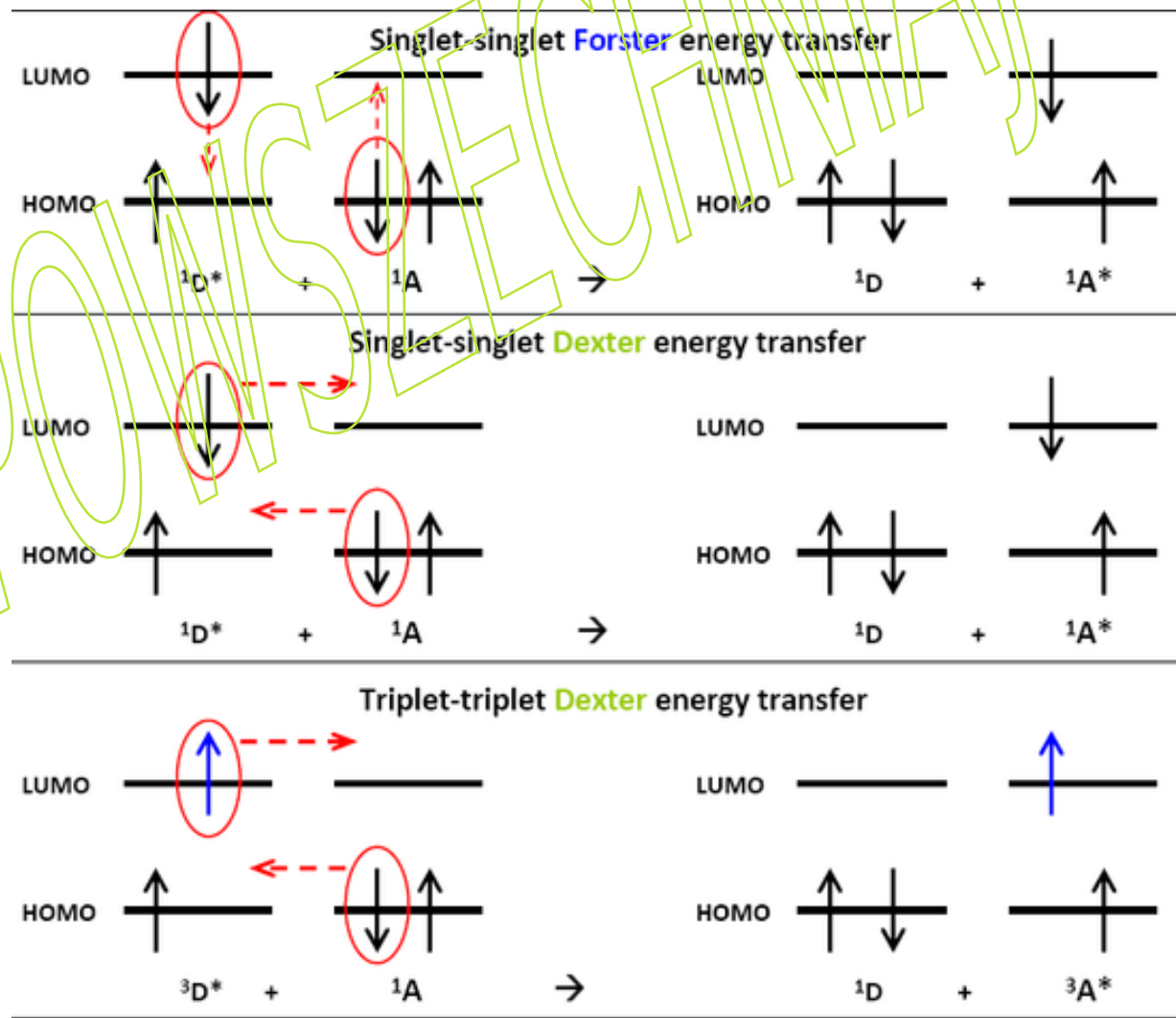


transfer energii triplet-triplet (TTET)

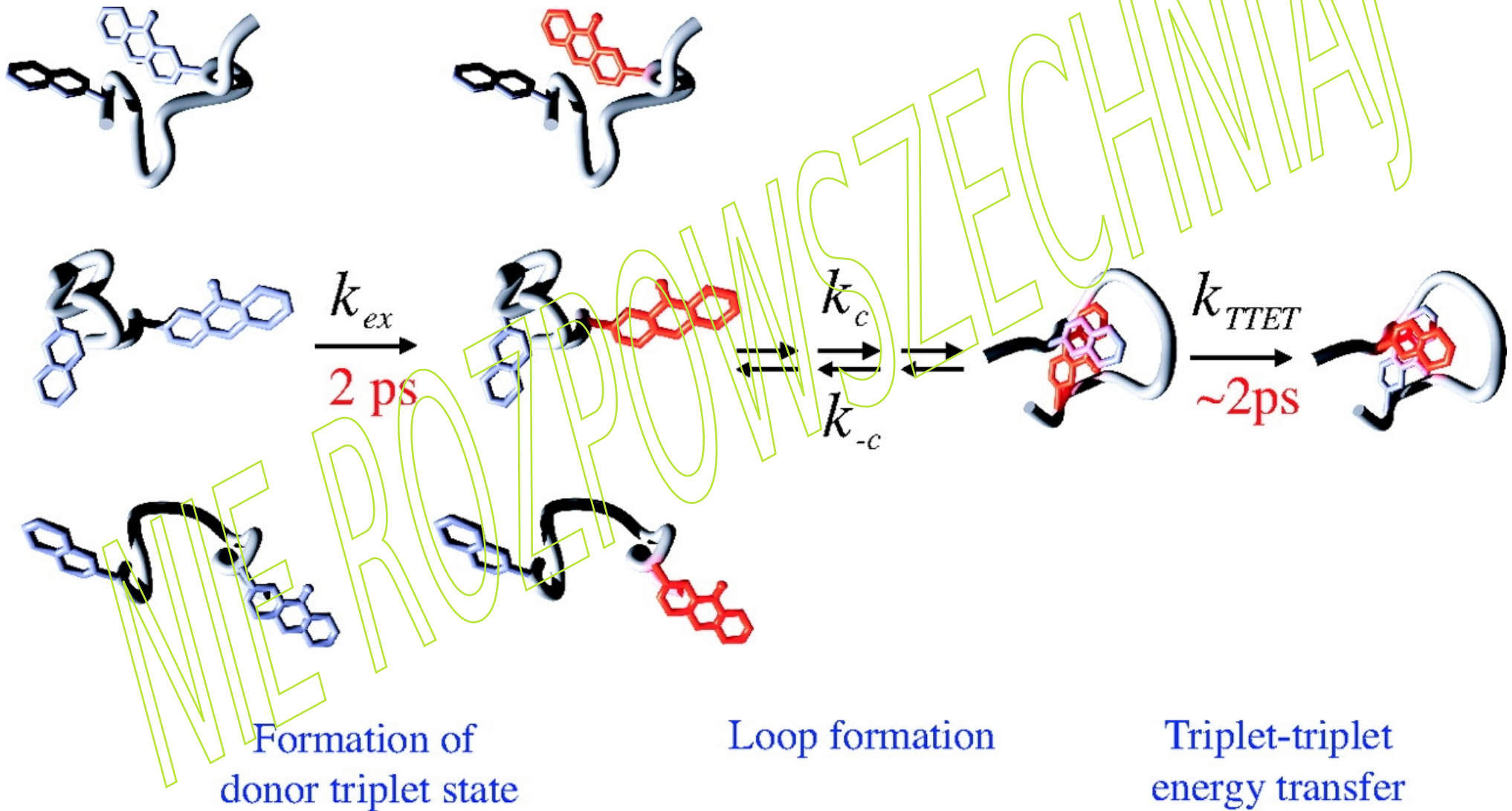
transfer energii z elektronicznie wzbudzonego donora trypletowego w prowadzący do wytworzenia elektronicznie wzbudzonego akceptora w jego stanie trypletowym (IUPAC Compendium of Chemical Terminology, wydanie 2 (1997)).

Transfer energii Dexter'a to proces, w którym dwie cząsteczki (międzycząsteczkowy) lub dwie części cząsteczki (wewnątrzcząsteczkowy) dwustronnie wymieniają swoje elektrony. W przeciwieństwie do zależności transferu energii Förstera od szóstej potęgi odległości, stała szybkości reakcji transferu energii Dexter'a maleje wykładniczo wraz ze wzrostem odległości między tymi donorem i akceptorem. Ze względu na wykładniczy związek z odległością, mechanizm wymiany zwykle zachodzi w zakresie 10 Å. Stąd mechanizm wymiany nazywany jest także transferem energii krótkiego zasięgu.

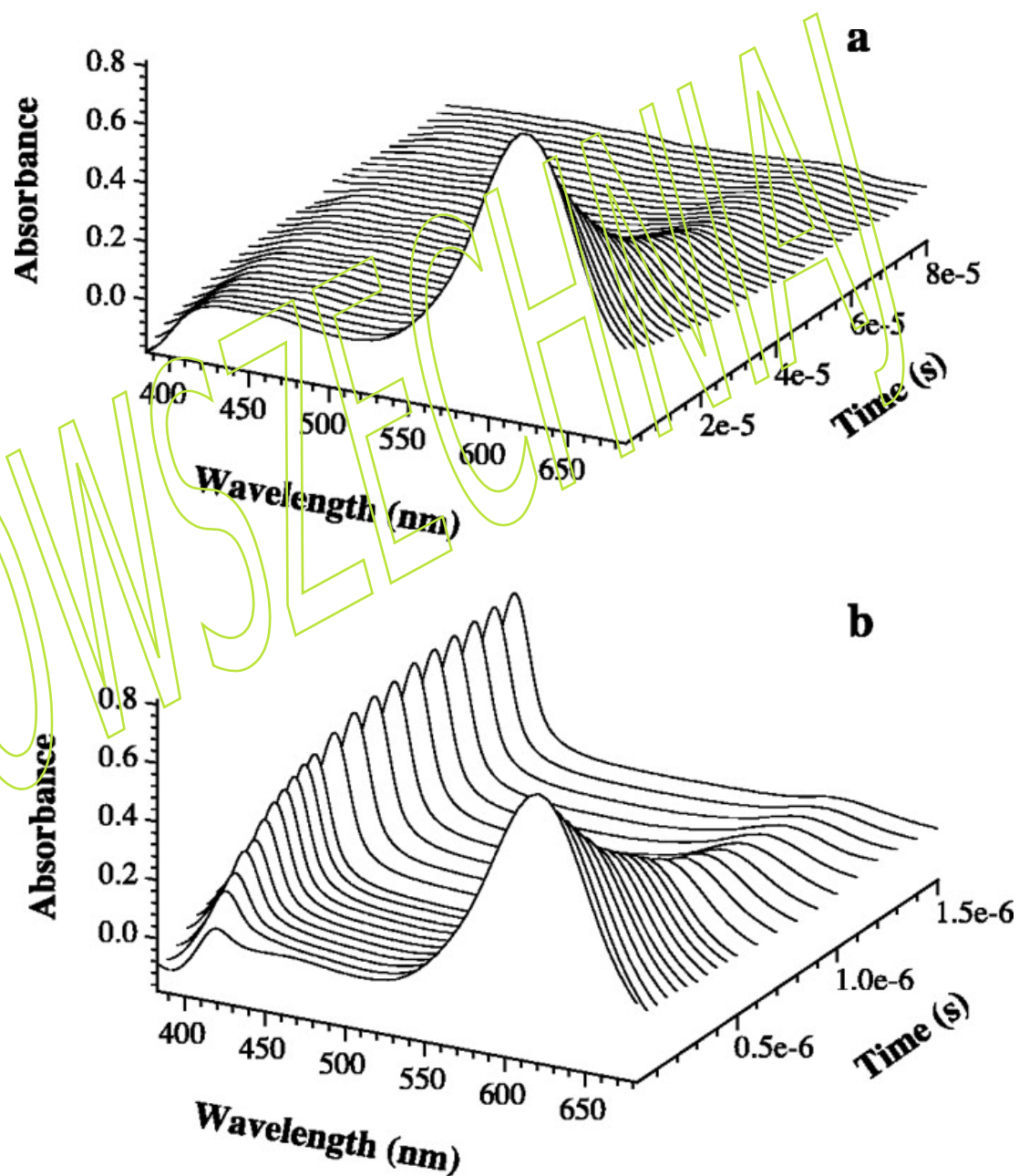
transfery energii

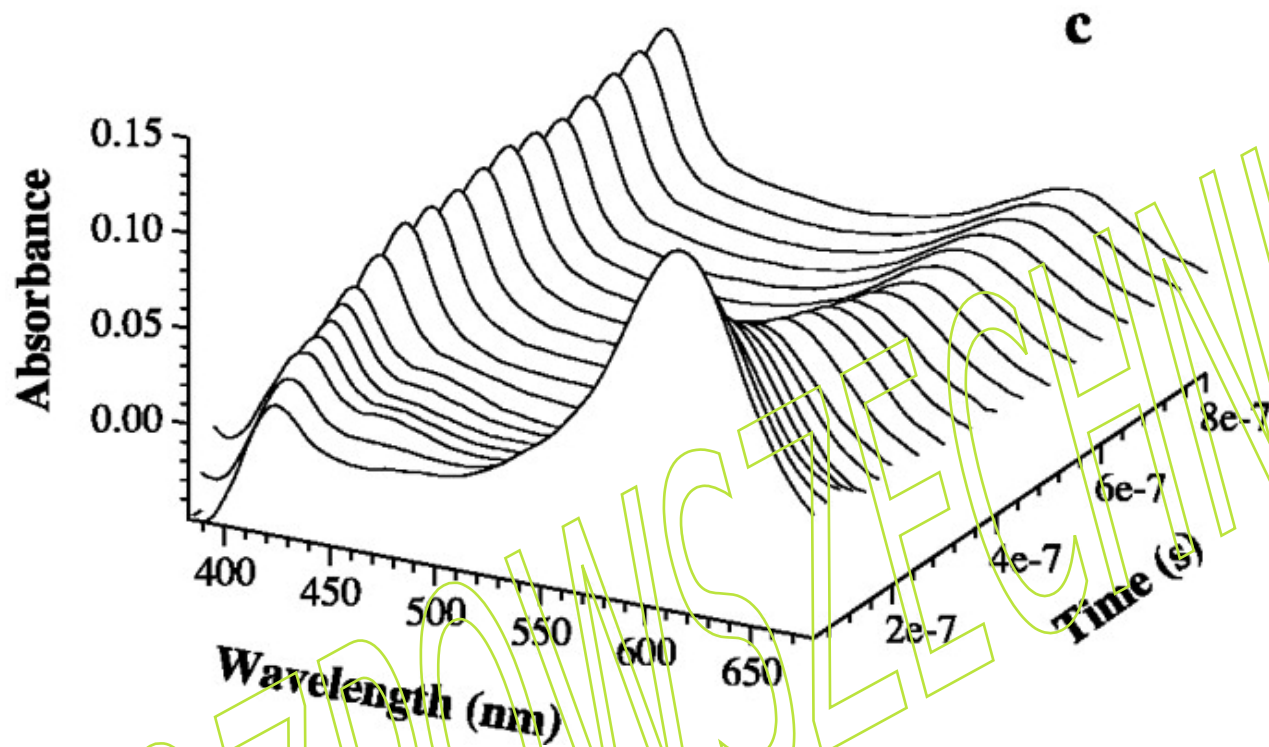


Badania dynamiki konformacyjnej peptydów i białek poprzez obserwację transferu energii triplet-triplet

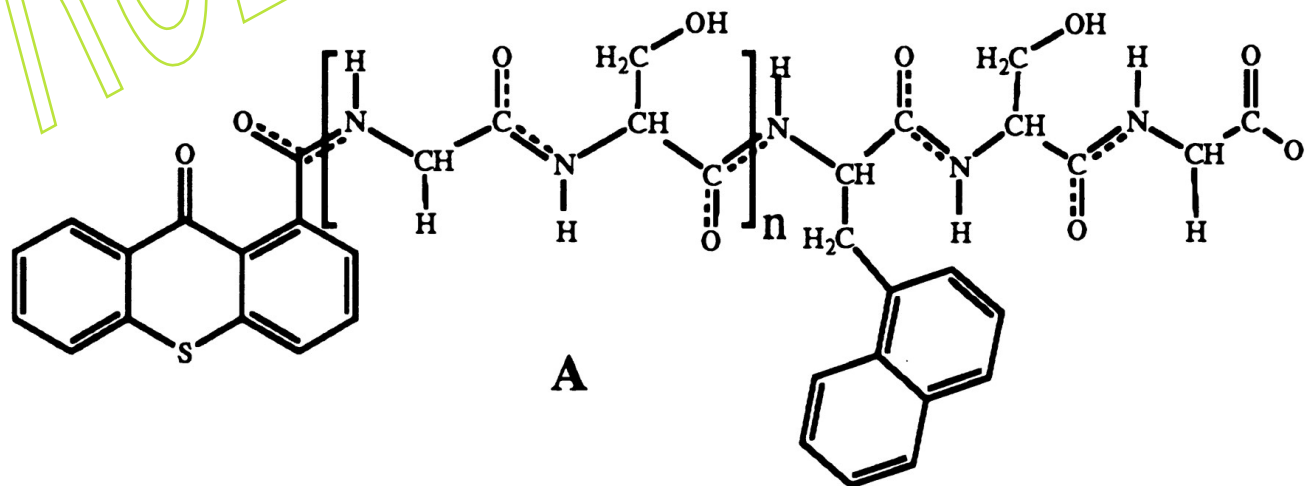


Widma absorbancji przejściowej tioksantonu (a) oraz mieszaniny tioksantonu i kwasu naftylooctowego (b) po selektywnym wzbudzeniu tioksantonu 20-ns impulsem lasera przy 351 nm. Stężenie tioksantonu w obu przypadkach wynosiło 86 μM . Populację trypletów donora (tioksantonu) i akceptora (1-naftyloalaniny) można łatwo zmierzyć na podstawie ich silnych pasm absorbancji odpowiednio przy 620 nm i 420 nm. Okres półtrwania tripletu tioksantonu przy braku akceptora (a) wynosił 30 μs w zastosowanych warunkach doświadczalnych. Zanik sygnału miał charakter mieszany z powodu anihilacji triplet-triplet. W obecności 0,5 mM 1-naftyloalaniny (b) czas życia tripletów tioksantonu spada do 500 ns. Efekt ten wynika z przeniesienia energii triplet-triplet do chromoforu akceptorowego, na co wskazuje równoczesny wzrost absorbancji tripletu przez 1-naftyloalaninę przy 420 nm.

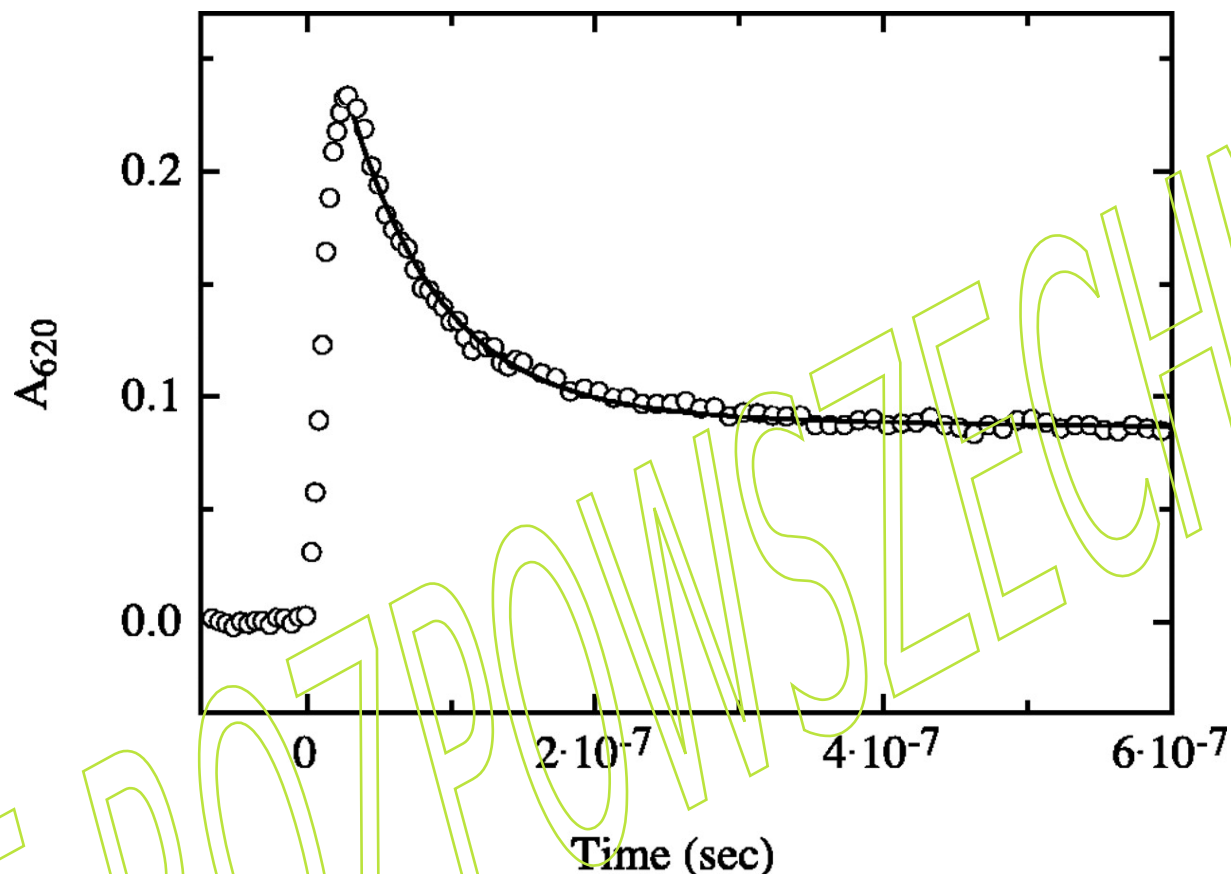




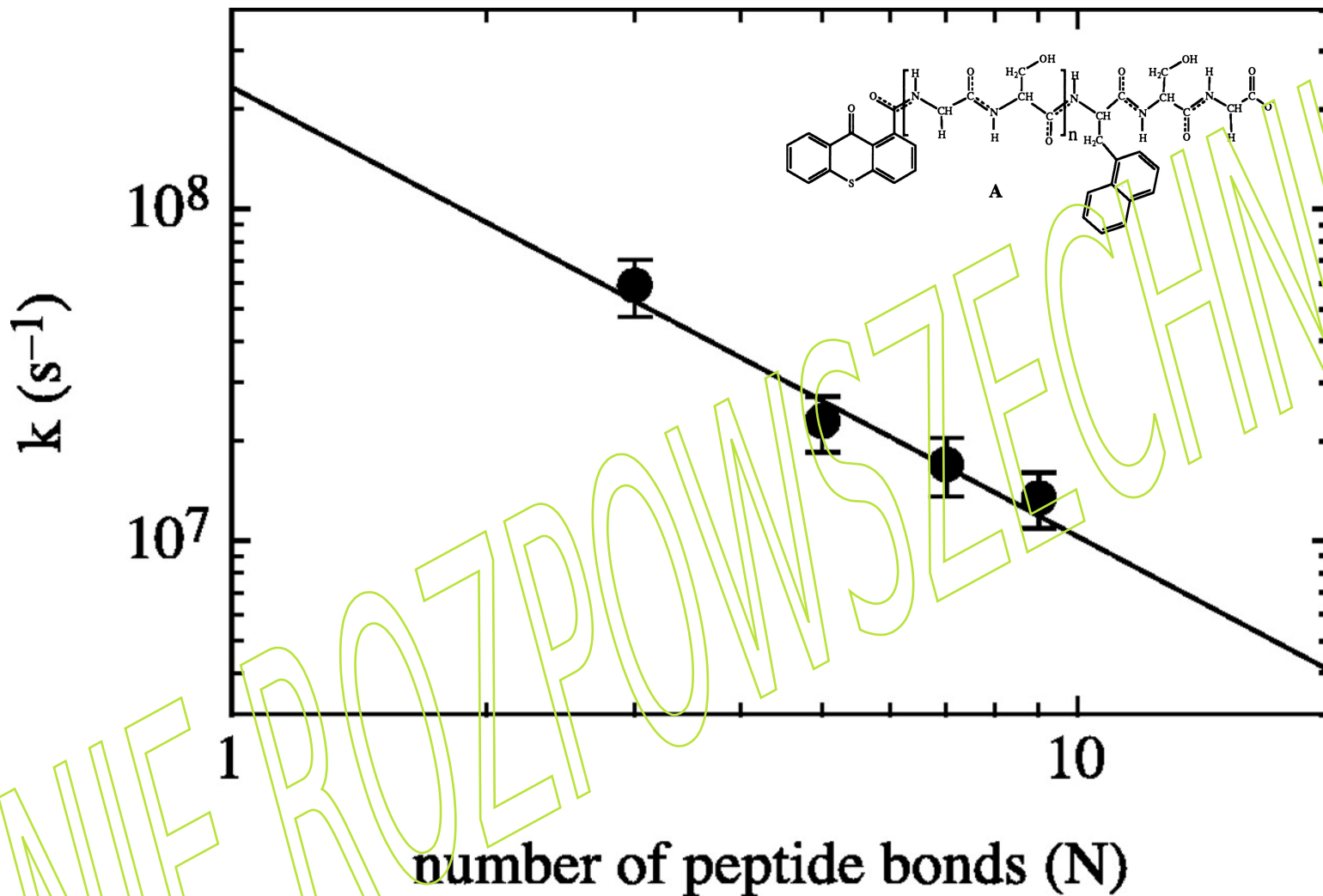
(c) pokazuje te same eksperymenty co część b, ale z chromoforami donora i akceptora przyłączonymi do łańcucha polipeptydowego [peptyd A (n=4)]. Doświadczenia przeprowadzono w etanolu. W przypadku transferu wewnątrzcząsteczkowego (c) roztwór zawierał 40% gliceryny. Spowalnia to tworzenie się kontaktu, a tym samym umożliwia rejestrację widm rozdzielonych czasowo. Stężenie peptydu wynosiło 15 μM .



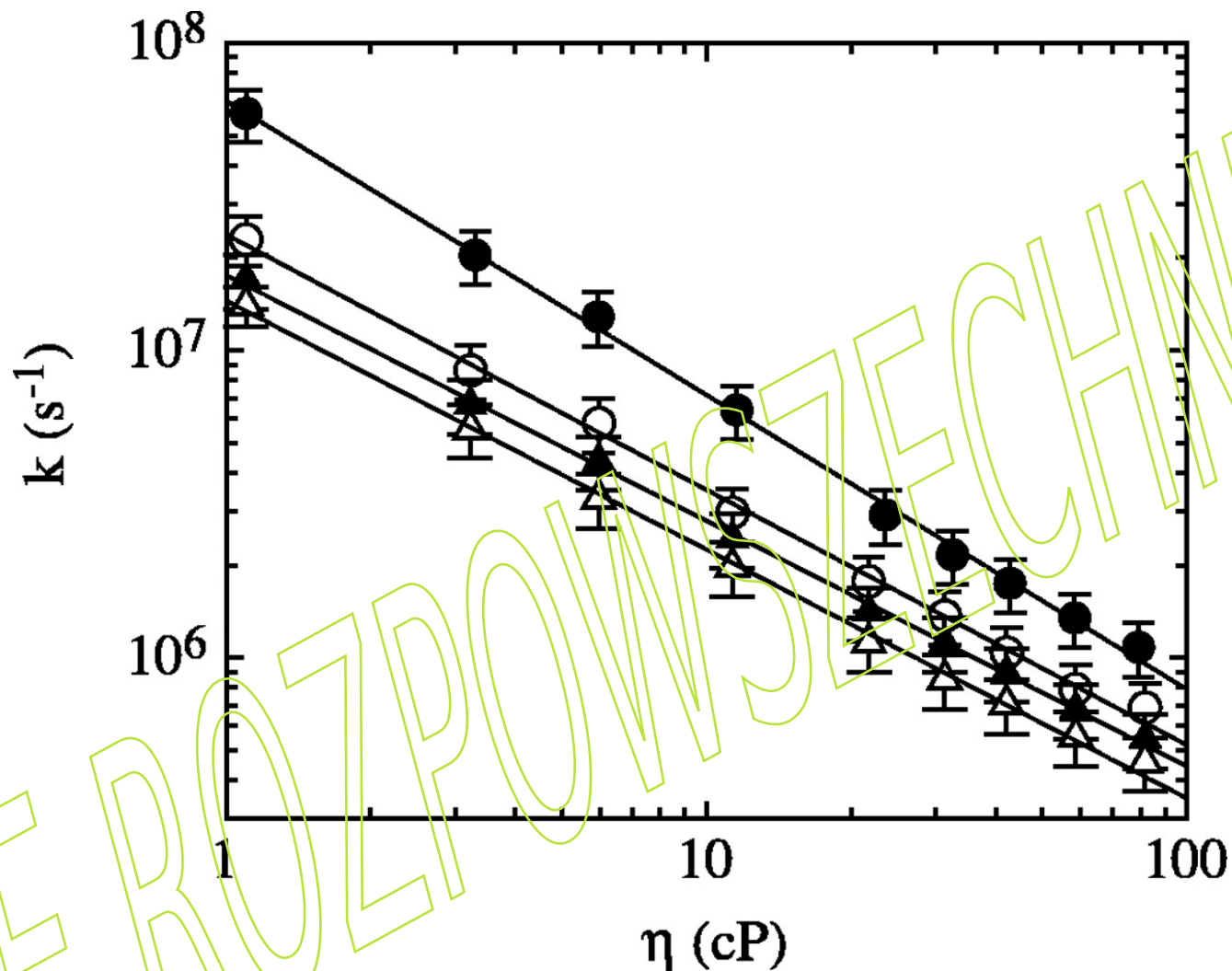
$[-\text{gly}-\text{ser}]_n$



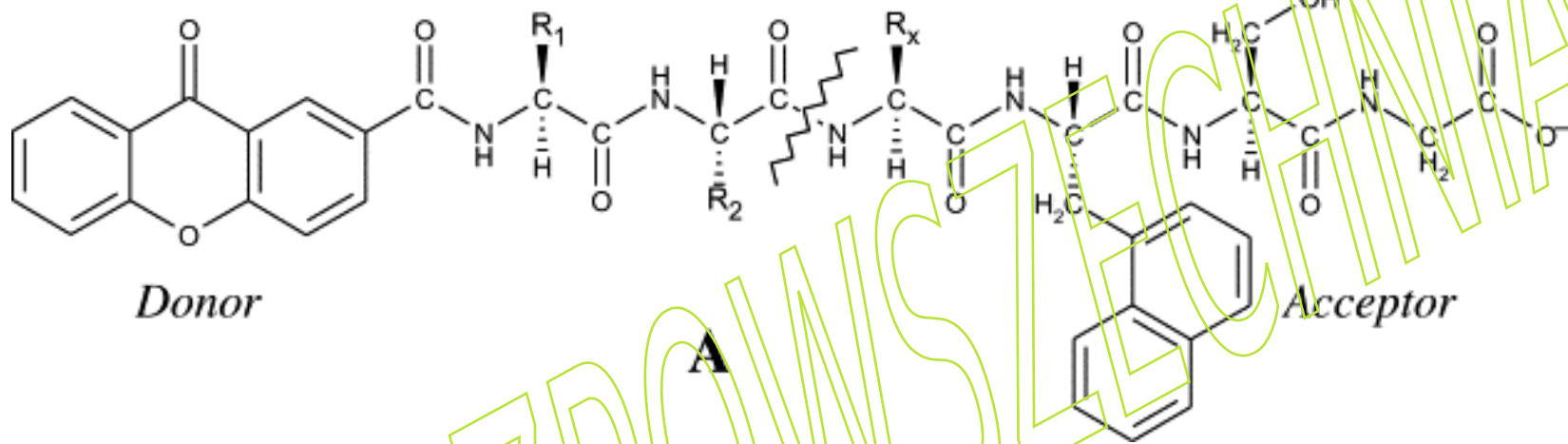
Prześciowa absorbanca roztworu tioksantonu w peptydzie A ($n=4$) w etanolu. Impuls lasera był przyłożony w $t=0$. Zanik absorbancji trypletu tioksantonu w 620 nm (\circ) może być opisany jako proces jedno-eksponencjalny ze stałą szybkości $1.4 \pm 0.2 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$ (linia ciągła). Ponieważ wykazano, że wewnątrzcząsteczkowy proces transferu energii stanu trypletowego jest kontrolowany procesami dyfuzji, ta stała szybkości odpowiada szybkości wewnątrzcząsteczkowej dyfuzji donora względem akceptora. Stężenie peptydu wynosiło $40 \mu\text{M}$. W tych warunkach, połowkowy czas życia trypletu tioksantonu Under these conditions, the half-life of thioxanthone triplets in peptides nie zawierających akceptora wynosił $30 \mu\text{s}$ (dane nie pokazane). Doświadczenia przeprowadzono w 22°C . Około 30% molekuł tioksantonu pozostawało w stanie trypletowym po osiągnięciu stanu równowagi z powodu małej różnicy w energii stanu trypletowego donora i akceptora w rozpuszczalnikach polarnych. Te stany równowagi trypletowej zanikają w znacznie dłuższej skali czasu porównywalnej z czasem zaniku trypletów akceptora ($1/k \approx 30 \mu\text{s}$; dane nie pokazane).



Zależność szybkości wewnątrzcząsteczkowej dyfuzji od odległości donor-akceptor. Szybkość tworzenia kontaktów w różnych peptydach A ($n=1-4$) została wykreślona w funkcji liczby wiązań peptydowych (N) oddziałających donor od akceptora. Jednoekspencyjalna kinetyka była obserwowana dla wszystkich peptydów A. Warunki eksperymentalne były takie jak dla danych pokazanych na poprzednim slajdzie. Stężenie peptydu wynosiło $15 \mu\text{M}$. Liniowy fit na wykresie z obiema osiami w skali logarytmicznej daje nachylenie -1.36 ± 0.26 . Teoretyczna wartość dla łańcucha Gaussowskiego wynosi -1.5 .

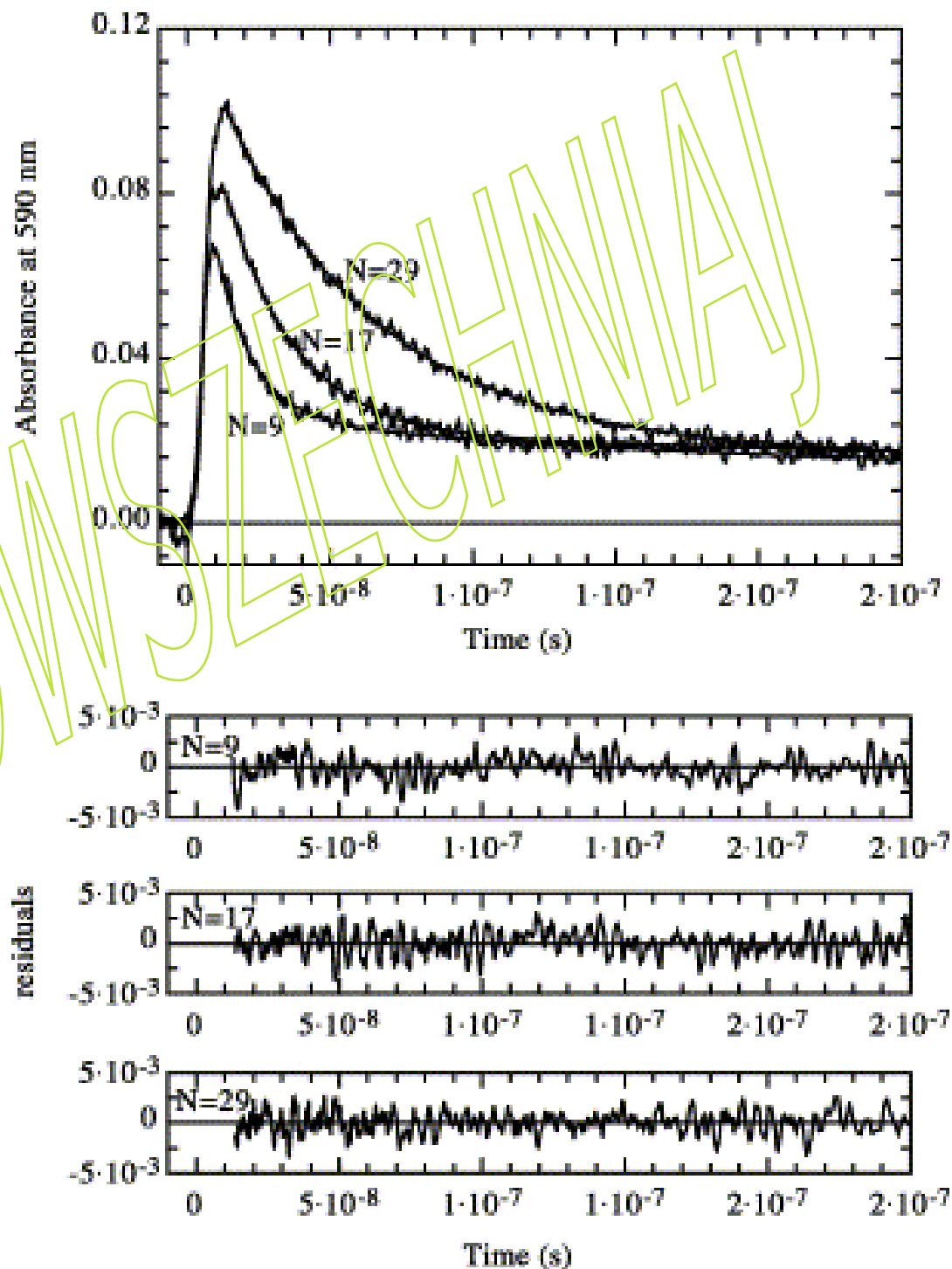


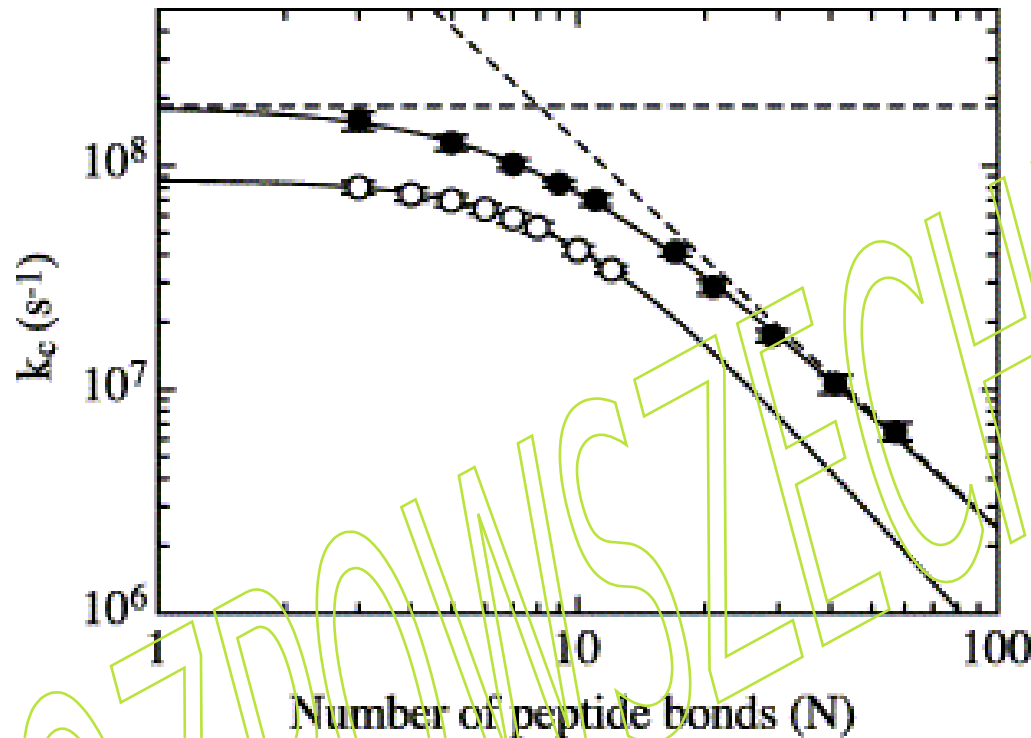
Zależność od lepkości szybkości tworzenia kontaktów w peptydach A zawierających $n=1$ (●), 2 (○), 3 (▲) and 4 (△) par glicyna/seryna między tioksantonem i 1-naftylalaniną. Liniowe fity na dwulogarytmicznym wykresie dają nachylenia -0.96 ± 0.05 , -0.83 ± 0.05 , -0.80 ± 0.05 , and -0.81 ± 0.05 , odpowiednio. Teoretyczna wartość oczekiwana dla procesów limitowanych wyłącznie przez dyfuzję wynosi -1 .



Pomiary TTET wewnątrzłańcuchowej dyfuzji w łańcuchach poli(glicyno-serynowych) liczących do 56 reszt aminokwasowych między punktami tworzenia kontaktów: ksantonem i naftyl-alaniną. Zaniki absorpcji przez stan trypletowy były rejestrowane przez Laser Flash Photolysis Reaction Analyzer (LKS.60) firmy Applied Photophysics. Stan trypletowy ksantonu był wzbudzany selektywnie przez laser Quantel Nd:YAG (354.6 nm, 4 ns pulse of 50 mJ), stężenia łańcucha polipeptydowego były w zakresie 50-100 μM . Pomiary przeprowadzono w temperaturze 22.5 $^{\circ}\text{C}$ i pH 7 w wodzie.

Przebieg czasowy tworzenia i zaniku trypletów ksantonu w peptydach Xan-(Gly-Ser)_n-NAla-Ser-Gly po podziałaniu a 4 ns impulsem lasera w t=0, mierzonego jako zmiany absorbancji w 590 nm (maksimum absorpcji trypletu ksantonu). Pokazane są dane dla różnych liczb wiązań peptydowych (N) między donorem i akceptorem. Linie ciągłe pokazują jednoeksponecjalne fity do danych doświadczalnych. Reszty z fitowań pokazane są na dole rysunku. Fity dają następujące czasy relaksacji: 11.6(±0.4) ns, 25.0(±1.3) ns i 57.1(±3.3) ns dla N = 9; 17, and 29, odpowiednio. Na końcu eksponencjalnego zaniku widać, że niewielka część ksantonów pozostaje w stanie trypletowym. Te stany zanikają w znacznie dłuższej skali czasu, $t_{1/2} \approx 30 \mu\text{s}$.





Wpływ rosnącej długości łańcucha (N) między donorem I akceptorem na stałą szybkości tworzenia kontaktów w serii peptydów z naprzemiennymi glicynami i serynami (●) i dla poliseryn (○). Linie ciągłe reprezentują fity równania:

$$k_c = \left(\frac{1}{k_o} + \frac{1}{k_i N^m} \right)^{-1}$$

Fity dają $k_o = 1.8(\pm 0.2) \times 10^8 \text{ s}^{-1}$, $k_i = 6.7(\pm 1.6) \times 10^9 \text{ s}^{-1}$ i $m = -1.72 \pm 0.08$ dla poli-(glicyno-seryn) oraz wartości $k_o = 8.7(\pm 0.8) \times 10^7 \text{ s}^{-1}$, $k_i = 1.0(\pm 0.8) \times 10^{10} \text{ s}^{-1}$ i $m = -2.1 \pm 0.3$ dla poliseryn. Dla łańcucha Gaussowskiego $m = -1.5$, zatem zależność od odległości jest silniejsza niż dla takiego łańcucha. Uwzględniając efekt objętości wyłączonej Szabo otrzymał $m = -1.8$, co jest bliskie m uzyskanego z fitowania dla peptydu serynowo-glicynowego. Dla peptydu poliserynowego dodatkowe efekty prowadzące do innych wartości są istotne.

(A) Wpływ różnych kosolwentów na dynamikę wewnątrzłańcuchowego tworzenia kontaktów w peptydzie Xan-(Gly-Ser)₄-NAla-Ser-Gly. TTET był mierzony w wodnych roztworach w obecności etanolu (◇), mocnika (●) i GdmCl (○). Logarytm k_c maleje liniowo ze wzrostem stężenia kosolwentu w peptydzie Xan-(Gly-Ser)₄-NAla-Ser-Gly.

(B) Wpływ odległości donor-akceptor (N) na stałą szybkości tworzenia kontaktów w serii peptydów z naprzemiennymi glicynami i serynami pomiędzy donorem i akceptorem. Stałe szybkości dla tworzenia kontaktów w wodzie (●) są porównane ze stałymi szybkości w 8 M GdmCl (○).

Wnioski: (A) kosolwentu faworyzują bardziej rozciągnięte, rozłożone konformacje, przez co tworzenie kontaktów jest wolniejsze. (B) W 8 M GdmCl przejście z dynamiki niezależnej od odległości na krótkich dystansach kontaktu do reżimu zależnego od odległości dla dłuższych peptydów następuje przy krótszych dystansach. Wskazuje to na zmniejszoną sztywność łańcucha w 8 M GdmCl w porównaniu z wodą, chociaż dynamika jest znacznie spowolniona w obecności GdmCl zarówno na krótkich, jak i na długich dystansach donor-akceptor. W przypadku długich peptydów wpływ odległości donor-akceptor na szybkość tworzenia kontaktu jest podobny w 8 M GdmCl i wodzie z $k_c \sim N^{-1.8 \pm 0.1}$.

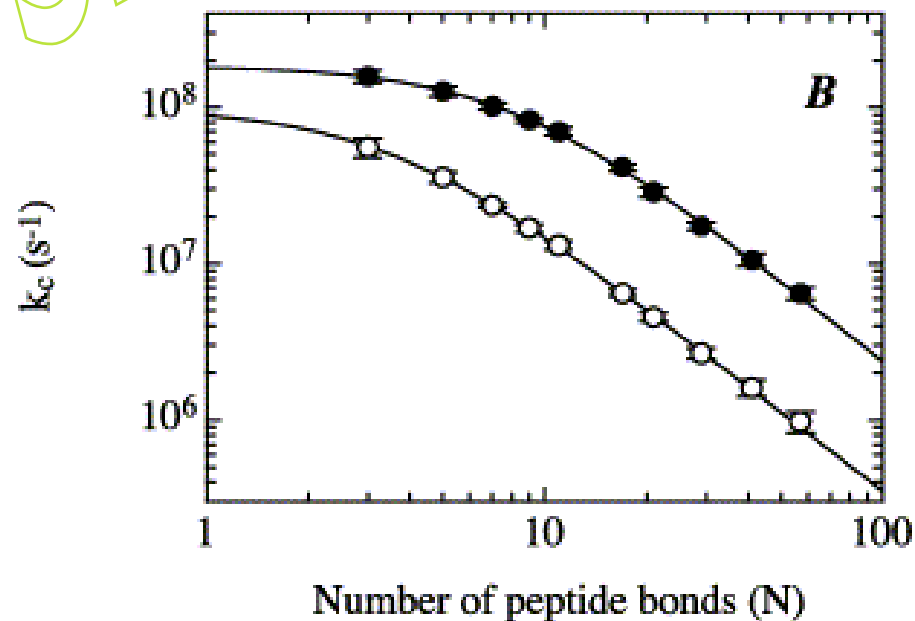
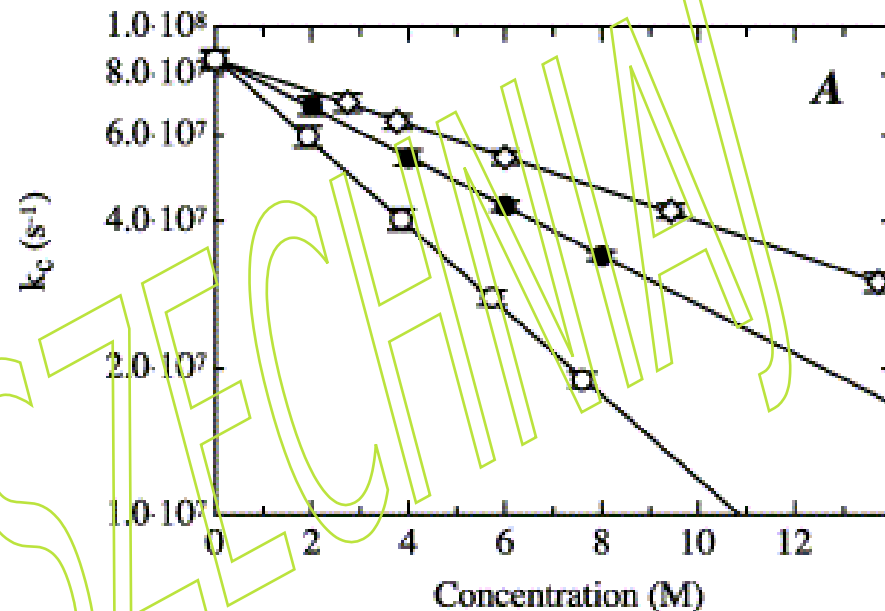
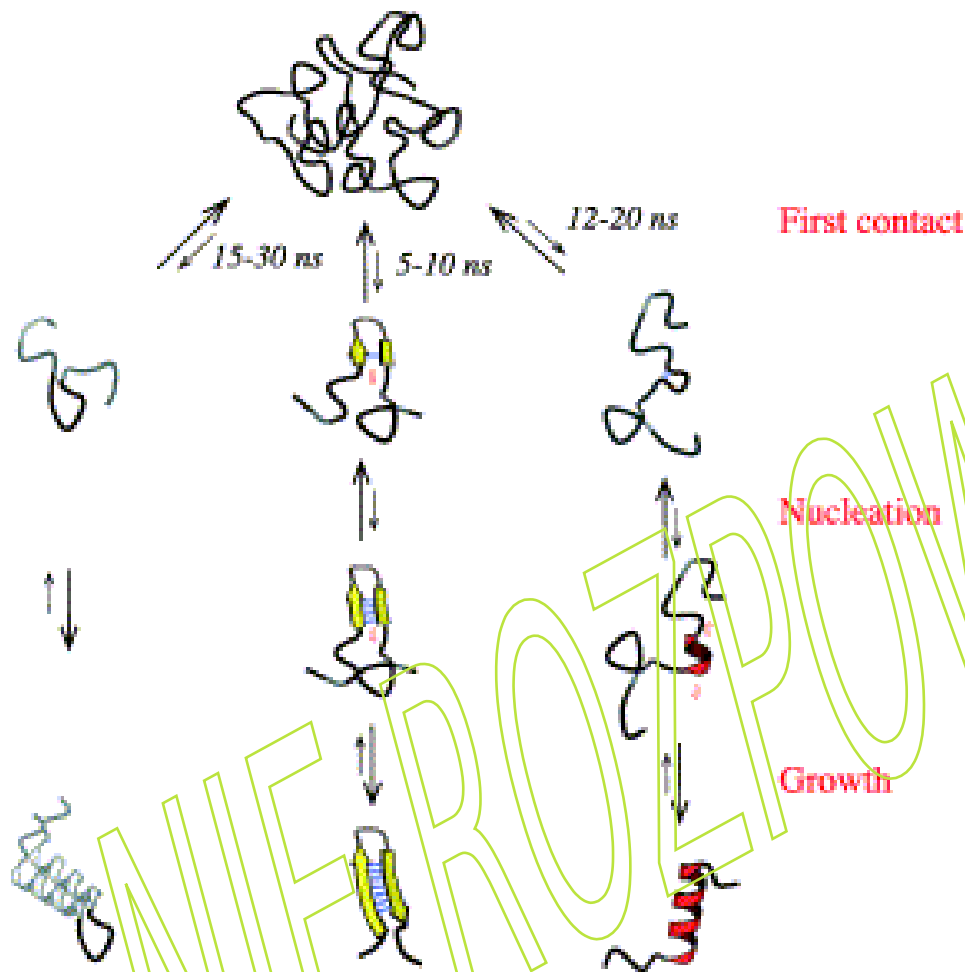


Table 1. Effect of different amino acids on local peptide dynamics

Xaa	k_c (10^7 s $^{-1}$)
Gly	12 ± 1
Ala	8.0 ± 0.7
Ser	6.7 ± 0.7
Glu	5.4 ± 0.2
Arg	5.5 ± 0.7
His	4.9 ± 0.4
Ile	4.4 ± 0.3
<i>trans</i> Pro	2.0 ± 0.3
<i>cis</i> Pro	25 ± 5

The rate constants for end-to-end contact formation (k_c) were measured by TTET from xanthone (Xan) to 1-naphthyl alanine (NAla) in host guest peptides of the sequence Xan-Ser-Xaa-Ser-NAla-Ser-Gly with varying guest amino acid (Xaa). Conditions were 22.5 °C, pH 7 in water.

Aby zbadać wpływ innych aminokwasów na dynamikę łańcucha lokalnego, zmierzono TTET w krótkich peptydach gospodarz-gość o sekwencji kanonicznej Xan-Ser-Xaa-Ser-NAla-Ser-Gly przy użyciu reszt aminokwasowych gościa Xaa = Gly, Ser, Ala, Ile, His, Glu, Arg i Pro. Tabela 1 pokazuje, że łańcuch boczny aminokwasu rzeczywiście ma niewielki wpływ na szybkość tworzenia kontaktu. Wszystkie aminokwasy z wyjątkiem proliny i glicyny wykazują bardzo podobną dynamikę. Co ciekawe, istnieje niewielka, ale znacząca różnica w szybkości między krótkimi łańcuchami bocznymi (Ala, Ser) a aminokwasami z dłuższymi łańcuchami bocznymi (Ile, Glu, Arg, His).



Reprezentatywne stałe czasowe pierwszych etapów tworzenia pętli, β -spinek do włosów i α -helis podczas zwijania białka, uzyskane z danych zmierzonych metodą TTET w wodzie.

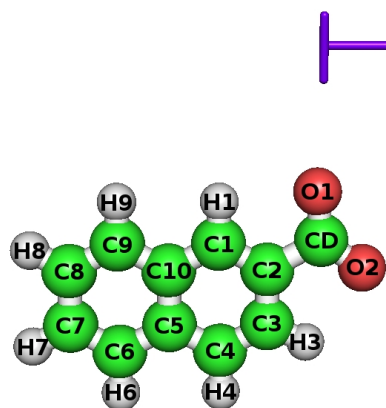
Wyniki pokazują, że sekwencja aminokwasów ma niewielki wpływ na lokalną dynamikę łańcuchów polipeptydowych. Wszystkie aminokwasy wykazują bardzo podobne szybkości dyfuzji końców ze stałymi czasowymi od 12 ns do 20 ns dla tworzenia kontaktów $i-i+4$. Łańcuchy polipeptydowe są znacznie bardziej elastyczne wokół glicyny ($\tau=8$ ns) i sztywniejsze wokół reszt prolilowych ($\tau=50$ ns dla izomeru trans).

Stałe czasowe pierwszych kroków tworzenia najciaśniejszych skrętów z kontaktami $i-i+3$ wynoszą około 5 ns dla Gly i cis Xaa-Pro. W skrętach wolnych od glicyny i proliny szybkości te są spowolnione do około 10–20 ns, w zależności od sekwencji aminokwasów.

Tworzenie α -helis jest najprawdopodobniej inicjowane przez utworzenie skrętu helikalnego, co wiąże się z utworzeniem kontaktu $i-i+4$. Ponieważ helisy są zwykle wolne od reszt glicylowych i prolilowych, inicjacja nie może nastąpić szybciej niż około 12–20 ns. Szybkości te stanowią górną granicę kinetyki tworzenia struktury drugorzędowej.

Diffusional Encounter Rate Constants for Xanthone and 2-Naphthoic Acid by Flash Photolysis Experiments and Brownian Dynamics Simulations: Substantial Effects of Polarizability of the Triplet State

K. Stachurska, P. Grochowski, and J. M. Antosiewicz



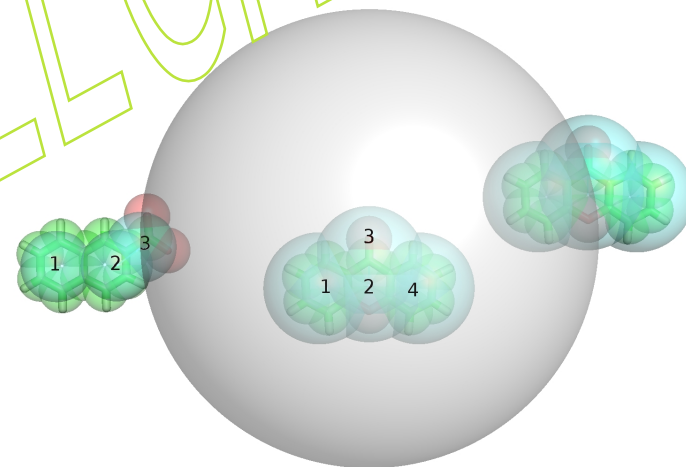
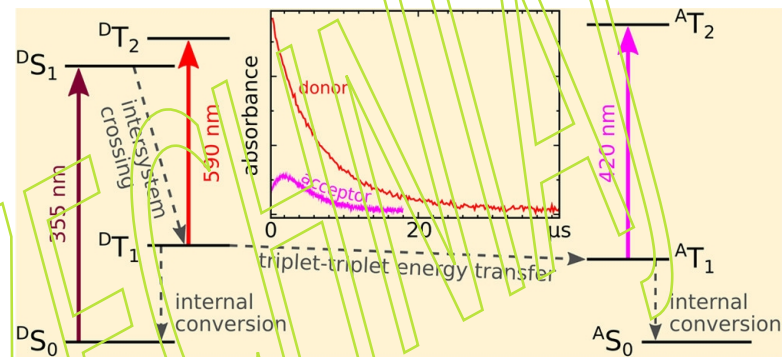
Stałe szybkości spotkania dyfuzyjnego dla cząsteczek ksantonu i kwasu 2-naftalenowego w ich stanach trypletowych z cząsteczkami ksantonu lub kwasu 2-naftalenowego w ich stanach trypletowych lub singletowych, określono za pomocą nanosekundowej laserowej spektroskopii fotolizy z błyskowej. Jednocześnie wykorzystano symulacje dynamiki Brownowskiej do obliczenia tych stałych szybkości dla założonych modeli cząsteczek tworzących te dyfuzyjne kompleksy spotkaniowe.

X3:X0 – Wartość stałej szybkości otrzymana z symulacji BD dla odległości “reakcji” 13 Å, $723 \pm 30 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$, zgadza się bardzo dobrze z wartością otrzymaną z eksperymentu $755 \pm 15 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$.

X3:N0 – Dla odległości reakcji 13 Å, otrzymano z symulacji BD $590 \pm 26 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$, co jest znacznie poniżej wartości eksperymentalnej, $3208 \pm 4 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$.

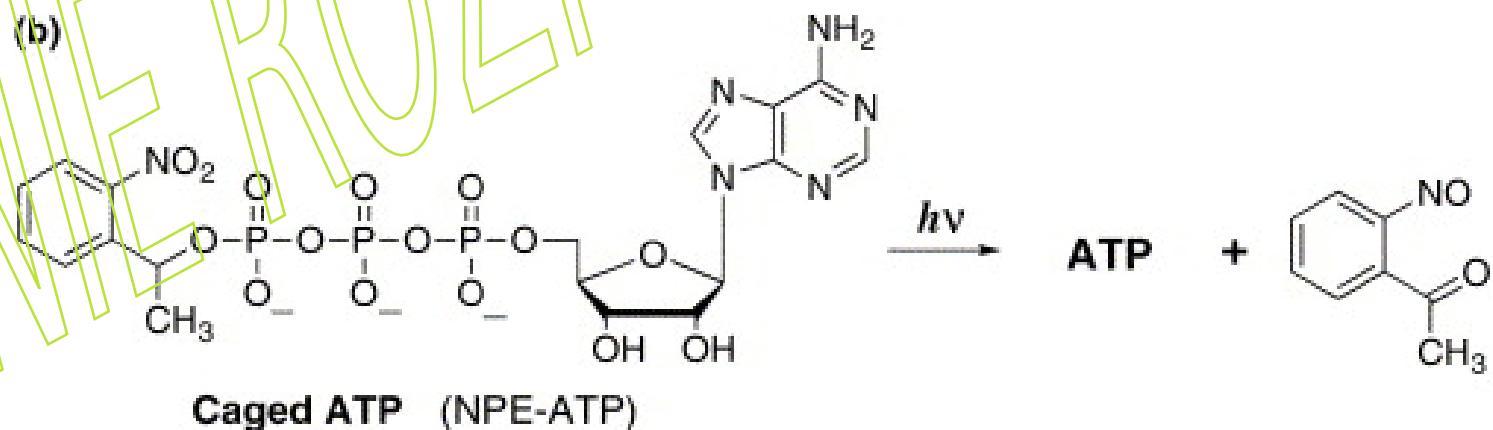
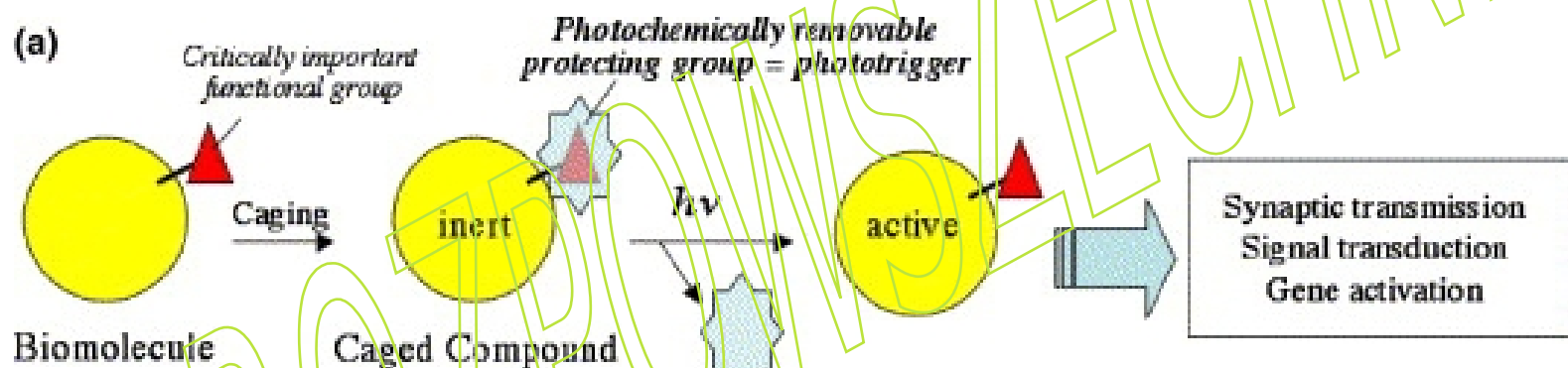
Ta znacząca rozbieżność może być wyjaśniona przez odwołanie się do udziału oddziaływań elektrostatycznych w tworzeniu kompleksu spotkaniowego, nieobecnych w symulacji BD. Mianowicie, oddziaływanie między zjonizowanym kwasem 2-naftalenowym w stanie podstawowym oraz ksantonom w stanie trypletowym jest oddziaływaniem między ładunkiem elektrycznym i wysokopolarizowalnym receptorem (właściwość stanu trypletowego).

Trzy warianty modelu elektrostatycznego spolaryzowanego X3 zostały opracowane przy użyciu programu mechaniki kwantowej Gaussian. Dla indukowanego dipola 1 otrzymano $k = 1492 \pm 72 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$, dla dipola 2 otrzymano $k = 2228 \pm 112 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$, i dla dipola 3 otrzymano $k = 3601 \pm 187 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$.

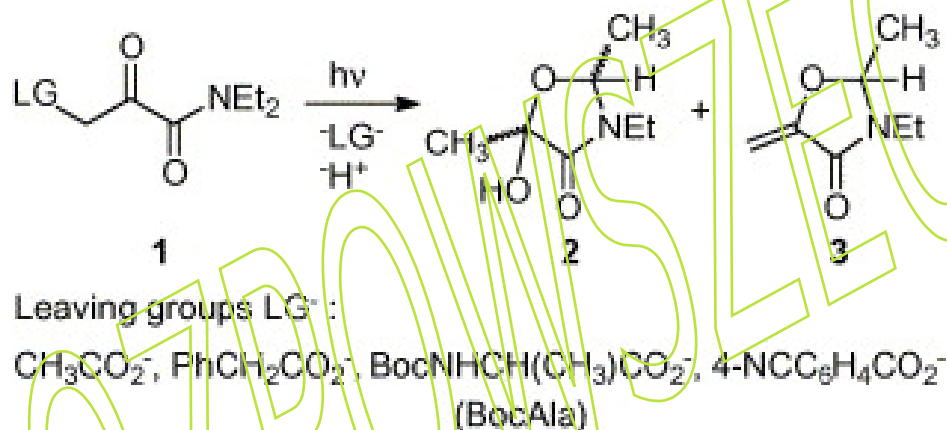


Eksperymenty relaksacyjne fotolizy błyskowej ze związkami klatkowanymi

- a) Związki klatkowane to sztucznie zaprojektowane cząsteczki, których aktywność biologiczna jest maskowana przez kowalencyjne przyłączenie fotochemicznie usuwalnej grupy blokującej aktywność krytycznie ważnej grupy funkcyjnej (fotowyzwalacz).
- (b) Fotochemiczna transformacja klatkowanego ATP (NPE-ATP) daje ATP i 2-nitrosoacetophenone.



Eksperymenty ze skokiem pH w czasie, wykorzystujące fotolizę błyskową lasera i zielen bromokrezolową jako wskaźnik, wykazały, że fotochemiczne rozszczepienie i uwolnienie kwasów karboksylowych z różnych pochodnych α -ketoamidów w środowisku wodnym zachodzi w mikrosekundowej skali czasu (18–136 μ s), w zależności na zdolność grupy opuszczającej karboksylany.

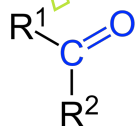


Fotoliza N,N-dietylo α -ketoamidów 1 z grupami opuszczającymi LG = CH₃CO₂⁻, PhCH₂CO₂⁻, w pozycji α do grupy ketonowej, powoduje skuteczne rozszczepienie i uwolnienie kwasów karboksylowych z zasadniczo ilościową wydajnością w środowisku wodnym.

Tetrahedron Letters 46 (2005) 1045–1048

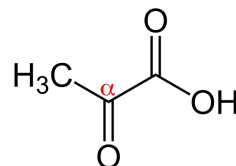
Ketokwasy karboksylowe: rodzaj oksokwasów karboksylowych, zawierających jednocześnie grupę karboksylową i ketonową. α -ketokwasy: ketonowa grupa karbonylowa jest bezpośrednio przyłączona do atomu węgla grupy karboksylowej, np. kwas pirogronowy

keton

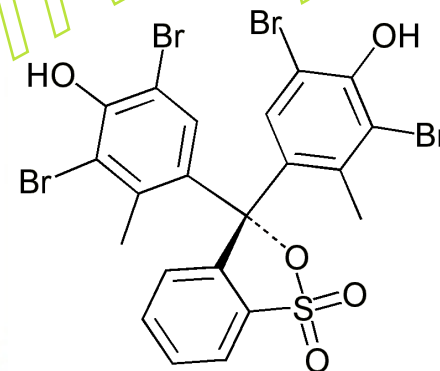
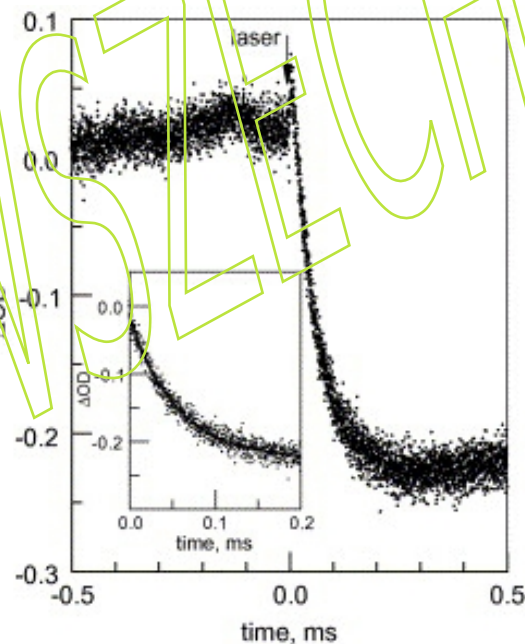
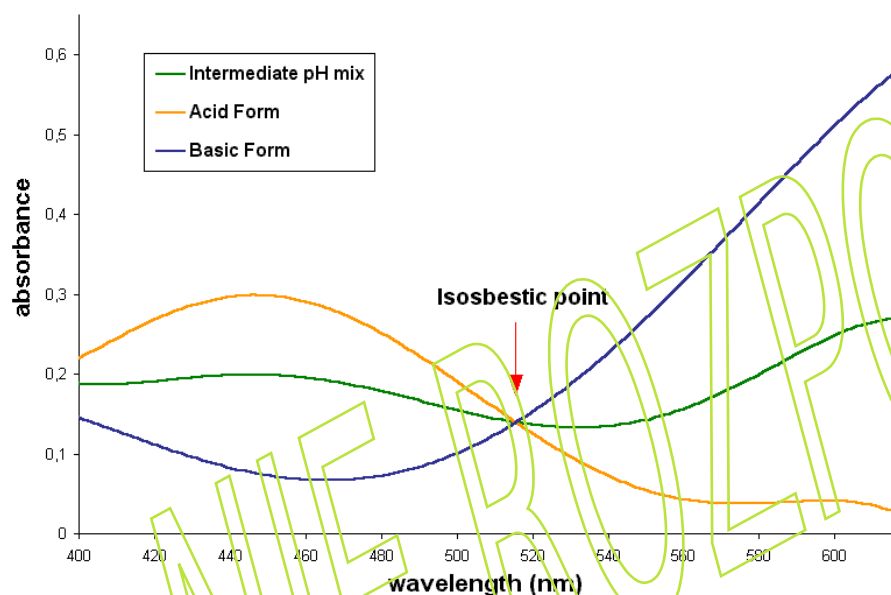


α -ketokwas

kwas pirogronowy



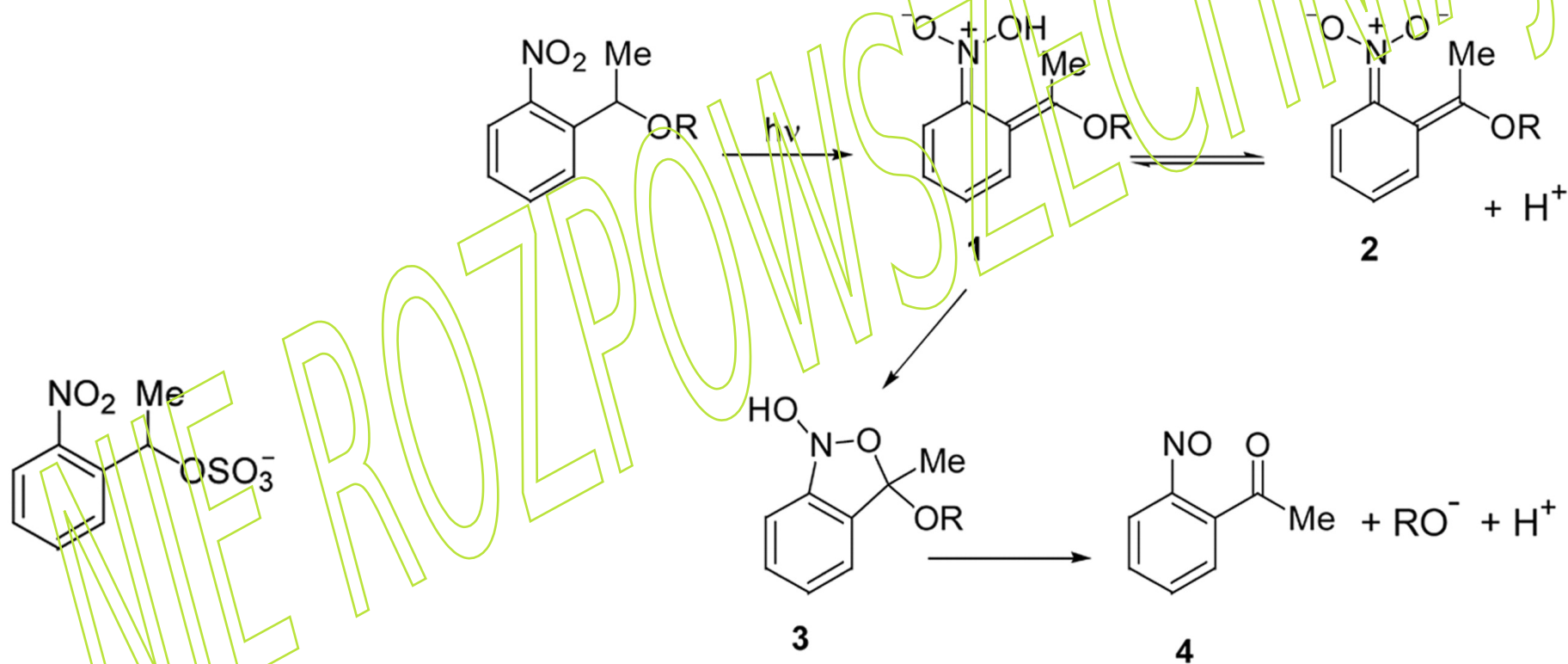
Zastosowano metodę czasowo-rozdzielczego skoku pH z wykorzystaniem laserowej fotolizy błyskowej, która wykorzystuje wyraźny wzrost kwasowości obserwowany podczas fotolizy pochodnych karboksylanowych α -ketoamidów w niebuforowanym środowisku wodnym. Skoki pH są na tyle duże, że trwale zmieniają kolor dodanego wskaźnika pH, zieleni bromokrezolowej (pK_a 4,90, 20 °C). Podano stałe szybkości wybielania pasma 620 nm tego barwnika, co pozwala autorom ustalić mechanizm utraty karboksylanowych grup opuszczających.



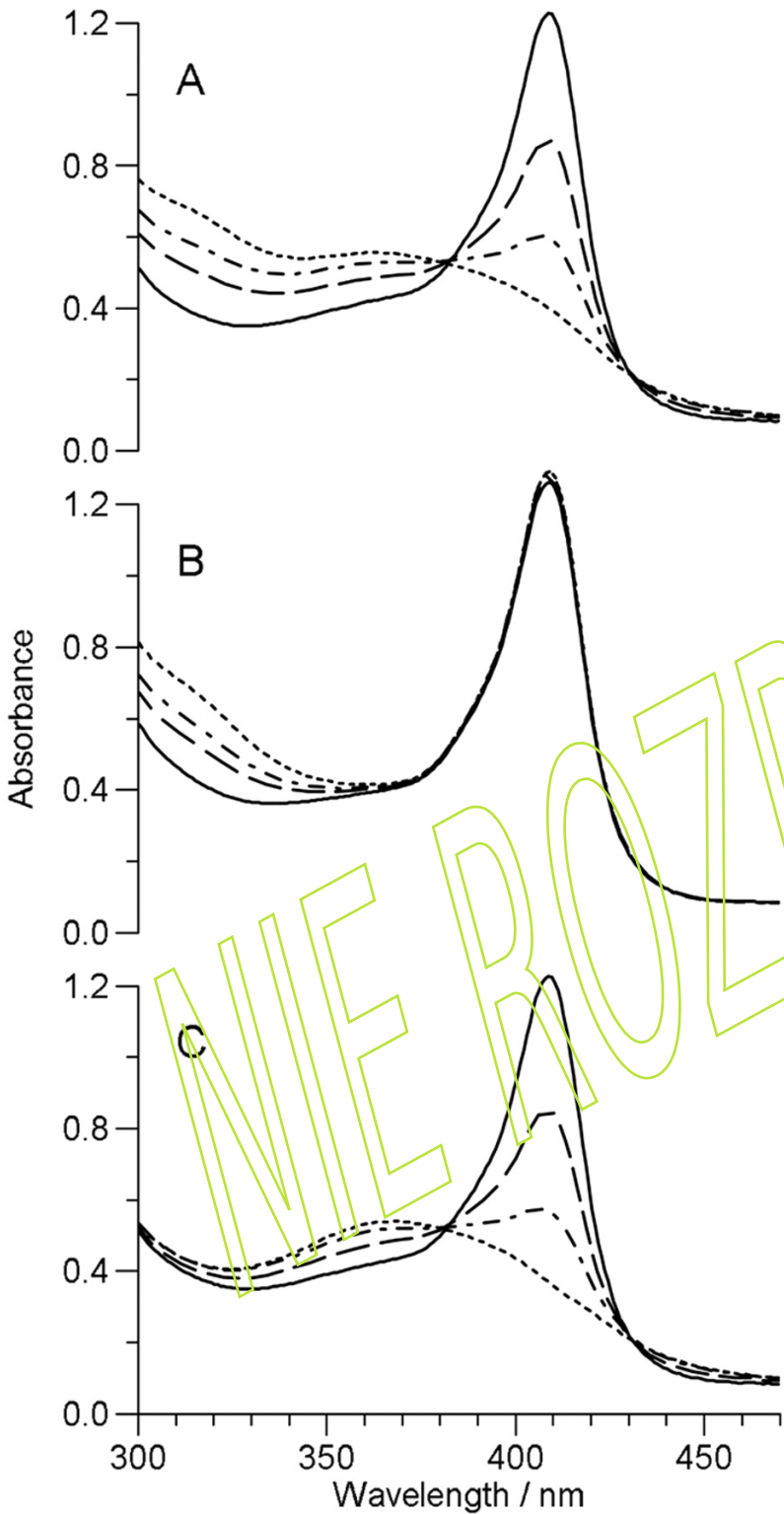
bromocresol green

Środek: Kinetyka zmniejszania się absorpcji przy 620 nm 20 μ M roztworu zieleni bromokrezolowej w obecności 0.1 M N,N-dietylo α -ketoamidu z $LG=PhCH_2CO_2^-$, pod impulsie 355 nm lasera Nd-YAG powodującego uwolnienie LG i zakwaszenie roztworu (zsumowane 15 strzałów lasera, kuweta przepływowa). Wstawka pokazuje fit monoeksponecjalny do zaniku absorpcji ($k=18 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$). Widoczny pik w "chwili zero" pochodzi od fotoluminescencji kuwety wywołanej impulsem lasera. Strona Lewa: widma absorpcji UV zieleni bromokrezolowej dla różnych wartości pH.

Nowy klatkowany proton, siarczan 1-(2-nitrofenylo)etylu (siarczan w klatce), może indukować duże skoki pH i protonować grupy o niskich wartościach pK (nawet 2.2). Przydatność tego nowego klatkowanego związku do badań biologicznych wykazano poprzez jego zdolność do kierowania indukowaną kwasem zmianą konformacyjną metmioglobiny. To przejście od konformacji natywnej do postaci częściowo rozwiniętej zachodzi w pobliżu pH 4 i było monitorowane za pomocą spektroskopii absorpcyjnej bliskiego UV.



Ogólny mechanizm reakcji fotolizy klatkowanych związków 1-(2-nitro-fenylo)etylowych. Dla klatkowanego siarczanu, -OR = OSO₃⁻.



Widma w zakresie UV-Vis (409nm=pasmo Soret'a) częściowego rozwinięcia struktury mioglobiny (Mb), indukowanego przez fotolizę klatkowanego siarczanu:

- , widmo przed pierwszą fotolizą;
- - -, widmo po jednej fotolizie;
- · —, widmo po dwóch fotolizach;
- · - ·, widmo po pięciu fotolizach.

(A) "Surowe" widma miareczkowania otrzymane z niebuforowanym roztworem Mb;
(B) Widma kontrolne otrzymane w 50 mM octanie sodu, pH 4,6, brak zmian w Mb, jedynie uwolnienie nitrobenzylu;
(C) Skorygowane widma miareczkowania, po odjęciu zmiany absorbancji klatkowanego siarczanu.

Warunki dla wszystkich eksperymentów były następujące: początkowe pH 4,6, 0,11 mM Mb, i 2,5 mM klatkowanego siarczanu.

Warz z kolejnymi błyskami światła, pasmo Soreta zmniejsza się, a absorbancja rośnie poniżej 380 nm (A). Ta druga zmiana pochodzi od kombinacji przesunięcia pasma Soreta w stronę mniejszych długości fali i zmian w widmie klatkowanego siarczanu po fotolizie. Aby rozdzielić te wkłady, pomiary wykonano na kontrolnej próbce buforowanej do pH 4,6 przez octan sodu. Kontrolne widma w (B) pokazują minimalne zmiany w pasmie Soreta pod wpływem kolejnych oświetleń próbki co demonstruje, że zablokowanie zmian pH pozwala zachować mioglobinie jej formę natywną. Ale widma kontrolne wykazują zmiany poniżej 370 nm, które pochodzą wyłącznie od fotolizy klatkowanego siarczanu. Te zmiany absorbancji zostały odjęte od "surowych" widm miareczkowania. Skorygowane widma miareczkowania pokazuje (C).