### PROTOCOLO DE UTILIZACIÓN DEL ESPECTROFLUORÍMETRO HORIBA/ JOBIN YVON FLUOROMAX-4

### <u>ÍNDICE</u>

- 1. OBJETO
- 2. ALCANCE
- 3. REFERENCIAS
- 4. GENERAL
- Descripción del equipo.
- Fundamento de la técnica.
- 5. MANEJO DEL EQUIPO
- Encendido del equipo.
- Comprobación de la calibración del monocromador de excitación.
- Comprobación de la calibración del monocromador de emisión.
- Realización de experimentos.
- 6. ANEXOS

### OBJETO

Este procedimiento tiene por objeto la descripción de las operaciones necesarias para la utilización del espectrofluorímetro Horiba/Jobin Yvon Fluoromax-4.

### ALCANCE

El procedimiento descrito se aplica para la realización de espectroscopía de fluorescencia para el análisis de estructura terciaria y plegamiento de proteínas, estudios de estabilidad conformacional de proteínas, y caracterización de unión de ligandos a proteínas y ácidos nucleicos entre otros.

### REFERENCIAS

- FluoroMax® -4 & FluoroMax® -4P Operation manual. Horiba scientific.
- USER GUIDE Digital or Analog Control System Instruments LFI3751 Temperature Controller High Precision Controller with Autotune PID.
- FluorEssence<sup>™</sup> user's guide for software.

### GENERAL

### Descripción del equipo:

El espectrofluorímetro Horiba/Jobin Yvon Fluoromax-4 Cuenta con una lámpara de 150 W (arco de Xe), fotomultiplicador con contador de fotones y fotodiodo corrector de referencia. El rango de longitudes de onda es 220-600 nm para excitación, y 290-850 para emisión. Dispone, además, de agitador magnético, accesorio de polarización en L (prismas de cuarcita) automatizado, y porta muestras para muestras sólidas o en polvo.



### Fundamento de la técnica:

La fluorescencia se produce cuando una muestra excitada (irradiada) con luz de una longitud de onda emite luz de otra longitud de onda, normalmente más larga. Un fluorímetro es un espectrómetro diseñado para medir este fenómeno. La primera parte del fluorímetro es muy similar a la del espectrofotómetro, y consta de una fuente de luz y un filtro o monocromador para seleccionar un grupo definido de longitudes de onda de excitación, que luego se dirigen a una muestra. A continuación, la luz emitida por la muestra pasa por otro filtro o monocromador que selecciona la longitud de onda de emisión de interés y elimina la mayor parte de la luz de excitación, antes de ser medida por un detector.

### Encendido del equipo:

## Nota: Es recomendable encender el equipo aproximadamente 20 minutos antes de comenzar a medir.

El orden establecido es el siguiente:

- Encender el ordenador.
- En caso de ser necesario establecer una temperatura determinada para el experimento, encender el equipo de control de temperatura Peltier.
- Encender el equipo y comprobar que la lámpara se enciende. (Puede verse observando la luz detrás del equipo).
- Si va a trabajar con una temperatura inferior a 15°C, deberá conectar la línea de gas nitrógeno para evitar la aparición de condensación en la cámara de la muestra.
- En la pantalla, hacer *click* en el icono "*FluorEssence*" para abrir el programa.
- Realizar los espectros de excitación de Xe y emisión de agua Raman y anotar los máximos de excitación (debería ser 467nm) y emisión (397nm) en el cuaderno. Anotar también la señal máxima del espectro de Raman.\*



\*Se tarda muy poco en realizar estas pruebas y los datos obtenidos sirven para controlar la calibración de los monocromadores y el estado de la lámpara.

### Comprobación de la calibración del monocromador de excitación

Esta comprobación de calibración verifica la calibración de la longitud de onda del monocromador de excitación utilizando el fotodiodo de referencia situado antes del compartimento de muestras. Se trata de un barrido de excitación de la salida de la lámpara de xenón, y debe ser la primera comprobación a realizar.

### Nota: Esta comprobación se realiza sin colocar la cubeta.

Para ello, en la barra de herramientas de la ventana principal del programa **Fluoressence:** 

- Seleccionar el icono



FluorEssence - C:\Documents and Settings\All Users\Documents\Jobin Yvon\Data\SCohen\UNTITLED	
Ble Edit Yew Collect Graph Analysis Icols Figmat Window Help	×
- L: A = = = = = = = = = = = = = = = = = =	📕 🖬 🕅 🛗 😋 📾 🗑 🖬 🖉 🌮

- Seleccionar "Spectra"
- Seleccionar
   "Excitation"



El experimento con lámpara de xenón se carga automáticamente.

Fightwood       Evectory         UPSSpectralExcitationaria       Chocoment and Setregridd User/Docoment/Udeby York       Image: Comment         Das Starrition       Secret and Setregridd User/Docoment/Udeby York       Image: Comment       Secret Action         Das Starrition       Secret and Setregridd User/Docoment/Udeby York       Image: Comment       Secret Action         Excitation 1       Secret and Set as Reference       More reserved       Activate and Set as Reference         Wavelength Set of a no       Secret and Set as Reference       Activate and Set as Reference       Activate and Set as Reference         Wavelength Set of a no       Secret and Set as Reference       Activate and Set as Reference       Activate and Set as Reference         Secret Set of a no       Secret and Set as Reference       Activate and Set as Reference       Activate and Set as Reference         Secret Set of a no       Secret and Set as Reference       Activate and Set as Reference       Activate and Set as Reference         Secret Set of a no       Secret and Set as Reference       Activate and Set as Reference       Activate and Set as Reference         Secret Set of a no       Secret and Set as Reference       Activate and Set as Reference       Activate and Set as Reference         Secret Set of a no       Secret and Set as Reference       Activate and Set as Reference       Activate and Set as Reference <th>General information</th> <th></th> <th></th> <th></th> <th></th> <th></th>	General information					
Uttopertain call sufficiend Located Fundament (solar metric)       Code       2 and the set of	Experiment	Directory		- Lord	E Same	E Sam Ar
Data Starrie:       DBE:         Convert:       Spectral Acquitice(Excision)         Convert:       Spectral Acquitice(Excision)         Convert:       Sectors         Convert:       Advanced         Convert:       Advanced         Stat       Advanced	UltispectralExcitation.xm	U-Documents and Si	tingsvAl Users/Documents/Vobin Yvon/U	Coan	Jane Jane	- 3446 Mar
Current: Spectral Acquisitor (Excitation)  Exercited on 1  Advanced  Excitation 1  Advanced  Excitation 1  Advanced  Excitation 1  Advanced  Statu  Statu	Data Storage Data Identifier:	0E×				
Experiment Type Monos           Calculation 1           Planted Parka           Planted           Workerdyn Stat           End           Participation           Advanced           Emission 1           Planted           Workerdyn Pask           mm           Statu	Comment: Spectral	Acquisition(Excitation)				
Excitation 1  Advanced  State  Advanced  State  Advanced  State  Comparison  Advanced  State  Comparison  Comparis	Experiment Type Monos					
Øktrode         Pale         © Set al Reference           Wavelength         Set         Inc           38         200 (400 )         1           38         1         Advanced             Emission 1         Ø         Advanced             Ø Advanced         Material         Advanced	Excitation 1					
Wovelength Stat End Inc.         ma       200 000 1         Six         ma       1         Advanced         Emission 1         Ø Advanced         Sixinate         Movelength Park,         ma       1         Advanced	Activate Park @	Set as Reference				
Advanced  Emission 1  V Advanced  W Advanced  Status	Wavelength Start Enc nm 200 60 Stit nm 1	Inc 1				
Emission 1 P. Activate Wavefungth Pask. mm 300 Site Site Status			Advanced			
C Advance  Advance  Statue  C Advance	Emission 1					
Wavelangth Pat. m 50 50 status	Activate					
Edvarced	Wavelength Park nm 350 Silt					
Edwards						
Status			Advanced			
	Status					
				P		
				Eull Disclosur	e <u>H</u> elp	RTC Bun

Nota: Los parámetros de excitación, son los que se recogen a continuación y vienen establecidos por defecto. NO MODIFICAR NADA.

Parámetros por defecto del monocromador para la comprobación de la lámpara de xenón

Monocromador (1200 grooves/mm)	Longitud de onda inicial	Longitud de onda final	Incremento	Slits (bandpass)
Excitación	200 nm	600 nm	1 mm	1mm
Emisión	350nm			1mm

# Parámetros predeterminados del detector para la comprobación de la lámpara de xenón.

Detector (señal)	Tiempo de integración	Unidades
Referencia (R1)	0,1s	mA



- Hacer click en el icono "Run" para comenzar a medir.



### Comprobación de la calibración del monocromador de emisión

Esta comprobación de calibración verifica la calibración de longitud de onda del monocromador de emisión con el tubo fotomultiplicador de emisión. con el tubo fotomultiplicador de emisión. Se trata de un barrido de emisión de la banda de dispersión Raman del agua realizada en modo de ángulo recto. **Realizar esta comprobación después de la comprobación de la lámpara de xenón. Una vez finalizada, se habrá verificado el funcionamiento del sistema.** 

La muestra de agua debe ser agua de calidad de investigación, triplemente destilada o desionizada.

Para el escaneo Raman se sugiere agua de grado HPLC o equivalente. Las muestras de agua impura provocarán niveles de fondo elevados, así como espectros distorsionados con (quizás) algunos picos no deseados.

### Nota: Utilizar una cubeta de cuarzo de 4 ml. Evitar las cubetas de vidrio o acrílicas: pueden presentar fluorescencia UV.

- Colocar la cubeta con agua en el compartimento de muestra.

En la barra de herramientas de la ventana principal del programa FluorEssence:

- Seleccionar el icono
- Seleccionar "Spectra"
- Seleccionar "Emission"
- Hacer *click* en "**Next** >>".

Fluorescence Main	n Experiment Menu	X	Experiment Type	×
Main	Experiment	Menu	Experiment Type	
Spectra	Kinetics	3D	Emission ExcRation Synchronous	
Anisotropy	Single Point	Phos		
Lifetime	Lifetime Kinetics	Anisotropy Decay	<< Back Next>>	

El experimento de Raman del agua se carga automáticamente.

Exercise     Decloyer       Verse     Decloyer       Instrument     Connects and Satisgluid Uter/Document/Uter/Versell       Instrument     Decloyer       Decloyer     Decloyer       Decloyer     Expenses       Instrument     Decloyer       Decloyer     Expenses       Instrument     Decloyer       Instrument     Decloyer       Decloyer     Expenses       Instrument     Decloyer       Instrument     Decloyer <t< th=""></t<>
Free     Directory       Processor     Directory       Ords Disage     Data densite:       Data densite:     Data       Convert:     Specified Acquatory Ension*
Data Stange
Comment Commen
Accessed Concernent Lyse Moos Concernent Ly
Declars Varietingh Pauk rm 1200 Sa 20 rm 5
Advanced
Emission 1 Park Colvide D Park O Set as Reference
Wavelength Start End Inc mm [365] 640 [1 SH mm [5]
Advanced
Satur Sa

Nota: Los parámetros de emisión, son los que se recogen a continuación y vienen establecidos por defecto. NO MODIFICAR NADA.

### Parámetros del monocromador para la el espectro Raman del agua:

Monocromador (1200 grooves/mm)	Longitud de onda inicial	Longitud de onda final	Incremento	Slits (bandpass)
Excitation	350nm			5nm
Emission	365nm	450nm	1 nm	5nm



### Parámetros del detector para la el espectro Raman del agua:

 Se acorta la señal en el UV de ~ 250 nm hacia longitudes de onda mayores.

2. Si se mide en tiempo real, modo continuo, se observan fluctuaciones de intensidad con el tiempo

Nota: El rendimiento observado (y, por tanto, la intensidad del pico) se ve afectado por la antigüedad y la alineación de la lámpara, los ajustes de la rendija y la pureza de la muestra. A medida que la lámpara de xenón envejece, el rendimiento del sistema disminuirá lentamente. disminuirá lentamente. Por lo tanto, una baja intensidad del pico agua-Raman puede indicar la necesidad de sustituir la lámpara de xenón.

460

### Realización de experimentos:

En la barra de herramientas de la ventana principal del programa Fluoressence:

- Seleccionar el

2.5 105

2 10

1.5 10<sup>5</sup>

1 10<sup>5</sup>

5 104

0 10° E 360

380

400

420

wavelength (nm)

440

signal (photos per sec)

icono

- Seleccionar el tipo de experimento que se desea realizar.



- Seleccionar el subtipo.
- Hacer *click* en "**Next >>**".



Se abrirá la siguiente ventana, en la que **los campos deben rellenarse como se detalla a continuación:** 

🚟 Fluorescenc	Division - Experiment Setup (Spectral Acquisition[Emission])
Experiment Monos	Declarad Information           Experiment         Directory           File         Directory           DtRSpectraEmission.wn/         [:\Documents and Settings\Vall Users\Documents\Usen Yvon\Vall
Detectors	Data Identifier: DIREm Comment: Spectral Acquisiton[Emission]
Accessories	Experiment Type Monos  Excitation 1  Activate  Wavelength Park res 350
	Prime 5 Advanced Emission 1 CAdvanced Advanced
	Wavelength Stat End Inc nm 365 450 1 Sit nm 5 Advanced
Triggers	Status Status Spectral Acquisitor(Enrission) Spectral Acquisitor(Enrission)

"Experiment file":
WTCa.xml ¡NO TOCAR!
"Data storage":
WTCa_nombredelexperimento.
"Excitation 1":
Wavelength peak: 295 nm
Slit: 2 o 3 nm.
"Emisision 1":

Wavelength start: 320 nm
Wavelength end: 400 nm
Wavelength Inc: 1 nm
Slit: 5 nm.
"Detectors":
Integration time: 0.5s.
"Accesories":
Temperature control: Enable.
(T): 5
(Teler): 0,1
(EQ): 0,5

Hacer *click* en el icono *"Run"* para comenzar a medir.



Nota: aparece un cuadro de espera para controlar la temperatura. Dar a continuar sin esperar.

Una vez terminado el experimento:

- Anotar el número de horas de la lámpara y cualquier incidencia o problema con el software en el cuaderno.
- Apagar ordenador, Peltier y finalmente, el equipo.
- Limpiar las cubetas.