

Absorptions - und Fluoreszenzspektroskopie

Biochemie II - Einführung in die Struktur und Dynamik von
Makromolekülen

Prinzipien

Energieübergänge in Biomolekülen

Spektrum elektromagnetischer Strahlung

Übergangswahrscheinlichkeiten, Übergangsdipolmoment

Absorption von sichtbarem und UV-Licht

Schmelzkurven von DNA

Circulardichroismus

Strukturanalyse von Proteinen

Fluoreszenz

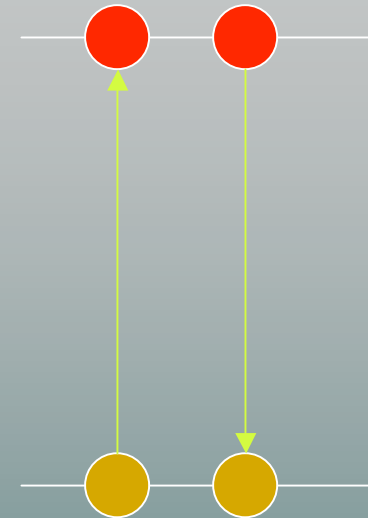
Fluoreszenzlebensdauer

Fluoreszenzquenching

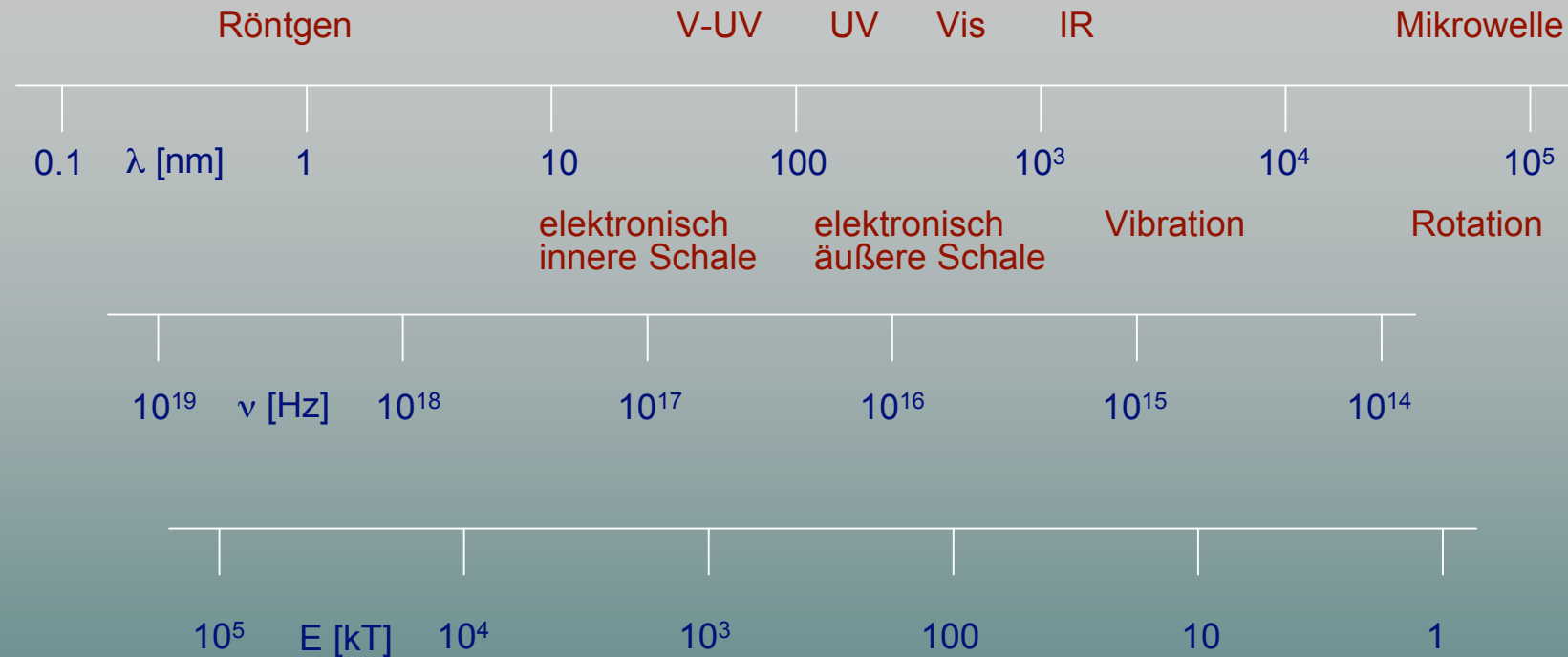
Fluoreszenzpolarisation

Prinzipien (Quantenmechanik)

- Licht ist eine elektromagnetische Welle mit elektrischen und magnetischen Feldkomponenten senkrecht zur Ausbreitungsrichtung
- Licht ist quantisiert („Teilchen-Welle-Dualismus“): Energie eines Photons $E = h \cdot \nu = h \cdot c / \lambda$
- Elektromagnetische Strahlung wird durch ein Molekül beim Übergang zwischen diskreten Energieniveaux absorbiert bzw. emittiert.
- Photonen können nur dann absorbiert oder emittiert werden, wenn ihre Energie gleich der Differenz zwischen den beteiligten Energieniveaux ist.
- Energie, Stärke und Richtung eines Übergangs können durch die Quantenmechanik vorhergesagt werden.



Spektrum elektromagnetischer Strahlung



- Die Rotations-, Vibrations- und elektronischen Zustände eines Moleküls sind quantisiert. Beim Übergang zwischen diesen Zuständen wird Licht einer bestimmten Wellenlänge absorbiert/emittiert.
- Übergänge im IR, sichtbaren und UV sind nicht thermisch angeregt.

Übergangswahrscheinlichkeiten

- **QM: System mit 2 Zuständen**

$$|\Psi\rangle = c_A |\Psi_A\rangle + c_B |\Psi_B\rangle; \quad \langle\Psi|\Psi\rangle = 1 \Rightarrow c_A^2 + c_B^2 = 1$$

- **Schrödingergleichung:**

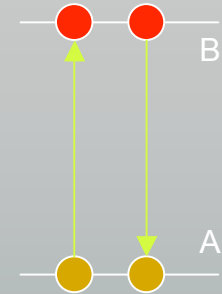
$$H|\Psi\rangle = E|\Psi\rangle = i\hbar \frac{\partial}{\partial t} |\Psi\rangle; \quad \Psi(t) = \Psi_0 e^{-iEt/\hbar}$$

- **kleine Störung, $H' = H + V(t)$:**

$$\begin{aligned} V \left[c_A(t) \Psi_A e^{-iE_A t/\hbar} + c_B(t) \Psi_B e^{-iE_B t/\hbar} \right] = \\ = i\hbar \left[\frac{dc_A}{dt} \Psi_A e^{-iE_A t/\hbar} + \frac{dc_B}{dt} \Psi_B e^{-iE_B t/\hbar} \right] \end{aligned}$$

- **mult. mit $|\Psi_A\rangle$:**

$$i\hbar \frac{dc_A}{dt} = \left[c_A(t) \langle\Psi_A|V|\Psi_A\rangle + c_B(t) \langle\Psi_A|V|\Psi_B\rangle e^{-i(E_B - E_A)t/\hbar} \right]$$



Übergangswahrscheinlichkeiten

- **WW des Systems mit E-Feld (Lichtwelle)**

$$V(t) = \vec{\mu}\vec{E} = \vec{\mu}\vec{E}_0 e^{i\omega t}; \quad \langle \Psi_A | V | \Psi_A \rangle = \langle \Psi_B | V | \Psi_B \rangle = 0 \quad (\text{Symmetrie})$$

- **Dann ist:**

$$i\hbar \frac{d c_B}{dt} = c_A(t) \vec{E}_0 \langle \Psi_B | \vec{\mu} | \Psi_A \rangle e^{-i[(E_A - E_B)/\hbar - \omega]t}$$

- **Lösung für $|c_B(0)|^2 = 0$, kleine E_0 :**

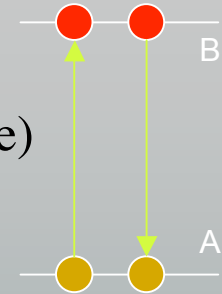
$$|c_B(t)|^2 = \frac{1}{2} \left[\frac{\vec{E}_0 \langle \Psi_B | \vec{\mu} | \Psi_A \rangle \sin\left[\left(\frac{E_B - E_A}{\hbar} - \omega\right)t/2\right]}{\left(\frac{E_B - E_A}{\hbar} - \omega\right)t/2} \right]^2;$$

$$\neq 0 \text{ nur für } E_B - E_A = \hbar\omega_0 \text{ (Resonanz)}$$

- **Zeitl. Änderung der Wahrscheinlichkeit für Zustand B:**

$$\frac{d P_B}{d t} = \frac{1}{2\hbar^2} \left[\langle \Psi_B | \vec{\mu} | \Psi_A \rangle \cdot \vec{E}_0 \right]^2 = B_{AB} I_0; \quad I_0 = E_0^2 / 4\pi$$

- **B_{AB} ist Übergangswahrscheinlichkeit für $A \rightarrow B$**

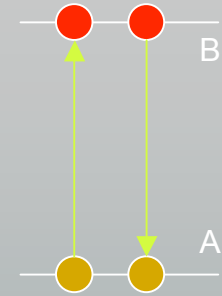


Übergangsdipolmoment

- Mittelung von B_{AB} über alle Orientierungen ergibt:

$$B_{AB} = \frac{2\pi}{3\hbar^2} \left| \langle \Psi_B | \vec{\mu} | \Psi_A \rangle \right|^2 = B_{BA}$$

$\langle \Psi_B | \vec{\mu} | \Psi_A \rangle$ ist das *Übergangsdipolmoment*.



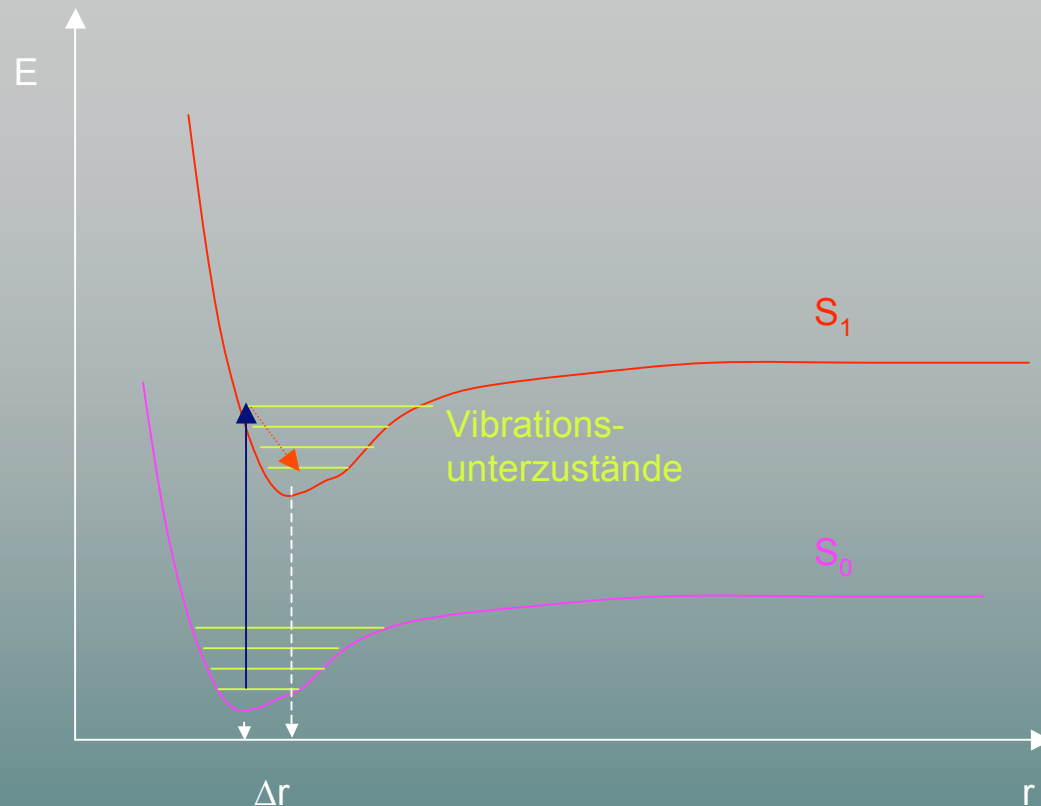
B_{AB} hängt mit dem Extinktionskoeffizienten zusammen:

$$-\frac{dI}{dt} = I_0 \frac{N_A}{1000} h\nu \cdot B_{AB}; \quad -\frac{dI}{dl} = -\frac{1}{c} \frac{dI}{dt} = I_0 \frac{N_A}{1000} \frac{h\nu}{c} \cdot B_{AB}$$

- Lambert-Beer'sches Gesetz, Extinktionskoeffizient

$$\varepsilon' = \frac{1}{I_0} \frac{dI}{dl} = 2.303\varepsilon = \frac{N_A}{1000} \frac{h\nu}{c} \cdot B_{AB}$$

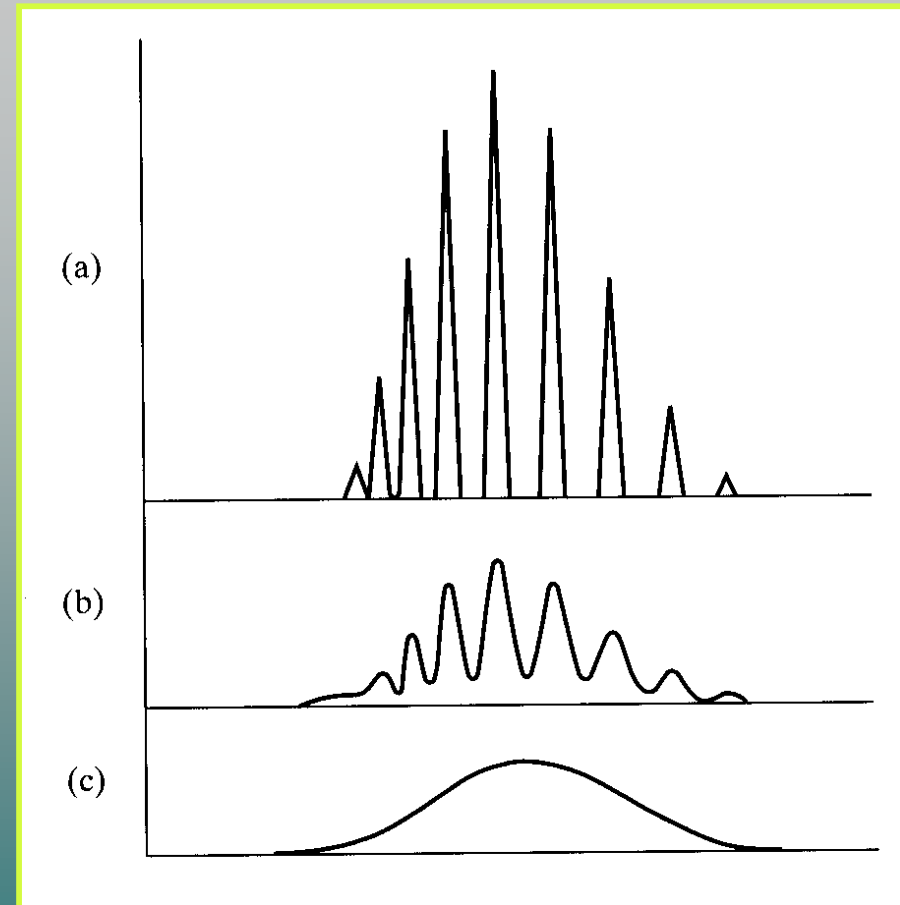
Franck-Condon-Prinzip



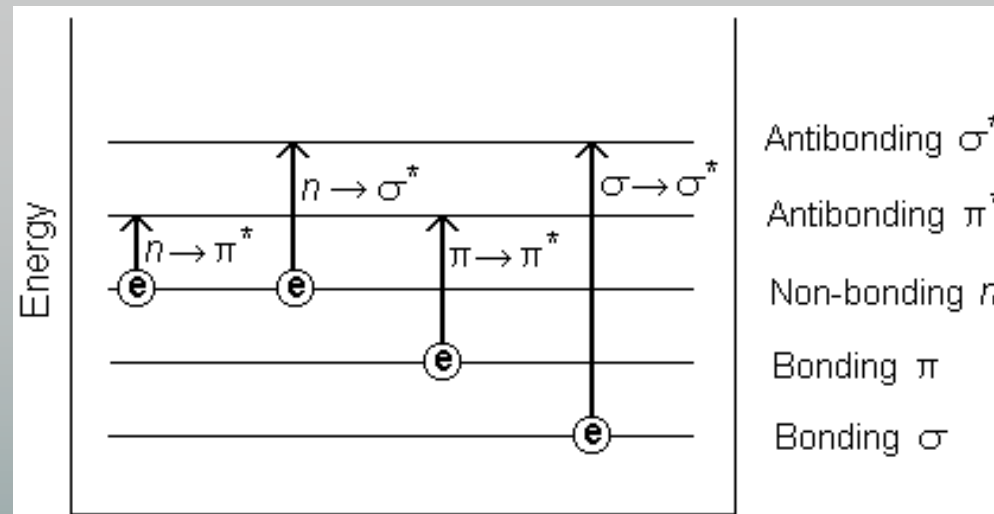
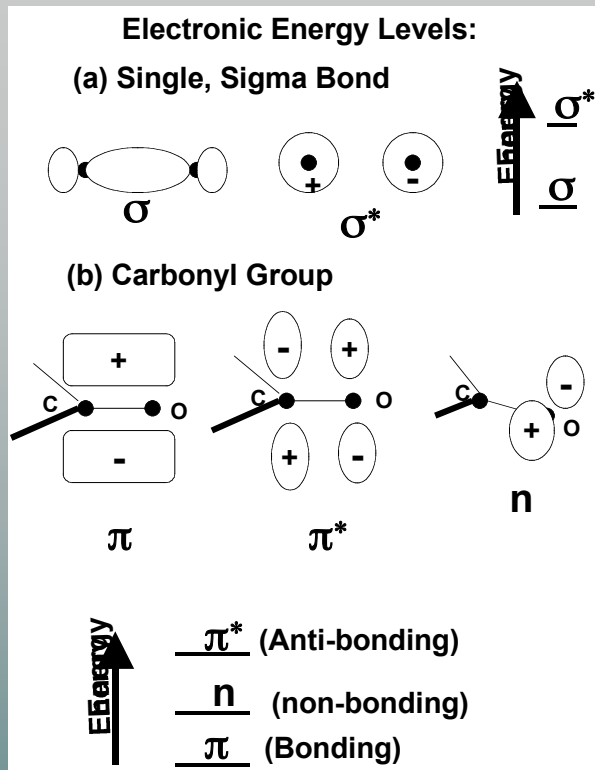
- Charakteristische Zeit des **elektronischen Übergangs**: 10^{-15} s
- Viel schneller als Relaxation der **Vibrationen** (10^{-12} s), daher Übergang in den Vibrationszustand, der am engsten mit dem Grundzustand überlappt

Struktur der Absorptionsbande

- Elektronischer Übergang bestehend aus Vibrationsunterbanden
- Verbreiterung durch Kollisionen
- Breite Bande in Lösung

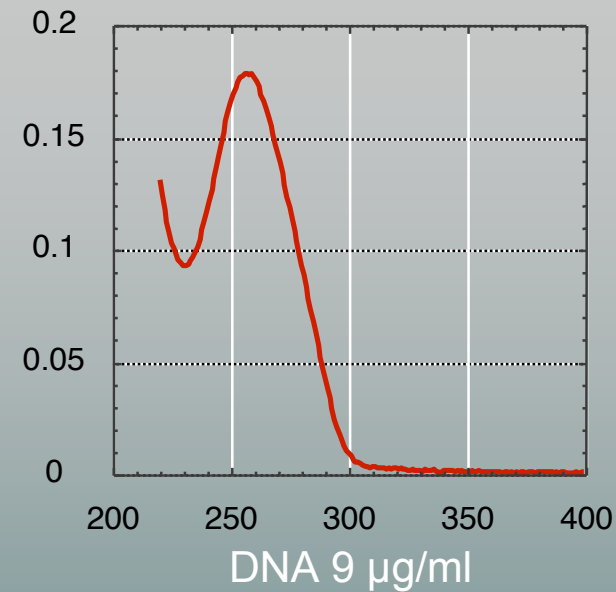
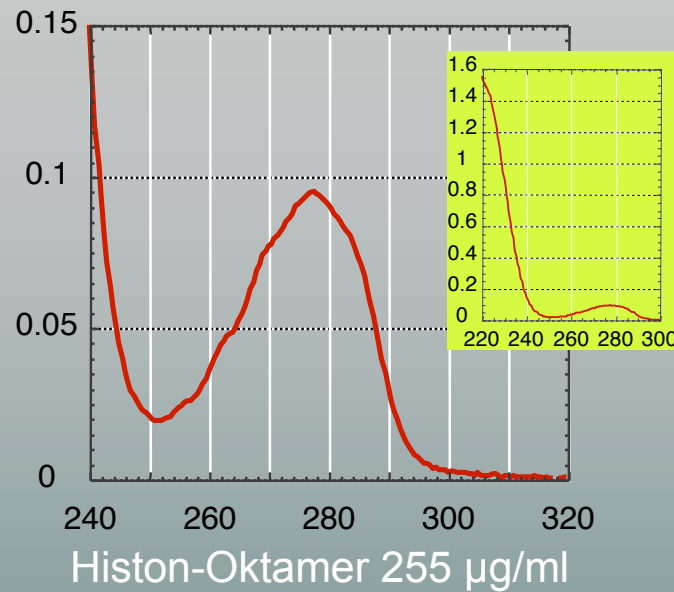


Wichtige elektronische Übergänge in Biomolekülen



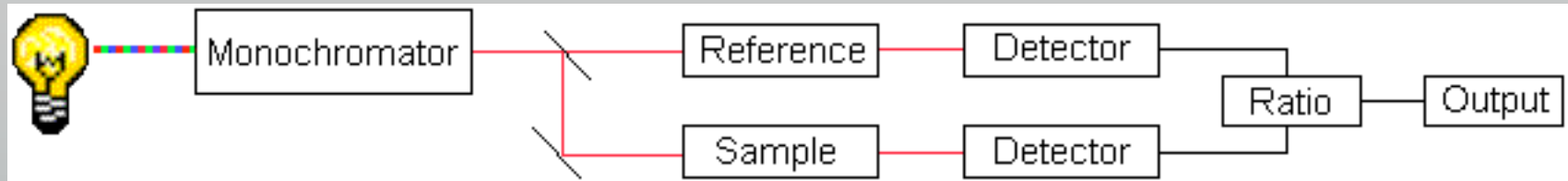
- $\sigma - \sigma^*$ Übergänge: Öffnung einer σ - Bindung, energiereich ($\lambda < 200$ nm)
- Wichtiger: $\pi - \pi^*$, $n - \pi^*$ Übergänge (konjugierte π -Systeme, Peptidbindung)
- Peptidbindung: $n - \pi^*$ 210 nm, $\pi - \pi^*$ 190 nm
- Aminosäureseitenketten: Phe $\pi - \pi^*$ 257 nm, Tyr, Trp $\pi - \pi^*$ 270, 280 nm
- Nukleinsäurebasen: $n - \pi^*$, $\pi - \pi^*$ \approx 260 nm

Typische Protein- und Nukleinsäurespektren

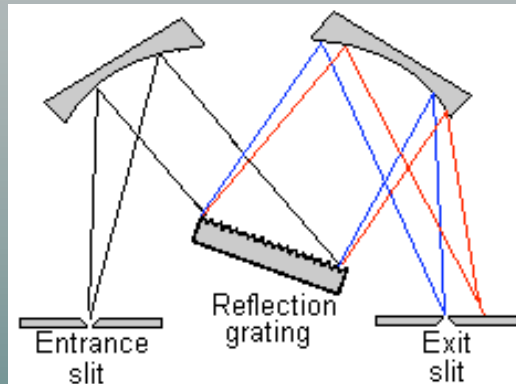


- Typische Werte für Extinktionen:
 - Proteine $A_{280} = 1 \rightarrow c = 1 \dots 2 \text{ mg/ml}$
 - DNA $A_{260} = 1 \rightarrow c = 50 \text{ µg/ml}$
- Für höhere Empfindlichkeit bei Proteinen A_{230} bestimmen
(Vorsicht: Messung an der Flanke des Spektrums;
Cl⁻ Absorption stört)

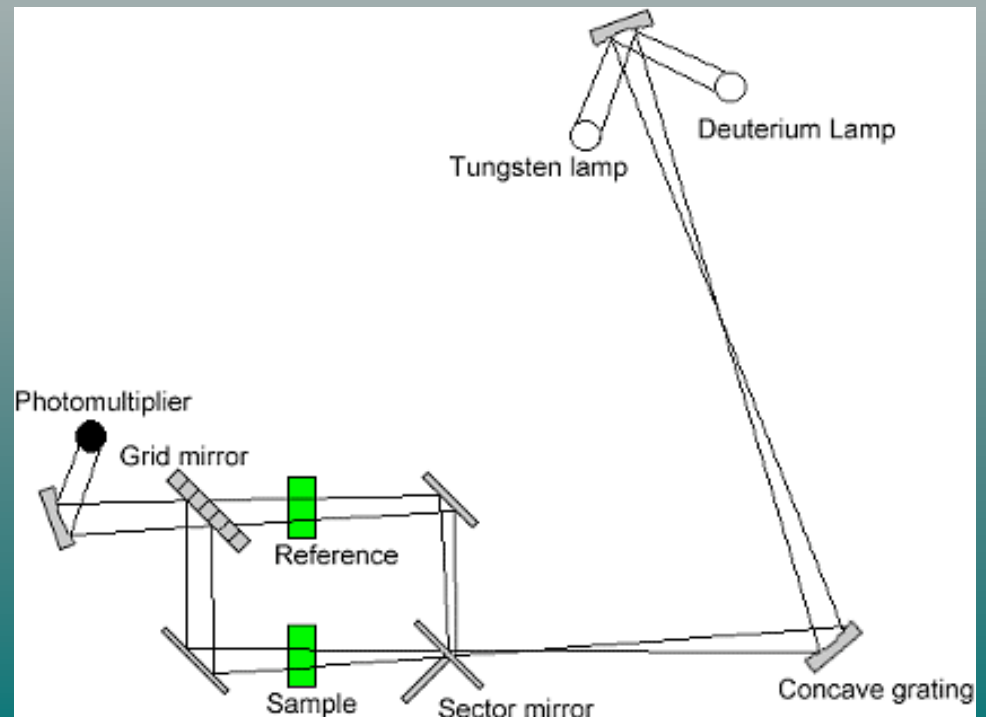
Aufbau eines Spektralphotometers



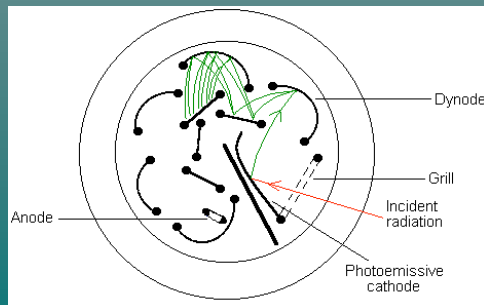
Monochromator
(Czerny-Turner-Aufbau)



Typisches
Zweistrahlspektralphotometer



Photomultiplier



Dichroismus

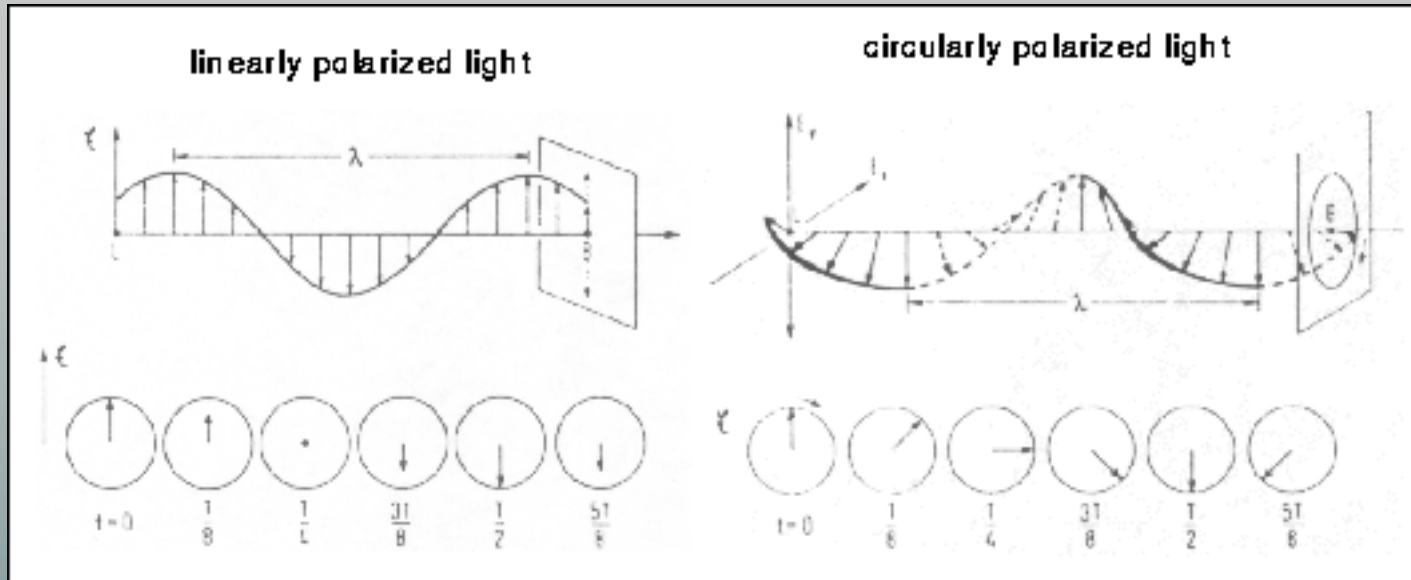
- Moleküle in Lösung sind statistisch orientiert, daher Absorption anisotrop: $\langle \Psi_B | \vec{\mu} | \Psi_A \rangle \cdot \mathbf{E}_0 \rangle^2 = \frac{1}{3} (\mu_x^2 + \mu_y^2 + \mu_z^2) \mathbf{E}_0^2$

- Orientierung der Moleküle führt zu Differenz zwischen Absorption von vertikal und horizontal polarisiertem Licht: *Dichroismus*

$$d = (A_{\parallel} - A_{\perp}) / (A_{\parallel} + A_{\perp})$$

- Anwendungen:
 - Bestimmung der spektralen Homogenität einer Absorptionsbande
 - Messung der Richtung von μ bei bekannter Struktur des Moleküls (z.B. DNA-Basen in orientierten DNA-Fibern)
 - Orientierung von Chromophoren in biologischen Makromolekülen bei bekanntem μ
 - Untersuchung der Dynamik von Makromolekülen in Lösung (Rotation, interne Bewegungen) nach Orientierung im elektrischen bzw. magnetischen Feld

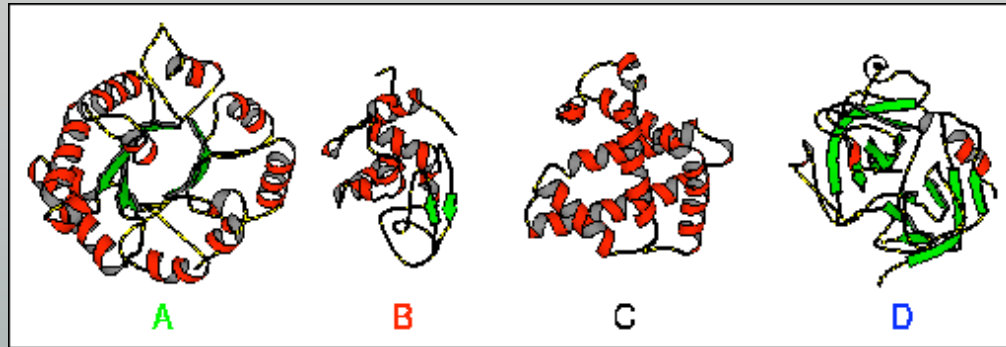
Zirkulardichroismus (CD)



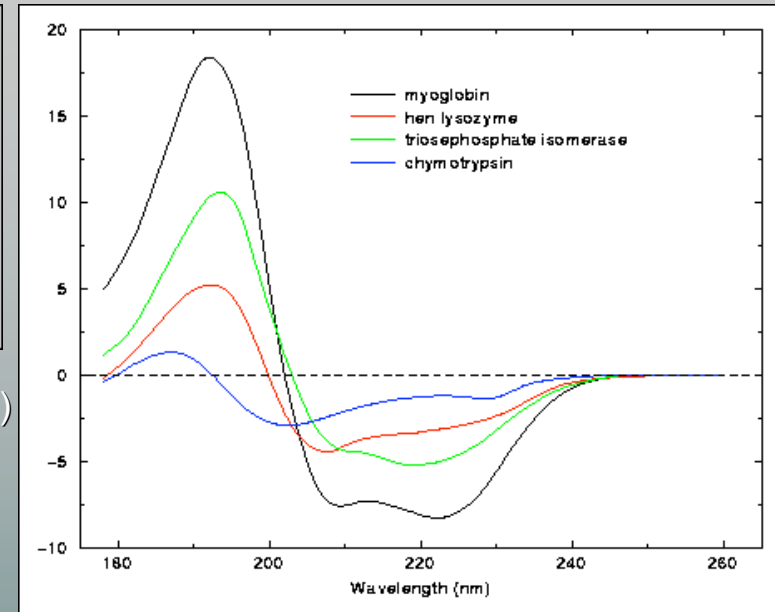
© Kurt D. Berndt, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden

- Optisch aktive Substanzen haben unterschiedliche Absorptionskoeffizienten für links und rechts zirkular polarisiertes Licht:
 $\Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R$ $\Delta\varepsilon/\varepsilon$ typ. $3 \cdot 10^{-4} \dots 3 \cdot 10^{-3}$
- Einheit: Elliptizität $\Theta = 2.303 (A_L - A_R) \cdot 180/4\pi$ [°]

Zirkulardichroismus (CD)



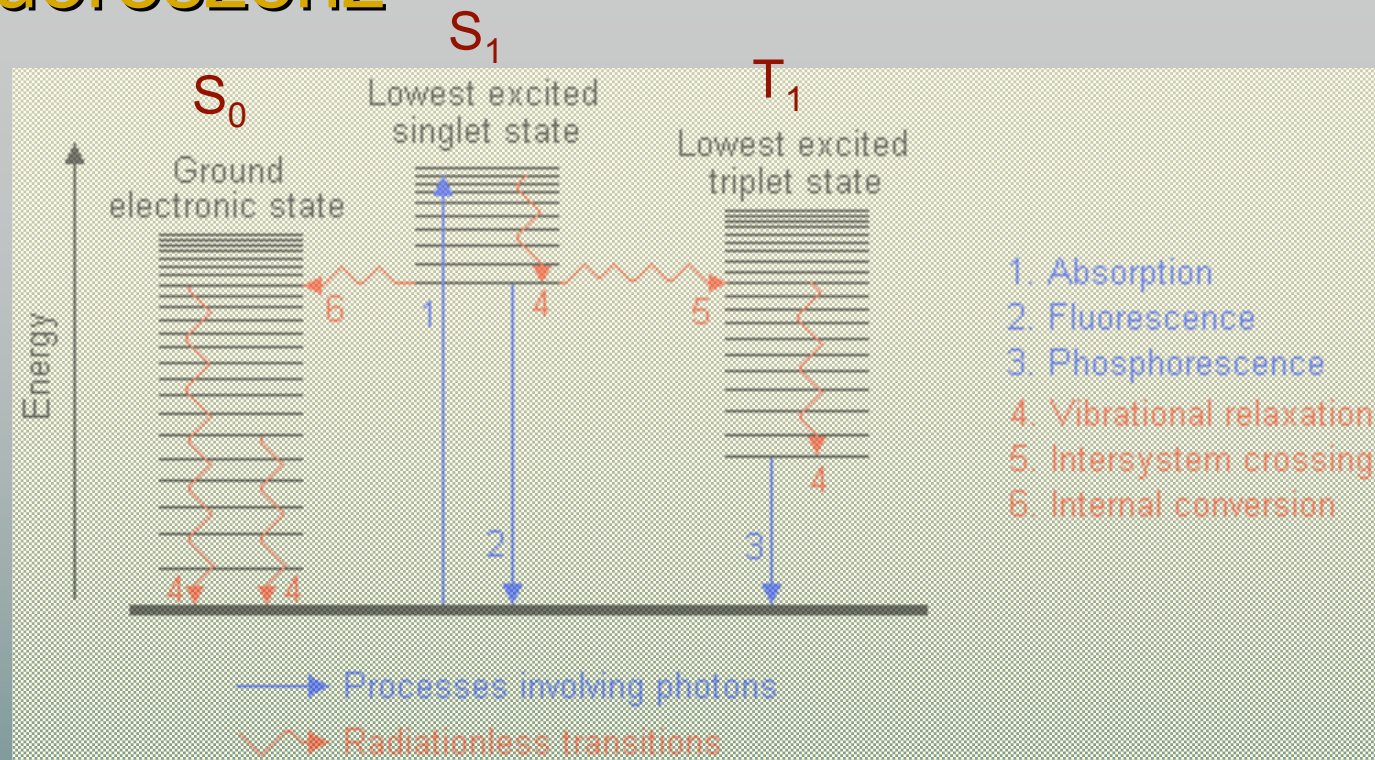
- A) triosephosphate isomerase (H:0.52, S:0.14, T:0.11, O:0.23)
B) hen egg lysozyme (H:0.36, S:0.09, T:0.32, O:0.23)
C) myoglobin (H:0.78, S:0.0, T:0.12, O:0.10)
D) chymotrypsin (H:0.10, S:0.34, T:0.20, O:0.36)



© Kurt D. Berndt, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden

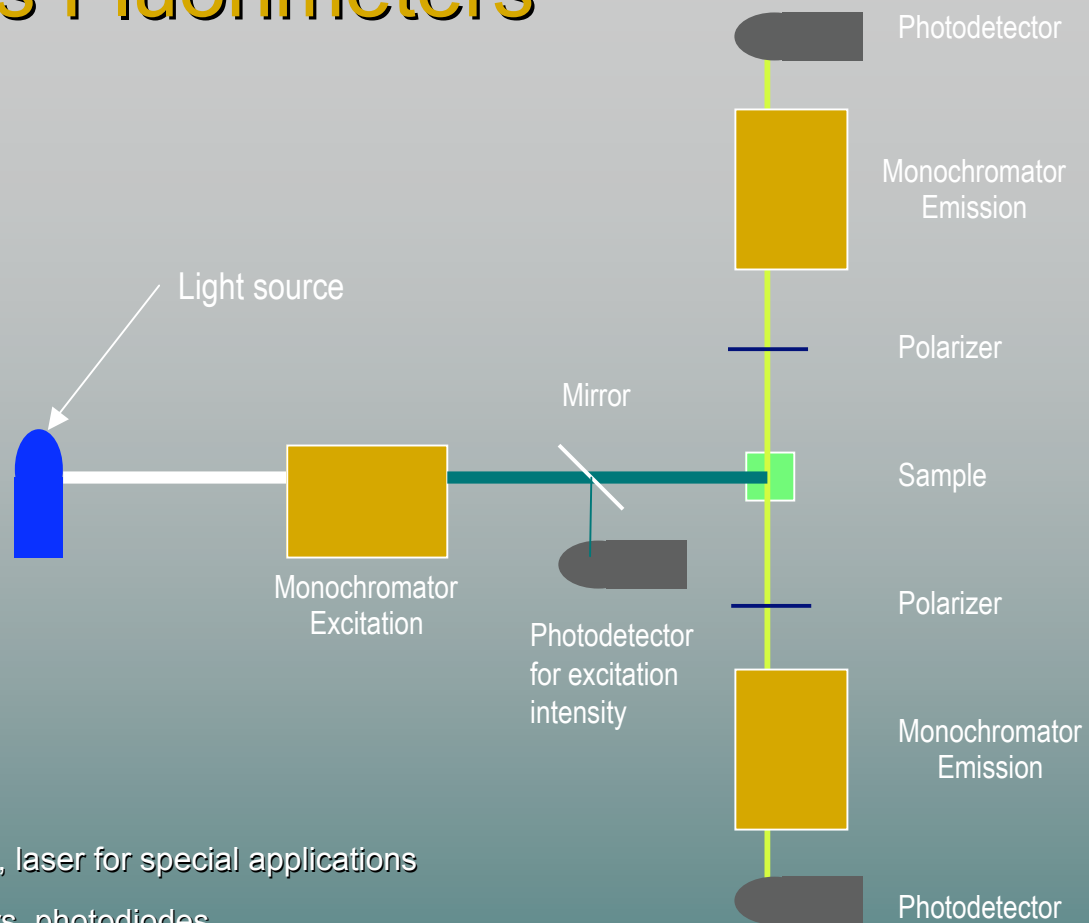
- Das CD-Spektrum der Peptidbindung hängt von der Sekundärstruktur ab: α -Helix \neq β -Faltblatt \neq β -Turn \neq random coil
- CD - Spektren können zur Voraussage von Protein-Sekundärstrukturen verwendet werden

Fluoreszenz



- Prinzip: Strahlung wird absorbiert (1), Vibrationsrelaxation (4), Emission (2) bei größerer Wellenlänge; Lebensdauer \approx ns
- Strahlungslose Prozesse: Übergang in Triplettzustand (5), Interne Konversion (6)
- Phosphoreszenz aus dem Triplettzustand (3); Lebensdauer $>$ μ s

Aufbau eines Fluorimeters



- Light source: Xenon lamp, laser for special applications
- Detectors: Photomultipliers, photodiodes
- Monochromators: typically grating, single or double
- time resolution allows lifetime measurements

Fluoreszenzlebensdauer

- Übergang von S_1 in S_0 hauptsächlich über 4 Prozesse:
 - $S_1 \xrightarrow{k_F} S_0 + h\nu$ (Fluoreszenz)
 - $S_1 \xrightarrow{k_L} S_0 + \text{Wärme}$ (Interne Konversion)
 - $S_1 + Q \xrightarrow{k_Q} S_0 + Q^* \rightarrow \text{Wärme}$ (Quenching; $Q = \text{Quencher}$)
 - $S_1 + A \xrightarrow{k_T} S_0 + A^* \rightarrow h\nu$ (Energietransfer; $A = \text{Akzeptor}$)
- Betrachtet man nur die ersten beiden Prozesse, ergibt sich die **Quantenausbeute** aus:
 - $Q = k_F / (k_L + k_F) = k_F \tau_F$
 - τ_F ist die **Fluoreszenzlebensdauer** $= 1 / (k_L + k_F)$

Fluorescence polarization

- Difference between intensities emitted parallel and perpendicular to excitation light:
 - Polarization $P = (I_{\parallel} - I_{\perp}) / (I_{\parallel} + I_{\perp})$
 - Anisotropy $A = (I_{\parallel} - I_{\perp}) / (I_{\parallel} + 2I_{\perp})$
- Application: measure rotation of biomolecules in solution
 - Rotation during fluorescence lifetime leads to loss of polarization
 - $P = 0.5$, $A = 0.4$ for ensemble of randomly oriented, completely rigid fluorophores
 - For mobile fluorophores, $P < 0.5$, $A < 0.4$
 - Often used for detection of binding of a small fluorescent ligand to a protein

Fluoreszenzquenching

-

Fluoreszenzenergietransfer

