

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

## **ÍNDICE**

### **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™ 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:

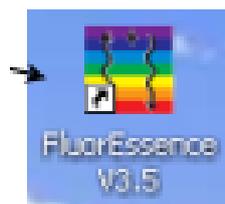
La fluorescencia se produce cuando una muestra excitada (irradiada) con luz de una longitud de onda emite luz de otra longitud de onda, normalmente más larga. Un fluorímetro es un espectrómetro diseñado para medir este fenómeno. La primera parte del fluorímetro es muy similar a la del espectrofotómetro, 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.**

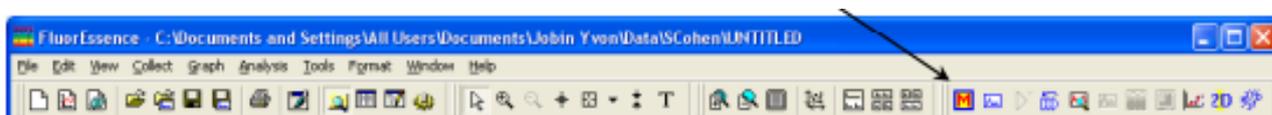
## Comprobación de la calibración del monocromador de excitación

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.

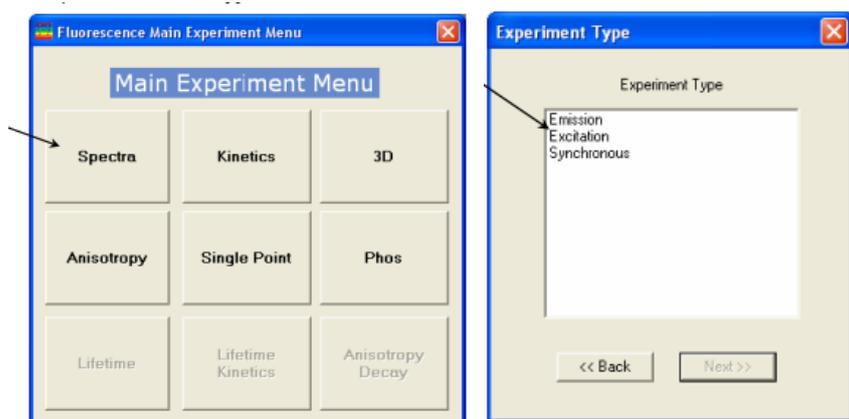
**Nota: Esta comprobación se realiza sin colocar la cubeta.**

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

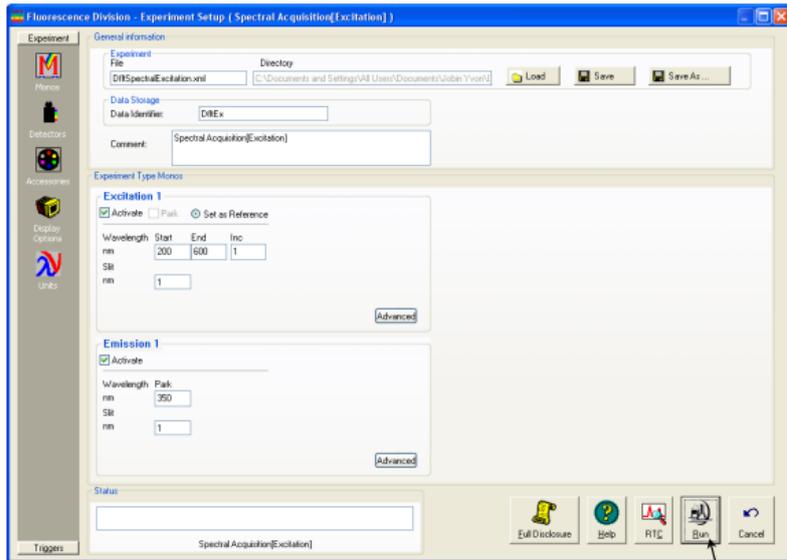
- Seleccionar el icono 



- Seleccionar **“Spectra”**
- Seleccionar **“Excitation”**



El experimento con lámpara de xenón se carga automáticamente.



**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**

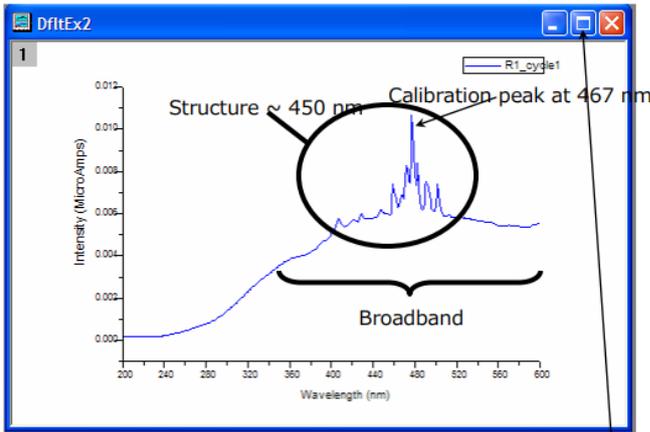
Monocromador (1200 grooves/mm)	Longitud de onda inicial	Longitud de onda final	Incremento	Slits (bandpass)
Excitación	200 nm	600 nm	1 mm	1mm
Emisión	350nm	--	--	1mm

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

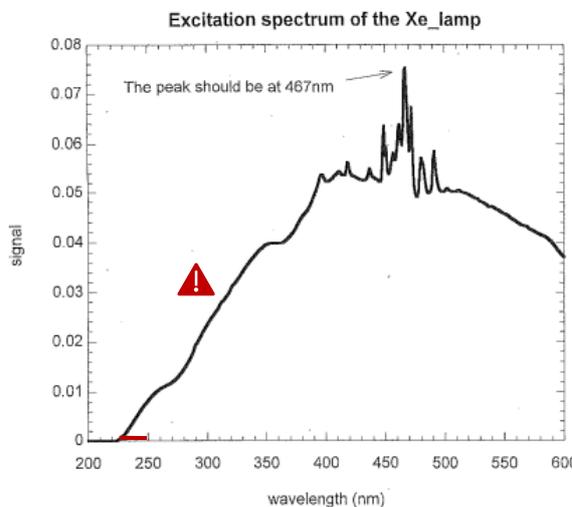
Detector (señal)	Tiempo de integración	Unidades
Referencia (R1)	0,1s	mA

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





El pico de calibración debe aparecer a 467 nm. Esta imagen es un ejemplo, en el que el pico aparece a 480 nm, lo que indica que es **necesario calibrar el monocromador**.



**Cuando la lámpara es vieja, la señal empieza a aparecer a longitudes de onda más altas.**

### 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. 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.

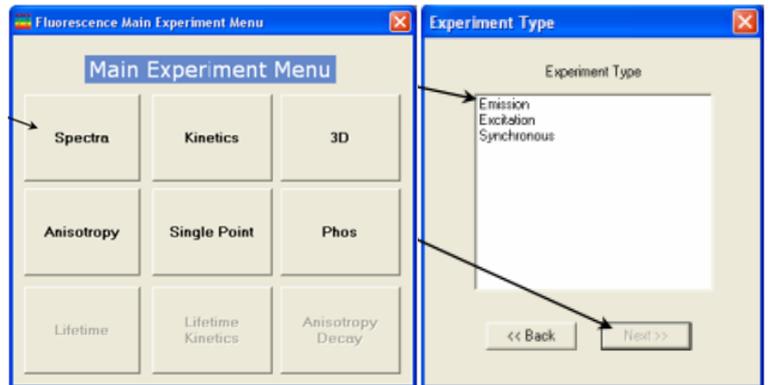
Para el escaneo Raman se sugiere agua de grado HPLC o equivalente. Las muestras de agua impura provocarán niveles de fondo elevados, así como espectros distorsionados con (quizás) algunos picos no deseados.

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

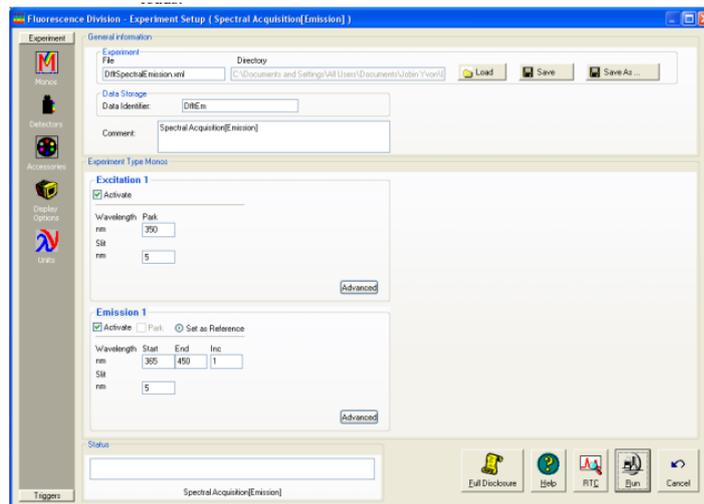
- Colocar la cubeta con agua en el compartimento de muestra.

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

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



El experimento de Raman del agua se carga automáticamente.



**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

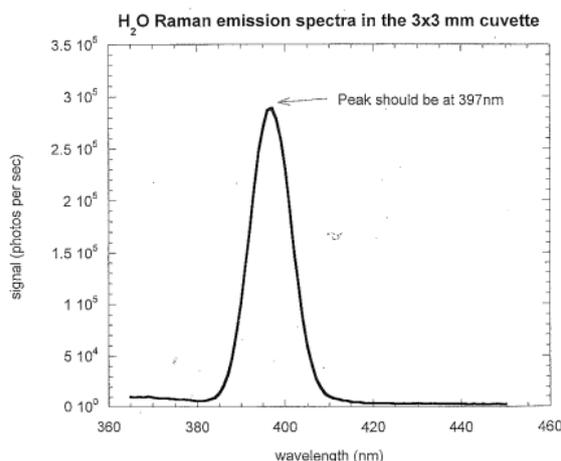
## Parámetros del detector para la el espectro Raman del agua:

Detector (señal)	Tiempo de integración	Unidades
Signal (S1)	0,1s	CPS (cuentas por segundo)



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

**El pico de la señal Raman del agua debe aparecer a 397 nm**



**Cuando la lámpara está agotada:**

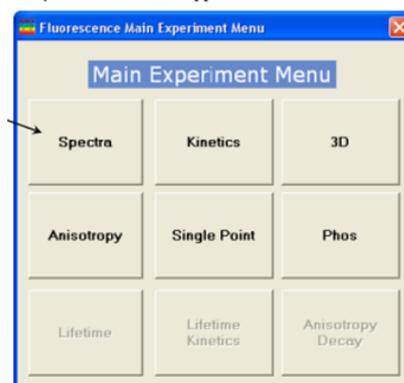
- 1. Se acorta la señal en el UV de ~ 250 nm hacia longitudes de onda mayores.**
- 2. Si se mide en tiempo real, modo continuo, se observan fluctuaciones de intensidad con el tiempo**

**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.

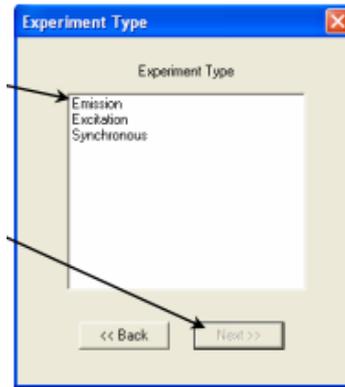
## Realización de experimentos:

En la barra de herramientas de la ventana principal del programa **Fluorescence**:

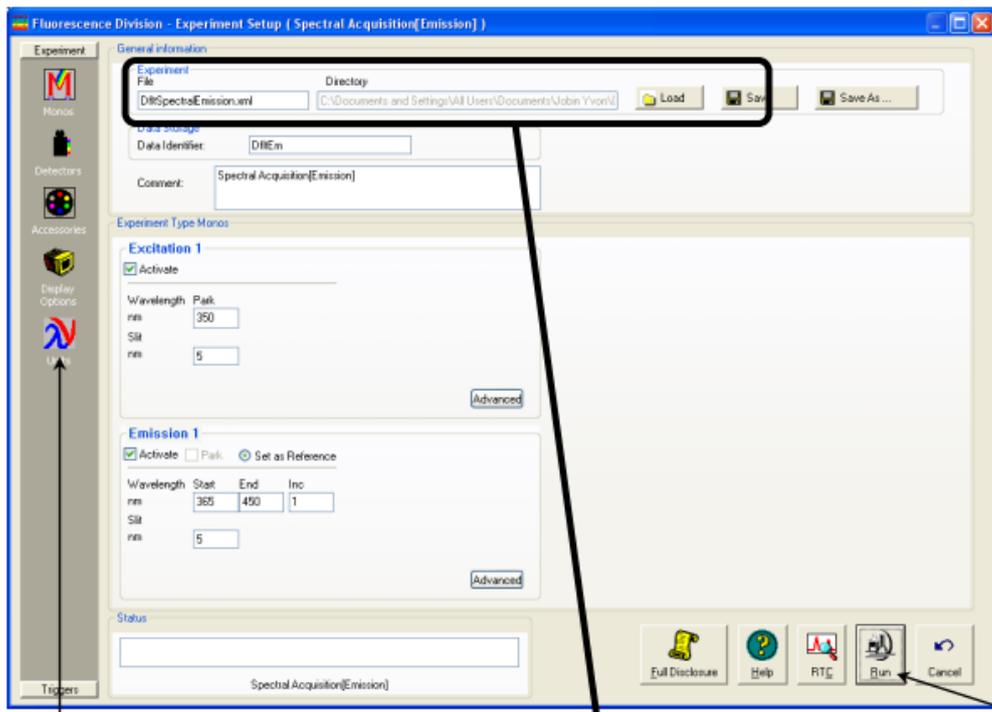
- Seleccionar el  icono
- Seleccionar el tipo de experimento que se desea realizar.



- Seleccionar el subtipo.
- Hacer *click* en “Next >>”.



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



**“Experiment file”:**

WTCa.xml ¡NO TOCAR!

**“Data storage”:**

WTCa\_*nombredelexperimento*.

**“Excitation 1”:**

Wavelength peak: 295 nm

Slit: 2 o 3 nm.

**“Emission 1”:**

<i>Wavelength start: 320 nm</i>
<i>Wavelength end: 400 nm</i>
<i>Wavelength Inc: 1 nm</i>
<i>Slit: 5 nm.</i>
<b>“Detectors”:</b>
<i>Integration time: 0.5s.</i>
<b>“Accesories”:</b>
<i>Temperature control: Enable.</i>
<i>(T): 5</i>
<i>(Teler): 0,1</i>
<i>(EQ): 0,5</i>

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.