

Geräte:

TCSPC: PicoHarp 300

Mikroskop: Leica TCS-SP5

Steuerungsprogramm: LAS AF

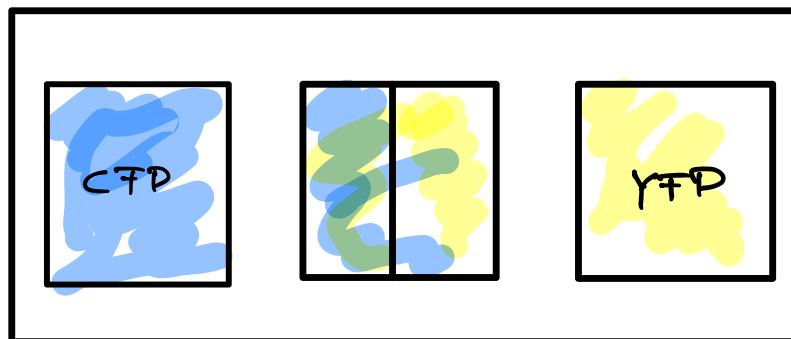
TCSPC-St. p.: SymPhoTime

Objektiv: HCX PL APO lambda blue 63x num apert 1.4 (100000x)

Laser: Argon-Laser

Verwendete Zellen: HeLa-Zellen

Verwendete Proteine: PH-CFP, PH-YFP



4.2 Aufnahme der Sensitized Emission

Gain : 1000

Offset = 0

Laser : 458 nm \rightarrow 81%

514 nm \rightarrow 3%

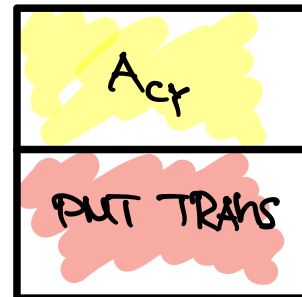
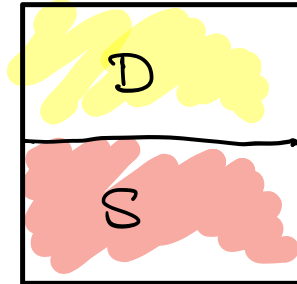
Laser wie oben vermerkt.

Dcy - Messbereich : 470 - 500 nm

Acy - Messbereich : 520 - 550 nm

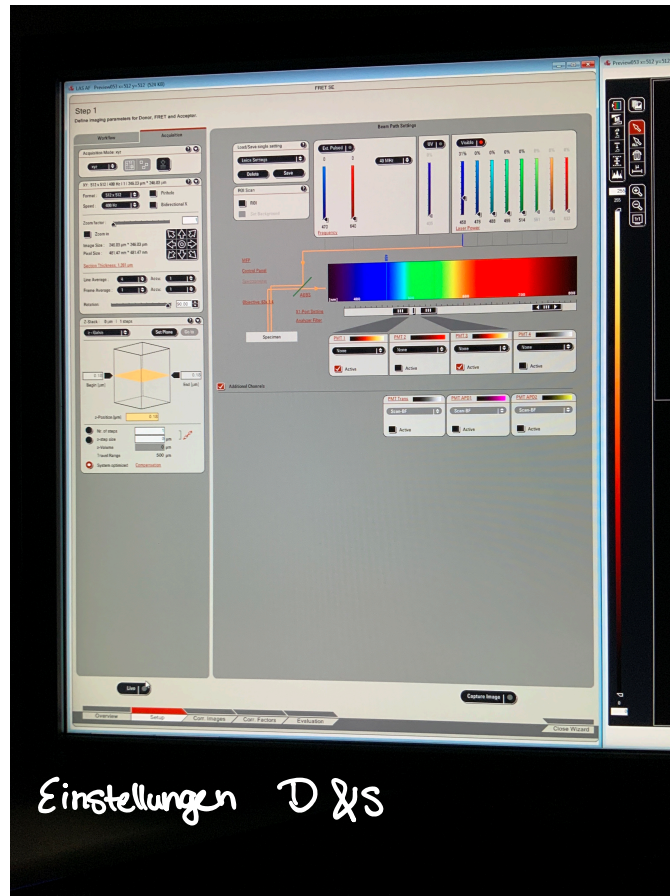
Dinhalte : 2 Frequenz : 400 Hz

Lineaveraging : 4



Gemessen werden 15 CY-Zellen :

Zelle 1:	Image 001/004	Zelle 8	45/47
Zelle 2	006/007	Zelle 9	50/52
Zelle 3	11/13	Zelle 10	57/58
Zelle 4	18/20	Zelle 11	65/66
Zelle 5	23/25	Zelle 12	72/73
Zelle 6	31/33	Zelle 13	76/77
Zelle 7	38/41	Zelle 14	81/82
		Zelle 15	85/86



Einstellungen D & S

Jetzt messen wir CFP 10x

Zelle 1: 3/4

Zelle 2: 7/8

Zelle 3: 11/12

Zelle 4: 16/17

Zelle 5: 20/21

Zelle 6: 24/25

Zelle 7: 29/30

Zelle 8: 33/34

Zelle 9: 37/38

Zelle 10: 43/44

Bilder werden wie oben aufgenommen

YSP-Messung:

Zelle 1:	3/4	Zelle 2:	7/8
Zelle 3:	11/12	Zelle 4:	15/16
Zelle 5:	19/20	Zelle 6:	24/25
Zelle 7:	28/29	Zelle 8:	32/33
Zelle 9:	36/37	Zelle 10:	40/41

Bleichen:

Vorgehen:

1. Suche einer Zelle und herantreten
2. Wählen des Bleichbereichs (ROI 1)
3. Einstellen der Bildserie

Bei allen Messungen:

Vor der Messung: 10 Frames

Bleichen: 12 Frames

Nach dem Bleichen: 20 Frames

→ Start des Bleichens

4. Zusätzliche ROIs einzeichnen:

- ROI 2: entlang der Membran
- ROI 3: um kleinen hellen Fleck

5. Screenshots + Graphen als csv exportieren

Messungen: 10 Messungen
(Nr. 2-11; 1: Test zum Verführen)

→ 1: Test

Messungen: 2, 3, 4, 5, 8,

Als Beispiel verwenden wir Snap2 aus Messung 13

Bleichung: Donormessung

Messen CFP wie oben beschrieben

Ab Messung 014.

Sehen keinen Unterschied → Beim Bleichen Retro
Emission

Bleichung Akzeptormessung

Messen YFP wie oben beschrieben ⇒ Messung 20 & 21
sind Fehlmessungen

Verwenden Messung 20, 21, 22

Lifetime-Messung

Eigentliche Arbeit wird auf dem „SynPhoTime“-Programm gemacht

Der Mensch muss nun noch die Zählrate auf circa 400 000 $1/s$ regulieren und dann auf Start drücken.

Danach wird mithilfe des Programms das Histogramm gefittet