

Praktikum: Instrumentelle Bioanalytik

Fluoreszenzspektroskopie

Im folgenden Versuch soll die Konzentration von selbst exprimiertem GFP anhand einer Kalibriergeraden bestimmt werden. Hierzu muss zunächst GFP zellfrei exprimiert und verschiedene Kalibrier- und Probelösungen hergestellt werden. Anschließend werden diese im Fluoreszenzspektrometer vermessen und die Kalibriergerade erstellt. Die Kalibriergerade zeigt einen linearen Zusammenhang zwischen der Fluoreszenzintensität und der Konzentration des Fluorophors und kann daher auch zur Bestimmung der GFP-Konzentration verwendet werden.

1 Theoretische Grundlagen

In der Fluoreszenzspektroskopie wird eine Probe durch elektromagnetische Strahlung angeregt und die Fluoreszenz (spontane Emission) beobachtet. Im Gegensatz zur Absorption wird die Fluoreszenz senkrecht zur Einstrahlrichtung gemessen (siehe Abbildung 1). Ein Monochromator vor der Probe selektiert die eingestrahlte Anregungswellenlänge und ein zweiter vor dem Detektor bestimmt die Wellenlänge der gemessenen Fluoreszenz.

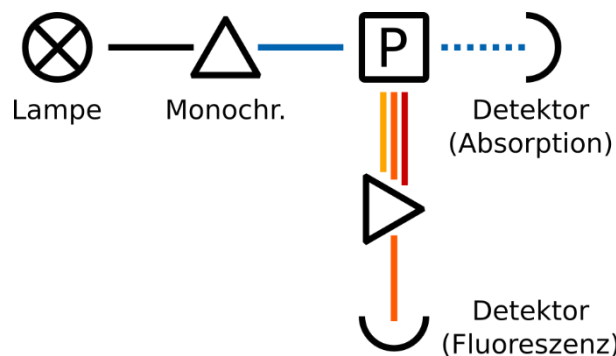


Abbildung 1: Aufbau eines Absorptions- und Fluoreszenzspektrometers.

1.1 Jabłoński-Termschema

Das Jabłoński-Termschema (Abbildung 2) beschreibt die elektronische Anregung eines Fluorophors und durch welche Prozesse die anschließende Abregung in den elektronischen Grundzustand erfolgen kann. Die Anregung erfolgt zunächst durch Absorption elektromagnetischer Strahlung. Der Fluorophor wird vom elektronischen Singulett-Grundzustand (S_0) in einen elektronisch angeregten Zustand (hier S_1) angehoben. Dabei kann eine elektronische Anregung in verschiedene Schwingungszustände des S_1 erfolgen (siehe **Franck-Condon**). Da die nachfolgende **vibronische Relaxation** (VR) in der Regel um Größenordnungen schneller ist als die spontane Emission, erfolgt die Fluoreszenz aus dem Schwingungsgrundzustand (**Kasha-Regel**). Die emittierte Strahlung ist folglich energieärmer als die zuvor absorbierte Strahlung (siehe **Stokes Verschiebung**). Unter bestimmten Umständen kann das Fluorophor durch **Intersystem Crossing** (ISC) in den Triplettzustand (T_1) übergehen. Die spontane Emission aus dem Triplettzustand erfolgt erneut unter Spin-Umkehr und wird Phosphoreszenz genannt. Ein weiterer Übergang von S_1 in den elektronischen Grundzustand S_0 erfolgt strahlungslos und wird **Internal Conversion** genannt. In diesem Prozess wird die absorbierte Strahlung vollständig in thermische Energie umgewandelt.

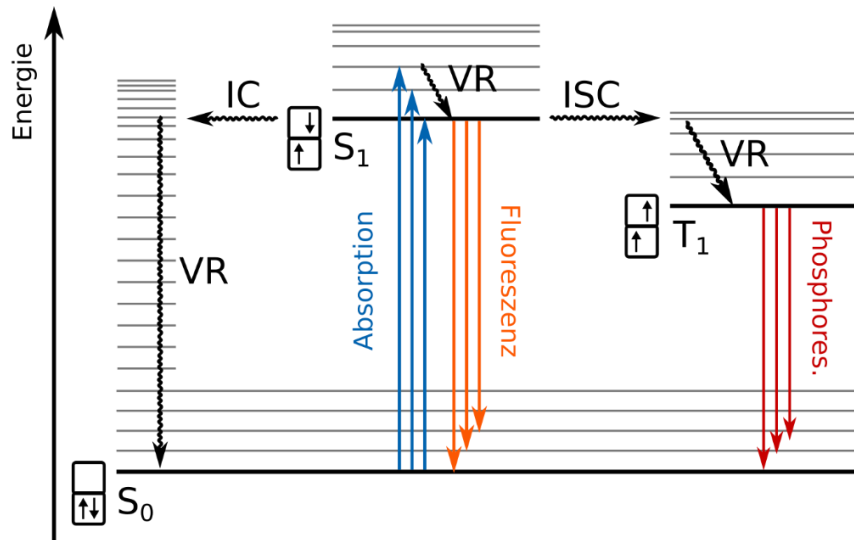


Abbildung 2: Es wird das Jablonski-Termschema mit folgenden Abkürzungen gezeigt: Elektronischer Grundzustand (S_0), erster angeregter Singulettzustand (S_1), Triplettzustand (T_1), vibronische Relaxation (VR), Internal Conversion (IC), Intersystem Crossing (ISC). Die grauen Linien repräsentieren Schwingungszustände der jeweiligen elektronischen Zustände.

1.2 Franck-Condon-Prinzip

Das Franck-Condon-Prinzip beschreibt, welchen Einfluss Molekülschwingungen auf die elektronische Anregung haben. Da die Anregung des Fluorophors sehr schnell erfolgt (ca. 1 fs), ändert sich währenddessen der Kernabstand nicht (eine Schwingung ist um ca. zwei Größenordnungen langsamer). In Abbildung 3 ist diese Anregung von S_0 in S_1 deshalb als senkrechter Pfeil gezeichnet, der Kernabstand bleibt während der Anregung konstant. Eine solche Anregung kann jedoch nur dann erfolgen, wenn bei einem konstanten Kernabstand sowohl der Anfangs- als auch der Endzustand eine gewisse Zustandswahrscheinlichkeit besitzen. Demnach ist ein Übergang zwischen zwei Zuständen umso wahrscheinlicher, je besser deren Schwingungswellenfunktionen überlappen.

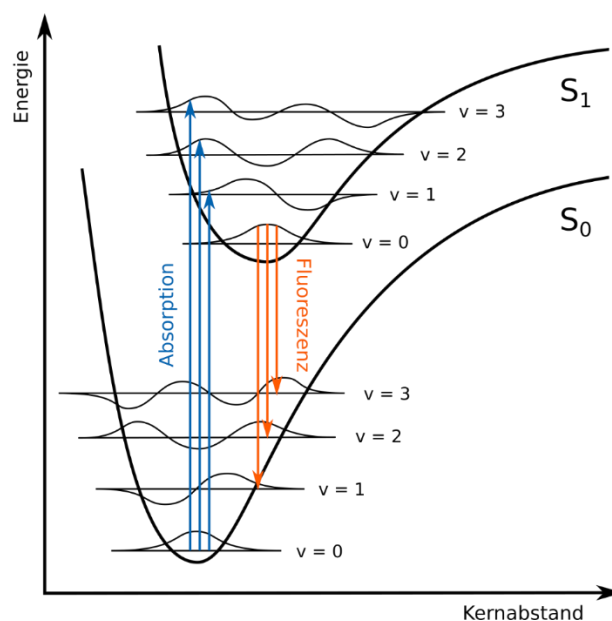


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Franck-Condon-Prinzips. Der Molekülschwingung wird der anharmonische Oszillator zu Grunde gelegt und es sind die ersten Schwingungszustände von S_0 und S_1 gezeigt.

1.3 Stokes Verschiebung

Es ist zunächst verwunderlich, dass die Energie der emittierten Strahlung nicht der Energie der absorbierten Strahlung entspricht. Es wurde festgestellt, dass das emittierte Licht eine höhere Wellenlänge besitzt, also energieärmer ist als das zuvor absorbierte. Hier werden zwei Prozesse aufgeführt, die zu der sogenannten Stokes Verschiebung beitragen.

Vibronische Relaxation

Wie in Abbildung 2 gezeigt, kann sowohl die Absorption als auch die Fluoreszenz in einen angeregten Schwingungszustand erfolgen. Dadurch wird zum einen die benötigte Energie der absorbierten Strahlung erhöht, sowie die Energie der emittierten Strahlung vermindert. Beides führt dazu, dass die Emission bei einer höheren Wellenlänge stattfindet als die Absorption.

Lösungsmittel Relaxation

Durch die Anregung des Fluorophors in einen elektronisch angeregten Zustand ändert sich auch dessen Ladungsverteilung. Dies führt dazu, dass die Lösungsmittelmoleküle, die zunächst energetisch günstig um das Fluorophor orientiert waren, nach Anregung energetisch ungünstig orientiert sind (Abbildung 4, links). Die Anregung erfolgt so schnell (analog zu Franck-Condon), dass sich das Lösungsmittel erst im Anschluss reorientiert und einen energetisch günstigeren Zustand einnimmt. Bei anschließender Fluoreszenz ist erneut eine Reorientierung des Lösungsmittels notwendig (Abbildung 4, rechts). Auch hier führen beide Effekte zu einer Stokes Verschiebung.

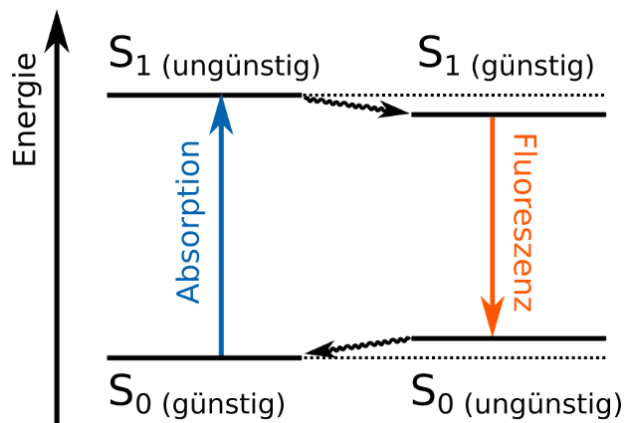


Abbildung 4: Es wird die Relaxation durch Reorientierung des Lösungsmittels veranschaulicht. Es ist zu beachten, dass eine günstige Anordnung der Lösungsmittelmoleküle stets zu einer energetischen Absenkung des Zustands führt.

1.4 Zerfall des angeregten Zustands S_1

Im folgenden Abschnitt soll der Zerfall des angeregten Zustands S_1 , welcher im Jabłoński-Termschema (Abbildung 2) qualitativ zusammenfasst ist, genauer betrachtet werden. Nach der Absorption von Licht lässt sich die zeitliche Entwicklung des S_1 typischerweise durch eine Kinetik erster Ordnung beschreiben. Folglich ist dessen Population n zum Zeitpunkt t gegeben durch

$$n(t) = n_0 \cdot \exp\{-k_{S_1} \cdot t\}$$

Dabei ist k_{S_1} die Ratenkonstante, welche die Geschwindigkeit des Zerfalls bestimmt. Sie setzt sich aus weiteren Raten zusammen, deren konkurrierende Prozesse (Fluoreszenz, Internal Conversion, Intersystem Crossing) aus dem Jabłoński-Termschema bekannt sind:

$$k_{S_1} = k_F + k_{IC} + k_{ISC} \quad (1.1)$$

Aus k_{S_1} lässt sich die Lebensdauer τ_{S_1} des angeregten Zustands wie folgt berechnen:

$$\tau_{S_1} = \frac{1}{k_{S_1}}$$

1.5 Fluoreszenzquantenausbeute

Die Fluoreszenzquantenausbeute Φ_F ist definiert als das Verhältnis von emittierter zu absorbierter Strahlung. Sie kann ebenfalls durch die entsprechenden Raten dargestellt werden:

$$\Phi_F = \frac{\text{emittierte Photonen}}{\text{absorbierte Photonen}} = \frac{k_F}{k_F + k_{IC} + k_{ISC}}$$

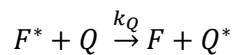
Ein weiterer Prozess, der zur Abregung des S_1 führt, wird als Fluoreszenzlöschung (Quenching) bezeichnet und wird im folgenden Kapitel genauer beschrieben.

1.6 Fluoreszenzlöschung

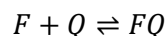
In Anwesenheit eines sogenannten Quenchers gibt es weitere Prozesse, die einen Zerfall des S_1 hervorrufen und Gleichung (1.1) muss um einen Term erweitert werden:

$$k_{S_1} = k_F + k_{IC} + k_{ISC} + k_Q * [Q]$$

Dabei ist $[Q]$ die Konzentration des Quenchers und k_Q die zugehörige Rate des Quenchprozesses. Man unterscheidet zwischen zwei Prozessen des Quenchens, der dynamischen und der statischen Fluoreszenzlöschung. Im Fall des dynamischen Quenchens wird die Energie des angeregten Fluorophors durch einen Stoß auf den Quencher übertragen und es wird daher auch vom Kollisions-Quenching gesprochen. Folgende Gleichung beschreibt den Prozess des dynamischen Quenchens:



Dahingegen bilden bei der statischen Fluoreszenzlöschung das Fluorophor und der Quencher einen Komplex, welcher nicht oder weniger fluoresziert. Dies wird durch folgende Gleichung veranschaulicht:



Ein Quenchprozess lässt sich mit Hilfe der **Stern-Volmer Gleichung** quantifizieren. Sie beschreibt die Fluoreszenz eines Farbstoffes in Abhängigkeit von der Konzentration eines Quenchers $[Q]$. Sie ist gegeben als

$$\frac{F_0}{F} = \frac{\Phi_0}{\Phi} = 1 + k_{SV} * [Q]$$

Dabei ist F die Fluoreszenzintensität mit und F_0 ohne Quencher, sowie Φ die Quantenausbeute mit und Φ_0 ohne Quencher. Die Stern-Volmer-Konstante k_{SV} bestimmt die Steigung der Geraden.

1.7 Zellfreie Proteinexpression

In der Biochemie werden Proteine standardmäßig rekombinant exprimiert. Eine schnellere und variabelere Möglichkeit Proteine herzustellen bietet die zellfreie (*cell free*) (CF) Expression. Statt auf lebenden Zellen basiert diese auf einem Zellextrakt, einer genetischen Vorlage und Zusätzen. Es handelt sich dabei um ein offenes System. Dies bietet einige Vorteile, wie eine einfache Anpassung der Reaktionsbedingungen. So können unter anderem markierte Aminosäuren oft leichter eingebaut werden.

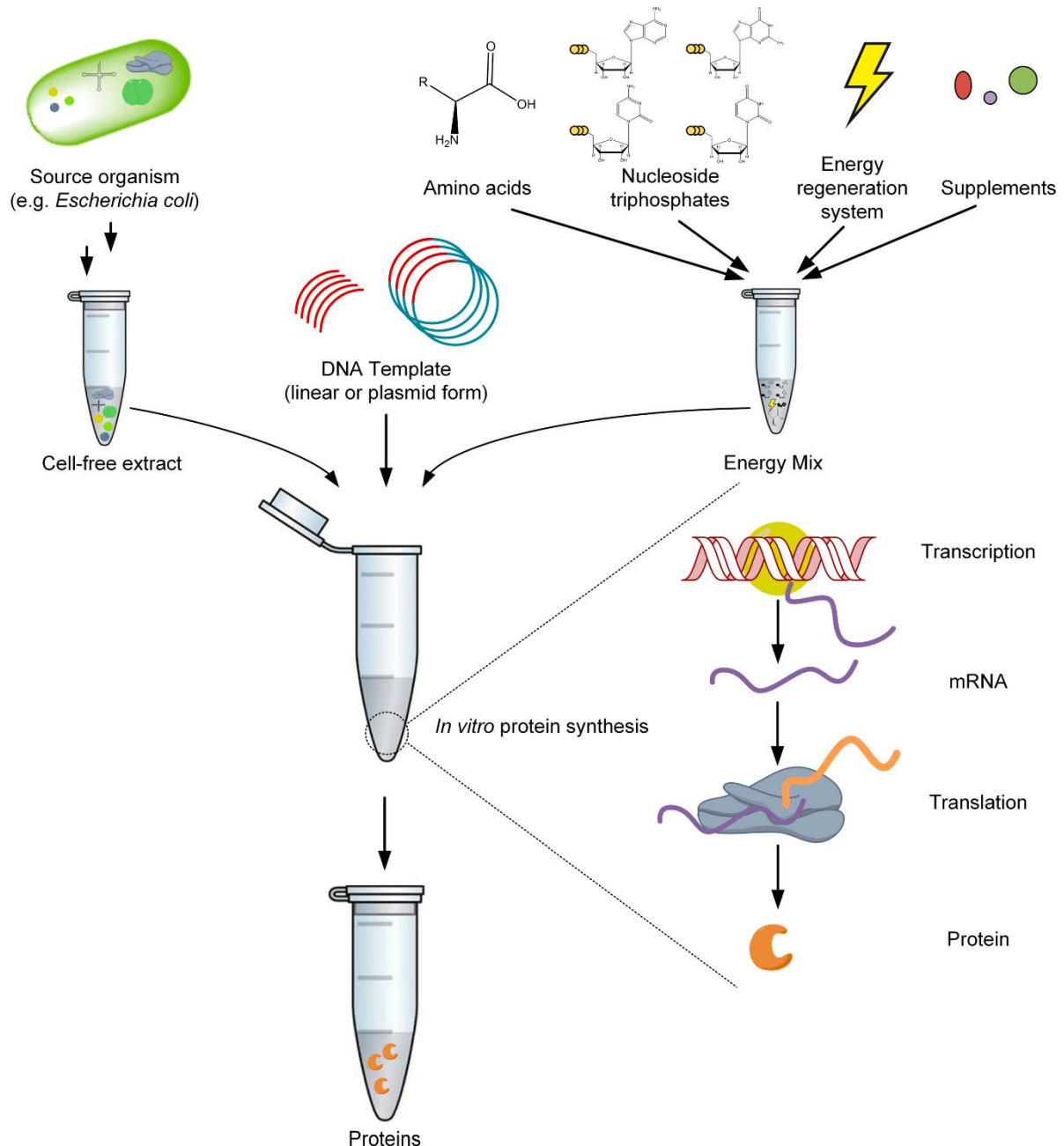


Abbildung 5: Überblick einer zellfreien Reaktion.

Rolf, J.; Rosenthal, K.; Lütz, S. Application of Cell-Free Protein Synthesis for Faster Biocatalyst Development. *Catalysts* **2019**, 9, 190. <https://doi.org/10.3390/catal9020190>

Die in der Expression verwendeten Zellextrakten enthalten dabei alle für die Translation und Transkription erforderlichen Komponenten (z.B. Ribosome, tRNA etc.). Die Extrakte können sowohl aus eukaryotischen (z.B. Hefe) als auch prokaryotischen (z.B. *E.coli*) Zellen hergestellt werden. Eukaryotische Extrakte sind aufwendiger und teurer in der Herstellung, ermöglichen jedoch fortgeschrittene posttranslationale Modifikationen. Hingegen können prokaryotische Extrakte leicht und in hohen Ausbeuten gewonnen werden. Bei Verwendung von DE3-Stämmen (z.B.: *E.coli* Zell-Linie BL21 (DE3)) kann durch Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) die T7-Polymerase-Expression induziert werden. Bei der zellfreien Expression muss dann keine T7-Polymerase zugegeben werden.

Das erforderliche Template kann in linearer Form (z.B. PCR-Produkt) oder als Plasmid zur Reaktion zugegeben werden. Standardmäßig werden Plasmide verwendet, da diese stabiler gegen Nukleasen sind.

Um das System zu vervollständigen, müssen Zusätze zugegeben werden. Dabei handelt es sich beispielsweise um Aminosäuren, Energielieferanten, Cofaktoren, Nukleotide und Salze (z.B. Magnesium). Die genaue Zusammensetzung der Zusätze muss getestet und auf das Protein abgestimmt werden, um eine optimale Expression zu erhalten. Um die Ausbeute zu steigern, können unter anderem Serin und Glutamin in erhöhten Konzentrationen zugegeben werden. Es wird angenommen, dass beide Aminosäuren nachteilig verstoffwechselt und nur ein Teil für die Reaktion zur Verfügung steht. Durch höhere Konzentrationen kann dies entgegengewirkt werden.

Man unterscheidet bei zellfreien Reaktionen typischerweise zwischen zwei Reaktionsmethoden: das ursprüngliche Batch- und das weiterentwickelte Kontinuierliche-Austausch-Verfahren (continuous exchange cell free) (CECF). Bei dem Batch-Verfahren werden alle Komponenten zusammen in ein Reaktionsgefäß gegeben. Durch die einfache Handhabung, die geringen Kosten und die kurzen Reaktionszeiten eignet es sich besonders gut für Testexpressionen zum Bestimmen optimaler Bedingungen. Durch den Verbrauch von Substraten und der Bildung inhibitorischer Nebenprodukten kommt die Reaktion jedoch nach mehreren Stunden bereits zum Erliegen. Bei dem CECF-Verfahren werden die Komponenten in zwei Kompartimente aufgeteilt. Das Extrakt und die Verbindungen mit hohem Molekulargewicht bilden den Reaktions-Mix (RM). Die restlichen Komponenten befinden sich im Feeding-Mix (feed zu Deutsch füttern) (FM). RM und FM sind durch eine semipermeable Membran voneinander getrennt. Der FM versorgt den RM mit unverbrauchtem Substrat und nimmt inhibitorische Nebenprodukte auf. Auf diese Weise kann die Reaktionszeit deutlich verlängert und höhere Ausbeuten gewonnen werden.

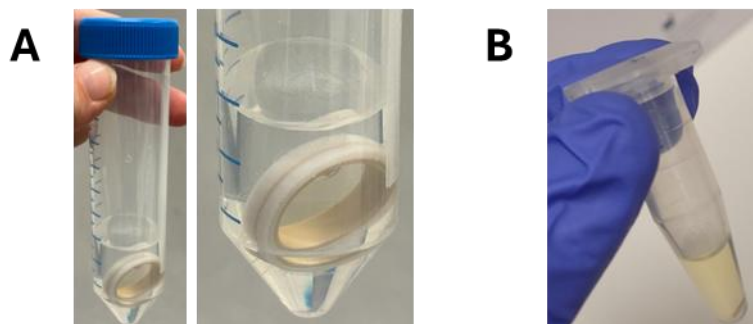


Abbildung 6: Zellfreie Reaktionsmethoden: Kontinuierliches-Austausch-Verfahren (A) und Batch-Verfahren (B).

1.8 Green fluorescent protein

Green fluorescent protein (GFP) (Abb. 7) ist ein Protein, das ursprünglich aus der Qualle *Aequorea victoria* stammt. Es wird häufig für spektroskopische und mikroskopische Untersuchungen verwendet, um biologische Funktionen zu verstehen. Aufgrund seiner hohen Stabilität eignet es sich gut für *in-vitro*-Studien. Dabei wird GFP beispielsweise zur Markierung anderer Strukturen verwendet. Heutzutage gibt es zudem eine große Anzahl an GFP-Versionen, die unterschiedliche Fluoreszenzspektren besitzen.

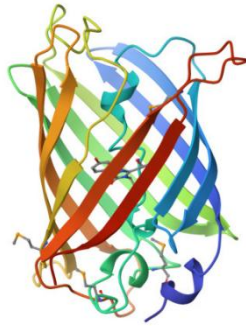


Abbildung 7: GFP (pdb 1EMA)

2 Durchführung

Zunächst wird die CF-Reaktion von GFP angesetzt und anschließend die Kalibrierlösungen aus den Stammlösungen hergestellt und im späteren Verlauf am Fluoreszenzspektrometer vermessen.

2.1 CF-Reaktion

Jedes Mitglied der Gruppe soll sein eigenes GFP mit dem Batch-Verfahren exprimieren. Die dafür benötigten Stammlösungen werden gestellt und müssen wie in Tabelle 1 zusammen pipettiert werden. **Dafür sollen die benötigten Volumina der Stammlösung vor dem Versuchstag berechnet werden (mit Ausnahme der DNA und dem Wasser).** Die Konzentration der DNA-Stammlösung wird im Praktikum von der Betreuerin genannt. Das zum Auffüllen benötigte Wasser-Volumen muss ebenfalls im Praktikum berechnet werden.

Die Komponenten müssen der Reihe nach (Extrakt als letztes!!) und genau zusammen pipettiert werden. Ansonsten gelingt die zellfreie Expression nicht! Es ist zu beachten, dass die Komponenten empfindlich sind und nicht lange bei RT gelagert werden dürfen.

Es soll außerdem eine Blank-Probe ohne DNA angesetzt werden (eine Probe pro Gruppe!). Dafür wird die Reaktion wie zuvor jedoch mit Wasser anstelle der DNA angesetzt.

Die Reaktionen inkl. Blank-Probe werden dann für 2 Stunden bei 30 °C und 800 rpm inkubiert.

Tabelle 1: Pipettierschema für die zellfreie Expression.

Komponente	c(ist)	c(soll)	V in μl
Wasser	Zum Auffüllen auf das Gesamtvolumen		
DNA		0,01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	
Mg(OAc)₂	500 mM	16 mM	
5x LMW	100 %	20 %	
Aminosäuren-Mix	5 mM	1 mM	
Ser	100 mM	2 mM	
Gln	100 mM	4 mM	
Kreatinkinase	10 mg/ml	0,125 mg/ml	
Extrakt	100 %	31 %	
		Gesamtvolumen	100

LMW steht für „low molecular weight“ und enthält die folgenden Komponenten.

Tabelle 2: Zusammensetzung von LMW.

Komponente	5x c(ist)
Ammoniumhydroxid	137 mM
D-Glutaminsäure	1 M
HEPES-KOH pH 7	263 mM
KOH	1 M
ATP	6 mM
GTP	4 mM
CTP	4 mM
UTP	4 mM
cAMP	3 mM
Folsäure	340 μM
DTT	9 mM
Kreatinphosphat	315 mM
tRNA	0,875 mg/ml
cOmplete™, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail	5 x

2.2 Kalibriergerade

Nachdem die zellfreie Expression angesetzt wurde, soll mit der Herstellung der Kalibriergerade fortgefahren werden. Für die Kalibriergerade wird eine Stammlösung von GFP (**2,1 mM**) zur Verfügung gestellt, aus der dann eine Verdünnungsreihe hergestellt werden soll. Proben 2-12 sollen dabei immer aus der vorherigen Verdünnung angesetzt werden (vortexen!!!). Zum Verdünnen soll ein Phosphatpuffer (50 mM NaH_2PO_4 , 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH7,5) verwendet werden (Puffer wird bereitgestellt).

Das Pipettierschema der Kalibriergerade muss vor dem Versuch (zu Hause!) ausgerechnet werden!

Das Volumen an Stammlösung ist begrenzt, jede Gruppe enthält nur einen Versuch die Verdünnungsreihe korrekt anzusetzen! Die berechneten Volumina müssen daher vorm Ansetzen der Lösungen von der Betreuerin genehmigt sein.

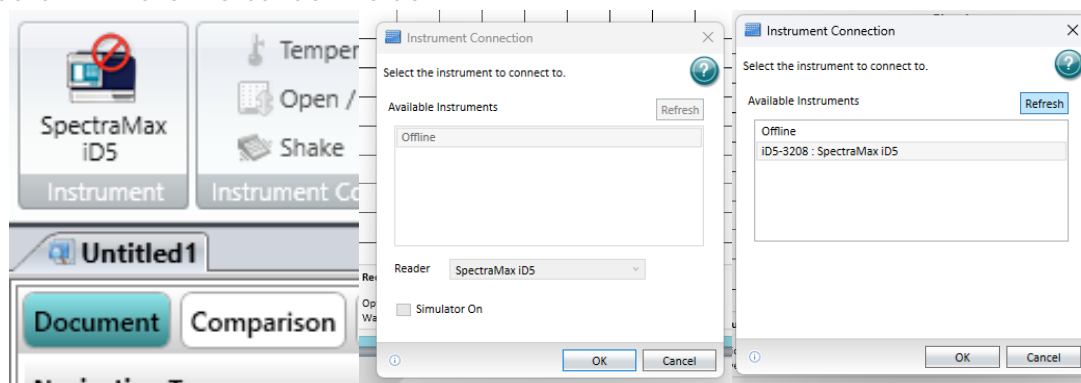
Probe	c(soll) in μM	V(soll) in μl	V(vorheriger Verdünnung) in μl	V(Puffer) in μl
1	5	2400		
2	4,5	2200		
3	4	2000		
4	3,5	1800		
5	3	1600		
6	2,5	1400		
7	2	1200		
8	1,5	1000		
9	1	900		
10	0,7	700		
11	0,4	500		
12	0,1	400		

2.3 Messung der Kalibriergerade

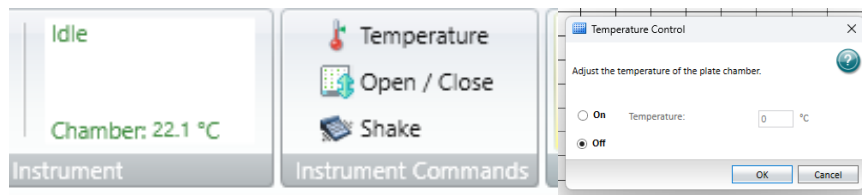
Im Anschluss können die Kalibrierlösungen mit dem *SpectraMax iD5* von Molecular Devices vermessen werden. Das Anregungsmaximum von GFP liegt bei 488 nm und das Emissionsmaximum bei 507 nm. Das Gerät kann mit diesen Wellenlängen jedoch nicht messen. Wieso? Schaut euch die Fehlermeldung an und probiert ähnliche Wellenlängen aus. Durch Testen unterschiedlicher Wellenlängenkombinationen soll ein Optimum bestimmt werden. Die gemessene Intensität sollte dabei möglichst hoch sein.

Es soll wie folgt vorgegangen werden:

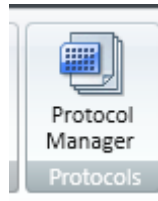
1. Je 100 μl der angesetzten Proben sollen in eine 96-Well Plate geben werden. Für eine spätere Hintergrundkorrektur sind außerdem eine Wasser-Probe und eine Puffer-Probe als Blank nötig. Es sollen immer Duplikate angesetzt werden. Es ist ratsam, vor dem Pipettieren ein Schema zu erstellen, wie die Proben in die Platte gegeben werden.
2. Gerät anschalten und warten, bis kein orangener Balken mehr am oberen Bildschirmrand zu sehen ist. Erst dann ist das Gerät einsatzbereit.
3. Programm *SoftMax Pro 7.4* am PC öffnen.
4. Links oben überprüfen, ob das Gerät verbunden ist. Falls nicht, muss das Gerät manuell durch Anklicken verbunden werden.



5. Platte in das Gerät geben und Messtemperatur einstellen: 30 °C



6. Messprotokoll (Protocol Manager → IBG4 → Fluoreszenz) wählen und speichern unter DATA E: → SpectraMax → Praktikum → WSXX (Titel: Datum und Gruppe).

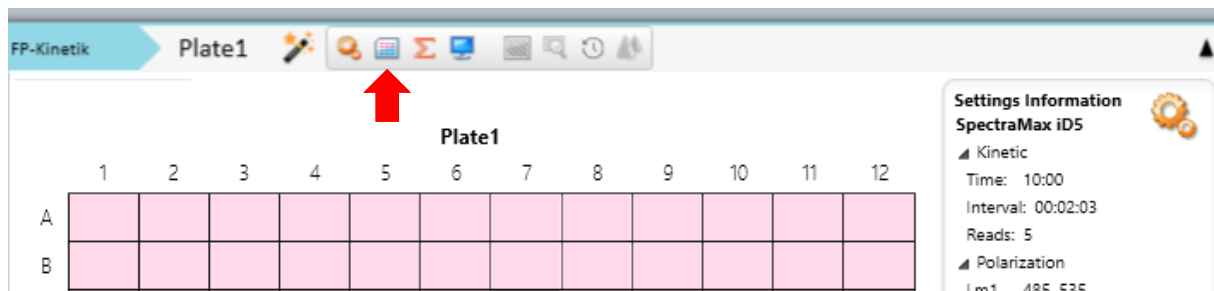


7. Experiment in Info-Note beschreiben: Titel, Datum, Gruppe, Konzentrationsbereich der Kalibriergerade, Pipettierschema der Wells, Temperatur, Probenvolumen
8. Die Platte in *FI Experiment* anwählen und die Platte in dem Experiment entsprechend umbenennen (unter *Navigation Tree*), hier wird die Kalibriergerade gemessen.

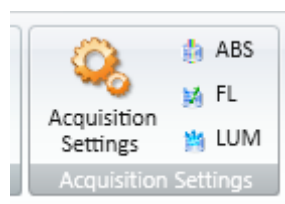
Hinweis 1: In den exportierten Daten wird später nur der Name der Platte zu sehen sein. Die Platte muss so benannt sein, dass eine klare Zuordnung zum Experiment möglich ist (z.B.: Kalibriergerade_XXnm_YYnm).

Hinweis 2: Pro Experiment immer nur eine Platte! Für einen neuen Versuch daher ein neues Experiment anlegen. Bei mehreren Platten in einem Experiment gibt es Probleme beim Exportieren.

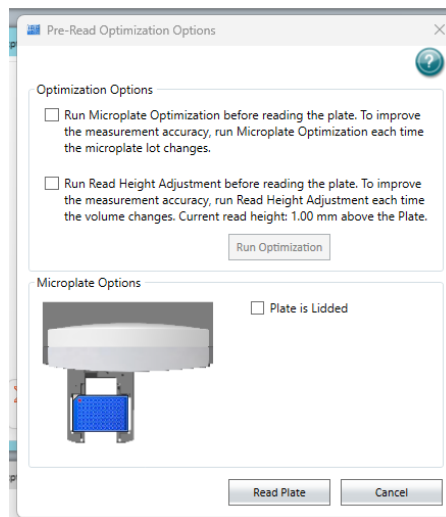
Hinweis 3: Um die Daten später exportieren zu können, müssen die gemessenen Felder rosa hinterlegt sein. Sollte dies nicht der Fall sein: *Template Editor* öffnen → entsprechende Wells anklicken → unter *Custom Sample* anwählen, dabei darauf achten, dass 01 gewählt ist → mit *Assign* bestätigen.



9. Experimentparameter unter *Acquisition Settings* anpassen.



- a. Es soll eine *Endpoint* Fluoreszenzmessung durchgeführt werden.
 - b. Wellenlänge eintragen. Zunächst mit den angegebenen Wellenlängen testen (Fehlermeldung wird durch schweben über dem Problem angezeigt). Dann drei Kombinationen ohne Meldung testen.
 - c. Die Platte soll nach *Well* vermessen werden (*More Settings*).
 - d. Unter *Plate Type* die Platte „96 Well Corning Half Area flat clrbtm [sfGFP_100µl]“ wählen.
 - e. Unter *Read Area* den Bereich der Proben wählen.
 - f. Unter *PMT and Optics* den *PMT Gain* auf *automatic* stellen und eine *Integration Time* von 200 ms eintragen. Die *Read Height* bleibt zunächst bei 1 mm, soll vor der ersten Messung jedoch optimiert werden (siehe Punkt 11).
 - g. Die Platte soll vor der Messung für 5 s geschüttelt werden.
 - h. Durch OK die Einstellungen bestätigen. Die Einstellungen werden am rechten Rand angezeigt und sollen nochmal überprüft werden.
10. Messung der Kalibriergerade mit dem grünen Play-Symbol starten.
11. Das Gerät schlägt zunächst mögliche Optimierungen vor, hier soll die Optimierung der *Read Height* ausgewählt und durch Klicken auf *Run Optimization* gestartet werden. Es müssen den Anweisungen des Gerätes gefolgt werden (Kein Blank-Well wählen!). Die optimierte *Read Height* soll für alle weiteren Messungen übernommen werden.



12. Nach erfolgreicher Optimierung kann die Messung gestartet werden (neue Höhe wird automatisch verwendet).
13. Programm speichern.

2.4 Messung des selbst exprimierten GFP

Nach 2 h Inkubation können die CF-Proben vom Schüttler genommen und ebenfalls gemessen werden. Dafür muss die 96-Well Plate zunächst aus dem Gerät geholt und mit 100 µl der Proben befüllt werden. Dann wird wie in Kapitel 2.3 beschrieben gemessen. Es soll nur mit dem zuvor bestimmten Optimum der Wellenlängen gemessen werden.

2.5 Daten exportieren

1. Daten speichern.
2. Auf das Plate-Symbol am linken oberen Rand klicken.
3. Export.
4. Export to XML XLS TXT.

5. Informationen und alle Tabellen (*Sample*) auswählen. Die Platte soll nicht exportiert werden! Die restlichen Einstellungen beibehalten und mit OK bestätigen.

3 Auswertung

3.1 Optimierung der Wellenlänge

1. Die Daten werden in Excel/Origin importiert.
Achtung: Das Komma wird meist nicht korrekt übernommen, vergleicht die Werte der TXT-Datei mit den importierten Werten!
2. Eine Probe aussuchen und anhand dieser die Auswirkung der unterschiedlichen Wellenlängen erläutern. Dafür zunächst den Mittelwert des Blanks (Puffer) bilden. Anschließend den Blank von den Proben abziehen und den Mittelwert bilden. Dies soll für alle getesteten Wellenlängen gemacht werden (jeweils den Blank der entsprechenden Messung nehmen!).
3. Standardabweichung der Proben berechnen.
4. Die erhaltenen Intensitäten sollen dann graphisch dargestellt werden (Balkendiagramm).
5. Ergebnisse erläutern. Warum kann das GFP-Optimum nicht verwendet werden? Wieso sind manche Wellenlängenkombinationen besser als andere?

3.2 Kalibriergerade

1. Die Daten (nur Ergebnisse mit optimierten Wellenlängen) werden in Excel/Origin importiert.
Achtung: Das Komma wird meist nicht korrekt übernommen, vergleicht die Werte der TXT-Datei mit den importierten Werten!
2. Zunächst soll der Mittelwert des Blanks (Puffer) gebildet werden.
3. Den Blank anschließend von den Proben der Kalibriergerade abziehen und den Mittelwert der Duplikate bilden.
4. Standardabweichung der Proben-Duplikate bilden.
5. Kalibriergerade mit Fehler graphisch auftragen (Intensität gegen Konzentration) und einen linearen Fit anwenden. Geradengleichung des linearen Fit in Graph anzeigen lassen.

3.3 Konzentration des exprimierten GFP berechnen

1. Die Daten (nur Ergebnisse mit optimierten Wellenlängen) werden in Excel/Origin importiert.
Achtung: Das Komma wird meist nicht korrekt übernommen, vergleicht die Werte der TXT-Datei mit den importierten Werten!
2. Den Blank von den Proben abziehen.
3. Die Konzentration der Proben aller Gruppenmitglieder berechnen.
4. Der Mittelwert der Intensitäten der Proben und dessen Standardabweichung berechnen. Aus dem Mittelwert dann erneut die Konzentration (+ Fehler) berechnen.
5. Falls die Konzentrationen des GFPs der einzelnen Gruppenmitglieder stark voneinander abweichen, muss dies erklärt werden!

3.4 Allgemein

- Die Ergebnisse aller drei Abschnitte müssen erläutert und diskutiert werden.
- Zusätzlich zur Fehlerrechnung sollen weitere Fehlerquellen kurz erläutert werden.

4 Themen fürs Kolloquium

Der Theorie-Teil dieses Skripts erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit, weshalb auch externe Quellen zur Vorbereitung verwendet werden sollten. Folgende Themen können Bestandteil des Kolloquiums sein:

- Aufbau eines Absorptions- bzw. Fluoreszenzspektrometers
- Lambert-Beer'sches Gesetz
- Jabłoński-Termschema
- Kasha-Regel
- Franck-Condon Prinzip
- Stokes-Verschiebung
- *Inner filter* -Effekt
- Fluoreszenzquantenausbeute
- Fluoreszenzlöschung
- Temperaturabhängigkeit der statischen / dynamischen Fluoreszenzlöschung
- Zellfreie Expression

5 Quellen

Kurreck J., Engels J. W. & Lottspeich F. (2022). Bioanalytik. Berlin: Springer Spektrum.

Hinderer F., . (2020). UV/Vis-Absorptions- und Fluoreszenz-Spektroskopie. Wiesbaden: Springer Fachmedien Wiesbaden.

Ritgen U., Oligschleger C. & Springer-Verlag GmbH. (2020). Analytische Chemie II. Berlin: Springer Spektrum.

Berg J. M., Tymoczko J. L., Gatto G. J. & Stryer L. (2018). Stryer Biochemie. Berlin: Springer Spektrum.

C. Moser, C. Muhle-Goll, Protein expression and purification 2024, 215, 106407.

D. Schwarz, F. Junge, F. Durst, N. Frölich, B. Schneider, S. Reckel, S. Sobhanifar, V. Dötsch, F. Bernhard, Nature protocols 2007, 2, 2945.

B. J. L. Dopp, D. D. Tamiev, N. F. Reuel, Biotechnology advances 2019, 37, 246.

A. Pedersen, K. Hellberg, J. Enberg, B. G. Karlsson, New biotechnology 2011, 28, 218.

F. Junge, S. Haberstock, C. Roos, S. Stefer, D. Proverbio, V. Dötsch, F. Bernhard, New biotechnology 2011, 28, 262.

C. Klammt, D. Schwarz, F. Löhr, B. Schneider, V. Dötsch, F. Bernhard, The FEBS journal 2006, 273, 4141.

S. K. Dondapati, M. Stech, A. Zemella, S. Kubick, BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy 2020, 34, 327