

Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie (EFS)

Klaus Steiniger, Alexander Wagner, Gruppe 850

klaus.steiniger@physik.tu-dresden.de, alexander.wagner@physik.tu-dresden.de

Betreuer: Dr. Zdenek Petrasek

Protokoll vom 18. Juni 2009

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	2
1.1	Konfokale Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie	2
1.2	Autokorrelations-Funktion	2
1.3	Protonierung	3
2	Durchführung	4
3	Auswertung	4
3.1	Größe des effektiven Messvolumens	4
3.2	Absolute Probenkonzentration für eine Messung	5
3.3	Bestimmung der Laserintensität im Fokus	5
3.4	Bestimmung der Dissoziationskonstante	5
4	Zusammenfassung	5
5	Messkurven	6

1 Einleitung

Ziel des Versuches ist es, die Methode der konfokalen Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie FCS kennenzulernen. Daher ist es unsere Aufgabe, ein green fluorescent protein GFP in Pufferlösungen mit verschiedenen pH -Werten zu bringen und anschließend auf das Objektiv aufzutragen.

1.1 Konfokale Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie

Konfokal bedeutet hierbei, dass wir einen Laserstrahl in der Probe fokussieren und das darin enthaltene GFP im Fokus anzuregen. Angeregtes GFP fluoresziert und über eine entsprechende Optik kann dieses Fluoreszenz-Signal ausgewertet werden. Die optische Anordnung ist schematisch in folgendem Bild dargestellt:

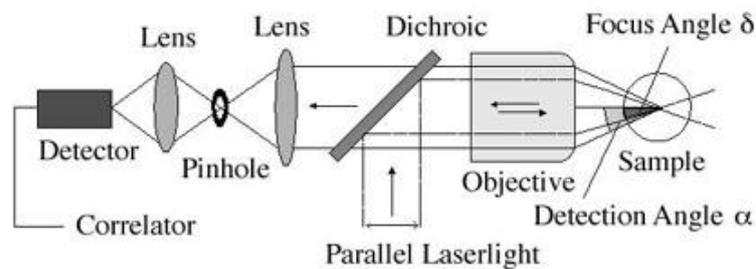


Abbildung 1: prinzipielle optische Anordnung

Der dichroische Spiegel reflektiert das einfallende Laserlicht und transmittiert das Fluoreszenzlicht nahezu vollständig. Das Pinhole (Lochblende) sorgt dafür, dass nur das Fluoreszenzlicht im Detektor ankommt, welches auch aus dem Laserfokus stammt. Dieser ist nämlich so klein, dass einzelne Moleküle, die sich durch diesen Fokus bewegen, bereits messbare Änderungen der Intensität des Fluoreszenzlichtes verursachen. Und genau diese Änderungen des Lichtes wollen wir in der Korrelations-Spektroskopie messen, in dem wir die Fluktuationen $\delta F(t)$ des Signals $F(t)$ auswerten.

1.2 Autokorrelations-Funktion

Um die Konzentration c der Moleküle bei bekanntem Fokolvolumen V zu bestimmen, brauchen wir die mittlere Anzahl \bar{N} der Moleküle in diesem Volumen, denn die Konzentration ergibt sich dann zu $c = \bar{N}/V$. Das gemessene Signal $F(t)$ ist direkt proportional zu $N(t)$, die Proportionalitätskonstante lässt sich jedoch experimentell nicht so einfach bestimmen, weshalb wir auf die Varianz $\sigma_F^2 = \overline{(F(t) - \bar{F})^2}$ zurückgreifen. Sie hängt mit σ_N über die gleiche Prop.-Konstante zusammen, weshalb bei sich Verhältnisbildung diese Konstante weghebt.

$$\frac{\sigma_F^2}{\bar{F}^2} = \frac{\sigma_N^2}{\bar{N}^2} = \frac{1}{\bar{N}}$$

Dieses Verhältnis ist zeitlich konstant. Will man den Einfluss der Diffusion mit ins Spiel bringen, muss man es zeitabhängig von τ schreiben:

$$\frac{\overline{(F(t) - \bar{F})(F(t + \tau) - \bar{F})}}{\bar{F}^2} = g(\tau) \quad \dots \text{Autokorrelations-Funktion}$$

Über τ aufgetragen kann man bestimmte Werte ablesen:

- $g(0) = \frac{1}{N}$
- $g(\tau \rightarrow \infty) = 0$
- $g(\tau_D) = \frac{1}{2N} \frac{1}{\sqrt{1 + \left(\frac{r_0}{z_0}\right)^2}} \approx \frac{1}{2N}$

τ_D bezeichnet hierbei eine Art charakteristische Diffusionszeit eines Moleküls durch das (effektive) Volumen, d.h. innerhalb dieser Zeit können Korrelationen auftreten, außerhalb sind diese sehr unwahrscheinlich. Den Zusammenhang zwischen τ_D , der Diffusionskonstanten D und dem Radius des Volumens r_0 kann man so schreiben:

$$\tau_D = \frac{r_0^2}{4D} \quad (1.1)$$

1.3 Protonierung

Das Molekül ist negativ geladen und kann spontan mit Protonen aus der Pufferlösung protoniert werden. Dabei ändert sich das Absorptionsverhalten, denn das Anion absorbiert bei einer deutlich höheren Wellenlänge als das neutrale (protonierte) Molekül. Da wir aber nahezu monochromatisch anregen, kann nur das Anion absorbieren und anschließend emittieren, das neutrale Molekül bleibt dunkel. Das Gleichgewicht der Reaktion



lässt sich also durch Verändern der Protonenkonzentration $[H^+]$ in die jeweilige Richtung verlagern. $[H^+]$ wiederum lässt sich über den pH -Wert regeln, denn in unserem Fall ist $[H^+] = 10^{-pH}$. Später werden wir an dieser Stelle noch ein c_0 rechts addieren, damit auch der internen Protonierung Rechnung getragen wird. Die Gleichgewichtslage wird durch die Konstanten k_1 und k_2 bestimmt, für die im chemischen Gleichgewicht gilt:

$$\begin{aligned} K_A &:= \frac{k_2}{k_1} = \frac{[A^-][H^+]}{[AH]} \\ \Rightarrow [A^-] &= K_A \frac{[AH]}{[H^+]} \end{aligned} \quad (1.2)$$

Weiterhin kann man den Anteil f_D der dunklen (protonierten) Moleküle $[AH]$ in der Lösung bestimmen:

$$\begin{aligned} f_D &= \frac{[AH]}{[AH] + [A^-]} \\ \text{mit (1.2) folgt} \quad f_D &= \frac{[AH]}{[AH] + K_A \frac{[AH]}{[H^+]}} \\ &= \frac{[H^+]}{[H^+] + K_A} \\ &= \frac{10^{-pH}}{10^{-pH} + 10^{-pK_A}} \end{aligned} \quad (1.3)$$

Wie oben bereits erwähnt, muss man noch einen Summand c_0 zu 10^{-pH} addieren, damit man auch die Intraprotolyse in der Rechnung berücksichtigt. Gleichung (1.3) wird dann zu

$$f_D = \frac{c_0 + 10^{-pH}}{c_0 + 10^{-pH} + 10^{-pK_A}} \quad (1.4)$$

2 Durchführung

Zunächst haben wir die GFP-Pufferlösungen mit verschiedenen PH-Werten erstellt. Dafür standen bereits Puffer zu den pH-Werten 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 9, 10 zur Verfügung. Diese wurden mit EGFP versetzt. Die Konzentration der GFP-Moleküle sollte dabei unter 100 nM gehalten werden, weshalb wir folgende Mischverhältnisse gewählt haben:

pH-Wert des Puffers	Menge Probe : Puffer	Volumen der Probelösung [μl]
4,5 – 5	1 : 6	5
5,5 – 6	1 : 15	2
6,5 – 10	1 : 30	1

Tabelle 1: Mischverhältnisse von Probelösung und Puffer

Mit einer Pipette haben wir dann diese hochverdünnten Lösungen auf die Linse des Mikroskops gebracht.

Die Verarbeitung des Messsignals erfolgte rechnergestützt. Das Messprogramm zeichnete das Fluoreszenzsignal und die Fluktuation auf. Die Auswertung der Daten, mit einem bereitgestellten Algorithmus (Marquardt-Levenberg) zum Fitten der Autokorrelationsfunktion, wurde mit Origin durchgeführt.

3 Auswertung

3.1 Größe des effektiven Messvolumens

Die Form des Messvolumens im Laserfokus wird durch eine Gaußsche Glockenkurve genähert. Das effektive Messvolumen berücksichtigt einen experimentellen Faktor, also $V_{\text{eff}} = \text{Faktor} \cdot V$. Es folgt

$$V_{\text{eff}} = \pi^{3/2} r_0^2 z_0$$

wobei für unseren Versuchsaufbau $z_0 = 5 \cdot r_0$ ist. Den Fokalradius r_0 kann man mit Hilfe der Diffusionskonstante $D = 8,7 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ nach Formel (1.1) berechnen. Siehe dazu Tabelle 2.

pH-Wert	τ_D [ms]	r_0 [μm]
4,5	$0,402 \pm 0,044$	$0,37 \pm 0,03$
5,0	$0,396 \pm 0,030$	$0,37 \pm 0,02$
5,5	$0,458 \pm 0,035$	$0,40 \pm 0,02$
6,0	$0,490 \pm 0,021$	$0,41 \pm 0,01$
6,5	$0,515 \pm 0,022$	$0,42 \pm 0,01$
7,0	$0,404 \pm 0,011$	$0,37 \pm 0,01$
7,5	$0,513 \pm 0,014$	$0,42 \pm 0,01$
8,0	$0,478 \pm 0,018$	$0,41 \pm 0,01$
9,0	$0,453 \pm 0,012$	$0,40 \pm 0,01$
10,0	$0,485 \pm 0,018$	$0,41 \pm 0,01$

Tabelle 2: Gemessene Diffusionszeit

Hieraus ergibt sich ein gemittelten Fokalradius von

$$\bar{r}_0 = (0,399 \pm 0,010) \mu\text{m}$$

Mit diesem berechnet sich das effektive Messvolumen zu

$$V_{\text{eff}} = (1,768 \pm 0,045) \mu\text{m}^3$$

3.2 Absolute Probenkonzentration für eine Messung

Für Berechnung der Probenkonzentration ist die mittlere Teilchenzahl im Messvolumen notwendig, um über $c = N/N_A V$ die Konzentration zu berechnen. Diese erhält man aus $1/g(0)$. Wir führen diese Rechnung für $pH = 5.5$ durch, denn hier gilt $r_0 \approx \bar{r}_0$. Man erhält

$$c = (9.27 \pm 0.64) \times 10^{-9} \frac{\text{mol}}{\text{l}}$$

Generell lässt sich sagen, dass die FCS die Kriterien einer Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie für hohe pH-Werte (≈ 10) erfüllt. Denn in diesem Bereich liegt die Teilchenzahl bei ungefähr 3-5. Bei kleinen pH-Werten (≈ 4) tragen bis zu 20 Teilchen zum Signal bei. Dies wird eben durch die Beobachtung der Intensitätsfluktuationen und nicht Gesamtintensität erreicht.

3.3 Bestimmung der Laserintensität im Fokus

Die Ausgangsleistung des Lasers ist mit $P_{\text{out}} = 10 \text{ mW}$ angegeben. Diese wird durch einen Filter und Verluste im Strahlengang reduziert. In der Fokusfläche ($= \pi r_0^2$) beträgt die Intensität

$$I_{\text{Fokus}} = \frac{P_{\text{out}} \cdot 10^{-2} \cdot 0.4 \cdot 0.3}{\pi r_0^2} = 24 \frac{\text{W}}{\text{cm}^2}$$

Eine höhere Intensität würde aufgrund der Wärmestrahlung eine intensivere Brownsche Bewegung zur Folge haben und so würde sich die Diffusionszeit verkürzen. Bei zu hohen Temperaturen würden die Proteine denaturieren.

3.4 Bestimmung der Dissoziationskonstante

Durch auftragen der Dunkelfraktion über dem pH -Wert können wir c_0 und pK_a aus Gleichung (1.4) mittels Fit bestimmen. Wir erhalten Abbildung 2 und bestimmen die Fitparameter zu

$$c_0 = (9.3 \pm 2.3) \times 10^{-7} \qquad pK_a = 5.434 \pm 0.075$$

Für $pH = pK_a = 5.434$ würden wir gleiche Anteile an hellen und dunklen Molekülen haben. Dies ist nah am zu erwartenden Wert $pK_a = 5.5$. Zum Vergleich, dass Formel (1.4) besser die Messwerte beschreibt als (1.3) haben wir Abbildung 3 erstellt.

4 Zusammenfassung

Die im Versuch aufgenommenen Messkurven und daraus ermittelten Parameter liefern gute Ergebnisse. So ist zum Beispiel pK_a nah am zu erwartenden und ebenfalls, innerhalb des Fehlerbereichs, die Diffusionszeit τ_D konstant geblieben und die Blinkzeit τ_F mit sinkendem pH-Wert gestiegen.

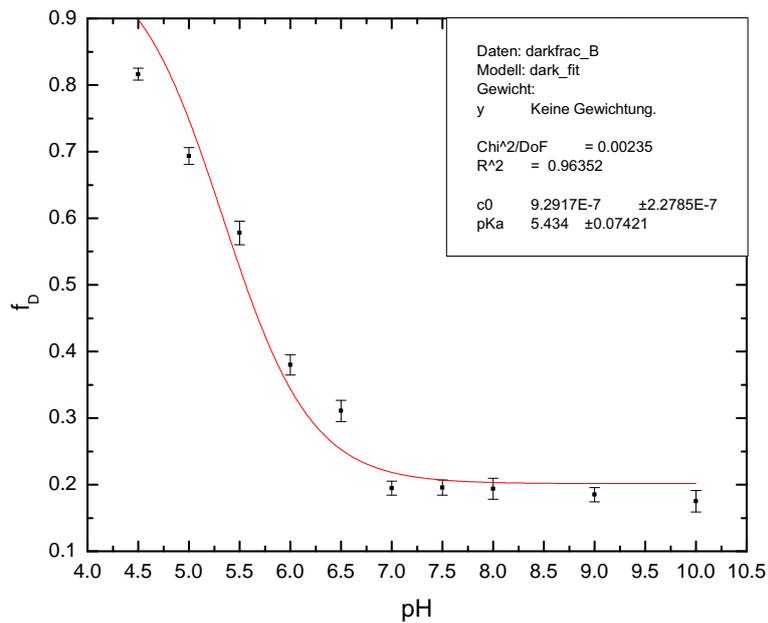


Abbildung 2: Aufgetragen ist die Dunkelfraktion über dem pH -Wert und ein Fit nach Gleichung (1.4). Es ist zu beachten, dass der Fehler für kleine pH -Werte schwierig zu bestimmen ist. Denn der Anteil der Dunkelfraktion kann dort, aufgrund von Zersetzung des EGFP, verfälscht werden.

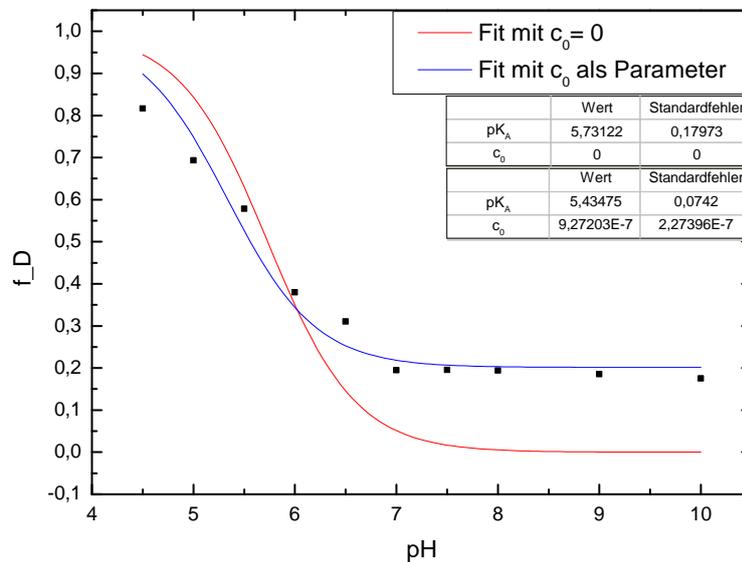


Abbildung 3: Zum Vergleich der richtigen beschreibung des Dunkelfraktionsanteils. (Blau) Fit mittels (1.4). (Orange) Fit mittels (1.3)

5 Messkurven

