



## Versuch 04 – Fluoreszenzspektroskopie

V. Vogel, D. Schubert und V. Franz

Stand 17.11.2020

### 1 Einführung

Die Fluoreszenzspektroskopie ist eine der aktuellsten und vielseitigsten spektroskopischen Untersuchungsmethoden in der Biophysik. Sie unterscheidet sich von den meisten anderen spektroskopischen Methoden dadurch, dass die Emission und nicht die Absorption von Strahlung gemessen wird. Die Vorgänge, die auf atomarer Ebene zu Emission von Strahlung führen, finden auf der Zeitskala in einem langsameren Bereich statt als die Absorption: der Übergang vom Grundzustand eines Systems in einen angeregten Zustand durch Absorption dauert ca.  $10^{-15}$  s; der Zeitbedarf für die Wiederaussendung eines Lichtquants – die „Fluoreszenz“ – beträgt etwa  $10^{-8}$  s. In diesem größeren Zeitintervall finden vielfältige Wechselwirkungen mit der Umgebung statt. Gerade diese Wechselwirkungen und ihr Einfluss auf die Fluoreszenz können Eigenschaften von biologischen Systemen offenbaren, die man bei Messung der Lichtabsorption nicht sieht.

Untersucht wird durch Fluoreszenzspektroskopie einerseits die Eigen-Fluoreszenz von biologischen Makromolekülen (intrinsische Fluoreszenz), andererseits die Fluoreszenz von künstlichen fluoreszierenden Gruppen (Fluorophoren), die an das biologische System angeheftet wurden (extrinsische Fluoreszenz). Vor allem auf der Nutzung von künstlichen Fluorophoren als „Marker“ in biologischen Systemen und der Möglichkeit, mittels gezielter Synthese quasi auf bestimmte Problemstellungen „maßgeschneiderte“ Marker herstellen zu können, beruht die Vielseitigkeit der Anwendungen der Fluoreszenzspektroskopie in der Biophysik. Für einen

Überblick über Grundlagen und Anwendungsmöglichkeiten dieser Technik sei auf die Vorlesung „Biophysik I: Experimentelle Methoden der Molekularbiophysik“ verwiesen. Der Vorlesungsstoff wird im Folgenden vorausgesetzt. Das Standardwerk über Fluoreszenzspektroskopie (zum Nachschlagen) ist [1].

Als Auswahl aus dem Spektrum verschiedener Anwendungsmöglichkeiten der Fluoreszenzspektroskopie auf biologische Systeme sollen Sie in diesem Praktikumsversuch drei Anwendungen der Technik auf das häufigste Protein des menschlichen Blutserums, Serumalbumin (HSA), kennenlernen. Das erste Anwendungsbeispiel beschäftigt sich mit der Analyse der Zugänglichkeit des Bausteins Tryptophan im HSA durch Fluoreszenzlöschung. Das zweite und dritte Beispiel betreffen den Nachweis der Bindung von kleinen Molekülen (Liganden) an HSA: von Flavonol durch Resonanz-Energieübertragung und von 8-Anilino-1-naphtalensulfonat (ANS) durch die Änderung der Quantenausbeute des Liganden beim Binden.

## 2 Grundlagen

### 2.1 *Eigenschaften von Serumalbumin*

Humanes Serumalbumin ist ein globuläres Protein aus 548 Aminosäuren; seine Molmasse beträgt ca. 60 000 g/mol. Seine wichtigste Funktion ist der Transport einer Vielzahl von kleinen, in wässriger Lösung schwerlöslichen Molekülen (Lipide, Steroidhormone etc.) im Blut bzw. zwischen Synthese- und Zielorgan. Zu diesem Zweck besitzt das Protein mehr oder weniger spezifische Bindungsstellen für diese Moleküle. Die Bindung der Moleküle erfolgt reversibel (beschrieben durch das Massenwirkungsgesetz); die Stärke der Bindung wird dabei durch die Assoziationskonstante beschrieben.

HSA ist ein Drei-Domänen-Protein; die Hauptbindungsstellen befinden sich in den Domänen II und III. In ersterer befindet sich auch der einzige Tryptophan-(Trp-) Rest des Proteins – also diejenige Aminosäure, die die intrinsische Fluoreszenz des Proteins bestimmt.

## 2.2 Fluoreszenzlöschung/„Quenching“ durch Stoß (Collisional Quenching)

### 2.2.1 Vorbemerkung

Ein angeregtes fluoreszierendes Molekül kann seine Anregungsenergie ohne Mithilfe anderer Moleküle abgeben – entweder durch Emission eines Lichtquants (Fluoreszenz) oder durch strahlungslose Übergänge. Die Energie kann aber auch auf andere Moleküle übertragen und damit die Fluoreszenz des zuerst angeregten Moleküls gelöscht („gequencht“) werden. In diesem Praktikumsversuch werden zwei solcher Energieübertragungen demonstriert und Anwendungen zur Beantwortung biochemischer Fragen gezeigt: Energieübertragung durch Stoß und die sog. „Resonanz-Energieübertragung“, bei der die Anregungsenergie durch sog. Resonanz-Wechselwirkungen ohne Stoß auf ein benachbartes Molekül übertragen wird (Abschnitt 2.3). In beiden Fällen liegen bimolekulare Prozesse vor. Wechselwirkungen zwischen dem fluoreszierenden Molekül und „der Umgebung“, z.B. dem Lösungsmittel, werden in 2.4 behandelt.

### 2.2.2 „Static“ und „dynamic“ (collisional) Quenching

Der Zusammenstoß eines fluoreszierenden Moleküls mit einem zweiten Molekül kann zu einem stabilen Komplex führen. Eine dabei ggf. auftretende Fluoreszenzlöschung bezeichnet man als statisch „static“. Fluoreszenzlöschung durch Stoß ohne Komplexbildung bezeichnet man als „dynamic quenching“. Im Experiment lassen sich beide durch ihren unterschiedlichen Einfluss auf die Lebensdauer des angeregten Zustands oder durch den Einfluss der Viskosität auf den Grad der Fluoreszenz-Löschung unterscheiden [1].

Dem hier untersuchten Collisional Quenching liegen Stoßprozesse zwischen dem fluoreszierenden Molekül oder – bei großen Molekülen – der fluoreszierenden Gruppe im Molekül und einem kleinen nicht fluoreszierenden Molekül/Atom/Ion zugrunde. Damit der Stoß zur Fluoreszenz-Löschung führt, muss er während der Lebensdauer des angeregten Zustandes (ca. 10 ns) erfolgen. Zur Fluoreszenz Löschung können also nur „Quencher“-Moleküle/Atome/Ionen beitragen, die zum Zeitpunkt der Anregung nicht weiter als die mittlere Diffusionsstrecke des Quenchers in ca. 10 ns vom Fluorophor entfernt sind. Damit ist neben der Quencher-Konzentration auch der Diffusions-Koeffizient des Quenchers für den Grad der Fluoreszenz-Löschung

wichtig. Weiter muss der Quenching-Grad wesentlich von Diffusionsbarrieren für den Quencher beeinflusst werden (s.u.). Untersuchungen zum Quenching können also Aussagen über solche Barrieren liefern – das ist ihre wichtigste Anwendung.

### 2.2.3 Die Stern-Volmer-Gleichung

Die Herabsetzung der Fluoreszenz-Intensität von  $F_0$  (ohne Quencher) auf  $F$  durch Collisional Quenching wird durch die Stern-Volmer-Gleichung beschrieben:

$$F_0/F = 1 + K_D [Q] \quad (1)$$

( $K_D$ : Stern-Volmer-Konstante (diese kann auch als Produkt aus der „bimolekularen Quenching-Konstante“  $K_q$  und der Lebensdauer  $t_0$  des ungestörten Systems dargestellt werden);  $[Q]$ : Quencher-Konzentration). Ein starker „Quencher“ wird also durch ein großes  $K_D$  charakterisiert. In vielen Fällen ist  $K_D$  eine Konstante, was nach Gl. (1) zu einer linearen Abhängigkeit von  $F_0/F$  von  $[Q]$  führt. In solchen Fällen liegt eine einzige Klasse von Fluorophoren vor, deren Moleküle alle gleichermaßen zugänglich für den Quencher sind. Sind mindestens zwei Klassen von Fluorophoren vorhanden, von denen bei einer der Fluorophor vor Stößen mit den Quencher teilweise abgeschirmt ist, ergeben sich nichtlineare, nach unten gekrümmte Stern-Volmer-Plots.

Ein besonders effektives Quencher-Molekül, und zwar für fast alle bekannten Fluorophore, ist  $O_2$ . Auch das Iodid-Anion  $I^-$  ist ein guter Quencher, wenn auch nicht für Fluorophore, die negativ geladen sind oder von negativen Ladungen umgeben sind.

Auch statisches Quenchen führt im Allgemeinen zu einem linearen Stern-Volmer-Plot [1]. Die Identifikation des Quenching-Typs muss also über andere Kriterien erfolgen (s.o.).

### 2.2.4 Eine biochemische Anwendung des Collisional Quenching: Zugänglichkeit der Trp-Seitenkette in HSA für I<sup>-</sup>

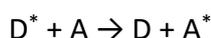
Biochemische Untersuchungen zum Collisional Quenching haben meist das Ziel, die Zugänglichkeit bestimmter fluoreszierender Molekülteile für den Quencher zu bestimmen. Da die fluoreszierende Gruppe in Proteinen meist die Seitenkette von Trp ist, dienen Quenching-Untersuchungen meist der Lokalisierung der Trp-Seitenketten bzgl. der Proteinoberfläche: leichte Löschbarkeit der Trp-Fluoreszenz durch polare Quencher zeigt eine Lokalisierung des/der Trp in der Proteinoberfläche an, schwere dagegen eine Lokalisierung im unpolaren Proteininneren. Konformationsänderungen im Protein können die Zugänglichkeit des/der Trp für den Quencher ändern und so zum Nachweis solcher Änderungen dienen. Ein besonders nützlicher Quencher der Trp-Fluoreszenz ist das Iodid-Anion I<sup>-</sup>.

In diesem Praktikumsversuch wird Quenchen durch I<sup>-</sup> zur Lokalisierung der einzigen Trp-Seitenkette im HSA benutzt. Verglichen werden „natives“ HSA bei pH 7, durch sauren pH in seiner Konformation geändertes HSA sowie die freie Aminosäure Trp. Stern-Volmer-Auftragungen sollen die Unterschiede und Gemeinsamkeiten aufzeigen.

## 2.3 Fluoreszenzenergie-Übertragung (noncollisional energy transfer, ET)

### 2.3.1 Allgemeines

ET ist eine spezielle Art von Quenching: Die Anregung eines Fluorophors („Donor“ D) führt nicht zur Fluoreszenz-Emission des angeregten Moleküls; sie endet aber auch nicht in einem strahlungslosen Übergang, sondern wird auf ein zweites Molekül („Akzeptor“ A) übertragen. Der Donor geht dabei in den Grundzustand über, der Akzeptor wird angeregt:



Die Energieübertragung erfolgt dabei ohne Stoß, aber auch ohne den Austausch eines Photons, durch sog. Resonanz-Wechselwirkungen (spezielle Dipol-Dipol-Wechselwirkungen). Nach der Energieübertragung kann  $A^*$  strahlungslos oder durch Fluoreszenz in den Grundzustand übergehen; in letzterem Fall wird die charakteristische Fluoreszenzstrahlung von A ausgestrahlt.

Die Wahrscheinlichkeit für ET und damit – im Fall eines Photonen-emittierenden Akzeptors – die Fluoreszenzintensität hängt von mehreren Faktoren ab: (1) dem Grad der Überlappung des Emissionsspektrums des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors, (2) der relativen Orientierung der Übergangsmomente von Donor und Akzeptor und (3) dem Abstand  $r$  zwischen den Molekülen, bei dem der ET erfolgt.  $r$  geht dabei in der 6. Potenz ein:

$$E = \frac{R_o^6}{R_o^6 + r^6}$$

(E: Wirksamkeit des ET (d.h. der Bruchteil der von D absorbierten Photonen, der auf A übertragen wird);  $R_o$ : „Förster-Abstand“) [1].

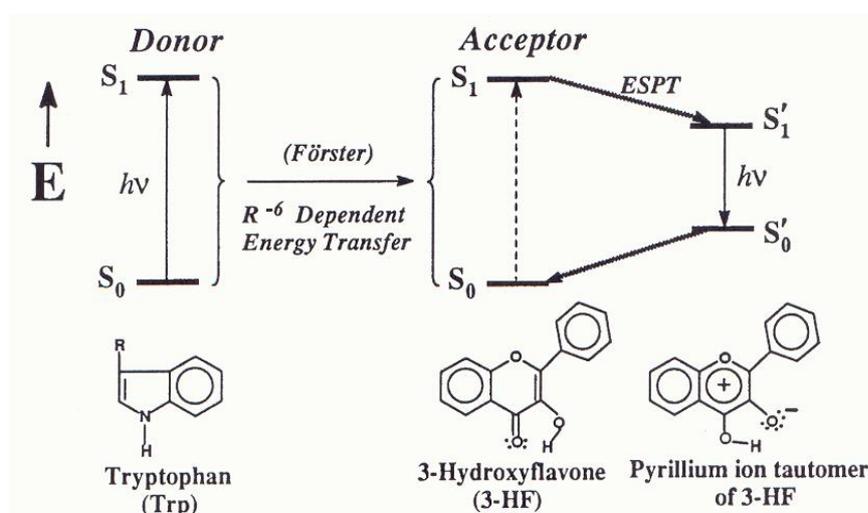
Untersuchungen zum ET haben zwei Hauptzielrichtungen, eine quantitative und eine qualitative: (i) die Abstandsmessung zwischen A und D sowie (ii) die Demonstration von Komplexbildungen zwischen Molekülen, durch die ET ermöglicht wird. Die vorkommenden  $R_o$ -Werte beschränken den bei (i) zugänglichen  $r$ -Bereich für Abstände A-D auf ca. 15-100 Å. In diesem

Bereich muss auch der A-D-Abstand im Komplex liegen, was aber sowohl für Makromolekül-Ligand- als auch für Makromolekül-Makromolekül-Komplexe meist erfüllt ist bzw. erfüllt werden kann.

### 2.3.2 Eine biochemische Anwendung des ET: Bindung von 3-Hydroxyflavon an Serumalbumin [2]

Wie in Abschnitt 2.1 beschrieben, besitzt HSA Bindungsstellen für eine Vielzahl von unterschiedlichen Molekülen. Dazu gehören auch Flavonol und dessen Derivate, die als Fluoreszenzsonden bei der Untersuchung der Cancerogenese benutzt werden können und denen HSA als „Träger“ beim Transport zum Einsatzort dienen kann. In unserem Praktikumsversuch dient ET zwischen dem Trp des HSA und 3-Hydroxyflavon (3-HF) (s. Abb. 1) als Nachweis der Komplexbildung zwischen beiden Molekülen [2].

Das HSA-Trp und 3-HF stellen allerdings kein „einfaches“ Donor-Akzeptor-Paar dar: Wie in Abb. 1 gezeigt, wird die Fluoreszenzenergie vom Trp zunächst auf einen Zustand  $S_1$  des 3-HF übertragen, der nur einen Zwischenzustand zum fluoreszierenden Zustand  $S_1'$  darstellt. Die Weiterleitung der Energie zu letzterem erfolgt durch intramolekularen Protonen-Transfer. Ein Teil der vom Donor abgegebenen Energie geht allerdings auf diesem Wege strahlungslos verloren, was zu einer Erniedrigung der Quantenenergie der Fluoreszenz von A führt.



Figur 1 – Kopplung zwischen Energietransfer (von Förster-Typ) und intramolekularem Protonentransfer (mit nachfolgender Lichtemission im Sichtbaren) im Systems HSA/3-HF [2]

## 2.4 *Änderungen der Fluoreszenzspektren und der Quantenausbeute bei Änderungen der Polarität in der Umgebung des Fluorophors*

Das Emissionsspektrum vieler Fluorophore hängt stark von der Polarität ihrer Umgebung ab. Ein Wechsel des Lösungsmittels führt damit in vielen Fällen zu Spektren, die hinsichtlich ihres Emissionsmaximums und ihrer Intensität verändert sind. Analoges gilt für eine Bindung des Fluorophors an eine Struktur mit anderer Polarität (an der Bindungsstelle) als das Lösungsmittel. Meist führt eine Erniedrigung der Polarität der Umgebung zu einer Verschiebung des Maximums des Emissionsspektrums,  $\lambda_{\max}$ , zu kürzeren Wellenlängen („blue shift“). Häufig ist dies gekoppelt mit Erhöhungen der Quantenausbeute  $q$  der Fluoreszenz. Mit manchen Fluorophoren kann letzterer Effekt extrem stark sein.

Die polaritätsabhängigen Änderungen im Emissionsspektrum und in der Quantenausbeute des Fluorophors haben sehr komplexe Ursachen [1]. Man kann grob zwei Arten von Ursachen unterscheiden: (1) Wechselwirkungen des elektrischen Dipolmoments des Fluorophors mit von ihm induzierten Dipolmomenten in den benachbarten Lösungsmittelmolekülen und (2) spezifische chemische Wechselwirkungen bzw. Komplexbildungen zwischen dem Fluorophor und ein oder zwei Molekülen des Lösungsmittels oder einem Makromolekül/einem supramolekularen Aggregat. Die erstere Art von Effekten lässt sich unter Benutzung makroskopischer Größen, wie Brechungsindex oder Dielektrizitätskonstante, beschreiben. Die zweite erfordert die Betrachtung spezifischer Bindungen; meist hat sie weitaus größere Auswirkungen als die erste. Für Anwendungen in Biochemie/Biophysik ist sie die wichtigere, obgleich die genaue theoretische Basis oft unklar bleibt [1].

Das bekannteste Beispiel eines Fluorophors mit extremer Empfindlichkeit der Fluoreszenzeigenschaften gegenüber der Polarität der Umgebung ist 1-Anilino-8-naphtalensulfonat (ANS). Für diese Substanz beträgt  $q$  in Wasser 0,004, dagegen in Octanol 0,63.  $\lambda_{\max}$  verschiebt sich dabei von 515 nm zu 462 nm. Noch drastischer ist die Auswirkung der Bindung von ANS an HSA (in wässriger Lösung):  $q$  wird 0,98 und  $\lambda_{\max}$  454 nm. Fluoreszenzspektroskopie erlaubt – unter Ausnutzung dieser Effekte – auf einfache Weise Untersuchungen über den Bindungsprozess (s.u.).

## 3 Versuchsdurchführung und Ergebnisauswertung

### 3.1 Vorbemerkung: Benutzte Spektrometer

Um eine vernünftige Planung der Versuche zur Fluoreszenzspektroskopie durchführen zu können (Auswahl der Anregungswellenlängen und der Konzentrationen der verwendeten Substanzen), müssen die Absorptionsspektren der Lösungen im Wellenlängenbereich 250-400 nm bekannt sein. Zu ihrer Messung wird ein Hitachi U-2000-Spektralphotometer in Verbindung mit reduzierten Quarzküvetten ( $d = 1 \text{ cm}$ ) verwendet.

Das benutzte Fluoreszenzspektrometer ist das Gerät LS 50 der Fa. Perkin-Elmer. Hier werden Standard-Quarzküvetten ( $d = 1 \text{ cm}$ ) verwendet.

Der/die BetreuerIn wird Sie in das Arbeiten mit beiden Geräten einführen.

### 3.2 Chemikalien

Folgende Stammlösungen stehen bereit:

- 10 mM NaPi-Puffer pH 7,0
- HSA in 10 mM NaPi-Puffer pH 7,0
- HSA in dH<sub>2</sub>O pH 7,0
- L-Trp in 10 mM NaPi-Puffer pH 7,0
- L-Trp in dH<sub>2</sub>O pH 7,0
- 5 M KI in dH<sub>2</sub>O pH 7,0
- 5 M NaCl in dH<sub>2</sub>O pH 7,0
- Vollentsalztes Wasser (dH<sub>2</sub>O) pH 7,0

Weitere Stammlösungen, die besonderer Beachtung bedürfen:

- 100 mM HCl in dH<sub>2</sub>O **pH 1,0**
- 1 mM NaOH in dH<sub>2</sub>O **pH 11,0**



### 3.3 Absorptionsspektren

- I. Messen Sie die Absorptionsspektren der vier Proben unverdünnt zwischen 250 und 400 nm gegen das jeweilige Lösungsmittel.
- II. Fotografieren Sie die aufgenommenen Spektren und fügen Sie die Aufnahmen Ihrem Protokoll bei oder drucken Sie sie mittels des eingebauten Druckers des Spektrometers aus und scannen Sie die Drucke ein, um sie dem Protokoll hinzuzufügen. Vergleichen Sie Ihre Spektren mit der Literatur und diskutieren Sie eventuelle Fehlerquellen.
- III. Berechnen Sie die Konzentrationen des Tryptophans sowie des Humanen Serumalbumins mittels der Absorption bei 278 bzw. 280 nm. Die Extinktionsfaktoren des L-Tryptophans und des Humanem Serumalbumin bei diesen Wellenlängen liegen bei  $\epsilon_{Trp,278} = 5,579 \cdot 10^3 \text{ (cmM)}^{-1}$  bzw. bei  $\epsilon_{HSA,280} = 3,5 \cdot 10^4 \text{ (cmM)}^{-1}$ .  
→ Geben Sie die berechneten Konzentrationen sowohl in  $\mu\text{M}$  als auch in  $\text{mg/ml}$  an!

Bei Fragen zur Bedienung des Hitachi-Spektrometers wenden Sie sich an Ihre(n) BetreuerIn.

### 3.4 Emissionsspektren

- I. Messen Sie die Emissionsspektren des Tryptophans bei pH 10, bei pH 7 sowie bei pH 2 und des Humanen Serumalbumins bei pH 7 sowie bei pH 3. Verdünnen Sie die HSA-Stammlösungen dabei jeweils 20-fach und die Tryptophan-Stammlösungen jeweils 10-fach! Regen Sie Tryptophan bei 280 nm und HSA bei 290 nm an; Laden Sie dazu die entsprechende Methode der zur Aufnahme verwendeten Software. Ihr(e) BetreuerIn wird sie hierin einweisen.
- II. Speichern Sie die aufgenommenen Emissionsspektren und fügen Sie diese in Ihr Protokoll ein. Vergleichen Sie Ihre Spektren mit der Literatur und diskutieren Sie eventuelle Fehlerquellen.

Bei Fragen zur Bedienung des Fluoreszenzspektrometers wenden Sie sich an Ihre(n) BetreuerIn.

### 3.5 Quenching der Emission von HSA und von Trp durch Iodid

#### 3.5.1 Tryptophan

Messen Sie die Emissionsspektren des L-Tryptophans bei pH 7 (Messreihe **A**) und unterschiedlichen Konzentrationen des Quenchers Kaliumiodid (s.u.). Verwenden Sie hierfür die Tryptophan-Puffer-Stammlösung! Regen Sie die Fluoreszenz des Tryptophans bei 280 nm an.

#### 3.5.2 Humanes Serumalbumin

Messen Sie die Emissionsspektren des Humanen Serumalbumins bei pH 7 (Messreihe **B**) sowie bei pH 3 (Messreihe **C**) bei unterschiedlichen Konzentrationen des Quenchers Kaliumiodid (s.u.). Verwenden sie für Messreihe **B** die HSA-Puffer- sowie für Messreihe **C** die HSA-dH<sub>2</sub>O-Stammlösung! Regen Sie die Fluoreszenz des HSA bei 290 nm an.

#### 3.5.3 Zusätzliche Informationen

Verwenden Sie die folgenden Quencher-Konzentrationen  $c_{KI}$  für die obigen drei Messreihen:

Messreihe	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>
$c_{KI,1}$ [mM]	0	0	0
$c_{KI,2}$ [mM]	62,5	250	250
$c_{KI,3}$ [mM]	125	500	500
$c_{KI,4}$ [mM]	250	1000	1000

Tipp: Fertigen Sie sich Pipettierschemata an, in die Sie die nötigen Volumina der jeweiligen Stammlösung für jede der Proben eintragen. Lassen Sie Ihre(n) BetreuerIn vor der Herstellung der Proben über Ihre Schemata blicken, um Folgefehler zu vermeiden.

Beachten Sie bei den obigen drei Messreihen folgendes:

- Die Volumina aller Proben sollen jeweils 2 ml betragen.
- Die Ionenstärke sollte in allen Proben gleich sein. Stellen Sie daher die Summe der Konzentrationen von KI und NaCl in den Proben auf 1 M ein.

- Stellen Sie – wenn nötig - die pH-Werte der Messlösungen mittels der gegebenen Salzsäure oder Natronlauge ein. Beachten sie dabei folgendes:  $pK_{a,HCl} \approx -6$  sowie  $pK_{B,NaOH} \approx -0,56$ .

### 3.6 Anmerkungen zum Versuchsabschluss

- I. Reinigen Sie die Küvetten mit destilliertem Wasser und stellen Sie sie aufrecht in die entsprechenden Behältnisse, sodass sie über Nacht trocknen können.
- II. Denken Sie daran, Ihre Daten auf einen mitgebrachten USB-Stick zu übertragen.
- III. Schließen Sie die verwendeten Programme ordnungsgemäß und fahren Sie den PC herunter. Die Spektrometer wird Ihr(e) *BetreuerIn* ausschalten.
- IV. Füllen Sie die Pipettenspitzen-Behälter auf. Achten Sie dabei darauf, *Handschuhe* zu tragen! Nach Versuchsende müssen die Behälter wieder *vollständig* befüllt sein.
- V. Hinterlassen Sie Ihren Arbeitsplatz sauber und ordentlich.

## 4 Fragen und Aufgaben für Ihr Protokoll

Diese Fragen und Aufgaben sind *zusätzlich* zu denjenigen zu beantworten bzw. zu erfüllen, die in Kapitel 3 bereits gestellt worden sind:

- 1) Warum mussten Sie die Ionenstärke in den Quencher-Proben konstant halten?
- 2) Berechnen Sie die Ionenstärke in Ihren Proben. Ignorieren Sie hierzu die Beiträge des Puffers bzw. der Salzsäure.
- 3) Welche Unterschiede können Sie zwischen den HSA-Emissionsspektren aus 3.4 bei pH 7 und pH 3 erkennen? Wie erklären Sie sich diese Unterschiede?
- 4) Welche Unterschiede können Sie zwischen den Emissionsspektren der Quencher-Messreihen aus **Error! Reference source not found.** bei pH 7 und 3.5.2 bei pH 3 erkennen? Wie erklären Sie sich diese Unterschiede?
- 5) Korrigieren Sie die in **Error! Reference source not found.** und 3.5.2 gemessene Intensitäten bezüglich der Verdünnung der Proben. Fertigen Sie für jede der drei

Messreihen einen Stern-Volmer-Plot an. Bestimmen Sie aus der Steigung der Geraden die jeweiligen Stern-Volmer-Konstanten. Vergleichen Sie die Ergebnisse mit denen aus Frage 4). Gibt es Zusammenhänge und/oder Widersprüche?

6) Übertragen Sie die in 3.5.3 angefertigten Pipettierschemata in Ihr Protokoll.

Hinweis: Diese Fragen und Aufgaben müssen nicht gesondert, sondern können gerne im Fließtext Ihres Protokolls beantwortet werden.

## 5 Bonusaufgabe

Vergleichen Sie die Emissionsspektren des L-Tryptophans bei den pH-Werten 11, 7 und 2. Welche Unterschiede oder Gemeinsamkeiten fallen Ihnen auf und wie lassen sich diese erklären?

## 6 Literatur

[1] Lakowicz, J.R. (1983) Principles of Fluorescence Spectroscopy. Plenum Press, New York.

[2] Sytnik, A. und Litvinyuk, J. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 12959-12963.

[3] Edsall, J.T. und Wyman, J. (1958) Biophysical Chemistry. Academic Press, New York.