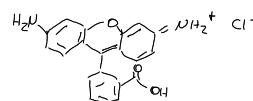


FCS (Fluoreszenz Korrelationspektroskopie)

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

Rhodamin 110: 0.37 kDa



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., photochim. & chem. Prozesse
⇒ im Detektionsvolumen fortlaufend angeregt → „burst“ an Photonen-Emission ⇒ Diffusion Molekül durch Beobachtungsvolumen
↳ Detektorsignale als Flkt. der Zeit
Detektion erzeugte Photonen

Korrelationsfunktion

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

↳ Grad Übereinstimmung Flkt mit sich selbst zu anderem Zeitpunkt

$$N_F(t) = \langle N_F \rangle + \delta N_F(t) \quad \langle N_F \rangle = \frac{1}{T} \sum_0^T N_F(t) dt \quad T: \text{Messzeit}$$

gemessenes Mittelwert Fluktuation

$$\text{Autokorrelationsfunktion} \quad A(t_c) = \langle N_F(t) \cdot N_F(t+t_c) \rangle = \frac{1}{T} \sum_0^T N_F(t) \cdot N_F(t+t_c) dt$$

Bedeutung

- Berechnung Korrelationsplot: jeder Wert durch Durchlaufen aller Korrelationszeiten $t_c \rightarrow$ Produkte $N_F(t) \cdot N_F(t+t_c)$
- ↳ Mitteln Zeitpunkte mit fester Korrelationsfkt

$$\hookrightarrow A(t_c) = \langle N_F^2 \rangle + \langle \delta N_F(t) \cdot \delta N_F(t+t_c) \rangle$$

$$\text{normierte Autokorrelation} \quad G(t_c) = \frac{\langle N_F(t) N_F(t+t_c) \rangle}{\langle N_F(t) \rangle^2} = 1 + \frac{\langle \delta N_F(t) \delta N_F(t+t_c) \rangle}{\langle N_F(t) \rangle^2}$$

↳ lin. o. log. Zeitskala → gleichzeitige Beobachtung versch. Prozesse ⇒ log. Zeitskala

Teilchenzahl & Poisson-Verteilung

- Intensität $N_F(t) \sim$ Anzahl registrierter Photonen an $t \sim$ Anzahl fluoreszierende Moleküle n

Wahrscheinlichkeit $p(n)$ an zufälligem Zeitpunkt n Moleküle im Detektionsvolumen: Poisson-Verteilung $p(n) = \frac{U^n}{n!} e^{-U}$

$$\hookrightarrow \langle n \rangle = \sum_{n=0}^{\infty} n \cdot p(n) = U; \quad \langle n^2 \rangle = \sum_{n=0}^{\infty} n^2 \cdot p(n) = U^2 + U$$

$$\Rightarrow t_c = 0: \quad G(0) = 1 + \frac{\langle \delta N_F(t)^2 \rangle}{\langle N_F(t) \rangle^2} = 1 + \frac{\langle n^2 \rangle - \langle n \rangle^2}{\langle n \rangle^2} = 1 + \frac{1}{U}$$

⇒ Amplitude T bei ↓ Teilchenzahl ⇒ Schwankungen größer, desto weniger Teilchen beteiligt

Aufbau

über Strahlteiler (Laserstrahl wird reflektiert)

- konfokales Mikroskop gekoppelt mit Laserstrahl geeigneter Wellenlänge

- Fokus Laser über Mikroskopobjektiv in Probe

- Mikroskopobjektiv sammelt Fluoreszenzlicht in parallelem Strahl

- Fluoreszenzlicht über Strahlteiler: Photonen durch Tubuslinse auf Lochblende abgesplittet

↳ Ø gibt große Detektionsvolumen vor ⇒ hier ca. 1 μm

- konfokaler Aufbau: Fluoreszenzlicht vor & hinter Fokalebene stark reduziert ⇒ bessere Auflösung

- Fluoreszenzlicht mit polarisierenden Strahlteiler auf 2 Detektoren aufgeteilt ⇒ einzelphotonenempfindliche Avalanche-Photodioden

↳ detektiertes Photon erzeugt Puls ⇒ Registriert von Zähltransistor

konfokaler Aufbau minimiert Hintergrundsignal → Rayleigh- & Ramanstreuung LM & fluoreszierende Verunreinigungen ~ Detektionsvolumen (1-6 fL)

↳ kl. Vol. durch konfokalen Aufbau → beeinflusst über Laserstrahl, konfokale Optik & Ø Lochblende

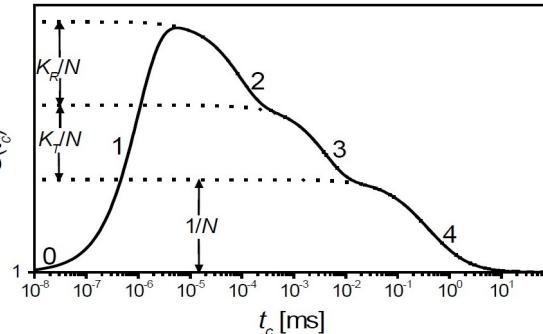
Modellfunktionen zur Interpretation von Fluoreszenz korrelationskurven

- Signalfluktuationen über verschiedene unabhängige Prozesse: $G(t_c) = 1 + \frac{1}{U} G_D(t_c) [1 + \sum_i G_i(t_c)]$

$$\hookrightarrow \text{Tripletts- & Protonierungsreaktionen: } G(t_c) = 1 + \frac{1}{U} G_D(t_c) [1 + G_i(t_c) + G_R(t_c)] = 1 + \frac{1}{U} G_D(t_c) [1 + K_T e^{-\frac{t_c}{\tau_T}} + K_R e^{-\frac{t_c}{\tau_R}}]$$

⇒ Amplitude invers Anzahl Fluorophore im Fokus ⇒ bekannte Detektionsvolumen: Konzentration, Zählrate pro Moleköl bestimbar

- Terme in Korr.fkt zu Abfall: Bunching, Anstieg: Antibunching

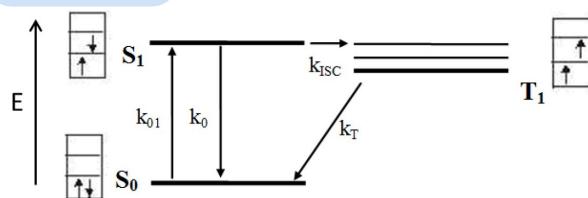


- bestimmt durch Anregungsrate & Fluoreszenzlebensdauer
- [0-1] Antiblinking: korrig. 2. Photonen für kurze Zeit t_c mit Korr.zeit ↑
- ↪ $t_c = 0$: Molekül in Grundzustand & Wahrsc. 2. Photon aussenden = 0
- [2] chem. GGW fluoreszierende & nicht-fluoreszierende Konformation Fluorophor
- [3] Triplettzeit t_T → Molekül nicht an Absorptions-Emissionszyklus beteiligt
- ↪ Korr. fkt. fällt ab, Amplitude K_T als Maß Anteil Mol. in Triplettzustand
- [4] Diffusionszeit t_D → Wahrsc. 2. Photon detektieren ↓ → Molekül aus Messfokus
hier: $t_D \approx 200 \mu\text{s} - 2\text{ns}$

Diffusion

- Beeinflussung Fluoreszenzsignal durch translativen Diffusion hier als langsamster Prozess
- ↪ $G_D(t_c) = \left(\frac{1 + \frac{t_c}{t_D}}{1 + \frac{\omega_0}{\omega_0} \frac{t_c}{t_D}} \right)^{\frac{1}{2}}$ ω_0 : radiale Ausdehnung ω_0 : axiale Ausdehnung
- ↪ Fick'sche Gesetze: $t_D = \frac{\omega_0^2}{4D}$ D berammt
- ↪ Detektionsvolumen $V_D = \pi^{\frac{3}{2}} z_0 \omega_0^2$
- ↪ Stokes-Einstein $D = \frac{k_B T}{6\pi \eta R_h} \rightarrow t_D \propto \frac{1}{D}$ ⇒ Bestimmung Molekülgröße η und Translationsdiffusionskonstante unempfindlich

Triplettkinetik



- Dunkelphasen z.B. durch Triplettzustand
- $G_T(t_c) = K_T e^{-\frac{t_c}{T_T}} = \frac{N_{\text{Triplet}}}{N_{\text{Sинглет}}} e^{-\frac{t_c}{T_T}} \frac{T_{\text{req}}}{1-T_{\text{req}}} e^{-\frac{t_c}{T_{\text{req}}}}$ T_{req} : stationäre Besetzungswahrsch. von T_T
- $\frac{1}{T_T} = (k_T + \frac{k_{01} k_{\text{ISC}}}{k_{01} + k_T}) \quad T_{\text{req}} = \frac{k_{\text{ISC}} k_{01}}{k_T} S_{\text{req}} = \frac{k_{\text{ISC}} k_{01}}{k_{01}(k_{\text{ISC}} + k_T) + k_T(k_{01} + k_{\text{ISC}})}$

Vollständige Korrelationsfunktion

- für Triplettanregung, GGW-Rkt. 1. Ordnung
- $G(t_c) = 1 + \frac{1}{N} G_D(t_c) [1 + G_T(t_c) + G_R(t_c)] = 1 + \frac{1}{N} \left(\frac{1}{1 + \frac{t_c}{t_D}} \right) \left(\frac{1}{1 + (\frac{\omega_0}{\omega_0})^2 \frac{t_c}{t_D}} \right)^{\frac{1}{2}} [1 + K_T e^{-\frac{t_c}{T_T}} + K_R e^{-\lambda_R t_c}]$
- gleichzeitige Diffusion zweier Molekülsorten unterschiedl. Helligkeit B: gemeinsamer Diffusionsterm additiv aus individuellen Terren
↪ Gewichtung über helligkeitsabhängigen Faktor

VERSUCHSDURCHFÜHRUNG

je 2 Messungen à 2 min

1. Bestimmung Streulichtanteil: Messung PBS phosphate buffered saline → Zählrate notieren
2. Messung Rhodamin 110: 1mL PBS + wenige µL Rhodamin-110-Lsg bis Zählrate ca. 504Hz, gut durchmischen
↪ Amplitude bei höherem c ↓ geringere Schwankungen
3. Messung GFP: 1mL PBS + 0,5µL GFP-Lsg
4. Messung Alexa-488-IgG: 1mL PBS + 0,5µL Alexa-488-IgG-Lsg
5. Messung Lsg 2 untersch. Konzentrationen: 1mL PBS + 0,5µL Lsg

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: $D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R}$

Korrelationsfunktion zweier Molekülsorten:

$$\begin{aligned} G(t_c) &= 1 + \left[\frac{N_1 B_1^2}{(N_1 B_1 + N_2 B_2)^2} G_{D1}(t_c) + \frac{N_2 B_2^2}{(N_1 B_1 + N_2 B_2)^2} G_{D2}(t_c) \right] [1 + G_T(t_c) + G_R(t_c)] \\ &= 1 + \frac{N_1 B_1^2 + N_2 B_2^2}{(N_1 B_1 + N_2 B_2)^2} \left[\frac{N_1 B_1^2}{N_1 B_1^2 + N_2 B_2^2} G_{D1}(t_c) + \frac{N_2 B_2^2}{N_1 B_1^2 + N_2 B_2^2} G_{D2}(t_c) \right] [1 + G_T(t_c) + G_R(t_c)] \\ &= 1 + \frac{1}{N_{\text{eff}}} \left[x_1 G_{D1}(t_c) + (1-x_1) G_{D2}(t_c) \right] [1 + G_T(t_c) + G_R(t_c)] \\ &= 1 + \frac{1}{N_{\text{eff}}} \left[x_1 \left(\frac{1}{1 + \frac{t_c}{t_{D1}}} \right) \left(\frac{1}{1 + \left(\frac{\omega_0}{z_0} \right)^2 \frac{t_c}{t_{D1}}} \right)^{1/2} + (1-x_1) \left(\frac{1}{1 + \frac{t_c}{t_{D2}}} \right) \left(\frac{1}{1 + \left(\frac{\omega_0}{z_0} \right)^2 \frac{t_c}{t_{D2}}} \right)^{1/2} \right] [1 + K_T e^{-\frac{t_c}{T}} + K_R e^{-k_R t_c}] \end{aligned}$$

Berechnung tatsächlicher Molekülanteile:

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

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

Berechnung Konzentrationen:

$$\begin{aligned} \frac{1}{N_{\text{eff}}} &= \frac{N_1 B_1^2 + N_2 B_2^2}{(N_1 B_1 + N_2 B_2)^2} \\ N_{\text{eff}} &= \frac{(N_1 B_1 + N_2 B_2)^2}{N_1 B_1^2 + N_2 B_2^2} = N_1 \frac{\left(\frac{N_2}{N_1} \frac{B_2}{B_1} \right)^2}{B_1^2 + \frac{N_2^2}{N_1^2} B_2^2} \end{aligned}$$

Berechnung Gesamtteilchenanzahl:

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

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.

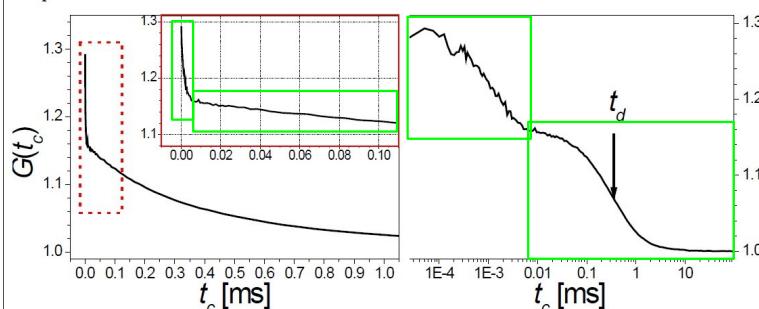


Abbildung 4: Korrelationskurve mit
(a) linearer Zeitskala (im Einsatz oben rechts
ist der markierte Bereich vergrößert)

(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