

Biofizyka

(1100-114BFIZ11)

Jan M. Antosiewicz

**Zakład Biofizyki
Instytut Fizyki Doświadczalnej
Wydział Fizyki**

Wykład 8

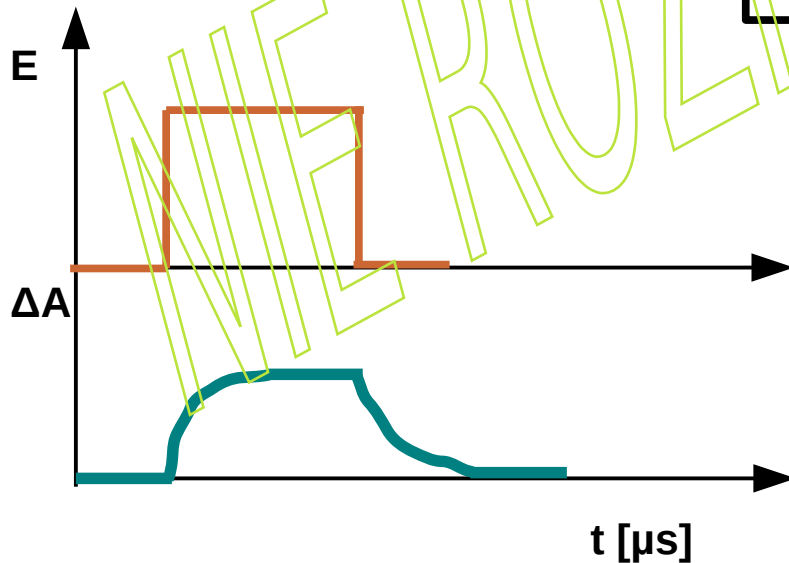
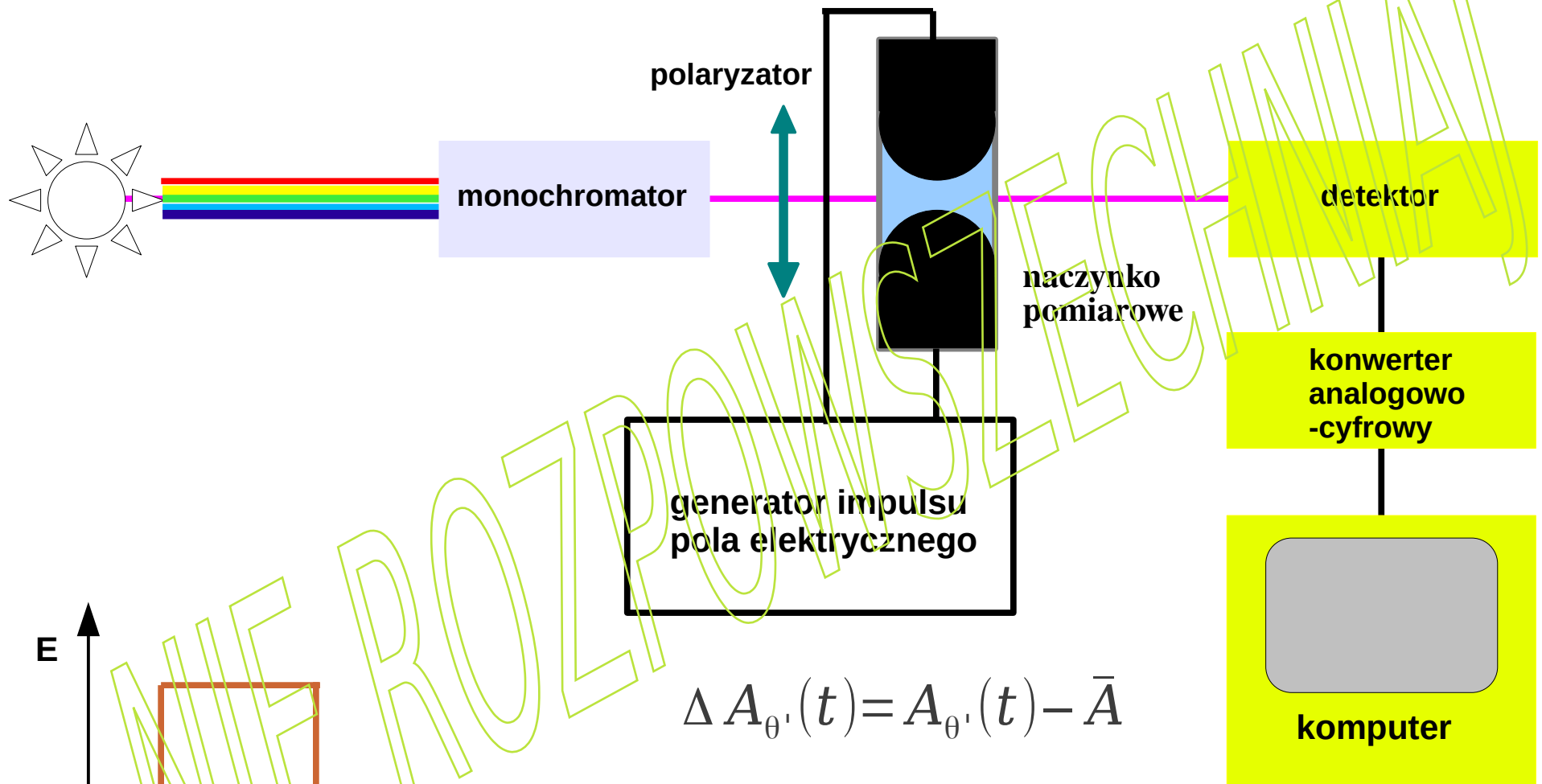
8 kwietnia, 2025

Kinetyka biomolekularna (cz. 4)

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

jantosi@fuw.edu.pl

Spektroskopia skoku pola elektrycznego (TED – transient electric dichroism)



$$\Delta A_{\theta'}(t) = A_{\theta'}(t) - \bar{A}$$

Dichroizm: zależność absorpcji światła spolaryzowanego liniowo od orientacji polaryzacji względem amateriału absorbującego.

Dichroizm liniowy (LD): różnica między absorpcją światła spolaryzowanego równolegle i spolaryzowanego prostopadle do osi orientacji.

Dichroizm elektryczny: dichroizm liniowy powstający w wyniku przyłożenia pola elektrycznego.

Przejściowy dichroizm elektryczny: przejściowy dichroizm liniowy powstający w wyniku przyłożenia impulsu pola elektrycznego.

Dla światła rozchodzącego się wzdłuż osi Oy, $\varphi'=0$ i średnią absorpcję otrzymuje się z uśrednienia po wszystkich kątach φ :

$$\int A(\theta, \theta', \phi) d\phi = \frac{K}{2\pi} \int_0^{2\pi} \cos^2 \gamma d\phi$$

gdzie K jest stałą współczynnikiem proporcjonalności, a 2π jest dodane w celach normalizacji. Zatem

$$A(\theta, \theta') = K \left(\cos^2 \theta \cos^2 \theta' + \frac{1}{2} \sin^2 \theta \sin^2 \theta' \right)$$

Gdy cząsteczki są doskonale zorientowane względem zewnętrznego pola elektrycznego, absorpcja A jest funkcją orientacji płaszczyzny polaryzacji padającego światła θ' i orientacji wektora momentu przejścia θ . Obliczenie pierwszej pochodnej A względem θ' daje ekstrema A dla $\theta' = 0^\circ$ i $\theta' = 90^\circ$, niezależnie od kąta θ :

$$\frac{\partial A(\theta, \theta')}{\partial \theta'} = K \cdot \sin \theta' \cos \theta' (\sin^2 \theta - 2 \cos^2 \theta) \quad \frac{\partial A(\theta, \theta')}{\partial \theta'} = 0 \Rightarrow \theta' = 0 \vee \theta' = \frac{\pi}{2}$$

Dla $\theta'=0$ mamy:

$$A(\theta, 0) = K \cdot \cos^2 \theta \equiv A_{\parallel}$$

i dla $\theta'=90$ mamy:

$$A(\theta, \pi/2) = \frac{1}{2} K \cdot \sin^2 \theta \equiv A_{\perp}$$

zatem, zachowując jedynie jawną zależność A od kąta θ' , możemy zapisać:

$$A(\theta, \theta') = K \cdot \left(\cos^2 \theta \cos^2 \theta' + \frac{1}{2} \sin^2 \theta \sin^2 \theta' \right) \Rightarrow A(\theta') = A_{\parallel} \cdot \cos^2 \theta' + A_{\perp} \cdot \sin^2 \theta'$$

niezależnie od kąta θ , czyli niezależnie od aktualnej orientacji cząsteczek w naczynku pomiarowym względem kierunku pola zewnętrznego (obowiązuje tylko wtedy, gdy pole nie powoduje żadnych zmian chemicznych)

Możemy obliczyć średnią absorpcję (współczynnik $\frac{1}{2}$ to współczynnik normalizacji, $\int_0^{\pi} \sin \theta' d\theta' = 2$):

$$\bar{A} = \frac{1}{2} \int_0^{\pi} (A_{\parallel} \cdot \cos^2 \theta' + A_{\perp} \cdot \sin^2 \theta') \sin \theta' d\theta' = \frac{A_{\parallel} + 2 A_{\perp}}{3}$$

Możemy sprawdzić, że:

$$\frac{A_{\parallel} + 2 A_{\perp}}{3} = \frac{K \cdot \cos^2 \theta + 2 \cdot \frac{1}{2} \cdot K \cdot \sin^2 \theta}{3} = \frac{K}{3}$$

Liniowy dichroizm jest zdefiniowany jako:

$$LD = A_{\parallel} - A_{\perp}$$

W eksperymentach elektrooptycznych $\parallel$ oraz $\perp$ oznaczają równoległy i prostopadły do kierunku zewnętrznego pola elektrycznego. Ogólnie rzecz biorąc, nie mierzymy bezpośrednio dichroizmu elektrycznego, ale w rzeczywistości mierzymy:

$$\Delta A_{\theta'}(t) = A_{\theta'}(t) - \bar{A}$$

wybierając często $\theta' = 0^\circ$. Korzystając ze wzoru na średnią absorpcję z poprzedniego slajdu, obowiązującego, gdy pole elektryczne nie powoduje zmian chemicznych w roztworze, mamy:

$$\Delta A_{\parallel} = A_{\parallel} - \bar{A} = 3\bar{A} - 2A_{\perp} - \bar{A} = -2(A_{\perp} - \bar{A}) = -2\Delta A_{\perp}$$

Ponadto: $\Delta A_{\theta'}(t) = A_{\parallel}(t) \cdot \cos^2 \theta' + A_{\perp}(t) \cdot \sin^2 \theta' - \bar{A}$ $\left(\bar{A} = \frac{A_{\parallel} + 2A_{\perp}}{3} \Rightarrow A_{\perp} = \frac{3\bar{A} - A_{\parallel}}{2} \right)$

$$\Delta A_{\theta'}(t) = A_{\parallel}(t) \cdot \cos^2 \theta' + \frac{3\bar{A} - A_{\parallel}(t)}{2} \cdot \sin^2 \theta' - \bar{A}$$

$$\Delta A_{\theta'}(t) = \frac{2A_{\parallel}(t) \cdot \cos^2 \theta' + (3\bar{A} - A_{\parallel}(t)) \cdot \sin^2 \theta' - 2\bar{A}}{2}$$

$$\Delta A_{\theta'}(t) = \frac{2A_{\parallel}(t) \cdot \cos^2 \theta' + (3\bar{A} - A_{\parallel}(t)) \cdot (1 - \cos^2 \theta') - 2\bar{A}}{2}$$

$$\Delta A_{\theta'}(t) = \frac{2A_{\parallel}(t) \cdot \cos^2 \theta' + 3\bar{A} \cdot (1 - \cos^2 \theta') - A_{\parallel}(t) \cdot (1 - \cos^2 \theta') - 2\bar{A}}{2}$$

$$\Delta A_{\theta'}(t) = \frac{(A_{\parallel}(t) - \bar{A}) \cdot (3\cos^2 \theta' - 1)}{2}$$

$$\Delta A_{\theta'}(t) = \frac{\Delta A_{\parallel}(t)}{2} \cdot (3\cos^2 \theta' - 1)$$

$$3\cos^2 \theta' - 1 = 0 \Rightarrow \theta' = 54.8^\circ$$

wyłącznie efekty "fizyczne" gdy:

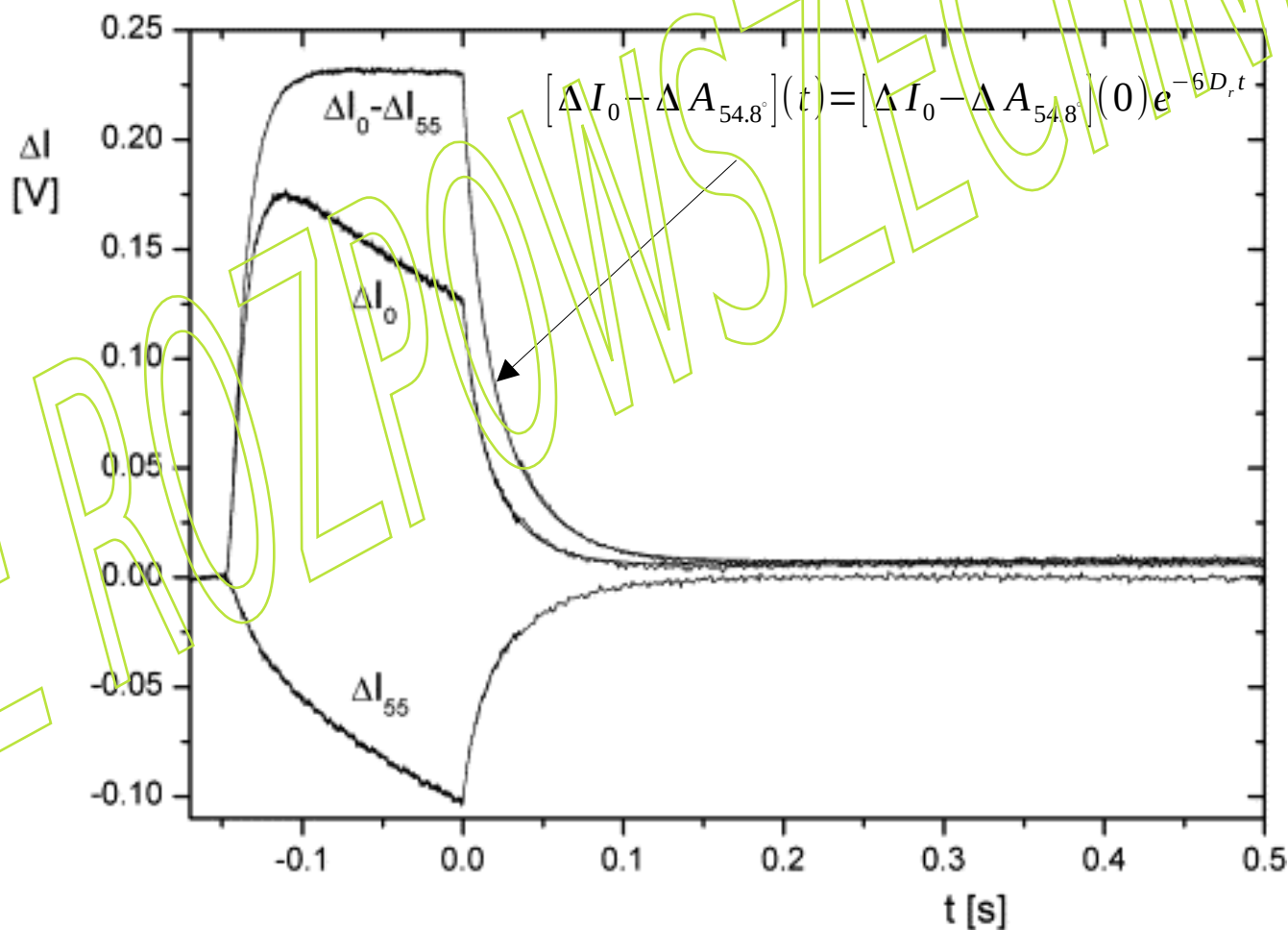
$$\Delta A_{\parallel} = -2\Delta A_{\perp}$$

$$\Delta A_{54.8^\circ}(t) = 0$$

Gdy:

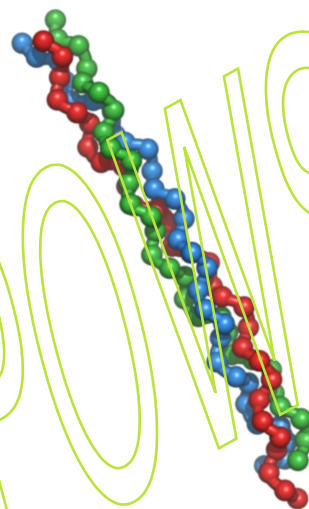
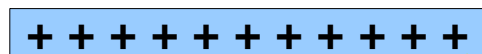
$$\Delta A_{54.8^\circ}(t) \neq 0$$

pole elektryczne inicjuje w cząsteczkach przemiany strukturalne i/lub chemiczne i można te przemiany badać metodą skoku pola elektrycznego używając światła spolaryzowanego liniowo pod powyższym kątem względem kierunku zewnętrznego pola elektrycznego.



Przejściowy liniowy dichroizm elektryczny bez wkładu od procesów “chemicznych”

$$\Delta A_{\parallel}(t) = \Delta A_{\parallel}(0) \cdot \exp(-6 D_r t)$$



Współczynnik dyfuzji rotacyjnej cylindra o długości L i promieniu r :

$$D_r = \frac{3kT}{\pi \eta L^3} \left[\ln\left(\frac{L}{r}\right) - 1.45 + 7.5 \left(\left(\ln\left(\frac{L}{r}\right) \right)^{-1} - 0.27 \right)^2 \right]$$

Kinetyka konwersji DNA B do A w eksperymentach skoku pola elektrycznego:

Dynamics of the B-A transition of DNA double helices

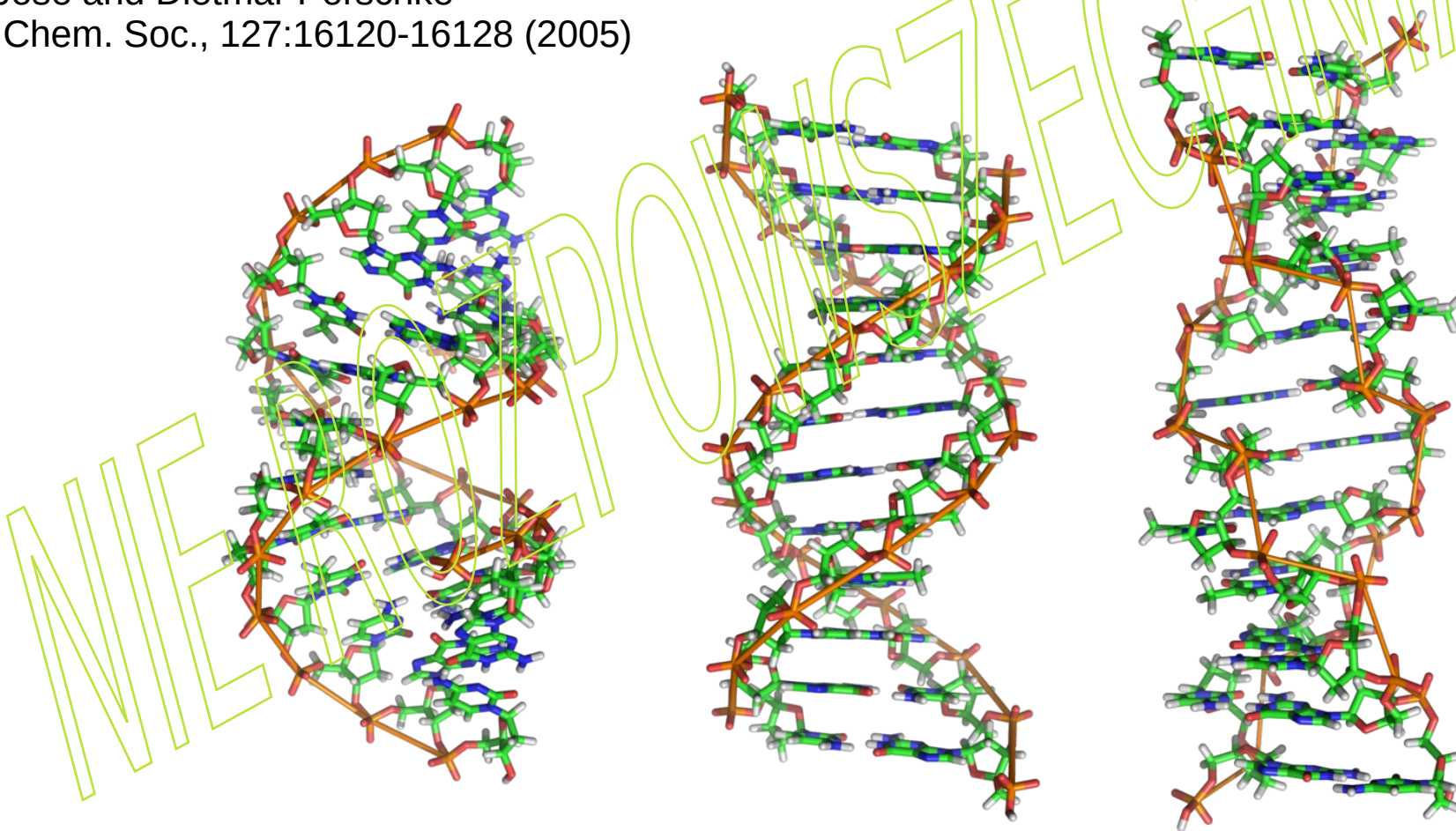
Davis Jose and Dietmar Porschke

Nucleic Acids Research, 32:2251-2258 (2004)

The Dynamics of the B-A Transition of Natural DNA Double Helices

Davis Jose and Dietmar Porschke

J. Am. Chem. Soc., 127:16120-16128 (2005)



Od lewej do prawej struktury DNA A, B i Z.

Motywacja podjęcia badań

Przejście pomiędzy standardową formą B podwójnych helis DNA a formą A zaobserwowano podczas pierwszych badań rentgenowskich.

Minęło pięćdziesiąt lat, a dynamika tego przejścia nadal nie została scharakteryzowana, mimo że wiadomo, że przejście B-A jest niezbędne do przetwarzania informacji genetycznej, m.in. podczas transkrypcji.

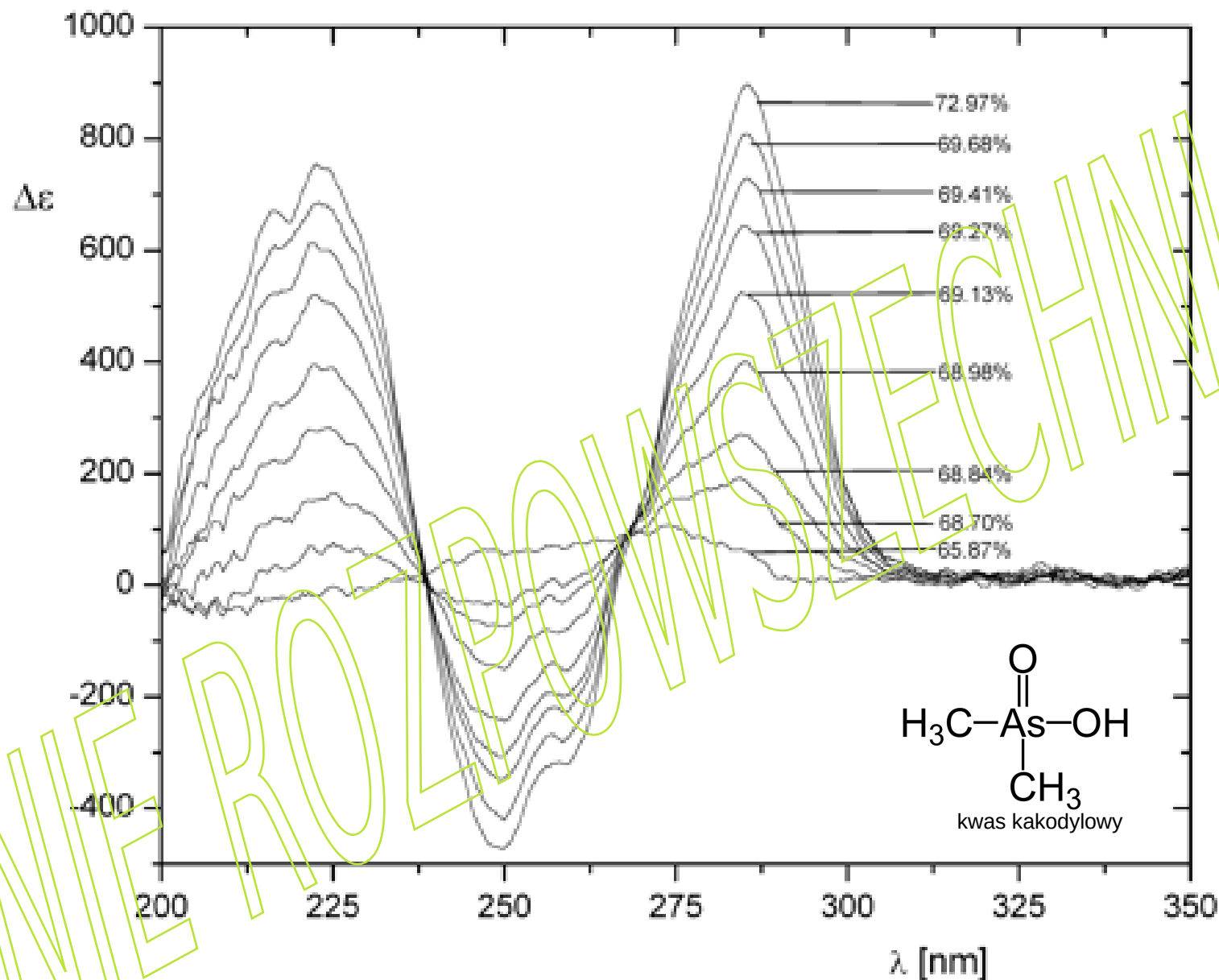
Jones, S., van Heyningen, P., Berman, H.M. and Thornton, J.M. (1999) Protein-DNA interactions: A structural analysis. *J. Mol. Biol.*, 287, 877-896.

Lu, X.J., Shakked, Z. and Olson, W.K. (2000) A-form conformational motifs in ligand-bound DNA structures. *J. Mol. Biol.*, 300, 819-840.

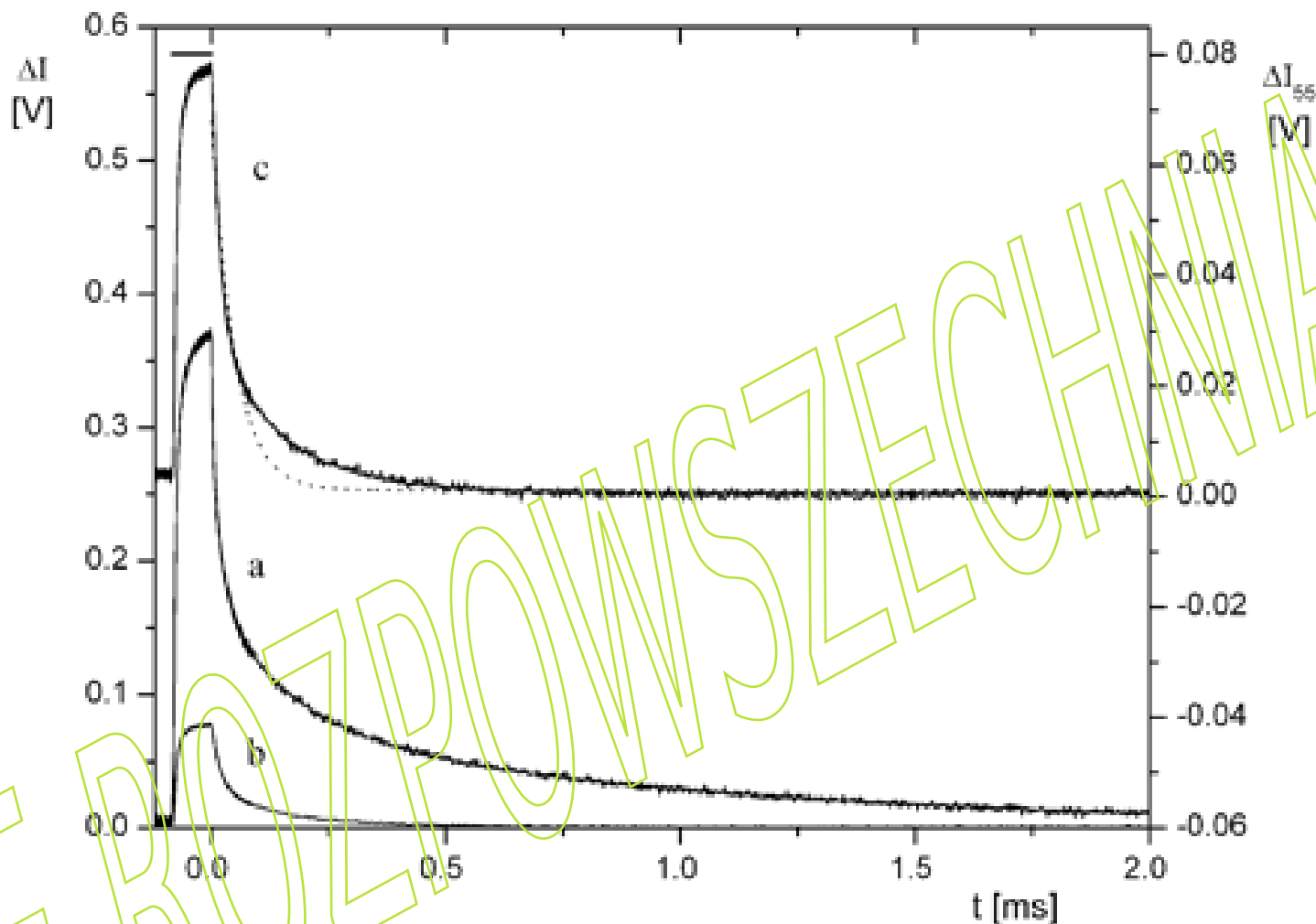
Kiefer, J.R., Mao, C., Braman, J.C. and Beese, L.S. (1998) Visualizing DNA replication in a catalytically active *Bacillus* DNA polymerase crystal. *Nature*, 391, 304-307.

Jacobo-Molina, A., Ding, J., Nanni, R.G., Clark, A.D., Jr, Lu, X., Tantillo, C., Williams, R.L., Kramer, G., Ferris, A.L., Clark, P., Hizi, A., Hughes, S.H. and Arnold, E. (1993) Crystal structure of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase complexed with double-stranded DNA at resolution 3.0 Å shows bent DNA. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 90, 6320-6324.

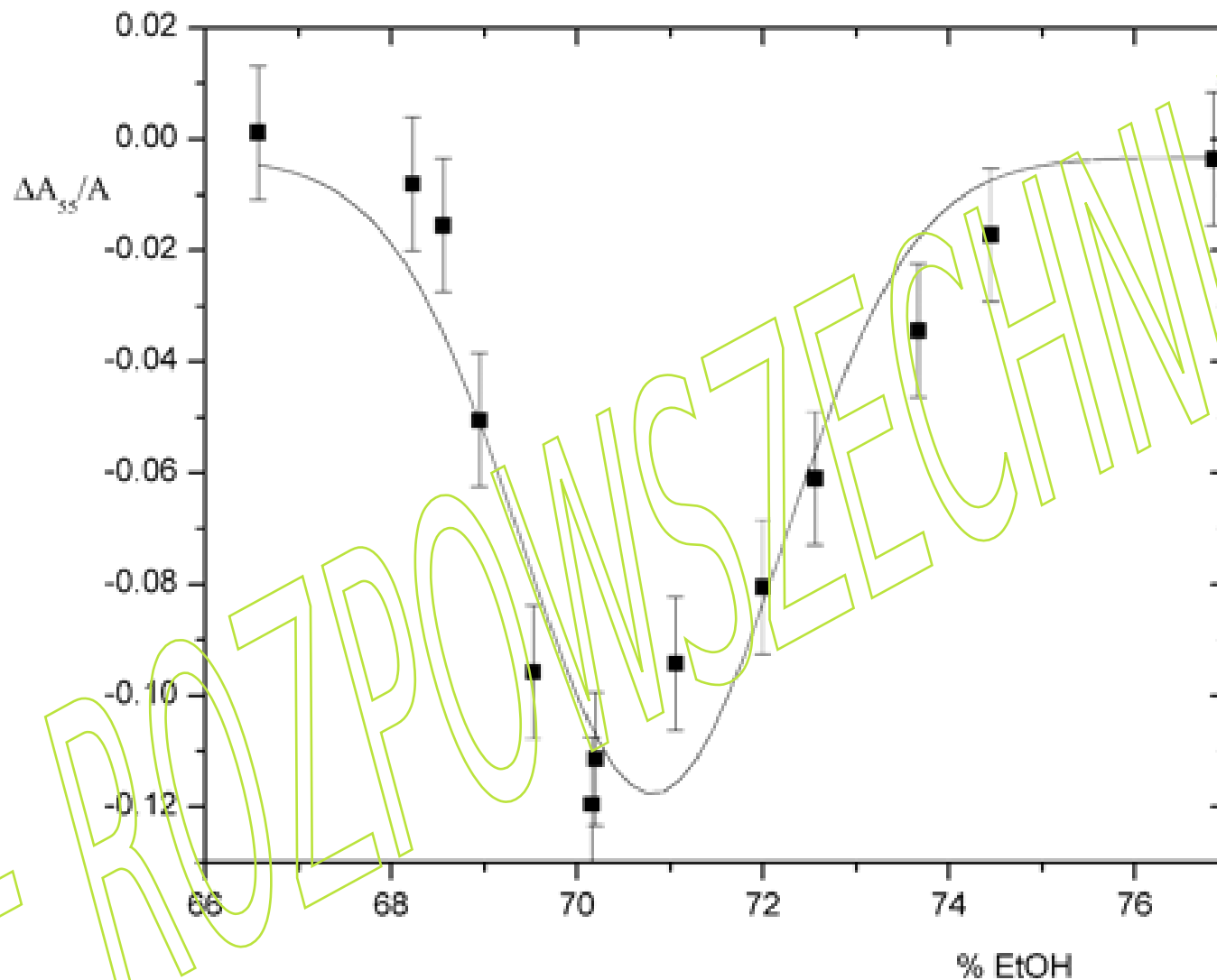
Cheatham, G.M.T. and Steitz, T.A. (1999) Structure of a transcribing T7 RNA polymerase initiation complex. *Science*, 286, 2305-2309.



Przejście B-A poli[d(A-T)] (średnia długość 1600 bp) śledzone poprzez widma różnicowe absorpcji przy różnych stężeniach etanolu. Widmo absorpcji zmierzone przy 51,68% etanolu odejmowano od widm absorpcji zmierzonych przy danym stężeniu etanolu. $\Delta\epsilon$ w $M^{-1}cm^{-1}$; % w jednostkach v/v; początkowe stężenia: 40 μM poly[d(A-T)], 125 μM NaCl, 125 μM bufor kakodylowy pH 7, 25 μM EDTA.

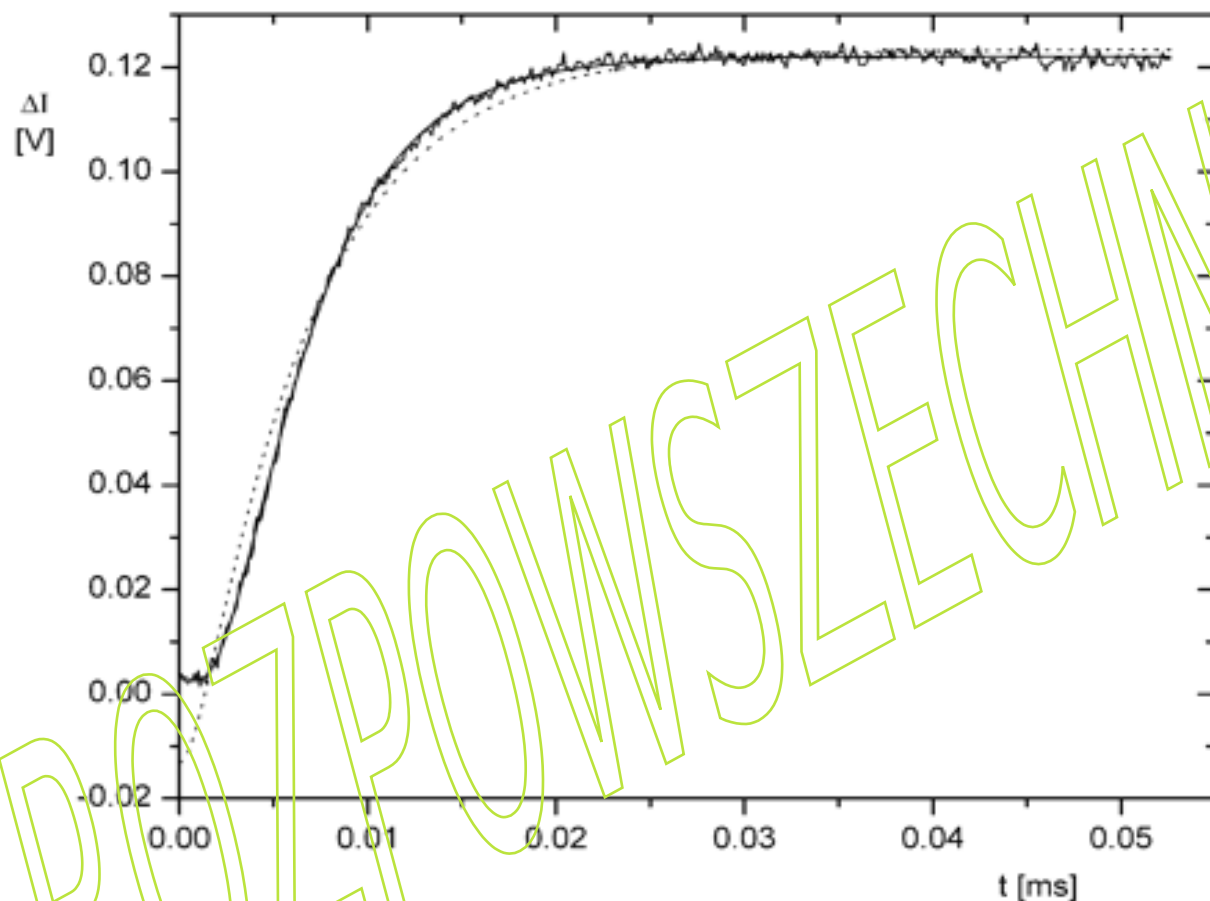


Zmiana transmisji ΔI przy 280 nm, wywołana skokiem pola E, dla poli[d(A-T)]. (a) Skorygowany dichroizm przejściowy ($\Delta I_0 - \Delta I_{55}$, lewa skala); (b) dichroizm przejściowy przy kącie magicznym (ΔI_{55} , średnia z pięciu strzałów, lewa skala); oraz (c) powiększony dichroizm przejściowy przy kącie magicznym (prawa skala). Kreska w lewym górnym rogu wskazuje czas trwania impulsu pola. Dopasowania metodą najmniejszych kwadratów zaniku sygnału przy kącie magicznym (c) przez sumę dwóch eksponensów (17,5 i 145 μ s przy amplitudach względnych odpowiednio 61 i 39%) oraz zaniku dichroizmu (a) przez sumę czterech eksponensów (2,25 μ s, 22,2 μ s, 165 μ s i 1 ms z amplitudami względnymi odpowiednio 22, 30, 27 i 21%) są nieodróżnialne od danych eksperymentalnych; jednoeksponecjalne dopasowanie (49 μ s) do zaniku sygnału przy kącie magicznym pokazano linią przerywaną. Warunki: 70.2% etanol v/v, 8°C, 8.5 μ M poly[d(A-T)], 75 μ M NaCl, 75 μ M bufor kakodylanowy, pH 7, 15 μ M EDTA; puls pola E 3.45×10^6 V/m.

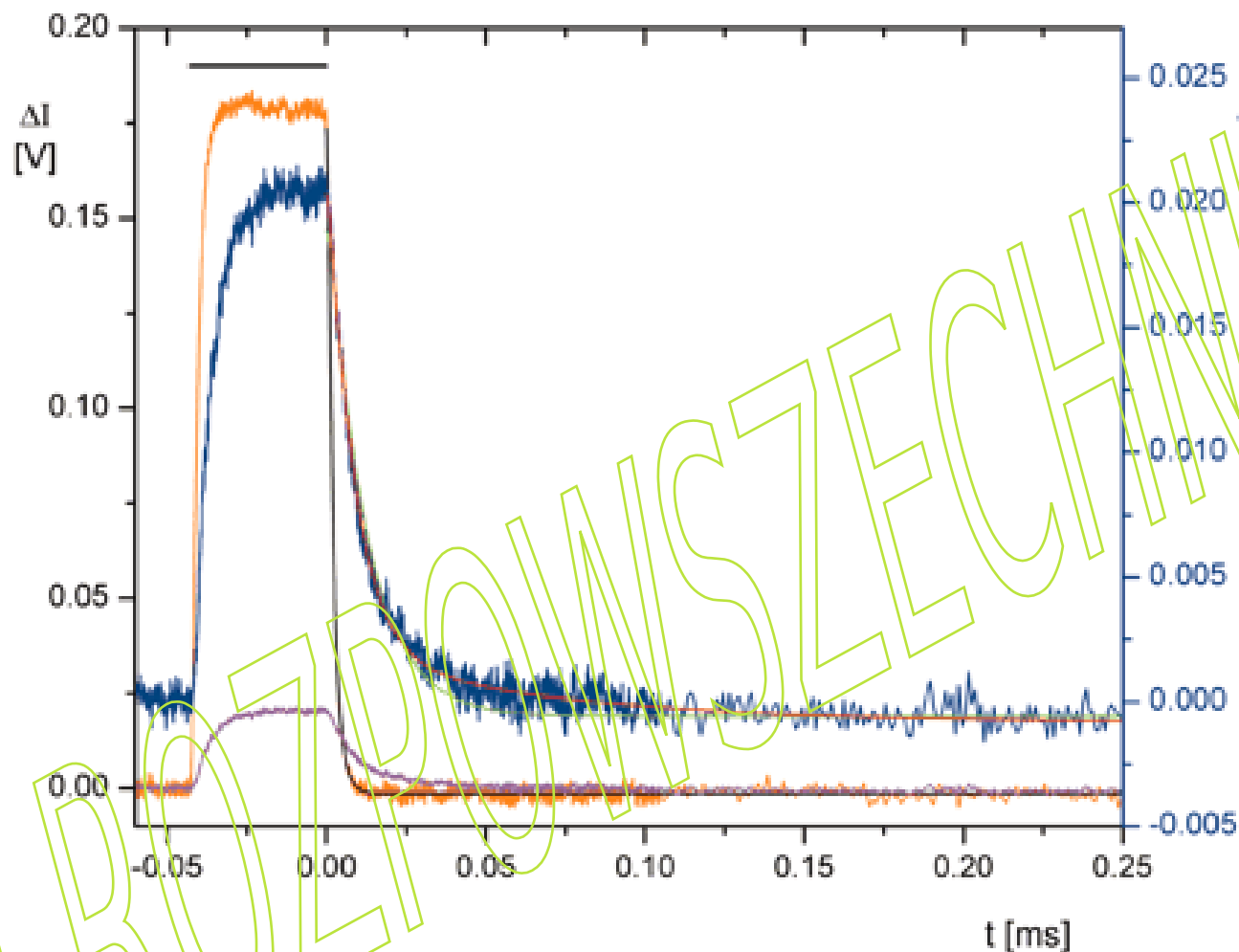


Względne amplitudy relaksacyjne sygnałów przejściowych rejestrowanych przy kącie magicznym, $\Delta A_{55}/A$ dla poly[d(A-T)] jako funkcje stężenia etanolu w procentach objętościowych %(v/v). Linia ciągła przedstawia fitowanie funkcji Gaussa. Warunki: 8°C, 8.5 μM poly[d(A-T)], 75 μM NaCl, 75 μM bufor kakodylanowy, pH 7, 15 μM EDTA; impuls pola E 3.45×10^6 V/m.

Preferencja formy B w obecności pola elektrycznego wskazuje, że helisy formy B mają większy efektywny moment dipolowy. Wiadomo, że momenty dipolowe DNA silnie rosną ze wzrostem długości helisy DNA. Przyrost długości helisy na parę zasad formy B-DNA (3.4 Å) jest znacznie większy niż przyrost na parę zasad w formie A-DNA (~2.8 Å).



Przesuwanie równowagi w stronę formy B przez pole elektryczne wynika z faktu, że moment dipolowy formy B jest większy niż moment dipolowy formy A. Interpretację tę potwierdza przedstawione na powyższym wykresie narastanie dichroizmu przy kącie magicznym dla poly[d(A-T)] indukowane przez impuls pola $3.7 \cdot 10^6$ V/m. Fit dwueksponencjalny daje 1.69 i 4.38 μ s, ze względnymi amplitudami -0.85 i 1.85 co świadczy o istnieniu okresu indukcji, odpowiadającemu początkowemu zerowemu nachyleniu krzywej dichroizmu względem osi x. Pierwszy eksponent opisuje narastanie momentu dipolowego, a drugi opisuje przejście A-B. Proces indukcji momentu dipolowego jest spleciony przejściem A→B, co w efekcie daje obserwowaną zależność dichroizmu od czasu.



Eksperymenty z krótkimi fragmentami DNA wykazujące, że w polu elektrycznym następuje zmiana długości: Indukowana przez pole zmiana transmisji światła w 280 nm dla poly[d(A-T)] o długości 70 par zasad, dla orientacji polaryzatora $\theta' = 0^\circ$ i 55° względem kierunku wektora pola E. Kreska w lewym górnym rogu pokazuje czas trwania impulsu pola E. Skorygowany dichroizm przejściowy ($\Delta I_0 - \Delta I_{55}$, pomarańczowy) z linią dopasowania sumy dwóch eksponensów (czarny, $\tau_1 = 0.83 \mu\text{s}$, $\tau_2 = 2.19 \mu\text{s}$, $A_1 = 61\%$, $A_2 = 39\%$); sygnał przejściowy przy kącie magicznym (ΔI_{55} , średnia z pięciu strzałów) jest pokazany zarówno przy tej samej skali jak sygnał skorygowanego dichroizmu (magenta, skala lewa) jak i powiększonej (niebieski, skala prawa) z dopasowaniem zaniku przez sumę dwóch eksponensów (czerwony, $\tau_1 = 8.25 \mu\text{s}$, $\tau_2 = 67.8 \mu\text{s}$, $A_1 = 87\%$, $A_2 = 13\%$) i jednego eksponensu (zielony). 70.4% ethanol (v/v), 8°C , $8.5 \mu\text{M}$ poly[d(A-T)], $75 \mu\text{M}$ NaCl, $75 \mu\text{M}$ kakodylan pH 7, $15 \mu\text{M}$ EDTA; impuls pola E $3.45 \times 10^6 \text{ V/m}$.

Pokazaliśmy, że

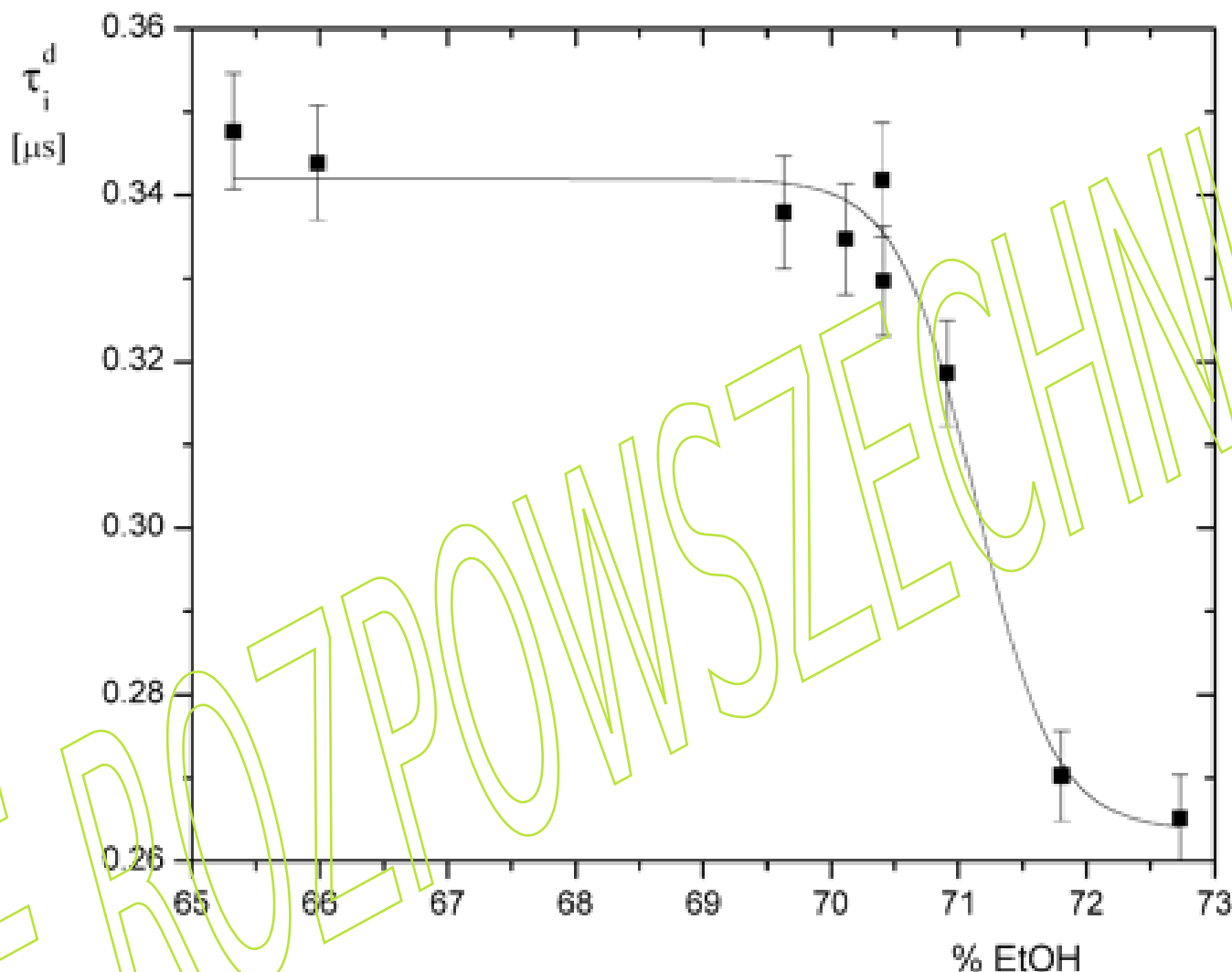
$$\tau \sim \frac{1}{D_r}$$

i

$$D_r \sim \frac{1}{L^3}$$

zatem

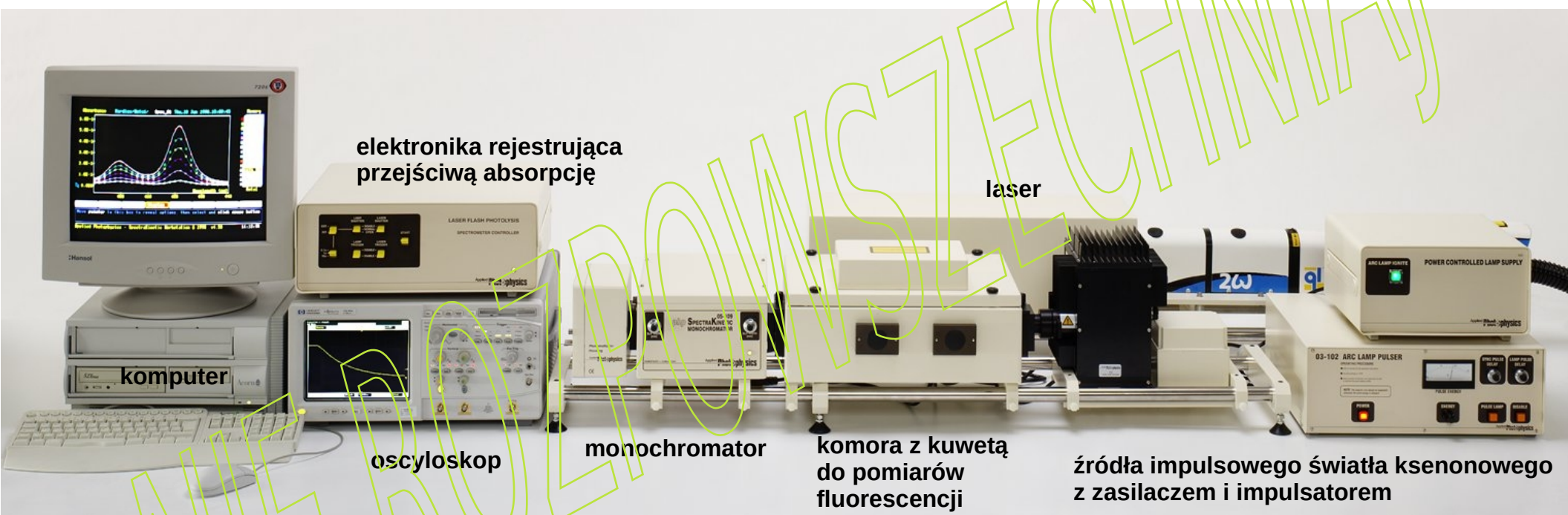
$$\tau \sim L^3$$



Wypadkowe stałe czasowe zaniku skorygowanego dichroizmu, τ_i , dla liczącego 70 par zasad poly[d(A-T)] jako funkcje stężenia etanolu (v/v), **poprawione na stan wody (lepkość)** w 20°C (75 μ M NaCl, 75 μ M kakodylan pH 7, 15 μ M EDTA; impuls pola E 3.45×10^6 V/m). τ_i był obliczony na podstawie parametrów z fitów dwueksponencjalnych, zgodnie z równaniem: $\tau_i = \tau_1 \cdot A_1 / (A_1 + A_2) + \tau_2 \cdot A_2 / (A_1 + A_2)$, gdzie τ_1 , τ_2 są czasami relaksacji a A_1 , A_2 amplitudami otrzymanymi z fitowania zaniku skorygowanego dichroizmu przejściowego (Rysunek na poprzednim slajdzie). Linia ciągła reprezentuje fit funkcji sigmoidalnej.

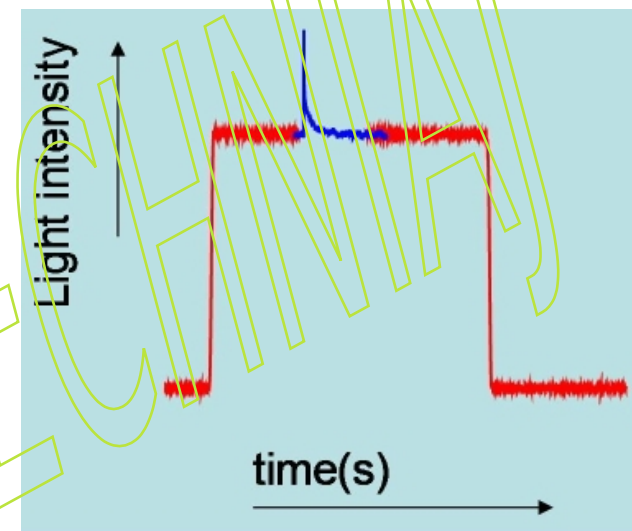
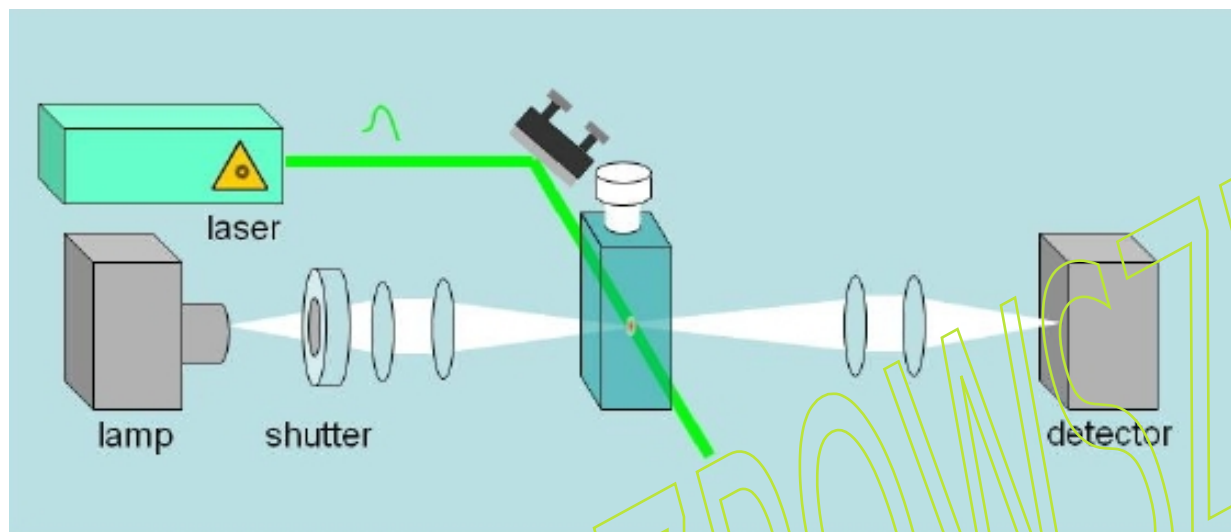
Fotoliza błyskowa

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.

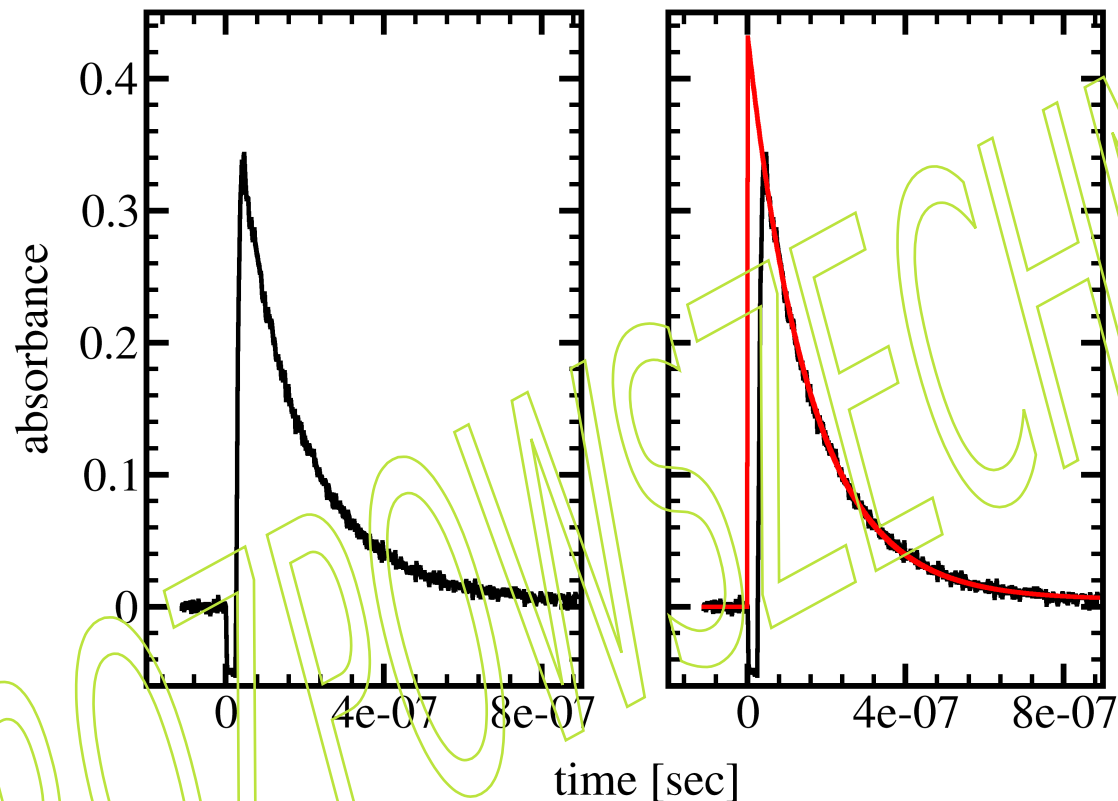
- Transfer energii triple-triplet.
- Uwolnienie związku w klatce inicjującego proces molekularny
- Reakcja chemiczna w stanie wzbudzonym



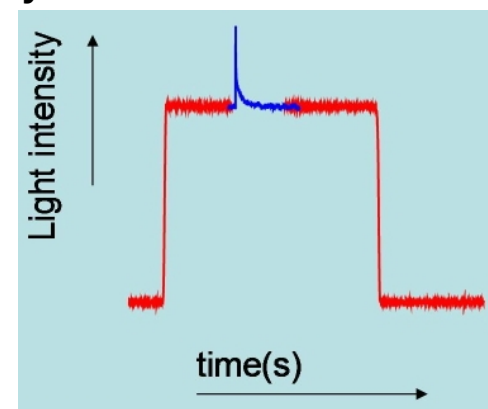
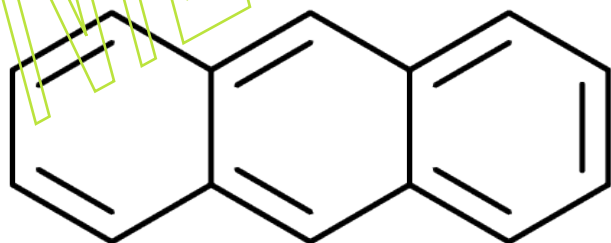
Podstawowy układ optyczny układu fotolizy z nanosekundową lampą błyskową lasera. Zmiany absorbancji, od milisekund do nanosekund, po wzbudzeniu za pomocą nanosekundowego lasera impulsowego monitoruje się za pomocą źródła światła ciągłego, takiego jak lampa łukowa Xe.

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.



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

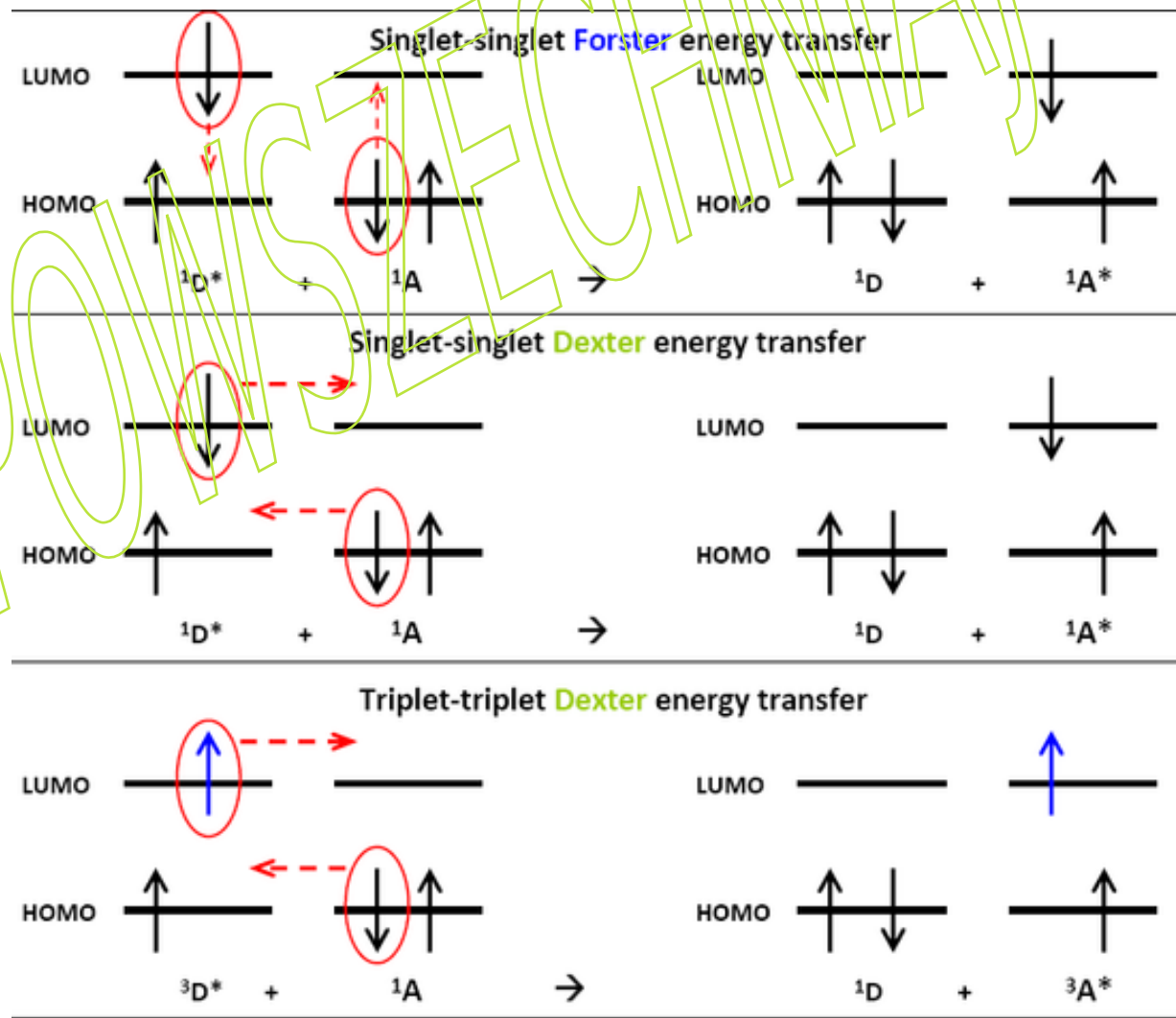


transfer energii triplet-triplet (TTET)

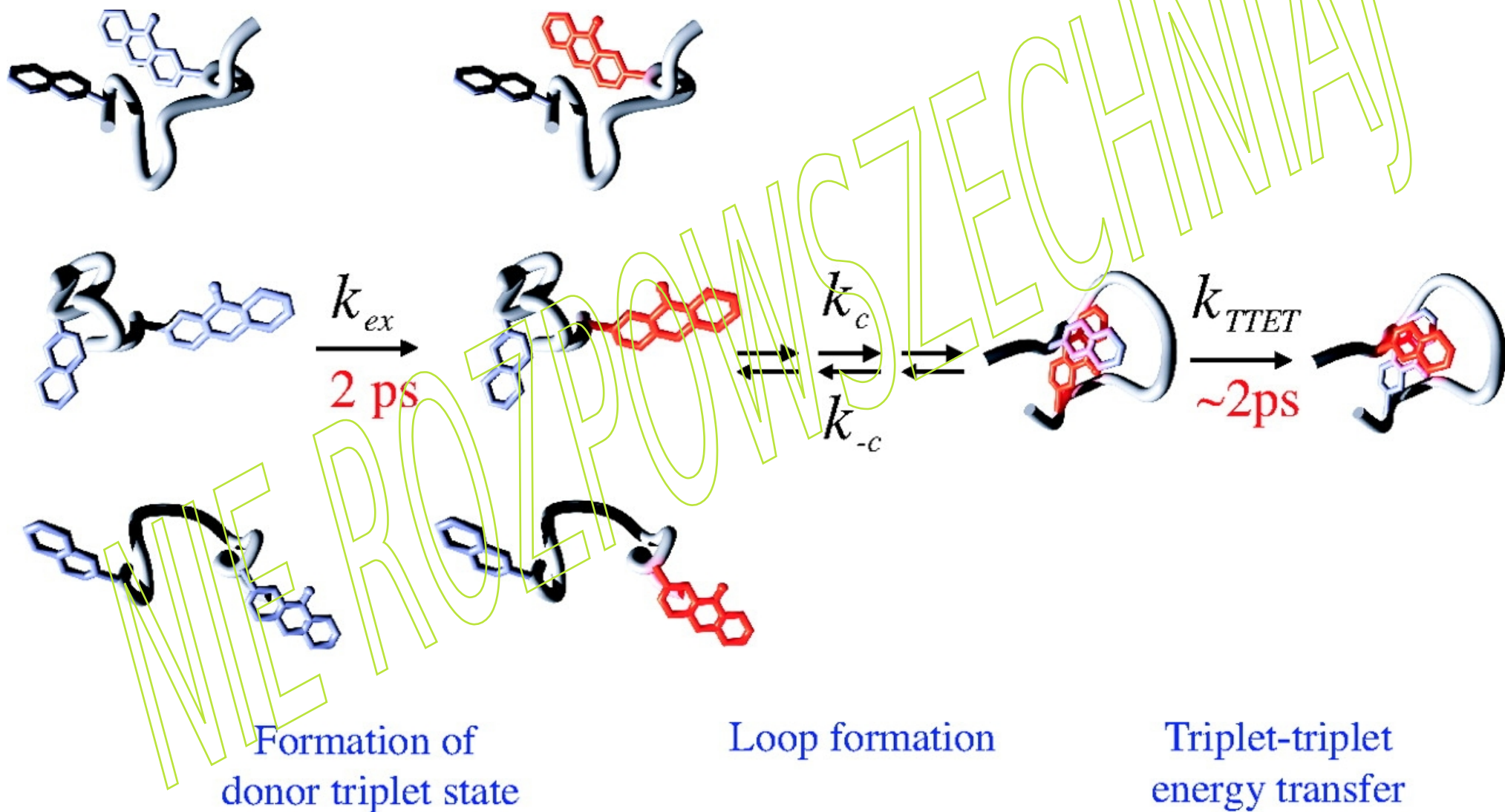
transfer energii z elektronicznie wzbudzonego donora trypletowego w prowadzący do wytworzenia elektronicznie wzbudzonego akceptora w jego stanie trypletowym (IUPAC Compendium of Chemical Terminology, wydanie 2 (1997)).

Transfer energii Dexter 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 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.

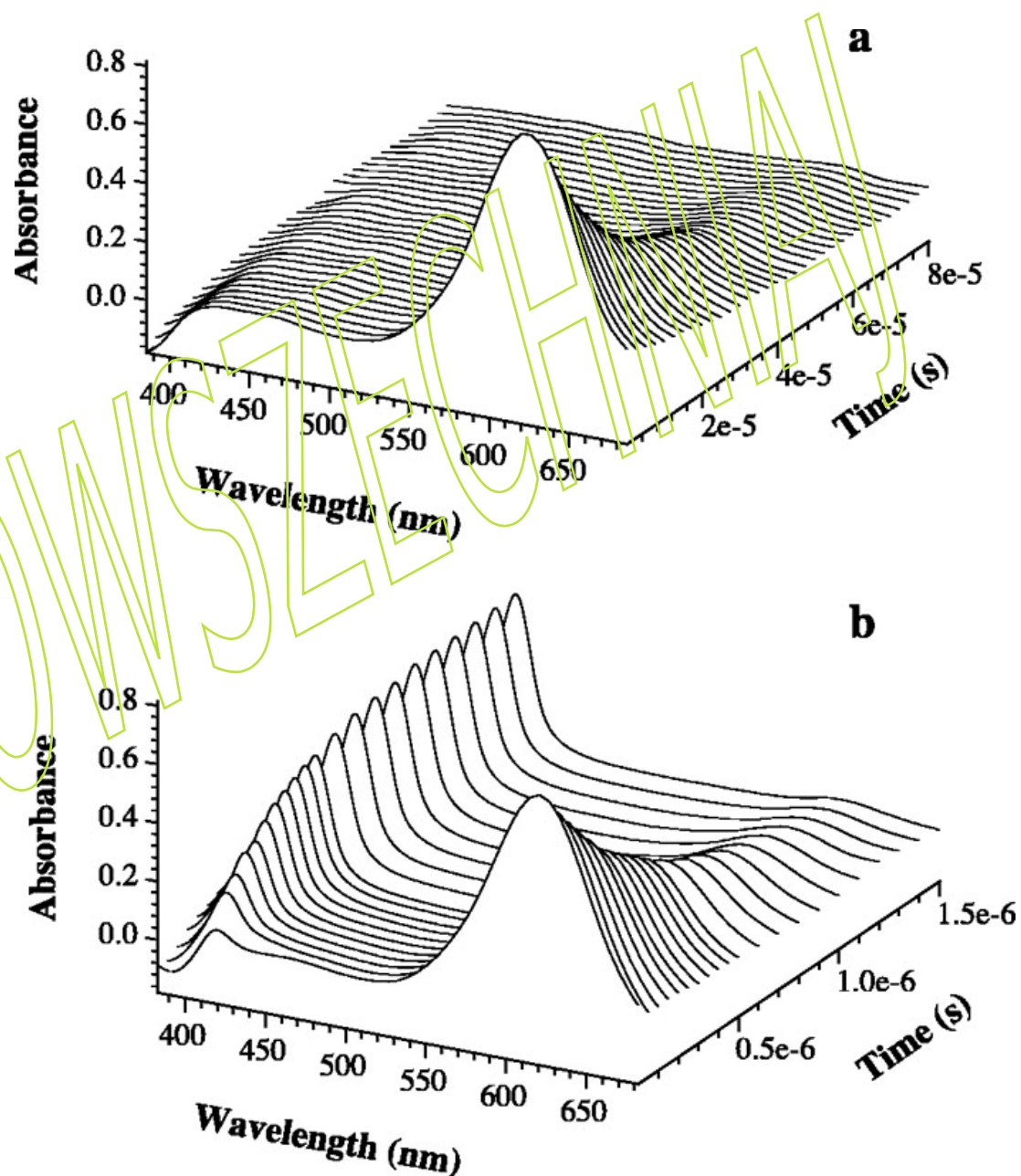
transfery energii

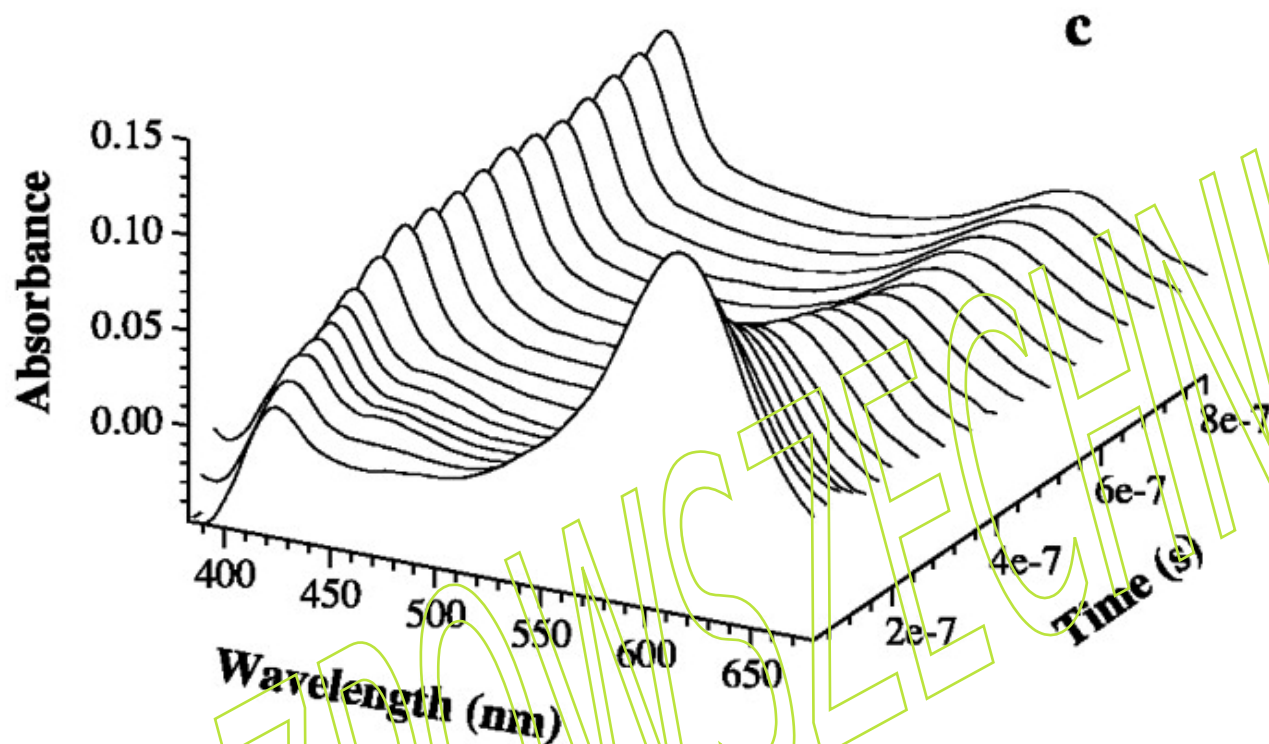


Badania dynamiki konformacyjnej peptydów i białek poprzez obserwację transferu energii triplet-triplet

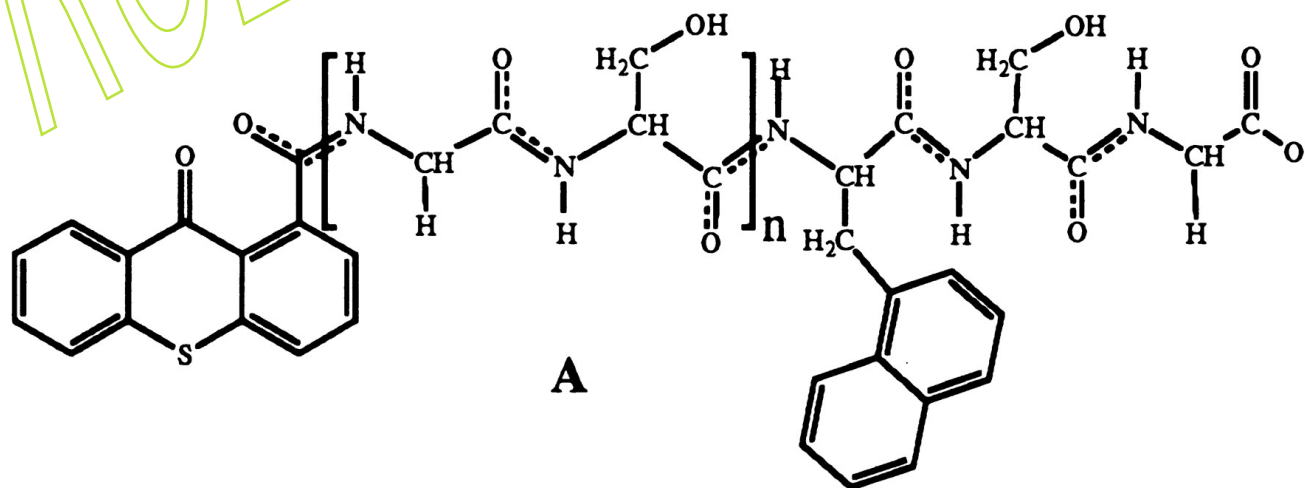


Widma absorbancji przejściowej tioksantonu (a) oraz mieszaniny tioksantonu i kwasu naftylooctowego (b) po selektywnym wzbudzeniu tioksantonu 20-ns impulsem lasera przy 351 nm. Stężenie tioksantonu w obu przypadkach wynosiło 86 μM . Populację trypletów donora (tioksantonu) i akceptora (1-naftyloalaniny) 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.

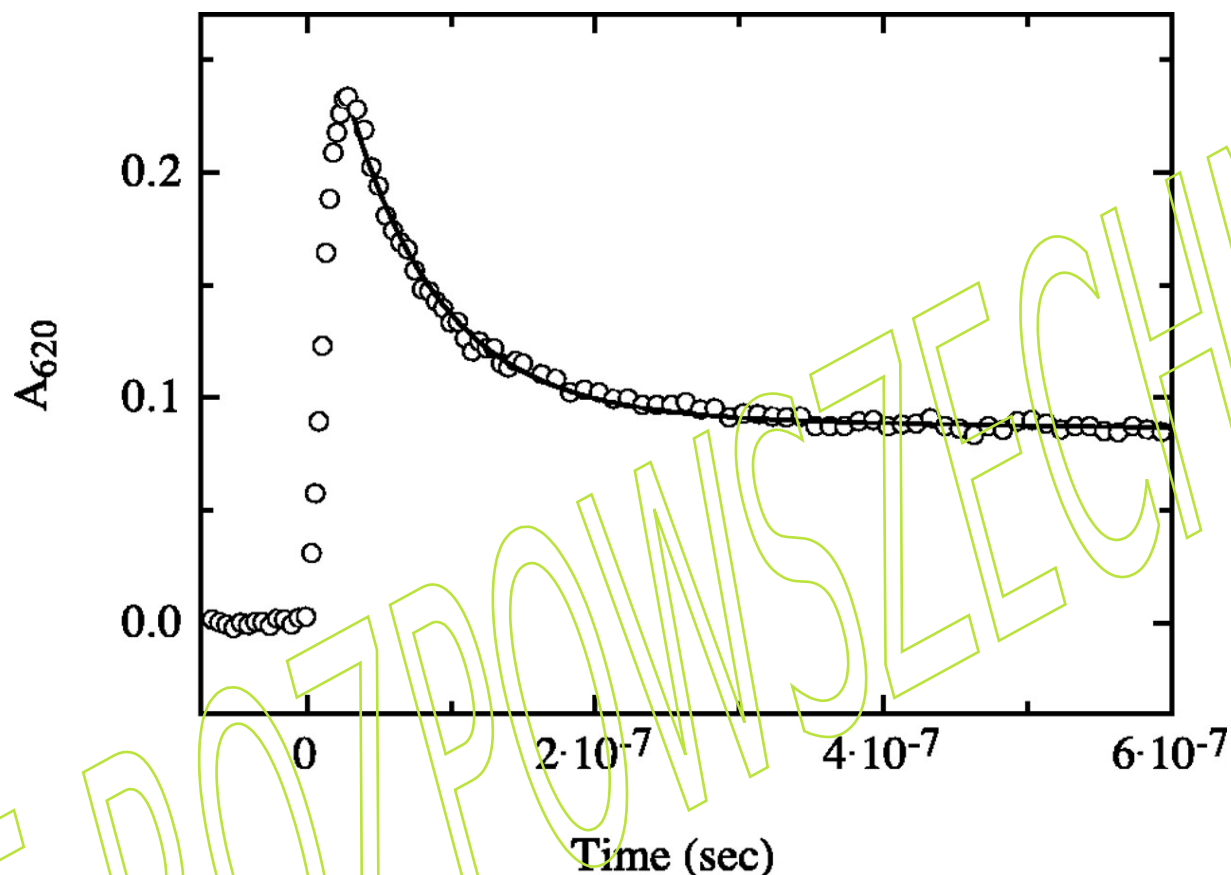




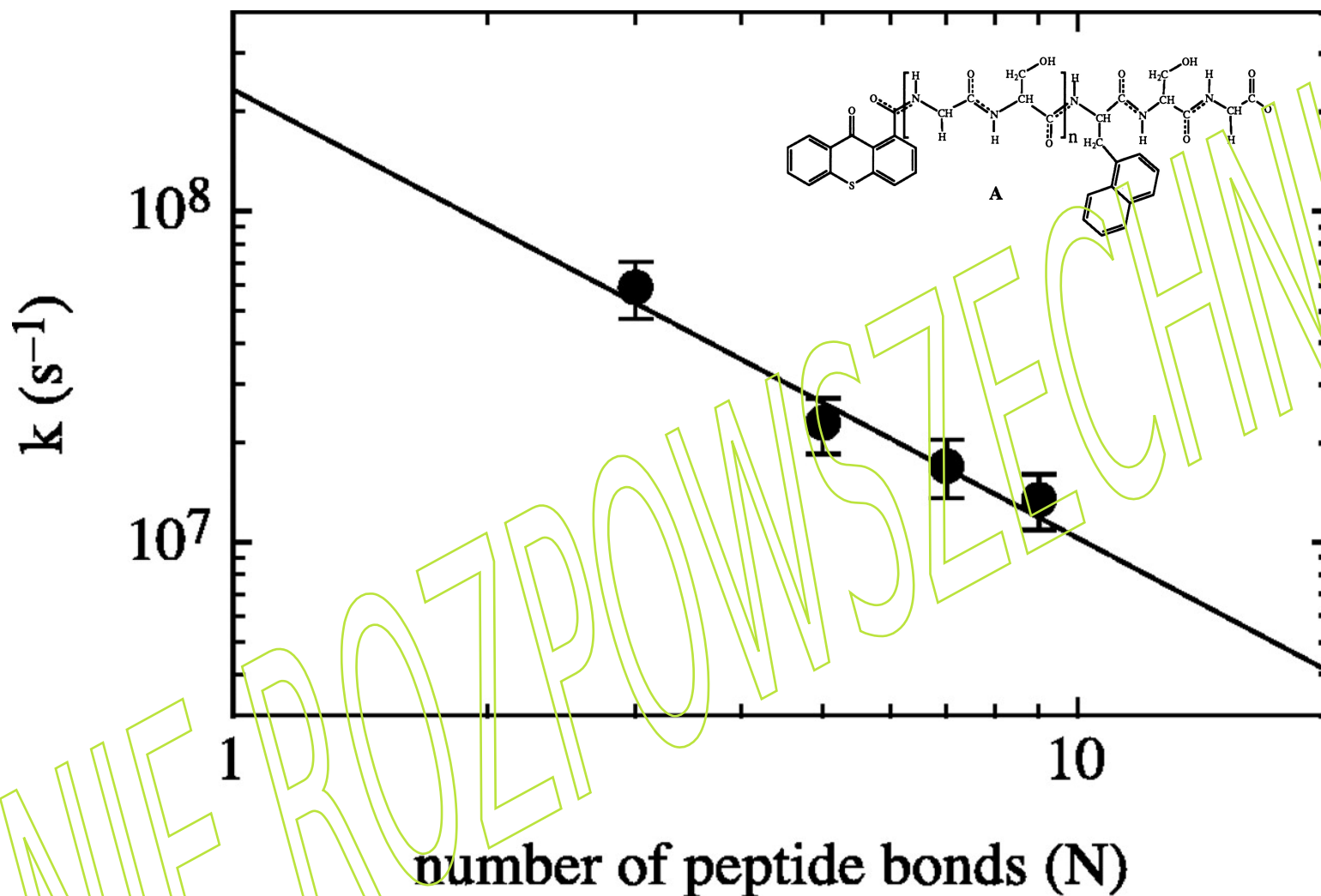
(c) pokazuje te same eksperymenty co część b, ale z chromoforami donora i akceptora przyłączonymi do łańcucha polipeptydowego [peptyd A ($n=4$)]. Doświadczenia przeprowadzono w etanolu. W przypadku transferu wewnątrzcząsteczkowego (c) roztwór zawierał 40% gliceryny. Spowalnia to tworzenie się kontaktu,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



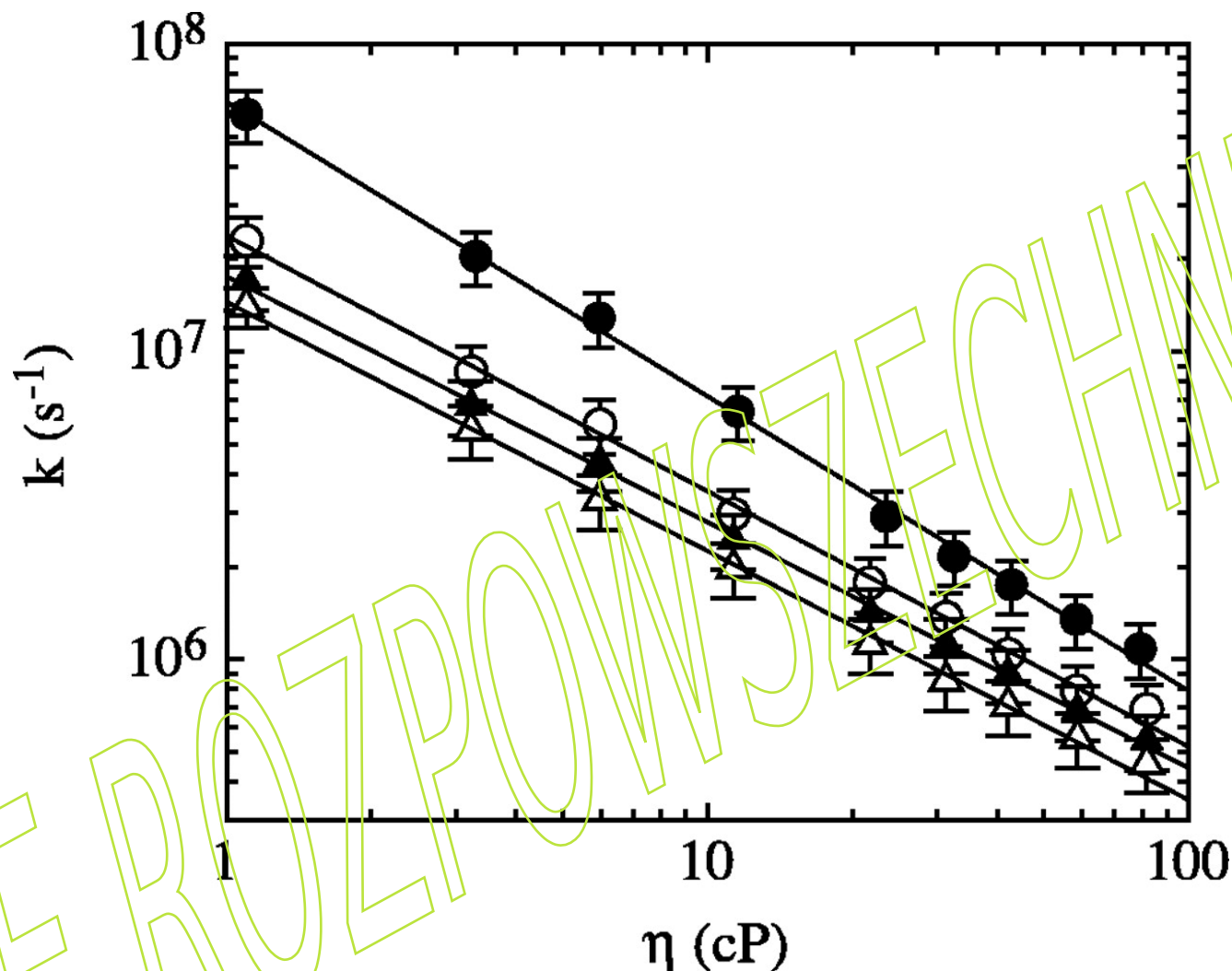
$[-\text{gly}-\text{ser}]_n$



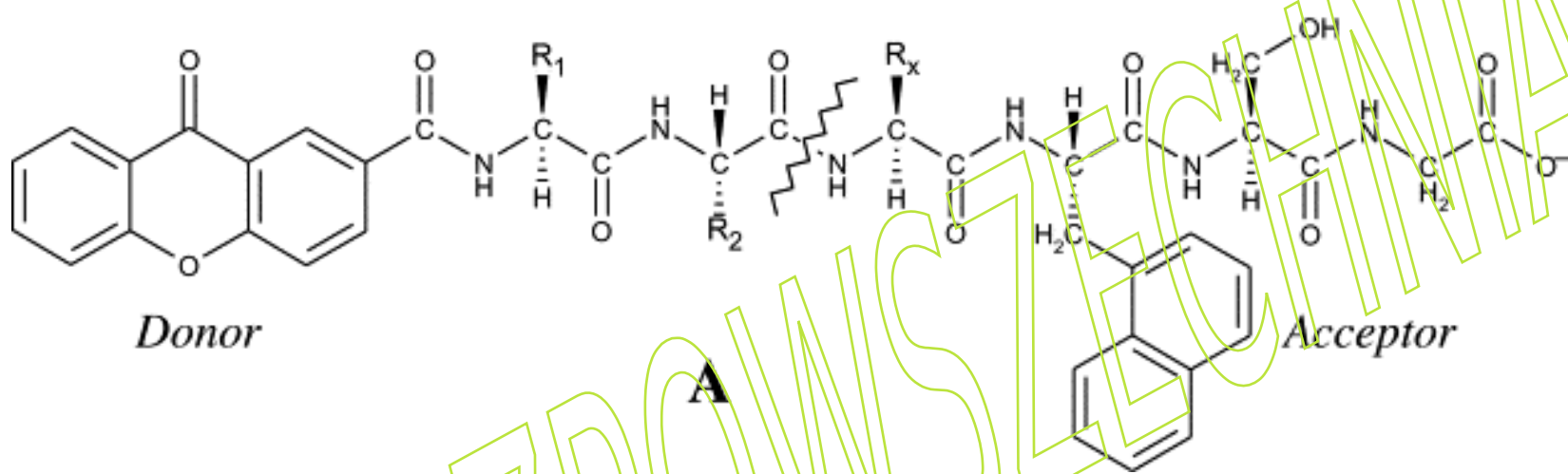
Przejęciowa absorbanca roztworu tioksantonu w peptydzie A(n=4) w etanolu. Impuls lasera był przyłożony w $t=0$. Zanik absorbancji trypletu tioksantonu w 620 nm ($\circ$) może być opisany jako proces jedno-eksponencjalny ze stałą szybkości $1.4 \pm 0.2 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$ (linia ciągła). Ponieważ wykazano, że wewnątrzcząsteczkowy proces transferu energii stanu trypletowego jest kontrolowany procesami dyfuzji, ta stała szybkości odpowiada szybkości wewnątrzłańcuchowej dyfuzji donora względem akceptora. Stężenie peptydu wynosiło $40 \mu\text{M}$. W tych warunkach, połowkowy czas życia trypletu tioksantonu w peptydach 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. Jednoekspencyjna 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 .

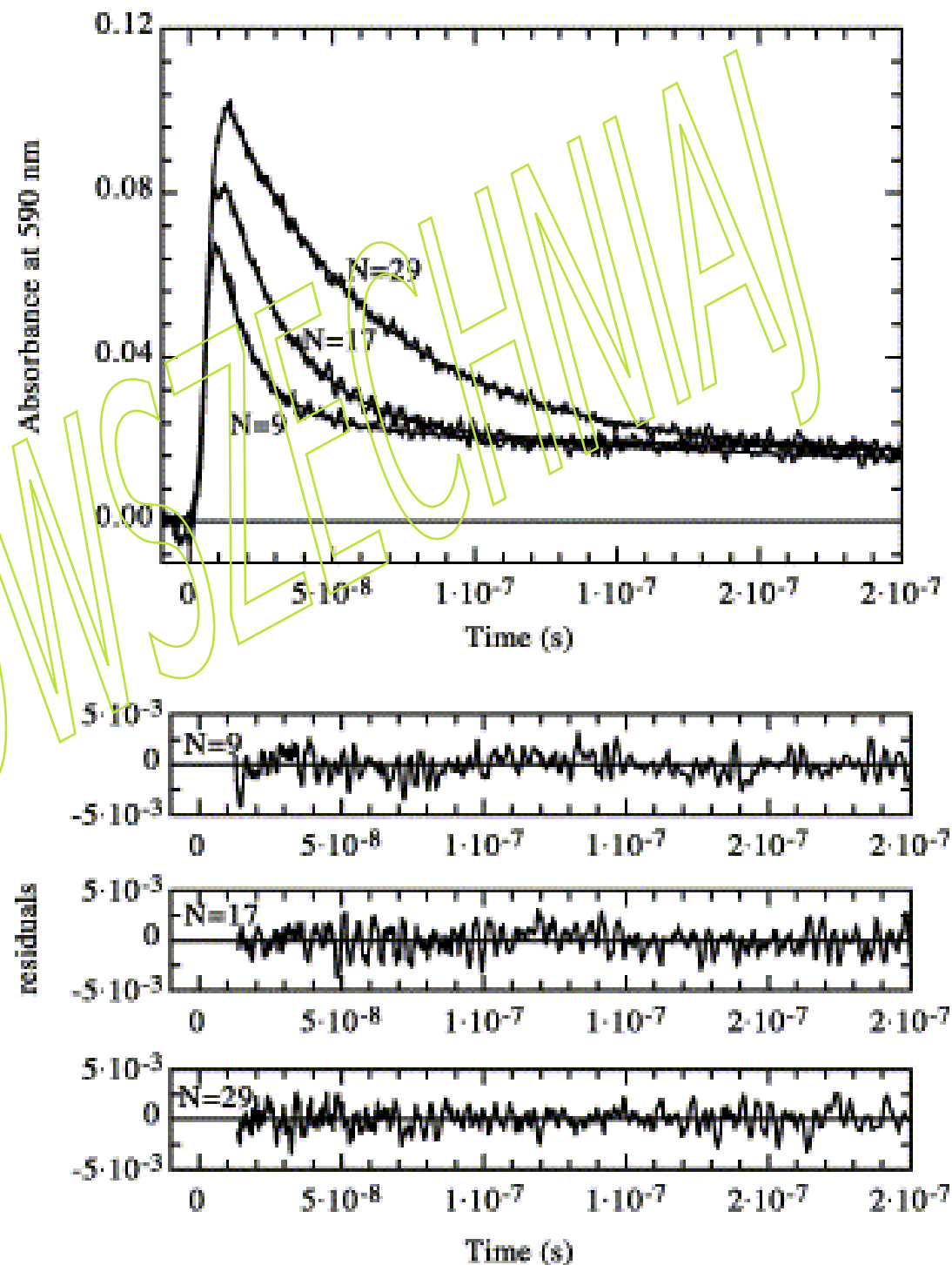


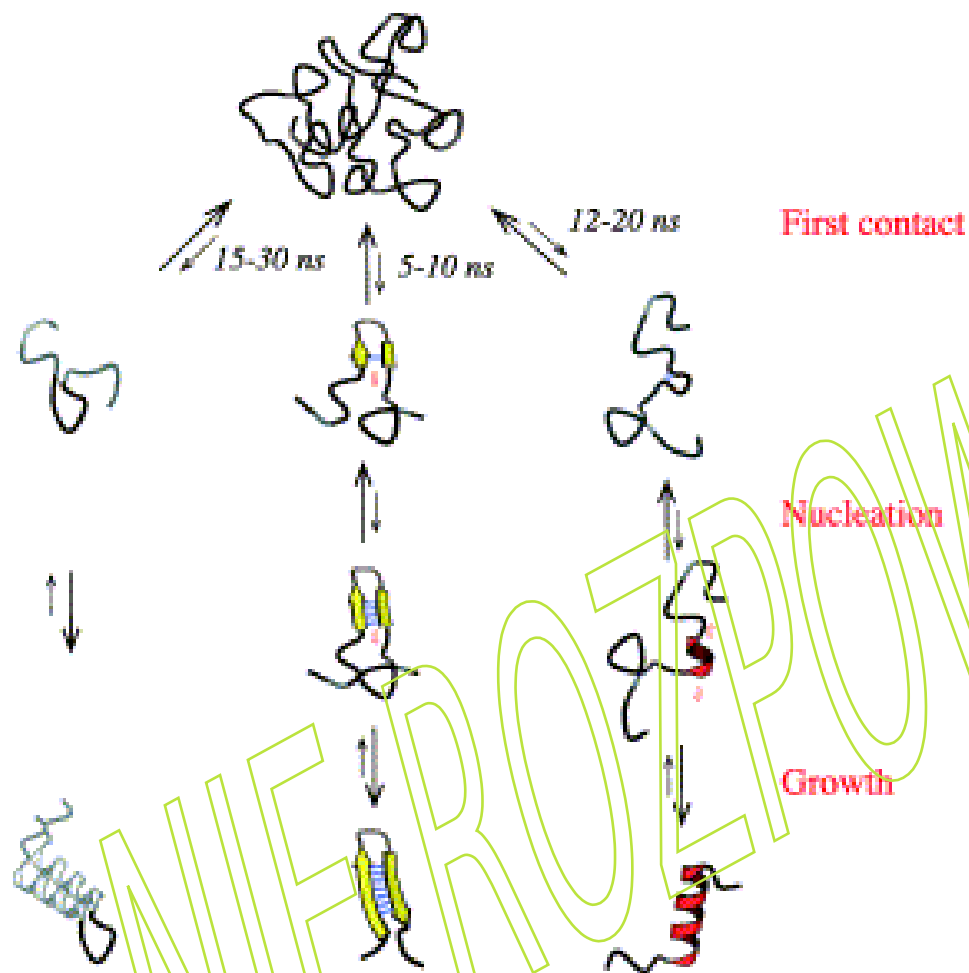
Zależność od lepkości szybkości tworzenia kontaktów w peptydach A zawierających $n=1$ (●), 2 (○), 3 (▲) and 4 (△) par glicyna/seryna między tioksantonem i 1-naftylalaniną. Liniowe fity na dwulogarytmicznym wykresie dają nachylenia -0.96 ± 0.05 , -0.83 ± 0.05 , -0.80 ± 0.05 , and -0.81 ± 0.05 , odpowiednio. 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 jednoeksponecjale 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, $t_{1/2} \approx 30 \mu\text{s}$.





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 prolinowych ($\tau=50$ 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 prolinowych, inicjacja nie może nastąpić szybciej niż około 12–20 ns. Szybkości te stanowią górną granicę kinetyki tworzenia struktury drugorzędowej.