



ulm university universität
uulm

Fortgeschrittenenpraktikum der Physik
Fluoreszenz-Korrelations-
Spektroskopie

Versuch 35

Oliver Heinrich **Tobias Meisch**

<oliver.heinrich@uni-ulm.de>

<tobias.meisch@uni-ulm.de>

Gruppe: 717

Versuchstag: 08. Mai.2008

Abgabe: 23. Mai 2008

Zweitabgabe: 29. Mai 2008

Betreuer: Andrei Kobitski

Inhaltsverzeichnis

1	Theoretische Grundlagen	3
1.1	Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie	3
1.1.1	Funktionsprinzip	3
1.2	Fluoreszenz	3
1.3	Diffusion	4
1.4	Autokorrelation	4
1.5	Diffusion und Autokorrelation	5
1.6	Diffusion und intramolekulare Dynamik	6
1.7	Untersuchung von Ligandenbildung mittels FCS	7
2	Versuchsbeschreibung	8
2.1	Der Aufbau	8
2.2	Kalibrierung	9
2.3	Bestimmung des Beobachtungsvolumens	10
2.4	Bestimmung des hydrodynamischen Radius	10
3	Versuchsauswertung	11
3.1	Bestimmung des Beobachtungsvolumens	11
3.1.1	Beobachtungsvolumen	11
3.1.2	Autokorrelationsfunktion	13
3.2	Bindungsanalyse eines DNS-Strangs	15
4	Fehlerdiskussion	19
5	Quellen	20

1 Theoretische Grundlagen

1.1 Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie

Die FCS wurde bereits um 1970 von W. W. Webb und R. Rigler unabhängig voneinander entwickelt, gewann allerdings aufgrund technischer Entwicklungen erst in den letzten Jahren an Bedeutung.

Die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS¹) ist eine höchst empfindliche optische Messmethode, mit deren Hilfe man aus der Fluktuation von Fluoreszenzintensitäten Aussagen treffen kann. Man kann zum Beispiel Transportvorgänge von fluoreszenzmarkierten Teilchen beobachten. Mit der FCS werden in der Regel Diffusionskonstanten, Konzentrationen und Ratenkonstanten zwischen verschiedenen diffundierenden Teilchen gemessen.

Eine *konfokale Optik* ermöglicht es, Proben in einem Volumen von nur $1 \text{ fl} = 1 \mu\text{m}^3$ mittels Spektroskopie zu untersuchen. Aufgrund der hohen Auflösung können sogar einzelne Moleküle untersucht werden. Weitere Vorteile sind die kurze Aufnahmezeit, die oft nur wenige Sekunden beträgt, und die geringe benötigte Probenmenge.

1.1.1 Funktionsprinzip

Zum Einen wird der Laser sehr gut in der Flüssigkeit fokussiert, zum Anderen auch die Fluoreszenz-Photonen durch das Pinhole (= Lochblende). Dadurch wird ein sehr kleines Beobachtungsvolumen aus der Flüssigkeit herausgegriffen. Gemessen werden die Intensitätsschwankungen des Fluoreszenzlichts, indem dieses in Abhängigkeit der Zeit gezählt wird. Die Intensitätsschwankungen hängen von den Fluktuationen (= Schwankungen) der fluoreszierenden Teilchen ab. Diese werden sowohl durch die Bewegung der Moleküle aufgrund von Diffusion (Brown'sche Bewegung), als auch der Reaktionen der Moleküle in den Triplettzustand, also einen nichtfluoreszierenden Zustand, verursacht. Deshalb kann man mit der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie Raten- und Diffusionskonstanten chemischer und photophysikalischer Reaktionen bestimmen.

1.2 Fluoreszenz

Bestrahlt man ein fluoreszierendes Teilchen, so werden Elektronen durch die Photonen der Bestrahlung in ein höheres Energieniveau gebracht, also angeregt. Beim Übergang der Elektronen vom angeregten Zustand in einen Zustand niedrigerer Energie wird spontan und kurzzeitig Licht emittiert. Diese Emission wird *Fluoreszenz* genannt. Das emittierte Licht ist meist energieärmer, als das vorher absorbierte. Es findet also eine Rotverschiebung statt. Dieses Nachleuchten endet meist in weniger als einer Millionstel Sekunde. Der Name Fluoreszenz rührt von dem fluoreszierenden Mineral Fluorit (Flussspat, Calciumfluorid, CaF_2).

Zu den fluoreszierenden Farbstoffen zählen unter Anderem die Rhodamine, wie zum Beispiel Rhodamin 6G ($\text{C}_{28}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_3\text{Cl}$) und Rhodamin B, und das

¹fluorescence correlation spectroscopy

Fluorescein ($C_{20}H_{12}O_5$). Die Quantenausbeute von Rhodamin 6G ist 95%, das bedeutet von 100 absorbierten Photonen werden 95 in Fluoreszenzphotonen umgewandelt.

1.3 Diffusion

Die *Brown'sche Bewegung* ist eine statistische Bewegung mikroskopisch kleiner Teilchen. Diese ist in alle Richtungen gleich wahrscheinlich, während sie ihre Ursache in der Temperatur hat.

Die *Diffusion* ist ein Netto-Stofftransport aus einem Raumgebiet höherer in eines niedrigerer Konzentration. Die Ursache dafür ist die Brown'sche Bewegung.

1.4 Autokorrelation

Bei der FCS werden Fluoreszenzphotonen in Abhängigkeit der Zeit gezählt. Da aber jedes Teilchen eine bestimmte Zeit, die so genannte Diffusionszeit, benötigt, um das Anregungsvolumen zu durchqueren, ist es wahrscheinlich, dass mehrere Fluoreszenzphotonen von einem Teilchen detektiert werden. Die gemessenen Intensitäten sind also zeitlich korreliert.

Die *Autokorrelationsfunktion* (1) beschreibt die Selbstähnlichkeit des Fluoreszenzsignals zu verschiedenen Zeiten t und $t + \tau$. Man muss die *Fluktuationen* $\delta F(t) = F(t) - \langle F(t) \rangle$ (Abweichung der momentanen Fluoreszenzintensität vom Mittelwert) eines Zeitpunkts t mit den Fluktuationen des Zeitpunktes $t + \tau$ multiplizieren und normieren. Dann erhält man:

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \cdot \delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2}. \quad (1)$$

Diese Autokorrelationsfunktion $G(\tau)$ ist eine Funktion der „lag time“, die die Verschiebung der zwei miteinander multiplizierten Fluktuationsfunktionen angibt. Ihr zeitlicher Verlauf enthält Informationen über die Zeiten der beteiligten dynamischen Prozesse.

Ein die Autokorrelation beschreibendes Diagramm ist in Abbildung 1 zu sehen.

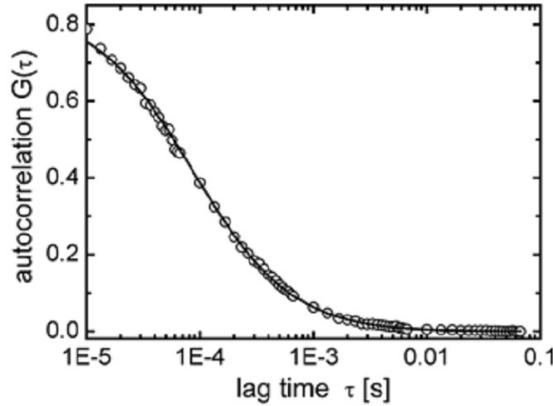


Abbildung 1: Autokorrelationsfunktion für die Brown'sche Bewegung von Rhodamin 6G in Wasser

1.5 Diffusion und Autokorrelation

Betrachtet man die Brown'sche Bewegung als ursächlich für die Intensitätsschwankungen der Fluoreszenz, so können diese mit Hilfe der Konzentrationsschwankungen ermittelt werden. Dazu integriert man die Änderungen der Konzentration $\delta c(\mathbf{r}, t)$, die mit der Wahrscheinlichkeit, ein Fluoreszenzphoton aus einem bestimmten Volumenelement zu detektieren, $\phi(\mathbf{r})$, multipliziert werden, über das gesamte Volumen:

$$\delta F(t) = \int \int \int \phi(r) \cdot \delta c(\mathbf{r}, t) d\mathbf{r}. \quad (2)$$

Die Wahrscheinlichkeit $\phi(\mathbf{r})$ legt somit die Ausdehnung des Beobachtungsvolumens fest, die in der Regel durch eine dreidimensionale Gauß-Funktion angenähert wird. Diese hängt ab von der Radialkomponente r_0 , die den lateralen Durchmesser des Beobachtungsvolumens angibt, und von der Axialkomponente z_0 , die den axialen Durchmesser des Anregungsvolumens beschreibt.

Nach Anwenden des *Fick'schen Gesetzes* für den dreidimensionalen Fall (3), das Konzentrationsschwankungen beschreibt, ergibt sich die Funktion (4) für frei diffundierende Moleküle.

$$\frac{\partial \delta c(\mathbf{r}, t)}{\partial t} = D \nabla^2 \delta c(\mathbf{r}, t) \quad (3)$$

$$G_D(\tau) = \frac{1}{N} \left[1 + \frac{\tau}{\tau_D} \right]^{-1} \left[1 + \frac{\tau}{\tau_D} \left(\frac{r_0}{z_0} \right)^2 \right]^{-\frac{1}{2}} \quad (4)$$

D ist der *Diffusionskoeffizient* der Probe, $N = c \cdot V_{eff}$ die mittlere Zahl der Moleküle im effektiven Beobachtungsvolumen V_{eff} , das sich wie folgt berechnet:

$$V_{eff} = \pi^{\frac{3}{2}} \cdot r_0^2 \cdot z_0 \quad (5)$$

Bei der Betrachtung der „Amplitude“ der Fluktuationen, also $G_D(0) = \frac{1}{N}$, erkennt man, dass die Fluktuationen am größten sind, wenn sich (im Mittel) am wenigsten Moleküle im Beobachtungsvolumen befinden. Der Grund hierfür lässt sich anschaulich so erklären: Befindet sich nur ein Molekül im Beobachtungsvolumen, so kann man es entweder beobachten, oder eben nicht. Bei vielen Molekülen machte es anteilig also nicht so viel aus, wenn ein oder mehrere Moleküle aus dem Beobachtungsvolumen austreten.

Die mittlere Verweildauer der Moleküle im Beobachtungsvolumen, also die Diffusionszeit τ_D , hängt von der Diffusionskonstante D und vom Radius des Beobachtungsvolumens r_0 ab. Der Zusammenhang ist:

$$\tau_D = \frac{r_0^2}{4D} \quad (6)$$

Die *Stokes-Einstein-Gleichung* bringt den Diffusionskoeffizienten und den (hydrodynamischen) Radius R_H zusammen:

$$R_H = \frac{k_B \cdot T}{6\eta\pi D} \quad (7)$$

k_B gibt die Boltzmann-Konstante an, η die dynamische Viskosität und T die Temperatur.

So können also, nachdem man das Beobachtungsvolumen kalibriert hat, mit der FCS-Apparatur mittlere Molekülradien oder absolute Diffusionskoeffizienten bestimmt werden. Des Weiteren können auch Veränderungen des Diffusionskoeffizienten, zum Beispiel durch Bindung eines fluoreszierenden Liganden an ein Makromolekül, detektiert werden. Zur Kalibrierung der Apparatur benutzt man in der Regel Lösungen von Teilchen mit bekanntem Diffusionskoeffizienten D . Ein Fit der Autokorrelationsfunktion (4) mit den freien Parametern N , τ_D und $\omega = \frac{r_0}{z_0}$ an die experimentell ermittelte Funktion ermöglicht nun die Berechnung des Beobachtungsvolumens V_{eff} (5).

1.6 Diffusion und intramolekulare Dynamik

Da es die Möglichkeit gibt, dass sich die im Beobachtungsvolumen befindlichen Teilchen in einem nicht fluoreszierenden² Zustand befinden, muss die Autokorrelationsfunktion $G_D(\tau)$ um den Reaktionsterm $G_R(\tau)$ erweitert werden. Mit

$$G_R(\tau) = 1 + \frac{F}{1-F} e^{-k_R\tau} \quad (8)$$

ergibt sich:

$$G(\tau) = G_D \cdot G_R = \frac{1}{N} \left[1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right]^{-1} \left[1 + \frac{\tau}{\tau_D} \left(\frac{r_0}{z_0}\right)^2\right]^{-\frac{1}{2}} \cdot \left[1 + \frac{F}{1-F} e^{-k_R\tau}\right] \quad (9)$$

²Es können sich sowohl physikalische (z.B. Singulett-Triplett-Übergang) als auch chemische (z.B. Protonierung/ Deprotonierung) Prozesse abspielen.

F gibt den Anteil der Moleküle an, die sich in einem „dunklen“, also nicht fluoreszierenden Zustand, befinden.

$k_R = \frac{1}{\tau_R}$ ist die charakteristische Rate für die Fluktuation eines Moleküls zwischen dem dunklen und dem hellen Zustand, τ_R ist die zugehörige charakteristische Zeit. In der Korrelationsfunktion in Abbildung 2 kann man dies an einer zusätzlichen Schulter für frühe Zeiten erkennen.

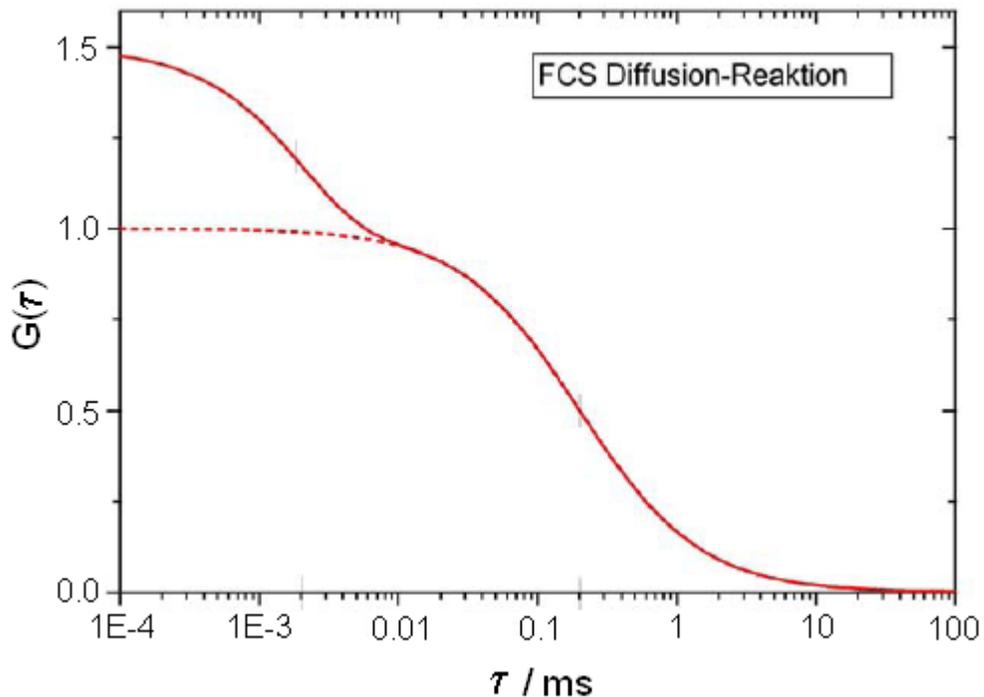


Abbildung 2: Korrelationsfunktion unter Berücksichtigung der Fluktuationen eines Moleküls von einem hellen in einen dunklen Zustand

1.7 Untersuchung von Ligandenbildung mittels FCS

Mit der FCS kann man auch Reaktionsgleichgewichte, wie die Bindung von Liganden untersuchen. Markiert man einen Ligand mit einem fluoreszierenden Farbstoff (siehe 1.2) so kann dieser an ein größeres Makromolekül binden. Man kann die Moleküle mit Ligand von denen ohne durch die langsamere Diffusionsgeschwindigkeit wegen ihrer größeren Masse unterscheiden.

Man bezeichnet die Konzentration der freien Moleküle mit M und L und die der gebundenen Komplexe mit ML . Im Gleichgewicht gilt also:

$$k_{geb} \cdot M \cdot L = k_{frei} \cdot ML \quad (10)$$

Die so genannte Gleichgewichtskonstante K_d , auch als Dissoziations- bzw. Bin-

dungskonstante bekannt, ergibt sich als Quotient der Edukte und dem Produkt:

$$K_d = \frac{k_{frei}}{k_{geb}} = \frac{M \cdot L}{ML} \quad (11)$$

Die Autokorrelationsfunktion für die Fluoreszenz liefert mit dem Bruchteil gebundener Liganden

$$x = \frac{ML}{ML + L} \quad (12)$$

zwei Diffusionsterme (ohne Reaktionsterm):

$$G(\tau) = \frac{1}{N} \cdot \left(\frac{x}{1 + \frac{\tau}{\tau_{ML}}} + \frac{1-x}{1 + \frac{\tau}{\tau_L}} \right) \quad (13)$$

τ_{ML} (τ_L) ist die Diffusionszeit er gebundenen (freien) Liganden.

Zudem wurde die Annahme gemacht, dass Absorption und Fluoreszenz des markierten Liganden bei der Bindung unverändert bleiben. Die Näherung, dass es sich um nur eine Spezies handelt, ist zulässig, wenn sich die Korrelationszeiten nur geringfügig (maximal Faktor 3) unterscheiden. Die Autokorrelationsfunktion ergibt sich dann als:

$$G(\tau) = \frac{1}{N} \cdot \left(\frac{1}{1 + \frac{\tau}{\langle \tau_D \rangle}} \right) \quad (14)$$

$\langle \tau_D \rangle$ ist die mittlere Diffusions-Korrelationszeit, die sich wie folgt als gewichteter Mittelwert ergibt:

$$\langle \tau_D \rangle \approx x \cdot \tau_{ML} + (1-x) \cdot \tau_L = \tau_L + (\tau_{ML} - \tau_L) \cdot x \quad (15)$$

x ergibt sich durch Einsetzen von (11) in (12):

$$x = \frac{ML}{ML + L} = \frac{1}{1 + \frac{K_d}{M}} \quad (16)$$

2 Versuchsbeschreibung

Die gesamte Messung findet in einem abgedunkelten Raum statt, um die Messungen des empfindlichen Photonendetektors nicht zu beeinflussen. Das einzige unvermeidbare Licht im Raum, war das des Computers.

2.1 Der Aufbau

Der Hauptbestandteil unseres Versuches ist das Laser-Fluoreszenz-Mikroskop. Der Laser erzeugt monochromatisches Licht mit der Wellenlänge von $\lambda = 532nm$ und sendet dieses durch diverse Linsen und Lochblenden aufgeweitet auf einen dichroitischen Strahlteiler. Licht der Laserwellenlänge wird gespiegelt und durch ein Objektiv geschickt, wo es nun einzelne Moleküle der zu untersuchenden Flüssigkeit zur Fluoreszenz anregt. Das wieder emittierte Licht ist gegenüber dem

absorbierten leicht rotverschoben ($\lambda = 556nm$). Diese Wellenlänge wird jedoch vom Strahlteiler nicht reflektiert. Das emittierte Licht kann also vom Detektor störungsfrei registriert werden. Dieser ist so empfindlich, dass er einzelne Lichtquanten registriert. Vor diesem ist noch ein so genanntes Pinhole ($\varnothing = 50\mu m$) montiert. Dieses soll sicher stellen, dass kein irgendwo reflektiertes Laserlicht in das Messgerät gelangt. Durch das Verstellen der Spiegel wird der Laserstrahl so justiert, dass das reflektierte Licht genau durch diese Lochblende gelangt. Außerdem müssen wir durch Auf- und Abfahren des Objektivs sicherstellen, dass sich unser Beobachtungsvolumen genau zwischen zwei Objektträgern befindet. Die folgende Abbildung 3 zeigt den schematischen Aufbau des Versuchs:

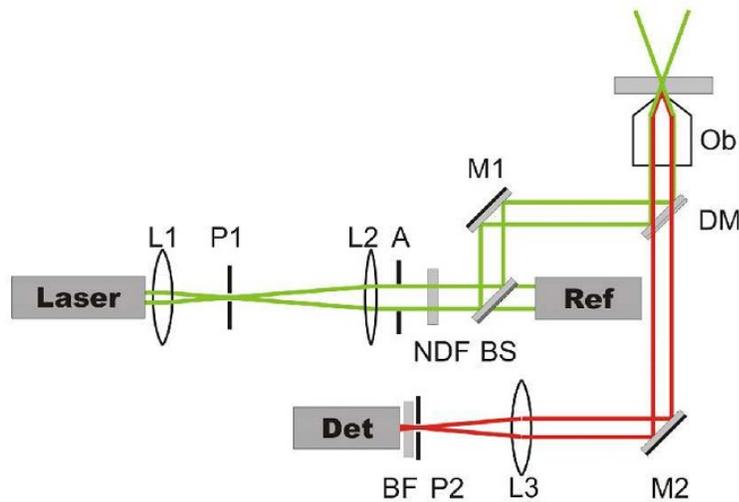


Abbildung 3: Schematischer Aufbau des FCS

2.2 Kalibrierung

Um sicher zu stellen, dass der Laserstrahl durch alle Pinholes, Linsen und Strahlteiler geht, muss die Apparatur vor der Versuchsdurchführung kalibriert werden. Dazu bringt man zunächst etwas Immersionsöl auf das Objektiv. Darauf legt man dann ein Glasplättchen. Bringt man nun ein Stückchen Papier in den Strahlengang nach dem dichroitischen Teiler, so sollte ein deutlicher Fokus des Reflexes der Grenzschicht zu erkennen sein, der sich auch bei Veränderung der Objektivhöhe nicht ändert. Außer dem sollte er symmetrisch sein. Ist dies nicht der Fall, kann man an zwei empfindlich eingestellten Schrauben den Strahlteiler samt Spiegel („Strahlaufzug“) bewegen.

2.3 Bestimmung des Beobachtungsvolumens

Unser erster Versuchsteil besteht darin, die jeweiligen Beobachtungsvolumina bei verschiedenen Laserstärken P zu untersuchen. Als Vorbereitung müssen wir zuerst die Objektträger präparieren. Auf ein größeres Deckglas, welches wir zuvor über einen Bunsenbrenner desinfiziert haben, kleben wir symmetrisch zwei doppelseitige Klebestreifen, um ein kleineres, ebenfalls zuvor desinfiziertes Deckblättchen fixieren zu können. Durch diese beiden Streifen entsteht zwischen den Deckgläsern ein Kanal. Diesen spülen wir mit reinem Wasser durch. Mit Hilfe einer Pipette können wir die Flüssigkeitsmengen auf $0,01\mu\text{l}$ genau dosieren. Nach einigen Spülgängen füllen wir nun Rhodamin 6G, ein Farbstoff, der bei der Wellenlänge unseres Lasers fluoreszierende Eigenschaften aufweist, hinein. Das effektive Beobachtungsvolumen können wir näherungsweise durch eine Gaußglocke beschreiben, die durch einen axialen und einen radialen Radius (x_0 , beziehungsweise r_0) aufgespannt wird. Das *Auswertungsprogramm* zeichnet die Werte für $\left(\frac{r_0}{z_0}\right)^2$ und $\tau_D = \frac{r_0^2}{4 \cdot D}$ (die Diffusionszeit der einzelnen Moleküle durch das Beobachtungsvolumen) auf. Außerdem ist uns der Diffusionskoeffizient $D = 2,8 \cdot 10^{-10} \frac{\text{m}^2}{\text{s}}$ für Rhodamin bekannt. Das Beobachtungsvolumen V_{eff} beschreiben wir durch die Formel (5):

$$V_{eff} = \pi^{\frac{3}{2}} \cdot r_0^2 \cdot z_0$$

2.4 Bestimmung des hydrodynamischen Radius

Für die nächste Versuchsdurchführung verwenden wir wieder ein neues Deckblättchen. Wir spülen es erst wieder ein paar Mal mit destilliertem Wasser durch und geben dann $20\mu\text{l}$ von einer Lösung ein, die einzelne DNS-Stränge (acht Basen), so genannte *Oligonukleotide* enthält. Diese sind am 5'-Ende mit dem fluoreszierenden Farbstoff *Alexa555* markiert. Diesmal ist uns die Diffusionskonstante unbekannt und wir müssen diese aus dem radialen Radius und der Diffusionszeit τ_D bestimmen: $D = \frac{r_0^2}{4 \cdot \tau_D}$. Den *hydrodynamischen Radius* wiederum bestimmen wir aus:

$$R_H = \frac{k_B T}{6\pi\eta D}$$

k_B ist hier die Boltzmann-konstante ($k_B = 1,380 \cdot 10^{-23} \frac{\text{J}}{\text{K}}$), T die Raumtemperatur von 22°C und η die dynamische Viskosität, die wir als gegeben betrachten können: $\eta = 9,55 \cdot 10^{-4} \frac{\text{Ns}}{\text{m}^2}$

In den nächsten Messungen injizieren wir zusätzlich zu den Alexa555-DNS-Strängen noch eine Lösung, die komplementäre Oligonukleotide enthält, an denen das Protein *Biotin-Streptavidin* (5'-Biotin-TEG-CCCATTCCACC) gebunden ist. Außerdem steht uns noch eine Pufferlösung zur Verfügung. Nach jeder Messung variieren wir nach einem festen Konzept unsere jeweiligen Konzentrationen des komplementären Oligonukleotids. Die Abfüllmenge bleibt jeweils bei $20\mu\text{l}$ (also zweimal mit $10\mu\text{l}$ das Deckblättchen durchspülen) konstant.

Folgende Tabelle zeigt die jeweiligen Mengen, die wir für unsere Messungen verwendet haben:

6nM DNS-F	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l
Pufferlösung	7 μ l	5 μ l	-	7 μ l	5 μ l	-	7 μ l	5 μ l	-
Anteil DNS-B	3 μ l 60 nM	5 μ l 60 nM	10 μ l 60 nM	3 μ l 600 nM	5 μ l 600 nM	10 μ l 600 nM	3 μ l 6 μ M	5 μ l 6 μ M	10 μ l 6 μ M
DNS-B	9nM	15nM	30nM	90nM	150nM	300nM	900nM	1,5 μ M	3 μ M

Tabelle 1: DNS - Konzentrationen

Wir variieren die Konzentration der DNS-B (komplementären Oligonukleotid) von 9 nM (Nano-Molar, das heißt 15 NanoMol pro Liter) bis zu 3000nM.

3 Versuchsauswertung

3.1 Bestimmung des Beobachtungsvolumens

3.1.1 Beobachtungsvolumen

Nach Berechnung des Beobachtungsvolumens mit der Formel (5) erhalten wir folgende Werte:

P / μ W	$\frac{r_0}{z_0}$	r_0 / μ m	z_0 / μ m	V_{eff} / fl
50	0,1001	0,2778	2,7744	1,1924
100	0,0886	0,2869	3,2378	1,4847
100	0,1590	0,3015	1,8962	0,9598
200	0,1090	0,3027	2,7766	1,4166
300	0,0794	0,2981	3,7550	1,8577

Tabelle 2: Werte der Beobachtungsvolumina

Man sieht, dass wir bei zwei Messungen bei 100 μ W zwei unterschiedliche Werte für das Beobachtungsvolumen erhalten haben. Auch die Werte für $\frac{r_0}{z_0}$ sind für unterschiedliche Laserleistungen verschieden, obwohl wir an der Apparatur nichts änderten. Das muss auf schlechte Kalibrierung und oder eventuelle Verunreinigungen zurückzuführen sein.

In folgender Abbildung 4 sind die Beobachtungsvolumina in Abhängigkeit von der Laserleistung dargestellt:

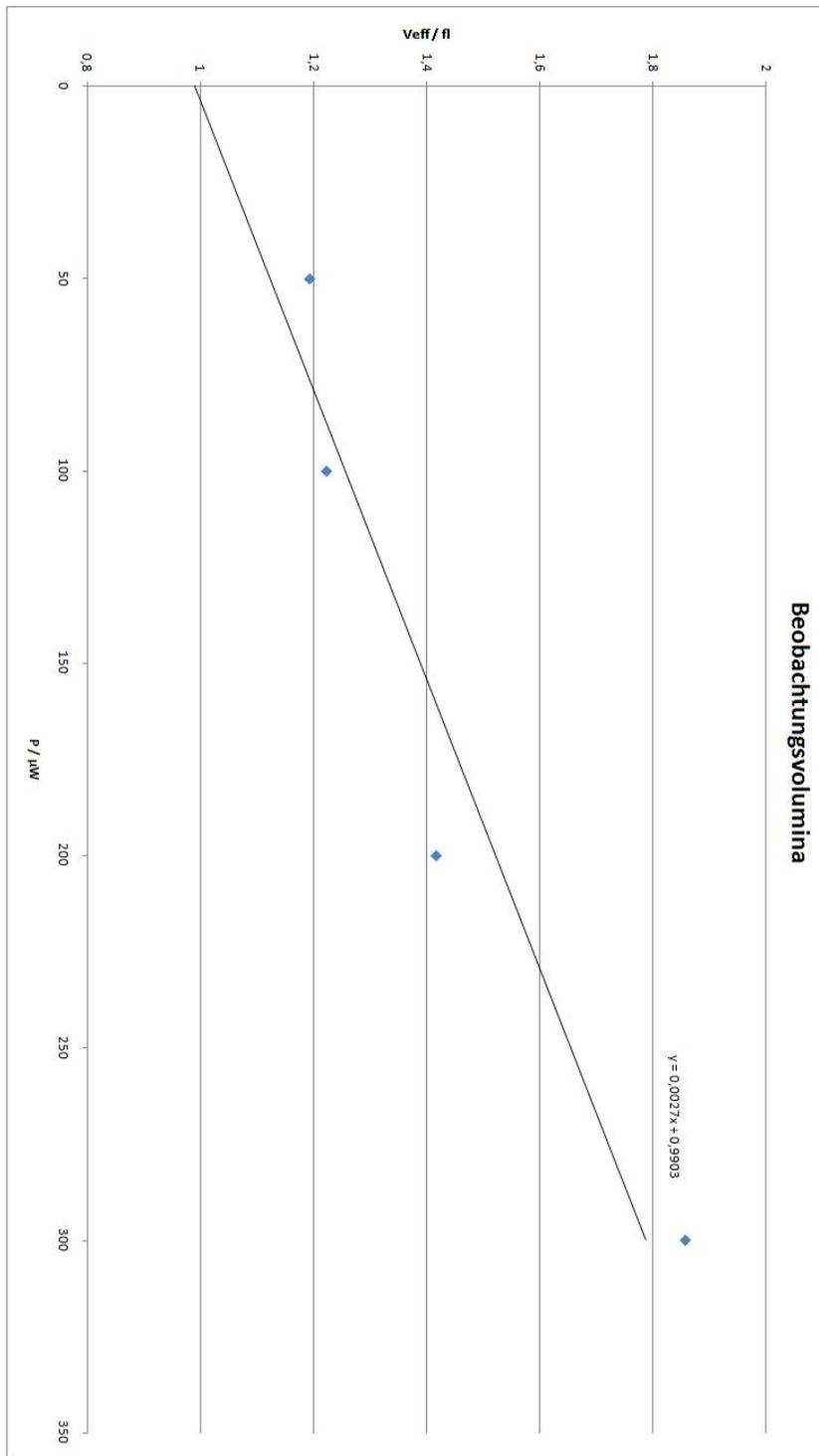


Abbildung 4: Beobachtungsvolumina in Abhängigkeit von der Laserleistung

In Abbildung 4 haben wir den Mittelwert der beiden Beobachtungsvolumina bei 100 mW genommen. Tendenziell erkennt man, dass das Beobachtungsvolumen mit ansteigender Laserleistung größer wird. Dies lässt sich damit erklären, dass mit steigender Laserleistung mehr Moleküle angeregt werden. Mit Hilfe der Regressionsgerade können wir auf das Beobachtungsvolumen bei 0 mW schließen. Das Volumen bei $0\text{ }\mu\text{W}$ beträgt $0,9903\text{ fl}$.

3.1.2 Autokorrelationsfunktion

Das Auftragen der vom *Auswertungsprogramm* ermittelten Autokorrelationsfunktionen der vier Laserleistungen über der Zeit, ergibt folgendes Schaubild:

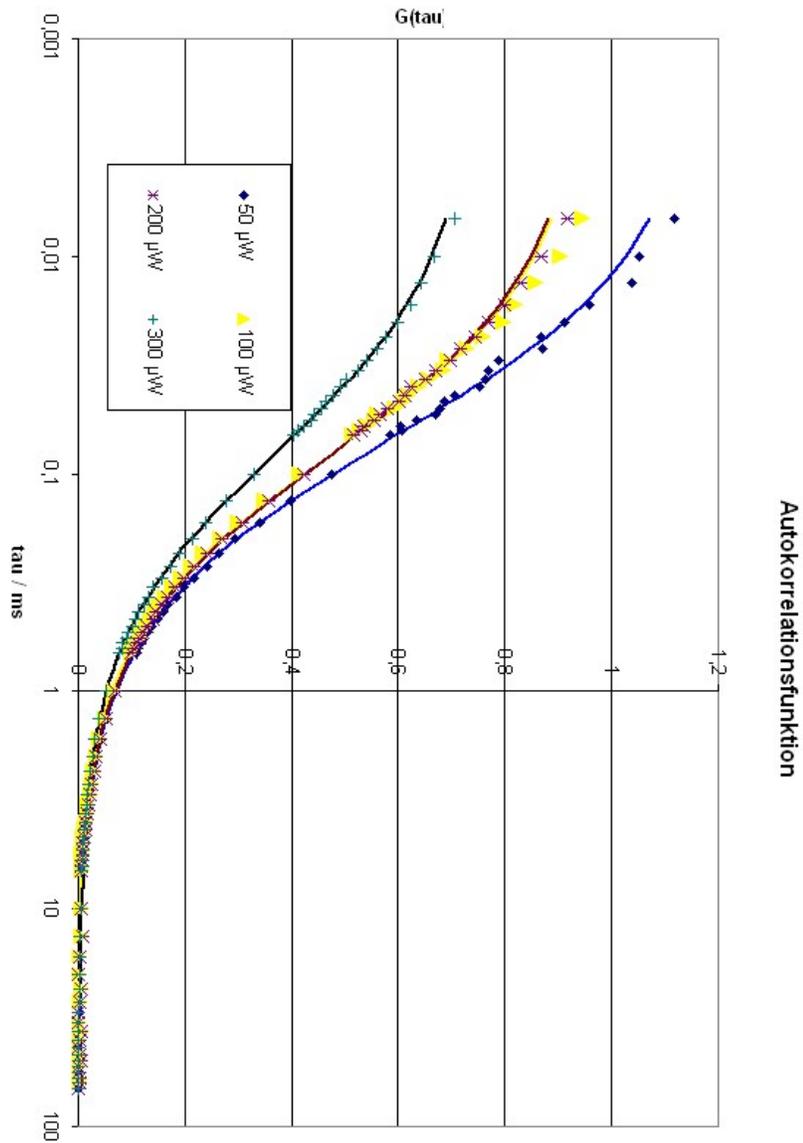


Abbildung 5: Autokorrelationsfunktion für den Pinholedurchmesser $50 \mu\text{m}$

Die vom *Auswertungsprogramm* gemessenen Werte (Symbole) stimmen sehr gut mit der an Gleichung (4) gefitteten Kurve überein, besonders für größere Zeiten. Man kann hier erkennen, dass die Autokorrelationsfunktion von der Laserleistung abhängt. Alle vier Kurven sind etwa nach der gleichen Zeit, etwa 0,1

ms, auf den halben Wert abgesunken.

3.2 Bindungsanalyse eines DNS-Strangs

Die vom *Auswertungsprogramm* ermittelten Autokorrelationskurven werden zunächst auf 1 normiert, damit sie besser vergleichbar sind. Anschließend werden die normierten Autokorrelationsfunktionen über der Zeit aufgetragen (Abbildung 6).

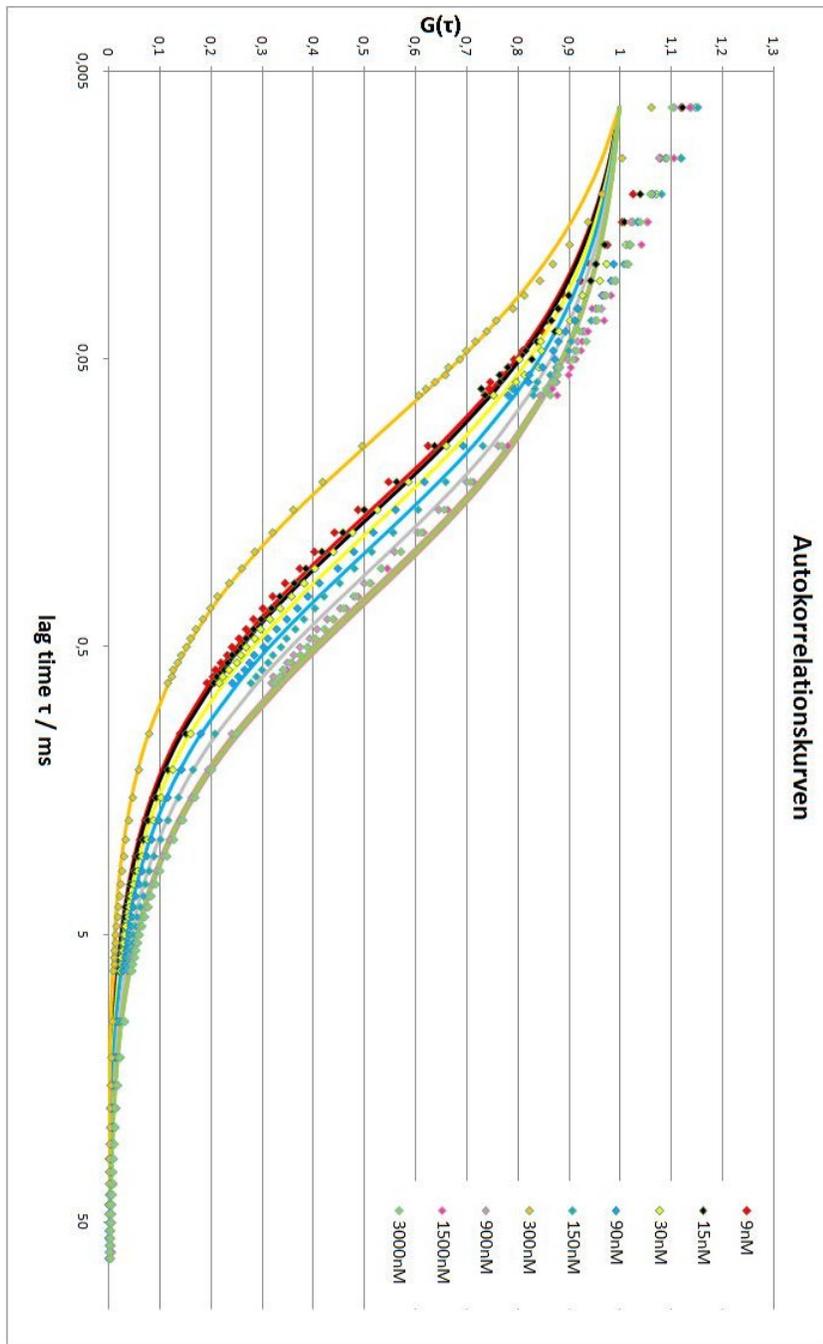


Abbildung 6: Autokorrelationskurven bei verschiedenen Konzentrationen

Wir sehen, dass sich mit steigender Konzentration der komplementären Oligonukleotiden sich die Korrelationszeit erhöht. Das lässt sich damit erklären, dass sich die beiden DNS-Stränge binden und somit ein Molekül höherer Masse darstellen, die Diffusionszeit erhöht sich damit. Die folgende Tabelle enthält die Diffusionszeiten, die das Auswertungsprogramm ermittelte.

Konzentration in nM	Diffusionszeiten in ms
9	0,168
15	0,176
30	0,198
90	0,231
150	0,277
300	0,091
900	0,334
1500	0,354
3000	0,344

Tabelle 3: Diffusionszeiten

Wie die Tabelle zeigt, weichen die Werte bei 300 nM und 3000 nM vom Trend ab. Für den Fit werden deshalb beide Werte nicht berücksichtigt. Der Grund hierfür könnte sein, dass wir nach versehentlichem Entfernen des Probenplättchens und nochmaligem Aufbringen des Öls auf das Objektiv die Probenkammer nicht mit dem Beobachtungsvolumen zusammenfiel.

Das folgende Schaubild zeigt die Diffusionszeiten in Abhängigkeit von den Konzentrationen:

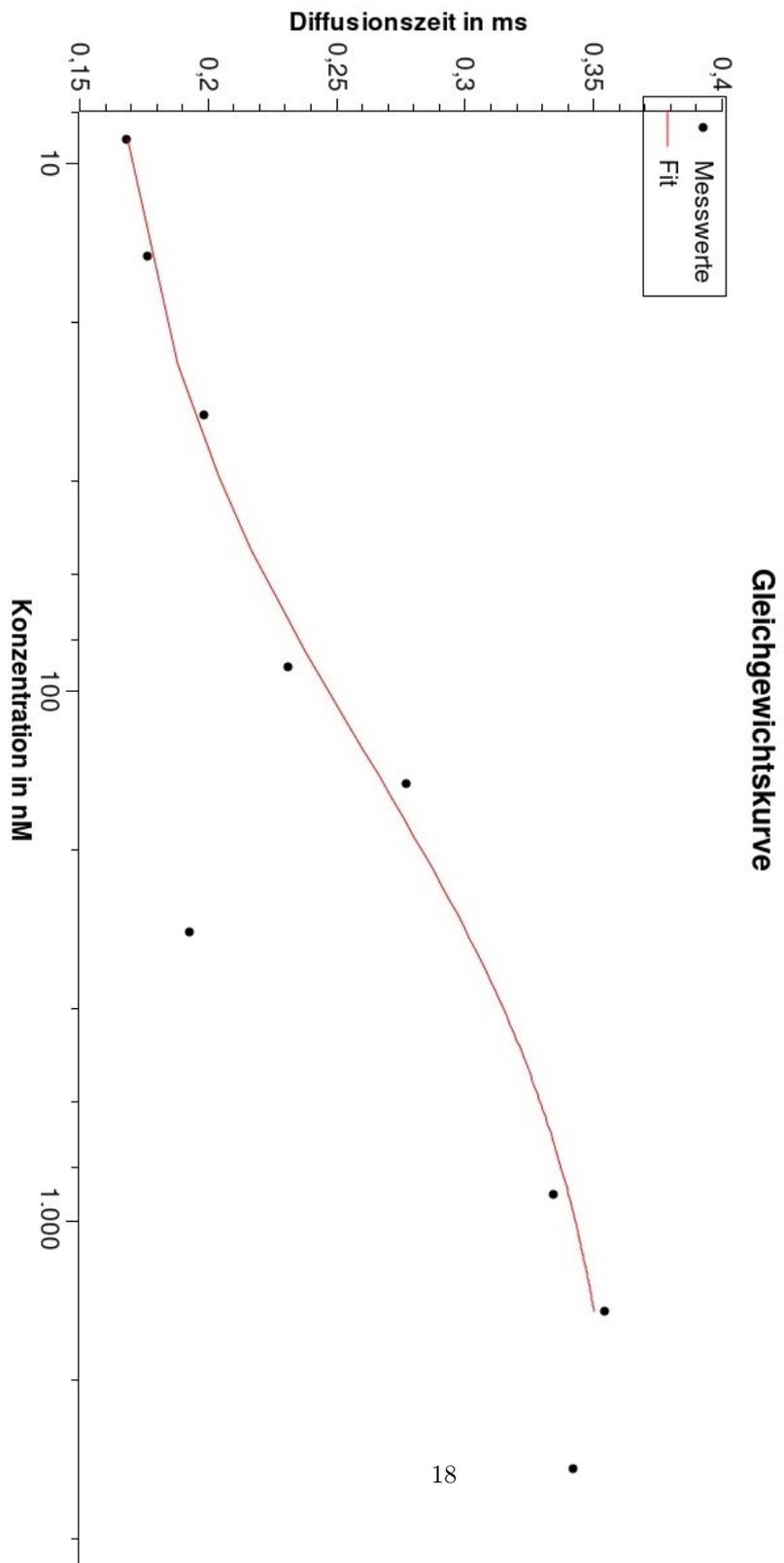


Abbildung 7: Gleichgewichtskurve

Dieses Schaubild erhält man, indem man Gleichung (16) in Gleichung (15) einsetzt, und so

$$\langle \tau_D \rangle = \tau_L + (\tau_{ML} - \tau_L) \cdot \frac{1}{1 + \frac{K_d}{M}} \quad (17)$$

erhält und mit (17) fittet. Der (freie) Fitparameter ist K_d . Für diesen erhält man:

$$K_d = 131,836 \text{ nM}.$$

Anhand der Abbildung 7 ist ersichtlich, dass das gerade die Konzentration ist, bei dem Mittelwert der gemessenen Diffusionszeiten. Die Bindungen sind also bei dieser Konzentration halb gesättigt. Nun kann man auch die Ratenkonstante berechnen:

$$k_{frei} = 13,184 \frac{1}{Ms}$$

Die berechneten hydrodynamischen Radien sind:

$$\begin{aligned} R_{H,L} &= 8,08 \cdot 10^{-10} \text{ m} \\ R_{H,ML} &= 3,42 \cdot 10^{-9} \text{ m} \end{aligned}$$

Der Radius der Duplex-DNS ist etwa vier mal so groß, wie der der ungebundenen Oligonukleotide.

4 Fehlerdiskussion

Auffallend ist, dass die berechneten Beobachtungsvolumina für unterschiedliche Laserleistungen auseinander gehen. Das kann eigentlich nicht sein, da wir bei der Messung mit den unterschiedlichen Laserleistungen nichts am Volumen änderten. Das kann an einer schlechten Kalibrierung der Apparatur gelegen haben. Es kann sein, dass die empfindlichen Stellschrauben des Strahlenaufzugs während des Versuches durch Berühren des Spektrometers verstellt haben. Dadurch wäre der Fokus nicht mehr exakt im Pinhole gewesen.

Dass Schwanken der Intensitäten kann daran gelegen haben, dass Teilchen in den nichtfluoreszierenden Zustand übergegangen sind. Ein weiterer Grund ist möglicherweise, dass sich die Teilchen an den Wänden der Probenkammer angelagert haben. Dies haben wir zwar versucht zu vermeiden, indem wir die Messung sofort nach dem Zubereiten der Probe durchgeführt haben, kann aber dennoch passiert sein.

Ein weiteres Problem könnte gewesen sein, dass das Objektiv zu nahe an der Probe war und somit die konfokale Näherung nicht mehr stimmt. Zudem haben wir die unterschiedlichen Brechungsindizes nicht beachtet. Unsere Proben waren hydrophil, während das Immersionsöl des Ölmikroskops hydrophob ist. Somit hätte es zu einer Verfälschung der Messergebnisse kommen können.

5 Quellen

- <http://de.wikipedia.org/wiki/Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie>
- <http://de.wikipedia.org/wiki/Fluoreszenz>
- <http://de.wikipedia.org/wiki/Rhodamin>
- <http://wwwex.physik.uni-ulm.de/lehre/fortgeschrittenenpraktikum/fp/FCS.pdf>