

Praktikum: Instrumentelle Bioanalytik

Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET)

In diesem Versuch wird die Fluoreszenzlöschung von Humanalbumin (*human serum albumin*, HSA) durch zwei Quencher-moleküle untersucht. Die beiden Quencher-moleküle 3-Hydroxyflavon (3-HF) und Quercetin bilden mit dem HSA jeweils ein FRET-Paar, wodurch es zum Quenching der Fluoreszenz des Proteins kommt. Um den Quenchingprozess zu untersuchen, werden Fluoreszenzspektren von HSA in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von 3-HF und Quercetin aufgenommen. Mithilfe dieser Spektren soll der Abstand des FRET-Paares HSA/3-HF sowie HSA/Quercetin berechnet und die Ergebnisse der beiden FRET-Paare verglichen werden.

Die Abnahme der Fluoreszenzintensität eines Fluorophors ohne dessen Zerstörung wird allgemein als Quenching bezeichnet. Dabei wird zwischen dynamischem, statischem und dem Quenching durch Fluoreszenz-/Försterresonanzenergietransfer (FRET) unterschieden. Bei ersterem wird die Energie des angeregten Fluorophors durch Stöße auf ein Quencher-molekül übertragen. Die Energie geht in Form von Wärme verloren. Bei der statischen Fluoreszenzlöschung findet die Bildung eines nicht oder schwach fluoreszierenden Komplexes zwischen Fluorophor und Quencher-molekül statt. FRET hingegen wird durch dipolare Wechselwirkungen zweier Fluorophore vermittelt. Ein FRET-Paar besteht dabei aus einem Donor und einem Akzeptor. Eine wichtige Bedingung für einen effizienten Transfer ist ein hoher Überlapp zwischen dem Emissionsspektrum des Donors und dem Absorptionsspektrum des Akzeptors.

Wichtige Hinweise:

Ein bestandenes Kolloquium vor dem Versuch ist Bedingung für die Ausführung des Versuchs! Wird das Kolloquium nicht bestanden, wird es einen Nachholtermin für den Versuch geben. Das Protokoll muss bis spätestens morgens 9:00 Uhr dem auf den Versuch folgenden vierten Tag abgegeben werden.

Herzustellende Lösungen und Pipettierschemata müssen als Vorbereitung auf den Versuch bereits ausgerechnet werden! Die Schemata werden am Versuchstag nur noch von der Assistentin abgenommen und bei Bedarf korrigiert.

1. Theoretische Grundlagen

Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET)

Bei dem Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (auch Förster-Resonanzenergietransfer genannt) handelt es sich um einen wichtigen physikalischen Prozess der Energieübertragung, wobei die Energie von einem Donor auf einen Akzeptor übertragen wird. Hierbei ist eine Voraussetzung für den Energietransfer, dass die Energiemenge, welche vom Donor übertragen wird, im Bereich der möglichen Energieaufnahme des Akzeptors liegt (siehe Abb. 1).

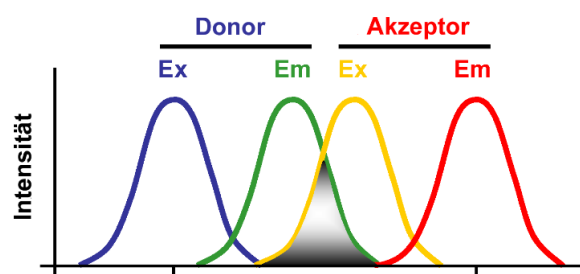


Abb. 1: Anregungs- (Ex) und Emissionsspektrum (Em) von Donor bzw. Akzeptor. Der Überlappsbereich (grau gekennzeichnet) von Emissionsspektrum des Donors und Anregungsspektrum des Akzeptors zeigt die Möglichkeit eines strahlungslosen Energieübertrags.

Das bedeutet, das Überlappungsintegral J muss hierbei ungleich 0 sein:

$$J = \varepsilon_A(\lambda_{Em}^D) \lambda_{Em}^D$$

$\varepsilon_A(\lambda_{Em}^D)$ ist dabei der Extinktionskoeffizient der zu untersuchende 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 ist die Beobachtung von Fluoreszenz des Akzeptors bei Einstrahlung der Absorptionswellenlänge des Donors.

Dies kann in der Fluoreszenzspektroskopie mit einem Fluoreszenzspektrometer beobachtet werden. Das Lambert-Beer'sche Gesetz beschreibt dabei die Abschwächung der Anfangsintensität I_0 bei Durchgang durch ein Medium mit einer absorbierenden Substanz. Die Abnahme ist abhängig von der Schichtdicke d und der Konzentration c :

$$A = \log_{10} \left(\frac{I_0}{I_1} \right) = \varepsilon_\alpha * c * d$$

Im Gegensatz zur Absorptionsspektroskopie, in der direkt hinter der Küvette detektiert wird, sitzt der Detektor in der Fluoreszenzspektroskopie um 90° zur Lichtquelle versetzt. Damit wird gewährleistet, dass möglichst kein Direktlicht der Lichtquelle den Detektor erreicht. Die Abbildung 2 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.

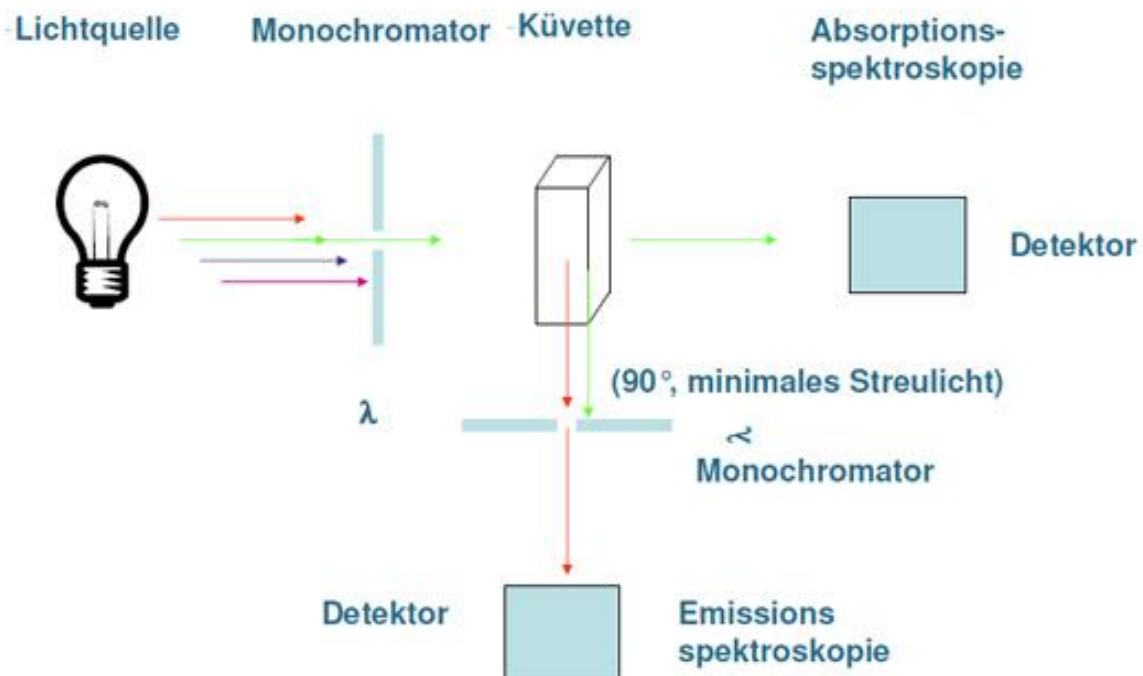


Abb. 2: Skizzierter Aufbau eines Fluoreszenzspektrometers.

Unterschiedliche Energietransfermechanismen

Energietransferprozesse können in intermolekulare- und intramolekulare Energietransfers unterschieden werden. Bei einem intermolekularen Transfer wird die Anregungsenergie von einem Molekül zum anderen übertragen. Bei einem intramolekularen Transfer hingegen wird die Energie innerhalb eines Moleküls übertragen. Der elektronische Energietransfer allgemein ist die Übertragung der Anregungsenergie eines angeregten Donor-Moleküls D^* auf ein Akzeptor-Molekül A. Dies stellt einen zweistufigen Prozess dar:

- 1) $D^* \rightarrow D + h\nu$
- 2) $h\nu + A \rightarrow A^*$

Dabei emittiert das angeregte Molekül D^* ein Photon, welches von A absorbiert wird.

Strahlungslose Energieübertragung

Es gibt zwei Formen des strahlungslosen Energietransfers:

- a) Zusammenstoß bzw. Austauschwechselwirkung (Dexter-Energietransfer)
- b) Coulomb-Wechselwirkung (Förster-Energietransfer)

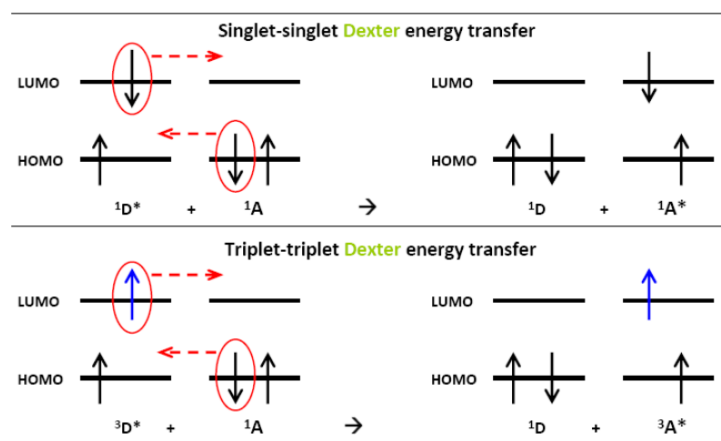
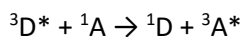


Abb. 3: Schematische Darstellung des Dexter-Energie-Transfers mit den beiden möglichen Übergängen.

Bei dem Energietransfer nach Dexter „stoßen“ die beteiligten Orbitale zusammen, damit kommt es zum Austausch des angeregten Elektrons des Donors mit einem unangeregten Elektron des Akzeptors.



Die Spinwechselwirkungen nehmen hierbei exponentiell mit dem Abstand ab und sind nur bei $r < 1$ nm effektiv. Bei dem Dexter-Energietransfer sind zudem Singulett-Singulett-Übergänge als auch Triplett-Triplett-Übergänge möglich.

In Abb. 4 sind die Vorgänge beim Förster-Mechanismus schematisch dargestellt:

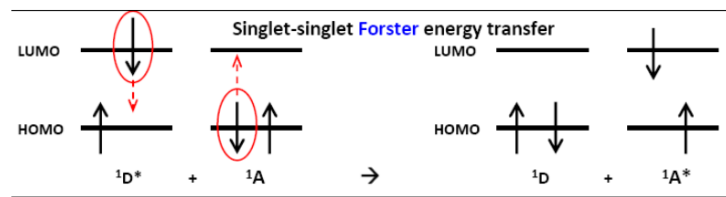


Abb. 4: Schematische Darstellung des Förster-Energie-Transfers.

Die Desaktivierung von D* und Anregung von A sind miteinander gekoppelt. Die Kopplung erfolgt durch eine Coulombsche Dipol-Dipol-Wechselwirkung. Zu beachten ist, dass kein räumlicher Kontakt wie beim Stoßmechanismus zwischen den Molekülen erforderlich ist, damit diese Form der Energieübertragung möglich wird.

Die Übergangswahrscheinlichkeit für einen Übergang zwischen einem angeregten Zustand und dem Grundzustand wird vom Übergangsdipolmoment bestimmt. Das Übergangsdipolmoment $\langle \mu \rangle$ ist dabei definiert durch:

$$\langle \mu \rangle = \int \varphi_2^* (-er) \varphi_1 dV$$

φ_1 : die elektronische Wellenfunktion des Moleküls im angeregten Zustand,

φ_2 : die konjugiert komplexe elektronische Wellenfunktion des Moleküls im Grundzustand,

e : die elektrische Ladung ,

r : die Ortskoordinate.

Das Integral gibt die Verschiebung der Ladungswolke zwischen dem angeregtem und Grundzustand bei einem induzierten Übergang durch das elektromagnetische Wechselfeld des Lichts wieder. Die Übergangsdipolmomente des Donors und Akzeptors können nun strahlungslos die Anregungsenergie transferieren.

FRET-Effizienz

Eine wichtige Größe ist die FRET-Effizienz E , welche die Werte zwischen 0 und 1 annehmen kann. Diese spiegelt die Effizienz des Energietransfers zwischen Donor und Akzeptor wider und ist wie folgt definiert:

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

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.

Um einen effektiven Transfer zu ermöglichen, dürfen Donor und Akzeptor nur wenige nm Abstand voneinander haben. Die Transferrate k_{ET} zeigt dabei folgende Abstandsabhängigkeit, welche in Abb. 5 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.

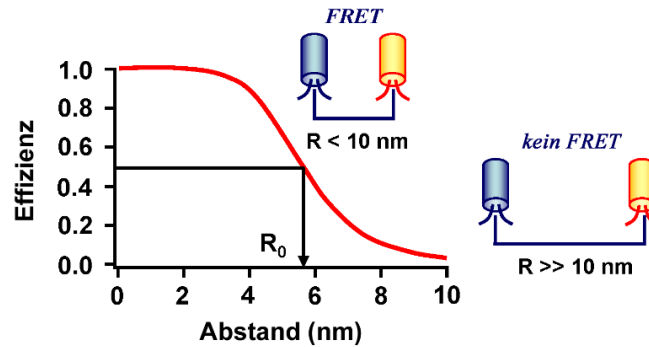


Abb. 5: Die rote Kurve zeigt den Verlauf der Abstandsabhängigkeit der Transfereffizienz E für einen Förster-Radius R_0 um die 6 nm. Im Bereich um den Försterradius kann der Abstand besonders genau bestimmt werden, da hier die Steigung der Kurve betragsmäßig am größten ist.

Der Förster-Radius lässt sich mit Hilfe folgender Formel berechnen:

$$R_0^6 = 8,8 * 10^{-28} * \kappa^2 n^{-4} Q_0 J$$

κ^2 ist dabei der Orientierungsfaktor, n der Brechungsindex und Q_0 die Quantenausbeute des Donors ohne Energietransfer.

Der Orientierungsfaktor ist abhängig von den Winkeln zwischen den Übergangsdipolmomenten der Moleküle, welcher ein Maß für die Fähigkeit des Moleküls ist, elektromagnetische Strahlung aufnehmen oder abgeben zu können.

Der Orientierungsfaktor kann dabei Werte zwischen 0 und 4 annehmen. Die Wechselwirkung beider Übergangsdipolmomente ist am effektivsten, wenn die Dipole hintereinander kollinear angeordnet sind, d. h. $\kappa^2 = 4$ (siehe Abbildung 6b). Sind sie senkrecht zueinander ausgerichtet, so ist $\kappa^2 = 0$ und es findet kein Energietransfer statt. Für die meisten FRET-Experimente wird ein Orientierungsfaktor von 2/3 angenommen, da es sich in Lösungen um ein dynamisches Gleichgewicht handelt.

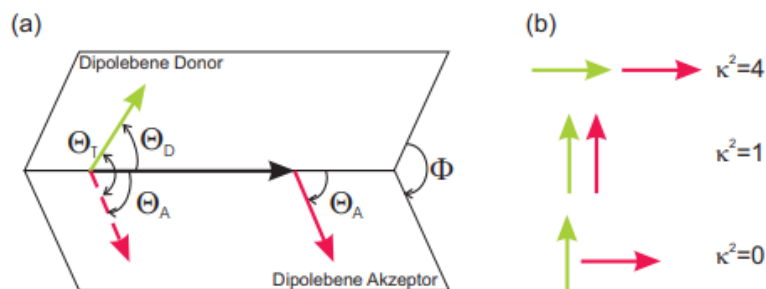


Abb. 6: Orientierung der Übergangsdipolmomente. Übergangsdipolmomente des Donors (grün) und Akzeptors (rot). a) zeigt die Winkel der Übergangsdipolmomente, b) die Werte von κ^2 in Abhängigkeit der Lage die Dipolmomente zueinander.

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 folglich auch in der folgenden Weise ausgedrückt werden:

$$E = \frac{1}{1 + \left(\frac{r}{R_0}\right)^6} = 1 - \frac{F}{F_0}$$

Es stellt dabei die Intensität der Donorfluoreszenz in Anwesenheit, F 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.

Stern-Volmer-Gleichung und Quenching

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:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV} * [Q]$$

K_{SV} ist die Stern-Volmer-Konstante. 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 (siehe Abbildung 7).

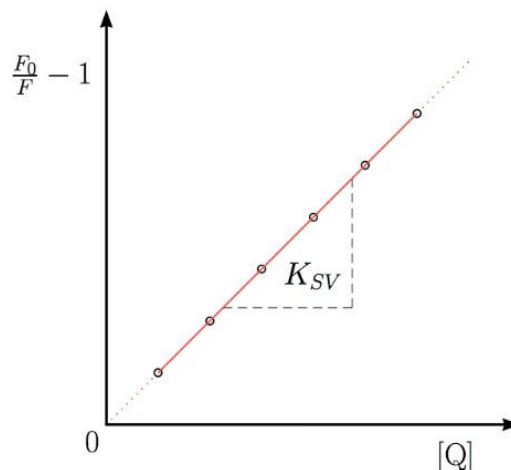


Abb. 7: Stern-Volmer-Plot.

HSA, 3-HF und Quercetin

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

Zusätzlich kann der Naturfarbstoff Quercetin als Akzeptor eingesetzt werden, welches im Protokoll mit 3-HF verglichen werden soll.

2. Durchführung

2.1 Herstellung der Lösungen

Für die anstehenden Messungen müssen zuerst die benötigten Lösungen hergestellt werden. Rechnet die Einwaagen der Substanzen für die vorgegebenen Konzentrationen und Volumina aus.

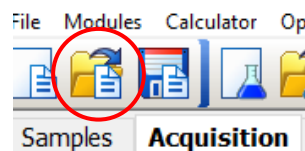
HSA-Lösung: 26 mL Lösung mit einer Proteinkonzentration von 6 μM . Das molare Gewicht des HSA beträgt 66,470 kDa. Das Protein wird in einem gestellten Natriumphosphat-Puffer, pH 7 (NaPh-Puffer) gelöst. **Achtung:** Die Lösung darf beim Ansetzen NICHT gevortext werden, sondern nur vorsichtig invertiert!

3-HF-Lösung: 1 mL Lösung mit einer Konzentration von 400 μM . Das molare Gewicht von 3-Hydroxyflavon beträgt 238,34 g/mol. Die Substanz wird in Ethanol gelöst. Warum ist die Herstellung einer Lösung mit einem Volumen von 1 mL praktisch nicht möglich? Rechnet die Einwaage auf ein passendes Volumen hoch, sodass ihr es herstellen könnt.

Quercetin-Lösung: 1 mL Lösung mit einer Konzentration von 400 μM . Das molare Gewicht von Quercetin beträgt 302,24 g/mol. Die Substanz wird in Ethanol gelöst. Warum ist die Herstellung einer Lösung mit einem Volumen von 1 mL praktisch nicht möglich? Rechnet die Einwaage auf ein passendes Volumen hoch, sodass ihr es herstellen könnt.

2.2 Messung des FRET-Paares HSA/3-HF

Als erstes soll die Fluoreszenzlöschung von HSA durch 3-HF gemessen werden. Öffnet dazu das Programm *BLDevelopment* und ladet die Methode *Praktikum_2025* in das Programm ein.

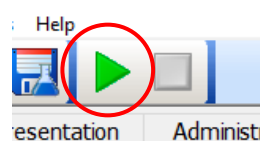


Die Einstellungen am unteren Bildrand sollen nach dem Laden der Methode wie folgt aussehen:

Scan type	Emission	Start [nm]	275	End [nm]	500
Ex. WL [nm]	280	Speed [nm/min]	200	Gain	Medium
Ex. Slit [nm]	4,0	Em. Slit [nm]	4,0	Auto Lamp	On

Die erste Messung ist der Blank. Dazu müssen 2 mL des NaPh-Puffers in eine Küvette pipettiert und in das Gerät gestellt werden. **Achtung:** Die Küvette darf nur im oberen Bereich und nur so, dass das Glas nicht verschmiert wird, angefasst werden! Warum ist das wichtig?

Zum Start der Messung klickt ihr auf das grüne Start-Symbol und ein Fenster öffnet sich, in dem man die Namen der Proben anpassen kann. Die erste Probe ist automatisch als *Blank* eingestellt, sodass nur noch auf *Start* gedrückt werden muss.



Please insert sample:

Standard ID	
Blank	

Start Stop

Sobald die Messung des Blanks fertig ist, öffnet sich das Fenster erneut. Der Name der nächsten Probe muss nur noch angepasst werden, sodass danach für die folgende Messung direkt wieder auf *Start* geklickt werden kann.

Please insert sample:

Sample ID	
Sample 1	

Start Stop

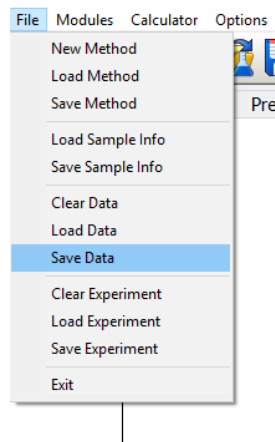
In eine neue Küvette sollen 2 mL der HSA-Lösung pipettiert werden. Invertiert davor das Falcon mit der Lösung nochmal vorsichtig. Sobald die Küvette in das Gerät gestellt wurde, kann die neue Messung mit dem Namen *HSA 1* gestartet werden. Um den Gerätefehler und die mittlere Wellenlänge des HSA später im Protokoll bestimmen zu können, soll die pure HSA-Lösung insgesamt fünfmal gemessen werden. Passt die Namen der Messungen dementsprechend an.

Anschließend erhöht ihr in der HSA-Lösung in mehreren Schritten die 3-HF-Konzentration (0,2 – 50 μM , 15 Punkte und nichtlinear, z.B. 0,2 μM , 0,5 μM , 2 μM , 5 μM , 7 μM , ..., 50 μM) durch Zugabe der 3-HF-Lösung und beobachtet die Fluoreszenzintensität des HSA in Abhängigkeit der steigenden Konzentration des 3-HF. In der Küvette sollen die 2 mL bereits gemessene HSA-Lösung als Startmenge vorliegen. In diese pipettiert ihr Schritt für Schritt eure berechneten Volumina zur Erhöhung der 3-HF-Konzentration. Nach der Zugabe des jeweiligen Volumens des Akzeptors soll immer eine gleiche Wartezeit (30 – 60 s) eingehalten werden, bevor die Messung gestartet wird, um eine Interaktion der Moleküle zu ermöglichen und die Messung immer identisch zu halten. Achtet beim Zugeben der 3-HF-Lösung, dass ihr diese in der Küvette gut hoch- und runterpipettiert, damit sich die Lösungen vermischen. Durch das Zugeben der Akzeptorlösung wird nicht nur dessen Konzentration, sondern auch das Gesamtvolumen immer größer. Welcher Fehler wird in der Messung dadurch gemacht? Schätzt diesen ab.

Achtung: Das Pipettierschema zur schrittweisen Erhöhung der 3-HF-Konzentration in der HSA-Lösung muss vor Beginn des Versuches berechnet sein und wird im Kolloquium abgefragt! Die 3-HF-Konzentrationen könnt ihr innerhalb eurer Gruppe selber wählen. Das minimalste Volumen, was ihr pipettieren solltet, ist 1 μL . Achtet bei eurer Berechnung darauf, dass das hinzuzugebende Volumen pro Schritt nicht kleiner ist!

Nachdem alle Konzentrationen durchgemessen wurden, soll im Anschluss die Arbeitsweise von direkter Probenherstellung mit der der schrittweisen Zugabe von zuvor verglichen werden. Dazu wählt ihr eine Konzentration in eurem Pipettierschema aus und stellt die Lösung in einer neuen Küvette direkt her. Wartet auch hier wie zuvor die gleiche Zeit zwischen Zugabe der 3-HF-Lösung und Messung ab. Benennt die Messung entsprechend, damit ihr sie am Ende identifizieren könnt.

Speichert die Daten ab. Dazu klickt ihr auf *File* und *Save Data*. Auf dem Desktop findet ihr den Ordner *Praktikum_2025_2026* mit Unterordnern der jeweiligen Gruppen. Wählt euren Gruppenordner und speichert dort die Daten sowohl als .txt- als auch als .res-Datei. Bevor ihr mit dem nächsten Teil beginnt, überprüft, ob die Daten richtig gespeichert wurden!



2.3 Messung des FRET-Paares HSA/Quercetin

Die Fluoreszenzlöschung von HSA durch Quercetin wird analog zu der durch 3-HF gemessen. Zuerst müssen jedoch die 3-HF-Daten entfernt werden. Dazu klickt ihr auf *File* und *Clear Data*.

Wie auch bei 3-HF beginnt ihr damit, den Blank (2 mL NaPh-Puffer) zu messen. Anschließend folgt die Messung der 2 mL HSA-Lösung (eine Fünffach-Messung ist an dieser Stelle nicht erneut nötig). In der Lösung mit HSA soll anschließend ebenso in mehreren Schritten die Quercetin-Lösung erhöht und die Fluoreszenzintensität des Donors bzw. Akzeptors untersucht werden. Sucht euch dafür fünf verschiedene Konzentrationen raus, die ihr auch schon für 3-HF verwendet habt und arbeitet analog zu vorher. Beachtet auch hier wieder die identische Wartezeit wie zuvor, um eine bestmögliche Vergleichbarkeit der Daten zu erhalten. **Achtung:** Auch dieses Pipettierschema soll vor Beginn des Versuches vorbereitet sein und wird im Kolloquium abgefragt!

Speichert die Daten erneut in beiden Dateiformaten ab. Überprüft vor Beendigung des Versuchs, ob eure Daten richtig gespeichert wurden.

3. Protokoll

Für die Berechnungen im Protokoll braucht ihr einige Größen:

Gegebene Größen	
M(HSA)	66,470 kDa
M(3-HF)	238,34 g/mol
M(Quercetin)	302,24 g/mol
Brechungsindex n	$1,4 \pm 0,005$
Fluoreszenzquantenausbeute des Donors Tryptophan Q_0	$0,11 \pm 0,005$
Orientierungsfaktor κ^2	2/3
Extinktionskoeffizient $\varepsilon_A(\lambda_{Em}^D)$	$9064 \cdot 10^{17} \text{ (nm}^2/\text{mol)} \pm 10 \cdot 10^{17} \text{ (nm}^2/\text{mol)}$
Fehler der BRAND-Pipetten	1 %

Wichtig: Größen ohne Fehler werden mit einem Fehler von 0,1 % abgeschätzt!

Folgende Themen sollen im Protokoll behandelt werden:

- Sucht für die Einleitung neben der Theorie auch Anwendungsgebiete der Fluoreszenz bzw. von FRET raus und beschreibt diese.
- Bezieht die berechneten Massen mit Fehler der Einwaage und die Tabelle mit den tatsächlichen Konzentrationen mit Fehler in die Durchführung mit ein.
- Plottet die Messdaten von beiden Messungen und beschreibt eure Spektren.
- Berechnet aus der Mehrfachmessung des HSA die mittlere Wellenlänge des Proteins mit Fehler und den Gerätefehler.
- Mithilfe der mittleren Wellenlänge könnt ihr im Anschluss das Überlappungsintegral I und damit den Försterradius R_0 bei einem pH-Wert von 7 bestimmen. Bestimmt jeweils auch den Fehler der berechneten Größen.
- Berechnet die Integrale der einzelnen Spektren mithilfe von Origin (setzt dafür sinnvolle Integralgrenzen). Nutzt diese, um die relative Donorfluoreszenz $I_0/I - 1$ (I_0 Donorfluoreszenz ohne Akzeptor, I Donorfluoreszenz mit Akzeptor) in Abhängigkeit der Akzeptorkonzentration aufzutragen (Stern-Volmer-Plot). Bestimmt daraus die Stern-Volmer-Konstante. Gebt diese genauso wie die Dissoziationskonstante und die relativen Donorfluoreszenzen immer mit einem Fehler an. Macht dies für beide FRET-Paare.
- Berechnet die FRET-Effizienzen E beider FRET-Paare und stellt diese in Abhängigkeit von der Akzeptorkonzentration dar und erklärt den Verlauf der Kurven. Berechnet den Fehler der Effizienzen.
- Berechnet den Abstand r zwischen dem Donor Tryptophan und dem Akzeptor 3-HF bzw. Quercetin inklusive Fehlerrechnung.
- Vergleicht die Ergebnisse für die FRET-Paare HSA/3-HF und HSA/Quercetin und diskutiert.
- Beachtet kritische Schritte in der Durchführung und diskutiert die Fehler.
- Vergleicht die schrittweise Probenherstellung mit dem direkten Ansetzen einer Lösung.
- FRET ist für unterschiedliche pH-Werte möglich (Beispiel: pH 3 und pH 7, siehe Abbildungen im Anhang). Vergleicht die Abbildungen und begründet.

Allgemeine Anmerkungen:

- Für jede berechnete Größe soll eine Fehlerrechnung durchgeführt werden, auch wenn das in den Stichpunkten oben drüber nicht explizit aufgeführt wurde.
- Für alle berechneten Fehler muss die entsprechende Fehlerrechnung mit ins Protokoll! Ergebnisse ohne Formeln und Rechnungsweg werden nicht akzeptiert.
- Alle errechneten Größen inkl. Fehler (auch alle Integrale, FRET-Effizienzen etc.) sollen im Protokoll aufgeführt sowie die Messdaten in den Anhang eingefügt werden!
- Zwischen Zahl und Einheit gehört ein geschütztes Leerzeichen (Ausnahme: Winkel)!

4. Kontrollfragen fürs Kolloquium

- Welche Stoffe fluoreszieren und warum? Nennt einige fluoreszierende Stoffe. (Lebensdauer, Beispiele aus dem täglichen Leben, atomare Phosphoreszenzmarker, ...)
- Informationsgehalt von Fluoreszenzspektren
- Bei welcher Wellenlänge absorbiert, bei welcher fluoresziert Tryptophan?
- Welche Bedingungen muss ein FRET-Paar erfüllen?
- Lambert-Beer'sche Gesetz
- Fermis goldene Regel
- Dipol-Dipol-Wechselwirkungen, Übergangsdipolmoment, Abhängigkeit der Orientierungsfaktor κ vom Dipolmoment
- Was sind die Einsatzmöglichkeiten in Wissenschaft und Industrie?
- Bedeutung der wichtigen Begriffe im Versuch wie Überlappungsintegral, FRET-Effizienz, etc.
- Was versteht man unter Mittelwert, Median, Quantil, Varianz, Standardabweichung, Regressionsgerade, Bedeutung von R^2 , Fehlerfortpflanzung
- Was versteht man in der Analytik unter Genauigkeit, Streuung und Präzession?

Anhang

Vorgegebene Messdaten zur Auswertung:

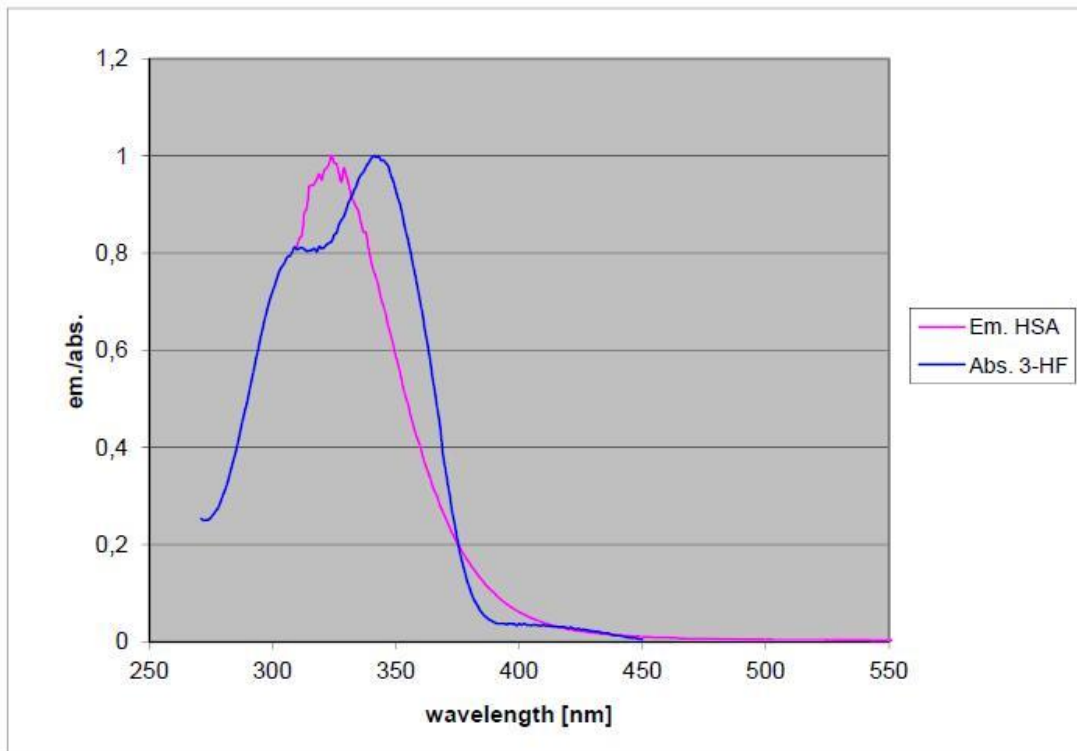


Abb. 8: Emissionsspektrum von HSA und Absorptionsspektrum von 3-HF bei pH = 3.

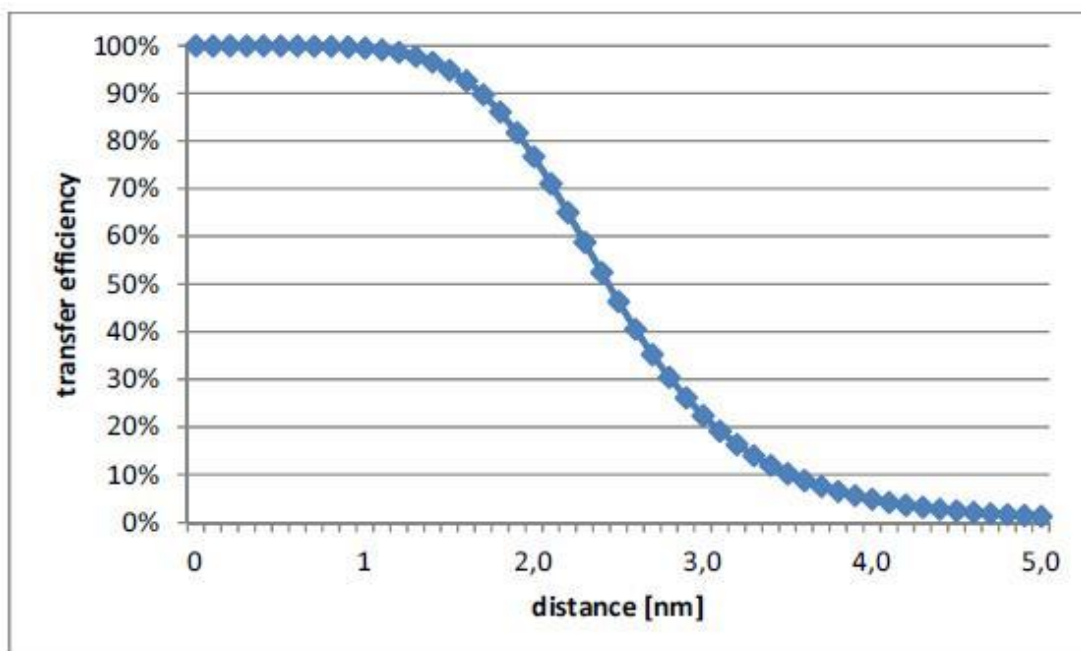


Abb. 9: Abstandsabhängigkeit der Transfereffizienz des FRET-Paares bei pH = 3.

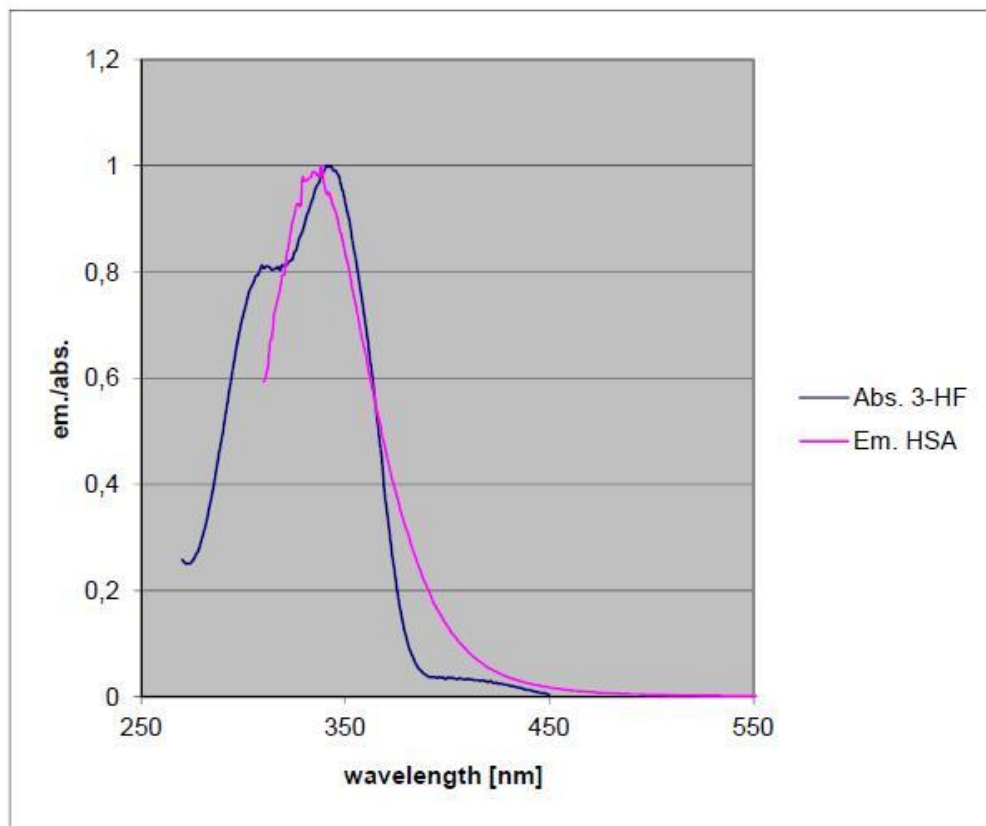


Abb. 10: Emissionsspektrum von HSA und Absorptionsspektrum von 3-HF bei pH = 7.

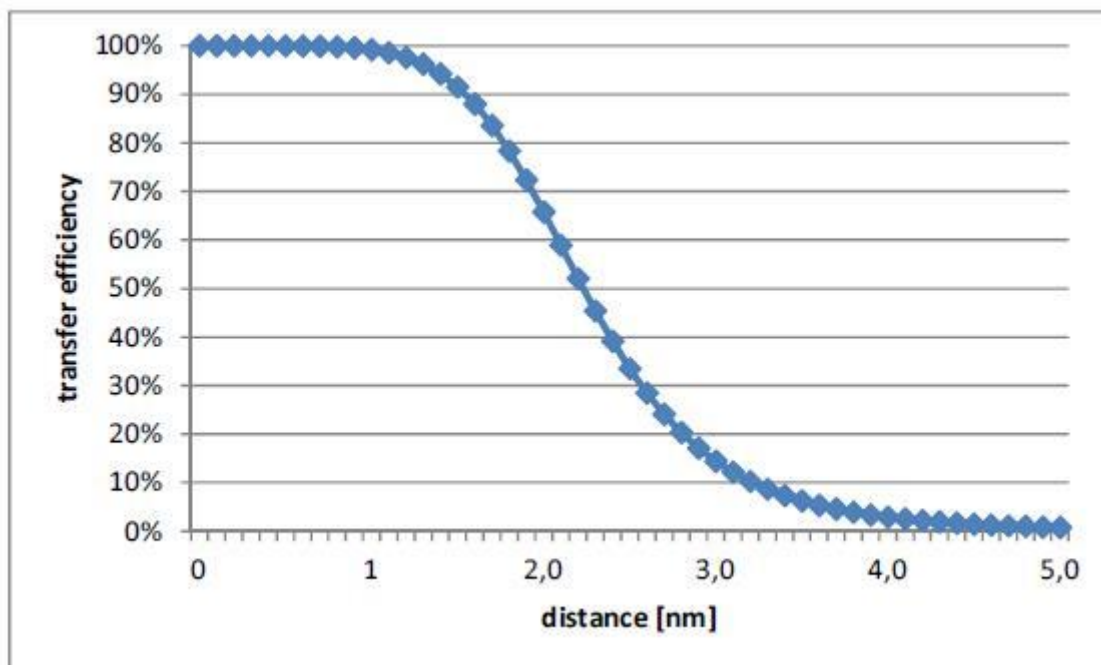


Abb. 11: Abstandsabhängigkeit der Transfereffizienz des FRET-Paares bei pH = 7.

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)

Skoog, Leary Instrumentelle Analytik, 2. Auflage, Springer, 2013

Förster-Resonanzenergietransfer – Wikipedia (2020). Online verfügbar unter <https://de.wikipedia.org/wiki/F%C3%B6rster-Resonanzenergietransfer#FRET-Effizienz>, zuletzt aktualisiert am 09.09.2020, zuletzt geprüft am 24.09.2020.

Stern-Volmer-Gleichung – Wikipedia (2020). Online verfügbar unter <https://de.wikipedia.org/wiki/Stern-Volmer-Gleichung>, zuletzt aktualisiert am 09.09.2020, zuletzt geprüft am 24.09.2020.

Dexter Energie Transfer (2020). Online Verfügbar unter [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_\(Physical_and_Theoretical_Chemistry\)/Fundamentals/Dexter_Energy_Transfer](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Fundamentals/Dexter_Energy_Transfer), zuletzt aktualisiert am 15.08.20, zuletzt geprüft am 02.12.20