

Diffusionskonstante (Fluoreszenzkorrelationspektroskopie) - N

1. Lernziele

- Kennenlernen der Fluoreszenzkorrelationspektroskopie
- Ermittlung der unterschiedlichen Diffusionsgeschwindigkeiten der eingesetzten Moleküle
- Ermittlung der unterschiedlichen spezifischen Helligkeiten der eingesetzten Moleküle

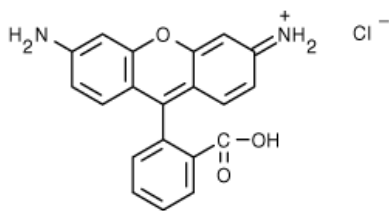
2. Theoretische Grundlagen

Die Fluoreszenzkorrelationspektroskopie (engl. *fluorescence correlation spectroscopy*; FCS) findet mittlerweile eine breite Anwendung bei der Gewinnung von thermodynamischen und kinetischen Informationen nicht nur in der physikalischen Chemie, sondern auch in der biochemischen, biologischen und physikalischen Forschung. Der Grund hierfür liegt darin, dass mit Hilfe der FCS sehr schnell ablaufende Prozesse, wie z.B. chemische Reaktionen im Bereich von wenigen Mikrosekunden als auch langsame Vorgänge wie die Diffusion von Proteinen in lebenden Zellen, die sich im Millisekunden- bis Sekundenbereich abspielen können, sehr effektiv untersucht werden können.

Ein Vorteil der FCS gegenüber anderen fluoreszenzspektroskopischen Methoden ist dabei, dass sie mit einer sehr geringen Anzahl von Fluoreszenzmolekülen in einem sehr geringen Messvolumen auskommt, da hier kleinste Abweichungen von einer rein Zufalls- (Poisson-) verteilten Fluoreszenzfluktuation gemessen werden. Für die Anwendung der FCS in lebenden Zellen bedeutet dies z.B., dass die Expressionslevel von fluoreszenzmarkierten Proteinen sehr niedrig sein müssen und FCS-Messungen somit unter annähernd physiologischen Bedingungen durchgeführt werden können, was die Aussagekraft solcher Daten stark erhöht.

In unserem FCS-Experiment wollen wir die Diffusionsgeschwindigkeiten und die charakteristischen Helligkeiten von drei verschiedenen, fluoreszierenden Molekülen mit sehr unterschiedlicher Größe analysieren, die routinemäßig in fluoreszenzmikroskopischen Experimenten zum Einsatz kommen, z.B.:

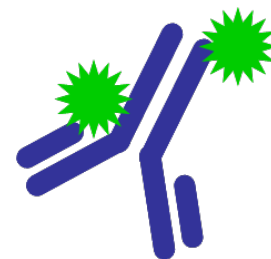
- **Rhodamin110** – ein freies Farbstoffmolekül, ähnlich dem Alexa-488,
- **GFP** - das „green fluorescent protein“, welches häufig als Marker bei Lebendzelluntersuchungen eingesetzt wird,
- **Alexa-488-IgG** – ein mit dem Fluorophor Alexa-488 gekoppelter Antikörper, wie er häufig in der Immunfluoreszenzfärbung verwendet wird.



Rhodamin 110: 0,37 kDa



GFP: 27 kDa



Alexa-488-IgG: ~150kDa

Abbildung 1: Fluoreszierende Moleküle (das im Praktikum benutzte GFP hat aufgrund eines His-Tags ein Molekulargewicht von 30,6 kDa)

2.1. Allgemeines

Bei der Fluoreszenzkorrelationspektroskopie bedient man sich der Fluoreszenzfluktuationen einer charakteristischen Zeitdauer um einen Gleichgewichtsmittelwert zur Bestimmung kinetischer Parameter auf molekularem Niveau. Dazu sind geringe Konzentrationen (nM) und sehr kleine zu untersuchende Volumina (fl) nötig, da sich sonst die Signale vieler Teilchen überlagern, bzw. das Fluoreszenzlicht vom Untergrundsignal überdeckt wird. Daher wird FCS meist in einem konfokalen Mikroskop gemessen. Der Zeitbereich der zu untersuchenden

Fluktuationen (Kinetiken) kann dabei viele Größenordnungen (Pikosekunden bis in den Sekundenbereich) abdecken.

Die entscheidende Voraussetzung für die Beobachtung von Prozessen mit FCS ist die Tatsache, dass diese Vorgänge die Fluoreszenzintensität systematisch beeinflussen müssen, d.h. helle und dunkle Zustände des Moleküls induzieren. Dazu gehören z.B. Translationsdiffusion (Diffusion der Moleküle in und aus dem Detektionsvolumen) und Rotationsdiffusion, photophysikalische (Fluoreszenz- und Tripletteigenschaften), photochemische (Photozerstörung, Löschung) und chemische Prozesse (Gleichgewichtsreaktionen). Während der Aufenthaltsdauer der zu untersuchenden fluoreszierenden Moleküle im Detektionsvolumen werden diese fortlaufend angeregt, so dass ein Schwall von Photonen (engl. *burst*) emittiert wird (s. Abb. 2). Die Diffusion eines Moleküls durch das Beobachtungsvolumen lässt sich somit durch die Detektion der dabei erzeugten Photonen beobachten. Die experimentelle Datengrundlage stellen Zeitspuren der Fluoreszenzintensität (Detektorsignale als Funktion der Zeit) dar.

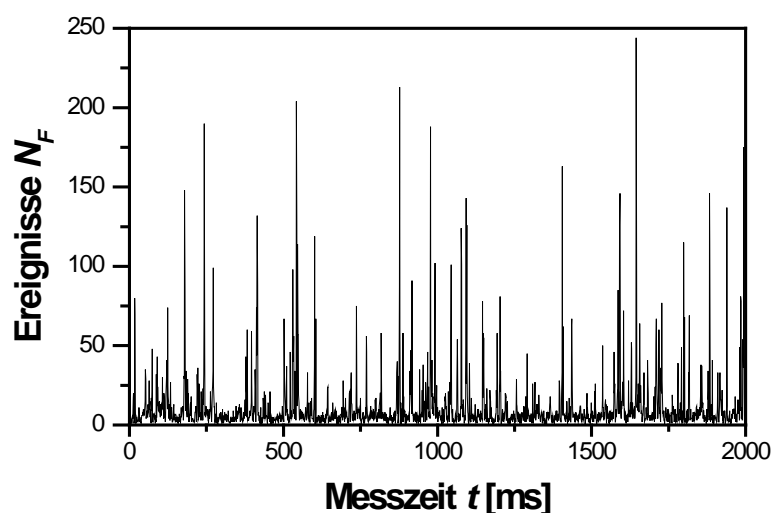


Abbildung 2: Fluktuationen des Fluoreszenzsignals $N_F(t)$.

2.1.1. Korrelationsfunktion

Rauschanalyse. Ein statistisch sehr effizientes Verfahren zur Analyse der Intensitätsfluktuationen ist die Berechnung einer Autokorrelationsfunktion. Dabei wird "systematisches" Rauschen identifiziert und von "zufälligem" Rauschen abgetrennt. Die Autokorrelationsfunktion fragt den Bezug eines zur Zeit t detektierten Signals $N_F(t)$, zum Wert $N_F(t+t_c)$, t_c Sekunden später ab (Selbstähnlichkeitsanalyse). Die Autokorrelation drückt damit den Grad der Übereinstimmung einer Funktion mit sich selbst zu einem anderen Zeitpunkt aus. Auf diese Weise können mit der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) aus den Fluktuationen des Fluoreszenzsignals (Hell- und Dunkelzustände) korrelierte molekulare Prozesse herausgearbeitet werden.

Definition. Das gemessene Fluoreszenzsignal (d.h. die Anzahl der registrierten Photonen in einem Zeitintervall) $N_F(t)$ lässt sich auch als Fluktuation $\delta N_F(t)$ um einen Mittelwert $\langle N_F \rangle$ beschreiben:

$$N_F(t) = \langle N_F \rangle + \delta N_F(t) \quad (1)$$

wobei $\langle \dots \rangle$ die Mittelung des Fluoreszenzsignals über die Messzeit T beschreibt:

$$\langle N_F \rangle = \frac{1}{T} \int_0^T N_F(t) dt \quad (2)$$

Mit Hilfe der Korrelationsfunktion einer beliebigen Zeitfunktion können die zeitlichen Vorgänge analysiert werden. Die Autokorrelation $A(t_c)$ einer Zeitfunktion $N_F(t)$ ist definiert als

$$A(t_c) = \langle N_F(t) \cdot N_F(t + t_c) \rangle = \frac{1}{T} \int_0^{+T} N_F(t) \cdot N_F(t + t_c) dt \quad (3)$$

wobei t_c als Korrelationszeit bezeichnet wird.

Anschauliche Bedeutung. Bei der Berechnung der Korrelationsfunktion werden für jeden Messwert auf der Messzeitachse t durch Durchlaufen aller Korrelationszeiten t_c auf der Korrelationszeitachse alle möglichen Produkte $N_F(t) \cdot N_F(t + t_c)$ gebildet. Die Werte für alle Zeitpunkte mit einer festen Korrelationszeit t_c werden anschließend gemittelt (s. Abb. 3). Die Korrelationsanalyse ist somit ein effizientes Verfahren zur Rauschanalyse, das ohne Annahmen auskommt. Die entscheidende Bedingung ist jedoch, dass der gesuchte Prozess die Fluoreszenzintensität überhaupt beeinflusst.

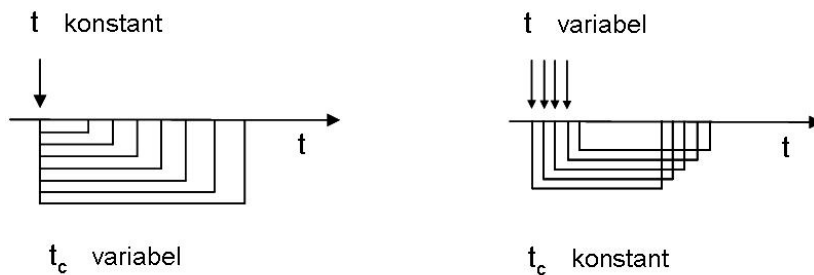


Abbildung 3: Berechnung der Korrelationsfunktion: zu einem konstanten Messpunkt $N_F(t)$ werden die Signale $N_F(t + t_c)$ zu jedem Zeitpunkt t_c später korreliert; dies wird für jeden Zeitpunkt t der Skala wiederholt. Die Berechnung einer Korrelationsfunktion beinhaltet die Variation von t und t_c (siehe Gl. 3).

Mit Gleichung (1) lässt sich $A(t_c)$ auch anders ausdrücken:

$$A(t_c) = \langle N_F(t) \cdot N_F(t + t_c) \rangle = \langle [\langle N_F \rangle + \delta N_F(t)] \cdot [\langle N_F \rangle + \delta N_F(t + t_c)] \rangle \quad (4)$$

Durch Ausmultiplizieren des Produkts ergibt sich:

$$\begin{aligned} A(t_c) &= \langle \langle N_F \rangle^2 + \delta N_F(t) \cdot \delta N_F(t + t_c) + \langle N_F \rangle \cdot [\delta N_F(t) + \delta N_F(t + t_c)] \rangle \\ &= \langle N_F \rangle^2 + \langle \delta N_F(t) \cdot \delta N_F(t + t_c) \rangle + \langle N_F \rangle \cdot \underbrace{\langle [\delta N_F(t) + \delta N_F(t + t_c)] \rangle}_{=0, \text{ da sich statistisch unabhängige Fluktuationen im Mittel ausgleichen}} \end{aligned} \quad (5)$$

$$A(t_c) = \langle N_F \rangle^2 + \langle \delta N_F(t) \cdot \delta N_F(t + t_c) \rangle \quad (6)$$

Die normierte Autokorrelationsfunktion $G(t_c)$ ergibt sich durch Division der Autokorrelationsfunktion $A(t_c)$ durch den Mittelwert $\langle N_F(t) \rangle^2$. Mit Gleichung (1) erhält man dann:

$$G(t_c) = \frac{\langle N_F(t)N_F(t+t_c) \rangle}{\langle N_F(t) \rangle^2} = 1 + \frac{\langle \delta N_F(t)\delta N_F(t+t_c) \rangle}{\langle N_F(t) \rangle^2} \quad (7)$$

Je nach Problemstellung kann zur Darstellung der Autokorrelationsfunktion mit einer linearen oder logarithmischen (vgl. pH-Skala) Zeitachse gearbeitet werden. Da mit FCS Fluktuationen über viele Dekaden verfolgt werden können, ist es für die gleichzeitige Beobachtung verschiedener Prozesse sinnvoll, eine Darstellung mit logarithmischer Zeitachse zu verwenden.

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.

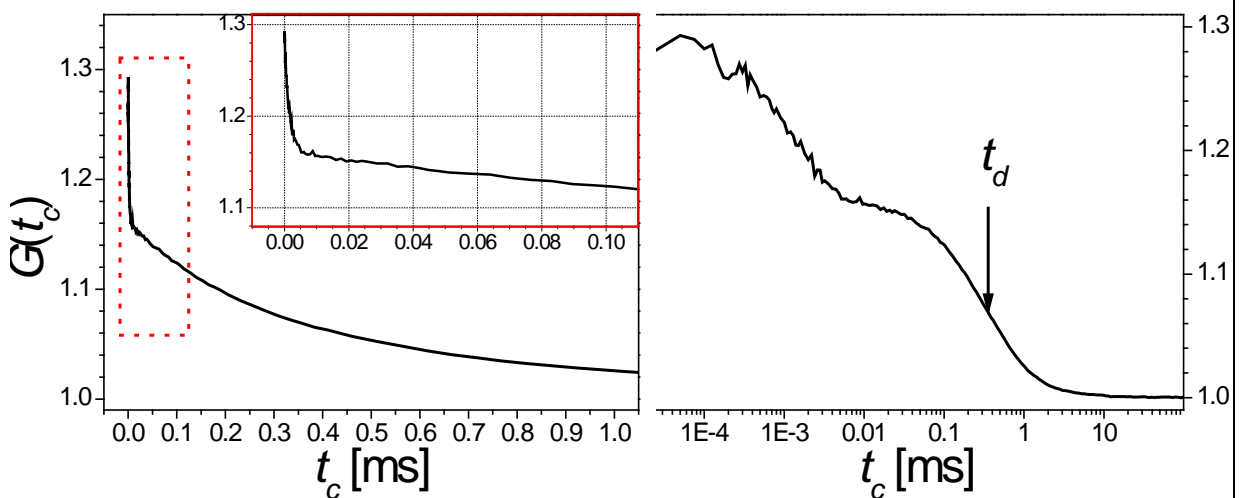


Abbildung 4: Korrelationskurve mit
(a) linearer Zeitskala (im Einsatz oben rechts ist der markierte Bereich vergrößert)

(b) logarithmischer Zeitskala mit der Darstellung der charakteristischen Diffusionszeit t_d .

Die Autokorrelationsfunktion kann wie beschrieben aus einer gemessenen und gespeicherten Fluoreszenzintensitätsspur berechnet werden (Softwarekorrelation) oder mit Hilfe einer speziellen Zähl elektronik (Hardwarekorrelation) online direkt aus den Detektorsignalen erhalten werden.

2.1.2. Teilchenzahl und Poisson-Verteilung

Die Intensität $N_F(t)$ ist proportional zur Anzahl der zur Zeit t registrierten Photonen und diese Anzahl ist wiederum proportional zur Anzahl der im Messvolumen vorhandenen fluoreszierenden Moleküle n . Die Wahrscheinlichkeit $p(n)$, dass sich bei einer mittleren Molekülzahl N zu einem zufälligen Zeitpunkt n Moleküle in dem Detektionsvolumen befinden, ist durch eine Poissonverteilung gegeben:

$$p(n) = \frac{N^n}{n!} \cdot e^{-N} \quad (8)$$

Zur Berechnung der mittleren Molekülzahl $\langle n \rangle = N$ im Beobachtungsvolumen, muss (wie üblich, z.B. Maxwell-Boltzmann-Geschwindigkeitsverteilung) das mit der Verteilungsfunktion gewichtete Mittel berechnet werden:

$$\langle n \rangle = \sum_{n=0}^{\infty} n \cdot p(n) = N \quad (9)$$

Analog gilt dies auch für die mittlere quadratische Anzahl $\langle n^2 \rangle$ der Teilchen im Messvolumen:

$$\langle n^2 \rangle = \sum_{n=0}^{\infty} n^2 \cdot p(n) = N^2 + N \quad (10)$$

Damit kann der Wert der normierten Autokorrelationsfunktion für $t_c = 0$ berechnet werden:

$$G(0) = 1 + \frac{\langle \delta N_F(t) \cdot \delta N_F(t+0) \rangle}{\langle N_F(t) \rangle^2} = 1 + \frac{\langle \delta N_F(t)^2 \rangle}{\langle N_F(t) \rangle^2} = 1 + \frac{\langle \delta n^2 \rangle}{\langle n \rangle^2} = 1 + \frac{\langle n^2 \rangle - \langle n \rangle^2}{\langle n \rangle^2} = 1 + \frac{1}{N} \quad (11)$$

Anschauliches Ergebnis. Die Amplitude der Korrelationsfunktion wird umso größer je kleiner die Teilchenzahl wird. Dies entspricht anschaulich dem Gesetz "der kleinen Zahlen": die Schwankungen werden umso größer, je weniger Teilchen daran beteiligt sind (Bsp. Änderung der Teilchenzahl um 1: der relative Kontrast "an-aus" ist maximal für Fall "1 → 0", (d.h. es wird ein oder kein Teilchen gesehen); der relative Kontrast ist wesentlich geringer für den Fall "1000 → 999", wenn bei einer großen Menge ein Molekül verschwindet).

V2: Was für Bedingungen sind phänomenologisch an ein zu untersuchendes System zu stellen, damit es durch FCS analysierbar ist?

2.2. Aufbau

Die Experimente werden in einem konfokalen Mikroskop mit einem über einen Strahlenteiler eingekoppelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge durchgeführt (Sicherheitseinweisung durch den Assistenten! Abb. 5). Das Laserlicht wird mit dem Mikroskopobjektiv in die Probe fokussiert. Das Mikroskopobjektiv sammelt auch das Fluoreszenzlicht in einem parallelen Strahl. Über den gleichen Strahlenteiler, der das Fluoreszenzlicht, im Gegenteil zum Laserlicht, nicht reflektiert, werden die Photonen durch eine Tubuslinse auf eine Lochblende in der Bildebene (Prinzip eines konfokalen Mikroskops) abgebildet. Der Durchmesser der Lochblende gibt die Größe des Detektionsvolumens vor.

Bei dem konfokalen Aufbau passiert das Fluoreszenzlicht eine Lochblende, wodurch Licht aus Bereichen vor (Überfokus) und hinter (Unterfokus) der Fokalebene stark reduziert wird (rote und blaue Linien in Abb. 5). Dies führt zu einer verbesserten Auflösung entlang der optischen Achse z , da nur das Licht aus dem Fokuspunkt die Lochblende ungeschwächt passiert. In der Abbildung 5 wird dies anhand der beiden gestrichelten Strahlengänge, die unter- und oberhalb der Fokusebene liegen, veranschaulicht.

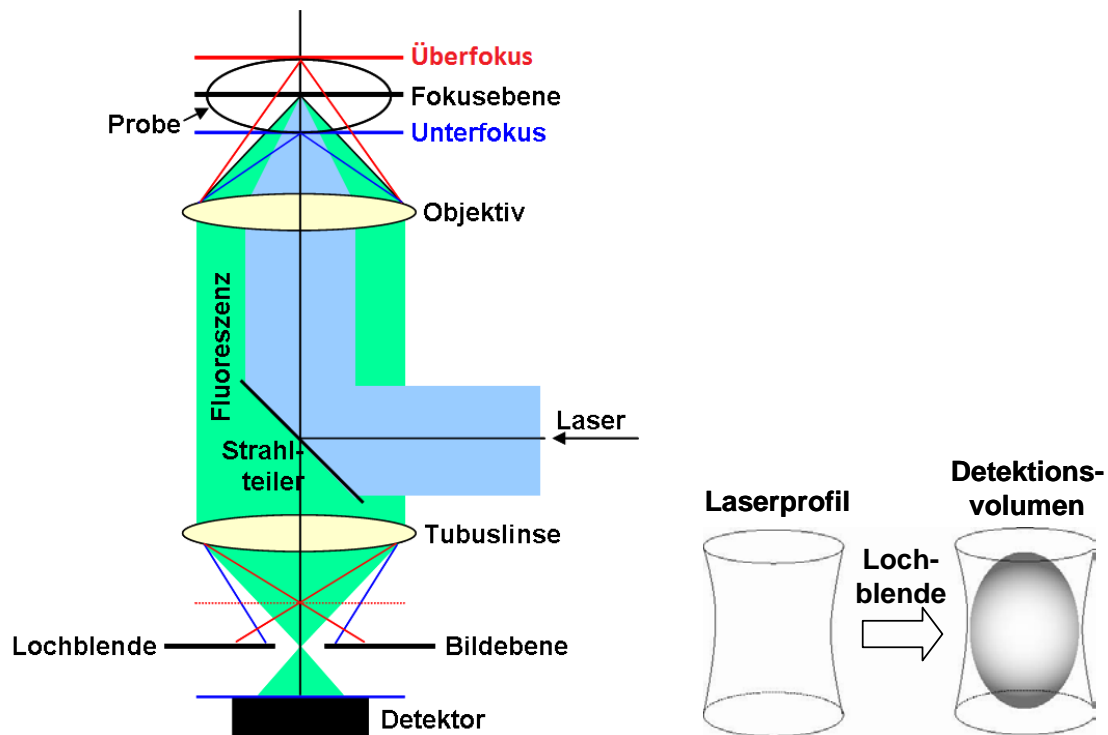


Abbildung 5: Schema eines konfokalen, inversen Mikroskops mit einer „Unendlich-Optik“. Anregungsprofil des Lasers mit Auswirkung der Lochblende auf das Detektionsvolumen (grau).

Das Fluoreszenzlicht wird mit einem (polarisierenden) Strahlteiler auf zwei Detektoren aufgeteilt. Die Detektion erfolgt mit einzelphotonenempfindlichen Avalanche-Photodioden (APD). Zu hohe Zählraten (> 1 MHz) sind zu vermeiden!

Jedes detektierte Photon erzeugt einen Puls, der von einer Zähl Elektronik registriert wird. Die Pulse sind unabhängig von der Wellenlänge (Photonenenergie).

Kein Photon, das während der Totzeit des Detektors ankommt, wird registriert (es werden zwei Detektoren verwendet, um totzeitfrei arbeiten zu können).

Die Korrelation erfolgt mit einem angeschlossenen Hardwarekorrelator.

Der Durchmesser des Detektionsvolumens ist mittels geeigneter Kombination von Strahlquerschnitt, Lochblendengröße und Objektiv auf ca. $1 \mu\text{m}$ eingestellt. **Die Lasereinstellung sowie der Einsatz der benötigten Fluoreszenzfilter und Strahlteiler werden vom Assistenten vorgenommen.**

Der konfokale Aufbau minimiert störendes Hintergrundsignal, welches von Raleigh- und Ramanstreuung des Lösungsmittels sowie von darin enthaltenen fluoreszierenden Verunreinigungen verursacht wird und proportional zum Detektionsvolumen ist. Das Detektionsvolumen ist nur zwischen 1 und 6 fL groß. Daher ist dieser Aufbau auch für den Einsatz in der Einzelmolekülspektroskopie gut geeignet. Niedrige Konzentrationen sind leicht durch Verdünnung zu erreichen; das kleine zu untersuchende Volumenelement entsteht mithilfe eines konfokalen Aufbaus. Dabei wird die Größe des dreidimensionalen, gaußschen Volumenelements durch folgende drei Parameter beeinflusst: den Laserstrahl, die konfokale Optik und den Durchmesser des Pinhole (Lochblende). Anregungs- und Detektionsvolumen sind nicht das gleiche, denn durch das Pinhole wird das Detektionsvolumenelement (in z-Richtung) verkleinert (Abb. 5 rechts).

2.3. Modellfunktionen zur Interpretation von Fluoreszenzkorrelationskurven

Sind die Signalfluktuations (Hell- und Dunkelzustände) auf verschiedene, voneinander unabhängige Prozesse zurückzuführen, lässt sich die Korrelationsfunktion als Summe aus den diese Prozesse beschreibenden Termen ausdrücken, multipliziert mit dem Diffusionsterm:

$$G(t_c) = 1 + \frac{1}{N} G_D(t_c) \cdot \left[1 + \sum_i G_i(t_c) \right] \quad (12)$$

Konkret bedeutet Gl. 12 z.B. für Triplet- und Protonierungsreaktionen mit nicht-fluoreszierenden Produkten, dass die Bunchingterme als Summe auftauchen. Jeder Bunchingterm hat eine charakteristische Gleichgewichtskonstante K_T bzw. K_R und eine charakteristische Relaxationszeit t_T bzw. t_R .

$$\begin{aligned} G(t_c) &= 1 + \frac{1}{N} G_D(t_c) \cdot [1 + G_T(t_c) + G_R(t_c)] \\ &= 1 + \frac{1}{N} G_D(t_c) \cdot [1 + K_T \exp(-t_c/t_T) + K_R \exp(-t_c/t_R)] \end{aligned} \quad (13)$$

Hierbei ist N die mittlere Anzahl der fluoreszierenden Moleküle im Detektionsvolumen. Man erkennt, dass die Amplitude der Korrelationsfunktion $G(t_c)$ invers zur Anzahl der Fluorophore im Fokus ist. Bei bekanntem Detektionsvolumen können daher Konzentrationen sowie die (Photonen-)Zählrate pro Molekül, die bei geringer Anregungsleistungsdichte der Fluoreszenzquantenausbeute proportional ist, ermittelt werden.

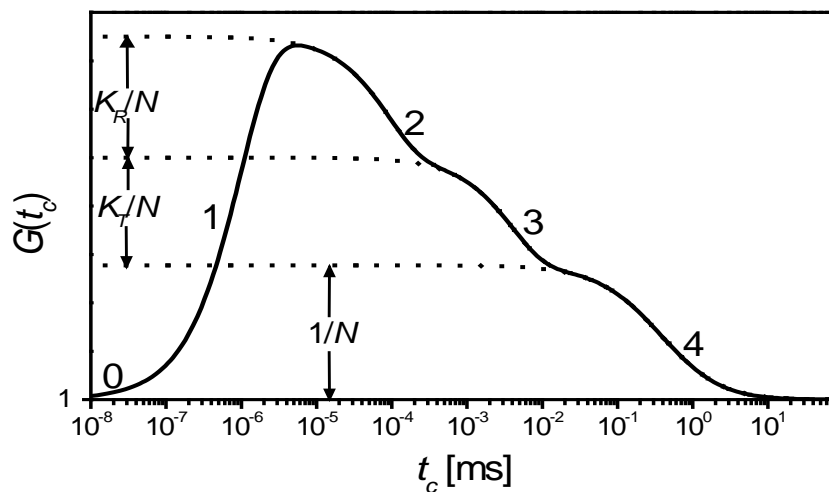


Abbildung 6: Simulierter Verlauf einer Fluoreszenzkorrelationskurve: [0-1] Antibunching, [2] chemische Reaktionskinetik, [3] Tripletkinetik, [4] translative Diffusion.

Abbildung 6 zeigt den simulierten Verlauf einer Fluoreszenzkorrelationsfunktion mit einer logarithmischen Korrelationszeitachse. Terme, die in der Korrelationsfunktion zu einem Abfall führen, werden als *Bunchingterme* (aufgrund von "Bündeln" (engl. bunch) in der Photonenspur, kurzfristig überdurchschnittlich hohen Photonendichten) und solche, die zu einem Anstieg führen, als *Antibunchingterme* beschrieben (Photonen können von einem Fluorophor nicht beliebig schnell emittiert werden. Überlegen Sie sich, warum (vgl. Jablonski-Diagramm, Abb. 8)).

[0-1] Hier zeigt sich das Phänomen des *Antibunching*. Das Photonen-Antibunching ist ein rein quantenmechanischer Effekt und beschreibt das Phänomen, dass die Korrelation zwischen zwei emittierten Photonen von einem einzelnen Molekül für sehr kurze Zeiten t_c mit der Korrelationszeit zunimmt. Dies liegt daran, dass sich ein Molekül nach Aussendung eines Photons zum Zeitpunkt $t_c = 0$ im elektronischen Grundzustand befindet und somit natürlich

die Wahrscheinlichkeit Null ist, ein zweites Photon auszusenden. Erst nach einer erneuten Anregung des Moleküls kann ein zweites Photon emittiert werden (daher wird die Antibunchingzeit durch die Anregungsrate und die Fluoreszenzlebensdauer bestimmt). Bei $t_c = 0$ ms müssen zwei Photonen zeitgleich detektiert werden, um eine von Null verschiedene Korrelationsamplitude zu erzielen (s. Gl. 7). Dies ist nach dem oben gesagten nur möglich, wenn die Fluoreszenz von zwei verschiedenen Molekülen stammt.

[2] Die Ursache für den Abfall an Punkt 2 kann z.B. ein chemisches Gleichgewicht zwischen einer fluoreszenten und einer nicht-fluoreszenten Konformation des Fluorophors sein. Derartige Kinetiken können sich im Submikrosekundenbereich abspielen (wie gezeigt), aber auch viele Größenordnungen langsamer sein. Die Gleichgewichtskonstante K_R entspricht dabei dem Verhältnis der Gleichgewichtskonzentrationen von dunkler und heller Spezies.

[3] Dieser Term im μ s-Zeitbereich repräsentiert meist die charakteristische Tripletzeit t_T eines Moleküls. Dieser Term ist charakterisiert durch die Geschwindigkeitskonstanten des *Intersystem Crossing* k_{ISC} und des Übergangs vom Triplet- in den Grundzustand k_T . Nach dem Übergang in den Tripletzustand ist das Molekül im Mittel für die Zeit t_T nicht am Absorptions-Emissionszyklus beteiligt. Die Korrelationsfunktion fällt ab. Die Amplitude, K_T , ist ein Maß für den mittleren Anteil der Moleküle, die sich unter den gegebenen Anregungsbedingungen im Tripletzustand befinden.

[4] Am Punkt 4, der typischen Diffusionszeit t_D eines Moleküls durch das Beobachtungsvolumen, nimmt die Wahrscheinlichkeit ab, ein zweites Photon zu detektieren, da das Molekül aus dem Messfokus verschwindet. Bei den hier verwendeten Molekülen liegt die Diffusionszeit t_D zwischen etwa ≈ 200 μ s und 2 ms. Die Korrelationsfunktion sinkt auf das Langzeitmittel ab.

Im Praktikumsversuch soll v.a. der Korrelationsterm für die translative Diffusion $G_D(t_c)$ sowie der Korrelationsterm für die Tripletanregung der verschiedenen Fluorophore $G_T(t_c)$ betrachtet werden

2.3.1. Diffusion

Der langsamste Prozess in unserem FCS-Experiment ist die Beeinflussung des Fluoreszenzsignals durch die translative Diffusion. Der Fall "Diffusion in einem Volumenelement, dessen dreidimensionale Ausdehnung für jede Dimension mit einer Gaußfunktion beschrieben werden kann", ist analytisch lösbar. Der Diffusionsterm (Gl. 14) für das dreidimensional approximierete Gauß'sche Detektionsvolumen enthält eine charakteristische Diffusionszeit t_D und den Geometrieparameter ω_0 / z_0 (Abb. 7).

$$G_D(t_c) = \left(\frac{1}{1 + t_c/t_D} \right) \left(\frac{1}{1 + (\omega_0/z_0)^2 t_c/t_D} \right)^{1/2} \quad (14)$$

ω_0 ist die radiale Ausdehnung (x-y-Ebene) und z_0 die axiale Ausdehnung (z-Achse) des Beobachtungsvolumens, bei der die molekulare Detektionseffizienz jeweils auf $1/e^2$ abgefallen ist.

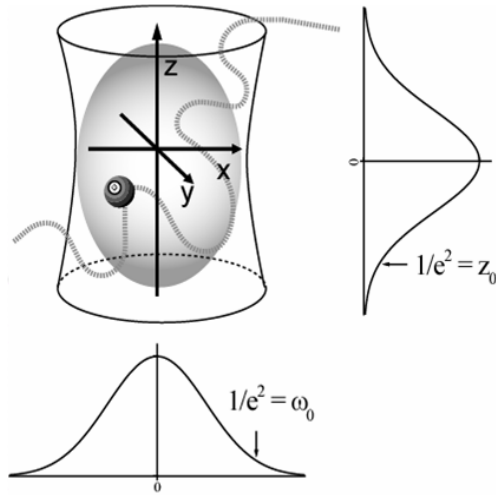


Abbildung 7: Darstellung des Anregungsprofils des Lasers und Beschreibung der Detektionseffizienz durch Gaußfunktionen.

Aus den Fick'schen Gesetzen ist das mittlere Verschiebungsquadrat (hier ω_0^2) für 2 Dimensionen bekannt, das in Beziehung zur Diffusionszeit und dem Diffusionskoeffizienten steht:

$$\omega_0^2 = 4Dt_D \quad (15)$$

$$\omega_0 = \sqrt{4Dt_D} \quad (16)$$

$$t_D = \omega_0^2 / 4D \quad (17)$$

Somit können diese Parameter über die Bestimmung der Diffusionszeit t_D ermittelt werden. Bei Rhodamin 110 ist die Diffusionskonstante bekannt mit $D_{22.5} \approx 4,3 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ in Wasser bei $22,5^\circ\text{C}$ [1]. Das entspricht etwa $D_{20} \approx 4,0 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ in Wasser bei 20°C und kann nach Gl. 19 unter Annahme konstanter Molekülgröße auf andere Temperaturen extrapoliert werden. Mit einem Verhältnis von z_0/ω_0 , welches aus der Anpassung der Kurve erhalten wird, berechnet sich nun das Detektionsvolumen V_D nach

$$V_D = \pi^{3/2} \cdot z_0 \cdot \omega_0^2 \quad (18)$$

Mit dem gemessenen Wert N (s. Gl. 12) können somit Konzentrationen auf kleinstem Raum bestimmt werden. V_D liegt im Allgemeinen im Femtoliterbereich.

Ein besonderes Augenmerk ist auf den Zusammenhang zwischen dem hydrodynamischen Radius eines Moleküls, also seiner Größe, und seiner Diffusionskonstanten D zu richten: die Diffusionskonstante wird durch die Stokes-Einstein-Formel beschrieben:

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R_h} \quad (19)$$

Hierbei ist k die Boltzmann-Konstante und T die absolute Temperatur in Kelvin, η entspricht der Viskosität des Mediums und R dem hydrodynamischen Radius, also der Größe des Moleküls. Bei konstanter Temperatur und Viskosität des Mediums hängt die Diffusionskonstante D eines idealerweise kugelförmigen Moleküls hauptsächlich von seinem hydrodynamischen Radius bzw. seiner Größe ab. Dabei ist zu beachten, dass eine Verdopplung des hydrodynamischen Radius (d.h. 8-fache Zunahme des molekularen Volumens $V_m \approx V_{\text{Kugel}} = 4/3 \pi R_h^3$) lediglich zu einer Halbierung des Wertes für die Diffusionskonstante führt ($t_D \propto 1/D$). Dies zeigt, dass die FCS für die Bestimmung von Molekülgrößen anhand der Translationsdiffusionskonstanten recht unempfindlich ist!

2.3.2. Triplettkinetik

In anschaulicher Weise lassen sich die verschiedenen photophysikalischen Prozesse anhand des Jablonski-Diagramms diskutieren.

Der Singulett-Grundzustand S_0 , der angeregte Singulett-Zustand S_1 und der Triplettzustand T_1 sind schematisch in Abbildung 8 dargestellt. Die photophysikalischen Prozesse sind durch Pfeile angedeutet. Durch die Absorption (k_{01}) eines Photons wird das Molekül in einen höheren Schwingungszustand von S_1 angeregt.

Das Molekül kann durch Abgabe eines Photons oder strahlungslos in den Grundzustand S_0 zurückkehren (k_0) oder durch einen Interkombinationsübergang in den Triplettzustand gelangen (k_{ISC}). Von dort kann der Übergang in den Grundzustand durch Phosphoreszenz (k_T) erfolgen.

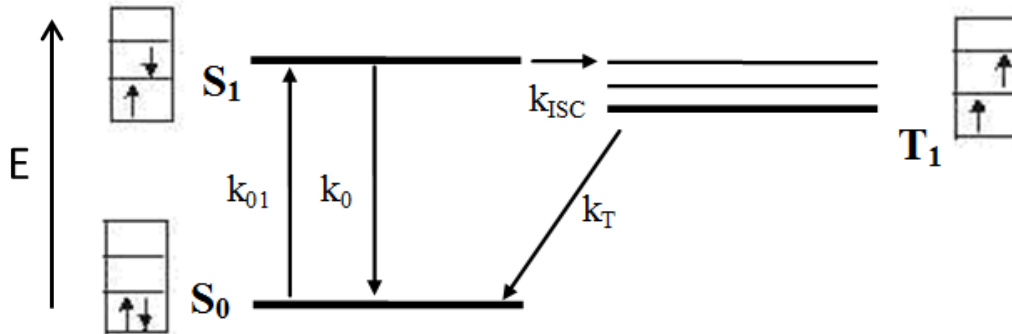


Abbildung 8: Jablonski-Diagramm

Durch Dunkelphasen wie dem Triplettzustand eines Moleküls kann ein zusätzlicher Bunchingterm im μs -Zeitbereich sichtbar werden. Man erhält hierfür folgenden Korrelationsterm, der verschieden geschrieben werden kann:

$$G_T(t_c) = K_T \cdot \exp(-t_c/t_T) = \frac{N_{\text{Triplett}} (= \text{dunkel})}{N_{\text{Singulett}} (= \text{fluoreszent})} \cdot \exp(-t_c/t_T) = \frac{T_{1eq}}{1 - T_{1eq}} \cdot \exp(-t_c/t_T) \quad (20)$$

Dabei sind K_T die stationäre photochemische Gleichgewichtskonstante, T_{1eq} die stationäre Besetzungswahrscheinlichkeit vom Triplettzustand T_1 und t_T die charakteristische Triplettrelaxationszeit k_T .

Mit

$$\frac{1}{t_T} = \left(k_T + \frac{k_{01} k_{ISC}}{k_{01} + k_0} \right) \quad (21a)$$

und

$$T_{1eq} = \frac{k_{ISC}}{k_T} S_{1eq} = \frac{k_{ISC} \cdot k_{01}}{k_{01} \cdot (k_{ISC} + k_T) + k_T \cdot (k_0 + k_{ISC})} \quad (21b)$$

sind die Geschwindigkeitskonstanten k_T und k_{ISC} des Übergangs $T_1 \rightarrow S_0$ und von $S_1 \rightarrow T_1$ zugänglich. k_0 ist invers zur messbaren Fluoreszenzlebensdauer τ_0 des Fluorophors und k_{01} als Anregungsrate ist proportional zur Anregungsleistung I und dem Absorptionsquerschnitt σ_{01} ($k_{01} = \sigma_{01} \cdot \gamma_P \cdot I$; γ_P ist die inverse Photonenergie).

2.3.3. Vollständige Korrelationsfunktion

Die Kombination von Gl. 13 mit Gl. 14 führt zur vollständigen Korrelationsfunktion für den Fall der Diffusion in einem 3-dimensional gaußförmigen Detektionsvolumen in Kombination mit Tripletanregung sowie einer Gleichgewichtsreaktion erster Ordnung zwischen dem leuchtenden Fluorophor und einem Dunkelzustand (z.B. einer Löschung aufgrund einer Komplexbildung):

$$\begin{aligned}
 G(t_c) &= 1 + \frac{1}{N} G_D(t_c) \cdot [1 + G_T(t_c) + G_R(t_c)] \\
 &= 1 + \frac{1}{N} \left(\frac{1}{1 + t_c/t_D} \right) \left(\frac{1}{1 + (\omega_0/z_0)^2 t_c/t_D} \right)^{1/2} [1 + K_T \exp(-t_c/t_T) + K_R \exp(-k_R t_c)]
 \end{aligned} \tag{22a}$$

Bei gleichzeitiger Diffusion zweier Molekülsorten mit unterschiedlicher Helligkeit B setzt sich der gemeinsame Diffusionsterm additiv aus den beiden individuellen Diffusionstermen zusammen. Die relativen Anteile müssen allerdings mit einem Helligkeitabhängigen Faktor gewichtet werden (die helleren Moleküle tragen stärker (quadratisch, siehe Gl. 5) zur gemeinsamen Korrelationskurve bei):

$$\begin{aligned}
 G(t_c) &= 1 + \left[\frac{N_1 B_1^2}{(N_1 B_1 + N_2 B_2)^2} G_{D1}(t_c) + \frac{N_2 B_2^2}{(N_1 B_1 + N_2 B_2)^2} G_{D2}(t_c) \right] \cdot [1 + G_T(t_c) + G_R(t_c)] \\
 &= 1 + \frac{N_1 B_1^2 + N_2 B_2^2}{(N_1 B_1 + N_2 B_2)^2} \left[\frac{N_1 B_1^2}{N_1 B_1^2 + N_2 B_2^2} G_{D1}(t_c) + \frac{N_2 B_2^2}{N_1 B_1^2 + N_2 B_2^2} G_{D2}(t_c) \right] \cdot [1 + G_T(t_c) + G_R(t_c)] \\
 &= 1 + \frac{1}{N_{eff}} [x_1 \cdot G_{D1}(t_c) + (1 - x_1) \cdot G_{D2}(t_c)] \cdot [1 + G_T(t_c) + G_R(t_c)] \\
 &= 1 + \frac{1}{N_{eff}} \left[x_1 \left(\frac{1}{1 + t_c/t_{D1}} \right) \left(\frac{1}{1 + (\omega_0/z_0)^2 t_c/t_{D1}} \right)^{1/2} + (1 - x_1) \left(\frac{1}{1 + t_c/t_{D2}} \right) \left(\frac{1}{1 + (\omega_0/z_0)^2 t_c/t_{D2}} \right)^{1/2} \right] \\
 &\quad * [1 + K_T \exp(-t_c/t_T) + K_R \exp(-k_R t_c)]
 \end{aligned} \tag{22b}$$

Die effektiven Anteile x_1 und $x_2 (= 1 - x_1)$ sowie die Teilchenzahl $N_{eff} (= N_{effektiv})$ entsprechen **nur** den tatsächlichen Molekülanteilen bzw. der Gesamtteilchenzahl, wenn die Helligkeiten beider Molekülsorten gleich sind (d.h. wenn $B_1 = B_2$).

3. Versuchsdurchführung

Im Rahmen dieses Versuches sollen Sie die Diffusionsgeschwindigkeiten und die Helligkeiten von drei unterschiedlichen, fluoreszierenden Molekülen untersuchen. Bei diesen Molekülen handelt es sich um ein ungebundenes, synthetisches Fluorophor, das Rhodamin110, das mit einem Molekulargewicht von 366 Da die kleinste fluoreszierende Einheit darstellt, die in typischen fluoreszenzmikroskopischen und -spektroskopischen Versuchen zum Einsatz kommt.

Außerdem werden wir das Protein GFP untersuchen, das mit 30,6 kDa deutlich größer ist. GFP und seine andersfarbigen Derivate kommen beim Live-cell-Imaging zum Einsatz. Dabei kann es vorkommen, dass das Molekulargewicht des GFP von 27 kDa das Molekulargewicht eines Proteins, mit dem es gentechnisch zu einem Fusionsprotein zusammengesetzt wird, sogar übersteigt, z.B. im Fall der Histonproteine, die nur ein Molekulargewicht zwischen 11 und 13 kDa haben. Trotzdem können auch solche Fusionsproteine erfolgreich zur Untersuchung von Proteinmobilitäten eingesetzt werden. Warum ist dies möglich? Diese Frage soll im Rahmen des Versuchs auch diskutiert werden.

Das dritte Molekül ist ein fluoreszenzmarkierter Antikörper, der ein Molekulargewicht von 150 kDa hat. Dieses IgG-Molekül wird häufig bei Immunfluoreszenzfärbungen eingesetzt.

Gegebenenfalls werden auch noch andere äquivalente Moleküle zur Verfügung gestellt.

Ziel dieses Versuches ist,

- dass Sie die unterschiedlichen Diffusionsgeschwindigkeiten der eingesetzten Moleküle ermitteln,
- dass Sie die unterschiedlichen, spezifischen Helligkeiten der eingesetzten Moleküle ermitteln,
- dass Sie mit Hilfe der bekannten Diffusionskonstanten D von Rhodamin 110 die Größe des konfokalen Volumenelementes berechnen,
- dass Sie herausfinden, welche zwei der drei fluoreszierenden Moleküle in welchem Verhältnis in einer Lösung vorliegen, die wir Ihnen zur Verfügung stellen.

Dazu werden FCS Kurven der drei oben beschriebenen Molekülarten aufgenommen und die entsprechenden Konstanten für die Diffusionsgeschwindigkeiten und Helligkeiten bestimmt. Unter Berücksichtigung dieser Konstanten können dann die Komponenten und die Anteile dieser Komponenten in einer unbekanntem Lösung ermittelt werden.

3.1. Vorbereitung:

Beachte: Die Daten sollen im Netzwerk auf dem Laufwerk „Praktikumsdaten“ abgelegt werden. Dadurch können Sie auch von anderen Arbeitsplätzen auf die Daten zugreifen und z.B. die Auswertung abschließen. Bei den abgespeicherten Daten bitte im Dateinamen den Namen der Probe angeben!

Für die Messungen verwenden Sie Kammerdeckgläschen. Alle Moleküle werden in PBS verdünnt. Achten Sie beim Hantieren am Messaufbau darauf, dass Sie nicht direkt in das Laserlicht schauen! **Zur Schonung der Detektoren und Vermeidung von Nichtlinearitäten müssen die Zählraten unter 500 kHz bleiben!** Alle Messungen werden zweimal durchgeführt. Zur Auswertung sollen dann die entsprechenden Mittelwerte benutzt werden (Mittelwerte der Fitparameter, der Zählraten etc.).

Notieren Sie die Raumtemperatur während der Messung!

3.2. Durchführung:

1. **Bestimmung des Streulichtanteils** aus Messung mit reinem Puffer (PBS) (Reinheitstest: der Puffer sollte neben einer niedrigen Zählrate keine bzw. eine sich nur in der Nähe des Rauschens befindende Korrelationsamplitude aufweisen). Bitte notieren Sie die Zählrate!
2. **Messung von Rhodamin 110:**
 - a. Legen Sie 1 ml PBS vor und pipettieren Sie in den Tropfen eine μl -Menge einer Rhodamin-110-Lösung, so dass Sie eine Zählrate von etwa 50 kHz auf jedem Detektor erhalten. Die Lösung muss gut durchmischt werden!
 - b. Messen Sie 2-mal, jeweils 2 Minuten, speichern Sie beide Messungen ab.

Was passiert mit der Amplitude der Korrelationskurve (Wert auf y-Achse), wenn Sie höhere Farbstoffkonzentrationen haben?

3. Messung von GFP:

- a. Legen Sie wieder 1 ml PBS vor, pipettieren Sie 0,5 μl der GFP-Lösung in den Tropfen.

b. Führen Sie wieder 2 Messungen à 2 Minuten durch.

4. Messung des Antikörpers Alexa-488-IgG:

a. Legen Sie wieder 1 ml PBS vor, pipettieren Sie 0,5 μ l der Alexa-488-IgG-Lösung in den Tropfen.

b. Führen Sie wieder 2 Messungen à 2 Minuten durch.

5. Messung von zwei Lösungen mit jeweils zwei unterschiedlichen Komponenten:

a. Legen Sie wieder 1 ml PBS vor, pipettieren Sie 0,5 μ l der Lösung mit den zwei Komponenten in den Puffer.

b. Führen Sie wieder jeweils 2 Messungen à 2 Minuten durch.

4. Auswertung

4.1. Mathematische Analyse der Messungen

4.1.1. Anpassung der Modellfunktionen

Die Kurvenanpassungen werden gemeinsam mit dem betreuenden Assistenten durchgeführt!

Zur Kurvenanpassung soll ein zur Verfügung gestelltes Excel template benutzt werden. Die ASCII-Daten der Korrelationskurven werden dazu mittels „copy-paste“ aus der Steuersoftware des Hardwarekorrelators in die Exceldatei geladen. Anschließend wird eine nicht-lineare Kurvenanpassung durchgeführt. Für diese Kurvenanpassung wird eine Fitfunktion entsprechend Gleichung 22b benutzt. Zum Anpassen von Einkomponentensystemen (die Messungen an den reinen Lösungen, nicht der Mischung) wird der Anteil der ersten Komponente (Parameter x_1 in der Modellfunktion) auf $x_1 = 1$ festgelegt. Bei einer Zweikomponentenanpassung kann der Strukturparameter z_0/ω_0 hier prinzipiell für beide Molekülsorten verschieden sein (\rightarrow Sättigungseffekte), kann aber hier im Rahmen der Messgenauigkeit als konstant (d.h. farbstoffunabhängig) angesehen werden.

Die Konstanten des experimentellen Aufbaus unter den gegebenen Bedingungen (Achsenverhältnis des Detektionsvolumens z_0/ω_0) werden aus der Messung mit reinem Rhodamin 110 gewonnen.

Für jede Messung werden mithilfe des Fitmodells die Triplettamplitude und -relaxationszeit, die Diffusionszeit und die Teilchenzahl im konfokalen Volumenelement, sowie die Helligkeit des jeweiligen Fluorophors bestimmt (Zählrate pro Molekül = Gesamtzählrate dividiert durch die Molekülzahl N).

Der Erfolg dieser nichtlinearen Kurvenanpassungen hängt stark von der korrekten Wahl der Startparameter ab. Diese sollten daher vor dem Fit durch Betrachten der Messkurve abgeschätzt und eingegeben werden. Die charakteristische Diffusionszeit t_D wird im Bereich von 0,15 bis 2 ms liegen, das Achsenverhältnis (z_0/ω_0) etwa zwischen 2 und 7. Falls die Fitergebnisse stark von den Erwartungswerten abweichen, müssen die Startparameter entsprechend variiert werden.

Für die Anpassung der Lösung mit den unbekanntenen Molekülen müssen Sie das komplette Fitmodell mit beiden Diffusionstermen benutzen. Aus den bestimmten scheinbaren Anteilen der Molekülsorten x_1 und $x_2 (= 1 - x_1)$ lassen sich mithilfe der vorher gemessenen Helligkeiten B (Zuordnung anhand der charakteristischen Diffusionszeiten, x_1 ist hier meist der Anteil der Komponente mit der kürzeren Diffusionszeit) mit Gleichung 23 (abgeleitet aus Gl. 22b) die tatsächlichen Molekülanteile berechnen:

$$\begin{aligned}
x_1 &= \frac{N_1 B_1^2}{N_1 B_1^2 + N_2 B_2^2} = \frac{1}{1 + \frac{N_2 B_2^2}{N_1 B_1^2}} \\
\Rightarrow \frac{N_2 B_2^2}{N_1 B_1^2} &= \frac{1}{x_1} - 1 \\
\Rightarrow \frac{N_2}{N_1} &= \left(\frac{1}{x_1} - 1 \right) \left(\frac{B_1}{B_2} \right)^2 = \frac{x_2}{x_1} \left(\frac{B_1}{B_2} \right)^2
\end{aligned} \tag{23}$$

Die einzelnen Konzentrationen können prinzipiell aus dem Vorfaktor ($1/N_{eff}$) aus Gleichung 22b berechnet werden:

$$\begin{aligned}
\frac{1}{N_{eff}} &= \frac{N_1 B_1^2 + N_2 B_2^2}{(N_1 B_1 + N_2 B_2)^2} \\
\Rightarrow N_{eff} &= \frac{(N_1 B_1 + N_2 B_2)^2}{N_1 B_1^2 + N_2 B_2^2} = N_1 \frac{\left(B_1 + \frac{N_2}{N_1} B_2 \right)^2}{B_1^2 + \frac{N_2}{N_1} B_2^2}
\end{aligned} \tag{24}$$

Alternativ kann die Mischung unter Berücksichtigung der gemessenen Gesamtintensität:

$$N_F(ges) = N_1 B_1 + N_2 B_2 = N_{ges} (f_1 B_1 + f_2 B_2) \tag{25}$$

mit den absoluten Molekülnzahlen im Fokus $N_1 + N_2 = N_{ges}$ und deren Anteilen in der Mischung $f_1 + f_2 = 1$ analysiert werden. Mit $f_1 / f_2 = N_1 / N_2$ folgt aus Gl.23 und Gl.24:

$$N_{ges} = \frac{N_F(ges)}{(f_1 B_1 + f_2 B_2)} = \frac{N_F(ges)}{(f_1 (B_1 - B_2) + B_2)} = N_F(ges) \left(\frac{(B_1 - B_2)}{\frac{1}{x_1} \left(\frac{B_1}{B_2} \right)^2 - \left(\frac{B_1}{B_2} \right)^2 + 1} + B_2 \right)^{-1} \tag{26}$$

Alle Zeitangaben (Korrelationskurve, Fitparameter) haben die Einheit "Millisekunde". Die Fitparameter entsprechen dabei den photophysikalischen Parametern aus Gl. 22b:

Tabelle 1: Erklärung der Parameter in der Ergebnistabelle

Gl. 22b	off set	N_{eff}	t_{D1}, t_{D2}	z_0/ω_0	x_1	K_T	t_T	K_R	t_R
		effektive Teilchenzahl	Diffusionszeiten	Achsenverhältnis	scheinbarer Anteil von 1	Tripletamplitude	Tripletrelaxationszeit	Gleichgewichtskonstante	Reaktionsrelaxationsrate

Für das Protokoll:

1. Stellen Sie alle Fitparameter (N_{eff}, \dots, t_R) aus allen Messungen (Rhodamin, EGFP, Alexa-488-IgG, Mischungen) in einer Tabelle dar, sowohl die Einzelwerte als auch deren Mittelwerte.

4.2. Graphische Darstellung und visuelle Analyse der Messungen durch Normierung

Ziel: Es ist wichtig, Messkurven mit "einem" Blick qualitativ auf den Messerfolg hin zu kontrollieren und miteinander vergleichen zu können. Entscheidend hierfür ist eine geeignete Darstellung der Messergebnisse, die einen schnellen Kurvenvergleich erlaubt. Daher wird unten ein Normierungsverfahren angewendet, um die Messkurven besser vergleichbar zu machen.

Dazu werden die schon nach Excel exportierten Daten der Korrelationskurven gemittelt, auf gleiche Konzentration normiert und gemeinsam in einer Graphik dargestellt.

4.2.1. Normierung auf die Konzentration und die Basislinie:

Dazu werden näherungsweise der Wert der Amplitude des Diffusionsbunchingterms der jeweiligen Messung (Rhodamin110: bei $t_c(\text{norm}) \approx 5 \cdot 10^{-3}$ ms, EGFP: $t_c(\text{norm}) \approx 2 \cdot 10^{-2}$ ms, Alexa-488-IgG: $t_c(\text{norm}) \approx 2 \cdot 10^{-2}$ ms) und der Wert der Basislinie ($t_c = 100$ ms) benutzt und in die folgende Formel eingesetzt:

$$G_{\text{norm}}(t_c) = 1 + \frac{(G_{\text{exp}}(t_c) - G_{\text{exp}}(t_c = 100 \text{ ms}))}{(G_{\text{exp}}(t_c(\text{norm})) - G_{\text{exp}}(t_c = 100 \text{ ms}))} \quad (27)$$

Hinweis zur Normierung: Die Zeit für die Normierung wird so gewählt, dass der Punkt im möglichst horizontalen Plateaubereich der Kurve liegt (also nicht im Abfallbereich eines Bunchingterms).

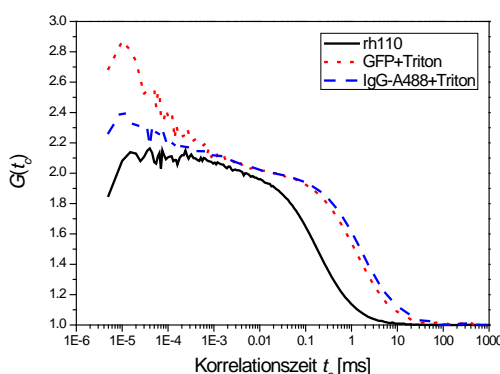


Abbildung 10:
Normierung auf die
Konzentration

Die Normierung auf die Konzentration erlaubt einen direkten visuellen Vergleich der Diffusionszeiten und veranschaulicht gegebenenfalls die Entwicklung zusätzlicher Bunchingterme (wie z.B. durch eine andere Triplettkinetik).

Für das Protokoll:

1. Erzeugen Sie eine Graphik, die alle 5 gemittelten Korrelationskurven (**reine Substanzen und Mischungen**), die auf die Konzentration normiert wurden, enthält (s. Abb. 10).
2. Markieren Sie in den einzelnen Korrelationskurven die aus den Fits ermittelten Diffusionszeiten. Haben Sie diese Ergebnisse für die Diffusionszeiten erwartet? Bitte diskutieren Sie Ihre Ergebnisse.
3. Welche zusätzlichen Bunchingterme können Sie in den einzelnen Korrelationskurven erkennen? Markieren Sie diese!

4.3. Abschätzung der Größe des Detektionsvolumens

Aus der gemessenen Diffusionszeit (t_D) des Farbstoffs Rhodamin 110 und dem Achsenverhältnis (z_0/ω_0) und unter Berücksichtigung des Diffusionskoeffizienten von Rhodamin 110 in Wasser und verdünnten wässrigen Lösungen von $D_{22,5} \approx 4,3 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ bei $22,5^\circ\text{C}$ kann, wie in Kap. 2.3.1. beschrieben, das Detektionsvolumen des konfokalen Aufbaus berechnet werden. Ein weiterer Wert wäre $D_{20} \approx 4,0 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ bei 20°C . Schätzen Sie ab, entsprechend der bei der Messung vorliegenden Temperatur.

Beachte: Benutzen Sie zur Berechnung die Messwerte aus der gepufferten Lösung.

Mit diesem Volumen und den in den Fits bestimmten Teilchenzahlen können nun die absoluten Konzentrationen der benutzten Farbstofflösungen berechnet werden.

Für das Protokoll:

1. Berechnen Sie das Detektionsvolumen des konfokalen Aufbaus! Alle nötigen Formeln dazu finden Sie in Kapitel 2.3.1., Diffusionszeit und Achsenverhältnis haben Sie über den Fit der Rhodamin-110-Messung ermittelt.
2. Bestimmen Sie dann die Konzentrationen (Einheit [nM]) der drei Einzellösungen mit Hilfe der gemessenen Teilchenzahl (inverse Amplitude des Diffusionsbunchingterms der Korrelationsfunktion; $N_1 = N_{eff}$ bei Einkomponentenfits)!
3. Geben Sie aus den Messungen der Einzellösungen auch die gemessene Zählrate pro Molekül an (Summe der Zählraten beider Detektionskanäle dividiert durch die mittlere Teilchenzahl. Für beide Messungen separat bestimmen und anschließend mitteln).

4.4. Analyse der Mischungen

Mit dem Parameter x_1 aus den Fits der Modellfunktion (Gl.22b) an die Messdaten der Mischungen sollen jetzt die tatsächlichen Teilchenzahlverhältnisse N_1/N_2 mit Hilfe der spezifischen Helligkeiten B_i der verschiedenen Fluorophore berechnet werden (Gl. 23). Anschließend können mit Gl. 24 (bzw. Gl. 26) die absoluten Konzentrationen der Mischungskomponenten bestimmt werden.

Beachte: Bei der Auswertung dürfen die Indices für Molekülspezies nicht verwechselt werden (x_1 , B_1 , N_1 ,... muss sich **immer** auf die **gleiche** Komponente beziehen). Besonders charakteristischer Parameter: Diffusionszeit!

Für das Protokoll:

1. Berechnen Sie die tatsächlichen Teilchenzahlverhältnisse N_1/N_2 in den Mischungen
2. Berechnen Sie die absoluten Konzentrationen der Mischungskomponenten

4.5. Überprüfung der Größenabhängigkeit der Diffusionskoeffizienten

Nach der Eichung des Detektionsvolumen des konfokalen Aufbaus mit Hilfe des bekannten Diffusionskoeffizienten von Rhodamin 110 sollen jetzt die Diffusionskoeffizienten der anderen gemessenen Moleküle berechnet werden (Gl. 15, Gl.16 und Gl.17). Unter der Annahme der Konstanz des Strukturparameters (z_0/ω_0) können die Diffusionskoeffizienten auch direkt nach $D_2/D_1 = t_{D1}/t_{D2}$ erhalten werden.

Für das Protokoll:

1. Berechnen Sie die unbekannt Diffusionskoeffizienten. Ermitteln Sie dann mit Gl. 19 die effektiven Radien (unter Annahme der Kugelform) dieser Moleküle. Dazu benötigen Sie den Wert der Viskosität des Lösungsmittels (Näherung: $\eta_{\text{Puffer}} \approx \eta_{\text{Wasser}}$) bei der Versuchstemperatur (Literaturwert mit Zitat!). Vergleichen Sie die dann zu

berechnenden molekularen Volumina mit den Molekulargewichten (Auftragung von V_m (Ordinate) vs. M_w (Abszisse)) und diskutieren Sie das Ergebnis. Geben Sie die molekularen Größen (hydrodynamischer Radius R_h , Volumen V_m) in [nm] bzw. [nm³] an, das Molekulargewicht M_w in [kDa].

4.6. Fehlerbetrachtung

Für das Protokoll:

1. Diskutieren Sie für alle angegebenen Werte (1.) die sich aus dem Experiment ergebenden Fehlergrenzen (Streuung der Messwerte, Ablesegenauigkeiten, gemachte Näherungen etc.) und (2.) im Vergleich mit Literaturwerten bzw. allgemeinen Abschätzungen mögliche Abweichungen vom Erwartungswert. Die Literaturwerte sollten dabei unter unserem Versuch ähnlichen Bedingungen gemessen worden sein (Lösungsmittel, Temperatur) bzw. auf diese umgerechnet werden (Stokes-Einstein-Gl.).

5. Stichworte zur Vorbereitung

- Prinzipieller Aufbau zur Messung von FCS, konfokales Mikroskop, Epi-Illumination
- Interpretation von FCS Kurven, Modelle
- Diffusionsgesetze (Fick'sche Gesetze)
- Singulett- und Triplettzustände
- Rotationskorrelation, Fluoreszenzanisotropie
- Einzelphotonenempfindliche Detektoren

6. Literatur

[1] Gendron P-O, Avaltroni F, Wilkinson KJ; J Fluoresc **18** 1093 (2008)

Allgemeine Einführung in Fluoreszenz & Diffusion:

Praktikumsskript, Lehrbücher der PC

Allgemeine Einführung in FCS:

<https://www.semanticscholar.org/paper/Fluorescence-Correlation-Spectroscopy-Analysis-to-its-and-Schwille-Haustein/11a9cb045cc94ce2a9407de3269cb71d747a7ed7>

15.11.2018