

## Protokoll zum Versuch Spektroskopie im Rahmen des Laborpraktikums Biophysik

### Aufgabenstellung

1. Zubereitung von Fluorescein-Lösungen verschiedener Konzentrationen mittels einer gesättigten Vorratslösung; Messung des Absorptions-, Emissions- und Anregungsspektrums; Achten auf: Maximal messbare Absorption, Wiederabsorption von emittierter Strahlung, Wirkung der Spaltbreite.
2. Zubereiten von Fluorescein-Lösungen verschiedener pH-Werte (4-10), Messung der Absorptions- und Emissionsspektren.
3. Untersuchung der folgenden Probe
  - a. DNA markiert mit Rhodamin G
  - b. DNA markiert mit TAMRA
  - c. DNA, die sowohl mit RhG als auch TAMRA markiert istMessung des Emissions- und Anregungsspektrums von a, b und c und der Mischung aus a und b unter Beachtung der richtigen Wahl der Wellenlängen.

### Durchführung

Vom Betreuer erhielten wir eine gesättigte Fluorescein-Lösung, an deren Boden ein Satz aus Fluoresceinpulver erkennbar war. Wir pipettierten ca. 1,5 ml vom oberen der Lösung in ein Eppendorf-Gefäß, das uns als Quelle für alle Lösungen verschiedener Konzentrationen diente. Die Lösung enthielt außerdem einen Puffer, der den pH-Wert auf 7,4 stabilisierte. Den selben Puffer gaben wir auch in eine vierkantige Küvette, die in die beiden Untersuchungsgeräte passte: SPECORD S 100 zur schnellen Messung des Absorptionsverhaltens und Spectra CQ zur exakten Feststellung des Emissions- und Anregungsspektrums. Beide Messgeräte überdecken sowohl den gesamten optischen Wellenlängenbereich als auch einen Teil des UV-Spektrums. Da SPECORD S 100 immer die Differenz der Intensitäten vor und hinter der Probe ermittelt, mussten wir mit der ausschließlich mit Puffer gefüllten Küvette eine Referenzmessung durchführen, bevor wir mit der eigentlichen Untersuchung der Lösung beginnen konnten. So stellten wir sicher, dass der Einfluss von Küvette und Puffer sich herausmittelt und wir bei einer anschließenden Messung nur die Wirkung des Fluorescein sehen. Es zeigte sich, dass die Intensität der Lampen des SPECORD S 100 für verschiedene Wellenlängen auch nach einer Aufwärmzeit von einer Viertelstunde noch nicht sehr konstant war und sich das Messgerät nur für qualitative Messungen eignete.

Bei der Untersuchung des Absorptionsverhaltens beobachteten wir dicke, mit flachen, aber mit unregelmäßigem Rauschen überzogene Banden großer Absorption (siehe Diagramm 1, 1:1). Wir erfuhren vom Betreuer, dass erst Intensitätsdifferenzen unter 2,3 zuverlässig sind. Zur Abhilfe empfahl er Verdünnung.

Also verdünnten wir die Fluorescein-Lösung auf 1:2 und führten die Messung erneut durch. Die Maxima der Banden lagen jetzt ein wenig niedriger, doch veränderte sich die Gesamtstruktur kaum.

Die Messung des Emissionsspektrums führten wir bei einer konstanten Beleuchtungswellenlänge von 450 nm durch, die im Spectra CQ mittels eines Paares von Gittern eingestellt wurde. Dann durchlief im Gerät ein weiteres Paar von Gittern einen bestimmten Winkelintervall, um das gesamte Emissionsspektrum aufzunehmen. Der resultierende Graph enthielt ein Maximum bei 529 nm (siehe Diagramm 2).

Erst bei dem Vergleich mit einer erneuten Messung bei Verdünnung auf 1:4 zeigte sich im Emissionsspektrum eine Verschiebung des Maxima (auf 526 nm) und somit einen Fehler im Ergebnis der ersten Messung: Die Lösung ist so stark konzentriert, dass ein Großteil der Strahlung, die von Fluorescein-Molekülen nach der Anregung wieder abgegeben wird, von anderen Molekülen in der Nachbarschaft wieder absorbiert wird. Das bewirkt nicht nur eine Verringerung in der Anzahl der im Photomultiplier detektierten Photonen (flacherer Graph), sondern auch eine Verschiebung des Maximas der Kurve zu größeren Wellenlängen, bei denen das Mole-

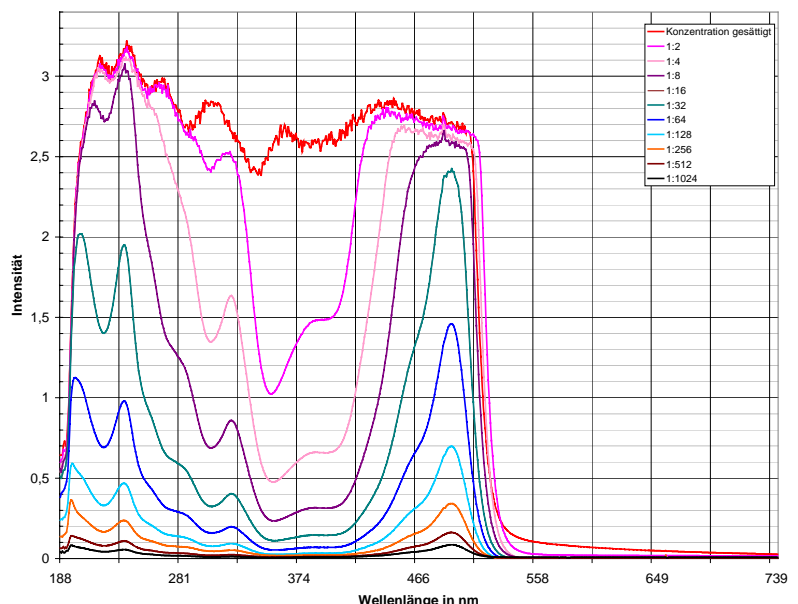


Diagramm 1: Absorptionsspektren für verschiedene Konzentrationen (gemessen am SPECORD S 100)

kül weniger wahrscheinlich Photonen absorbiert. Aus dem selben Grund ist an der Stelle der Beleuchtungswellenlänge kein Peak zu erkennen, obwohl zumindest ein wenig Streulicht zu erwarten wäre.

Also verdünnten wir weiter, um bessere Messergebnisse zu erhalten. Bei einer Verdünnung von 1:64 erhielten wir erstmals ein glaubwürdiges, also nicht von starkem Rauschen überlagertes Absorptionsspektrum. Die Position des Maximas im Emissionsspektrum veränderte sich allerdings erst bei der Verdünnung 1:512 vernachlässigbar wenig. Bei dieser Verdünnung ist auch das Absorptionsspektrum noch befriedigend.

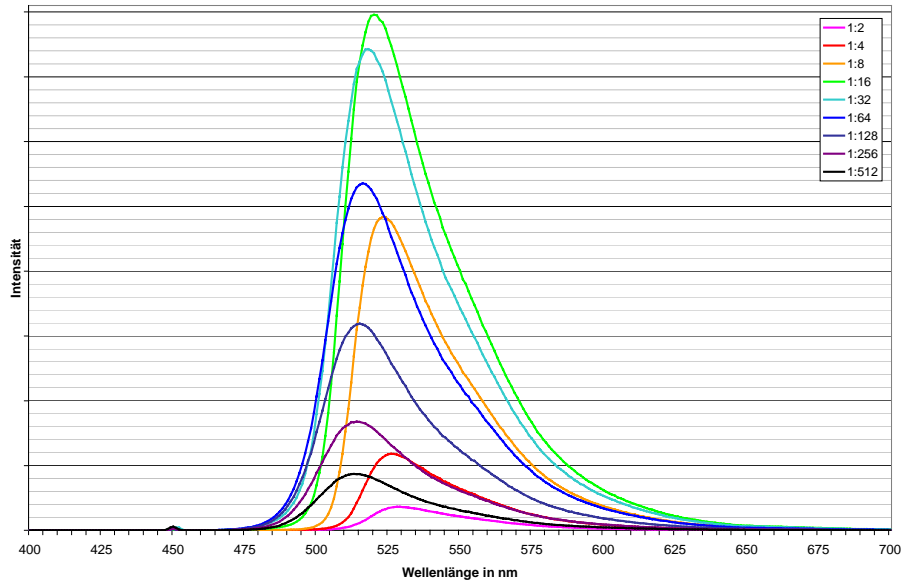


Diagramm 2: Emissionsspektren bei verschiedenen Konzentrationen, Anregung mit Photonen mit  $\lambda=450$  nm

## 2. Aufgabe: verschiedene pH-Werte

Bis zu diesem Punkt enthielt unsere Lösung noch einen Puffer für den pH-Wert 7,4. Wir benutzten für die folgenden Schritte weiter die für die Messung günstige Konzentration 1:512, allerdings mit verschiedenen Puffern. Wie schon vorher gaben wir die Lösungen nacheinander in die Küvette und nahmen für alle die Absorptions- und Emissionsspektren auf.

Die unterschiedlichen optischen Eigenschaften er-

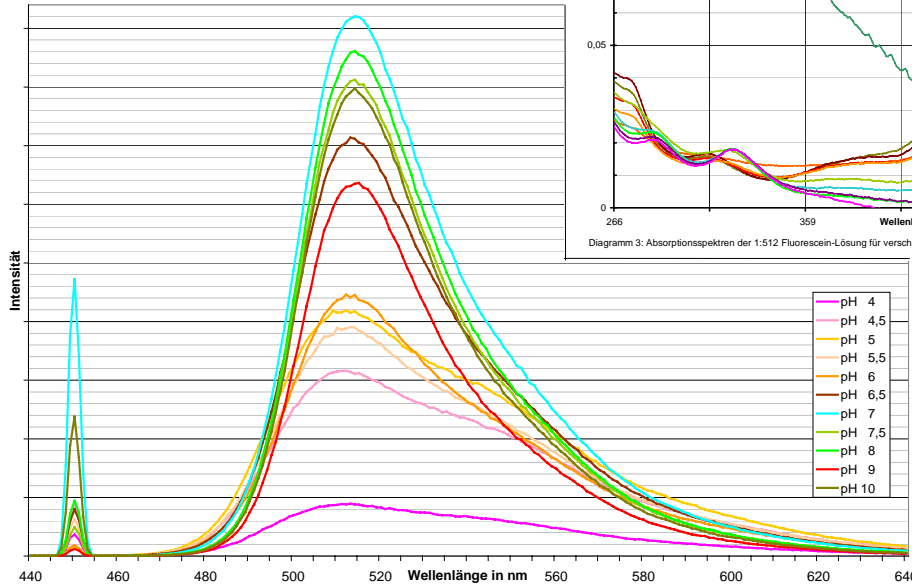


Diagramm 4: Emissionsspektren für verschiedene pH-Werte (gemessen mit Spectra CQ)

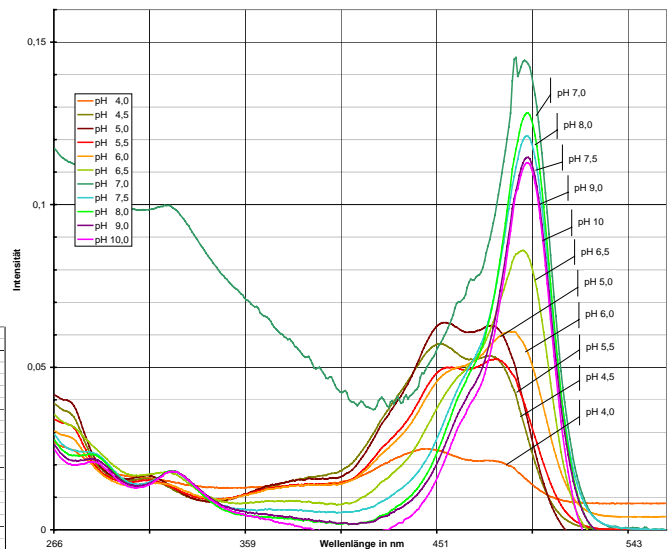


Diagramm 3: Absorptionsspektren der 1:512 Fluorescein-Lösung für verschiedene pH-Werte

klären sich durch das Gleichgewicht zwischen verschiedenen ungleich stark protonierten Molekülvarianten, die jeweils verschiedene Energiezustände haben.

In Diagramm 3 lassen sich einige Punkte erraten, in denen sich fast alle Graphen schneiden. Diese lassen sich erklären,

indem man annimmt, dass im Bereich der Schnittpunkte (270-340 nm) und pH-Werte nur 2 Molekülvarianten relevante optische Eigenschaften zeigen und im Gleichgewicht miteinander stehen. Das heißt, dass die Summe der Konzentrationen der beiden konstant ist. Dadurch spielen nur die beiden Absorptionskoeffizienten  $\epsilon_i(\lambda)$  eine Rolle. Sind sie gleich, sollte es einen Schnittpunkt geben. Die Abweichungen im Diagramm könnten nicht nur durch die möglichen Abweichungen der Moleküleigenschaften von unseren Annahmen hervorgerufen werden, sondern auch hauptsächlich durch den ungenau definierten Nullpunkt aufgrund der schon erwähnten Intensitätsschwankungen der Lampen des SPECORD S 100. Dieses Problem erkennt man am rechten Rand des Diagramms. Nicht erklären konnten wir uns außerdem den außergewöhnlichen Verlauf der Kurve für pH-Wert 7 im linken Teil des Diagramm 3.

### 3. Aufgabe: DNA-Analyse mittels Fluoreszenz -Markern

Vom Betreuer erhielten wir 3 Eppendorf-Gefäße, in denen DNA in einem Puffer gelöst war. Wir pipettierten den knappen Inhalt in eine sehr kleine Küvette, die mittels eines Adapters in die Halterung im Spectra CQ passte. Da wir zu diesem Zeitpunkt noch nichts über die optischen Eigenschaften wussten, nahmen wir ein Emissionsspektrum mit einer willkürlich gewählten Beleuchtungswellenlänge auf. Darin auftauchende Maxima sind Bereiche, in denen die Lösung besonders viel Licht emittiert. Um aussagekräftige Daten über das Absorptionsverhalten zu gewinnen, mussten wir einerseits eine Wellenlänge wählen, für die die Emission recht groß ist, andererseits entsteht für diese Wellenlänge durch Streulicht ein Artefakt, das nichts mit dem Absorptionsverhalten zu tun hat. Aus diesem Grund wählen wir im Emissionsspektrum eine Wellenlänge aus, die an der Flanke zu einem Maximum liegt, aber nicht direkt am Maximum.

Mit dieser Wellenlänge erhalten wir das Anregungsspektrum aller 4 Proben, vor allem auch des Akzeptors, für den wir FRET beobachten wollen.

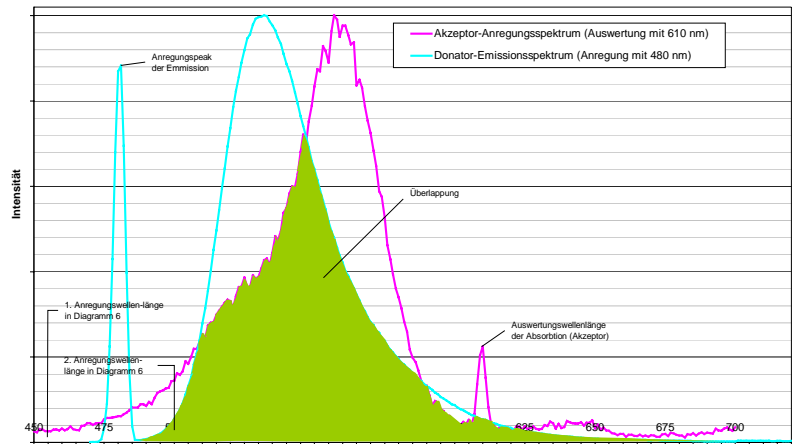


Diagramm 5: Donator-Akzeptor-Überlappung

Anhand der Daten wählten wir dann eine Wellenlänge, für die einerseits der Akzeptor möglichst wenig Licht absorbiert, andererseits der Donator sehr viel. Mit dieser Wellenlänge beleuchteten wir sowohl die DNA, an die beide Marker befestigt sind, als auch die Mischung der beiden Proben, in denen je nur ein Marker an der DNA hängt (a+b) und nehmen die Emissionsspektren auf. Es war ein deutlicher Unterschied zu erkennen, ob der Akzeptor fest an den Donator gebunden ist, oder ob er ihm nur gelegentlich durch Brown'sche Bewegung nahe kommt. Außer-

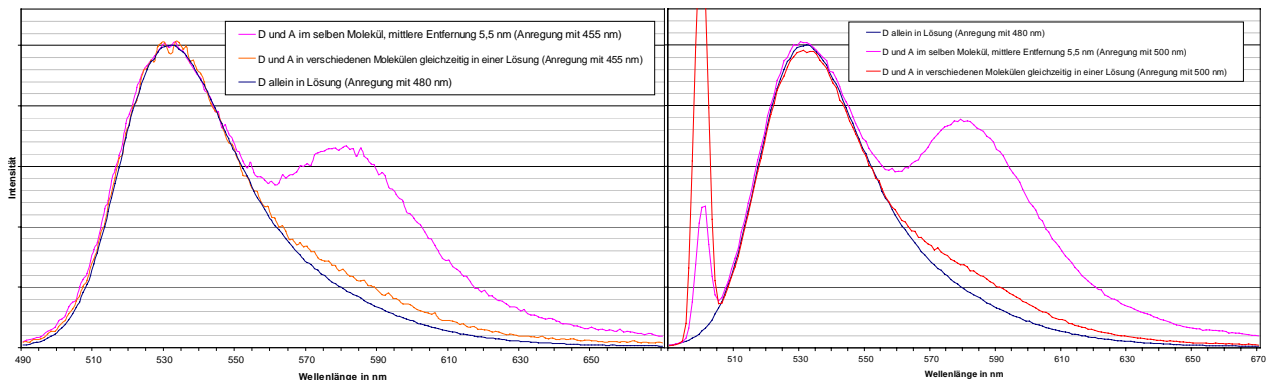


Diagramm 6: Emissionsspektrum von Donator und Akzeptor in verschiedenen Situationen, bei 455 und 500 nm Anregungswellenlänge

dem wird der Akzeptor zum Teil auch direkt (also ohne FRET, rote Kurve im Diagramm 6) angeregt, weil sein Absorptionskoeffizient im Bereich unserer Anregung nicht absolut null ist.

Zur Untersuchung des Einflusses der Anregungswellenlänge haben wir die Emissionsspektren der 2 Lösungen, die den Akzeptor enthalten, bei 2 verschiedenen Wellenlängen untersucht. Dabei kommt es bei der Anregung mit 500 nm zu einer stärkeren Abstrahlung im Bereich des Akzeptors als bei der Anregung mit 455 nm. Das ist verständlich, denn in Diagramm 5 lässt sich erkennen, dass der Akzeptor bei unseren beiden Wellenlängen Strahlung absorbiert.

Alles in allem sind wir nicht auf größere Probleme gestoßen und konnten uns die praktischen Ergebnisse des Spektroskopie-Versuchs durch Wissen über die Theorie plausibel machen. Offen bleibt die Frage nach dem Grund für die unterschiedlichen Basislinien bei der Messung mit Lösungen verschiedener pH-Werte am SPECORD S 100, der höchstwahrscheinlich eine Beschränkung des Messverfahrens ist, womöglich aber auch in anderen Effekten liegt.