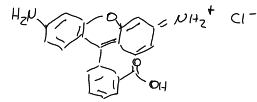


FCS (Fluoreszenz korrelationspektroskopie)

- TD & kin. Informationen
- 10^{-12} bis 10^0 s Prozesse messbar
- geringe Anzahl Fluoreszenzmoleküle & geringes Messvolumen
- ↳ annähernd physiologische Bedingungen

Rhodamin 110: 0,37 kDa

↳ freies Farbstoffmolekül



GFP: 27 kDa (hier 30,6 kDa)

↳ Lebendzelluntersuchungen

Alexa-488-IgG: ~150 kDa → Antikörper + Alexa-488

↳ Immunfluoreszenzfärbung

FCS:

- Fluoreszenzfluktuationen charakteristischer Zeitdauer um GGW-Mittelwert → Bestimmung kin. Parameter
- Konz. im nM, Vol. im fl. Bereich nötig → sonst Überlagerung Signale / zu starkes Untergrundsignal
- ↳ Messung in konfokalem Mikroskop
- Voraussetzung: Prozesse müssen Fluoreszenzintensität system. beeinflussen
- ↳ Translationsdiffusion, Rotationsdiffusion, photophys., photochem. & chem. Prozesse
- ⇒ im Detektionsvolumen fortlaufend angeregt → „burst“ an Photonen-Emission ⇒ Diffusion Molekül durch Beobachtungsvolumen
- ↳ Detektorsignale als Fkt. der Zeit

Korrelationsfunktion

- Rauschanalyse: Berechnung Autokorrelationsfunktion → Trennung system. & zufälliges Rauschen

↳ Grad Übereinstimmung Fkt mit sich selbst zu anderen Zeitpunkt

$$U_F(t) = \langle U_F \rangle + \delta U_F(t) \quad \langle U_F \rangle = \frac{1}{T} \int_0^T U_F(t) dt \quad T: \text{Messzeit}$$

gemessenes Fluoreszenzsignal Mittelwert Fluktuation

$$\text{Autokorrelationsfunktion} \quad A(t_c) = \langle U_F(t) \cdot U_F(t+t_c) \rangle = \frac{1}{T} \int_0^T U_F(t) \cdot U_F(t+t_c) dt$$

Bedeutung

- Berechnung Korrelationsfkt: jeder Messwert durch Durchlaufen aller Korrelationszeiten t_c → Produkte $U_F(t) \cdot U_F(t+t_c)$
- ↳ Mitteln Zeitpunkte mit fester Korrelationsfkt
- ↳ $A(t_c) = \langle U_F^2 \rangle + \langle \delta U_F(t) \cdot \delta U_F(t+t_c) \rangle$
- normierte Autokorrelation $G(t_c) = \frac{\langle U_F(t) U_F(t+t_c) \rangle}{\langle U_F(t) \rangle^2} = 1 + \frac{\langle \delta U_F(t) \delta U_F(t+t_c) \rangle}{\langle U_F(t) \rangle^2}$
- ↳ lin. o. log. Zeitskala → gleichzeitige Beobachtung versch. Prozesse ⇒ log. Zeitachse

Teilchenzahl & Poisson-Verteilung

- Intensität $U_F(t) \sim$ Anzahl registrierter Photonen an $t \sim$ Anzahl fluoreszierende Moleküle n
- Wahrscheinlichkeit $p(n)$ an zufälligem Zeitpunkt n Moleküle im Detektionsvolumen: Poisson-Verteilung $p(n) = \frac{U^n}{n!} e^{-U}$
- ↳ $\langle n \rangle = \sum_{n=0}^{\infty} n \cdot p(n) = U$; $\langle n^2 \rangle = \sum_{n=0}^{\infty} n^2 \cdot p(n) = U^2 + U$
- ⇒ $t_c = 0$: $G(0) = 1 + \frac{\langle \delta U_F(t)^2 \rangle}{\langle U_F(t) \rangle^2} = 1 + \frac{\langle n^2 \rangle - \langle n \rangle^2}{\langle n \rangle^2} = 1 + \frac{U}{U^2} = 1 + \frac{1}{U}$
- ⇒ Amplitude ↑ bei ↓ Teilchenzahl ⇒ Schwankungen größer, desto weniger Teilchen beteiligt

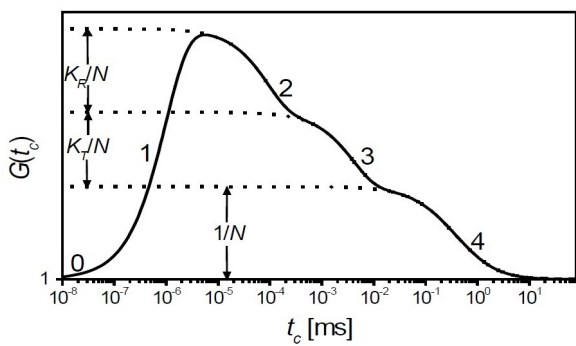
Aufbau

über Strahlenteiler (Laserlicht wird reflektiert)

- konfokales Mikroskop gekoppelt mit Laserstrahl geeigneter Wellenlänge
- Fokus Laser über Mikroskopobjektiv in Probe
- Mikroskopobjektiv sammelt Fluoreszenzlicht in parallelem Strahl
- Fluoreszenzlicht über Strahlenteiler: Photonen durch Tubuslinse auf Lochblende abgebildet
- ↳ gibt große Detektionsvolumen vor ⇒ hier ca. 1 μm
- konfokaler Aufbau: Fluoreszenzlicht vor & hinter Fokalebene stark reduziert ⇒ bessere Auflösung
- Fluoreszenzlicht mit polarisierendem Strahlenteiler auf 2 Detektoren aufgeteilt ⇒ Einzelphotonenempfindliche Avalanche-Photodioden
- ↳ detektiertes Photon erzeugt Puls ⇒ registriert von Zellelektronik
- ↳ Totzeitfrei arbeiten
- konfokaler Aufbau minimiert Hintergrundsignal → Rayleigh- & Ramanstreuung LM & fluoreszierende Verunreinigungen ~ Detektionsvolumen (1-6 fl)
- ↳ kl. Vol. durch konfokalen Aufbau → beeinflusst über Laserstrahl, konfokale Optik & Lochblende

Modellfunktion zur Interpretation von Fluoreszenzkorrelationskurven

- Signalfluktuationen über verschiedene unabhängige Prozesse: $G(t_c) = 1 + \frac{1}{U} G_D(t_c) [1 + \sum_i G_i(t_c)]$
- ↳ Triplett- & Protonierungsreaktionen: $G(t_c) = 1 + \frac{1}{U} G_D(t_c) [1 + G_T(t_c) + G_R(t_c)] = 1 + \frac{1}{U} G_D(t_c) [1 + K_T e^{-\frac{t_c}{\tau_T}} + K_R e^{-\frac{t_c}{\tau_R}}]$
- ⇒ Amplitude invers Anzahl Fluorophore im Fokus ⇒ bekanntes Detektionsvolumen: Konzentration, Zählrate pro Molekül bestimmbar
- Terme in Korn.fkt zu Abfall: Bunching, Anstieg: Antibunching



- bestimmt durch Anregungsrate & Fluoreszenzlebensdauer
- [0-1] Ankündigung: Kor. 2 Photonen für kurze Zeit t_c mit Kernzeit \uparrow
 $\hookrightarrow t_c = 0$: Molekül in Grundzustand & Wahrsch. 2. Photon aussenden = 0
 - [2] chem. GGW fluoreszente & nicht-fluoreszente Konformation Fluorophor
 - [3] Triplettzeit $t_T \rightarrow$ Molekül nicht an Absorption-Emissionszyklus beteiligt
 \hookrightarrow Kor. Plot fällt ab, Amplitude K_T als Maß Anteil Mol. in Triplettzustand
 - [4] Diffusionszeit $t_D \rightarrow$ Wahrsch. 2. Photon detektieren $\downarrow \rightarrow$ Molekül aus Messfokus
hier: $t_D \approx 200 \mu s - 2 ns$

Diffusion

Beeinflussung Fluoreszenzsignal durch translativer Diffusion hier als langsamster Prozess

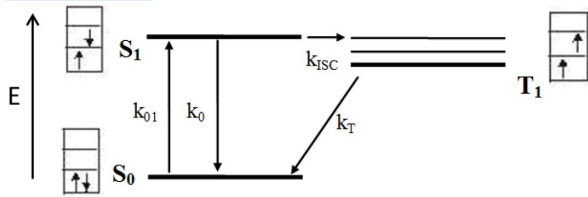
$$\hookrightarrow G_D(t_c) = \left(1 + \frac{t_c}{t_D}\right) \left(1 + \frac{\omega_0^2}{\omega_z^2} \frac{t_c}{t_D}\right)^{-\frac{1}{2}} \quad \omega_0: \text{radiale Ausdehnung} \quad \omega_z: \text{axiale Ausdehnung}$$

$$\hookrightarrow \text{Fick'sche Gesetze: } t_D = \frac{\omega_0^2}{4D} \quad D \text{ bekannt}$$

$$\hookrightarrow \text{Detektionsvolumen } V_D = \pi \frac{\omega_0^2}{2} \omega_z^2$$

$$\hookrightarrow \text{Stokes-Einstein } D = \frac{k_B T}{6\pi \eta R_h} \rightarrow t_D \propto \frac{1}{D} \Rightarrow \text{Bestimmung Molekülgröße anhand Translationsdiffusionskonstante unempfindlich}$$

Triplettkinetik



Dunkelphasen z.B. durch Triplettzustand

$$G_T(t_c) = K_T e^{-\frac{t_c}{t_T}} = \frac{N_{\text{Triplett}}}{N_{\text{Singulett}}} e^{-\frac{t_c}{t_T}} \frac{T_{\text{req}}}{1 - T_{\text{req}}} e^{-\frac{t_c}{t_T}} \quad T_{\text{req}}: \text{stationäre Besetzungswahrsch. von } T_1$$

$$\frac{1}{t_T} = \left(k_T + \frac{k_{01} k_{isc}}{k_{01} + k_0}\right) \quad T_{\text{req}} = \frac{k_{isc}}{k_T} S_{1eq} = \frac{k_{isc} k_{01}}{k_{01}(k_{isc} + k_T) + k_T(k_0 + k_{isc})}$$

Vollständige Korrelationsfunktion

für Triplettanregung, GGW-Rkt. 1. Ordnung

$$G(t_c) = 1 + \frac{1}{D} G_D(t_c) [1 + G_T(t_c) + G_R(t_c)] = 1 + \frac{1}{D} \left(\frac{1}{1 + \frac{t_c}{t_D}}\right) \left(\frac{1}{1 + \frac{\omega_0^2}{\omega_z^2} \frac{t_c}{t_D}}\right)^{\frac{1}{2}} [1 + K_T e^{-\frac{t_c}{t_T}} + K_R e^{-\frac{t_c}{t_R}}]$$

gleichzeitige Diffusion zweier Molekülsorten unterschiedl. Helligkeit B : gemeinsamer Diffusionskern additiv aus individuellen Termen
 \hookrightarrow Gewichtung über Helligkeitsabhängigen Faktor

VERSUCHSDURCHFÜHRUNG je 2 Messungen à 2 min

1. Bestimmung Streulichtanteil: Messung PBS phosphate buffered saline \rightarrow Zählrate notieren

2. Messung Rhodamin 110: 1 mL PBS + wenige μL Rhodamin-110-Lsg bis Zählrate ca. 50 kHz, gut durchmischen

\hookrightarrow Amplitude bei höherem $c \downarrow$ geringere Schwankungen

3. Messung GFP: 1 mL PBS + 0,5 μL GFP-Lsg

4. Messung Alexa-488-IgG: 1 mL PBS + 0,5 μL Alexa-488-IgG-Lsg

5. Messung Lys 2 untersch. Komponenten: 1 mL PBS + 0,5 μL Lys

Diffusionsterm Gauß'sches Detektionsvolumen: $G_D(t_c) = \left(\frac{1}{1 + \frac{t_c}{t_D}} \right) \left(\frac{1}{1 + \left(\frac{\omega_0}{z_0} \right)^2 \frac{t_c}{t_D}} \right)^{1/2}$

Fick'sches Gesetz: $\omega_0^2 = 4D t_D$
 $\omega_0 = \sqrt{4D t_D}$
 $t_D = \frac{\omega_0^2}{4D}$

Detektionsvolumen: $V_D = \pi^{3/2} z_0 \omega_0^2$

Stokes-Einstein-Formel: $D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_h}$

Korrelationsfunktion zweier Molekülsorten:

$$G(t_c) = 1 + \left[\frac{N_1 B_1^2}{(N_1 B_1 + N_2 B_2)^2} G_{D1}(t_c) + \frac{N_2 B_2^2}{(N_1 B_1 + N_2 B_2)^2} G_{D2}(t_c) \right] [1 + G_T(t_c) + G_R(t_c)]$$

$$= 1 + \frac{N_1 B_1^2 + N_2 B_2^2}{(N_1 B_1 + N_2 B_2)^2} \left[\frac{N_1 B_1^2}{N_1 B_1^2 + N_2 B_2^2} G_{D1}(t_c) + \frac{N_2 B_2^2}{N_1 B_1^2 + N_2 B_2^2} G_{D2}(t_c) \right] [1 + G_T(t_c) + G_R(t_c)]$$

$$= 1 + \frac{1}{N_{\text{eff}}} [x_1 G_{D1}(t_c) + (1-x_1) G_{D2}(t_c)] [1 + G_T(t_c) + G_R(t_c)]$$

$$= 1 + \frac{1}{N_{\text{eff}}} \left[x_1 \left(\frac{1}{1 + \frac{t_c}{t_{D1}}} \right) \left(\frac{1}{1 + \left(\frac{\omega_0}{z_0} \right)^2 \frac{t_c}{t_{D1}}} \right)^{1/2} + (1-x_1) \left(\frac{1}{1 + \frac{t_c}{t_{D2}}} \right) \left(\frac{1}{1 + \left(\frac{\omega_0}{z_0} \right)^2 \frac{t_c}{t_{D2}}} \right)^{1/2} \right] [1 + K_T e^{-\frac{t_c}{\tau_T}} + K_R e^{-k_R t_c}]$$

Berechnung tatsächlicher Molekülanteile:

$$x_1 = \frac{N_1 B_1^2}{N_1 B_1^2 + N_2 B_2^2} = \frac{1}{1 + \frac{N_2 B_2^2}{N_1 B_1^2}}$$

$$\frac{N_2 B_2^2}{N_1 B_1^2} = \frac{1}{x_1} - 1 \rightarrow \frac{N_2 B_2}{N_1 B_1} = \left(\frac{1}{x_1} - 1 \right) \left(\frac{B_1}{B_2} \right)^2 = \frac{x_2}{x_1} \left(\frac{B_1}{B_2} \right)^2$$

Berechnung Konzentrationen:

$$\frac{1}{N_{\text{eff}}} = \frac{N_1 B_1^2 + N_2 B_2^2}{(N_1 B_1 + N_2 B_2)^2}$$

$$N_{\text{eff}} = \frac{(N_1 B_1 + N_2 B_2)^2}{N_1 B_1^2 + N_2 B_2^2} = N_1 \frac{(B_1 + \frac{N_2}{N_1} B_2)^2}{B_1^2 + \frac{N_2}{N_1} B_2^2}$$

Berechnung Gesamtteilchenanzahl:

$$N_{\text{ges}} = \frac{N_F(\text{ges})}{(f_1 B_1 + f_2 B_2)} = \frac{N_F(\text{ges})}{(f_1 (B_1 - B_2) + B_2)} = N_F(\text{ges}) \left(\frac{(B_1 - B_2)}{\frac{1}{x_1} \left(\frac{B_1}{B_2} \right)^2 - \left(\frac{B_1}{B_2} \right) + 1} + B_2 \right)^{-1}$$

V1: In der Abb. 4a (links) ist eine Korrelationskurve mit zwei sehr unterschiedlichen exponentiellen Anteilen gegen eine lineare Zeitachse dargestellt. Markieren Sie in der Abbildung die zwei Funktionsbereiche. Markieren Sie diese auch in der logarithmischen Darstellung (4b). Orientieren Sie sich dabei an der Korrelationszeit t_c und dem Amplitudenwert.

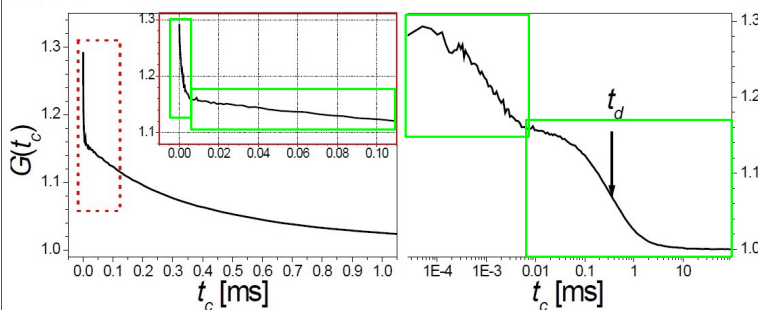


Abbildung 4: Korrelationskurve mit
(a) linearer Zeitskala (im Einsatz oben rechts ist der markierte Bereich vergrößert)

(b) logarithmischer Zeitskala mit der Darstellung der charakteristischen Diffusionszeit t_d .

V2: Fluoreszierende Marker im System

- zeitliche Fluktuation der Fluoreszenz
- geringe Teilchenzahl im Beobachtungsvolumen
- stationäres System
- Dynamik im messbaren Zeitbereich
- Fluoreszenz über Messdauer nicht zerstört