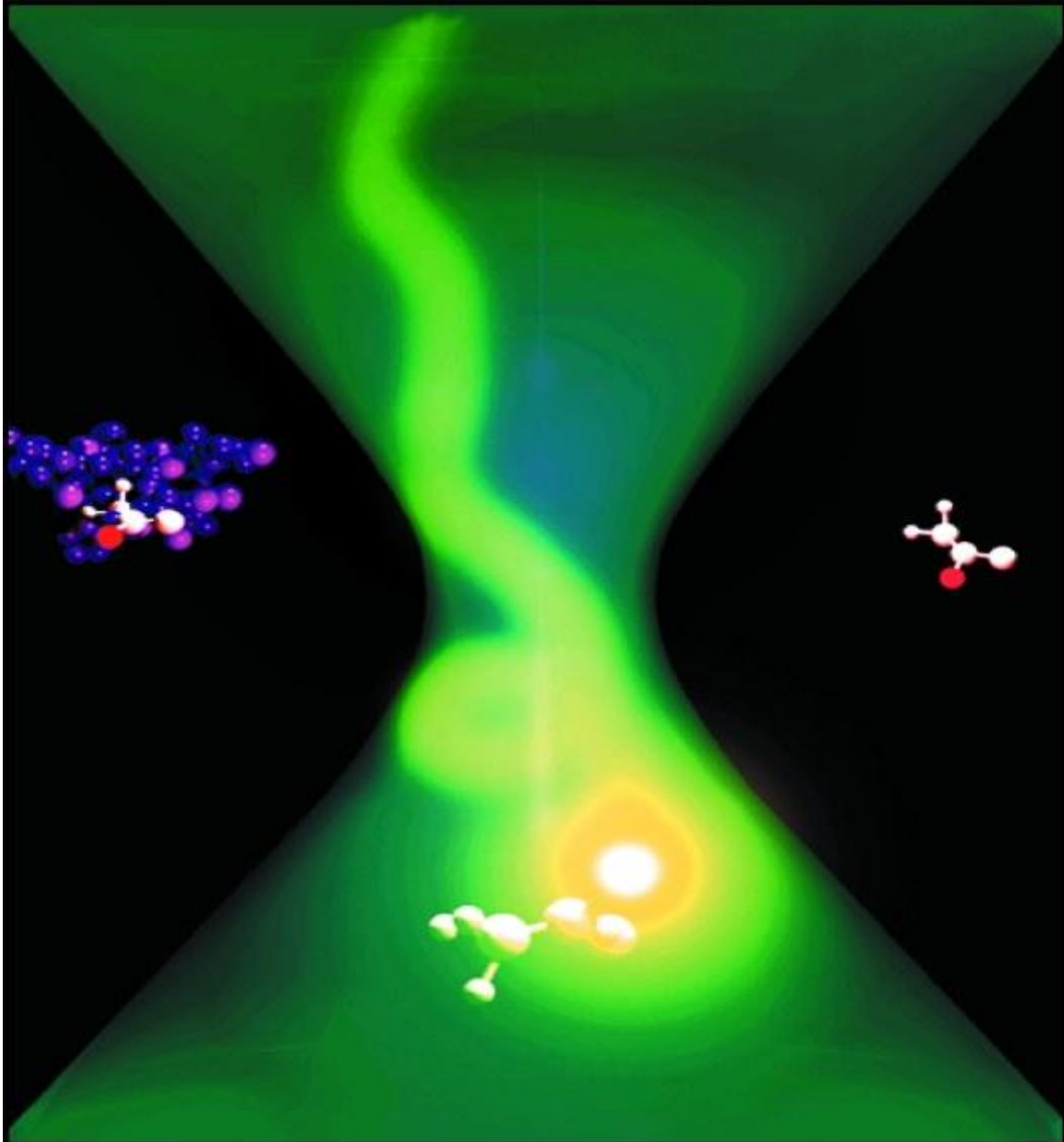


Praktikum zum „Biophysikalischen Modul“ für  
den Studiengang Integrated Life Science



**Fluoreszenz Korrelationspektroskopie  
(FCS)**

## 1.1 Vorbereitung

Für den Versuch Fluorescence Correlation Spectroscopy sind folgende Sachverhalte vorzubereiten:

- Machen Sie sich mit dem Prinzip der Fluoreszenz vertraut. Erläutern Sie auf quantenmechanischer Ebene, welche Vorgänge sich abspielen und welche Stoffe zur Fluoreszenz fähig sind.
- Was ist eine Autokorrelationsfunktion und was sagt sie aus? Erklären Sie welche Faktoren in der für den Versuch verwendeten Formel der Autokorrelationsfunktion für freie dreidimensionale Diffusion vorkommen.
- Erklären Sie die Funktionsweise einer Avalanche Photodiode.
- Erläutern sie die Funktionsweise eines konfokalen Mikroskops.
- Im Versuch werden Biomoleküle mit Farbstoffen versehen. Auf welche Weise geschieht das und welche Probleme könnten in Bezug auf die Wahl des Farbstoffes auftreten?
- Erklären Sie die Funktionsweise eines Lasers.
- Erklären Sie, Photobleaching und Quenching und erläutern Sie, welche Probleme diese auf die Anwendung der FCS haben könnten.

## 1.2 Theorie

Die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie wurde in den 1970er Jahren entwickelt [Madge et al, 1972] und ist heute noch sowohl in ihrer Urform, als auch in den zahlreichen Weiterentwicklungen [Wiseman et al, 2007; Hwang et al, 2007; Hauenstein et al, 2007] eine der wichtigsten und aussagekräftigsten Methoden der Biophysik. Mit ihrer Hilfe ist es möglich, innerhalb kurzer Messzeiten und mit einer geringen Probenkonzentration den Diffusionskoeffizienten einzelner Moleküle zu bestimmen. Die zu beobachtenden Moleküle oder Proteine werden vor einer Messung mit einem Fluoreszenzfarbstoff versehen und in eine Lösung gebracht. Anschließend wird die Schwankung eines Fluoreszenzsignals, welches aus einem kleinen Volumen dieser Lösung angeregt wird, mit Hilfe einer Avalanche Photodiode (APD) oder eines Photomultipliers (PMT) aufgezeichnet und in einer Autokorrelationsfunktion (AKF) verrechnet. Ihr zeitlicher Verlauf enthält dann Informationen über die charakteristischen Zeiten der beteiligten dynamischen Prozesse.

Durch die Entwicklung der konfokalen Technik lässt sich mittels eines stark fokussierten Lasers ein kleines Anregungsvolumen erzeugen, etwa in der Größenordnung von  $1 \mu\text{m}^3$ . Bei einer bestimmten, ausreichend niedrigen Konzentration der Lösung diffundieren jeweils nur ein oder wenige Moleküle bzw. Partikel mit angebundenem Farbstoff gleichzeitig durch dieses Fokussvolumen und werden zur Fluoreszenz gebracht. Die APD nimmt dann die Schwankung im Fluoreszenzsignal wahr, die durch die Diffusionsbewegung der Moleküle oder Partikel durch das Anregungsvolumen aufgrund Brown'scher Bewegung verursacht wird.

Ein Übergang der Moleküle in einen nichtfluoreszierenden Zustand, etwa durch die chemische Wechselwirkung des Fluoreszenzmarkers mit einem anderen Molekül, kann ebenfalls zu Schwankungen des Signals führen, allerdings wird in diesem Praktikums-

Versuch nur der Gleichgewichtszustand eines Moleküls ohne weitere Reaktionspartner betrachtet. Der Vollständigkeit halber sei aber erwähnt, dass eine Bindung mit einem anderen Molekül zur Änderung des Diffusionskoeffizienten führt, da sich die Größe des Molekül-Komplexes ändert, weshalb man FCS auch sehr gut als Nachweis für eine stattfindende Bindung verwenden kann. Dabei muss jedoch ausgeschlossen werden, dass es durch die Bindung der Moleküle zu fluoreszenzlöschenden Reaktionen kommt.

Ein zusätzlicher Vorteil der FCS ist außerdem, dass sie mit sehr kleinen Probenmengen auskommt und dabei, je nach Genauigkeit der Anlage, einzelne Moleküle detektieren kann. Des Weiteren dauert die gesamte Messung nur wenige Sekunden und ist schnell auszuwerten.

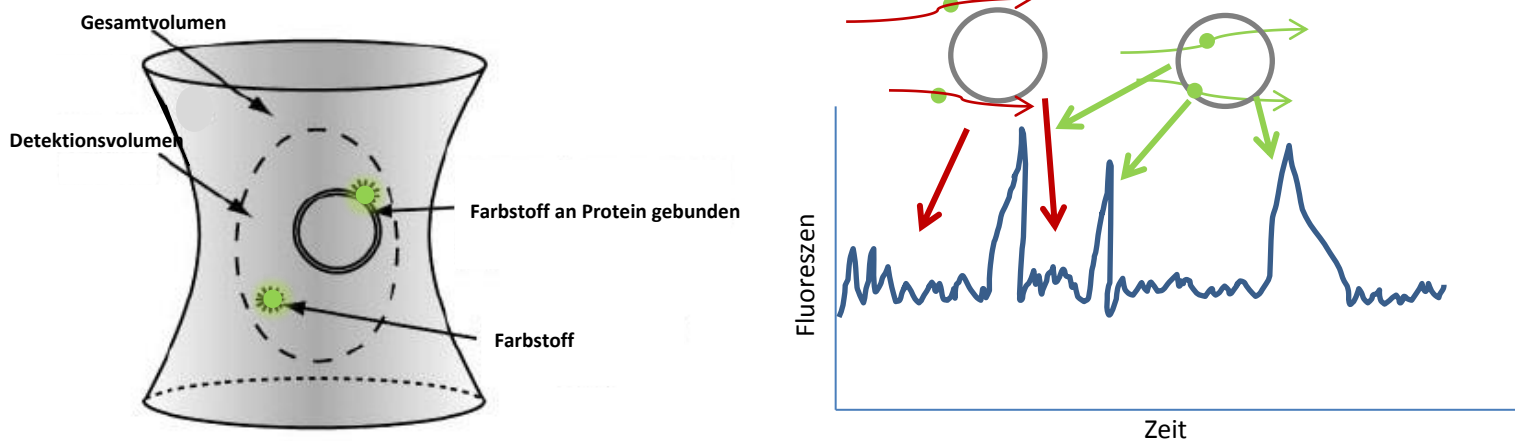


Abbildung 1: Funktionsweise der FCS: Im Detektionsvolumen (links) werden die Farbstoffmoleküle, die beispielsweise an ein Protein gebunden sind, zur Fluoreszenz angeregt. Dieses Signal (rechts) kann mit einem Fluoreszenzdetektor (z.B. einer APD) wahrgenommen werden. Passiert kein Teilchen das Fokusvolumen, wird kein Signal, bzw nur Rauschen wahrgenommen. [Zeichnung orientiert an Rusu et al, 2004]

## 1.2.1 Fluoreszenz

Atome sind in der Lage, Energie in Form von elektromagnetischen Wellen oder Photonen zu absorbieren. Bei der Absorption wird ein Elektron von einem niedrigen Energieniveau in ein höheres Energieniveau angehoben. Das Atom befindet sich in einem angeregten Zustand. Diese Zustände sind jedoch nicht sehr stabil, und die aufgenommene Energie wird durch verschiedene quantenmechanische Prozesse umgewandelt. Unter Fluoreszenz versteht man die spontane, kurzzeitige Emission von Licht einer bestimmten Wellenlänge als unmittelbare Folge einer Anregung eines Elektrons mit Licht [Pringsheim, 1928]. Das angeregte Elektron fällt dabei zurück in den Grundzustand und sendet Emissionslicht einer Wellenlänge aus, die im Allgemeinen nicht der Anregungswellenlänge entspricht.

Seit der Mitte des 20. Jahrhunderts wird die Fluoreszenz im Rahmen der Fluoreszenzspektroskopie genutzt, um Systeme zu untersuchen, die mit klassischen lichtmikroskopischen Methoden schwer zu untersuchen sind, so zum Beispiel

Proteindiffusionen in Zellen. Vor allem in den Bereichen der Biologie und Biophysik wird die Fluoreszenz und Fluoreszenzspektroskopie als eine der wichtigsten Messmethoden verwendet.

## 1.2.2 Autokorrelation-Funktion (AKF)

Die AKF ist eine Funktion, die die Selbstähnlichkeit eines gemessenen Signals nach einem bestimmten Zeitintervall beschreibt. In der FCS wird eine normierte Form der AKF dazu verwendet die Fluoreszenzschwankungen zu analysieren. Dabei werden die Fluktuationen eines Fluoreszenzsignales zum Zeitpunkt  $t$  mit den Fluktuationen des Signales zum Zeitpunkt  $t + \tau$ , miteinander multipliziert. Die Korrelationsfunktion  $G(\tau)$  des zeitlich veränderten Fluoreszenzsignales  $F(t)$  ist dabei definiert als:

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

wobei  $\delta F(t) = F(t) - \langle F(t) \rangle$  und  $\tau$  die sogenannte Lagtime, also die Verschiebung der zwei miteinander multiplizierten Fluktuationen, ist.

Da in diesem Versuch die Schwankung des Signals aufgrund von Diffusionsprozessen untersucht werden soll, wird nun kurz erläutert, welche rechnerischen Schritte nötig sind, um den Versuch auswerten zu können. Die Auseinandersetzung mit der detaillierten Herleitung der im Versuch verwendeten Formulierung soll Teil der Vorbereitung für den Praktikumsversuch sein.

Wie schon erwähnt ist die Ursache für die Schwankung des Fluoreszenzsignals Brown'sche Bewegung, aufgrund derer die Moleküle durch das Fokusvolumen diffundieren. Diese Schwankung des Fluoreszenzsignales geht einher mit einer Schwankung der Konzentration der fluoreszierenden Moleküle. Die Konzentrationsschwankung kann man mit  $\delta C(r, t)$  bezeichnen, welche sodann über das Beobachtungsvolumen integriert wird, denn es soll die Schwankung in eben diesem Volumen betrachtet werden. Zusätzlich muss die Konzentrationsschwankung noch mit der Wahrscheinlichkeit  $W(r)$  multipliziert werden, mit der man ein Photon in einem bestimmten Volumenelement überhaupt wahrnehmen kann. In  $W$  verbirgt sich damit auch die Größe des Detektionsvolumens, die man üblicherweise mit einer dreidimensionalen Gaußfunktion nähert. Man gelangt also zu:

$$\delta F(t) = W(r) \cdot \delta C(r, t) \, dr$$

Nach einigen Umstellungen, und unter Betrachtung von Diffusionsvorgängen, erhält man eine Form, die Autokorrelationsfunktion für freie dreidimensionale Diffusion:

$$G(\tau) = \frac{1}{V_{eff} \langle C \rangle} \cdot \frac{1}{(1 + \frac{\tau}{\tau_D})} \cdot \frac{1}{1 + (\frac{r_0}{z_0})^2 \cdot \frac{\tau}{\tau_D}}$$

wobei  $r_0$  die radiale Ausdehnung des Fokusvolumens,  $z_0$  die axiale Komponente des Fokusvolumens und  $V_{eff} = \pi^{3/2} \cdot r_0 z_0 = \langle N \rangle / \langle C \rangle$  ist.  $\langle N \rangle$  ist die mittlere Teilchenzahl im Fokusvolumen, und  $\langle C \rangle$  die mittlere Teilchenkonzentration. Je nachdem,

welche Größen bekannt sind bzw. durch vorherige Kalibration bestimmt wurden, kann eine oder mehrere dieser Werte durch den Fit gewonnen werden kann.

Die Größe  $1/\langle N \rangle = G(0)$  ist die Amplitude der Korrelationsfunktion. Diese Amplitude ist bei einer geringen Teilchenkonzentration am größten, allerdings muss bei einer zu geringen Konzentration die Messdauer verlängert werden. Außerdem können dann Nebeneffekte wie das Dunkelrauschen der APD störend in Erscheinung treten. Im Versuch soll deshalb die Probenlösung soweit verdünnt werden, bis eine optimale Konzentration erreicht ist.

Schließlich kann anhand der mittleren Aufenthaltsdauer im Fokusvolumen  $\tau_D$ , über die Beziehung  $\tau_D = \frac{r_0^2}{4D}$  der Diffusionskoeffizient ermittelt werden. Bei bekanntem Diffusionskoeffizienten kann im Umkehrschluss der Radius des konfokalen Volumens bestimmt werden. Eine solche Kalibrationsmessung ist Teil des Praktikumsversuches.

- Empfehlenswert zur Vorbereitung : Schwille, P. and E. Haustein – FCS An introduction to its concepts and applications, Biophysics Textbook online (2004), frei online zugänglich

### **1.3 Aufbau**

Ausgangspunkt des Aufbaus, der schematisch in Abb. 2 dargestellt ist, sind zwei cw-Laser, die bei einer Wellenlänge von 532 nm beziehungsweise 473 nm emittieren. Die Laser geben eine Leistung von 3mW beziehungsweise 20mW ab und sind daher zu stark für die Versuche, weshalb sie einen Neutraldichtefilter (NDF) abgeschwächt werden müssen.

Da der Strahldurchmesser der Laser zu gering ist, um eine optimale Ausfüllung des Mikroskopobjektivs zu erreichen, muss ihr Strahl durch ein Linsensystem, bestehend aus einer 30 mm und einer 100 mm Linse, aufgeweitet werden. Um das Strahlprofil, das oft nicht optimal geformt ist, zusätzlich zu korrigieren, steht im gemeinsamen Brennpunkt des Linsensystems eine Lochblende (Pinhole) mit einem Durchmesser von 50  $\mu\text{m}$ .

Nach der Aufweitung wird der Strahl durch einen Filterwürfel und auf einen Spiegel gelenkt. Der Filterwürfel soll dazu dienen, nur Licht der Anregungswellenlänge in das Objektiv und nur Licht der Emissionswellenlänge zu den Detektoren zu lassen. Zu diesem Zweck befindet sich ein Farbfilter und ein dichroitischer Spiegel in seinem Inneren.

Durch den 45° Spiegel hinter dem Filterwürfel wird der Strahl senkrecht nach oben in das 100x Mikroskopobjektiv reflektiert. Mit Hilfe der hohen numerischen Apertur von 1,25 und dem Einsatz des Pinholes erreicht man ein sehr kleines Fokusvolumen von idealerweise etwa  $1\mu\text{m}^3$ .

Das Fluoreszenzlicht aus dem Fokusvolumen nimmt den gleichen Lichtweg zurück wie das Anregungslicht; es wird jedoch im Filterwürfel nicht zurück in den Anregungsstrahlengang geleitet, sondern passiert den dichroitischen Spiegel im Inneren des Filterwürfels in Richtung der Detektionsgeräte. Um sicherzustellen, dass nur Fluoreszenzlicht in den Detektionsstrahlengang gerät, befindet sich ein Farbfilter im Inneren des Filterwürfels direkt hinter dem dichroitischen Spiegel.

Nach dem Filterwürfel wird das Fluoreszenzlicht durch einige Linsen auf die Messgeräte fokussiert. Als Messgerät dient im Falle der FCS die APD. Eine CCD Kamera dient hier lediglich als Hilfe zur Justierung der Anlage. Die Linsen sind so positioniert, dass sie auf

beide Geräte (APD und CCD-Kamera) fokussieren. Zwischen den beiden Geräten kann durch einfaches Umlegen eines Klappspiegels hin- und hergeschaltet werden.

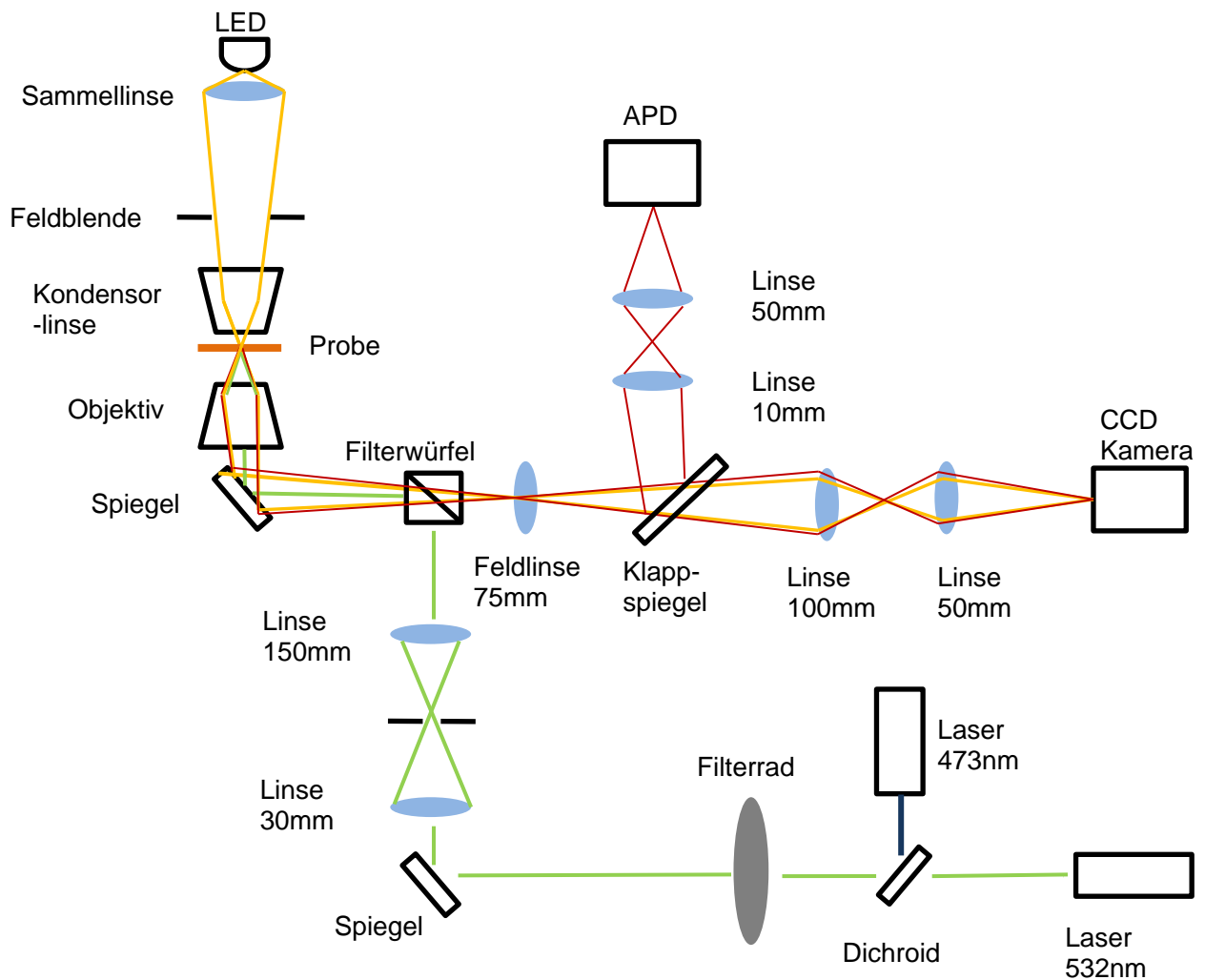


Abbildung 2: Strahlengang für FCS: Kompletter Strahlengang für FCS mit Anregungs- und Detektionsstrahlengang.

### 1.3.1 Zubehör

- Laser der Wellenlänge 532nm (emittiert grün, 3mW Leistung)
- Laser der Wellenlänge 473nm (emittiert blau, 20mW Leistung)
- 1 dichroitischer Spiegel
- 2 Filtercubes für grünes oder blaues Licht
- 8 Linsen
- 2 Irisblenden (als Justierungshilfe)
- 45° feststehender Spiegel
- umklappbarer Spiegel
- Objektiv 100x, 1.25 NA
- Filterrad
- Pinhole (50  $\mu\text{m}$ )
- CCD-Kamera
- Avalanche-Photodiode

- Beleuchtung mit Gehäuse, optische Laufsschiene, Mikrometerlineal, Einstellhilfe, Infratopplättchen
- Messprogramme APD live und APD write, sowie das Auswerteprogramm FCS\_Auswertung\_ILS

## **1.4 Aufgaben**

- Folgen Sie der beiliegenden Justageanleitung und justieren Sie den Aufbau ein. Achten Sie dabei vor allem darauf, dass das Fokusvolumen auf der Kamera als annähernder Kreis abgebildet wird. Des Weiteren soll der Fokus möglichst genau auf die APD abgebildet werden, also legen Sie Wert auf die Feinjustage der APD.
- Testen Sie, wie viele Ereignisse auf der APD gezählt werden, wenn Sie verschiedene Konzentrationen einer Rhodaminlösung als Probe einsetzen. Diese Messung ist wichtig, um abschätzen zu können, wann das Messgerät nur noch Rauschen wahrnimmt und wann es übersteuert. Verwenden Sie dazu auch das APD live Programm und notieren Sie sich jeweils einige Werte für die jeweilige Konzentration.
- Variieren Sie anschließend die in der Probe ankommende Leistung, indem Sie die ND Filter im Filterrad dementsprechend einstellen. Tragen Sie diese Werte in entsprechende Diagramme ein. Welchen Verlauf würden sie für diese Kurve erwarten, und bestätigt ihre Messung diese Erwartung? Wenn nein, warum nicht?
- Bestimmen Sie die tatsächliche Größe ihres Fokusvolumens durch eine Messreihe mit Polystyrolbeads bekannter Größe. Verwenden Sie dazu das APD write Programm und führen Sie 20 Messungen durch. Notieren Sie sich die jeweiligen Ausgabewerte und berechnen Sie
  - a) den Diffusionskoeffizienten der Beads
  - b) den Radius des Fokusvolumens durch die Beziehung des Diffusionskoeffizienten mit der Verweildauer im Fokusvolumen.
- Bestimmen Sie schließlich den Diffusionskoeffizienten von Rhodamin durch eine Messreihe mit Hilfe des APD write Programmes. Notieren Sie dazu auch wiederum 20 Messwerte und berechnen Sie den Diffusionskoeffizienten mit der Formel aus dem Skript.

## **1.5. Justageanleitung**

Sehr wichtig bei der FCS ist die korrekte und genaue Justierung der Anlage, da schon geringe Abweichungen zu großen Fehlern in der Messung führen und diese vollständig unbrauchbar machen. Dazu sollte man der folgenden Justageanleitung Schritt für Schritt folgen. Dabei muss nicht immer der gesamte Versuch neu aufgebaut oder justiert werden, jedoch sollte vor jeder Messreihe die optimale Passage durch das Pinhole (siehe Schritt 3) überprüft werden, sowie der optische Weg durch das Objektiv und den Detektionsstrahlengang (siehe Schritte 8-10).

### 1. Schritt: grüner Laser(532nm)

Die Höhe des Lasers ist so einzustellen, dass er den 45° Spiegel mittig trifft. Dazu kann man die beiden Irisblenden zu Hilfe nehmen bzw die beiliegende Einstellhilfe (ein Metallteil mit einem Fadenkreuz auf der richtigen Höhe), indem man sie auf die Höhe des Laserstrahls bringt und durch schrittweise Erhöhung der Entfernung einer Blende die Parallelität zur Tischoberfläche und zur Längsachse der Versuchsanordnung kontrolliert. Ist dies nicht der Fall, muss der Laser solange nachjustiert werden, bis die optimale Position gefunden ist.

### 2. Schritt: Linsen

Als nächstes werden die beiden Linsen zur Strahlaufweitung eingebracht. Hierbei ist darauf zu achten, dass der Laserstrahl zentral durch die Linsen tritt. Man kann dazu ein Infrarotplättchen mit Target (liegt dem Versuchsaufbau bei) zu Hilfe nehmen. Danach wird wieder mittels der beiden Irisblenden die horizontale und vertikale Abweichung sowie der parallele Strahlengang kontrolliert.

### 3. Schritt: Pinhole

Das 50 µm Pinhole wird in den Fokus zwischen den beiden Linsen gebracht. (In der Fokusebene erhält man die maximale Intensität hinter dem Pinhole!)

### 4. Schritt: Filtercube

Der Filtercube ist so anzubringen, dass der Laserstrahl den Filterwürfel mittig trifft und mittig auf den 45° Spiegel reflektiert wird.

### 5. Schritt: 45° Spiegel

Hier ist darauf zu achten, dass der Strahl den Spiegel mittig trifft. Außerdem muss der Strahl exakt vertikal und zentral durch die Objektivhalterung verlaufen. (Achtung, im aktuellen Aufbau ist der 45° Spiegel bereits optimal eingestellt und sollte nur auf ausdrückliche Anweisung der Betreuer verstellt werden)

### 6. Schritt: Objektiv

Die Halterung des Mikroskopobjektives wird mit der Wasserwaage ausgelotet. Danach wird das Objektiv vorsichtig eingesetzt. Zur Kontrolle, ob der Strahl überall parallel zum Tisch verläuft, kann man einen losen Spiegel zur Hilfe nehmen. Diesen legt man vor dem Einsetzen des Objektivs auf dessen Halterung. Die entstehende Reflexion muss genau auf dem Anregungsstrahl liegen.

### 7. Schritt: Beleuchtung

Das Gehäuse mit der Beleuchtung wird über dem Objektiv angebracht. Danach wird die zweite 30mm Linse so eingestellt, dass das Licht der Lampe in das Mikroobjektiv fokussiert wird.

### 8. Schritt: Linsen im Detektionsstrahlengang

Um ein optimales Bild sowohl auf der Kamera als auch auf der APD zu erhalten, werden in den Detektionsstrahlengang mehrere Linsen eingebracht. Direkt hinter dem Filterwürfel steht die Feldlinse (75mm), im weiteren Verlauf vor der CCD Kamera stehen dann noch eine 100mm und eine 50mm Linse. Diese drei Linsen müssen so justiert werden, dass die Abbildung auf der CCD Kamera gut fokussiert ist. Achten Sie dabei auf die Lage der Brennpunkte der jeweiligen Linsen (auf die Kamera muss fokussiert werden und der APD-Chip muss vollständig und gleichmäßig ausgeleuchtet sein) und verwenden Sie zur Einstellung der Abbildung das beiliegende Mikrometerlineal.



### 9. Schritt: Klappspiegel und APD

Nach der Feldlinse wird der Klappspiegel so angebracht, dass er den Strahl in Richtung der APD ablenkt. Vor der APD befinden sich zwei weitere Linsen, eine 10mm und eine 50mm Linse. Diese werden auch wieder dazu benutzt, den Strahl auf die APD zu fokussieren und müssen richtig eingestellt werden. Nun wird die APD so positioniert, dass der Fokus des Strahls möglichst genau die aktive Fläche trifft. Mit Hilfe des APD-Live Programmes kann der Spiegel über die Justageschrauben genau eingestellt werden. Außerdem kann die Position der APD über deren Stellschraube in y-Richtung eingestellt werden.

### 10. Schritt: Filtrerrad

Das Filtrerrad wird vor der 30mm Linse eingebracht. Der Strahl muss die Filter nicht mittig passieren, aber es ist darauf zu achten, dass er an keiner Stelle abgeschnitten wird.

### 11. Schritt (Optional): Blauen Laser einkoppeln

Zuerst muss sichergestellt werden, dass blauer und grüner Laser sich auf einer Strahlhöhe befinden. Außerdem muss auch der blaue Laserstrahl parallel zum Tisch verlaufen. Hier kann man die Wasserwaage zur Hilfe nehmen. Um den blauen Laserstrahl in den restlichen Strahlengang einzukoppeln, verwendet man den dafür vorgesehenen Spiegel. Dieser wird vor dem grünen Laser eingebaut, so dass er den grünen Strahl passieren lässt und den blauen in den Strahlengang hineinreflektiert. Grüner und blauer Strahl sollten deckungsgleich sein.

## A) Literaturverzeichnis

- Hauenstein, E. and P.Schwille, Fluorescence Correlation Spectroscopy: Novel Variations of an Established Technique. *Annu.Rev.Biophys.Biomol.Struct.*2007. 36:151-69
- Hwang, L.C.and T.Wohland. Recent Advances in Fluorescent Cross-correlationSpectroscopy. *Cell. Biochem. Biophys.* (2007). 49:1-13
- Madge,D., W.W.Webb, and E.Elson. Thermodynamic fluctuations in a reacting system – measurement by fluorescence correlation spectroscopy. *Phys.Rev. Lett.* (1972) 29, 705-708.
- Schwille, P. and E. Haustein – FCS An introduction to its concepts and applications, *Biophysics Textbook online* (2004).
- Rusu,L., A.Gambhir, S.McLaughlin and J. Rädler. Fluorescence Correlation Spectroscopy Studies of Peptide and Protein Binding to Phospholipid Vesicles. *Biophysical Journal*. Volume 87. August 2004. 1044 – 1053.
- Pringsheim, P., *Fluoreszenz und Phosphoreszenz im Lichte der neueren Atomtheorie*. Springer. Berlin 1921, 2. Auflage 1923, 3. Auflage 1928
- Wiseman, P. W., J.A. Squier, M.H.Ellisman, and K.R. Wilson. 2000. Two – photon video rate image correlation spectroscopy (ICS) and image cross-correlation (ICCS). *J. Microsc.*200:14-25.