

## 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'ete pufrém A pomocí tabulky:

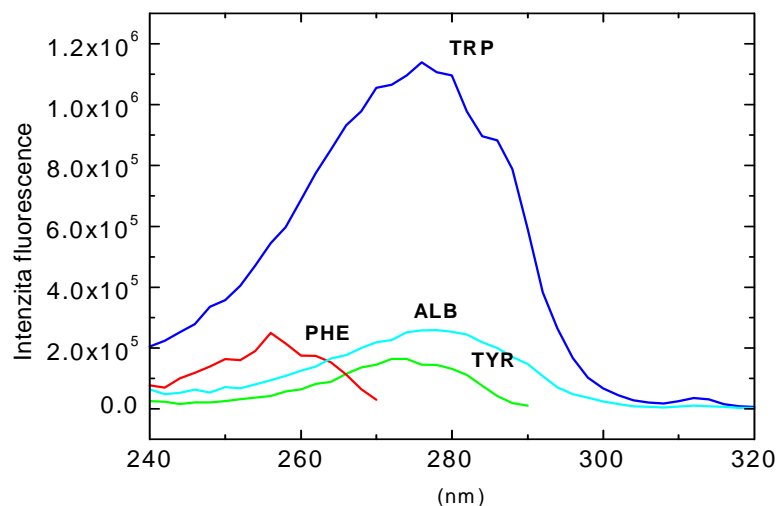
|     | zásobní koncentrace | 1. ředění           | 1. počet ředění (např. 100x) | 2. ředění (to 1500 $\mu\text{l}$ ) | 2. počet ředění |
|-----|---------------------|---------------------|------------------------------|------------------------------------|-----------------|
| Trp | 10 mM               | 5 $\mu\text{M}$     |                              | 100 nM                             |                 |
| Tyr | 2 mM                | 20 $\mu\text{M}$    |                              | 142,8 nM                           |                 |
| Phe | 10 mM               | 16,66 $\mu\text{M}$ |                              | -----                              | -----           |
| BSA | 0,3 mM              | 0,6 $\mu\text{M}$   |                              | 30 nM                              |                 |

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

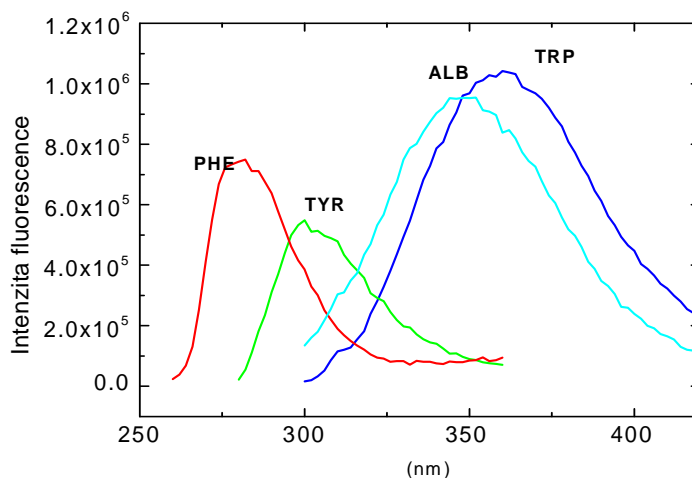
|               | excitační spektrum  |                     | emisní spektrum     |                     |
|---------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
|               | $\lambda_{em}$ (nm) | $\lambda_{ex}$ (nm) | $\lambda_{ex}$ (nm) | $\lambda_{em}$ (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  $\mu\text{M}$  Trp ( $\lambda_{em} = 350$  nm), 20  $\mu\text{M}$  Tyr ( $\lambda_{em} = 300$  nm), 200  $\mu\text{M}$  Phe ( $\lambda_{em} = 280$  nm) a 0.6  $\mu\text{M}$  albuminu ( $\lambda_{em} = 350$  nm).



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