

# TRABAJO PRÁCTICO N°1

## Espectroscopía de fluorescencia

### Objetivo General

- Familiarizarse con el empleo de las técnicas de fluorescencia *in vitro*.
- Consolidar los conceptos introductorios de fluorescencia: espectros de excitación y emisión, transferencia de energía resonante.

### Objetivos Particulares

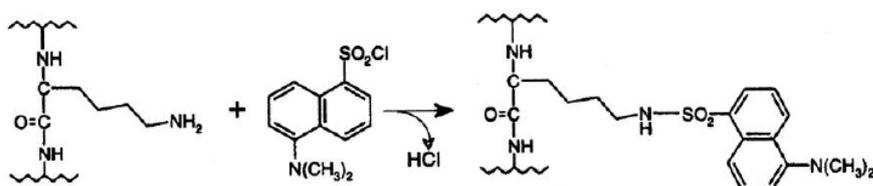
- Analizar la influencia del entorno en sondas intrínsecas (tirosina, triptofano) y extrínsecas (dansilo) en proteínas.
- Estudiar la transferencia de energía entre las sondas triptofano y dansilo, y su relación con la conformación de la proteína.

### Introducción

La espectroscopía de fluorescencia es una técnica ampliamente utilizada para el estudio de sistemas biológicos. Una de las estrategias experimentales utilizada consiste en marcar la biomolécula en estudio con una sonda fluorescente y aprovechar determinadas propiedades fotofísicas de la sonda para estudiar indirectamente la biomolécula.

*Marcación de albúmina bovina (BSA) con la sonda fluorescente cloruro de dansilo (realizada previamente)*

La sonda cloruro de dansilo (Ds) es utilizada ampliamente en estudios estructurales de proteínas. Reacciona con los grupos amino de la proteína de acuerdo al siguiente esquema:



Esquema 1: reacción de Ds con un residuo lisina de una proteína

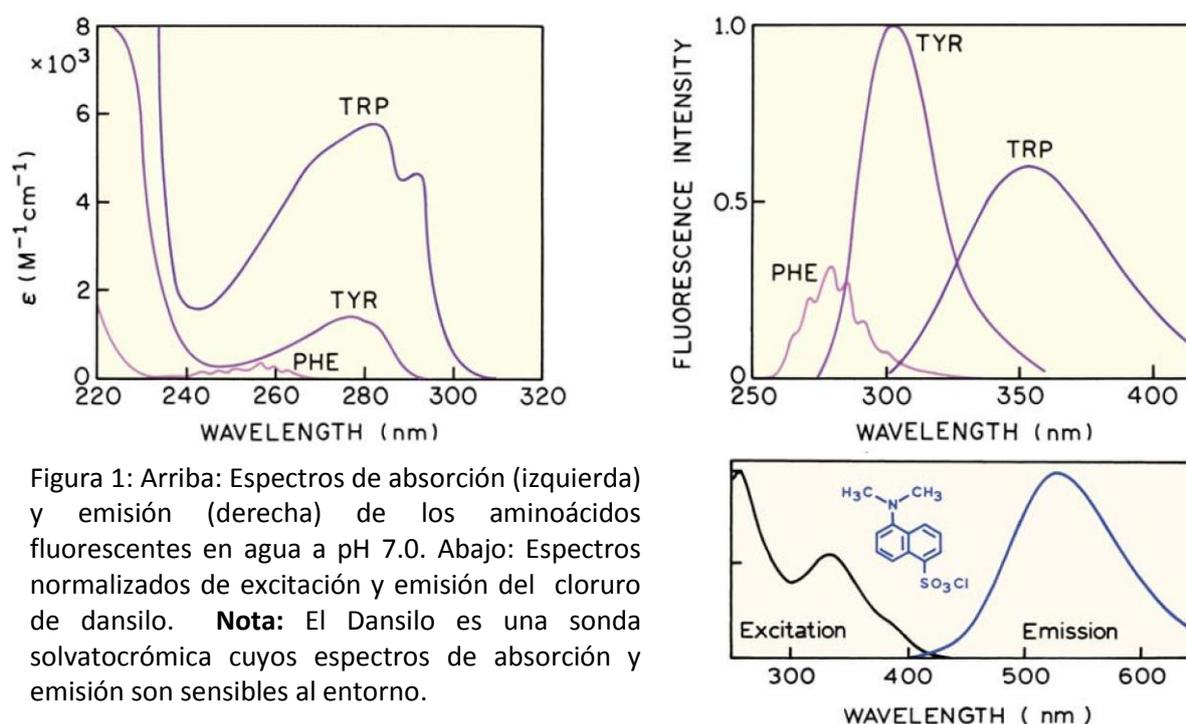


Figura 1: Arriba: Espectros de absorción (izquierda) y emisión (derecha) de los aminoácidos fluorescentes en agua a pH 7.0. Abajo: Espectros normalizados de excitación y emisión del cloruro de dansilo. **Nota:** El Dansilo es una sonda solvatocrómica cuyos espectros de absorción y emisión son sensibles al entorno.

## Muestras

Se contará con las siguientes soluciones que presentan la misma concentración de BSA:

- A. Solución de BSA en buffer TRIS (50 mM; pH 7,5).
- B. Solución de BSA marcada con Cloruro de Dansilo (BSA-Ds) en buffer TRIS.
- C. Solución de BSA en buffer TRIS + cloruro de guanidinio (GdCl) 6M.
- D. Solución de BSA-Ds en buffer TRIS + GdCl 6 M.
- E. Solución de Cloruro de Dansilo (Ds) en buffer TRIS.
- F. Solución de buffer Tris

Las soluciones en cloruro de guanidinio (GdCl) se incubaron al menos dos horas a temperatura ambiente para asegurar la completa desnaturalización de la proteína.

Registrar los espectros de excitación y emisión de fluorescencia, excitando y detectando a distintas longitudes de onda según se indica a continuación:

Muestra BSA en tris (A)

Número	Tipo espectro	$\lambda$ exc (o $\lambda$ em) en nm	Intervalo (nm)
1	emisión	280	290- 580
2	emisión	295	310- 580
3	excitación	(340)	260-310

Muestra BSA-DS en tris (B)

4	emisión	295	310- 580
5	emisión	340	<b>350-580</b>
6	excitación	(460)	260-400

Muestra BSA en GdmCl (C)

7	emisión	295	310- 580
8	emisión	280	290- 580

Muestra BSA-DS en GdmCl (E)

9	emisión	295	310- 580
---	---------	-----	----------

Muestra DS en tris (E)

10	emisión	295	310- 580
11	emisión	340	<b>350-580</b>

Tris (F)

12	emisión	295	310- 580
----	---------	-----	----------

## Algunas pautas para el informe

- Para las distintas muestras, discutir los cambios observados (cambios en longitudes de onda máxima o los corrimientos de espectro, los cambios de intensidad de emisión en los distintos espectros, etc.) Para ello comparar espectros de a grupos en un mismo gráfico (por ejemplo espectros de emisión BSA vs BSA en GdCl, BSA vs BSA-Ds ; etc). Explique el espectro de excitación registrado en 6.
- Calcular la distancia media entre triptofano y cloruro de dansilo en la proteína marcada nativa y en la desnaturalizada ( $R_0_{\text{Trp-dansyl}} = 21 \text{ \AA}$ ). Para ello restar el blanco, y calcular la eficiencia de FRET entre Trp y Ds utilizando la integral de las curvas entre 310 y 390 nm.