

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 a tyrozinu.

Vlastnosti L-tryptofanu

- $MW = 204.23$, $\epsilon (\text{Trp}) = 5690 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
- 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

- $MW = 181.19$; $\epsilon (\text{Tyr}) = 1280 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
- 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

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)
- Hovězí sérový albumin (BSA, $MW = 67000$), $\epsilon (\text{BSA}) = 49915 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
- pufr A (50 mM NaCl, 50 mM Na-fosfát, pH 7,0)

Postup

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

	zásobní koncentrace	1. ředění (do 1000 μl)	1. počet ředění (např. 1000x)	2. ředění (do 1500 μl)	2. počet ředění
Trp	10 mM	20 μM		50 nM	
Tyr	2 mM	10 μM		1000 nM	
BSA	0.3 mM	3 μM		150 nM	

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

	excitační spektrum		emisní spektrum	
	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)
L-tryptofan	240-300	350	280	290-420
L-tyrozin	240-290	300	270	280-420
BSA	240-320	350	275,292	300-420

Výsledky

Určete, jaká část fluorescence BSA je způsobena tryptofanem a jaká tyrozinem za použití diferenčního spektra.