

PRACOWNIA Z BIOFIZYKI DLA ZAAWANSOWANYCH

Ćwiczenia laboratoryjne dla studentów III roku kierunku

„Zastosowania fizyki w biologii i medycynie”

Biofizyka molekularna

**Zastosowanie spektrofluorymetrii
czasowo-rozdzielczej w badaniach białek
(PB39)**



KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY



Projekt *Fizyka wobec wyzwań XXI wieku* współfinansowany ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego

PB39

Zastosowanie spektrofluorymetrii czasowo-rozdzielczej w badaniach białek

I. Wstęp

Absorpcja fotonów przez makrocząsteczki biologiczne (np., kwasy nukleinowe, białka, chloroplasty) w zakresie długości fali 200-400 nm (bliskiego UV) lub powyżej 400 nm (światła widzialnego) może być wywołana przez sprzężone wiązania wielokrotne w zasadach kwasów nukleinowych, aminokwasach aromatycznych (tryptofan, tyrozyna i fenyloalanina - absorpcja białek w zakresie bliskiego UV), oraz barwnikach takie jak chlorofil, karoten - absorpcja chloroplastów w zakresie widzialnym. Stosunkowo niska energia wzbudzenia elektronowego w tych cząsteczkach jest związana z obecnością zdelokalizowanych wiązań typu π , które są także przyczyną płaskiego charakteru tych cząsteczek. Cząsteczki powiązane takim układem wiązań zachowują płaską strukturę, orbitale p prostopadłe do płaszczyzny cząsteczki mogą się nakładać i tworzyć wielocentrowe czyli zdelokalizowane orbitale cząsteczkowe tzw. orbitale π . W ogólności możemy mówić o stanach elektronowo-oscylacyjno-rotacyjnych cząsteczek, przy czym w środowisku wodnym w laboratorium lub w środowisku biologicznych wewnątrz żywych komórek lub tkanek najważniejsze są stany elektronowo-oscylacyjne. Ponadto w temperaturze pokojowej cząsteczki te znajdują się w podstawowym stanie oscylacyjnym podstawowego stanu elektronowego.

Absorpcja fotonu o energii równej różnicy między dozwolonymi stanami elektronowymi powoduje przejście cząsteczki ze stanu podstawowego do wzbudzonego stanu elektronowego, natomiast przejście odwrotne jest realizowane poprzez emisję fotonów zwaną fluorescencją. Zarówno po absorpcji jak i po emisji kwantu światła cząsteczka może znaleźć się w podstawowym lub wzbudzonym stanie oscylacyjnym. Dezaktywacja bezpromienista stanu oscylacyjnego odbywa się bardzo szybko i emisja fotonu odbywa się z podstawowego stanu oscylacyjnego. Absorpcja i emisja zależą od właściwości fizycznych badanej cząsteczki i jej

oddziaływania z innymi cząsteczkami (otoczeniem), zarówno w stanie podstawowym jak i wzbudzonym.

Wybór spektroskopii emisyjnej jako podstawowego narzędzia badawczego wynika m.in. z następujących obserwacji. Po pierwsze, chociaż metody spektroskopii emisyjnej stanów elektronowych cząsteczek biologicznych i ich kompleksów nie udzielają tak precyzyjnej informacji o strukturze jak krystalografia lub spektroskopia wielowymiarowego magnetycznego rezonansu magnetycznego (NMR), to można je uznać za komplementarne, a nawet posiadające większe możliwości. Dostarczają bowiem informacji o strukturze, oddziaływaniach i dynamice układów cząsteczkowych w roztworze, tj. w warunkach zbliżonych do takich jakie są w żywych komórkach i tkankach. W przypadku białek (enzymów) możemy to sprawdzić m.in. na podstawie pomiaru ich aktywności katalitycznej wobec typowych ligandów (substratów, inhibitorów) oraz na podstawie wpływu oddziaływania białek z ligandami na emisję znaczników emisyjnych przyczepionych kowalencyjnie do białek i ligandów.

1.1 Funkcja wielowykładnicza opisująca zanik fluorescencji

Wpływ środowiska i oddziaływań z ligandami odzwierciedlony jest w zaniku fluorescencji białka opisanym zależnością wykładniczą

$$I(t) = A_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau_0}\right)$$

lub wielowykładniczą

$$I(t) = \sum_{i=1}^M A_{oi} \exp\left(-\frac{t}{\tau_i}\right)$$

Badania czynników, najczęściej oparte o czasowo-rozdzielcze zaniki natężenia fluorescencji, przyczyniają się do pogłębienia wiedzy o makrocząsteczkach biologicznych (białkach). Czasowo-rozdzielcze zaniki natężenia fluorescencji $I(t)$ wyznacza się z równania

$$I(t) = \sum f_i \exp(-t/\tau_i) \text{ oraz } f_i = A_{oi} \tau_i / (\sum A_{oj} \tau_j),$$

gdzie f_i — udziały i -tej składowej emisji fluorescencji opisanej charakterystycznym czasem zaniku (τ_i). Konsekwentnie średni czas zaniku fluorescencji dany jest wzorem

$$\langle \tau_e \rangle = \sum f_i \tau_i,$$

I.2 Funkcja potęgowa opisująca zanik fluorescencji

Model wielowykładniczy dyskretnych i nieoddziaływających składników, pomimo jego historycznych zasług, bardzo często nie jest wystarczający do opisu zaników fluorescencji w heterogenicznych układach biologicznych składających się między innymi z bardzo dużych makrocząsteczek białkowych o ogromnej liczbie stopni swobody i stanów energetycznych. Ciągły rozkład czasów życia fluorescencji $P(\tau)$ oraz funkcje zaniku fluorescencji

$$I(\tau, t) = P(\tau) \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \quad \text{zamiast} \quad I(t) = A_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau_0}\right)$$

lub

$$I(t) = \int_0^{\infty} P(\tau) \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) d\tau \quad \text{zamiast} \quad I(t) = \sum_{i=1}^M A_{oi} \exp\left(-\frac{t}{\tau_i}\right)$$

są bardziej odpowiednie. Według tego modelu funkcja zaniku powinna być „sumą” indywidualnych zaników z wagami $P(\tau)$. Dla złożonego przypadku z N ścieżkami zaniku opisanymi stałymi kinetycznymi $\gamma_i = 1/\tau_i$

$$\gamma = \sum_{i=1}^N \gamma_i$$

parametr heterogeniczności (q) określony jest przez względną wariancję rozkładu $\omega = \langle (\gamma - \langle \gamma \rangle)^2 \rangle / \langle \gamma \rangle^2$ i liczbę ścieżek zaniku N (J. Włodarczyk & B. Kierdaszuk, *Biophys. J.* 85:589-598)

$$q = 1 + \frac{\langle (\gamma - \langle \gamma \rangle)^2 \rangle}{\langle \gamma \rangle^2} = 1 + \frac{2}{N}$$

Podstawiając rozkład gamma za $P(\tau)$ do $I(t) = \int_0^{\infty} P(\tau) \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) d\tau$

Otrzymujemy zanik potęgowy

$$I(t) = I_0 \left[1 - (1 - q) \frac{t}{\tau_0} \right]^{\frac{1}{1-q}}$$

oraz czynnik normalizacyjny

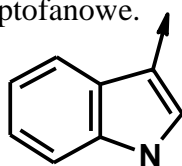
$$I_0 = (2 - q) / \tau_0$$

i średni czas zaniku potęgowego

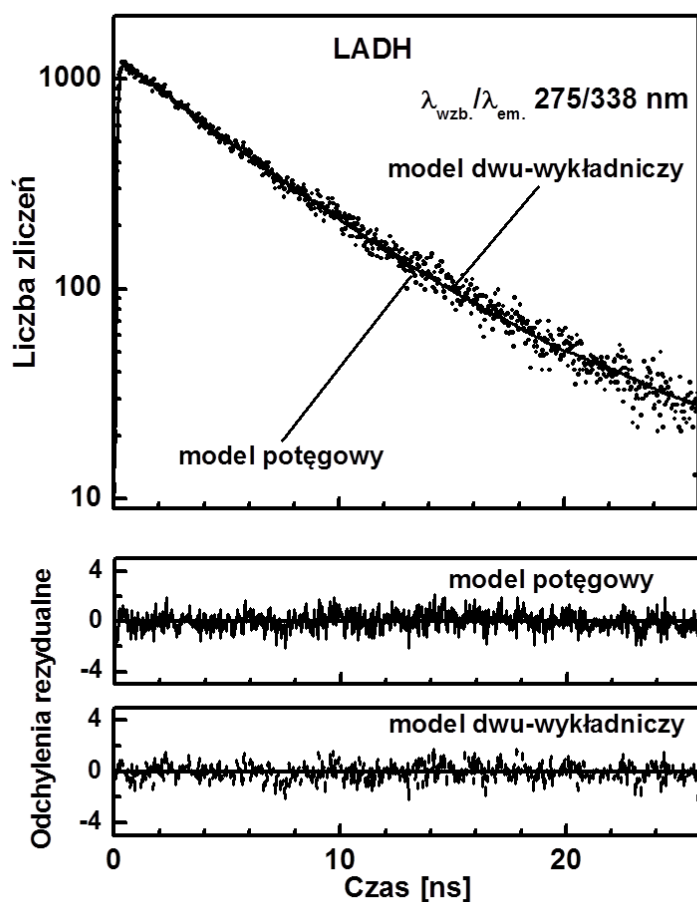
$$\langle \tau_p \rangle = \frac{\tau_0}{3 - 2q}$$

I.3 Zanik emisji fluorescencji dehydrogenazy alkoholowej

Jako przykład warto omówić pomiary i analizę zaniku emisji fluorescencji dehydrogenazy alkoholowej z wątroby konia (LADH) (MW = 2 x 40000) (Rys. 1), gdzie przewidywana wartość średniego charakterystycznego czasu zaniku fluorescencji wynosi $\langle \tau_e \rangle = (5.78 \pm 0.09)$ ns i $\langle \tau_p \rangle = (5.5 \pm 0.2)$ ns, odpowiednio dla modelu wielowykładniczego i potęgowego $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ 275/338 nm. Białko tego enzymu zawiera dwie reszty tryptofanowe Trp-15 (eksponowaną) i Trp-314 (zanurzoną), które znajdują się odpowiednio w hydrofilowym i hydrofobowym otoczeniu. Otoczenie to wpływa zarówno na położenie pasm emisji ich fluorescencji jak i na charakterystyczne czasy zaniku (Lakowicz et al., *J. Fluoresc.* 6:51-59, 1996) reprezentujące te dwie sondy tryptofanowe.



Schemat reszty indolowej tryptofanu

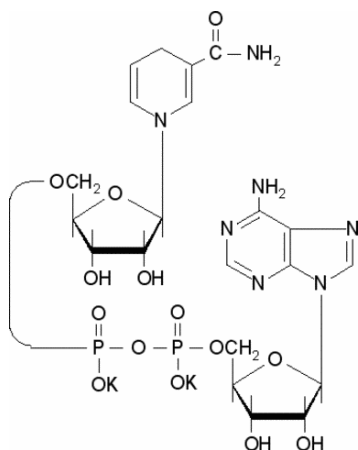


Rys. 1 Kinetyka zaniku natężenia fluorescencji dehydrogenazy alkoholowej z wątroby konia (LADH)

I.4 Zanik emisji fluorescencji zredukowanego nikotynamidu w NADH

Ten fragment pracowni dotyczy zbadania zaniku emisji fluorescencji zredukowanej formy dwunukleotydu nikotynamidu i adeniny (NADH) (Kierdaszuk et al., *Biophys. Chem.* 62:1-13, 1996). Projekt pracowni przewiduje także wprowadzenie do metodologii pracy z makrocząsteczkami biologicznymi (białkami) i zapoznanie się z nowoczesnymi technikami spektroskopii fluorescencyjnej wysokiej rozdzielczości czasowej.

Stała szybkości zderzeń (k_d) podczas reakcji *stacking-destacking* między cząsteczkami zredukowanego nikotynamidu i adeniny w kofaktorze NADH (*reduced nicotinamide adenine dinucleotide*) zależy od zaniku natężenia emisji NMNH (*reduced nicotinamide nucleotide*), który jest opisany funkcją dwu-wykładniczą z czasami charakterystycznymi: $\tau_{m1} = 0.25$ ns ($A_1 = 0.97$) i $\tau_{m2} = 0.76$ ns ($A_2 = 0.03$). Natomiast zanik fluorescencji NADH jest opisany funkcją dwu-wykładniczą z czasami charakterystycznymi: $\tau_{d1} = 0.27$ ns ($A_{d1} = 0.72$) i $\tau_{d2} = 0.59$ ns ($A_{d2} = 0.28$). Zderzenia te nie wpływają na składnik krótko żyjący, natomiast składnik $\tau_{d2} = 0.59$ ns jest wynikiem dynamicznego wygaszania składnika τ_{m2} stanu wzbudzonego zredukowanego nikotynamidu przez pierścień adeniny. Wyznacz stałą dezaktywacji promienistej reszty zredukowanego nikotynamidu oraz stałą szybkości zderzeń między cząsteczką nikotynamidu i adeniny w kofaktorze NADH.



II. Wymagania przy kolokwium wstępnym

Warunkiem przystąpienia do części eksperymentalnej ćwiczenia jest zaliczenie kolokwium wstępnego. Wybór sposobu przeprowadzenia kolokwium wstępnego tj forma pisemna czy ustna, pytania otwarte czy zamknięte – należy do prowadzącego ćwiczenie.

1. Materiał z zakresu spektroskopii molekularnej absorpcyjnej i emisyjnej oraz zastosowania spektroskopii do badania właściwości molekuł:

Kęckiego *Podstawy spektroskopii molekularnej*,
Barrowa, *Wstęp do spektroskopii molekularnej*
Kowalczyka *Fizyka cząsteczek*
Lakowicza, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*

2. Materiał z zakresu budowy badanych molekuł i ich roli biologicznej:
Fishera i Arnolda *Chemia dla biologów, krótkie wykłady*
Hamesa i Hoopera *Biochemia, krótkie wykłady*

Z książek tych (lub innych podanych na końcu opisu w sekcji Literatura) należy przeczytać tylko tyle, aby być przygotowanym do omówienia poniższych zagadnień:

1. Podstawowe definicje związane z promieniowaniem elektromagnetycznym i pomiarami spektroskopowymi oraz stanami elektronowo-oscylacyjnymi cząsteczek.
2. Pomiar absorpcji promieniowania elektromagnetycznego
 - schemat zasady pomiarów absorpcji (spektrofotometr jedno- i dwuwiązkowy)
 - co rozumiemy pod pojęciem widmo absorpcyjne?
 - ilościowy opis absorpcji (parametry pasma spektralnego)
 - czynniki determinujące kształt i szerokość konturu pasma absorpcyjnego
3. Absorpcyjne widmo elektronowe ze strukturą oscylacyjną i prawo Lamberta-Beera.
4. Pomiar widm emisji i wzbudzenia fluorescencji oraz zaniku natężenia fluorescencji:
 - charakterystyczny czas zaniku fluorescencji
 - wkłady składników oraz średni czas zaniku
 - wpływ środowiska oraz lepkości na widma emisji i wzbudzenia fluorescencji
 - wpływ środowiska oraz lepkości na zanik fluorescencji

III. Badane obiekty

W ćwiczeniu są rejestrowane i analizowane widma absorpcji, widma emisji i wzbudzenia fluorescencji zaniki emisji fluorescencji roztworów wodnych składników białek czyli wybranych aminokwasów oraz dehydrogenazy alkoholowej z wątroby konia (LADH) i jej kompleksu ze zredukowaną formą dinukleotydu nikotynamidu i adeniny (NADH).

Badane w ćwiczeniu związki to:

- Wybrane aminokwasy aromatyczne - tryptofan, tyrozyna
- Białko (dehydrogenaza alkoholowa z wątroby konia, LADH)
- Kofaktor (zredukowana forma dinukleotydu nikotynamidu i adeniny, NADH)

IV. Przebieg ćwiczenia

Studenci otrzymują przygotowane wcześniej roztwory wodne badanych związków (w buforze o pH 7.0). Stężenie roztworów jest znane i odpowiednie do rejestracji widm przy użyciu dostępnych spektrofotometrów. Wszystkie widma będą rejestrowane dla roztworów umieszczonych w kuwetach kwarcowych o długości drogi optycznej 1 cm. Objętość badanego roztworu w kuwecie powinna być równa 2 ml. Ćwiczenie wykonywane jest na spektrofotometrze dwuwiązkowym pracującym w zakresie promieniowania UV-VIS (Varian 50Bio), spektrofluorymetrze steady-state (FluoroMax) oraz wysokiej rozdzielczości czasowej Chronos (ISS).

Wykonanie ćwiczenia:

1. Zapoznanie się ze spektrometrem absorpcyjnym pracującym w zakresie promieniowania UV-VIS, spektrofluorymetrem steady-state (FluoroMax) oraz spektrofluorymetrem wysokiej rozdzielczości czasowej Chronos (ISS).
2. Sprawdzenie przepuszczalności stosowanego 20mM buforu hepes (pH 7) i kuwet kwarcowych czyli rejestracja ich widm w zakresie 200-600 nm.
3. Rejestracja widm absorpcyjnych roztworów tyrozyny, tryptofanu, LADH i NADH w zakresie 200-600 nm (zdolność rozdzielcza spektrofotometru 1 nm).

4. Rejestracja zaników emisji fluorescencji w roztworze wodnym, w którym lepkość zmniejszała się przy wzroście temperatury, jeżeli lepkość ta dla poszczególnych temperatur wynosi $\eta = 1.13 \cdot 10^{-3} \text{ kg m}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ($T = 15.4 \text{ }^\circ\text{C}$), $\eta = 10^{-3} \text{ kg s}^{-1} \cdot \text{m}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ($25 \text{ }^\circ\text{C}$) i $\eta = 0.37 \cdot 10^{-3} \text{ kg m}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ($T = 44.4 \text{ }^\circ\text{C}$).
5. (Stałe fizyczne: $N_A = 6.022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$, $R = 8.314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$, $k_B = 1.38 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$)
6. Po rejestracji wszystkich widm pliki należy przesłać na własne konto pocztowe lub przegrać na własny pendrive. W przypadku plików rejestrowanych przez niektóre spektrofotometry konieczna jest konwersja plików do formatu tekstowego.

V. Raport z wykonanego ćwiczenia

W opisie ćwiczenia należy uwzględnić *Wstęp*, w którym mogą być omówione ogólne zagadnienia spektroskopii absorpcyjnej i emisyjnej, mające związek z wykonywanym zadaniem, oraz *Materiały i metody*, w których należy przedstawić stosowaną aparaturę, badane związki i warunki pomiarów. Następnie, w części *Wyniki i Dyskusja* należy przedstawić, opisać i zinterpretować zarejestrowane widma absorpcji, zaniki emisji fluorescencji i wykonane obliczenia czasów zaniku emisji fluorescencji.

1. Interpretacja widma kontrolnego kuwety i rozpuszczalnika (wody, buforu). Dlaczego musimy używać kuwety kwarcowej a nie szklanej ?
2. Analiza zależności zarejestrowanych widm absorpcyjnych od budowy cząsteczek, tj. porównanie widm aminokwasów aromatycznych i widma białka.
3. Jakie są charakterystyczne długość fali absorpcji dla białek i ich składników?
4. Analiza zaniku roztworów tyrozyny, tryptofanu, LADH i NADH.

VI. Literatura

JR Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*

Z. Kęcki, *Podstawy spektroskopii molekularnej*

G. Barrow, *Wstęp do spektroskopii molekularnej*

Praca zbiorowa pod redakcją W. Zielińskiego i A. Rajcy *Metody spektroskopowe i ich zastosowanie do identyfikacji związków organicznych*

J. A. Barltrop i J. D. Coyle, *Fotochemia, podstawy*

P. Kowalczyk *Fizyka cząsteczek*

J. Sadlej *Spektroskopia molekularna*

J. Fisher, J.R.P. Arnold *Chemia dla biologów, krótkie wykłady*

B.D. Hames, N.M. Hooper *Biochemia, krótkie wykłady*

A także, w razie potrzeb:

H. Haken, H. C. Wolf, *Fizyka molekularna z elementami chemii kwantowej*

H. A. Staab, *Wstęp do teoretycznej chemii organicznej*

W. Kołos, *Chemia kwantowa*

J. Simons, *Fotochemia i spektroskopia*

L. A. Kazicyna i N. B. Kupletska, *Metody spektroskopowe wyznaczania struktury związków organicznych*



KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY



Projekt Fizyka wobec wyzwań XXI wieku współfinansowany ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego