

Praktikumsanleitung zur
**Fourier–Transform Infrarotspektroskopie
an Proteinen**

Fortgeschrittenen-Praktikum am
Institut für Angewandte Physik der
Universität Tübingen

Assistent: F. Zhang
Raum: C7 P28
Tel.: (07071) 29 75242



Tübingen
Oktober 2018

Inhaltsverzeichnis

1. Vorbemerkungen	4
1.1. Laserschutz	4
1.2. Lehr- und Lernziele	4
1.3. Vorkenntnisse	4
1.4. Leitfaden zur Vorbereitung	4
1.5. Literatur	5
2. Infrarotspektroskopie an Proteinen	6
2.1. Schwingung von Molekülen	6
2.2. Absorption im infraroten Spektralbereich	7
2.3. Aufbau von Proteinen	7
2.4. Infrarotspektroskopie an Proteinen	9
2.5. Absorptionsbanden der Peptidgruppe	10
2.6. Die Beiträge der Aminosäureseitenketten	11
3. Das Fourier–Transform Spektrometer	13
3.1. Das Interferogramm	13
3.2. Die Fourier–Transformation	15
3.3. Apodisation	15
3.4. Zerofilling	16
3.5. Auflösungsverbesserung	16
3.5.1. Höhere Ableitungen	16
3.5.2. Fourier-Selbstdekonvolution	16
3.5.3. Feinstrukturverstärkung	17
3.6. Durchführung einer Sekundärstrukturanalyse	17
3.7. Sekundärstrukturanteile einiger Proteine	18
4. Versuchsdurchführung	19
4.1. Präparation der Proben	20
4.2. Bedienung des FTIR	20
4.3. Vorversuche	21
4.4. Die Amid-I–Bande von Proteinen	21
5. Auswertung	22
5.1. Vorversuche	23
5.2. Die Amid-I–Bande von Proteinen	23
A. Anhang	25
A.1. Aufbau und Funktionsweise des IFS 48	25
A.2. Optische Dichte	26

A.3. Proben	26
A.3.1. Präparation der Proben	26
A.4. Gnuplot	27

1. Vorbemerkungen

1.1. Laserschutz

Achtung!

Sie arbeiten bei diesem Versuch mit einem Gerät, in dessen Inneren ein Laser (Klasse 3R) mit der Leistung von ~ 1 mW arbeitet. Gelangt der Laserstrahl ungeschwächt in Ihr Auge, so kann dieses geschädigt werden. Aus Gründen des Laserschutzes ist jede in der Versuchsanleitung nicht genannte Veränderung der Apparatur zu unterlassen.

Bitte beachten Sie jedoch, dass der Laser (mit einer Wellenlänge im sichtbaren Bereich) zur Justierung des beweglichen Spiegels dient und nicht zur IR-Spektroskopie selbst eingesetzt wird.

1.2. Lehr- und Lernziele

Ziel des Versuches ist es, Sie mit einem modernen Verfahren der Infrarotspektroskopie vertraut zu machen. Sie sollen mit Hilfe der Fourier-Transformation Infrarotspektroskopie die Sekundärstruktur von Proteinen untersuchen. Dabei lernen Sie auch wesentliche Schritte zur Präparation von biologischen Proben kennen.

1.3. Vorkenntnisse

Dieser Abschnitt soll Ihnen als Leitfaden für die Vorbereitung auf den Versuch dienen. Die weiter unten angeführten Punkte erheben durchaus nicht den Anspruch auf Vollständigkeit, sondern sollen Sie zum eigenständigen Durcharbeiten der einschlägigen Literatur animieren. Unter diesem Aspekt sind auch die Literaturangaben am Ende dieses Abschnittes zu verstehen.

1.4. Leitfaden zur Vorbereitung

1. Schwingung von Molekülen
2. Absorptionsbanden von Peptiden
3. Fourier-Transformation
4. Michelson-Interferometer
5. Fourier-Transformation Infrarotspektroskopie

1.5. Literatur

- Erwerb der Grundkenntnisse
 1. E. Hecht, *Optik*, Oldenburg, 2001.
 2. W. Demtröder, *Molekülphysik*, Oldenburg, 2003.
 3. F. Schreiber, *Physik der weichen und biologischen Materie*, Vorlesungsmanuskript, Universität Tübingen, 2018.
- Zur Vertiefung und Ergänzung
 1. H. Günzler, H.-U. Gremlich, *IR-Spektroskopie*, Wiley-VCH, 2003.
 2. A. Barth, C. Zscherp, *What vibrations tell us about proteins*, Quart. Rev. Biophys. 35(4), 369–430 (2002)
 3. J. L. R. Arrondo, A. Muga, J. Castresana and F. M. Goñi, *Quantitative studies of the structure of proteins in solution by fourier-transform infrared spectroscopy*, Prog. Biophys. Molec. Biol. 59(1) 23–56 (1993)
 4. E. Goormaghtigh, V. Cabiaux, J. M. Ruyschaert, *Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy*, Subcell. Biochem 23 329–450 (1994)
 5. W. K. Surewicz, H. H Mantsch, D. Chapman, *Determination of protein secondary structure by Fourier transform infrared spectroscopy: a critical assessment*, Biochem. 32(2), 389–394 (1993)

2. Infrarotspektroskopie an Proteinen

2.1. Schwingung von Molekülen

Die Wechselwirkung eines Moleküls mit einem Strahlungsfeld ist direkt proportional zum Dipolmoment des Moleküls (siehe auch Lehrbücher der Atom- und Molekülphysik). Absorption oder Emission von Strahlung wird deshalb nur beobachtet, wenn sich dabei das Dipolmoment des Moleküls verändert; Multipolübergänge höherer Ordnung werden hier nicht berücksichtigt. Entscheidend für die Beobachtung von Strahlung ist deshalb der Aufbau des Moleküls. So zeigen zweiatomige Moleküle mit gleichen Atomen (z.B. N_2 , O_2) bei Schwingungsanregung oder Rotation keine Änderung des Dipolmoments und damit keine Absorption oder Emission von Strahlung.

Die Anzahl der möglichen Schwingungsformen von mehratomigen Molekülen lässt sich auf einfache Art ableiten; Jedes einzelne Atom kann Bewegungen in den 3 Richtungen des Raumes ausführen, ein System von N Atomen verfügt deshalb über $3N$ Bewegungsfreiheitsgrade. Da jedoch 3 Bewegungskombinationen zu Rotationen um den Massenschwerpunkt und weitere 3 Bewegungskombinationen zu Translationen des Massenschwerpunktes führen, beträgt die Zahl der Schwingungsfreiheitsgrade Z nur noch $3N - 6$. Bei linearen Molekülen kommen nur 2 Rotationsfreiheitsgrade vor, da die Rotation um die Molekülachse mit keiner Bewegung der Atome oder des Massenschwerpunktes verbunden ist. In diesem Fall gibt es deshalb $Z = 3N - 5$ Schwingungsfreiheitsgrade. Für jeden dieser Schwingungsfreiheitsgrade findet man eine sogenannte Normalmode. Hierbei schwingen die an der Normalmode beteiligten Atome mit der gleichen Frequenz und fester Phase zueinander. Jeder Normalmode ist eine bestimmte Schwingungsfrequenz zugeordnet.

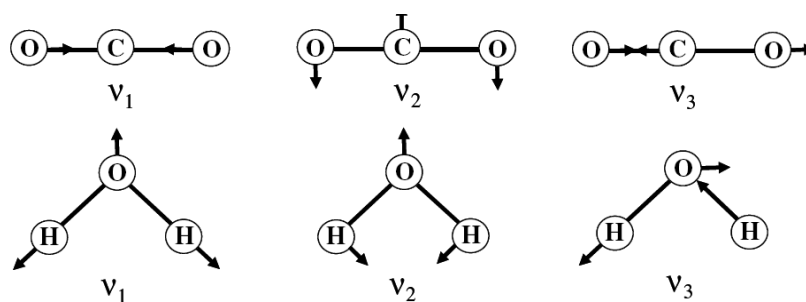


Abbildung 2.1.: Normalmoden der Moleküle CO_2 und H_2O . Oben CO_2 : symmetrische Streckschwingung $\tilde{\nu}_1 = 1337 \text{ cm}^{-1}$, symmetrische Biegeschwingung $\tilde{\nu}_2 = 667 \text{ cm}^{-1}$, antisymmetrische Streckschwingung $\tilde{\nu}_3 = 2349 \text{ cm}^{-1}$. Unten H_2O : symmetrische Streckschwingung $\tilde{\nu}_1 = 3657 \text{ cm}^{-1}$, symmetrische Biegeschwingung $\tilde{\nu}_2 = 1595 \text{ cm}^{-1}$, antisymmetrische Streckschwingung $\tilde{\nu}_3 = 3756 \text{ cm}^{-1}$.

2.2. Absorption im infraroten Spektralbereich

Absorbiert ein Molekül Licht im infraroten Spektralbereich, geht es in einen höher angeregten Schwingungszustand über. Absorption kann nur stattfinden, wenn sich während einer Schwingung das Dipolmoment der betreffenden Atomgruppierung ändert. Die Intensität einer Absorptionsbande ist proportional zum Quadrat der Dipolmomentsänderung relativ zum Gleichgewichtszustand. Dies wird verursacht bei Streckerschwingungen durch Änderung der Bindungslängen, bei Deformations- und Biegeschwingungen durch Änderung von Bindungswinkeln. Die Frequenz, bei der eine Schwingung absorbiert, hängt von den reduzierten Massen der beteiligten Atome, der Kraftkonstante der Bindung, der Bindung zu den Nachbaratomen und der Kopplung mit anderen Molekülschwingungen ab. Sie berechnet sich für ein zweiatomiges Molekül (mit verschiedenen Atomen) nach

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}}, \quad (2.1)$$

wobei ν die Schwingungsfrequenz, k die Kraftkonstante und μ die reduzierte Masse ist:

$$\mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2}, \quad (2.2)$$

Es ist üblich, nicht die Frequenzen selbst anzugeben, sondern die energieproportionalen Wellenzahlen, die sich aus dem Kehrwert der Wellenlänge ergeben. Für die Wellenzahl $\tilde{\nu}$ ist die Einheit cm^{-1} gebräuchlich.

Wellenzahl / cm^{-1}	1000	2000	3000	4000	5000	6000	8000	10000
Wellenlänge / μm	10	5	3.33	2.5	2	1.67	1.25	1

Tabelle 2.1.: Wellenzahl und Wellenlänge

2.3. Aufbau von Proteinen

Stellt man sich eine lange Proteinkette vor, so gibt es im Prinzip sehr viele Möglichkeiten wie diese Kette gefaltet werden kann. Eine erste wesentliche Randbedingung besteht in der speziellen Eigenschaft der Peptidbindung (siehe Abb. 2.2), die eine planare Anordnung der CO- und NH-Gruppen im Peptid fordert. Eine Peptidkette besteht folglich aus starren Blättchen, die über zwei Bindungswinkel, ϕ und ψ , mit je einem C-Atom verknüpft sind (siehe Abb. 2.3). Auf Grund der Randbedingungen können nur bestimmte Werte der Bindungswinkel auftreten. Zusätzlich spielen Wasserstoffbrückenbindungen für die Ausbildung der Struktur eine sehr große Rolle. Hier sind es im wesentlichen die Wasserstoffbrückenbindungen, die zwischen der NH- und der CO-Gruppe des Rückgrats aufgebaut werden. Bei der Struktur unterscheidet man die Primär- und die Sekundärstruktur der Proteine. Erstere beschreibt die Sequenz der Aminosäuren, während letztere die spezielle räumliche Anordnung nah benachbarter Aminosäuren beschreibt.

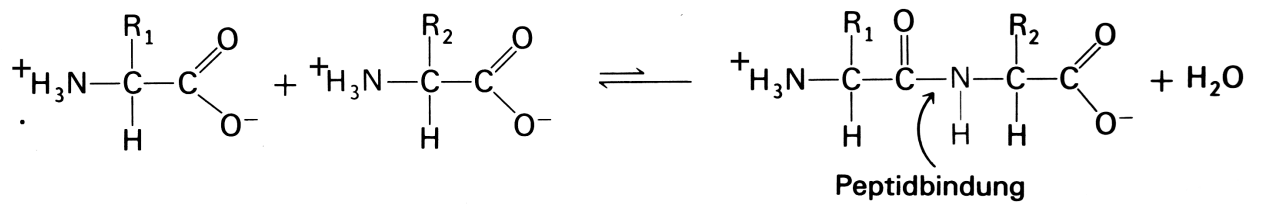


Abbildung 2.2.: Struktur und Entstehung einer Peptidbindung durch Abspaltung von H₂O.

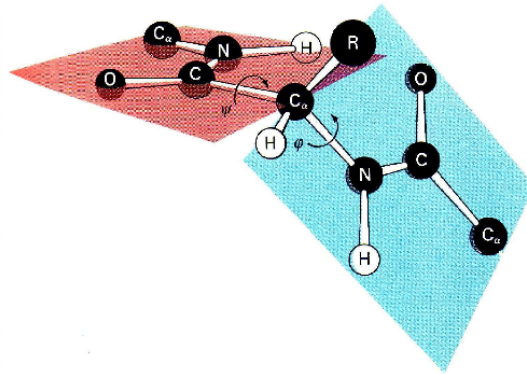


Abbildung 2.3.: Schematische Darstellung der Peptidbindung.

Sekundärstrukturen

α-Helix

Die α-Helix ist eine stabförmige Struktur, bei der eine eng aufgewickelte Polypeptidhauptkette den inneren Teil des Stabes bildet. Die Seitenketten sind in dieser schraubenartigen Anordnung nach außen gerichtet (siehe Abb. 2.4).

Die α-Helix wird durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den NH- und den CO-Gruppen des Rückgrates stabilisiert. Dabei bildet die CO-Gruppe einer Aminosäure eine Wasserstoffbrücke zu der NH-Gruppe der Aminosäure, die in der Sequenz vier Reste vor ihr liegt. Alle CO- und NH-Gruppen der Hauptkette sind an der Wasserstoffbrückenbindung beteiligt. Der Abstand zwischen benachbarten Resten entlang der Helixachse ist 1,5 Å, die Verdrehung in der Helixachse 100°. Die Ganghöhe der α-Helix beträgt 5,4 Å. In den Proteinen findet man nur rechtsgängige α-Helices. Der Anteil des Proteins, der in einer α-Helix gefaltet ist, kann zwischen unterschiedlichen Proteinen stark variieren.

β-Faltblatt

Während sich bei der α-Helix die Wasserstoffbrückenbindung zwischen nahe benachbarten Aminosäuren ausbilden, werden die Wasserstoffbrücken in der β-Faltblattstruktur zwischen verschiedenen Strängen gebildet (siehe Abb. 2.5). Die β-Faltblattstruktur gibt platten- oder stabförmige Strukturen. In einem β-Faltblatt ist die Polypeptidkette praktisch völlig gestreckt. Benachbarte Stränge in einem β-Faltblatt können dieselbe Richtung aufweisen (paralleles β-Faltblatt) oder entgegengesetzt verlaufen (antiparalleles β-Faltblatt).

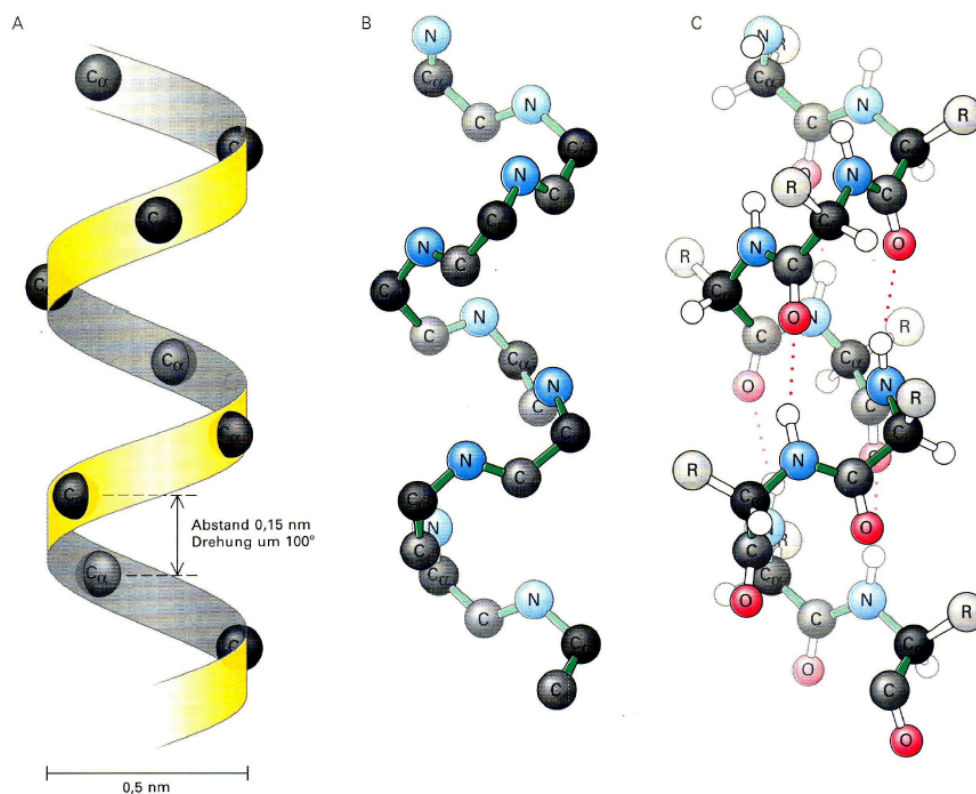


Abbildung 2.4.: Schematische Darstellung der α -Helix.

2.4. Infrarotspektroskopie an Proteinen

Für das Verständnis biologischer Reaktionen gewinnt die Infrarotspektroskopie zunehmend an Bedeutung, insbesondere weil sie Informationen liefert, die mit Methoden der Strukturaufklärung wie NMR, Elektronenmikroskopie und Röntgenstrukturanalyse nicht erhalten werden. Sie erlaubt Aussagen über die Struktur und die Umgebung des Proteinrückgrats und vieler Aminosäureseitenketten. Sie macht dynamische Vorgänge zugänglich, wie zum Beispiel die Änderung von Bindungslängen und -geometrien im Verlauf einer Proteinreaktion, die Modifizierung chemischer Gruppen (z.B. Protonierung) oder die veränderte Ladungsdichte einer chemischen Bindung.

Die Empfindlichkeit moderner Infrarotspektrometer ist heute prinzipiell groß genug, um mit speziellen Techniken die Beiträge einzelner Aminosäuren zu detektieren. Ein Protein liefert jedoch im Absorptionsspektrum eine Vielzahl überlappender Banden des Peptidrückgrats (Tabelle 2.2) und der Aminosäureseitenketten.

Darüberhinaus werden die Peptid-C=O-Moden von einer starken Wasserbande bei ca. 1650 cm^{-1} überlagert, die zwar, im Vergleich zu den Moden der Aminosäureseitenketten, einen schwachen Extinktionskoeffizienten ($20\text{ l/mol}\cdot\text{cm}$) besitzt, aber bereits bei einer Schichtdicke von $10\text{ }\mu\text{m}$ aufgrund des hohen Wassergehaltes der Proben zu einer optischen Dichte von 1 führt (d.h. nur 10% des eingestrahlenen Lichtes wird transmittiert). Zur Definition der optischen Dichte siehe Anhang A.2.

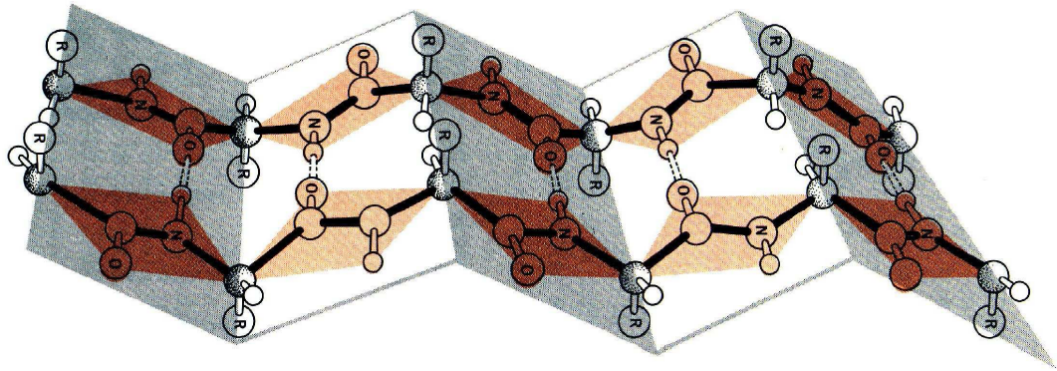


Abbildung 2.5.: Schematische Darstellung der β -Faltblattstruktur.

2.5. Absorptionsbanden der Peptidgruppe

Einer (hypothetischen) freien, planaren Peptidgruppe können 9 Schwingungsmoden zugeordnet werden, die mit abnehmender Wellenzahl der Absorptionsbande als Amid-A, -B und Amid-I bis -VII bezeichnet werden. Für Strukturuntersuchungen ist besonders die Amid-I-Schwingung von Bedeutung. Für die Amid-I-Schwingung, zu der ca. 80% die C=O-Valenzschwingung der Carbonylpeptidgruppe beiträgt, kann die Lage der Absorptionsbanden mit der Sekundärstruktur des betreffenden Polypeptids korreliert werden. Dies wird dadurch verursacht, dass die exakte Geometrie und damit die Lage und Intensität der ψ - und ϕ -Winkel die Amid-I-Bande verändern (starke Wechselwirkung und Veränderung der Dipolwechselwirkung zwischen den C=O-Schwingungen). Die genaue Analyse der Amid-I-Bande kann daher in Verbindung mit mathematischen Verfahren zur Trennung überlappender Absorptionsbanden (Fourier-Selbstdekonvolution) Informationen über die Sekundärstruktur von Proteinen liefern.

Ein Wasserstoff-Deuterium-Austausch (H/D-Austausch) im Peptid, wie er zum Beispiel in D_2O -Lösung auftritt, verändert die Massen der schwingenden Atome und damit die Schwingungsfrequenz und die Lage der Absorptionsbanden im Spektrum. Dabei ist die Bandenverschiebung abhängig von der Sekundärstruktur: die schwache hochfrequente Amid-I-Bande von β -Faltblatt und Schleifen ($\approx 1670\text{ cm}^{-1}$) wird oft mit ca. 10 cm^{-1} am stärksten zu niedrigen Wellenzahlen verschoben, während bei allen anderen Sekundärstrukturelementen die Verschiebung nur wenige cm^{-1} beträgt. Tab. 2.2 zeigt eine Zusammenstellung der Amid-I-Moden der verschiedenen Sekundärstrukturelemente. Die Amid-II-Bande (40...60% N-H Biegeschwingung, 18...40% C-N Streckschwingung, ca. 10% C-C Streckschwingung) zeigt gegenüber der Amid-I-Bande eine weitaus größere Empfindlichkeit gegenüber H/D-Austausch. Sie wird um etwa 100 cm^{-1} zu kleineren Wellenzahlen verschoben. Dabei ändert sich der Charakter der Schwingung. Sie ist hauptsächlich eine C-N Streckschwingung und enthält keine Anteile der N-H Biegeschwingung mehr. Diese Eigenschaft ermöglicht die Kontrolle des Deuterierungsgrades des Proteins über das Verschwinden des Amid-II- und das Entstehen des sog. Amid-II'-Signals bei 1450 cm^{-1} in D_2O . Ein ähnlicher Effekt tritt bei der Amid-A-Bande auf.

Abhängig von der Stabilität der Proteinstruktur zeigen die verschiedenen Bereiche des Proteins unterschiedliche H/D-Austauschgeschwindigkeiten, was zur Zuordnung der Ab-

Sekundärstruktur	Bandenposition in H ₂ O / cm ⁻¹		Bandenposition in D ₂ O / cm ⁻¹	
	Mittelwert	Bereich	Mittelwert	Bereich
α -Helix	1654	1648 ... 1657	1652	1642 ... 1660
β -Faltblatt	1633	1623 ... 1641	1630	1615 ... 1638
	1684	1674 ... 1695	1679	1672 ... 1694
Schleifen	1672	1662 ... 1686	1671	1653 ... 1691
Ungeordnet	1654	1642 ... 1657	1645	1639 ... 1654

Tabelle 2.2.: Amid-I-Moden verschiedener Sekundärstrukturelemente.

Quelle: nach E. Goormaghtigh et al. (1994), *Subcellular Biochemistry* 23, 405. Anmerkung: Oft tauchen in ähnlichen Tabellen unterschiedliche Bandenpositionen für die hochfrequente Bande von parallelem und antiparallelem β -Faltblatt auf. Dies beruht auf der berechneten Bandenposition (für β -parallel). Experimentell kann jedoch nicht zwischen parallelem und antiparallelem β -Faltblatt unterschieden werden.

sorptionsbanden zu einzelnen Sekundärstrukturelementen genutzt werden kann.

2.6. Die Beiträge der Aminosäureseitenketten

Im Bereich der Amid-I-Bande tragen auch Aminosäureseitenketten zur Absorption bei, insbesondere wenn sie C=O-Gruppen enthalten. Es sind dies Tyr, Lys, Phe, Glu, Asp. Diese tragen etwa 10 ... 15% zur Gesamtabsorption in diesem Spektralbereich bei. Der Einfluss der jeweiligen Proteinumgebung (Solvation, pH-Wert, Dielektrizitätskonstante) auf die Absorptionseigenschaften der Seitenketten macht es unmöglich, die jeweils genaue Lage der Absorptionsbanden aufgrund von Modellspektren der Aminosäuren in wässriger Lösung vorherzusagen. Abb. 2.6 gibt einen Überblick über die verschiedenen Aminosäureseitenketten.

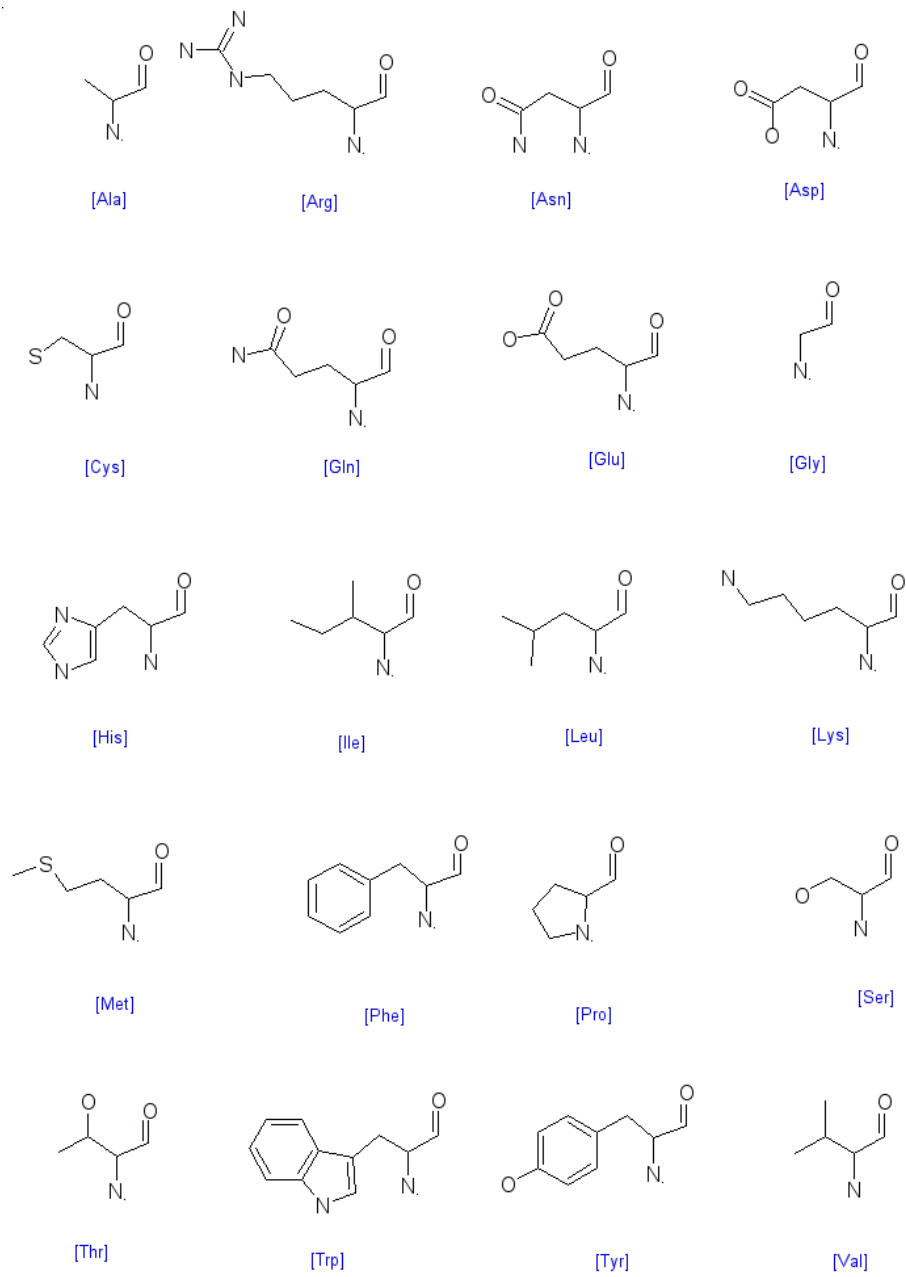


Abbildung 2.6.: Schematische Darstellung von Aminosäuresideketten

3. Das Fourier–Transform Spektrometer

In modernen Messgeräten zur Bestimmung der Infrarottransmission und in der Raman-spektroskopie werden meist Fourier–Transformations–Spektrometer (FT–Spektrometer) eingesetzt. Ein solches Spektrometer besitzt als Herzstück statt eines Monochromators (dispersives Spektrometer, wie z.B. Spektrometer für den sichtbaren Spektralbereich) ein Michelson–Interferometer (siehe Abb. 3.1). Dabei wird durch teilreflektierende Spiegel die zu messende Strahlung in zwei Strahlbündel zerlegt, welche anschließend zur Interferenz gebracht werden.

Im Vergleich zur herkömmlichen dispersiven Infrarotspektroskopie hat die FT-Spektroskopie folgende Vorteile zu bieten:

- Aufgrund der **parallelen Messung aller Frequenzen** entsteht eine **erhebliche Zeitersparnis**. Ein komplettes Spektrum kann sehr viel schneller aufgenommen werden.
- Weil bei der FT-Spektroskopie der Strahl nicht durch Spalte eingengt werden muss, steht eine höhere Lichtintensität zur Verfügung, was ein **besseres Signal–Rausch–Verhältnis** zur Folge hat. Dieser Vorteil ist auch unter dem Begriff „Fellgett’s advantage“ bekannt (siehe z.B. W. D. Perkins, *J. Chem. Ed.*, **64**, A269, 1987).
- Wegen der Kontrolle der Spiegelposition durch einen HeNe–Laser ist die **Genauigkeit der Wellenlängenbestimmung** sehr hoch.

3.1. Das Interferogramm

Im FT–Spektrometer wird das Spektrum der Probe nicht direkt gemessen. Stattdessen erhält man zunächst ein sog. Interferogramm, das mittels Fourier–Transformation in ein Spektrum umgerechnet wird. Das Interferogramm wird durch ein Michelson–Interferometer erzeugt (siehe Abb. 3.1). Das Interferogramm ist die gemessene Intensität in Abhängigkeit der Position des Spiegels S_2 .

Das von einer Quelle ausgehende Licht wird durch eine halbdurchlässige Platte P_1 (die reflektierende Schicht S befindet sich auf der Rückseite) in zwei Komponenten, Lichtbündel I und II, aufgespalten. Das transmittierte Licht (I) durchläuft eine zweite Platte P_2 identischer Dicke und wird von einem genau senkrecht stehenden Spiegel S_1 in sich zurückreflektiert. Von der Spiegelschicht S des halbdurchlässigen Spiegels wird ein Teil des rücklaufenden Lichtes dann auf den Schirm (Detektor) gelenkt. Das zweite Lichtbündel (Bündel II) werde von S nach oben reflektiert; es durchläuft ein zweites Mal die Glasplatte P_1 , wird am Spiegel S_2 in sich zurückgeworfen. Sein durch S transmittierter Anteil fällt ebenfalls auf den Schirm (Detektor) und interferiert dort mit Bündel I. Durch Verschieben

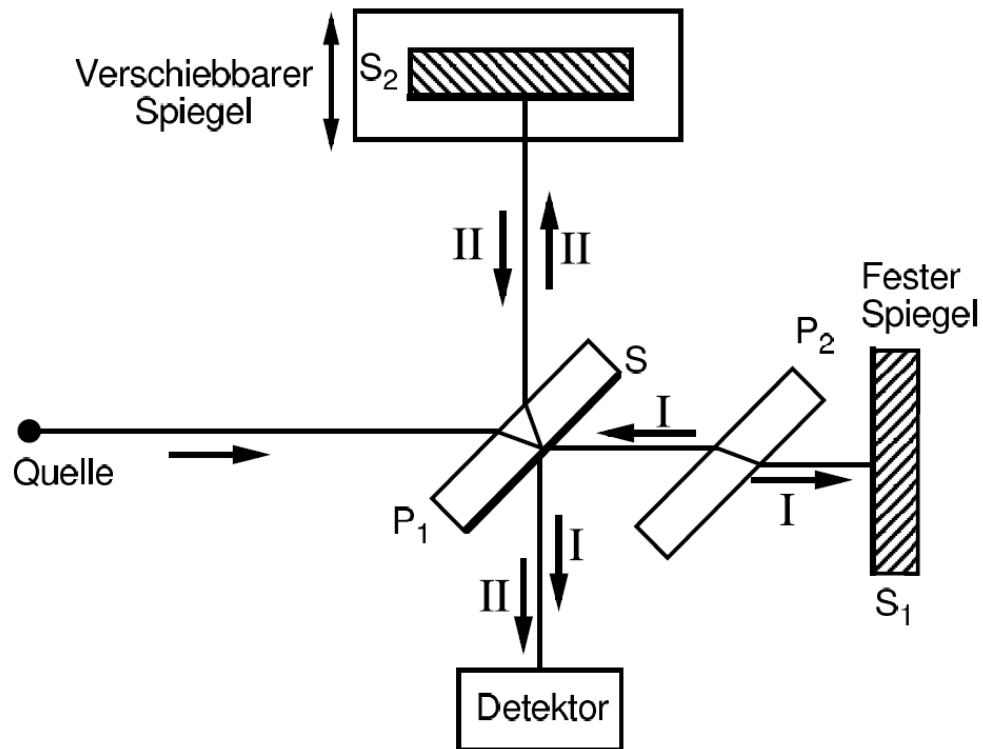


Abbildung 3.1.: Michelson-Interferometer

des Spiegels S_2 längs der Strahlachse lässt sich der Gangunterschied zwischen den beiden Lichtbündeln variieren. Bei einer Messung befindet sich die Probe vor dem Detektor.

Die Nullstellung, d.h. die Einstellung, bei der beide Strahlengänge genau gleich sind, lässt sich am besten mit weißem Licht überprüfen: Die Verwendung von weißem Licht ist vorteilhaft, da dort die Kohärenzlänge extrem kurz ist und so die Nullstellung exakt bestimmt werden kann. Der dabei vorliegende Phasenunterschied von π rührt daher, dass Bündel I an der Außenfläche des Spiegels, Bündel II an der Innenfläche reflektiert wurde. Die Kompensationsplatte P_2 wird im Michelson-Interferometer verwendet, um auch für spektral breitbandiges Licht beide Strahlengänge exakt identisch zu führen. Da beide Lichtbündel die Glasplatten gleich oft (dreimal) durchqueren, erfahren sie auch die gleiche Dispersion.

Im Falle von monochromatischem Licht erhält man als Interferogramm eine Kosinusfunktion. Dies wird zur Kontrolle der Spiegelposition ausgenutzt, indem das Licht eines HeNe-Lasers (632 nm) ebenfalls in das Interferometer eingekoppelt wird. An den Nulldurchgängen des Laser-Interferogramms wird das Infrarot-Interferogramm digitalisiert. Aus der Wellenlänge des Lasers ergibt sich, dass die Nulldurchgänge einen Abstand von $1/31600 \text{ cm} = \lambda_{\text{HeNe}}/2$ besitzen, was zu einer Wellenzahlkalibrierung des Gerätes mit einer Genauigkeit in der Größenordnung von 0.01 cm^{-1} führt.+

Das Interferogramm einer polychromatischen Lichtquelle ist durch einen Punkt maximaler Interferenz (Weißlichtposition, Gangunterschied Null) gekennzeichnet, an dem sich das Licht aller Frequenzen konstruktiv überlagert, da die Abstände von der Glasplatte P_1 zum festen und zum beweglichen Spiegel gleich sind. An allen anderen Punkten ist die Bedingung für konstruktive Interferenz nur für wenige Wellenlängen aus dem Spektrum

erfüllt, während andere destruktiv überlagern (geringe Kohärenz von weißem Licht).

3.2. Die Fourier–Transformation

Die Intensität am Detektor $I(x)$ als Funktion der Spiegelposition x (das Interferogramm) und die Intensität $S(\tilde{\nu})$ als Funktion der Wellenzahl $\tilde{\nu} = \lambda^{-1}$ des Lichtes (das sog. Einkanalspektrum) stellen ein Fourier–Transformiertenpaar dar:

$$S(\tilde{\nu}) = \int_{-\infty}^{\infty} I(x) \exp(2\pi i \tilde{\nu} x) dx \quad (3.1)$$

$$I(x) = \int_{-\infty}^{\infty} S(\tilde{\nu}) \exp(-2\pi i \tilde{\nu} x) d\tilde{\nu} \quad (3.2)$$

Natürlich kann in der Praxis kein kontinuierliches Interferogramm unendlicher Ausdehnung gemessen werden. Stattdessen wird eine endliche Anzahl N von Interferogrammpunkten im Abstand Δx digitalisiert. Ersetzt man x durch $n\Delta x$, $\tilde{\nu}$ durch $k\Delta\tilde{\nu}$ und das Integral durch eine Summe, so erhält man die diskrete Fourier–Transformation

$$S(k\Delta\tilde{\nu}) = \sum_{n=0}^{N-1} I(n\Delta x) \exp\left(\frac{2\pi i k \Delta\tilde{\nu} n \Delta x}{N}\right) \Delta x. \quad (3.3)$$

Die berechneten Punkte im Frequenzraum besitzen den Abstand

$$\Delta\tilde{\nu} = \frac{1}{N\Delta x}. \quad (3.4)$$

Der Punkteabstand $\Delta\tilde{\nu}$, der die spektrale Auflösung bestimmt, ist also umgekehrt proportional zum Spiegelweg und der Anzahl der Messpunkte. Probleme, die bei der diskreten Fourier–Transformation entstehen, und deren Korrektur werden in den nächsten Abschnitten besprochen.

3.3. Apodisation

Wegen der endlichen Länge der gemessenen Interferogramme kann es bei der Fourier–Transformation zu Artefakten kommen. Das bei $x = x_{max}$ abgeschnittene Interferogramm kann als Produkt eines Interferogramms unendlicher Ausdehnung mit einer Rechteckfunktion aufgefasst werden. Die Rechteckfunktion hat die Werte Eins für $0 \leq x \leq x_{max}$ und Null sonst. Als Folge dessen entstehen neben der eigentlichen Bande Nebenminima und –maxima. Die Amplitude des größten Nebenminimums macht 22% der Amplitude des Hauptmaximums aus.

Dieser störende Effekt kann umgangen werden, indem man das Interferogramm statt mit der Rechteckfunktion mit einer anderen Funktion multipliziert, die sich sanfter an Null annähert. Solche Funktionen werden *Apodisationsfunktionen* genannt. Weil durch die Apodisation Informationen an den Rändern des Interferogramms verloren gehen, ist eine Verschlechterung der Auflösung bzw. eine Linienverbreiterung die Folge. Die Apodisationsfunktionen sind darauf optimiert, dass trotz starker Unterdrückung der Nebenmaxima eine geringe Verbreiterung des Hauptmaximums resultiert.

3.4. Zerofilling

Wegen der endlichen Abstände der Stützpunkte des Interferogramms und des daraus berechneten Spektrums kann es vorkommen, dass schmale Banden, die zwischen den Stützstellen liegen, mit verringerter Amplitude wiedergegeben werden. Dieser Fehler kann durch folgenden Trick ausgeglichen werden: Vor der Durchführung der Fourier-Transformation werden an das Interferogramm Nullen angehängt (*Zerofilling*). Dies entspricht einer Näherung eines Interferogramms das bei höherer spektraler Auflösung (d.h. längerem Spiegelweg) aufgenommen wurde. Dadurch wird der Abstand zwischen den Punkten des Spektrums kleiner, allerdings ohne dass sich die spektrale Auflösung verbessert. Auf diese Weise wird zwischen den Stützstellen des Spektrums interpoliert.

3.5. Auflösungsverbesserung

Die Amid-I-Bande von Proteinen besteht meist aus mehreren Banden, die für die verschiedenen Sekundärstrukturen charakteristisch sind. Diese Einzelkomponenten überlappen sich zu einer konturlosen Bande. Daher werden Verfahren angewandt, um das Spektrum in die Einzelkomponenten aufzulösen, also um das Spektrum zu entwirren (*Dekonvolution*). Hierbei handelt es sich nicht um eine tatsächliche nachträgliche Verbesserung der spektralen Auflösung, sondern um Methoden, welche die Feinstruktur des Spektrums hervorheben. Drei Methoden seien hier vorgestellt und ihre Effekte auf eine Absorptionsbande beschrieben.

3.5.1. Höhere Ableitungen

Es ergibt sich jeweils eine schmälere Bande, die bei der 2. (4.) Ableitung ein negatives (positives) Vorzeichen hat.

Vorteil: Lässt sich fast mit jedem Programm durchführen

Nachteil: Prominente Seitenbanden mit anderen Vorzeichen, die die Interpretation bei komplizierten Spektren erschweren.

3.5.2. Fourier-Selbstdekonvolution

Man nutzt die Eigenschaft der Fourier-Transformation, bzw. des Interferogramms aus, dass die Information über die Feinstruktur des Spektrums bei großen Spiegelauslenkungen registriert wird. Wenn man diesen Teil des Interferogramms stärker gewichtet, ist daher die Feinstruktur im Spektrum stärker hervorgehoben und die Banden erscheinen schärfer. Man macht dies, indem man das Interferogramm mit einer Exponentialfunktion multipliziert.

Vorteil: Die Banden im bearbeiteten Spektrum haben das gleiche Vorzeichen, wie im unbearbeiteten.

Nachteil: Man braucht spezielle Programme, zwei Parameter sind frei wählbar, was zu einer gewissen Subjektivität der Ergebnisse führt. Überdekonvolution mit dem Auftreten von Artefakten ist möglich.

3.5.3. Feinstrukturverstärkung

Wenn man vom Originalspektrum eine geglättete Version des gleichen Spektrums abzieht, wird die Grobstruktur eliminiert, und die Feinstruktur bleibt übrig. Die Banden werden schärfer. Zur Vermeidung von negativen Nebenbanden wird das geglättete Spektrum mit einem Faktor ≤ 1 (etwa 0.9) multipliziert.

Vorteil: Die Banden im bearbeiteten Spektrum haben das gleiche Vorzeichen wie im unbearbeiteten. Lässt sich mit fast jedem Programm durchführen. Das „Auflösungsvermögen“ ist mit der Fourier-Selbstdekonvolution vergleichbar.

Nachteil: Das Auftreten von Artefakten ist ebenfalls möglich.

3.6. Durchführung einer Sekundärstrukturanalyse

Das FTIR-Spektrum der Amid-I-Bande wird mit obigen Verfahren bearbeitet. Man erhält ein Spektrum, in dem die Feinstruktur deutlicher hervorgehoben ist und in dem man die Position der zugrundeliegenden Einzelkomponenten des Spektrums erkennen kann. An diesen Stellen werden dann Banden angefittet und aus der Fläche der Banden die Sekundärstrukturanteile berechnet. Trotz der weiter unten aufgeführten Probleme ist die Übereinstimmung der Infrarotergebnisse mit den aus der Röntgenstrukturanalyse gewonnenen Anteile recht gut. Die maximalen Abweichungen sind etwa 15%. Zu bedenken ist auch, dass bei der Analyse der Kristallstruktur je nach Definition der Kriterien für die Sekundärstrukturen bis zu 20% Variation auftreten können. Die Infrarotspektroskopie eignet sich insbesondere dazu, β -Faltblattstrukturen zu detektieren. Mögliche Probleme dabei sind:

- Der Schluss von Bandenpositionen auf die Sekundärstruktur ist nicht eindeutig. Dies führt insbesondere bei hochhelikalen Proteinen zu Fehlern. Die α -Helix erzeugt offensichtlich (und theoretisch nachvollziehbar) nicht nur eine Bande bei 1654 cm^{-1} , sondern auch Nebenbanden bei niedrigeren Wellenzahlen. Diese werden in der Sekundärstrukturanalyse einem β -Faltblatt zugeordnet.
- Die Extinktionskoeffizienten der Sekundärstrukturelemente werden oft als gleich angenommen. Dies ist insbesondere falsch für die beiden Banden des β -Faltblatts. Die hochfrequente Bande bei 1684 cm^{-1} ist wesentlich schwächer als die bei 1633 cm^{-1} .
- Der Abzug der Wasserbande (H_2O) im Amid-I-Bereich ist nicht ganz einfach und beeinflusst die relativen Flächenanteile der angefitteten Kurven. Daher werden die Experimente oft in D_2O durchgeführt, welches im Bereich der Amid-I-Bande nicht so stark absorbiert.
- Im Bereich der Amid-I-Bande absorbieren auch Seitengruppen, die etwa 15...20% der Absorption ausmachen können. Ein Abzug dieses Beitrages ist problematisch, weil die Absorption der Seitenketten von ihrer Umgebung im Protein abhängt.
- Wenn man das aus dem Fit rekonstruierte Spektrum so bearbeitet wie das Originalspektrum, sollte natürlich das Gleiche herauskommen. Dies wird oft nicht kontrolliert.

3.7. Sekundärstrukturanteile einiger Proteine

Tabelle 3.1 gibt einen Überblick über die Sekundärstrukturanteile einiger Proteine, die aus einer Röntgenstrukturanalyse gewonnen wurden.

Proteine	α -Helix	β -Faltblatt	Schleifen	Sonstiges
Myoglobin	77... 88	0	7... 12	7... 11
Phosphoglyceratkinase	30	23	20	27
Papain	26... 29	22... 29	18... 23	25... 30
Alkoholdehydrogenase	25... 29	36... 40	19	12... 20
Trypsin Inhibitor	21... 26	26... 45	16... 24	13... 29
Elastase	10	40... 47	26... 28	16... 24
Chymotrypsinogen	12	49	23	16
9-Chymotrypsin	8... 11	35... 50	25... 27	14... 30
Trypsinogen	9	56		
Concanavalin	2... 3	44... 65	22... 25	10... 28
Bovine serum albumin (BSA)	50... 68	16... 18		
Immunoglobulin G	7.4	54	k. A.	k. A.

Tabelle 3.1.: Sekundärstrukturanteile einiger Proteine. Die Daten für Immunoglobulin G entsprechen den Werten, die auf www.rcsb.org für den Eintrag *1HZH* angegeben werden. Die dort genannte Referenz zur Berechnung der Sekundärstrukturanteile ist W. Kabsch und C. Sander, *Biopolymers*, 22(12), 2577, 1983.

Anmerkung: Man beachte die z.T. erheblichen Unsicherheiten bei den Sekundärstrukturanteilen durch unterschiedliche Definitionen der Sekundärstrukturen.

4. Versuchsdurchführung

Für die Versuchsdurchführung werden zu Beginn des Experiments Proben von γ -globulin, Papain und Myoglobin in D₂O hergestellt. Der H-D-Austausch in den Lösungen dauert etwa eine Stunde.

γ -globulin (Molekulargewicht etwa 152 kDa, 1344 Aminosäuren) aus Rinderblut besteht aus Immunglobulinen (Antikörpern) der Subklasse Immunglobulin G (IgG). IgG hat eine Y-förmige Struktur (Abb. 4.1). Die oberen Arme dienen zur Bindung an das Antigen während der untere Teil zur Bindung an körpereigene Zellen dient. Weitere Informationen sind in der Doktorarbeit von S. Da Vela, auf www.rcsb.org unter dem Eintrag *1HZH* sowie beispielsweise in R. Rappuoli et al., *Antibodies for Infectious Diseases*, Washington DC: ASM Press, 2015 zu finden.

Papain (Molekulargewicht etwa 23 kDa, mehr als 230 Aminosäuren) wird vorwiegend aus dem Milchsaft des Melonenbaums (*Carica papaya*) gewonnen. Es wird verwendet als Zusatz zu Reinigungsmitteln, als Weichmacher für Fleisch, zur Entfernung von Trübstoffen in Bier, zur Wundheilung, zur Senkung der Viskosität in Tiernahrung. Es hat eine allgemein milde, beruhigende Wirkung auf den Magen und hilft bei der Verdauung von Proteinen.

Myoglobin (Molekulargewicht etwa 18 kDa, 153 Aminosäuren) wird z.B. aus Pferdeherz gewonnen, es ist ein Hämhaltiges Protein, das eine hohe Affinität zu Sauerstoff hat. Es dient der Speicherung von Sauerstoff in den Muskeln und gibt den Muskeln die rote Farbe.

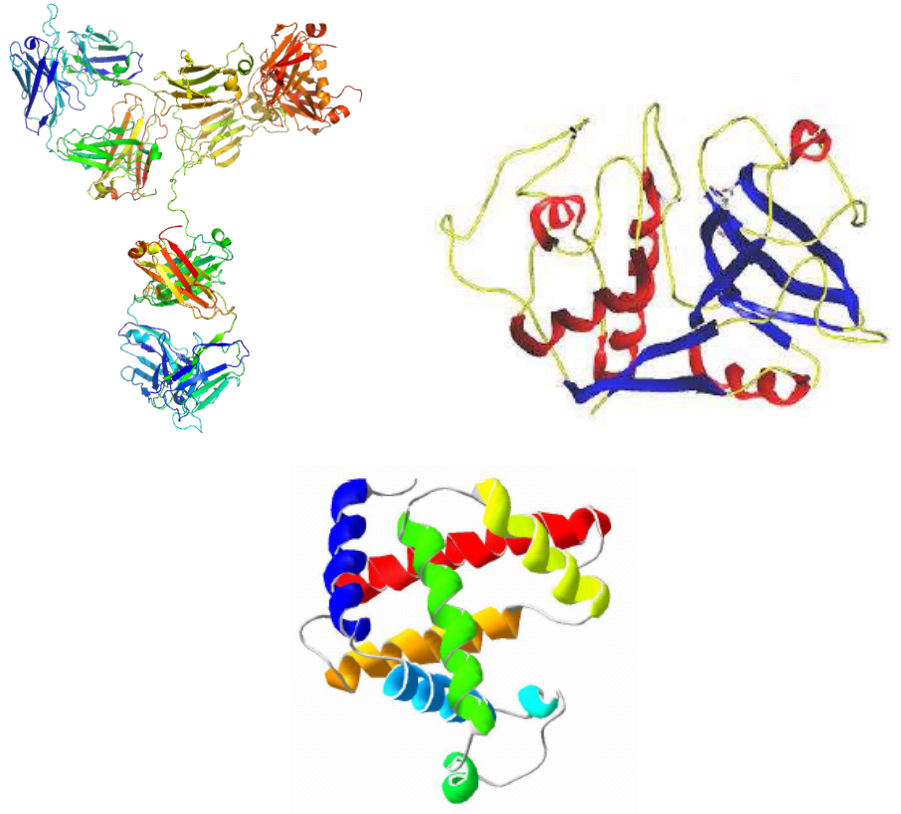


Abbildung 4.1.: Links oben: Struktur von Immunoglobulin G (Eintrag *1HZH* auf www.rcsb.org), rechts oben: Papain und unten: Myoglobin.

4.1. Präparation der Proben

Von jedem Protein werden etwa 6 mg des Proteinpulvers in 200 μl D_2O gelöst. Zur Messung mit einer 20 mm Transmissionszelle (siehe Abb. 4.2) werden bei einer Schichtdicke von ca. 50 μm etwa 50 μl Probenflüssigkeit benötigt.

4.2. Bedienung des FTIR

Zur Ansteuerung des FTIR-Spektrometers wird das Programm OPUS verwendet. Nach dem Start des Programms werden im Menü *Measure/Advanced Measurement* die Messparameter eingestellt. Als Messbereich wird 1000 cm^{-1} bis 4000 cm^{-1} gewählt, für die Wellenlängenaufösung 2 cm^{-1} . Es empfiehlt sich zunächst als Pfad für die Dateien den lokalen Pfad `D:\fpraktik` anzugeben. Die Daten liegen zunächst als Binärform vor, können zur weiteren Verarbeitung der Daten aber unter dem Menüpunkt *File/Save as* auch im ASCII-Format in Form einer Tabelle abgespeichert werden.

Es wird zunächst immer eine Hintergrundmessung sowie anschließend eine Probenmessung durchgeführt.

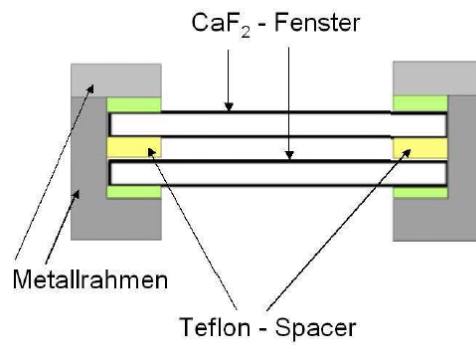


Abbildung 4.2.: Aufbau der Transmissionzelle.

4.3. Vorversuche

- Nehmen Sie ein Spektrum mit einer leeren Transmissionzelle bei geöffnetem Probenraum auf (sog. Leerspektrum). Diskutieren Sie die beobachteten Absorptionsbanden mit dem Betreuer.
- Schließen Sie den Probenraum und öffnen Sie die Trockenluftzufuhr. Wiederholen Sie die vorgehende Messung nach 2 und 5 Minuten. Diskutieren Sie die Ergebnisse. Bestimmen Sie die erforderlichen Wartezeit für möglichst rauscharme Absorptionsspektren.
- Nehmen Sie ein Absorptionsspektrum von H_2O und D_2O sowie ein Hintergrundspektrum von D_2O auf.

4.4. Die Amid-I-Bande von Proteinen

Nehmen Sie die Absorptionsspektren in D_2O mit einer Wellenlängenauflösung von 2 cm^{-1} von folgenden Proteinen auf:

- *gamma*-Globulin stellvertretend für Proteine mit hohem β -Faltblattanteil.
- Papain stellvertretend für Proteine mit gemischten Sekundärstrukturanteilen.
- Myoglobin stellvertretend für Proteine mit hohem Helixanteil.

Verwenden Sie bei allen Transmissionmessungen die Flüssigkeitszelle mit CaF_2 -Fenstern und variablen Spacern. Reinigen Sie bei jedem Probenwechsel die gesamte Flüssigkeitszelle.

5. Auswertung

Im folgenden ist die Auswertung der FTIR-Messungen beschrieben (§ kennzeichnet optionale Teilaufgaben). Zur Analyse der Daten benötigen Sie ein Programm, mit dem die Spektren dargestellt und bearbeitet werden können. GNU PLOT, ein leistungsfähiges und frei verfügbares Programm ist eine mögliche Option (siehe Anhang A.4 für weitere Informationen). Jedes andere Plotprogramm, welches ASCII-Tabellen als Quelldaten akzeptiert, kann selbstverständlich ebenfalls benutzt werden. Die komplette Auswertung bitte fristgerecht abgeben.

Abbildung 5.1 zeigt einige beispielhafte Messungen von Papain, Poly-L-Lysin, Myoglobin sowie der Lösungsmittel H₂O und D₂O.

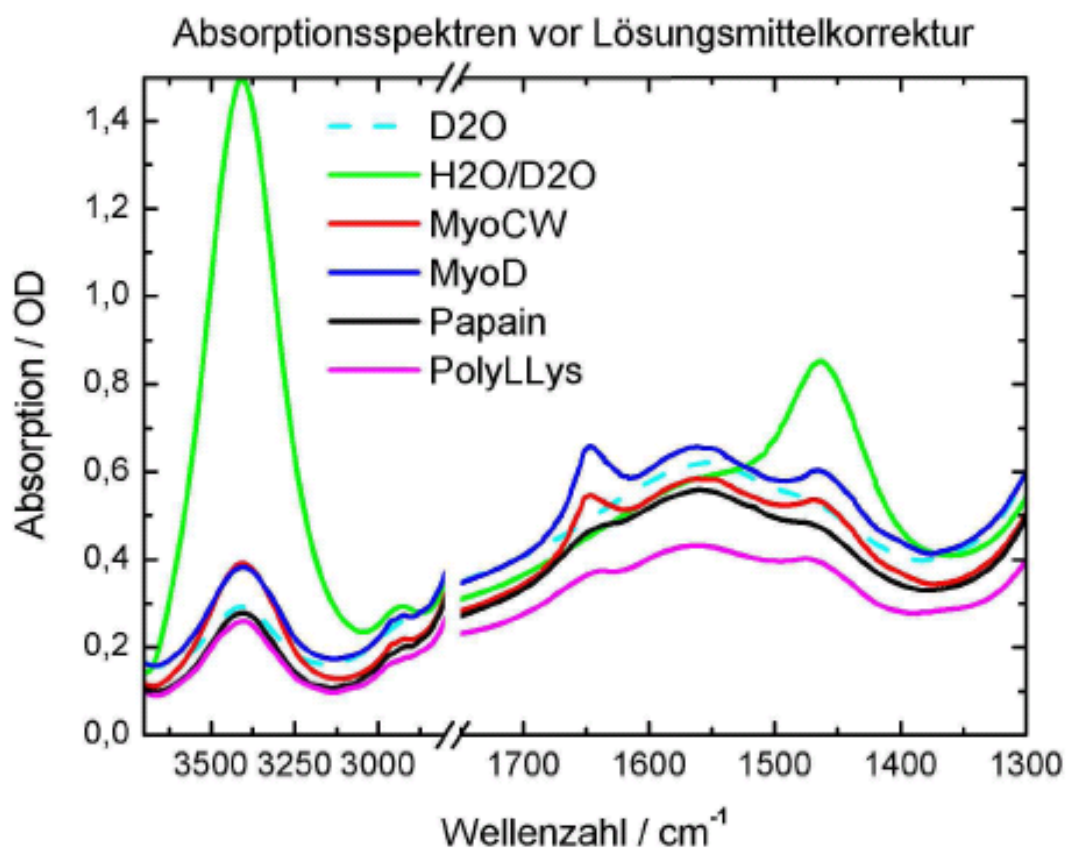


Abbildung 5.1.: Beispielspektren.

5.1. Vorversuche

- Bestimmen Sie aus den Strukturen im Leerspektrum der Transmissionszelle die Dicke des Probenraums.
- Diskutieren Sie die Spektren (FTIR offen und geschlossen mit Trockenluftspülung).
- Bestimmen Sie die Wartezeit für möglichst rauscharme Absorptionsspektren.
- Bestimmen Sie das reine Absorptionsspektrum von H_2O sowie D_2O .

5.2. Die Amid-I-Bande von Proteinen

- Diskutieren Sie einen möglichen H_2O -Gehalt der γ -Globulin-, Papain- und Myoglobinproben an Hand der Spektren.
- Lokalisieren Sie die typischen Banden der Proteine im Bereich 1400 cm^{-1} bis 1700 cm^{-1} und der Amid-A-Bande.
- Weshalb eignen sich andere Wellenlängenbereiche nicht zur Auswertung?
- Analysieren Sie nun die Absorptionsspektren der drei Proteine im Bereich der Amid-I-Banden. Machen Sie zunächst die Basislinienkorrektur, indem Sie zwischen 1600 cm^{-1} und 1700 cm^{-1} einen linearen Untergrund vom Absorptionsspektrum abziehen. Näherungsweise entspricht dies einer Subtraktion der Seitenkettenabsorption.
- Identifizieren Sie die Einzelbanden im obigen Spektralbereich entsprechend Tabelle 5.1.
- Fitten Sie die Absorptionsspektrum mit einem Multi-Gauß-Fit (Summe aus fünf Gauß-Funktionen). Benutzen Sie dazu als Startwerte für den Fit die Angaben in Tabelle 5.1. Starten Sie den Fit zunächst mit den gegebenen Zentralwellenlängen und Halbwertsbreiten (FWHM), und optimieren Sie in einem zweiten Schritt den Fit durch Freigeben dieser Parameter. Integrieren Sie nun die Fitkomponenten und bestimmen Sie daraus die Sekundärstrukturanteile. Dabei wird angenommen, dass die Extinktion durch die verschiedenen Sekundärstrukturen im Bereich der Hauptbande näherungsweise konstant ist. Die Gauß-Funktion, welche die hochfrequenten Nebenbanden der β -Faltblattstruktur beschreibt wird bei der Ermittlung der Sekundärstrukturanteile außen vor gelassen, da man sonst den β -Flächenanteil doppelt zählen würde. Für die Berechnung der Anteile werden also nur vier der fünf gefitteten Gauß-Funktionen berücksichtigt. Bitte beachten Sie, dass das Integral einer Gauß-Funktion analytisch berechnet werden kann.

‡ Integrieren Sie die Absorptionsspektren in den in Tabelle 5.1 genannten Grenzen durch Aufsummation der Datenwerte und ermitteln Sie aus den so erhaltenen Flächen die Sekundärstrukturanteile. Ignorieren Sie dabei den Bereich zwischen 1682 cm^{-1} und 1689 cm^{-1} .

- Diskutieren Sie die Werte im Vergleich zu denen aus der Röntgenstrukturanalyse (siehe Tabelle 3.1). Diskutieren Sie zudem Probleme und Fehlerquellen der Sekundärstrukturanalyse mittels Infrarotspektroskopie.

Bandenparameter / cm^{-1}			Sekundärstruktur
Bereich	Maximum	FWHM	
1613 ... 1637	1632	20	β -Faltblatt
1637 ... 1648	1640	20	Ungeordnet
1648 ... 1662	1655	20	α -Helix
1662 ... 1682	1675	20	Schleifen
1682 ... 1689	1685	20	β -Faltblatt

Tabelle 5.1.: Typische Wellenlängenbereiche verschiedener Sekundärstrukturen

A. Anhang

A.1. Aufbau und Funktionsweise des IFS 48

Die FTIR-Spektrometer besteht im wesentlichen aus der Strahlungsquelle, der Interferometereinheit und dem Detektor. Das IFS 48 der Firma Bruker ist ein FTIR-Spektrometer vom Michelson-Interferometer Typ. Die Abbildung A.1 zeigt den prinzipiellen Aufbau. Das

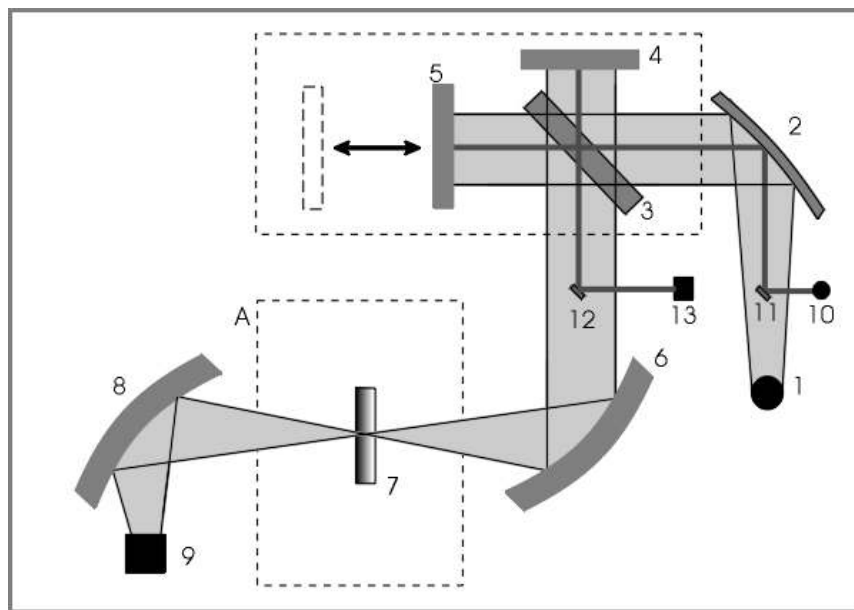


Abbildung A.1.: Strahlengang im IFS48

durch die Strahlungsquelle (1) erzeugte Licht wird durch den Parabolspiegel (2) in Richtung des Strahlteilers (3, halbdurchlässiger Spiegel) gebündelt. Jeweils die Hälfte des Lichtes wird von (3) in Richtung des festen Spiegels (4) reflektiert beziehungsweise in Richtung des beweglichen Spiegels (5) hindurchgelassen. Die beiden von (4) beziehungsweise (5) reflektierten Teilstrahlen werden durch (3) in Richtung des Parabolspiegels (6) vereinigt und interferieren. (6) fokussiert den Strahl auf die im Probenraum (A) befindliche Probe (7). Der Ellipsoidspiegel (8) bildet den Strahl schließlich auf den Detektor (9) ab. Zusätzlich wird ein HeNe-Laser (10) durch den Spiegel (11) in Richtung des Parabolspiegels (2) gelenkt. Der Laserstrahl passiert das Michelson-Interferometer und wird durch den Spiegel (12) auf einen separaten Detektor (13) abgebildet. Die Interferenzen des monochromatischen Lasers dienen dazu, die Position des beweglichen Spiegels (5) zu bestimmen. Die Wellenzahl der Laserstrahlung ist 15803 cm^{-1} . Das entspricht einer Wellenlänge von 632.8 nm und liegt demnach im roten Spektralbereich.

Als Strahlungsquelle nutzt man in der FTIR-Spektroskopie thermische Lichtquellen, die

ein breitbandiges Spektrum abstrahlen und einem schwarzen Strahler ähneln. Das IFS 48 arbeitet im mittleren Infrarot und verwendet einen Globar. Globars sind stabförmig und bestehen aus Siliziumcarbid. Durch Anlegen einer Spannung werden sie erhitzt und erreichen bei etwa 1500 K ihre Betriebstemperatur.

Der Detektor im IFS 48 ist ein DTGS-Detektor (deuteriertes Triglycinsulfat). DTGS-Detektoren gehören zu den pyroelektrischen Detektoren. Diese bestehen aus Ferroelektrika, die die Eigenschaft haben, unterhalb der Curie-Temperatur spontan elektrisch zu polarisieren. Die durch Strahlungseinfall bedingte Änderung der Temperatur ändert die Polarisation, was man als Spannungsänderung nachweisen kann. Pyroelektrische Detektoren sind schneller als rein thermische Detektoren.

Optisches System	Michelson-Interferometer mit einem luftgelagertem Arm und HeNe-Laser zur Positionsbestimmung
Strahlungsquelle	Globar
Blendendurchmesser	4.7 mm
Strahlteiler	Ge auf CsI
Detektor	DTGS mit CsI-Fenster
Interferogrammpunkte je Sekunde	1×10^4 oder 4×10^4
Wellenzahlbereich	$4400 \dots 235 \text{ cm}^{-1}$
Maximale Auflösung	0.5 cm^{-1}
Wellenzahlgenauigkeit	0.01 cm^{-1}
Ordinatengenauigkeit	0.1% T
Strahldurchmesser am Ort der Probe	8 mm

Tabelle A.1.: Kenndaten des IFS 48

A.2. Optische Dichte

Die optische Dichte ergibt sich aus dem Lambert–Beerschen Gesetz, das die Absorption von Strahlung beim Durchgang durch ein homogenes Medium beschreibt:

$$I = I_0 10^{-\epsilon c d}, \quad (\text{A.1})$$

wobei I_0 die Intensität der einfallenden Strahlung, I die Intensität der Strahlung nach Durchgang durch das homogene Medium mit dem Extinktionskoeffizienten ϵ , der Konzentration c und der Dicke d beschreibt.

Den Exponenten fasst man zur dimensionslosen Größe der optischen Dichte „OD“ (auch „Absorbanz“) zusammen.

A.3. Proben

A.3.1. Präparation der Proben

Zur Probenpräparation stehen verschiedene Proteine im Tiefkühlschrank im Chemielabor (-20°C) zur Verfügung. Tabelle A.2 gibt einen Überblick über die Proteine und empfoh-

lenen Konzentrationen. Um eine Verunreinigung der Proben möglichst gering zu halten, wurde jeweils eine geringe Menge des Proteins in einen kleineren Glasbehälter abgefüllt (Sekundärproben). Bitte zur Probenpräparation nur die Sekundärproben benutzen und die Originalproben stets im Kühlschrank lagern.

Protein	Konzentration / $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
γ -Globulin	30
Myoglobin	30
Papain	20

Tabelle A.2.: Konzentration der verwendeten Proteine in Lösung

Für einen Versuch wird jeweils ein Probenvolumen von ca. $100\ \mu\text{l}$ benötigt. Da die Genauigkeitsgrenze der Waage bei etwa $0.1\ \text{mg}$ liegt, müssen Sie vorsichtig und sehr genau arbeiten. Zum Abwiegen ist die Probenwaage im Chemielabor zu benutzen. Dabei jeweils ein kleines Glasfläschchen auf die Waage stellen und die Waage neu austarieren. Dann die erforderliche Menge mit einem Spatel in das Gläschen füllen.

Falls das genaue Abwiegen nicht gelingt, kann das Probenvolumen auch verdoppelt werden. Dann die erforderliche Menge D_2O mit einer Pipette hinzufügen. Verschließen und beschriften Sie das Gefäß.

A.4. Gnuplot

Gnuplot ist ein interaktives Plotprogramm, das für alle gängigen Betriebssysteme frei verfügbar ist. Mit *Gnuplot* können Daten aus ASCII-Dateien in 2D- oder 3D-Darstellung geplottet werden. Die Ausgabe kann auf eine Vielzahl von Geräten/Formaten erfolgen (z.B. X11-Terminal, ASCII-Terminal, PS-, PDF-, PNG-Datei). Neben der interaktiven Steuerung ist es ebenfalls möglich, *Gnuplot* über ein Skript zu steuern. Tabelle A.3 enthält eine Liste der empfohlenen Dokumentation. In der *Gnuplot*-Kommandozeile ist außerdem eine Online-Hilfe verfügbar.

Homepage	http://www.gnuplot.info/
Download	http://www.gnuplot.info/download.html
Dokumentation allgemein	http://www.gnuplot.info/documentation.html
Ausführliches Handbuch (PDF)	http://www.gnuplot.info/docs/gnuplot.pdf
Online Handbuch (HTML)	http://www.gnuplot.info/docs/gnuplot.html
sehr gute Kurzanleitung	http://www.duke.edu/hpgavin/gnuplot.html

Tabelle A.3.: Download und Dokumentation zu *Gnuplot*

Im Folgenden werden werden an einem Beispielspektrum (FTIR-Spektrum von KBr) einige Plotmöglichkeiten von *Gnuplot* gezeigt. Hier ein kurzer Ausschnitt aus der Datei von kbr.dat

```
#
# KBr Testmessung FTIR
# 10.03.2005
```

```
#
7500.54795    1.63501
7498.61930    1.57173
7496.64069    1.57159
7494.76198    1.56722
...
```

Diese Daten können nach dem Aufruf von Gnuplot mit dem Kommando **plot** dargestellt werden

```
gnuplot> plot "kbr.dat" using 1:2 title 'KBr Testmessung FTIR'
```

Dies erzeugt einen Graph der Daten in einem Standardfenster. Zur Gestaltung des Plots können die folgenden Kommandos verwendet werden:

Titel:	> set title "KBr Testmessung FTIR"
Bezeichnung der x-Achse	> set xlabel "Wellenlaenge"
Bezeichnung der y-Achse	> set ylabel "Absorption"
Datenbereich der x-Achse	> set xrange [0.001:0.005]
Datenbereich der y-Achse	> set yrange [20:500]
automatische Skalierung	> set autoscale
Markierung setzen	> set label "Marke" at 0.003, 260
alle Markierungen loeschen	> unset label
logarithmische Skalierung	> set logscale
logarithmische Skalierung y-Achse	> unset logscale; set logscale y
setzen der Skalierung x-Achse	> set tics xtics (0.002,0.004,0.006)
automatische Ticks x-Achse	> unset tics; set xtics auto

Die Daten können zum Beispiel mit Hilfe des folgenden Skriptes geplottet werden:

```
# Gnuplot script for plotting data file "kbr.dat"
# This file is called kbr.gpl
set autoscale
unset log
unset label
set xtics auto
set ytics auto
set title "KBr-Testmessung 10.03.2005 FTIR"
set xlabel "[cm-1]"
set ylabel "Absorption"
set key 0.01,100
set label "Yield Point" at 0.003,260
```

Die Umlenkung des Plots in eine Postscriptdatei wird mit folgenden Kommandos erreicht:

```
gnuplot> set out 'plotfile.ps'
gnuplot> set term postscript enhanced color
gnuplot> replot
```

An das Spektrum lässt sich eine beliebige Funktion mit folgenden Kommandos fitten und darstellen

```
gnuplot> l(x) = a*x+b
gnuplot> a = 1; b = 1
gnuplot> fit f1(x) 'linear.dat' using 1:2 via a, b
gnuplot> plot 'linear.dat' using 1:2 w points, l(x) w lines
```

Daten lassen sich auch mit Bezierkurven oder Splines glätten. Um den Datensatz geglättet zu plotten, wird einfach nach dem plot-Kommando die Glättungsfunktion angegeben:

```
gnuplot> plot 'kbr.dat' using 1:2:(0.00001) smooth acsplines
```

Dabei gibt der Wert im Klammern das Gewicht der einzelnen Punkte an: Je kleiner der Wert, desto mehr Punkte werden bei der Berechnung der Splines einbezogen. Die geglätteten Daten können auch wieder in eine ASCII-Datei ausgegeben werden, indem die Ausgabe zuvor in eine Tabelle umgelenkt wird.

```
gnuplot> set out 'kbr_smooth.dat'
gnuplot> set term table
gnuplot> plot 'kbr.dat' using 1:2:(0.00001) smooth acsplines
```