

FRET: Versuchsdruchführung

Anna-Maria Pleyer

September 7, 2021

1 Bildaufnahmen am Konfokalmikroskop

- Konfokalmikroskop testen
- Wovon hängt die minimale Aufnahmedauer einer konfokalen Aufnahme ab?
- Wie ist das Detektorsignal von den Aufnahmeparametern abhängig?
- Parametereinstellungen (ohne Bleichen!)

2 Aufnahmen der Sensitized Emission

FRET Effizienz über fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen bestimmen.
Mithilfe der Argon-Laserlinien und Detektion über die Photomultiplier.
FRET Intensität ist die Akzeptorfluoreszenz bei Donor-Anregung.
Probe mit doppelten Zellen (CFP und YFP).

- FRET Bilder aufnehmen S_{CY}
- Aufnahmen nur von CFP D_{CY}
- Aufnahmen nur von YFP A_{CY}
- D_{CY} mit Anregung und Detektion des Donors
- A_{CY} mit Anregung und Detektion des Akzeptors
- S_{CY} mit Anregung des Donors und Detektion des Akzeptors
- mindest 10 Zellen bei gleicher Anregungsintensität

Bilder für die Korrekturfaktoren
CFP:

- NUR Zellen mit reiner CFP Makierung
- D_{CFP} mit Anregung und Detektion des Donors
- A_{CFP} mit Anregung und Detektion des Akzeptors
- S_{CFP} mit Anregung des Donors und Detektion des Akzeptors
- mindest 10 Zellen, selbe aufnahme Parameter (wie FRET)

Wiederholung mit YFP:

- NUR Zellen mit reiner YFP Makierung
- D_{YFP} mit Anregung und Detektion des Donors
- A_{YFP} mit Anregung und Detektion des Akzeptors
- S_{YFP} mit Anregung des Donors und Detektion des Akzeptors
- mindest 10 Zellen, selbe aufnahme Parameter (wie FRET)

Kann man aus E den Abstand der Fluorophore berechnen? Zusätzliche Messungen?

3 Donoremission nach Akzeptorbleichen

- Parameter von bleichen bestimmen (!NUR Akzeptor bleichen; Nicht Donor!)
- FRET Effizienz bestimmen VOR dem Bleichen
- Akzeptormolekül Bleichen (min. 50% der Ursprünglichen Intensität)
- FRET Effizienz bestimmen NACH Bleichen
- mindest. 10 Zellen ausreichend Bilder pro Zelle
- Vergleichen mit Sensitized Emission
- Mögliche Nachteile/Störgrößen dieser Methode?

4 Lebenszeitmessung

- Lebenszeiten von CFP an Zellen, die nur eine CFP Makierung aufweisen
- Lebenszeiten von YFP an Zellen, die nur eine YFP Makierung aufweisen
- Passender Filter Würfel verwenden
- Lebenszeit der Donor Moleküle (YFP **und** CFP Zellen) VOR Bleichung des Akzeptormolekül
- Bleichen des Akzeptormolekül
- Lebenszeit der Donor Moleküle (YFP **und** CFP Zellen) NACH Bleichung des Akzeptormolekül
- Vergleich der (vor und nach Bleichung) Lebenszeiten (Nur CFP, YFP und CFP)
- Abschätzung der FRET Effizienz
- Vergleich FRET Effizienz mit Sensitized Emission und Donoremission unter AKzeptorbleichen
- Physikalisch sinnvolle Ergebnisse der Lebenszeiten
- Eventuelle Abweichungen?
- Vor- und Nachteile dieser Methode?