

Spectrofluorimétrie. Fluorimétrie quantitative. Quenching. Application à la fluorescence de l'albumine bovine.

La sérumalbumine bovine possède deux résidus tryptophanyl qui lui confèrent une fluorescence dans l'U.V.

Données concernant le phénomène de quenching.

On appelle quenching l'effet physicochimique qui détermine une diminution de l'émission de fluorescence par transfert d'énergie à une autre molécule (le quencher).

Le quenching dit de collision correspond au phénomène suivant. Le quencher entre en collision (par diffusion) avec le fluorophore (la partie de la molécule qui détermine la fluorescence) alors que le fluorophore est excité. A la suite de ce contact (collision), l'énergie d'excitation est transférée au quencher et le fluorophore se désexcite ainsi sans émission d'un photon, puis le quencher. D'où l'affaiblissement de fluorescence.

Le quenching par formation d'un complexe (quenching dit statique) correspond au phénomène suivant. Un complexe se forme entre le quencher et le fluorophore et le complexe n'est pas fluorescent.

Réactifs disponibles pour le travail proposé :

- albumine bovine (SAB dégraissée) à 1 mg/mL en tampon phosphate sodique 0,05 mol/L, pH 7,0 ;
- KI 0,3 mol/L en tampon P ;
- tampon P = tampon phosphate sodique 0,05 mol/L, pH 7,0 ;
- tampon E = tampon phosphate sodique 1 mol/L, pH 7,0.
- caféine (194,19 g/mol) à 5,8 mmol/L tampon phosphate sodique 0,05 mol/L, pH 7,0.

1. Etude simple de la fluorescence de l'albumine : spectre d'excitation, spectre d'émission

1.1 Préliminaire : spectre d'absorption d'une solution d'albumine dans l'U.V.

Établir le spectre d'absorption de la solution d'albumine à 1 g/L entre 240 et 440 nm contre le tampon P. En cuve de quartz (attention à la manipulation, le prix d'une cuve quartz est très élevé).

Compte-rendu :

Spectre annoté avec valeur de λ_{\max} d'absorption plus le calcul des coefficients d'absorbance spécifique massique et molaire (masse molaire sérumalbumine bovine = 65 600 g/mol).

1.2 Spectres d'excitation et d'émission de fluorescence

Il va falloir effectuer 2 réglages sur l'appareil, un réglage de zéro de fluorescence et un réglage de niveau maximal du signal de fluorescence. Régler le « zéro » de fluorescence avec du tampon P pour une excitation vers 280 nm et une émission à 440 nm par exemple. Dans la cuve quartz propre introduire environ 1 mL de solution SAB à 1 g/L et 2 mL de tampon P.

Régler la λ d'excitation à λ_{\max} d'absorption et balayer rapidement les λ d'émission depuis 240 nm jusqu'à 440 nm en notant la longueur d'onde d'émission donnant le maximum de fluorescence. Utiliser λ_{\max} d'absorption λ_{\max} d'émission pour régler un niveau de sortie (relative fluorescence unit, RFU) convenable (atténuation et gain).

Réaliser alors un spectre d'émission précis.

Réaliser ensuite un spectre d'excitation au maximum d'émission. Régler désormais la λ d'émission à la valeur qui correspond au maximum d'intensité de fluorescence obtenue lors de l'expérience précédente. Balayer les λ d'excitation en notant la fluorescence pour chacune d'elles depuis 240 nm jusqu'à 440 nm.

Compte-rendu :

Pourquoi as-t-on choisi 280 nm comme première longueur d'onde d'excitation ?

Spectres annotés et légendés, sur un graphique unique, avec les valeurs des λ_{\max} .

2. 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.

Réaliser alors la série de mesures suivantes :

Manip.	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
SAB 1 g/L en mL	0	0,2	0,4	0,8	1,2	2	2,5	3	0,4	0,8
Tampon P en mL	4	3,8	3,6	3,2	2,8	2	1,5	1	0	1,7
Tampon E	0	0	0	0	0	0	0	0	3,6	0
KI 0,3 mol/L	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,5
Fluorescence F	0									

Note technique : une seule cuve est utilisée. Elle est vidée, rincée avec un peu de solution à mesurer, vidée, puis remplie de la solution à mesurer. On peut alors mesurer.

Compte-rendu :

Analyse et interprétation (un graphe $F = f([SAB])$ est conseillé pour analyser les manipulations 0 à 7).

3. Etude de l'effet du Quencher iodure sur la fluorescence de la serumalbumine bovine

Manip.	0	1	2	3	4	5	6	7	8
KI 0,3 mol/L mL	0	0,25	0,5	0,75	1	1,25	1,5	2	2,5
SAB mL	1,5 mL de solution SAB 1g/L en tampon P par tube								
P mL	qsp 4 mL								
Fluorescence									
	= F_0	= fluorescences F_i							
F_0 / F_i	1								

Compte-rendu

Tracé de la fonction $F_0 / F_i = f([\text{caféine dans le milieu réactionnel}])$ et interprétation. Pour interpréter cette fonction, il faut savoir qu'en cas de quenching par effet unique de collision on a la relation $F_0 / F_i = 1 + K [\text{quencher}]$

Cette relation est appelée relation de Stern-Volmer du quenching de simple collision, K est le coefficient directeur de la droite obtenue). Si le quenching est du à la fois à la collision et à la formation d'un complexe avec le quencher, la courbe est déformée « vers le haut ».

4. Mise en évidence d'une interaction albumine / caféine par étude d'effet de quenching

4.1 Préliminaire : absorbance U.V. de la caféine, non fluorescence de la caféine

Établir le spectre d'absorption d'une solution de caféine à 0,058 mM entre 240 et 440 nm contre le tampon P. En cuve de quartz (attention à la manipulation, le prix d'une cuve quartz est très élevé). Il faudra donc diluer au 1/100 la solution stock fournie.

Dans une cuve quartz propre introduire environ 1 mL de solution de caféine 5,8 mM et 2 mL de tampon P.

Régler la λ d'excitation à λ_{max} d'absorption et balayer les λ d'émission en notant la fluorescence pour chacune d'elles depuis 240 nm jusqu'à 440 nm (de 10 nm en 10 nm).

Compte-rendu : spectre(s) annoté(s). Commentaire.

4.2 Liaison albumine/caféine

Réaliser les mesures suivantes après réglage de l'excitation à 300 nm et de l'émission à 335 nm :

Manip.	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Caf. 5,8 mM μ L	0	30	70	100	125	150	175	200	230	260	300	350	400
SAB mL	1,5 mL de solution SAB 1g/L en tampon P par tube												
P mL	qsp 4 mL												
[caféine] en mM													
Fluorescence													
	= F_0	= fluorescences F_i											
F_0 / F_i	1												
$(F_0 - F_i)/F_0$													

Attention, lors de cette série de mesures, il faudra veiller à régler à nouveau l'atténuation et le gain de l'appareil sur la manipulation « 0 » du tableau.

Compte-rendu :

Tableau ci-dessus complété. Justification du choix des longueurs d'onde d'émission et d'excitation.

Tracé de la fonction $F_0 / F_i = f([\text{caféine dans le milieu réactionnel}])$ et interprétation. Pour interpréter cette fonction, il faut savoir qu'en cas de quenching par effet unique de collision on a la relation $F_0 / F_i = 1 + K [\text{quencher}]$ (équation de Stern-Volmer du quenching de simple collision présentée en paragraphe 3). Si le quenching est du à la fois à la collision et à la formation d'un complexe avec le quencher, la courbe est déformée « vers le haut ».

Tracé de la fonction $(F_0 - F_i)/F_0 = f([\text{caféine}])$. En supposant que la fluorescence devient nulle chaque fois qu'un site de liaison de la caféine est occupé par la caféine, que représente $(F_0 - F_i)/F_0$? Interpréter alors l'allure de la courbe $(F_0 - F_i)/F_0 = f([\text{caféine}])$.

5. Bibliographie

- M. T. Montero, J. Hernandez, J. Esterlich, Fluorescence Quenching of albumin. A spectrofluorimetric experiment, Biochemical Education 18(2), 1990.
- Daniel C. Harris, Quantitative chemical analysis, 6^e édition, Freeman and Company, 2003.
- David Jameson, Principles of fluorescence techniques Basic fluorescence principles II, 2004 sur www.fluorescence-foundation.org/2004Lectures/Lecture2.pdf.