

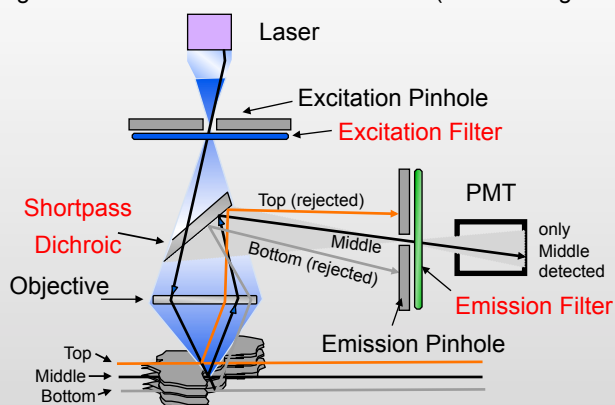
IV. Messmethoden – FRAP

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

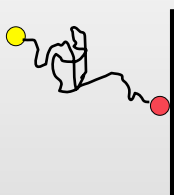
Steigende numerische Apertur => bessere Auflösung

Experimental Physics I, University of Bayreuth



Information über molekulare Bindungen?

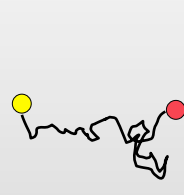
Diffusion & Assoziation
an Zielstruktur



gebundener Zustand



Dissoziation & Diffusion
weg von Zielstruktur

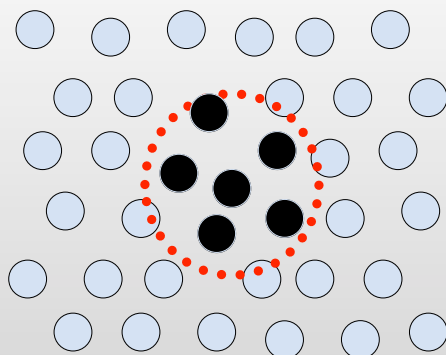


Experimental Physics I, University of Bayreuth



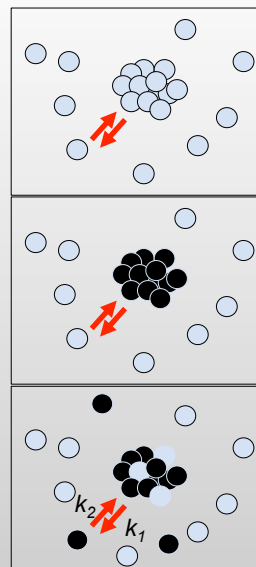
Nutze das Bleichen von Fluorophoren

Fluorescence Recovery After Photobleaching



Erholung der Fluoreszenz

=> Austausch (Bindung und/oder Transport)

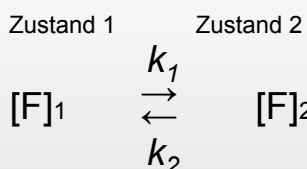


Experimental Physics I, University of Bayreuth



Vorhersage aus Theorie (Fitkurve)

Annahme: zwei wohlgemischte Kompartimente (keine Transportvorgänge)



$$\frac{d[F_1]}{dt} = -k_1[F_1] + k_2[F_2] \quad [F_1] + [F_2] = \text{const.} = 1$$

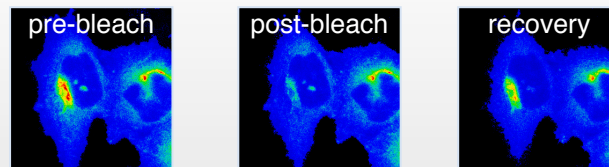
$$1/\tau = k_1 + k_2 \quad A = \frac{k_2}{k_1 + k_2} \quad \boxed{f(t) = A(1 - e^{-t/\tau})}$$

$$\boxed{f(t) = B + A(1 - e^{-t/\tau})}$$

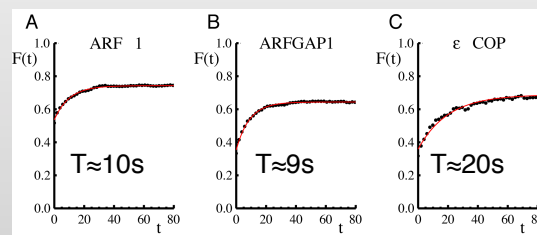
Experimental Physics I, University of Bayreuth



Beispiel: Bindung von COPI an Golgi-App.



in vivo data...



Experimental Physics I, University of Bayreuth



Was sagt die FRAP-Kurve aus?

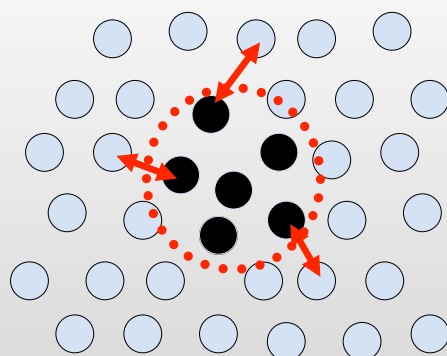
Etwas genauere Analyse der einfachen Herleitung...

Bemerkungen zur sog. Immobilen Fraktion

Experimental Physics I, University of Bayreuth



Diffusiver Transport in FRAP



kreisförmige Region

$$f(z) = Ae^{-z}(I_0(z) + I_1(z))$$

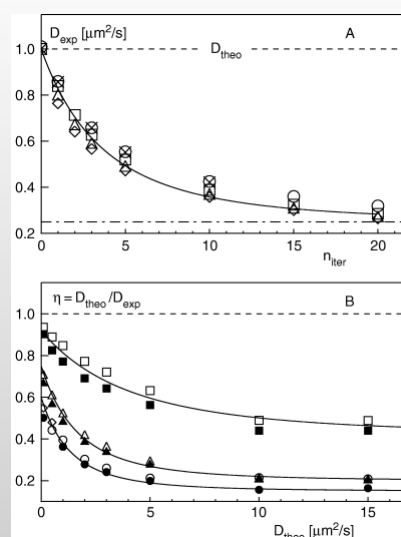
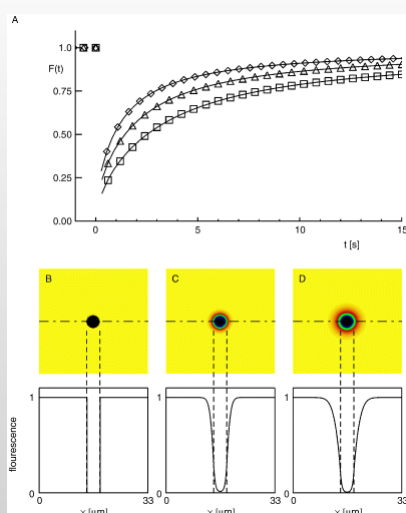
$$z = w^2/(4Dt)$$

Experimental Physics I, University of Bayreuth

Soumpasis 1983



Probleme bei Diffusion & FRAP



Experimental Physics I, University of Bayreuth



Fragen zu FRAP

- Wie kann man den “Korona-Effekt” bei Diffusionsmessungen mit FRAP mildern?
- Wie verändert sich die FRAP-Kurve und deren Interpretation im Falle der Bindungskinetik, wenn die Diffusion langsam ist?
- Wie kann man einfach testen ob Transport oder Bindungskinetik die FRAP-Kurve dominiert?