

# Introduction à la spectrofluorimétrie. Spectres d'émission et d'excitation. Fluorescence de la eGFP

la « Green Fluorescence Protein » (GFP) de la méduse *Aequorea victoria* est une protéine très utilisée pour la fabrication d'outils moléculaires d'analyse du vivant. Le travail proposé utilise une GFP génétiquement modifiée étiquetée notamment d'un motif 6 histidinyls à son extrémité N<sub>terminale</sub> et appelée eGFP. Elle a été exprimée chez *E. coli* grâce à un vecteur pET15-EGFP et purifiée. Voici quelques données concernant la EGFP disponible.

The fluorescence properties of GFP have been changed by genetic engineering leading to several mutants, especially EGFP (Enhanced GFP, fluorophore = Leu-Thr-Tyr-Gly-Val-Gn) which have red-shifted excitation spectra (maximal excitation peak at 488 nm) and fluoresces (at 507 nm) 35 more brightly than wild-type GFP. eGFP extinction coefficient at 488 nm = 55 000 L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>

**pet15-EGFP** : Mgsshhhhhssglvprgsh mvsksgeelft gvvpilveld gdvnghkfsv sgegegdaty gkltlkfict  
tgklpvpwpt lvtltlygvq cfsrypdhmk qhdffksamp egyvqertif fkddgnyktr aevkfeqdtl vnriekgid  
fkedgnilgh kleynynshn vyimadkqkn gikvnfkirh niedgsvqla dhyqqntpig dgpvllpdnh ylstqsalsk  
dpnekrdhmv llefvtaagi tlgmdelyk ; 20+239 = 259 aa : 29,11 kda ; pi calculé = 5,83.  
LVPR<sub>1</sub>GS = THROMBIN CLEAVAGE SITE SEQUENCE

## 1 Préliminaire : spectre d'absorption d'une solution d'eGFP

Établir le spectre d'absorption de la solution d'EGFP fournie entre 350 et 700 nm (en tampon P = phosphate sodique 50 mM pH 7,3). Pour réaliser un spectre convenable, tenir compte de la concentration annoncée de la solution de eGFP et des données fournies dans l'introduction.

Compte-rendu. Dilution de travail utilisée de la solution EGFP fournie. Spectre annoté avec valeur de longueur d'onde au maximum d'absorption plus le calcul de la concentration molaire et massique de la solution fournie en utilisant les données de l'introduction. Comparaison avec la concentration annoncée.

## 2 Spectres d'excitation et d'émission de fluorescence

Utiliser le spectrofluorimètre en mode « mesures de spectres » (voir notice fournie). Régler la  $\lambda$  d'excitation à  $\lambda_{\max}$  d'absorption et paramétrer le balayage d'émission depuis 350 nm jusqu'à 700 nm. Régler les autres paramètres, par exemple : bande passante à 5 nm, réponse sur 0,2s, intervalle 2 nm, vitesse 500 nm/s. Il va falloir effectuer 2 autres réglages sur l'appareil, un réglage d'amplification du signal (sensibilité) et un réglage de zéro. Commencer avec la sensibilité « medium ». Régler enfin le « zéro » de fluorescence avec du tampon P en cuve (pour une excitation et une émission à consigner dans le compte-rendu).

Réaliser le spectre d'émission du tampon P.

Dans la même cuve, rincer avec un peu de solution EGFP de concentration adaptée. Il faudra diluer la solution utilisée pour établir le spectre d'absorption car la fluorimétrie est très sensible. Diluer par exemple au 1/50. Réaliser le spectre d'émission sur cette dilution.

En fonction des résultats obtenus, adapter les réglages, la concentration...Réaliser alors un spectre d'émission précis.

Réaliser ensuite un spectre d'excitation au maximum d'émission. Régler désormais la  $\lambda$  d'émission à la valeur qui correspond au maximum d'intensité de fluorescence obtenue lors de l'expérience précédente. Balayer les  $\lambda$  d'excitation depuis 340 nm jusqu'à 700 nm.

Compte-rendu :

Pourquoi as-t-on choisi 488 nm comme première longueur d'onde d'excitation ?  
Spectres annotés et légendés, sur un graphique unique, avec les valeurs des  $\lambda_{\max}$ .

## 3 Relation de proportionnalité entre intensité de fluorescence et concentration

Régler la longueur d'onde d'excitation et la longueur d'onde d'émission du spectrofluorimètre à chacune des valeurs de maximum déterminées en 1.2. Régler le « zéro » de fluorescence avec du tampon P.

Proposer une manipulation simple illustrant la proportionnalité intensité de fluorescence et concentration (toutes choses égales par ailleurs).

Compte-rendu :

Mode opératoire et résultats.

## Bibliographie

- Living Colors User Manual Clontech Laboratories Inc. Palo Alto CA. à [http://www.science.marshall.edu/dneff/gfp\\_and\\_other\\_fluorophores/gfp%20manual%20clontech.pdf](http://www.science.marshall.edu/dneff/gfp_and_other_fluorophores/gfp%20manual%20clontech.pdf)
- Biophys J. 1997 November; 73(5): 2782–2790. à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1181180/pdf/biophysj00028-0540.pdf>
- Daniel C. Harris, Quantitative chemical analysis, 6<sup>e</sup> édition, Freeman and Company, 2003.
- David Jameson, Principles of fluorescence techniques Basic fluorescence principles II, 2004 sur [www.fluorescence-foundation.org/2004Lectures/Lecture2.pdf](http://www.fluorescence-foundation.org/2004Lectures/Lecture2.pdf).