

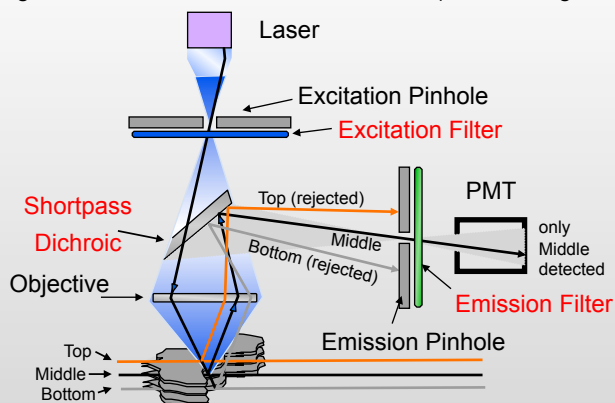
V. Messmethoden – FCS

Experimental Physics I, University of Bayreuth



Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

Abbildung der beiden Lochblenden aufeinander (confocal – gem. Fokus)



3D-Information, Abrastern des Bildes mit Laser, Datenaufnahme (pixelweise) mit PMT

Problem:

teuer, langsam ($\sim 1\text{fps}$), $>50\%$ der Fluoreszenz wird verworfen
wiederholte Belichtung der Probe für nächste fokale Ebene (\Rightarrow Bleichen)

Experimental Physics I, University of Bayreuth



Die Grenzen der Lichtmikroskopie

Abbesches Beugungslimit, Auflösungsgrenze



Ernst Abbe, 1873

$$d = \frac{\lambda}{2 \text{NA}}$$

$\lambda_{\text{exc.}} = 520 \text{ nm (green)}$
 $\text{NA} = 1.3$
 $\Rightarrow \text{resolution: } 200 \text{ nm}$

n = Brechungsindex des Immersionsmediums
 • 1.0 Luft
 • 1.33 Wasser
 • <1.56 Öl

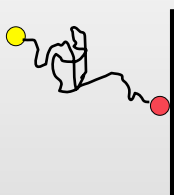
Steigende numerische Apertur => bessere Auflösung

Experimental Physics I, University of Bayreuth



Information über molekulare Bindungen?

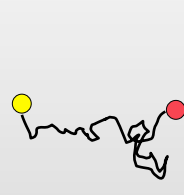
Diffusion & Assoziation
an Zielstruktur



gebundener Zustand



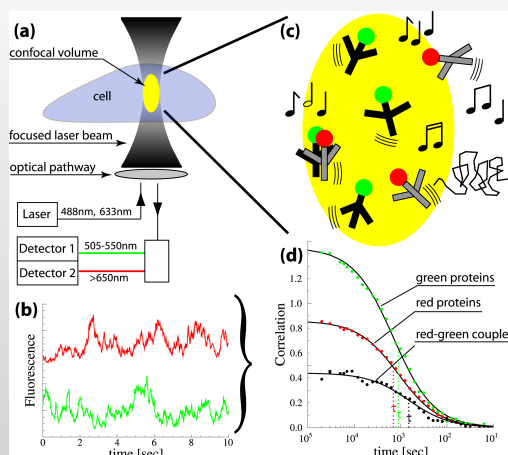
Dissoziation & Diffusion
weg von Zielstruktur



Experimental Physics I, University of Bayreuth



Nicht-invasive Diffusionsmessung



Fluorescence Correlation Spectroscopy

Probenvolumen <1fl
nM Konzentrationen reichen
On-average single molecule

Experimental Physics I, University of Bayreuth



Herleitung der FCS-Kurve

Zerlege Fluoreszenz in Teilchendichte und Anregungsfokus

$$F(t) = \langle F \rangle + f(t) = \int \langle \rho \rangle I(r) d^3r + \int \rho(r) I(r) d^3r$$

$$\text{mit } I(r) = I_0 \exp \left\{ -\frac{2(x^2 + y^2)}{r_0^2} - \frac{2z^2}{S^2 r_0^2} \right\}$$

$$C(\tau) = \langle f(t) \cdot f(t + \tau) \rangle = \int \langle \rho(r, t) \rho(r', t + \tau) \rangle I(r) I(r') d^3(r, r')$$

$$= \int G(r, r', \tau) I(r) I(r') d^3(r, r') \quad \text{mit dem Propagator } G \text{ der Diffusion}$$

$$= \frac{1/N}{(1 + \tau/\tau_D) \sqrt{1 + \tau/(S^2 \tau_D)}} , \quad \tau_D = \frac{r_0^2}{4D}$$

Experimental Physics I, University of Bayreuth



FCCS-Theorie in Kurzform

Bestimme beide Autokorrelationskurven und die Kreuzkorrelation

$$C_{RG}(\tau) = \langle f_R(t) \cdot f_G(t + \tau) \rangle = \int \langle \rho_R(r, t) \rho_G(r', t + \tau) \rangle I_R(r) I_G(r') d^3(r, r')$$

$$= \frac{1/N_{RG}}{(1 + \tau/\tau_D) \sqrt{1 + \tau/(S^2 \tau_D)}} \quad , \quad \tau_D = \frac{r_0^2}{4\sqrt{D_R D_G}}$$

$$C_{GG}(\tau=0) = \frac{1}{N_G + N_{RG}} \quad C_{RR}(\tau=0) = \frac{1}{N_R + N_{RG}} \quad C_{GR}(\tau=0) = \frac{1}{N_{RG}}$$

Erhalte damit die Dissoziationskonstante der Reaktion

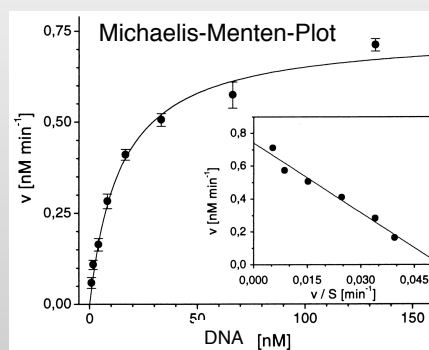
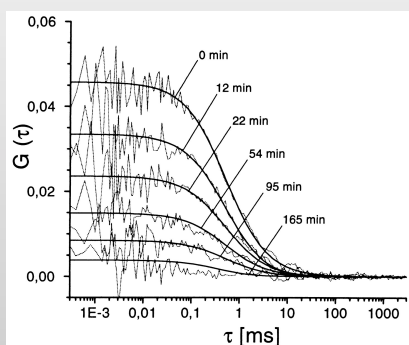
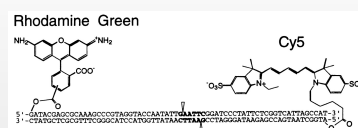
$$K_D = \frac{[R][G]}{[RG]} = \frac{N_R N_G}{N_{RG}}$$

Experimental Physics I, University of Bayreuth



FCS in vitro...

DNA ist an Enden rot/grün markiert
Restriktionsenzym schneidet in der Mitte
=> Kreuzkorrelation verschwindet

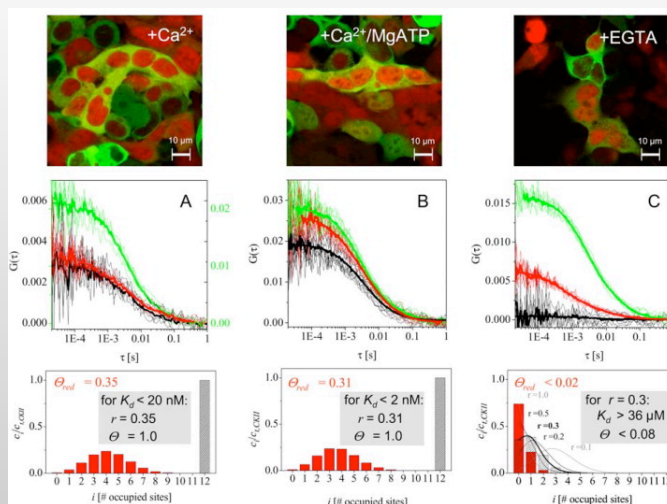


Experimental Physics I, University of Bayreuth



...auch in vivo

Calmodulin (R) bindet CaM-Kinase II (G)



Experimental Physics I, University of Bayreuth



Fragen zu FCS

- A) Wie äußert sich in der FCS-Kurve
 - A) eine Vergrößerung des diffundierenden Teilchens?
 - B) eine Verkleinerung der Viskosität?
 - C) das Auftreten dunkler Triplett-Zustände?
- B) Warum "sieht" FCS nur bewegliche Teilchen?
- C) Warum sollte bei FCS die Teilchenkonzentration niedrig sein?
- D) Wie sieht die Korrelationskurve aus, wenn man Fluoreszenzen an zwei unterschiedlichen Punkten anschaut?

Experimental Physics I, University of Bayreuth

