

Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS)

Marcel Köpke & Axel Müller
Gruppe 13

11.11.2013

Inhaltsverzeichnis

1	Theorie	3
1.1	Klassische Lichtmikroskopie und ihr Auflösungsvermögen	3
1.2	Konfokale Lichtmikroskopie	3
1.3	Termschema und Fluoreszenz von Molekülen	4
1.4	Brown'sche Molekularbewegung	4
1.5	Faltung und Korrelation	4
1.6	Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie	5
2	Versuchsaufbau	7
3	Versuche	8
3.1	Versuch 1	8
3.2	Versuch 2	10
3.3	Versuch 3	11

1 Theorie

Dieser Versuch behandelt den Umgang mit einem Rasterlichtmikroskop, mit dem fluoreszierende Partikel und Moleküle unter verschiedenen Bedingungen untersucht werden sollen. Hierfür verwendet man verschiedene Methoden der Korrelationsspektroskopie. Zunächst wird nun die nötige Theorie besprochen, bevor anschließend die Aufgabenstellungen untersucht und ausgewertet werden.

1.1 Klassische Lichtmikroskopie und ihr Auflösungsvermögen

Klassische Lichtmikroskope stellen im einfachsten Sinne eine Anordnung von Linsen dar, die ein Bild eines beleuchteten Objekts erzeugen. Die Brennweiten und Abstände zwischen den Linsen bestimmen hierbei die Vergrößerung, die erzielt werden kann. Das Mikroskop besteht allgemein aus zwei Teilsystemen, dem Objektiv und dem Okular. Das Objektiv erzeugt ein vergrößertes Zwischenbild, welches dann vom Okular erneut vergrößert und in die Beobachtungsebene projiziert wird. Die Qualität eines Mikroskops hängt in erster Linie nicht von der Vergrößerung, sondern vom Auflösungsvermögen ab, welches durch die Wellennatur des Lichts beschränkt ist. Für das Auflösungsvermögen einer optischen Apparatur gilt

$$d = \frac{\lambda}{n \cdot \sin \alpha}$$

d steht hierbei für die erzielbare Auflösung, also den Mindestabstand, den zwei Objekte besitzen müssen, um als getrennt wahrgenommen zu werden. λ ist die Wellenlänge des Lichts, n der Brechungsindex des Immersionsmediums und α der halbe Öffnungswinkel des Objektivs.

1.2 Konfokale Lichtmikroskopie

Bei der konfokalen Lichtmikroskopie wird im Gegensatz zur klassischen Lichtmikroskopie nur ein kleiner Teil des zu untersuchenden Objekts beleuchtet. Die Beleuchtung wird dann über das Objekt "gerastert" und ein Detektor registriert die Intensität des Lichtes, das vom Objekt reflektiert oder abgegeben wird. Dadurch können die Daten dann wieder zu einem Gesamtbild zusammengeführt werden. Wie bei den klassischen Lichtmikroskopen, ist die Auflösung durch die Wellennatur des Lichts begrenzt. Allerdings gibt man bei den konfokalen Lichtmikroskopen häufiger die Halbwertsbreite der abgebildeten "point spread function" an. Hierbei geht man von einer Intensitätsverteilung aus, die der

Normalverteilung entspricht

$$y_{\mu,\sigma}(x) = A \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}\right)$$

Die Halbwertsbreite liegt dann bei

$$x = \sqrt{2 \ln 2} \sigma$$

1.3 Termschema und Fluoreszenz von Molekülen

In diesem Praktikumsversuch wird das Fluoreszenzlicht der zu untersuchenden Moleküle untersucht. Dazu werden die Moleküle mit Laserlicht bestrahlt und somit angeregt. Fluoreszenz bedeutet nun die spontane Emission von Licht, welche energieärmer als das zuvor absorbierte Licht ist. Diese Stokesverschiebung resultiert aus der Schwingungsrelaxation, des Moleküls, die einen Teil der Energie aufnimmt. Im Gegensatz zur Phosphoreszenz sind bei der Fluoreszenz die Übergänge spinerlaubt, erfolgen also zwischen Zuständen mit gleichem Spin.

1.4 Brown'sche Molekularbewegung

Der Schotte Robert Brown entdeckte 1827, dass kleine Samenkörner in Wasser unregelmäßigen Bewegungen unterliegen. Die Ursache für diese Bewegungen liegt in der Wärmebewegung der Lösungsmittelteilchen. Das Teilchen, das sich in dem Lösungsmittel aufhält, erhält aus allen Richtungen Kraftstöße von den Lösungsmittelmolekülen, die sich jedoch nicht komplett gegenseitig aufheben. Somit vollführt das Teilchen eine fortwährende Bewegung, die Diffusion genannt wird.

1.5 Faltung und Korrelation

Faltung und Korrelation sind grundlegende Operationen in der Signalverarbeitung, die aus der Kombination zweier Signale ein drittes Signal erzeugen. Mittels Faltung lässt sich jedes Ausgangssignal eines Systems bestimmen, solange ein bestimmtes Signal bekannt ist. Mit dem Ausgangssignal $y(t)$, dem Eingangssignal $x(t)$ und der Impulsantwort $h(t)$ gilt

$$y(t) = \int_{-\infty}^{\infty} x(\tau)h(t-\tau)d\tau$$

Mit der Korrelation hingegen, lässt sich ein Maß dafür finden, wie ähnlich sich zwei Signale sind. $x(t)$ und $y(t)$ seien zwei deterministische Signale. Für den Grad der Übereinstimmung $r_{xy}(\tau)$ folgt

$$r_{xy}(\tau) = \int_{-\infty}^{\infty} x(t)y(t+\tau)dt$$

Die Signale sind sich dann umso ähnlicher, je größer der Grad der Übereinstimmung ist. Autokorrelation nennt man die Korrelation eines Signal mit sich selbst. Dabei ist zufälliges Rauschen per Definition unkorreliert, also nur mit sich selbst korreliert.

1.6 Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie

Durch die Fokussierung eines Laserstrahls in einer Flüssigkeit und dem Strahlengang des emittierten Lichts durch eine sehr kleine Blendenöffnung, kann ein sehr kleines Probenvolumen in der Flüssigkeit untersucht werden. Die Fluoreszenz-Photonen aus diesem Probenvolumen werden dann in Abhängigkeit von der Zeit gezählt, wodurch man deren Intensitätsschwankungen untersuchen kann. Diese Schwankungen stammen in erster Linie aus der Diffusion bzw. der Brown'schen Molekularbewegung in der Flüssigprobe. Für die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie besonders wichtig ist die Autokorrelationsfunktion $G(\tau)$. Wie oben beschrieben ist diese ein Grad für die Selbstähnlichkeit des Fluoreszenzsignals und liefert somit Informationen über die Zeitskalen der beteiligten Prozesse. Dafür werden die Fluktuationen $\delta F(t) = F(t) - \langle F(t) \rangle$ zu einem bestimmten Zeitpunkt mit den Fluktuationen zum Zeitpunkt $t + \tau$ multipliziert. Normiert ergibt sich

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

Betrachtet man nun die Brown'sche Molekularbewegung als Ursache für die Intensitätsschwankungen, so können die Fluktuationen mithilfe der Konzentrationsschwankungen ermittelt werden. Dazu integriert man die Konzentrationsänderungen $\delta c(\mathbf{r}, t)$ multipliziert mit der Wahrscheinlichkeit $\phi(\mathbf{r})$, ein Photon aus dem Volumenelement zu detektieren, über das gesamte Volumen

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

Das Beobachtungsvolumen nähert man dabei durch eine dreidimensionale Gauß-Funktion. Diese hängt von der Radialkomponente r_0 ab, die durch die numerische Apertur des Lasers bestimmt wird. Ein weiterer Faktor ist die axiale Komponente z_0 , die von der Größe der Blendenöffnung vor dem Detektor abhängt. r_0 und z_0 beschreiben den Radius und die Höhe, an denen die Intensität der Verteilung auf $\frac{1}{e^2}$ des Maximums abgefallen ist. Nun kann man zur Beschreibung der Konzentrationsschwankungen das Fick'sche Gesetz anwenden, wodurch man folgende Gleichung erhält

$$\frac{\partial \delta c(\mathbf{r}, t)}{\partial t} = D \Delta \delta c(\mathbf{r}, t)$$

$$G_D(\tau) = \frac{1}{\langle c \rangle \cdot V_{eff}} \left[1 + \frac{\tau}{\tau_D} \right]^{-1} \left[1 + \frac{\tau}{\tau_D} \left(\frac{r_0}{z_0} \right)^2 \right]^{-1/2}$$

V_{eff} ist hierbei das effektive Beobachtungsvolumen

$$V_{eff} = \frac{\left(\int W(\mathbf{r}) dV \right)^2}{\int W(\mathbf{r})^2 dV} = \frac{\left(\int \exp\left(-2\frac{x^2+y^2}{r_0^2}\right) \exp\left(-2\frac{z^2}{z_0^2}\right) dV \right)^2}{\left(\int \exp\left(-4\frac{x^2+y^2}{r_0^2}\right) \exp\left(-4\frac{z^2}{z_0^2}\right) dV \right)} = \pi^{\frac{3}{2}} r_0^2 z_0$$

Für die mittlere Verweildauer der Moleküle in V_{eff} (Diffusionszeit) τ_D gilt

$$\tau_D = \frac{r_0^2}{4D}$$

Im Jahr 1905 entdeckte Albert Einstein den Zusammenhang zwischen dem Diffusionskoeffizienten D und dem hydrodynamischen Radius R_H . Die Stokes-Einstein-Relation lautet

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

η ist hierbei die dynamische Viskosität der Lösung die sich wie folgt berechnet

$$\eta = \frac{\langle F(t) \rangle}{N}$$

Im Praktikumsversuch kann sie jedoch für verschiedene Temperaturen aus einer Tabelle abgelesen werden, genauso wie die Diffusionskonstante D . Zur Kalibrierung des Systems benützt man normalerweise Lösungen mit bekanntem Diffusionskoeffizienten. Durch Fit-ten der Autokorrelationsfunktion an die experimentell gewonnen Daten erhält man die freien Parameter $N = c \cdot V_{eff}$, τ_D und $\omega = \frac{r_0}{z_0}$, wodurch das Beobachtungsvolumen bestimmt werden kann.

2 Versuchsaufbau

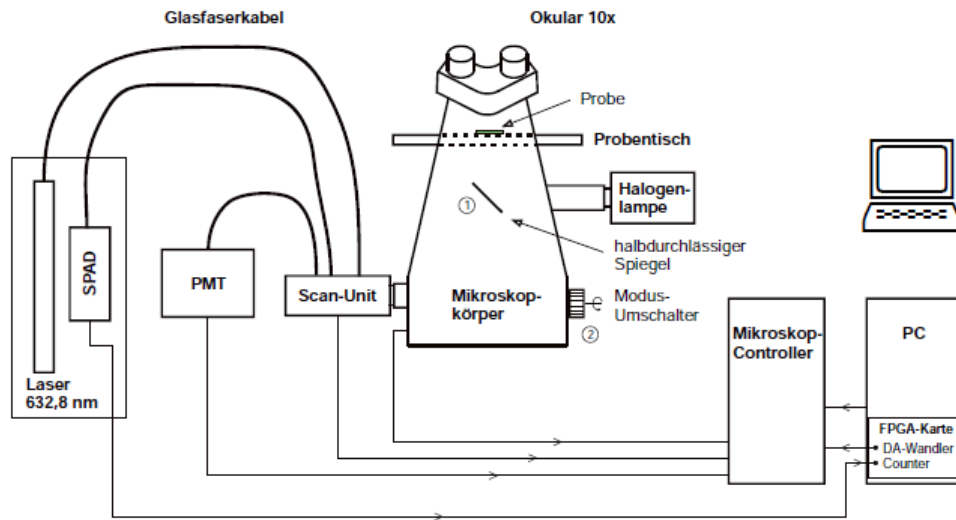


Abbildung 2.1: Versuchsaufbau; Quelle: Vorbereitungsmappe

Im Praktikumsversuch stehen zwei verschiedene Detektoren zur Auswahl:

1. Der Photomultiplier verarbeitet das Photonensignal analog und kann am PC eingestellt werden
2. Die hocheinsensitive Lawinen-Photodiode kann einzelne Photonen detektieren und gibt anhand der nachgeschalteten Elektronik ein verstärktes Signal aus. Die digitalen Signale werden wiederum mit dem PC ausgewertet.

3 Versuche

3.1 Versuch 1

In diesem Versuch haben wir uns mit dem Mikroskop vertraut gemacht und dieses dafür zunächst in den herkömmlichen Modus eingestellt um die Mikroskopie-Ebene zu finden. Dabei schalteten wir eine Blende vor, welche bei einem Medienwechsel ein helles Sechseck erzeugte. Anschließend wurde der Rastermodus eingestellt. Am Platz lagen verschiedene Gegenstände, wie ein EPROM-Chip und eine gepresste CD. Diese wurden mit dem Raster-Licht-Mikroskop vergrößert und abgebildet:

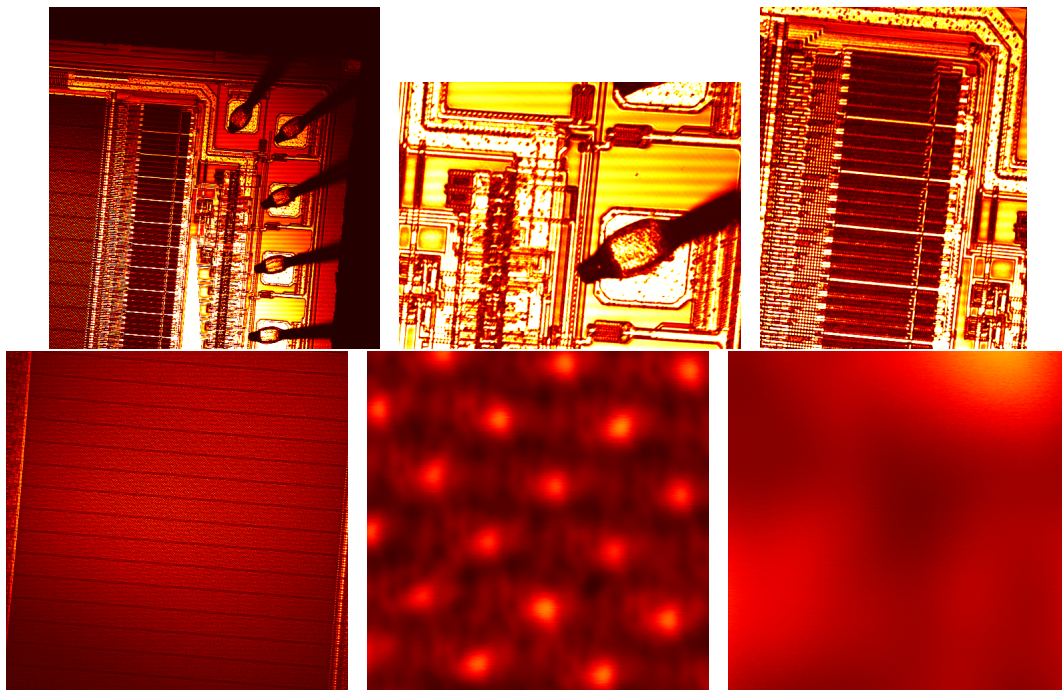


Abbildung 3.1: EPROM-Chip

Die ersten vier Bilder sind größere Bildausschnitte der Vergrößerung des EPROM-Chips. Die letzten zwei sind Vergrößerungen des vierten Bildes, mit denen wir die Auflösung abschätzen wollen. Dem Bildausschnitt des letzten Bildes entspricht eine Probengröße von $0.01\text{mm} \times 0.01\text{mm}$. Man kann gerade noch so rechts oben in der Ecke einen hellen, von einem dunkleren Punkt unterscheiden. Damit schätzen wir das Auflösungsvermögen

auf:

$$d \leq 7,07\mu\text{m}$$

Als nächstes wurde die CD aufgenommen:

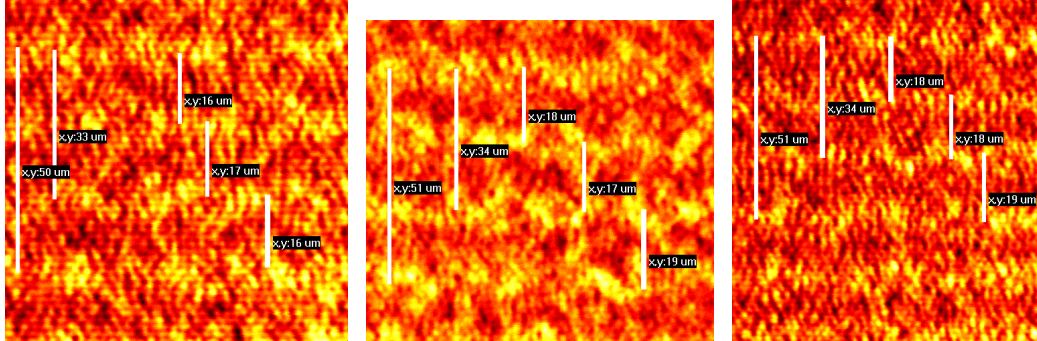


Abbildung 3.2: CD

Hier wird das Auflösungsvermögen durch das Abzählen der erkennbaren CD-Spuren ermittelt. Auf dem mittleren Bild ließen sich leider keine Spuren ablesen. Ein Fit liefert:

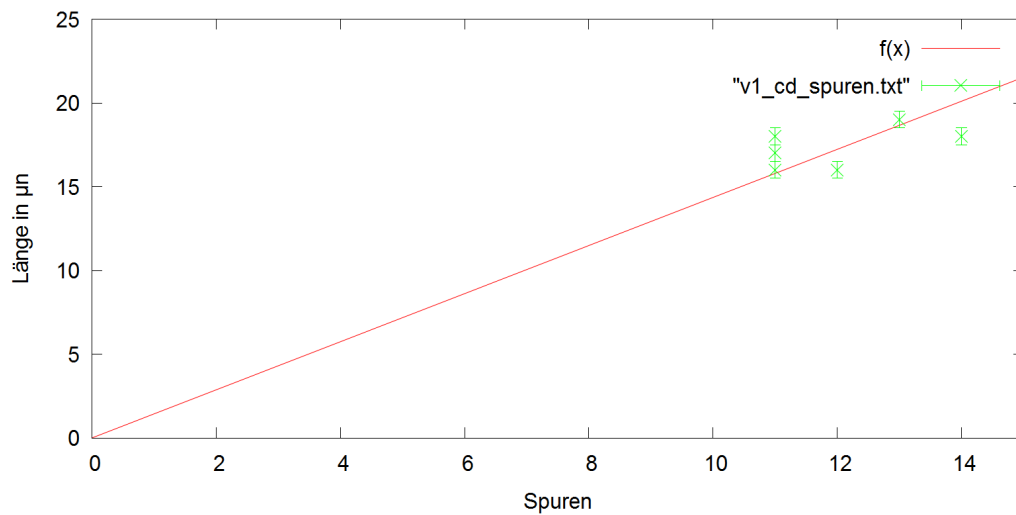


Abbildung 3.3: Fit

$$d = (1.44 \pm 0.05)\mu\text{m}$$

wobei sich d aus der Steigung ergibt, wenn man voraussetzt, dass die Spuren gerade die Größe des kleinsten Auflösungsvermögens haben. Die Fehlerbalken ergeben sich aus der Annahme, dass die "Skalengröße" der Längenmessung (Einstellung auf dem Computer) bei $1\mu\text{m}$ lag. Damit setzten wir den Fehler auf die halbe Skalengröße $0.5\mu\text{m}$. Zudem haben

wir noch zwei Linienspektren der Spuren aufgenommen, in denen wir die Position der Spuren durch Gauß-Peaks approximieren und durch diesen Fit die Fehler extrahieren:

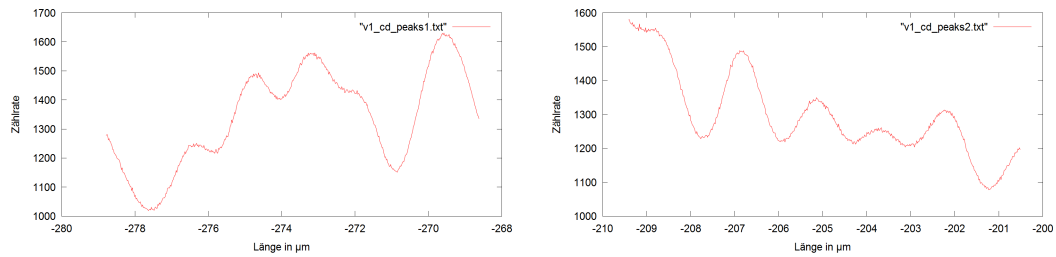


Abbildung 3.4: Peaks

Analoges Vorgehen liefert durch einen Fit:

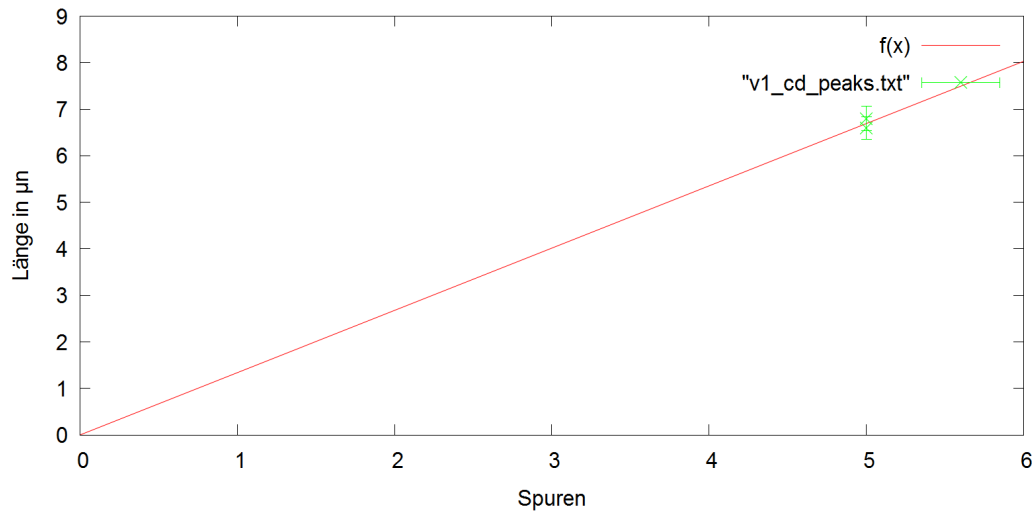


Abbildung 3.5: Fit

$$d = (1.34 \pm 0.02) \mu\text{m}$$

Offensichtlich konnten wir die Ergebnisse der vorherigen Messung zumindest größenordnungsmäßig reproduzieren.

3.2 Versuch 2

In diesem Versuch wurde das Mikroskop auf 60-fache Vergrößerung gestellt und die Ölimmersionslinse verwendet. Die Detektion erfolgte mit der Lawinen-Photodiode. Zunächst musste auf die obere Glas-Luft-Grenze des unteren Deckgläschens fokussiert werden. Auf diesem lagen Kugeln mit 100nm Durchmesser, die dann abgebildet werden sollten.

Anschließend hätte bei hoher Vergrößerung das Linienprofil einer solchen Kugel gemessen werden sollen. Damit hätte sich das laterale Auflösungsvermögen des Mikroskops bestimmen lassen. Hierfür nimmt man an, dass die Kugel-Leuchtdichte und die optische Transmissionsfunktion Gauß-Funktionen sind. Dann gilt für die Halbwertsbreiten ω

$$\omega_{Mess}^2 = \omega_{Kugel}^2 + \omega_{Auflösung}^2$$

Wir konnten eine solche Kugel erkennen und diese abbilden:

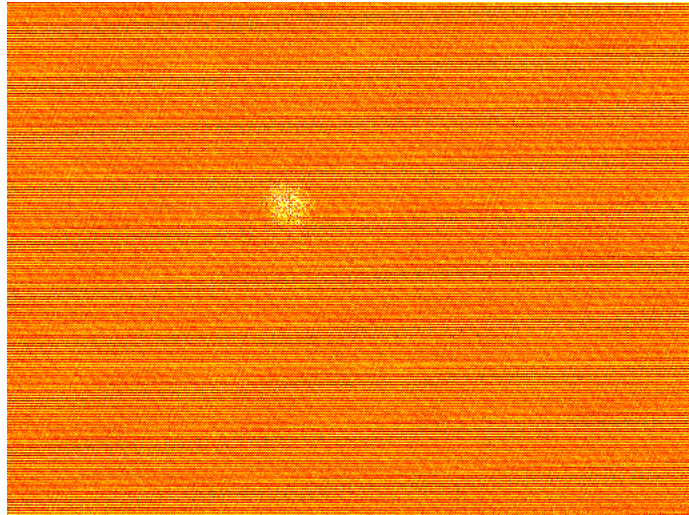


Abbildung 3.6: Kugel

Allerdings gelang es uns nicht, ein Linienprofil des Partikels anzufertigen, da er nach mehrmaliger Beobachtung seine fluoreszierenden Eigenschaften verlor. Daher konnten wir das Auflösungsvermögen des 60 x Ölimmersions-Objektivs nicht bestimmen.

3.3 Versuch 3

Wir konnten den Versuch nicht durchführen, da keine Proben vorhanden waren. Die nachfolgenden Messwerte sind von einer anderen Gruppe.

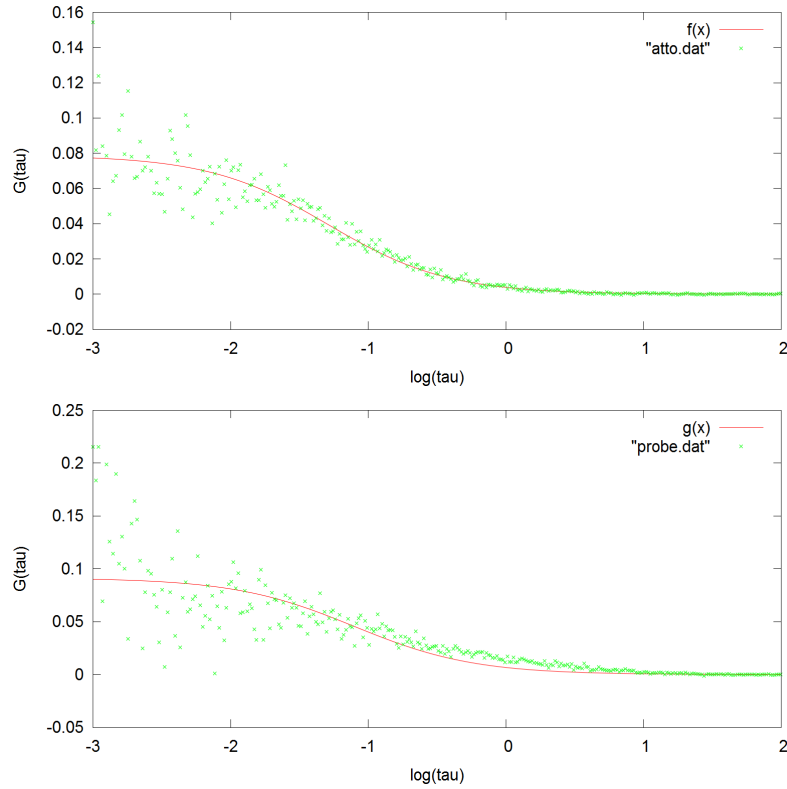


Abbildung 3.7: Messwerte

In diesem Versuch sollten Atto655-Moleküle in wässriger Lösung mit dem 60x Objektiv untersucht werden. Hierbei sollte die Diffusionszeit wie oben angegeben bestimmt werden. Die laterale Diffusionszeit kann durch Fitten der Werte bestimmt werden. Allerdings konnte der Fit für die Referenzwerte nicht vollständig durchgeführt werden, da das Fit-Programm “gnuplot” beim Optimierungsprozess auf eine singuläre Matrix stieß. Der obige Fit gibt die Parameter wieder, welche einen Schritt vorher approximiert wurden. Auch schien der Fit für beliebige $0 < S < 1$ kaum verändert. Daher können wir im Folgenden keine Fehler für diese Werte angeben:

$$S := \frac{r_0}{z_0} = 0.5$$

$$\tau_D = 0,05\mu s$$

Anschließend wurde mit denselben Einstellungen die Diffusionszeit für die bereitgestellten Proben ermittelt. Die Temperatur lag durchgehend bei etwa $T = 22^\circ\text{C}$. Aufgrund der Tatsache, dass der Probenabstand nicht verändert wurde, bleibt S zwischen beiden Messungen konstant. Nun fittet man die Autokorrelationsfunktion:

$$G(\tau) = \frac{1}{n'} \left[1 + \frac{\tau}{\tau_D'} \right]^{-1} \left[1 + \frac{\tau}{\tau_D'} S'^2 \right]^{-1/2} \cdot (1 - T + T e^{-\frac{\tau}{\tau_{\text{triplett}}}})$$

an die Probenmesswerte und erhält analog:

$$\begin{aligned} S &= S' = 0,5 \\ \tau'_D &= (0,08 \pm 0,01)\mu s \end{aligned}$$

Nun erhalten wir mit Hilfe der Vorbereitungsmappe den Wert für $D = D(T) = D(22^\circ\text{C}) = 393\mu\text{m}^2/\text{s}$ für die Referenzprobe. Über:

$$r_0^2 = 4D\tau_D$$

erhalten wir r_0^2 , welches für die Probenmessung gilt. Draus folgt:

$$D' = \frac{r_0^2}{4\tau'_D} = D \frac{\tau_D}{\tau'_D}$$

Aus der Stokes-Einstein-Gleichung folgt nun:

$$\begin{aligned} R_H &= \frac{k_B T}{6\pi\eta D'} = \frac{k_B T}{6\pi\eta D} \cdot \frac{\tau'_D}{\tau_D} \\ &= 0,9\text{nm} \end{aligned}$$

Die Viskosität $\eta = \eta(T) = \eta(22^\circ\text{C}) = 955\mu\text{Pa} \cdot \text{s}$ lesen wir erneut aus der Vorbereitungsmappe ab.

Den Fehler für R_H erhalten wir durch Fehlerfortpflanzung in den Größen $T, D, \eta, \tau'_D, \tau_D$:

$$\begin{aligned} \Delta R_H &= \left| \frac{\partial R_H}{\partial T} \right| \Delta T + \left| \frac{\partial R_H}{\partial D} \right| \Delta D + \left| \frac{\partial R_H}{\partial \eta} \right| \Delta \eta + \left| \frac{\partial R_H}{\partial \tau'_D} \right| \Delta \tau'_D + \left| \frac{\partial R_H}{\partial \tau_D} \right| \Delta \tau_D \\ &= 0,2\text{nm} \end{aligned}$$

wobei $\Delta \tau_D := \Delta \tau'_D$ gesetzt wurde und $\Delta \tau'_D$ sich aus den Fits ergibt. Für $\Delta T, \Delta D$ und $\Delta \eta$ nehmen wir die halbe Skalengröße auf dem Thermometer bzw. den Diagrammen an:

$$\begin{aligned} \Delta T &= 0,5\text{K} \\ \Delta D &= 2,5\mu\text{m}^2/\text{s} \\ \Delta \eta &= 5\mu\text{Pa} \cdot \text{s} \end{aligned}$$

Wir erhalten somit für den hydrodynamischen Radius:

$$R_H = (0,9 \pm 0,2)\text{nm}$$