

Kreuzkorrelationsspektroskopie mit zwei Fluoreszenzfarbstoffen

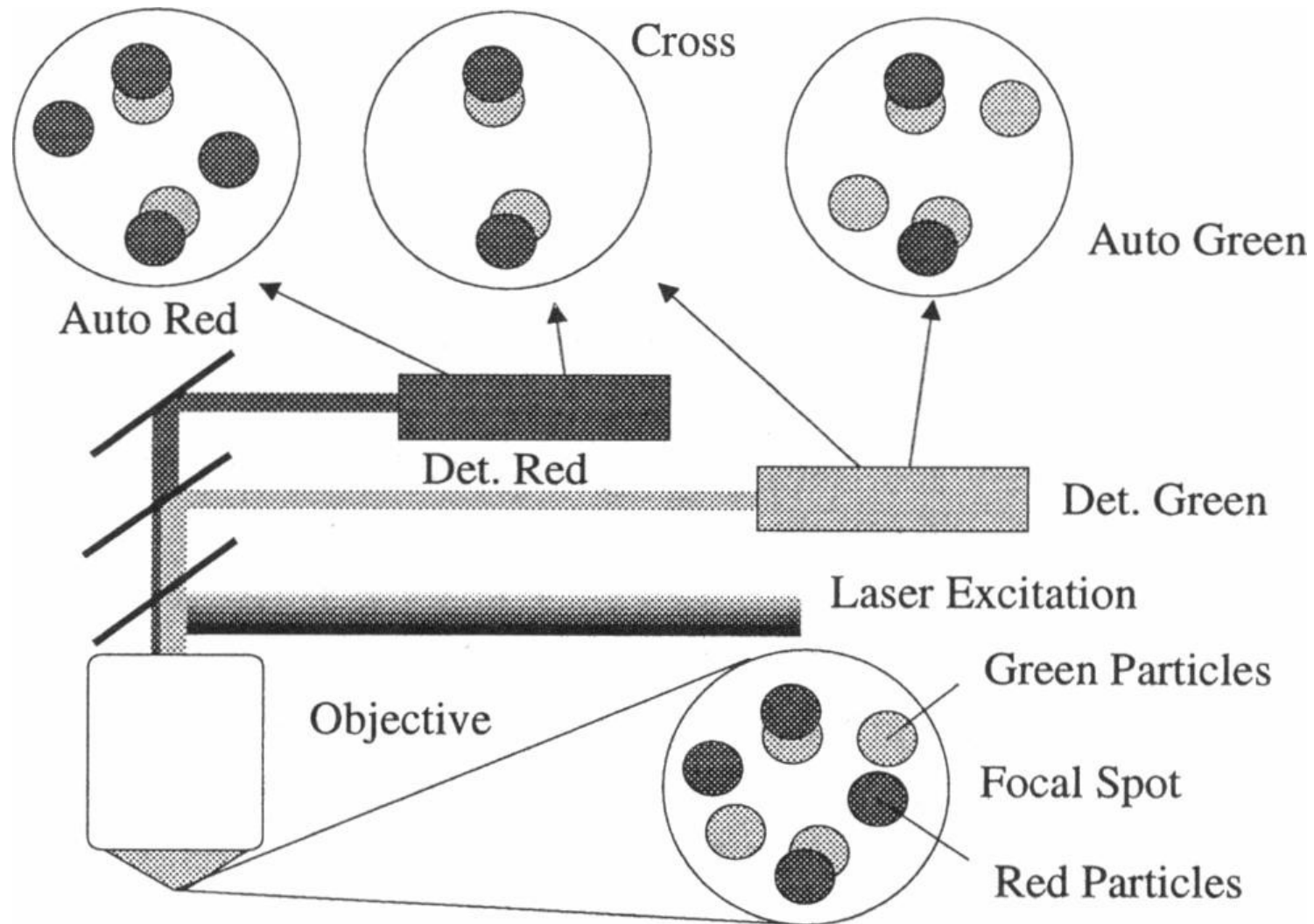
Gliederung

- Einführung in die Technik
- Experimentelle Methoden
- Ergebnisse und Diskussion
- Fazit und Quellen

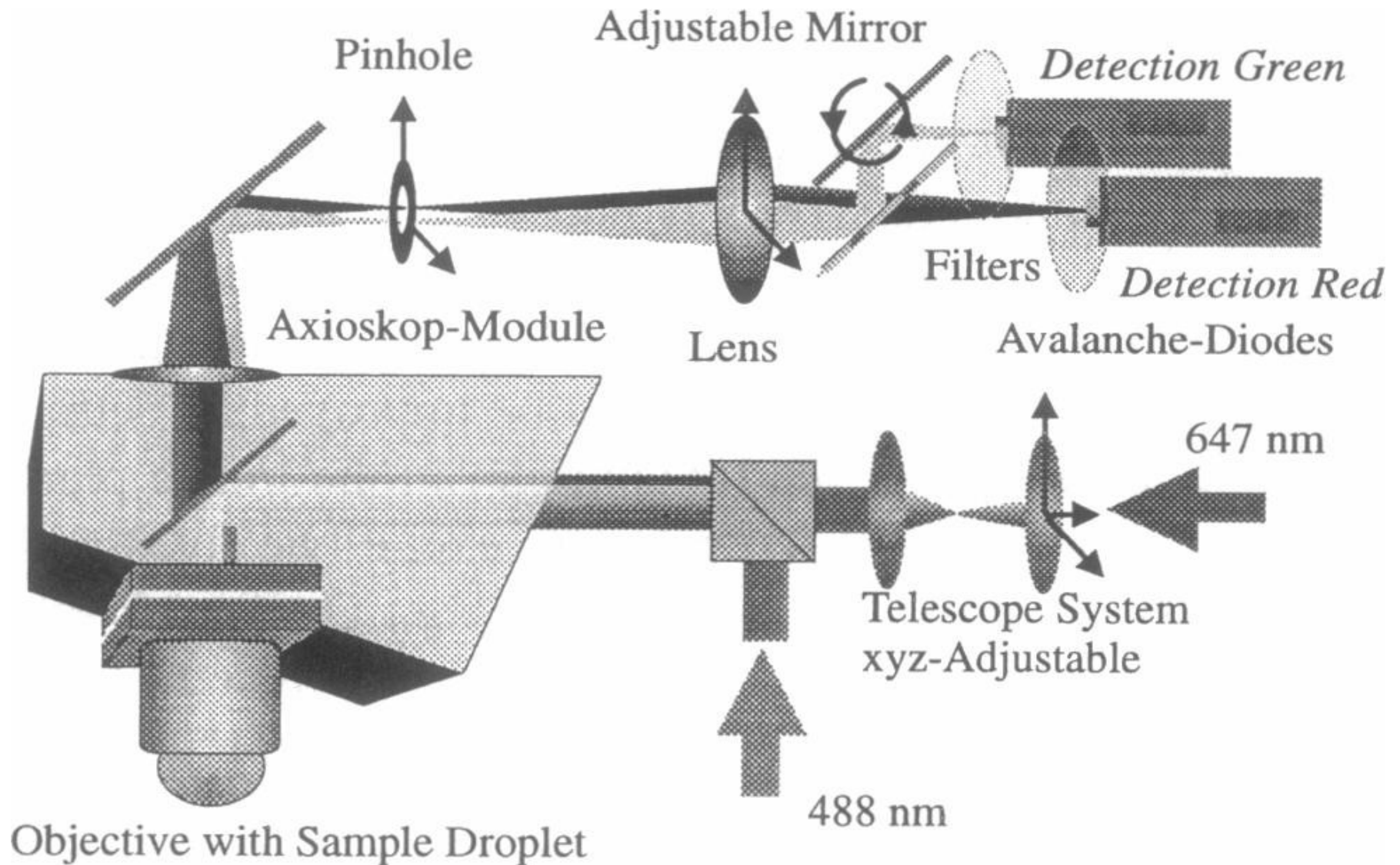
Fluoreszenzspektroskopie

- Nutzt die atomaren Energieniveaus
- Niveau wird durch Absorption eines Photons angeregt
- Fällt wieder in den Grundzustand zurück
=> Photon mit charakteristischer Wellenlänge wird emittiert
- Funktioniert auch mit Molekülen, hier werden aber auch Vibrationsmoden angeregt!

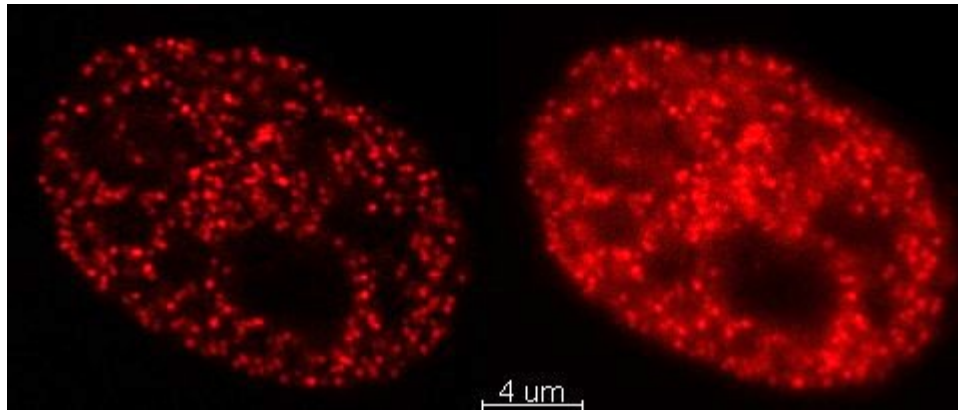
Prinzip der Messung



Experimenteller Aufbau



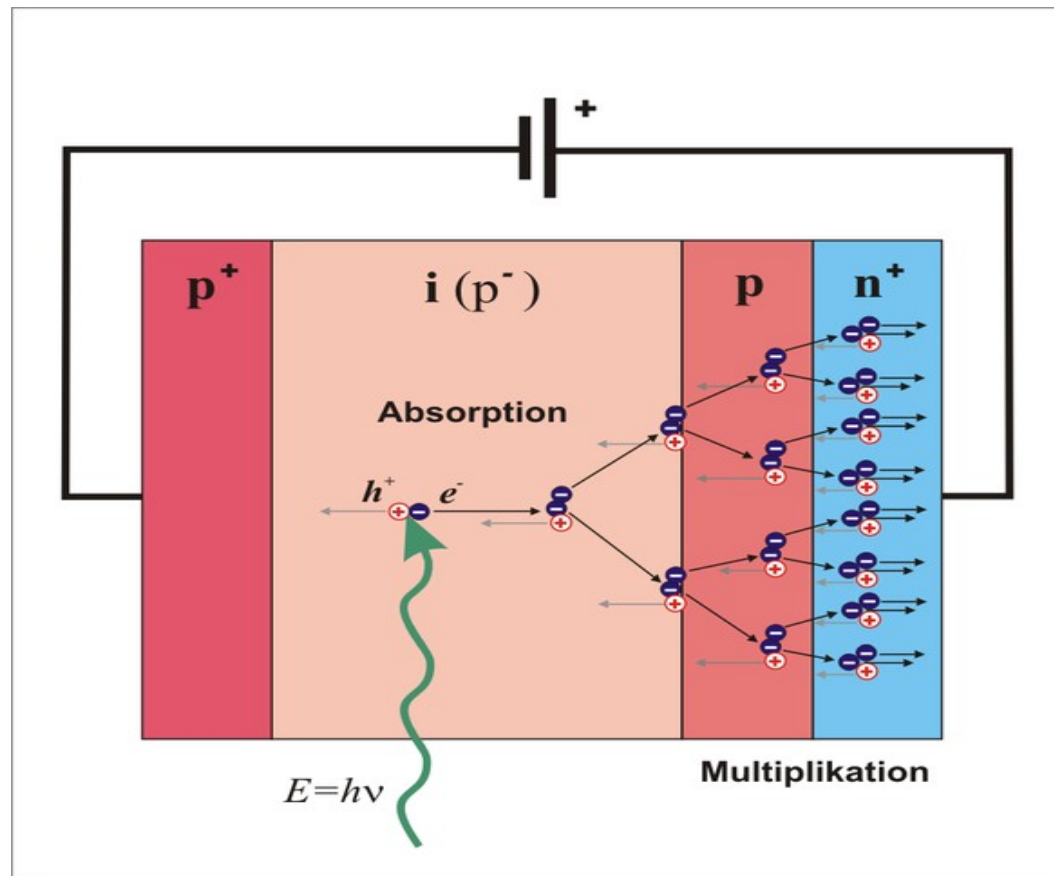
Konfokales Mikroskop



$$\textit{Allgemein} : V_{eff} = \Pi^{(3/2)} * r_0^2 * z_0$$

$$\textit{Hier} : V_{eff} \approx 10^{(-15)} \textit{ liter}$$

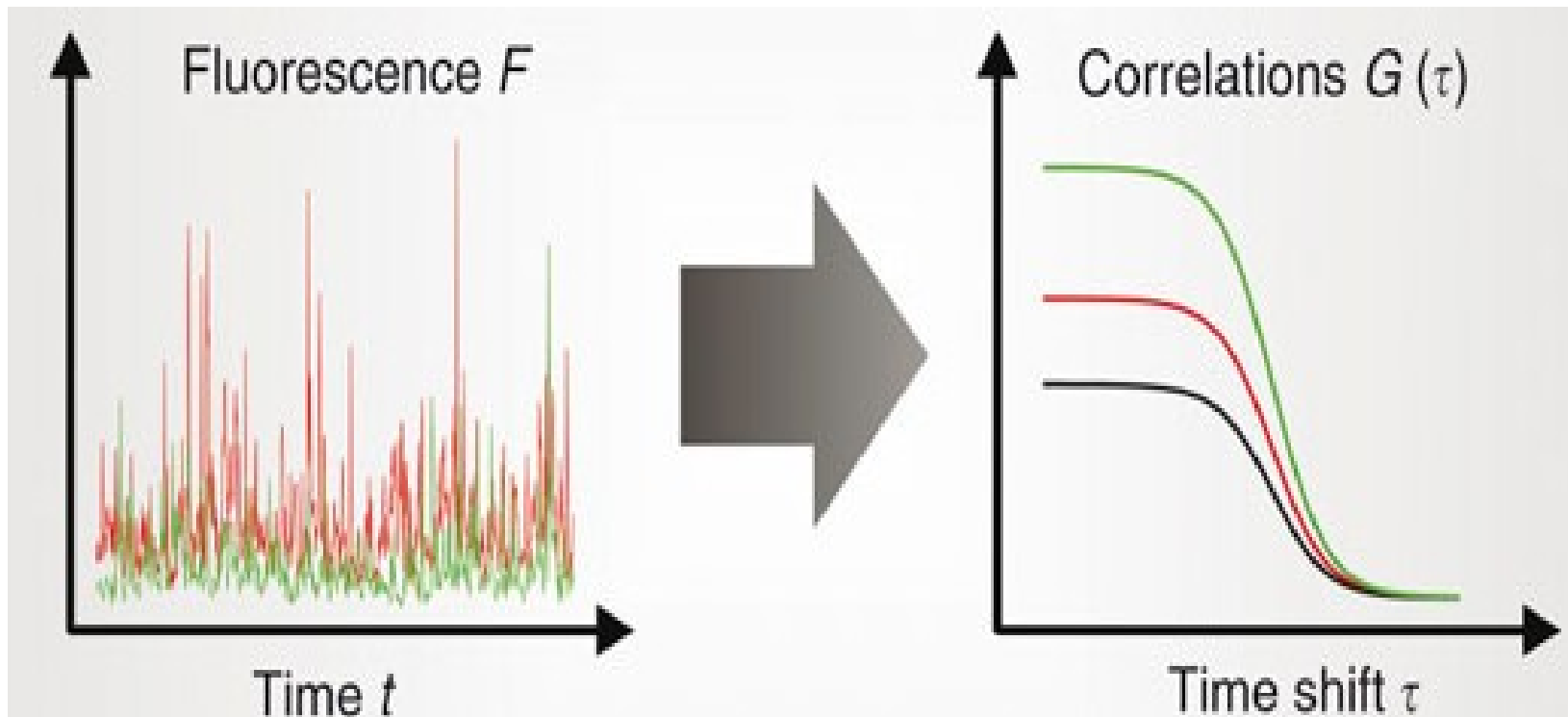
Avalanche Detektor



Autokorrelationsfunktion

- Was wird gemessen?

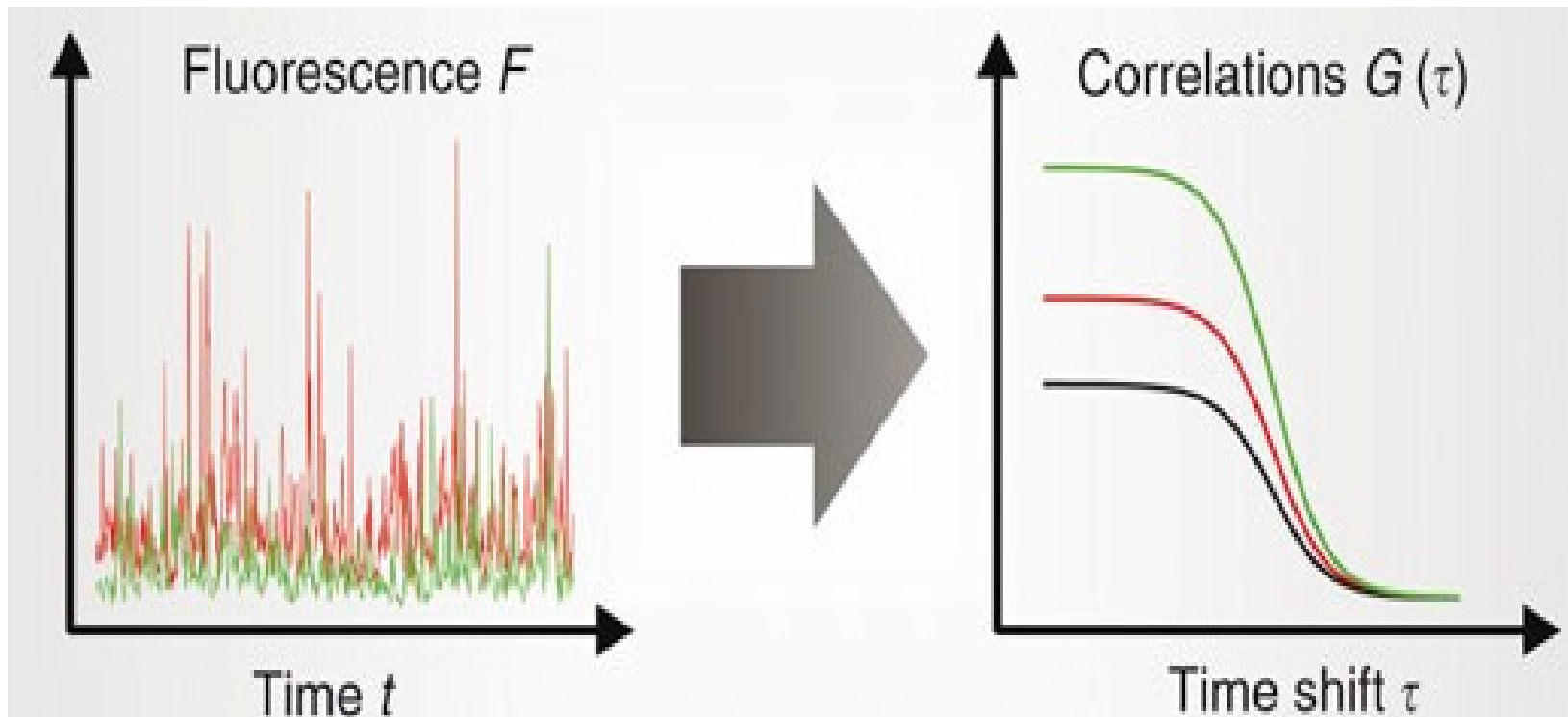
Intensitäten:



Autokorrelationsfunktion

- Wie berechnet man Sie?

$$G(\Delta t) = \int I(t) * I(t + \Delta t) dt$$

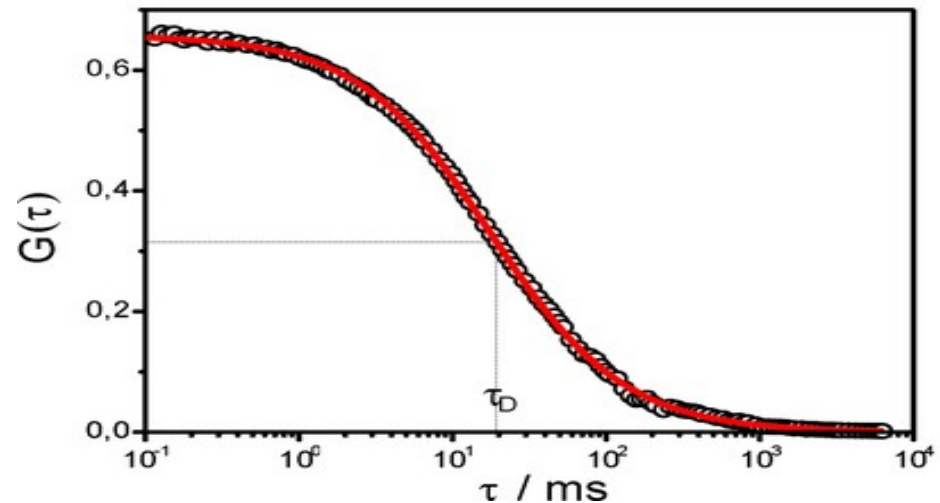
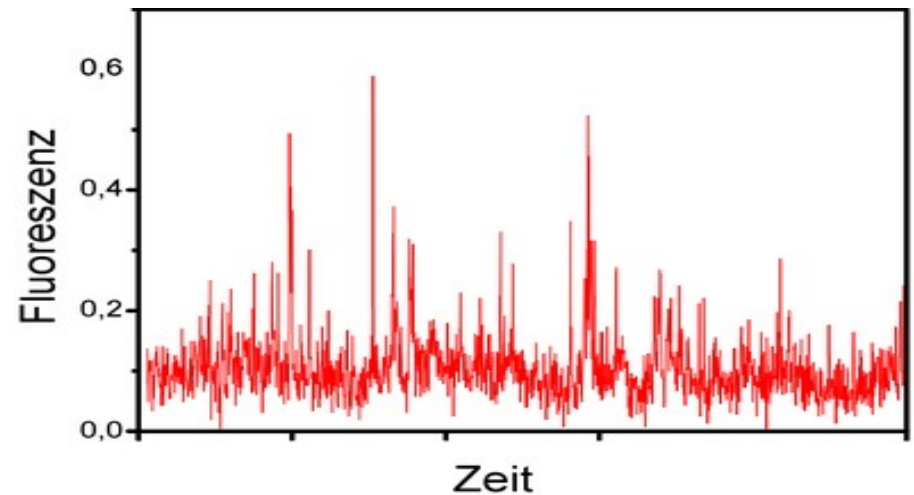


Autokorrelationsfunktion

- Was lernt man daraus?

Diffusion:

$$\tau_{d,i} = r_0^2 / 4D_i$$



Kreuzkorrelation

- Zwei fluoreszierende Farben:

$$G_{\text{kreuz}}(\Delta t) = \int I_{\text{grün}}(t) * I_{\text{rot}}(t + \Delta t) dt$$

Kreuzkorrelation

- Was gewinnt man dadurch?
Betrachtung der relativen Bewegung zweier Teilchensorten gegeneinander.
- Betrachtung chemischer Reaktionen,
die Bestimmung der
Geschwindigkeitskonstante chemischer
Reaktionen.

Nützlichkeit der Methode/Motivation

- Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) kann Molekülbewegungen und Konzentrationen bestimmen.
- Dual-Color FCCS ist viel besser bei der Beobachtung molekularer Wechsekwirkungen.
- 1997 (Paper): Methode wurde 1994 bereits vorgeschlagen, hier erste Realisierung!

Gliederung

- Einführung in die Technik
- **Experimentelle Methoden**
- Ergebnisse und Diskussion
- Fazit und Quellen

Farbstoffe

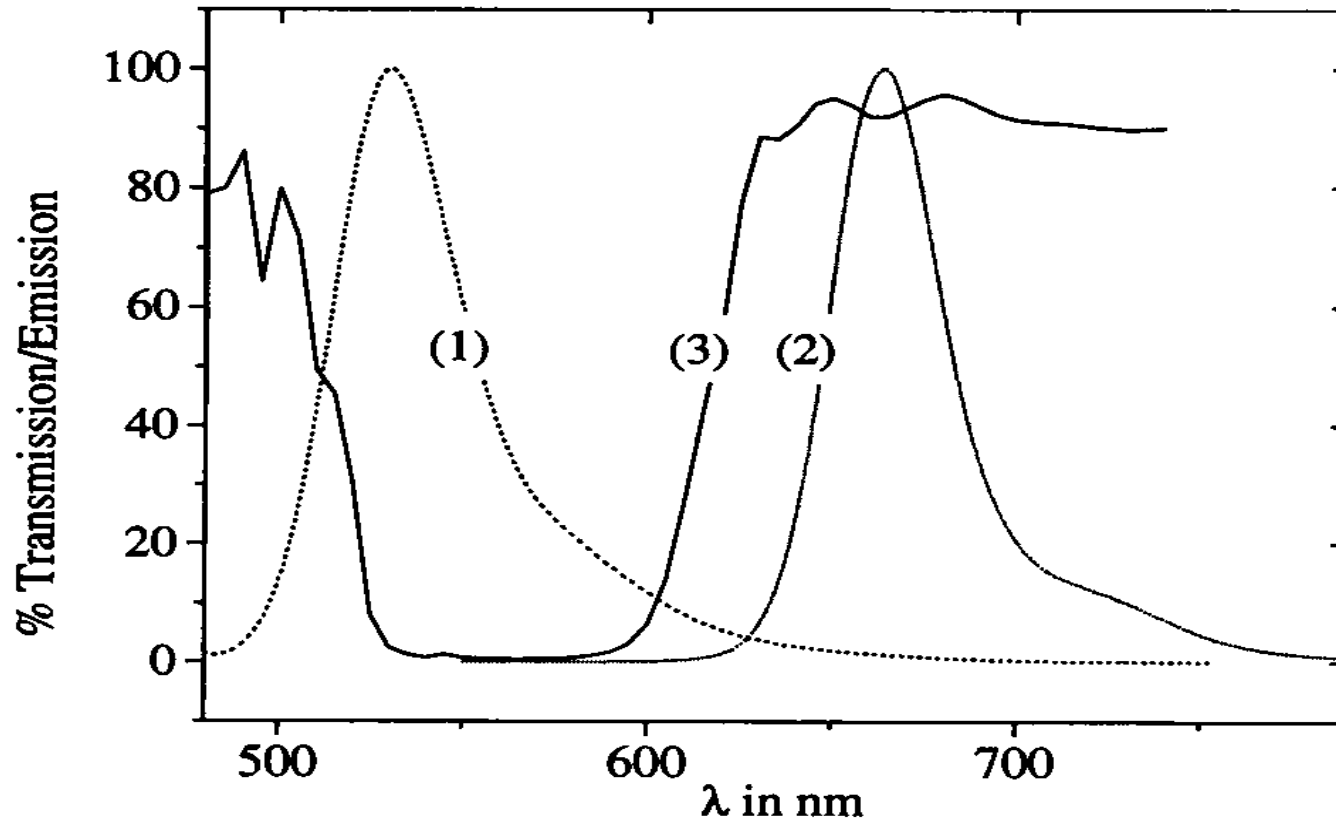


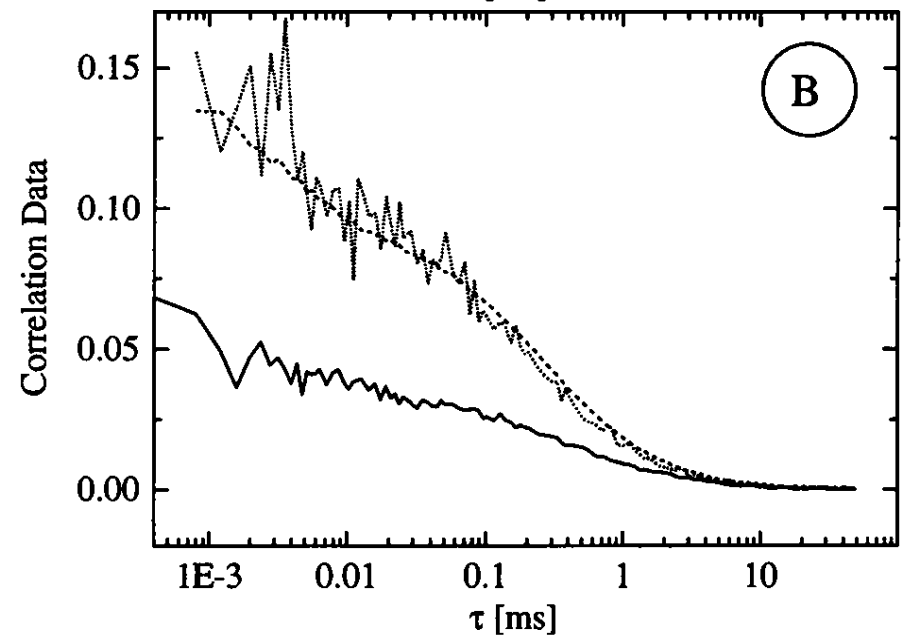
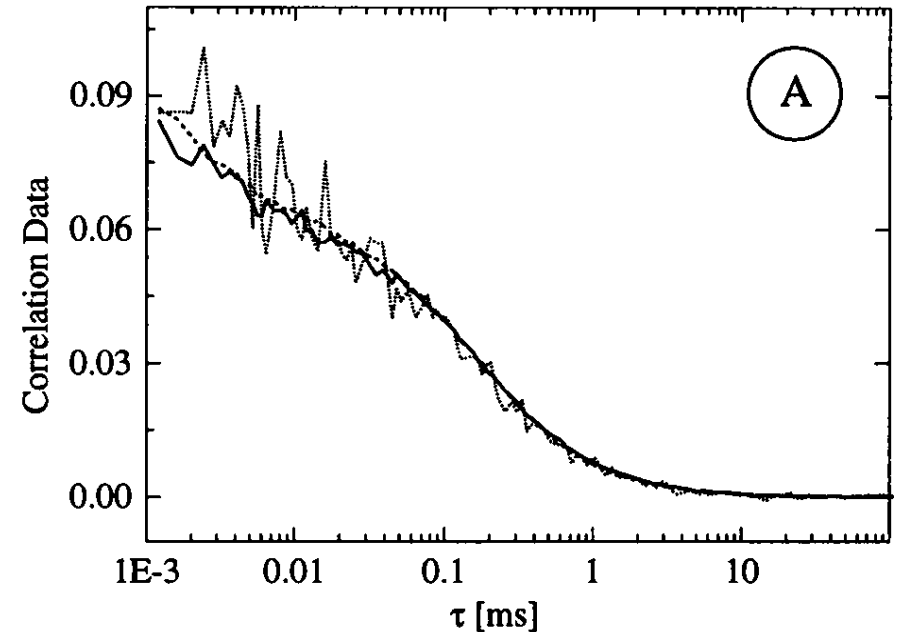
FIGURE 1 Emission spectra of rhodamin green (1) and Cy-5 (2), as well as transmission characteristics of second dichroic mirror (3).

Experimente Übersicht

1. Objektivtest: Wie wichtig ist das richtige Objektiv?
2. Emittieren die Farbstoffe trotz 2-Laser Anregung auch nur die richtige Farbe?
3. Wie gut funktioniert die Kreuzkorrelation?
4. DNA Renaturierungsexperiment
(Zwei Einzelstränge fügen sich zusammen)

1. Objektivtest

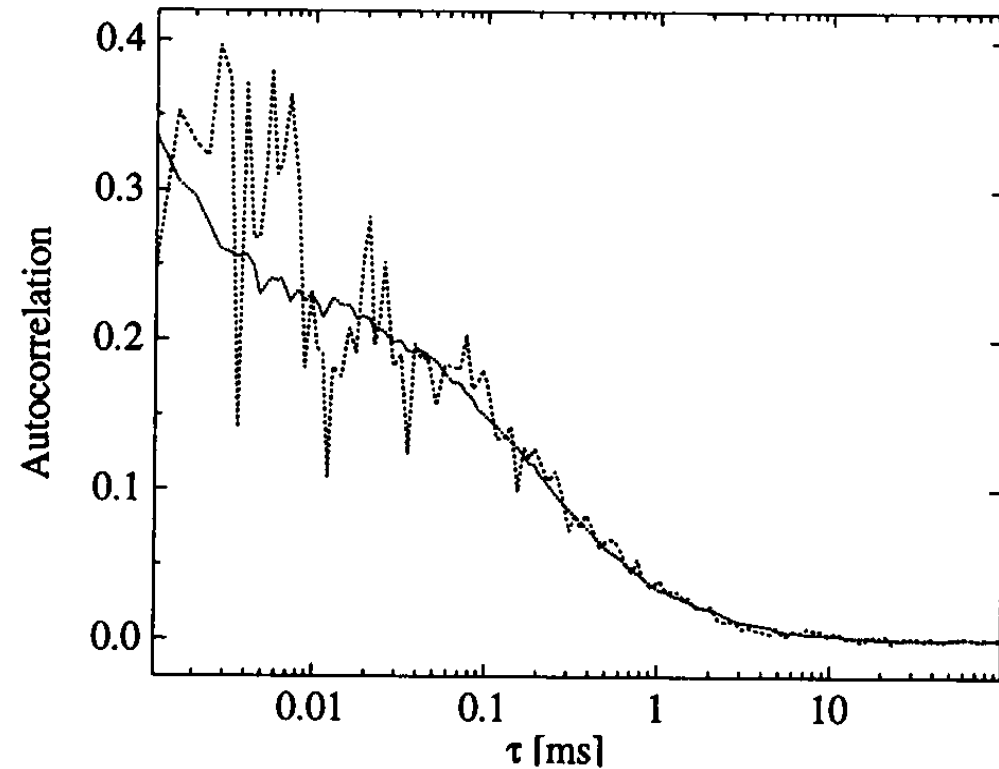
- A: Zeiss Plan Neofluar
40 X 0.9 objective
- B: Zeiss Plan 63 X 1.2
water immersion
Neofluar objective
(einige Moleküle nur
in einem Detektor
sichtbar)



2. Farbstofftest

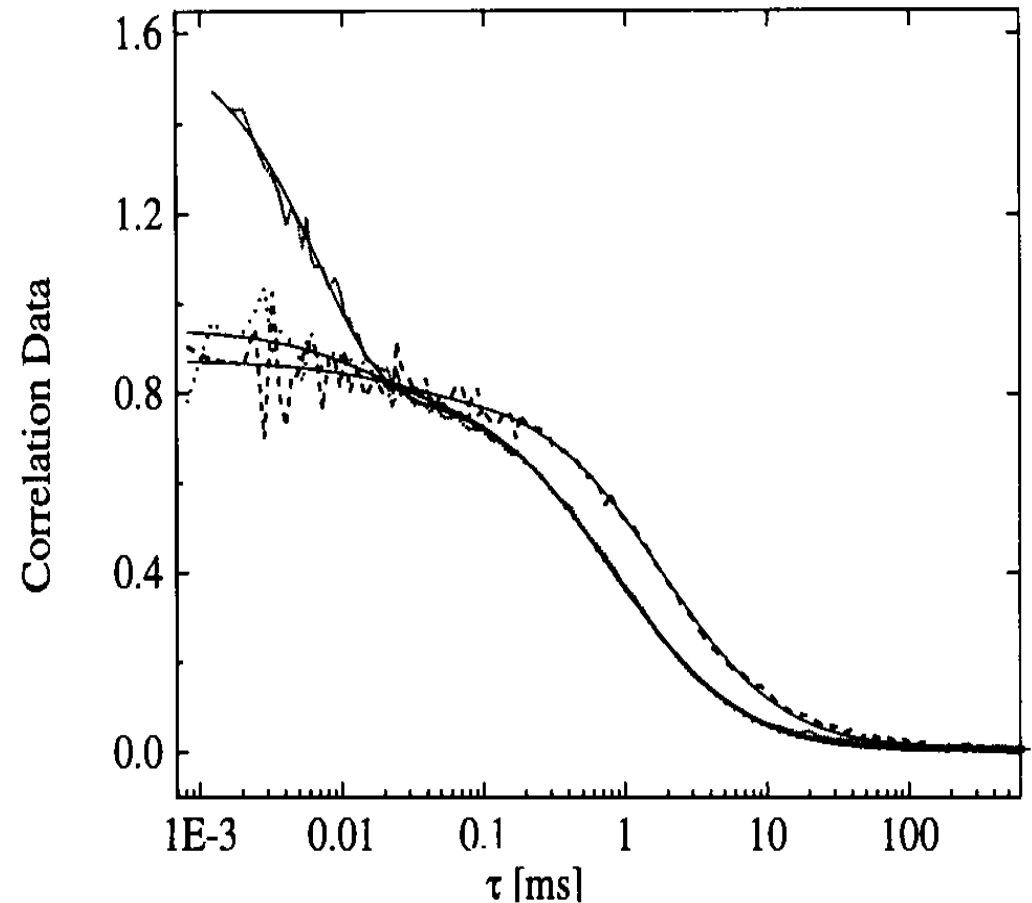
- Nur roter Farbstoff mit beiden Lasern angeregt
- Weit gepunktet: Grün
- Eng gepunktet: Rot

- Beleuchtete Volumenelemente genau gleich
- Aus den Intensitäten:
Anteil im roten Detektor durch grünen Farbstoff gering



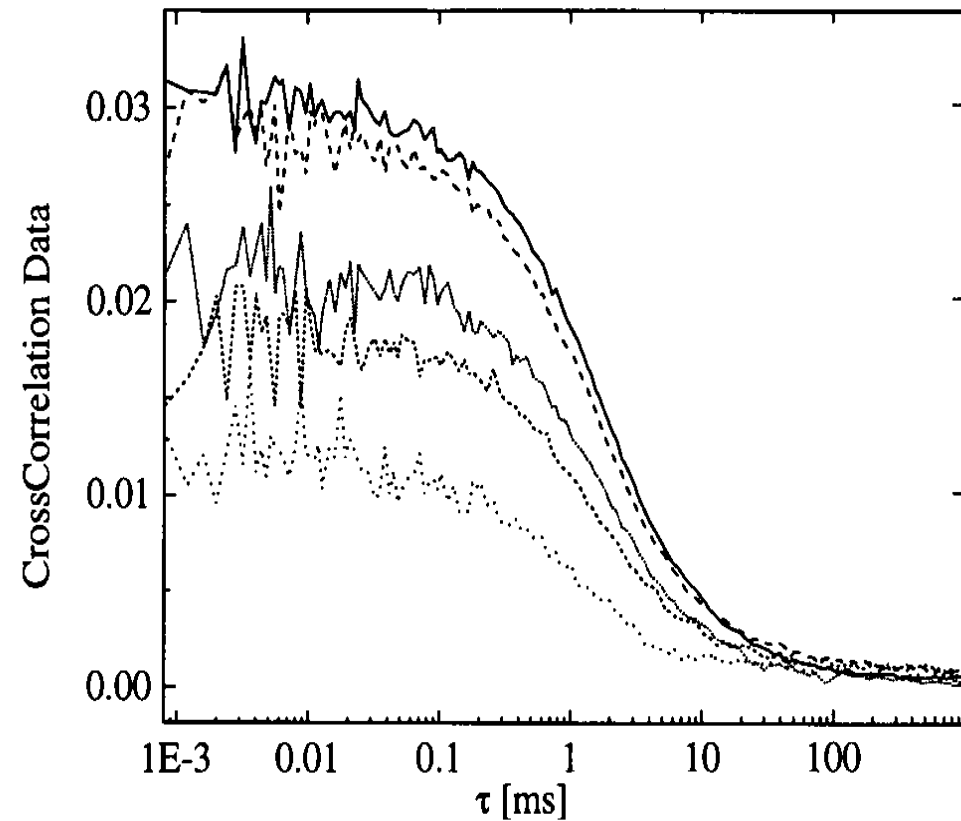
3. Kreuzkorrelationstest

- 2 DNA-Einzelstränge
jeweils einfarbig
- Ein doppelt so
großes zweifarbiges
DNA-Fragment



4. Renaturierungsexperiment

- Von unten nach oben:
Kreuzkorrelation
8, 15, 25, 60, 120
Minuten nach
Beginn der
Messung

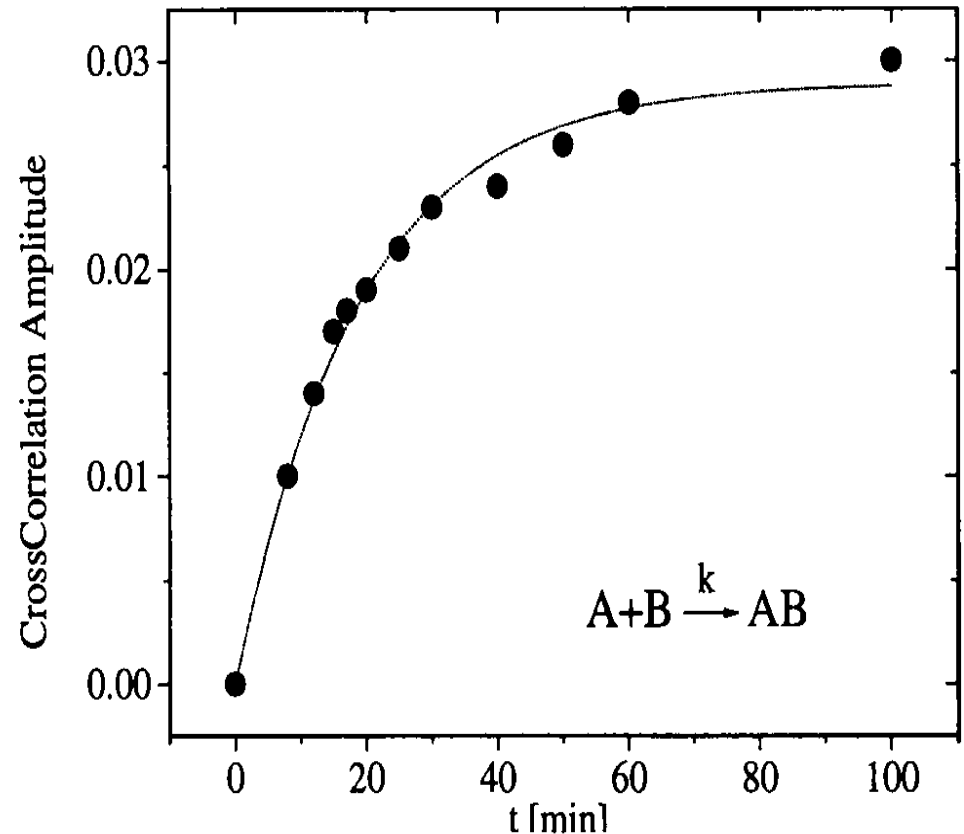


Gliederung

- Einführung in die Technik
- Experimentelle Methoden
- **Ergebnisse und Diskussion**
- Fazit und Quellen

Diskussion

- Amplitude der Kreuzkorrelation gefittet an eine Reaktion 2. Ordnung:
 $k=8 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$



Gliederung

- Einführung in die Technik
- Experimentelle Methoden
- Ergebnisse und Diskussion
- **Fazit und Quellen**

Fazit

- Die Methode ist erfolgreich bei der Unterscheidung von Edukten und Produkten.
- FCS-setup kann fast übernommen werden.

Zukunft:

- Messungen an Antikörpersystemen
- Weitere DNA/RNA-Untersuchungen
- Wurde bereits auch in Membranen und Zellen angewendet

Quellen

- Petra Schwille, Franz-Josef Meyer-Almes, and Rudolf Rigler. April 1997. *Biophys. J.* 72:1878-1886
- Kirsten Bacia & Petra Schwille. 2007. *Nature Protocols* 2, 2842 – 2856
- en.wikipedia.org
- Bacia, K., Kim, S.A. & Schwille, P. Fluorescence cross-correlation spectroscopy in living cells. *Nat. Methods* 3, 83–89 (2006).