# Praktikum: Instrumentelle Bioanalytik

## Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET)

In diesem Versuch wird die Fluoreszenzlöschung von Humanalbumin (*human serum albumin*, HSA) durch zwei Quenchermoleküle untersucht. Die beiden Quenchermoleküle 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 Quenchermolekül 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 Quenchermolekül 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 übertagen 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).

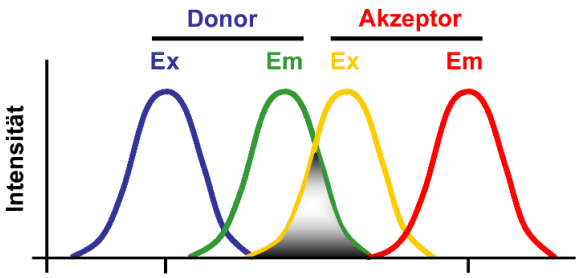



Abb. 1: Anregungs- (Ex) und Emissionsspektrum (Em) von Donor bzw. Akzeptor. Der Überlappungsbereich (grau gekennzeichnet) von Emissionsspektrum des Donors und Anregungsspektrum des Akzeptors zeigt die Möglichkeit eines strahlungslosen Energieübertrags.

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

$$J = \varepsilon_A(\lambda_{Em}^D)\lambda_{Em}^{D\ 4}$$

$\varepsilon_A(\lambda_{Em}^D)$ ist dabei der Extinktionskoeffizient der zu untersuchende Lösung bei der Emissionswellenlänge $\lambda_{Em}^D$ 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.

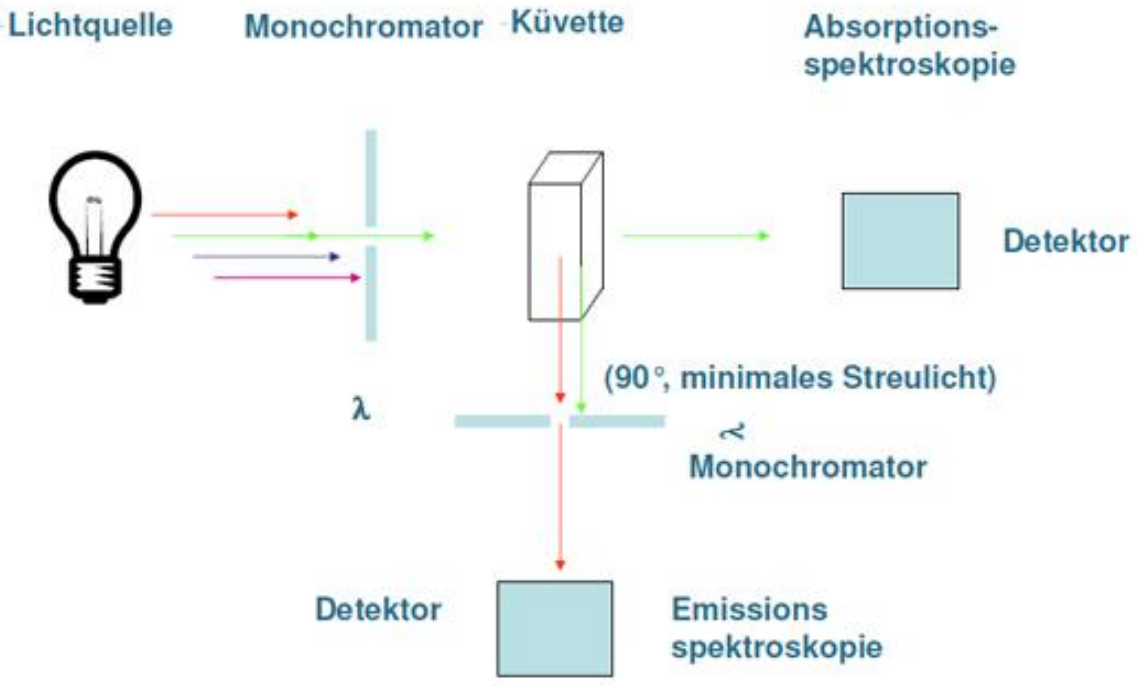



Abb. 2: Skizzierter Aufbau eines Fluoreszenzspektrometers.

## 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) $D^* \rightarrow D + hv$
2) $hv + A \rightarrow A^*$

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)

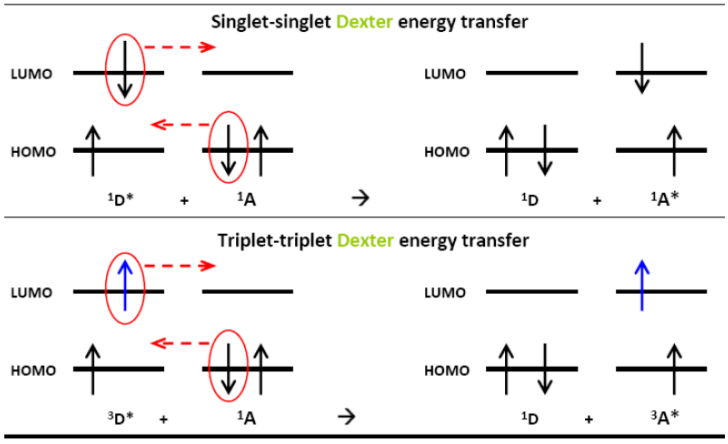



Abb. 3: Schematische Darstellung des Dexter-Energie-Transfers mit den beiden möglichen Übergängen.

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.

$^3D^* + {}^1A \rightarrow {}^1D + {}^3A^*$

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:

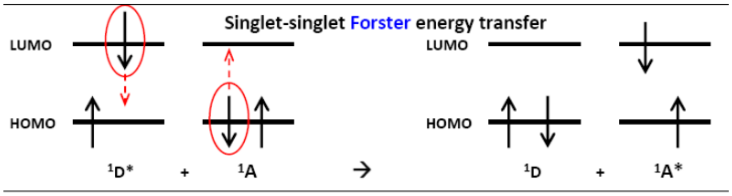



Abb. 4: Schematische Darstellung des Förster-Energie-Transfers.

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:

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

$\varphi_1$: die elektronische Wellenfunktion des Moleküls im angeregten Zustand,

$\varphi_2$: 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:

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

$k_{ET}$ 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-Übergansrate 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.

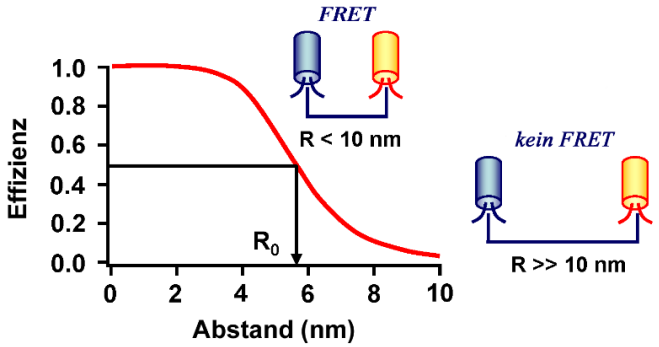



Abb. 5: Die rote Kurve zeigt den Verlauf der Abstandsabhängigkeit der Transfereffizienz E für einen Förster-Radius $R_0$ um die 6 nm. Im Bereich um den Försterradius kann der Abstand besonders genau bestimmt werden, da hier die Steigung der Kurve betragsmäßig am größten ist.

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

$$R_0^6 = 8{,}8 * 10^{-29} * \kappa^2 n^{-4} Q_0 J$$

$\kappa^2$ 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.

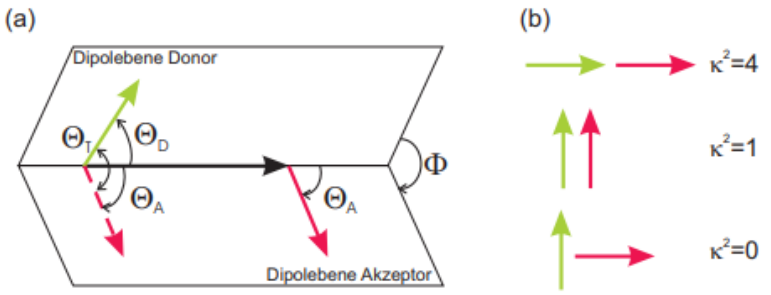



Abb. 6: Orientierung der Übergangsdipolmomente. Übergangsdipolmomente des Donors (grün) und Akzeptors (rot). a) zeigt die Winkel der Übergangsdipolmomente, b) die Werte von $\kappa^2$ in Abhängigkeit der Lage die Dipolmomente zueinander.

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:

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

*F* stellt dabei die Intensität der Donorfluoreszenz in Anwesenheit, $F_0$ 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).

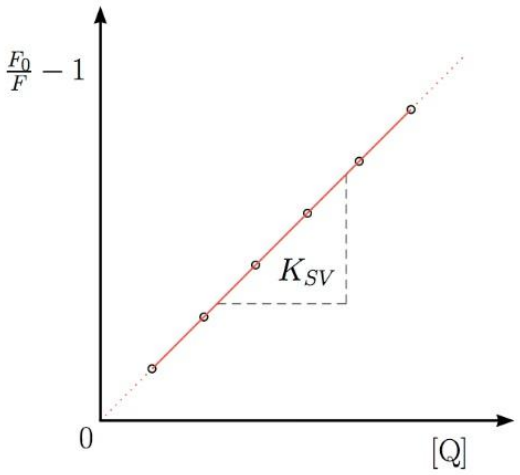



Abb. 7: Stern-Volmer-Plot.

## 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. Diese werden im Kolloquium abgefragt!

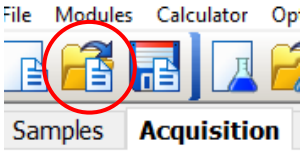
**HSA-Lösung:** 35 mL Lösung mit einer Proteinkonzentration von 6 µM. Das molare Gewicht des HSA beträgt 66,47 kDa. Das Protein wird in einem gestellten Natriumphosphat-Puffer, pH 7 (Natriumphosphat-Puffer) gelöst. **Achtung:** Die Lösung darf beim Ansetzen NICHT gevortext werden, sondern nur vorsichtig invertiert!

**3-HF-Lösung:** 20 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.

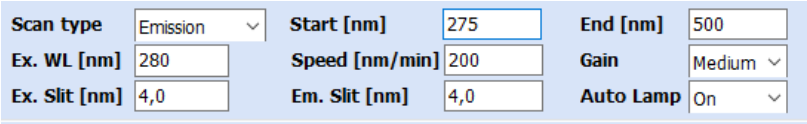
**Quercetin-Lösung:** 20 mL Lösung mit einer Konzentration von 400 µM. Das molare Gewicht von Quercetin beträgt 302,24 g/mol. Die Substanz wird in Ethanol gelöst.

## 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 *BLDevelopement* und ladet die Methode *Praktikum_2026* in das Programm ein.

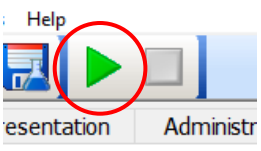


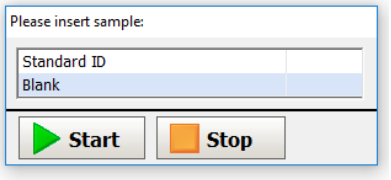

Die Einstellungen am unteren Bildrand sollen nach dem Laden der Methode wie folgt aussehen:



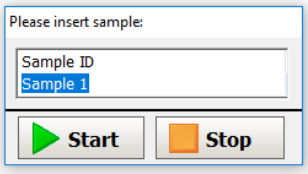

Die erste Messung ist der Blank. Dazu müssen 2 mL des Natriumphopshat-Puffers in eine Küvette pipettiert und in das Gerät gestellt werden. **Achtung:** Die Küvette darf nur im oberen Bereich und nur so angefasst werden, dass das Glas nicht verschmiert wird! Warum ist das wichtig?

Zum Start der Messung klickt ihr auf das grüne Start-Symbol und nach kurzer Zeit öffnet sich ein Fenster, 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.



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.

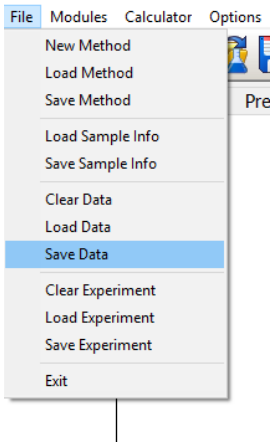



In eine neue Küvette sollen 2 mL der HSA-Lösung pipettiert werden. Invertiert davor das Falcon mit der Lösung nochmal vorsichtig. Sobald die Küvette in das Gerät gestellt wurde, kann die neue Messung mit dem Namen *HSA 1* gestartet werden. Um die mittlere maximale Emissionswellenlänge des HSA später 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. So könnt ihr die Fluoreszenzintensität der HSA in Abhängigkeit der steigenden Konzentration des 3-HF messen.
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 3-HF soll immer die gleiche Wartezeit (30-60 s) eingehalten werden, bevor die Messung gestartet wird. So wird eine Interaktion der Moleküle ermöglicht und die Messung immer identisch gehalten.
Achtet beim Zugeben der 3-HF-Lösung darauf, dass ihr diese in der Küvette hoch- und runterpipettiert, damit sich die Lösungen gut vermischen.
**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 im Bereich von 0,2 bis 50 µM könnt ihr innerhalb eurer Gruppe selber wählen. Die Abstände sollten aber nichtlinear sein.
**Tipps zur Erstellung des Pipettierschemas:** Das minimalste Volumen, was ihr pipettieren könnt, ist 1 µL. Achtet bei eurer Berechnung darauf, dass das hinzuzugebende Volumen pro Schritt nicht kleiner ist. Denkt daran, dass sich euer Gesamtvolumen, mit dem ihr rechnen müsst, mit jedem Schritt erhöht.

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 der mittleren 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_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! Öffnet dazu die .txt-Datei und überprüft, ob alle Daten vorhanden sind.




## 2.3 Messung des FRET-Paares HSA/Quercetin

Die Fluoreszenzlöschung von HSA durch Quercetin wird analog zu der durch 3-HF gemessen.

Wie auch bei 3-HF wird damit begonnen, den Blank (2 mL Natriumphopshat-Puffer) zu messen. Anschließend folgt die Messung der reinen HSA-Lösung. In der Lösung mit HSA soll anschließend ebenso in mehreren Schritten die Quercetin-Lösung erhöht und die Fluoreszenzintensität des Donors bzw. Akzeptors untersucht werden. Analog zum 3-HF wird in 15 Schritten die Quercetinkonzentration in der HSA-Lösung erhöht (0,2 – 50 µM). Eine Wartezeit von 60 Sekunden wurde nach jeder Zugabe eingehalten.
Diese Messreihe wird am Versuchstag nicht selber gemessen, sondern die Daten der Messreihe von der Assistentin zur Verfügung gestellt.

## 2.4 Auswertung der Ergebnisse

Nach der Fertigstellung der Messreihe wird vor Ort mit der Auswertung der Daten begonnen. Mithilfe von Origin sollen die Kurven geplottet, die maximale Emissionswellenlängen der Mehrfachmessungen bestimmt und die Integralgrenzen der Kurven gesetzt werden. Anschließend berechnet ihr die weiteren Größen, die in Kapitel 3 aufgeführt sind und plottet die Graphen ebenso in Origin.

Für einige Größen soll eine Fehlerrechnung erfolgen, diese werden in Kapitel 3 genannt. **Achtung:** Die Formeln für die Fehlerrechnung der genannten Größen sollen zuhause schon vorbereitet werden und sind Teil des Kolloquiums.

**Tipps für die Auswertung mit Origin:**

Nachdem ihr die gemessenen Spektren mit Origin geplottet habt, könnt ihr über „Minitools“ mit „Integration“ die Integrale der Kurven berechnen lassen. Wählt bei dem neuen Fenster unter dem Reiter „Ausgabe“ zu den voreingestellten Feldern auch die Felder „An Worksheet anhängen“ und „X bei YMax“ aus. Setzt die Integralgrenzen manuell nochmal passend und lasst euch dann die Ergebnisse in einem neuen Blatt ausgeben. Denkt danach bei den Integralgrenzen für Quercetin daran, dass ihr die gleichen Grenzen setzt. Diese könnt ihr manuell im Integrationsfenster unter dem Reiter „Grafische Datenauswahl“ eingeben.

# 3. Protokoll

Für die Berechnungen im Protokoll braucht ihr folgende 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 ± 0,005 |
| Fluoreszenzquantenausbeute des Donors Tryptophan $Q_0$ | 0,11 ± 0,005 |
| Orientierungsfaktor $\kappa^2$ | 2/3 ± 6,67*10$^{-4}$ |
| Extinktionskoeffizient $\varepsilon_{3-HF}(\lambda_{Em}^{D})$ | 1,91*10$^{21}$ nm$^2$ ± 1,91*10$^{18}$ nm$^2$ |
| Extinktionskoeffizient $\varepsilon_{Quercetin}(\lambda_{Em}^{D})$ | 2,81*10$^{21}$ nm$^2$ ± 2,81*10$^{18}$ nm$^2$ |

Folgende Themen sollen im Protokoll behandelt werden:

Einführung:

- Theorieteil zum Versuch
- Zusätzlich Anwendungsgebiete von FRET in Wissenschaft und/oder Industrie
- Zielsetzung des Versuchs

Durchführung

- Beschreibt die Durchführung des Versuches.
- Verwendet für die Berechnung der Konzentration der verwendeten Stammlösung die tatsächliche eingewogene Masse und das hinzugegebene Volumen.
- Fügt die verwendeten Pipettierschemen als Tabelle ein, auch die gestellte für die Messreihe des FRET-Paares HSA/Quercetin.

Ergebnisse und Auswertung:

- Plottet die Messgraphen beider Messreihen und beschreibt die Spektren in mehreren Sätzen.
- Geht auch auf die beiden Kurven für den Vergleich des direkten Probenansetzens vs. schrittweise Probenansetzung beim FRET-Paar HSA/3-HF ein.
- Berechnet aus den Mehrfachmessungen des HSA die mittlere maximale Emissionswellenlänge $\bar{\lambda}_{Em}^{D}$ des Trp mit Fehler (= Standardabweichung).
- Mithilfe der berechneten mittleren maximalen Emissionswellenlänge $\bar{\lambda}_{Em}^{D}$ könnt ihr im Anschluss das Überlappungsintegral *J* und damit den Förster-Radius $R_0$ beider FRET-Paare bestimmen. Verwendet hier für beide FRET-Paare die berechnete mittlere maximale Emissionswellenlänge $\lambda_{Em}^{D}$ sowie deren Fehler aus der Mehrfachmessung. Bestimmt für beide Größen *J* und $R_0$ auch die Fehler mithilfe einer Fehlerfortpflanzung (Tipp für die Fehlerfortpflanzung: Der Orientierungsfaktor $\kappa^2$ wird als Konstante verstanden, sodass dieser als ganzes abgeleitet wird und der Exponent nicht berücksichtigt werden muss).
- Berechnet die Integrale der einzelnen Spektren mithilfe von Origin, setzt dafür sinnvolle Integralgrenzen. Zieht den Blank von den anderen Messungen ab, bevor ihr mit diesen weiterarbeitet!
- Mit den Integralen berechnet ihr die relative Donorfluoreszenz $I_0/I - 1$ ($I_0$ Donorfluoreszenz ohne Akzeptor, *I* Donorfluoreszenz mit Akzeptor). Diese tragt ihr in Abhängigkeit zur Akzeptorkonzentration auf (Stern-Volmer-Plot). Aus dem Plot bestimmt ihr die Stern-Volmer-

Konstante. Gebt diese genauso wie die daraus geschlossene Dissoziationskonstante an. Auch der Plot soll ins Protokoll eingefügt werden.
- Berechnet die FRET-Effizienz *E* der Paare und stellt diese in Abhängigkeit von der Akzeptorkonzentration dar. Plottet den Graphen und erklärt den Verlauf der Kurven.
- Berechnet den Abstand *r* zwischen dem Donor Tryptophan und den Akzeptoren für die höchste Effizienz des jeweiligen FRET-Paares. Für den Abstand *r* soll eine Fehlerrechnung mit Fehlerfortpflanzung erfolgen (Anmerkung: Der Fehler für die Effizienz *E* wird mit 0,1 % des Wertes angenommen und muss nicht extra berechnet werden).

Diskussion:

- Vergleicht die berechneten Ergebnisse für die beiden FRET-Paare und diskutiert. Welcher Akzeptor ist der stärkere Quencher?
- Betrachtet kritische Schritte in der Durchführung, die zu Fehlern führen können und diskutiert diese Fehler und ihren Einfluss.
- Vergleicht die schrittweise Probenherstellung mit dem direkten Ansetzen des Schrittes in der Küvette. Wie könnt ihr euch den Unterschied zwischen den beiden Kurven erklären?

**Allgemeine Anmerkungen:**

- Für alle berechneten Fehler muss die entsprechende Fehlerrechnung mit ins Protokoll! Einzelne Ergebnisse ohne die verwendeten Formeln, in die nur noch die Zahlen eingesetzt werden müssen, werden nicht akzeptiert.
- Alle errechneten Größen (inkl. Fehler und auch alle Integrale aus Origin, FRET-Effizienzen etc.) sollen im Protokoll tabellarisch aufgeführt werden! Beachtet hier, dass die signifikanten Stellen ausreichen und nicht alle Nachkommastellen aufgeführt werden sollen.
- 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?

## 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 Phosphorescene, 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, zuletzt aktualisiert am 15.08.20, zuletzt geprüft am 02.12.20