



UV/VIS – und Fluoreszenzspektroskopie

- Grundlagen - Prinzipielles
- Apparatives
- Beispiele und Anwendungen

Titel Vorlesung: Strukturaufklärung von Biomolekülen

→ bei Fluoreszenz „ + Funktion “

Literatur

J.R Lakowicz: Principles of Fluorescence Spectroscopy
Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York, 2nd ed. 1999

UV/VIS-Spektroskopie

Lambert-Beersches Gesetz (für monochromatisches Licht)

Voraussetzungen:

- absorbierende Substanz homogen in Lösung verteilt
- keine Lichtstreuung
- keine Photoreaktion in der Lösung

$$A = \log \left(\frac{I_0}{I} \right) = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

$$T = \left(\frac{I}{I_0} \right) = -\log A$$

$$T_{\%} = 100 \cdot \left(\frac{I}{I_0} \right)$$

Absorption

Transmission

I_0 : Intensität der einfallenden Strahlung

I : Intensität der austretenden Strahlung

ε : molarer Extinktionskoeffizient [L · mol⁻¹ · cm⁻¹]

d : Schichtdicke [cm]

A ist dimensionslos, keine Einheiten wie z.B. AU oder OD !

Sinnvoll sind Absorptionsmessungen nur bis A = 2 (T = 1%) !

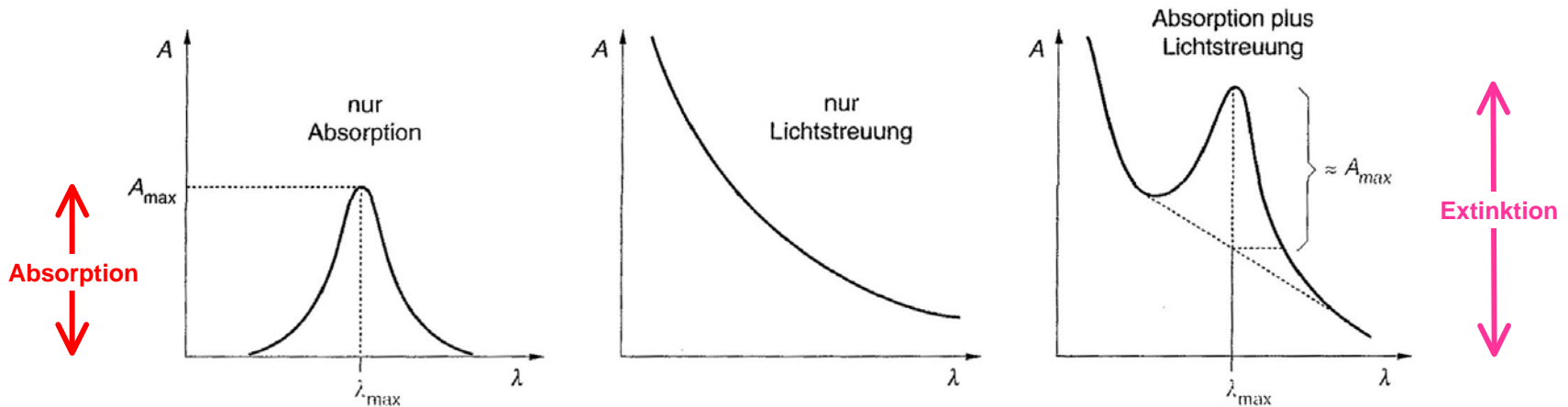
Absorption ist additiv, bei i Substanzen: $A = (\varepsilon_1 \cdot c_1 + \varepsilon_2 \cdot c_2 + \dots + \varepsilon_i \cdot c_i) \cdot d$

Absorption / *Extinktion* oft synonym verwendet, aber

Absorption → molekularer Prozess

Extinktion → dem Messstrahl entnommener Anteil, unabhängig ob „echte“ oder „scheinbare Absorption“

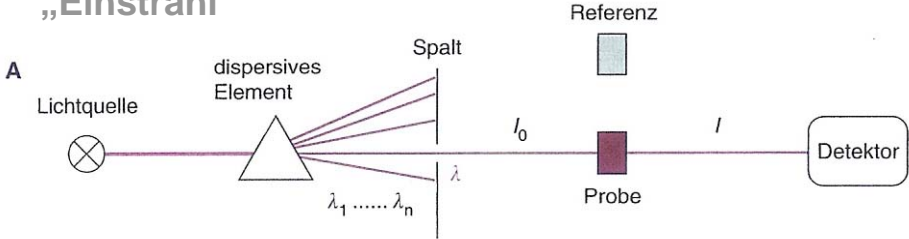
A als $f(\lambda)$ → Absorptionsspektrum



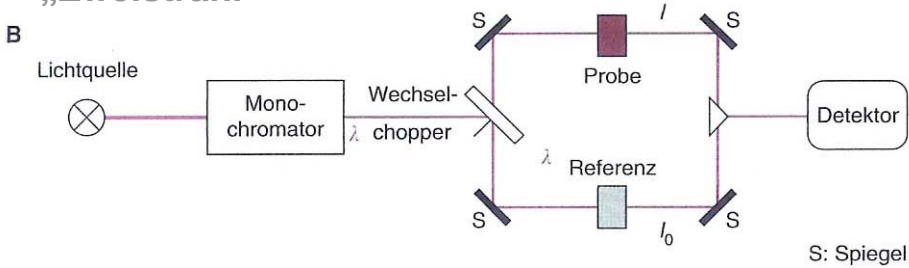
Apparatives

Spektrometer

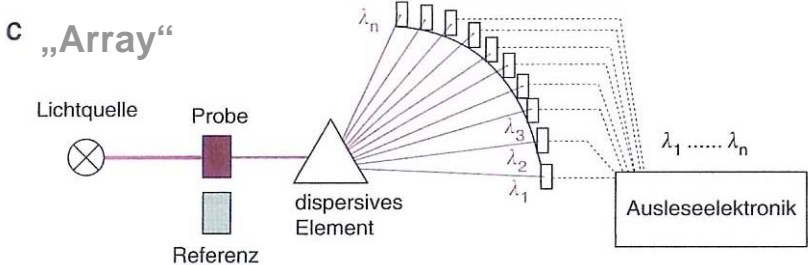
„Einstrahl“



„Zweistrahl“

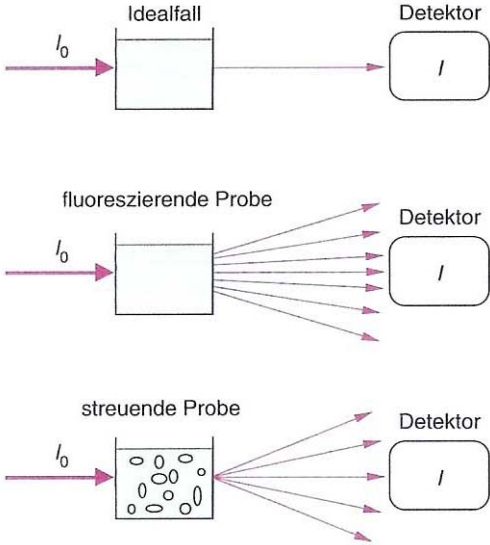


„Array“



Messung

Idealer / realer Proben



UV-Absorption Proteine

Peptidbindung	$\pi \rightarrow \pi^*$	190 nm	$\varepsilon = 7.000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
	$\pi \rightarrow \pi^*$	220 nm	$\varepsilon = 100 \dots 200 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
<u>Tryptophan</u>	$\pi \rightarrow \pi^*$	280 nm	$\varepsilon = 6.000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
Phenylalanin	$\pi \rightarrow \pi^*$	260 nm	$\varepsilon = 200 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
Tyrosin	$\pi \rightarrow \pi^*$	190 nm	$\varepsilon = 1.500 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

→ Einfache (grobe) Konzentrationsbestimmung:
durchschnittl. Verteilung Tyr und Trp: $A_{280\text{nm}} \approx 1$, $d = 1\text{cm}$ → $c = 1 \text{ mg/mL}$

Chromoproteine

= Proteine mit chromophoren prosthetischen Gruppen

- Absorption im VIS - Bereich
- vielfach empfindliche Sonden für Funktion

Chromophore Gruppen: Metallzentren

Flavine

Porphyrine (2)

Chlorophylle (3)

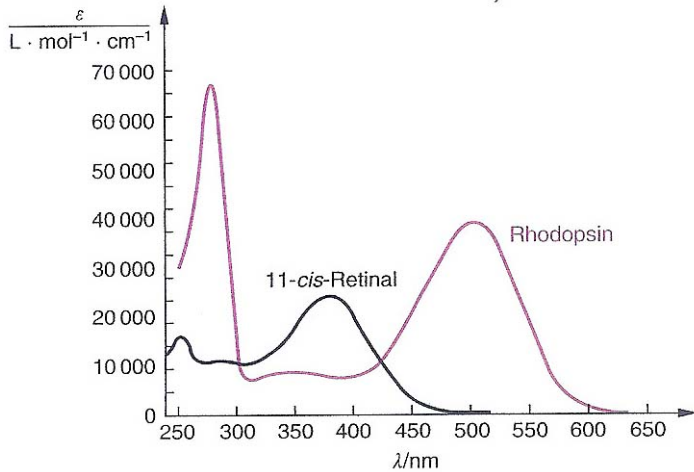
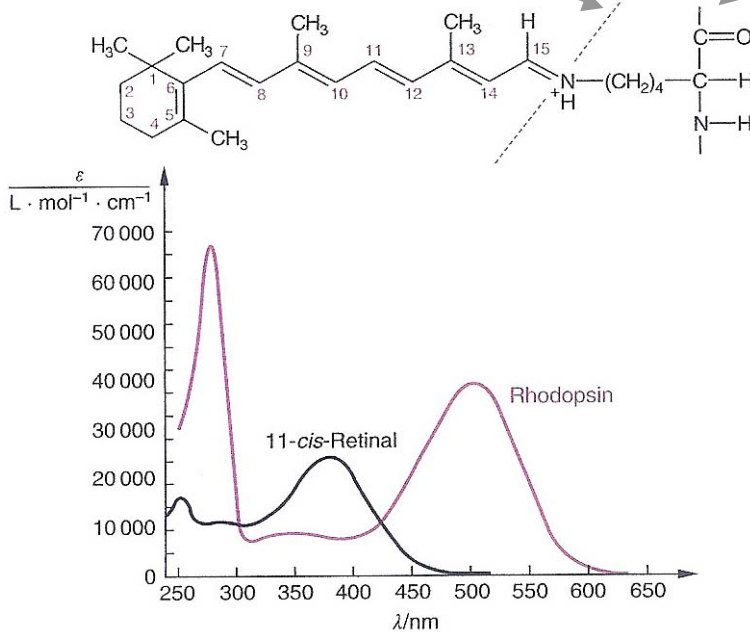
Retinale (1)

Beispiel 1: Rhodopsin

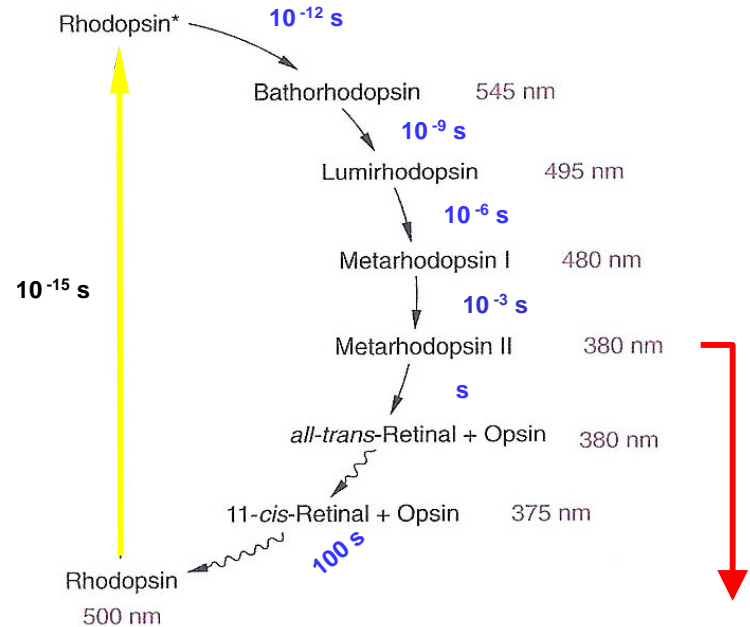
= „**Sehpigment**“

Prosthetische Gruppe: Retinal (Vitamin-A-Aldehyd, über Schiff'sche Base an ϵ -Aminogruppe von Lys296 gebunden)

Reaktionskaskade

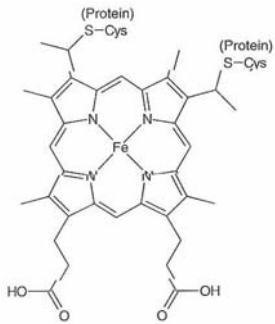


Spektren



Kopplung an Enzymkaskade
(G-Protein, etc.)
→ visueller Reiz

Beispiel 2: Cytochrome

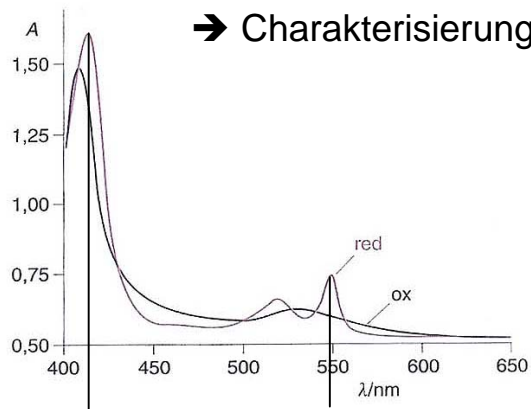


Struktur der Häm-Gruppe
in Cytochrom c

Cytochrom c (Klasse der Hämproteine)
Vorkommen: Elektronentransferketten
(Atmung, Photosynthese)

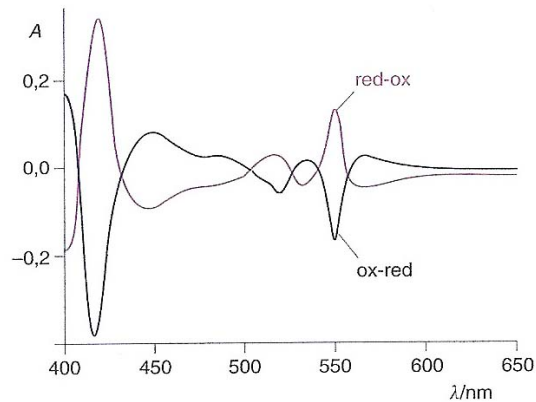
Versch. WW im Protein → untersch. spektrale Eigenschaften
und untersch. Redoxpotentiale → c-Cytochrome treten an
versch. Teilen von Elektronentransferketten auf.

Spektrum abh. vom
Redoxzustand
→ Charakterisierung

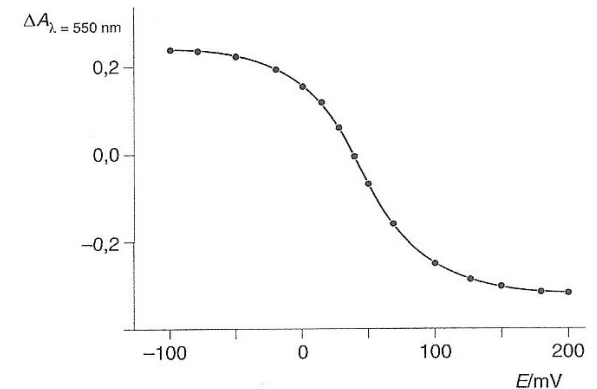


Soret-Bande α-Bande

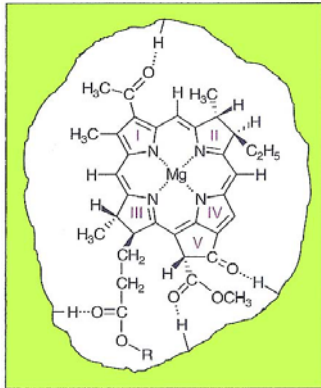
Differenzspektren



Redox titration
α-Bande 552 nm



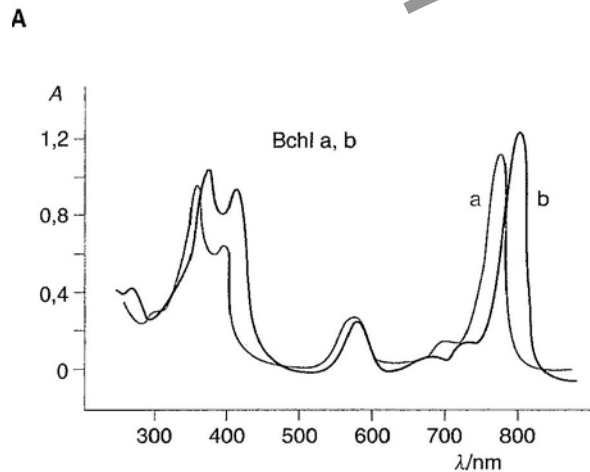
Beispiel 3: Chlorophyll / Chlorophyll - Protein – Komplexe



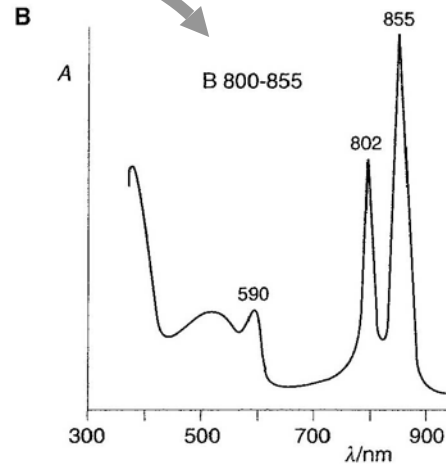
Chlorophylle (ca. 60 natürliche Varianten),
gemeinsam: Tetrapyrrol-Ringstruktur mit durch 4 Stickstoffe
koordiniertes Magnesium

Unterschiede in peripheren Substituenten → Einfluss auf Lage
und Intensität der Absorptionsbanden

Chlorophylle an Proteine nur assoziiert, nicht kovalent gebunden.



Spektrum Bakteriochlorophyll
a und b in **EtOH**



Spektrum Bakteriochlorophyll
a in **Protein-Komplex**

Detaillierte WW, die die Lage und Intensität der Banden bestimmen, sind noch nicht verstanden. Spektren werden genutzt, um Vorkommen, Menge und Reaktionen der Protein-Komplexe zu bestimmen, außerdem Test für „Qualität“ einer Präparation.

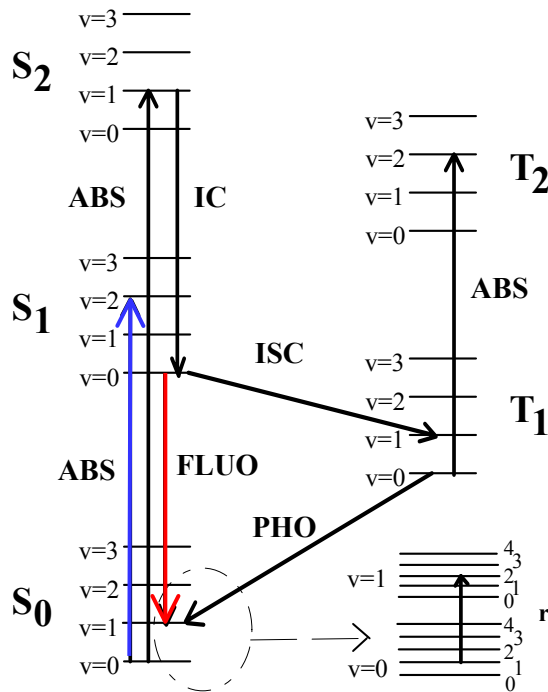
Fluoreszenzspektroskopie

- Wichtige und sehr verbreitete spektroskopische Technik der Analytik in der Biochemie und Molekulargenetik.
- Spurennachweis mit phantastisch hoher Empfindlichkeit
- Zuverlässige Techniken zur Markierung
- Erfassen von Enzym- oder Membranzuständen
- Mikroskopie → hohe Ortsauflösung
- Lasertechniken → sehr hohe Zeitauflösung
- Neu: Fluoreszenzspektroskopie an Einzelmolekülen

Aus Fluoreszenzsignalen von Proteinen oder biologischen Membranen werden weniger hochdetaillierte Strukturaussagen erhalten (Techniken hierzu: NMR, Kristallographie, (CD-Spektroskopie))

Fluoreszenz liefert eher globale Parameter einer Probe (z.B. Beschreibung der Fluidität einer biologischen Membran, Entfaltung oder Denaturierung eines Proteins, Änderung der Umgebung einer Sonde am / im Protein, usw.)

Fluoreszenz ist ein **Relaxationsprozess**, durch den Moleküle aus dem angeregten Zustand mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit wieder in den Grundzustand übergehen können.



Jablonski - Diagramm

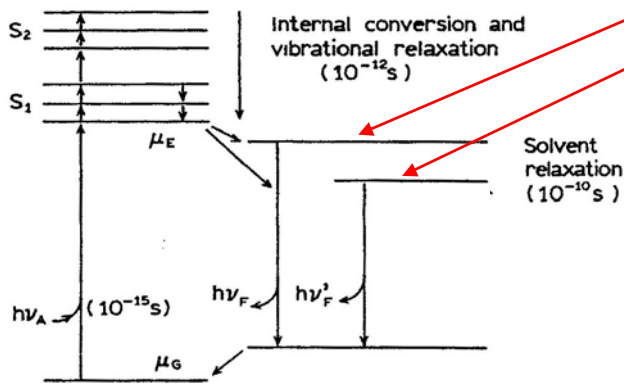
Lebensdauer des angeregten Zustands (**Strahlungslebensdauer**) abhängig von Gesamtheit aller Relaxationsprozesse:

- **Fluoreszenz**
- strahlungslose Relaxation (thermisch)
- evtl. Singulett-Triplett-Übergang
- evtl. mögliche chemische Reaktionen aus dem angeregten Zustand,

Lebensdauer des angeregten Zustands:
typ. 10^{-7} s ... 10^{-9} s

>> **Absorptionsprozess** (ca. 10^{-15} s)

Sehr viel längere Lebensdauer des angeregten Zustands bietet Zeit für Relaxation - Wechselwirkung mit Umgebung:



- Lösungsmittelmoleküle
- absorbierende Gruppe in einem Protein

können sich in einer für den angeregten Zustand günstigen Weise anordnen und damit z.B. die Energie des angeregten Zustands absenken

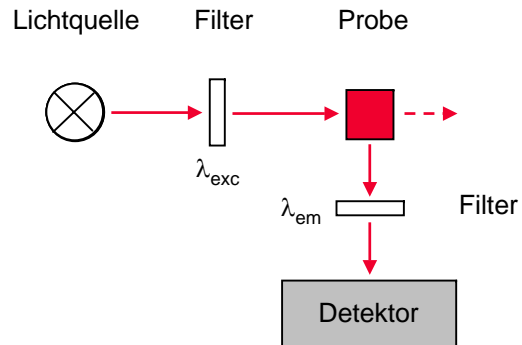
Die Energiedifferenz zwischen einem derart relaxierten angeregten elektronischen Zustand und dem Grundzustand wird / ist sensitiv auf
 → Umgebungsänderung(en)

Fluoreszierenden Gruppen = empfindliche Sonden - "Reportergruppen
 für schnelle konformelle Relaxationen

Änderungen der Lebensdauer des angeregten Zustands liegen Zeitbereich der Translation und Rotation von Proteinen in Lösung oder in einer biologischen Membran: Nach Rotation entspricht die Polarisationsrichtung der emittierten Welle nicht mehr der der absorbierten Welle

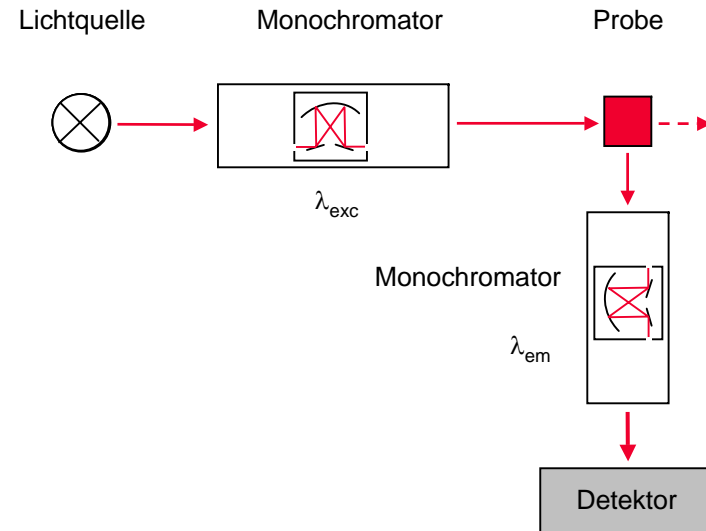
→ "Fluoreszenzdepolarisation" : Wechselwirkungen in und Viskositätseigenschaften von biologischen Membranen.

Apparatives



Bei Routineanwendungen
Anregungswellenlänge λ_{exc}
und Emissionswellenlänge λ_{em}
durch Filterkombination

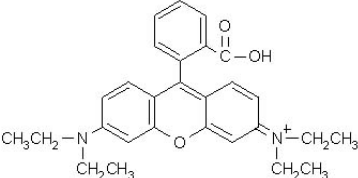
Detektoren:
Photomultiplier
CCD



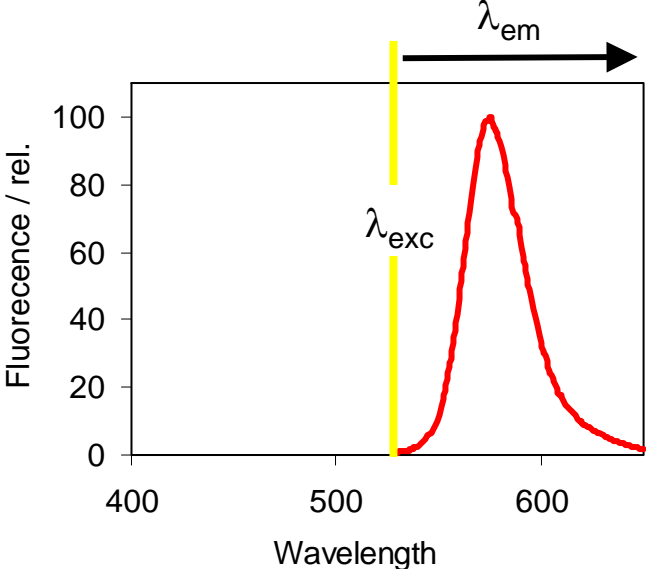
Intensive Anregungslichtquelle, u.U. Laser
empfindliche Detektion unter 90°

Monochromatoren:
freie Wahl der Anregungswellenlänge λ_{exc}
und der Emissionswellenlänge λ_{em}

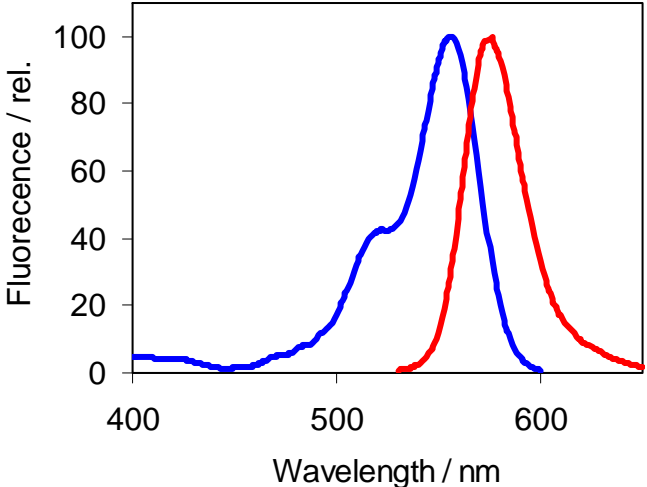
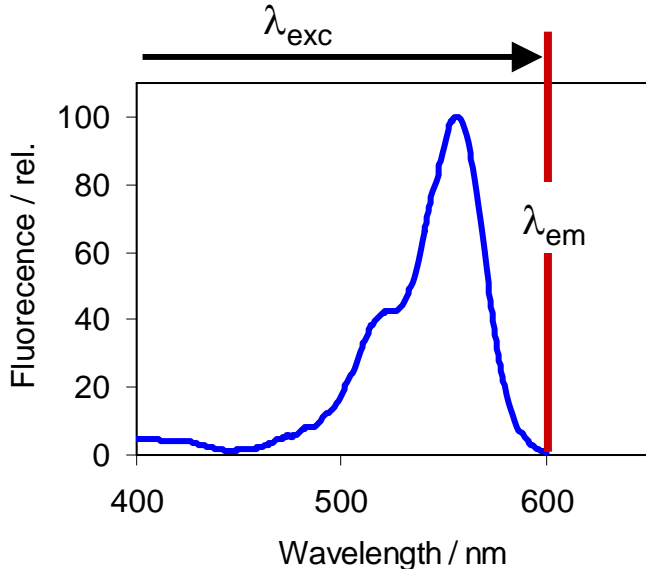
Beispiel: Rhodamin B



Emissionsspektrum



Aktionsspektrum



Fluoreszenzintensität $F \sim c$

$$F \sim I_0 \Phi \varepsilon c d$$

I_0 : Intensität des eingestrahlt Lichts

Φ : Quantenausbeute $\Phi = \frac{n_{em}}{n_{abs}} \leq 1$ $\Phi : 0,1 \dots 1$

ε : molarer Extinktionskoeffizient

c : Konzentration

d : Schichtdicke

Fluoreszenz konzentrationsabhängig (Störung durch „Re-absorption“, Rotverschiebung) !

Korrekturmöglichkeit: Emissionsspektren als $f(c)$ und Extrapolation $c = 0$

Vorsicht bei höherer Konzentration Fluoreszenzlöschung ("Quenching") !

→ Absorption $< 0,1$

Fluoreszenzuntersuchungen mit

intrinsischen

und

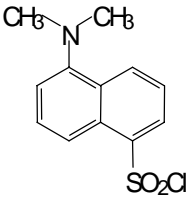
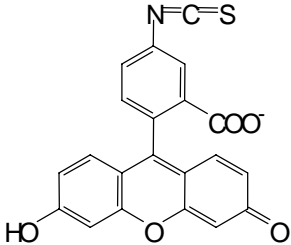
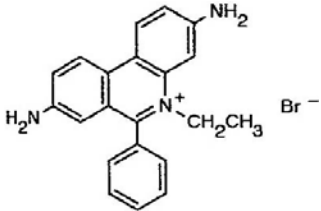
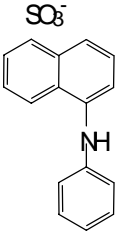
extrinsischen

Fluorophoren

- Tryptophan ($\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 340 \text{ nm} \dots 360 \text{ nm}$)
- Chlorophylle und Chlorophyll-Protein-Komplexe (Bakterien, Photosynthese)
- GBP (*green fluorescent protein*) (Genexpression, Proteinlokalisierung, pH-Sonde in Zellen)

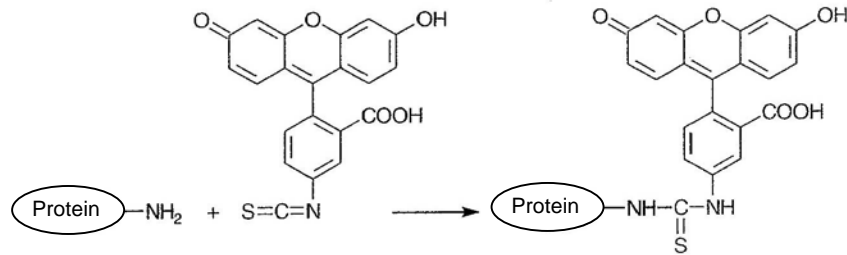


„Kleine“ Auswahl Fluorophore

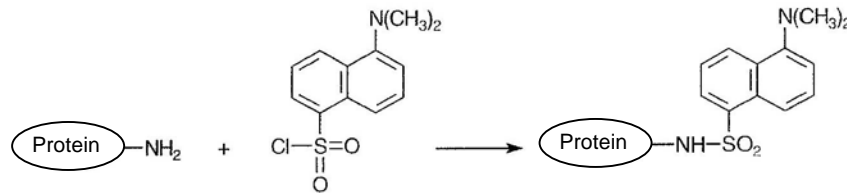
Name	Eigenschaften	λ_{\max} Absorption	λ_{\max} Emission	Struktur
Dansylchlorid	kovalente Bindung an Proteine über Lysin oder Cystein	330 nm	510 nm	
Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)	kovalente Bindung an Proteine über Lysin	495 nm	516 nm	
Ethidium-bromid	nichtkovalente Bindung an Nukleinsäuren	515 nm	600 nm	
8-Anilino-1-Naphtalen-Sulfonat (ANS)	Nichtkovalente Bindung an Proteine	374 nm	454 nm	

Fluoreszenzmarkierung von Proteinen

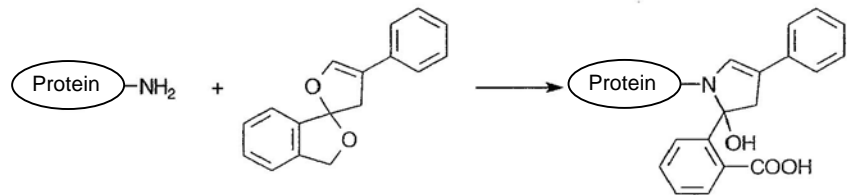
mit



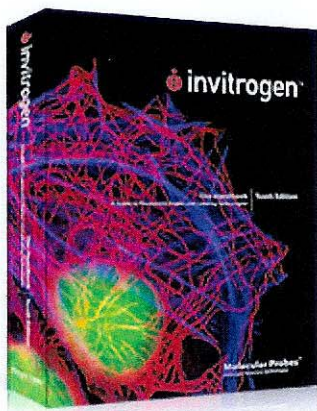
**Fluoresceinisothiocyanat
(FITC)**



Dansylchlorid



Fluorescamin



The Handbook

The Handbook — A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies is a comprehensive resource for fluorescence techniques and applications. Newly revised, *The Handbook* contains detailed information describing the use of more than 3000 Molecular Probes for life science research, including extensive data, numerous technical notes, and full-color images of the products in action.

This Web Edition of *The Handbook, Tenth Edition* is presented in two formats. Sections in "standard" format load into browsers and contain links to all of the tables, figures and images. Sections in "printer-friendly" format include tables, figures and images of the text and are specifically designed for printing and offline reading.

[Introduction to Fluorescence Techniques](#)

[Chapter 1](#)

Fluorophores and Their Amine-Reactive Derivatives

[Chapter 2](#)

Thiol-Reactive Probes

[Chapter 3](#)

Reagents for Modifying Groups Other Than Thiols or Amines

[Chapter 4](#)

Biotin Derivatives and Haptens

[Chapter 5](#)

Crosslinking and Photoactivatable Reagents

[Chapter 6](#)

Ultrasensitive Detection Technology

[Chapter 7](#)

Antibodies, Avidins, Lectins and Related Products

[Chapter 8](#)

Nucleic Acid Detection and Genomics Technology

[Chapter 9](#)

Protein Detection and Proteomics Technology

[Chapter 10](#)

Enzyme Substrates

[Chapter 14](#)

Fluorescent Tracers of Cell Morphology and Fluid Flow

[Chapter 15](#)

Assays for Cell Viability, Proliferation and Function

[Chapter 16](#)

Probes for Endocytosis, Receptors and Ion Channels

[Chapter 17](#)

Probes for Signal Transduction

[Chapter 18](#)

Probes for Reactive Oxygen Species, Including Nitric Oxide

[Chapter 19](#)

Indicators for Ca²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺ and Other Ions

[Chapter 20](#)

pH Indicators

[Chapter 21](#)

Indicators for Na⁺, K⁺, Cl⁻ and Miscellaneous Ions

[Chapter 22](#)

Probes for Membrane Potential

[Chapter 23](#)

Accessories and Resources

Technical Notes and Product Highlights

Handbook Search:

 Search

[Tips](#) · [Advanced](#)

Additional Links

- ▶ [Recent Updates to The Handbook, Web Edition](#)
- ▶ [Errata for the Handbook, Ninth Edition](#)
- ▶ [How to Use The Handbook](#)
- ▶ [Master Product List](#)

Quick-Select Chapter Pad

The Handbook

Introduction to Fluorescence Techniques

- 1. Fluorophores and Their Amine-Reactive Derivatives**
- 2. Thiol-Reactive Probes**
- 3. Reagents for Modifying Groups Other Than Thiols or Amines**
- 4. Biotin Derivatives and Haptens**
- 5. Crosslinking and Photoactivatable Reagents**
- 6. Ultrasensitive Detection Technology**
- 7. Antibodies, Avidins, Lectins and Related Products**
- 8. Nucleic Acid Detection and Genomics Technology**
- 9. Protein Detection and Proteomics Technology**
- 10. Enzyme Substrates**
- 11. Probes for Cytoskeletal Proteins**
- 12. Probes for Organelles**
- 13. Probes for Lipids and Membranes**

The Handbook

- 14. Fluorescent Tracers of Cell Morphology and Fluid Flow**
- 15. Assays for Cell Viability, Proliferation and Function**
- 16. Probes for Endocytosis, Receptors and Ion Channels**
- 17. Probes for Signal Transduction**
- 18. Probes for Reactive Oxygen Species, Including Nitric Oxide**
- 19. Indicators for Ca{++}, Mg{++}, Zn{++} and Other Metal Ions**
- 20. pH Indicators**
- 21. Indicators for Na{+}, K{+}, Cl{-} and Miscellaneous Ions**
- 22. Probes for Membrane Potential**

Accessories and Resources

Technical Notes and Product Highlights

List of Tables

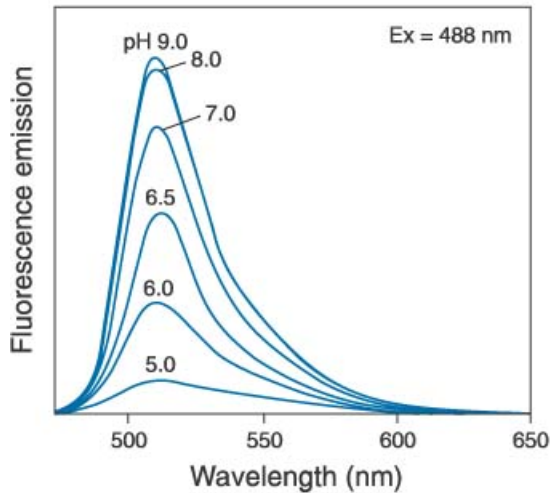
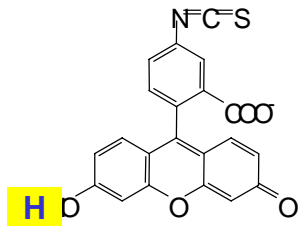
List of Figures

Einfache Beispiele

- pH-Indikatoren

FITC

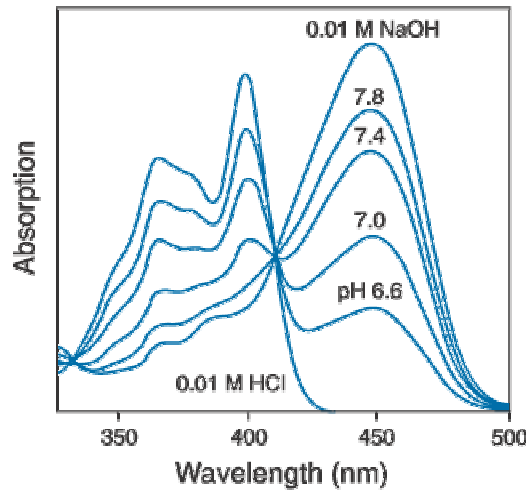
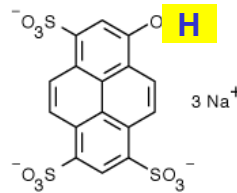
Fluoresceinisothiocyanat



Eichung separat

HPTS

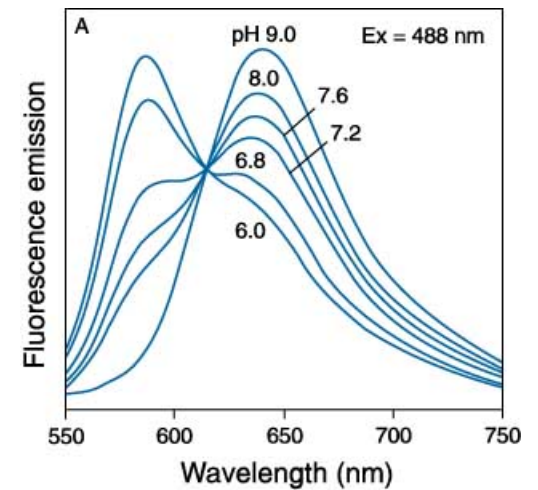
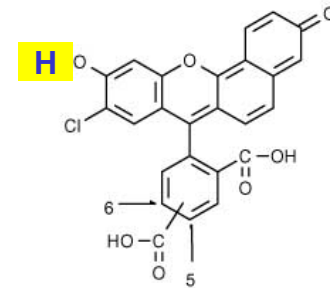
Hydroxypyrentrisulfonic acid



Eichung durch Ratio Ex_{400} / Ex_{450}

SNARF

Semna[®]phthorhodaf[®]luors



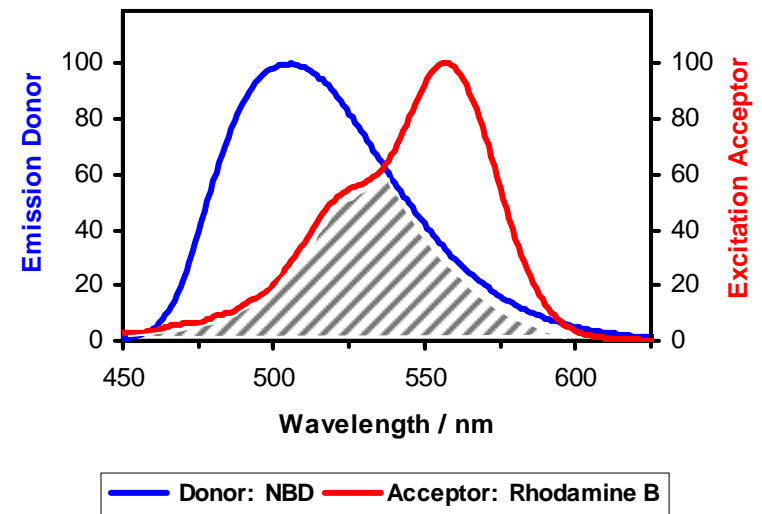
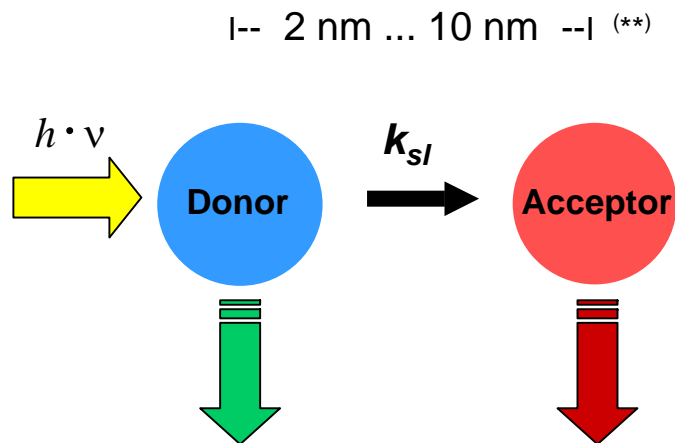
Eichung direkt Em_{580} / Em_{640}

Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer – FRET (*)

Ein FRET erfolgt, wenn ein Fluoreszenz **donor** sich nahe zu einem Fluoreszenz **akzeptor** befindet

und

sich ihre **Emissions-** und **Excitations** spektren überlappen.



(**) = typische Distanzen in biologischen Systemen: Proteine, Membranen, ...

(*) Förster (1948) Ann Phys (Leipzig) 2, 55-75

FRET ist sehr empfindlich auf Distanzänderungen, da Effizienz $\sim r^{-6}$!

$$k_T = \left(\frac{1}{\tau_0} \right) \left(\frac{R_0}{r} \right)^6$$

k_T : rate of energy transfer
 τ_0 : donor's excited state lifetime
 R_0 : distance where the transfer efficiency is 0.50, „Förster distance“

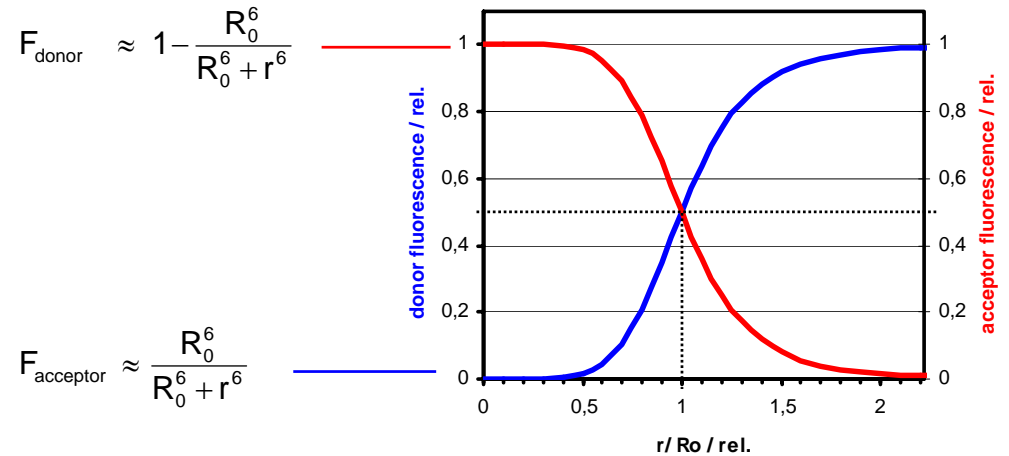
$$R_0 = (J \kappa^2 Q_0 n^{-4})^{1/6} \times 9.786 \times 10^3$$

J : overlap integral

κ^2 : dipole-dipole orientation factor

Q_0 : quantum yield of donor

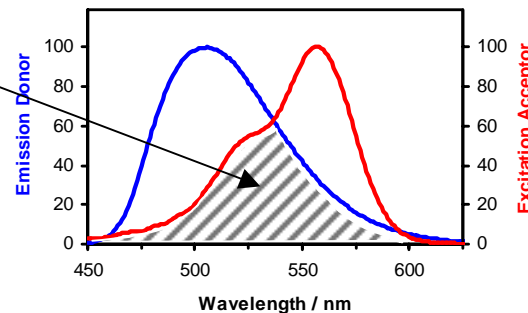
n : index of refraction



$$J = \int_0^{\infty} A(\lambda) E(\lambda) \lambda^4 d\lambda / \int_0^{\infty} E(\lambda) d\lambda$$

$A(\lambda)$: absorbance spectrum of acceptor ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

$E(\lambda)$: corrected fluorescence emission spectrum of donor



Förster-Abstände für verschiedene Donor - / Akzeptor - Paare

Table 13.3. Representative Förster Distances for Various Donor–Acceptor Pairs^{a,b}

Donor	Acceptor	R_0 (Å)	Reference
Naphthalene	Dansyl	22	12
Dansyl	FITC	33–41	82
Dansyl	ODR	43	12
ϵ -A	NBD	38	12
IAF	TMR	37–50	12
Pyrene	Coumarin	39	12
FITC	TMR	49–54	12
IAEDANS	FITC	49	12
IAEDANS	IAF	46–56	12
IAF	EIA	46	12
BODIPY	BODIPY	57	21
BPE	Cy5	72	12
Terbium	Rhodamine	65	23
Europium	Cy5	70	79
Europium	APC	90	83

^aValues are from Refs. 12, 20, 23, 79, 82, and 83, which should be consulted for further details.

^bAbbreviations: Dansyl, 5-dimethylamino-1-naphthalenesulfonic acid; ϵ -A, 1-*N*⁶-ethenoadenosine; IAF, 5-(iodoacetamido)fluorescein; FITC, fluorescein 5-isothiocyanate; IAEDANS, 5-(((2-iodoacetyl)amino)ethyl)amino naphthalene-1-sulfonic acid; CF, carboxyfluorescein, succinimidyl ester; BODIPY, 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene; BPE, B-phycoerythrin; ODR, octadecyl-rhodamine; NBD, 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl; TMR, tetramethylrhodamine; EIA, 5-(iodoacetamido)eosin; TR, Texas Red; Cy5, carboxymethylindocyanine-*N*-hydroxysuccinimidyl ester; APC, allophycocyanin.

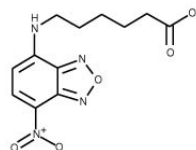
Table 13.4. Förster Distances for Tryptophan–Acceptor Pairs^a

Acceptor ^b	R_0 (Å)
Nitrobenzoyl	16
Dansyl	21–24
IAEDANS	22
Anthroyloxy	24
TNB	24
Anthroyl	25
Tyr-NO ₂	26
Pyrene	28
Heme	29
NBS	30
DNBS	33
DPH	40

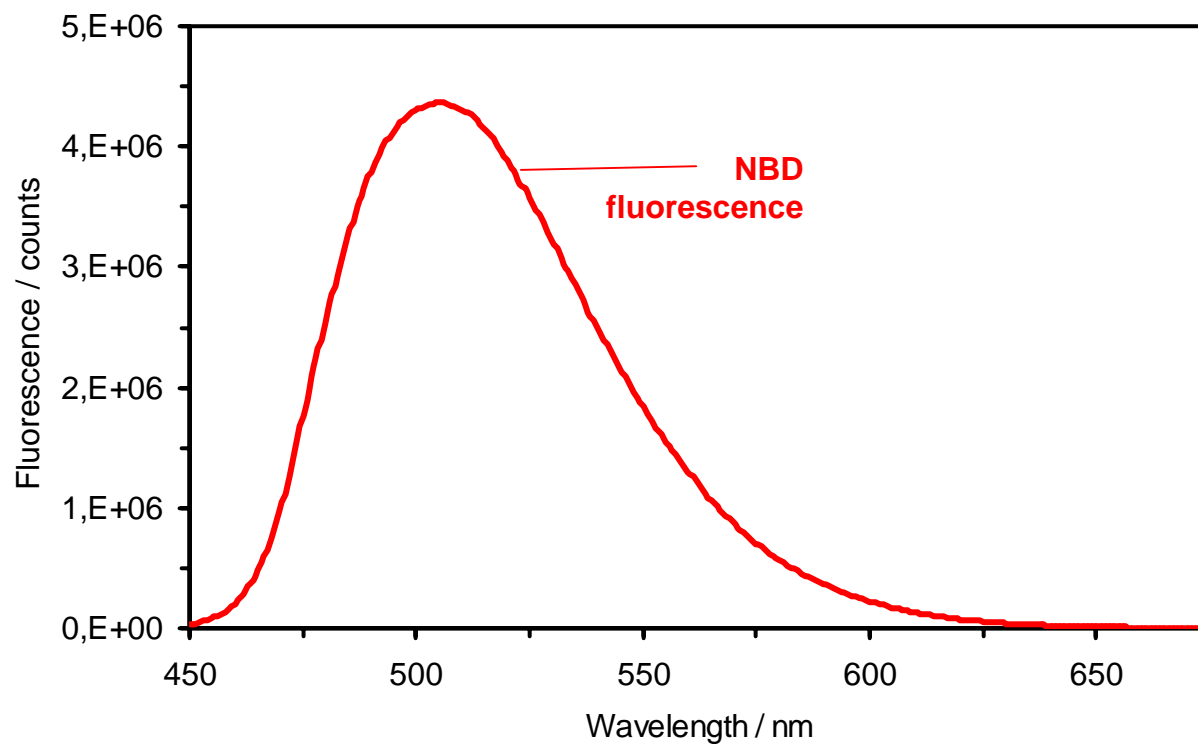
^aFrom Ref. 12.

^bAbbreviations: Dansyl, 5-dimethylamino-1-naphthalenesulfonic acid; IAEDANS, 5-(((2-iodoacetyl)amino)ethyl)amino)naphthalene-1-sulfonic acid; TNB, trinitrophenyl; NBS, nitrobenzenesulfenyl; DNBS, dinitrobenzenesulfenyl; DPH, 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene.

FRET Simulation

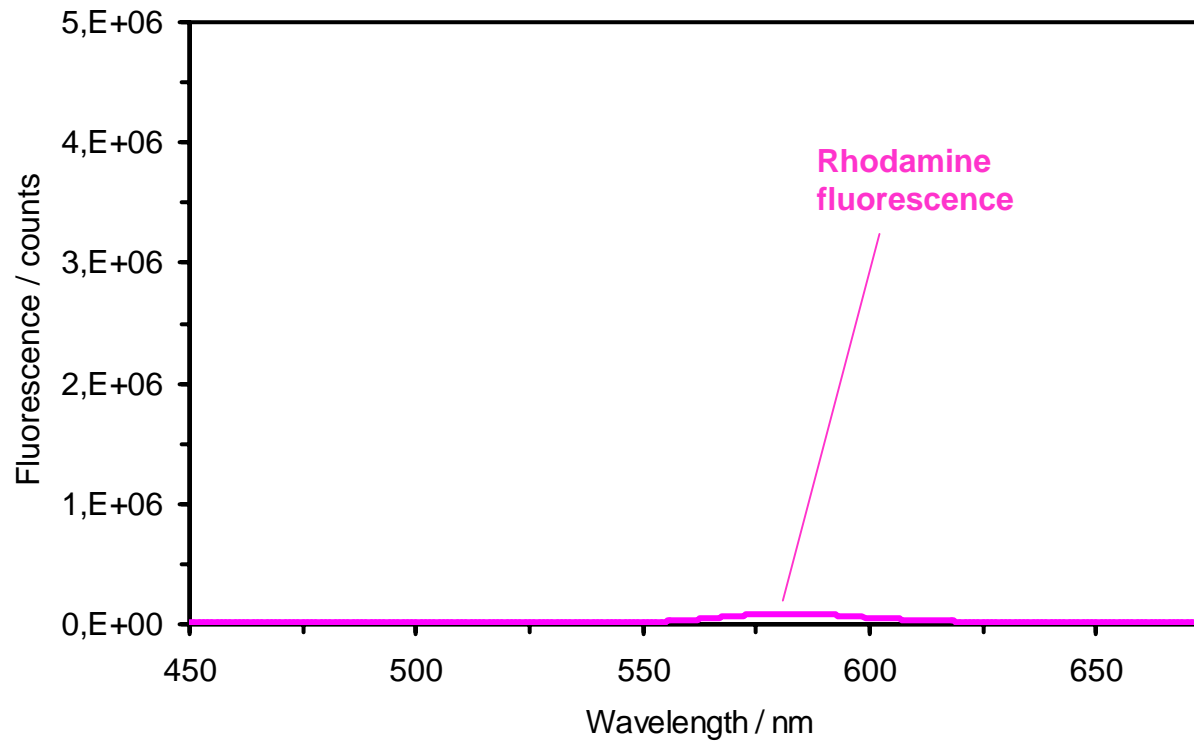


Donor : Nitrobenzoxadiazole (NBD), $\lambda_{\text{exc}} = 440 \text{ nm}$



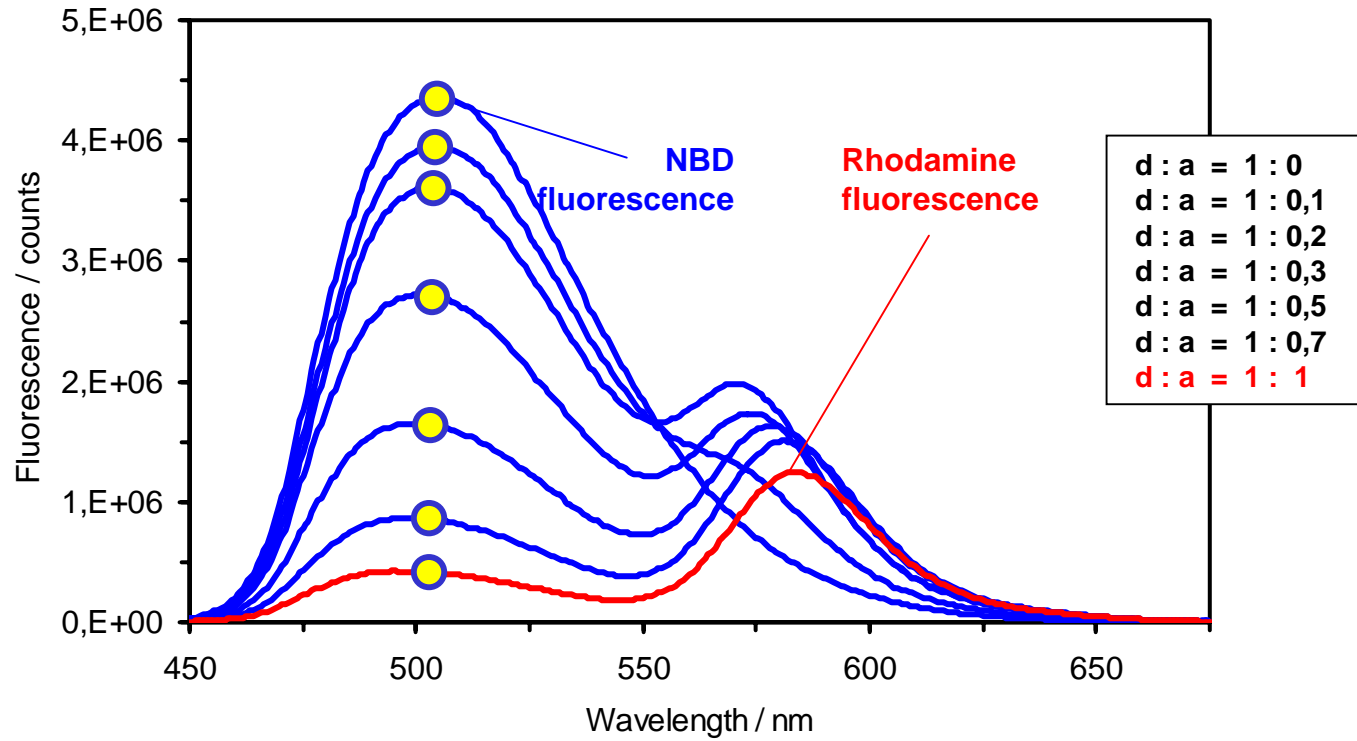

FRET Simulation

Akzeptor : Rhodamin B, $\lambda_{\text{exc}} = 440 \text{ nm}$

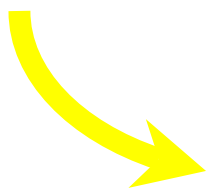
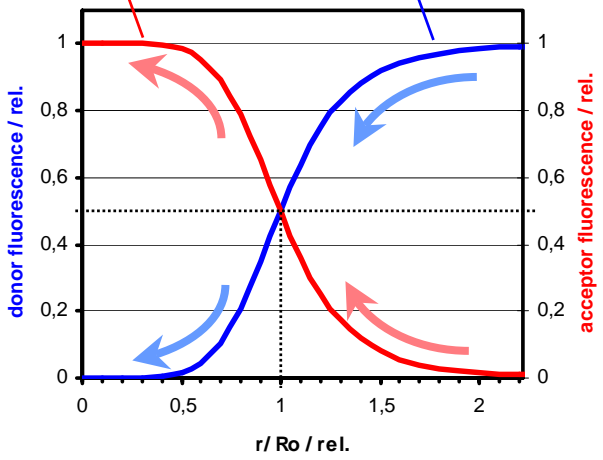


FRET Simulation

abnehmender Abstand
Donor Fluoreszenz nimmt ab

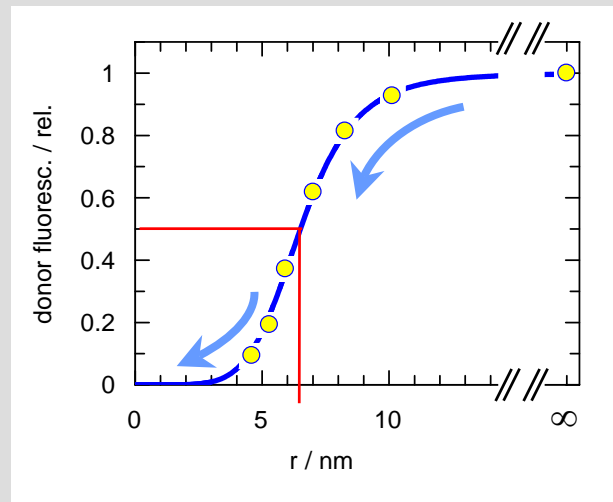


$$F_{\text{acceptor}} \approx \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad F_{\text{donor}} \approx 1 - \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6}$$



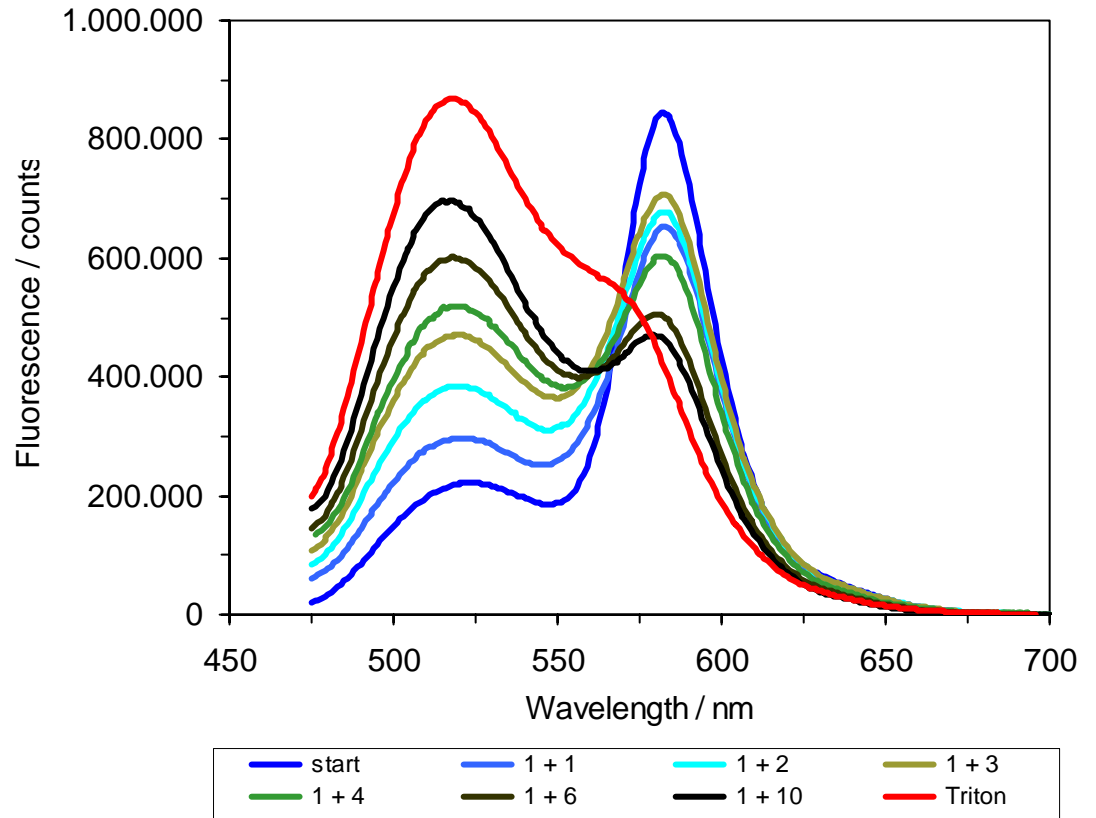
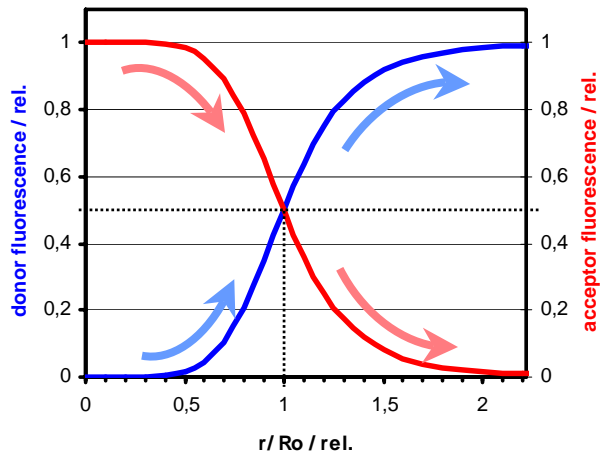
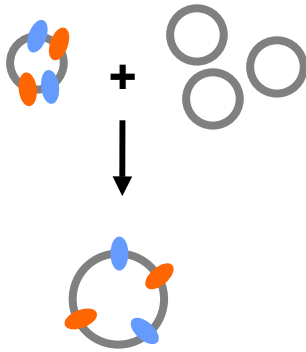
Data from polymer films

donor NBD
acceptor Rhodamine B

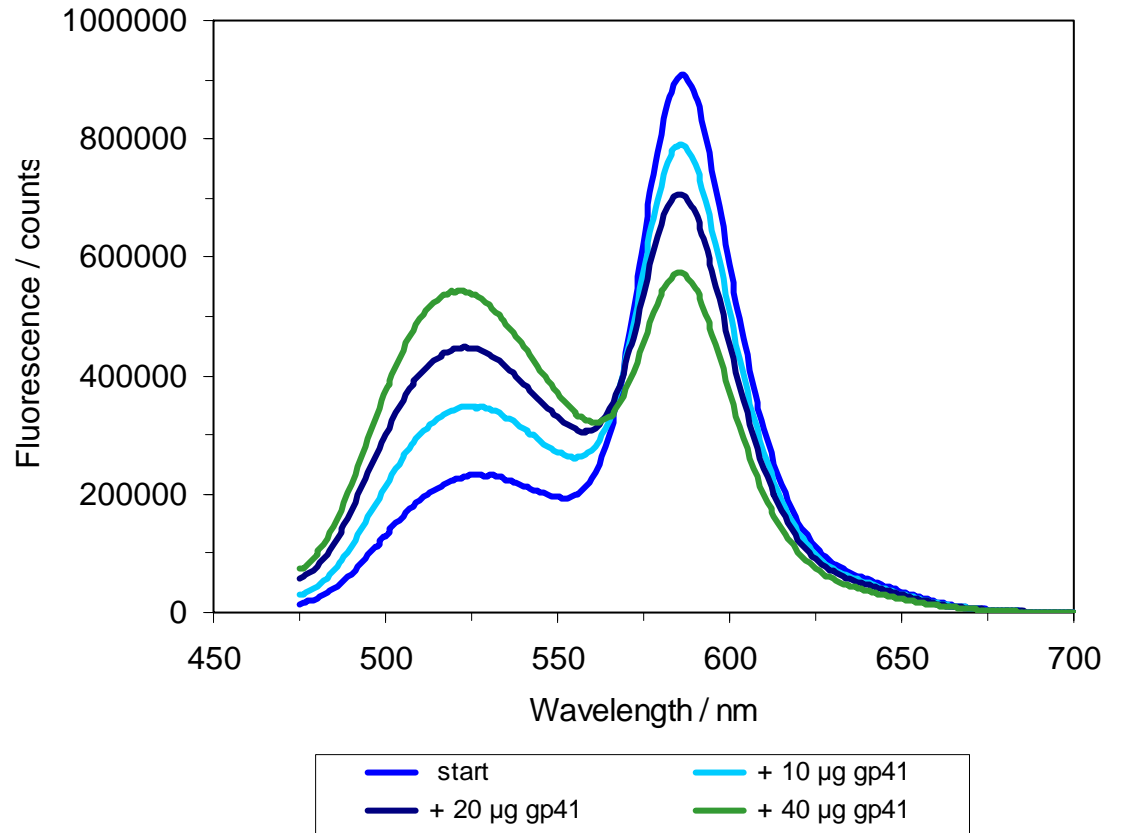
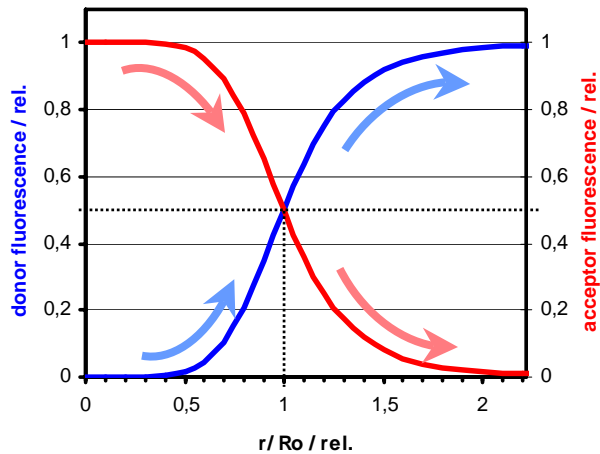
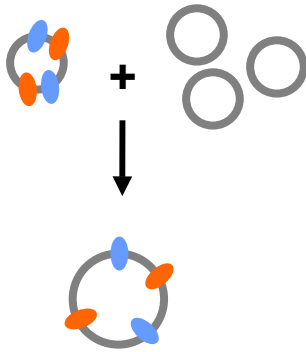


Fit :
 $R_0 = 6.51 \pm 0.01 \text{ nm}$

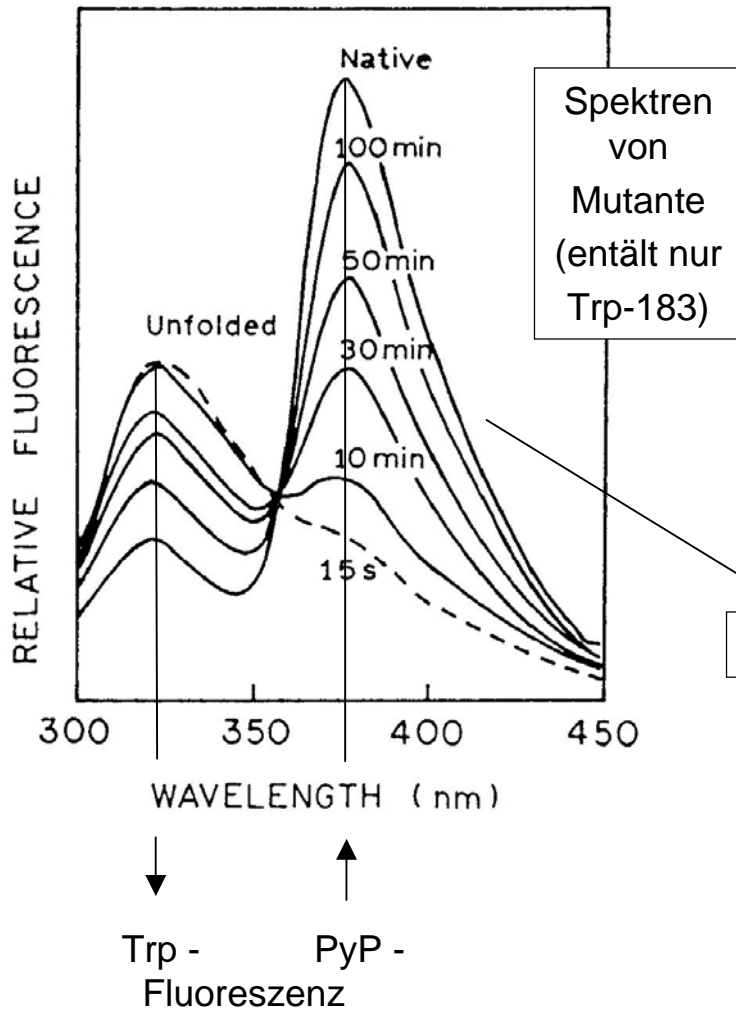
FRET Beispiel – Ca^{++} - induzierte Fusion von Lipid-Vesikeln



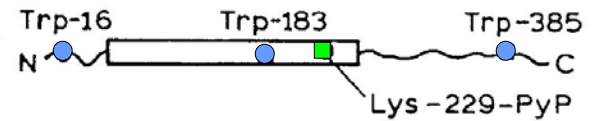
FRET Beispiel – gp41 – induzierte Fusion von Lipid-Vesikeln



Beispiel FRET – Proteinfaltung



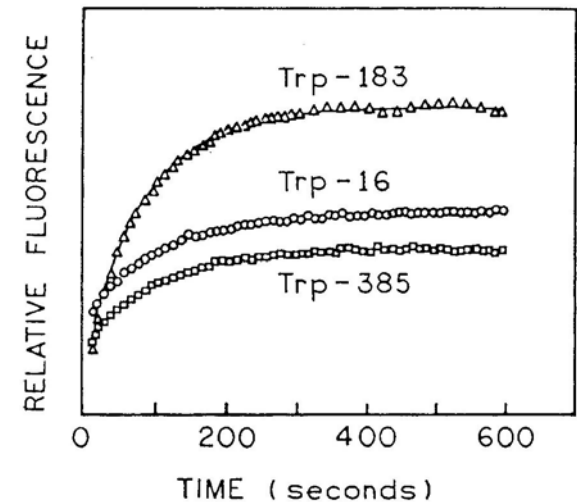
Hydroxymethyltransferase



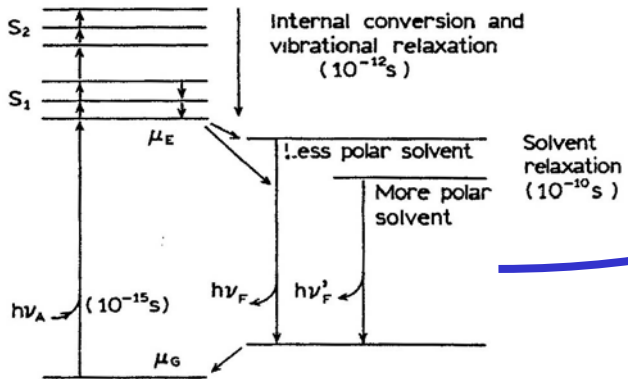
Donor: Trp-16, Trp-183 oder Trp-385

Akzeptor: Lys-229 (gelabelt, Pyridoxyl-5'-phosphat, PyP)

Kinetik

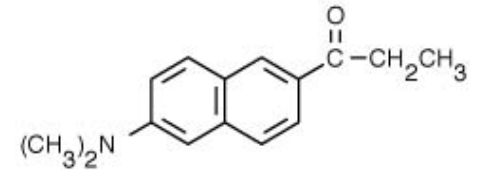


Lösemittel- / Umgebungseffekte auf Emissionsspektren



i.A. unpolares LM → polares LM → **Rotshift**

Beispiel: Prodan (*)

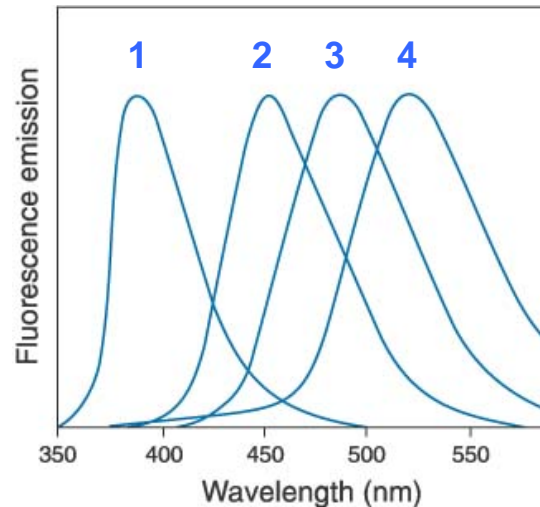


Jablonski Diagramm

Beschreibung / Theorie LM-Effekte
(für Spezialisten)

Lippert-Gleichung

$$\bar{\nu}_a - \bar{\nu}_F = \frac{2}{hc} \left(\frac{\epsilon - 1}{2\epsilon + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1} \right) \frac{(\mu_E - \mu_G)^2}{a^3} + \text{const.}$$



- 1 Cyclohexan
- 2 DMF
- 3 EtOH
- 4 H₂O

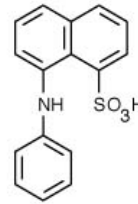
(*) 6-propionyl-2-dimethylaminonaphthalen

Table 6.4. Spectral Properties of Well-Known Solvent-Sensitive Probes^a

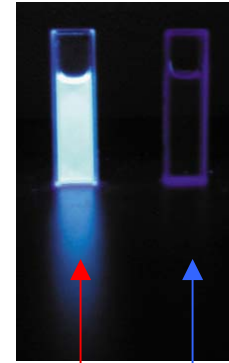
Probe ^b	λ_{abs} (nm) [ϵ , ($M^{-1} \text{cm}^{-1}$)]	λ_F (nm) in CHCl_3	λ_F (nm) in MeOH	$\Delta\lambda_F$ (nm)
Dapoxyl SEDA	373 (28,000)	584	509	71
Dansyl EDA	335 (4,600)	526	499	27
ADMAN	360 (15,000)	499	440	59
Prodan	361 (16,000)	498	440	58
1,8-ANS	372 (7,800)	480	490	-10
2,6-ANS	319 (27,000)	422	410	12
7-Ethoxycoumarin	324 (11,000)	399	385	4

^a From Ref. 93.

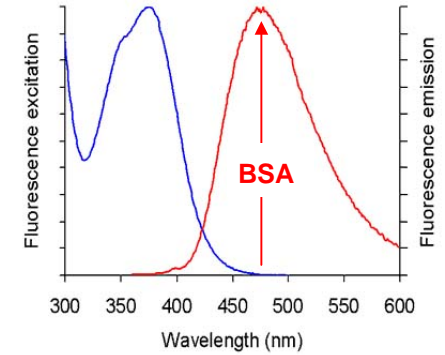
^b Dapoxyl SEDA, Daproxyl sulfonyl ethylenediamine; Dansyl EDA, dansyl ethylenediamine; ADMAN, 6-acetyl-2-dimethylaminonaphthalene; Prodan, 6-propionyl-2-(dimethylamino)naphthalene; 1,8-ANS, 8-anilinonaphthalene-1-sulfonic acid; 2,6-ANS, 6-anilinonaphthalene-2-sulfonic acid.



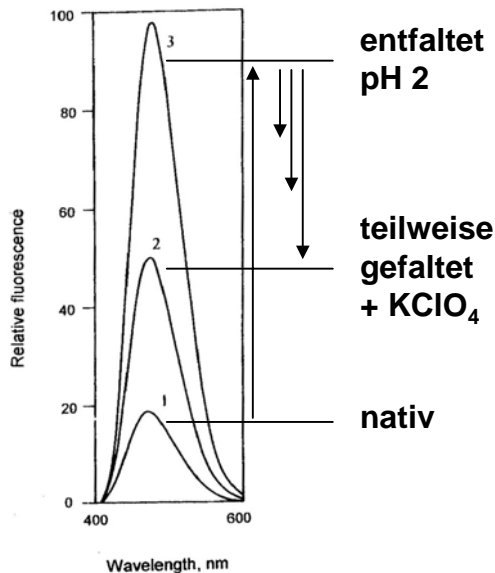
ANS –
Anilino-
naphthalen-
sulfonsäure



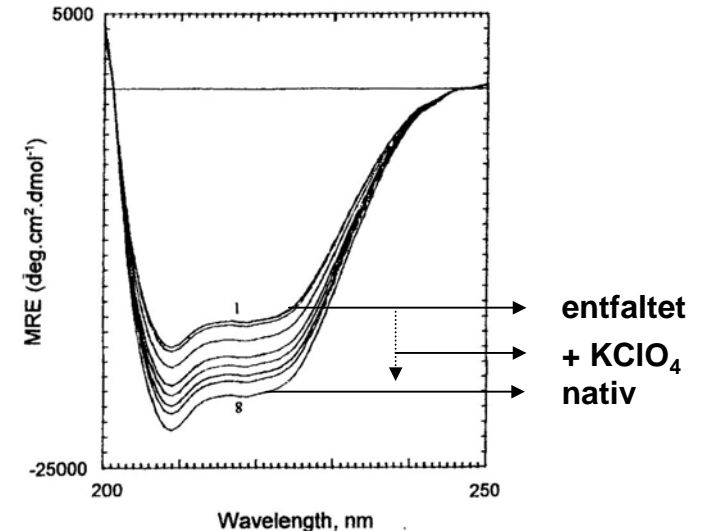
BSA Puffer



Anwendung (*): Proteinfaltung (HSA)

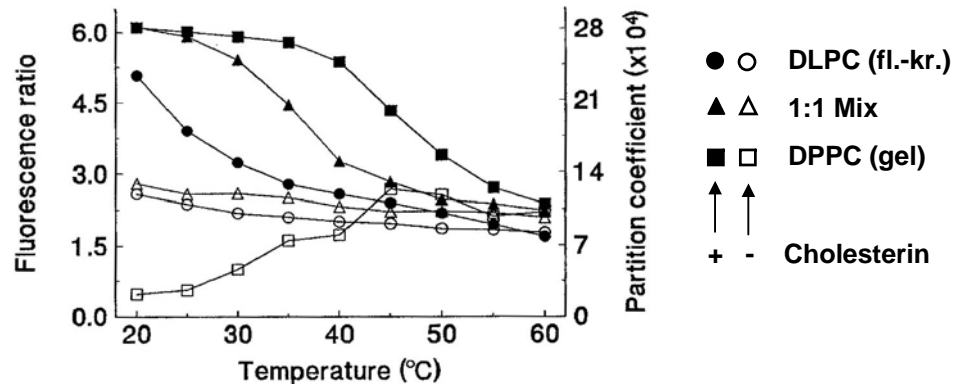
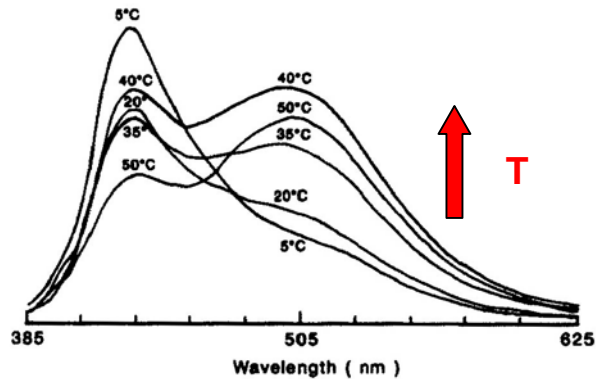
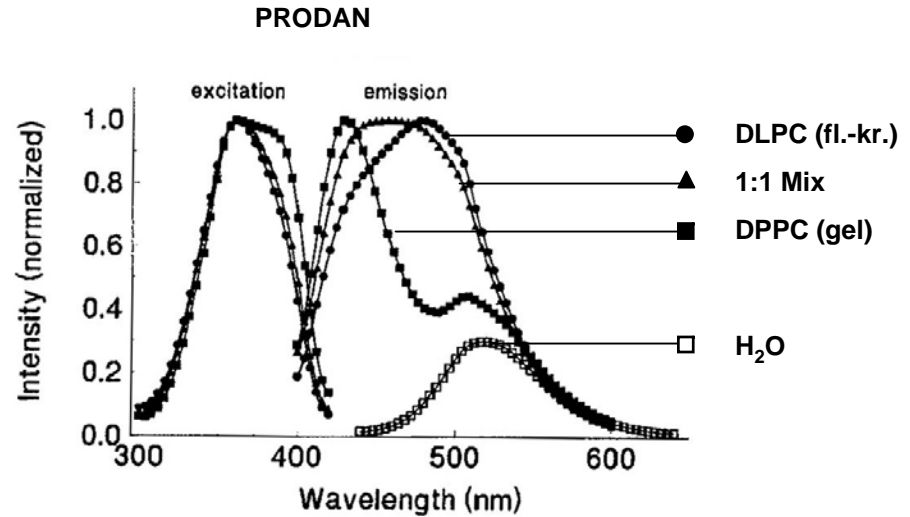
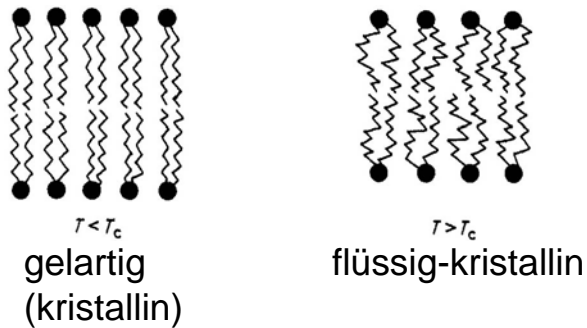


**Fluoreszenz-
messungen
ergänzt durch
CD-Untersu-
chungen:**



(* Muzammil et al. BBA (2000) 1476, 139-148

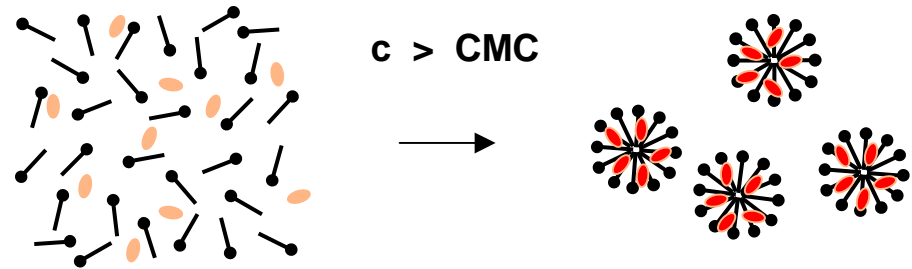
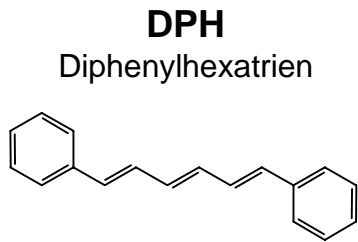
Anwendung: Lipidphase / Lipid – Zusammensetzung (*) (**)



(*) Rottenberg Biochemistry (1992) 31,9473-9481

(**) Krasnowska et al. BBA (2001) 1511, 330-340

Beispiel: Bestimmung CMC mit DPH



Detergens –
Monomere

Detergens –
Mizellen

A. Chattopadhyay, K.G. Harikumar/FEBS Letters 391 (1996) 199–202

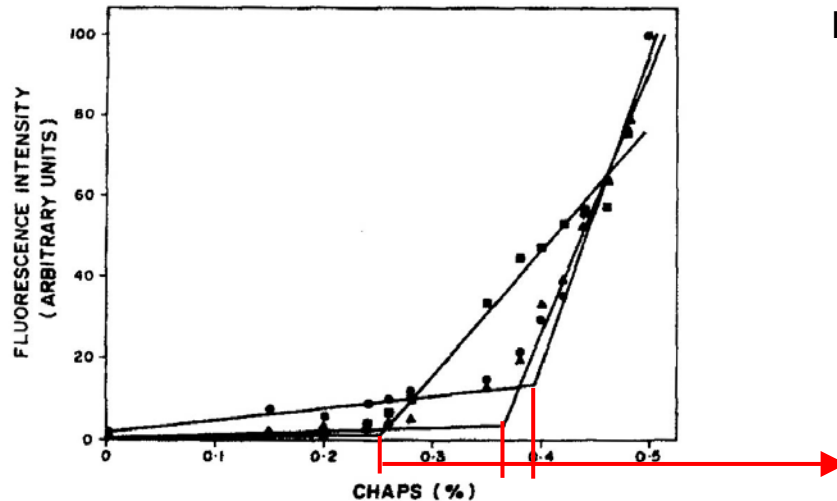
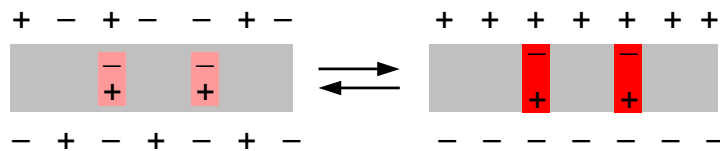
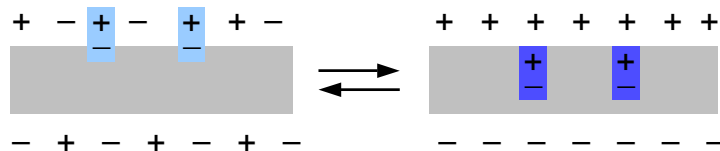


Fig. 1. DPH fluorescence as a function of concentration of CHAPS for 0 (●), 0.2 (▲), and 1.5 M (■) NaCl. The fluorescence scale is in arbitrary units, and the maximum fluorescence for each concentration of NaCl has been assigned a value of 100. See Section 2 for other details.

Table 1
CMC of CHAPS as a function of salt concentration

NaCl concentration(mM)	CMC (%)	CMC (mM)
0	0.394	6.41
100	0.382	6.21
200	0.365	5.94
500	0.347	5.64
1000	0.267	4.34
1500	0.252	4.10

Fluoreszenzfarbstoffe für Membran-Potenzial



zwei „Klassen“

(A) „slow responding“

Mechanismus: polaritäts-sensitiv,
FS „taucht“ in Membran ein,
empfindlich ΔF bis 100%,
z.B. Carbocyanine, Oxonole,
Rhodamin, Merocyanin

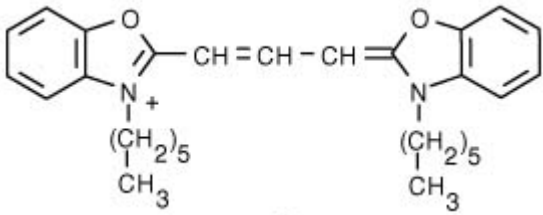
(B) „fast responding“

Mechanismus: direkt auf el. Feld
ansprechend - Stark-Effekt (*),
weniger empfindlich ΔF max. 10%,
z.B. Styryl-FS, RH-FS (Rina
Hildesheim), impermeables
Oxonol

(*) Feldstärke über Lipid-Membran:

$d = 5 \text{ nm}$, $U = 100 \text{ mV}$

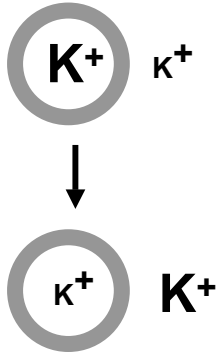
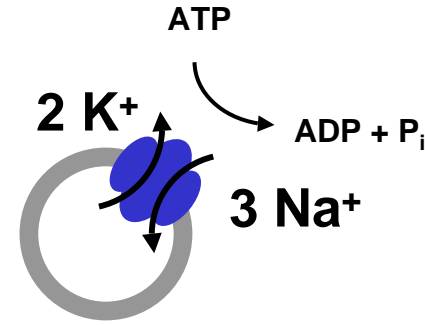
→ $E = 2 \times 10^8 \text{ V/cm !!!}$



Beispiel A : Carbocyanin Farbstoff

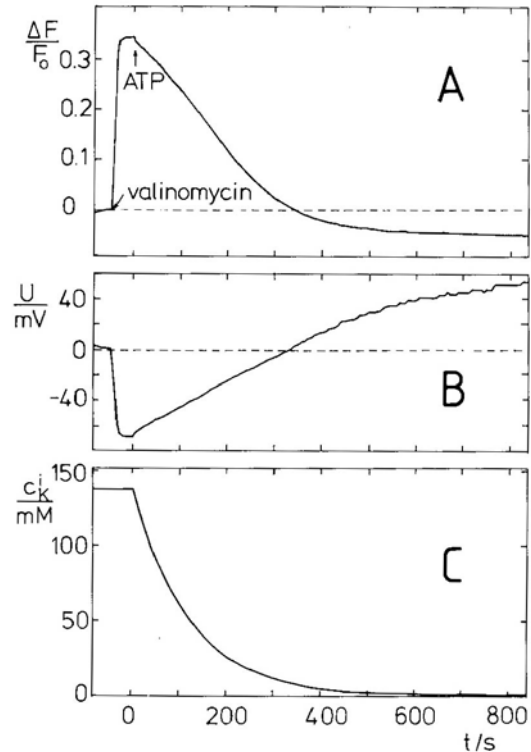
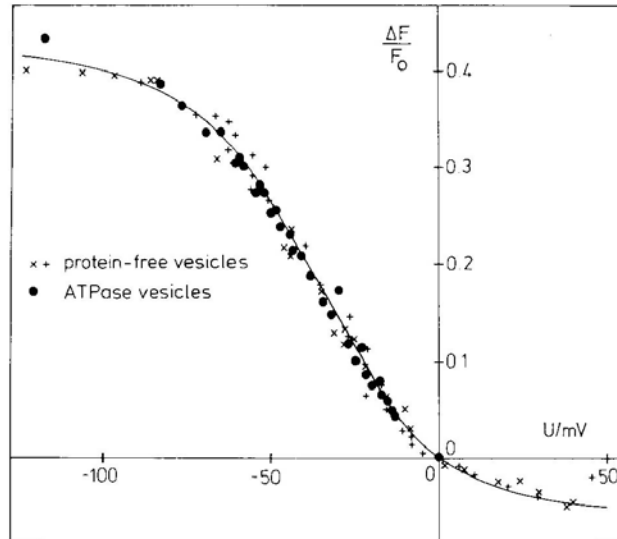
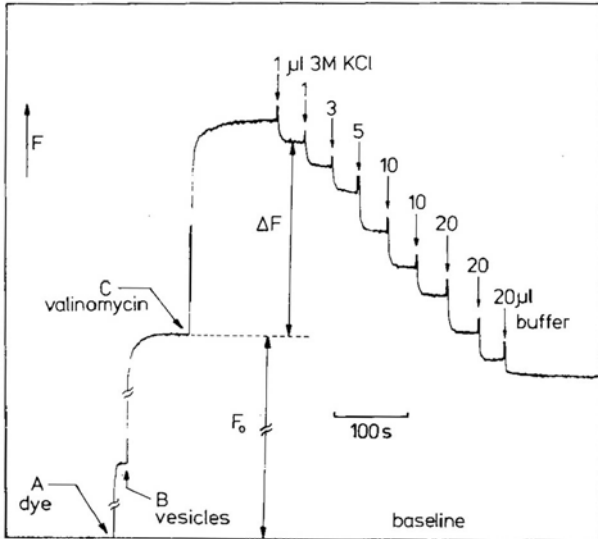
Anwendung:

Untersuchung Na,K-ATPase (*)

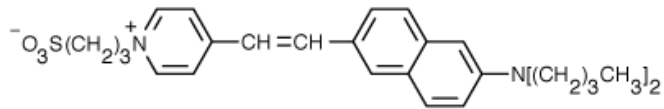


Eichung FS

$$U \equiv \Psi_i - \Psi_a = \frac{RT}{F} \ln \frac{c_K^e}{c_K^i} \quad (\text{Nernst Potenzial})$$

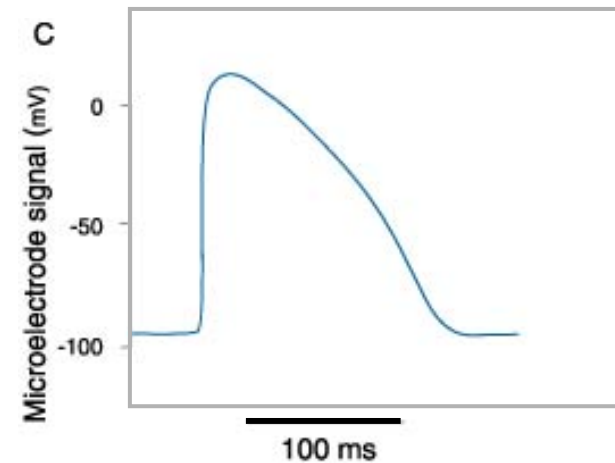
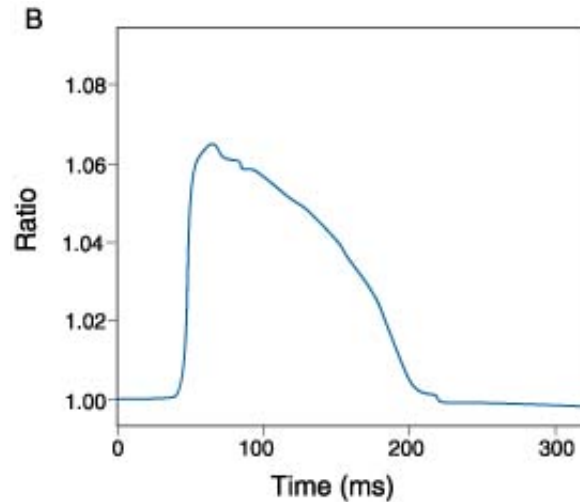
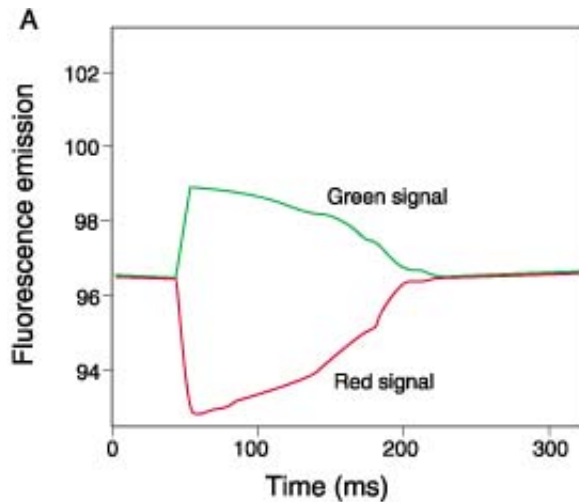
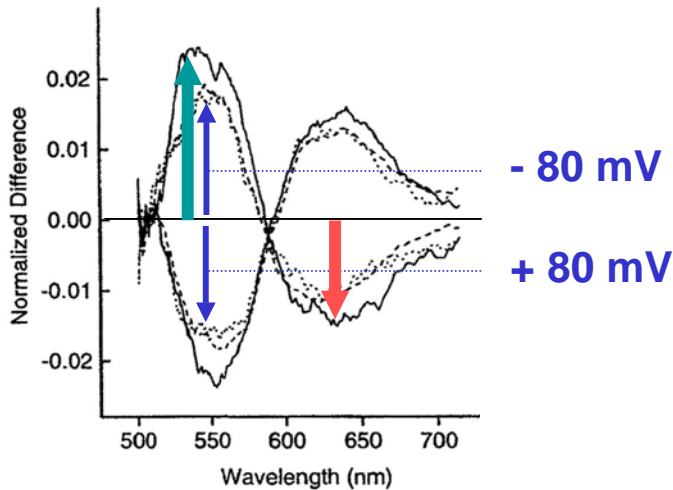


(*) Appell et al. BBA (1985) 85, 49-63

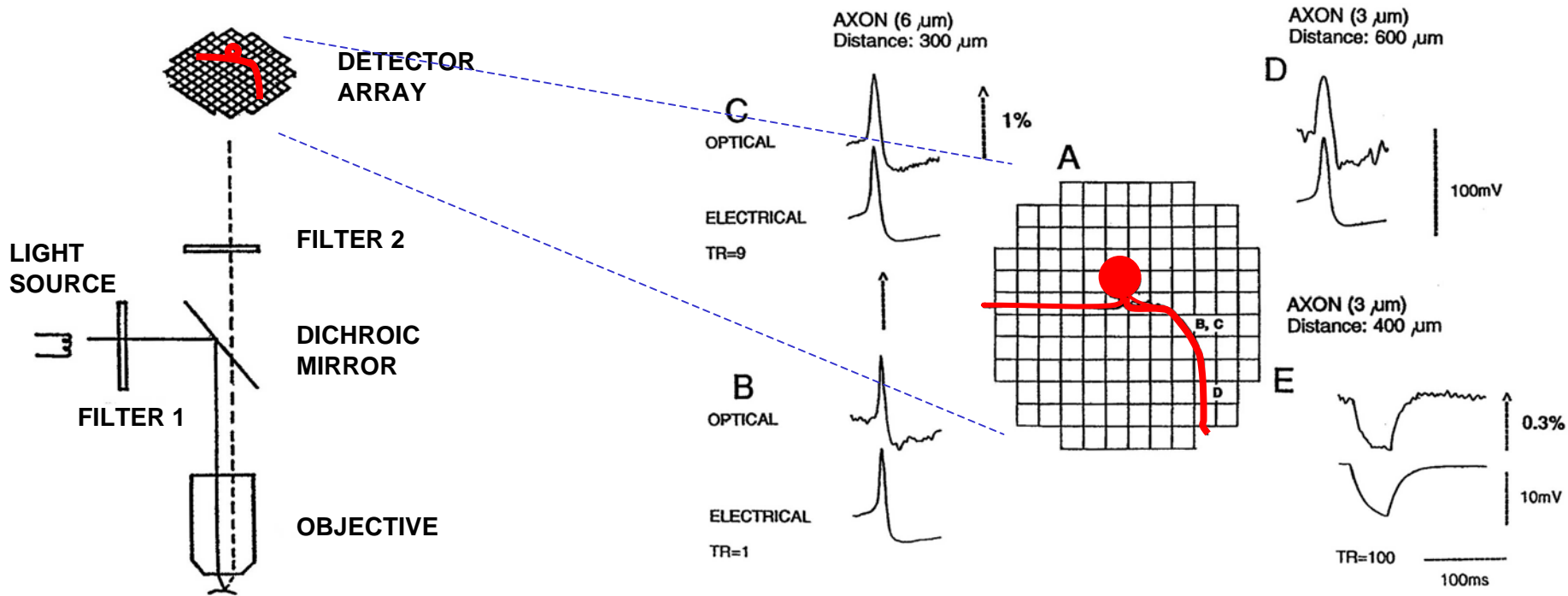


Beispiel B: Aminonaphthylethylpyridinium (ANEP dyes)

- (nur) einige % $\Delta F / 100 \text{ mV}$
- sub-Millisekunden Ansprechen
- sensitiv auf umgebendes elektrisches Feld (Stark – Effekt)



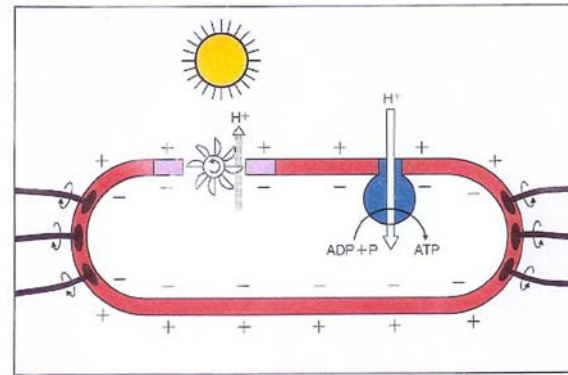
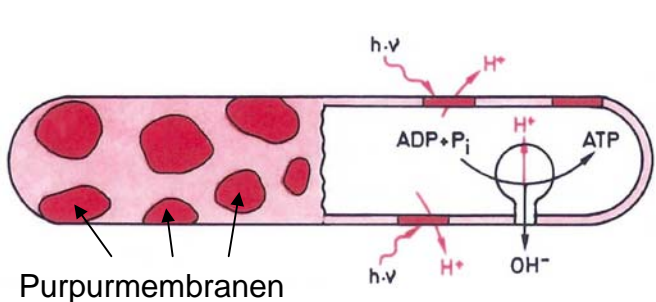
Optische Potenzialmessung an Nervenzellen (*)



(*) Antic and Zecevic, J Neuroscience (1995) 15, 1392-1405

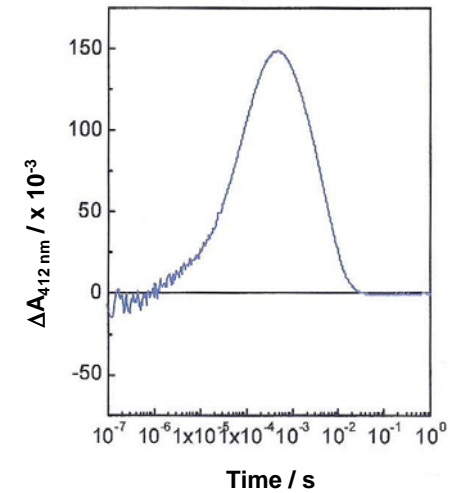
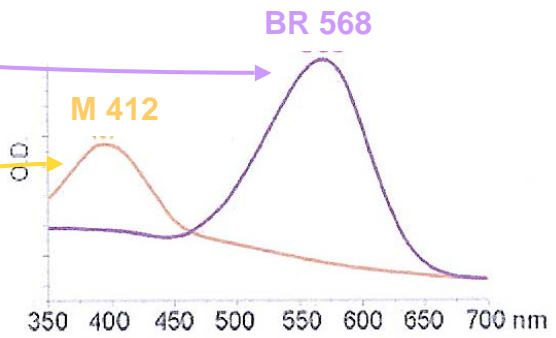
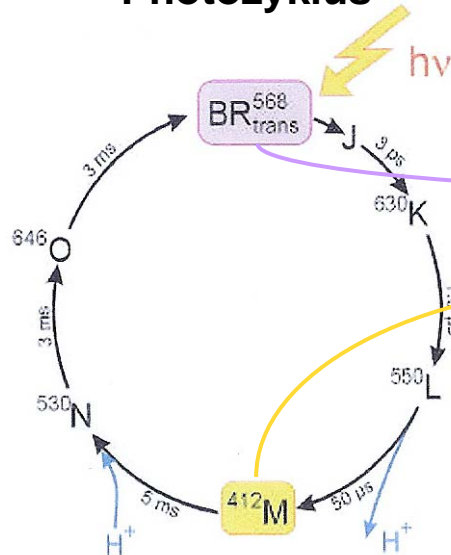
Beispiel: Transiente Protonierungen

Bacteriorhodopsin: Lichtgetriebene Protonenpumpe im *Halobacterium salinarum*



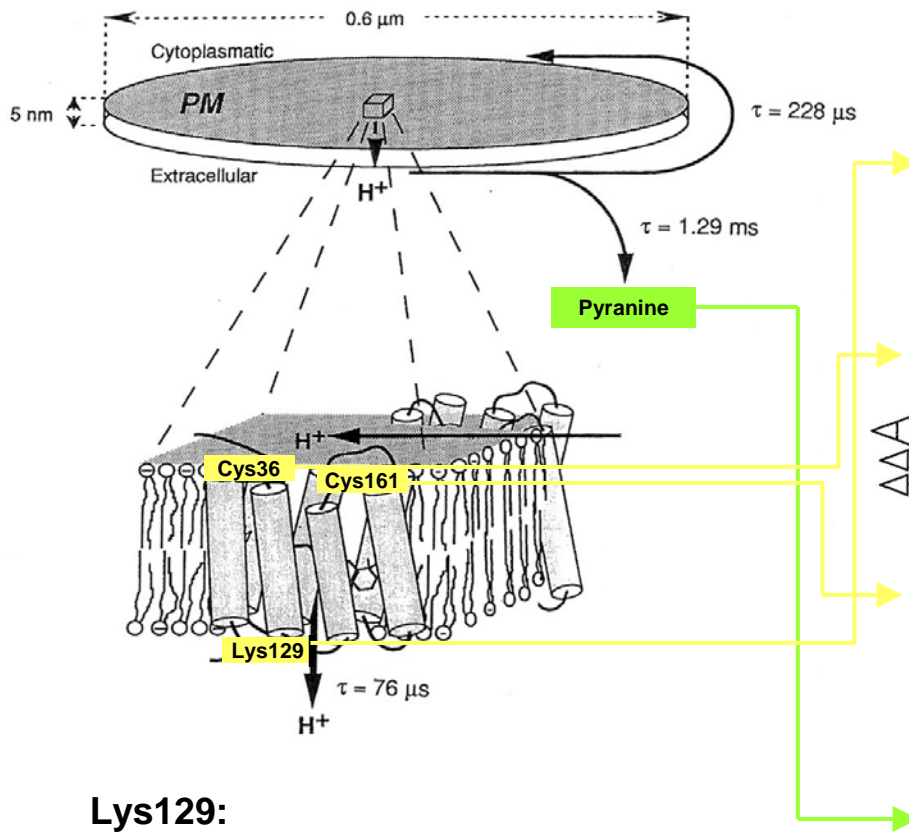
Bei Nährstoffmangel
phototrophe Energie-
Versorgung:
 H^+ -Gradient \rightarrow
ATP-Synthese

Photozyklus



Wie korreliert Protonenabgabe / -aufnahme mit M_{412} ?

Protonenabgabe und -diffusion an/auf BR-Membran (*)



Lys129:

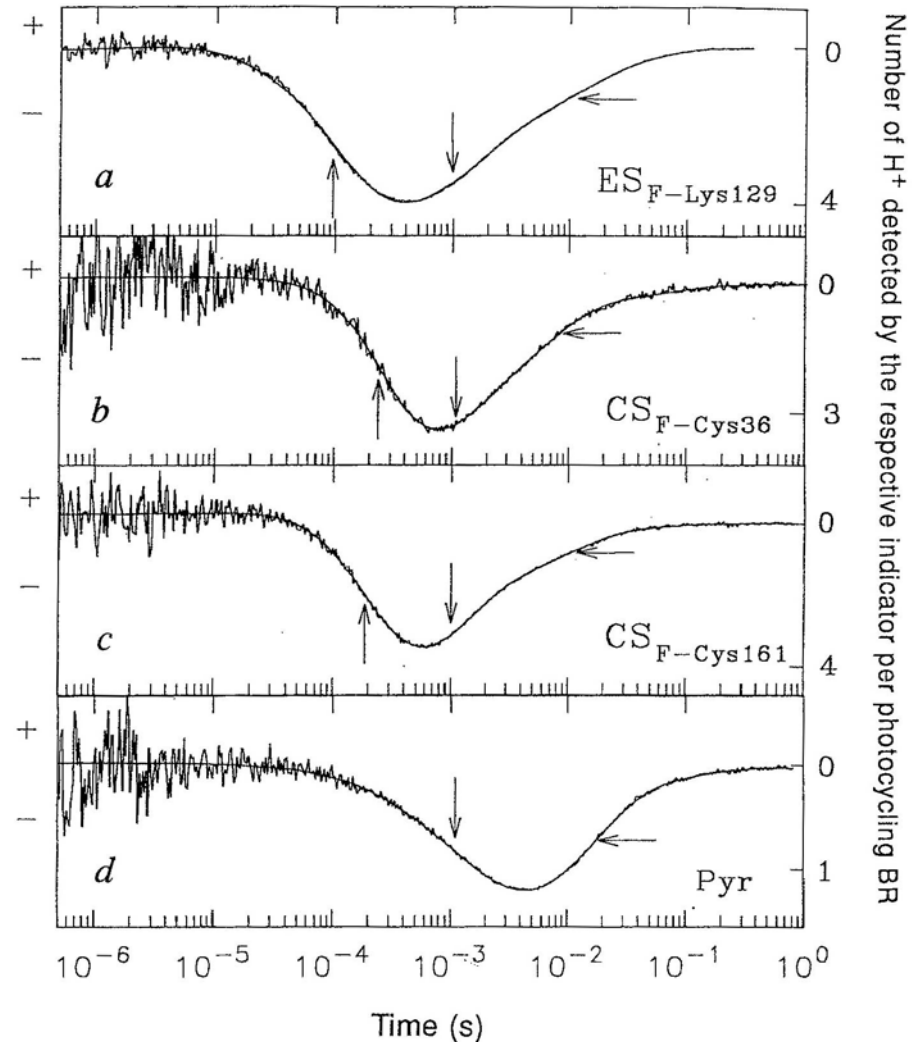
H⁺-Abgabe extrazellulär τ = 76 μs

Cys36 / Cys161:

H⁺-Diffusion entlang Membran τ = 228 μs

Pyranin:

H⁺ extrazellulär τ = 1,29 ms



Number of H⁺ detected by the respective indicator per photocycling BR

(*) Heberle et al. , Nature (1994) 370, 379-382