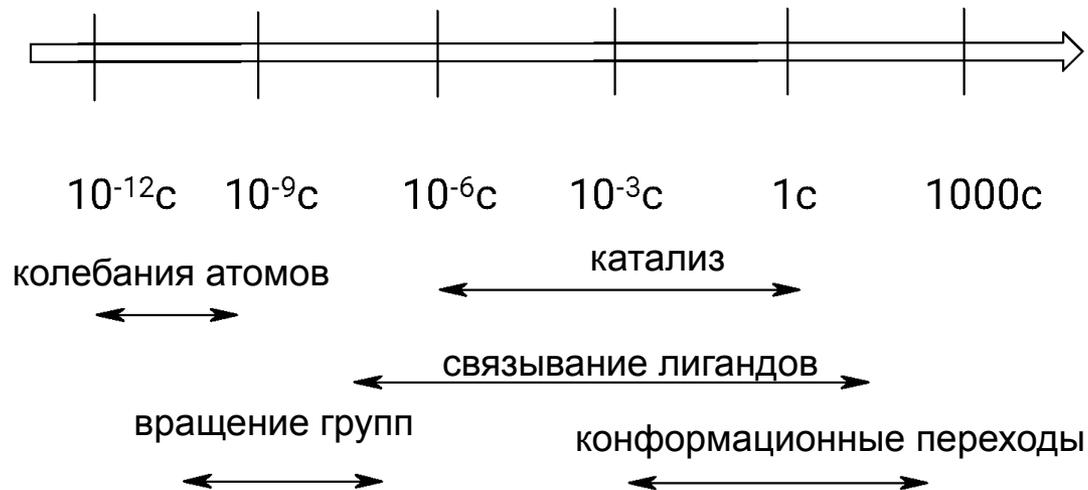


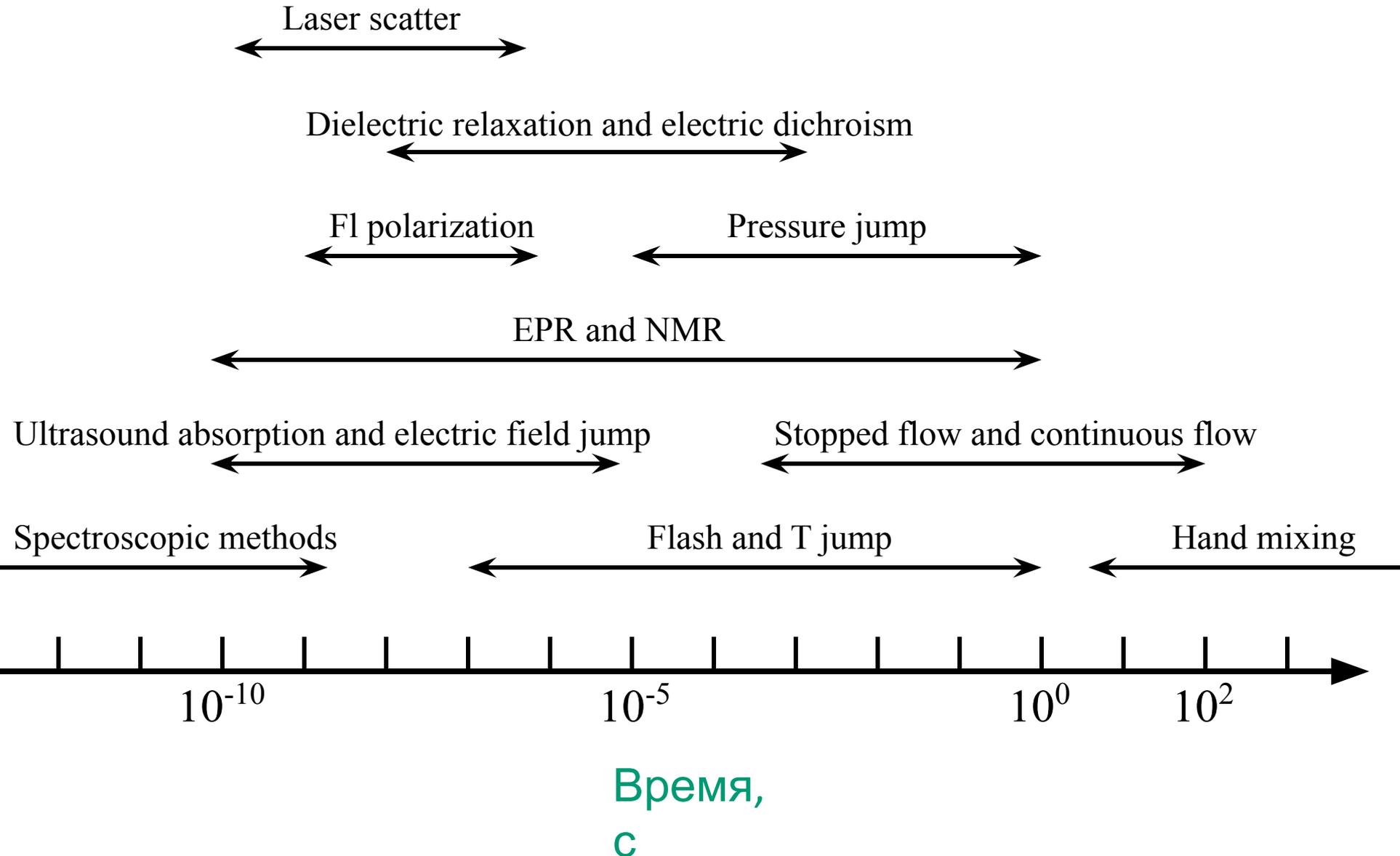
# **Системы регистрации взаимодействия биомолекул в реальном времени**

**25 сентября 2014**

# Временная шкала динамических событий в ферментах и фермент-субстратных комплексах



# Временные возможности методов исследования



**Исходные  
компоненты**

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

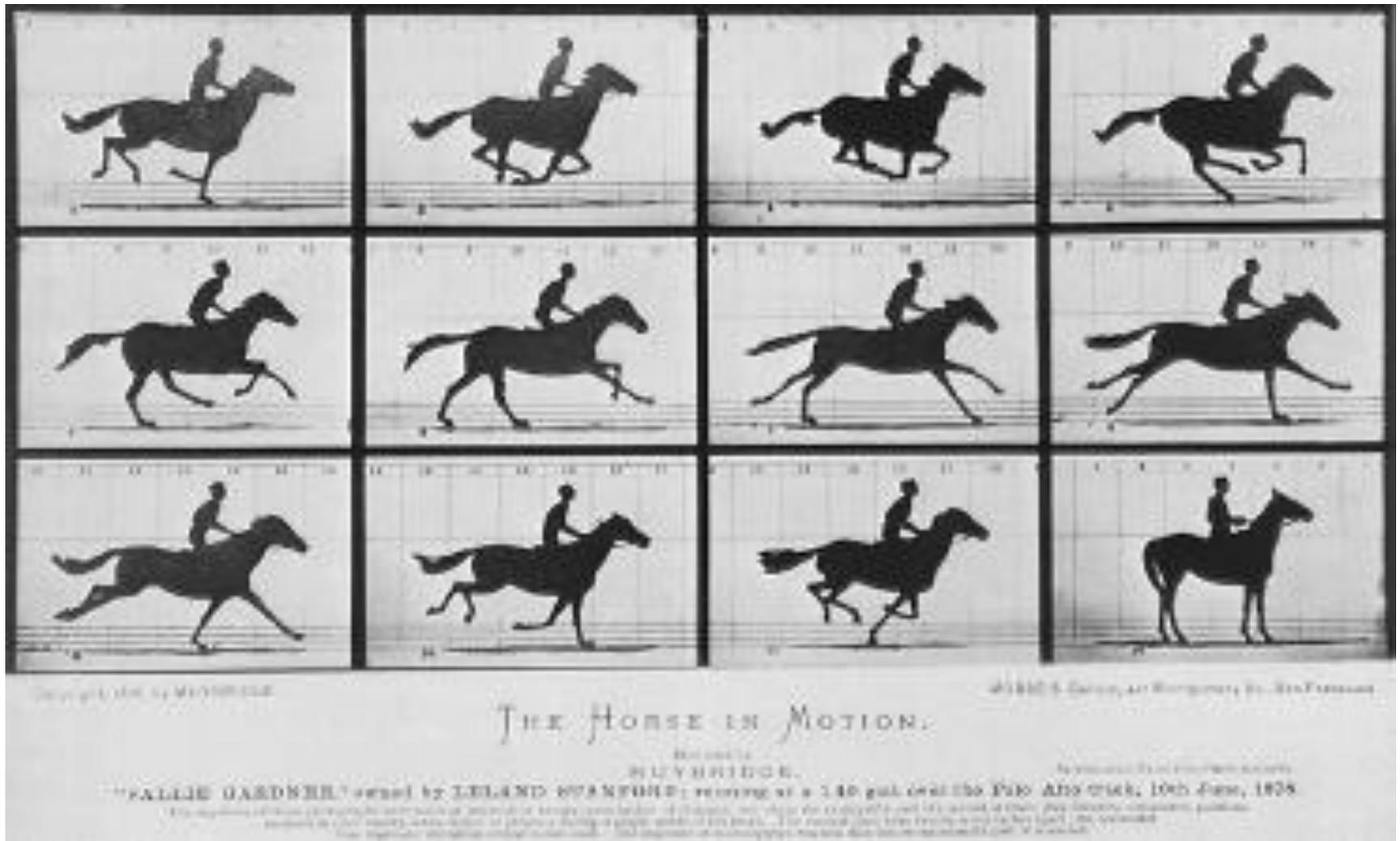
**Продукты  
реакции**

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

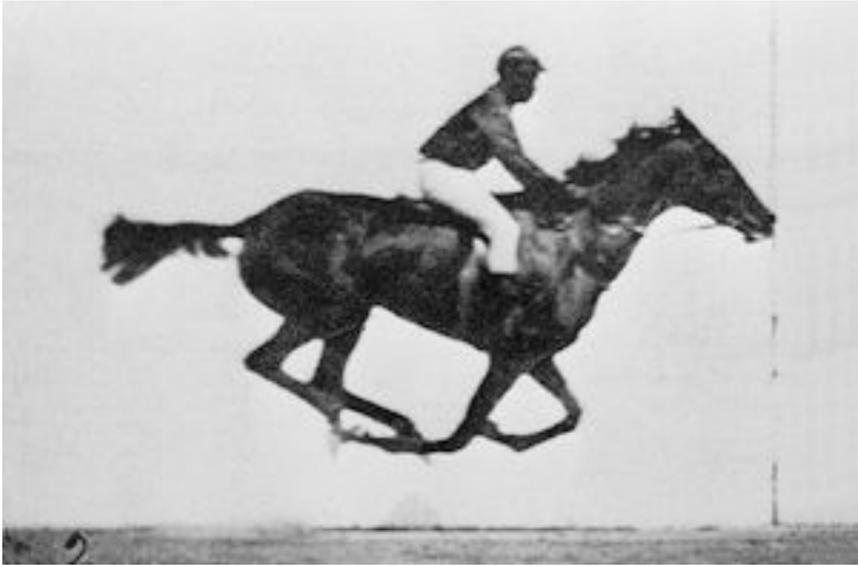
В 1872 году бывший губернатор Калифорнии Леланд Стэнфорд (Leland Stanford), бизнесмен и владелец скаковых лошадей, сделал ставку в споре: все ли четыре копыта лошади отрываются от земли во время галопа .

Спор был решён с помощью «быстрой фотографии»

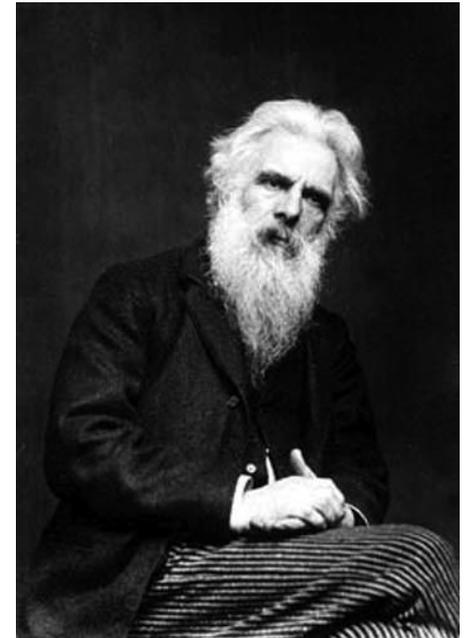
«Фотографии» химических процессов - методы быстрой регистрации



Eadweard Muybridge, 1878



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

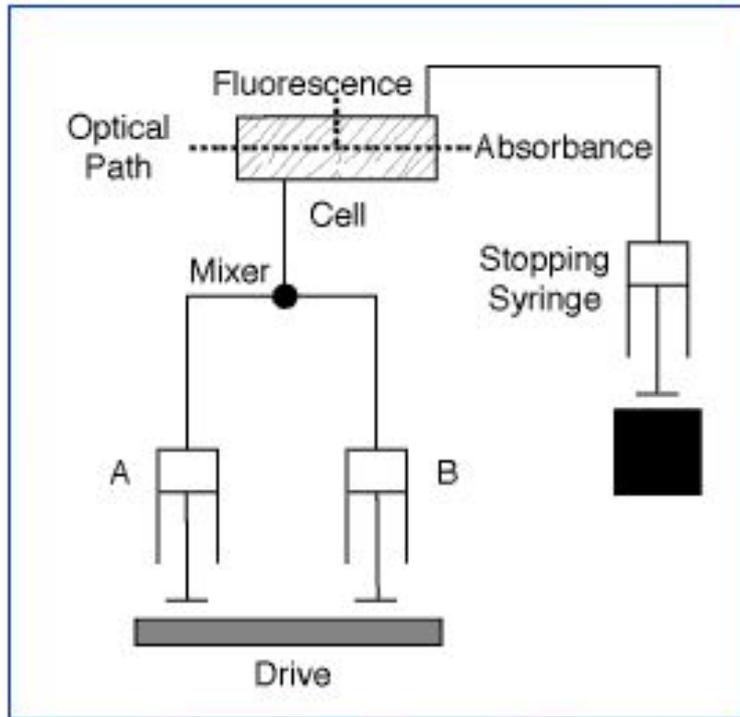


# **Методы регистрации неравновесной кинетики в применении для физико-химической биологии**

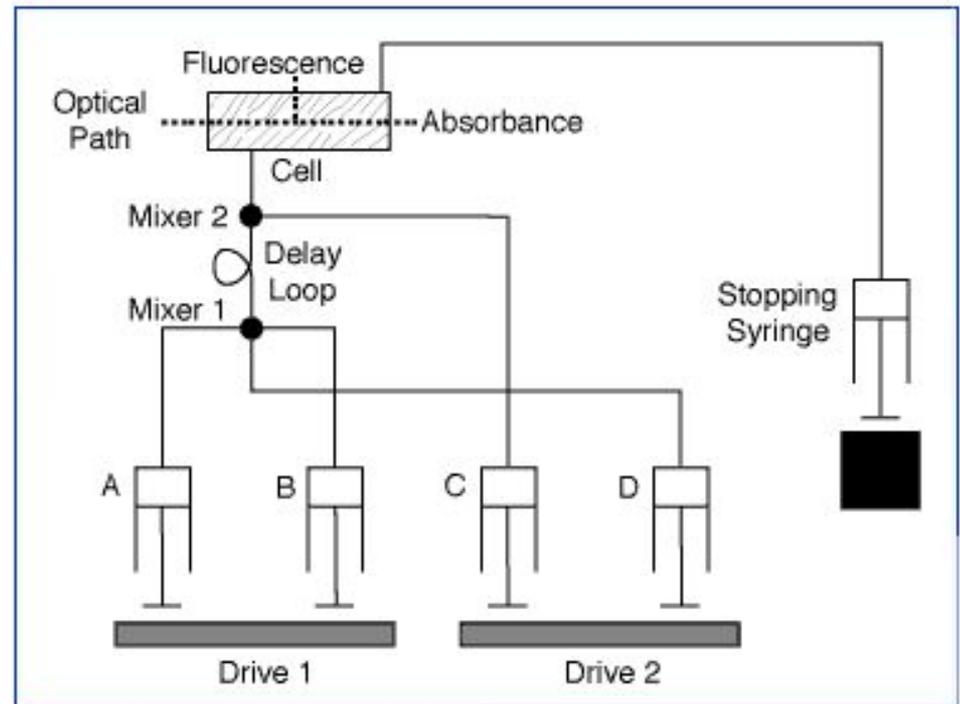
- 1. Stopped-Flow technique**
- 2. Continuous flow method**
- 3. Quench-Flow technique**
- 4. Fast freeze quench**
- 5. Temperature Jump**
- 6. Pressure jump**
- 7. Laser Flash Photolysis**

# Метод «остановленной струи»

## Mechanical mixing-spectroscopic observation

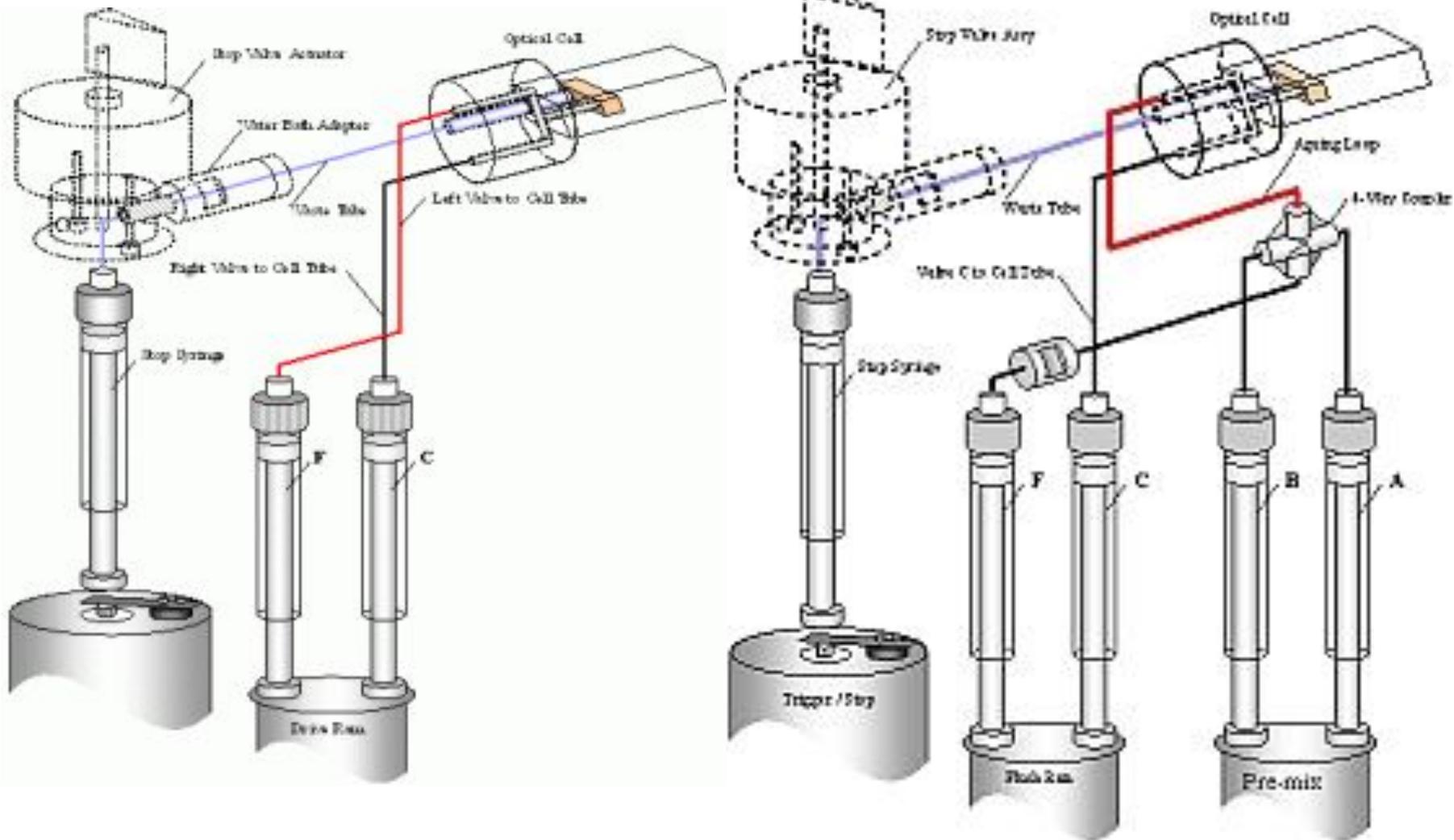


Single Mixing Stopped-Flow



Double Mixing Stopped-Flow

Usual deadtime  $\sim 1$  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

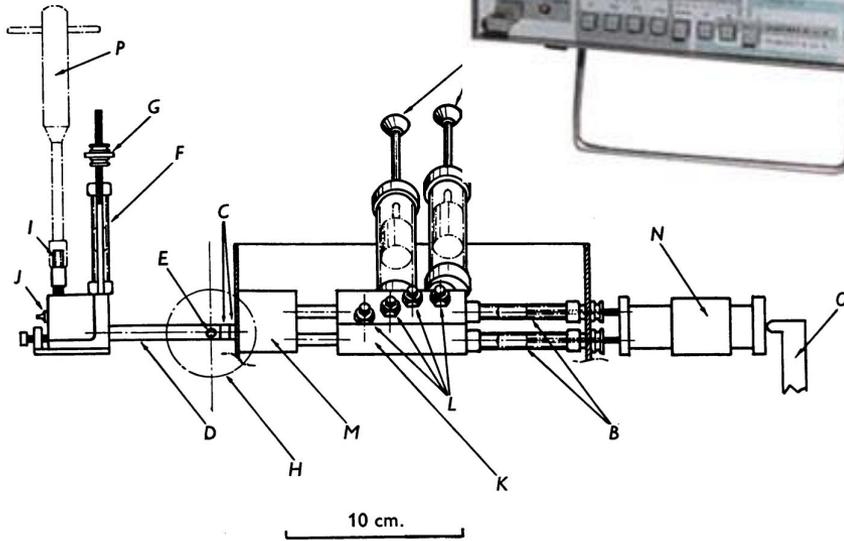
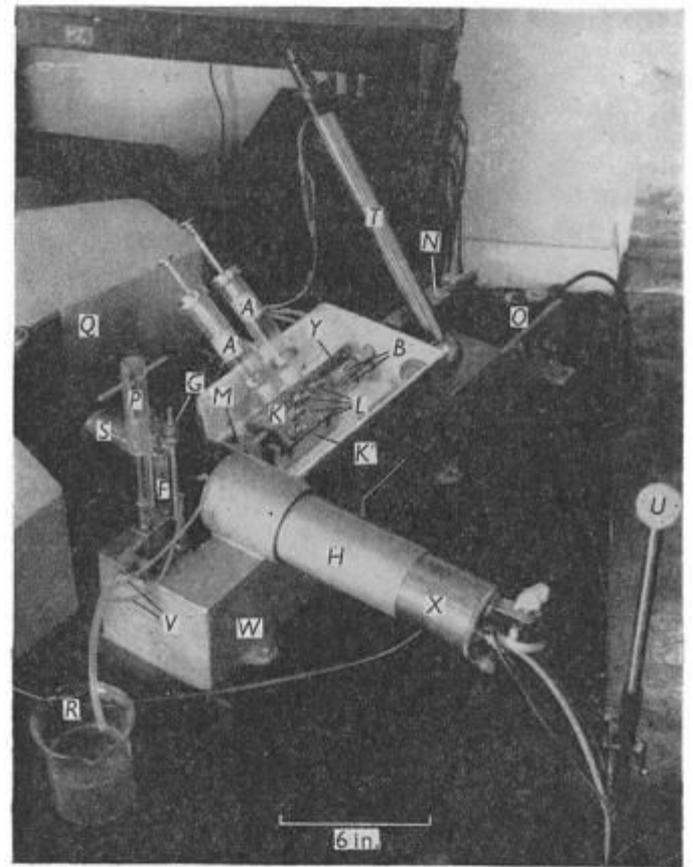
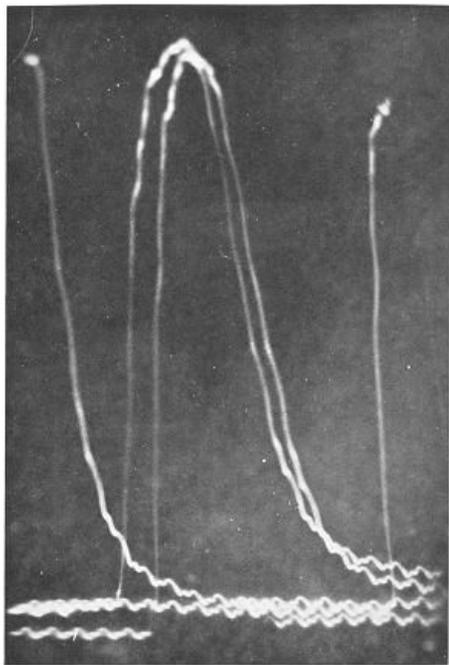


**Britton Chance**

(July 24, 1913 – November 16, 2010)



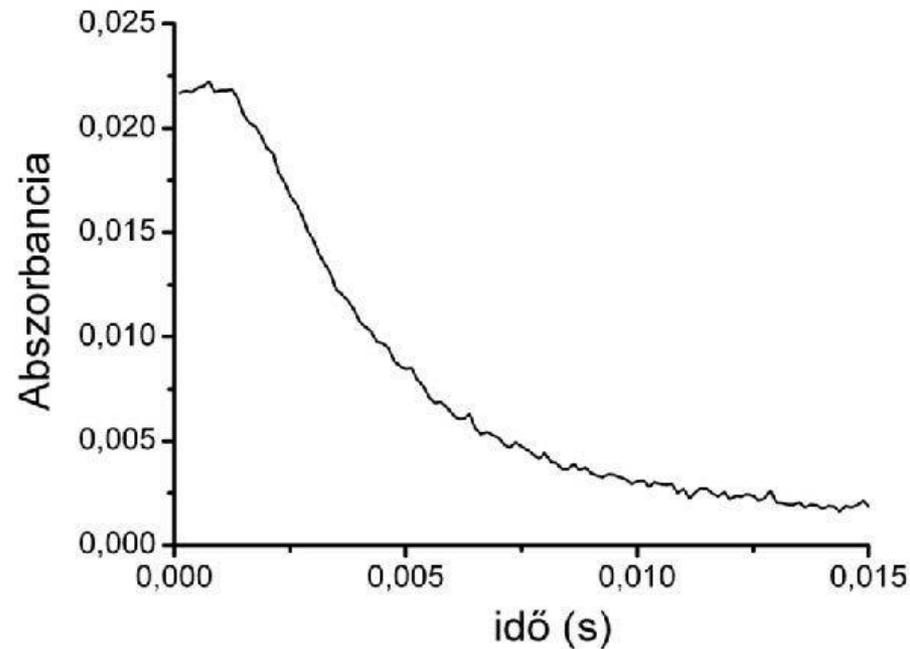
Britton Chance and his "magic machine" for studying stop-flow kinetics, 1947



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

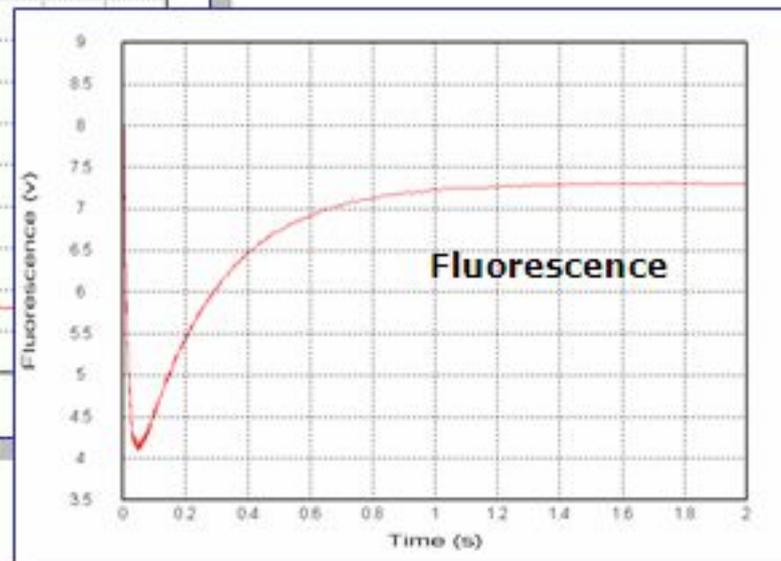
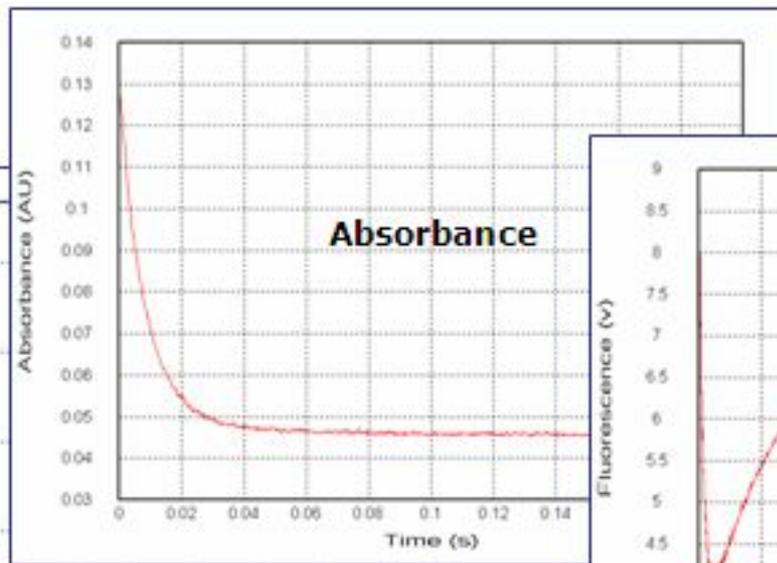
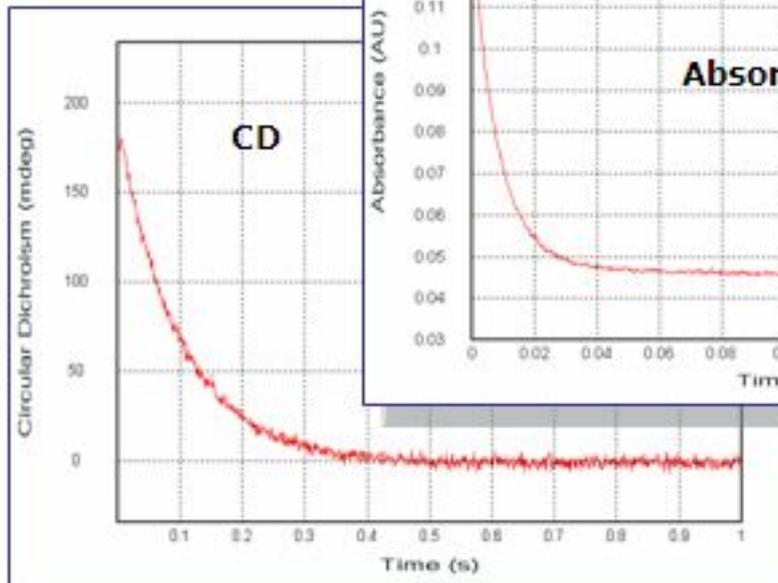
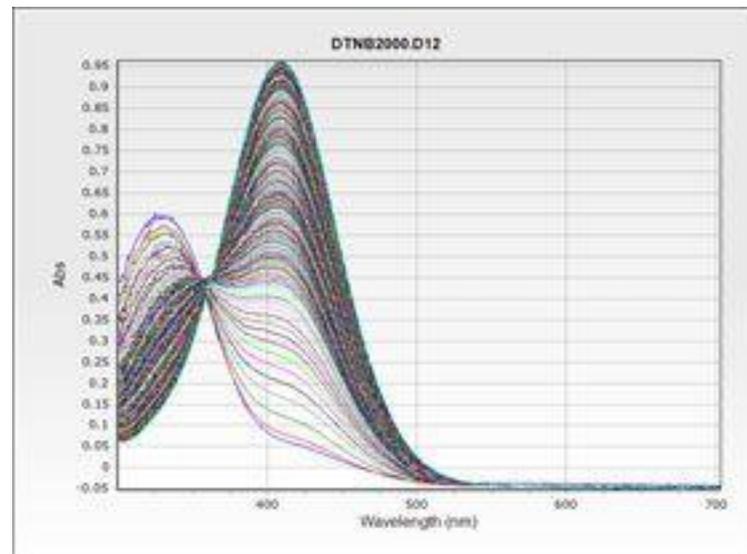
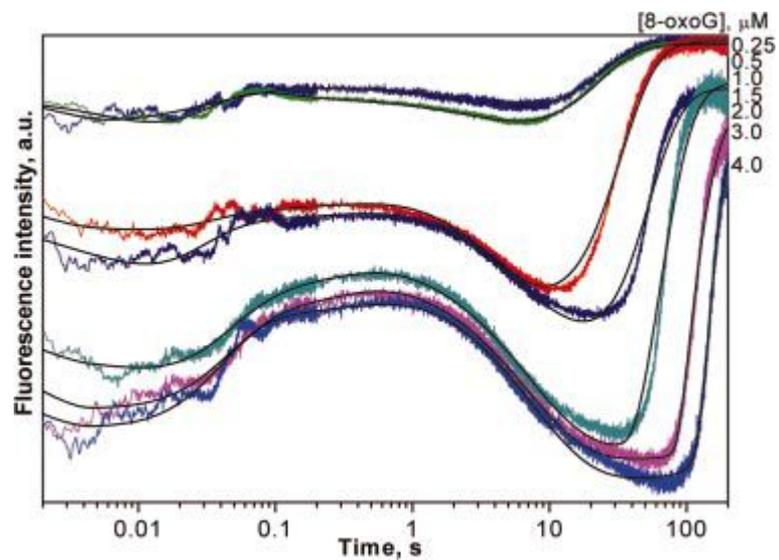


# Современное оборудование



# 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

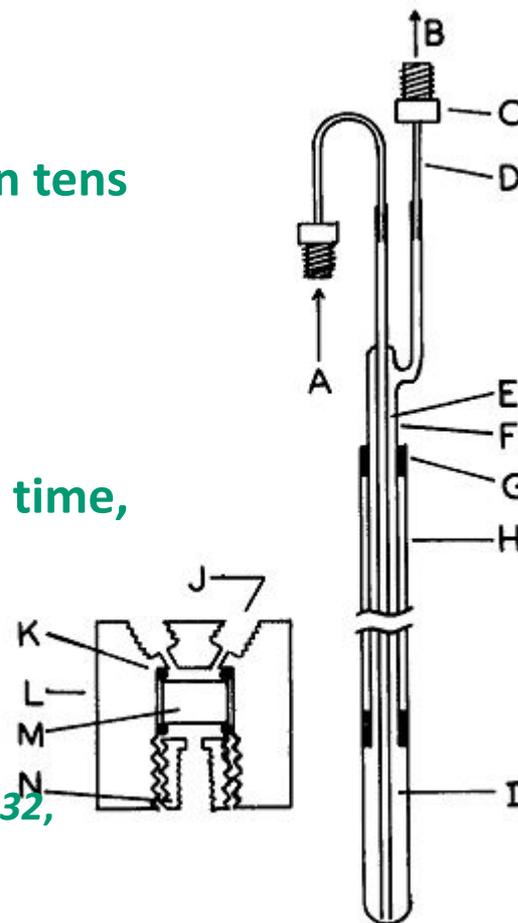
Stopped flow is useful to get data points within 2-10 s

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

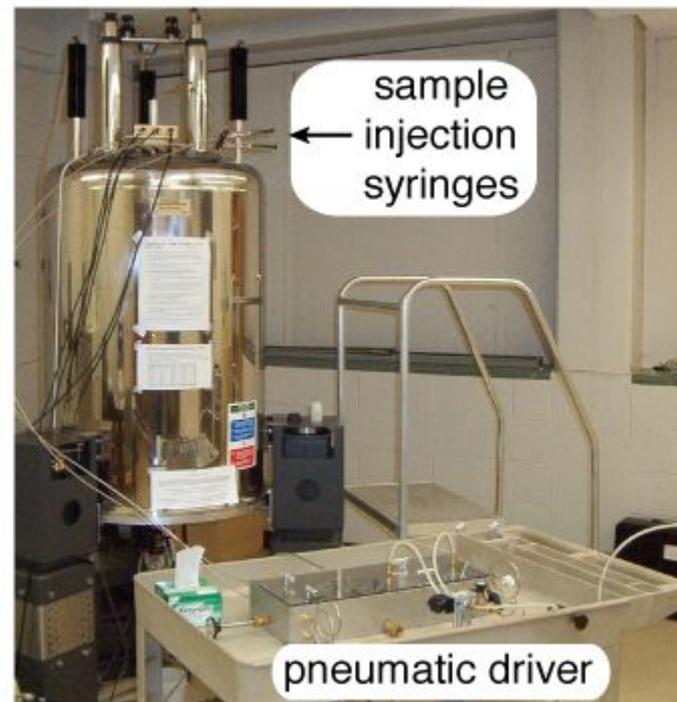
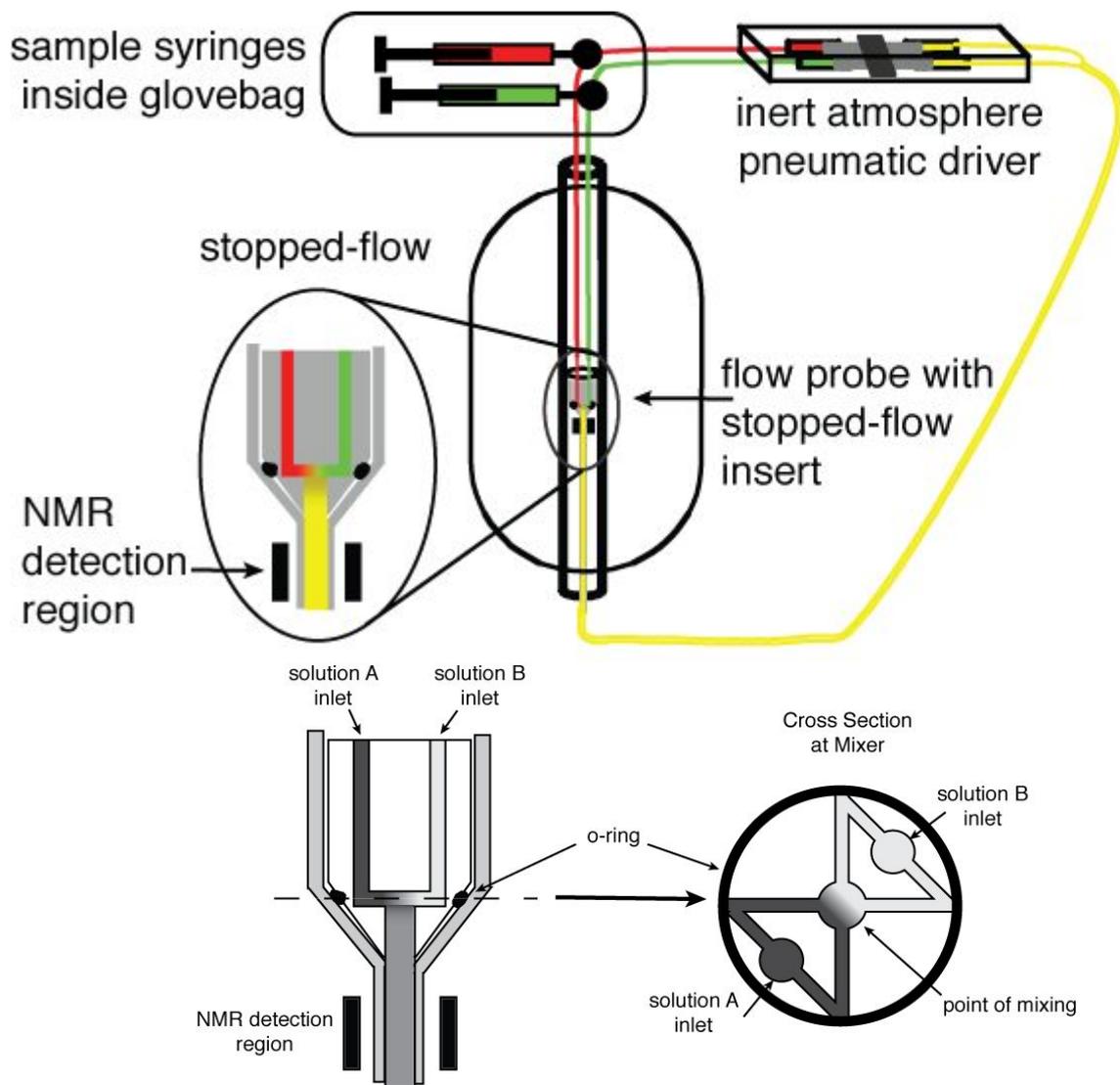
Apparatus not commercially available yet

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.



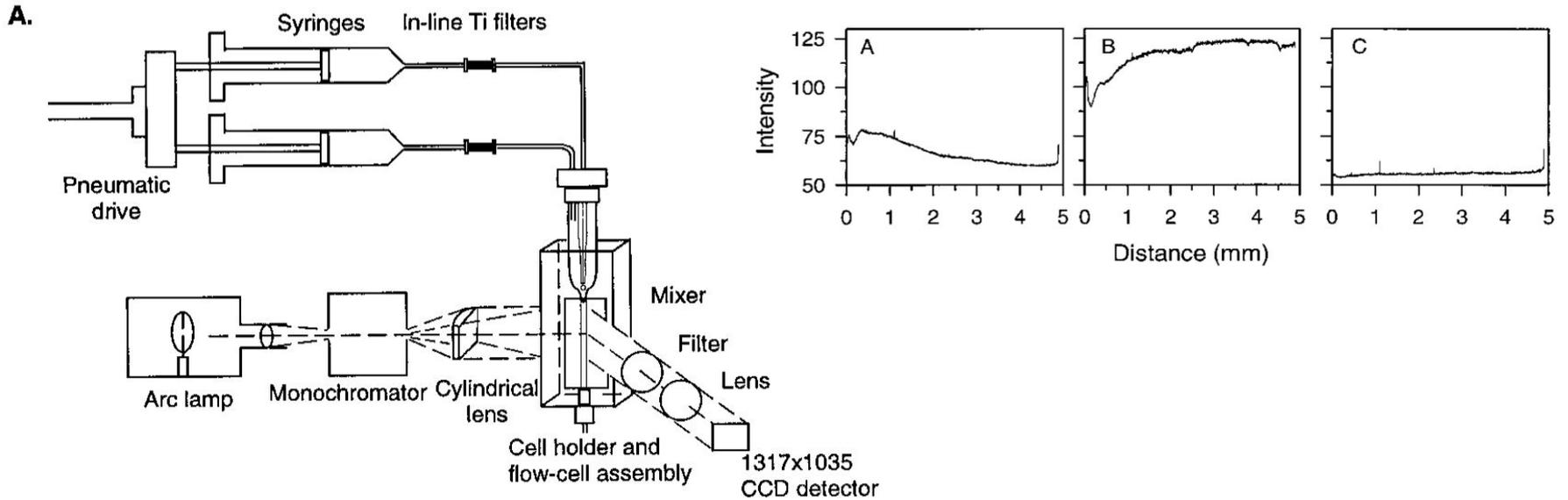
# Stopped-flow RMP



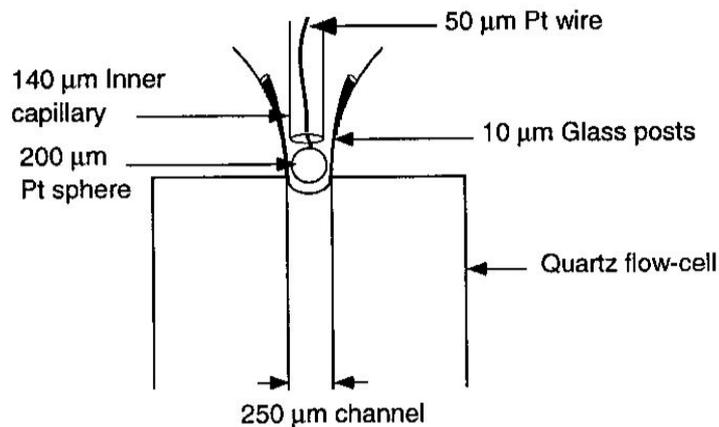
Christianson, M. D.; Tan, E. H. P.; Landis, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* 2010, 132, 11461.

# Метод непрерывной струи

## Continuous flow



**B.**

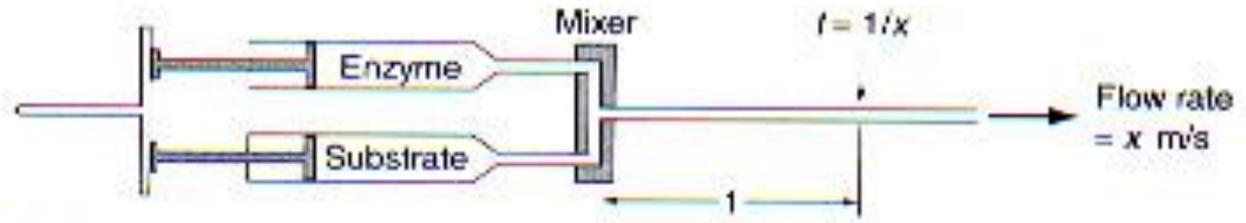


M. C. R. Shastry, S. D. Luck, H. Roder.  
Biophysical Journal Volume 74 May 1998  
2714–2721

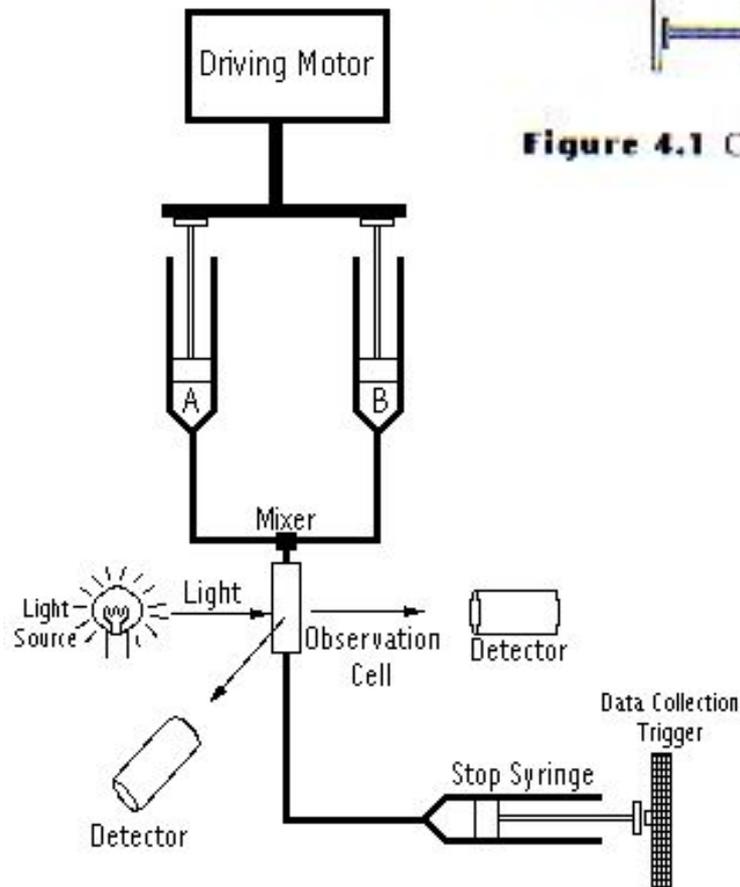
# Детекторы для Continuous flow

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:**

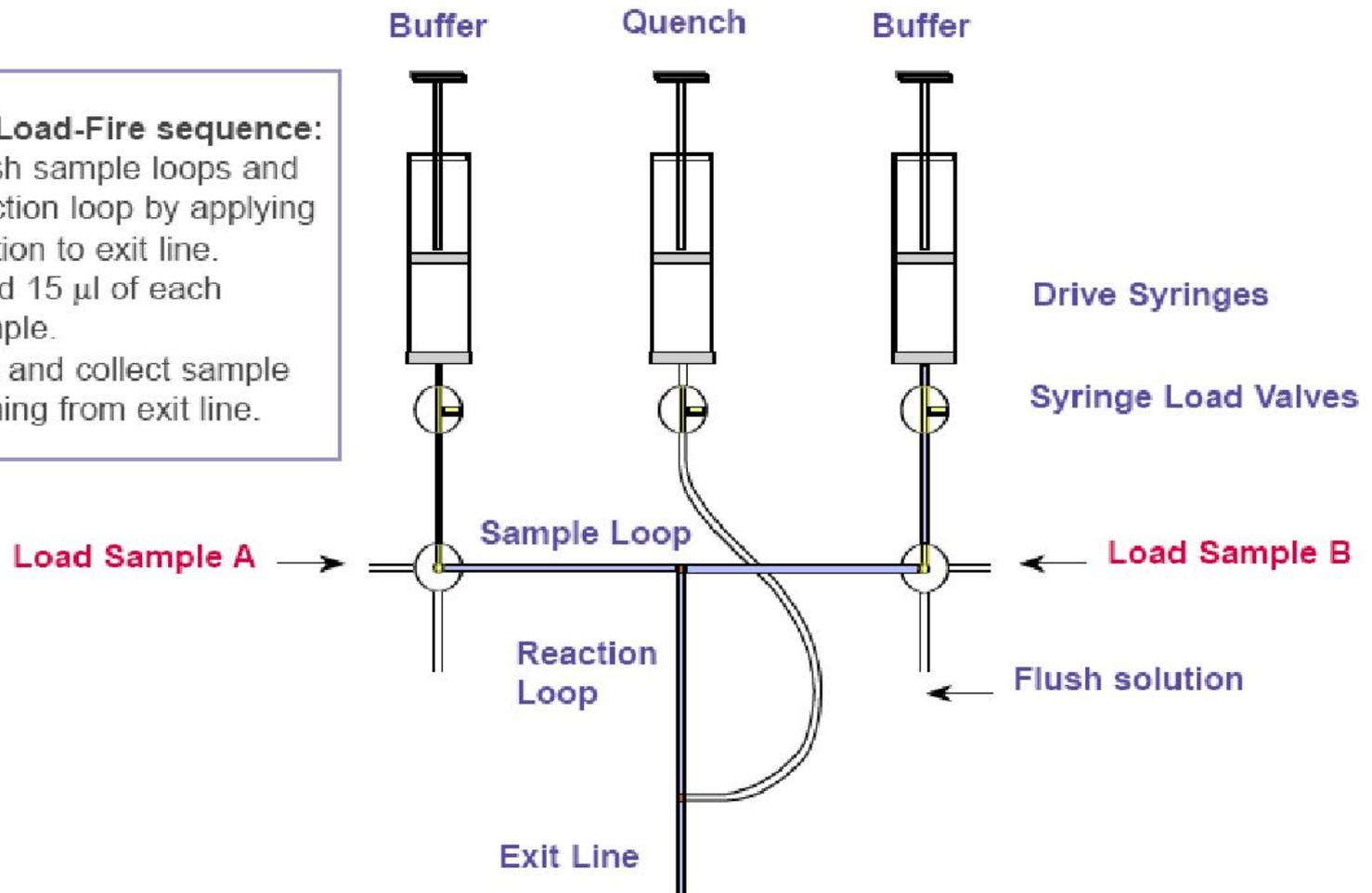
- Full kinetic only with variable flow or movable detector
- Signal can be accumulated
- Needs more sample

# Quench-Flow technique

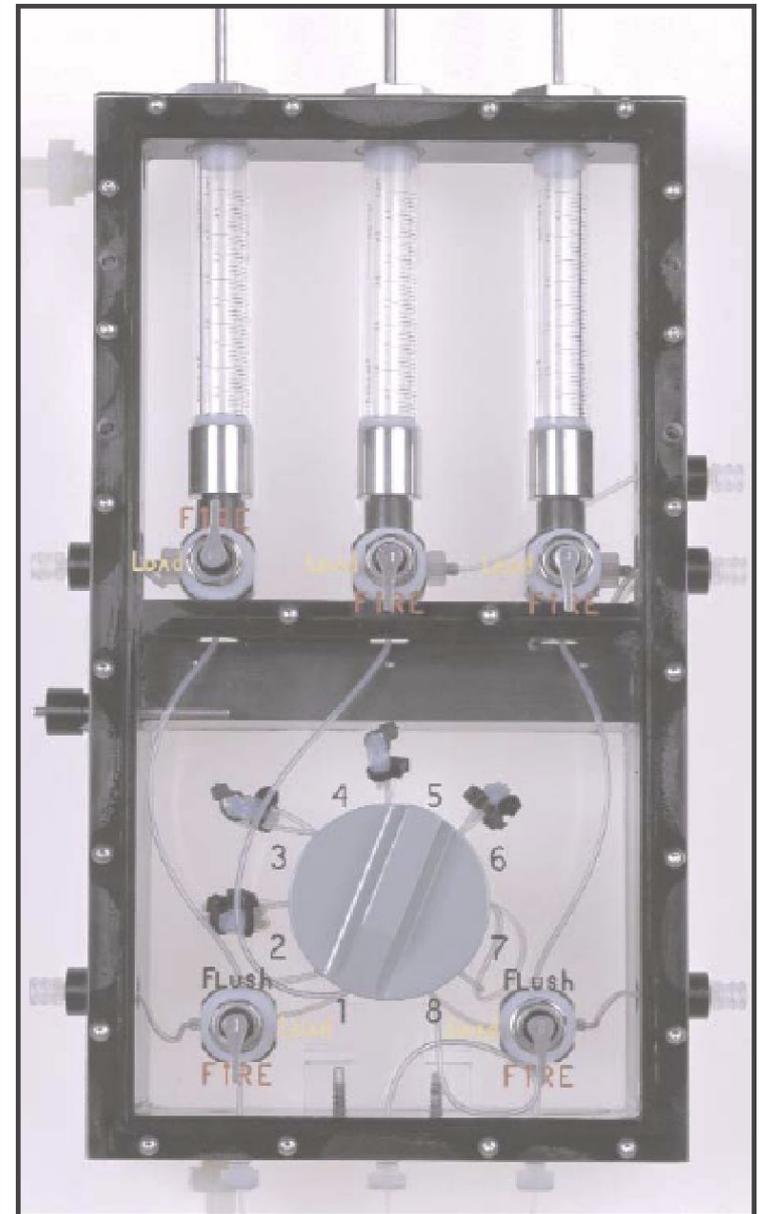
## KINTEK QUENCH-FLOW SCHEMATIC DIAGRAM

### Flush-Load-Fire sequence:

1. Flush sample loops and reaction loop by applying suction to exit line.
2. Load 15  $\mu\text{l}$  of each sample.
3. Fire and collect sample coming from exit line.



New improved performance!



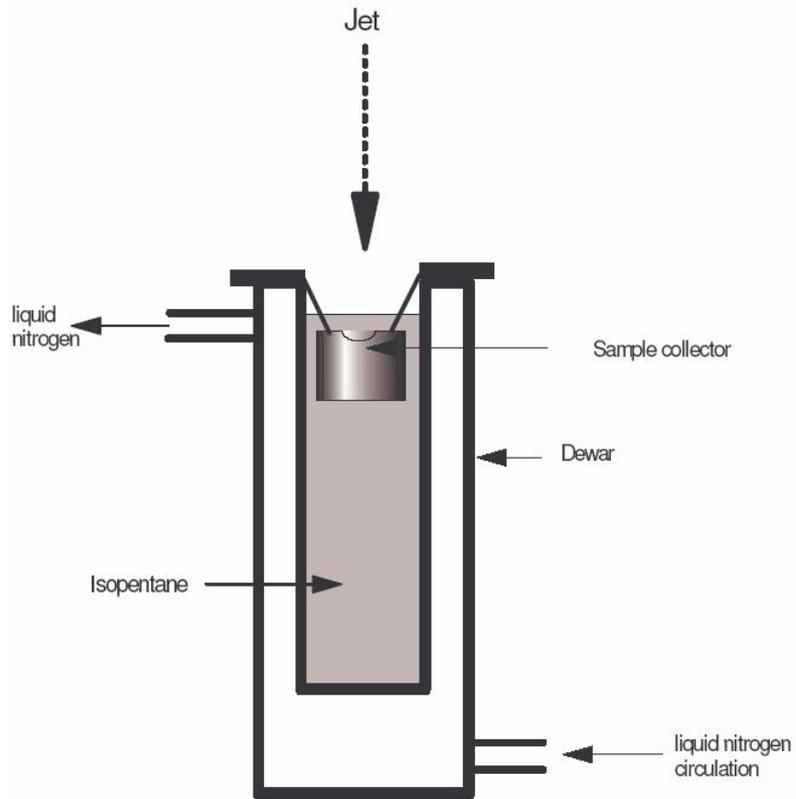
# Остановка реакции

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

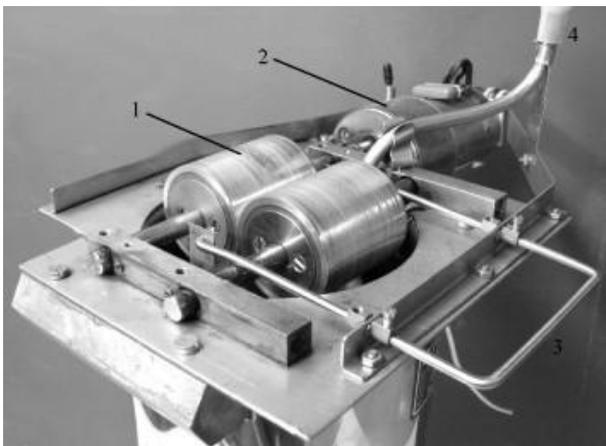
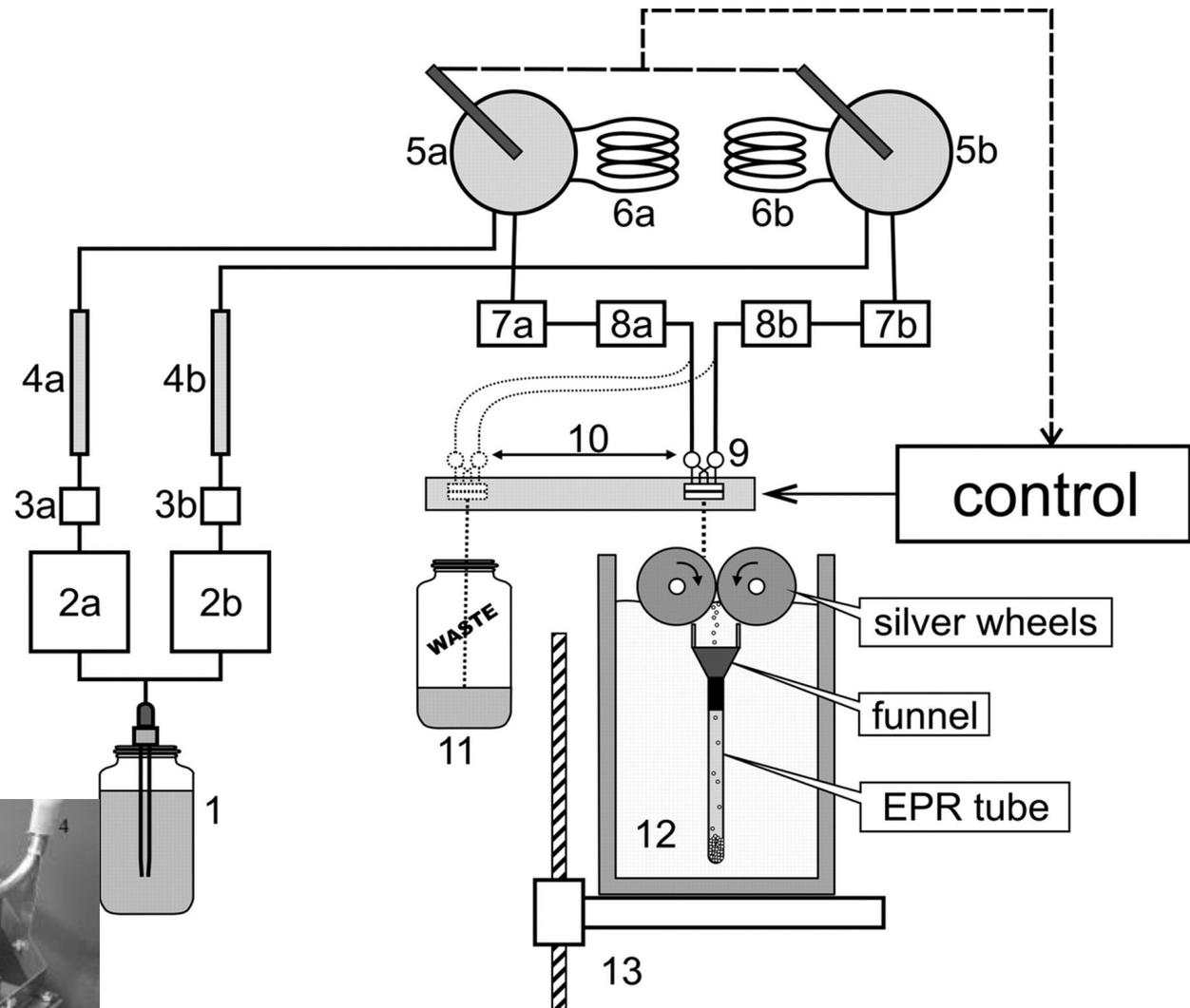
# Fast freeze quench



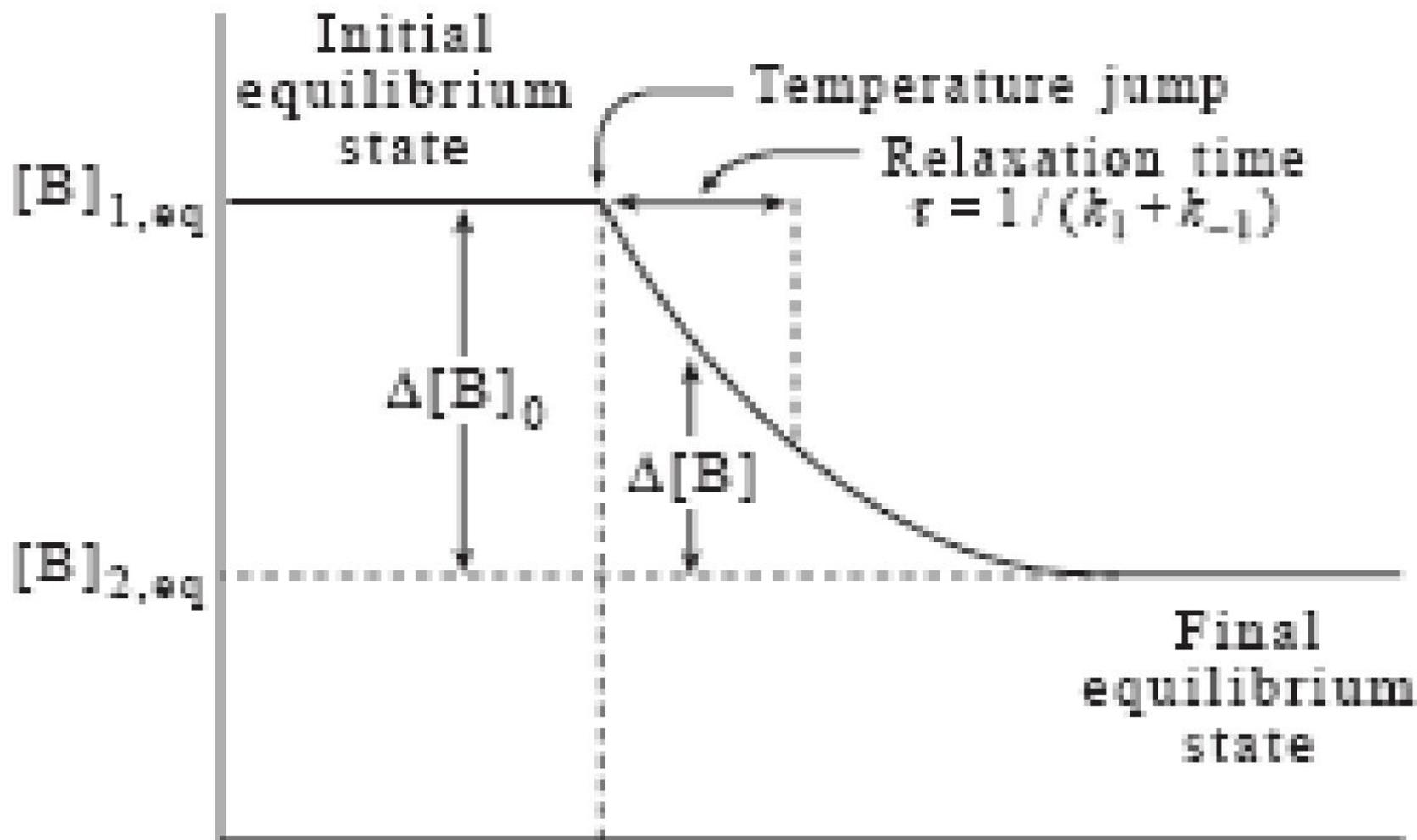
# Анализ промежуточных продуктов после Fast freeze quench

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

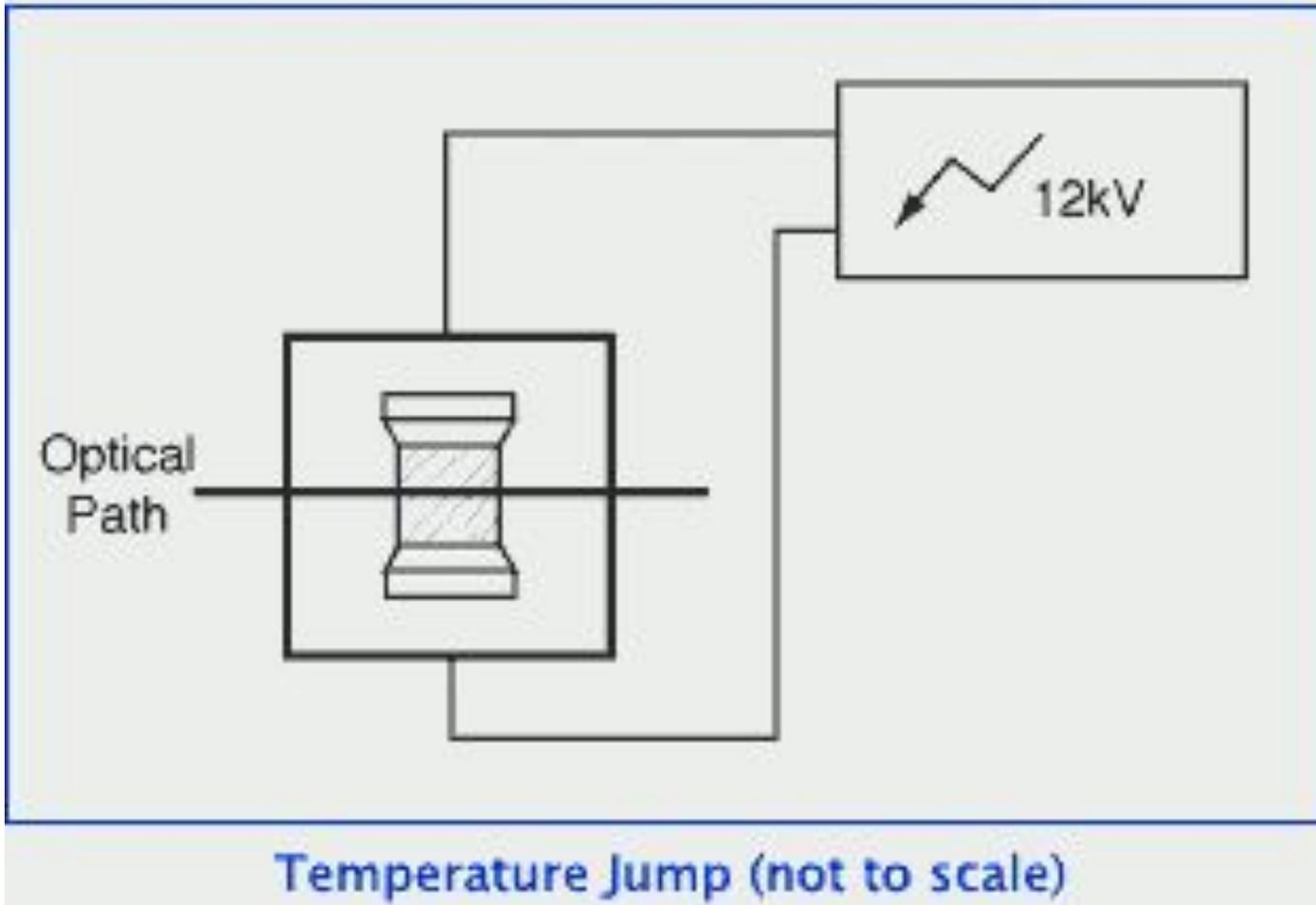
# Схема оборудования для freeze-quench



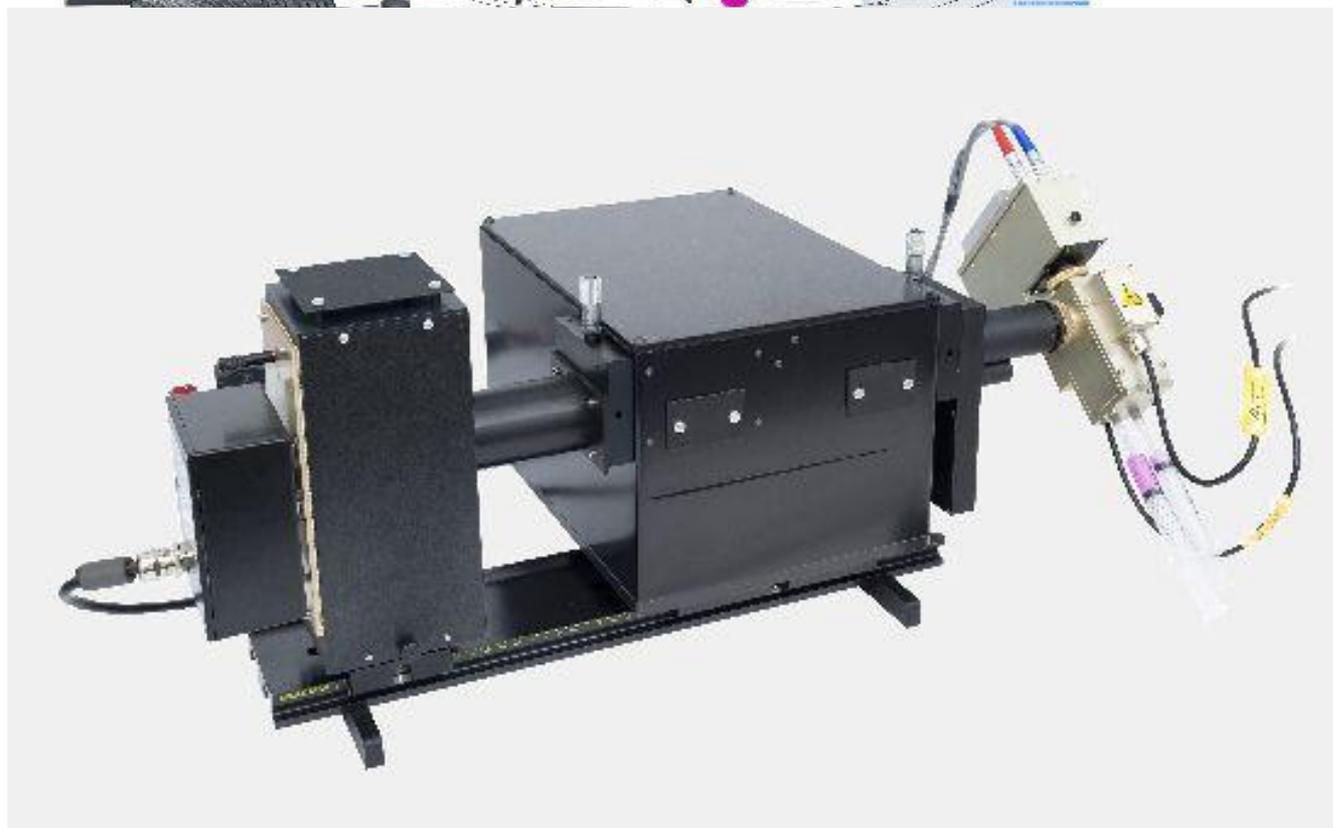
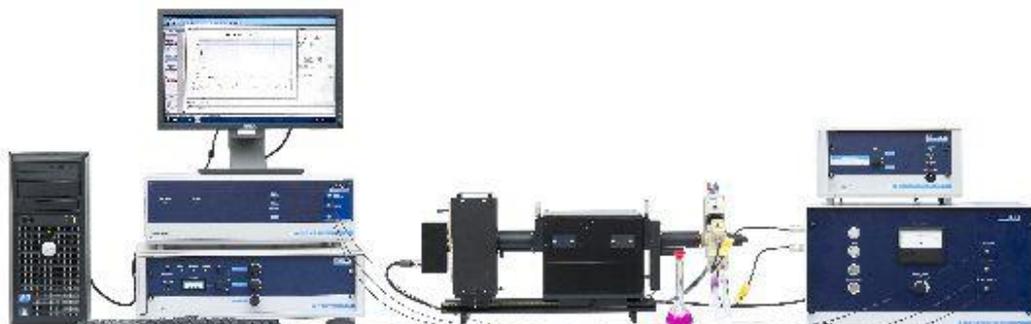
# Релаксационные методы



# 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  $10^\circ\text{C}$  за несколько микросекунд.

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

## Temperature Dependence of Reaction Rates

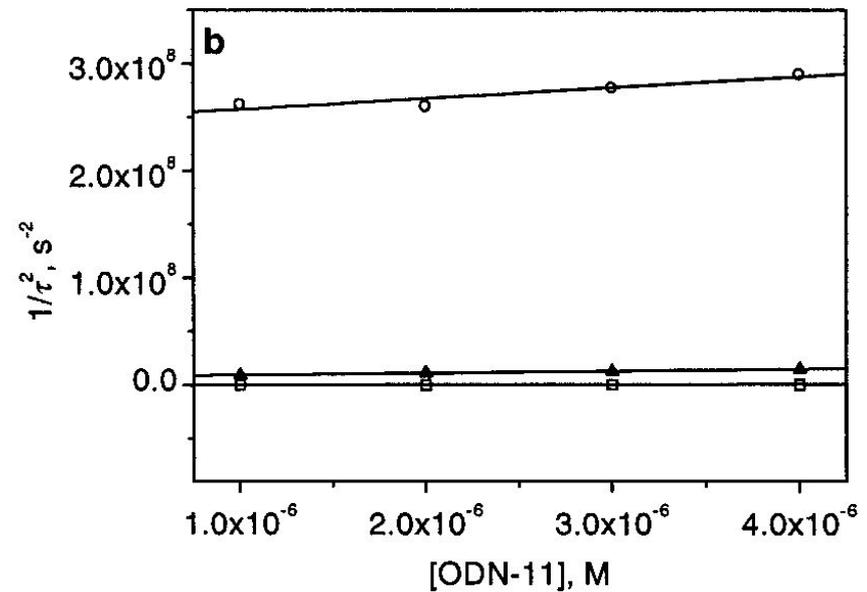
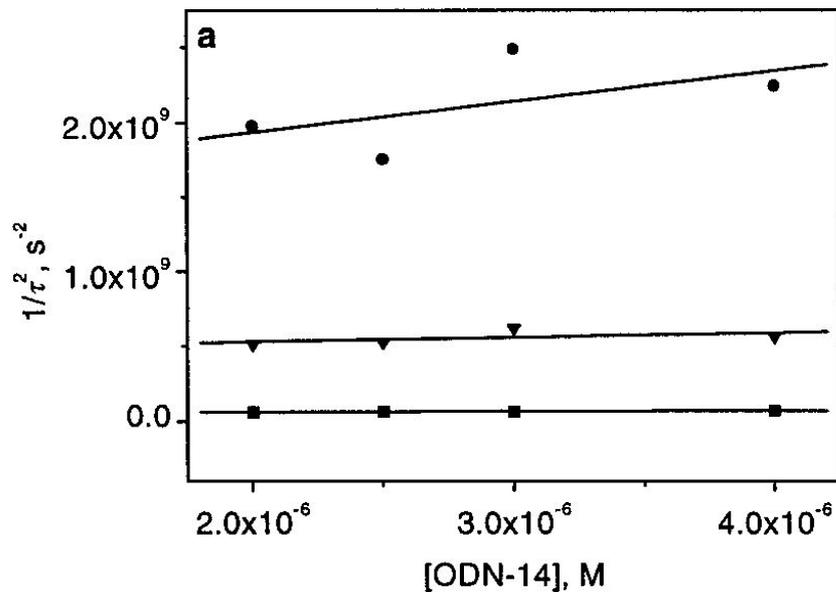
Svante Arrhenius observed that reaction rate constants had a temperature dependence that could be expressed by the Arrhenius equation:

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

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) $\zeta$  (ODN-14) at  $49.7 \pm C$  (j),  $52.7 \pm C$  (.), and  $54.7 \pm C$  (<sup>2</sup>) and for (b) (p14) $\zeta$  (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)

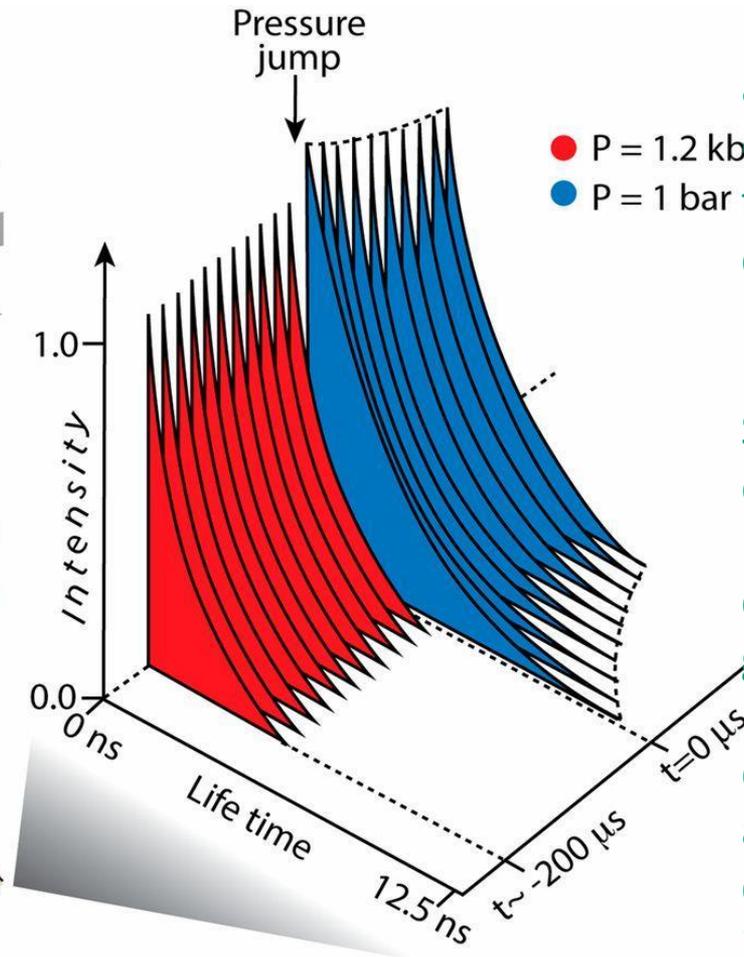
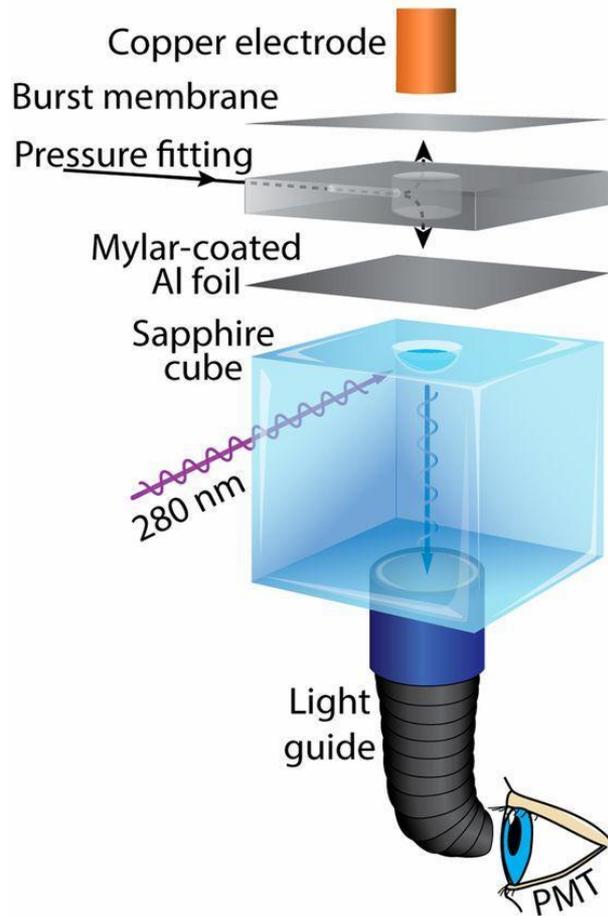
Скачок давления - метод, используемый в исследовании химической кинетики. Она включает в себя быстрое изменение давления экспериментальной системы и наблюдения за возвращением к равновесию. Метод позволяет изучать смещение равновесия реакций, в диапазоне времени между от миллисекунд до нескольких часов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

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

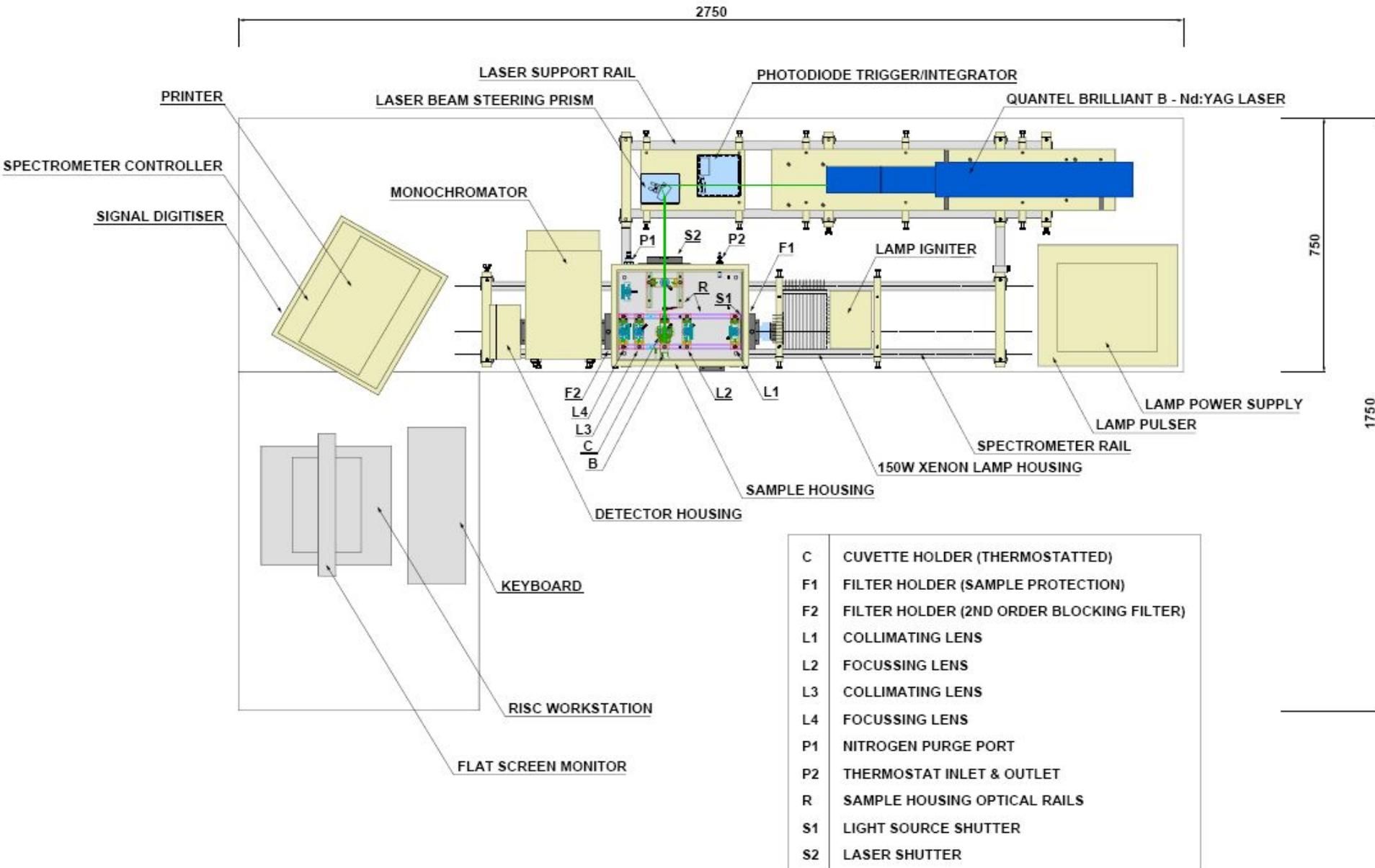


Лазерный импульсный фотолиз является одной из самых эффективных для исследования путем прямых измерений быстропротекающих химических и биологических реакций, например, с участием свободных радикалов, ионов и веществ в возбуждённых состояниях.

Использования 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

