

Biophysik-Praktikum R1b

Charakterisierung von Produkten der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mittels Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS)

Anita Reiser, anita.reiser@physik.lmu.de, 089-2180-2704
Ricarda Berger, ricarda.berger@physik.lmu.de, 089-2180-2430

Sommersemester 2017

In diesem Versuch sollen mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) verschiedene, unterschiedlich lange Fragmente aus einem Plasmid amplifiziert werden. Hierzu werden fluoreszenzmarkierte Primer verwendet. Der Erfolg der PCR wird mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Die so gewonnenen Genfragmente werden anschließend im FCS untersucht.

Die Methode der Polymerase-Kettenreaktion (Saiki et al. 1988) wurde 1987 von Kary B. Mullis entwickelt. Dieses Verfahren hat die Gentechnik revolutioniert. Es ermöglicht enzymatisch von bestimmten Nukleotidsequenzen *in vitro* millionenfach Kopien herzustellen. Dieser als Amplifikation bezeichnete Vorgang macht auch sehr geringe Mengen von DNA einer Analyse schnell zugänglich.

1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

1.1 Anwendungsgebiete

Die PCR wird meist verwendet um ein beliebiges Genfragment zu vervielfältigen, oder ein bekanntes Fragment zu sequenzieren. Mit Hilfe der PCR kann aber auch nachgewiesen werden, ob ein bestimmtes Gen in einem Organismus enthalten ist. Von großer Bedeutung ist die PCR auch bei der Herstellung von Hybridisierungssonden, z. B. für die DNA-Microarray-Technologie. Das Hauptanwendungsgebiet der PCR stellt aber sicherlich die medizinische Diagnostik dar. Beispiele sind der Nachweis und die Quantifizierung viraler und anderer mikrobieller Gensequenzen oder die Unterscheidung von Punktmutationen in sonst identischen PCR-Fragmenten mittels denaturierender Gradienten-Gelelektrophorese. Als weitere Anwendungsmöglichkeiten für die PCR in der Medizin seien hier nur die Chromosomenanalyse zum Nachweis chromosomaler Veränderungen und die rechtsmedizinische Spurenanalytik genannt. Häufig wird an Tatorten nur eine

geringe Menge an DNA gefunden, z. B. Blutflecken oder einzelne Haare, die dann mittels PCR vervielfältigt und eingehender analysiert werden kann.

1.2 Grundprinzip

Die Vorgänge bei der Vervielfältigung einer Nukleinsäuresequenz mittels PCR ähneln dem Reaktionsablauf der natürlichen Replikation (Abbildung 1). Dabei synthetisiert eine DNA-Polymerase, ausgehend von Startermolekülen, einen neuen DNA-Strang an einer einzelsträngigen Nukleinsäure-Matrize, der Template-DNA. Bei der PCR werden als Startermoleküle synthetische DNA-Oligonukleotide (sogenannte Primer) verwendet, die an die Template-DNA hybridisieren. Von deren 3'-Ende aus synthetisiert eine hitzestabile DNA-Polymerase den neuen DNA-Doppelstrang. Durch die Wahl eines gegenläufig orientierten Oligonukleotid-Primerpaares kann gezielt die DNA-Sequenz zwischen den beiden Primern vervielfältigt werden (siehe Abbildung 1). Das entscheidende Prinzip der PCR ist die zyklische Wiederholung der einzelnen Reaktionsschritte, wodurch die Matrize exponentiell amplifiziert wird (Anzahl der Kopien = $(2^n - 2n) \cdot x$, n = Anzahl der Zyklen, $2n$ = Produkte des 1. und 2. Zyklus, x = Anzahl der Kopien der ursprünglichen DNA).

Ein PCR-Zyklus beginnt mit der thermischen Denaturierung des zu amplifizierenden DNA-Doppelstranges, indem bei etwa 95 °C die zu amplifizierende DNA aufgeschmolzen wird. Es entstehen einzelsträngige DNA-Templatemoleküle. Danach erfolgt die Primerhybridisierung an die einzelsträngige DNA, wobei die synthetischen Oligonukleotide bei Temperaturen von 37 °C bis 65 °C an die komplementären Sequenzen der Template-DNA binden. Auf diesem Weg wird die Amplifikation des dazwischen gelegenen Sequenzabschnittes eingeleitet, die normalerweise bei 72 °C erfolgt. Dieser Schritt wird von den sog. Polymerasen durchgeführt. Es gibt verschiedene Polymerasen wie z. B. die hitzestabile Polymerase aus *Thermus aquaticus* (Taq), die keine Korrekturlesefunktion besitzt und daher mehr Fehler produziert als z. B. die Pfu-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* die eine Korrekturlesefunktion besitzt. Durchgeführt werden die PCR-Experimente in Thermocyclern. Diese bestehen aus einem temperierbaren Reaktionsraum, in den die PCR-Probengefäße gestellt werden. Eine automatische Steuerung regelt das zyklische Temperaturprogramm, wobei die jeweilige Temperatur und Zeit pro Reaktionsschritt sowie die Zyklenzahl individuell programmierbar sind.

Polymerasekettenreaktion - PCR

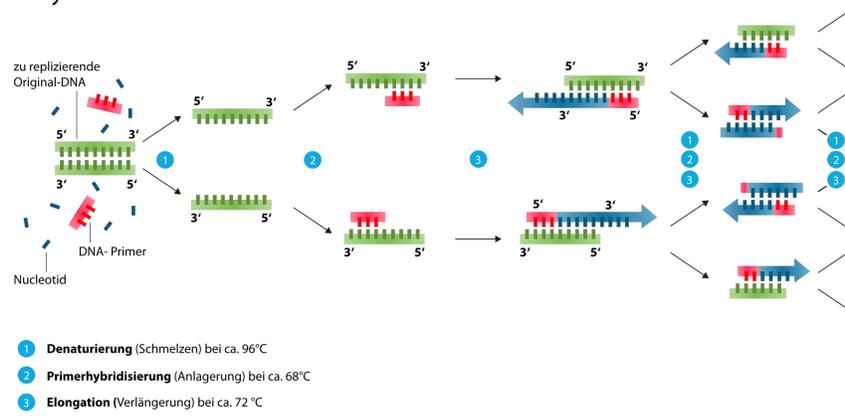


Abbildung 1: Veranschaulichung der Polymerase-Kettenreaktion, Quelle: Wikipedia

Neben der richtigen Polymerase und dem DNA-Template ist vor allem die Auswahl der richtigen Primer für das Gelingen der PCR wichtig.

Wichtig hierbei sind:

1. Länge des Primers: 20-30 Nukleotide
2. GC-Gehalt: 40-60 %
 Annealingtemperatur: $5^\circ\text{C} < T_m$
 T_m ist die Schmelztemperatur, bei der die betrachteten DNA-Moleküle zu 50 % denaturiert sind, d.h. einzelsträngig vorliegen.
 Schmelztemperatur der Primer (Näherung):

$$T_m = (A + T) \times 2^\circ\text{C} + (G + C) \times 4^\circ\text{C}$$
3. keine sich wiederholenden Motive
4. keine ausgeprägte Sekundärstruktur
5. Primer dürfen am 3'-Ende weder inter- noch intramolekular komplementär sein, sonst Dimer-Bildung der Primer
6. Sequenz am 3'-Ende: sollte GC und nicht AT enthalten
 keine Wiederholungen von 3 oder mehr G oder Cs am Ende

Näherungsweise kann man die Konzentrationen der gewünschten DNA-Fragmente leicht berechnen. Bezeichnen $p_1^i, p_2^i, h_1^i, h_2^i$ die Konzentrationen der gewünschten Produkte sowie der halbseitig ausgedehnten Polymerisationsprodukte (diese entstehen bei jedem Zyklus an den Originalsträngen) nach i PCR-Zyklen und o_1, o_2

die Konzentrationen der originalen Stränge, so kann man folgende Rekursionsrelationen aufstellen:

$$\begin{aligned} h_1^i &= h_1^{i-1} + o_2 \\ h_2^i &= h_2^{i-1} + o_1 \\ p_1^i &= p_1^{i-1} + p_2^{i-1} + h_2^{i-1} \\ p_2^i &= p_1^{i-1} + p_2^{i-1} + h_1^{i-1} \end{aligned}$$

Hier nimmt man natürlich an, dass alle Reaktionen – Hybridisierung, Polymerisation – ideal verlaufen, und dass Primer in starker Überzahl vorhanden sind. Ist, $o_1 = o_2 =: N_0$, so überzeugt man sich leicht, dass die Zahl der Produktstränge nach n Runden gleich

$$p_{1,2}^n = (2^{n-1} - 1) \cdot N_0 \quad (1)$$

ist, die Zahl der halbseitig ausgedehnten Produkte hingegen nur

$$h_{1,2}^n = n \cdot N_0 \quad (2)$$

Diese Ergebnisse können stark modifiziert sein, wenn nicht stöchiometrisch gearbeitet wird und wenn nicht berücksichtigt wird, dass die Zahl der Primer im Verlaufe der Reaktion immer geringer wird. Im Allgemeinen sieht man jedoch, dass die Zahl der gewünschten kurzen Reaktionsprodukte, die von den Primersequenzen flankiert werden, exponentiell ansteigt und diese somit nach wenigen Runden die dominante Spezies in der Reaktionslösung darstellen.

1.3 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren werden in der Regel über Agarosegele aufgetrennt. Die Auftrennung erfolgt dabei im elektrischen Feld der Größe nach. Für große DNA-Fragmente verwendet man geringprozentige Agarosegele mit einer Agarosekonzentration von 0,3-1,0 %. Kleine DNA-Fragmente trennt man in höher konzentrierten Agarosegelen auf, mit einer Agarosekonzentration von 1,0-2,0 %. Eine kleine Menge der PCR-Proben (5 – 10 μ l) werden zusammen mit Gelauftragspuffer in die Geltaschen gefüllt. Dieser Gelauftragspuffer enthält Glycin um das Befüllen der Taschen zu erleichtern, sowie einen Farbstoff, der eine Visualisierung des Gellaufes ermöglicht. Zur Kontrolle und zur Größenbestimmung des Amplikons wird ein Standard mit definierten Größen aufgetragen. Um die DNA-Banden im Gel sichtbar zu machen wird das Gel anschließend mit SYBR Safe DNA Gel Stain, einem interkalierenden Farbstoff, gefärbt. Die Banden werden dann unter UV-Bestrahlung sichtbar.

1.4 Primer für die Detektion von EGFP im pEGFP-N1-Vektor (CLONTECH)

```

1   tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata tggagttccg
61  cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc cccgccatt
121 gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca
181 atgggtggag tattttacggt aaactgccca cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc
241 aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gctggcatt atgccagta
301 catgacctta tgggactttc ctacttgga gtacatctac gtattagtca tcgctattac
361 catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggttg actcacggg
421 atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagttg ttttggcacc aaaatcaacg
481 ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc cccattgacg caaatgggcg gtaggcggtg
541 acggtgggag gtctatataa gcagagctgg tttagtgaac cgtcagatcc gctagcgcta
601 ccggactcag atctcgagct caagcttoga attctgcagt cgacggatcc gcgggcccgg
661 gatccaccgg tggccaccat ggtgagcaag ggcgaggagc tgttcaccgg ggtggtgcc
P1f 721 atcctggtcg agctggacgg cgacgtaaac ggcacaaagt tcagcgtgtc cggcgagggc
P5r 781 gaggggcgtg ccacctacgg caagctgacc ctgaagttca tctgcaccac cggcaagctg
841 cccgtgccct ggcccaccct cgtgaccacc ctgacctacg gcgtgcagtg cttcagccgc
901 taccocgacc acatgaagca gcacgacttc ttcaagtccg ccatgccoga aggctacgtc
P9r 961 caggagcgca ccattcttct caaggacgac ggcaactaca agaccgcgc cgaggtgaag
1021 ttcgagggcg acaccctggt gaaccgcatc gagctgaagg gcatcgactt caaggaggac
1081 ggcaacatcc tggggcacia gctggagtac aactacaaca gccacaacgt ctatatcatg
1141 gccgacaagc agaagaacgg catcaaggtg aactcaaga tccgccacia catcagggac
1201 ggcagcgtgc agctcgccga ccactaccag cagaacaccc ccatcgcgga cggcccctg
1261 ctgctgcccg acaaccacta cctgagcacc cagtccgccc tgagcaaaaga cccaacgag
1321 aagcgcgatc acatggtcct gctggagttc gtgaccgccc cgggatcac tctcggcatg
P13r 1381 gacgagctgt acaagtaaag cggccgcgac tctagatcat aatcagccat accacatttg
1441 tagaggtttt acttgcttta aaaaacctcc cacacctccc cctgaacctg aaacataaaa
1501 tgaatgcaat tgttgttgtt aacttgttta ttgcagctta taatggttac aaataaagca
1561 atagcatcac aaatttcaca aataaagcat ttttttact gcattctagt tgtggtttgt

```

Sequence information:

P1 EGFP (672-691f): 5' CGC CAC CAT GGT GAG CAA GG 3' Tm=(66°C) / 63.4°C

P5 EGFP (772-753r): 5' GGA CAC GCT GAA CTT GTG GC 3' Tm= (64°C) / 61.4°C

P9 EGFP (971-952r): 5' GTG CGC TCC TGG ACG TAG CC 3' Tm= (68°C) / 65.5°C

P13 EGFP (1364-1383r): 5' GTC CAT GCC GAG AGT GAT CC 3' Tm= (64°C) / 61.4°C

All primers are labeled with the fluorophore Cy5 at the 5'-end.

Abbildung 2: Gezeigt ist ein Ausschnitt aus der Nukleotidsequenz des Vektors mit Markierung des forward-Primers (grün), den drei reverse-Primern (gelb) und zugehöriger Information zu den jeweiligen Primern.

1.5 Durchführung

Zur Überprüfung der Längen werden folgende drei PCR-Ansätze angesetzt:

Primer Forward	F Primer Reverse	Fragment (bp)	T_m ($^{\circ}\text{C}$)
P1 (672-691f)	P5 (772-753r)	101	63.4 / 61.4
P1 (672-691f)	P9 (971-952r)	300	63.4 / 65.5
P1 (672-691f)	P13 (1364-1383r)	712	63.4 / 61.4

Dazu werden die benötigten Komponenten auf Eis aufgetaut und der Ansatz nach folgendem Schema zusammengemischt. Alle Schritte finden auf Eis statt.

Komponente	Endkonzentration	μl für 50 μl -Ansatz
10 \times Puffer	1 \times	5
2mM dNTP-Mix	10 nmol	5
Primer F (10 pmol/ μl)	50 pmol	5
Primer R (10 pmol/ μl)	50 pmol	5
Template (pEGFP-N1-plasmid)	10 ng	1
Taq (5.000U/ml)	5 U	1
Wasser		ergänzen zu 50,0

Die Ansätze werden in den programmierbaren Thermoblock (PCR-Maschine) gestellt und folgendes Programm eingestellt und gestartet.

1. Schritt	Denaturierung	95 $^{\circ}\text{C}$	5 min
Zyklen (30)	Denaturierung	95 $^{\circ}\text{C}$	30 s
	Annealing	65 $^{\circ}\text{C}$	30 s
	Elongation	68 $^{\circ}\text{C}$	60 s
Letzter Schritt	Finale Elongation	68 $^{\circ}\text{C}$	5 min

Jeweils 5 μl der PCR-Ansätze werden mit 1 μl 6 \times Auftragepuffer versetzt und danach auf ein 1%-iges Agarosegel aufgetragen. Auf jeweils eine weitere Spur werden 6 μl eines Marker (1 kb Leiter und 100 bp Leiter von NEB) aufgetragen. Das Gel wird für ca. 1 Stunde an ein Netzgerät bei ca. 80 V angeschlossen. Anschließend wird das Gel 30 Minuten mit SYBR Safe DNA Gel Stain gefärbt und unter UV-Licht fotografiert.

Die restlichen 45 μl PCR-Ansatz jeder Probe werden mittels des PCR purification kit von QIA-quick gereinigt und deren DNA-Konzentration mit dem NanoDrop gegen den verwendeten Puffer spektroskopisch gemessen.

1.6 Auswertung PCR

Beschriften Sie das Gelfoto mit den PCR-Fragmenten (Beladung der Spuren, Fragmentgrößen des DNA -Standards). Erstellen Sie mit Hilfe der Standard-DNA eine Eichkurve (Abbildung 3). Tragen Sie auf halblogarithmischem Papier

die Wanderstrecke gegen den Logarithmus der DNA-Länge der jeweiligen Fragmente (in bp) auf. Ermitteln Sie die Größe der erhaltenen Fragmente anhand der von Ihnen erstellten Eichkurve und erklären Sie, warum diese nicht exakt der angegebenen Länge entsprechen.

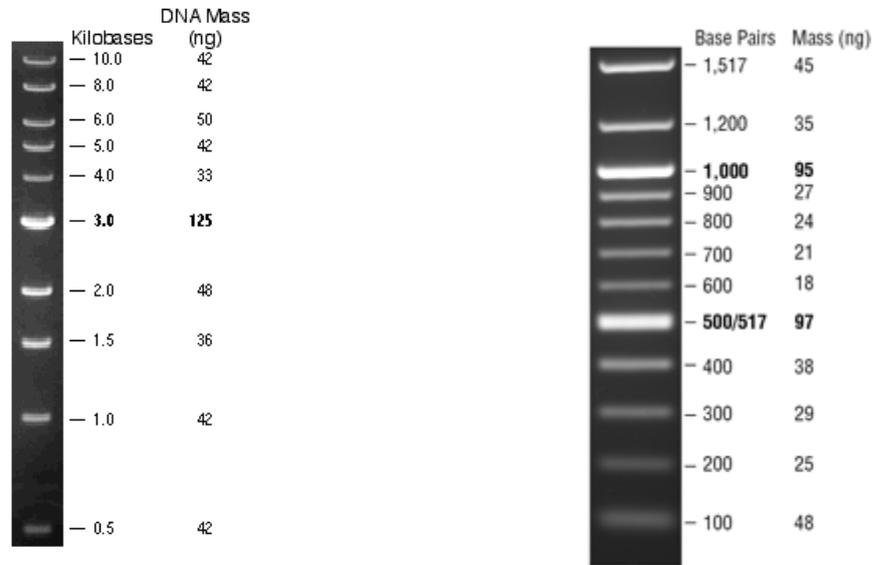


Abbildung 3:

links: 1 kb DNA Leiter, Quelle: www.neb.com/products/n3232-1-kb-dna-ladder,
rechts: 100 bp DNA Leiter, Quelle: www.neb.com/products/n3231-100-bp-dna-ladder

2 Diffusion von DNA

Im Weiteren wird diskutiert, wie mit Hilfe der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie die Diffusionskonstante eines fluoreszenzmarkierten Objektes bestimmt werden kann. Dies soll in diesem Versuch anhand von PCR-Produkten unterschiedlicher Länge überprüft werden. Was erwartet man für Diffusionsverhalten bei diesen DNA-Molekülen?

Für kugelförmige Objekte mit Radius r gilt die bekannte Stokes-Einstein-Relation

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta(T)r}, \quad (3)$$

worin $k_B T$ die thermische Energie und $\eta(T)$ die Viskosität des umgebenden Mediums bei Temperatur T ist.

Die DNA-Stücke in diesem Versuch mit Längen von 100, 300 und 700 Basenpaaren sind jedoch keineswegs kugelförmig. Der Abstand zwischen zwei Basenpaaren in DNA in der B-Form ist 0.34 nm, die DNA-Fragmente haben also eine Konturlänge von etwa 35 nm, 100 nm und 240 nm. Eine Vielzahl biophysikalischer Untersuchungen haben ergeben, dass DNA sich mechanisch wie ein „semiflexibles Polymer“ mit einer sogenannten Persistenzlänge von etwa 50 nm verhält. Auf dieser Längenskala kann man DNA als steifen Zylinder auffassen. In diesem Versuch werden wir daher die experimentell bestimmten Diffusionskonstanten mit denen für einen Zylinder mit Durchmesser $d = 2$ nm und Länge $L = 35$ nm, 100 nm und 240 nm vergleichen. Für einen Zylinder gibt es keine geschlossene Darstellung für die Diffusionskonstante, es gilt aber näherungsweise:

$$D = \frac{k_B T}{3\pi\eta L} \times \{ \ln L/d + 0.312 + 0.565d/L - 0.100(d/L)^2 \} \quad (4)$$

Für $L \gg d$ ist der erste Term in der Klammer entscheidend und man kann auch

$$D = \frac{k_B T}{3\pi\eta L} \times \ln L/d \quad (5)$$

verwenden (siehe Abbildung 4).

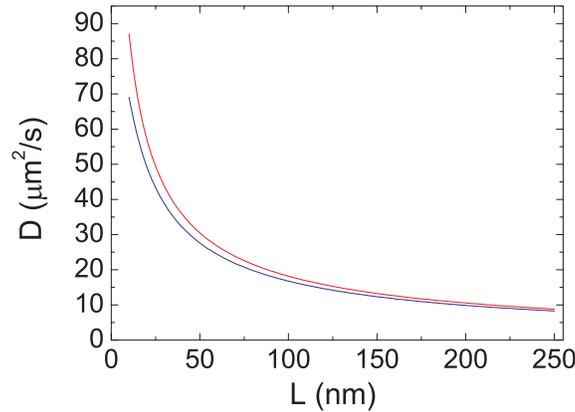


Abbildung 4: Vergleich der beiden Näherungen für die Diffusionskonstante eines Zylinders der Länge L mit Durchmesser $d = 2$ nm. Die obere Kurve stammt von dem genaueren Ausdruck Gleichung 4.

3 Fluoreszenz

Lumineszenz ist Lichtemission, die von den angeregten Elektronen einer Substanz herrührt. Im Spezialfall der Fluoreszenz sind diese angeregten Elektronen in Singulett-Zuständen (der Gesamtspin ist Null). Eine übliche Darstellung

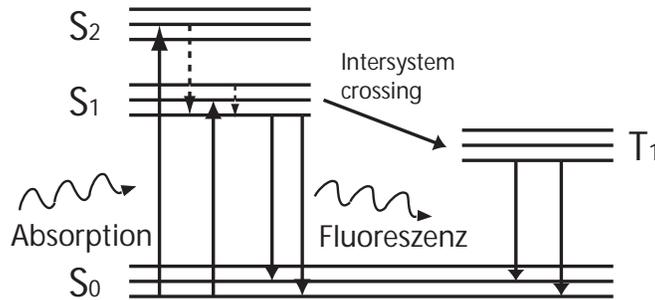


Abbildung 5: Einfaches Jablonski-Diagramm: Ausgehend von einem Singulett-Grundzustand (S_0) werden Elektronen auf höhere Orbitale (S_1, S_2) angeregt, diese sind energetisch noch in Vibrations- und Rotationsmoden aufgespalten.

der beteiligten Elektronenübergänge ist das sogenannte Jablonski-Diagramm (Abbildung 5). Die wichtigsten Vorgänge sind in dem Diagramm angedeutet. Normale Fluoreszenz tritt auf, wenn ein Elektron durch Lichtabsorption vom Grundzustand in einen angeregten Zustand gehoben wird. Von dort relaxiert es zunächst zur energetisch niedrigsten Vibrationsmode und fällt unter Aussendung eines rotverschobenen Photons von dort wieder in eine Grundzustandsmode. Alternativ kann es aber auch zu einem Übergang zum Triplettzustand T_1 kommen. Aus diesem Zustand ist eine Rückkehr in den Singulett-Grundzustand verboten, weswegen seine Lebensdauer wesentlich größer ist, als die eines angeregten Singulett-Zustandes. Typische Fluoreszenzlebensdauern sind im ns-Bereich, Triplettlebensdauern sind im ms bis s-Bereich. Bei einem Farbstoff konkurrieren natürlich mehrere Kanäle, über die er aus dem angeregten Zustand in den Grundzustand zurückkehren kann. So tritt zu einem gewissen Prozentsatz immer ein Übergang in den Triplettzustand ein, auch andere nichtstrahlende Prozesse sind möglich. Auch die Umgebung (Abregung durch Kollisionen mit Lösungsmittelmolekülen) spielt eine Rolle bei der Fluoreszenz. Eine wichtige Kenngröße zur Charakterisierung von Farbstoffen ist daher die sogenannte "Quantenausbeute" Q . Bezeichnet man die Übergangsrate für nichtstrahlende Prozesse mit k_{nr} und die Rate, mit der Photonen abgestrahlt werden mit Γ , so gilt

$$Q = \frac{\Gamma}{\Gamma + k_{nr}}. \quad (6)$$

Das ist der Prozentsatz an Anregungen, die erfolgreich zu einem Fluoreszenzergebnis führen.

In unserem Versuch labeln wir die DNA mit dem Farbstoff „Cy5“ (Cyanine 5) (Abbildung 6). Er hat sein Absorptionsmaximum bei 649 nm und sein Emissionsmaximum bei 670 nm (mit leichten Variationen, je nach Lösungsmittel). Seine Quantenausbeute ist größer als 0.28 (Angabe von Amersham Biosciences), der molare Extinktionskoeffizient ist $\epsilon = 250'000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Der Farbstoff allei-

ne hat ein Molekulargewicht von etwa 470 *Dalton* und eine Diffusionskonstante von etwa $250 \mu\text{m}^2/\text{s}$.

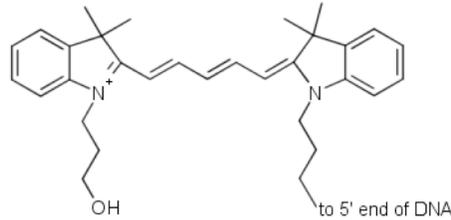


Abbildung 6: *Wie die meisten Fluoreszenzfarbstoffe hat auch Cy5 ein ausgedehntes π -Elektronensystem: Die aromatischen Ringe an den Seiten verbunden durch die π -konjugierte Brücke. Die OH-Gruppe an der Alkankette links unten macht das Molekül etwas wasserlöslicher, über den Linker rechts ist der Farbstoff an die 5'-OH-Gruppe der DNA gebunden.*

4 Fluoreszenzkorrelationspektroskopie

Die Fluoreszenzkorrelationspektroskopie (FCS) ist eine elegante Messmethode, mit deren Hilfe aus den Fluktuationen eines Fluoreszenzsignals Aussagen über wichtige physikalische Kenngrößen biomolekularer Systeme gemacht werden können, insbesondere den Diffusionskonstanten. Zentrale Messgröße bei der FCS ist die zeitliche Autokorrelationsfunktion $\tilde{G}(\tau)$ des Fluoreszenzsignals $F(t)$ einer fluoreszierenden Probe. $G(\tau)$ ist definiert zu:

$$\tilde{G}(\tau) := \frac{\langle F(t+\tau)F(t) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \quad (7)$$

Mit

$$F(t) = \langle F \rangle + \delta F(t)$$

wird daraus

$$\tilde{G}(\tau) = 1 + \frac{\langle \delta F(t+\tau)\delta F(t) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} =: 1 + G(\tau) \quad (8)$$

Bei $\tau = 0$ ist also

$$G(\tau = 0) = \frac{\text{var}F}{\langle F \rangle^2} \quad (9)$$

Das Fluoreszenzsignal wird dabei von einer stark verdünnten Probe in einem konfokalen Mikroskopaufbau aufgenommen. Es werden dabei immer nur Fluoreszenzmoleküle angeregt, die sich gerade im Fokalvolumen ($V \approx 1\mu\text{m}^3$) befinden. Bei Konzentrationen von etwa $c = 10 \text{ nM} = 10 \text{ nmol/l}$ tragen im Durchschnitt also nur

$$N = c \cdot V = 10 \times 10^{-9} \times N_A \times 10^3 \text{m}^{-3} \times 10^{-18} \text{m}^3 \approx 6$$

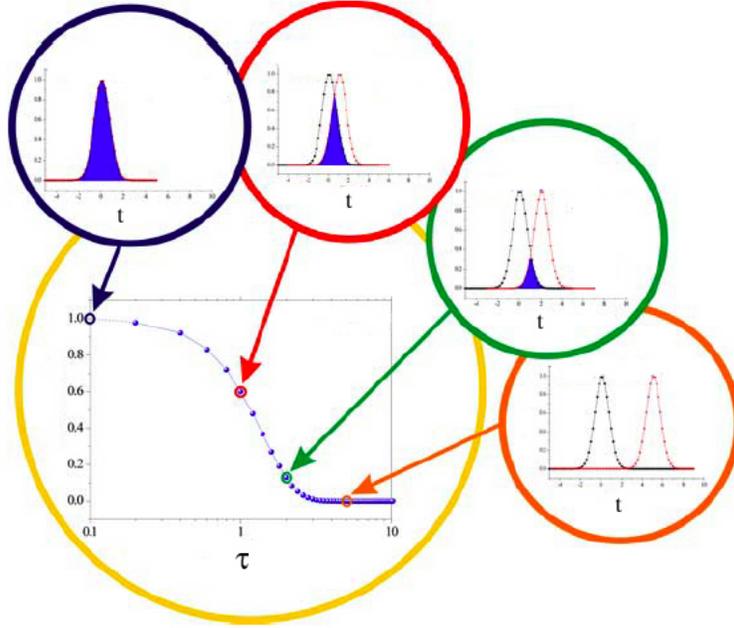


Abbildung 7: Veranschaulichung der Autokorrelationsfunktion, Quelle: P. Schwille und E. Haustein

Fluoreszenzmoleküle zum Signal bei (hier ist N_A die Avogadrozahl). In diesem Regime sind die Fluktuationen des Signals deutlich – und tragen auch physikalische Information. Für unseren Versuch ist die Betrachtung der Autokorrelationsfunktion eines einfachen, diffundierenden, fluoreszierenden Objekts ausreichend. Komplexere Situationen sind beispielsweise mehrere unterschiedliche fluoreszierende Spezies, das Vorhandensein einer „internen“ Fluktuation der Fluoreszenz oder Assoziations- Dissoziationsreaktionen.

Zur mathematischen Behandlung der experimentellen Situation wird das Anregungsvolumen – der Laserfokus – durch eine Gaußsche Intensitätsverteilung angenähert:

$$I(x, y, z) = I_0 \exp\left(-\frac{2(x^2 + y^2)}{w_{xy}^2} - \frac{2z^2}{w_z^2}\right). \quad (10)$$

Hier ist z als Strahlrichtung des Lasers gewählt. w_{xy} ist der Radius des Intensitätsprofils im Fokus, w_z die Ausdehnung in Strahlrichtung. Die Diffusionsgleichung

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

gilt auch für die Konzentrationsfluktuationen $\delta c(\mathbf{r}, t) = c(\mathbf{r}, t) - \bar{c}$, also

$$\frac{\partial}{\partial t} \delta c(\mathbf{r}, t) = D \nabla^2 \delta c(\mathbf{r}, t) \quad (11)$$

Eine wichtige Annahme, die man über die Fluktuationen $\delta c(\mathbf{r}, t)$ in verdünnten Proben an dieser Stelle macht, ist

$$\langle \delta c(\mathbf{r}, t) \delta c(\mathbf{r}', t) \rangle = \bar{c} \delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}'), \quad (12)$$

d. h. Konzentrationsfluktuationen zur gleichen Zeit, jedoch an unterschiedlichen Orten sind statistisch unabhängig voneinander. Der Vorfaktor ist im Falle einer Poissonstatistik gleich der mittleren Konzentration. Eine Fouriertransformation der Fluktuationen liefert:

$$\tilde{c}(\mathbf{q}, t) = \int d^3 \mathbf{r} e^{i\mathbf{q} \cdot \mathbf{r}} \delta c(\mathbf{r}, t), \quad (13)$$

mit der Rücktransformation

$$\delta c(\mathbf{r}, t) = \frac{1}{(2\pi)^3} \int d^3 \mathbf{q} e^{-i\mathbf{q} \cdot \mathbf{r}} \tilde{c}(\mathbf{q}, t) \quad (14)$$

Im Fourierraum wird die Diffusionsgleichung zu

$$\frac{\partial}{\partial t} \tilde{c}(\mathbf{q}, t) = -q^2 D \tilde{c}(\mathbf{q}, t), \quad (15)$$

eine Lösung ist also

$$\tilde{c}(\mathbf{q}, t) = \tilde{c}(\mathbf{q}, 0) e^{-q^2 D t}, \quad (16)$$

Die Konzentrationsschwankungen der fluoreszierenden Spezies δc führen zu Fluoreszenzfluktuationen δF , wobei:

$$\delta F(t) = \gamma \epsilon Q \int d^3 \mathbf{r} I(\mathbf{r}) \delta c(\mathbf{r}, t) \quad (17)$$

Hier ist ϵ die Extinktion der Probe, Q die Quanteneffizienz des Farbstoffs und γ berücksichtigt die Effizienz der Detektion durch den apparativen Aufbau. Gemeinsam beschreiben diese Faktoren, wieviele Photonen man effektiv aus dem Anregungsvolumen einsammelt. In den Ausdruck für die Korrelationsfunktion eingesetzt ergibt das:

$$G_{diff}(\tau) = \frac{\gamma^2 \epsilon^2 Q^2}{\langle F \rangle^2} \int \int d^3 \mathbf{r} d^3 \mathbf{r}' I(\mathbf{r}) I(\mathbf{r}') \langle \delta c(\mathbf{r}, t + \tau) \delta c(\mathbf{r}', t) \rangle \quad (18)$$

Betrachten wir zunächst die Korrelationsfunktion der Konzentrationsschwankungen:

$$\langle \delta c(\mathbf{r}, t + \tau) \delta c(\mathbf{r}', t) \rangle \quad (19)$$

$$= \frac{1}{(2\pi)^3} \int d^3 \mathbf{q} e^{-i\mathbf{q} \cdot \mathbf{r}} \langle c(\mathbf{q}, t + \tau) \delta c(\mathbf{r}', t) \rangle \quad (20)$$

$$= \frac{1}{(2\pi)^3} \int d^3 \mathbf{q} e^{-i\mathbf{q} \cdot \mathbf{r}} e^{-q^2 D \tau} \langle c(\mathbf{q}, t) \delta c(\mathbf{r}', t) \rangle \quad (21)$$

$$= \frac{1}{(2\pi)^3} \int d^3 \mathbf{q} \int d^3 \mathbf{r}'' e^{i\mathbf{q} \cdot (\mathbf{r}'' - \mathbf{r})} e^{-q^2 D \tau} \langle \delta c(\mathbf{r}'', t) \delta c(\mathbf{r}', t) \rangle \quad (22)$$

$$= \frac{\bar{c}}{(2\pi)^3} \int d^3 \mathbf{q} e^{i\mathbf{q} \cdot (\mathbf{r}' - \mathbf{r})} e^{-q^2 D \tau} \quad (23)$$

Setzt man dieses Ergebnis in Gl. 18 ein, so erhält man

$$G_{diff}(\tau) = \frac{\bar{c}\gamma^2\epsilon^2Q^2}{(2\pi)^3\langle F \rangle^2} \int d^3\mathbf{r} \int d^3\mathbf{r}' \int d^3\mathbf{q} e^{i\mathbf{q}\cdot(\mathbf{r}'-\mathbf{r})} e^{-q^2D\tau} I(\mathbf{r})I(\mathbf{r}'). \quad (24)$$

Die Integrale über \mathbf{r} und \mathbf{r}' sind jeweils Fouriertransformationen des Intensitätsprofils. Für das Gaußsche Profil ist das einfach:

$$I_0 \int d^3\mathbf{r} e^{i\mathbf{q}\cdot\mathbf{r}} \exp\left(-\frac{2(x^2+y^2)}{w_{xy}^2} - \frac{2z^2}{w_z^2}\right) \quad (25)$$

$$= I_0 \left(\frac{\pi}{2}\right)^{3/2} w_{xy}^2 w_z \exp\left(-\frac{w_{xy}^2(q_x^2+q_y^2)}{8} - \frac{w_z^2 q_z^2}{8}\right) \quad (26)$$

Oben eingesetzt erhält man:

$$G_{diff}(\tau) = \frac{\bar{c}\gamma^2\epsilon^2Q^2I_0^2w_{xy}^4w_z^2}{64\langle F \rangle^2} \quad (27)$$

$$\times \int d^3\mathbf{q} \exp\left(-\frac{(w_{xy}^2+4D\tau)(q_x^2+q_y^2)}{4} - \frac{(w_z^2+4D\tau)q_z^2}{4}\right) \quad (28)$$

Um diesen Ausdruck etwas zu vereinfachen, bestimmen wir zunächst das mittlere Fluoreszenzsignal:

$$\langle F \rangle = \gamma\epsilon Q\bar{c} \int d^3\mathbf{r} I(\mathbf{r}) = \gamma\epsilon Q\bar{c}I_0 \frac{\pi w_{xy}^2}{2} \sqrt{\frac{\pi w_z^2}{2}}, \quad (29)$$

wobei wir wieder die Gaußsche Form des Intensitätsprofils ausgenutzt haben. Damit wird aus Gl.28, nach Auswertung des Integrals

$$G_{diff}(\tau) = \frac{1}{(2\pi)^3\bar{c}} \frac{4\pi}{w_{xy}^2+4D\tau} \sqrt{\frac{4\pi}{w_z^2+4D\tau}} \quad (30)$$

$$= \frac{1}{\pi^{3/2}w_{xy}^2w_z\bar{c}} \frac{1}{1+4D\tau/w_{xy}^2} \sqrt{\frac{1}{1+4D\tau/w_z^2}} \quad (31)$$

Nun führen wir noch ein paar wichtige Abkürzungen ein:

Das effektive Probenvolumen wird definiert zu $V = \pi^{3/2}w_{xy}^2w_z$, damit ist $\bar{N} = V\bar{c}$ die mittlere Teilchenzahl in diesem Volumen. Die Zeit $\tau_D := w_{xy}^2/4D$ ist die Diffusionszeit senkrecht zur Strahlrichtung und $\tau'_D := w_z^2/4D$ entsprechend die Diffusionszeit entlang dieser Richtung. Schließlich führt man noch für das Aspektverhältnis der longitudinalen zur lateralen Ausdehnung des Fokus $w := w_z/w_{xy}$ ein, den sog. Strukturparameter. Für die Korrelationsfunktion einer einkomponentigen fluoreszierenden Probe erhält man

$$G_{diff}(\tau) = \frac{1}{\bar{N}} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{w^2\tau_D}\right)^{-1/2} \quad (32)$$

Im Experiment wird zunächst w mit Hilfe einer Probe bekannter Diffusionszeit bestimmt (Alexa Fluor 633, $D = 280 \mu\text{m}^2/s$) und für die weiteren Proben fixiert. Die experimentell ermittelte Korrelationsfunktion wird dann mit obiger Gleichung mit den freien Fitparametern \bar{N} und τ_D angeglichen.

5 Versuchsaufbau

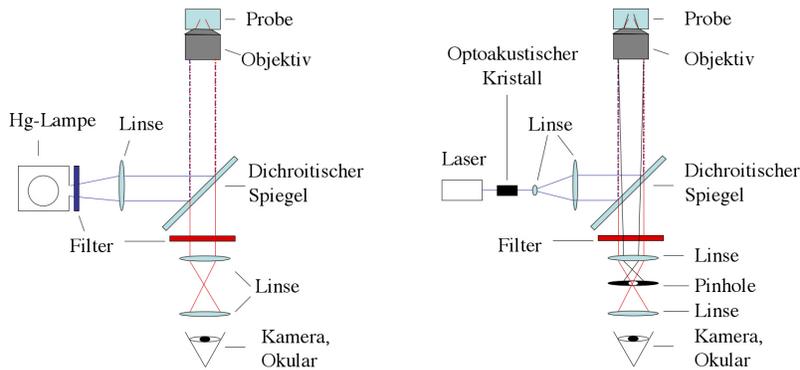


Abbildung 8: *Konventionelles Fluoreszenzmikroskop und konfokaler LSM bzw. FCS-Aufbau*

Die Experimente werden mit einem konfokalen FCS-Aufbau der Firma Zeiss (ConfoCor2) durchgeführt. Der Aufbau ist in Abbildung 8 skizziert. Laserlicht der gewünschten Wellenlänge wird über eine Glasfaser eingespeist. Es wird an einem dichroitischen Spiegel reflektiert und durch das Beobachtungsobjektiv ungefähr $200 \mu\text{m}$ über dem Deckglas einer Nunc-Lab-Kammer in der Probe fokussiert. Bei konfokalen Aufbauten, die ohne Lasereinspeisung konzipiert sind, wird in der Regel Licht einer Quecksilberdampfampe gefiltert und durch ein erstes Pinhole gelenkt, bevor es auf den Spiegel trifft. Im Fokusbereich werden die untersuchten Fluorophore angeregt und emittieren Licht einer spezifischen Wellenlänge. Dieses Licht wird wiederum durch das Objektiv gesammelt und auf den dichroitischen Spiegel geworfen, der für diese Wellenlänge durchlässig ist. Das Licht trifft durch eine Linse auf passende Filter, die unerwünschte Strahlungsanteile absorbieren bzw. reflektieren. Bevor die verbleibenden Anteile des Lichts in einer Avalanche-Photodiode erfasst werden, selektiert ein Pinhole das Licht der Fokusebene. Die Intensität des Signals wird über einen bestimmten Zeitraum mit einer zeitlichen Auflösung von einigen Nanosekunden aufgenommen.

6 Durchführung des FCS-Experiments

6.1 Eichung

Die Initialisierung des Gerätes wird zusammen mit einem Betreuer durchgeführt. Um den Fokusradius w_{xy} in Gleichung 32 zu bestimmen, wird der Aufbau mit einem fluoreszierenden Molekül, dessen Diffusionskonstante bekannt ist, geeicht. Hierfür wird ein Farbstoff, Alexa Fluor 633 (Life Technologies), mit einem Literaturwert der Diffusionskonstante von $280 \mu\text{m}^2/\text{s}$ verwendet. Alexa Fluor 633 absorbiert Licht mit 633 nm Wellenlänge und sein Emissionsspektrum hat bei 647 nm ein Maximum. Zur Anregung wird die 633 nm Linie eines HeNe-Laser verwendet. In Abbildung 9, links, sind ein Teil der Rohdaten, also das Fluoreszenzsignal, in Abhängigkeit von der Zeit, und die sich daraus mit Gleichung 8 ergebende Autokorrelationsfunktion $\tilde{G}(\tau)$ gezeigt. Es werden 10×20 Sekunden des Fluoreszenzsignals aufgenommen. Die zugehörigen Autokorrelationsfunktionen $\tilde{G}(\tau)$ werden mit den Gleichungen 8 und 32 mit den freien Parametern τ_D und N gefittet. Man erhält als Mittelwert eine charakteristische Diffusionszeit τ_D , einen Strukturparameter w und die durchschnittliche Anzahl der Partikel im Fokusbereich N . Mit der Beziehung $\tau_D := w_{xy}^2/4D$ lässt sich der aktuelle Fokusradius w_{xy} berechnen. Das effektive Fokusbereich V_{eff} erhält man aus der Beziehung $V = \pi^{3/2}w_{xy}^2w_z$.

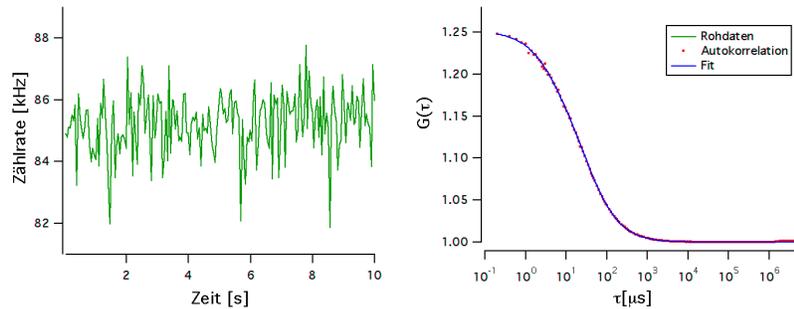


Abbildung 9: *Eichung des FCS-Aufbaus mit Alexa Fluor 633. Links: Rohdaten des Fluoreszenzsignals von Alexa Fluor 633. Rechts: Autokorrelationsfunktion des Fluoreszenzsignals mit Fit durch die Gleichungen 8 und 32.*

6.2 Messung

Ist das Gerät geeicht und der Strukturparameter w bestimmt, kann mit den eigentlichen Messungen begonnen werden. Die zu untersuchende Probe wird in geeignetem Puffer zu ungefähr 10 nM verdünnt und in eine der acht Kammern des Probenhalters gefüllt. Die Messung wird fast ausschließlich mit der Software des Mikroskopes durchgeführt. Zur Messung wird das Menü „AnalyzeFCS“ gewählt. Zuerst wird die Position des Halters über dem Objektiv in dem

Menü „Carrier“ ausgewählt. Der Focus wird 200 μm über dem Glasplättchen eingestellt. Durch Wahl des Buttons „Laser“ in diesem Menüfenster wird die Zählrate der Detektoren angezeigt. Diese sollte zwischen 10 und 100 kHz liegen. Die Laserleistung darf nicht verstellt werden, da sich dadurch das Profil des Fokusbereichs verändert und das Gerät neu kalibriert werden muss. Es ist einfacher die Konzentration der Probe zu verändern.

In dem Menü „Method“ lassen sich die Parameter der Messung überprüfen. Aus dem Menü „Optimize“ lassen sich die Messungen starten und gegebenenfalls abbrechen. In der Regel werden 10×20 Sekunden pro Probe gemessen.

6.3 Auswertung FCS

Im oberen Bereich des Fensters sind die Rohdaten des Detektors sowie die dazugehörigen Autokorrelationsfunktionen der einzelnen Messungen zu sehen. Im unteren Bereich kann man die verschiedenen Messungen auswählen. Die letzte Zeile zeigt den gemittelten Werte der Einzelmessungen an. Im rechten Bereich des Fensters kann man zwischen den verschiedenen Bereichen der Analyse-Software wählen: Anfangs ist der Modus „Correlation“ gewählt. Im Modus „Fit“ lassen sich die Fit-Parameter festlegen. Der Strukturparameter sollte hier auf den ermittelten Wert fixiert werden. Versuchsweise kann man auch den Einfluss des Tripletzerfalls überprüfen. Nach einer Veränderung der Parameter müssen alle Werte neu errechnet werden. Dies geschieht durch Wahl der Taste „Apply to all“.

Ist eine oder mehrere (Shift-Taste) der Messungen markiert, lässt sich unter „Preview“ eine Zusammenfassung der Messergebnisse ausdrucken. Hier unbedingt darauf achten, dass „Selection“ gewählt ist, da sonst alle Einzelmessungen ausgedruckt werden. Um selber den Fit-Vorgang nachvollziehen zu können, werden die Rohdaten der gemittelten Kurven zu exportiert. Dafür klickt man mit der rechten Maustaste in eine angezeigte Autokorrelationsfunktion und exportiert die Daten als .txt-File. Dieses lässt sich dann später durch ein Programm wie gnuplot, Igor oder Origin einlesen und auswerten. Zuletzt sollen die durch das Fitting erhaltenen Diffusionszeiten über die in Kapitel 4 angegebenen Relationen in Diffusionskonstanten bzw. geometrische Abmessungen der diffundierenden Objekte umgerechnet und mit den theoretischen Werten in einem Plot verglichen werden. Für die Auswertung soll die Viskosität von Wasser bei Raumtemperatur als Näherung verwendet werden.