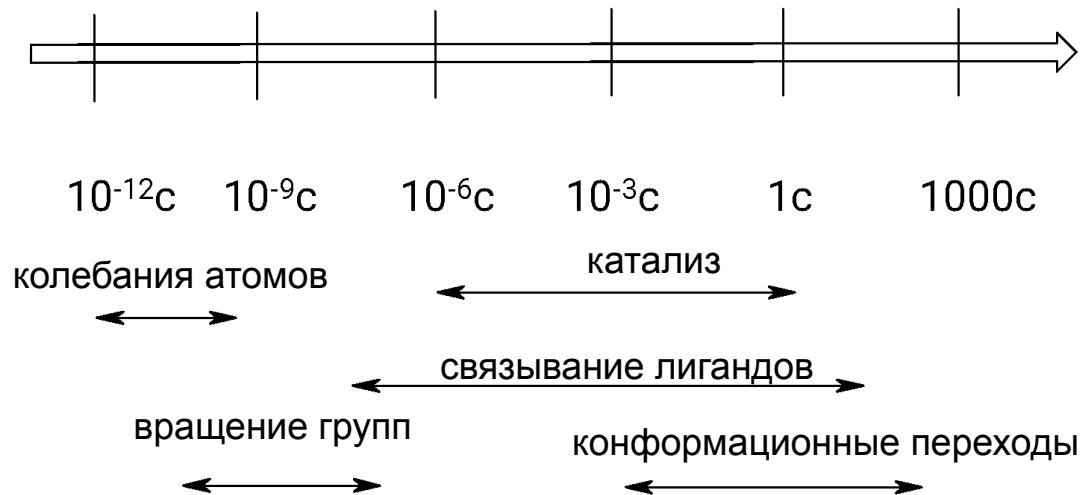


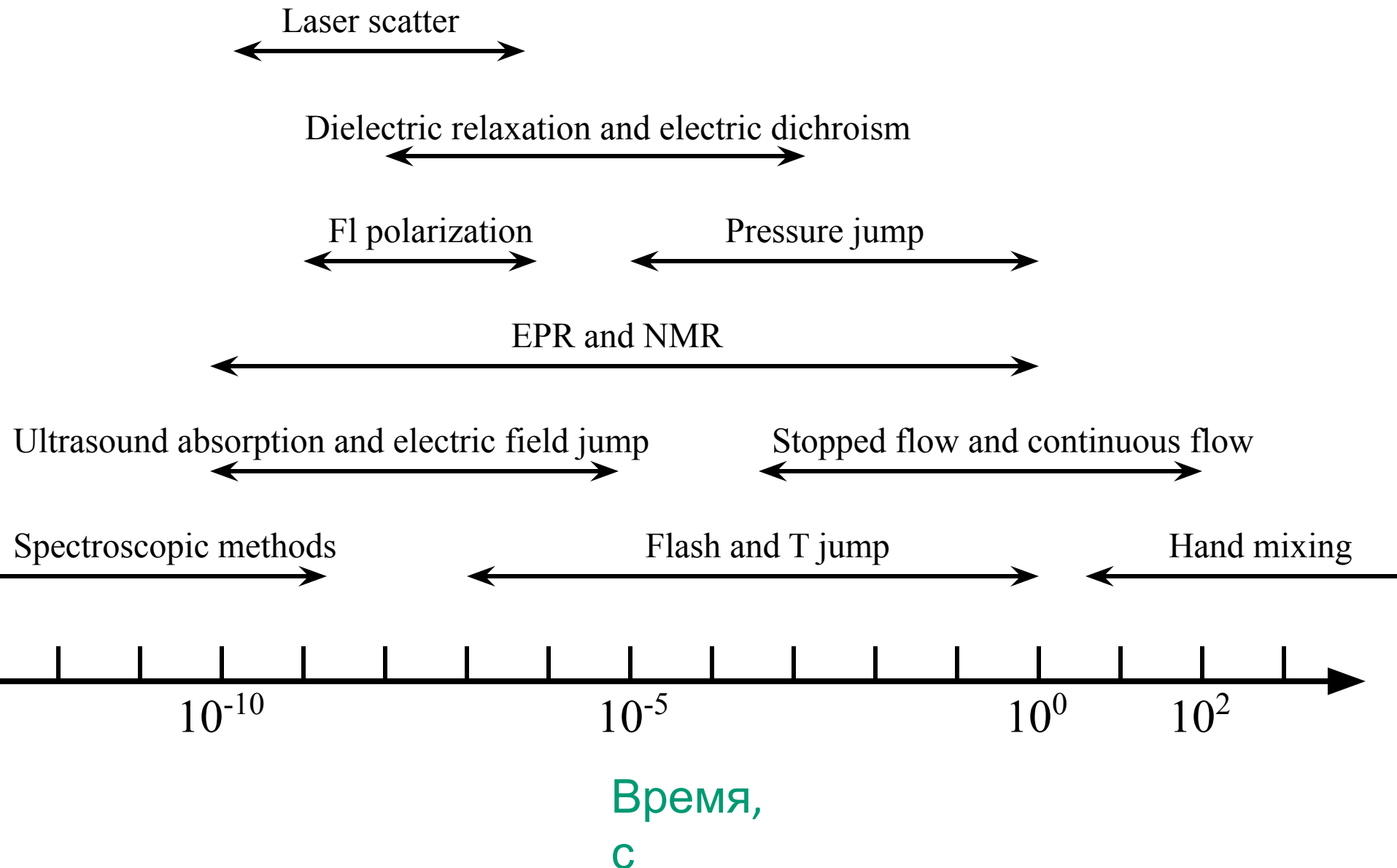
Системы регистрации взаимодействия биомолекул в реальном времени

25 сентября 2014

Временная шкала динамических событий в ферментах и фермент-субстратных комплексах



Временные возможности методов исследования



**Исходные
компоненты**

**Скорость?
Механизм?
Переходн
ые
состояния
?**

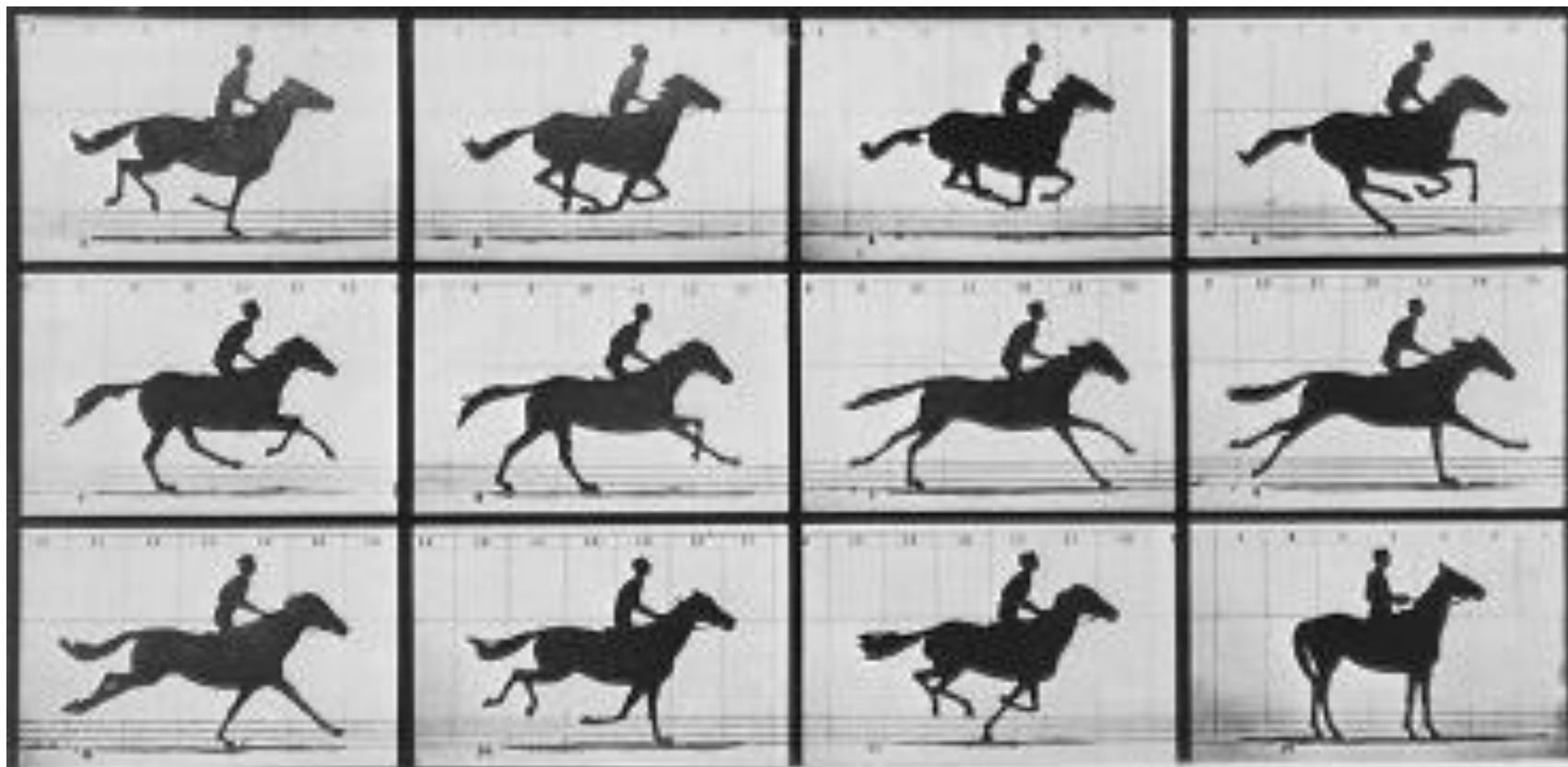
**Продукты
реакции**

Изучение исходных компонентов, продуктов, их соотношений не даёт информации ни о механизме, ни о скорости реакции, ни о промежуточных соединениях

В 1872 году бывший губернатор Калифорнии Леланд Стэнфорд (Leland Stanford), бизнесмен и владелец скаковых лошадей, сделал ставку в споре: все ли четыре копыта лошади отрываются от земли во время галопа .

Спор был решён с помощью «быстрой фотографии»

«Фотографии» химических процессов - методы быстрой регистрации



Copyright 1878, by MUYBRIDGE.

©1878 E. S. Easton, Art Photographer, No. 250, FIFTH AVENUE.

THE HORSE IN MOTION.

By EADWEARD MUYBRIDGE.

"FALLIE GARDNER" owned by LELAND STANFORD; receiving a 140 gal. oval tin Pilsener Beer, 10th June, 1878.

The negative of this photograph was taken at Stanford's racetrack, San Francisco, California, and is a record of the horse's motion in a gait which is called a "running walk".

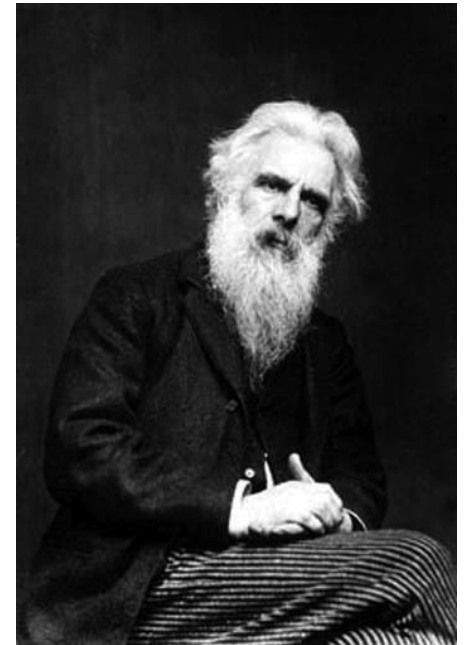
Printed in New York by E. S. Easton, Art Photographer, No. 250, Fifth Avenue.

Copyright, 1878, by E. S. Easton, Art Photographer, No. 250, Fifth Avenue.

Eadweard Muybridge, 1878



Eadweard James Muggeridge
Edward J. Muybridge (Helios)
9 April 1830 – 8 May 1904

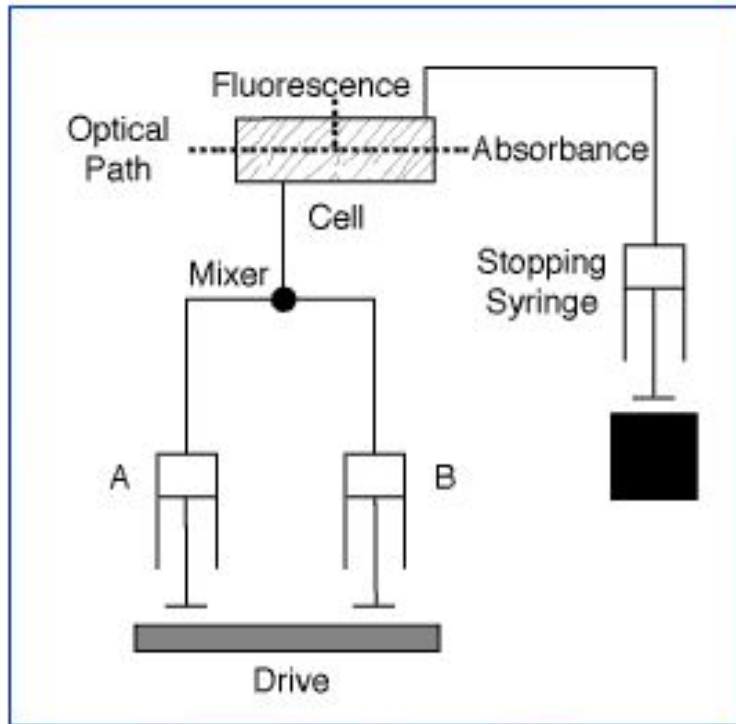


Методы регистрации неравновесной кинетики в применении для физико-химической биологии

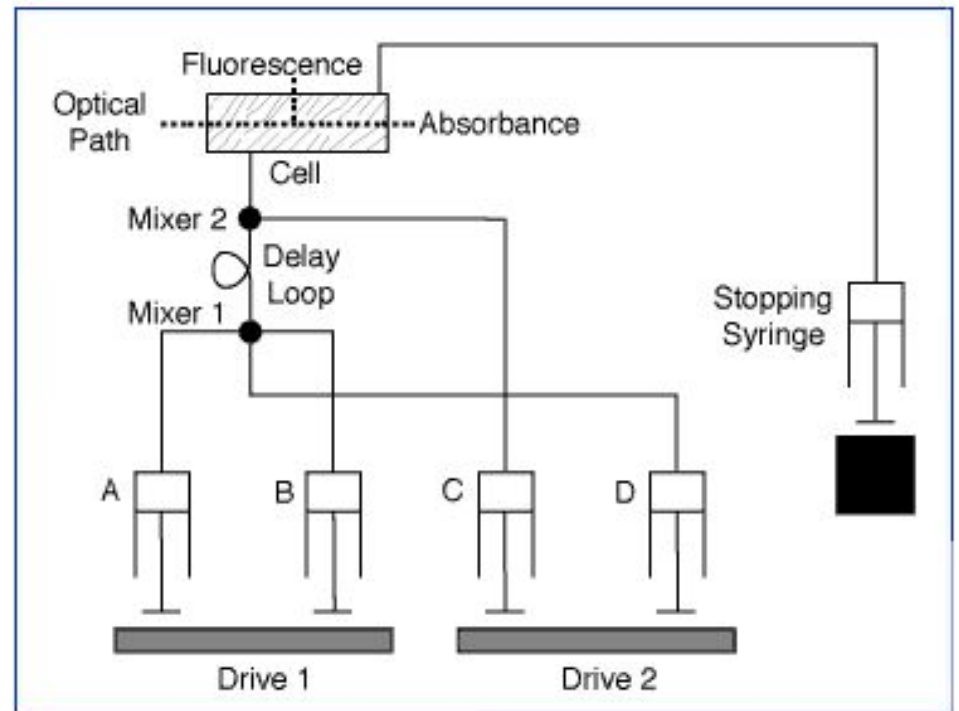
- 1. Stopped-Flow technique**
- 2. Continuous flow method**
- 3. Quench-Flow technique**
- 4. Fast freeze quench**
- 5. Temperature Jump**
- 6. Pressure jump**
- 7. Laser Flash Photolysis**

Метод «остановленной струи»

Mechanical mixing-spectroscopic observation

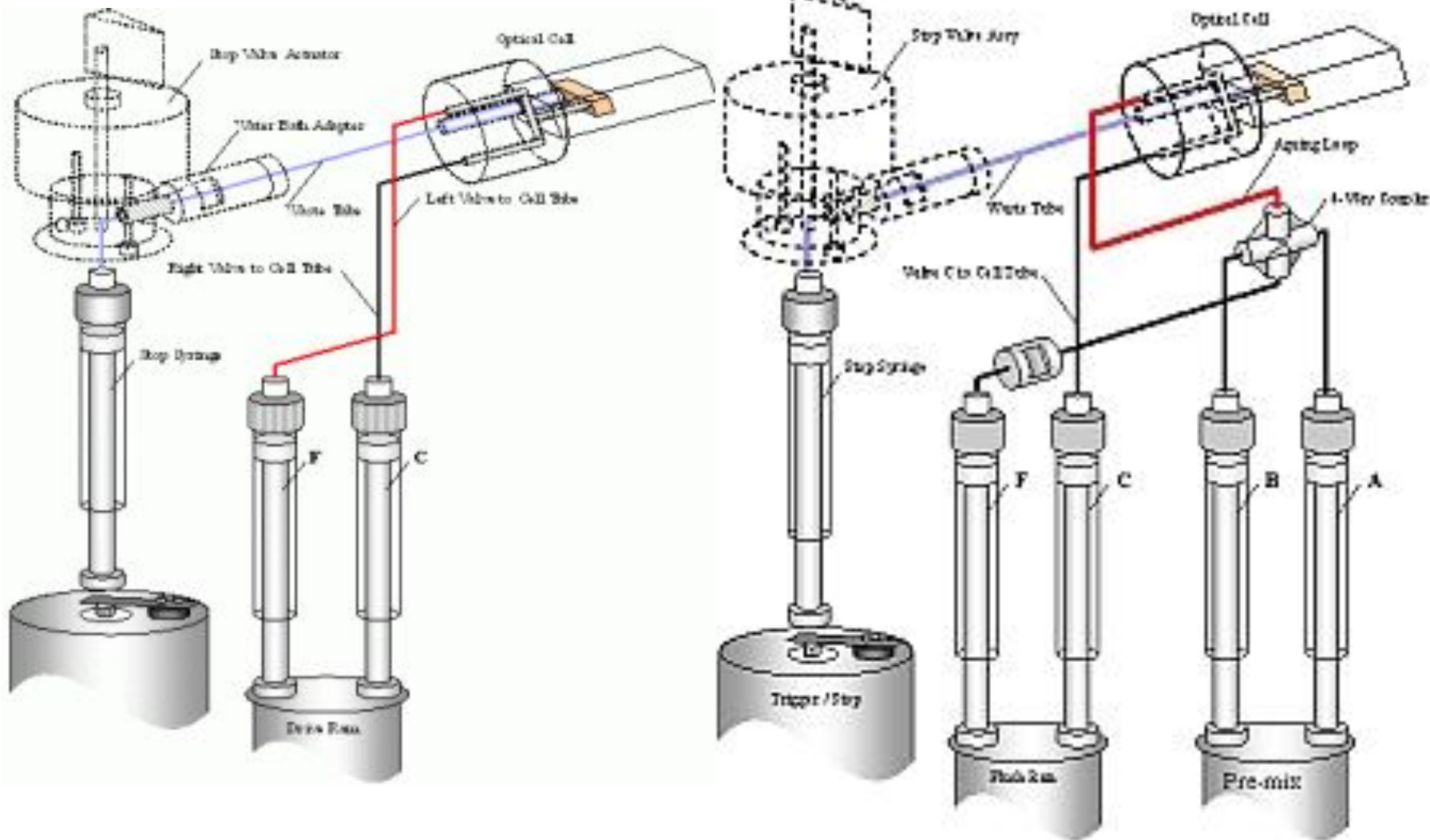


Single Mixing Stopped-Flow



Double Mixing Stopped-Flow

Usual deadtime ~ 1 ms; time resolution is less than 1 ms



1. Быстрое смешивание компонентов
2. Спектрофотометрическая

Первая аппаратура для stopped-flow

Chance B. The accelerated flow method for rapid reactions. Journal of the Franklin Institute. 1940. V. 229. P. 613-640. (University of Pennsylvania)



5.5 metre class

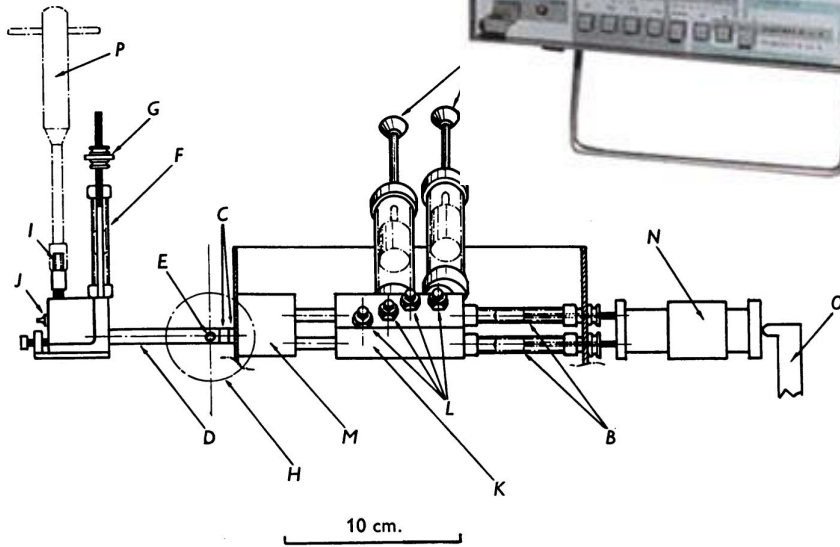
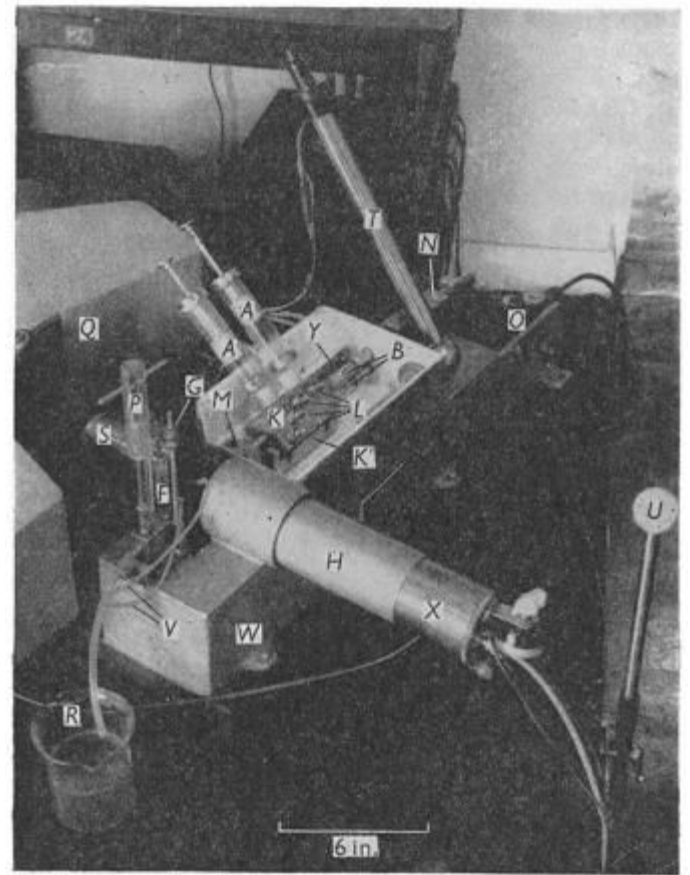
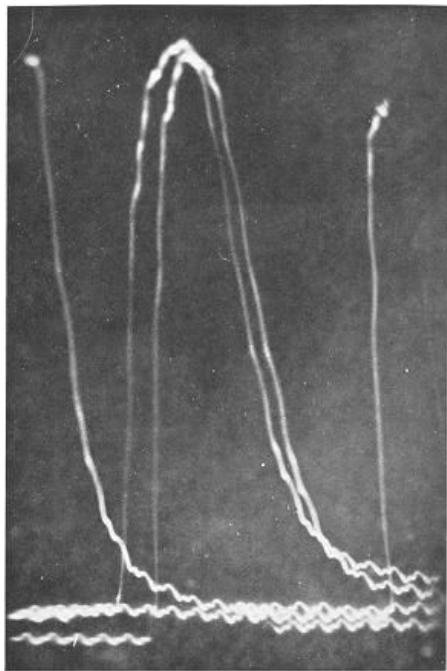


Britton Chance

(July 24, 1913 – November 16, 2010)



Britton Chance and his "magic machine" for studying stop-flow kinetics, 1947

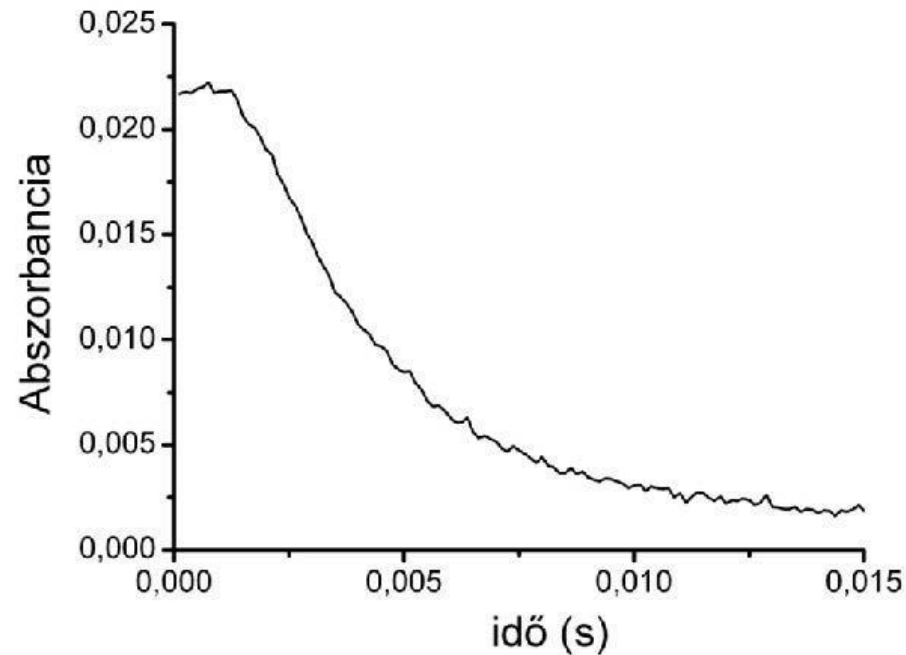


Q. H. Gibson and L. Milnes. Apparatus for rapid and sensitive spectrophotometry. *Biochem. J.* (1964) **91** (161–170) (University of Sheffield)

Мертвое время прибора (Dead time)

Время, которое проходит между смешиванием компонентов и началом регистрации сигнала.

Обычно: 0,5 – 1,3 мс

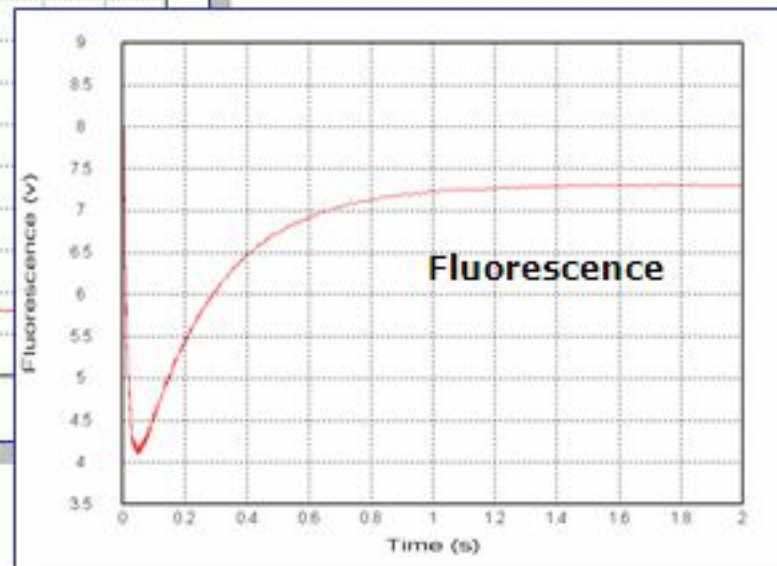
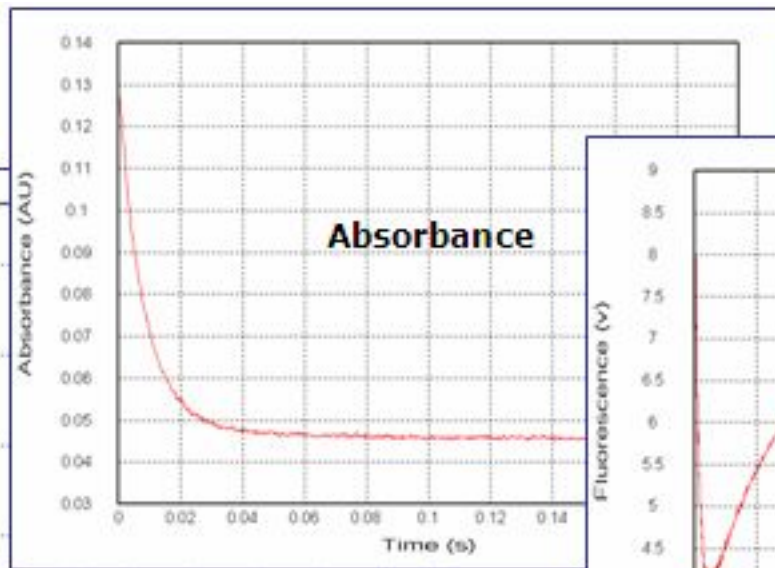
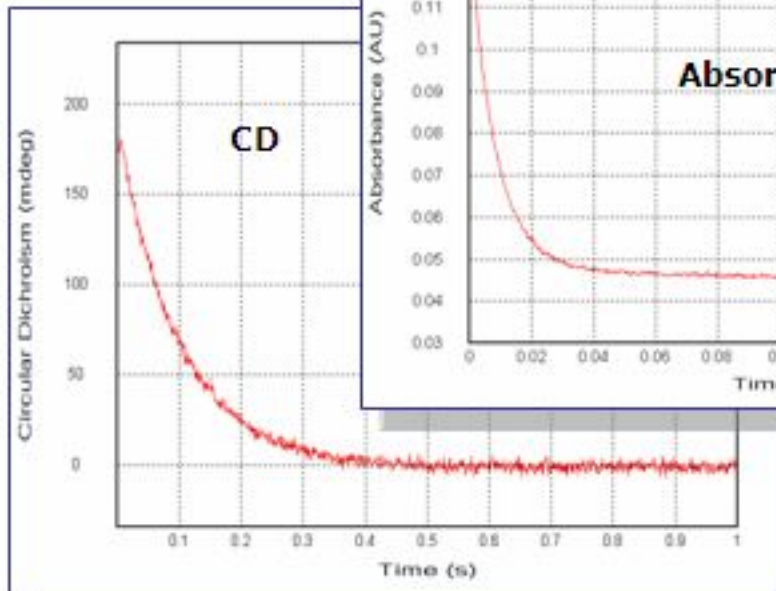
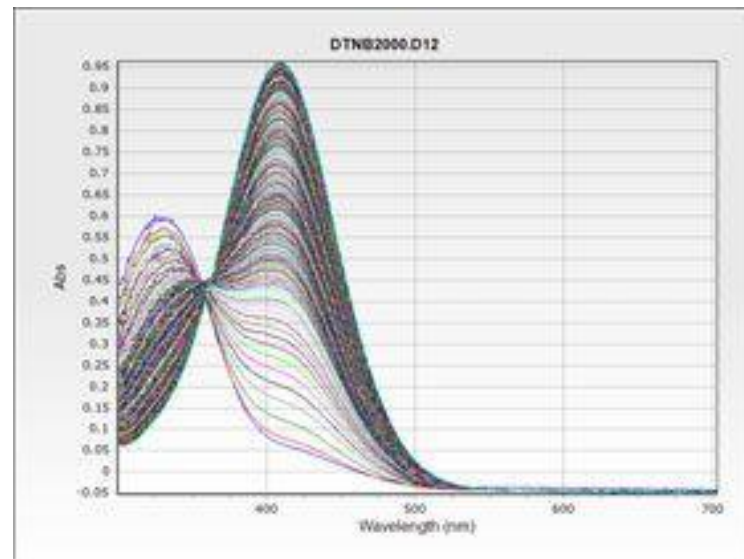
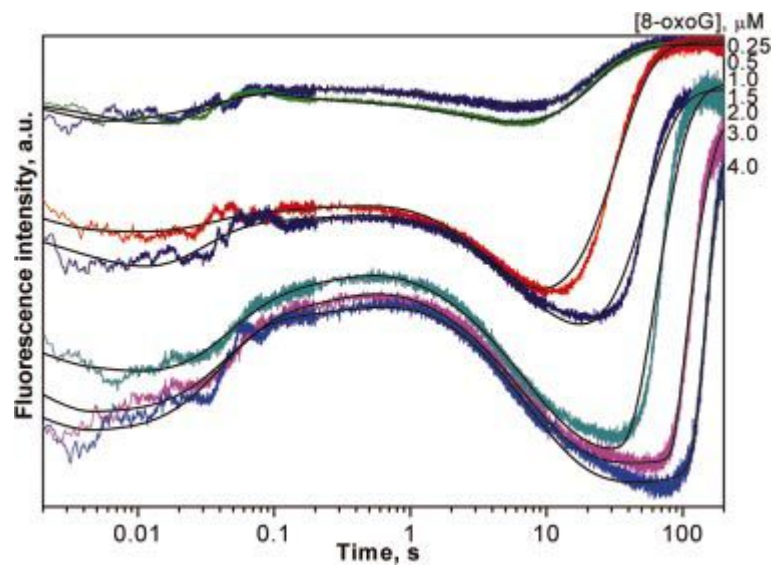


Современное оборудование



Детекторы

1. UV/Vis поглощение
2. PDA – весь спектр за один скан
3. Изменение флуоресценции
(флуорофоры белков/введённые флуорофоры в субстратах/введённые флуорофоры в белках)
4. Изменение оптического спектра
5. Изменения поляризации флуоресценции
6. Изменения в спектрах КД
7. Stopped-flow ЯМР



Stopped-flow ЯMP

NMR is the most information-rich type of spectroscopy

Hand-mixing of reagents –useful to get data points within tens of seconds

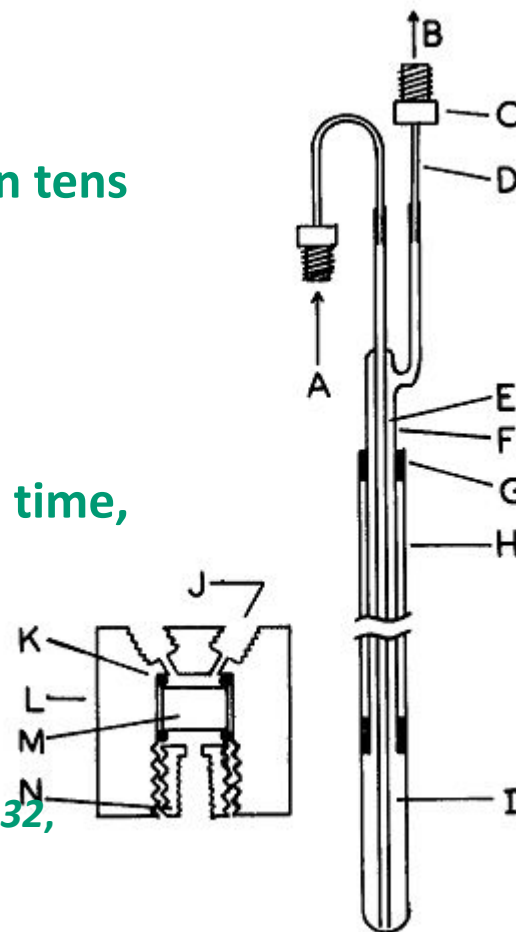
Stopped flow is useful to get data points within 2-10 s

Main delay in this technique is the spin-lattice relaxation time, T_1

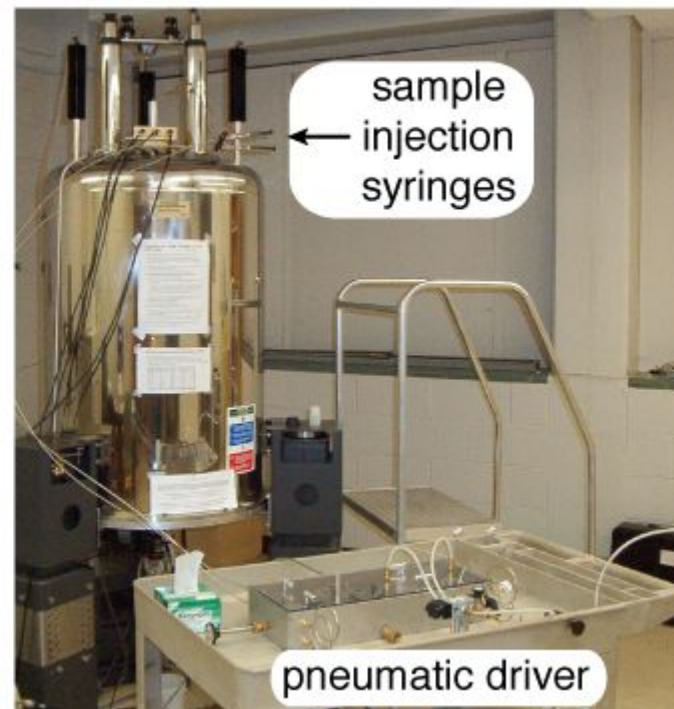
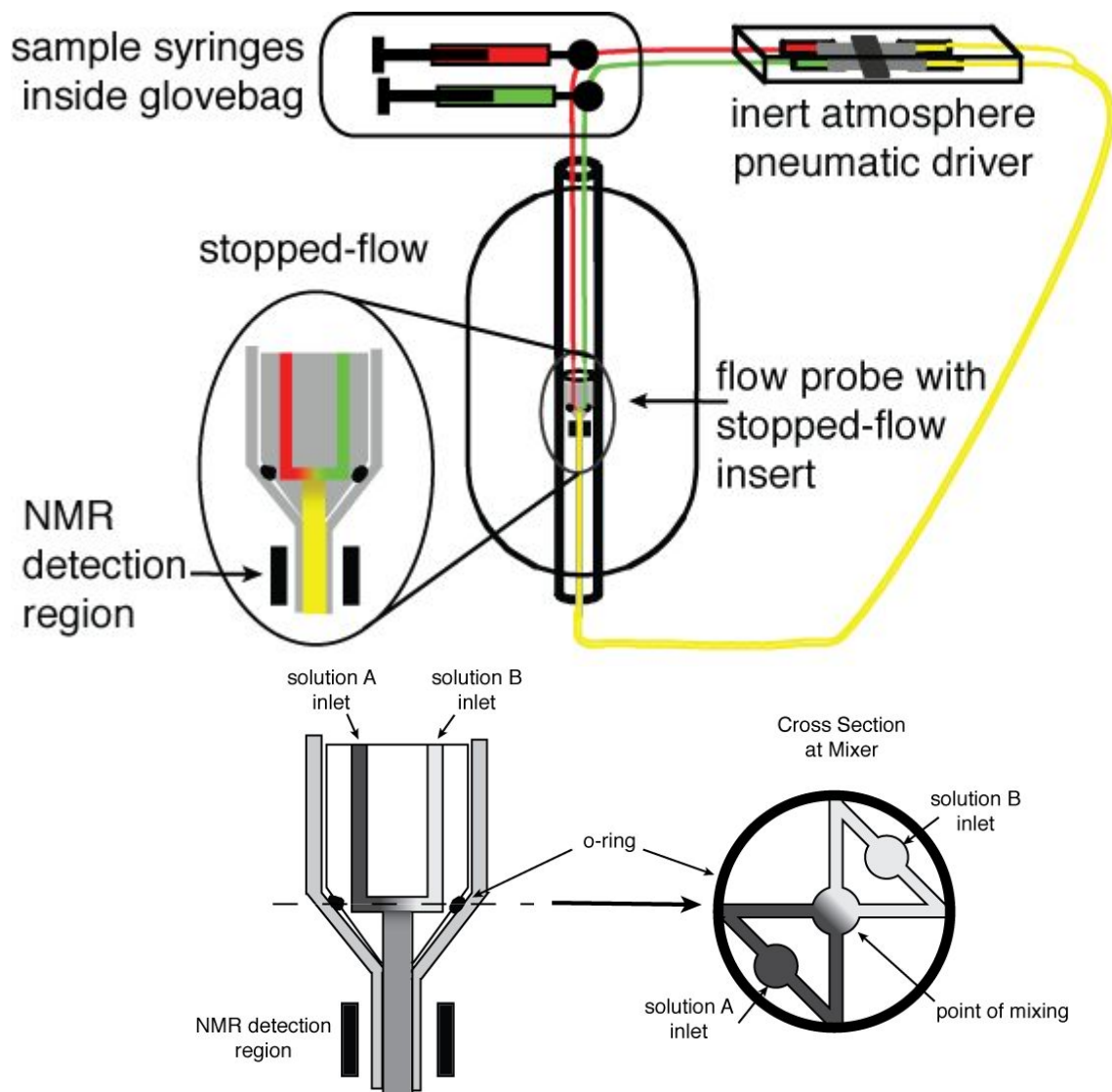
Apparatus not commercially available yet

Christianson, M. D.; Tan, E. H. P.; Landis, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* 2010, 132, 11461.

Green, D. B.; Lane, J.; Wing, R. *Appl. Spectrosc.* 1987, 41, 847.



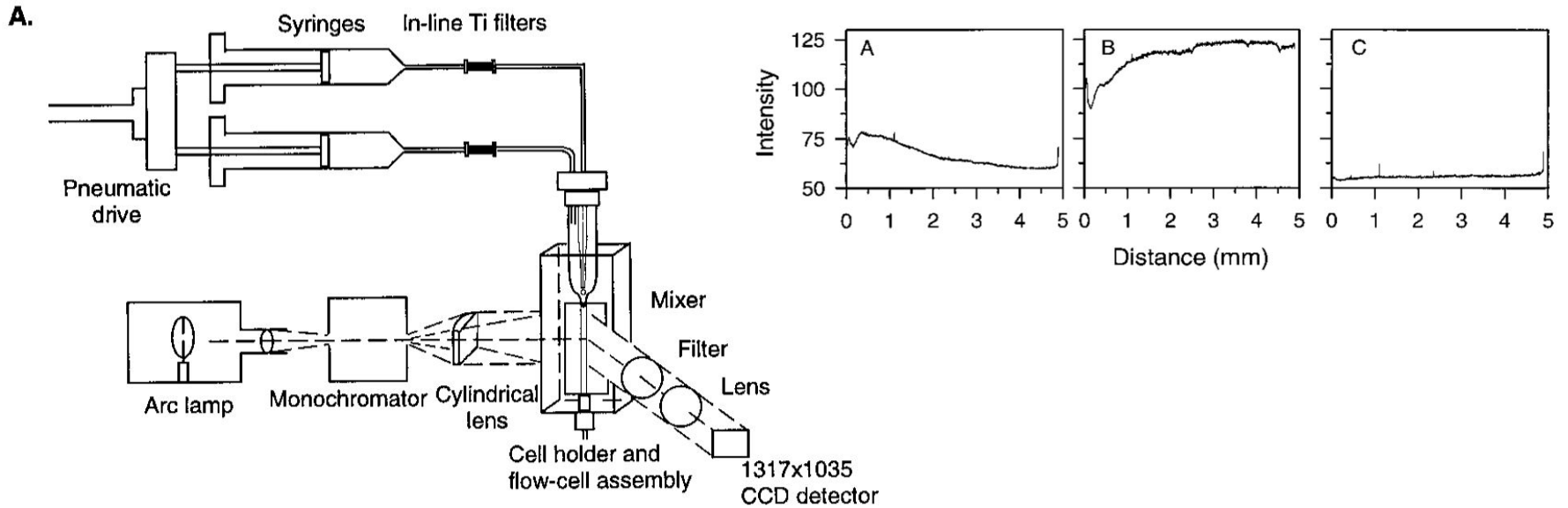
Stopped-flow RMP



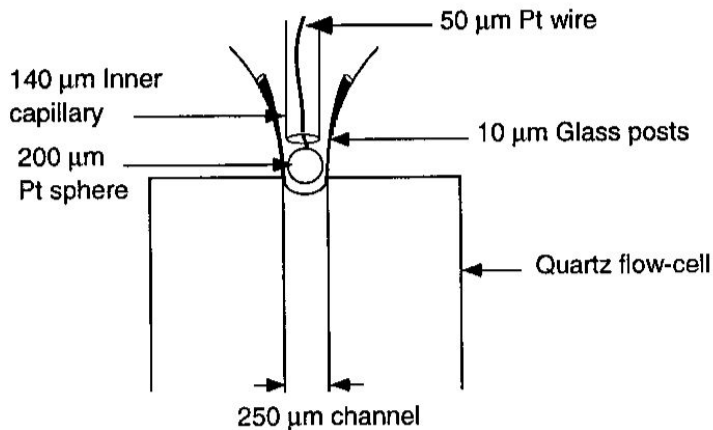
Christianson, M. D.; Tan, E. H. P.; Landis, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* 2010, 132, 11461.

Метод непрерывной струи

Continuous flow



B.



M. C. R. Shastry, S. D. Luck, H. Roder.
Biophysical Journal Volume 74 May 1998
2714–2721

Детекторы для Continuous flow

1. UV/Vis поглощение
2. Изменения в ИК-спектрах
3. Изменение оптического спектра
4. Изменения в спектрах КД
5. ЯМР и ЭПР-спектрометры

Stopped-flow / Continuous flow

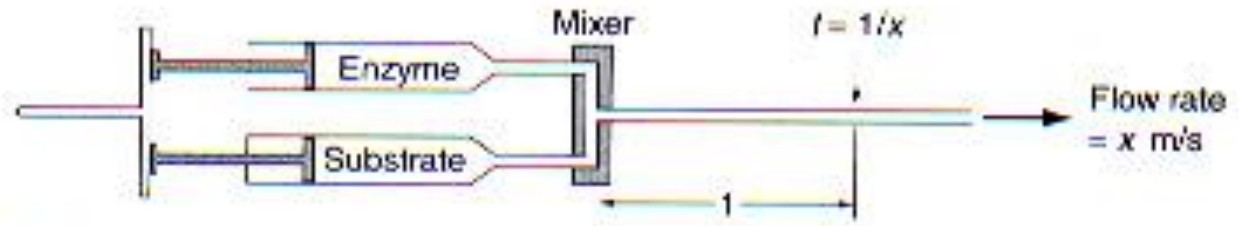
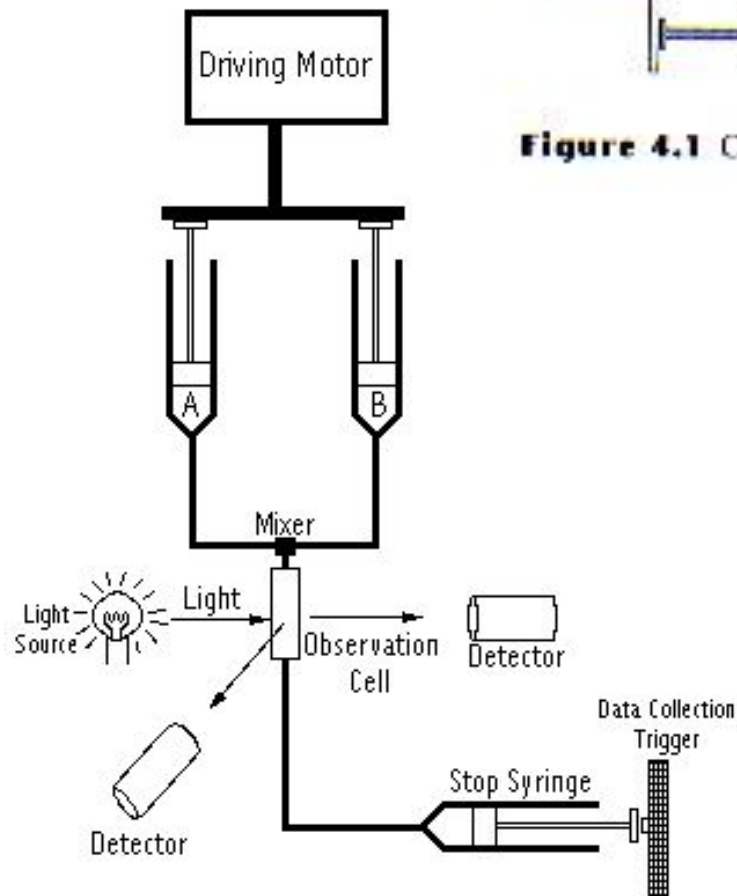


Figure 4.1 Continuous-flow apparatus.



Schematic of a basic Stopped-Flow apparatus

Stopped flow method:

- full kinetic in one experiment
- needs fast detection
- Needs less sample

Continuous flow method:

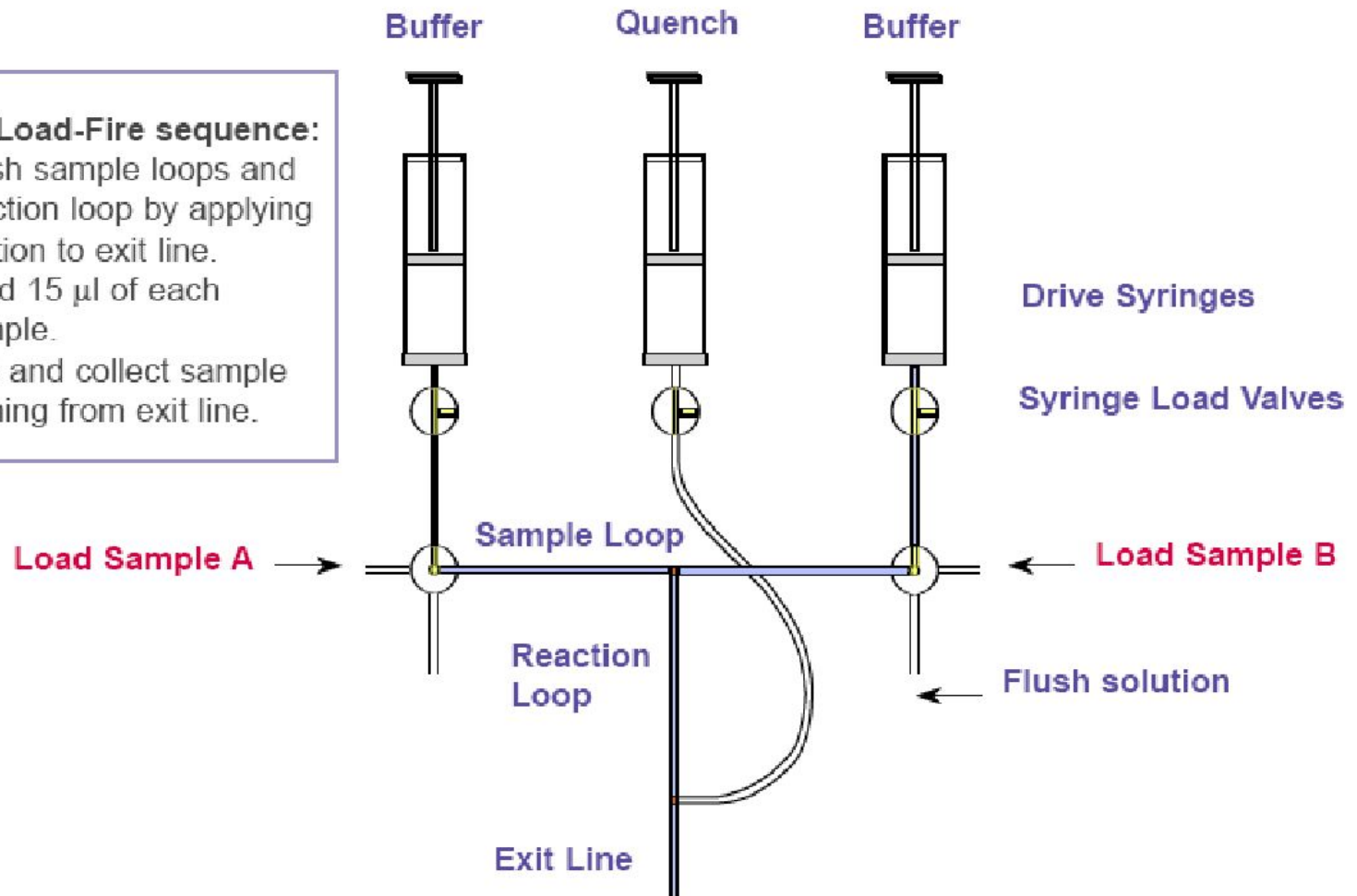
- Full kinetic only with variable flow or movable detector
- Signal can be accumulated
- Needs more sample

Quench-Flow technique

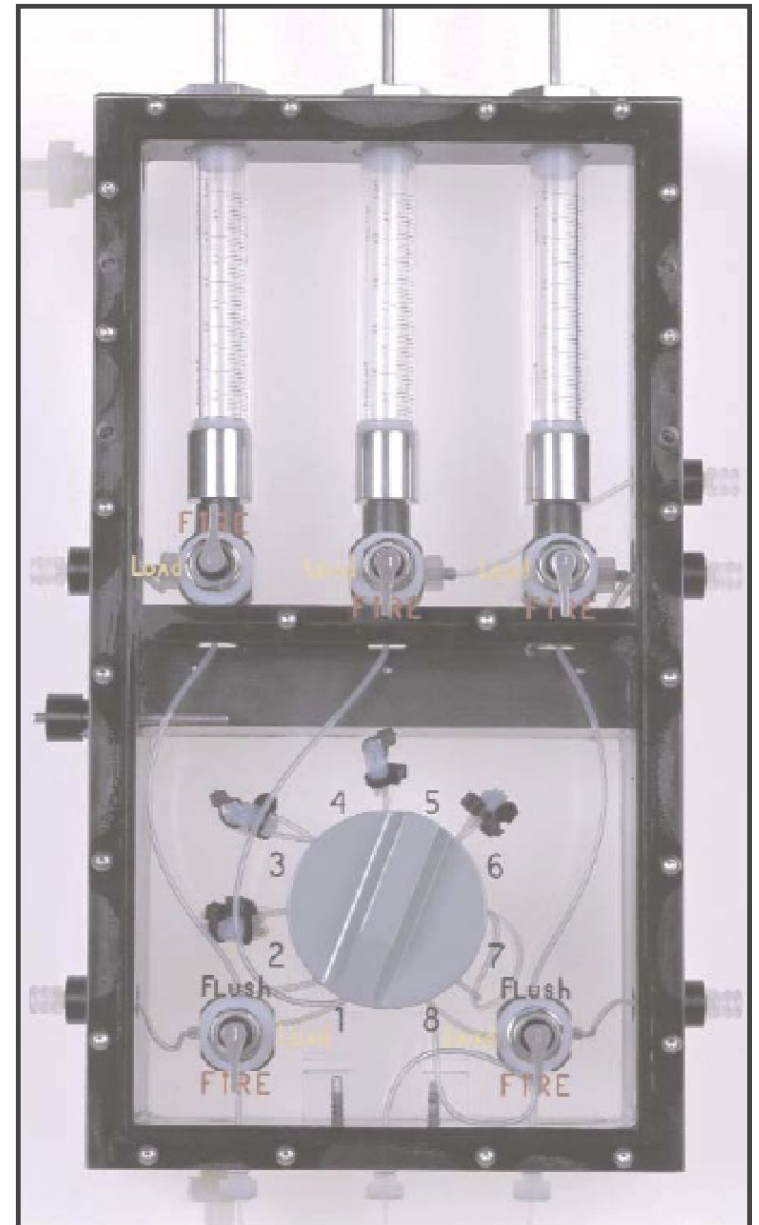
KINTEK QUENCH-FLOW SCHEMATIC DIAGRAM

Flush-Load-Fire sequence:

1. Flush sample loops and reaction loop by applying suction to exit line.
2. Load 15 μl of each sample.
3. Fire and collect sample coming from exit line.



New improved performance!



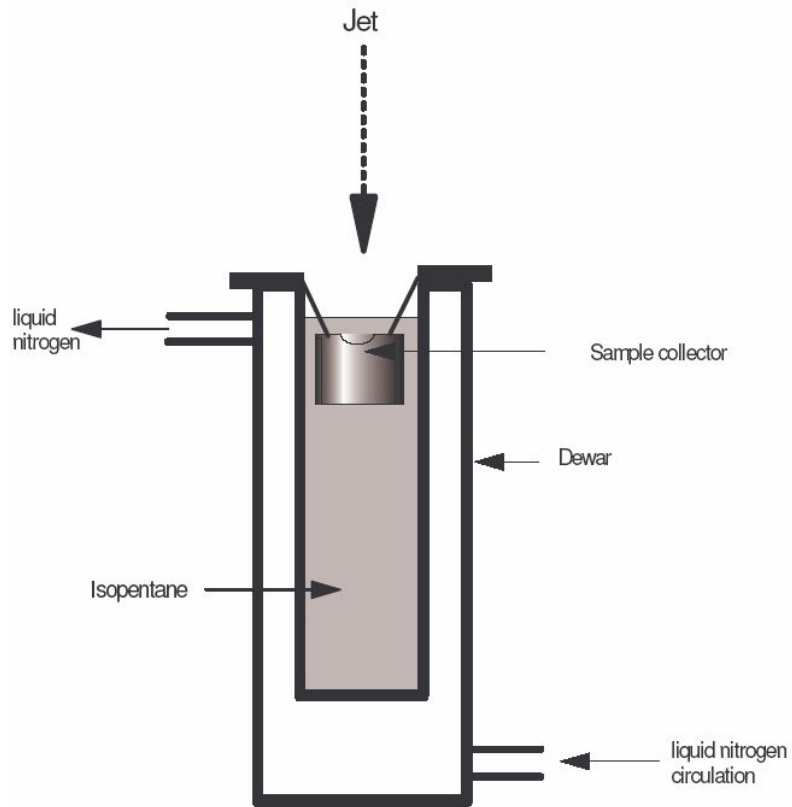
Остановка реакции

1. Хаотропные агенты
2. Детергенты
3. Стоп-аналоги субстратов
4. Щёлочи/кислоты
5. Высокие концентрации немеченых субстратов

Последующий анализ продуктов

1. Жидкостная хроматография + MS
2. Электрофорез
3. РСА
4. ЯМР/ЭПР

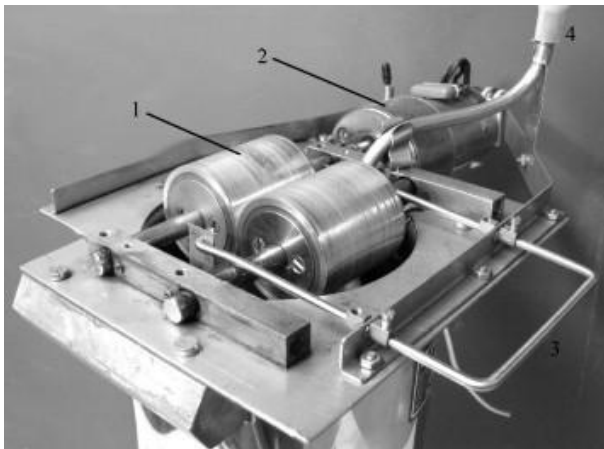
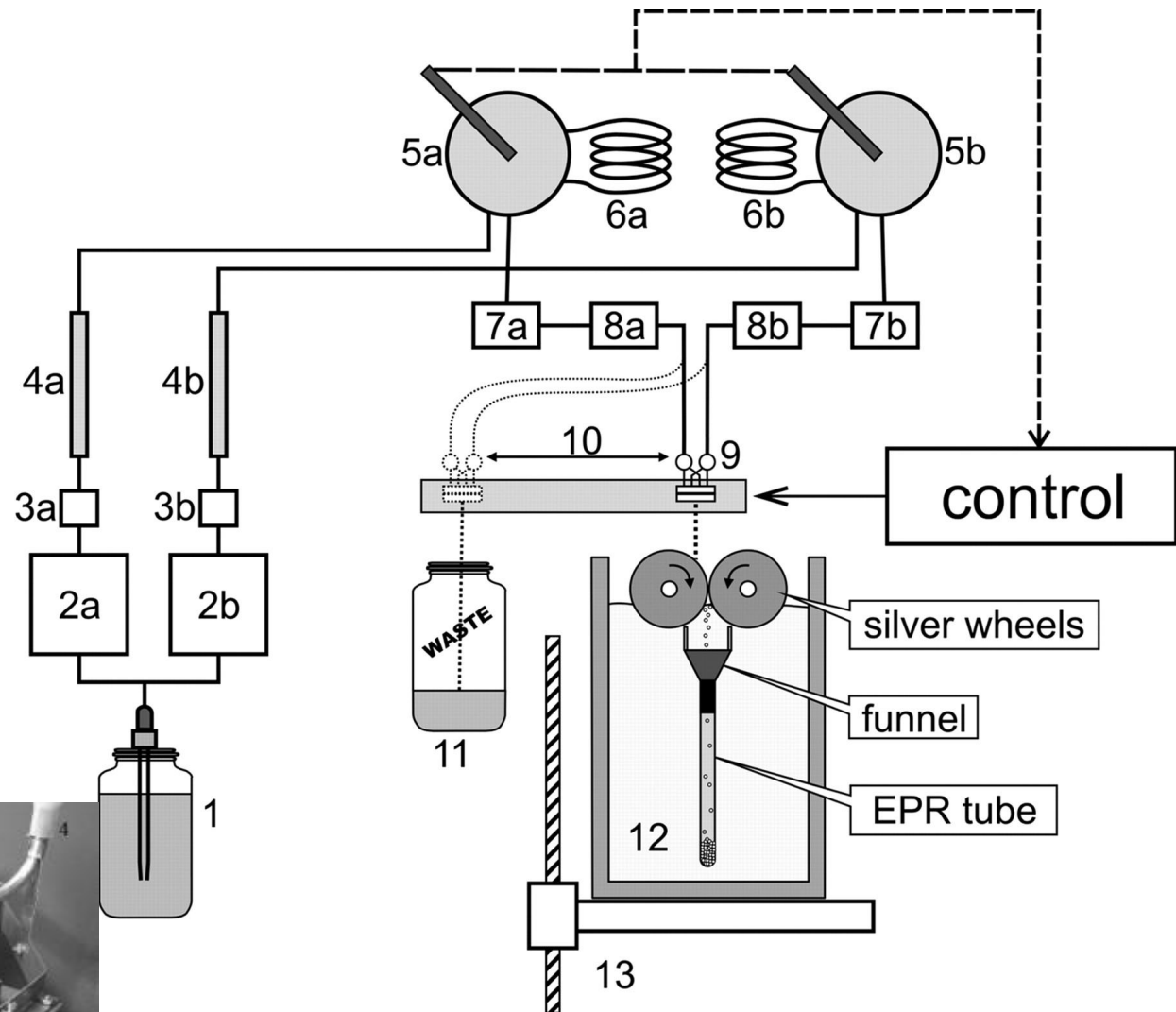
Fast freeze quench



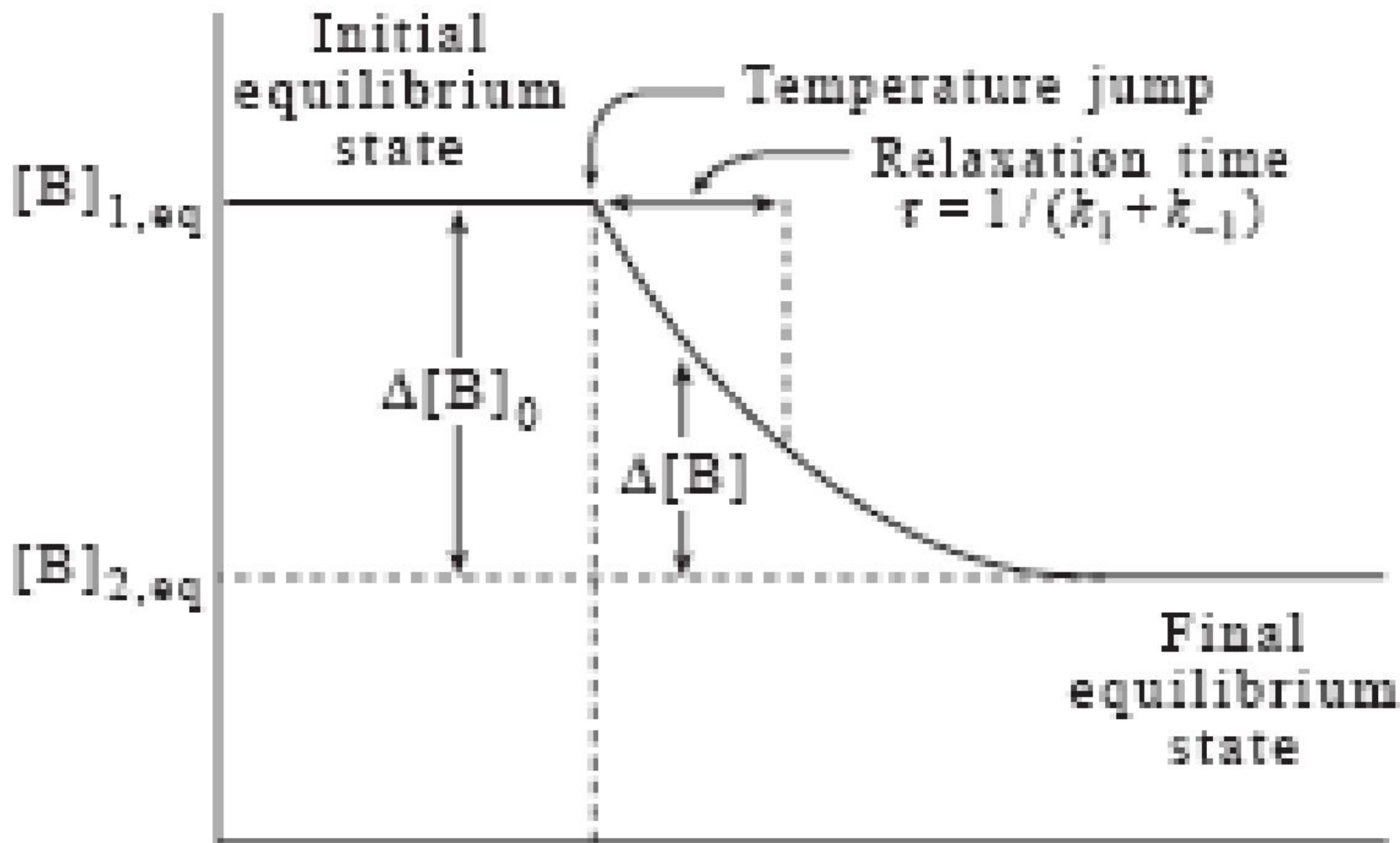
Анализ промежуточных продуктов после Fast freeze quench

1. ЯМР и ЭПР-спектроскопия
2. UV-Vis-, ИК- спектроскопия в «стёклах»
3. XAFS

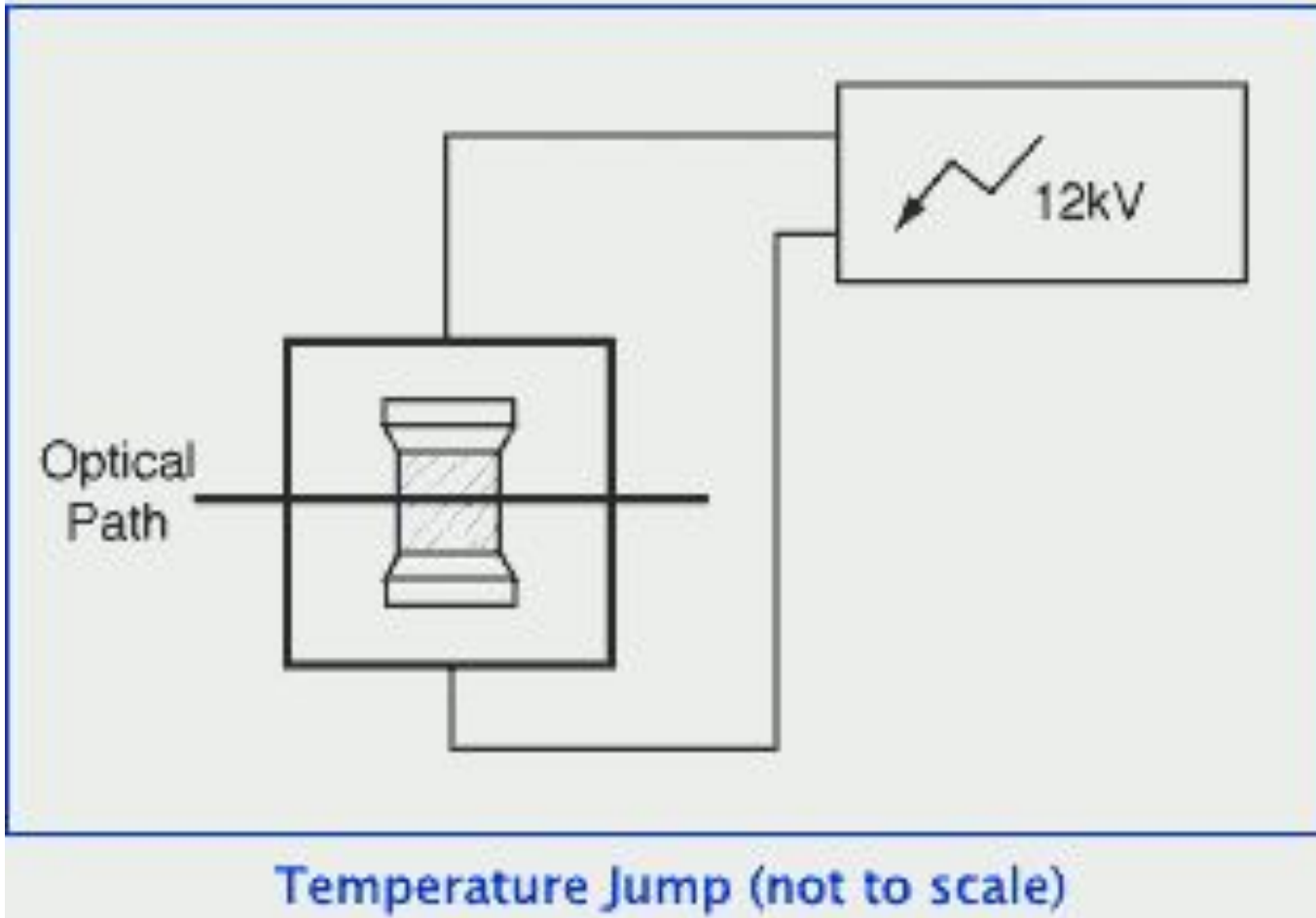
Схема оборудования для freeze-quench



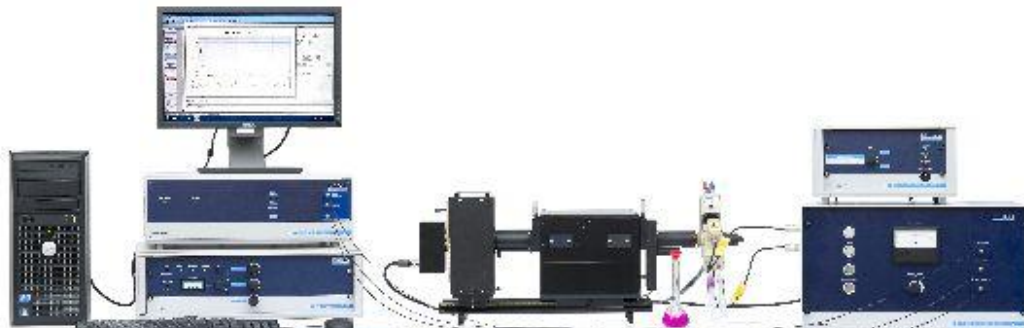
Релаксационные методы



Temperature-Jump (Релаксационные методы)



Аппаратура для Temperature-Jump





Метод T-Jump позволяет регистрировать ход быстрых реакций со временем полупревращения порядка нескольких микросекунд. Реакционную смесь поддерживают в равновесии при определенной температуре, а затем вводят возмущение быстрым изменением температуры.

Нагрев обусловлен прохождением через буфер короткого импульса электрического разряда при высоком напряжении, способного индуцировать повышение температуры до 10°C за несколько микросекунд.

Ход реакции регистрируют спектрофотометрически по UV / VIS (поглощение и флуоресценция) с помощью

Temperature Dependence of Reaction Rates

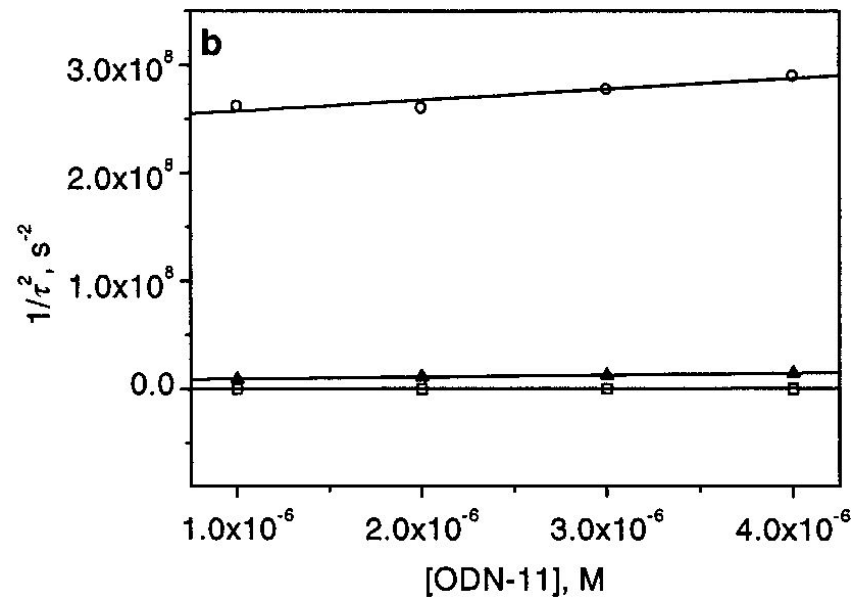
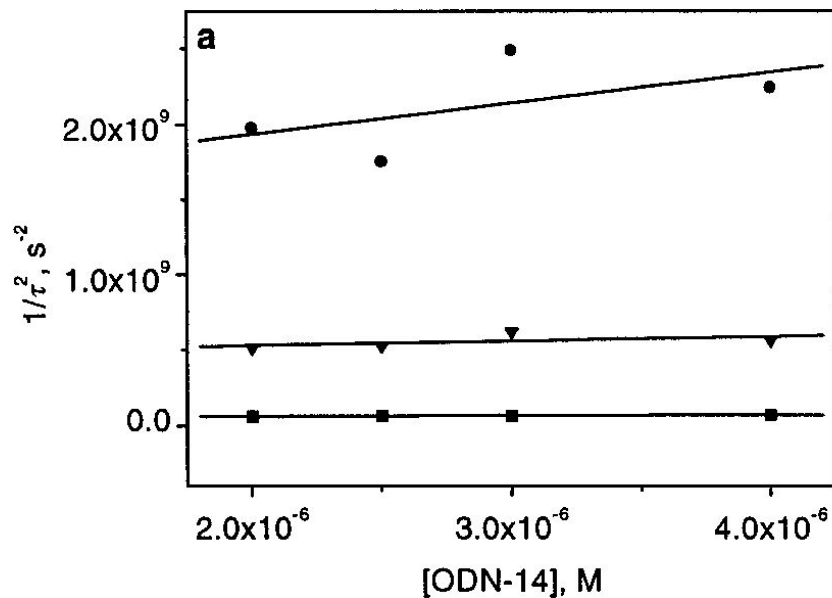
Svante Arrhenius observed that reaction rate constants had a temperature dependence that could be expressed by the Arrhenius equation:

$$k = A e^{-E_a / (R T)}$$

Here A is the pre-exponential factor or frequency factor and is related to frequency with which the reacting species collide. Since:

$$\ln k = \ln A - E_a / (R T)$$

plots of the natural logarithm of rate constant versus the inverse of the Kelvin temperature are expected to be linear



Square of reciprocal relaxation time, s^{-2} , vs oligonucleotide concentrations for (a) (p14) ζ (ODN-14) at $49.7 \pm C$ (j), $52.7 \pm C$ (.), and $54.7 \pm C$ (2) and for (b) (p14) ζ (ODN-11) at $41.7 \pm C$ (u), $46.7 \pm C$ (m), and $51.7 \pm C$ (\pm).

Koval V. et. al. IUBMB *Life*, 48: 317–320, 1999.

Pressure-jump

(Релаксационные методы)

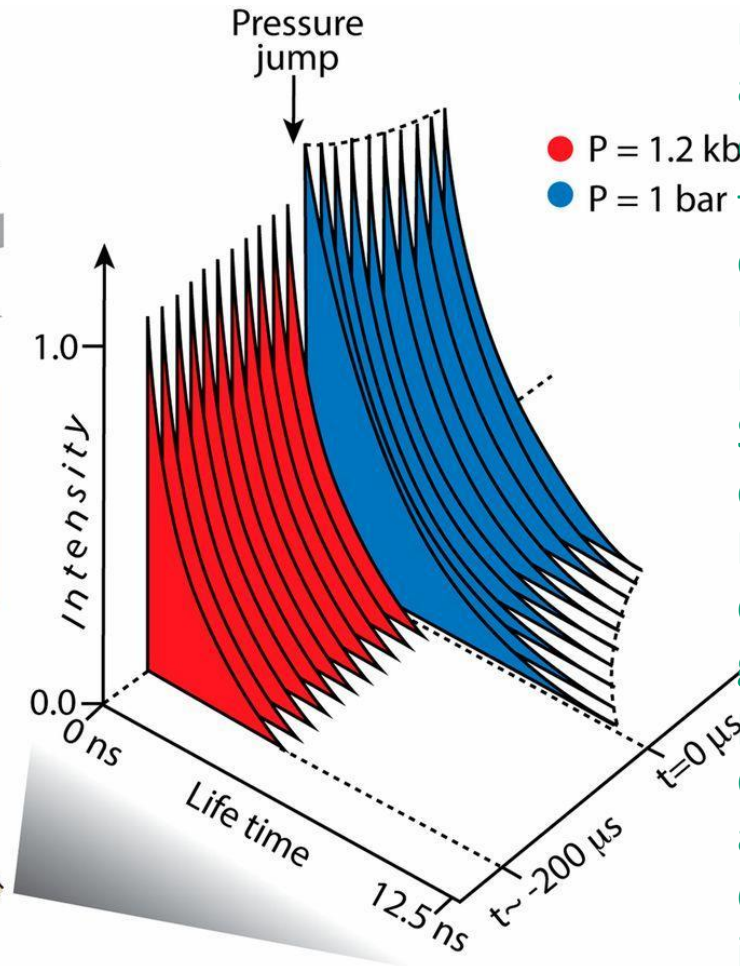
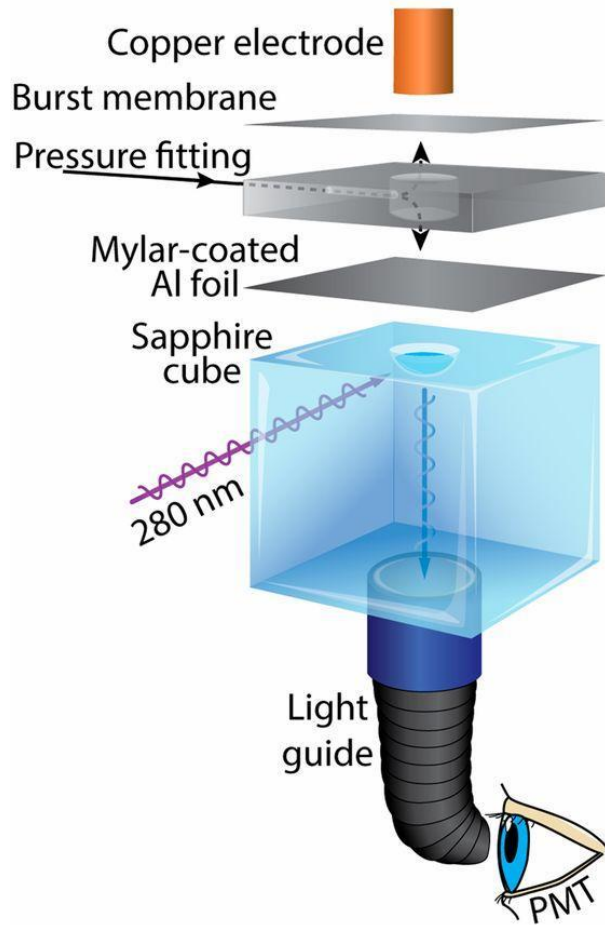
Скачок давления - метод, используемый в исследовании химической кинетики. Она включает в себя быстрое изменение давления экспериментальной системы и наблюдения за возвращением к равновесию. Метод позволяет изучать смещение равновесия реакций, в диапазоне времени между от миллисекунд до нескольких часов .

Детекторы: абсорбционная или флуоресцентная спектроскопия, круговой дихроизм (CD), FTIR и ЯМР.

Чаще всего быстрое падение давления достигается с помощью использования быстрого клапана либо взрыва мембраны.

$$\Delta V^{\circ} = -RT \left(\frac{\partial \ln K}{\partial P} \right)_T$$

Pressure-jump



The sample is pipetted into a dimple in a sapphire cube. The dimple is covered with mylar-coated aluminum foil and pressurized by pumping ethanol into a pressure fitting. A current burst into a copper electrode bursts the upper steel membrane and releases the pressure. Sample fluorescence is excited by a 280-nm pulsed laser every 12.5 ns and is collimated by a UV light guide onto a photomultiplier. The digitized raw data consist of a train of fluorescence decays, whose lifetime and intensity monitor the refolding of the sample after the sudden P-drop at $t = 0$.

Laser Flash Photolysis

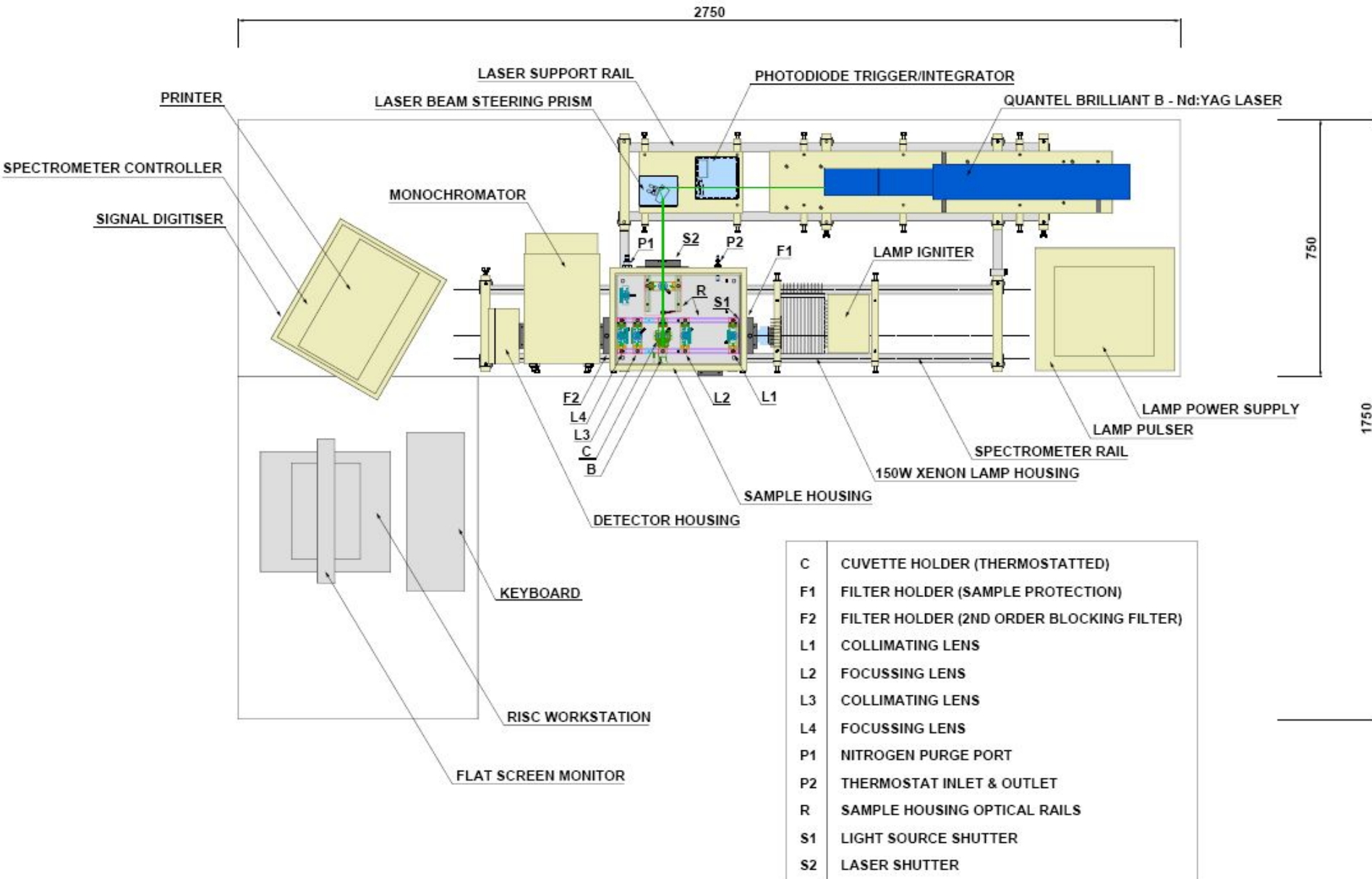


Лазерный импульсный фотолиз является одной из самых эффективных для исследования путем прямых измерений быстропротекающих химических и биологических реакций, например, с участием свободных радикалов, ионов и веществ в возбуждённых состояниях.

Использование лазера в качестве источника возбуждающего излучения позволяет проводить исследования при чётко заданной длине волны с наносекундной развёрткой. Подобный источник излучения гарантирует высокую воспроизводимость результатов и позволяет получать спектры с разрешением по времени в рамках вышеуказанного шага.

Лазерный импульсный фотолиз находит всё более широкое применение в сфере исследования механизмов биоорганических реакций, например, изучение переноса электронов в цитохромах или связывание лигандов гемсодержащими белками. Также данный метод анализа применим для исследования конформационных изменений белков в ходе биохимических взаимодействий.

Принципиальная схема установки



Принцип метода очень прост: короткий импульс (лазера) света используют для воздействия на образец в оптическом отсеке спектрометра. Результатом взаимодействия может быть как мгновенное поглощение, так и эмиссия. Изменения сигнала на детекторе после возбуждения образца лазером может быть результатом различных процессов: переход возбужденных электронов на триплетный уровень, расщепление молекул с образованием радикалов, электронный перенос, молекулярные перестройки и т.д.

Характеристики

Высокая стабильность работы ксенонового источника излучение как в режиме длительной работы, так и в импульсном режиме

Возможность регистрации данных с развёрткой в интервале от наносекунды до секунды

Передискретизация до 64 000 значений из базы данных одного эксперимента

Линейная и логарифмическая временная развёртка

В стандартной конфигурации доступна функция автоматической

