

Praktikum Instrumentelle Bioanalytik

Versuch: Fluoreszenzspektroskopie

wichtige Hinweise:

Die beiden Versuchsteile werden an zwei unterschiedlichen Tagen im Praktikumssaal durchgeführt. Ein bestandenes Kolloquium vor dem Versuch ist Bedingung für die Ausführung des Versuchs. Wird das Kolloquium nicht bestanden, wird es zu einem Nachholtermin wiederholt. Das Kolloquium, sowie die Versuchsdurchführung sind ausschlaggebend für die Benotung. Das maximal 15-seitige Protokoll (gern kürzer) muss eine Woche nach Ende des jeweiligen Versuchsteils abgegeben werden.

Inhalt des Protokolls:

- kurze Wiederholung der theoretischen Grundlagen (in eigenen Worten!)
- kurze Darstellung der Aufgabenstellung und der Versuchsdurchführung
- Auflistung der Messwerte
- Auswertung der Messungen
- Fehlerdiskussion (inkl. Fehlerrechnung)

Kontrollfragen:

- Erklärung des Phänomens der Fluoreszenz einschließlich Jablonski-Diagramm, Franck-Condon-Prinzip und dessen Auswirkungen
- Rolle und Erklärung der Phosphoreszenz
- Genereller Verlauf eines Fluoreszenzspektrums und eines Absorptionsspektrums (Absorptionsspektrum von Chinin)
- Nennt einige fluoreszierende Stoffe, welche Stoffe fluoreszieren stark und warum
- Informationsgehalt von Fluoreszenzspektren
- Genereller Aufbau eines Spektrometers
- Einflüsse auf die Fluoreszenz
- Welche unterschiedlichen Formen des Quenching sind zu beobachten?
- Wie könnte man mittels Fluoreszenzspektroskopie die Zahl der Tryptophane in einem Protein bestimmen?
- Bei welcher Wellenlänge absorbiert, bei welcher fluoresziert Tryptophan?
- Welche Bedingungen muss ein FRET Paar erfüllen?

Literatur:

Peter W. Atkins, Physikalische Chemie, 4. Auflage, Wiley-VCH Weinheim, 2006, S.551 (Kapitel 14.2.1)

Gerd Wedler, Lehrbuch der Physikalischen Chemie, 5. Auflage, Wiley-VCH Weinheim, 2004, S.634 (Kapitel 6.4.8)

David Rendell, Fluorescence and Phosphorescence, Wiley Chichester, 1987 (Bibliotheks-Signatur: 87A4106)

Georg Schwedt, Fluorimetrische Analyse, Weinheim Verlag Chemie, 1981 (Bibliotheks-Signatur: 81A971)

Ashutosh Sharma, Fluorescence Spectroscopy, Wiley Weinheim, 1999 (Bibliotheks-Signatur: 99A2192)

Aufgabenstellung:

1. Teil (Tag 1): Bestimmung der Chinin-Konzentration in Tonic Water

Herstellung von:

- 1l 0,5M H₂SO₄

- Stammlösung: 10ml aus 0,5 M H₂SO₄ mit $c_{\text{Chinin}} = 0.1 \text{ g/l}$ (sinnvolle Einwaage!)

- Kalibrierlösungen: jeweils 10ml mit 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900µg/l, 1mg/l

- Probenlösung 1 ml Tonic/Bitter Lemon mit 0,5 M H₂SO₄ auf 200 ml auffüllen (1:200-Verdünnung)

-Aufzeichnen eines Übersichtsfluoreszenzspektrums von Chinin (Wellenlänge 200-800nm) bei einer Einstrahlwellenlänge von 300nm und Wahl des für die Messung interessanten Bereichs. Erklären der auftretenden Signale.

-Optimierung der Anregungswellenlänge durch Untersuchung der zugehörigen Fluoreszenzspektr. Variiert die Anregungswellenlänge dazu im Bereich von 275-375nm.

-Aufzeichnen der Fluoreszenzspektr bei verschiedenen Chinin-Konzentrationen und Aufstellung einer Kalibrierfunktion. Durchführung einer Hintergrundkorrektur durch Messung des Fluoreszenzspektrums der reinen Pufferlösung.

-Bestimmung der Chinin-Konzentration von Tonic-Water und Bitter Lemon (in 1:200 Verdünnung).

-Fehlerdiskussion zu den einzelnen Messungen (Mehrfachmessungen um Spektrenreproduzierbarkeit zu prüfen! Pipettier & Gerätefehler?)

-Aufzeichnen des Fluoreszenzspektrums von Chinin nach Zusatz von NaCl als Quencher. Welche Änderungen könnt ihr Beobachten?

2. Teil (Tag 2): Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET)

- FRET ist für beide pH Werte möglich. Begründung?

- Berechnet aus den vorliegenden Messgraphen und Daten das Überlappungsintegral J und damit den Försterradius des FRET-Paares bei den beiden unterschiedlichen pH Werten. Bestimmt den Fehler der Berechnung.

Zu verwendende Größen:

Brechungsindex $n = 1,4$

Fluoreszenzquantenausbeute des Donors Tryptophan: $Q_0 = 0,11$

Orientierungsfaktor: $\kappa^2 = 2/3$

- Herzustellende Lösungen:

jeweils 5ml zweier HSA Lösungen (Proteinkonzentration $2 \mu\text{M}$) mit den pH-Werten 3 bzw 7. Als Lösungsmittel werden dafür NaPh-Puffer (pH 7) bzw. HCl (pH 3) bereitgestellt.

1ml 3-HF Lösung in Ethanol mit der Konzentration $800 \mu\text{M}$.

- Erhöht in den Lösungen mit HSA in mehreren Schritten die 3-HF Konzentration ($0,2\text{-}30 \mu\text{M}$, 15 Punkte, nichtlinear) und untersucht die Fluoreszenzintensität des Donors bzw. des Akzeptors. Wie verändern sich diese? In der Küvette für die Fluoreszenzmessung soll die Startprobenmenge 2ml (pure HSA Lösung) betragen. Durch zugeben der 3-HF Lösung wird nicht nur dessen Konzentration sondern auch das Gesamtvolumen immer größer. Welcher Fehler wird in der Messung dadurch gemacht? Schätzt diesen ab.

- Tragt die relative Donorfluoreszenz $\frac{I_0}{I} - 1$ (I_0 Donorfluoreszenz ohne Akzeptor, I

Donorfluoreszenz mit Akzeptor) in Abhängigkeit der Akzeptorkonzentration für die beiden pH Werte auf (Stern-Volmer Plot). Bestimmt daraus die Stern-Volmer Konstanten. Gebt diese genauso wie die Dissoziationskonstanten mit Fehler an.

- Stellt die FRET Effizienz in Abhängigkeit von der Akzeptorkonzentration dar und erklärt den Verlauf der Kurven (beide pH-Werte).

- Berechnet den Abstand zwischen Donor Tryptophan und Akzeptor 3-HF.

- **Allgemeine Anmerkung:** Für jede berechnete Größe soll eine Fehlerrechnung durchgeführt werden.

Grundlagenteil

Werden Atome durch die Absorption von elektromagnetischer Strahlung in einen elektronisch angeregten Zustand transferiert, kehren diese nach einer bestimmten Lebensdauer durch Energieabgabe zurück in den elektronischen Grundzustand. Diese Übergänge werden durch verschiedene Mechanismen ermöglicht, die im folgenden Jablonski-Schema dargestellt sind.

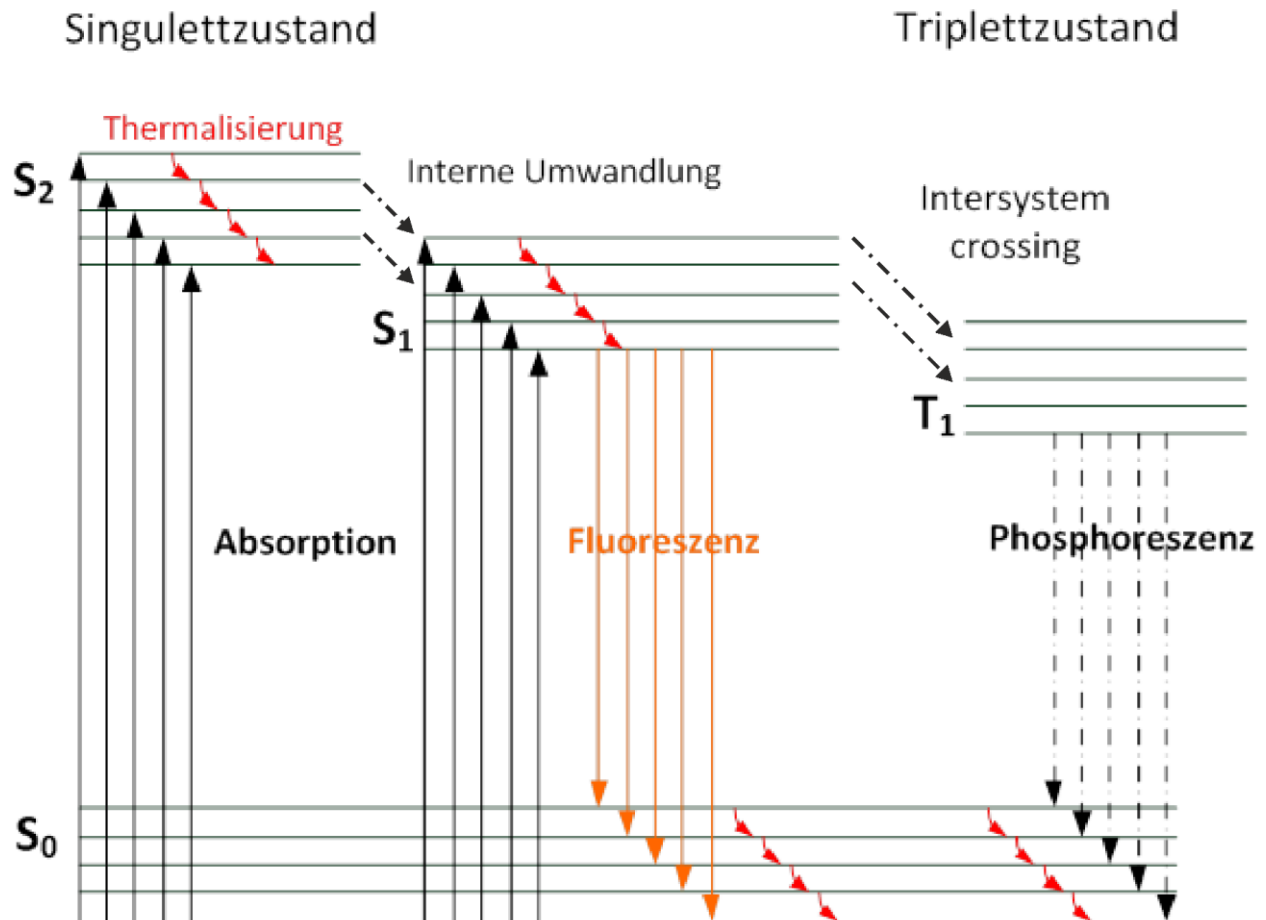


Abb. 1 Jablonski Diagramm

Allgemein findet ein elektronischer Übergang des Atoms vom Schwingungsgrundzustand v_0 in einen angeregten Schwingungszustand v_n des elektronisch angeregten Zustands statt. Aufgrund der geringen Lebensdauer von Schwingungszuständen relaxieren Moleküle durch Thermalisierung schnell in den Schwingungsgrundzustand. Bei einer genügend starken Überlappung der Potentiale zweier elektronischer Zustände, kommt es zu einer Umwandlung des Schwingungsgrundzustands eines elektronisch angeregten Zustands in einen Schwingungszustand eines energetisch tieferliegenden Elektronenzustands mit erneuter anschließender Thermalisierung (Interne Umwandlung). Vom Schwingungsgrundzustand des S₁-Niveaus kann Fluoreszenz als strahlender Übergang in den elektronischen Grundzustand stattfinden. In verdünnten Lösungen kann die Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Fluorophorkonzentration als linear angesehen werden.

Falls ausreichende Überlappung zwischen einem Singulett- und einem Triplettzustand besteht, kann ein theoretisch verbotener Übergang („Intersystem Crossing“) stattfinden. Intersystem Crossing ist nicht begünstigt, da sich die Spinmultiplizität des Zustands beim Übergang ändert (Spinverbot). Diese Übergänge sind in der Realität langsamer. Der strahlende Übergang zwischen angeregten Triplett-niveaus in einen Singulettgrundzustand ist als Phosphoreszenz bekannt. Durch die längere Lebensdauer ist eine Emission von Photonen bis zu Sekunden nach Abschalten der Lichtquelle möglich. Die genannten Übergänge können konkurrieren, weshalb Phosphoreszenz eine mögliche Fluoreszenz einschränken kann.

Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET)

Die Abnahme der Fluoreszenzintensität eines Fluorophors ohne dessen Zerstörung wird allgemein als Quenching bezeichnet. Dabei wird zwischen dynamischem, statischem und dem Quenching durch Fluoreszenz/Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) unterschieden. Bei ersterem wird die Energie des angeregten Fluorophores durch Stöße auf ein Quenchemolekül übertragen. Die Energie geht also in Wärme verloren. Bei der statischen Fluoreszenzlöschung findet die Bildung eines nicht, oder schwach fluoreszierenden Komplexes zwischen Fluorophor und Quenchemolekül statt. FRET wird durch dipolare Wechselwirkungen zweier Fluorophore vermittelt. Ein FRET-Paar besteht aus einem Donor und einem Akzeptor. Eine Bedingung für effizienten Transfer ist ein hoher Überlapp zwischen dem Emissionsspektrum des Donors und dem Absorptionsspektrum des Akzeptors. Das heißt das Überlappungsintegral J , welches sich zu

$$J = \int \epsilon_A(\lambda_{Em}^D) \lambda_{Em}^D{}^4 d\lambda$$

berechnet muss ungleich 0 sein. $\epsilon_A(\lambda_{Em}^D)$ ist dabei der Extinktionskoeffizient der zu untersuchenden Lösung bei der Emissionswellenlänge λ_{Em}^D des Donors. Diese Formel ist unter der Annahme gültig, dass das Emissionsspektrum des Donors eine infinitesimale Linienbreite aufweist. Die Folge eines effizienten Transfers wäre die Beobachtung von Fluoreszenz des Akzeptors bei Einstrahlung der Absorptionswellenlänge des Donors.

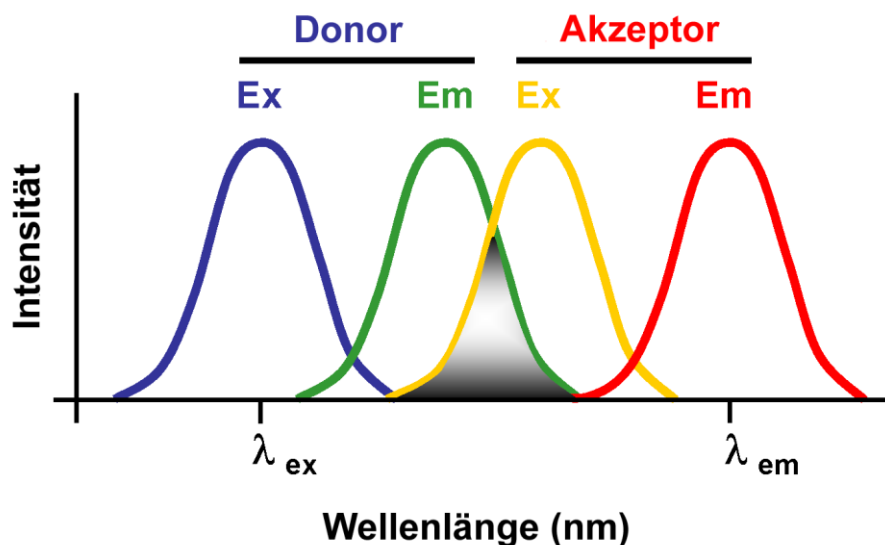


Abb. 2 Anregungs (Ex) - und Emissionsspektrum (Em) von Donor bzw. Akzeptor. Der Überlappungsbereich (grau gekennzeichnet) von Emissionsspektrum des Donors und Anregungsspektrum des Akzeptors zeigt die Möglichkeit eines strahlungslosen Energieübertrags.

Eine wichtige Größe ist die FRET-Effizienz E , die Werte zwischen 0 und 1 annehmen kann. Diese ist in folgender Weise definiert:

$$E = \frac{\text{Anzahl der Energietransfers pro Zeitintervall}}{\text{Anzahl der Donoranregungen}} = \frac{k_{ET}}{k_f + k_{ET} + \sum_i k_i}$$

k_{ET} ist dabei die Rate der durch Energietransfer hervorgerufenen Übergänge, diese wird zur Summe aller möglichen Übergangsarten ins Verhältnis gesetzt.

k_f stellt dabei die Fluoreszenz-Übergangsrate dar, k_i die durch alle übrigen Mechanismen verursachte Übergangsrate.

Donor und Akzeptor dürfen nur wenige nm Abstand voneinander haben, um einen effektiven Transfer zu ermöglichen. Die FRET-Rate k_{ET} zeigt die folgende Abstandsabhängigkeit

die in Abb. 3 skizziert ist. k_D ist die Strahlungsemissionsrate des Donorfarbstoffs, R_0 der sogenannte Förster-Radius des Donor-Akzeptor Paares. Dieser stellt den Abstand zwischen Donor und Akzeptor dar, bei dem eine Energieübertragung zu 50% erfolgt. Der Förster Radius lässt sich mit Hilfe der Formel

$$R_0^6 = 8,8 * 10^{-28} * \kappa^2 n^{-4} Q_D J$$

berechnen. κ^2 ist der Orientierungsfaktor, n der Brechungsindex und Q_D die Quantenausbeute des Donors ohne Energietransfer.

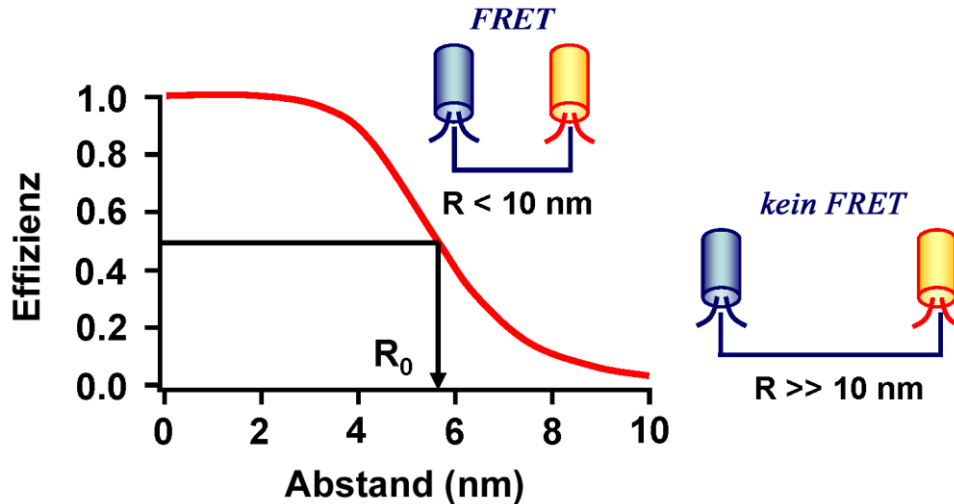


Abb. 3 Die rote Kurve zeigt den Verlauf der Abstandsabhängigkeit der Transfereffizienz E für einen Förster-Radius R_0 um die 6 nm. Im Bereich um den Försterradius kann der Abstand besonders genau bestimmt werden, da hier die Steigung der Kurve betragsmäßig am größten ist.

Der Verlauf der Abhängigkeit zeigt in welchem Bereich der Abstand mit Hilfe dieser Methode besonders genau bestimmt werden kann bzw. sie besonders sensitiv auf Änderungen desselben reagiert. Die FRET-Effizienz kann auch in der folgenden Weise ausgedrückt werden

$$E = \frac{1}{1 + \left(\frac{r}{R_0}\right)^6} = 1 - \frac{F'_D}{F_D}$$

F'_D stellt dabei die Intensität der Donorfluoreszenz in Anwesenheit, F_D in Abwesenheit des Akzeptors dar. Durch die Messung dieser beiden Werte können also die Transfereffizienz E und damit der Abstand der beiden Farbstoffe bestimmt werden.

Die Stern-Volmer-Gleichung beschreibt die Abhängigkeit der Fluoreszenz eines Farbstoffes von der Konzentration $[Q]$ eines in der Umgebung befindlichen Quenchers, bei dem es sich hier um den Akzeptor des FRET Paares handelt. Sie lautet:

$$\frac{F_D}{F'_D} = 1 + K_{SV} * [Q].$$

Mit der Stern-Volmer-Konstante K_{SV} . Voraussetzung für die Gültigkeit dieser Formel ist die gleiche Erreichbarkeit aller Fluorophore durch den Quencher. K_{SV} kann hier als Assoziationskonstante angesehen werden und damit die Dissoziationskonstante K_D bestimmt werden.

Bei dem FRET-Paar in diesem Versuch handelt es sich um das Tryptophan des Proteins Humanalbumin (HSA) als Donor und dem Ligandenmolekül 3-hydroxyflavone (3-HF) als Akzeptor. HSA besteht aus 585 Aminosäuren und hat eine Molekülmasse von etwa 66,470 Da. Es besitzt genau ein Tryptophan das sich in der Nähe einer Hauptbindungsstelle befindet.

**Vorgegebene Messdaten zur
Auswertung:**

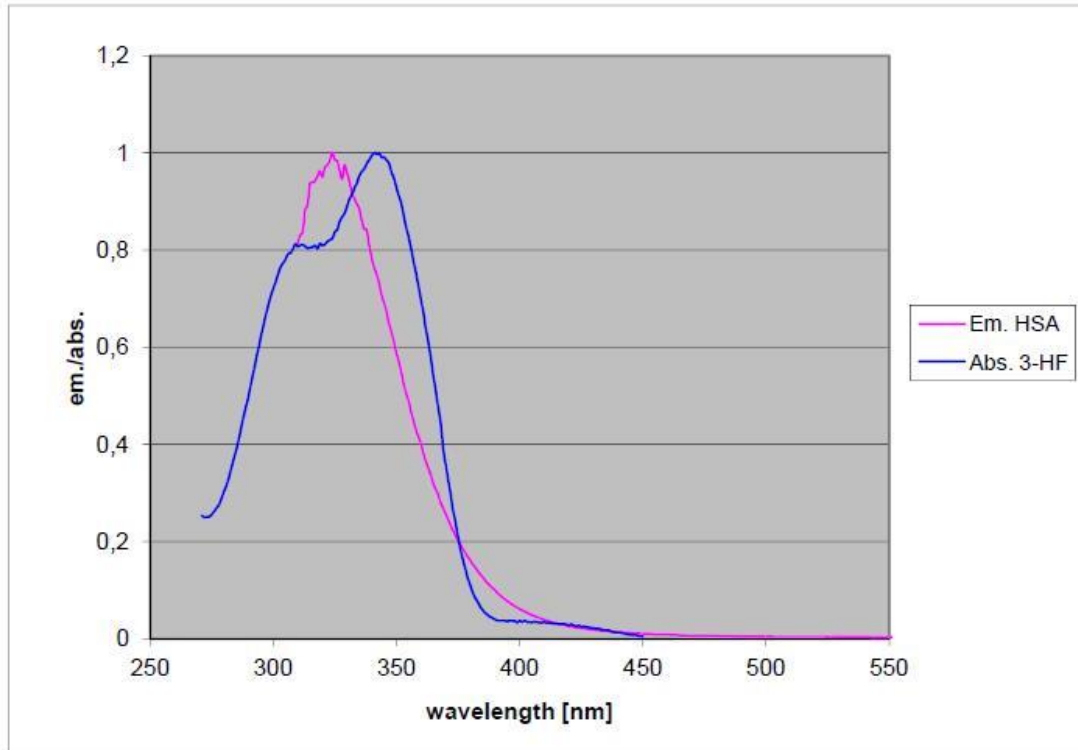


Abb. 4 Emissionsspektrum von HSA und Absorptionsspektrum von 3-HF bei pH=3.

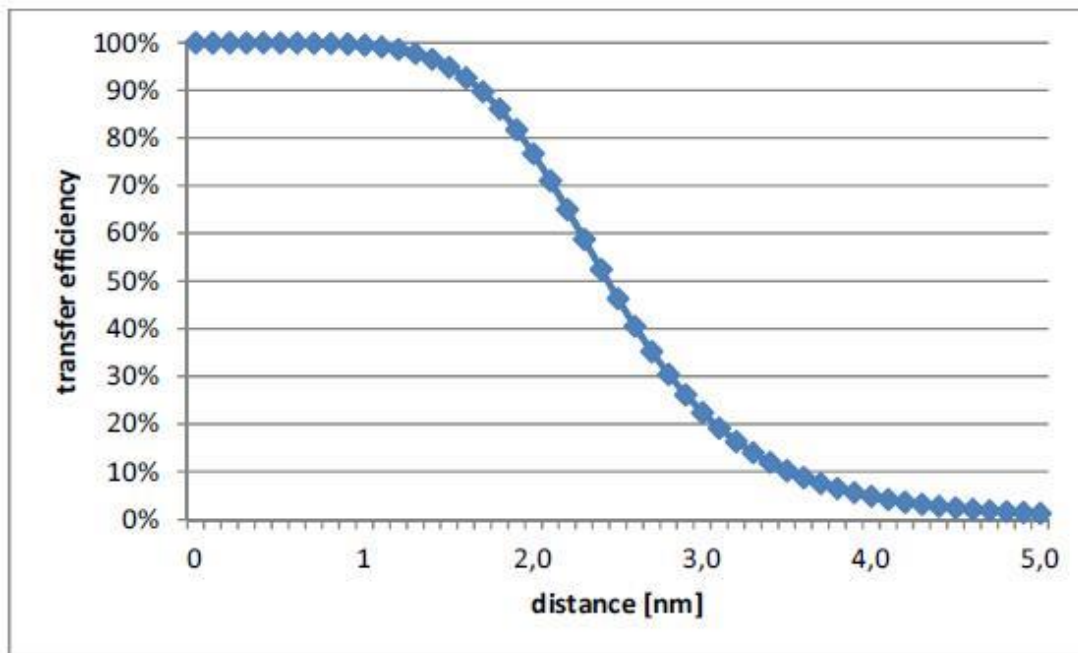


Abb. 5 Abstandsabhängigkeit der Transfereffizienz des FRET Paares bei pH=3.

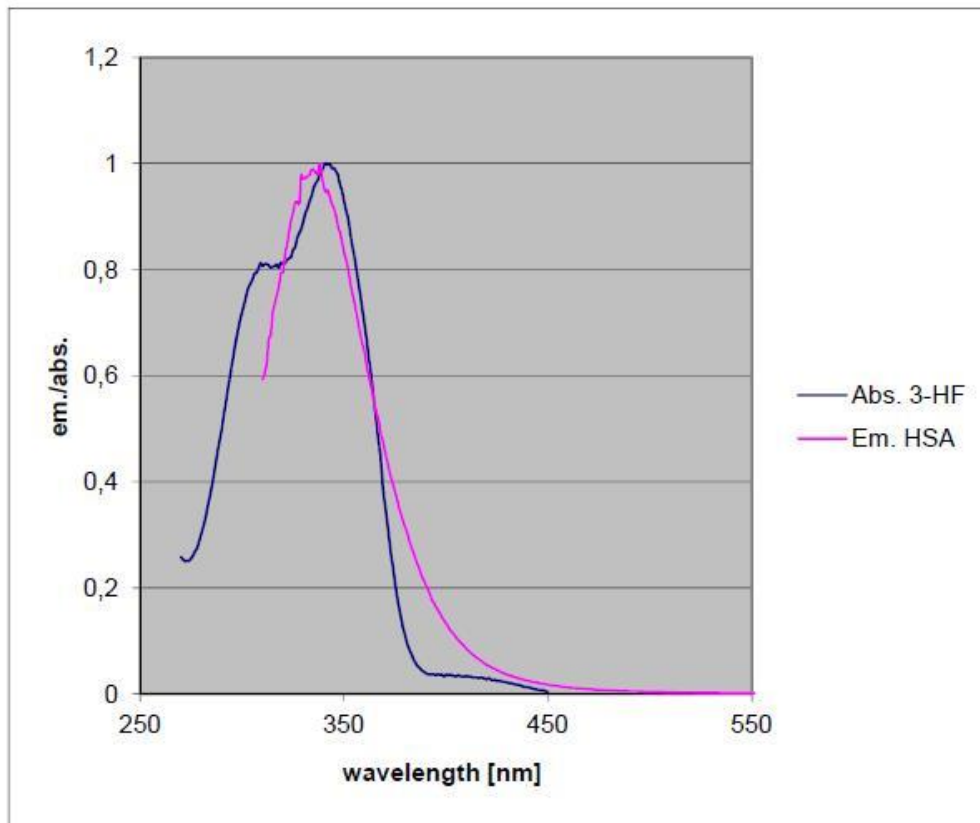


Abb. 6 Emissionsspektrum von HSA und Absorptionsspektrum von 3-HF bei pH=7.

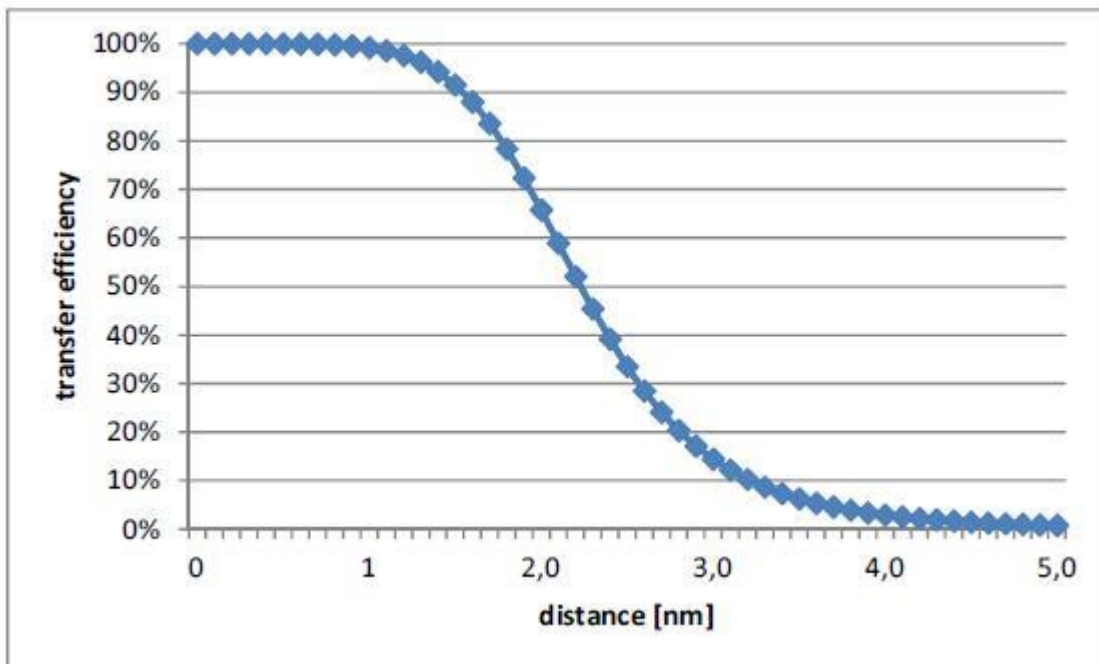


Abb. 7 Abstandsabhängigkeit der Transfereffizienz des FRET Paares bei pH=7.

Gerätetechnisches und Bedienung

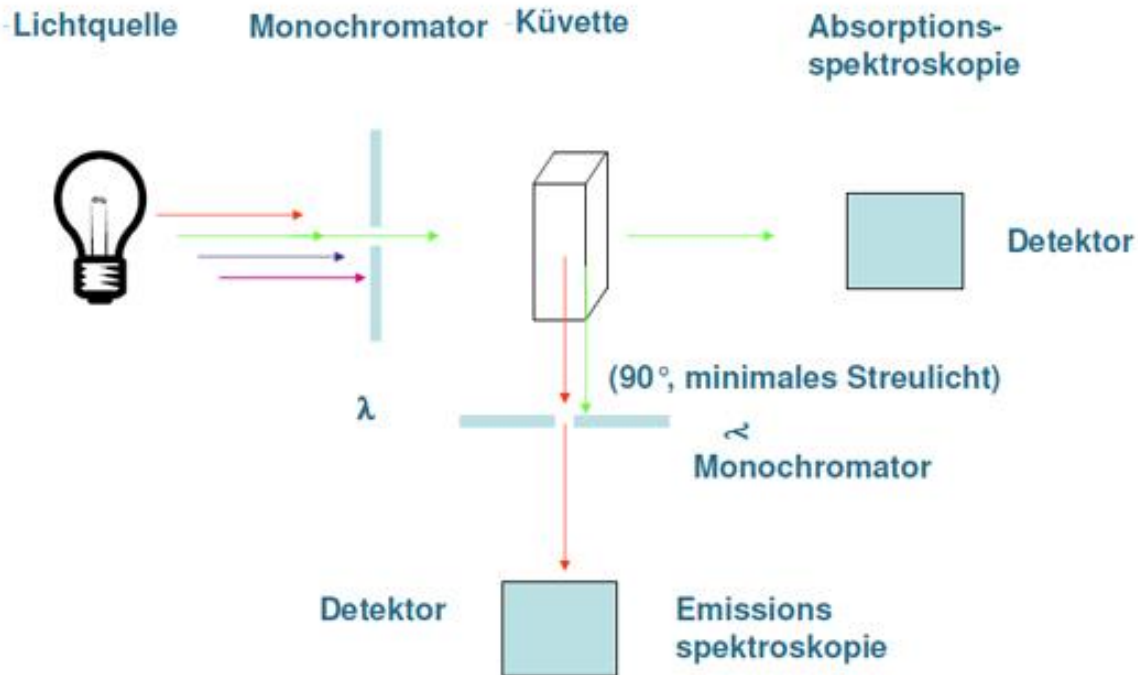


Abb. 8 Skizzierter Aufbau eines Fluoreszenzspektrometers

Die Abbildung zeigt den allgemeinen, stark vereinfachten Aufbau eines Fluoreszenzspektrometers. Die Lichtquelle emittiert weißes Licht, über den Monochromator kann die Einstrahlwellenlänge selektiert werden die auf die Küvette und damit die Probenlösung trifft. Im Gegensatz zur Absorptionsspektroskopie, in der direkt hinter der Küvette detektiert wird, sitzt der Detektor in der Fluoreszenzspektroskopie um 90° versetzt. Damit wird gewährleistet, dass möglichst kein Direktlicht der Lichtquelle den Detektor erreicht.

Spektrometerbedienung:

Einführung durch den Betreuer.

Hinweise zur Auswertung

Zur Auswertung der Fluoreszenzintensitäten empfiehlt es sich die Integrale, statt den Maxima der entsprechenden Peaks zu verwenden, da diese eine asymmetrische Form zeigen. Das kann direkt mit der entsprechenden Spektrometersoftware unternommen werden. Außerdem sollte die Messung der Fluoreszenzspektren am besten 4 mal wiederholt werden (2 mal mindestens) um den Messfehler abschätzen zu können.

Weiteres kann dann vor Ort mit dem entsprechenden Betreuer des Versuchs besprochen werden.