

PRACOWNIA BIOFIZYKI DLA ZAAWANSOWANYCH

Ćwiczenia laboratoryjne dla studentów III roku kierunku

„Zastosowania fizyki w biologii i medycynie”

Biofizyka molekularna

Porównanie rozwijania białka zielonej fluorescencji EGFP związkami chaotropowymi i poprzez zakwaszanie (PBdZ 32a)



KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY



Projekt *Fizyka wobec wyzwań XXI wieku* współfinansowany ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego

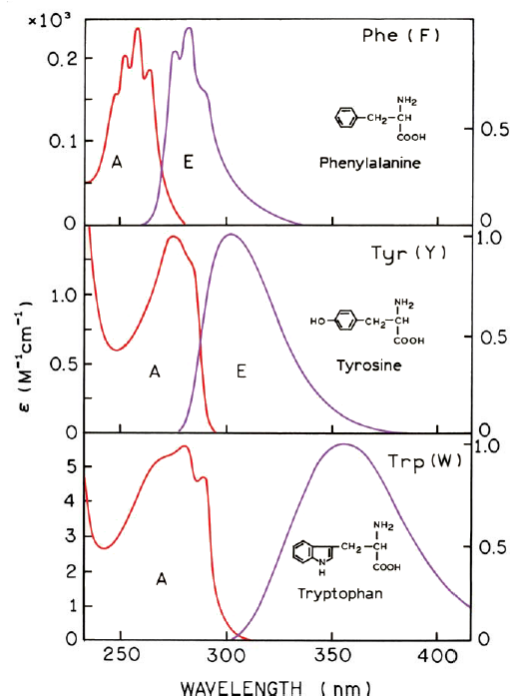
Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest obserwacja procesu rozwijania bardzo stabilnego białka, jakim jest mutant białka zielonej fluorescencji GFP (Enhanced Green Fluorescent Protein, F64L/S65T-GFP). Do denaturacji zostanie użyty czynnik chaotropowy, jakim jest chlorowodorek guanidyny (GdnHCl), oraz roztwór buforu fosforanowego o pH 1. Zostanie przeprowadzony pomiar kinetyki rozwijania przy użyciu techniki zatrzymanego przepływu w celu wyznaczenia i porównania między denaturantami charakterystycznych czasów reakcji w zależności od stężenia GdnHCl i wartości pH. Czasowy przebieg rozwijania dla czasów dłuższych niż jest to możliwe dla techniki zatrzymanego przepływu, będzie przeprowadzony za pomocą spektrofluorymetru. Pomiary na spektrofluorymetrze posłużą także próbie udowodnienia występowania intermediatu rozwijania.

Wstęp

Właściwości absorpcyjne i emisyjne aminokwasów i białek

Białka oraz peptydy składają się z 20 podstawowych aminokwasów, które poza rolą strukturalną mogą być również substratami utleniania komórkowego, neuroprzekaznikami czy hormonami. Jedynie 3 aminokwasy: fenyloalanina, tyrozyna i tryptofan, przejawiają właściwości absorpcyjne i emisyjne w zakresie bliskiego nadfioletu (Rys. 1). Za właściwości te odpowiadają występujące w strukturze wymienionych aminokwasów pierścienie aromatyczne zawierające sprzężony układ π -elektronowy.



Rys. 1 Widma absorpcji (A) i emisji fluorescencji (E) aminokwasów aromatycznych w roztworze wodnym pH 7 oraz ich wzory strukturalne. Rysunek z J.R. Lakowicz, 2006.

Tabela 1. Właściwości spektralne aminokwasów aromatycznych w pH 7 (za G. D. Fasman 1976 i J. R. Lakowicz 2006)

	max. λ_A [nm]	max. λ_E [nm]	ϵ [$M^{-1}cm^{-1}$]	Φ
Phe	257,5	282	15	0,03
Tyr	274	303	1 405	0,14
Trp	278	350	5 579	0,20

Szczególnie użytecznym aminokwasem do badania białek jest tryptofan. Ze wszystkich trzech aminokwasów aromatycznych ma on największą wydajność kwantową (Tabela 1), a długość fali emisji, jak i intensywność fluorescencji zależy od środowiska w jakim się znajduje. W związku z tym może on odzwierciedlać zachodzące w białku zmiany konformacyjne, denaturację, łączenie się podjednostek czy wiązanie substratu. Daje to także możliwości badania funkcji białek, ich zwiwania oraz dynamiki. Ponadto ma on najdalej wysunięte pasmo absorpcji, dzięki czemu można wzbudzać go selektywnie, zazwyczaj w zakresie 295-305 nm. Ze względu na przekrywanie się widm absorpcji i emisji poszczególnych aminokwasów aromatycznych, może zachodzić między nimi przeniesienie

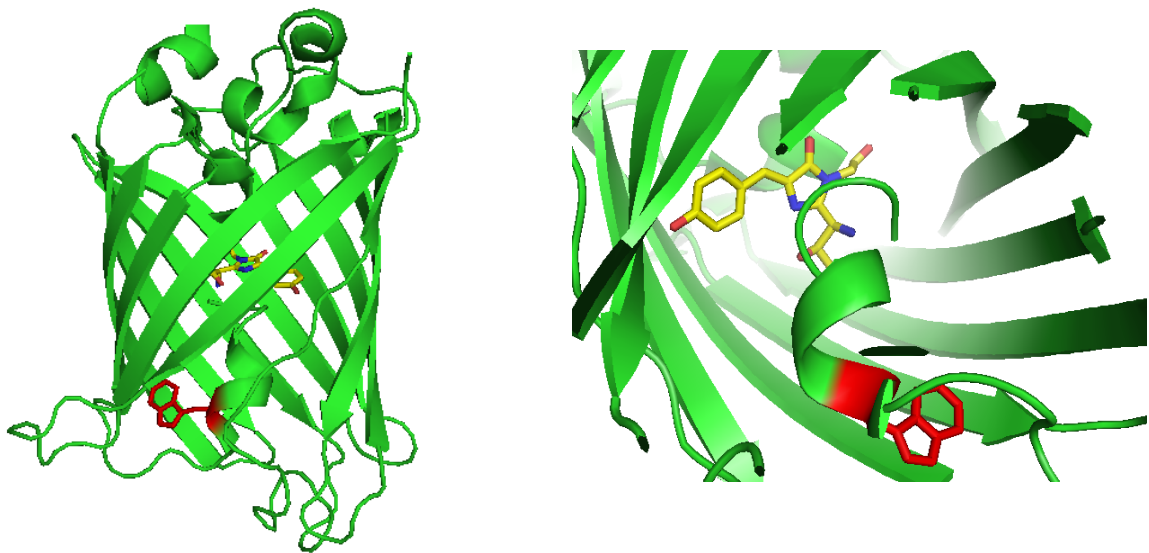
energii z fenyloalaniny na tyrozynę oraz z tyrozyny na tryptofan. Tryptofan jest także wrażliwy na wygaszanie fluorescencji, nie tylko przez cząsteczki roztworu, ale także we wnętrzu białka przez inne aminokwasy, np. lizynę lub histydynę, a także przez grupy amidowe wiązania peptydowego. Wszystkie te własności sprawiają, że decydujący wpływ na kształt widma absorpcji i emisji białka ma tryptofan, a maksimum absorpcji białka obserwuje się w 280 nm.

Białko zielonej fluorescencji

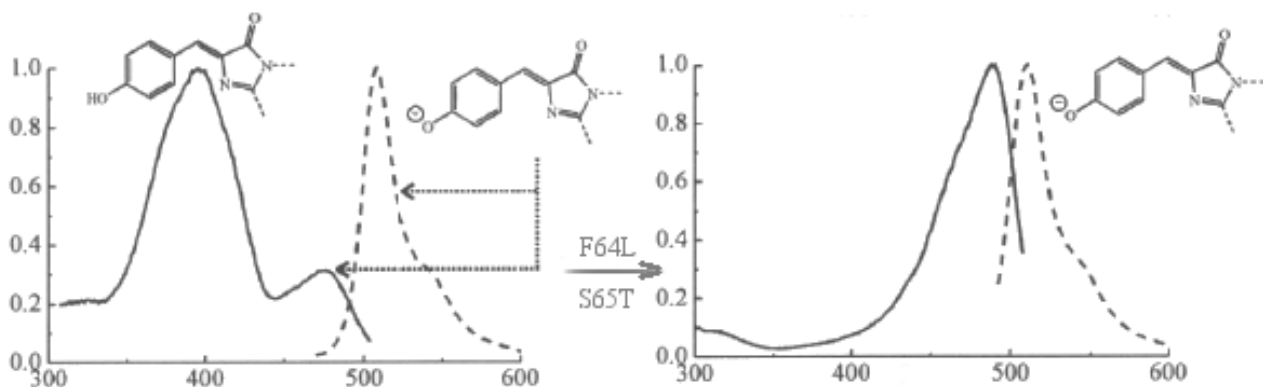
Białko zielonej fluorescencji (GFP – green fluorescent protein) zostało odkryte w latach 60-tych XX w. przez japońskiego naukowca Osamu Shimomura podczas badań nad białkiem akworyną. W 2008 r. Osamu Shimomura, Martin Chalfie oraz Roger Y. Tsien otrzymali nagrodę Nobla w dziedzinie chemii za odkrycie i rozwój metod pozwalających na zastosowania białka zielonej fluorescencji w biotechnologii. GFP naturalnie występuje w meduzie *Aequorea victoria* i tworzy z akworyną układ sprawiający, że zdenerwowana meduza zaczyna świecić. Akworyna, która ma związaną kolentrazynę (pigment występujący w pewnych jamochłonach), pod wpływem wiązania jonów wapnia utlenia kolentrazynę do wzbudzonej formy kolentramidu, który powracając do stanu podstawowego emituje światło o niebieskiej barwie. Emisja niebieskiego światła nie jest jednak widoczna, gdyż w układzie akworyna-GFP zachodzi rezonansowe przeniesienie energii (FRET), które powoduje wzbudzenie chromoforu białka zielonej fluorescencji i emisję o zielonej barwie.

Białko zielonej fluorescencji jest niedużym białkiem (ok. 27 kDa, 238 aminokwasów) o strukturze β -kartkowej tworzącej beczkę przykrytą pętlami i helikalnymi fragmentami łańcucha polipeptydowego. W środku, wzdłuż osi beczki, biegnie α -helisa zawierająca chromofor (p-hydroksybenzylidienoimidazolinon), a u jej podstawy znajduje się jedyny w tym białku tryptofan (Rys. 3). Odległość między pierścieniami chromoforu i tryptofanu wynosi 11-15 Å, co umożliwia transfer energii z aminokwasu na chromofor. Ponadto w swojej strukturze EGFP zawiera także 11 tyrozyn i 12 fenyloalanin oraz 2 cysteiny nie tworzące ze sobą mostka disiarczkowego.

W porównaniu z typem dzikim białka zielonej fluorescencji w EGFP wprowadzono leucynę w miejsce fenyloalaniny 64 i treoninę w miejsce seryny 65. Obie te mutacje okazały się mieć bardzo duże znaczenie dla wydajniejszego zwijania, wzmocnienia intensywności fluorescencji oraz uproszczenia widma absorpcyjnego białka (Rys. 4). Związane jest to między innymi ze zmianą stanu jonowego chromoforu, który w białku dzikim występuje zarówno w formie neutralnej (absorpcja w ok. 395 nm), jak i anionowej (absorpcja w ok. 475 nm), podczas gdy w EGFP praktycznie cała populacja białka ma chromofor w formie zjonizowanej. Maksima absorpcji dla białka EGFP obserwuje się: dla aminokwasów aromatycznych w 278 nm oraz dla chromoforu w 489 nm. Doświadczalnie wyznaczone współczynniki ekstynkcji w pH 7,3 wynoszą odpowiednio $\epsilon_{277} = 21\ 000\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ oraz $\epsilon_{488} = 38\ 000\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Seifert et al., 2002). Maksima emisji obserwuje się w 336 nm dla aminokwasów aromatycznych i w 509 nm dla chromoforu, co nadaje białku jaskrawe, zielono-żółte zabarwienie.



Rys. 3 Struktura mutantu F64L/S65T-GFP (lewy panel, PDB 2Y0G) oraz wnętrze β -beczki z chromoforem (żółty) i tryptofanem 57 (czerwony) (prawy panel).



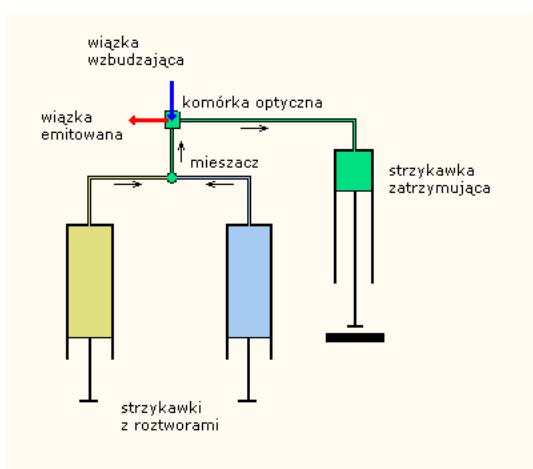
Rys. 4 Widmo wzbudzenia (ciągła linia) i emisji (przerywana linia) typu dzikiego wtGFP (lewy panel) oraz mutantu F64L/S65T-GFP (prawy panel). Rysunek za R. Y. Tsien 1998, str. 520.

Rozwijanie białka zielonej fluorescencji

Odwracalna denaturacja białka może zostać osiągnięta przez użycie związku chaotropowego takiego jak mocznik czy chlorowodorek guanidyny (GdnHCl) lub też poprzez zakwaszenie środowiska. Denaturujące działanie GdnHCl opiera się na zaburzeniu oddziaływania białka ze środowiskiem ze względu na zakłócenie sieci wiązań wodorowych wody w roztworze. Z kolei zakwaszenie powoduje nagromadzenie ładunku dodatniego na powierzchni większości białek, co skutkuje wystąpieniem niekorzystnych dla molekuly oddziaływań elektrostatycznych, a także wpływa na wartości stałej asocjacji łańcuchów bocznych kwasu glutaminowego i asparaginowego. Z rozwijaniem białka zielonej fluorescencji zawsze wiąże się utrata fluorescencji, gdyż rozluźnienie struktury zwiększa ruchliwość chromoforu oraz powoduje jego ekspozycję do środowiska i naraża go na wygaszanie przez cząsteczki rozpuszczalnika. Jednak sama utrata fluorescencji nie jest jeszcze wyznacznikiem rozwinięcia białka. Stwierdzono, że w pH 2,9, pH 2, pH 1.5, a także w pH 1 występuje resztkowa struktura białka mimo wcześniejszej utraty fluorescencji chromoforu. Z kolei brak emisji chromoforu w wysokich stężeniach GdnHCl nie jest równoważny z osiągnięciem stanu równowagi przez białko poddane denaturacji, gdyż proces ten może trwać nawet kilka dni w zależności od ob-

serwowanego mutantu GFP. Zatem proces rozwijania białka zielonej fluorescencji jest powolny w porównaniu z innymi niewielkimi monomerycznymi białkami. Podczas równowagowego rozwijania GFP zarówno w przypadku użycia GdnHCl, jak i podczas zakwaszania, zaobserwowano występowanie intermediatu. Jego struktura była podobna w obu przypadkach i zawierała znaczną część struktury II- i III-rzędowej. Nie we wszystkich warunkach intermediat ten jest łatwo dostrzegalny, co może być spowodowane dużym podobieństwem do struktury natywnej białka. Wydaje się, że większa część β -beczki jest dobrze zachowana z wyjątkiem β -kartek od 7 do 10, które łatwiej podlegają zmianom konformacyjnym. Pomiar kinetyki rozwijania wskazuje, że przy stężeniach GdnHCl powyżej 5 M czas rozwijania wynosi od ok. 40 do 76 s. Jednak im mniejsze stężenie denaturanta, tym białko wolniej się rozwija. W zależności od stopnia zakwaszenia i rodzaju mutantu GFP rozwijanie może trwać od kilkudziesięciu milisekund do kilkudziesięciu sekund.

Technika zatrzymanego przepływu



(za M. Narczyk, praca magisterska 2006)

Schemat aparatu zatrzymanego przepływu (ang. stop-ped-flow) przedstawiony został na Rys. 6. W strzykawkach aparatu umieszcza się substancje pomiędzy którymi ma zajść reakcja i w zależności od rodzaju aparatu możliwe jest umieszczenie nawet 4 roztworów. Reakcję rozpoczyna się poprzez jednoczesne wypchnięcie za pomocą zewnętrznego tłoka cieczy ze strzykawek, które poprzez element mieszający trafiają do komórki optycznej. Mieszacz powoduje szybkie mieszanie składników i do kuwety trafia homogeny roztwór. Do cieczy o dużej różnicy gęstości często potrzebne są elementy mieszające specjalnie do tego przygotowane. Wraz z postępującym przepływem roztworów wyjściowych napełniana jest strzykawka zatrzymująca,

której tłok blokuje się po uzyskaniu zadanej objętości, co jednocześnie zatrzymuje przepływ w całym aparacie. Zatrzymanie przepływu rozpoczyna rejestrację obserwowanego procesu. Wszystkie opisane wyżej czynności trwają zazwyczaj kilka milisekund i jest to tzw. czas martwy aparatu. Technikę zatrzymanego przepływu stosuje się w połączeniu z pomiarami absorpcyjnymi, emisyjnymi i dichroizmu kołowego.

Metody analizy danych

Do opisu kinetyki rozwijania białka stosowano model wieloeksponencjalny [5,8]

$$I = \sum_i A_i \cdot \exp\left(\frac{-t}{\tau_i}\right) + A_{inf} \quad (1)$$

gdzie:

I – intensywność sygnału (sygnał absorpcyjny, emisyjny, dichroizmu kołowego)

A_i – amplituda i -tej fazy procesu

τ_i – czas charakterystyczny i -tej fazy procesu

A_{inf} – wyraz wolny

Należy dopasować i wybrać najlepiej pasujący do uzyskanych danych model (tzn. sumę odpowiedniej liczby funkcji eksponens), po uwzględnieniu uzyskanych parametrów dopasowań i ich niepewności oraz analizy odchyłeń residualnych. Na podstawie otrzymanej liczby faz i czasów charakterystycznych można próbować dokonać interpretacji poszczególnych procesów występujących podczas rozwijania białka.

Przebieg ćwiczenia

Do pomiarów czasowych na spektrofluorymtrze studenci otrzymają 50 mM bufor fosforanowy z 300 mM NaCl pH 8 bez GdnHCl oraz z 6 M GdnHCl o pH 8. Z tych roztworów studenci powinni przygotować serię buforów o różnym stężeniu GdnHCl, w których będą badać rozwijanie białka. Rozwijanie białka będzie inicjowane poprzez zawieszenie stężonego roztworu białka w odpowiednim buforze rozwijającym bezpośrednio w kuwecie pomiarowej. Mieszanie roztworu będzie następowało za pomocą mieszadła magnetycznego. Do zadań studenta należy wybór odpowiedniej długości fali wzbudzenia i obserwacji oraz szerokości szczelin spektrofluorymtru, a także czasu pomiaru. Należy pamiętać o sprawdzeniu przebiegu czasowego tła.

Do pomiarów stacjonarnych na spektrofluorymtrze studenci otrzymają serię roztworów 100 mM fosforanowego o różnym pH w zakresie od pH 1 do pH 8. Rozwijanie białka będzie inicjowane poprzez zawieszenie stężonego roztworu białka w odpowiednim buforze rozwijającym bezpośrednio w kuwecie pomiarowej. Mieszanie roztworu będzie następowało za pomocą mieszadła magnetycznego. Należy wykonać widmo fluorescencyjne białka EGFP dla długości fali wzbudzenia $\lambda_{ex} = 280$ nm w zakresie od 290 do 550 nm. Stężenie białka nie powinno przekraczać 2 μ M. Do zadań studenta należy dalszy dobór ustawień parametrów spektrofluorymtru. Należy pamiętać o wykonaniu pomiarów widm tła.

Do pomiarów techniką zatrzymanego przepływu w funkcji stężenia chlorowodoru guanidyny studenci otrzymają serię roztworów 50 mM buforu fosforanowego z 300 mM NaCl i różną ilością GdnHCl o pH 8. Mieszanie roztworu białka i buforu denaturującego będzie występowało w stosunku 1:10, także stężenie GdnHCl będzie dobrane tak, aby końcowe jego stężenie wynosiło: 7,5 M, 7 M, 6,5 M, 6 M, 5,5 M, 5 M, 4,5 M i 4 M. Do pomiarów tą samą techniką w funkcji pH studenci otrzymają serię roztworów 100 mM buforu fosforanowego z dodatkiem różnej ilości kwasu solnego. Również tutaj po zmieszaniu białka z buforem denaturującym powinno uzyskać się roztwór o pH 1, pH 2, pH 3, pH 4, pH 5 i pH 6. W obu przypadkach wyjściowe stężenie białka EGFP powinno wynosić 55 μ M. W pomiarach tych należy zachować te same długości fali wzbudzenia i obserwacji, jak przy pomiarach na spektrofluorymtrze. Dobór szerokości szczelin monochromatorów oraz napięcia na fotopowielaczu należy do studenta. Technika zatrzymanego przepływu wymaga, aby pomiar w odpowiednich warunkach został wykonany kilkakrotnie. Zaleca się wykonanie 10 po-

wtórzeń dla każdego warunku oraz policzenie z nich średniej, jeśli przebiegi są takie same. Należy także pamiętać o wykonaniu pomiaru tła, a więc przebiegu mieszania buforu, w którym znajduje się białko z odpowiednim buforem rozwijającym.

Należy dokonać analizy uzyskanych danych:

- w przypadku wszystkich pomiarów czasowych należy dopasować odpowiednią funkcję według wzoru (1)
- w przypadku pomiaru czasu rozwijania w funkcji stężenia GdnHCl na spektrofluorymetrze należy wykreślić czas rozwijania białka w zależności od stężenia GdnHCl i ocenić, czy widoczne jest występowanie intermediatu rozwijania
- w przypadku pomiarów stacjonarnych w funkcji pH należy wyznaczyć położenie maksimum pasma tryptofanowego oraz jego intensywność w zależności od pH, a także wykreślić zależność intensywności fluorescencji chromoforu w zależności od pH i na tej podstawie ocenić, czy występuje intermediat rozwijania
- w przypadku pomiarów techniką zatrzymanego przepływu, po wyznaczeniu charakterystycznych czasów rozwijania, należy porównać liczbę faz oraz wartości czasów charakterystycznych pomiędzy stosowanymi denaturantami

Raport z wykonanego ćwiczenia

Opis powinien zawierać *Wstęp* z teoretycznym opisem badanego zagadnienia, *Materiały i metody*, z których student korzystał w czasie doświadczenia, także w tej części można zawrzeć opis przebiegu doświadczenia lub wyodrębnić go w osobnym akapicie. Następnie opis powinien zawierać *Wyniki i dyskusję* z prezentacją danych ich analizą i interpretacją. Należy pamiętać o podawaniu odpowiednio zaokrąglonego wyniku liczbowego wraz z niepewnością oraz o umieszczeniu na końcu opisu *Bibliografii*, a także załączników, jeśli student uzna to za konieczne.

Kolokwium wstępne

Warunkiem przystąpienia do części eksperymentalnej jest zaliczenie kolokwium wstępnego. Wybór sposobu przeprowadzenia kolokwium wstępnego zależy od prowadzącego ćwiczenie. Materiał z zakresu spektroskopii absorpcyjnej i emisyjnej obowiązujący w czasie kolokwium wstępnego został przedstawiony w niniejszej instrukcji, podczas wykładów „Spektroskopia Molekularna”, „Biologia Molekularna” oraz podczas zajęć na „Pracowni podstaw biofizyki” i w umieszczonej na końcu instrukcji bibliografii. Można także posłużyć się następującymi podręcznikami:

- Zbigniew Kęcki *Podstawy spektroskopii molekularnej*
- Gordon M. Barrow *Wstęp do spektroskopii molekularnej*
- pod redakcją Wojciecha Zielińskiego i Andrzeja Rajcy *Metody spektroskopowe i ich zastosowanie do identyfikacji związków organicznych*
- Alfons Kawski *Fotoluminescencja roztworów*
- John A. Baltrop, John D. Coyle *Fotochemia podstawy*
- Joseph R. Lakowicz *Principles of fluorescence spectroscopy*

Przed kolokwium wstępnym należy także zapoznać się z publikacjami:

- ✓ S. Enoki, K. Saeki, K. Maki, K. Kuwajima, *Acid denaturation and refolding of green fluorescent protein*, *Biochemistry* 2004, 43, 14238-14248
- ✓ J-r. Huang, T. D. Craggs, J. Christodoulou, S. E. Jackson, *Stable intermediate states and high energy barriers in the unfolding of GFP*, *J. Mol. Biol.* 2007, 370, 356-371, z naciskiem na podrozdziały „Chemical denaturation and fluorescence measurements” oraz „Kinetic studies on the unfolding of GFP
- ✓ S-T. D. Hsu, G. Blaser, S.E. Jackson, *The folding, stability and conformational dynamics of β -barrel fluorescent proteins*, *Chem. Soc. Rev.* 2009, 38, 2951-2965, rozdział 3 i 4

które otrzymają Państwo od prowadzącego.

Należy posiadać wiedzę na temat następujących zagadnień:

- Podstawowe definicje związane z promieniowaniem elektromagnetycznym i pomiarami spektroskopowymi:
 - długość fali, częstość drgania, liczba falowa
 - intensywność promieniowania, gęstość promieniowania
 - molowy współczynnik absorpcji (ekstynkcji), integralny współczynnik absorpcji
 - stan podstawowy, stan wzbudzony, siła oscylatora
 - wydajność kwantowa emisji
- Pomiar emisji promieniowania elektromagnetycznego
 - schematyczne przedstawienie zasady pomiarów emisji
 - co rozumiemy pod pojęciem widmo emisji?
 - co rozumiemy pod pojęciem widmo wzbudzenia?
 - ilościowy opis emisji (wydajność kwantowa emisji, jak ja wyznaczyć?)
 - czynniki determinujące kształt i szerokość konturu pasma emisyjnego
 - efekt filtra wewnętrznego
- Stany elektronowe cząsteczek:
 - pojęcie orbitali molekularnych, co oznaczają symbole σ , σ^* , π , π^* , n
 - diagram stanów elektronowych (S_0 , S_1 , S_2 , ..., T_1 , T_2 ,...) diagram Jabłońskiego
 - możliwe przejścia absorpcyjne i względne położenie odpowiadających im pasm na skali częstości promieniowania elektromagnetycznego
 - procesy dezaktywacji stanów wzbudzonych, przejścia promieniste i bezpromieniste, charakterystyczne stałe czasowe omawianych procesów.
- Właściwości absorpcyjne i emisyjne aminokwasów i białek
 - które aminokwasy posiadają właściwości absorpcyjne i emisyjne? Dlaczego?
 - charakterystyka spektralna aminokwasów aromatycznych
 - szczególne własności tryptofanu
 - w jaki sposób można spektralnie badać białka?
- Białko zielonej fluorescencji (GFP)
 - budowa i działanie GFP
 - wpływ mutacji na F64L i S65T na GFP
 - własności spektralne EGFP
 - rozwijanie białka GFP

Bibliografia

- (1) O. Shimomura, *Structure of the chromophore of Aequorea Green Fluorescent Protein*, FEBS Letters 1979, 104 (2), 220-222
- (2) M. Chalfie, *Green Fluorescent Protein*, Photochemistry and Photobiology 1995, 62 (4), 651-656
- (3) I. Żak, *Chemia medyczna*, rozdział 13 „Aminokwasy i pochodne”, Śląska Akademia Medyczna, Katowice 2001
- (4) H. Fukuda, M. Arai, K. Kuwajim, *Folding of Green Fluorescent Protein and the Cycle 3 mutant*, Biochemistry 2000, 39, 12025-12032
- (5) S. Enoki, K. Saeki, K. Maki, K. Kuwajima, *Acid denaturation and refolding of green fluorescent protein*, Biochemistry 2004, 43, 14238-14248
- (6) S. Enoki, K. Maki, T. Inobe, K. Takahashi, K. Kamagata, T. Oroguchi, H. Nakatani, K. Tomoyori, K. Kuwajima, *The equilibrium unfolding intermediate observed at pH 4 and its relationship with the kinetic folding intermediates in green fluorescent protein*, Journal of Molecular Biology 2006, 361, 969-982
- (7) J. R. Lakowicz, *Principles of fluorescence spectroscopy*, Springer, 2006
- (8) J-r. Huang, T. D. Craggs, J. Christodoulou, S. E. Jackson, *Stable intermediate states and high energy barriers in the unfolding of GFP*, J. Mol. Biol. 2007, 370, 356-371
- (9) T. D. Craggs, *Green fluorescent protein: structure, folding and chromophore maturation*, Chem. Soc. Rev. 2009, 38, 2865-2875
- (10) S-T. D. Hsu, G. Blaser, S.E. Jackson, *The folding, stability and conformational dynamics of β -barrel fluorescent proteins*, Chem. Soc. Rev. 2009, 38, 2951-2965
- (11) J. Krasowska, M. Olasek, A. Bzowska, P. L. Clark, B. Wielgus-Kutrowska, *The comparison of aggregation and folding of enhanced green fluorescent protein*, Spectroscopy 2010, 24, 343-348
- (12) J. S. Merkel, L. Regan, *Modulating Protein Folding rates in vivo and in vitro by side-chain interactions between the parallel strands of green fluorescent protein*, J. Biol. Chem. 2000, 275, 29200-29206

Przygotowanie odczynników:

- Do pomiarów stopped-flow: 50 mM fosforan, 300 mM NaCl z dodatkiem GdnHCl o następujących stężeniach: 8,25 M, 7,7 M, 7.15 M, 6,6 M, 6,05 M, 5,5 M, 4,95 M i 4,4 M. (po 50 ml); EGFP o stężeniu 55 μ M w buforze 50 mM fosforan, 300 mM NaCl, pH 8
- Do pomiarów na spektrofluorymetrze: 50 mM fosforan, 300 mM NaCl bez GdnHCl oraz z 6M GdnHCl, pH 8 (po 250 ml); stężony roztwór EGFP w buforze j.w.
- Do pomiarów stopped-flow: serię buforów 100 mM fosforan o pH takim, żeby po zmieszaniu w stosunku 1:10 z białkiem, które będzie w buforze o pH 8 (1 część białka, 10 części buforu), uzyskać pH 1, pH 2, pH 3, pH 4, pH 5, pH 6 (po 50 ml); EGFP o stężeniu 55 μ M w buforze 100 mM fosforan, pH 8
- Do pomiarów na spektrofluorymetrze: serię buforów 100 mM fosforan o pH 1, pH 1,5, pH 2, pH 2,5, pH 3, pH 3,2, pH 3,6, pH 4, pH 4,2, pH 4,6, pH 5, pH 5,2, pH 5,6, pH 6, pH 6,5, pH 7, pH 7,5 i pH 8 (po 50 ml); stężony roztwór EGFP w dowolnym buforze