

PROTOCOLO DE UTILIZACIÓN DE ESPECTROPOLARÍMETRO JASCO J-810

ÍNDICE

1. OBJETO

2. ALCANCE

3. REFERENCIAS

4. GENERAL

- Descripción del equipo.
- Fundamento de la técnica.

5. MANEJO DEL EQUIPO

- *Encendido y apagado del equipo.*
- *Medir, guardar y exportar espectros.*
 - Manejo del programa *Spectra Manager*.
 - Manejo del programa *Variable temperature* para experimentos de fusión.
 - Manejo del programa *Spectra analysis*.

6. ANEXOS

- Manejo del equipo Peltier.
- Exportar datos a Excel
- Interpretación de resultados. Cálculo de la elipticidad molar.

OBJETO

Este procedimiento tiene por objeto la descripción de las operaciones necesarias para la utilización del espectropolarímetro modelo Jasco J-810, para el análisis estructural de moléculas en disolución, mediante espectros de dicroísmo circular.

ALCANCE

El procedimiento descrito se aplica para la realización de ensayos de determinación de estructura secundaria de proteínas, así como ensayos de fusión utilizando el equipo Peltier para el control de temperatura, en la región del UV lejano (180-240 nm).

REFERENCIAS

- Greenfield, N. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. Nat Protoc 1, 2876–2890 (2006). <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.202>.
- Physical Principles of Circular Dichroism. Steven S. Andrews and James Tretton. Journal of Chemical Education 2020 97 (12), 4370-4376. DOI: 10.1021/acs.jchemed.0c01061.
- MODEL J-810 SPECTROPOLARIMETER Operation manual.
- MODEL J-810 SPECTROPOLARIMETER Hardware/Function Manual.
- Spectra Analysis Program Instruction Manual.

GENERAL

❖ Descripción del equipo:

El espectropolarímetro Jasco J-810 (163-900 nm) es un instrumento híbrido que consiste en un polarímetro de longitud de onda variable y un espectrofotómetro de absorción.

Su diseño permite la determinación de la estructura secundaria por dicroísmo circular; en concreto, para medir la luz polarizada circularmente a izquierda y derecha de las moléculas ópticamente activas. Está equipado con un dispositivo Peltier controlado por ordenador (3-90 °C) y un titulador de dos jeringas para evaluar las estabilidades térmicas/químicas de las proteínas/polipéptidos o para monitorizar la unión de ligandos, y está controlado por el software *Spectra Manager*.



❖ Fundamento de la técnica:

El dicróismo circular se define como la absorción desigual, por parte de medios ópticamente activos, como los compuestos quirales, de luz circularmente polarizada a izquierdas (cuando la onda se propaga hacia el observador con el vector eléctrico girando hacia la izquierda) y a derechas, en el caso contrario.

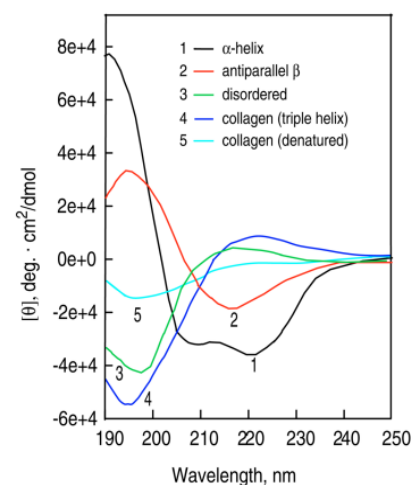
Esta técnica permite evaluar, de manera relativamente rápida, la estructura secundaria, el plegamiento, y las propiedades de interacción de las proteínas.

La interacción de las proteínas con la luz polarizada en la región del UV cercano (250-350 nm) se debe a sus aminoácidos aromáticos, y puede definirse como una “huella dactilar” de la conformación nativa de la proteína, cuya pérdida nos indicará que han ocurrido cambios conformacionales considerables.

En el caso del UV lejano (180-240nm) la absorción principal se debe al enlace peptídico, que no es quiral per se, pero debido a su interacción con grupos peptídicos adyacentes, con una orientación determinada, absorbe en esta región, permitiendo así estimar su estructura secundaria.

Tanto los elementos principales de estructura secundaria, como las zonas no periódicas (bucles presentes en conformaciones nativas o conformaciones desplegadas) presentan una absorción y, por tanto, un espectro característico:

- Hélices α : presentan bandas negativas (mínimos) a 222 y 208 nm, y una banda positiva (máximo) a 193nm.
- Láminas β : presentan un mínimo a 218 y un máximo a 193 nm.
- Random coil: presentan una elipticidad muy baja por encima de 210 nm y un mínimo cerca de 195 nm.



Así, el espectro que se observa, es una combinación lineal de los espectros de las estructuras secundarias y no periódicas que contiene.

Por otro lado, uno de los experimentos más habitualmente llevados a cabo, son los de seguimiento de fusión mediante la medición de un espectro a una determinada longitud de onda, que será escogida en función de la estructura secundaria.

El aumento de temperatura, así como la adición de agentes desnaturalizantes como la urea, provocarán el desplegamiento de la proteína y, consecuentemente, la desaparición de la señal de dicroísmo.

MANEJO DEL EQUIPO

❖ Encendido y apagado del equipo:

Antes de proceder a la realización del experimento, es importante poner en marcha el equipo atendiendo a las siguientes instrucciones, siendo de especial relevancia el orden de los pasos.

1. Abrir el flujo de nitrógeno. Para ello, salir al armario del pasillo, se encuentra justo al lado de la puerta de entrada del laboratorio, y abrir la llave del nitrógeno hasta que el manómetro marque 2 bares de presión. Dejar de nuevo cerrado el armario.
 - *Gas nitrógeno: la fuerte radiación UV producida por la fuente puede crear niveles de ozono dañinos para los elementos ópticos a menos que se tomen medidas para eliminar el oxígeno del instrumento. Estos efectos aumentan a medida que disminuye la longitud de onda. El gas nitrógeno se utiliza para purgar el aire de la óptica del instrumento.*
2. En el interior, se encuentra un panel para dirigir el flujo de nitrógeno en función de la región UV en la que se quiera trabajar. Como el alcance de este protocolo es para experimentos en la región del UV lejano, se procede de la siguiente manera. Abrir la llave de rueda del panel de los medidores de flujo hasta que el manómetro marque 1 bar, y girar la llave en forma de palanca hacia el rotámetro A.
3. Abrir la llave del medidor de flujo A hasta que la bolita se encuentre entre 70 y 80.
4. Abrir el circuito de agua de refrigeración. Para que el flujo de agua sea adecuado, es necesario que la boya localizada en el indicador de flujo se encuentre siempre entre las dos marcas señaladas. En caso de que no fuese así, puede regularse con la llave de bola situada al lado. Es importante que, durante la realización del experimento, se revise cada cierto tiempo si se mantiene en la

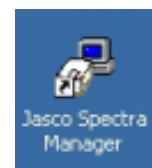
posición correcta, con el fin de evitar variaciones del flujo.

5. Encender la turbina de aspiración de ozono, pulsando el interruptor que se encuentra justo detrás del equipo. Para comprobar que está encendido, puede observarse una luz roja.
6. Para la realización de experimentos que requieran un control de temperatura, encender el equipo Peltier. Cuando se enciende está siempre en STOP, pulsar START.
7. Encender el espectropolarímetro. Se encenderá la luz indicadora del shutter.
8. Finalmente, proceder a encender también el ordenador.

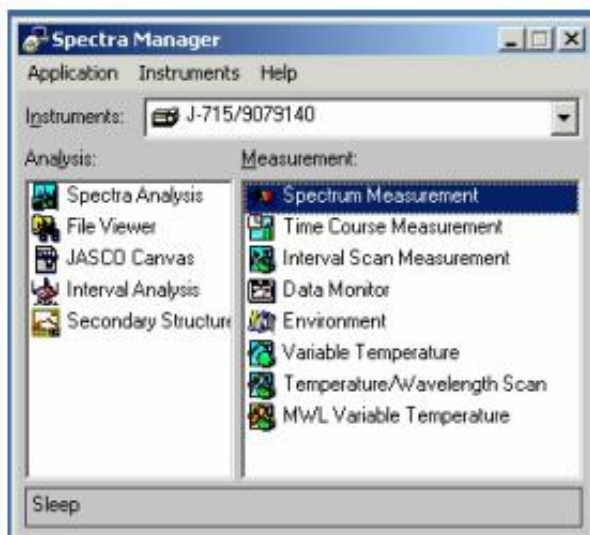
Una vez finalizado el experimento, para apagar el equipo, debe procederse con los mismos pasos, pero en orden inverso.

❖ Manejo del programa *Spectra Manager*:

Para la obtención de los espectros, se utiliza el programa *Spectra Manager* que se encuentra localizado en el escritorio.



Al abrir el programa aparecerá la siguiente ventana:



En la columna de la izquierda “*Analysis*” aparecen los programas de ajuste, y en la de la derecha “*Measurement*” los programas de medida.

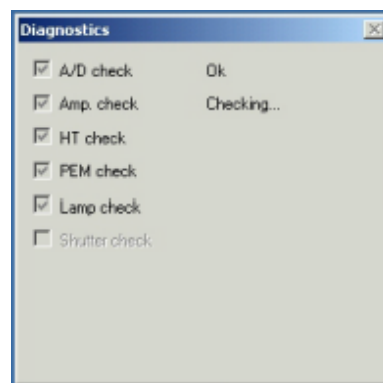
Para los experimentos de obtención de espectros de estructura secundaria de proteínas, seleccionar el programa “Spectrum Measurement”.

- **Manejo del programa de medida “*Spectrum Measurement*”:**

Seleccionar el programa, haciendo “doble click” sobre el mismo.

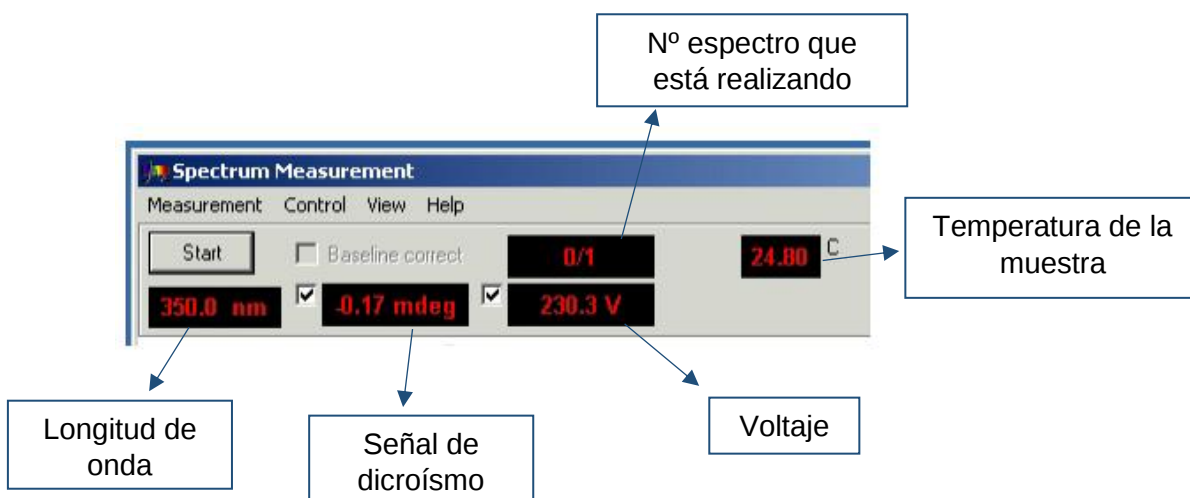
Aparecerá una pantalla indicando que se está haciendo el cambio O-N (la lámpara de Xe-Ng produce O₃), y una vez realizado se encenderá la luz indicadora de la lámpara

Seguidamente, se abrirá una nueva ventana de diagnóstico del sistema. Realizar el diagnóstico 2-3 veces si alguno de los parámetros no está en “Ok” haciendo click en “*Retry*”. Si tras realizarlo varias veces no cambia nada, hacer click en “*Ignore*” para continuar.

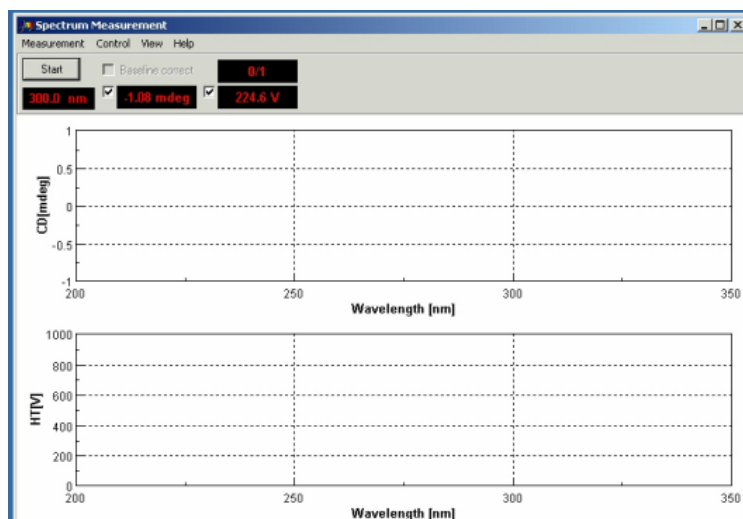


Es recomendable esperar unos 10 minutos antes de proceder con el experimento, para que la lámpara se caliente.

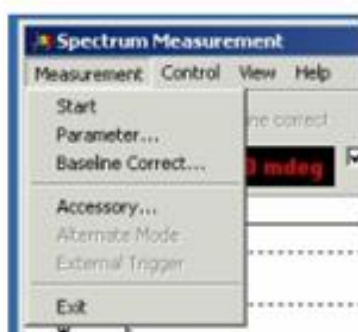
Se abrirá entonces la ventana con la pantalla de medida:



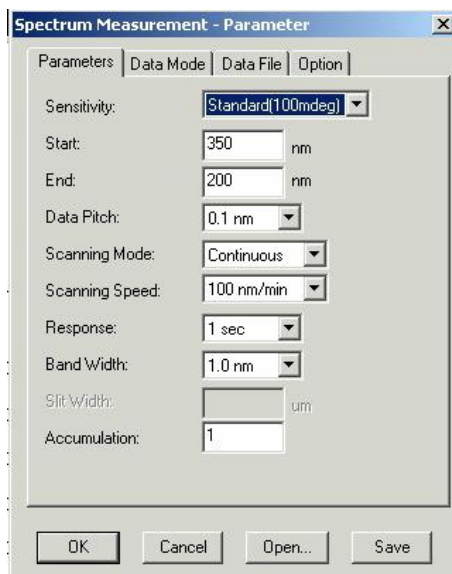
Debajo de este panel, se encuentran dos gráficos diferenciados correspondientes al espectro (gráfica CD) y al registro del voltaje del fotomultiplicador (gráfica HT).



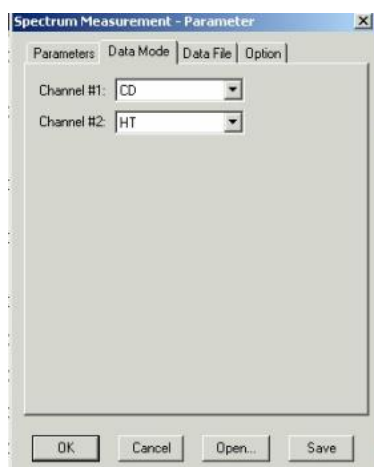
Para ajustar los parámetros de medida, seleccionar el icono “*Measurement*”, y dentro del desplegable, seleccionar la opción “*Parameters*”. Se abrirá la siguiente ventana con distintas pestañas:



- **Pestaña *Parameters*:**



- **Pestaña Data Mode:**



Ejemplo de ajuste de los parámetros

- + **Sensitivity:** Standard (100mdeg).
- + **Start:** 260 nm.
- + **End:** 195 nm.
- + **Data Pitch:** 0,5 nm.
- + **Scanning Mode:** Continuous.
- + **Scanning Speed:** 50 nm/min.
- + **Response:** 4 sec.
- + **Band With:** 1.
- + **Accumulation:** 4.

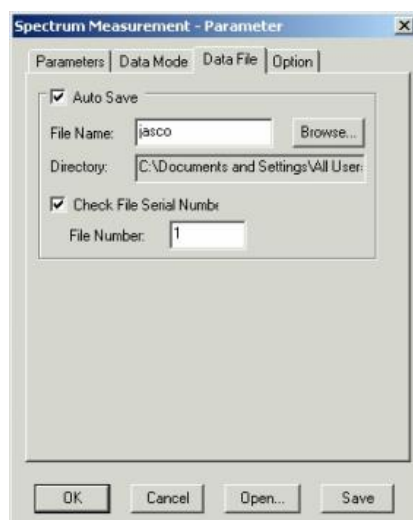
Instrucciones para ajustar los parámetros

- + **Sensitivity:** Selección de la sensibilidad. Lo recomendable es utilizar la estándar (100mdeg) y solo utilizar la sensibilidad alta para muestras muy diluidas.
- + **Start:** Selección de la longitud de onda en la que comienza a medir.
- + **End:** Selección de la longitud de onda en la que termina de medir.
- + **Data Pitch:** Selección de cada cuanto toma puntos.
- + **Scanning Mode:** Modo de escaneo.
- + **Scanning Speed:** Velocidad de escaneo. Cuanto menor es la velocidad, de mejor calidad será el espectro.
- + **Response:** Selección del tiempo que tarda en hacer el siguiente espectro.
- + **Band With:** Anchura del paso de luz. Se debe utilizar 1 ó 2, como máximo 3.
- + **Accumulation:** Número de espectros que realiza. Mínimo seleccionar 2.

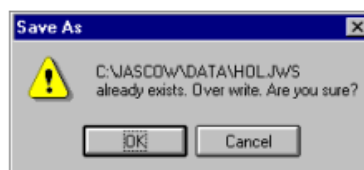
En esta pestaña se selecciona el número de canales de medida y el modo fotométrico de cada uno de ellos. Como se ha mencionado antes, el primero corresponde al espectro de dicroísmo y en el segundo se monitoriza el voltaje.

Aquí no se debe modificar nada.

- **Pestaña Data File:**



En esta pestaña, se selecciona mediante el icono “Browse” la localización en la que se guardará el archivo y donde permite ponerle el nombre deseado. Si no se cambia el nombre, se sobrescribirá sobre el antiguo, aunque aparece una ventana de aviso para evitar que esto ocurra.



Mantener seleccionado “Auto Save”. Por defecto se guardará en la carpeta C:\jascow\data y dentro de la misma en la carpeta que se seleccione.

El formato (.jwb) en el que se guarda el archivo, solo permite abrirlo con el programa *Spectra Manager*, pero también es posible guardarlo en ASCII (.txt) para analizar los datos en Excel.

Si se va a realizar el espectro a una temperatura concreta, seguir las instrucciones del Anexo I: Manejo del equipo Peltier.

- **Pestaña Option:**

Esta pestaña permite introducir información acerca del experimento que se va a realizar. Por ejemplo, la concentración de la muestra, los componentes del buffer, la temperatura o el tipo de cubeta que se va a utilizar.

Una vez completado el ajuste de parámetros, se selecciona *Ok*, y aparecerá una ventana que indica que se están transmitiendo estos parámetros.

Introducir la cubeta con la muestra (400µL). Es importante que la cubeta se coloque siempre en la misma posición. Así, en el caso de que ésta tuviese alguna imperfección, no se produzcan variaciones en las medidas.

Para iniciar la medida hacer *click* en START.

Tras realizar la medida del blanco, se procede a la introducción de la muestra, no siendo necesario volver a modificar los parámetros, pero sí el nombre del archivo.

El programa te da la opción “*Baseline correct*” para hacer la corrección teniendo en cuenta los datos del blanco. Si se desea proceder de esta manera, es importante que en el icono “*Measurement*” se seleccione “*Baseline*” y se abre una ventana con un desplegable en el que han quedado guardados los últimos blancos realizados.

Existe la opción de cargar el archivo del blanco realizado en el experimento, pero si hay demasiados ficheros en el desplegable, será necesario borrar alguno para poder cargar el nuevo. **Cuando se borran archivos de este desplegable no se destruyen, simplemente se eliminan del listado disponible, y es necesario volver a cargarlos si se desean utilizar nuevamente.**

Finalmente, en la pantalla de medida se selecciona “*Baseline correct*” para que haga la corrección.

Si se desea realizar el espectro a una temperatura determinada, será necesario, acceder al menú desplegable de “*Measurements*”, seleccionar “*Accessories*” y habilitar el controlador de temperatura Peltier.

Para iniciar la medida hacer *click* en START.

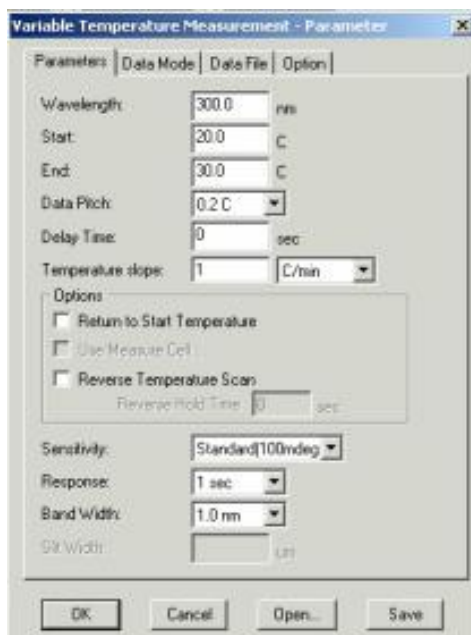
Una vez llevadas a cabo las mediciones, se abrirá una ventana con el programa “*Spectra Analysis*” donde se muestra el espectro obtenido.

- **Manejo del programa de medida “*Variable Temperature*” para experimentos de fusión:**

Este programa permite medir el cambio en los valores de dicroísmo circular con el tiempo a una longitud de onda fija mientras va cambiando la temperatura.

Para ajustar los parámetros de medida, seleccionar el icono “*Measurement*”, y dentro del desplegable, seleccionar la opción “*Parameters*”. Se abrirá la siguiente ventana con distintas pestañas:

- **Pestaña Parameters:**



Ejemplo de ajuste de los parámetros

- ✚ **Wavelength:** 222nm (hélice α).
- ✚ **Start:** 5°C.
- ✚ **End:** 90°C.
- ✚ **Data Pitch:** 0,5 C.
- ✚ **Delay time:** 2.
- ✚ **Temperature slope:** 50 nm/min.
- ✚ **Sensitivity:** Standard (100mdeg).
- ✚ **Response:** 4 sec.
- ✚ **Band With:** 1.

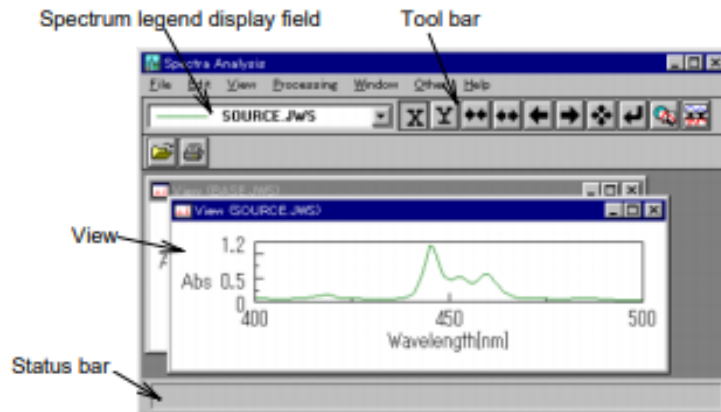
Instrucciones para ajustar los parámetros

- ✚ **Wavelength:** Selección de la longitud de onda en la que se quiere realizar la medida. Se debe seleccionar en función de la estructura de la proteína
- ✚ **Start:** Selección de la temperatura en la que comienza a medir.
- ✚ **End:** Selección de la temperatura en la que termina de medir.
- ✚ **Data Pitch:** Selección de cada cuanto toma puntos.
- ✚ **Delay time:** tiempo antes de que comience la medición después de que se haya alcanzado la temperatura objetivo.
- ✚ **Temperature slope:** indica la rapidez con la que el Peltier aumentará la temperatura.
- ✚ **Options:** En este apartado se puede seleccionar la opción de volver a poner la muestra a la temperatura de inicio, así como hacer un espectro de la rampa de bajada de temperatura.
- ✚ **Sensitivity:** Selección de la sensibilidad. Lo recomendable es utilizar la estándar (100mdeg) y solo utilizar la sensibilidad alta para muestras muy diluidas.
- ✚ **Response:** Selección del tiempo que tarda en hacer el siguiente espectro.
- ✚ **Band With:** Anchura del paso de luz. Se debe utilizar 1 ó 2, como máximo 2.

Las pestañas *Data Mode* y *Data File* y *Option* son exactamente iguales a las descritas en el apartado “Manejo del programa *Spectrum Measurement*”.

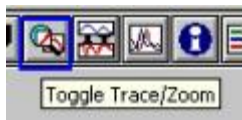
❖ **Manejo del programa *Spectra Analysis*:**

Cuando se finaliza la medición de un espectro se abre por defecto la ventana del programa *Spectra Analysis*. También es posible acceder a ella desde el menú inicial del programa *Spectra Manager*.



“Status bar”: permite visualizar la longitud de onda y el dato correspondiente a la posición seleccionada. Para seleccionar una posición, mover el ratón hasta el lugar deseado y hacer “click” con el botón izquierdo.

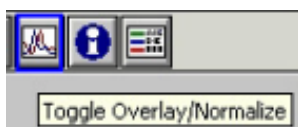
“Tool bar”: Contiene iconos para funciones que se utilizan frecuentemente. Los primeros iconos permiten hacer cambios en la escala del espectro.



Permite cambiar el modo de cambios en la escala de los iconos de la barra de herramientas al ratón.



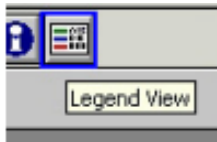
Selecciona el archivo de datos "activo" de los de la vista.



Permite seleccionar entre "superposición" o normalización individual al ver múltiples espectros.



Ver y modificar la información almacenada con el espectro.



Muestra un resumen condensado de los espectros abiertos.

“Superposición de espectros”: Para superponer dos o más espectros para compararlos, el programa dispone de la función “*overlay*”. Para acceder a ella, seleccionar File, y en el desplegable seleccionar “*overlay*”.

“Derivadas”: Muestra el cuadro de diálogo que sirve para obtener la derivada de 1er, 2º o 3er orden de un espectro.

“*Peak find*”: Esta opción se utiliza para detectar los máximos y mínimos de un espectro. Para acceder, seleccionar “processing”, “peak process” y “peak find” finalmente. Permite detectar un máximo de 100 máximos/mínimos por espectro.

ANEXO I: MANEJO DEL EQUIPO PELTIER

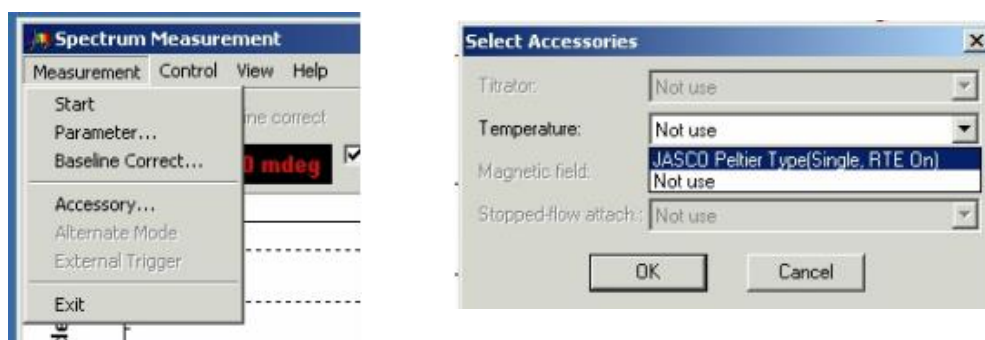
Este equipo permite el control de temperatura de la muestra para realizar las mediciones de espectros de dicroísmo circular con rampas térmicas.

Se utiliza con dos tipos de programas:

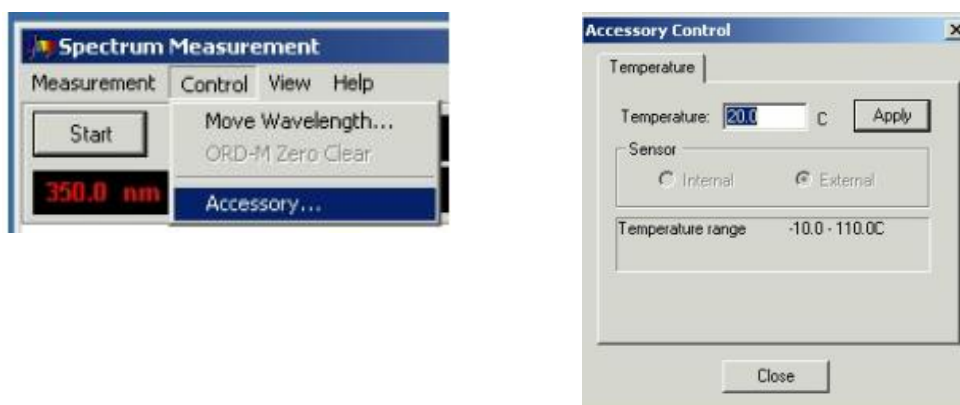
- *Variable Temperature*: mide el cambio en los valores de dicroísmo circular con el tiempo a una longitud de onda fija mientras va cambiando la temperatura.
- *Temperature/Wavelength Scan*: mide el espectro de dicroísmo escaneando longitudes de onda a una temperatura fijada mientras mide el cambio en los valores con el cambio de temperatura.

También puede utilizarse para llevar a cabo espectros con el programa *Spectrum Measurement*, a una temperatura determinada.

En este caso, en la pantalla de medidas, seleccionar *Measurement*, y en el desplegable seleccionar *Accesory*. Se abrirá una ventana con un desplegable en el apartado temperatura, donde se deberá escoger Jasco Peltier, para habilitar el equipo.



Después, seleccionar *Control*, y en el desplegable seleccionar *Accesory*, se abrirá una nueva ventana en la que permite introducir el valor de temperatura deseado.



Pese a que los valores de temperatura deseados para la realización de los experimentos se establecen desde el ordenador en los diferentes programas, en ocasiones, se hace necesario introducirlos manualmente mediante el panel de operaciones del equipo.

Para ello se procede de la siguiente manera:

Cuando se enciende el equipo, por defecto se encuentra en STOP. El primer paso para establecer la temperatura es pulsar ENTER y mediante los botones con flechas ajustar el valor deseado, finalmente pulsar START y esperar a que la temperatura llegue a ese valor y se mantenga estable, antes de realizar el espectro.

ANEXO II: Exportar datos a Excel

1. Abrir el programa *Spectra Manager*.
2. Seleccionar el programa *Spectra analysis*, donde se visualizan los espectros obtenidos.
3. En el desplegable *File*, seleccionar open para abrir el archivo que se desee.
4. Una vez abierto, en el mismo desplegable *File*, seleccionar save as y guardarlo con formato ASCII.txt.
5. Abrir el archivo con *Wordpad*, *Word*, o cualquier procesador de texto. Debajo de XYDATA aparecen 3 columnas de datos numéricos, que se corresponden con:
 - a. Primera columna: longitud de onda (nm).
 - b. Segunda columna: señal de dicroísmo (mDeg).
 - c. Tercera columna: voltaje (V).
6. Copiar las 3 columnas y pegar estos datos en un nuevo Word.
7. Reemplazar todos los puntos por comas.
8. Copiar los datos corregidos y pegarlos en Excel. (Para la representación gráfica en Excel, solo se necesitan los datos de las dos primeras columnas).

ANEXO III: Interpretación de resultados. Cálculo de la elipticidad molar.

En los experimentos realizados con proteínas, es recomendable que la elipticidad obtenida experimentalmente se convierta en elipticidad media por residuo.

De esta manera, se puede corregir la medida en función de la concentración de la muestra y del número de enlaces peptídicos de la proteína. Llevando así a cabo un proceso de pseudonormalización, que permite realizar comparaciones entre *wild type* y mutantes, así como entre diferentes proteínas.

La elipticidad molar media por residuo puede calcularse mediante la siguiente fórmula:

$$[\theta] = \frac{\theta_{obs}(\lambda)}{n_{pb} \cdot 10 \cdot l \cdot C} = \text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$$

Donde θ_{obs} es la señal de elipticidad observada (mdeg), n_{pb} es el número de enlaces peptídicos (número de aminoácidos – 1), l es el paso óptico de la cubeta (cm) y C es la concentración de la muestra (mol/L).

Algo muy importante a considerar cuando se desea comparar múltiples espectros es la concentración, esta debe ser determinada con precisión.