

Vlastní fluorescence proteinů

Vlastní fluorescenci proteinů je způsobena aromatickými aminokyselinami v nich obsaženými: tryptofanem (Trp), tyrozinem (Tyr) a fenylalaninem (Phe). Dominující je fluorescence tryptofanu, naopak prakticky vůbec se neuplatňuje fenylalanin. V této úloze jsou změřena fluorescenční excitační a emisní spektra albuminu a čistého tryptofanu, tyrozinu a fenylalaninu.

Vlastnosti L-tryptofanu

- MW = 204,23
- absorpční maximum: $\lambda_{\text{exmax}} = 295 \text{ nm}$
- fluorescenční emisní maximum: $\lambda_{\text{emmax}} = 353 \text{ nm}$
- emise Trp je vysoce závislá na polaritě a okolním prostředí

Vlastnosti L-tyrozinu

- MW = 181,19
- absorpční maximum: $\lambda_{\text{exmax}} = 275 \text{ nm}$
- fluorescenční emisní maximum: $\lambda_{\text{emmax}} = 304 \text{ nm}$
- emise Tyr je relativně málo citlivá na polaritu rozpouštědla

Vlastnosti L-fenylalaninu

- MW = 165,19
- absorpční maximum: $\lambda_{\text{exmax}} = 260 \text{ nm}$
- fluorescenční emisní maximum: $\lambda_{\text{emmax}} = 282 \text{ nm}$
- emise Phe je strukturovaná

Fluorescence proteinů je obvykle excitována při 280 nm nebo při delších vlnových délkách, takže fenylalanin není ve většině experimentů excitován. Navíc je kvantový výtěžek fluorescence Phe velmi malý (kolem 0,02). Tryptofanovou fluorescenci v proteinech lze selektivně excitovat při 295-305 nm.

Materiál

- L-tryptofan (Applichem), L-tyrozin (Applichem), L-fenylalanin (Applichem)
- Hovězí sérový albumin (BSA, MW = 67000)
- pufr A (120 mmol/l NaCl, 10 mmol/l KCl, 30 mmol/l Tris HCl, pH 7,4)

Postup

1. Připravené zásobní roztoky Trp, Tyr, Phe a BSA nařed'te pufrém A pomocí tabulky:

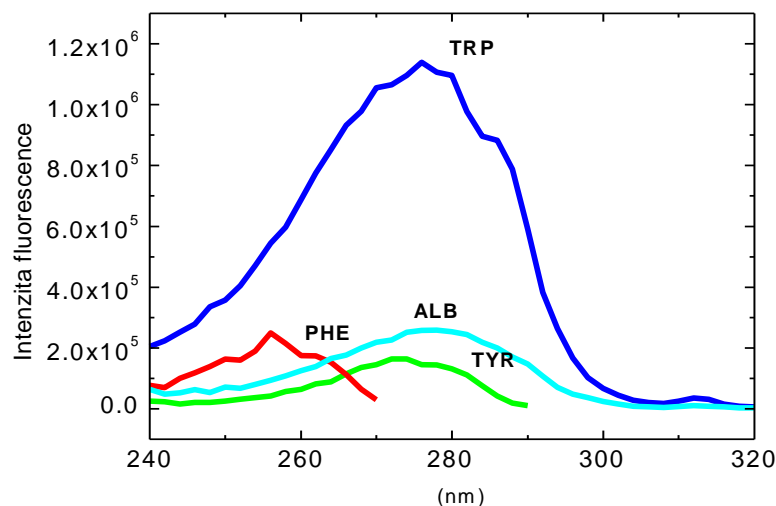
	zásobní koncentrace	1. ředění	1. počet ředění (např. 100x)	2. ředění (do 1500 μl)	2. počet ředění
Trp	10 mM	5 μ M		100 nM	
Tyr	2 mM	20 μ M		143 nM	
Phe	10 mM	16,66 μ M		-----	-----
BSA	0,3 mM	0,6 μ M		30 nM	

2. Změřte excitační a emisní spektra vzorků za podmínek uvedených v tabulce.

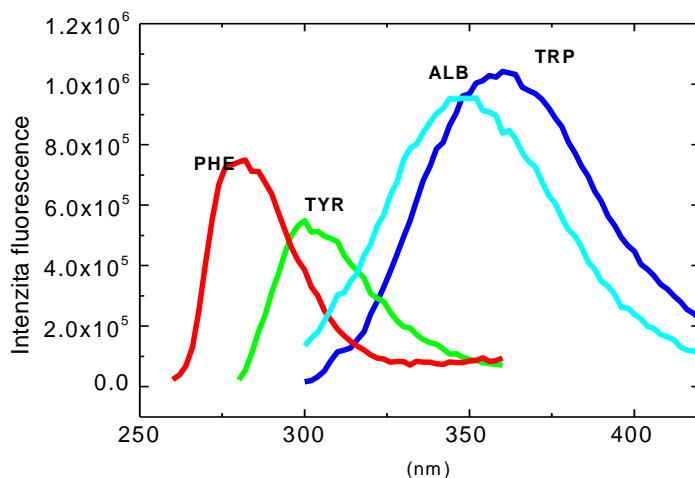
	excitační spektrum		emisní spektrum	
	λ_{em} (nm)	λ_{ex} (nm)	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)
L-tryptofan	350	240-300	280	290-420
L-tyrozin	300	240-290	270	280-450
L-fenylalanin	280	240-270	250	260-360
albumin	350	240-320	280	300-420

Výsledky

Změřená excitační a emisní spektra vlastní fluorescence tryptofanu (Trp), tyrozinu (Tyr), fenylalaninu (Phe) a albuminu v pufru A jsou na Obr.1 a Obr 2. Z výsledných spekter je zřejmé, že prakticky veškerá vlastní fluorescence albuminu pochází od tryptofanu. Měření byla provedena na spektrofluorometru FluoroMax-4.



Obr. 1 Excitační spektra 5 μM Trp ($\lambda_{em} = 350$ nm), 20 μM Tyr ($\lambda_{em} = 300$ nm), 200 μM Phe ($\lambda_{em} = 280$ nm) a 0.6 μM albuminu ($\lambda_{em} = 350$ nm).



Obr. 2 Emisní spektra 5 μM Trp ($\lambda_{ex} = 280$ nm), 20 μM Tyr ($\lambda_{ex} = 270$ nm), 200 μM Phe ($\lambda_{ex} = 250$ nm) a 0.6 μM albuminu ($\lambda_{ex} = 280$ nm).