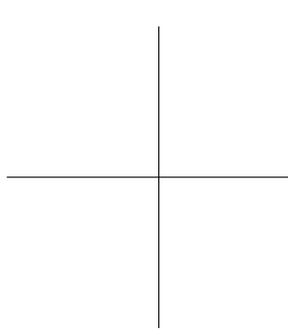
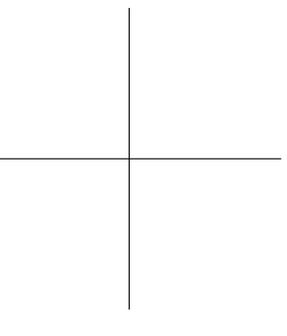


|

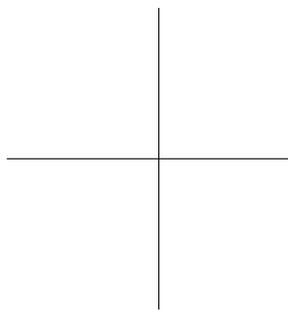


—

—



|









# INAUGURALDISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Fakultät für Physik der

Universität Bielefeld

von

IDIR YAHIAENE

geboren in Rinteln

Angefertigt in der Abteilung für

EXPERIMENTALPHYSIK

Gedruckt auf alterungsbeständigem, holz- und säurefreiem Papier  
gemäß DIN-ISO 9706.

Konfokale Mehrfarben  
Einzelmolekülspektroskopie in  
Mikrokanälen  
zur Charakterisierung  
biologischer Proben

Idir Yahiatène

27. Februar 2012

Gutachter: Prof. Dr. Markus Sauer  
Prof. Dr. Thomas Huser

# Zusammenfassung

In dieser Arbeit wird die konfokale Einzelmolekülfluoreszenzdetektion auf zwei Farben in einem mikrofluidischen Kanal ausgedehnt. Die sogenannte zwei-Farben Koinzidenzanalyse kann, wie in dieser Arbeit gezeigt, auf die Detektion und Analyse von molekularen Bindungsereignissen angewendet werden. Der große Vorteil der Methode ist, dass sie im Gegensatz zur weit verbreiteten Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) eine Sensitivität, bis hin zum sub- $pM$  Bereich aufweist. Es werden Messungen an Proben mit diagnostischer Relevanz durchgeführt, die die potentielle Anwendbarkeit des hier entwickelten Verfahrens für die Früherkennung viraler oder bakterieller Infektionen zeigen. Anders als die ein-Farben Einzelmoleküldetektion sorgt diese Mehrfarbenmethode außerdem für eine drastische Reduktion der falsch-positiven Ereignisse. Dadurch werden die Resultate und Interpretationen der Messungen, gerade mit medizinischer Anwendung zuverlässiger und können zu einer enormen Kostenreduktion für die Durchführung von Untersuchungen führen. Die heutige, aufwendige Kultivierung von Bakterien zur mühsamen Quantifizierung von Kolonien (engl. Colony forming units) nimmt Zeit in Anspruch, die, bei sensitiver und damit frühzeitiger Detektion, bereits zur Behandlung genutzt werden kann. Durch den Einsatz eines Mikrofluidik-Kanals können die Probelösungen in kurzer Zeit auf Koinzidenzen und damit, wie in der hier vorliegenden Arbeit gezeigt, auf die Präsenz der Zielmoleküle untersucht werden.

Der erste Teil der hier vorliegenden Arbeit beschreibt durch eine Reihe von mikrofluidischen Experimenten, dass zum Einen eine Grundgleichung der Flui-

dik, die Hagen-Poiseuille Gleichung, gilt und zum Anderen wie mit Hilfe eines auf Ihr basierenden Modells die Detektionssensitivität erhöht und quantitativ beschrieben werden kann. Mit Hilfe dieses Modells ist es durch nichtlineare Anpassung der experimentellen Daten möglich, die Breite des (gefrästen) Kanals bis auf 10 % abzuschätzen und Flußgeschwindigkeiten zu messen. Durch die Verwendung dieser Mikrostruktur konnte das Signal-zu-Hintergrund Verhältnis ( $SNR$ ) um mindestens das vierfache erhöht werden.

Es wurde eine statistische Methode, die Korrelations- Matrix Methode, eingeführt, die es ermöglicht, die Qualität einer zwei-Farben Koinzidenzmessung zu bestimmen. Damit wird ein Maß für die molekulare Interaktion von zwei (oder mehr) Spezies eingeführt. Der charakteristische Parameter ist die sogenannte  $\Gamma$  – Norm,  $l_\Gamma$ , die einen Wert von zwei für eine perfekte Koinzidenz liefert. Der Wert dieser euklidischen Norm ist kleiner oder gleich eins für rein statistische Koinzidenzen (für die eine Wahrscheinlichkeit von 7 % bestimmt wurde). Werte zwischen eins und zwei (praktisch zwischen 1,4 und 2) deuten auf eine Mischprobe von echten Bindungsereignissen und Einzelemittlern hin. Zum ersten Mal wird in dieser Arbeit das Autofluoreszenzsignal von M280-Beads zur Kalibrierung der Koinzidenzmessungen ausgenutzt. Die experimentell ermittelte Koinzidenzwahrscheinlichkeit wurde zu  $\approx 85\%$  bestimmt. Die dazugehörige  $\Gamma$  – Norm beträgt  $l_\Gamma \approx 1,9$ .

Beide in den ersten Teilen der Arbeit entwickelte Verfahren, die Sensitivitätserhöhung und die  $KMM$ , werden im letzten Teil der Arbeit zur sensitiven, quantifizierenden, Detektion von DNA-Molekülen mit Hilfe von zwei spektral verschiedenen, gut gelöschten molekularen Sonden, so genannten “Molecular Beacons” ( $QY_{rel} \approx 4\%$ ), eingesetzt. Für die Sonden wurde eine Dissoziationskonstante von  $k_d \approx 2 \cdot 10^{-10} M$  ermittelt. Mit einer Messdauer von nur 30 s konnte erstmals eine Konzentration von  $10^{-13} M$  der Zielsequenz des Organismus *Streptococcus Pneumoniae* bei einer Koinzidenzrate von  $\approx 0,23 Hz$  detektiert werden. Der, bei doppel-logarithmischer Auftragung, lineare Zusammenhang zwischen der detektierten Koinzidenzrate und der Targetkonzentration

---

on zeigt, dass bei einer Konzentration von  $1 \text{ fM}$  der Zielsequenz bei gleicher Messdauer von  $30 \text{ s}$  eine Koinzidenzrate von  $\approx 0,04 \text{ Hz}$  zu erwarten ist. Dies entspricht  $\approx 1,2$  koinzidenten Ereignissen in 30 Sekunden. Verglichen mit einer Detektion im offenen Volumen entspricht dies einer 100-fachen Steigerung der Empfindlichkeit bei einem zehntel der Messdauer.



# Abstract

In this work confocal single-molecule fluorescence detection is extended to two-color detection in microfluidic channels. The so-called two-color coincidence analysis can be applied to detect and to analyze molecular binding events, as demonstrated in this thesis. The great advantage of this method in comparison to the widely used FCS-method is its sensitivity which lies in the sub- $pM$  regime, as successfully demonstrated in this thesis. I performed measurements with diagnostic relevance which show, due to the sensitivity, the potential adaptability to early-stage detection of viral or bacterial infections.

The first part of this work shows by a number of microfluidic experiments that on the one hand, one of the basic equations, the Hagen-Poiseuille equation, holds and on the other hand it demonstrates how to describe quantitatively the increase in sensitivity. With the aid of this model it is possible to approximate the width of the microchannel with an error of about 10 % and to calculate flow velocities as a function of applied pressure. Making use of this microstructure enables to achieve a (at least) fourfold increase in Signal-to-Noise ( $SNR$ ).

In the next part of this work a novel statistical method, the Correlation-Matrix Method ( $CMM$ ), is introduced, which enables to judge the quality of a two-color coincidence measurement. Thus a measure for the efficiency of molecular interaction of two (or more) species can be calculated. The characteristic parameter, the so-called  $\Gamma$ -Norm,  $l_\Gamma$ , yields a value of two in case of a perfect coincidence sample. The value of this Euclidian norm is smaller than or equal to one for pure statistical coincidences (for which the probability is around 7 %). Values between two and one (practically between two and 1.4) indicate

a mixed sample of pure coincidences and single emitters.

To my knowledge in this work i report for the first time how to use the intrinsic autofluorescence of M280-Beads to calibrate coincidence measurements. Experimentally the fraction of coincident events could be estimated to be  $\approx 85\%$ . The corresponding  $\Gamma - Norm$  is  $l_{\Gamma} \approx 1,9$ .

Both in this work developed methods, the sensitivity increase by using microfluidics and its description and the CMM, are used to quantitatively detect single DNA target sequences of the organism *Streptococcus Pneumoniae* with the help of two spectrally separated and efficiently quenched ( $QY_{rel} \approx 4\%$ ) short hairpin-shaped oligonucleotides (Molecular Beacons). These smart-probes yield dissociation constants of  $k_d \approx 2 \cdot 10^{-10} M$ . In this thesis a so far unmached and unpublished aquisition time of  $30 s$  is reported to detect a concentration of the target sequence of  $10^{-13} M$ . The corresponding coincidence rate is  $\approx 0.23 Hz$ . The linear behavior (double-logathmic scale) of the coincidence rate as a function of target concentration indicates that one can expect a coincidence rate of  $0.04 Hz$  at a target concentration of  $1 fM$ . This rate corresponds to  $\approx 1.2$  coincident events in  $30$  seconds. In comparison with a measurement in an open volume we achieve a 100-fold improvement in sensitivity in one-tenth of the measurement time.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b>	<b>v</b>
<b>Abstract</b>	<b>ix</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>5</b>
<b>2 Theoretische Grundlagen</b>	<b>11</b>
2.1 Biochemischer Aufbau der DNA . . . . .	11
2.2 Nachweis von DNA mit Hilfe von PCR . . . . .	12
2.3 Absorption und Emission . . . . .	14
2.3.1 Jablonski-Diagramm zur Fluoreszenz . . . . .	14
2.3.2 Franck-Condon-Prinzip . . . . .	16
2.3.3 Stokes-Verschiebung . . . . .	18
2.3.4 Fluoreszenzlebensdauer und Quantenausbeute . . . . .	19
2.4 Effekte der Fluoreszenzlöschung . . . . .	20
2.4.1 Statische- und dynamische Löschung - Die Stern-Volmer Analyse . . . . .	20
2.4.2 Prinzip des Photoinduzierten Elektronentransfers (PET)	21
2.4.3 Förster Resonanz-Energietransfer (FRET) . . . . .	23
2.5 Hintergrundsignal durch Streuung . . . . .	24
2.6 Grundzüge der Strömungsmechanik . . . . .	25
2.6.1 Laminare und turbulente Strömung . . . . .	26
2.6.2 Laminare Rohrströmung - Die Hagen-Poiseuille Gleichung	27

<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>29</b>
3.1	Verwendete Geräte und Anlagen . . . . .	29
3.1.1	Beschreibung der konfokalen Einzelmolekülanlage . . .	29
3.1.2	Ensembleproben . . . . .	33
3.1.3	Absorptionsmessungen . . . . .	33
3.1.4	Ensemble-Fluoreszenz . . . . .	35
3.2	Die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) . . . . .	37
3.3	Beschreibung von Algorithmen zur Einzelmoleküldetektion . .	42
3.3.1	Die $4\sigma$ -Detektion . . . . .	42
3.3.2	Identifikation einzelner Moleküle mittels Interphotonen- Zeit . . . . .	44
3.4	Zubereitung der verwendeten Proben . . . . .	46
3.4.1	Verwendete Proben . . . . .	46
3.4.2	Verwendete Mikro- und Nanokügelchen . . . . .	49
3.4.3	Probenezubereitung für Einzelmolekülmessungen . . . . .	50
3.5	Herstellung des Mikrofluidikkanals . . . . .	51
3.6	Verwendete Software zur Datenaufnahme und Auswertung . .	52
3.6.1	Datenaufnahme und Vorbereitung zur Auswertung . .	53
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>57</b>
4.1	Stand der Technik - Bursterkennung . . . . .	57
4.1.1	Verschiedene Parameter von Atto655 als Funktion der Anregungsleistung . . . . .	57
4.1.2	Burstrate von Atto565 als Funktion der Konzentration .	61
4.2	Charakterisierung der Einzelmolekülanlage . . . . .	62
4.2.1	Spektrale Charakterisierung der Detektionskanäle . . .	63
4.2.2	Eindringtiefenvariation und Bestimmung relevanter Pa- rameter . . . . .	66
4.3	Mikrofluidische Experimente . . . . .	73
4.3.1	Vorexperimente zur mikrofluidischen Detektion von ein- zelnen Molekülen . . . . .	74

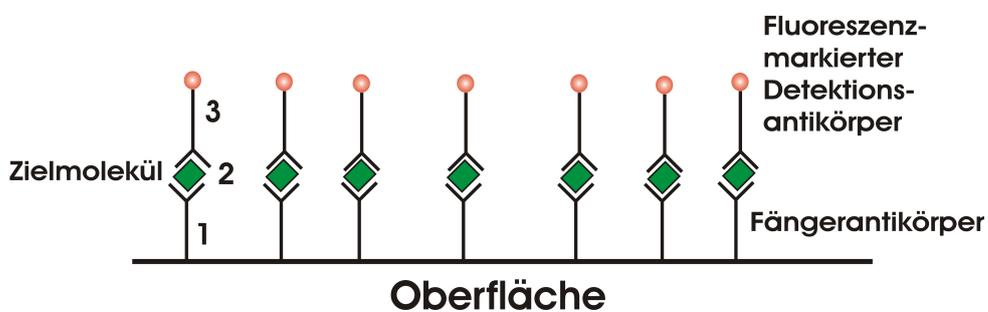
4.3.2	Beobachtung der Teilchenzahl als Funktion des Ortes entlang des Kanalquerschnitts . . . . .	81
4.3.3	Kontrolle der Flüssigkeit durch Anlegen von Druck . .	82
4.3.4	Semi-quantitatives Modell zur Beschreibung der Geschwindigkeitverteilung im Mikrokanal . . . . .	83
4.3.5	Verifizierung der parabolischen Geschwindigkeitsverteilung durch FCS Messungen . . . . .	87
4.3.6	Messung der Transitzeit als Funktion des Drucks . . .	89
4.3.7	Bestimmung des SNR als Funktion des Drucks . . . . .	91
4.3.8	Untersuchung der Signalhöhenverteilungen als Funktion des Drucks . . . . .	93
4.3.9	Verifizierung der laminaren Strömung durch Reynoldszahlen . . . . .	96
4.3.10	Sensitivitätserhöhung durch Anlegen von Druck . . . . .	97
4.3.11	Detektion von Farbstoffmolekülen auf 130 nm Beads .	98
4.4	Multiplexing Experimente . . . . .	103
4.4.1	Zwei-Farben Multiplexing Messung in offenem Volumen mit freiem Farbstoff . . . . .	104
4.5	Koinzidenzmessungen und die Korrelationsmatrix-Methode . .	107
4.5.1	Einführung der Korrelationsmatrix-Methode . . . . .	107
4.5.2	Monte-Carlo Einzelmolekülsimulationen zur $\Gamma - Norm$	110
4.5.3	Charakterisierung von statistischen Koinzidenzereignissen mittels Korrelationsmatrix-Methode . . . . .	114
4.5.4	Doppelt gelabelter DNA-Doppelstrang als Koinzidenzprobe . . . . .	119
4.5.5	Ausnutzung der M280-Bead Autofluoreszenz als ideale Koinzidenzprobe . . . . .	120
4.6	DNA-Detektion und Quantifizierung . . . . .	126
4.6.1	Charakterisierung der Hairpins auf Ensembleebene . .	128
4.6.2	Bestimmung der Dissoziationskonstanten mittels FCS	132

4.6.3	Durchführung einer Untersuchung zur Zwei-Farben Ko- inzidenzdetektion einzelner Pathogener DNA-Moleküle	136
<b>5</b>	<b>Ausblick und Diskussion</b>	<b>143</b>
	<b>Anhang</b>	<b>149</b>
1	Quelltext zur Bursterkennungssoftware . . . . .	149
2	Bedienungsanleitung zur Verwendung der Auswertesoftware .	149
2.1	Bursterkennung mit $4\sigma$ und $3\sigma$ Detektion . . . . .	151
2.2	Bursterkennung mit festem Schwellwert . . . . .	154
	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>161</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>175</b>

# 1 Einleitung

Die Untersuchung und die diagnostische Analyse von Erregern [1, 2], wie sie heutzutage durchgeführt wird, benötigt eine hoch spezifische und sehr sensitive Detektion von Proteinen, DNA oder RNA. Diese Tatsache erfordert die Entwicklung von Methoden, die das komplexe Zusammenspiel von mehreren Makromolekülen, wie Antigen-Antikörper Wechselwirkungen oder DNA Hybridisierung, aufklären.

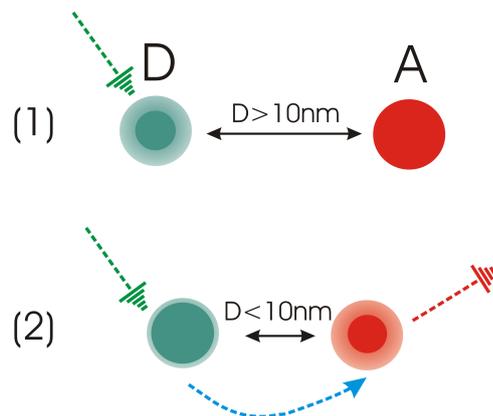
Der berühmte ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)[3] , z.B., verwendet einen auf einer Oberfläche immobilisierten Antikörper, dessen Aufgabe es ist, das Zielmolekül zu fangen und es aus der Lösung auf die Oberfläche zu ziehen (Abb.1.1).



**Abbildung 1.1:** Idealisiertes Schema einer einfachen Fluoreszenzdetektion von Zielmolekülen mit Hilfe von Antikörpern in drei Schritten. An eine Oberfläche fixierte Antikörper “fangen” oder “fischen” das Zielmolekül aus der Lösung (z.B.) Blut (1&2). Im nächsten Schritt bindet ein weiterer, mit einem Fluorophor, markierter Antikörper gegen das gefangene Molekül. Nach einem Waschschrift, der ungebundene Detektionsantikörper entfernt, kann die Probe zur Fluoreszenz angeregt werden. Es emittieren nur diejenigen Moleküle, die auch einen Detektionsantikörper tragen.

Danach wird ein weiterer Antikörper, meistens ein markierter Antikörper, eingesetzt, um das Zielmolekül zu erkennen und zu detektieren. Durch eine geschickte Wahl der Antikörper und durch die entsprechend dichte Belegung der Oberfläche können sub-nanomolare Konzentrationen der Zielmoleküle (hier Antigene) detektiert werden.

Um diese Verfahren in ihrer maximalen Sensitivität anwenden zu können, sind optische Methoden unerlässlich, mit Hilfe derer es möglich ist, einzelne fluoreszierende Spezies zu detektieren [4, 5]. In der Regel machen sich solche Einzelmolekülmethode [6, 7] in der Fluoreszenzspektroskopie die Verwendung von mehreren spektral getrennten Fluorophoren [8] zu nutze, um molekulare Interaktionen zwischen komplexen Systemen zu beobachten.

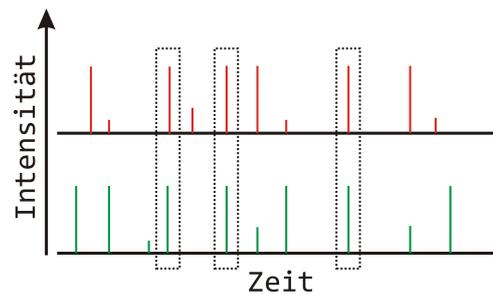


**Abbildung 1.2:** Schema des distanzabhängigen Förster-Resonanz Energietransfer (FRET). Im Fall (1) wird keine Energie vom Donor (D) auf das Akzeptormolekül (A) übertragen. Es findet lediglich eine sogenannte Donor-Only Anregung statt. Im Fall (2) unterschreiten die Moleküle den Abstand von ca.  $10\text{nm}$  und die Energie kann strahlungslos vom Donor auf den Akzeptor übertragen werden. Die Emission des Donors reduziert sich dadurch.

Experimente zum Förster-Resonanz Energietransfer (FRET) [9, 10, 11, 12, 13, 14] (Abbildung 1.2), bei denen die Anregungsenergie eines Donor- Moleküls strahlungslos auf ein anderes, rotverschobenes Akzeptor-Fluorophor über eine

---

Distanz von  $1 - 10\text{ nm}$  übertragen wird, können ausgenutzt werden, um den Donor/Akzeptor Abstand und Distanzänderungen zu bestimmen und damit eine genauere Beschreibung molekularer Interaktion liefern[15, 16]. In Kombination mit der Einzelmolekül- Fluoreszenz- Spektroskopie konnte FRET bereits zur Studie der Wechselwirkung von mit Donor/Akzeptor-Molekülen markierten Proteinen eingesetzt werden, während sie durch das Anregungsvolumen eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops diffundieren. Die Ausnutzung von FRET erfordert allerdings, dass die beteiligten Fluorophore dicht bei einander liegen. Dieser Umstand ist nicht immer möglich, wenn man bedenkt, dass die Markierung von Proteinen nicht einfach ist und ein sehr genaues Wissen über die Binde- und Interaktionsstellen der beteiligten Makromoleküle erfordert.



**Abbildung 1.3:** Schema einer zwei-Farben-Koinzidenzdetektion. Zwei spektral getrennte Kanäle registrieren von zwei Molekülspezies Einzelmolekülsignale.

Alternativ können zwei spektral getrennte Fluorophore [17, 18] gleichzeitig angeregt und die zwei-Farben Koinzidenzdetektion (Abbildung 1.3) kann auf spektral separierten Kanälen bewerkstelligt werden. Die simultane Detektion von Einzelmolekülphotonenschauer (engl. Bursts) kann dazu verwendet werden, gemeinsame Diffusion (Kokalisation) und damit die Bindung der beiden Interaktionspartner anzuzeigen und zu untersuchen. Ähnlich dazu kann die Mehrfarben- Fluoreszenzkorrelations-Spektroskopie [19, 20, 10, 21, 22, 23] zum Studium molekularer Wechselwirkung eingesetzt werden[24, 25, 26]. Diese Me-

thode ist allerdings nur für nanomolare Konzentrationen der Probenmoleküle gut geeignet, da die Korrelationsanalyse [27] ein deutliches Fluoreszenzsignal erfordert [28, 29]. Die Mehrfarben-Einzelmoleküldetektion [30, 31, 32, 33, 34] von Zielmolekülen dagegen, wurde zur Detektion piko- bis femtomolarer Konzentration angewendet und bietet so die Möglichkeit, sehr sensitiv molekulare Interaktionen zu messen. Der Nachteil liegt leider darin, dass die Koinzidenzdetektion nicht zwischen echten und statistischen Koinzidenzen unterscheidet [35]. In der hier vorliegenden Arbeit wird mit Hilfe von mikrofluidischen Methoden, ihrer quantitativen Beschreibung im Sinne der Berechnung von Flußgeschwindigkeiten, der Sensitivitätserhöhung und der Anwendung einer Analysemethode, basierend auf einer Korrelationsmatrix und der daraus resultierenden euklidischen Norm eines Merkmalsvektors ein Maß für die molekulare Wechselwirkung zwischen verschiedenen Probemolekülen eingeführt.

Im Zuge der Detektion von Bio- und insbesondere DNA-Molekülen ist die Nachfrage an von PCR [36, 37, 38, 39] unabhängigen (s. Kap.2.2) und hochempfindlichen Detektionsmethoden zur Quantifizierung von Krankheitserregern und eventueller Bestimmung des Stadiums einer Infektion, gerade im Licht der MRSA-Forschung gestiegen. MRSA (lat. *Staphylococcus aureus*) ist ein Bakterium, das für eine Vielzahl von Erkrankungen, z.B. der Haut, der Muskulatur und sogar der Atemwege verantwortlich ist. Durch dessen hohe Verbreitung ist es zu einem oft gewählten Zielorganismus für medizinische Untersuchungen geworden. In diesem Zusammenhang verfolgt das EU-Projekt TheraEdge das Ziel, die Entwicklung eines robusten, kompakten und möglichst wartungsarmen Geräts, das sowohl optische Komponenten zur Fluoreszenzanregung - und Detektion als auch Methoden der Mikrofluidik [40, 41, 42, 43, 44, 45, 46] einsetzt, um bakterielle oder virale DNA-Moleküle, die dem Organismus zuvor in einem Lyseschnitt entnommen werden, ohne amplifizierenden Schritt sensitiv zu detektieren. Die gesamte Analyse soll nicht mehr als 20 Minuten betragen und dem Anwender (Arzt oder Pflegepersonal), basierend auf den Ergebnissen, sogar Behandlungsmöglichkeiten aufzeigen. Im Rahmen des Projekts wurde ein

---

kurzes (100b) DNA Fragment des Erregers der Lungentzündung *Streptococcus Pneumoniae* als Modellsequenz für weitere Analysen und z.B. die Entwicklung der notwendigen Pufferlösungen (Hybridisierungspuffer, Waschpuffer, Lysepuffer...) ausgewählt.

Motiviert durch das Projekt wird hier die hochsensitive Detektion der DNA-Zielsequenz des Erregers mit Hilfe der Zwei-Farben Koinzidenzdetektion vorgestellt. Es werden zwei spektral verschiedene, effizient gelöschte [47, 48, 49, 50, 3, 51], molekulare Sonden (eng. Smart-Probes oder Molecular Beacons [52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 3]) gleichzeitig gegen das selbe Zielmolekül hybridisiert [62]. Bei gleichzeitiger Anregung der Fluorophore an den Sonden wird ein Koinzidenzsignal detektiert, was ein sicheres Zeichen dafür ist, die Zielsequenz detektiert zu haben.

Wendet man die Korrelations-Matrix Methode (*KMM*) auf eine Zwei-Farben Probe an, kann klar gezeigt werden, dass zwischen echten Koinzidenzproben molekularer Interaktionen und statistischen Koinzidenzereignissen unterschieden werden kann. Die *KMM* liefert einen Wert der  $\Gamma - Norm$ , der hier  $l_\Gamma$  genannt wird, der für Zwei-Farben Experimente zwischen Null und zwei liegt. Je größer die Abweichung von  $l_\Gamma$  vom Maximalwert von zwei ist, desto kleiner ist das Verhältnis von echten zu zufälligen Koinzidenzereignissen. Die  $\Gamma - Norm$  konvergiert gegen einen Wert von eins oder kleiner für eine Probe mit vollständig unabhängigen Einzelemittlern (z.B. freie Fluorophore).



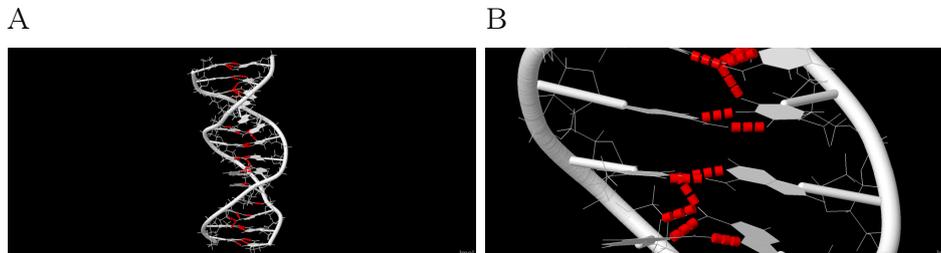
## 2 Theoretische Grundlagen

### 2.1 Biochemischer Aufbau der DNA

Da in dieser Arbeit bakterielle DNA-Sequenzen nachgewiesen und quantifiziert werden, soll der folgende Abschnitt über den Aufbau von sogenannter Desoxyribonukleinsäure (DNS, oder DNA) aufklären. Im Wesentlichen besteht jedes DNA-Makromolekül aus drei Komponenten: Dem Phosphatrückrad, den sogenannten Basen (A)denin, (T)hymen, (G)uanin und (C)ytosin und den Wasserstoffbrücken, die komplementäre Basen (weiße ausgefüllte Sechsecke, Abb. 2.1 ) miteinander verbinden.

Ein sogenanntes Nukleotid bildet eine Einheit aus einem Phosphat, einer Desoxyribose (Zucker) und einer o.g. (Nukleo)Base. Die Phosphatreste und der Zucker bilden das negativ geladene, stabilisierende und hydrophobe Phosphatrückrad.

In einem DNA-Doppelstrang sind die Basen eines Nukleotids in folgendem Schema komplementär und bilden zwischen ihnen Wasserstoffbrücken aus. Guanin ist komplementär (d.h. bindet) zu einem Adenin, wobei Thymin immer zum Adenin komplementär ist. Eine Besonderheit an der Bindung zwischen den Basen ist, dass G-C Paare drei H-Brücken und A-T nur zwei H-Brücken ausbilden. Damit ist die Stabilität und die Schmelztemperatur maßgeblich durch den sogenannten G-C Gehalt definiert.



**Abbildung 2.1:** Ein willkürlicher DNA-Doppelstrang mit rot markierten Wasserstoffbrückenbindungen und klar zu erkennendem Phosphatrückrad. (A) zeigt eine vollständige aus zwölf Basenpaaren bestehende DNA-Doppelhelix und (B) ist die Vergrößerung des mittleren Abschnitts.

## 2.2 Nachweis von DNA mit Hilfe von PCR

Die PCR (polymerase chain reaction) ist ein Verfahren zur exponentiellen *in vitro* Vervielfältigung von definierten DNA-Abschnitten [63]. Die eigentliche Amplifizierung findet mit Hilfe einer sogenannten DNA-Polymerase statt, die die Synthese von DNA-Strängen durch die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen einzelnen Nukleotiden katalysiert. Sie ist also im Wesentlichen für die Replikation der DNA während der Zellteilung zuständig. Zur Vervielfältigung werden noch sogenannte Primer benötigt. Dies sind kurze ( $\geq 17$  Nukleotide) einzelsträngige DNA-Moleküle, die komplementär zu spezifischen Bereichen der einzelnen Strängen des zu amplifizierenden DNA-Doppelstrangs sind. Die Synthese erfolgt an beiden Strängen (beginnend am 3'-Ende der Primer) gegenläufig, um zu gewährleisten, dass der Abschnitt zwischen den Primern amplifiziert wird.

Im Wesentlichen läuft die PCR in vier Schritten ab [63]:

1. Denaturierung: Der zu amplifizierende DNA-Doppelstrang wird bei etwa  $90^{\circ}\text{C}$  denaturiert.
2. Anlagerung: In diesem Schritt hybridisieren die in der Lösung (im Überschuss) vorhandenen Primer an die komplementäre Sequenz im Zielstrang

bei etwa  $37^{\circ}\text{C}$ .

3. Polymerisierung: Die DNA-Polymerase vervielfältigt die Zielsequenzen beginnend bei den Primern. Der optimale Temperaturbereich liegt bei etwa  $70^{\circ}\text{C}$ .
4. Im letzten Schritt folgt eine weitere Denaturierung, um die neu erstellten Teilstücke von den Originalsträngen abzulösen. Nach diesem Schritt wird in jedes Mal die Anzahl der für die Amplifizierung zur Verfügung stehenden Stränge verdoppelt.

Diese Schritte werden zu einem Zyklus zusammengefasst. Um eine, relativ zur Anfangsmenge der zu vervielfältigenden DNA,  $10^6 - 10^7$ -fache Amplifizierung zu erreichen, werden in der Regel 25 – 40 Zyklen durchlaufen[63].

Die PCR bietet die Möglichkeit selbst kleinste Konzentrationen viraler oder bakterieller DNA so weit zu vervielfältigen, um sie z.B. in einfachen UV-Absorptionsmessungen (OD260-Methode) nachweisen zu können. Eine weitere Nachweismethode für die entstandenen PCR Fragmente ist die Agarose-Gelelektrophorese. Damit ist die Methode zur Früherkennung von Infektionen geeignet.

Die Vervielfältigung von DNA mittels PCR muss allerdings sehr sorgfältig vorbereitet werden. Die Auswahl und das Design der Primer ist dabei von besonderer Bedeutung. Sie müssen unter anderem hochspezifisch für die Zielsequenz sein, um die fälschliche Vervielfältigung von fremder, durch Verunreinigungen eingebrachte DNA, zu minimieren. Außerdem müssen das korrekte Temperaturprogramm für die einzelnen Schritte der PCR gewählt werden. Zum Beispiel muss die Temperatur für den Polymerisierungsschritt auf die verwendete Polymerase angepasst werden, sodass ein effizientes Arbeiten der Polymerase gewährleistet werden kann.

Aus diesem Grund werden in der medizinischen Diagnostik Verfahren entwickelt, die die hochsensitive und vor allem amplifizierungsfreie Detektion von pathogener DNA ermöglichen. Ein solcher Ansatz wird im EU-Projekt

TheraEdge verfolgt. Dabei werden die Ziel-DNA Moleküle im Wesentlichen auf der Oberfläche von magnetischen Beads mit hoher Bindekapazität mit einer dazu komplementären Fängersequenz gebunden und über eine weitere komplementäre, fluoreszenzmarkierte Detektorsequenz auf einem Weitfeldmikroskop sichtbar gemacht. Überschüssige Detektormoleküle können über magnetische Separation entfernt werden, um das Hintergrundsignal zu reduzieren.

## 2.3 Absorption und Emission

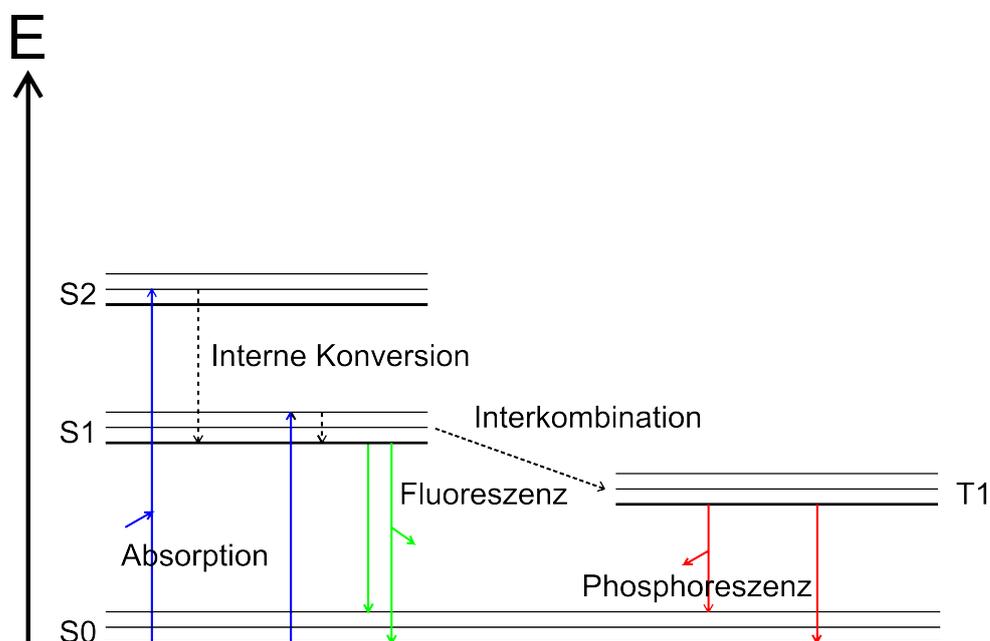
### 2.3.1 Jablonski-Diagramm zur Fluoreszenz

Fluoreszenz ist das Licht, das ein Molekül oder Atom nach der Absorption ( $\tau_{ABS} \approx 10^{-15} \text{ s} = 1 \text{ fs}$ ) eines Photons emittiert, dass die Bohr'sche Resonanzbedingung

$$(2.1) \quad \Delta E = E_1 - E_0 = h \cdot \nu$$

zwischen dem Grundzustand und einem angeregten Zustand erfüllt, wobei  $h$  die Planck'sche Konstante und  $\nu$  die Frequenz des einfallenden Photons ist. Der Absorptionsprozess geschieht so schnell, dass eine örtliche Verschiebung der Atomkerne zu vernachlässigen ist (siehe Franck-Condon Prinzip 2.3.2).

Molekulare Absorptions- und Emissionsprozesse werden in der Regel durch das in Abbildung 2.2 dargestellte Jablonski Diagramm, einem Energieterm-Schema beschrieben.



**Abbildung 2.2:** Das Jablonski-Diagramm zur Beschreibung intramolekularer Übergänge (verändert übernommen aus [64]). Die mit  $S_0$ ,  $S_1$  und  $S_2$  bezeichneten dicken Linien stellen elektronische Zustände dar, wobei  $S_0$  den elektronischen Grundzustand bezeichnet. Die darüberliegenden feineren Linien deuten vibronische Zustände des Moleküls im jeweiligen elektronischen Zustand an. Blaue Pfeile kennzeichnen hier immer Absorptionsprozesse. Grüne und rote jeweils die Emission.

Bei Raumtemperatur liegen die meisten Moleküle im Grundzustand vor, da die thermische Energie nicht genügt, um Moleküle in einen angeregten Zustand zu versetzen. Bei der Absorption von Licht (blaue Pfeile) bevölkert das Molekül zuerst ein vibronisches Niveau eines angeregten Zustands hier z.B.  $S_1$  oder  $S_2$ . Als nächstes relaxiert das Molekül über einen Prozess, den man Interne Konversion nennt (vertikale gestrichelte Pfeile), in den untersten Schwingungszustand des ersten angeregten elektronischen Zustands  $S_1$ . Dieser Prozess nimmt eine Dauer von etwa  $\tau_{IC} \approx 10^{-12} \text{ s} = 1 \text{ ps}$  in Anspruch [64]. Dabei geben die beobachteten Fluorophore überschüssige Energie bei Stößen mit Lösungsmittelmolekülen ab.  $\tau_{IC}$  entspricht gerade dem reziproken Wert der

Stoßrate. Bevor also ein Molekül fluoreszieren kann, relaxiert es zuerst immer in das thermisch stabile unterste schwingungsfähige Niveau des  $S_1$ -Zustands. Aus diesem angeregten Zustand relaxiert das Molekül unter Aussendung eines zur Absorption rotverschobenen Photons (Stokes-Verschiebung (engl. Stokes-Shift) vergleiche Kap. 2.3.3) in den Grundzustand. Dieser strahlende Übergang besitzt eine Lebensdauer von etwa  $\tau_{fl} \approx 10^{-8} \text{ s} - 10^{-9} \text{ s}$  [64].

Mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit kann ein Molekül, welches sich im  $S_1$  Zustand befindet, in Folge einer (quantenmechanisch verbotenen) Spinumkehr in einen sogenannten Triplett-Zustand  $T_1$  übergehen (Interkombination, engl. Intersystem Crossing). Bei der Relaxation in den Grundzustand wird ein relativ zur Fluoreszenz rot verschobenes Photon (kleinere Energiedifferenz zum  $S_0$ ) als Phosphoreszenz frei.

Als Besonderheit zur Absorption und Emission eines Moleküls ist anzumerken, dass sich das Absorptionsspektrum spiegelsymmetrisch zum Emissionsspektrum verhält. Diese Spiegelbild-Regel rührt daher, dass sich die Kernkonfiguration des Moleküls bei der Anregung nicht wesentlich verändert [64]. Das resultiert daher, dass der Abstand der vibronischen Zustände im angeregten Zustand den Abständen der vibronischen Zustände im Grundzustand ähnlich ist (Siehe Kap. 2.3.2). Außerdem sind im Wesentlichen die selben Übergänge bei der Absorption und Emission von Licht involviert.

### 2.3.2 Franck-Condon-Prinzip

Abbildung 2.3 zeigt eine für elektronische Zustände anharmonische Potentialfunktion (Morsepotential)

$$(2.2) \quad U(r) = D \cdot (1 - e^{-\alpha(r-r_0)})^2$$

für ein zweiatomiges Molekül. Dabei gibt  $\alpha$  mit

$$(2.3) \quad \alpha = \sqrt{\frac{k}{2D}}$$

die Krümmung der Potentialkurve in der Umgebung des Minimums und  $k$ , die aus der klassischen Mechanik bekannte Kraftkonstante an [65].  $D$  gibt außerdem die Dissoziationsenergie an und  $r = r_0$  ist der Gleichgewichtsabstand der Atome, bei dem repulsive und attraktive Wechselwirkungen zwischen den Atomen ausgeglichen sind.

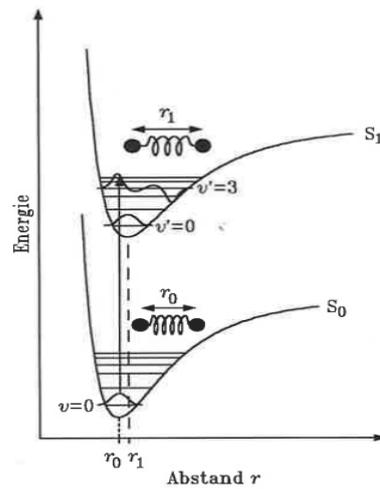
Die Potentiale sind als Funktion des Kern-Kern Abstands der Moleküle aufgetragen. Wie auch im Jablonski-Diagramm angedeutet, besitzt jeder elektronische Zustand (hier  $S_0$  und  $S_1$ ) Schwingungszustände  $\nu$  in denen sich das Molekül befinden kann. Nach der Born-Oppenheimer Approximation finden elektronische Übergänge so schnell statt ( $1\text{ fs}$ ), dass sich die relativen Kernkoordinaten nicht verändern, da die Schwingungsdauer etwa  $10^{-13}\text{ s}$  in Anspruch nimmt. Symbolisiert wird dies durch die senkrechte Linie (keine Änderung in  $r$ -Richtung) vom elektronischen Grundzustand in einen Schwingungszustand des (hier) ersten elektronischen angeregten Zustands [66].

Die Schnittpunkte der Energieniveaus mit den Potentialfunktionen geben die Umkehrpunkte der Schwingung an.

Die Anregung von einem Zustand in einen anderen ist umso wahrscheinlicher je größer der Überlapp der eingezeichneten Vibrationswellenfunktionen  $\psi_\nu$  ist. Man erkennt, dass  $\psi_\nu$  ausschließlich von den Koordinaten der Kerne abhängt. Dieser Überlapp skaliert direkt mit der Intensität der absorbierten Strahlung [65].

Die Energieeigenwerte  $E_\nu$  (Schwingungsenergiezustände) der Schrödingergleichung können dann für den anharmonischen Oszillator mit

$$(2.4) \quad E_\nu = hc\omega_0\left(\nu + \frac{1}{2}\right) - \frac{h^2c^2\omega_0^2}{4D}\left(\nu + \frac{1}{2}\right)^2$$



**Abbildung 2.3:** Franck-Condon Prinzip. Entnommen aus [66].

angegeben werden mit  $\nu = 0, 1, 2, 3$ , wobei der erste Term die diskreten Energieeigenwerte für den harmonischen Oszillator berechnet [65].

### 2.3.3 Stokes-Verschiebung

Die Stokes-Verschiebung (oder Rotverschiebung) beschreibt einen intrinsischen “Energieverlust” von der Absorption zur Emission von Photonen fluoreszierender Moleküle. Der Grund für die Verschiebung des Maximums des Absorptionsspektrums um  $\lambda_{stokes}$  ist der Prozess der internen Konversion, der dem System als Wärme “verloren” geht. Es gilt daher

$$(2.5) \quad \lambda_{stokes} = \lambda_{em} - \lambda_{abs}.$$

Für die meisten Fluorophore ergibt sich eine Stokes-Verschiebung von ca.  $20 \text{ nm} - 40 \text{ nm}$ .

### 2.3.4 Fluoreszenzlebensdauer und Quantenausbeute

Die Fluoreszenzquantenausbeute gibt das Verhältnis von emittierten zu absorbierten Photonen

$$(2.6) \quad QY = \frac{\#em}{\#abs}$$

an und ist damit ein Maß für die Wahrscheinlichkeit für einen strahlenden  $S_1 - S_0$ -Übergang. Für viele Fluorophore, z.B. Rhodaminfarbstoffe, liegt dieser Wert bei  $\approx 0.9$ . Sie kann auch mit Hilfe von Ratenkonstanten für radiative Übergänge  $k_{rad}$  und nicht radiative Übergänge  $k_{nr}$  als

$$(2.7) \quad QY = \frac{k_{rad}}{k_{rad} + k_{nr}}$$

ausgedrückt werden [64]. In der Regel ist die Quantenausbeute aufgrund der Stokes-Verschiebung (und dem damit einhergehenden Energieverlust) kleiner eins.

Die sogenannte Fluoreszenzlebensdauer ist die Zeit, die das Molekül (durchschnittlich) im angeregten Zustand verweilt, bevor es in den Grundzustand relaxiert. Sie ist definiert als

$$(2.8) \quad \tau_{fl} = \frac{1}{k_{rad} + k_{nr}}.$$

Die intrinsische oder natürliche Lebensdauer [64] ist die Zeit eines Fluorophors im angeregten Zustand unter Vernachlässigung nicht-radiativer Prozesse, also

$$(2.9) \quad \tau_n = \frac{1}{k_r}.$$

Der Zusammenhang zur Quantenausbeute ist sofort durch

$$(2.10) \quad \tau_n = \frac{\tau_{fl}}{QY}$$

gegeben.

## 2.4 Effekte der Fluoreszenzlöschung

### 2.4.1 Statische- und dynamische Löschung - Die Stern-Volmer Analyse

Der typische Weg die durch Stöße mit anderen Molekülen (hier Löschmolekülen, engl. Quencher) induzierte Fluoreszenzlöschung (z.B. durch induzierten Elektronentransfer, vgl. Kap. 2.4.2) zu beschreiben ist die sogenannte Stern-Volmer Gleichung

$$(2.11) \quad \frac{I_0}{I} = 1 + K_{SV} \cdot [Q] = 1 + k_q \cdot \tau_0 \cdot [Q].$$

Dabei ist mit  $K_{SV} = k_q \cdot \tau_0$  die Stern-Volmer Löschkonstante,  $k_q$  die bimolekulare Löschkonstante (hier die Stoßrate) und  $\tau_0$  ist die Fluoreszenzlebensdauer in Abwesenheit des Quenchers [64].  $[Q]$  ist die Konzentration des Löschmoleküls,  $I_0$  und  $I$  geben die Fluoreszenzintensität ohne und mit Quencher an. In der Regel ergibt sich beim Auftragen der relativen Fluoreszenzintensität  $\frac{I_0}{I}$  gegen  $[Q]$  ein linearer Zusammenhang, wenn nur das sogenannte dynamische, also kollisionsinduzierte Löschen involviert ist. In dem Fall ist die Stern-Volmer Konstante  $K_{SV} = K_{dyn}$ .

Außer der Stoßlöschung kann das Fluorophor noch durch die sogenannte Komplexbildung zwischen Quencher und Fluorophor gelöscht werden. Dabei spricht man im Gegensatz zur dynamischen Löschung von statischer Löschung. Ist bekannt, dass bei dem Experiment beide Prozesse zur Löschung beitragen, oder erkennt man einfach eine Abweichung des oben angesprochenen linea-

ren Zusammenhangs, wird der Prozess durch die erweiterte Stern-Volmer Beziehung

$$(2.12) \quad \frac{I_0}{I} = (1 + K_D \cdot [Q]) + (1 + K_S \cdot [Q])$$

beschrieben [64]. Dabei sind jetzt  $K_D$  und  $K_S$  die Stern-Volmer Konstanten für dynamisches und statisches Löschen.

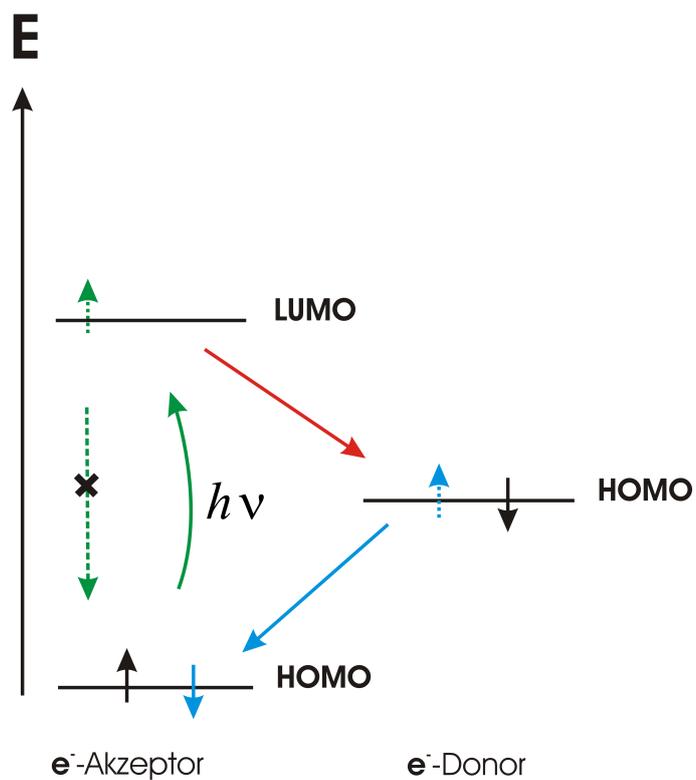
### 2.4.2 Prinzip des Photoinduzierten Elektronentransfers (PET)

Der photoinduzierte Elektronentransfer (PET) ist ein Löschprozess, der häufig (aber nicht ausschließlich) bei der sogenannten Exziplexbildung (Komplex von Teilchen, von denen sich eins im angeregten Zustand befindet) von Atomen und Molekülen stattfindet. Dabei ist es von dem Exziplex abhängig, ob sich der Donor oder der Akzeptor angeregt ist. Nach der elektronischen Anregung des Akzeptors durch Absorption eines Photons (grüner, gebogener Pfeil) in das LUMO (engl. Lowest unoccupied molecular orbital), transferiert der Elektronendonator ein Elektron aus seinem HOMO (engl. highest occupied molecular orbital) in das HOMO des Akzeptors und besetzt damit den letzten freien Zustand.

Der Elektronenakzeptor ist nun nicht mehr in der Lage durch elektronische Relaxation vom LUMO zurück ins HOMO die Energie in Form von elektromagnetischer Strahlung abzugeben (grüner durchgestrichener Pfeil) (Pauli-Prinzip). Stattdessen wird das Elektron des Akzeptors, welches sich im LUMO befindet, da es energetisch günstiger ist, in das HOMO des Donors versetzt (roter Pfeil). Der ganze Prozess tritt bei direktem van-der Waals Kontakt ein und ist vollständig strahlungslos.

Die freie Reaktionsenthalpie eines PET-Prozesses kann mit der sogenannten Rehm-Weller Gleichung

$$(2.13) \quad \Delta G_{ET} = E(D^+/D) - E(A/A^-) - \Delta G_{00} - \frac{e^2}{\epsilon d}$$



**Abbildung 2.4:** Fluoreszenzlöschung durch photoinduzierten Elektronentransfer.

beschrieben werden [64]. Der Prozess der Reduktion



beim Donor wird durch  $E(D^+/D)$  beschrieben. Die Reduktion des Akzeptors ist



und dem wird durch den Ausdruck  $E(A/A^-)$  Rechnung getragen [64]. Mit  $\Delta G_{00}$  ist die Energie des  $S_0 \rightarrow S_1$  Übergangs des Fluorophors gemeint, der, abhängig vom System, entweder Donor oder Akzeptor sein kann. Der letzte Term der Rehm-Weller Gleichung beschreibt einfach die Coulomb-Wechselwirkung, wobei  $\varepsilon$  die Dielektrizitätskonstante und  $d$  der Abstand zwischen den beiden Ladungen ist.

### 2.4.3 Förster Resonanz-Energietransfer (FRET)

Ein weiterer stark distanzabhängiger, strahlungsgloser Energietransfer, der das detektierte Fluoreszenzsignal beeinflusst, ist der Förster- Resonanz- Energietransfer. An diesem Prozess sind in der Regel zwei Fluorophore (Donor, Akzeptor) beteiligt. Er tritt jedes Mal auf, wenn das Absorptionsspektrum des Akzeptors mit dem Emissions-/Fluoreszenzspektrum des Donors überlappt und der Abstand zwischen den Molekülen etwa  $1 \text{ nm} \leq r \leq 10 \text{ nm}$  beträgt.

Die Rate  $k_{FRET}(r)$  des Übertrags ist durch

$$(2.16) \quad k_{FRET}(r) = \frac{1}{\tau_D} \left( \frac{R_0}{r} \right)^6$$

charakterisiert, wobei  $\tau_D$  die Lebensdauer des Donors in Abwesenheit des Akzeptors ist [64]. Die FRET-Rate ist direkt proportional zum Überlappintegral  $J(\lambda)$  der o.g. Spektren der Fluorophore mit

$$(2.17) \quad k_{FRET}(r) \propto J(\lambda) = \int d\lambda \cdot f_D(\lambda) \cdot \epsilon_A(\lambda) \cdot \lambda^4$$

Dabei ist  $f_D$  das Fluoreszenzspektrum des Donors und  $\epsilon_A$  das wellenlängenabhängige Absorptionsspektrum des Akzeptors.

$R_0$  ist der sogenannte Försterradius. Dies ist der Abstand, der durch 50% der

Transfereffizienz beschrieben wird. Die Effizienz  $E$  wird durch die Försterformel

$$(2.18) \quad E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6}$$

erklärt [64]. Bemerkenswert ist dabei die  $r^6$ - Abstandsabhängigkeit. Das heißt, dass kleine Änderungen im Abstand schon große Auswirkungen auf die Transfereffizienz besitzen.

In der Praxis ist FRET dadurch zu erkennen, dass bei Donoranregung die Fluoreszenzintensität des Donors (je nach Überlappintegral) stark verringert und der Akzeptor stattdessen, obwohl nicht direkt angeregt, emittiert.

## 2.5 Hintergrundsignal durch Streuung

Ein störender Effekt, der bei fluoreszenzbasierten Messungen auftritt ist der sogenannte Raman-Effekt. Beim Raman-Effekt handelt es sich um einen sogenannten inelastischen Streuvorgang von Licht. Beleuchtet man eine Probe mit Laserlicht der Frequenz  $\nu_0$ , so wird beobachtet, dass das Licht, das nach der Wechselwirkung mit den Probenmolekülen detektiert wird im Wesentlichen aus der ursprünglichen Laserstrahlung (Rayleigh-Streuung, durch elastischen Streuprozess) und einem relativ dazu verschobenen Frequenzanteil  $\nu_R$  besteht. Je nach dem ob  $\nu_{streu} > \nu_0$  oder  $\nu_{streu} < \nu_0$  ist, wird zwischen ANTI-Stokes und Stokes-Streuung unterschieden. Man mißt also insgesamt drei Linien mit  $\nu_0 = \nu_{streu}$ , als Rayleigh,  $\nu_0 + \Delta\nu$  als Stokes und  $\nu_0 - \Delta\nu$  als Anti-Stokes [66]. Das oszillierende E-Feld des Laserstrahls induziert, aufgrund seiner Wechselwirkung mit den Elektronenhüllen der Atome/Moleküle, erzwungene Schwingungen und damit ein oszillierendes Dipolmoment, das die Fähigkeit der Elektronen zu Schwingen charakterisiert. Dieses Dipolmoment wird beschrieben durch

$$(2.19) \quad \mu_{ind}^{el} = \alpha \cdot E = \alpha \cdot E_0 \cdot \cos(2\pi \cdot \nu_0 t)$$

wobei  $\alpha = \alpha(\nu)$  die Polarisierbarkeit angibt [66]. Man findet, dass die Intensität  $I$  des gestreuten Lichts proportional zu

$$(2.20) \quad I \propto \nu_0^4 (\mu_{ind}^{el})^2$$

ist [66]. Glücklicherweise (zumindest für die Fluoreszenzspektroskopie) ist der Raman-Streuquerschnitt ( $\sigma \approx 10^{-30} \text{ cm}^{-1}$ ) (was im Prinzip auch den limitierenden Faktor in der Ramanspektroskopie aus Sicht der Sensitivität ausmacht) und damit die Wahrscheinlichkeit ein Raman-Photon zu detektieren um einige Größenordnungen kleiner als die Wahrscheinlichkeit ein Molekül zur Fluoreszenz anzuregen.

Rayleigh Streuung dagegen, da sie durch elastische Streuung zustande kommt, wird, wie auch das Anregungslicht selbst (fast) nicht detektiert, da es durch geeignete Filter eliminiert werden kann.

## 2.6 Grundzüge der Strömungsmechanik

Der folgende Abschnitt klärt über notwendige Kenntnisse der Fluidmechanik auf, die für diese Arbeit verwendet werden. Obwohl die Ergebnisse in dieser Arbeit immer unter der Annahme ausgewertet werden, dass in dem verwendeten Kanal die Strömung laminar ist und es sich außerdem bei den Pufferlösungen um ein sogenanntes Newton'sches Fluid handelt, soll nochmal in aller Kürze auf den Unterschied (zwischen laminarer und turbulenter Strömung) und dafür wichtige Größen eingegangen werden.

### 2.6.1 Laminare und turbulente Strömung

Unter laminarer Strömung versteht man grundsätzlich die Strömung, die auf die sogenannte innere Reibung zurückzuführen ist [67].

Eine feste Wand wird von einer beweglichen Platte der Querschnittsfläche  $A$  durch eine Flüssigkeitsschicht der Dicke  $z$  getrennt. Um die Platte mit einer Geschwindigkeit  $v$  parallel zur Wand zu verschieben wird die Kraft

$$(2.21) \quad F = \eta A \frac{v}{z}$$

benötigt [67].  $\eta$  ist die Viskosität der Flüssigkeit. Hier wird die Reibung zwischen Flüssigkeitsschichten beschrieben. Je kleiner der Abstand  $z$  desto schneller gleiten die einzelnen Molekülschichten übereinander hinweg. Ist die Änderung der Geschwindigkeit entlang des Abstands  $z$  nicht linear, gilt die obige Gleichung nur für infinitesimale Abschnitte, also

$$(2.22) \quad F = \eta A \frac{dv}{dz}.$$

Es sei ein Volumenelement  $dV = dx dy dz$  in einer Flüssigkeit, die in  $y$ -Richtung strömt und ein Geschwindigkeitsgefälle in  $x$ -Richtung besitzt. Auf die linke Stirnfläche des Volumenelements wirkt eine Reibungskraft  $F_l$ , die vom Geschwindigkeitsgefälle (analog zur Gleichung 2.22) in  $x$ -Richtung abhängt

$$(2.23) \quad dF_l = -\eta \frac{\partial v}{\partial x} \Big|_{links} dy dz.$$

In analoger Weise gilt diese Formulierung auch für die rechte Stirnfläche des Volumenelements (bei möglichem verschiedenem Geschwindigkeitsgefälle)

$$(2.24) \quad dF_r = \eta \frac{\partial v}{\partial x} \Big|_{rechts} dy dz = \eta \left( \frac{\partial v}{\partial x} \Big|_{links} + \frac{\partial^2 v}{\partial x^2} dx \right) dy dz.$$

Die Summe aus beiden Reibungskräften ist gerade gegeben durch

$$(2.25) \quad dF_{\text{reibung}} = dF_l + dF_r = \eta \frac{\partial^2 v}{\partial x^2} dx dy dz = \eta \frac{\partial^2 v}{\partial x^2} dV.$$

Bei gekrümmter Geschwindigkeitsverteilung entlang der x-Richtung ist sie ungleich Null. Für den allgemeinen Fall, dass sich die Geschwindigkeit auch in y- und z-Richtung ändert, ist  $dF_{\text{reibung}}$  gegeben durch

$$(2.26) \quad dF_{\text{reibung}} = \eta v \cdot dV = \eta \Delta dV$$

wobei  $\Delta = \left( \frac{\partial^2 v}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 v}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 v}{\partial z^2} \right)$  der Laplace-Operator ist.

Die turbulente Strömung wird im Wesentlichen durch Verwirbelungen der Lösung charakterisiert. Um beide Strömungen von einander abzugrenzen, wird eine Dimensionslose Kenngröße, die sogenannte Reynoldszahl,  $Re$  eingeführt, mit

$$(2.27) \quad Re = \frac{\rho v l}{\eta}.$$

Dabei ist  $\rho$  die Dichte des Fluids,  $v$  die Strömungsgeschwindigkeit,  $l$  eine charakteristische Länge des Gegenstands, der die Lösung enthält und  $\eta$  die dynamische Viskosität. In der Praxis findet man laminare Strömung für  $Re \leq 2000$  [67]. Für größere Reynoldszahlen gilt die Strömung als turbulent. Die vollständige Behandlung der turbulenten Strömung würde den Umfang dieses Abschnitts überschreiten.

### 2.6.2 Laminare Rohrströmung - Die Hagen-Poiseuille Gleichung

Unter der Annahme, dass die Strömung in dem hier verwendeten Mikrofluidik-Kanal laminar ist, kann die bereits im obigen Kapitel eingeführte Theorie dazu verwendet werden, die Strömung und vor allem das Geschwindigkeitsprofil in dieser Mikrostruktur zu modellieren.

Betrachtet man nun einen Flüssigkeitszylinder mit dem Radius  $r$  und der Länge  $l$ , greift die Reibungskraft  $F_{\text{reibung}} = 2\pi r \cdot l\eta \frac{dv}{dr}$  an. Außerdem wirkt auf die Mantelfläche (oder Rohrmantelfläche) die Druckkraft

$$(2.28) \quad F_{\text{druck}} = \pi r^2 (p_1 - p_2).$$

Unter der Annahme, dass sich die Geschwindigkeit zeitlich nicht ändert (stationär,  $\frac{dv}{dt} = 0$ ), gilt für diese Annahme  $F_{\text{reibung}} = F_{\text{druck}}$  mit

$$(2.29) \quad \frac{dv}{dr} = \frac{p_1 - p_2}{2\eta l} \cdot r.$$

Eine Integration dieses Ausdrucks über den Rohrradius liefert das parabolische Geschwindigkeitsprofil

$$(2.30) \quad \underline{v(r) = v_{\text{max}} - \frac{p_1 - p_2}{4\eta l} r^2}$$

mit  $v_{\text{max}} = \frac{p_1 - p_2}{4\eta l} R^2$ , wobei  $R$  der Rohrradius ist. In der Mitte des Kanalquerschnitts besitzt die Flüssigkeit offensichtlich die höchste Geschwindigkeit, die quadratisch zum Rand abfällt.

Betrachtet man den infinitesimalen Volumenstrom zwischen  $r$  und  $r + dr$ , ergibt sich  $d\dot{V} = 2\pi r dr \cdot v(r)$ . Ein elementarer Integrationsschritt über das ganze Rohr liefert das bekannte Ohm'sche Gesetz für die laminare Rohrströmung oder das Hagen-Poiseuille Gesetz

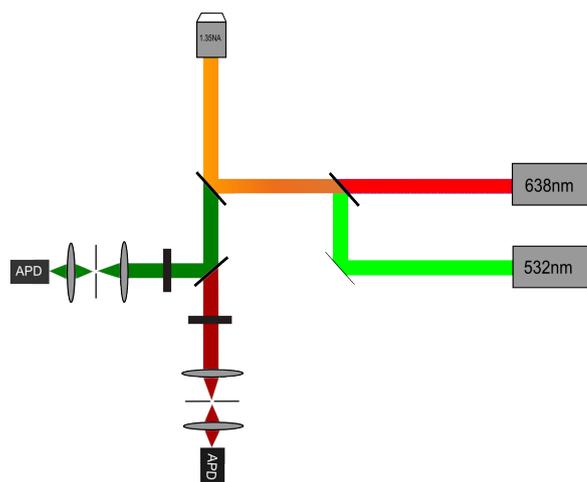
$$(2.31) \quad \underline{\dot{V} = \int_0^R 2\pi r v(r) dr = \frac{\pi(p_1 - p_2)}{8\eta l} R^4}$$

wobei der Strömungswiderstand durch  $\frac{8\eta l}{\pi R^4}$  gegeben ist [67]. Bemerkenswert ist hier, dass bei gleichem Druckgradienten zwischen Beginn und Ende des Rohres  $\Delta p = p_1 - p_2$  und einer Verdoppelung des Rohrradius eine ver-16-Fachung des Volumennstroms resultiert.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Verwendete Geräte und Anlagen

#### 3.1.1 Beschreibung der konfokalen Einzelmolekülanlage



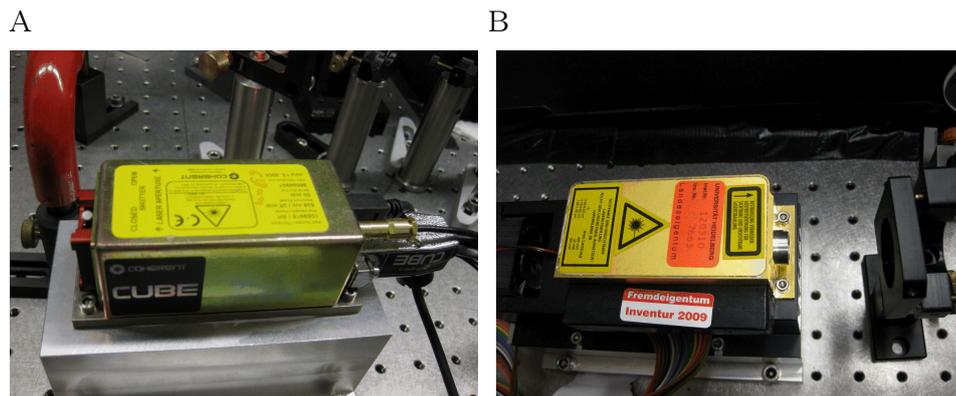
**Abbildung 3.1:** Schema der verwendeten konfokalen zwei-Farben Einzelmolekülanlage. Zwei Laserlinien  $638\text{ nm}$  und  $532\text{ nm}$  werden über einen Strahlteiler überlagert und dann mittels Triple-Line dichroitischen Spiegel in ein Objektiv hoher Numerischer Apertur reflektiert. In der Detektion wird die Fluoreszenz wieder spektral geteilt und nach einer weiteren Filterung über ein Linsensystem, mit zwischengeschalteter Apertur (engl. Pinhole) eines Durchmessers von  $100\text{ }\mu\text{m}$ , auf einzelphotonensensitive Detektoren abgebildet, die sich in der Brennebene der hinteren Linse befinden.

Eine Laserdiode (Cube 25mW; Coherent, Dieburg, Deutschland) mit einer zentralen Wellenlänge von  $\lambda_c = 638\text{ nm}$  und ein frequenzverdoppelter YAG -

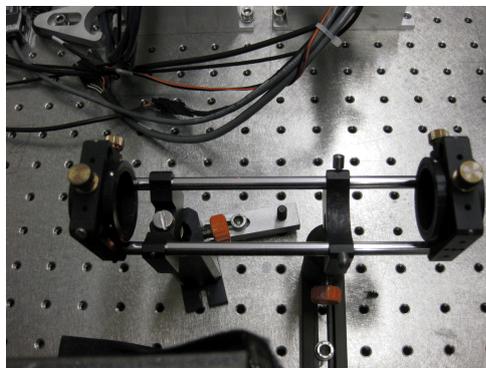
### 3 Material und Methoden

---

Festkörperlaser einer Wellenlänge von  $532\text{ nm}$  (Compass 215M-10; Coherent, Deutschland, Abbildung 3.2)



**Abbildung 3.2:** Für die Arbeit hauptsächlich verwendete Laser. (A) Coherent Laserdiode bei  $\lambda_c = 638\text{ nm}$  und (B) Frequenzverdoppelter YAG-Laser emittierend bei  $\lambda_c = 532\text{ nm}$ .



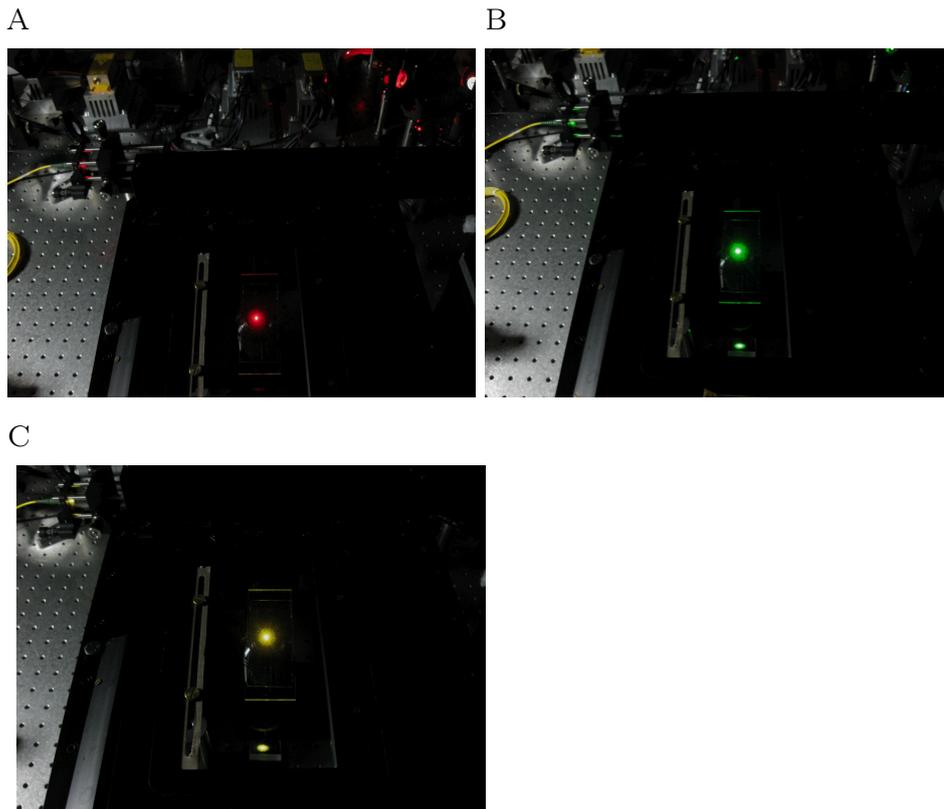
**Abbildung 3.3:** Die Galilei-Optik zur Kollimation der Strahlen.

werden nach Kollimation durch ein Linsensystem (hier wird eine umgekehrte Galilei-Anordnung mit zwei Sammellinsen verwendet, Abbildung 3.3) mit einem dichroitischen Strahlteiler (540DCXR, Chroma, Bellows Falls, VT, USA)

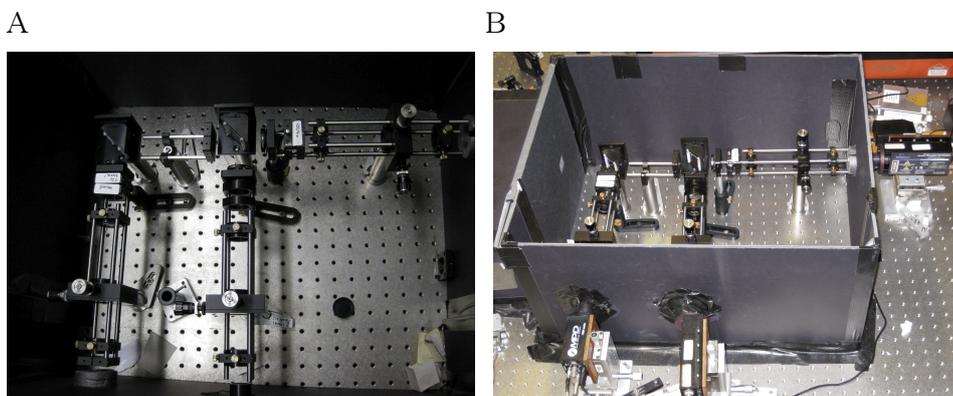
### 3.1 Verwendete Geräte und Anlagen

---

in ein Öl-Immersionmikroskopobjektiv ( $60\times$ ,  $1,35\text{ NA}$ , Olympus, Hamburg, Germany) eingekoppelt (Abbildung 3.4).



**Abbildung 3.4:** Objektiv mit in eine Lösung fokussierte Laserstrahlen. (A) roter Spot (B) grüner Spot und (C) überlagerter Spot.



**Abbildung 3.5:** Detektionsarm in Aufsicht (A) und (B) mit angeschlossenen Detektoren.

Die Fluoreszenz, die von der Probe bzw. den Probenmolekülen (meistens in einem Volumen von  $75\mu\text{l}$  auf einem Mulden-Objektträger) emittiert wird, wird vom selben Objektiv wieder eingesammelt, spektral durch einen  $640\text{ nm}$  dichroitischen Spiegel (640 DCXR, Chroma, Bellows Falls, VT, USA) gefiltert und zu letzt örtlich durch eine  $100\mu\text{m}$  kleine Apertur gefiltert, um sogenanntes Out-of-Focus-Light zu blocken. Weitere spektrale Filterung wurde mit Hilfe von Kombinationen aus Band- und Langpassfiltern (“grüner Kanal”: 582/50 Bandpass, RazorEdge 568 Langpass und HQ 600/40 Bandpass; “roter Kanal”: 692/40 Bandpass, RazorEdge 647 Langpass und Brightline 670/30; alle von Semrock, NY, USA) bewerkstelligt (siehe Abbildung 3.5).

Das Fluoreszenzsignal wurde auf beiden Kanälen mit zwei avalanche photodioden (APD) im photon-counting-Modus detektiert (SPCM-AQR-15; Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA, Abbildung 3.6). Die gewählte Laserintensität wird in einen beugungsbegrenzten Laserspot in der Lösung fokussiert. Einzelne Photonen, die von den APDs detektiert werden, werden mit Hilfe einer digitalen Zählkarte (PCI-6602, National Instruments, Ettetal, Schweiz) mit einer Zeitaufösung von  $12,5\text{ ns}$  registriert und mit einer (von der

Arbeitsgruppe) selbst geschriebenen Labview-Software (National Instruments, Kapitel 3.6) analysiert.



**Abbildung 3.6:** Einzelphotonensensitiver Detektor (SPCM-AQR-15) von Perkin Elmer.

#### 3.1.2 Ensembleproben

Unter dem Begriff Ensembleprobe versteht man Proben mit darin enthaltenen Fluorophorkonzentrationen, die nicht auf den hier beschriebenen konfokalen Mikroskopen (aufgrund zu hoher Photonen Emissionsraten) beobachtet werden. Praktisch sind dies alle Konzentrationen der Probenmoleküle mit  $c \geq 10^{-8} M$ . Das entspricht, bei einem typischen Probenvolumen für Ensemblemessungen von  $1 ml$ , einer Molekülanzahl von  $\approx 6 \cdot 10^{12}$ . Ab einer Probe nanomolarer Konzentration  $10^{-9} M$  können konfokale Messungen an einem Fluoreszenzmikroskop durchgeführt werden.

#### 3.1.3 Absorptionsmessungen

Konzentrationsbestimmungen der in dieser Arbeit verwendeten Proben wurden mit einem Lambda 25 UV/Vis Spektrometer (Perkin Elmer Inc, Wellesley Massachusetts, USA, Abbildung 3.7) durchgeführt. Bei diesem Gerät handelt es sich um ein Zweistrahl Spektrometer mit eingebauten Deuterium-und

Wolframhalogenlampen. Der Messbereich ist von  $190\text{ nm}$  bis  $1100\text{ nm}$  mit einer Auflösung von  $1\text{ nm}$  (und einer nominellen Genauigkeit von  $0,1\text{ nm}$ ) durch einen Spalt begrenzt.



**Abbildung 3.7:** Lambda 25 UV/Vis Spektrometer

Im Wesentlichen wird die optische Dichte ( $OD$ ) einer Probe relativ zu einer Referenz (hier meistens PBS) bestimmt. Dies wird bewerkstelligt, indem die Transmission des (durch einen Monochromator bestimmten) Lichts durch die Probe mit Hilfe von Photodioden bestimmt wird. Beim Durchgang des Lichts durch die Probe wird die wellenlängenabhängige Intensität  $I = I(\lambda)$  in Abhängigkeit des sogenannten Extinktionskoeffizienten  $\epsilon$  abgeschwächt. Das diesem Mechanismus zugrunde liegende Gesetz ist das sogenannte Lambert-Beer'sche Gesetz. Es kann durch

$$(3.1) \quad OD = \log\left(\frac{I_{aus}}{I_{ein}}\right) = \epsilon \cdot c \cdot d$$

beschrieben werden, wobei  $I_{aus}$  und  $I_{ein}$  die transmittierte und die einfallende Intensität darstellen. Die Konzentration der Probe ist  $c$  und die vom Licht

zurückgelegte Pfadlänge wird durch die Variable  $d$  denotiert. Die für diese Arbeit durchgeführten Messungen sind stets in Küvetten durchgeführt worden, die eine Pfadlänge von  $d = 1\text{ cm}$  besitzen und ein Probenvolumen von  $500\ \mu\text{l}$  bis  $1000\ \mu\text{l}$  enthielten. Das bedeutet, dass die gemessene optische Dichte des Materials direkt proportional zur Konzentration ist, die demnach sofort aus

$$(3.2) \quad c = \frac{OD}{\epsilon}$$

bestimmt werden kann.

#### 3.1.4 Ensemble-Fluoreszenz

Die Fluoreszenzmessungen zur Charakterisierung von Farbstoffmolekülen auf Ensembleebene wurden mit einem Cary Eclipse (Varian, Santa Clara, CA, USA, Abbildung 3.8), mit angeschlossenem Peltier-Element für temperaturabhängige Messungen, durchgeführt. Dieses Instrument verfügt zur Anregung der Probe über eine Xenon-Blitzlichtlampe. Die Detektion von Fluoreszenzphotonen wird über einen Photomultiplier (engl. Photo Multiplier Tube, kurz PMT) bewerkstelligt. Um Photozerstörung bei der Probe, laut Hersteller, so weit wie möglich ausschließen zu können, wird die Probe bei der Aufnahme eines Datenpunktes nur kurz beleuchtet.



**Abbildung 3.8:** Cary Eclipse Fluoreszenzspektrometer.

Im Wesentlichen werden drei verschiedene Software Module, *Scan*, *Thermal* und *Kinetics* zur Charakterisierung der Proben verwendet. Die Software *Scan* ist zur Aufnahme von Anregungs- und Emissionsspektren geeignet. So kann bei einer gegebenen Anregungswellenlänge die Fluoreszenzantwort auf einem  $\approx 800 \text{ nm}$  breiten Intervall untersucht werden. Andersherum kann ein Wellenlängenspektrum, das durchgeföhren werden soll, angegeben werden, woraufhin die Emissionsintensität (hier in willkürlichen Einheiten (proportional zum PMT-gain)) für jede Wellenlänge aufgezeichnet werden kann. Die Anregungsintensität kann über verschiedene Spaltbreiten von  $2,5 \text{ nm}$  bis  $10 \text{ nm}$  variiert werden. Auch die auf den Detektor auftreffende Lichtintensität kann analog über verschiedene Spalte reguliert werden.

Das Paket *Thermal* eignet sich zur Untersuchung der Fluoreszenzintensität der Probe als Funktion der Temperatur. So können z.B. (wie in Kapitel 4.6.1 gezeigt) Biomoleküle denaturiert werden. Mit Hilfe des angeschlossenen Peltierelements können Temperaturen von bis zu  $\approx 100^\circ \text{C}$  erreicht werden.

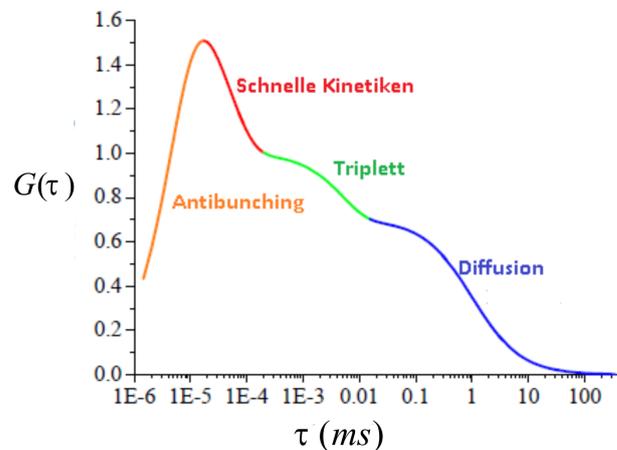
Dazu können wieder eine Anregungswellenlänge und eine Detektionswellenlänge

nanometergenau ausgewählt werden. In den hier untersuchten Ensembleproben wurden immer die selben Anregungswellenlängen gewählt, die auch in den folgenden Einzelmolekülexperimenten verwendet wurden.

Die einzustellenden Parameter der Software *Kinetics* sind analog. Dieses Programm ist zur Beobachtung der Emissionsintensität als Funktion der Zeit.

## 3.2 Die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS)

Die Idee von FCS ist, dass bestimmte molekulare Prozesse auf ganz charakteristischen Zeitskalen stattfinden. So liegt die freie Diffusion von Molekülen bzw. Fluorophoren im  $ms$ -Bereich, wogegen sich photophysikalische Prozesse auf  $\mu s$ - und konformationelle Änderungen (Lösung) sowie das Vermögen der Fluorophore selbst Photonen zu emittieren (Antibunching) sich auf  $ns$  und  $sub-ns$  Zeitskala abspielen. Das Ergebnis einer typischen FCS-Messung mit allen Zeitskalen ist in Abbildung 3.9 zu erkennen.



**Abbildung 3.9:** Schema einer Autokorrelationsfunktion mit allen Zeitskalen. Verändert entnommen aus [26].

In der Regel werden FCS-Messungen an einzelmolekülsensitiven konfokalen

Mikroskopen (Siehe Kap. 3.1.1) durchgeführt, die Technik der Korrelationsanalyse selbst ist allerdings per Definition keine Einzelmolekültechnik. Die optimale Konzentration für FCS-Messung liegt bei  $\approx 1 \text{ nM} = 10^{-9} \text{ M}$  der Probenmoleküle. Geringere Konzentrationen können nur mit (z.T. erheblicher) Steigerung der Messdauer detektiert werden.

Dieser Abschnitt soll sich mit einer (vergleichsweise) kurzen Herleitung der Autokorrelationsfunktion beschäftigen (die nur die Wesentlichen Schritte enthält), wie sie bereits durch Magde et al. im Jahre 1974 [68, 69] durchgeführt wurde, obwohl die FCS erst mit der Entwicklung von stabilen Laserquellen und effizienten Detektoren (dadurch zu erhöhter Sensitivität) zu Beginn der 1990er Jahre wieder in den Fokus der Biophotonik gerückt ist.

Die lokale Konzentration einer chemischen Substanz  $j$  (bei  $m$  Substanzen insgesamt) in einer Lösung ist durch  $C_j(\vec{r}, t)$  gegeben, wobei  $\bar{C}_j = \langle C_j(\vec{r}, t) \rangle$  das Konzentrationsmittel und  $\delta C_j(\vec{r}, t) = C_j(\vec{r}, t) - \bar{C}_j$  die lokale Abweichung vom Mittelwert ist. Im Wesentlichen finden nun zwei Prozesse in der Lösung statt. Zum einen ist dies einfache Diffusion und zum anderen sind es chemische Reaktionen, die Komplexe von Teilchen und neue Subpopulationen entstehen lassen. Dieser Sachverhalt kann nahe dem (chemischen) Gleichgewicht durch linearisierte chemische Gleichungen (im Grunde das 2. Fick'sche Gesetz) für Konzentrationsfluktuationen  $\delta C_j$  mit

$$(3.3) \quad \frac{\partial \delta C_j(\vec{r}, t)}{\partial t} = D_j \nabla^2 \delta C_j(\vec{r}, t) + \sum_{k=1}^m K_{jk} \delta C_k(\vec{r}, t)$$

modelliert werden [70]. Der erste Term trägt der Diffusion Rechnung und der zweite Summand approximiert chemische Veränderungen/Reaktionen, wobei die Koeffizienten  $K_{jk}$  sowohl chemische Ratenkonstanten als auch Gleichgewichtskonstanten zwischen den Reaktionspartnern darstellen. Ferner wird die

Anzahl der in einem Zeitintervall  $\Delta t$  detektierten Photonen durch

$$(3.4) \quad n(t) = \Delta t \int d^3\vec{r} \cdot I(\vec{r}) \sum_{k=1}^m Q_k C_k(\vec{r}, t)$$

dargestellt, wobei  $I$  die Verteilung des Anregungslichts und  $Q_k$  das Produkt aus Absorptionsquerschnitt und der Fluoreszenzquantenausbeute der  $k$ -ten Komponente ist. Damit ist die Abweichung der Photonenzahl vom Mittelwert (analog zur Konzentrationsabweichung) gegeben durch

$$(3.5) \quad \delta n(t) = n(t) - \bar{n} = \Delta t \int d^3\vec{r} I(\vec{r}) \sum_{k=1}^m Q_k \delta C_k(\vec{r}, t).$$

Zur diskreten Autokorrelationsfunktion  $G(t)$  gelangt man durch eine Multiplikation der zeitlichen Mittelwerte der Intensitätsfluktuationen, normiert auf das Quadrat der mittleren Intensität  $\bar{n}^2$

$$(3.6) \quad G(t) = \frac{1}{\bar{n}T} \sum_{i=0}^{T-1} \delta n(t') \delta n(t' + t) \rightarrow G(t) = \frac{1}{\bar{n}^2} \langle \delta n(0) \delta n(t) \rangle$$

wobei  $T$  die Gesamtzahl der Abtastpunkte  $\Delta t$  ist ( $T \cdot \Delta t$  ist also die Gesamtmessdauer) [70]. Durch Einsetzen von Audr.3.5 in Gl. 3.6 erhält man sofort

$$(3.7) \quad G(t) = \frac{(\Delta t)^2}{\bar{n}^2} \int \int d^3\vec{r} d^3\vec{r}' I(\vec{r}) I(\vec{r}') \sum_{j,l} Q_j Q_l \langle \delta C_j(\vec{r}, 0) \delta C_l(\vec{r}', t) \rangle.$$

Es handelt sich bei der Autokorrelationsfunktion von Intensitätsfluktuationen um eine Faltung der Auto- und Kreuzkorrelationen der Konzentrationsfluktuationen mit dem Anregungsprofil.

In der Regel wird ein gaussförmiges Intensitätsprofil angenommen, dass man

leicht mit

$$(3.8) \quad I(\vec{r}) = I_0 \exp\left(-\frac{2(x^2 + y^2)}{\omega_{xy}^2} - \frac{2z^2}{\omega_z^2}\right)$$

beschreiben kann, wobei  $\omega_z$  und  $\omega_{xy}$  die Ausdehnungen der Strahltaile in  $z$  und  $xy$ -Richtung darstellen. In der Regel gilt  $\omega_z > \omega_{xy}$ . Die Fouriertransformierte dieses Profils ist dann

$$(3.9) \quad \tilde{I}(\vec{q}) = \frac{I_0 \omega_{xy}^2 \omega_z}{8} \exp\left(-\frac{\omega_{xy}}{8}(q_x^2 + q_y^2) - \frac{\omega_z^2}{8} q_z^2\right).$$

Im Wesentlichen folgt mit Gleichung 3.7 dann durch Einsetzen

$$(3.10) \quad G(t) = \frac{(2\pi)^{-3}}{(\sum Q_i \bar{C}_i)^2} \int d^3 \vec{q} \cdot \exp\left(-\frac{\omega_{xy}}{4}(q_x^2 + q_y^2) - \frac{\omega_z^2}{4} q_z^2\right) \times \\ \sum_{i,l} Q_j Q_l \bar{C}_j \sum_s X_l^{(s)} \exp(\lambda^{(s)} t) (X^{-1})_j^{(s)},$$

wobei  $\lambda^{(s)}$  und  $X^{(s)}$  Eigenwerte und Eigenvektoren einer Matrix M sind (Vergleiche [70]).

Betrachtet man die Diffusion einer einzelnen Komponente, dann reduziert sich Gl. 3.3 zum bekannten Diffusionsgesetz

$$(3.11) \quad \frac{\partial \delta C(\vec{r}, t)}{\partial t} = D \nabla^2 \delta C(\vec{r}, t)$$

welches durch die Anwendung der Fouriertransformation

$$(3.12) \quad \delta C(\vec{q}, t) = \delta C(\vec{q}, 0) \cdot \exp(-Dq^2 t)$$

gelöst werden kann. In diesem Fall hat die Matrix M nur einen Eigenwert  $\lambda = -Dq^2$  und der dazugehörige Eigenvektor ist  $X = 1$ . Einsetzen der Werte

in Gleichung 3.10

$$(3.13) \quad G(t) = \frac{(2\pi)^{-3}}{Q^2\bar{C}^2} \int d^3\vec{q} Q^2\bar{C} \cdot \exp\left(-\frac{\omega_{xy}}{4}(q_x^2 + q_y^2) - \frac{\omega_z^2}{4}q_z^2 - Dt(q_x^2 + q_y^2 + q_z^2)\right) \\ = \frac{1}{\bar{C}V} \left(1 + \frac{t}{\tau_D}\right)^{-1} \left(1 + \frac{t}{\tau'_D}\right)^{-\frac{1}{2}}$$

wobei  $V = \pi^{3/2}\omega_{xy}^2\omega_z$  das Anregungsvolumen,  $\tau_D = \frac{\omega_{xy}^2}{4D}$  und  $\tau'_D = \frac{\omega_z^2}{4D}$  die charakteristische Diffusionszeiten in die entsprechenden Richtungen ist [70]. Abschließend kann man die die mittlere Teilchenzahl im fokalen Volumen  $\bar{N} = V\bar{C}$  und das Seitenverhältnis der fokalen Ausdehnung ist  $\omega = \frac{\omega_z}{\omega_{xy}}$  angeben und schließlich die Autokorrelationsfunktion mit

$$(3.14) \quad G(t) = \frac{1}{\bar{N}} \left(1 + \frac{t}{\tau_D}\right)^{-1} \left(1 + \frac{t}{\omega^2\tau_D}\right)^{-\frac{1}{2}}$$

angeben. Man erkennt, dass die Amplitude der Funktion invers proportional mit der Teilchenzahl skaliert. Betrachtet man weitere Prozesse in der FCS-Messung wird jedem mit einem zusätzlichen Exponentialterm  $1 + K \cdot \exp(-\frac{t}{\tau})$  Rechnung getragen, wobei  $K = \frac{k_{AB}}{k_{BA}}$ , die Gleichgewichtskonstante des Prozesses/der Reaktion ist und  $\tau = (k_{AB} + k_{BA})^{-1}$  die charakteristische Zeit.

Eine weitere wichtige Größe, die die Güte einer FCS-Messung bestimmt, ist das Signal zu Hintergrund- Verhältnis (SNR) [70], was hier der Vollständigkeit halber einfach angegeben wird mit

$$(3.15) \quad SNR = \frac{G(t)}{\sqrt{Var(G(t))}} \approx G(t)\nu\bar{N} \propto \nu\sqrt{T}.$$

Dabei ist  $G(t) \propto \frac{1}{\bar{N}}$  die Amplitude der Autokorrelation,  $\nu$  ist die mittlere Zahl detektierter Photonen pro Molekül pro Abtastintervall  $\Delta t$  und  $T$  die Gesamtzahl dieser Intervalle. Ein typischer Wert für  $\nu$  ist  $\nu \approx 0,04$ . Man erkennt also, dass das SNR mit der Anzahl der Photonen pro Molekül und

der Messdauer skaliert.

### 3.3 Beschreibung von Algorithmen zur Einzelmoleküldetektion

#### 3.3.1 Die $4\sigma$ -Detektion

Die Identifikation von Einzelmolekülsignalen bzw. deren Diskriminierung vom Hintergrundsignal ist Inhalt dieses Abschnitts. Bei der  $4\sigma$ - Detektion handelt es sich um eine Methode der dynamischen Schwellersuche, ab der ein detektiertes Signal als Einzelmolekülburst gewertet werden kann. Die Voraussetzung für die Anwendung der Methode ist das sogenannte Binning der Fluoreszenzdaten in  $1\text{ ms}$  - Intervalle. Dies wird sofort plausibel unter der Überlegung, dass die charakteristische Diffusionszeit von Fluorophoren auf  $\text{ms}$ -Zeitskala stattfindet. Abbildung 3.10 zeigt eine typische Fluoreszenzzeitspur von *Atto647N*.

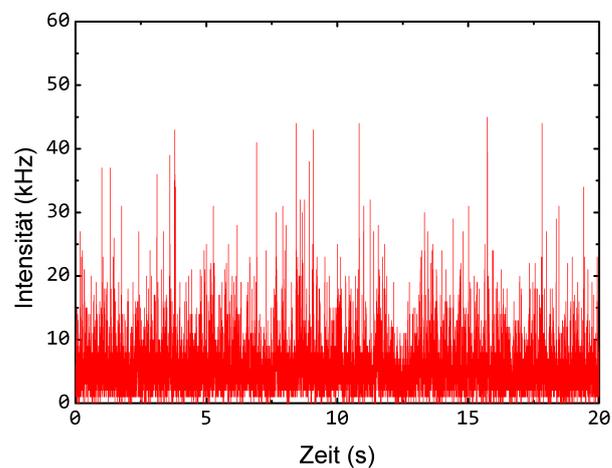
Jeder Peak stellt einen Photonenschauer (engl. Burst) dar, der durch ein Molekül, das durch das Anregungsvolumen diffundiert, verursacht wird. Die Schwierigkeit liegt jetzt darin "echte" Peaks von Hintergrundsignal zu trennen. Eine einfache und zugleich effektive Methode dies zu bewerkstelligen ist, den arithmetischen Mittelwert und die Standardabweichung der Zeitspur zu bilden. Für Einzelmolekülkonzentrationen der Fluorophore liegt der Mittelwert etwa beim Hintergrund so kann man näherungsweise annehmen, dass

$$(3.16) \quad \mu \approx \langle B \rangle .$$

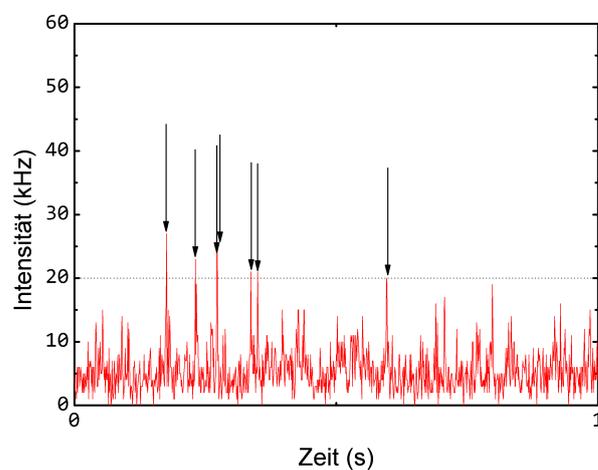
Diese Annahme ist dadurch gerechtfertigt, dass mehr Bins existieren, die Hintergrundphotonen enthalten, als Einzelmolekülsignale. Es findet jedoch eine leichte Verfälschung dieser Annahme durch die darin enthaltenen Einzelmolekülsignale

### 3.3 Beschreibung von Algorithmen zur Einzelmoleküldetektion

---



**Abbildung 3.10:** Einzelmolekülfluoreszenz-Zeitspur von Atto647N Molekülen einer Konzentration von  $10^{-11} M$  bei einer Laserleistung von  $\approx 500 \mu W$  in PBS bei  $1 ms$ -Binning.



**Abbildung 3.11:** Einzelmoleküldetektion der ersten Sekunde der in Abb.3.10 gezeigten Messung mit markierten Einzelmolekülsignalen.

statt. Im zweiten Schritt wird der Schwellwert zur Einzelmolekülerkennung zu

$$(3.17) \quad T = \mu + 4 \cdot \sigma \approx \langle B \rangle + 4 \cdot \sigma$$

angegeben. Das bedeutet, dass jedes Signal  $I(t)$  als Einzelmolekül gewertet wird, wenn  $I(t) \geq T$  erfüllt ist. Durch die Addition der vierfachen Standardabweichung zum Mittelwert wird sichergestellt, dass wirklich Signale hoher Intensität erkannt werden und kein Signal gewertet wird, dessen Intensität sich durch statistische Schwankung zufällig oberhalb von  $\mu$  befindet.

Eigene Experimente haben ergeben, dass die Standardabweichung etwa 5% – 7% des Mittelwerts ausmacht. Der Algorithmus ist in Alg. 3.1 für die ein-Kanaldetektion zusammengefasst.

Die Vorteile dieser Rechenvorschrift ist, dass die Daten in linearer Rechenzeit nach Einzelmolekülsignalen durchsucht werden können. Die Laufzeit jeder der drei Schleifen hängt nur von der Anzahl der Bins (also der Länge der Messung) ab. Dies liefert eine Laufzeit von  $\mathcal{O}(3 \cdot n + c) \approx \mathcal{O}(n)$ . Außerdem ist die Implementierung recht einfach. Physikalisch gesehen besitzt man ein Werkzeug, dass sich auf ändernden Hintergrund anpassen kann und so eine willkürliche, manuelle Schwellwertwahl unnötig wird. Die im Kapitel über Ergebnisse und Diskussion (4) dargestellten Daten entstammen der Auswertung mit diesem Algorithmus.

#### 3.3.2 Identifikation einzelner Moleküle mittels Interphotonen-Zeit

Eine weitere prominente Methode einzelne Bursts in einer Zeitspur zu identifizieren wird hier [71] vorgeschlagen. Dies ist die sogenannte “Sliding-Burst”-Suche. Die zugrunde liegende Idee dieses Verfahrens ist die sogenannte Interphoton-Zeit zu verwenden und basierend darauf ein Multiparameter-Modell aufzubauen. Die Interphoton-Zeit ist die Zeit zwischen zwei aufeinander folgenden Photonen. Die Voraussetzung ist, dass die Interphoton-Zeit zwischen zwei

---

**Algorithmus 3.1** Algorithmus zur  $4\sigma$ -Bursterkennung im Pseudocode.

---

```
 $\mu_0 \leftarrow 0$   
 $\mu \leftarrow 0$   
 $i \leftarrow 1$   
 $T \leftarrow 0$   
 $length \leftarrow$  Länge der Zeitspur  
[Berechnung der Hintergrundintensität]  
While ( $i \leq length$ ) {  
   $\mu_0 \leftarrow \mu_0 + I(t = i)$   
   $i \leftarrow i + 1$   
}  
 $\mu \leftarrow \mu_0 / length$   
[Berechnung des Schwellwertes]  
 $i \leftarrow 1$   
While ( $i < length$ ) {  
   $diffsquares \leftarrow diffsquares + power(I(t = i) - \mu, 2)$   
   $i \leftarrow i + 1$   
}  
 $diffsquares \leftarrow diffsquares / (i - 1)$   
 $\sigma \leftarrow \sqrt{diffsquares}$   
 $T \leftarrow \mu + 4\sigma$   
[Bursterkennung]  
 $i \leftarrow 1$   
 $n_{bursts} \leftarrow 0$   
While ( $i < length$ ) {  
  If ( $I(t = i) \geq T$ ) {  
     $n_{bursts} \leftarrow n_{bursts} + 1$   
  }  
   $i \leftarrow i + 1$   
}  
Return  $n_{bursts}$ 
```

---

Hintergrundphotonen größer ist, als die Zeit zwischen Photonen, die während der Diffusionszeit eines Moleküls durch das Anregungsvolumen emittiert werden. So wird ein Burst durch  $L$  aufeinanderfolgende Photonen, die mindestens  $M$  benachbarte Photonen innerhalb eines Zeitfensters von  $T$  besitzen, definiert. So ist ein Burst also durch einen dreikomponentigen Vektor

$$(3.18) \quad \text{Burst} = \begin{bmatrix} L \\ M \\ T \end{bmatrix}$$

definiert. Typische Werte sind  $L = 10 - 50$ ,  $M = 2 - 10$  und  $T = 100\mu\text{s} - 1000\mu\text{s}$ .

Die gute Eigenschaft dieser Methode ist, dass sie vom Binning der Daten unabhängig ist. Das bedeutet, dass die Daten binär ( $Photon = 1$  und kein  $Photon = 0$ ) vorliegen. Dadurch, dass es sich hierbei um ein Multiparameter-Modell handelt, kann es durch die falsche Wahl der Parameter zu Fehlklassifikationen kommen und fälschlicherweise Hintergrundphotonen als Burst registriert werden. Die Wahl der Parameter hängt sehr von den äußeren Messbedingungen, wie z.B. dem Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis und damit von der Laserleistung ab. Unter Umständen müssen die Parameter jedes Mal neu angepasst werden. Eine optimale Lösung und damit eine komplett automatisierte Auswertung gestaltet sich dadurch schwer.

## 3.4 Zubereitung der verwendeten Proben

### 3.4.1 Verwendete Proben

Die in dieser Arbeit verwendeten Farbstoffe (Tabelle 3.1) und Oligonukleotide werden in den folgenden Tabellen zusammengefasst:

### 3.4 Zubereitung der verwendeten Proben

**Tabelle 3.1:** Verwendete Farbstoffmoleküle mit charakteristischen Eigenschaften.

Bezeichnung	$\lambda_{abs}(\text{nm})$	$\epsilon_{max}(\frac{l}{\text{mol}\cdot\text{cm}})$	$\lambda_{fl}(\text{nm})$	QY	$\tau_{fl}(\text{ns})$
<i>ATTO 565</i>	563	$1,2 \cdot 10^5$	592	0,9	4,0
<i>ATTO 647N</i>	644	$1,5 \cdot 10^5$	669	0,65	3,5

Alle DNA-Sequenzen wurden von der Firma IBA-The TAG company synthetisiert und aufgereinigt (HPLC-Grade). Die von IBA gelieferte Stammkonzentration beträgt für jede Probe  $0,1 \frac{\text{nmol}}{\mu\text{l}} = 10^{-4} \text{ M}$ . Tabelle 3.2 stellt alle synthetisierten Oligonukleotide zusammen. *2C – dsDNA* (two-color double-stranded DNA) besteht aus zwei komplementären Strängen Poly-A und Poly-T mit jeweils 20 Nukleotiden ( $d \approx 6,8 \text{ nm}$ ), die bereits nach der Synthese hybridisiert wurden. Zusätzlich sind die jeweiligen Einzelstränge terminal mit *Atto565* und *Atto647N* kovalent funktionalisiert und dienen damit als Zwei-Farben Koinzidenzprobe.

Die beiden mit *HP – Red* und *HP – Green* bezeichneten DNA-Sequenzen dienen als molekulare Sonden (sogenannten Molecular Beacons, kurz MB). Sie sind 5' jeweils mit einem Farbstoff und 3' mit einem Löschmolekül (engl. Quencher) markiert. Eine mögliche Sekundärstruktur der beiden Sonden ist Abbildung 3.12 zu entnehmen.

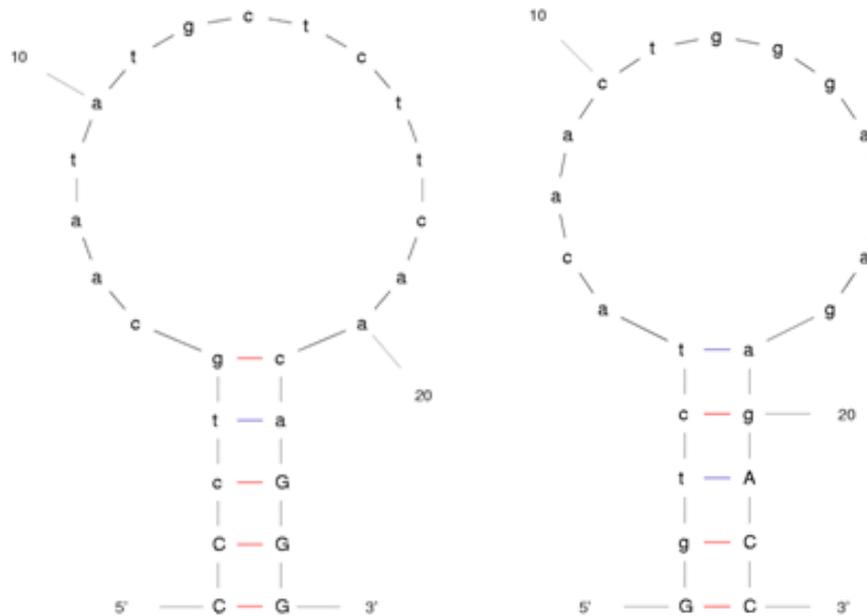
Als Zielsequenz dient ein 100b langes einzelsträngiges DNA-Molekül, welches an den fett markierten Teilen komplementär zur sogenannten Schleifensequenz (engl. Loop, fett markiert) der MBs ist.

### 3 Material und Methoden

---

**Tabelle 3.2:** Verwendete Oligonukleotide mit ihren Charakteristika und Modifikationen.

Bez.	Sequenz 5' → 3'	Modifizierung 5'	Modifizierung 3'	dsDNA
2C-dsDNA	AAA AAA AAA AAA AAA AAA AA	ATTO 647N		JA
	TT TTT TTT TTT TTT TTT TTT		ATTO 565	JA
HP-Green	CCC TGC AAT ATG CTC TTC AAC AGG G	ATTO 565	BHQ2	NEIN
HP-Red	GGG TCT ACA ACT GGG ATA GAG ACC	ATTO 647N	BBQ 650	NEIN
S.Pneum	GAC CTT ATT CAA AGT CTC AAC GGC TGT GAC ATT CGT TGA TTG TTG AAG AGC ATA TTG CAG AGT AAT ATT ACC GAA ATA TGC TCT ATC CCA GTT GTA GAC A	-	-	NEIN



**Abbildung 3.12:** Mit der Software Mfold minimierte Sekundärstrukturen der beiden MBs bei Raumtemperatur unter PBS Bedingungen. Mit Atto647N funktionalisiertes Molekül (links) und mit Atto565 markiertes Molekül (rechts).

### 3.4.2 Verwendete Mikro- und Nanokügelchen

In dieser Arbeit wurden zwei Typen von magnetischen Kügelchen (Beads) eingesetzt. Zum einen sind dies sogenannte Dynabeads M-280 (Nr. 11205D, Invitrogen, Deutschland) mit einem Durchmesser von  $\approx 2,8 \mu\text{m}$  und einer Streptavidinhülle. Die Stammkonzentration der Beads beträgt laut Hersteller  $10 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ . Die Belegungsdichte für freie Biotinmoleküle (d.h. sterische Hinderung wird ausgeschlossen) beträgt  $650 - 900 \frac{\text{pmol}}{\text{mg}}$  der beads.

Der andere Typ Beads (Nanomag-D; Streptavidin, Micromod Partikeltechnologie, Deutschland) unterscheidet sich im Wesentlichen nur im Durchmesser  $\approx 130 \text{nm}$  und in der Belegungsdichte ( $\approx 60 \frac{\text{SA}}{\text{Bead}}$ , laut Hersteller) der Streptavidinhülle. Wie im Laufe der Arbeit gezeigt wird, leiden Messung mit diesen

Beads nicht unter dem störenden Einfluss von Autofluoreszenz.

### 3.4.3 Probenzubereitung für Einzelmolekülmessungen

Die für alle in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen der Farbstoffmoleküle (oder markierte Biomoleküle) liegt, sofern nicht anders erwähnt, bei  $10^{-15} \geq c < 10^{-10} M$ . Grundsätzlich befinden sich die Moleküle in wässriger Umgebung. Die genaue Umgebung kann ggf. von Experiment zu Experiment etwas variieren. Die Basis für alle Pufferumgebungen bildet immer PBS (Phosphate Buffered Saline, *pH* 7, 2;  $[NaCl] = 140 mM$ , Sigma-Aldrich, Taufkirchen bei München, Deutschland) um den physiologischen PH-Wert konstant zu halten. Die folgende Tabelle (3.3) liefert eine Übersicht über alle verwendeten Pufferbedingungen:

**Tabelle 3.3:** Hergestellte, auf PBS basierende wässrige Messpuffer.

Bezeichnung	Zusammensetzung
PBS(T)	PBS + 0,05% Tween20
PBS(T)	PBS + 0,02% Tween20
PBSN800	PBS + 800mM NaCl
PBSN500	PBS + 500mM NaCl
PBSN300	PBS + 300mM NaCl

Um die Einzelmolekül-Koinzidenzdaten einer Probe mit diagnostischer Relevanz zu bewerten, wurden beide, spektral unterschiedlich markierte, MBs bei einer konstanten Konzentration von  $10^{-10} M$  zusammen mit verschiedenen Konzentrationen der Gegensequenz in PBS(T)N800 mit einer Tween20- Konzentration von 0,02 % in einem programmierbaren Thermogerät (PTC-100 Programmable Thermal Controller, ESCO Technologies Inc., PA, USA) (siehe Abbildung 3.13 ) inkubiert. Die Konzentration der Gegensequenz wird dabei

### 3.5 Herstellung des Mikrofluidikkanals

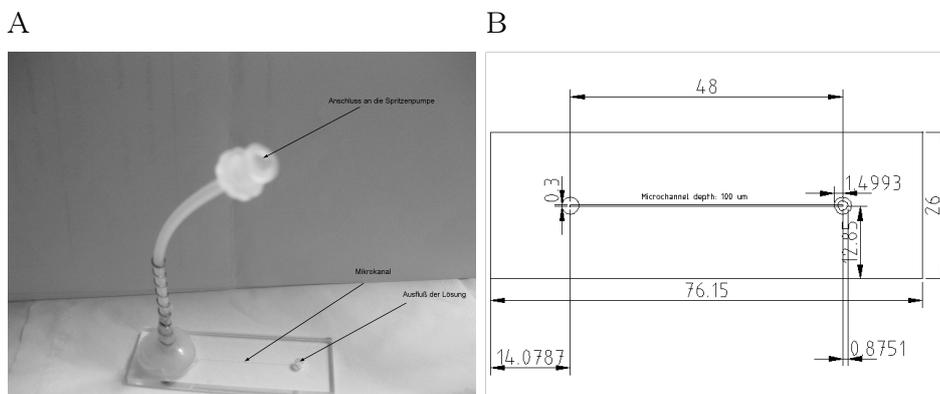
über vier Größenordnungen von  $10^{-10} M$  bis  $10^{-13} M$  bei konstanter MB Konzentration titriert. Die Proben wurden für fünf Minuten auf  $95^{\circ}C$  aufgeheizt und danach bei einer Rate von  $1 \frac{^{\circ}C}{min}$  bis auf Raumtemperatur abgekühlt, um eine möglichst effiziente Hybridisierung (siehe Smart-Probe-Konzept in Abb. 4.51) zu gewährleisten.



**Abbildung 3.13:** Der programmierbare Thermocycler zur Hybridisierung der Proben.

### 3.5 Herstellung des Mikrofluidikkanals

Der in den Experimenten verwendete mikrofluidische Kanal (Abb. 3.14 ), bestehend aus einem PMMA Substrat (Polymethylmethacrylat) besitzt die Dimensionen eines typischen Mikroskop- Objektträgers ( $76,15 mm \times 26 mm \times 3,9 mm$ ). Mit Hilfe einer computergesteuerten Frässpitze mit einem Durchmesser von  $300 \mu m$  wurde ein  $4,8 cm$  langer, linearer Kanal einer Tiefe von  $100 \mu m$  in den Kunststoff gefräst.



**Abbildung 3.14:** Die in der Mechanikwerkstatt gefertigte Mikrostruktur. (A) ist eine Gesamtübersicht und (B) zeigt die entsprechende technische Zeichnung mit allen Abmessungen.

Um den Kanal abzudecken wurde kommerziell erhältliches, optisch transparentes, Klebeband (TesaFilm, Crystal clear, Tesa, Hamburg, Deutschland) mit einer Dicke von  $(40 \pm 2) \mu\text{m}$  verwendet. Wie im Verlauf der Arbeit deutlich wird, sind dies die Minimalanforderungen für schnelle und hochsensitive Einzelmoleküldetektion. Der Kanal ist dann an beiden Enden zugänglich durch zwei  $\varnothing = 3 \text{ mm}$  Bohrungen, wobei an einem Loch ein flexibler HPLC-Schlauch angebracht ist. An diesem ist eine Spritzenpumpe (PHD2000; Infusion Harvard Apparatus, Holliston, Massachusetts, USA, Abbildung 3.15) angeschlossen. Die andere Bohrung dient als Ausfluss für die Lösung.

## 3.6 Verwendete Software zur Datenaufnahme und Auswertung

Dieses Kapitel soll über die verwendete Labview-Software zur Datenaufnahme und Analyse aufklären. Abschnitt 3.6.1 beinhaltet eine knappe Beschreibung der Verwendung der Software, die als "Ted's-Package" bekannt ist. Da dies



**Abbildung 3.15:** Spritzenpumpe mit eingespannter Spritze.

ein sehr umfangreiches Softwarepaket ist, soll sich hier auf das notwendigste beschränkt werden.

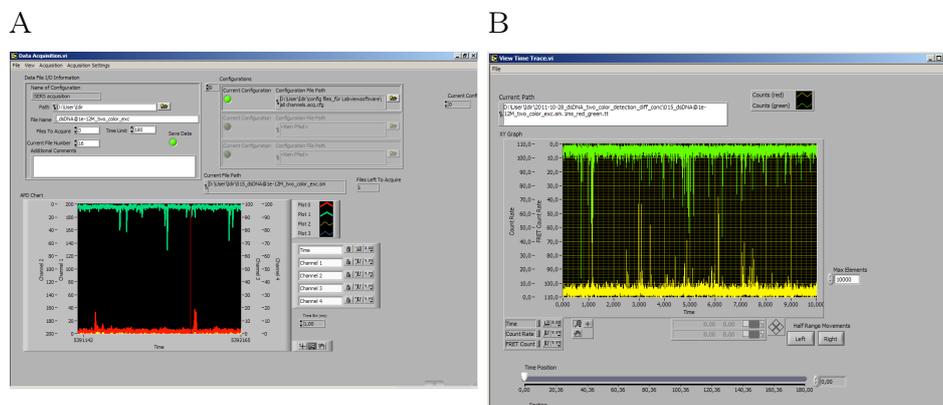
Über die während der Arbeit entstandene Software zur Einzelmolekülerkennung soll gesondert im Anhang mit einer Bedienungsanleitung (Kapitel 2) berichtet werden. Mit wenigen Modifikationen des Formats der Eingabedaten kann es auf die Verwendung als Statistik-Software ausgedehnt werden.

#### 3.6.1 Datenaufnahme und Vorbereitung zur Auswertung

Die reine Datenaufnahme wird in jedem Experiment mit dem Unterprogramm "Data Acquisition" (Abbildung 3.16 (A)) nach dem Laden einer Konfigurationsdatei durchgeführt, die im Wesentlichen die Anzahl der aufzunehmenden Kanäle mit Kanal-ID enthält. Hier können Rohdaten aufgenommen und (vom Binning abhängig) dargestellt werden. Das Binning ist das Zeitintervall, das die in den Zeitspuren dargestellte Intensitäten bestimmt. Abhängig von der Messdauer, dem Dateinamen und der Anzahl hintereinander aufzunehmender Dateien werden die Daten in einem vorgegebenen Pfad als Rohdaten im ".sm"-Format gespeichert.

Um nun die Zeitspur in das lesbare ASCII-Format zu konvertieren, kann diese im Sub-Vi "View Time Trace", nach dem korrekten Binning in der "Data

### 3 Material und Methoden



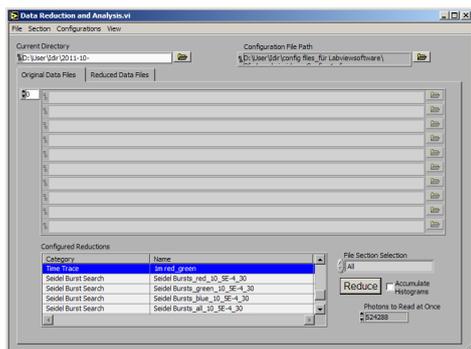
**Abbildung 3.16:** Datenaufnahme mit der “Data Acquisition” (A) und die spätere Extraktion der aufgenommenen Fluoreszenztrajektorie in (B) mit “View Timetrace”.

Reduction”-Vi (Abbildung 3.17(A) und (B)), eingelesen und bspw. als “.dat” gespeichert werden.

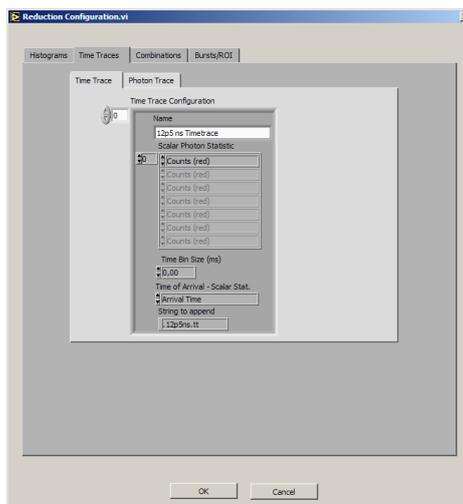
Sollen die Daten allerdings in irgendeiner Weise korreliert und als FCS-Messung verwendet werden, so müssen die gewünschten Kanäle ausgewählt werden (siehe Abbildung 3.17 (C)). Im Hauptmenü der Datenreduktion “Data reduction and Analysis” (Abb. 3.17 (A)) können in der Liste mehrere Dateien eingeladen werden und eine unten zu wählende Prozedur gleichzeitig auf alle Dateien angewendet werden.

### 3.6 Verwendete Software zur Datenaufnahme und Auswertung

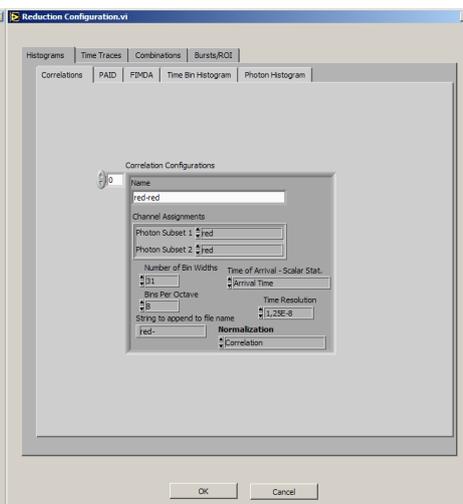
A



B



C



**Abbildung 3.17:** Aufbereitung der Rohdaten um entweder die Zeitspuren in einem bestimmten Binning zu extrahieren (B) oder um verschiedene Kanäle mit einander zu korrelieren (C).



## 4 Ergebnisse

### 4.1 Stand der Technik - Bursterkennung

In diesem Kapitel wird die in Abschnitt 3.3.1 vorgestellte Erkennung von Einzelmolekülsignalen anhand der Analyse extrahierter Zeitspuren evaluiert und unter definierten Bedingungen getestet. Dieses Kapitel ist in die Beschreibung zweier Experimente unterteilt, die sowohl die Intensität der Einzelmolekülbursts als auch ihre Anzahl (oder Rate) variiert und die Auswirkung auf unterschiedliche Parameter einer Messung untersucht [72].

#### 4.1.1 Verschiedene Parameter von Atto655 als Funktion der Anregungsleistung

Mit der Anregungsleistung wird die Anzahl der pro Zeiteinheit vom Molekül absorbierten Photonen bestimmt. Ist die Leistung hoch, so wird nach der charakteristischen Fluoreszenzlebensdauer schnell das nächste Photon absorbiert und es steigt die Anzahl der emittierten Photonen pro Zeit (Abbildung 4.1). Ab einer kritischen Anregungsleistung tritt eine Sättigung der Anregung ein. Dies bedeutet, dass das gerade beobachtete Molekül sofort nach der Emission eines Photons wieder in einen angeregten Zustand versetzt wird. Erhöht man die Leistung weiter, so tritt schließlich die Photozerstörung des Moleküls ein. Die in Abbildung 4.1 dargestellten Ergebnisse zeigen den linearen Zusammenhang zwischen der Burstintensität und der Anregungsleistung. Mit der Anregungsleistung steigt auch die mittlere Burstintensität. Bei den hier verwendeten

Molekülen handelt es sich um einzelne Atto655-Moleküle einer konstanten Konzentration von  $\sim 10^{-11} M$ . Der zur Bursterkennung in Abbildung 4.1 verwendete Schwellwert beträgt  $4\sigma$ .

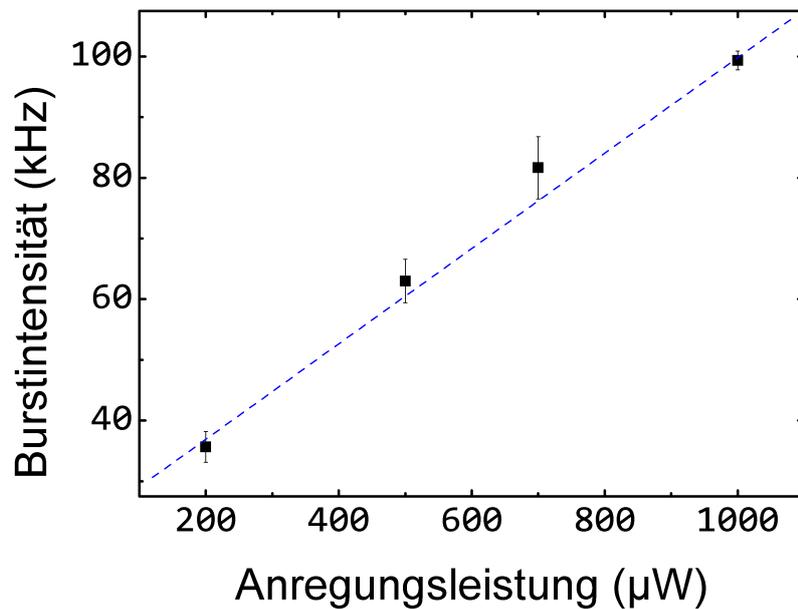
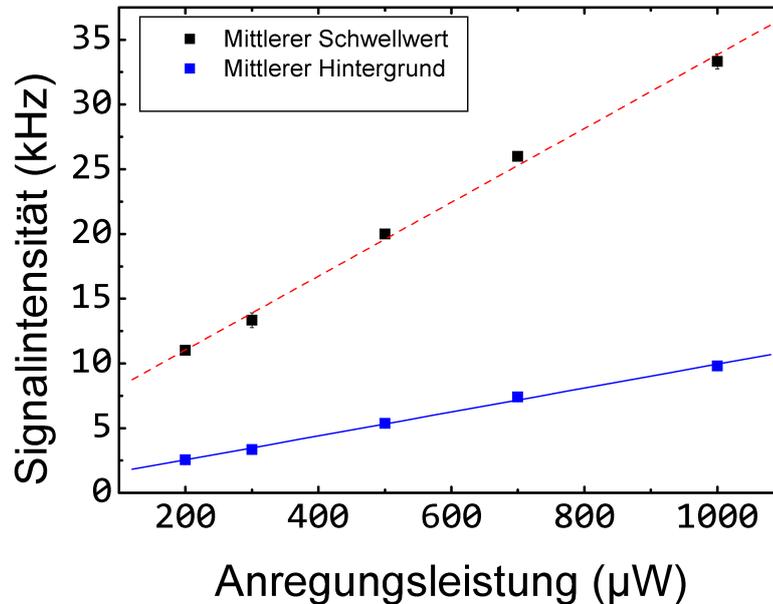


Abbildung 4.1: Burstintensität als Funktion der Anregungsleistung.

Variiert man die Anregungsleistung bei konstanter Farbstoffkonzentration, so steigt nicht nur die Intensität des Nutzsignals (Photoemission der Farbstoffmoleküle), sondern auch der Hintergrund linear an. Abbildung 4.2 zeigt diesen Sachverhalt. Außerdem ist dargestellt, wie der Schwellwert zur Bursterkennung automatisch an den steigenden Hintergrund angepasst wird. Auch in diesem Experiment wurde eine  $4\sigma$ -Schwellwertanalyse eingesetzt.



**Abbildung 4.2:** Experimentell relevante Parameter als Funktion der Anregungsleistung (blau) der Hintergrund und (rot) der mittlere Schwellwert zur Bursterkennung.

Ein weiterer Parameter, der insbesondere für den weiteren Verlauf der Arbeit relevant ist, ist die sogenannte Burstrate (hier in Hertz). Die Burstrate ist die Anzahl von detektierten Einzelmolekülsignalen pro Zeitintervall (pro Sekunde). Bei einer konstanten Molekülkonzentration soll die Burstrate als Funktion der Leistung konstant sein, da sich die Anzahl der Moleküle in der Probenlösung nicht ändert d.h.

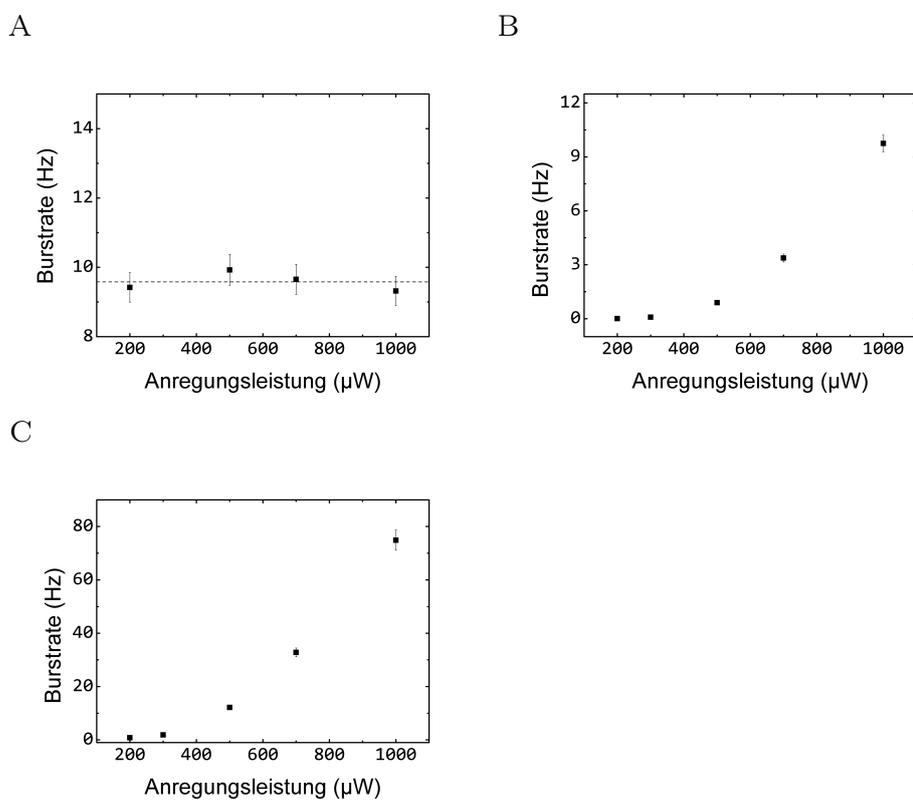
$$(4.1) \quad c = const. \rightarrow \frac{dB}{dP} = 0$$

wobei  $B$  die Burstrate und  $P$  die Anregungsleistung darstellt. Abbildung 4.3 zeigt verschiedene Szenarien der Zeitspurenanalyse. In (A) erkennt man den erwarteten Sachverhalt. Über ein Leistungsintervall von  $800 \mu W$  wird die Bur-

strate aufgenommen. Die Auswertung beinhaltet die dynamische Anpassung des Schwellwertes an den mit der Laserleistung wachsenden Hintergrund.

Die in Abbildung 4.3(B) und (C) dargestellten Ergebnisse entsprechen nicht der Vorhersage. In (B) wurde lediglich der Schwellwert für die Zeitspur bei höchster Anregungsleistung ermittelt und dann für alle anderen Messungen konstant gehalten. Bei dieser Auswertemethode gewinnt man sofort den Eindruck, als würde die Burstrate mit sinkender Anregungsleistung abnehmen. Dieser Effekt kommt dadurch zustande, dass bei höchster Anregungsleistung sowohl der Hintergrund als auch das Fluoreszenzsignal maximal ist, was zu einem maximalen Schwellwert führt. Untersucht man nun mit diesem Schwellwert die anderen Leistungsbereiche (in denen eine weniger effiziente Anregung der Moleküle stattfindet), so wird man zwangsläufig auch eine geringere Anzahl an Einzelmolekülsignalen detektieren, sodass ein exponentieller Abfall der Funktion von maximal  $10\text{ Hz}$  bis nahezu  $0\text{ Hz}$  zu erwarten ist. In Teil (C) der Abbildung ist im Wesentlichen der selbe Effekt zu erkennen. Hier besteht lediglich der Unterschied, dass der Schwellwert per Augenmaß (also eher willkürlich) festgelegt wurde und sich daher z.T. erheblich in den Burstraten unterscheidet. So ist bei höchster Anregungsleistung ein neunfacher Unterschied in der Burstrate zu verzeichnen.

Wichtig festzuhalten ist also, dass bei variierender Anregungsleistung eine dynamische Anpassung des Schwellwertes an das Hintergrundsignal erforderlich ist.



**Abbildung 4.3:** Burstrate bei dynamischer Anpassung des Schwellwertes (A) bei Bursterkennung mit höchstem Schwellwert (B) und empirisch ermittelten Schwellwert (C).

#### 4.1.2 Burstrate von Atto565 als Funktion der Konzentration

Wichtig, für alle weiteren Betrachtungen bezüglich der Einzelmolekülidentifikation ist, dass sich alle Messungen in einem beschränkten Konzentrationsbereich abspielen und maximal eine Konzentration von  $10^{-10} M$  verwendet wird.

Die Burstrate kann durch die Variation der Molekülkonzentration in der Probenlösung gesteuert werden. Je höher die Konzentration, desto höher ist auch die Wahrscheinlichkeit, dass ein Molekül durch das Anregungsvolumen dif-

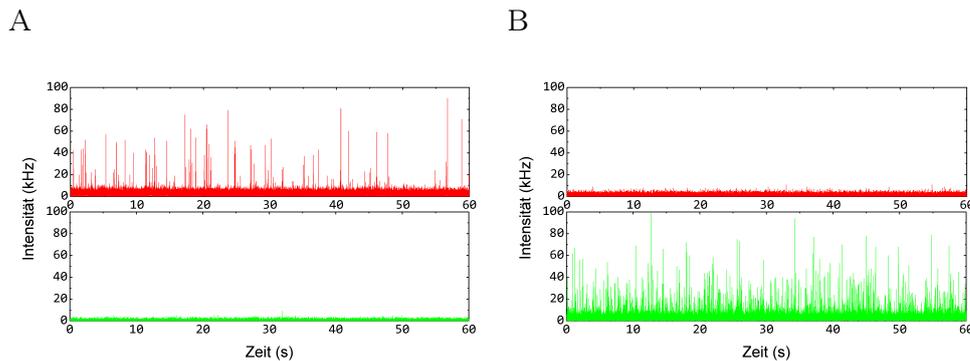
fundiert und damit die Burstrate steigt. Wird jede Messung mit dynamischer Schwellwertanpassung ausgewertet, so würde dies für eine Konzentration von  $10^{-11} M$  bedeuten, dass ein Schwellwert (aufgrund der hohen Konzentration) ermittelt wird, der über dem der anderen Schwellwerte für geringere Konzentrationen liegt. Dies führt dazu, dass bei dieser Konzentration entgegen der Vermutung die ermittelte Burstrate geringer ist als bei einer kleineren Molekülkonzentration. Bei Verringerung der Moleküldichte wird der Mittelwert der Zeitspur und damit der Schwellwert sinken. Als Folge detektiert man eine höhere Burstrate. Wird die Lösung darüber hinaus verdünnt, so sinkt der Schwellwert abermals, jedoch auch die Moleküldichte, sodass ein monotoner Abfall der Burstrate bis zu einer Konzentration von  $\sim 10^{-12} M$  zu erwarten ist.

Es lässt sich festhalten, dass im Wesentlichen zwei Parameter die Schwellwertanalyse bestimmen: Zum Einen die Konzentration und zum Anderen die Laserleistung. Letzteres ist maßgeblich für die Burstintensität und den Hintergrund verantwortlich. Das bedeutet, dass im Falle variierender Laserleistung der Schwellwert dynamisch an den Hintergrund angepasst werden muss. Im Falle variierender Fluorophorkonzentrationen muss die Messreihe (z.B. bei direkten Vergleichen) mit einem konstanten Schwellwert ausgewertet werden.

### 4.2 Charakterisierung der Einzelmolekülanlage

Um eine (bis auf elektronisches Rauschen und einzelne Hintergrundphotonen) störungsfreie Messungen zu gewährleisten muss in erster Linie sichergestellt werden, dass kein Übersprechen (engl. Crosstalk) von Fluoreszenz unterschiedlicher Kanäle auftritt. Außerdem muss geprüft werden, ob die verwendeten Laserlinien effizient aus dem Detektionsarm herausgefiltert werden.

## 4.2.1 Spektrale Charakterisierung der Detektionskanäle

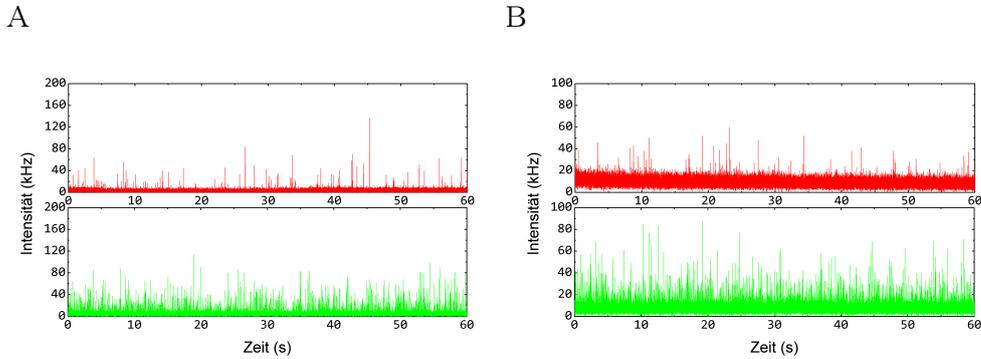


**Abbildung 4.4:** Zwei-Farben Zeitspuren bei (A) roter (638nm) und (B) grüner (532nm) Anregung bei Anregungsleistungen von  $\approx 600 \mu W$  und  $\approx 550 \mu W$ . Die Zeitspuren zeigen eine Einzelmolekülmessung einer Mischprobe aus Atto647N und Atto565 bei äquimolarer Konzentration von  $\approx 10^{-11} M$ .

In Abbildung 4.4 wird jeweils in (A) und (B) die selbe Probe unter unterschiedlicher Anregung dargestellt. Es handelt sich dabei um eine Mischprobe aus zwei (spektral) unterschiedlichen Molekülen, Atto565 (grün) und Atto647N (rot) bei einer äquimolaren Konzentration von  $\approx 10^{-11} M$  in PBS. Die Laserleistungen betragen  $\approx 600 \mu W$  bei  $638 nm$  und  $\approx 600 \mu W$  bei  $532 nm$ . In (A) wird eine Zweifarben Zeitspur gezeigt, die lediglich bei roter Anregung aufgenommen wurde. Dabei wurde verhindert, dass grüne Laserstrahlung zur Probe gelangt, indem der Laserstrahl mittels Blende blockiert wurde. Bei Betrachtung der roten Zeitspur in (A) erkennt man, wie zu erwarten, ein von einzelnen Atto647N Molekülen generiertes zeitabhängiges Intensitätssignal. Das diese Messung definierende Signal-zu-Hintergrund Verhältnis (SNR=Signal to noise ratio) beträgt  $9,46 \pm 0,89$  (siehe Tabelle 4.1). Dieses Verhältnis wird maßgeblich durch den Hintergrund bestimmt, welcher proportional zum Nutzsignal steigt. Die dazu korrespondierende grüne Zeitspur dagegen, zeigt wie gewünscht (bis auf

den bei konstanter Laserleistung konstanten Hintergrund bei  $\approx 3\text{ kHz}$ ) kein störendes bzw. von rot fluoreszierenden Molekülen ausgelöstes Signal, welches auch als Einzelmolekülereignis sichtbar wäre. Im Teil (B) der Abbildung 4.4 wird der entgegengesetzte Fall dargestellt. Dabei wird die selbe Mischprobe nur mit Licht der Wellenlänge von  $532\text{ nm}$  angeregt. Hier erkennt man, dass die rote Einzelmolekülspur verschwindet und dafür das rote Signal erscheint. Das SNR beträgt für den grünen Kanal unter diesen Messbedingungen  $7,92 \pm 0,33$  was einem relativen Unterschied von  $\approx 16,3\%$  zum roten Kanal entspricht. Auf dem roten Kanal herrscht ein Hintergrundsignal von  $\approx 7 - 10\text{ kHz}$ , was etwa einem Faktor von zwei gegenüber dem grünen Kanal entspricht. Diese Diskrepanz ist hauptsächlich auf leicht unterschiedliche Filtereigenschaften zurückzuführen.

Das dritte Szenario, dargestellt in Abbildung 4.5(A), beinhaltet die simultane Anregung der Mischprobe durch beide ( $532\text{ nm}$  bei  $\approx 550\text{ }\mu\text{W}$  und  $638\text{ nm}$  bei  $\approx 600\text{ }\mu\text{W}$ ) Wellenlängen. Die Einzelmolekülsignale auf beiden Kanälen können mit dem Auge klar vom Hintergrund getrennt werden. Führt man allerdings auf beiden Kanälen eine genauere Analyse durch, so findet man heraus, dass sich auf beiden Kanälen im Gegensatz zur Einfarbenanregung das SNR verschlechtert. Man findet, wie in Tabelle 4.1 dargestellt für den grünen Kanal ein SNR von  $5,3 \pm 0,06$  und der rote Kanal weist ein SNR von  $3,99 \pm 0,17$  auf. Dieser Umstand bedeutet eine zweifache Verschlechterung des Verhältnisses. Sehr wahrscheinlich wird dieses Ergebnis durch die Tatsache hervorgerufen, dass die Signalintensität auf beiden Kanälen durch Photozerstörung [15, 73] herabgesetzt wird. Absorbiert z.B. ein rotes Farbstoffmolekül (hier Atto647N) ein rotes Photon so wird es in einen angeregten Zustand versetzt. Absorbiert der angeregte Farbstoff daraufhin ein weiteres Photon vom grünen Laser mit einer kürzeren Wellenlänge könnte die Zerstörung des  $\pi$ -Elektronensystems die Folge sein. Ein ähnlicher Prozess könnte demnach auch auf dem grünen Kanal mit Atto565-Farbstoffmolekülen geschehen.



**Abbildung 4.5:** Zwei-Farben Zeitspuren bei (A) rot-grüner und (B) rot-grün-blauer Anregung. Die Zeitspuren zeigen eine Einzelmolekülmessung der Farbstoffmoleküle Atto647N und Atto565 bei äquimolarer Konzentration von  $\approx 10^{-11} M$ . Die Laserleistungen betragen hier  $\approx 600 \mu W$  im roten ( $638 nm$ ),  $\approx 550 \mu W$  im grünen ( $532 nm$ ) und in (A)  $\approx 600 \mu W$  im blauen ( $476 nm$ ).

Nimmt man die an der hier vorgestellten Anlage dritte implementierte Laserlinie in Betrieb und regt die Zwei-Farben Mischprobe zusätzlich mit Licht der Wellenlänge  $476 nm$  an, so wird eine weitere Abnahme des SNR verzeichnet. Dies liegt zum Einen wiederum an einem erhöhtem Grad von Photozerstörung und zum Anderen erkennt man deutlich in den Zeitspuren der Abbildung 4.5 (B), dass das Beleuchten der Probe mit Licht dieser Wellenlänge eine Erhöhung des Hintergrundes mit sich bringt. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit werde ich mich daher auf die Zweifarbenanregung der Proben beschränken.

**Tabelle 4.1:** Signal zu Hintergrundverhältnisse bei verschiedenen Anregungsmodi.

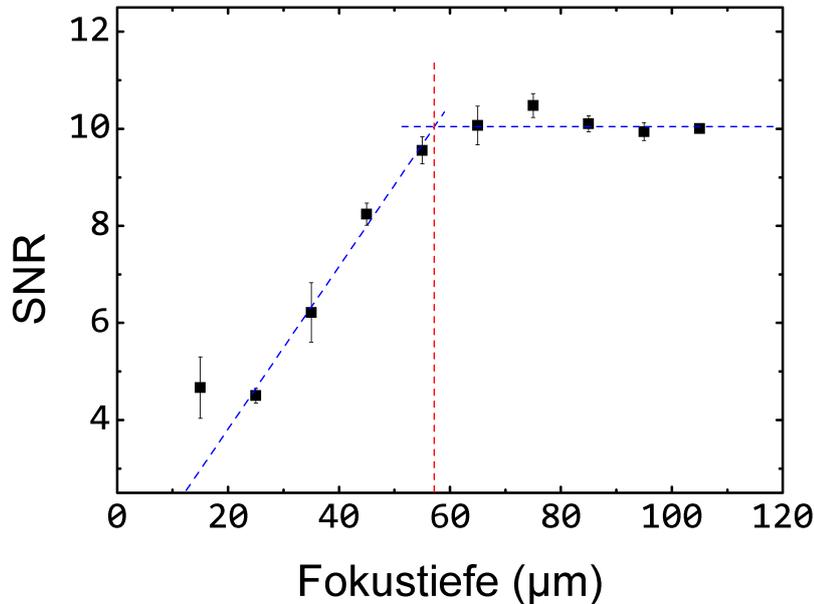
Anregungswellenlänge (nm)	SNR grüner Kanal	SNR roter Kanal
532	$7,92 \pm 0,33$	-
638	-	$9,46 \pm 0,89$
532 & 638	$5,3 \pm 0,06$	$3,99 \pm 0,17$
532 & 638 & 476	$4,4 \pm 0,08$	$3,45 \pm 0,21$

### 4.2.2 Eindringtiefevariation und Bestimmung relevanter Parameter

Das folgende Kapitel thematisiert ein grundlegendes Experiment zur Variation der Eindringtiefe des fokussierten Laserstrahls in eine homogene Probe. Bei Einzelmolekülmessungen in Lösung (PBS) bei homogener Verteilung der Moleküle stellt sich die Frage nach der (optimalen)  $z$ -Position des Laserfokus nach Überschreitung des sogenannten Glassprungs. Mit Hilfe eines Schrittmotors kann das verwendete Objektiv (Kapitel 3.1.1) in definierter Weise mit einer Schrittweitauflösung von  $\approx 1 \mu\text{m}$  in der Probenlösung bewegt werden. Alle in diesem Unterkapitel dargestellten Ergebnisse sind unter Verwendung einer konstanten Atto647N-Konzentration von  $\approx 10^{-10} M$  und einer ebenfalls konstanten Laserleistung von  $\approx 350 \mu\text{W}$  aufgenommen worden.

Abbildung 4.6 zeigt das SNR als Funktion der  $z$ -Position des Laserfokus in der Lösung. Auffällig dabei ist, dass das Verhältnis nach einem linearen Anstieg bei etwa  $60 \mu\text{m}$  saturiert. Nahe an der Oberfläche des Deckglases ist, wie man auch in Abbildung 4.11(A) (bei  $15 \mu\text{m}$ ) an der dargestellten Zeitspur erkennt, ist der Hintergrund, verursacht durch am Glas inelastisch getreute Photonen, noch nicht vernachlässigbar und wird mit zunehmender Tiefe 4.11(B) und (C) geringer. Ab  $\approx (60 \pm 2) \mu\text{m}$  bis zu einer Tiefe von  $\approx 100 \mu\text{m}$  erreicht das SNR einen Wert von etwa 10. Verfährt man den Laserfokus über  $100 \mu\text{m}$  hinaus, so gelangt (je nach Arbeitsweite des Objektivs) an die obere Seite des Objektträgers, was sich wiederum durch ein erhöhtes Streusignal und eine Verschlechterung des SNR bemerkbar macht.

Die mittlere Transitzeit der fluoreszierenden Moleküle durch das Anregungsvolumen ist dagegen direkt proportional zur Eindringtiefe des Laserfokus (Abbildung 4.7). Dieser Graph zeigt eine Messreihe, bei der schrittweise ( $\Delta d_f = 10 \mu\text{m}$ ) die Eindringtiefe, beginnend bei  $\approx 15 \mu\text{m}$ , bis  $\approx 105 \mu\text{m}$  erhöht wurde. Für jede Position des Anregungsvolumens in der Lösung wurde

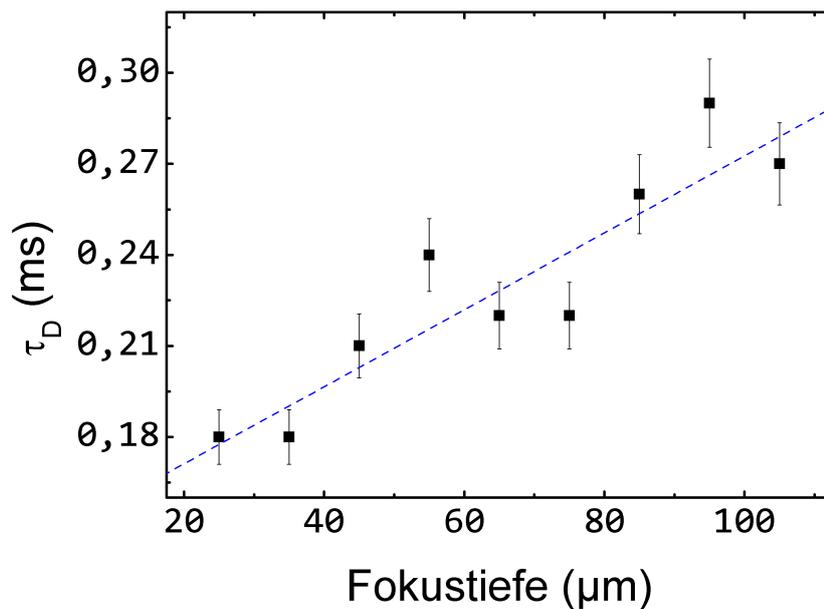


**Abbildung 4.6:** Signal zu Hintergrundverhältnis als Funktion der Eindringtiefe. Die Fehlerbalken stellen Standardabweichungen aus dreifachen Messungen dar.

die Diffusionszeit der Moleküle ermittelt. Die Änderung der Diffusionszeit als Funktion der Eindringtiefe wurde in diesem Experiment durch eine lineare Anpassung zu  $\frac{d\tau_D}{d(d_f)} \approx 0,0013 \frac{\text{ms}}{\mu\text{m}} = 1,3 \frac{\mu\text{s}}{\mu\text{m}}$  bestimmt. Dieser Wert zeigt, dass die Änderung der Eindringtiefe um einen Mikrometer etwa einer Änderung der Diffusionszeit von einer Mikrosekunde entspricht, was unterhalb der (Diffusionszeit-)Auflösung der FCS-Methode liegt und damit als Fehler für eine Messung in der Praxis unkritisch ist.

Man stellt fest, dass die Diffusionszeit mit steigender Eindringtiefe wächst. Bei dieser Interpretation ist es wichtig anzumerken, dass es sich bei den ermittelten Diffusionszeiten um sogenannte apparente Diffusions- oder Transitzeiten handelt. Bei geringen Eindringtiefen gewinnen Oberflächeneffekte zunehmend an

Bedeutung. Die Moleküle besitzen die Eigenschaft sich an der Deckglasoberfläche abzusetzen und damit langsamer zu diffundieren als andere Moleküle, die sich weiter oberhalb der Oberfläche befinden. Diese Wechselwirkung bewirkt eine längere Aufenthaltszeit im Anregungsvolumen und erlaubt dadurch eine effizientere Anregung. Der Zyklus der Absorption eines Anregungsphotons und der darauf folgenden Emission kann damit öfter stattfinden, was die Wahrscheinlichkeit für Dunkelzustände (z.B. Triplettzustände) und damit Photozerstörung erhöht. Dringt man tiefer in die Probenlösung ein, ist der Einfluss der Adsorption der Teilchen an der Deckglasoberfläche geringer und es werden realistischere (apparente) Diffusionszeiten registriert.



**Abbildung 4.7:** Mittlere Transitzeit als Funktion der Eindringtiefe. Die Fehlerbalken stellen Standardabweichungen aus dreifachen Messungen dar.

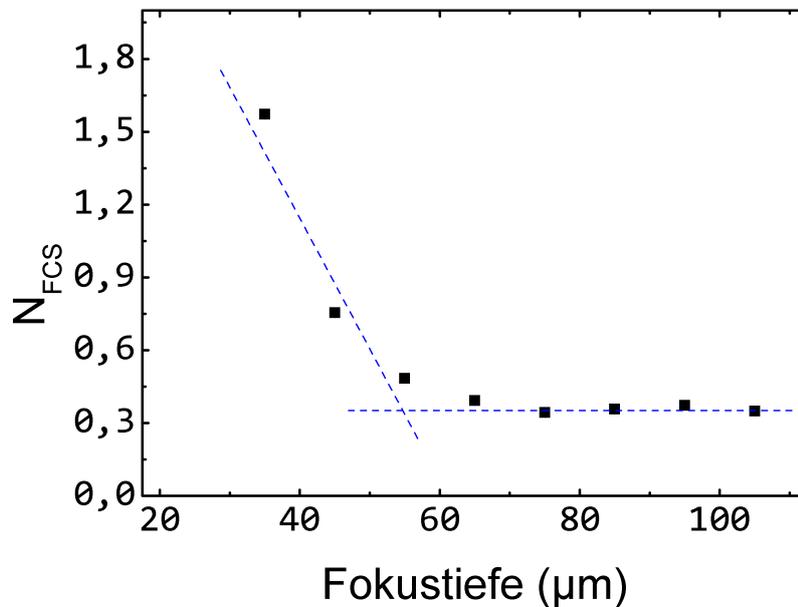
Eine Darstellung, die den letzten Abschnitt der Interpretation von Abbildung

4.7 untermauert, ist der in Abb. 4.8 gezeigte Graph. Bis zu einer charakteristischen Eindringtiefe von  $d_{crit} \approx 60 \mu m$  nimmt die mit FCS ermittelte mittlere Teilchenzahl in linearer Weise ab. Man kann einen klaren Sättigungsverlauf für Eindringtiefen mit  $d_f \geq 60 \mu m$  erkennen, bei der sich die Teilchenkonzentration invariant gegenüber der Eindringtiefenvariation verhält. Über eine Tiefe von  $\Delta d_f \approx 40 \mu m$  bis  $60 \mu m$  ändert sich die Teilchenzahl um etwa 1,3 Moleküle. Dies entspricht einer Steigung von  $\approx 0,03 \frac{\text{Teilchen}}{\mu m}$ .

Die Tatsache, dass die durchschnittliche Anzahl der Moleküle dicht an der Oberfläche höher ist als ab  $d_{crit}$  unterstreicht die Vermutung, dass eine attraktive Wechselwirkung mit der Glasoberfläche stattfindet und sich so die Konzentration graduell als Funktion der Tiefe ändert. In der Messpraxis ist es deshalb ratsam den Fokus oberhalb von  $d_{crit}$  einzustellen, um so robustere, und dadurch weniger von statistischen Fluktuationen [72] behaftete, Teilchenzahlen zu bestimmen.

Bei der Erweiterung des Experiments der Eindringtiefenvariation von einem FCS- zu einem Einzelmolekülexperiment kann man (mit bereits besprochenen Methoden) die Rate der Einzelmolekülereignisse als Funktion der Fokustiefe auswerten (Abb. 4.9). Auch hier findet man, dass bis zur kritischen Tiefe  $d_{crit}$  ein (näherungsweise) linearer Zusammenhang besteht. Es ist ein Zuwachs der Burstrate mit größer werdender Eindringtiefe zu verzeichnen. Im linearen Teil des dargestellten Zusammenhangs ist die Änderung der Burstrate nach der Fokustiefe  $\frac{dR}{d(d_f)} \approx 0,03 \frac{Hz}{\mu m}$ , wobei  $R$  die Burstrate in  $Hz$  angibt, bestimmt worden.

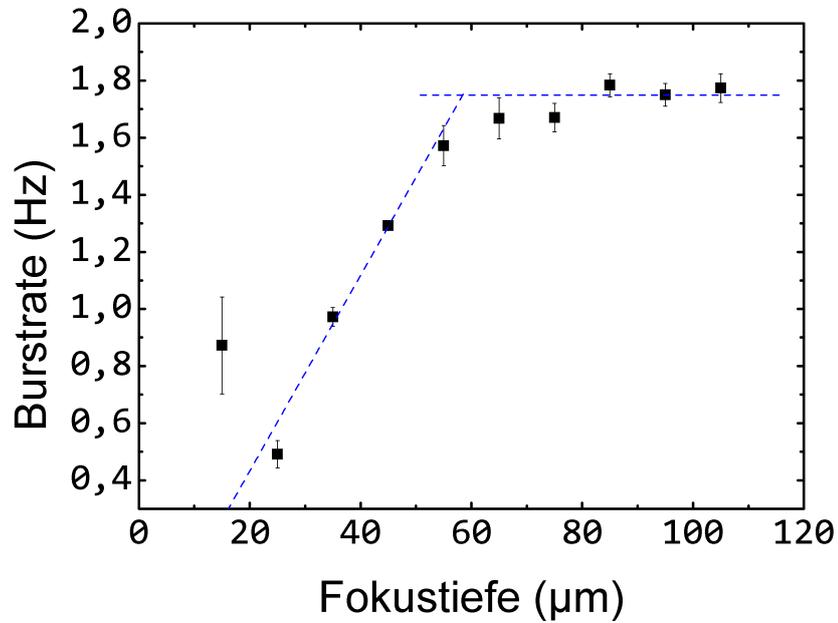
Bedingt durch die verlangsamte Diffusion der Moleküle an der Glasoberfläche ist die Burstrate (Anzahl der Einzelmolekülereignisse pro Sekunde) herabgesetzt. Diese Aussage wird durch die in Abbildung 4.11 gezeigten Zeitspuren bekräftigt. Es werden höhere Intensitäten verzeichnet, dafür allerdings weniger Ereignisse. Diffundieren die Moleküle mit zunehmender Entfernung von der Oberfläche immer ungehinderter, so steigt  $R$  bis zu einem Wert von etwa



**Abbildung 4.8:** Teilchenzahl als Funktion der Eindringtiefe. Die Fehlerbalken stellen Standardabweichungen aus dreifachen Messungen dar.

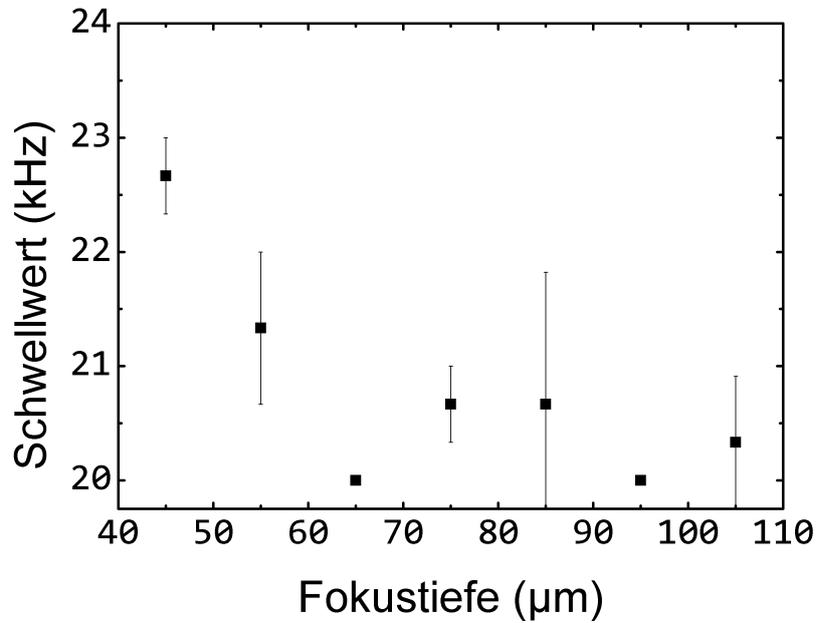
$\approx 1,8 \text{ Hz}$  an und ist dann unabhängig von axialen Fokusänderungen.

Um das Experiment der Eindringtiefevariation abzurunden und vor allem die Korrektheit der Einzelmolekülbetrachtungen zu bestätigen, ist in Abbildung 4.10 der (automatisch) ermittelte  $4\sigma$ -Schwellwert, der zur Bursterkennung angewendet wurde, gegen die Fokustiefe aufgetragen. Sehr deutlich ist bei kleineren Abständen zur Oberfläche ein höherer Schwellwert errechnet worden, was leicht mit einem höheren Hintergrundsignal begründet werden kann. Dieses Hintergrundsignal, rührt von "roter" Glaslumineszenz her, was, da rotverschoben, durch die Emissionsfilter vor den Detektoren transmittiert und damit detektiert wird. Dieser erhöhte Hintergrund ist sehr gut in Abbildung 4.11(A)



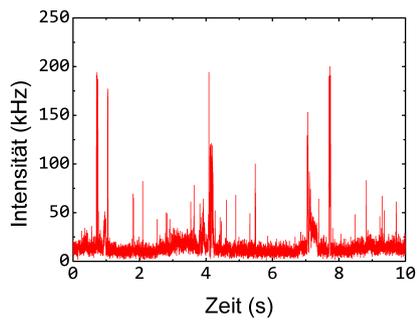
**Abbildung 4.9:** Burstrate als Funktion der Eindringtiefe. Die Fehlerbalken stellen Standardabweichungen aus dreifachen Messungen dar.

im Vergleich zu der in (B) gezeigten Zeitspur bei größerer Eindringtiefe zu erkennen. Außerdem erkennt man bei etwas genauerer Betrachtung des Graphen in Abb.4.10, dass die Fehlerbalken etwa  $\Delta_{rel} \approx 5\%$  des Messwertes darstellen. Diese im Vergleich zu anderen Messungen höhere Schwankungen kommen durch den ebenfalls stark variierenden Hintergrund (selbst bei konstanter) Eindringtiefe zustande.

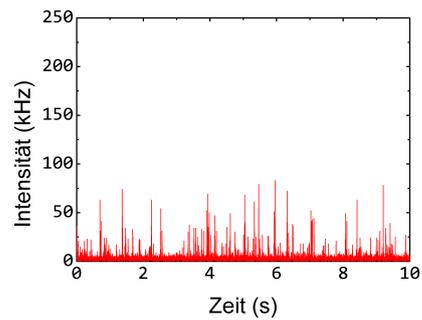


**Abbildung 4.10:** Schwellwert zur Bursterkennung als Funktion der Eindringtiefe. Die Fehlerbalken stellen Standardabweichungen aus dreifachen Messungen dar.

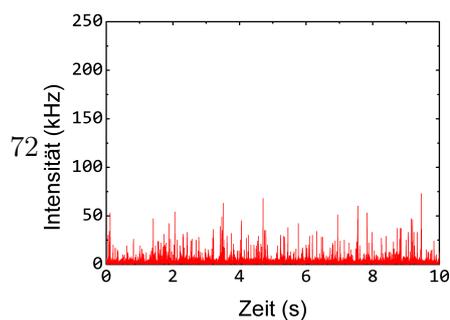
A



B



C



**Abbildung 4.11:** Zeitspuren für verschiedene Eindringtiefen (A)  $15 \mu\text{m}$  (B)  $65 \mu\text{m}$  (C)  $105 \mu\text{m}$ .

Abschließend kann man festhalten, dass die Ergebnisse dieses Abschnitts klar zeigen, dass bei konfokalen FCS/Einzelmolekülmessungen eine Mindesteindringtiefe von  $d_f \geq d_{crit} \approx 60 \mu m$  eingestellt werden sollte, um zuverlässige, mit wenig Schwankungen behaftete Resultate (Teilchenzahlen, Burstraten), zu erhalten. Einzig die Diffusions- bzw. Transitzeit verändert sich stetig über den gesamten gemessenen Bereich von  $\Delta d_f = 80 \mu m$  in linearer Weise. Der Beste Grund, diese Mindesttiefe zu wählen ist das bei  $d_f \geq d_{crit}$  saturierende SNR. Ein möglichst hohes SNR ist zur eindeutigen Auswertung (gerade bei nichtlinearen Anpassungen von FCS-Daten) essentiell und verringert zu dem den Messaufwand, da die erhaltenen Ergebnisse zuverlässiger werden.

Des Weiteren sollte man bei Einzelmolekülmessungen die Eindringtiefe so wählen, dass das Driften des Objektivs in z-Richtung bis zu einem gewissen Grad kompensiert werden kann ( $d_f \gg d_{crit}$ ). Die Driftrate hängt allerdings stark vom verwendeten Mikroskop und der Objektivhalterung ab. Mit einer aktiven z-Regelung, z.B. über einen geschlossenen Regelkreis (z.B. Soll-Ist-Vergleich beim PID Regler) kann der Drift korrigiert bzw. ausgeglichen werden.

## 4.3 Mikrofluidische Experimente

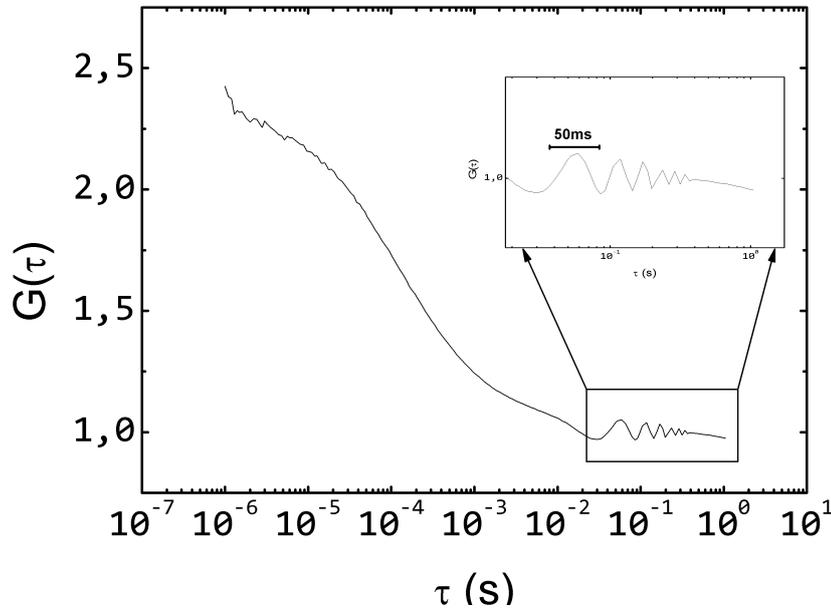
Die Hauptlimitierung bei konfokalen Einzelmolekülmessungen ist die praktische Detektionssensitivität bei einer Molekülkonzentration von  $c \approx 10^{-12} M$ . Das bedeutet, dass die Zeit (bei freier Diffusion der Moleküle), die bis zur Detektion des nächsten Einzelmolekülereignisses bei geringeren Konzentrationen zu lang ist, um eine praktisch signifikante Statistik zu erhalten. Theoretisch verzehnfacht sich die Zeit bei einer Konzentration von  $10^{-13} M$ . Um dieses Hindernis zu überwinden und in den sub-pikomolaren Bereich vorzudringen bedient man sich im Wesentlichen zweier Methoden. Zum Einen, der beugungsbegrenzten Ausdehnung des fokalen Anregungsvolumens: Man verwendet nun (Nano/Mikro-)Strukturen, die kleiner sind als das Anregungsvolumen, um die zu beobachtenden Moleküle in ihrer räumlichen Bewegung einzuschränken.

Anders als in einem offenen Volumen (z.B. ein Tropfen auf einem Deckglas), in dem die Moleküle auch am Fokus vorbeidiffundieren, kann man sie nun durch diese Einschränkung dazu zwingen sich innerhalb eines definierten Volumens aufzuhalten. Um das zu erreichen, können sogenannte Mikro/Nanokapillare mit einem Innendurchmesser von  $\approx 500\text{ nm}$  verwendet werden. In z-Richtung besitzt der Fokus etwa eine Ausdehnung von  $d_z \approx 1\ \mu\text{m}$ . Bringt man die soeben angesprochene Kapillare in das Anregungsvolumen, welches eine größere Ausdehnung besitzt, so wird jedes Molekül, das sich durch die dünne Spitze der Kapillare [74] bewegt angeregt und emittiert daraufhin Fluoreszenzphotonen. Auf diese Art erzielt man eine lokale Konzentrationserhöhung der fluoreszierenden Moleküle und außerdem erreicht man eine wesentlich effizientere Anregung bei gleicher Anregungsleistung, verglichen mit einer Messung in freiem Volumen.

Zum Anderen kann die Konzentration, wie im Verlauf gezeigt wird, durch das Anlegen von Druck an eine solche Mikrostruktur erhöht werden. Auf diese Art, werden auch mehr Moleküle in kürzerer Zeit detektiert, was ebenfalls einer Erhöhung der Burstrate bzw. einer Konzentrationserhöhung gleich kommt.

### 4.3.1 Vorexperimente zur mikrofluidischen Detektion von einzelnen Molekülen

Die erste Möglichkeit der Konzentrationserhöhung durch die Volumeneinschränkung kann relativ leicht unter Verwendung einer Mikrokapillaren realisiert werden. Die hier eingesetzte Kapillare (Femtotips, Eppendorf) besitzt an ihrer dünnsten Stelle einen Innendurchmesser von  $500\text{ nm}$  und ist unter einem Winkel von  $35^\circ$  abgewinkelt, sodass eine bequeme Positionierung über dem Objektiv des Mikroskops ermöglicht werden soll, ohne Gefahr zu laufen, das Objektiv durch versehentliches Aufsetzen der Kapillare zu beschädigen. In dem speziellen Fall des hier entwickelten Aufbaus, wurde der Einfachheit halber auf



**Abbildung 4.12:** FCS-Kapillarmessung von freiem Atto655 Farbstoff einer Konzentration von  $\approx 10^{-10} M$  bei einer Anregungsleistung von  $\approx 300 \mu W$  mit einer Vibration von etwa  $20 Hz$  der Kapillare.

die Verwendung eines kompletten Mikroskops verzichtet (siehe Kapitel 3.1.1), sodass sich die exakte Positionierung der dünnsten Stelle der Kapillare in x, y - und z-Richtung ohne Okular als schwierig herausstellt, da die Mikrokapillare für das Auge nur an ihrer breitesten Stelle sichtbar ist. Demnach ist es auch nur schwer zu beurteilen, ob sich das fokale Anregungsvolumen wirklich an der Position des dünnsten Innendurchmessers von  $500 nm$  befindet.

Nach entsprechender Positionierung der Kapillaren über dem Objektiv liefert eine einfache FCS Messung das in Abbildung 4.12 dargestellte Resultat. Eine

Anpassung nach Gleichung [75]

$$(4.2) \quad G(\tau) = \frac{1}{N} \left( \frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_d}} \right) \cdot \left( 1 + K \cdot \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_{exp}}\right) \right)^b$$

liefert wie zu erwarten eine mittlere Diffusionszeit des Farbstoffes von  $\tau_D \approx (350 \pm 50) \mu s$ . Betrachtet man die aufgenommene Korrelationsfunktion zu längeren Zeiten, fällt auf, dass sich eine Schwingung mit einer Periode von etwa  $T \approx 50 ms$  ausbildet. Die Interpretation dieses Wertes ist unter Betrachtung der daraus resultierenden Frequenz von  $\frac{1}{T} = f \approx 20 Hz$  nicht schwer. Die Frequenz kann damit erklärt werden, dass die Kapillare etwa 20 Mal in der Sekunde in das Anregungsvolumen hinein und heraus schwingt und dadurch Fluktuationen im Fluoreszenzsignal erzeugt, was die Kapillare für Anwendungen in der FCS-Analyse fragwürdig macht. Die Schwingungen könnten entweder Eigenschwingungen der Kapillare oder durch Schmitt induzierte Schwingungen sein. Durch die Erhöhung der Viskosität des der Kapillare umgebenen Mediums kann die Frequenz nur unwesentlich verringert werden.

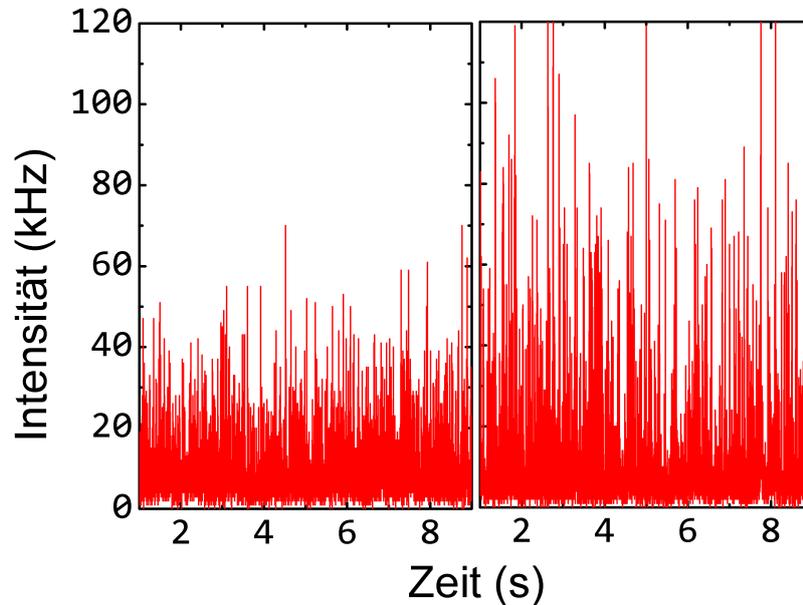
Eine weitere Tatsache, die das Messen mit Mikrokapillaren evtl. problematisch werden lässt, ist der Umstand, dass einige dieser Kapillaren bereits ab Werk, beim Öffnen der Schutzhülle, an der Spitze verstopft sind. Dies ist exemplarisch in Abbildung 4.13 dargestellt. Das Befüllen einer solchen Kapillare mit der Farbstofflösung ist weiterhin möglich, jedoch gibt es keine Möglichkeit, die Kapillare von der Verunreinigung zu befreien, ohne die feine Spitze zu beschädigen.

Bei Einzelmolekülmessungen kommt der wesentliche Vorteil der Mikrokapillare zum Tragen. Durch das etwa zweifache Verhältnis von fokaler z-Ausdehnung zu Kapillarinndendurchmesser diffundieren die in der Lösung enthaltenen Moleküle nur noch durch den Fokus und nicht mehr, wie es im offenen Volumen auf einem Objektträger der Fall ist, durch Randbereiche und werden so



**Abbildung 4.13:** Ein Auflichtbild einer verstopften Mikrokapillare. Damit wird der Durchfluss der Probenlösung bis in die Spitze verhindert und die Kapillare unbrauchbar.

wesentlich effizienter angeregt. In Abbildung 4.14 sind Fluoreszenzzeitspuren der selben Konzentration ( $\approx 10^{-10} M$ ) und konstanter Leistung ( $\approx 650 \mu W$ ) von freien Atto655 Molekülen in PBS gezeigt. Die linke Abbildung stellt eine Einzelmolekültrajektorie dar, die im offenen Volumen eines Objektträgers entstanden ist. Abhängig von mehreren experimentellen Faktoren kann für diese Messung ein SNR von etwa  $\approx 6$  bestimmt werden. Überführt man eine Lösung mit gleicher Molekülkonzentration in die Kapillare und regt die Moleküle bei gleicher Leistung an, so lässt sich das SNR zu  $SNR \approx 12$  bestimmen. Dies entspricht einer Verdoppelung des SNR im Vergleich zur Messung im freien Volumen. Durch eine effizientere Anregung der Moleküle in der Kapillare, werden mehr Photonen bei konstantem Hintergrund (im Vergleich zur Messung im offenen Volumen) emittiert. Durch den Femtojet-Injektor besitzt man zusätzlich die Möglichkeit einen definierten Druck an die Kapillare anzulegen, um ungerichtete Bewegung der Moleküle zu unterdrücken und diese in eine bevorzugte Richtung zu drücken. In einer Kapillare, bei der

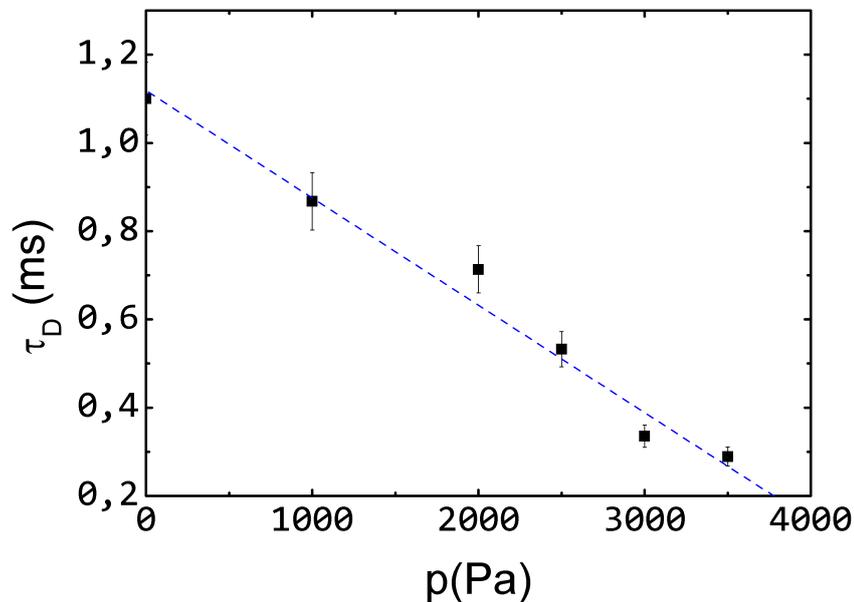


**Abbildung 4.14:** Freie Atto655 Moleküle in PBS einer Konzentration von  $\sim 10^{-10} M$  bei einer Anregungsleistung von  $\sim 650 \mu W$  in (links) offenem Volumen und (rechts) in einer Mikrokapillare mit einem Spitzeninnendurchmesser von  $\sim 500 nm$ .

die Dimensionen des Innendurchmessers kleiner sind, als die fokale Ausdehnung, hat dies außerdem zur Folge, dass jedes Molekül (das nicht photozerstört wird), das sich in der Spitze der Kapillare befindet auch detektiert werden kann und so die Sensitivität steigt.

Durch das Anlegen von Druck wird zunehmend die Diffusionszeit durch die sogenannte Transitzeit ersetzt, da der Druck proportional zur Molekülgeschwindigkeit ist (siehe Kapitel 4.3.6). In Abbildung 4.15 lässt sich ein linearer Zusammenhang mit negativer Steigung erkennen. Mit zunehmendem Druck (zunehmender Geschwindigkeit) reduziert sich die Transitzeit. Der funktionale Zusammenhang für diese Messung lässt sich zu  $\tau_D(p) = -2,43 \cdot 10^{-4} p + 1,12$  bestimmen. Der relevante Parameter ist hier der Wert der Steigung mit

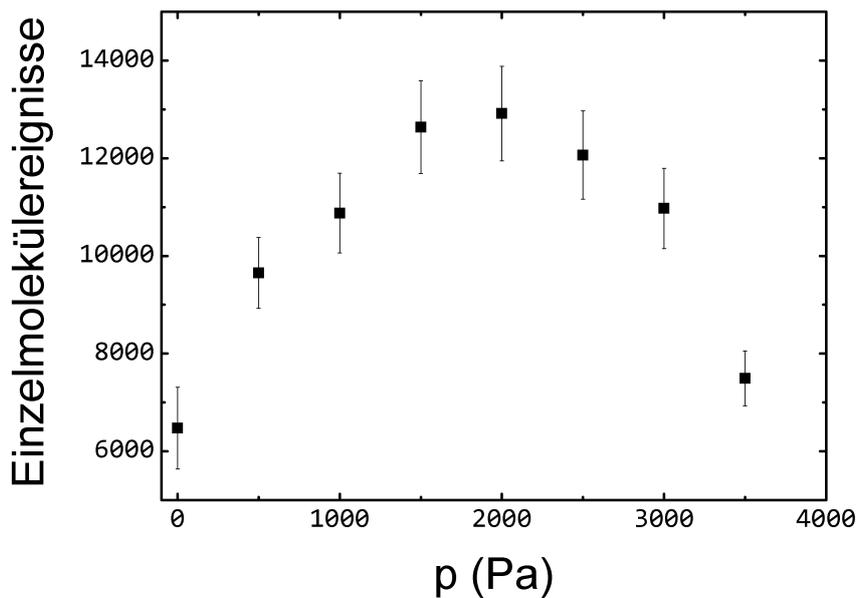
$\frac{d\tau_D}{dp} = -(2,43 \pm 0,18) \cdot 10^{-4} \frac{ms}{Pa} = -(0,243 \pm 0,018) \frac{\mu s}{Pa}$ . Die Transitzeit ändert sich bei einer Druckdifferenz von einem Pascal gerade um  $\approx 0,243 \mu s$ . Dieser Wert liegt etwa um einen Faktor 50 unterhalb der zeitlichen Auflösungsgrenze (bzw. Unterscheidungsgrenze) der FCS-Messung, was bedeutet, dass man den Druck um mindestens  $50 Pa$  erhöhen müsste, um zwei Datenpunkte von einander unterscheiden zu können. Der Y-Achsenabschnitt (hier  $\approx 1,1 ms$ ) gibt die Diffusionszeit ( $p = 0$ ) an.



**Abbildung 4.15:** Transitzeit als Funktion des angelegten Drucks des von freien Atto655 Molekülen einer Konzentration von  $\approx 10^{-10} M$ .

Durch die zunehmende Verkürzung der Transitzeit der Moleküle beim Anlegen von Druck, kann man eine Erhöhung der Rate der Einzelmolekülereignisse erwarten, da bezogen auf ein Zeitintervall (hier  $1 s$ ) mehr Moleküle den Fokus durchqueren. Bei der Analyse der verschiedenen Zeitspuren mit konstantem

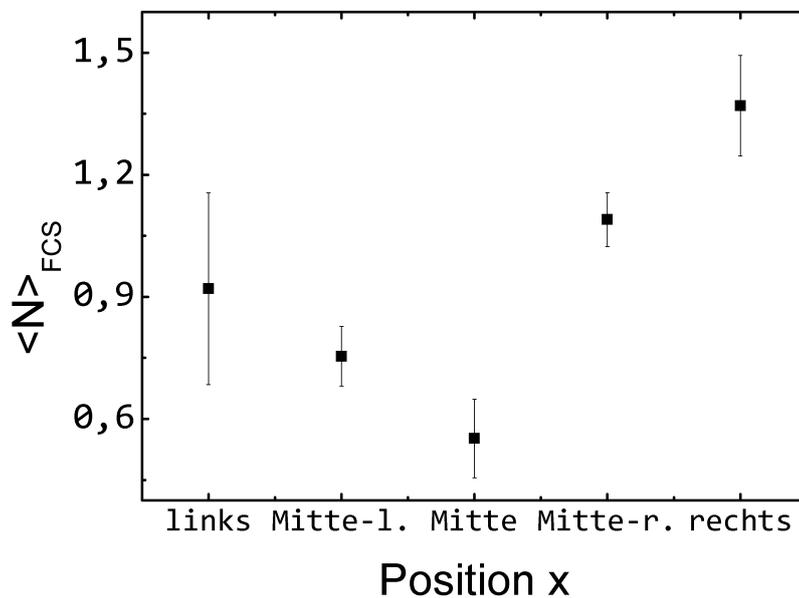
Schwellwert zur Signalseparation fällt der in Abbildung 4.16 dargestellte parabolische Zusammenhang mit einem Maximum bei etwa  $2000 \text{ Pa}$  und  $12915 \pm 968$  Ereignissen auf. Relativ zur gesamten Messzeit entspricht dieser Wert einer Einzelmolekülrate von  $(43,05 \pm 3,2) \text{ Hz}$ . Das so klar ausgebildete Maximum dieser Funktion liegt darin begründet, dass die Moleküle ab einer kritischen Geschwindigkeit  $v_c$  zu kurz im Fokus sind, um als Burst detektiert zu werden. Dies führt dazu, dass die Moleküle nicht mehr als solche erkannt werden und nicht mehr vom Hintergrund der Messung diskriminiert werden können.



**Abbildung 4.16:** Die Anzahl der Einzelmolekülereignisse als Funktion des angelegten Drucks bei einer 5 Minuten Messung. Die Moleküle liegen in einer Konzentration von  $\approx 10^{-11} \text{ M}$  vor und werden mit einer Leistung von  $\approx 500 \mu\text{W}$  angeregt.

### 4.3.2 Beobachtung der Teilchenzahl als Funktion des Ortes entlang des Kanalquerschnitts

Aufgrund der im vorherigen Abschnitt angesprochenen Nachteile der Kapillare (Blockierung durch Verunreinigungen und Vibrationen auf ms-Zeitskala) werden alle weiteren Experimente in dem in Kapitel 3.5 vorgestellten Mikrokanal durchgeführt.



**Abbildung 4.17:** Mittels FCS bestimmte mittlere Teilchenzahl als Funktion des Ortes entlang des Kanalquerschnitts, dicht ( $50 \mu\text{m} \leq x \leq 70 \mu\text{m}$ ) oberhalb der Oberfläche. Die Positionen  $x$  sind im Abstand von  $75 \mu\text{m}$  gewählt. Diese Daten wurden in dreifachen, 45-sekündigen Messungen bei einer Laserleistung von  $\approx 1 \text{ mW}$  und einer Farbstoffkonzentration von  $[\text{Atto655}] \approx 10^{-10} \text{ M}$  aufgenommen. Außerdem wurde ein konstanter Druck von  $\approx 500 \text{ pa}$  angelegt.

Der in Abbildung 4.17 gezeigte Zusammenhang zwischen der mittleren Teilchen-

zahl und der Position des Anregungsvolumens entlang des Kanalquerschnitts (in x-Richtung) zeigt einen parabolischen Funktionsverlauf und zeigt auf, dass sich in der Kanalmitte weniger fluoreszierende Moleküle aufhalten, als an den Rändern. Dieser Umstand kann durch hydrophobe Wechselwirkungen der Farbstoffe mit den Kanalwänden erklärt werden, die ähnlich denen sind, die auch an der Glasoberfläche eines Objektträgers bereits beschrieben wurden. Zu den Rändern besteht, relativ zur Kanalmitte, ein etwa zweifacher Unterschied in der Teilchenzahl.

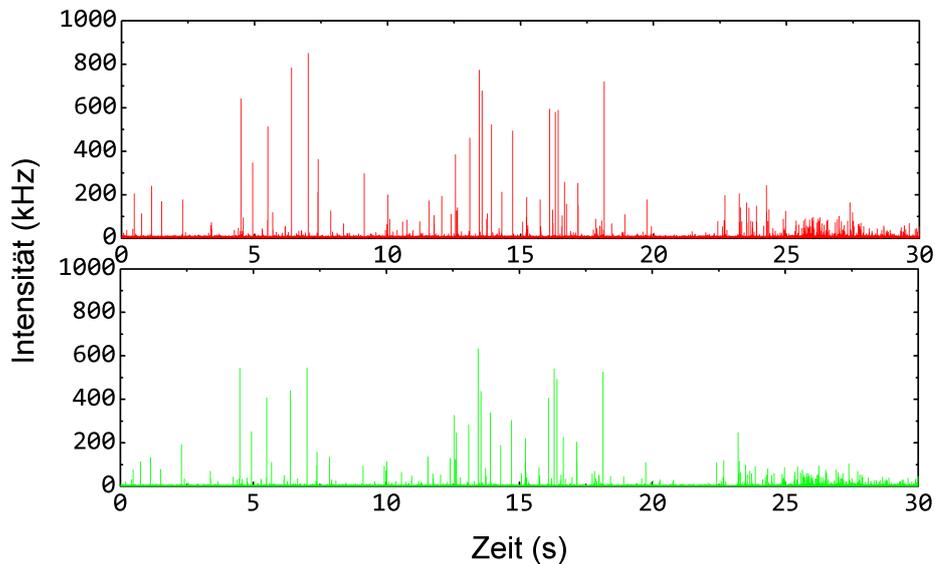
### 4.3.3 Kontrolle der Flüssigkeit durch Anlegen von Druck

Das folgende Experiment soll die Kontrolle der im Kanal enthaltenen Flüssigkeit durch das (plötzliche) Anlegen von Druck demonstrieren. Die für diesen Versuch verwendete Lösung von M280-Beads ist eine 1:100 (1  $\mu\text{l}$  Bead-Stocklösung auf 99  $\mu\text{l}$  PBS) Verdünnung der Mikropartikel.

20 Sekunden nach Beginn der Datenaufnahme wurde ein Volumenstrom (Druck) von  $\approx 50 \frac{\text{ml}}{\text{h}}$  an das Schlauchsystem angelegt. Bis zu diesem Zeitpunkt kann die mittlere Burstintensität zu  $\approx 330 \text{ kHz}$  bestimmt werden. Nach Beschleunigung des Lösungsmittels fällt die Signalintensität auf  $\approx 50 \text{ kHz}$  was einer mehr als sechsfachen Abnahme der Intensität entspricht. Durch den angelegten Druck verkürzt sich die fokale Aufenthaltszeit und damit die zur Emission verfügbare Zeit, was die reduzierte Intensität begründet.

Auffällig ist die abrupte Verringerung des Signals. Mit einer kleinen Verzögerung von weniger als einer Sekunde erreicht die Luftsäule in dem Schlauch das Lösungsmittel und befördert es damit in Richtung Ausgangsöffnung des Mikrokanals.

Dieses Experiment zeigt, dass die Kontrolle über die Strömungsgeschwindigkeit der Moleküle mit Hilfe von Volumenströmen möglich ist.



**Abbildung 4.18:** Eine Zweifarben-Zeitspur von Beads bei Anlegen von Druck ab der 20. Sekunde. Eine Lösung mit einer Konzentration von  $\approx 10^{-14} M$  wird ab der 20. Sekunde durch den Mikrokanal gedrückt. Die Laserleistung beträgt hier  $\approx 500 \mu W$ .

#### 4.3.4 Semi-quantitatives Modell zur Beschreibung der Geschwindigkeitverteilung im Mikrokanal

Unter der Annahme laminarer Strömung (s. Theorie zur Fluidik) in dem betrachteten Mikrokanal wird im Folgenden in Anlehnung an die Hagen-Poiseuille Gleichung ein Modell, angepasst an die halb-ellipsoidale Kanalgeometrie, zur Beschreibung der Geschwindigkeitsverteilung (bei konstantem Druck) angegeben.

Der Druck(gradient)

$$(4.3) \quad \Delta p = p_{\text{angelegt}} - p_0,$$

wobei  $p_0$  den Normaldruck darstellt, kann einfach über

$$(4.4) \quad \Delta p = \frac{F_p}{A}$$

berechnet werden, mit  $F_p$  der korrespondierenden Kraft und  $A$  der Querschnittsfläche des Kanals. Daraus geht hervor, dass die Kraft, die die Lösung beschleunigt durch

$$(4.5) \quad F_p = \Delta p \cdot A$$

gegeben ist.

Die Fläche einer Ellipse ist durch

$$(4.6) \quad A = \pi \cdot r_{lang} \cdot r_{kurz}$$

beschrieben, wobei  $r_{lang}$  und  $r_{kurz}$  die Längen der langen und kurzen Halbachsen der Ellipse sind. Die kurze Halbachse wird im Folgenden konstant bei  $100 \mu m$  gehalten, während die Länge im späteren Verlauf als Integrationsvariable dient.

Da nur die halbe Fläche der Ellipse für die Betrachtungen relevant ist, reduziert sich der Ausdruck für die Fläche auf

$$(4.7) \quad A = \frac{\pi \cdot r_{lang} \cdot r_{kurz}}{2}$$

Nach Einsetzen dieser Gleichung in Ausdruck 4.5 kann man die Kraft nun durch

$$(4.8) \quad F_p = \Delta p \cdot \left( \frac{\pi \cdot r_{lang} \cdot r_{kurz}}{2} \right)$$

beschreiben.

Eine zweite Kraft, die auf die Lösung wirkt ist die "Reibungskraft" (engl.

drag/friction force)  $F_d$  welche von der Lösungsmittelviskosität  $\eta$  (welche wir  $\eta \approx 1$  setzen für PBS bei Raumtemperatur) und der Rohrmantelfläche  $A_{shell} = 1,9 \cdot 10^{-5} m^2$  des Kanals abhängt. Dabei ist  $A_{shell} = \frac{1}{2} C_{el} \cdot l$ , wobei  $C_{el}$  (engl. circumference) der Umfang der Ellipse ist, der nicht analytisch angegeben werden kann und hier numerisch approximiert wurde. Insgesamt kann dann die Reibungskraft zu

$$(4.9) \quad F_d = A_{shell} \cdot \eta \cdot \frac{dv}{dr}$$

angegeben werden, wobei  $\frac{dv}{dr}$  die Änderung der Geschwindigkeit pro Position entlang des Kanalquerschnitts ist. Direkt an den Kanalwänden wird (zu Modellierungszwecken) angenommen, dass die Geschwindigkeit verschwindet, was bedeutet, dass die Lösung an der Wand haftet (Haftbedingung). Physikalisch bedeutet dies, dass sich dort die Kräfte  $F_p$  und  $F_d$  gerade aufheben:

$$(4.10) \quad F_p + F_d = 0 \Leftrightarrow F_p = -F_d$$

Durch explizites Ausformulieren der Kräfte in Gleichung 4.10 erhält man direkt

$$(4.11) \quad \Delta p \cdot \left( \frac{\pi \cdot r_{lang} \cdot r_{kurz}}{2} \right) = -A_{shell} \cdot \eta \cdot \frac{dv}{dr}.$$

Nun integriert nun die rechte Seite der Gleichung 4.11 über den gesamten Kanalquerschnitt von  $r$  bis  $R$  ( $r$  ist die aktuelle Position und  $R$  gibt die volle Breite des Kanals an. Wir integrieren entlang der langen Halbachse und verwenden der Einfachheit halber  $r := r_{lang}$ ):

$$(4.12) \quad \int_r^R \frac{1}{2} \cdot 100 \mu m \cdot r \cdot \pi \cdot \Delta p = \int_v^0 -\frac{1}{2} \cdot A_{shell} \cdot \frac{dv}{dr}$$

Wegen Linearität des Integrals können konstante Faktoren vorgezogen werden

was zum Ausdruck

$$(4.13) \quad \frac{1}{2} \cdot 100 \mu m \cdot \pi \cdot \Delta p \int_r^R dr \cdot r = -\frac{1}{2} \cdot A_{shell} \int_v^0 \frac{dv}{dr}$$

führt. Nach dem Integrationsschritt erhält man die Gleichung  $50 \mu m \cdot \pi \cdot \Delta p \cdot \frac{1}{2}(R^2 - r^2) = \frac{1}{2} \cdot A_{shell} \cdot v(r)$ , was zum Ausdruck

$$(4.14) \quad v(r) = \frac{50 \mu m \cdot \pi \cdot \Delta p \cdot (R^2 - r^2)}{A_{shell}}$$

mit  $R = 300 \mu m$  führt. Unter Berücksichtigung, dass sich die Mantelfläche des Verbindungsschlauchs von der Mantelfläche des Kanals unterscheidet wird hier eine empirische Korrektur mit

$$(4.15) \quad A_{rel} = \frac{A_{tubing-shell}}{A_{shell}} = \frac{(0,48 \cdot 10^{-3} m)^2 \cdot \pi \cdot 8 \cdot 10^{-2} m}{1,9 \cdot 10^{-5} m^2} \approx 0,003$$

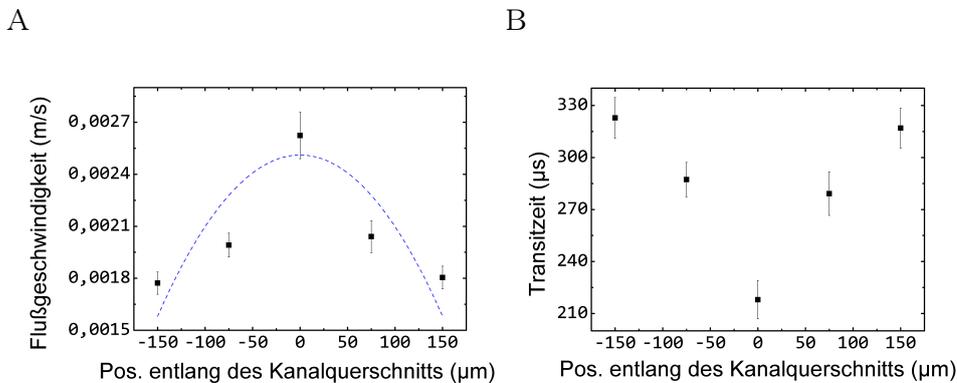
, wobei der Schlauchinnenradius gerade  $\approx 0,48 mm$  und die Schlauchlänge  $\approx 8 cm$  beträgt. Der Unterschied in der Anschlussfläche des Schlauches und des Kanals führt zu einem relativen Kräfteunterschied an der Verbindungsstelle  $F_{rel} \approx 30$ . Insgesamt kann dann ein empirischer Korrekturfaktor  $corr = F_{rel} \cdot A_{rel} \approx 0,09 \approx 0,1$  errechnet werden. Eine Normierung (Korrektur) auf diesen Wert liefert dann den entgeltigen Ausdruck zur Beschreibung der Geschwindigkeitsverteilung

$$(4.16) \quad v(r) = \frac{50 \mu m \cdot \pi \cdot \Delta p \cdot (R^2 - r^2)}{A_{shell} \cdot corr}$$

Auf Basis dieser Gleichung kann man bei konstantem Druck eine parabolische Geschwindigkeitsverteilung entlang der x-Koordinate des Kanals erwarten, wobei die maximale Geschwindigkeit  $v_{max}$  in der Mitte vorherrscht. Im Folgenden soll dieses semi-empirische Modell mit Hilfe von FCS Messungen bestätigt werden.

### 4.3.5 Verifizierung der parabolischen Geschwindigkeitsverteilung durch FCS Messungen

Mit FCS Messungen ist es möglich fokale Transitzeiten von fluoreszierenden Molekülen zu bestimmen. Im Folgenden wird der Fokus sukzessiv in Schritten von  $\Delta x \approx (75 \pm 10) \mu m$  beginnend dicht ( $\approx 5 \mu m$ ) an der linken Kanalinnenseite bis zur rechten Kanalinnenseite verschoben und etwa  $\approx 35 \mu m$  oberhalb der Oberfläche positioniert. Bei einem konstanten Druck von  $p \approx 500 pa$  werden bei einer Atto655- Konzentration von  $\approx 10^{-11} M$  für jede Position jeweils 4 Messungen über 45 Sekunden durchgeführt. Abbildung 4.19b zeigt den mit FCS ermittelten, erwarteten parabolischen Zusammenhang (da in diesem Graphen Zeiten betrachtet werden, ist der Zusammenhang im Vergleich zu Geschwindigkeiten (s. Abb. 4.19a) invers). In der Mitte des Kanals, hier bezeichnet mit  $0 \mu m$ , zeigt die fokale Transitzeit ein Minimum und wächst zu den Rändern des Kanals um den Faktor  $\approx 1,5$  an.



**Abbildung 4.19:** Nachweis der parabolischen Geschwindigkeitsverteilung im mikrofluidischen Kanal als Funktion des Ortes entlang des Kanalquerschnitts mit Hilfe von FCS Messungen. Bei einem Druck von  $500 pa$  wird eine Lösung mit freien Farbstoffmolekülen einer Konzentration von  $[Atto655] \approx 10^{-11} M$  und einer Anreizleistung von  $\approx 1 mW$  durch den Mikrokanal gedrückt und dabei die mittlere Flußgeschwindigkeit (A) und die mittlere Transitzeit (B) aus 4 Messungen ermittelt. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

Um die bestimmten Zeiten nun in Geschwindigkeiten umzurechnen muss der Weg, den das Molekül durch das Anregungsvolumen zurücklegt berechnet werden. Mit dem Rayleigh-Auflösungskriterium

$$(4.17) \quad d \approx \frac{1,22 \cdot \lambda}{NA}$$

wird die fokale Ausdehnung in x-y Richtung abgeschätzt [76]. Mit  $NA = 1,35$  und  $\lambda = 633$  (Anregung mit HeNe Licht) erhält man eine geschätzte laterale Ausdehnung von  $d \approx 573 \text{ nm}$ . Nun kann die mittlere Flußgeschwindigkeit  $v$  mit  $v = \frac{\tau_t}{d}$  errechnet werden, wobei  $\tau_t$  die mittlere (gemessene) Transitzeit ist. Das Ergebnis ist in Abbildung 4.19a dargestellt. Die in der Mitte des Kanals bestimmte Geschwindigkeit, bei konstantem Druck, lässt sich dann zu  $(2,62 \pm 0,13) \frac{\text{mm}}{\text{s}}$  bestimmen.

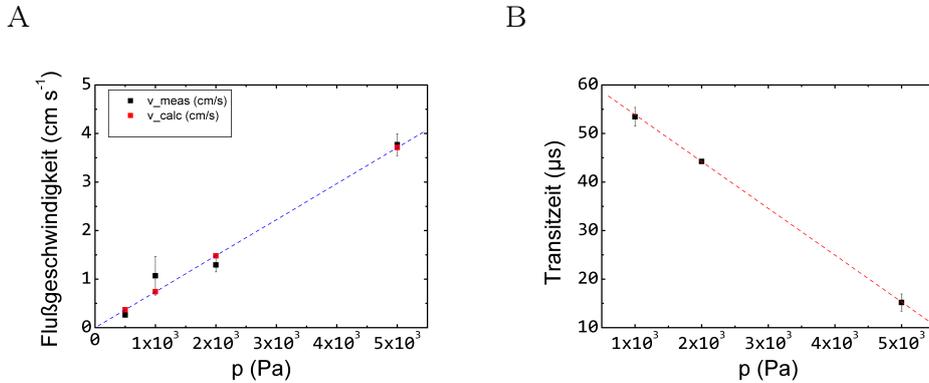
Mit dem in 4.16 abgeleiteten Modell kann man jetzt eine quantitativere Analyse der Messdaten durchführen. Die blaue Linie in Abbildung 4.19a stellt eine Anpassung mit der angegebenen Gleichung dar und liefert für  $\Delta p = 500 \text{ pa}$  eine zufriedenstellende Anpassung an die experimentellen Daten. Als einziger freier Parameter geht der Durchmesser des Kanals (lange Halbachse laut Werkstatt  $R \approx 300 \mu\text{m}$ ) ein. Die Fitroutine liefert einen Wert von  $R = (246,47 \pm 5,35) \mu\text{m}$ . Dieser Wert stimmt auf den ersten Blick nicht mit dem zu erwartenden ein. Wenn man allerdings beachtet, dass die Messungen im Kanalinneren, genauer  $\approx 35 \mu\text{m}$  von der langen Halbachse entfernt, stattfinden, ist es klar, dass dort aufgrund der Krümmung die Kanalbreite weniger als  $300 \mu\text{m}$  beträgt. Geometrische Konstruktionen ergeben eine Änderung der Breite von  $\Delta x \approx 10,2 \mu\text{m}$  auf beiden Seiten des Kanals über eine Eindringtiefe von  $\approx 35 \mu\text{m}$ . Insgesamt beträgt die Breite des Kanals in der Beobachtungsebene also  $300 \mu\text{m} - 2 \cdot 10,2 \mu\text{m} = 279,6 \mu\text{m}$ . Dies führt zu einem relativen Fehler des Modells zur quantitativen Beschreibung von  $\Delta x_{\text{rel}} \approx \frac{279,6 \mu\text{m} - 246,47 \mu\text{m}}{279,6 \mu\text{m}} \approx 0,118 = 11,8\%$ . Dieser Fehler beschreibt in erster Linie nur die Abweichung zum erwarteten Wert. In Anbetracht der Tatsache,

dass der Mikrokanal durch einfaches Fräsen in ein PMMA Substrat entstanden ist, kann es auch sein, dass Ungenauigkeiten bei der Herstellung zum Tragen kommen, womit der Fehler des Modells unter Umständen geringer wäre.

#### 4.3.6 Messung der Transitzeit als Funktion des Drucks

Die in Unterkapitel 4.3.5 dargestellte Diskussion über die Brauchbarkeit des von der Hagen-Poiseuille Gleichung abgeleiteten Modells zur quantitativen Beschreibung der Geschwindigkeitsverteilung zeigt, dass eine Abweichung von  $\leq 12\%$  zu erwarten ist. Im Folgenden soll es dazu verwendet werden gemessene Flußgeschwindigkeiten mit Vorhersagen (dieses Modells) zu vergleichen. In allen weiteren Messung (sofern nicht anders beschrieben) bei denen der hier beschriebene Mikrokanal verwendet wird, wird das fokale Anregungsvolumen in der Mitte des Kanals positioniert. Dies hat den Vorteil, dass die maximale Geschwindigkeit wie in der Anpassung in Abb. 4.19a zu sehen ist gut den gemessenen Wert approximiert.

In Abbildung 4.20 wird gezeigt, dass die durch FCS Messungen ermittelte Transitzeit (B) invers mit der daraus berechneten Geschwindigkeit (A) skaliert. Je höher der Druck ist, desto kürzer ist auch die gemessene fokale Transitzeit. Über eine Druckdifferenz von  $\approx 4000\text{ pa}$  erzielt man eine Änderung der Transitzeit von  $\approx 40\text{ }\mu\text{s}$ . Bei einem Maximaldruck von  $\approx 5000\text{ pa}$  (da der Kanal relativ kurz ist, ist die Messdauer natürlich durch den Druck, also die Transitzeit/Geschwindigkeit limitiert) wurde eine mittlere Transitzeit von  $(15 \pm 5)\text{ }\mu\text{s}$  gemessen und ist damit etwa 30 – 50-fach kürzer als die gemessene Diffusionszeit von freiem Farbstoff. Diese Messung zeigt das große Potential der Methode für sogenannte Hochdurchsatzmessungen, bei denen (meistens) viel Probenmaterial in möglichst kurzer Zeit untersucht werden soll.



**Abbildung 4.20:** Flußgeschwindigkeit (A) und fokale Transitzeit (B) in Abhängigkeit des angelegten Drucks. Bei einer Anregungsleistung von  $\approx 800 \mu W$  werden von einer  $10^{-11} M$  Farbstofflösung mit freien Atto655 Molekülen bei verschiedenen Drücken FCS Daten aufgenommen.

Errechnet man nun aus den gemessenen Transitzeiten entsprechende Flußgeschwindigkeiten und vergleicht diese mit Vorhersagen des bereits mehrfach angesprochenen Modells so erkennt man eine im Rahmen des experimentellen Machbarkeit sehr gute quantitative Übereinstimmung. Eine Tatsache, die die Richtigkeit der in (A) gezeigten Aussage (zumindest für hohe Drücke) bekräftigt ist, dass die lineare Anpassung hier eine Ursprungsgerade darstellt (das Modell erwartet einen linearen Zusammenhang zwischen Druck und Geschwindigkeit an einer fixer Position im Kanal), was bedeutet, dass bei keinem angelegten Druck die Messung in eine reine Diffusionsmessung übergeht. Bei sehr kleinen Drücken sind allerdings deutlichere Abweichungen zu erwarten, da die Geschwindigkeit für freie Diffusion zu etwa  $v_{diff} \approx 0,1 \frac{cm}{s}$  (bei  $\tau_D \approx 500 \mu s$ ) abgeschätzt werden kann. Dies kann mit dem Modell allerdings nicht mehr beschrieben werden, da es nicht zur Beschreibung des Grenzfalles der Diffusion, da es sich um einen ungerichteten (statistischen, vom Druck unabhängigen Prozess) handelt, geeignet ist.

### 4.3.7 Bestimmung des SNR als Funktion des Drucks

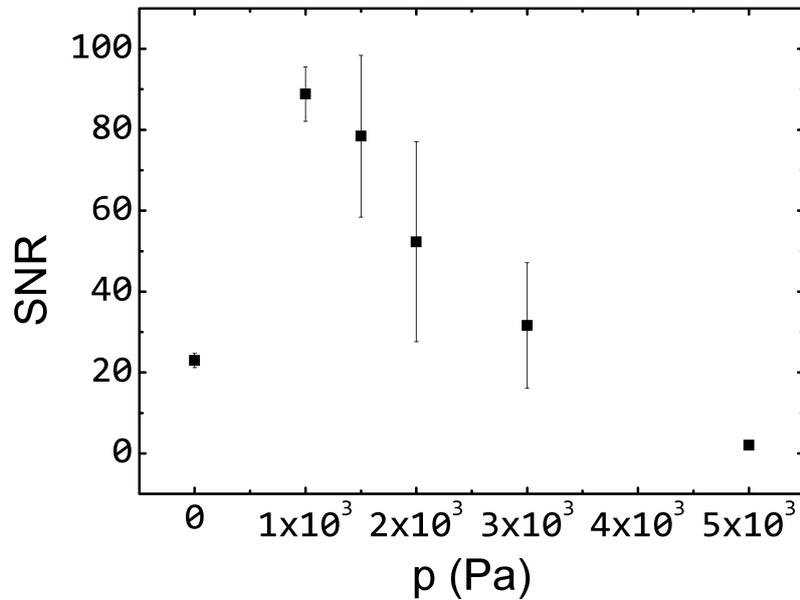
Wie bereits berichtet, besitzt das Anlegen von Druck, bzw. die Durchführung von Einzelmolekülmessungen unter Bedingungen von schnellen Flußgeschwindigkeiten mit  $v \gg v_{diff}$  Auswirkungen auf die Signalintensität und damit auf das SNR.

Abbildung 4.21 zeigt aus einer Einzelmolekül-Messreihe gewonnene Daten. Das SNR wird als Funktion des Drucks bestimmt. Einige Aspekte dieser Messreihe sind bemerkenswert: Zum Einen ist sehr gut zu erkennen, dass bei  $0\text{ pa}$  bereits ein relativ zum offenen Volumen erhöhtes SNR von etwa 20 herrscht. Dies lässt sich auf die Tatsache der bereits in Abbildung 4.14 angesprochenen Einingung der Moleküle zurückführen. Durch alleiniges räumliches Beschränken der Moleküle wird das SNR, bedingt durch die effizientere Anregung erhöht.

Beim Anlegen eines Druckes von  $10^3\text{ pa}$  erreicht das SNR einen gemessenen Maximalwert von  $SNR \approx 80$ . Die Zuverlässigkeit dieses Wertes wird allerdings, betrachtet man nachfolgende Messpunkte und die dazugehörigen Fehler, relativiert. Das gemessene SNR variiert sehr stark ( $\Delta SNR_{rel} \approx 0,6$ ), was eine wirklich zuverlässige Bestimmung des SNR erschwert. Diese Variationen können durch etwaige Verunreinigungen oder auch durch Luftblasen in der Lösung verursacht werden, die durch stark gestreutes Licht die gemessenen Burstintensitäten verfälschen. Auch Mehrfachmessungen scheinen die Schwankungen nicht wesentlich zu verringern. Auffällig ist, dass die Fehlerbalken bei hohen Druckwerten groß sind. Auf jeden Fall ist zu erkennen, dass die gemessenen Mittelwerte abnehmen, was auf die kürzere Aufenthaltszeit der Moleküle im Fokus zurückgeführt werden kann. Bei  $\approx 5000\text{ pa}$  sinkt das SNR sogar weit unterhalb von  $SNR \approx 10$ , was ein typischer Wert für Einzelmolekülmessungen in offenem Volumen ist. Bei diesem Druck ist es offensichtlich nicht mehr sinnvoll möglich die Einzelmolekülsignale vom konstanten Hintergrund zu unterscheiden, was auch den verhältnismäßig geringen Fehler erklärt.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass es realistisch ist (unter Be-

rücksichtigung der Fehler) unter Druck ein SNR von etwa 30 – 40 zu erreichen. Es sei darauf hingewiesen, dass alle (sofern nicht anders beschrieben) Messungen im Kanal ohne Tween20 oder Triton-X 100 durchgeführt wurden, um die Bildung von evtl. Verwirbelungen oder zusätzlichen Luftblasen zu vermeiden. Dies ist in der Mikrostruktur auch nicht notwendig, da die Adhäsion der Moleküle auf der Oberfläche durch das Anlegen von Druck unterdrückt und damit vernachlässigt werden kann.



**Abbildung 4.21:** SNR als Funktion des angelegten Drucks in einer 4-fachen, 30-Sekunden langen Einzelmolekülmessung. Die Fehlerbalken werden durch die Standardabweichung repräsentiert.

#### 4.3.8 Untersuchung der Signalhöhenverteilungen als Funktion des Drucks

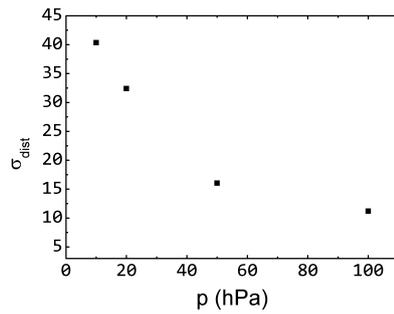
Bei Einzelmolekülmessungen hängt die emittierte Intensität pro Molekül maßgeblich davon ab, an welcher Stelle das Teilchen das Anregungsvolumen passiert und damit, wie effizient es angeregt werden kann. Schickt man die Probelösung (im Vergleich zum offenen Volumen) unter Druck durch einen Kanal, so zwingt man die Moleküle dazu einen ähnlichen Weg, je nach Positionierungsgenauigkeit des Kanals über dem Objektiv, durch den Fokus zu nehmen. Dieser Zwang skaliert, wie man in Abbildung 4.23(A-D) sehen kann, mit dem angelegten Druck.

Gezeigt sind Signal-Höhen (Häufigkeits-)Verteilungen, die durch Histogrammierung einer gesamten Zeitspur entstanden sind. Je breiter (ein Maß für die Breite ist die Standardabweichung - vgl. Abb.4.22(A)) eine Verteilung ist, desto inhomogener ist die gemessene Signalhöhe. Mit zunehmendem Druck wurde eine Verschmälerung der Verteilungen festgestellt. In Abbildung 4.23 (A-D) fällt außerdem auf, dass eine Verschiebung des Maximums der Verteilung von etwa  $25\text{ kHz}$  zu  $\approx 50\text{ kHz}$  stattfindet, was für eine zunehmend effizientere Anregung spricht. Zugleich verringert sich jedoch auch die absolute Häufigkeit der Signale.

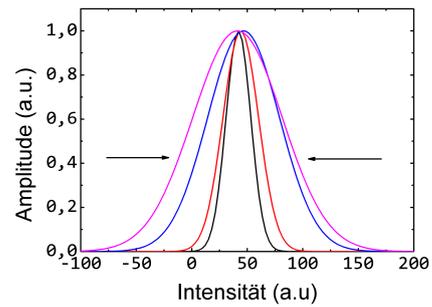
Die in Abb.4.23 gezeigten Verteilungen wurden mit einer Gauß'schen Näherung approximiert und die gefundenen Standardabweichungen als Funktion des Drucks in Abbildung 4.22(A) aufgetragen. Man erkennt leicht den exponentiellen Zusammenhang. Die Standardabweichungen können dann verwendet werden, um die Verschmälerung wie in Abb. 4.22(B) dargestellt, mit rekonstruierten Verteilungen zu veranschaulichen.

Dieses Experiment bestätigt die Vermutung einer einheitlichen Trajektorie der Moleküle durch das fokale Anregungsvolumen. Das heißt, je höher der angelegte Druck an dem Mikrokanal ist, desto eher wird die ungerichtete Bewegung der Moleküle unterdrückt.

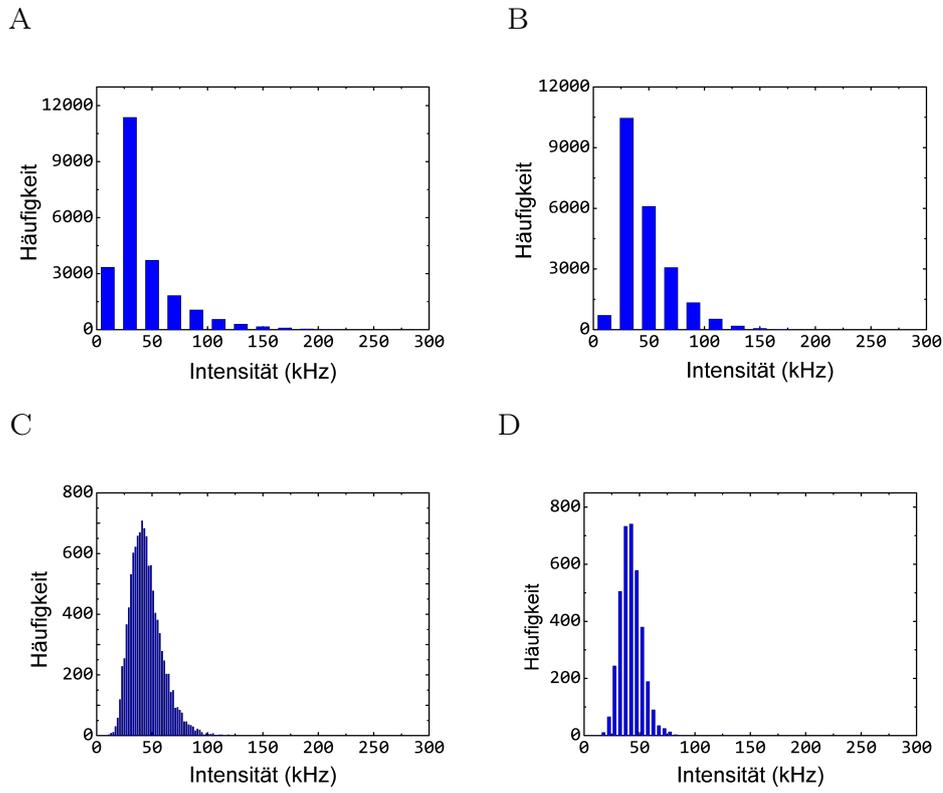
A



B

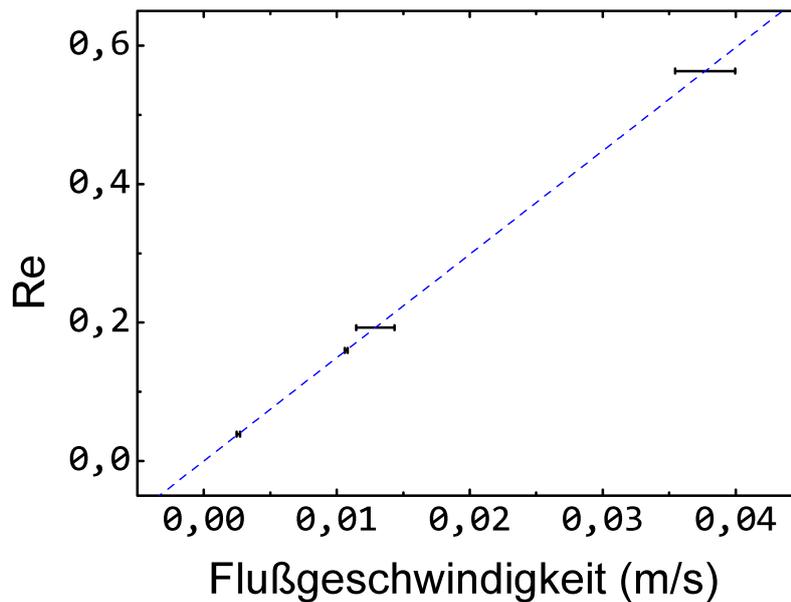


**Abbildung 4.22:** Gemessene Standardabweichungen (A) und daraus rekonstruierte (normierte) Verteilungen (B). In (B) sind die verschiedenen Drücke farblich kodiert und die Verteilung wird von lila bis schwarz (von außen nach innen) mit zunehmendem Druck schmaler.



**Abbildung 4.23:** Signal-Höhen-Verteilungen für 10hPa (A) 20hPa (B) 50hPa (C) und 100hPa (D) einer Einzelmoleküllösung mit einer Konzentration von  $[Atto655] \approx 10^{-11} M$  bei einer 45-Sekunden Messung.

### 4.3.9 Verifizierung der laminaren Strömung durch Reynoldszahlen



**Abbildung 4.24:** Verifizierung der laminaren Strömung durch Bestimmung der Reynoldszahlen.

Eine wichtige Kenngröße bei der Charakterisierung von mikrofluidischen Systemen ist die Reynoldszahl (vgl. Kapitel 2.6.1). Alle hier getroffenen Annahmen sind ausschließlich unter der Prämisse laminarer (im Gegensatz zur turbulenten) Strömung gültig. In Abbildung 4.24 ist die Linearität der Reynoldszahlen als Funktion der Flußgeschwindigkeit zu erkennen. Bis zu einer Flußgeschwindigkeit von  $v \approx 3,5 \frac{cm}{s}$  ist gezeigt worden, dass die Reynoldszahl  $Re \approx 0,55$  wesentlich kleiner als die kritische experimentell ermittelte  $Re_{krit} \approx 2000$  ist (die Werte wurden für makroskopische Rohre ermittelt). Da in allen hier beschriebenen Experimenten Flußgeschwindigkeiten von  $3,5 \frac{cm}{s}$  nicht über-

schritten werden, kann klar von laminarer Strömung innerhalb des Mikrokanals ausgegangen werden. Außerdem ist es bemerkenswert, dass die Hagen-Poiseuille Gleichung, als Modell für makroskopische Rohrsysteme, erfolgreich auf mikroskopischer Größenskala angewendet werden kann.

#### 4.3.10 Sensitivitätserhöhung durch Anlegen von Druck

Basierend auf den Analysen von Einzelmolekülmessungen im mikrofluidischen Kanal unter Druck kann nun eine quantitative Untersuchung der lokalen Konzentrationserhöhung im Anregungsvolumen durch FCS-Messungen erfolgen. Wie bereits im Abschnitt über Material und Methoden erklärt, kann mit FCS-Messungen eine Aussage über die Konzentration der Teilchen im Fokus getroffen werden.

In Abbildung 4.25 sind mehrere FCS-Korrelationsfunktionen, bei verschiedenen Drücken aufgenommen, zum Vergleich zusammen dargestellt. Wie bereits bekannt ist, lässt sich die mittlere Teilchenzahl direkt aus der Amplitude (siehe Gleichung 3.14) der Korrelationsfunktion angeben. Mit Erhöhung des angelegten Drucks sinkt die Amplitude der Funktion zunehmend von ca.  $\frac{1}{N} = 4$  auf etwa  $\frac{1}{N} = 3$  für eine Einzelmolekülmessung von Atto655-Molekülen bei einer Konzentration von  $10^{-11} M$ . Diese Verkleinerung der Amplitude um 1 entspricht einer Erhöhung der mittleren Teilchenzahl um  $\Delta N \approx 0,2 \pm 0,05$  wie Abbildung 4.26 zu entnehmen ist. Hier ist ein linearer Zusammenhang erkennbar, der durch  $N(p) \approx 3,3 \cdot 10^{-5} \cdot p + 0,2$  beschrieben wird. Die Steigung gibt an, dass eine Erhöhung des Drucks um ein Pascal eine experimentell vernachlässigbare Erhöhung der Teilchenzahl (und damit der Sensitivität) von  $S \approx 3 \cdot 10^{-5}$  bewirkt. Das heißt in der Praxis, dass eine erhebliche Steigerung des Drucks (zumindest in dem hier verwendeten Kanal) nötig ist, um eine signifikante Erhöhung der mittleren Teilchenzahl zu erreichen.

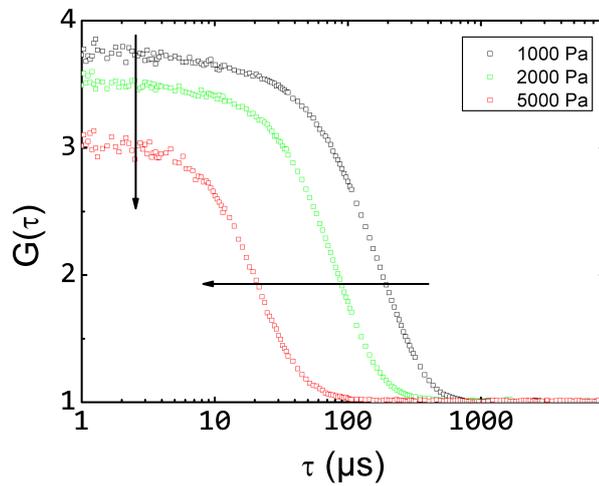
Außerdem kann Abbildung 4.25 entnommen werden, dass es bei einer Druckerhöhung zu einer Verschiebung der Autokorrelation zu kürzeren Zeiten kommt.

Dieser Sachverhalt wurde schon in Abschnitt 4.3.6 thematisiert.

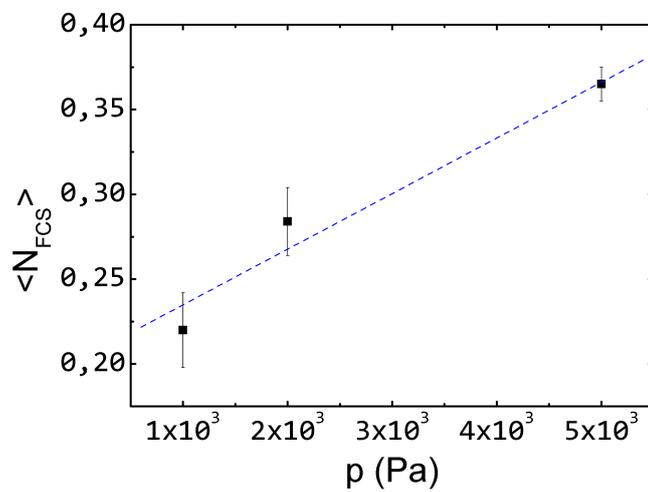
#### 4.3.11 Detektion von Farbstoffmolekülen auf 130 nm Beads

In diesem Abschnitt soll die Fähigkeit von den hier verwendeten  $d = 130\text{ nm}$  großen, mit Streptavidin funktionalisierten, magnetischen Nanokügelchen (vgl. Abschnitt über Material und Methoden 3.4.2) diskutiert werden, biotinylierte Moleküle (hier Atto647N-Biotin) aus der Lösung auf ihrer Oberfläche zu binden. Außerdem sollen die Beads als Methode zur Erhöhung der Sensitivität dienen.

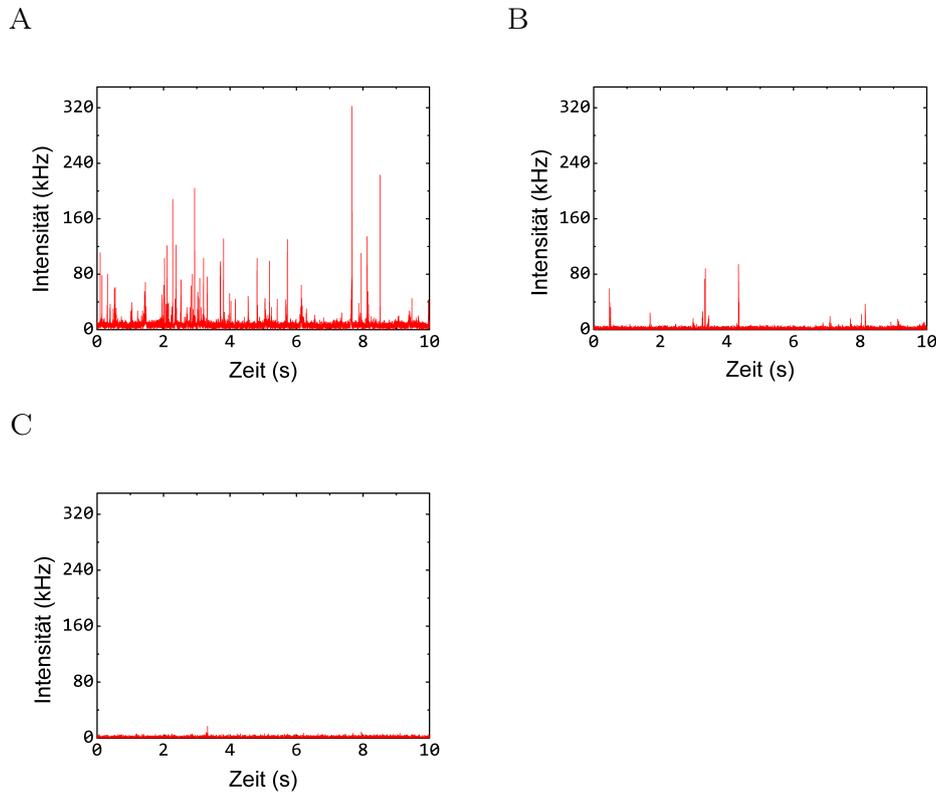
Die in Abbildung 4.27 (A-C) dargestellten Zeitspuren zeigen Messungen von an Beads gebundenen Atto647N-Biotin Farbstoffmolekülen bei verschiedenen Konzentrationen. Man erkennt mit abnehmender Konzentration der Moleküle eine Abnahme der Burstrate bis zu einer Konzentration von etwa  $10^{-12}\text{ M}$ . Bei  $10^{-13}$  molarer Konzentration von Farbstoffmolekülen werden statistisch zehnfach weniger Einzelmolekülereignisse registriert, obwohl die verwendeten Beads eine recht hohe Bindungskapazität besitzen (vgl. Kapitel über Material und Methoden).



**Abbildung 4.25:** FCS Autokorrelationsfunktionen aufgenommen bei drei verschiedenen Drücken 1000 Pa (schwarz), 2000 Pa (rot) und 5000 Pa (grün). Die Probenlösung enthält eine Einzelmolekülkonzentration von Atto655-Molekülen bei  $\approx 10^{-11} M$ . Die Messreihe wurde bei einer Anregungsleistung von  $\approx 1 mW$  durchgeführt.



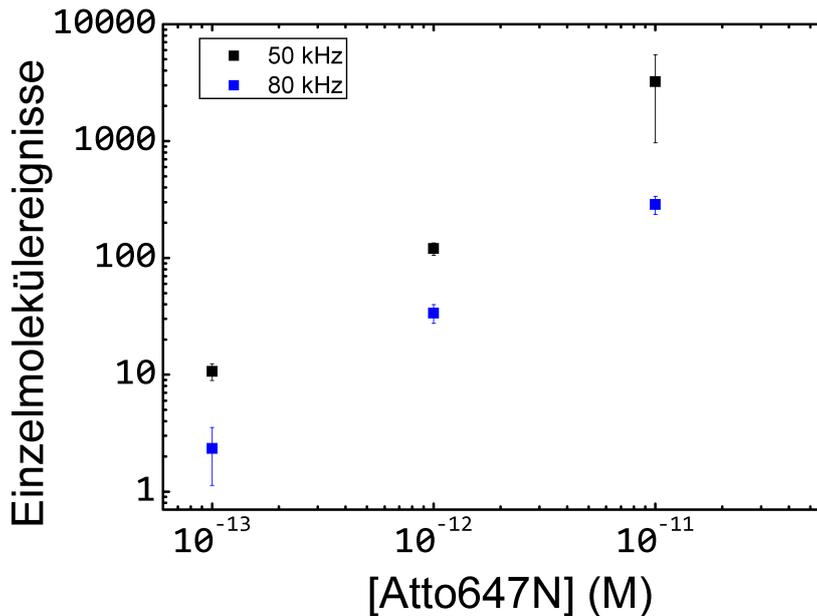
**Abbildung 4.26:** Teilchenzahl als Funktion des Drucks extrahiert aus den Autokorrelationsfunktionen aus Abbildung 4.25.



**Abbildung 4.27:** Zeitspuren für verschiedene Atto647N-Biotin Konzentrationen (A)  $[Atto647N - Biotin] \approx 10^{-11}M$  (B)  $[Atto647N - Biotin] \approx 10^{-12}M$  und (C)  $[Atto647N - Biotin] \approx 10^{-13}M$  in offenem Volumen bei  $\approx 500 \mu W$ . Die Beadkonzentration beträgt  $\approx 5 \frac{\mu l}{ml}$ .

Füllt man hingegen die selbe Lösung in den Mikrokanal und führt wiederum eine Einzelmolekülmessung bei einem Volumenstrom von  $20 \frac{ml}{h}$  bei konstanter (und gleicher) Anregungsleistung (Abb. 4.29) durch so detektiert man selbst bei einer Konzentration von  $1 fM = 10^{-15} M$  noch eine Burstrate von  $\approx (3,6 \pm 0,42) Hz$ . Zu erwarten war ebenfalls eine Abnahme der Fluoreszenzintensität, da die absolut in der Lösung enthaltenen fluoreszierenden Moleküle abnimmt. Der Vergleich von Abbildung 4.27 und 4.29 zeigt die Nützlichkeit der Beads

für die Erhöhung der Sensitivität in Verbindung mit dem Mikrokanal.



**Abbildung 4.28:** Die Anzahl der Einzelmolekülereignisse bei einer Messdauer von 120s und einer Anregungsleistung von  $\sim 500\mu W$ .

Zur Bestimmung der Effizienz der Bindung von biotinmodifizierten Molekülen an Streptavidin (in diesem Fall auf Streptavidin funktionalisierte Beadoberflächen) kann man zum Einen die sogenannte Dissoziationskonstante einer Gleichgewichtsreaktion zur Deutung hinzu nehmen. Im Falle der Biotin-Streptavidin beträgt diese  $k_d \approx 10^{-15} M$  und ist damit die affinste oder stärkste nicht-kovalente Bindung. Diese Konstante sagt jedoch nichts darüber aus, wie groß der Anteil der Biotin-Moleküle ist, der aus der Lösung an die Bead-Oberfläche gebunden wird.

Um den relativen Anteil gebundener Farbstoffe bestimmen zu können wird mit den in 4.27 gezeigten Daten eine Bursthöhen-Analyse durchgeführt. Dazu wird

eine  $10^{-11}$  M Lösung der Atto647N-Moleküle im offenem Volumen angeregt. Die Bestimmung der mittleren Burstintensität ergab einen Wert von  $\approx 50$  kHz. Führt man danach die oben beschriebene Messung (also mit auf dem Bead gebundenen Farbstoffen unter den selben Bedingungen durch) lässt sich eine Burstintensität von  $\approx 80$  kHz ermitteln. Mit diesen beiden Werten kann dann für jede Farbstoffkonzentration abermals eine Einzelmolekül-Erkennung durchgeführt werden. Man erhält damit zwei Werte, nämlich jeweils  $B_{50}$ , was die Anzahl der Bursts ab einer Intensität von  $50$  kHz darstellt und  $B_{80}$ , was die Anzahl der Einzelmolekülsignale ab  $80$  kHz denotiert. Da  $B_{50} > B_{80}$  muss  $B_{80}$  von  $B_{50}$  subtrahiert werden, da  $B_{50}$  alle mit dem  $80$  kHz Schwellwert detektierten Bursts enthält, um eine Doppelzählung zu vermeiden. Dieses Verhalten ist in dem in Abbildung 4.28 gezeigten linearen Graphen bei doppellog Skala dargestellt.

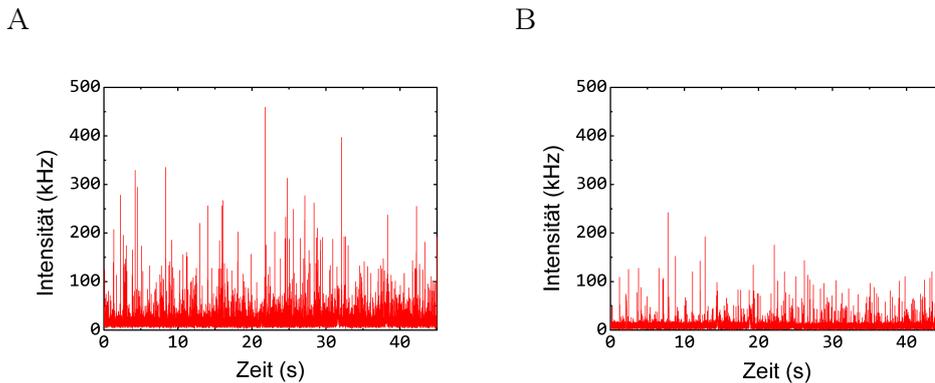
Aus den in Abbildung 4.28 dargestellten Daten kann dann mit Hilfe des Ausdrucks

$$(4.18) \quad E^{(f)} = \frac{B_{50} - B_{80}}{B_{50}}$$

die sogenannte Fishing-Effizienz der Beads ermittelt werden. Dieser Ausdruck liefert nur unter der Voraussetzung, dass  $B_{50} \geq B_{80}$  zuverlässige Werte. In der oben dargestellten Messung, wurden fünf Mikroliter der  $130$  nm großen Partikel in einem ml PBS und der entsprechenden zu detektierenden Farbstoffkonzentration gelöst. Wertet man diesen Ausdruck für die oben gezeigte Messung aus, erhält man einen Wert von  $0,8 \pm 0,1$  für die Fishing-Effizienz.

Das bedeutet statistisch gesehen, dass fast jedes 2-te Molekül, welches in der Lösung vorhanden ist, an einen Bead bindet. Dabei muss beachtet werden, dass je mehr Beads in der Lösung vorhanden sind, desto mehr Farbstoffmoleküle auch gebunden werden können. Verteilt sich jedoch eine gegebene Anzahl an Farbstoffmolekülen auf zu viele Beads, sinkt die Wahrscheinlichkeit diese Farbstoffe zu detektieren. Insgesamt stellt dieses Verfahren eine zuverlässige

Methode dar die Fishing-Effizienz zu quantifizieren und damit zu optimieren. Allerdings sind für eine sensitive Methode zur Detektion von Molekülen mit Hilfe von Beads, Partikel notwendig, die kein zusätzliches autofluoreszentes Signal emittieren.



**Abbildung 4.29:** Exemplarische Zeitspuren von 45-Sekunden Messungen für mit Biotinfarbstoff (Atto647N) belegte Beads bei einer Farbstoffkonzentration von  $10^{-12} M$  (A) und  $10^{-15} M$  (B) und einer Anregungsleistung von  $\approx 500 \mu W$ .

## 4.4 Multiplexing Experimente

Eine gerade im Hinblick auf diagnostische Verfahren wichtige, in die Mehrfarbendetektion einführende, Fragestellung, ist die Frage nach der Möglichkeit Konzentrationsverhältnisse zweier spektral unterschiedlicher Spezies von Fluoreszenzfarbstoffen in einer Probe aufzulösen - man spricht vom Multiplexing. Im folgenden Experiment werden verschiedene Konzentrationsverhältnisse der beiden Farbstoffe Atto647N und Atto565 hergestellt und im offenen Volumen angeregt. Die Anregung erfolgt mit Licht der Wellenlänge  $638 \text{ nm}$  und  $532 \text{ nm}$  bei gleicher und konstanter Leistung, gemessen vor dem Objektiv, von  $P \approx 1 \text{ mW}$ . Die Konzentration des roten Farbstoffes wird in diesem Versuch bei  $\approx 10^{-11} M$  fixiert und die Konzentration von Atto565 ändert sich über eine

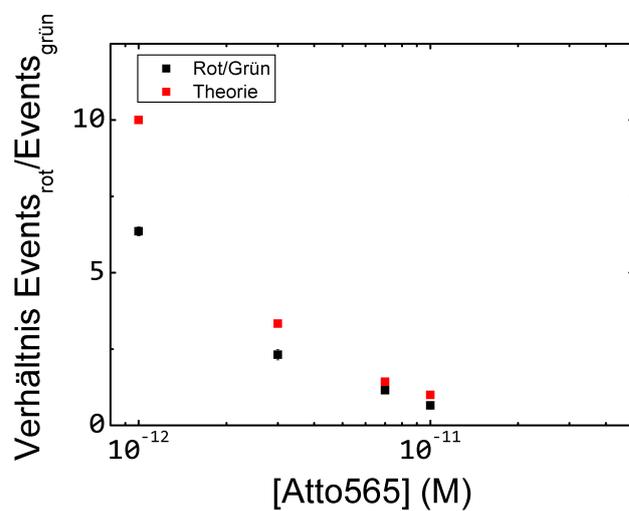
Größenordnung von äquimolarer Konzentration bis hin zum zehnfachen Verhältnis von  $10^{-12}$  M. Außerdem wurde eine Tween-Konzentration von 0,025 % zu der Lösung hinzugegeben, um Wechselwirkungen der Farbstoffmoleküle mit der Glasoberfläche zu minimieren. Es wurden drei Messungen zu je 180 Sekunden für jedes Konzentrationsverhältnis durchgeführt.

### 4.4.1 Zwei-Farben Multiplexing Messung in offenem Volumen mit freiem Farbstoff

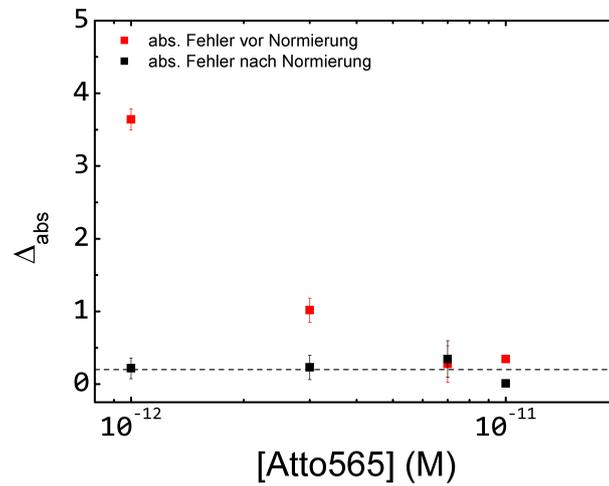
Abbildung 4.30 zeigt den direkten Vergleich der erwarteten Konzentrationsverhältnisse mit den aus den Einzelmolekülexperimenten bestimmten Verhältnissen. Es fällt auf, dass lediglich der qualitative Verlauf der Daten übereinstimmt. Besonders zu kleinen Konzentrationen von Atto565 (also bei hohen Verhältnissen) stellt sich eine klare Abweichung von den theoretischen Werten ein.

Der schwarze Graph in Abbildung 4.31 zeigt im Vergleich zum roten Graphen den Unterschied des absoluten Fehlers vor- und nach der Normierung der Verhältnisse der Einzelmolekülsignale auf das Produkt der Quantenausbeuten der beiden Farbstoffe [77] mit  $QY_{norm} = 0,9 \cdot 0,65 = 0,585$ . Nach der Normierung ist der Fehler invariant gegenüber Konzentrationsänderungen und charakterisiert damit lediglich den Pipettierfehler. Eine Normierung des Verhältnisses auf die Quantenausbeute macht dieses von der Quantenausbeute der einzelnen Farbstoffe unabhängig. Da beide Moleküle verschiedene Quantenausbeuten besitzen ist die Wahrscheinlichkeit für die Emission von Photonen auch unterschiedlich. Um die Einzelmolekülsignale trotzdem miteinander vergleichen zu können ist eine Normierung auf diese Wahrscheinlichkeit notwendig.

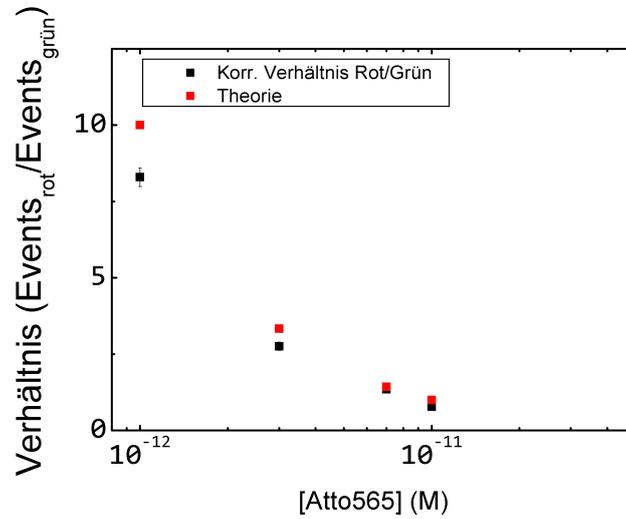
Das Ergebnis dieser Korrektur ist in Abbildung 4.32 zu sehen. Durch die Normierung auf die Quantenausbeute der beiden Farbstoffe erreicht man eine sehr gute ( $\Delta_{rel} < 10\%$ ) Übereinstimmung mit dem theoretischen Wert.



**Abbildung 4.30:** Das Verhältnis von roten Einzelmolekülsignalen zu grünen bei konstantem Schwellwert nach einer 180-Sekunden Messung als Funktion der über eine Größenordnung variierenden Atto565-Konzentration. Die Fehlerbalken sind Standardabweichungen aus drei Messungen.



**Abbildung 4.31:** Fehler (in rot) vor-und nach (in schwarz) der Normierung auf die Quantenausbeute der beiden Farbstoffe. Die Fehlerbalken sind Standardabweichungen aus drei 3-Minuten Messungen.



**Abbildung 4.32:** Verhältnis zwischen roten und grünen Einzelmolekülsignalen nach Korrektur auf die Quantenausbeute. Die Fehlerbalken sind Standardabweichungen aus drei 3-Minuten Messungen.

## 4.5 Koinzidenzmessungen und die Korrelationsmatrix- Methode

Allgemein ist ein koinzidentes Ereignis (bezogen auf Einzelmolekülfluoreszenz) die simultane Detektion von zwei (oder mehr) Bursts, emittiert von spektral verschiedenen Fluorophoren. Es handelt sich dabei um eine spezielle Technik der konfokalen Mehrfarbendetektion auf Einzelmolekülebene.

In der hier vorliegenden Arbeit wird die Koinzidenzdetektion oder Kolokalisation verwendet, um die gemeinsame Diffusion (oder Fluß im Kanal) zweier Farbstoffmoleküle nach der spezifischen Bindung an ein Zielmolekül aufzudecken. Einen ähnlichen Ansatz, um molekulare Interaktion zu studieren, bietet die Zwei-Farben Kreuzkorrelationsanalyse (2-Farben FCS) mit auf nanomolare Konzentration ( $c = 10^{-9} M$ ) der Moleküle beschränkte Sensitivität. Um auch sub-pikomolare Probenkonzentrationen untersuchen zu können  $c < 10^{-12} M$ , wurde hier die Einzelmolekülidentifikation gewählt.

Ein großes Problem, das sich bei der Einzelmolekülkoinzidenzdetektion ergibt ist dessen Unvermögen zwischen statistischen und "gewollten" Koinzidenzen zu unterscheiden. Dazu wird im folgenden Unterkapitel eine auf einer Korrelationsmatrix basierenden Methode vorgestellt, mit der dieses Manko behoben werden und die Qualität einer Koinzidenzprobe/Messung objektiv bewertet werden kann.

### 4.5.1 Einführung der Korrelationsmatrix-Methode

Bei Anwendung der Korrelationsmatrix-Methode (*KMM*) auf eine Zwei-Farben Messung, kann gezeigt werden, dass klar zwischen echten und zufälligen Koinzidenzen unterschieden werden kann. In dieser Arbeit wird demonstriert, dass die Wahrscheinlichkeit für zufällige Koinzidenzen mit der Konzentration von ungebundenem, freiem Farbstoff steigt. Die *KMM* liefert einen Wert für die sogenannte  $\Gamma$  - Norm,  $l_{\Gamma} \in [0, 2]$  für Zwei-Farben Experimente. Je

größer die Abweichung vom Maximalwert von  $l_\Gamma = 2$  ist, desto kleiner ist das Verhältnis zwischen wirklichen und statistischen Koinzidenzen in der vorliegenden Probe. Die  $\Gamma$  – Norm nimmt Werte  $l_\Gamma \leq 1$  für eine Probe an, die einen signifikanten Anteil an Zufallskoinzidenzen aufweist. Dies ist für eine Probe der Fall, in der sich lediglich freier Farbstoff in der Lösung befindet. Das Verhalten der  $\Gamma$  – Norm wird mit Hilfe von einigen Einzelmolekülexperimenten und zusätzlich von Computersimulationen untersucht.

Eine Identifikation der Photonenschauer mit dem bereits angesprochenen  $\mu+4\sigma$  Schwellwert wurde durchgeführt. Die aufgenommenen Zeitspuren werden dabei in  $N$ , zeitlich äquidistante Teile aufgeteilt und die Anzahl der Burst  $B_i(r)$  auf jedem Kanal ( $i = 1, 2$  ist der entsprechende Detektionskanal zur zur Detektion von roten und grünen Fluorophoren und  $r$  das aktuelle Teilstück der Zeitspur) und jedem Abschnitt der Zeitspur bestimmt. Außerdem wird für jeden Teil die Summe aller detektierten Bursts von allen Kanälen  $B_s(r)$  und die Anzahl der koinzidenten Ereignisse in allen Kanälen  $B_c(r)$  bestimmt.

Mit diesen vier Parametern lässt sich eine korrespondierende  $4 \times 4$ - Korrelationsmatrix aufbauen, die definiert ist als

$$(4.19) \quad X = \begin{bmatrix} 1 & \chi_{2,1} & \chi_{s,1} & \chi_{c,1} \\ \chi_{1,2} & 1 & \chi_{s,2} & \chi_{c,2} \\ \chi_{1,s} & \chi_{2,s} & 1 & \chi_{c,s} \\ \chi_{1,c} & \chi_{2,c} & \chi_{s,c} & 1 \end{bmatrix}$$

,wobei jedes

$$(4.20) \quad \chi_{i,j} = \text{corr}(B_i, B_j)$$

einen Korrelationskoeffizient darstellt, der aus der bestimmten Anzahl von Einzelmolekülsignalen berechnet wird mit  $i, j \in \{1, 2, c, s\}$ . Die normierten

Korrelationskoeffizienten werden dann mit

$$(4.21) \quad \chi_{i,j} = \frac{\frac{1}{N} \sum_{r=1}^N (B_i(r) - \bar{B}_i) \cdot (B_j(r) - \bar{B}_j)}{\sqrt{\frac{1}{N} \sum_{r=1}^N (B_i(r) - \bar{B}_i)^2} \cdot \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{r=1}^N (B_j(r) - \bar{B}_j)^2}}$$

berechnet wobei  $\bar{B}_i$  und  $\bar{B}_j$  die korrespondierenden Mittelwerte der Zeitspur sind. Eine Normierung und die Symmetrie der Korrelationskoeffizienten führt zu einer hermiteschen Korrelationsmatrix, bei der die Elemente der Hauptdiagonalen gerade eins sind.

Für die *KMM* werden (aus Symmetriegründen) nur  $\chi_{1,2}$ ,  $\chi_{1,c}$ ,  $\chi_{2,c}$  und  $\chi_{s,c}$  gewählt.  $\chi_{s,1}$  und  $\chi_{s,2}$  werden nicht weiter verwendet. Im letzten Schritt werden diese für die Analyse essenziellen Koeffizienten in einem Merkmalsvektor  $\Gamma = (\chi_{1,2}, \chi_{1,c}, \chi_{2,c}, \chi_{s,c})$  zusammengefasst und die euklidische Norm

$$(4.22) \quad l_\Gamma = \sqrt{\chi_{1,2}^2 + \chi_{1,c}^2 + \chi_{2,c}^2 + \chi_{s,c}^2}$$

berechnet. Diese  $\Gamma$  – Norm nimmt nun Werte zwischen zwei und Null mit zwei als Maximum für eine ideale Koinzidenzprobe an.

Gibt

$$(4.23) \quad Q = \frac{B_c}{B_1 + B_2} = \frac{B_c}{B_s}$$

den Anteil koinzidenter Ereignisse einer Messung an, so ist  $\bar{Q} = 1 - Q$  der Anteil der Einzelereignisse. Für die  $\Gamma$  – Norm kann man einen zu  $\bar{Q}$  äquivalenten Parameter, nämlich

$$(4.24) \quad l_{\Gamma-rel} = \frac{2 - l_\Gamma}{2}$$

angeben, was die relative Abweichung von einer idealen Koinzidenzprobe charakterisiert. Für den Zusammenhang zwischen  $\bar{Q}$  und  $l_{\Gamma-rel}$  gilt in guter

Näherung

$$(4.25) \quad \bar{Q} \approx l_{\Gamma-rel},$$

was zeigt, dass die  $\Gamma$ -Norm auch zur quantitativen Bewertung einer Messung eingesetzt werden kann.

#### 4.5.2 Monte-Carlo Einzelmolekülsimulationen zur $\Gamma$ -Norm

Als erster Schritt wurde die oben beschriebene Analyseroutine in Zusammenarbeit mit Dr. Doose mit Hilfe von Computersimulationen charakterisiert. Aus zufällig generierten Einzelmolekülzeitspuren wurde die  $\Gamma$ -Norm unter verschiedenen Bedingungen, wie Burstrate/Konzentration, Anzahl der Sektionen und verschiedenen Probenmischungen, berechnet.

Nachdem Einzelmoleküldaten auf zwei Kanälen mit Hilfe eines (pseudo-) Zufallszahlen Generators aus dem Mathematica-Software Paket erzeugt wurden, wurden aus den  $10^5$  erzeugten Bins (jedes Bin enthält entweder ein Einzelmolekülsignal oder nicht) die Einzelmoleküle identifiziert. Da kein Hintergrundsignal künstlich eingeführt wurde, ist der Schwellwert für die Bursterkennung gleich eins (in einer binären Zeitspur), unter Vernachlässigung aller Informationen über die Signalintensität. Die Generierung von zwei unabhängigen Burst-Zeitspuren, repräsentiert damit zwei unabhängige Kanäle, die einzeln nach Einzelmolekülsignalen und dann zusammen auf koinzidente Signale geprüft werden können.

Es wird angenommen, dass die Burstintensität für eine gegebene Konzentration von Fluorophoren in jedem Bin Poisson-Verteilt ist mit einem Mittelwert und einer Varianz von  $L$

$$(4.26) \quad P_\lambda(s) = \frac{L^s}{s!} e^{-L}$$

wobei  $s = s(t)$  die Anzahl der Photonen pro Bin ist. Der Parameter  $L$  kann als

Konzentration interpretiert werden, die für alle Simulationen zwischen  $10^{-3}$  und 3 gehalten wird, da die Anzahl der Bursts mit  $L$  steigt und damit mit der Konzentration in einem vergleichbaren Einzelmolekülexperiment skaliert.

Abbildung 4.34 zeigt die Anzahl der detektierten Bursts, relativ zur Gesamtzahl der Bins, eines einzelnen Kanals. Dieser Wert ist gleich der Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines Einzelmolekülereignisses in einem Bin. Zusätzlich ist die relative Anzahl koinzidenter Ereignisse in beiden simulierten Kanälen bestimmt worden und das Verhältnis zwischen koinzidenten Ereignissen und Bursts wird dargestellt.

Die Berechnung der  $\Gamma$  – Norm als Funktion von  $L$  zeigt, dass die  $\Gamma$  – Norm aufgrund einer steigenden Zahl von zufälligen Koinzidenzen steigt (Abb. 4.34 (B)). Für jedes Konzentrationsregime, in dem Einzelmoleküle mit einem konfokalen Mikroskop detektiert werden können, bleibt der Wert der  $\Gamma$  – Norm unter eins.

Als technische Besonderheit ist es hier wichtig anzumerken, dass die  $\Gamma$  – Norm von der Anzahl der Abschnitte abhängt, in die die gesamte Zeitspur zur Berechnung der Korrelationsmatrix aufgeteilt wird (Abbildung 4.33). Wie auch im weiteren Verlauf der experimentellen Ergebnisse gezeigt wird, nimmt die  $\Gamma$  – Norm mit der Anzahl der Abschnitte ab und konvergiert ab etwa 100 Abschnitten gegen einen stabilen Wert. Alle weiteren Analysen werden daher mit 100 Abschnitten durchgeführt.

Abbildung 4.35 demonstriert das Verhalten der  $\Gamma$  – Norm für eine Mischung aus reinen und statistischen Koinzidenzproben. Bei der Mischung einer perfekten Koinzidenzprobe (hier simuliert als identische Einzelmolekülereignisse auf beiden Kanälen mit  $L = 0, 2$ ) mit unabhängigen Einzelmolekülereignissen (simuliert auf beiden Kanälen mit verschiedenen  $L$ ) fällt die  $\Gamma$  – Norm von ihrem Maximalwert von zwei in Richtung eins. Beim höchsten  $L$  als Konzentration für die unabhängigen Ereignisse steigt die  $\Gamma$  – Norm ein wenig aufgrund der gestiegenen Anzahl von zufälligen Koinzidenzen.

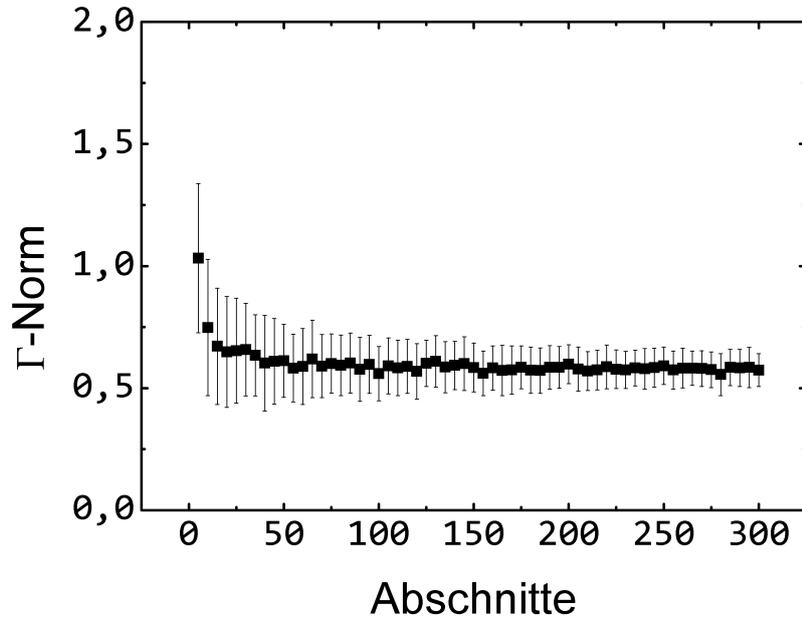


Abbildung 4.33:  $\Gamma$  – Norm als Funktion der Abschnitten.

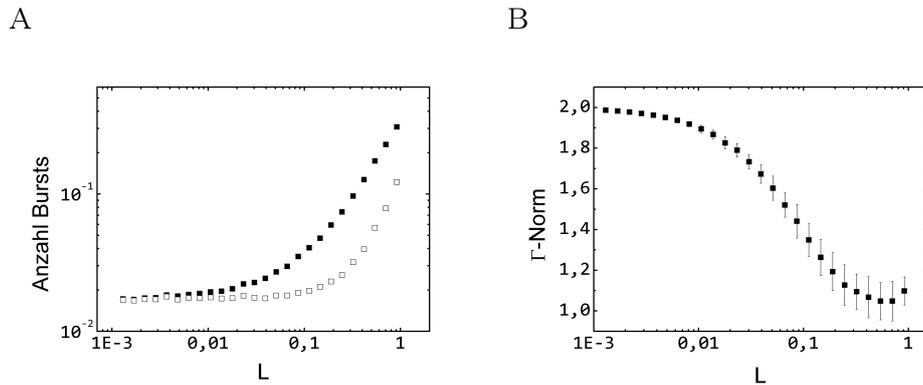
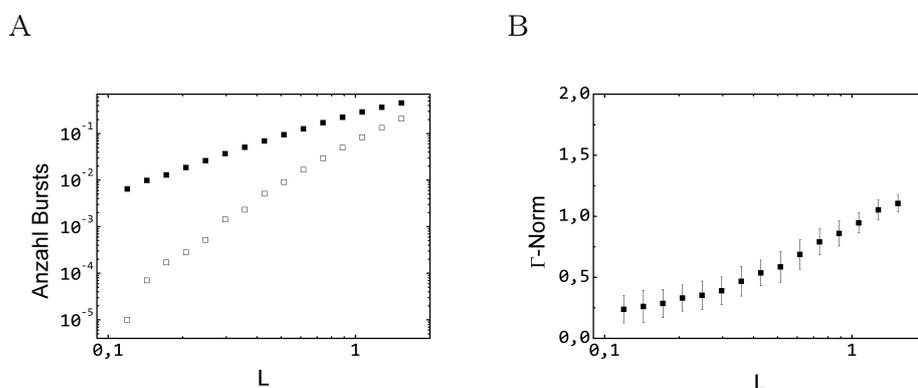


Abbildung 4.35: Simulierte Einzelmoleküldaten verschiedener Verhältnisse aus perfekten koinzidenten Ereignissen und einzelnen Ereignissen auf zwei Kanälen. (A) Einzelmolekülereignisse wurden in  $10^5$  bins bei einer konstanten Konzentration von koinzidenten Ereignissen ( $L = 0, 2$ ) und verschiedenen Konzentrationen von einzelnen Bursts (gefüllte Quadrate) simuliert. Die Gesamtzahl von Ereignissen wurde bestimmt (offene Kreise). (B) Die berechnete  $\Gamma$  – Norm für jedes  $L$  als Mittelwert aus 100 Datensätzen und die Standardabweichung wird durch die Fehlerbalken repräsentiert.



**Abbildung 4.34:** Simulierte Einzelmoleküldaten auf zwei unabhängigen Kanälen. (A) Einzelne Bursts, simuliert in  $10^5$  bins für verschiedene  $L$  (Konzentrationen) (ausgefüllte Quadrate) und die Koinzidenzen wurden ermittelt (offene Kreise). (B) Die berechnete  $\Gamma$  – Norm für verschiedene  $L$  als Mittelwert aus 100 Datensätzen und die Standardabweichung stellt hier die Fehlerbalken dar.

Aus den Simulationen kann gedeutet werden, dass die  $\Gamma$  – Norm nicht direkt das Verhältnis aus perfekten Koinzidenzen und der Gesamtzahl von Einzelmolekülereignissen darstellt, eher das Verhältnis von detektierten Koinzidenzen und der Gesamtzahl von Einzelmolekülereignissen unter der Voraussetzung, dass die beiden Detektionskanäle die selbe Anzahl an Bursts aufweisen.

Aber anders als ein einfaches Verhältnis gibt die  $\Gamma$  – Norm (außer dass sie ein quantitatives Gütemaß für eine Koinzidenzprobe ist) noch den Grad molekularer Interaktion an. Durch die Auswertung einzelner Korrelationskoeffizienten kann eine getrennte, quantitative Aussage über die Interaktion der beiden Fluorophore auf beiden Kanälen getroffen werden und erlaubt damit eine detaillierte Analyse der vorliegenden Probe. Der Informationsgehalt der  $\Gamma$  – Norm ist deutlich höher. Außerdem zeigen die Messungen in Zusammenhang mit den Simulationen, dass diese Methode vollständig unabhängig vom Binning der Zeitspur und damit von der Bursterkennung ist. Das bedeutet, dass man diese Methode ebenfalls zur zeitlichen Korrelation von Einzelphotonendaten

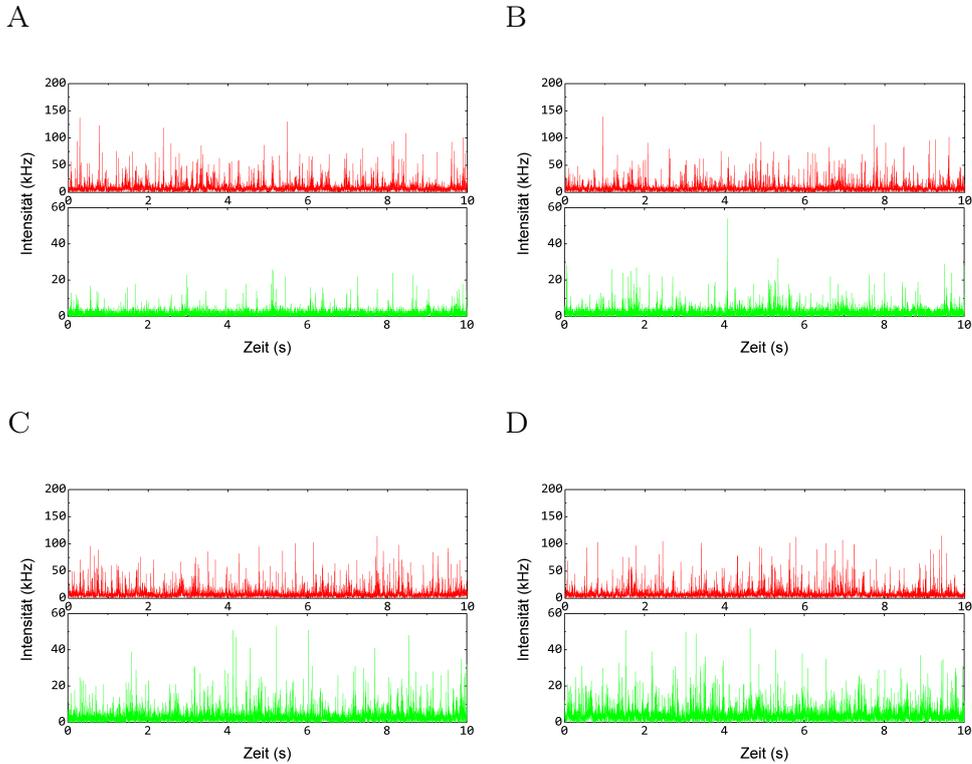
verwenden und daraus ein Gütemaß für Multifarben-Einzelmolekülmessungen ableiten kann. Wendet man die *KMM* auf Einzelphotonendaten (ohne Bursterkennung) an, zeigen Messungen, dass die Methode sehr robust gegen den Einfluß von Hintergrundphotonen ist und ein zuverlässiges Gütemaß für die molekulare Interaktion darstellt.

Diese Unabhängigkeit von der Bursterkennung führt dazu, dass dieser Algorithmus schnell und zudem noch einfach zu implementieren ist.

### 4.5.3 Charakterisierung von statistischen Koinzidenzereignissen mittels Korrelationsmatrix-Methode

In diesem Unterkapitel wird eine systematische Analyse statistischer Koinzidenzen mit Hilfe der *KMM* und Burstratenbestimmung durchgeführt.

Es werden wieder, ähnlich dem Multiplexingexperiment in Kapitel 4.4, die beiden Farbstoffmoleküle Atto647N und Atto565 in definierten Verhältnissen in einer Lösung zusammengebracht. Dabei wird die Konzentration des Fluorophors Atto647N bei  $10^{-11}$  M fixiert und die Atto565-Konzentration wird über eine Größenordnung variiert. Die aufgenommenen Daten sind in Form von Fluoreszenzzeitspuren exemplarisch in Abbildung 4.36 dargestellt. Man erkennt sehr genau, dass sich nur die Konzentration des grünen Farbstoffes verändert, wohingegen die des roten konstant bleibt.



**Abbildung 4.36:** Gemessene Einzelmolekülzeitspuren für verschiedene Atto565-biotin Konzentrationen bei konstanter Atto647N Konzentration. Atto647N ist jeweils in rot und Atto565 ist in grün dargestellt. Die Anregungsleistung beider Laser in jeder Messung war konstant bei  $P \approx 1 \text{ mW}$ . Die Konzentration von Atto565 beträgt in (A)  $[\text{Atto565} - \text{biotin}] \approx 10^{-12} \text{ M}$  (B)  $[\text{Atto565} - \text{biotin}] \approx 3 \cdot 10^{-12} \text{ M}$  (C)  $[\text{Atto565} - \text{biotin}] \approx 7 \cdot 10^{-12} \text{ M}$  und in (D)  $[\text{Atto565} - \text{biotin}] \approx 10^{-11} \text{ M}$ .

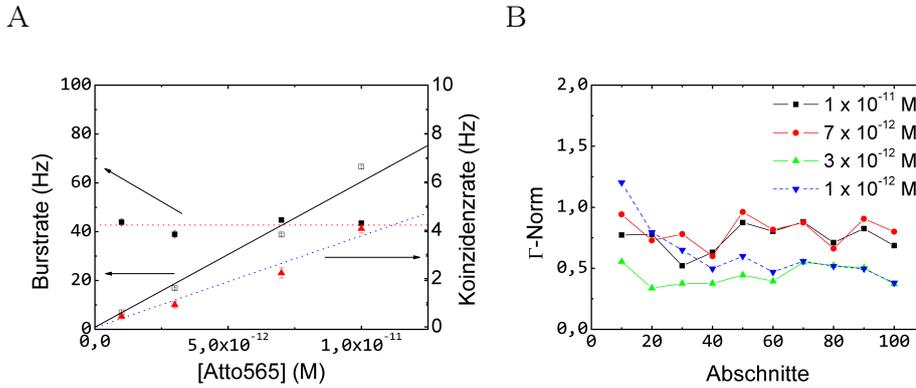
Zur Analyse der Burstraten, die essentiell zur Anwendung der *KMM* ist, wurde der  $4\sigma$  Schwellwert für die rote und die grüne Zeitspur bestimmt. Der Schwellwert zur Bursterkennung der grünen Fluoreszenzsignalen wird bei der geringsten Konzentration (hier  $10^{-12} \text{ M}$ ) bestimmt und dann für alle anderen grünen Zeitspuren konstant gehalten. Der Schwellwert ergibt sich für diese Messreihe zu  $10 \text{ kHz}$ . Für die roten Signale, erübrigt sich die Frage nach dem

Schwellwert, da er ohnehin für alle Messungen konstant ist und hier  $25\text{ kHz}$  beträgt. Mit Hilfe dieser beiden Schwellwerte werden nun alle Messungen nach Einzelmolekülsignalen untersucht.

Der linke Graph in Abbildung 4.37 klärt über drei für die Messung wesentliche Informationen auf: Zum Einen erkennt man an der rot gepunkteten Linie, dass die Burstrate des roten Farbstoffes konstant bei, im Mittel,  $(42,7 \pm 3,2)\text{ Hz}$  ist. Diese Tatsache erklärt sofort den linearen Zusammenhang und einen theoretischen Y-Achsenabschnitt von Null der Koinzidenzrate als Funktion der Atto565-Konzentration. Je weniger Atto565 Moleküle in der Lösung vorhanden sind, desto geringer wird auch die Koinzidenzrate bei gleichbleibender Atto647N Konzentration. Die Wahrscheinlichkeit dafür sinkt, dass zwei verschieden farbige Moleküle gleichzeitig durch den Fokus diffundieren.

Zum anderen zeigt die Burstrate des freien Atto565 Moleküls auch einen linearen Trend, der wie zu erwarten war ebenfalls keinen Y-Achsenabschnitt aufweist.

Hier handelt es sich um eine Zweifarben Einzelmolekülmessung bei der im Falle der höchsten (äquimolare) Konzentration beider Farbstoffe (bei gegebenem Schwellwertpaar) eine Koinzidenzrate von  $(4,1 \pm 0,2)\text{ Hz}$  erwartet werden kann. Bei einer Erhöhung der Atto565 Konzentration um eine Größenordnung auf  $10^{-10}\text{ M}$  erhält man eine Burstrate von  $(11,53 \pm 0,08)\text{ Hz}$ . Diese Burstrate wäre eine Verdreifachung, was dem begründeten linearen Trend widersprechen würde. Die Erklärung für diese Verletzung liegt in der Tatsache, dass bei dieser Konzentration das Einzelmolekülregime verlassen wird und irgendwann jedes aufgenommene Signal (da es oberhalb des Schwellwertes liegt) als Einzelmolekül gewertet wird. Mit anderen Worten, ab dieser Konzentration wird dann (abhängig vom Schwellwert und der Quantenausbeute) keine Einzelmolekülmessung mehr durchgeführt.

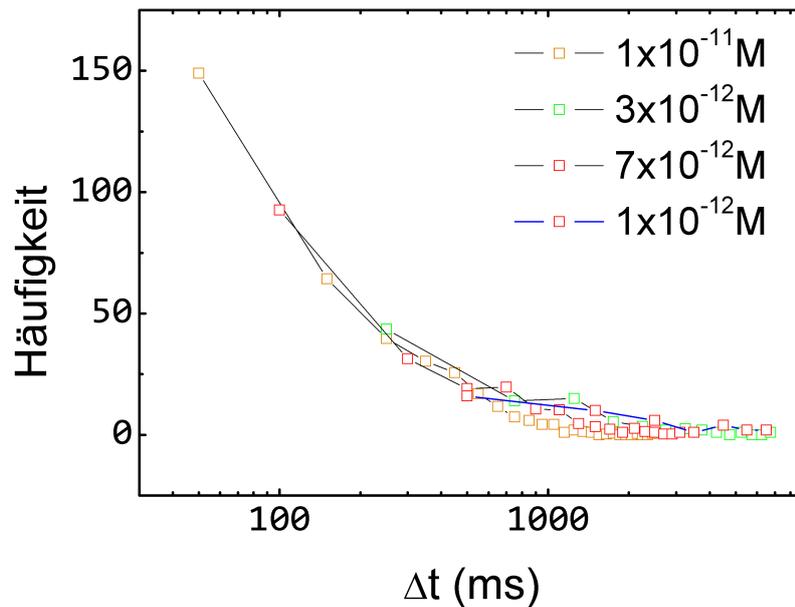


**Abbildung 4.37:** Gemessene Einzelmolekülburstraten als Funktion der Atto565 Konzentration (A) und die  $\Gamma$  – Norm (B) als Funktion der Abschnitte. Die Pfeile im linken Graphen nehmen die Achsenzuweisung vor. Die rote, gepunktete Linie stellt den Mittelwert der Burstrate des roten Farbstoffes dar. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen aus drei Messungen zu je 180 Sekunden. Im rechten Bild sind die einzelnen Farbstoffkonzentrationen farblich in der Legende kodiert.

In Anbetracht der Tatsache, dass bei dieser Probe zwei spektral unterschiedliche Moleküle bei verschiedenen Konzentrationsverhältnissen (örtlich) unabhängig voneinander, da ungebunden, durch einen überlappten Laserfokus diffundieren können an dieser Stelle nur statistische Koinzidenzen ausgewertet werden. Wie bereits in dem einführenden Abschnitt über die *KMM* erwähnt, liefert eine rein statistische Koinzidenzprobe einen Wert für die  $\Gamma$  – Norm von  $\leq 1$ . Dieser Sachverhalt ist gerade im rechten Graphen der Abbildung 4.37 zu erkennen. Mit sinkender Konzentration von Atto565 sinkt auch die  $\Gamma$  – Norm. Interessanterweise fällt bei genauerer Betrachtung auf, dass sich zwei Untergruppen gebildet haben. Die beiden Konzentrationen im  $10^{-11}$  M Regime ( $10^{-11}$  M und  $7 \cdot 10^{-12}$  M) zeigen eine (statistisch fast zu vernachlässigende) Abweichung von 0,05 in der  $\Gamma$  – Norm. Die beiden Konzentrationen im  $10^{-12}$  M Regime ( $10^{-12}$  M und  $3 \cdot 10^{-12}$  M) nehmen (fast) identische Werte an.

Die für freien Farbstoff auf Einzelmolekülebene bestimmte Koinzidenzwahr-

scheinlichkeit bei äquimolarer Konzentration liegt bei  $P = (0,074 \pm 0,003)$ , also etwa 7%.



**Abbildung 4.38:** Verteilung der Interkoinzidenzzeiten bei einer statistischen Probe als Funktion der Konzentration. Die verschiedenen Atto565-Konzentrationen sind farblich kodiert.

Zum Abschluss dieses Abschnitts über statistische Koinzidenzereignisse soll ein, der Koinzidenzrate äquivalenter, Parameter eingeführt werden. Hierbei handelt es sich um die in Abbildung 4.38 gezeigten Interkoinzidenzzeiten (IKZ). Die IKZ ist die mittlere Zeit zwischen zwei aufeinanderfolgende Koinzidenzen. Genau genommen zeigt der Graph in Abbildung 4.38 die Häufigkeitsverteilung der IKZ als Funktion der Atto565-Konzentration. Man erkennt (bei logarithmierter t-Achse), dass die IKZ einer einfachen Exponentialverteilung folgt. Hier ist zu beachten, dass die qualitative Form der Verteilung in dieser Darstellung von

der Konzentration unabhängig ist.

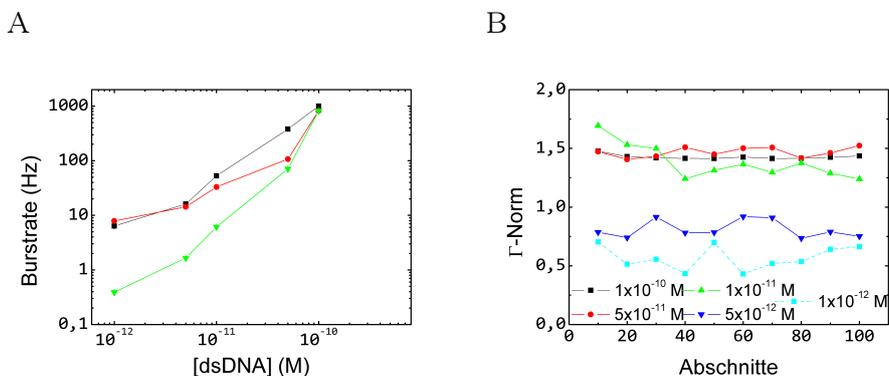
#### 4.5.4 Doppelt gelabelter DNA-Doppelstrang als Koinzidenzprobe

In dem folgenden Experiment wurde doppelt markierte DNA mit Atto565 und Atto647N, gebunden an einen 20 Basen langen DNA-Doppelstrang untersucht. Wie in Abbildung 4.39 gezeigt, stellt die Probe keine perfekte Koinzidenzprobe dar. Sowohl die Burstrate, als auch die  $\Gamma$  – Norm weisen darauf hin, dass die Probe(n) eine Mischung aus einer echten Koinzidenzprobe (Abb. 4.40) und einzelnen, fluoreszierenden Emittlern, die wahrscheinlich auf eine ineffiziente Hybridisierung zurückgeführt werden können. Außerdem kann die Emission des doppelt markierten DNA-Doppelstrangs auf nur einem Kanal die Folge von inaktiven Fluorophoren oder Photozerstörung sein. Die Tatsache, dass sich die Burst- und Koinzidenzrate einander bei einer Konzentration von  $10^{-10} M$  annähern ist wahrscheinlich durch die zunehmende Anzahl überlappender Einzelmolekülsignale zu erklären. (siehe Abbildung 4.39(A)).

Die  $\Gamma$  – Norm zeigt auf jeden Fall einen konsistenten Wert von 1,5 für alle Konzentrationen oberhalb von  $10^{-11} M$ .

Dieser Wert liegt signifikant über dem Wert, der für eine vollständig zufällige Probe erreicht wird. Bei Konzentrationen unterhalb von  $10^{-11} M$  fällt die  $\Gamma$  – Norm unter den Wert von eins und signalisiert einen zunehmenden Beitrag einzelner Emittler (z.B. durch schlechte Hybridisierungseffizienz bei geringen Konzentrationen).

Dieses Verhalten indiziert, dass die Zwei-Farben Probe einen kleineren Beitrag zur Anzahl detektierter Einzelmolekülsignale besitzt, z.B. aufgrund einer geringeren Fluoreszenzintensität verglichen mit einzelnen Emittlern. Dieser Effekt kann teilweise durch die Tatsache erklärt werden, dass die Donor/Akzeptor Distanz von etwa  $\approx 6,8 nm$  (was einer 20bp Separation entspricht) einen Förster Resonanz Energie Transfer ermöglicht und so die Intensität des grünen Fluorophors vermindert. Außerdem hat die nähere Studie dieser Probe gezeigt, dass

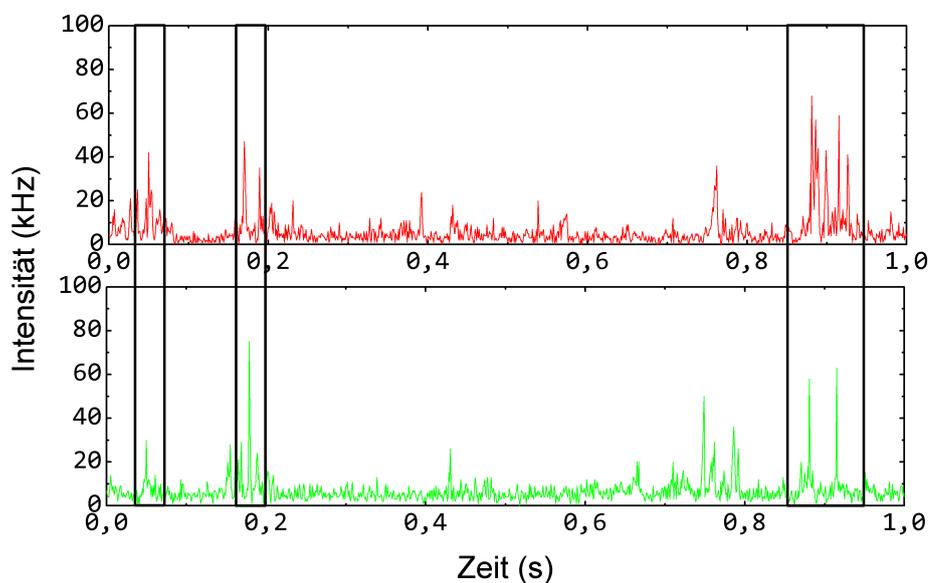


**Abbildung 4.39:** Gemessene Einzelmoleküldaten von zwei getrennten Detektionskanälen für einen 20bp poly (A) - poly (T) DNA Duplex, doppelt gelabelt mit Atto647N und Atto565 in PBS. Die Proben wurden gleichzeitig von Lasern der Wellenlänge  $638\text{ nm}$  und  $532\text{ nm}$  bei Leistungen von  $600\text{ }\mu\text{W}$  und  $900\text{ }\mu\text{W}$  angeregt. Der Graph in (A) zeigt die Koinzidenzrate (schwarz), die Burstrate des roten Kanals (rot) und die Burstrate des grünen Kanals (grün) als Funktion der DNA Konzentration. Die Fehlerbalken stellen Standardabweichungen aus vier Messungen dar. Der Graph in (B) zeigt die  $\Gamma$  - Norm als Funktion der Abschnitte für verschiedene DNA Konzentrationen von  $10^{-12}\text{ M}$  bis  $10^{-10}\text{ M}$ .

das verwendete Tween20 auf dem grünen Kanal Hintergrundsignale erzeugt und dadurch bei kleinen DNA Konzentrationen einen Abfall der  $\Gamma$  - Norm verursacht.

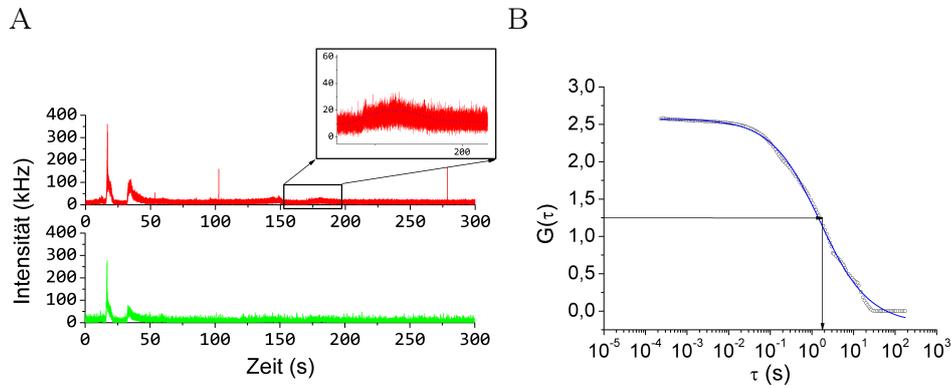
#### 4.5.5 Ausnutzung der M280-Bead Autofluoreszenz als ideale Koinzidenzprobe

Als nächstes wurden ähnliche Experimente mit  $2,8\text{ }\mu\text{m}$  großen M280 Beads bei einer konstanten Verdünnung von  $1 : 100$  in PBS Puffer, was einer Konzentration von  $10^{-14}\text{ M}$  entspricht durchgeführt. Die Beads zeigen eine sehr langsame Diffusion (siehe Abbildung 4.41 ) und tendieren aufgrund ihrer Größe zur Sedimentation. Es wurde eine mittlere Diffusionszeit von  $\tau_d = (1,5 \pm 0,2)\text{ s}$  bei Raumtemperatur ermittelt.



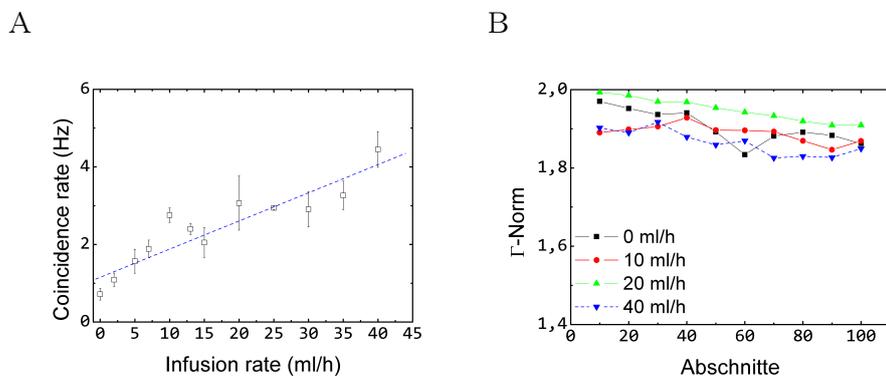
**Abbildung 4.40:** Eine Sekunde einer repräsentativen Zwei-Farben Koinzidenzzeit-spur mit doppelt markierter DNA bei einer Konzentration von  $10^{-11}$  M.

Um die Detektionsrate zu erhöhen, wurden die Beads durch den bereits erwähnten  $300\ \mu\text{m}$  breiten Mikrofluidik-Kanal gedrückt. Die simultane Anregung bei  $532\ \text{nm}$  und  $638\ \text{nm}$  generiert ein (Auto)fluoreszenzsignal, das hoch genug ist, um dessen Detektion auf zwei spektral getrennten Kanälen zu gewährleisten (Abb. 4.41 (A)). Die Fluoreszenzzeit-spuren, aufgenommen bei verschiedenen Flußraten zeigen, dass die Beads als “perfekte” Koinzidenzprobe bzw. als Kalibrationsprobe verwendet werden können (siehe Abbildung 4.45).

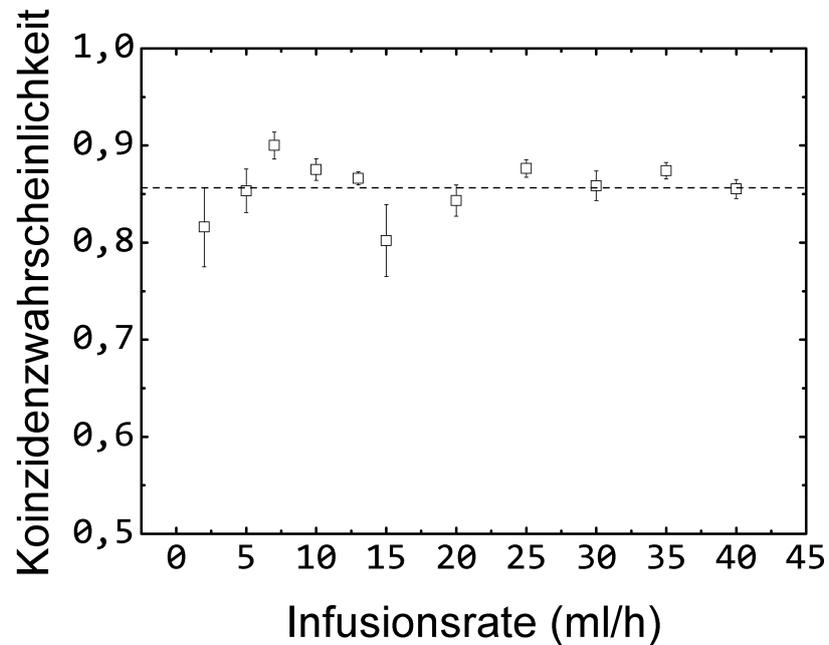


**Abbildung 4.41:** Zweifarben Zeitspur zeigt ein zeitlich breites, diffusionsabhängiges Fluoreszenzsignal der Beads (A) was durch FCS-Daten (B) bestätigt wird. Der vergrößerte Ausschnitt in (A) zeigt das Fluoreszenzsignal eines durch den Fokus diffundierenden Beads.

Bei Variation der Flußraten zwischen  $0 \frac{ml}{h}$  und  $40 \frac{ml}{h}$  konnte gezeigt werden, dass Koinzidenzraten zwischen  $0,5 Hz$  und  $5 Hz$  auftreten (Abb.4.42(A)). Aus Burst- und Koinzidenzidentifikation konnte geschlossen werden, dass der Anteil der koinzidenten Signale, relativ zur gesamten Anzahl an Einzelmolekülsignalen größer als 85 % ist (siehe Abbildung 4.43). Die  $\Gamma$ -Norm (Abb.4.42 (B)) nimmt ab etwa 100 Abschnitten einen Wert um 1,9 an und ist unabhängig von der Flußrate (oder äquivalent der absoluten Anzahl von Bursts). Damit stellt die Beadprobe eine ideale Koinzidenzprobe dar, die maximale Werte der  $\Gamma$ -Norm liefert.



**Abbildung 4.42:** Einzelmoleküldaten, gemessen auf zwei spektral getrennten Kanälen für  $2,8 \mu\text{m}$  M280 Beads, die bei einer Konzentration von  $\approx 10^{-14} M$  durch einen Mikrokanal fließen. Die Proben werden gleichzeitig bei  $638 \text{ nm}$  und  $532 \text{ nm}$  mit Anregungsleistungen von  $\approx 630 \mu\text{W}$  angeregt. (A) zeigt die gemessene Koinzidenzrate als Funktion der Flußgeschwindigkeit (oder Volumenstrom), um künstlich die apparente Konzentration zu erhöhen. Die Fehlerbalken zeigen Standardabweichungen aus drei Messungen. (B) Berechnete  $\Gamma$  – Norm als Funktion der Abschnitte und für verschiedene Flußraten von  $0 \frac{\text{ml}}{\text{h}}$  bis  $40 \frac{\text{ml}}{\text{h}}$ .



**Abbildung 4.43:** Koinzidenzwahrscheinlichkeit als Funktion der Flußrate für eine  $\approx 10^{-14} M$  Lösung von M280 Beads.

Die Verteilungen der gemessenen IKZ für die M280 Beads zeigen im Vergleich zu den Verteilungen der IKZ des freien Farbstoffes eine größere Variation in den absoluten Häufigkeiten und damit in der Amplitude der Verteilung. In Abbildung 4.44 sind die Häufigkeitsverteilungen der IKZ für verschiedene Flußraten dargestellt. Sie zeigen eine klare Verschiebung zu kürzeren IKZ mit zunehmender Flußrate, was äquivalent zu einer steigenden Burstrate ist. Bis zur IKZ von  $\Delta t \approx 700 \text{ ms}$  ( $\approx 1,43 \text{ Hz}$ ) hat es den Anschein, dass die Verteilungen stark (unabhängig von der Flußrate) fallen und bei späteren Zeiten verschwinden.

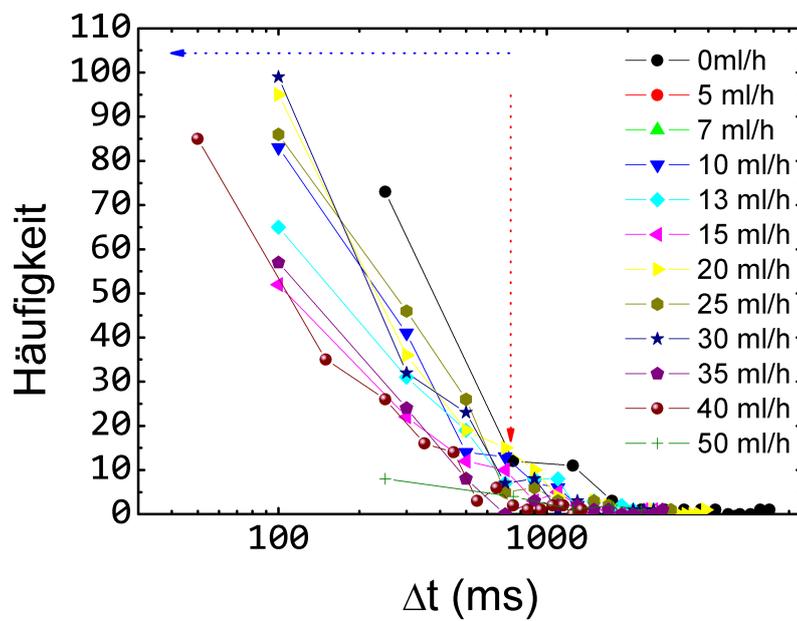
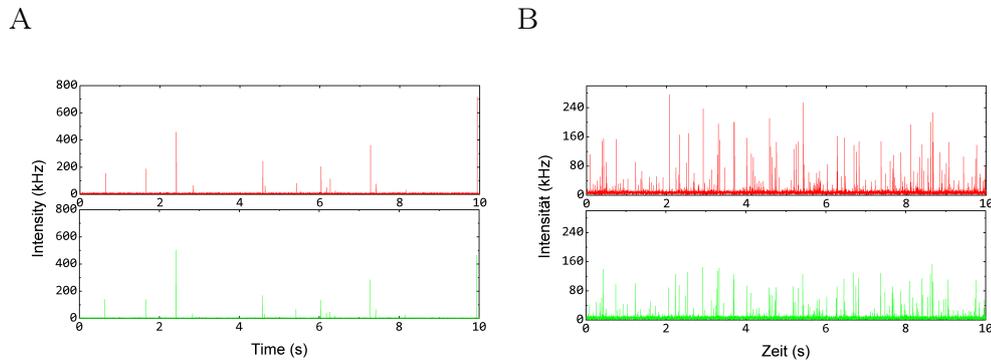


Abbildung 4.44: Verteilungen der Interkoinzidenzzeiten (IKZ) für verschiedene Flußraten.



**Abbildung 4.45:** Ausschnitte von Fluoreszenzzeitserien vom M280-Beads im mikrofluidischen Kanal bei (A)  $0 \frac{ml}{h}$  und (B)  $40 \frac{ml}{h}$ . Die Anregungsleistung beträgt  $\approx 600 \mu W$  bei  $532 nm$  und  $638 nm$ . Das Binning der Photonendaten beträgt  $1 ms$ .

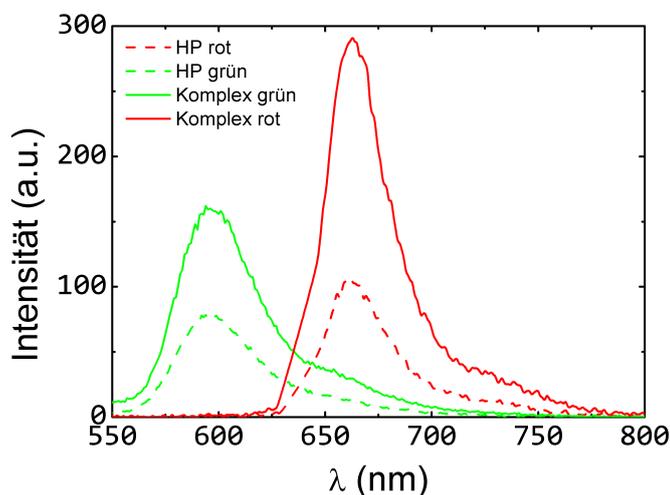
## 4.6 DNA-Detektion und Quantifizierung

Im letzten Kapitel dieser Arbeit wird die bereits vorgestellte Zwei-Farben Koinzidenzdetektion mit Hilfe des Konzeptes der intelligenten Sonden [78, 79, 80, 81, 82, 3, 83, 84, 61] (siehe Abbildung 4.51) auf die einzelmolekülsensitive Detektion [85] von pathogenen DNA Molekülen in wässriger Umgebung angewendet.

Um nun die Koinzidenzdetektion mit diagnostischer Relevanz durchzuführen wird im Folgenden ein 100 Basen langes, einzelsträngiges DNA-Molekül als Zielsequenz verwendet, an welches zwei unterschiedlich markierte sogenannte intelligente oder molekulare Sonden [86] (engl. Smart-Probes oder Molecular Beacons) hybridisieren. Sogenannte Molecular Beacons (MB) sind fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide, die eine Haarnadelstruktur (siehe Abbildung 3.12) bilden. Diese MBs bestehen aus einer sogenannten Schleife (engl. loop) und einem Stamm (engl. stem). In ihrer geschlossenen Struktur wird die Fluoreszenz vom am 5'-Ende angebrachten Farbstoffmolekül effizient durch ein anderes Mo-

lekül, das Löschmolekül (oder Quencher) am 3'-Ende über einen PET-Prozess (vgl. Kapitel 2.4.2), gelöscht. Es werden die sogenannten Black-Hole Quencher 2 (BHQ2) für Atto565 und der Black Berry Quencher (BBQ650) für Atto647N verwendet. Bei Hybridisierung zwischen der Loop-Sequenz der MBs und einem komplementären Teil der Zielsequenz [87] öffnet sich die Stem-Loop Sequenz und das Fluoreszenzsignal steigt stark an. Die beiden in diesen Experimenten verwendeten MBs zeigen einen 20-40 fachen Fluoreszenzanstieg bei Hinzugabe eines zehnfachen Überschusses der Zielsequenz (Abbildung 4.47).

Die Hybridisierung zweier MBs an das selbe Zielmolekül führt zur Detektion eines koinzidenten Signals und ist damit ein sicheres Signal, mit hoher Sensitivität und vor allem Spezifität, für die Präsenz des Zielmoleküls in der Probenlösung. Der Vorteil in der Verwendung von gelöschten MBs für die Koinzidenzdetektion liegt in der Tatsache, dass ungebundene (d.h. nicht hybridisierte) MBs keinen Beitrag zu zufälligen oder zielsequenzunabhängigen koinzidenten Signalen leisten. Außerdem erlaubt die Verwendung von effizient gelöschten Sonden einen  $10^3 - 10^4$ -fachen Überschuss der MBs einzusetzen, um das Gleichgewicht auf die Seite des hybridisierten Zustands zu verschieben und damit die Detektionssensitivität zu erhöhen.

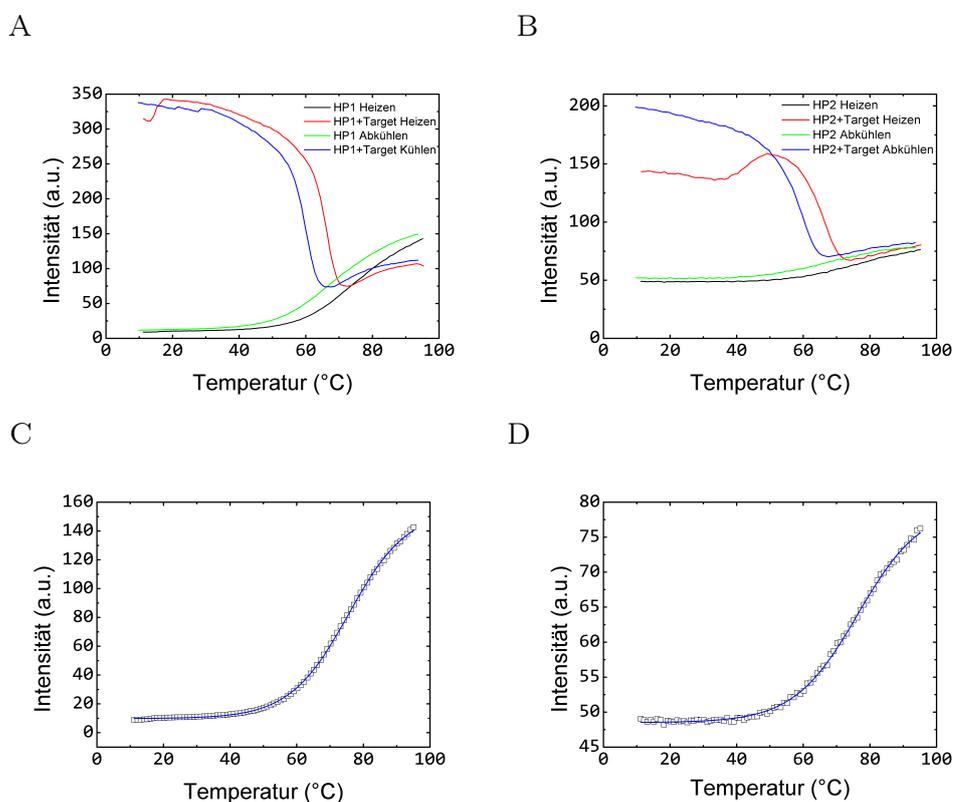


**Abbildung 4.46:** Repräsentative Emissionsspektren der beiden Molecular Beacons einer Konzentration von  $\approx 10^{-5} M$  ohne Gegensequenz (gestrichelte Linien) und mit äquimolarer Konzentration der Gegensequenz (durchgezogene Linie). Die wurden jeweils mit Licht der Wellenlängen angeregt, das auch in den Einzelmolekülexperimenten verwendet wurde ( $532 nm$  und  $638 nm$ ).

Abbildung 4.46 zeigt Emissionsspektren der verwendeten Sonden vor und nach Zugabe der Gegensequenz. Man erkennt einen etwa einen zwei- bis vierfachen Anstieg der Fluoreszenzintensität. Charakteristisch für das Spektrum ist, dass sich nur die Intensität verändert, nicht jedoch die Form.

#### 4.6.1 Charakterisierung der Hairpins auf Ensembleebene

Dieser Abschnitt beschäftigt sich mit der Charakterisierung [83] der intelligenten Sonden auf Ensemble-Ebene. Das bedeutet, dass in diesen Experimenten (relativ zu den Einzelmolekülversuchen) etwa  $10^3 - 10^5$ - mal mehr Moleküle untersucht werden. Damit sind keine Aussagen mehr über einzelne Spezies möglich, sondern man erhält lediglich eine gemittelte der Fluoreszenzintensität aller Moleküle.



**Abbildung 4.47:** Repräsentative Schmelzkurven der Hairpins in PBS für das grün markierte und für das rot markierte. Die Heiz- und Abkühlraten betragen jeweils  $1 \frac{^{\circ}\text{C}}{\text{min}}$ . Beide Graphen zeigen, jeweils farblich kodiert, sowohl den Aufheiz- als auch den Abkühlvorgang mit (A,B) und ohne Gegensequenz (C,D).

Zu Anfang, werden die MBs bei einer Konzentration von  $10^{-6} \text{ M}$  ohne Zielsequenz in  $50 \mu\text{l}$  - Küvetten schrittweise mit einer Rate von  $1 \frac{^{\circ}\text{C}}{\text{min}}$  aufgeheizt. Beim Aufheizen werden die intermolekularen Bindungen (hier Wasserstoffbrücken) zwischen den beiden Einzelsträngen im Stamm des MB mit zunehmender Temperatur aufgebrochen [88]. Als Folge dieses Aufheizvorgangs entfernen sich Fluorophor und Löschmolekül von einander, es ist mit zunehmender Temperatur ein Anstieg der Fluoreszenzintensität messbar (siehe 4.47(A, B) schwarze

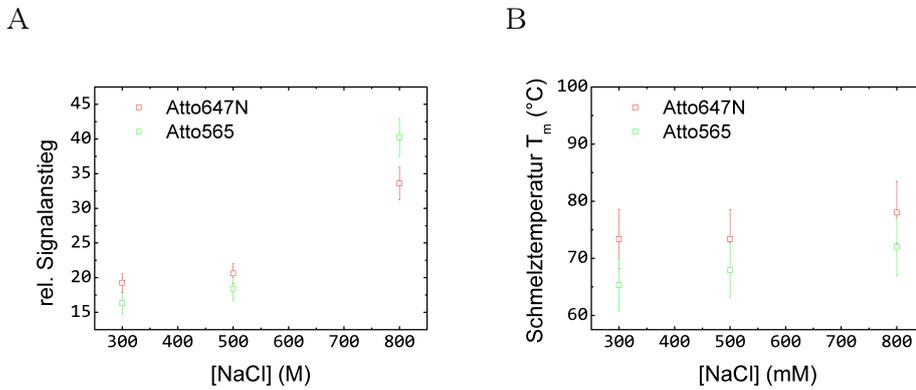
Kurve oder (C, D)). Beim Abkühlen schließen sich die komplementären Teile des Stamms wieder zusammen und bringen somit den Quencher mit dem Fluorophor in Kontakt (Abb.4.47 (A, B) grüne Kurve). Als Ergebnis nimmt die Fluoreszenzintensität wieder bis zu ihrem ursprünglichen Wert ab.

Diese im Wesentlichen sigmoidalen Funktionen werden mit Hilfe eines logistischen Modells

$$(4.27) \quad I(T) = \frac{I_{max} - I_{min}}{1 + (T/T_m)^p} + I_{min}$$

angepasst, wobei  $I_{min}$  und  $I_{max}$  die Sättigungsintensitäten zu Beginn und am Ende der Messung sind und  $T_m$  die Schmelztemperatur darstellt, bei der gerade die Hälfte aller Doppelstränge denaturiert sind.  $p$  ist ein Maß für die Steigung im dynamischen Bereich der Kurve. Die in PBS ermittelten Schmelztemperaturen sind für beide MBs ähnlich und liegen bei etwa  $T_m = (62 \pm 4)^\circ\text{C}$ .

Gibt man gleich zu Beginn der Messung die Zielsequenz im zehnfachen Überschuss ( $[target] = 10^{-5} M$ ) zu den Sonden findet spontane Hybridisierung statt. Mit steigender Temperatur beginnen die MBs allerdings wieder von den Gegensequenzen zu dissoziieren bis die Schmelztemperatur überschritten wird und nur noch sehr wenig Komplexe in der Lösung vorliegen (Abb. 4.47 rote Kurven). Wird die Lösung aktiv abgekühlt und überschreitet die Schmelztemperatur, so werden die MBs durch die Zielsequenz daran gehindert sich in ihre Haarnadelstruktur zurückzufalten und bleiben geöffnet. Die Fluoreszenzintensität nimmt nicht wieder auf ihren initialen Wert ab, was ein Zeichen für die erfolgreiche Hybridisierung ist (Abb. 4.47 blaue Kurve).



**Abbildung 4.48:** Der relative Signalanstieg (A) und die Schmelztemperatur (B) als Funktion der *NaCl*-Konzentration bei  $10^{-6}$  M Konzentration der MBs und einer zehnfach höheren Konzentration der Zielsequenz.

Es ist bekannt, dass die Hybridisierungseffizienz mit der Natriumchlorid Konzentration in der Lösung skaliert [89, 90].

Mit Erhöhung der *NaCl* Konzentration wird erwartet, dass die Komplexe (d.h. DNA Doppelstränge) stabilisiert werden, d.h., dass eine bessere Lösung der MBs (bzw. der Farbstoffmoleküle) zustande kommt. Durch die Zugabe von Salz in eine wässrige Lösung, die (komplementäre) einzelsträngige DNA Moleküle enthält, wird das negativ geladene Phosphatrückrad der DNA Moleküle durch die in Lösung gebrachten  $Na^+$ -Ionen abgeschirmt, was eine Coulomb-Abstoßung der beiden Einzelstränge, beschrieben durch den Ausdruck

$$(4.28) \quad F \propto \frac{q_1 \cdot q_2}{r^2}$$

verringert und damit mit steigender Konzentration (bis zu einer Sättigungskonzentration) die Hybridisierung begünstigt. Eine Möglichkeit die Stabilität der entstandenen DNA-Doppelstränge zu messen ist wieder die Aufnahme einer Schmelzkurve. Je höher die Schmelztemperatur  $T_m$ , desto höher ist also

auch die Energie, die aufgewendet werden muss, um den Doppelstrang wieder zu denaturieren. Abbildung 4.48(B) zeigt für beide MBs (mit Atto565 und Atto647N funktionalisiert) die Abhängigkeit der Schmelztemperatur von der *NaCl* Konzentration.

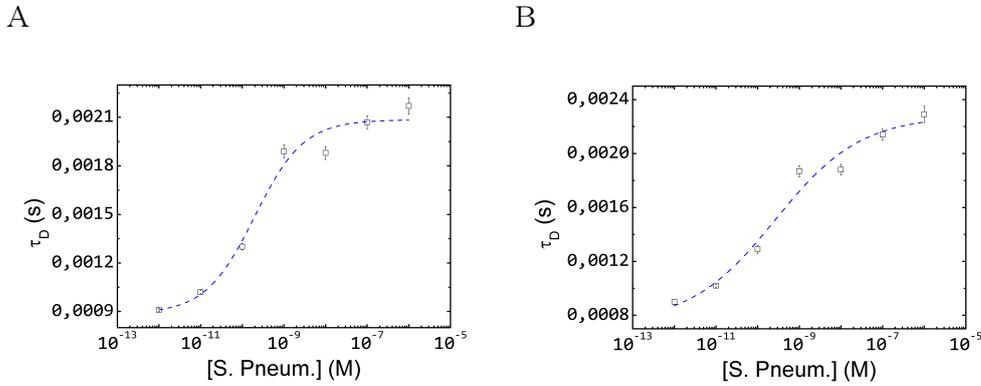
Je höher die Salzkonzentration in der Lösung ist, desto größer ist auch die Fraktion der MBs, die sich in einer Haarnadelstruktur befinden. Beim Überschreiten der Schmelztemperatur kann sich dann auch ein größerer Anteil von MBs öffnen, was zu einem höheren Fluoreszenzanstieg der Probe führt (Abbildung 4.48 (A)). Eine mittlere relative Änderung der Schmelztemperatur um  $\approx 8\%$  bei einer Erhöhung der *NaCl* Konzentration um  $500\text{ mM}$  bewirkt bei beiden MBs einen Unterschied von 30 im relativen Signalanstieg.

Dieser Anstieg der Fluoreszenzintensität ist natürlich neben der *NaCl* Konzentration noch stark von der Länge des Stamms und damit wieder von der Schmelztemperatur abhängig.

Zusätzlich wurden die relativen Quantenausbeuten der MBs auf  $QY_{rel} \approx 4\%$  mit Hilfe der jeweils freien Farbstoffe als Referenz mit  $QY_{rel} = \frac{Abs_{ref}}{Abs_{probe}} \cdot \frac{I_{probe}}{I_{ref}}$  ermittelt.

### 4.6.2 Bestimmung der Dissoziationskonstanten mittels FCS

Nach der Charakterisierung des Fluoreszenzanstiegs bei Hybridisierung der MBs wird die Bindungsaffinität dieser kurzen Oligonucleotide an die Zielsequenz mit Hilfe einer FCS Bindungsstudie für beide MBs einzeln analysiert (Abbildung 4.49). Der essentielle Parameter dieser Messung ist die Diffusionszeit. Bei FCS-Messungen wird bei einer heterogenen Mischung von Teilchen in der Lösung (hier freie und an die Zielsequenz gebundene MBs) sowohl eine mittlere Teilchenzahl als auch eine über die vorhandene Molekülmischung gemittelte Diffusionszeit bestimmt. Je mehr Komplexe in der Lösung vorliegen, desto höher ist auch die mittlere Diffusionszeit, da sie sich direkt proportional zum hydrodynamischen Radius des Moleküls verhält.



**Abbildung 4.49:** Bestimmung der Dissoziationskonstanten (A) für das rot markierte und (B) für das grün markierte Hairpin mit FCS. Die MB Konzentration wird bei  $10^{-9} M$  fixiert und die Konzentration der Gegensequenz wird von  $1 \mu M$  ( $10^{-6} M$ ) bis  $1 pM$  ( $10^{-12} M$ ) titriert. Die beiden Proben wurden jeweils mit einer Leistung von  $\approx 500 \mu W$  bei den entsprechenden Laserwellenlängen von  $532 nm$  für *Atto565* und  $638 nm$  für *Atto647N* angeregt. Die Fehlerbalken stellen Standardabweichungen aus fünf Messungen dar. Die fünfminütigen Messungen wurden in PBS mit zusätzlichen  $800 mM NaCl$  bei Raumtemperatur nach einer ebenfalls bei Raumtemperatur stattfindenden zweistündigen Hybridisierung durchgeführt.

Ein sigmoidaler, gradueller Anstieg der gemessenen Diffusionszeit kommt dadurch zustande, dass eine konstante Konzentration der MBs ( $10^{-9} M$ ) mit einer steigenden Konzentration der Zielsequenz von  $10^{-12} M$  bis  $10^{-6} M$  in einer Lösung reagiert und die Diffusionszeit so bis zu einer Sättigungskonzentration anwächst. Bei Sättigung trägt jedes Zielmolekül ein MB und kann auch bei weiterer Zugabe keine Bindung mehr eingehen. Im Wendepunkt dieses Zusammenhangs findet sich die Dissoziationskonstante, die über

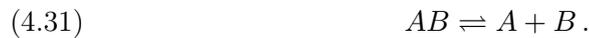
$$(4.29) \quad K = \frac{k_a}{k_d}$$

bzw. durch

$$(4.30) \quad k_d = \frac{[A][B]}{[AB]}$$

gegeben ist. Die Dissoziationskonstante  $k_d$  gibt an bei welcher Konzentration sich 50 % aller Komplexe ausgebildet haben und wird typischerweise in  $M$  angegeben [91].

$K$  ist dabei die Gleichgewichtskonstante dieser Bindungsreaktion und  $k_a$  entsprechend die Assoziationskonstante. In Ausdruck 4.30 stellen  $[A]$  und  $[B]$  die Einzelkonzentrationen der beiden Reaktionspartner dar.  $[AB]$  ist dann die Konzentration des sich gebildeten Komplexes nach der Reaktion



Über Beziehung 4.30 lässt sich dann bei bekannter  $k_d$  leicht die vorliegende Konzentration des Komplexes bestimmen.

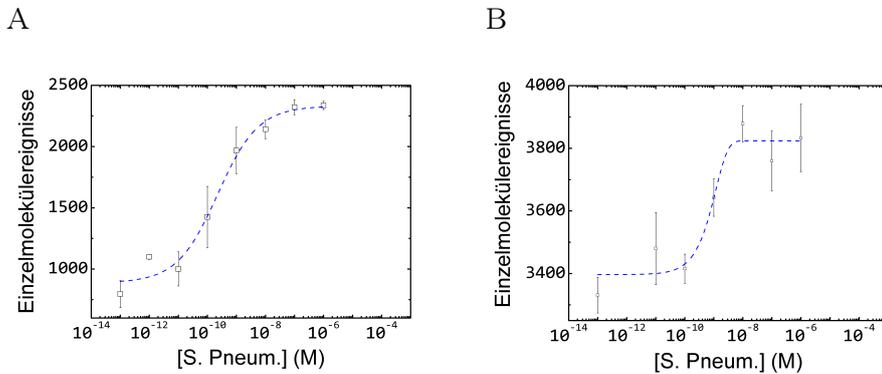
Dieser sigmoidale Verlauf wird dann mit Hilfe von Gleichung 4.32

$$(4.32) \quad \tau_d(c) = \frac{\tau_{max} - \tau_{min}}{1 + (c/k_d)^p} + \tau_{min}$$

wobei  $c$  die Konzentration der Gegensequenz und  $k_d$  die Dissoziationskonstante ist.

Die Dissoziationskonstante des mit rotem Farbstoff *Atto647N* markierten MB wurde zu  $k_{d-Atto647N} = (2,24 \pm 1,01) \cdot 10^{-10} M$  und die des MBs, funktionalisiert mit grünem Fluorophor *Atto565* zu  $k_{d-Atto565} = (2,67 \pm 1,2) \cdot 10^{-10} M$  bestimmt. Beim Vergleich dieser Werte fällt auf, dass das Bestreben der MBs in ungebundener Form vorzuliegen etwa gleich ist. Es besteht eine relative Abweichung von  $\approx 16\%$ . Die ähnlichen Dissoziationskonstanten bieten eine ideale Vorraussetzung für Koinzidenzmessungen.

Im Vergleich zu anderen Systemen wie z.B. Proteinen ist die Äffinität dieser MBs gebunden vorzuliegen etwa 1000-fach höher [53].



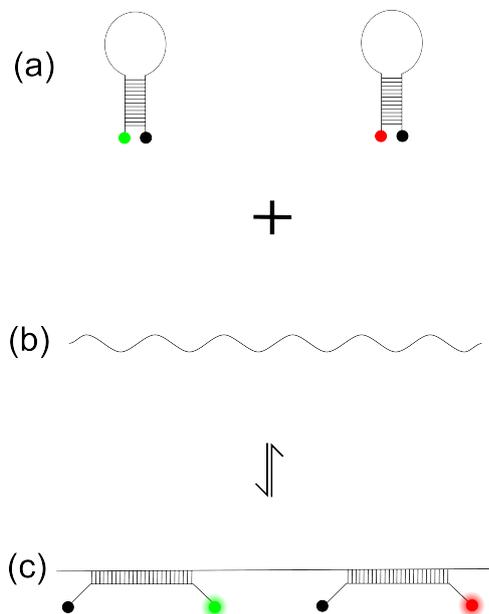
**Abbildung 4.50:** Bestimmung der Dissoziationskonstanten (A) für das rot markierte und (B) für das grün markierte Hairpin mittels Einzelmoleküldetektion. Die MB Konzentration wird bei  $10^{-9} M$  fixiert und die Konzentration der Gegensequenz wird von  $1 \mu M$  ( $10^{-6} M$ ) bis  $1 pM$  ( $10^{-12} M$ ) titriert. Die beiden Proben wurden jeweils mit einer Leistung von  $\approx 500 \mu W$  bei den entsprechenden Laserwellenlängen von  $532 nm$  für *Atto565* und  $638 nm$  für *Atto647N* angeregt. Die Fehlerbalken stellen Standardabweichungen aus fünf Messungen dar. Die fünfminütigen Messungen wurden in PBS mit zusätzlichen  $800 mM NaCl$  bei Raumtemperatur nach einer ebenfalls bei Raumtemperatur stattfindenden zweistündigen Hybridisierung durchgeführt.

Eine weitere, prinzipiell äquivalente, Methode um Dissoziationskonstanten und damit die Bindungsaffinität zu bestimmen ist mit Hilfe der Einzelmoleküldetektion möglich. Mit steigender Konzentration der Zielsequenz in der Lösung findet (wie oben besprochen) eine zunehmende Bindung der MBs und damit ein gradueller Anstieg der Einzelmolekülsignale statt (Abb. 4.50). Für das rot markierte MB lässt sich ein im Wesentlichen gleicher Wert, wie auch durch FCS ermittelt wurde, angeben. Beim Vergleich der Ergebnisse der beiden Methoden für das grüne MB fällt bereits ein merklicher Unterschied in der Form der Kurve auf. Der im Falle der FCS-Daten lineare, dynamische Bereich ändert seine Steigung für die Einzelmoleküldaten relativ sprunghaft und liefert einen Wert von  $k_{d-Atto565(SM)} = (2,98 \pm 2,02) \cdot 10^{-10} M$ . Die signifikante Abweichung des durch die Einzelmolekülmessung erhaltenen Wert vom FCS-Wert liegt unter anderem an der hohen statistischen Schwankung

der Einzelmolekülereignisse.

Insgesamt konnte in diesem Abschnitt eine sehr ähnliche Bindungsaffinität der MBs gezeigt werden. Außerdem stellt die Einzelmolekülmessung eine sensitive Alternative dar, um Bindungseigenschaften zu charakterisieren.

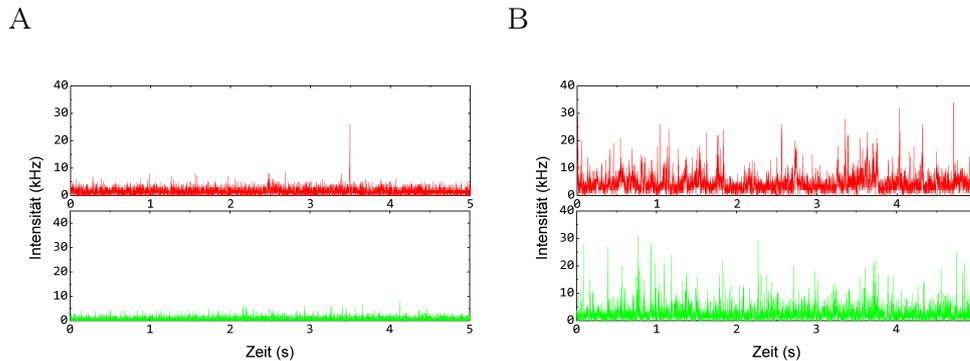
#### 4.6.3 Durchführung einer Untersuchung zur Zwei-Farben Koinzidenzdetektion einzelner Pathogener DNA-Moleküle



**Abbildung 4.51:** Das “Smart-Probe” - Konzept. Die freien, unterschiedlich markierten Hairpins (A) binden durch einen Hybridisierungsschritt an die freie Zielsequenz (B) und formieren einen zweifach markierten Komplex (C), der mittels Koinzidenzdetektion in Lösung nachweisbar ist.

Dem in 3.4.3 beschriebenen Hybridisierungsprotokoll nach, wurden die Proben nach dem in Abbildung 4.51 dargestellten Schema für die Einzelmolekülmessungen vorbereitet.

Abbildung 4.52 zeigt das Verhalten der molekularen Sonden bei Zugabe einer Konzentration der Gegensequenz von  $10^{-10} M$ . In 4.52(A) sind jeweils die Zeitspuren der Sonden ohne entsprechende Gegensequenz zu sehen. Im Wesentlichen (bis auf seltene, statistisch detektierte Einzelmolekülsignale von ineffizient gelöschten Molekülen) zeigen diese Fluoreszenztrajektorien ein typisches Hintergrundsignal. Die Aufnahme in 4.52 (B) zeigt die selbe Konzentration von Sonden nach Zugabe der Gegensequenz in o.g. Konzentration. Ein signifikanter Anstieg in der Signalintensität über das Hintergrundniveau ist zu verzeichnen.

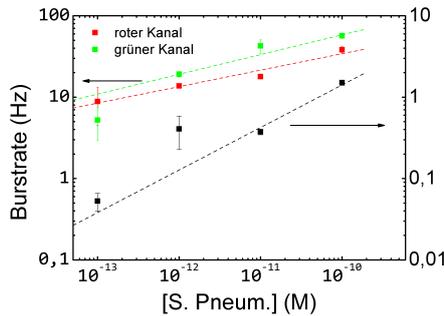


**Abbildung 4.52:** Zehn-Sekunden Ausschnitte der Fluoreszenzzeitstrajektorien zeigen das Signal für eine Probe ohne Gegensequenz (A) und eine Probe mit einer Konzentration von  $10^{-10} M$  der Gegensequenz. Die Anregungsleistungen der roten (638nm) und grünen (532nm) Linie betragen jeweils  $\approx 350 \mu W$ . Als Binning wurde  $1 ms$  gewählt.

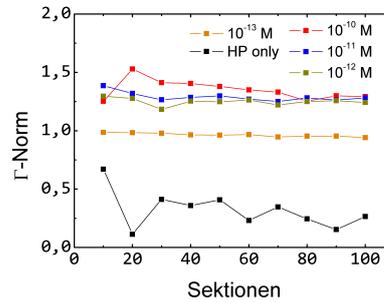
Abbildung 4.53 (A) zeigt die beobachtete Koinzidenzrate für eine Mischprobe aus molekularen Sonden bei einer konstanten Konzentration von  $10^{-10} M$  und Konzentrationen der Gegensequenz von  $0 M$  bis  $10^{-10} M$ . Diese nimmt Werte zwischen  $(0,026 \pm 0,005) Hz$  und  $(1,5 \pm 0,11) Hz$  an. Als Vergleich wurde bei einer äquimolaren Konzentration zweier unabhängiger Farbstoffe (Atto565 und Atto647N) bei  $10^{-11} M$  eine statistische Koinzidenzrate von etwa  $4 Hz$  beobachtet. Dieser Wert ist ungefähr 100-fach größer, als der Wert für eine

Mischung von MBs ohne Zielsequenz. Dieser Vergleich macht noch einmal den Vorteil gelöschter Sonden klar: Weil nicht hybridisierte MBs effizient gelöscht sind, ist die Wahrscheinlichkeit für zufällige Koinzidenzen drastisch reduziert.

A



B



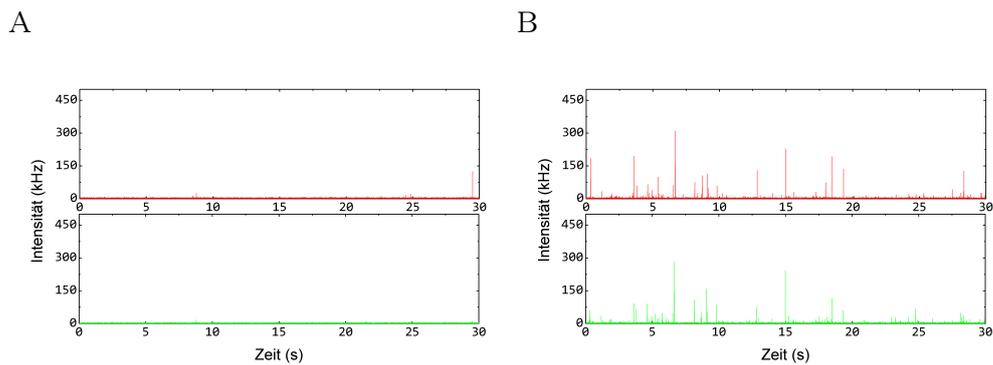
**Abbildung 4.53:** Burstrate in Abhängigkeit von der Targetkonzentration, aufgenommen auf zwei getrennten Kanälen für eine Probe bestehend aus der 100-Basen synthetischer Einzelstrang DNA als Zielsequenz und zwei gelöschten haarnadelförmigen Oligonukleotiden, die an zwei unterschiedlichen Regionen an das selbe Zielmolekül hybridisieren. Die Proben wurden simultan bei 638 nm und 532 nm mit Leistungen von  $\approx 550 \mu W$  und  $\approx 900 \mu W$  angeregt. Die auf dem roten und grünen Kanal detektierten Bursraten als Funktion der Konzentration der Gegensequenz sind in (A) entsprechend farblich gekennzeichnet. Die Pfeile markieren die korrespondierenden Achsen. Die Fehlerbalken stellen Standardabweichungen von dreifachen Messungen dar. In (B) wurde  $\Gamma$  – Norm als Funktion der Abschnitte für verschiedene Konzentrationen der Zielsequenz berechnet.

Zur Detektion der Gegensequenz mit Hilfe der Zwei-Farben Koinzidenzdetektion mit molekularen Sonden, wurde die  $\Gamma$  – Norm berechnet, die einen Wert um 1,4, unabhängig von der Konzentration der Gegensequenz annimmt (Abb. 4.53(B)), präzise gilt also

$$(4.33) \quad \frac{dI_{\Gamma}}{dc_{target}} = const.$$

was einen weiteren Vorteil der *KMM* ausmacht. Die  $\Gamma$  – Norm bricht auf

einen Wert von 0,5 ein, wenn die molekulare Interaktion zwischen den Sonden und der Zielsequenz abnimmt. Sogar bei einer Gegensequenzkonzentration von  $10^{-13} M$  (sub-piko molar) ist ein signifikanter Unterschied der  $\Gamma$  – Norm zu dem Wert, der für eine Mischung der MBs ohne Zielsequenz bestimmt wurde und zeigt die Sensitivität dieses Parameters auf molekulare Interaktion auf. Der Wert der  $\Gamma$  – Norm für hohe Konzentrationen der Zielsequenz liegt bei 1,4 und damit geringer ist als der Wert, der für eine ideale Koinzidenzprobe erwartet wird, jedoch signifikant höher als Werte zwischen Null und eins für Zufallskoinzidenzen. Die Abweichung von einer idealen Koinzidenzprobe kann auf die Tatsache zurückgeführt werden, dass die MBs nicht immer paarweise an ein Zielmolekül hybridisieren und damit einen Beitrag zu statistischen Koinzidenzen liefern.



**Abbildung 4.54:** Fluoreszenzzeitserien einer 30-Sekunden Messung in einem mikrofluidischen Kanal bei einem Druck von  $20 hPa$  zeigen das Signal für eine Probe ohne Gegensequenz (A) und eine Probe mit einer Konzentration von  $10^{-10} M$  der Gegensequenz.

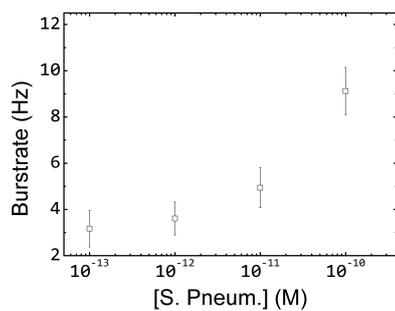
Im nächsten Schritt können weitere Verbesserungen an der Versuchsdurchführung vorgenommen werden. Durch Verwendung des mikrofluidischen Kanals [92] [60] unter Druck kann das SNR deutlich verbessert werden. Zusätzlich wird die Messdauer [93] und damit die Dauer eines späteren Pathogen-Assays

erheblich verkürzt und das Probenmaterial kann reduziert werden. Außerdem kann die Konzentration der molekularen Sonden um eine Größenordnung auf  $10^{-9} M$  erhöht werden, um das chemische Reaktionsgleichgewicht weiter auf die Seite des Komplexes zu drängen. Die Hybridisierungsprozedur bleibt bis auf die angesprochenen Änderungen erhalten.

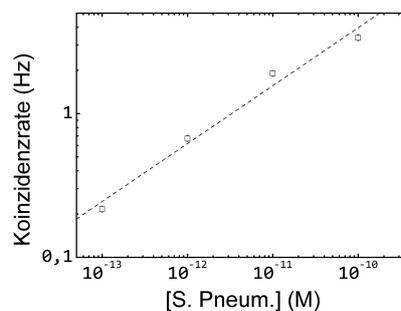
Abbildung 4.54 zeigt anhand einer vollständigen Messung wieder den Vergleich zwischen einer Probe ohne (A) und mit (B)  $10^{-10} M$  Gegensequenz. In (B) erkennt man nun, dank des erhöhten SNR, deutlich einzelne koinzidente Ereignisse. Nach einer dreifachen Messung wurde eine mittlere Koinzidenzrate von  $\approx 0,23 Hz$  bei geringster Konzentration der Zielsequenz ermittelt, die fast zehnfach höher ist als bei der Messung in offenem Volumen bei gleicher Konzentration. Zusätzlich ist aufgefallen, dass kein zufälliges Koinzidenzereignis aufgetreten ist. Dies ist darauf zurückzuführen, dass evtl. durch das Anlegen von Druck eine effizientere Faltung des MBs zustande kommt, was dazu führt, dass eventuelle falsch-positive Signale so klein sind, dass sie unter den gesetzten Schwellwert von  $50 kHz$  fallen. Insgesamt zeigt diese Messung eine bisher unerreichte Messdauer. Die Sensitivität dieser Methode ist nur durch die Flußgeschwindigkeit und den Löschgrad der MBs beschränkt.

Eine einfache Extrapolation des in Abbildung 4.55 (B) dargestellten Zusammenhangs zeigt, dass eine Targetkonzentration von  $1 fM = 10^{-15} M$  unter gleichen Messbedingungen eine Koinzidenzrate von  $\approx 0,04 Hz$  liefern würde, was etwa  $\approx 1,2$  koinzidenten Ereignissen in 30 Sekunden und damit der Empfindlichkeit der Messung im offenen Volumen bei  $100 fM$  entspricht. Also liefert die Einzelmolekülmessung in dem in dieser Arbeit verwendeten Mikrokanal bei einem zehntel der Messdauer eine 100-fache Erhöhung der endgültigen Empfindlichkeit.

A



B



**Abbildung 4.55:** Burstrate aller Ereignisse (A) und der koinzidenten Ereignisse (B) jeweils als Funktion der Konzentration der Gegensequenz.



## 5 Ausblick und Diskussion

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen sich in drei wesentliche Abschnitte einteilen: Zum Einen, dem Nachweis und der Anwendung fundamentaler Gesetzmäßigkeiten der Strömungsmechanik auf die Einzelmoleküldetektion, zum Anderen die Entwicklung einer statistischen Methode, der Korrelationsmatrix-Methode (*KMM*), zur Bewertung der Güte einer Mehrfarben-Koinzidenzmessung. Der dritte Abschnitt beschäftigt sich mit der praktischen Anwendung der Zwei-Farben-Koinzidenzmessung auf die Detektion und Quantifizierung von einzelnen unmarkierten DNA-Molekülen in wässriger Umgebung als diagnostische Maßnahme.

Es konnte nachgewiesen werden, dass laminare Strömung im hier verwendeten mikrofluidischen Kanal herrscht und dass damit das Hagen-Poiseuille Gesetz gilt. Die Strömung im  $100\ \mu\text{m}$  Kanal kann durch weit unterkritische Reynoldszahlen charakterisiert werden. Bei konstantem Druckgefälle  $\Delta p$  kann mit Hilfe von quantitativen FCS-Messungen eine parabolische Geschwindigkeitsverteilung entlang des Kanalquerschnitts nachgewiesen werden. Das Geschwindigkeitsmaximum, d.h. die höchste Flußgeschwindigkeit der Probenmoleküle, befindet sich genau in der Mitte des Kanals. Durch die quantitative Anwendung eines auf der Hagen-Poiseuille Gleichung basierenden Modells konnten Flußgeschwindigkeiten um  $0,5\ \text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$  bestimmt werden. Da dies nur bei laminarer Strömung der Fall sein kann, ist dies eine weitere Bestätigung der Wirbelfreiheit. Daher wurden alle weiteren mikrofluidischen Experimente in der Mitte des Kanals durchgeführt, um eine Minimierung der Messdauer zu erreichen. Eine lineare Abhängigkeit der fokalen Transitzeit der

Einzelmoleküle als Funktion des Drucks konnte gezeigt werden. Das  $SNR$  konnte als Funktion des Drucks optimiert werden, was die Bursterkennung, d.h. die Separation der Einzelmolekülsignale vom Hintergrund, vereinfacht. Es wird ein  $SNR \approx 40$  erreicht, was ein mindestens vierfach höherer Wert ist als bei Einzelmolekülmessungen in offenem Volumen. Die Bestimmung des  $SNR$  aus Einzelmolekülmessungen unter Bedingungen schneller Strömung ist mit relativen Abweichungen von bis zu 40 % behaftet. Bei diesen Messreihen hängt das  $SNR$  kritisch von der Eindringtiefe in den Kanal ab. Man erkennt zwar ein klares Maximum im gemessenen Zusammenhang (betrachtet man nur die Mittelwertwe), jedoch können nur sehr schwer absolute Aussagen über das tatsächlich vorherrschende  $SNR$  getroffen werden, da, unabhängig von der Flußgeschwindigkeit ein Überlapp der Fehler zu erkennen ist.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Signalhöhenverteilung mit zunehmender Flußgeschwindigkeit immer schmaler wird. Dies ist ein Zeichen für die zunehmend homogenere Bursthöhe. Dies lässt sich auf die starke Ähnlichkeit des Pfades zurückführen, den die Moleküle durch das Anregungsvolumen nehmen.

Das zentrale Ergebnis der mikrofluidischen Charakterisierung ist der Nachweis einer möglichen Erhöhung der Detektionssensitivität. Die Sensitivität  $S$  wird in Einheiten von  $S \approx 3 \cdot 10^{-5} \frac{\text{Teilchen}}{\text{Pa}}$  angegeben, was die lineare Abhängigkeit der Teilchenzahl als Funktion des Drucks beweist. Damit wurde ein quantitatives Maß für die Sensitivität eingeführt. Obwohl, wie Abbildung 4.17 zeigt, die Teilchenzahl aufgrund der Wechselwirkung der Moleküle mit den Kanalwänden an den Rändern des Kanals maximal ist, kann durch eine Erhöhung der Flußgeschwindigkeit trotzdem eine signifikante, meßbare Konzentrationserhöhung erwirkt werden. Dies hat zwei entscheidende Vorteile: Zum einen verkürzt sich in bei einer Messung in der Kanalmitte die Messdauer und zum Anderen wird eine weitere Verschlechterung des  $SNR$  aufgrund von Laserstreuung an der Kanalinnenwand vermieden. Die Verschlechterung des  $SNR$  spiegelt sich in einer relativen Streuung der Diffusionszeit von  $\approx 30\%$  am Kanalrand wieder.

---

Außerdem gestaltet es sich schwierig eine Messung an den Kanalinnenwänden besser als in der soeben angegebenen Fehlergrenze zu reproduzieren, da die Wände, bedingt durch den Herstellungsprozess an verschiedenen Stellen auch unterschiedliche Oberflächenrauheiten aufweisen.

Mit der Einführung der Korrelationsmatrix-Methode und damit der  $\Gamma$  – Norm in Kap.4.5.1 ist es möglich die Güte von Koinzidenzmessungen zu bewerten. Eine perfekte Koinzidenzmessung bzw. Probe liefert einen Wert von zwei. Eine Mischprobe aus Koinzidenzen und Einzelemittern einen Wert von  $1 > l_{\Gamma} \leq 2$ . Pur statistische Proben liefern einen Wert der  $\Gamma$  – Norm von  $l_{\Gamma} \leq 1$ . Erstmals wurden M280 Mikropartikel aufgrund ihrer breitbandigen Absorption und Emission als perfekte Koinzidenzprobe verwendet. Hier wurde eine Koinzidenzwahrscheinlichkeit von  $> 85\%$  ermittelt. Diese Probe wurde als Kalibrationsprobe für die Koinzidenzdetektion ausgewählt. Eine Probe, die lediglich aus unabhängigen Einzelemittern (hier freiem Farbstoff) besteht, liefert auf Einzelmolekülebene bei höchster, äquimolarer Konzentration eine Koinzidenzwahrscheinlichkeit von  $\approx 7\%$  und ein  $l_{\Gamma} < 1$ . Der größte Vorteil der *KMM* ist die Unabhängigkeit von der Bursterkennung selbst. Sowohl mit  $1\text{ ms}$  Daten als auch mit binären Einzelphotonen-Zeitspuren und der Untersuchung von koinzidenten Photonen kann eine  $\Gamma$  – Norm berechnet werden. Die *KMM* zeigt durch die Berechnung von Korrelationskoeffizienten eine Robustheit gegen Hintergrundphotonen, die andere Verfahren nicht leisten können und damit auf eine Bursterkennung zur Analyse von Koinzidenzdaten angewiesen sind. Aufeinanderfolgende Hintergrundphotonen stehen in keiner zeitlichen Korrelation zueinander, demnach liefern sie auch nur einen kleinen Korrelationskoeffizient und somit einen zu vernachlässigenden Beitrag zur  $\Gamma$  – Norm. Eine interessante Eigenschaft der  $\Gamma$  – Norm ist die praktisch zu vernachlässigende Abhängigkeit von der Molekülkonzentration, d.h. von dem Anteil der koinzidenten Ereignisse in einer Probe.

Der letzte Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Anwendung der hier entwickelten Arbeit zu Zweifarben-Koinzidenzmessungen auf die sensitive De-

tektion von einzelnen (synthetischen) pathogenen DNA Molekülen in wässriger Umgebung. Es wird demonstriert, dass es möglich ist mit Hilfe von effizient gelöschten DNA-Sonden, sogenannten Molecular Beacons, durch spontane, gleichzeitige Hybridisierung gegen ein Zielmolekül sub-pikomolare bis femtomolare Konzentrationen der DNA des Erregers *S. Pneumoniae*, sowohl im offenen Volumen, als auch im Mikrokanal, aufzuspüren. Die relative Quantenausbeute der molekularen Sonden beträgt etwa 4%. Außerdem zeigen Ensemble-Untersuchungen eine klare Abhängigkeit der Schmelztemperatur, die ein Maß für die Stabilität des Hairpins ist, von der *NaCl*-Konzentration. Von 300 *mM* bis 800 *mM* konnte ein Anstieg der Schmelztemperatur von etwa 70 °C bis 75 °C verzeichnet werden. Auch der Signalanstieg, relativ zur Intensität nicht hybridisierter Sonden, konnte verdoppelt werden, so dass ein 20 – 40 facher Anstieg bei Hybridisierung folgt. Bei der Arbeit mit MBs ist es wichtig darauf zu achten möglichst viele Stammlösungen herzustellen. Durch häufiges Einfrieren und Auftauen ist der Anteil an geschlossenen (damit effizient gelöschten) und offenen MBs unbekannt. Dieser undefinierte Zustand der Sonden macht z.B. die Hybridisierung bei Raumtemperatur ungünstig und ist nur mit hohen Konzentrationen möglich. Sie kann nur unter definierten Bedingungen, wie in Kap. 3.4.3 beschrieben, effizient erfolgen. Durch eine FCS-Bindestudie konnte gezeigt werden, dass die Affinität der molekularen Sonden, an die Zielsequenz zu binden, nämlich die Dissoziationskonstante  $k_d$ , für beide Sonden ähnliche Werte um  $k_d \approx 2 \cdot 10^{-10} M$  liefert. Auch die dazugehörige Auswertung der Einzelmolekülsignale liefert einen vergleichbaren Wert und zeigt, dass dies eine äquivalente Methode ist. Der Vorteil dieser Sonden ist, dass sie im großen Überschuss ( $10^3 - 10^4$ ) zu der zu untersuchenden Lösung gegeben werden können. Die Messung der Dissoziationskonstanten liefert Ergebnisse, die sich gut mit Literaturwerten für DNA Hybridisierungsexperimente [94, 57, 89, 81] decken.

Durch Anwendung der Mikrofluidik konnte die Messdauer für die Detektion der 100 Nukleotide langen, synthetischen Sequenz des Erregers *Streptococcus*

---

*Pneumoniae* auf eine bisher unveröffentlichte Zeit von lediglich 30 s verkürzt werden. Dabei wurde die  $\Gamma$  – Norm zu  $l_\Gamma \approx 1,7$  bestimmt. Dieser Wert liegt damit weit oberhalb des Wertes für zufällige Koinzidenzen. Die Koinzidenzrate für die Probe mit geringster Konzentration der Zielsequenz von  $10^{-13} M$  konnte mit  $\approx 0,23 Hz$  abgeschätzt werden, was zwei Größenordnungen weniger ist als eine Probe mit freien Sonden ergeben hat. Bei einer Konzentration von einem  $fM$  würde die Koinzidenzrate  $\approx 0,04 Hz$  betragen. Diese Sensitivität bietet die Möglichkeit eine Erkennung von Infektionen bereits in frühen Stadien in kurzer Zeit. Bei Betrachtung der in dieser Arbeit verwendete synthetische Einzelstrangsequenz muss man bedenken, dass sie eine Länge von 100nt besitzt und damit relativ zu realistischeren Sequenzen von 5-10kb weniger komplizierte Sekundärstrukturen ausbildet und damit eine leichtere Hybridisierung der MBs erlaubt. Die Zwei-Farben Koinzidenzdetektion von DNA Molekülen hat den großen Vorteil, dass die Wahrscheinlichkeit von falsch-positiven Ergebnissen drastisch sinkt. Für freien Farbstoff (wie oben erwähnt) wurde experimentell eine Koinzidenzwahrscheinlichkeit von  $\approx 7\%$  ermittelt. Dieser Wert deckt sich gut mit dem nach dem Verfahren der “desynchronisierten Zeitspur” [35] ermittelten Wert für zufällige Koinzidenzen. Daher ist die Wahrscheinlichkeit, dass zwei gelöschte oder ineffizient gelöschte molekulare Sonden gleichzeitig detektiert werden geringer, weil dadurch die effektive Farbstoffkonzentration erniedrigt wird. Es werden nur koinzidente Ereignisse registriert. Einzel hybridisierte Sonden tragen nicht zum Signal bei und erniedrigen ebenfalls die relative Häufigkeit falsch-positiver Signale.

Die Spezifität der molekularen Sonden kann in weiteren Arbeiten dadurch ausgenutzt werden, dass es möglich ist ein sogenanntes Multiplexverfahren [95, 96] zu etablieren. Dabei können mehrere verschiedene DNA- Zielmoleküle in einer einzigen Probenlösung durch Farbkombinationen von koinzidenten Signalen detektiert werden. Die Daten in Abbildung 4.32 zeigen bereits die technische Realisierbarkeit der Auflösung von Konzentrationsverhältnissen und legt damit den Grundstein für weitere Experimente. So könnte als nächstes ein

weiteres, mit blauem Farbstoff markiertes MB, welches spezifisch an die neue Zielsequenz bindet eingeführt werden. Zusätzlich zu dem bereits vorhandenen, grün markierten MB, wird ein weiteres grünes MB, jedoch mit einer zum neuen Zielstrang komplementären Sequenz synthetisiert. Detektiert man in der Messung eine rot-grüne Koinzidenz, wurde die bekannte Sequenz von *Streptococcus Pneumoniae* detektiert. Registriert man allerdings eine grün-blaue Koinzidenz, wurde das neue Zielmolekül detektiert. Für eine erfolgreiche Durchführung dieses Verfahrens muss sichergestellt werden, dass die entwickelten molekularen Sonden sehr spezifisch gegen ihre Zielsequenz hybridisieren, um falsch-positive Signale zu unterbinden. Die hohe Spezifität kann dadurch erreicht werden, dass die Sequenzen der MBs verlängert werden  $> 30nt$  [97]. Je kürzer die Sequenzen sind, desto höher ist die unspezifische Hybridisierung, da die Wahrscheinlichkeit steigt eine bestimmte Basenkombination vorzufinden. Ist die Sonde jedoch zu lang, so können sich stabile Sekundärstrukturen ausbilden, die die Hybridisierungseffizienz erniedrigen.

Ein Ansatzpunkt zur Erhöhung der Sensitivität, ist die Aufkonzentrierung der Probe. Die Erhöhung der Konzentration der Zielmoleküle (bei gegebener Stoffmenge) kann nur durch eine Reduzierung des Volumens erfolgen. Ein lohnenswerter, hier [92] angesprochener Ansatz, beinhaltet das Erwärmen der Probe und damit die Evaporation der Lösung. Außerdem wäre ein mikrostrukturiertes "Sieb" denkbar, dass die DNA Moleküle aus der Lösung herausfiltert, während die Probe hindurchfließt. Beide angesprochene Ansätze zur Aufkonzentrierung erfordern ein Design von feinen Mikro- und Nanostrukturen zur Untersuchung extrem kleiner Volumina.

# Anhang

## 1 Quelltext zur Bursterkennungssoftware

Die zur Auswertung der Einzelmoleküldaten entwickelte Software liegt dieser Arbeit vorkompiliert und als Quelltext auf einem Datenträger bei.

## 2 Bedienungsanleitung zur Verwendung der Auswertesoftware

Diese Software ist nur zur Verarbeitung von Zeitspuren im ASCII-Format konzipiert und kann rohe .sm-Dateien im Labviewformat nicht einlesen. Die gebinnten Photonendaten selbst müssen in Spalten (je Kanal eine Spalte) vorliegen (Abbildung 1).

Arrival Time	Counts (red)	Counts (green)
0,000000000E+0	1,100000000E+1	4,000000000E+0
1,000000000E-3	2,000000000E+0	0,000000000E+0
2,000000000E-3	5,000000000E+0	4,000000000E+0
3,000000000E-3	5,000000000E+0	2,000000000E+0
4,000000000E-3	1,000000000E+0	1,000000000E+0
5,000000000E-3	7,000000000E+0	3,000000000E+0
6,000000000E-3	2,000000000E+0	4,000000000E+0
7,000000000E-3	4,000000000E+0	0,000000000E+0
8,000000000E-3	2,000000000E+0	7,000000000E+0
9,000000000E-3	6,000000000E+0	1,000000000E+0
1,000000000E-2	4,000000000E+0	4,000000000E+0
1,100000000E-2	4,000000000E+0	1,000000000E+0
1,200000000E-2	8,000000000E+0	3,000000000E+0

**Abbildung 1:** Format der ASCII-Zeitspuren.

Die linke Spalte stellt die Zeitspalte dar. Das Programm ist auf die Verarbeitung von maximal drei Kanälen konzipiert und so können die ASCII-Zeitspuren höchstens vier Spalten besitzen. Die Bedienung selbst ist sehr intuitiv und über Tastatureingaben zu bewerkstelligen.

Bevor die Bursterkennung stattfinden kann, müssen alle zu prozessierenden ASCII-Zeitspuren in einer Textdatei beliebigen Namens in einer Liste zusammengeführt werden. Unter Windows kann dies mit einer Batch-Datei, die den folgenden Befehl enthält “dir \*.dat\* /B >tts.txt” erledigt werden. Alle .dat Dateien (hier die Zeitspuren) werden mit relativem Pfad in einer Datei (hier) namens “tts.txt” aufgelistet (Abb. 2). Es ist unbedingt darauf zu achten, dass in der Zeitspurlisten-Datei keine Leerzeilen eingefügt werden, da Leerzeilen (auch am Ende der Datei) nicht gelesen werden können.

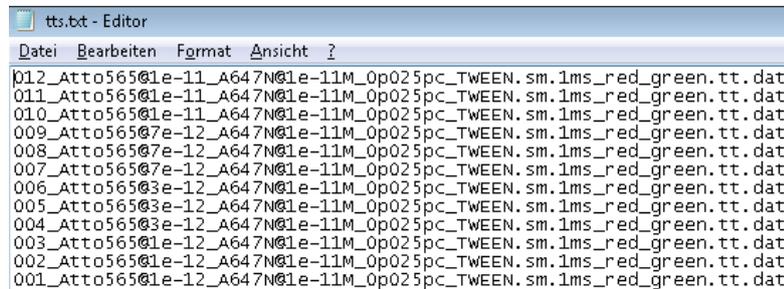


Abbildung 2: Repräsentative Zeitspurliste mit zu prozessierenden Dateinamen.

Nur der Dateiname dieser Zeitspurliste (und nicht jeder Einzeldatei) wird als Eingabe in der Software benötigt. Auch im Falle einer einzigen Zeitspur muss der Dateiname der Zeitspur in einer Zeitspurlisten-Datei stehen und kann nicht direkt in dem Programm eingegeben werden. Die Zeitspurliste ermöglicht das automatische Auswerten großer Datenmengen ohne, dass weitere Benutzereingaben notwendig sind. Die Verwendung aller implementierten Module funktioniert analog. Im folgenden Abschnitt wird nur kurz auf die beiden (meistens) in dieser Arbeit verwendeten eingegangen.

Die Software “burstdetection.exe” ist dann in dem Verzeichnis auszuführen, das sowohl die Zeitspuren als auch die Zeitspurlistendatei enthält.

## 2.1 Bursterkennung mit $4\sigma$ und $3\sigma$ Detektion

Im Hauptmenü des Programms (Abb.3) besitzt man die Wahl zwischen insgesamt 7 Menüpunkten. Zum Ausführen der  $4\sigma$ -Detektion muss die 3 gedrückt und mit Return bestätigt werden.

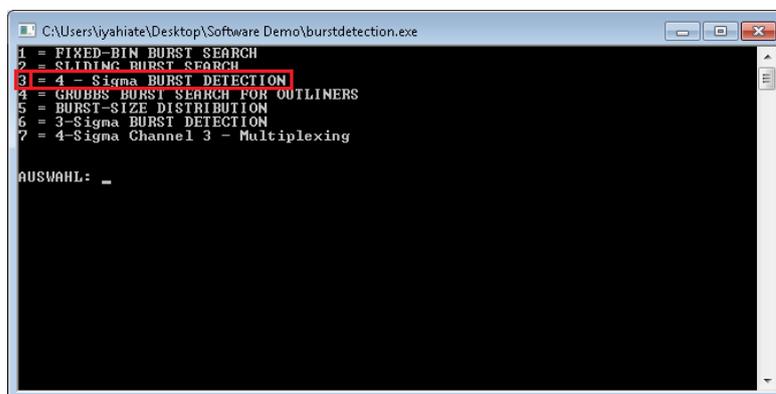


Abbildung 3: Programm - Hauptmenü.

Im Wesentlichen folgt man dann einfach den Anweisungen auf dem Bildschirm und bestätigt weiterhin jedes Kommando. Es muss darauf geachtet werden, dass die Eingaben keine Leerzeichen enthalten (Abb.4).

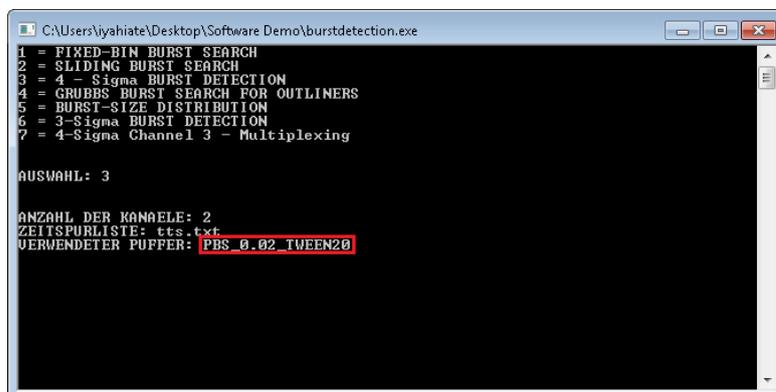
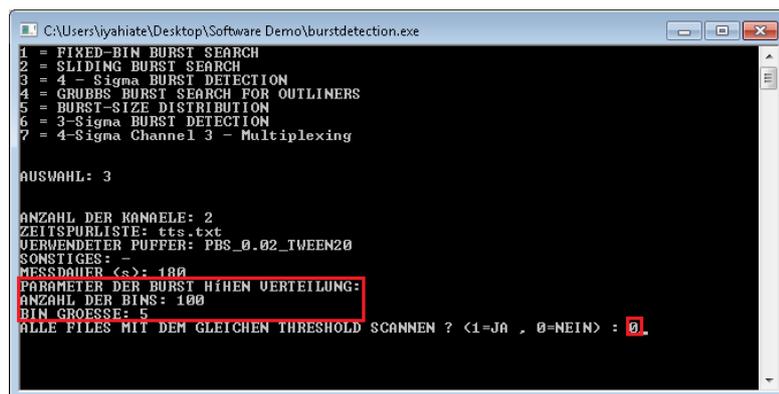


Abbildung 4: Eingabe der Pufferinformationen in der Software.

Im Laufe der Eingaben wird ein vollständiges Messprotokoll mit allen Wesentlichen Messparametern, wie der Anzahl der Kanäle, Puffer- und Leistungsangaben und Messdauer erstellt. Außerdem besitzt die Software ein Unterprogramm zur automatischen Histogrammierung der detektierten Einzelmolekülsignale zu

## 2 Bedienungsanleitung zur Verwendung der Auswertesoftware

einer Bursthöhenverteilung. Die letzte Eingabeoption beinhaltet die Möglichkeit alle Zeitpuren mit einem gemittelten Schwellwert zu durchsuchen (Abb. 5).



```
C:\Users\iyahiate\Desktop\Software Demo\burstdetection.exe
1 = FIXED-BIN BURST SEARCH
2 = SLIDING BURST SEARCH
3 = 4 - Sigma BURST DETECTION
4 = GRUBBS BURST SEARCH FOR OUTLINERS
5 = BURST-SIZE DISTRIBUTION
6 = 3-Sigma BURST DETECTION
7 = 4-Sigma Channel 3 - Multiplexing

AUSWAHL: 3

ANZAHL DER KANAELE: 2
ZEITSPURLISTE: tts.txt
VERWENDETER PUFFER: PBS_0.02_TWEEN20
SONSTIGES: -
MESSDAUER (<s>): 100
PARAMETER DER BURST HÖHEN VERTEILUNG:
ANZAHL DER BINS: 100
BIN GRÖSSE: 5
ALLE FILES MIT DEM GLEICHEN THRESHOLD SCANNEN ? <1=JA , 0=NEIN> : 0
```

Abbildung 5: Abgeschlossene Eingaben.

Nach Bestätigung der letzten Eingabe beginnt die Bursterkennung. Bei Mehrfarbenanwendungen wird immer eine Kovarianz- und Korrelationsmatrix berechnet und in der Datei “cov.dat” im selben Verzeichnis abgespeichert. Diese ist notwendig, um die Korrelationsmatrix-Methode, wie sie in Abschnitt 4.5.1 beschrieben ist, anzuwenden.

Möchte man zum Schluß noch eine Auswertung der Interkoinzidenz-Zeiten vornehmen muss man abermals im aktuellen Verzeichnis einen Batch-Befehl “dir \*timetonextcoincidence.txt /B >ttncs.txt” ausführen. Durch diesen Befehl wird eine Datei, die eine Liste mit “\*\_timetonextcoincidence.txt” Dateinamen erstellt, die die Interkoinzidenz-Zeiten der gleichnamigen Zeitspur enthält. In diesem Beispiel wurde sie mit “ttncs.txt” benannt. Die Software erstellt ein vollständiges Protokoll über die durchgeführte Messung wie es in Abbildung 6 dargestellt ist.

```

012_Atto565@1e-11_A647N@1e-11M_0p02pc_TWEEN.sm.Lms_red_green.tt.dat coincident_events_summary.txt - Editor
Datei Bearbeiten Format Ansicht ?
MESSDAUER (s): 1.60
KANÄLE: 2
ANZAHL DER KOINZIDENTEN EVENTS: 9
DETEKTIERTE BURSTS INSGESAMT: 2795
# EREIGNISSE - KANAL 1: 1505
MITTLERE BURSTINTENSITÄT FÜR KANAL 1: 64.0154
ANTEIL DER BURSTS AUF KANAL 1: 0.538462
MAX. INTENSITÄT KANAL1: 1531.139
# EREIGNISSE - KANAL 2: 1290
MITTLERE BURSTINTENSITÄT FÜR KANAL 2: 26.5004
ANTEIL DER BURSTS AUF KANAL 2: 0.461538
MAX. INTENSITÄT KANAL2: 65.0391
# EREIGNISSE - KANAL 3: 0
MITTLERE BURSTINTENSITÄT FÜR KANAL 3: nan
ANTEIL DER BURSTS AUF KANAL 3: 0
MAX. INTENSITÄT KANAL3: 0
ANTEIL KOINZIDENTER EREIGNISSE (CP)= 0.00644009
KOINZIDENZRATE (1/s) = 0.05
THRESHOLD FÜR KANAL1 : 45
THRESHOLD FÜR KANAL2 : 20
THRESHOLD FÜR KANAL3 : 0
HINTERGRUND KANAL 1: 8.82314
HINTERGRUND KANAL 2: 3.94031
HINTERGRUND KANAL 3: nan
SNR CHANNEL 1: 7.25539
SNR CHANNEL 2: 6.72546
SNR CHANNEL 3: nan
CPU - TIME FOR CALCULATION: 4867
PUFFERBEDINGUNGEN: PBS_0.02_TWEEN20
SONSTIGE ANGABEN: -

```

Abbildung 6: Fertiges Messprotokoll mit Auswertungsergebnissen.

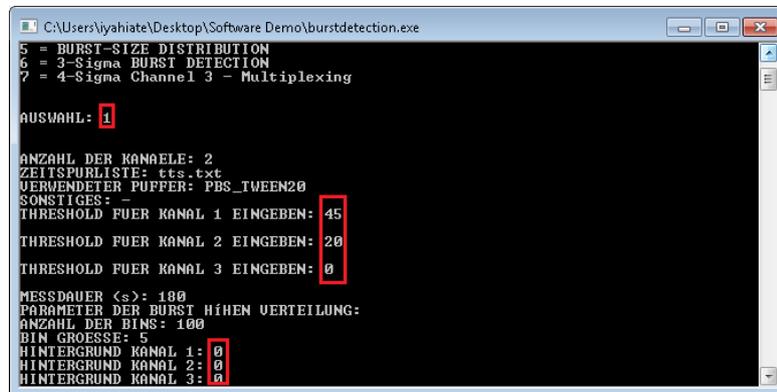
Insgesamt wird zu jeder Zeitspurdatei zusätzlich eine Reihe von Ergebnisdateien erstellt, wie Dateien, die jeden detektieren Burst und die dazugehörige Zeit enthält. Außerdem existiert dann zu jedem Kanal eine Bursthöhenverteilung mit der Endung “\*\_bsd.dat”.

Die  $3\sigma$ -Detektion kann analog durchgeführt werden.

## 2.2 Bursterkennung mit festem Schwellwert

Die Bursterkennung mit konstantem Schwellwert folgt dem selben Schema wie die  $4\sigma$ -Detektion des vorherigen Abschnitts. Hier können die Schwellwerte bei Anforderung für alle Kanäle manuell eingegeben werden. Bei dieser Erkennung wird zusätzlich noch das Hintergrundniveau der Messung erfragt (Abb. 7). Sind die Eingabewerte  $> 0$ , so werden diese zum bereits eingegebenen Schwellwert des jeweiligen Kanals hinzuaddiert. Sind weniger als zwei Kanäle verwendet worden, so können beliebige Werte für die nicht verwendeten Kanäle eingegeben werden.

## 2 Bedienungsanleitung zur Verwendung der Auswertesoftware



```
C:\Users\iyahiate\Desktop\Software Demo\burstdetection.exe
5 = BURST-SIZE DISTRIBUTION
6 = 3-Sigma BURST DETECTION
7 = 4-Sigma Channel 3 - Multiplexing

AUSWAHL: 1

ANZAHL DER KANAEL: 2
ZEITSPURLISTE: tts.txt
VERWENDETER PUFFER: PBS_TWEEN20
SONSTIGES: -
THRESHOLD FUER KANAL 1 EINGEBEN: 45
THRESHOLD FUER KANAL 2 EINGEBEN: 20
THRESHOLD FUER KANAL 3 EINGEBEN: 0

MESSDAUER (<s>): 100
PARAMETER DER BURST HINEN VERTEILUNG:
ANZAHL DER BINS: 100
BIN GROESSE: 5
HINTERGRUND KANAL 1: 0
HINTERGRUND KANAL 2: 0
HINTERGRUND KANAL 3: 0
```

**Abbildung 7:** Bursterkennung mit konstantem Schwellwert. Hier wurden nur zwei Kanäle verwendet.



# Vorträge und Publikationen

## Vorträge

- “Detection of pathogenic DNA at the Single-Molecule level”, SPIE Photonics West, San Francisco, Januar 2011
- Ausgewählter Vortrag beim Scietalk NRW unter dem Motto “Cutting-Edge Technologies in Molecular Life Sciences” in Münster mit dem Titel “Ultrasensitive and Rapid Single-Molecule, Two-Color Coincidence Detection of DNA Sequences with Molecular Beacons”

## Publikationen

Wesentliche Teile dieser Arbeit sind in den folgenden Werken publiziert.

- **Idir Yahiatène**, Tobias Klamp, Mark Schüttpelz, Markus Sauer; Detection of pathogenic DNA at the Single-Molecule level, Proc. SPIE, Vol.7905 (2011)
- Tobias Klamp, **Idir Yahiatène**, Mark Schüttpelz, Markus Sauer; A reliable and sensitive bead-based fluorescence assay for identification of nucleic acid sequences, Proc. SPIE, Vol. 7905 (2011)
- **Idir Yahiatène**, Sören Doose, Markus Sauer, Thomas Huser; Correlation-matrix analysis of two-color coincidence events in single-molecule fluorescence”, Anal. Chem., eingereicht

## **Wissenschaftlicher Preis**

- Mit 1000€ dotierter Nachwuchspreis der IHK Ostwestfalen zu Bielefeld, 2009, in der Kategorie “Molecular Sciences and Technology”.

# Danksagung

Im Folgenden möchte ich noch den Menschen danken, die geholfen haben diese Arbeit möglich zu machen.

- Mein größter Dank geht an Prof. Dr. Markus Sauer, der mir den Zutritt zur Welt der Einzelmolekülspektroskopie eröffnet und mir damals ohne zu zögern die Möglichkeit gegeben (und damit sein Vertrauen ausgesprochen) hat an diesem spannenden und hochaktuellen Thema in seiner Arbeitsgruppe zu arbeiten - vielen Dank Markus!
- Ein großer Dank gebührt Prof. Dr. Thomas Huser, der sich gerne zur Begutachtung dieser Arbeit bereiterklärt und mich herzlich in seinen Arbeitskreis "Biomolecular Photonics" aufgenommen hat. Auch für eine stets offene Tür und ein offenes Ohr möchte ich hier meinen herzlichen Dank ausdrücken!
- Bei Prof. Dr. Edwin Laermann und Prof. Dr. Andreas Hütten bedanke ich mich für die Zeit und die bereitwillige Zusage der Prüfung beizuwohnen.
- Vielen Dank an Dr. Gerd Wiebusch, der immer ein offenes Ohr für meine Fragen hatte und die technische Expertise, die er mir zuteil werden lies.
- Bei meinen Zimmerkollegen und Freunden Fabian Humpert und Simon Hennig möchte ich mich für die stets lustige und zugleich lehrreiche Zeit bedanken. Auch für die vielen Gespräche und so manche frustrierte Stunde im Labor, die wir zusammen durchgestanden haben möchte ich euch danken!
- Einen großen Dank auch an meinen Kollegen und Freund Tobias Klamp,

mit dem ich auch die ein oder andere Nacht, hoffend auf gute Ergebnisse, im Labor verbracht habe. Tobi, San Francisco werden wir nie vergessen!

- Auch meinen ehemaligen Kollegen Marc Löllmann und Ralf Brune seien hier für eine angenehme Arbeitsatmosphäre lobend erwähnt.
- Dr. Martina Lummer möchte ich für den ein oder anderen Crashkurs in Molekularbiologie danken.
- Nicht zuletzt möchte ich auch Dr. Sören Doose danken, der mir gerade in der Endphase der Arbeit eine große Hilfe war und mit dem ich mir gerne den Kopf über Einzelmolekülfragen zerbrochen habe - danke Sören!
- Reinhild Pätzmann sei an dieser Stelle für so manch aufmunterndes Wort, gerade in der heißen Phase, gedankt.
- Zu guter letzt möchte ich dem ganzen Arbeitskreis D3 (dem heutigen und insbesondere um Markus Sauer) für ein freundliches Miteinander danken.
- Ich danke meinen Eltern für den Zuspruch und den Rückhalt, den sie mir während der ganzen Zeit zuteil werden ließen.
- Auch meinen Brüdern möchte ich hier für alles danken! Sogar für jede Pokerrunde, die ich gegen euch verloren habe, die mich für einen Moment durchatmen lies!
- Danke Steffi - du warst immer für mich da!

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Idealisiertes Schema einer einfachen Fluoreszenzdetektion von Zielmolekülen mit Hilfe von Antikörpern in drei Schritten. An eine Oberfläche fixierte Antikörper “fangen” oder “fischen” das Zielmolekül aus der Lösung (z.B.) Blut (1&2). Im nächsten Schritt bindet ein weiterer, mit einem Fluorophor, markierter Antikörper gegen das gefangene Molekül. Nach einem Waschschritt, der ungebundene Detektionsantikörper entfernt, kann die Probe zur Fluoreszenz angeregt werden. Es emittieren nur diejenigen Moleküle, die auch einen Detektionsantikörper tragen.	5
1.2	Schema des distanzabhängigen Förster-Resonanz Energietransfer (FRET). Im Fall (1) wird keine Energie vom Donor (D) auf das Akzeptormolekül (A) übertragen. Es findet lediglich eine sogenannte Donor-Only Anregung statt. Im Fall (2) unterschreiten die Moleküle den Abstand von ca. $10\text{ nm}$ und die Energie kann stahlungslos vom Donor auf den Akzeptor übertragen werden. Die Emission des Donors reduziert sich dadurch. . . .	6
1.3	Schema einer zwei-Farben-Koinzidenzdetektion. Zwei spektral getrennte Kanäle registrieren von zwei Molekülspezies Einzelmolekülsignale. . . . .	7

2.1	Ein willkürlicher DNA-Doppelstrang mit rot markierten Wasserstoffbrückenbindungen und klar zu erkennendem Phosphatrückrad. (A) zeigt eine vollständige aus zwölf Basenpaaren bestehende DNA-Doppelhelix und (B) ist die Vergrößerung des mittleren Abschnitts. . . . .	12
2.2	Das Jablonski-Diagramm zur Beschreibung intramolekularer Übergänge (verändert übernommen aus [64]). Die mit $S_0$ , $S_1$ und $S_2$ bezeichneten dicken Linien stellen elektronische Zustände dar, wobei $S_0$ den elektronischen Grundzustand bezeichnet. Die darüberliegenden feineren Linien deuten vibronische Zustände des Moleküls im jeweiligen elektronischen Zustand an. Blaue Pfeile kennzeichnen hier immer Absorptionsprozesse. Grüne und rote jeweils die Emission. . . . .	15
2.3	Franck-Condon Prinzip. Entnommen aus [66]. . . . .	18
2.4	Fluoreszenzlöschung durch photoinduzierten Elektronentransfer. . . . .	22
3.1	Schema der verwendeten konfokalen zwei-Farben Einzelmolekülanlage. Zwei Laserlinien $638\text{ nm}$ und $532\text{ nm}$ werden über einen Strahlteiler überlagert und dann mittels Triple-Line dichroitischen Spiegel in ein Objektiv hoher Numerischer Apertur reflektiert. In der Detektion wird die Fluoreszenz wieder spektral geteilt und nach einer weiteren Filterung über ein Linsensystem, mit zwischengeschalteter Apertur (engl. Pinhole) eines Durchmessers von $100\text{ }\mu\text{m}$ , auf einzelphotonensensitive Detektoren abgebildet, die sich in der Brennebene der hinteren Linse befinden. . . . .	29
3.2	Für die Arbeit hauptsächlich verwendete Laser. (A) Coherent Laserdiode bei $\lambda_c = 638\text{ nm}$ und (B) Frequenzverdoppelter YAG-Laser emittierend bei $\lambda_c = 532\text{ nm}$ . . . . .	30
3.3	Die Galilei-Optik zur Kollimation der Strahlen. . . . .	30

---

3.4	Objektiv mit in eine Lösung fokussierte Laserstrahlen. (A) roter Spot (B) grüner Spot und (C) überlagerter Spot. . . . .	31
3.5	Detektionsarm in Aufsicht (A) und (B) mit angeschlossenen Detektoren. . . . .	32
3.6	Einzelphotonensensitiver Detektor (SPCM-AQR-15) von Perkin Elmer. . . . .	33
3.7	Lambda 25 UV/Vis Spektrometer . . . . .	34
3.8	Cary Eclipse Fluoreszenzspektrometer. . . . .	36
3.9	Schema einer Autokorrelationsfunktion mit allen Zeitskalen. Verändert entnommen aus [26]. . . . .	37
3.10	Einzelmolekülfluoreszenz-Zeitspur von Atto647N Molekülen einer Konzentration von $10^{-11} M$ bei einer Laserleistung von $\approx 500 \mu W$ in PBS bei $1 ms$ -Binning. . . . .	43
3.11	Einzelmoleküldetektion der ersten Sekunde der in Abb.3.10 gezeigten Messung mit markierten Einzelmolekülsignalen. . .	43
3.12	Mit der Software Mfold minimierte Sekundärstrukturen der beiden MBs bei Raumtemperatur unter PBS Bedingungen. Mit Atto647N funktionalisiertes Molekül (links) und mit Atto565 markiertes Molekül (rechts). . . . .	49
3.13	Der programmierbare Thermocycler zur Hybridisierung der Proben. . . . .	51
3.14	Die in der Mechanikwerkstatt gefertigte Mikrostruktur. (A) ist eine Gesamtübersicht und (B) zeigt die entsprechende technische Zeichnung mit allen Abmessungen. . . . .	52
3.15	Spritzenpumpe mit eingespannter Spritze. . . . .	53
3.16	Datenaufnahme mit der "Data Acquisition" (A) und die spätere Extraktion der aufgenommenen Fluoreszenztrajektorie in (B) mit "View Timetrace". . . . .	54

3.17	Aufbereitung der Rohdaten um entweder die Zeitspuren in einem bestimmten Binning zu extrahieren (B) oder um verschiedene Kanäle mit einander zu korrelieren (C).	55
4.1	Burstintensität als Funktion der Anregungsleistung.	58
4.2	Experimentell relevante Parameter als Funktion der Anregungsleistung (blau) der Hintergrund und (rot) der mittlere Schwellwert zur Bursterkennung.	59
4.3	Burstrate bei dynamischer Anpassung des Schwellwertes (A) bei Bursterkennung mit höchstem Schwellwert (B) und empirisch ermittelten Schwellwert (C).	61
4.4	Zwei-Farben Zeitspuren bei (A) roter (638nm) und (B) grüner (532nm) Anregung bei Anregungsleistungen von $\approx 600 \mu W$ und $\approx 550 \mu W$ . Die Zeitspuren zeigen eine Einzelmolekülmessung einer Mischprobe aus Atto647N und Atto565 bei äquimolarer Konzentration von $\approx 10^{-11} M$ .	63
4.5	Zwei-Farben Zeitspuren bei (A) rot-grüner und (B) rot-grünblauer Anregung. Die Zeitspuren zeigen eine Einzelmolekülmessung der Farbstoffmoleküle Atto647N und Atto565 bei äquimolarer Konzentration von $\approx 10^{-11} M$ . Die Laserleistungen betragen hier $\approx 600 \mu W$ im roten (638 nm), $\approx 550 \mu W$ im grünen (532 nm) und in (A) $\approx 600 \mu W$ im blauen (476 nm).	65
4.6	Signal zu Hintergrundverhältnis als Funktion der Eindringtiefe. Die Fehlerbalken stellen Standardabweichungen aus dreifachen Messungen dar.	67
4.7	Mittlere Transitzeit als Funktion der Eindringtiefe. Die Fehlerbalken stellen Standardabweichungen aus dreifachen Messungen dar.	68
4.8	Teilchenzahl als Funktion der Eindringtiefe. Die Fehlerbalken stellen Standardabweichungen aus dreifachen Messungen dar.	70

---

4.9	Burstrate als Funktion der Eindringtiefe. Die Fehlerbalken stellen Standardabweichungen aus dreifachen Messungen dar. . . . .	71
4.10	Schwellwert zur Bursterkennung als Funktion der Eindringtiefe. Die Fehlerbalken stellen Standardabweichungen aus dreifachen Messungen dar. . . . .	72
4.11	Zeitspuren für verschiedene Eindringtiefen (A) $15 \mu m$ (B) $65 \mu m$ (C) $105 \mu m$ . . . . .	72
4.12	FCS-Kapillarmessung von freiem Atto655 Farbstoff einer Konzentration von $\approx 10^{-10} M$ bei einer Anregungsleistung von $\approx 300 \mu W$ mit einer Vibration von etwa $20 Hz$ der Kapillare. . . . .	75
4.13	Ein Auflichtbild einer verstopften Mikrokapillare. Damit wird der Durchfluss der Probenlösung bis in die Spitze verhindert und die Kapillare unbrauchbar. . . . .	77
4.14	Freie Atto655 Moleküle in PBS einer Konzentration von $\sim 10^{-10} M$ bei einer Anregungsleistung von $\sim 650 \mu W$ in (links) offenem Volumen und (rechts) in einer Mikrokapillare mit einem Spitzeninnendurchmesser von $\sim 500 nm$ . . . . .	78
4.15	Transitzeit als Funktion des angelegten Drucks des von freien Atto655 Molekülen einer Konzentration von $\approx 10^{-10} M$ . . . . .	79
4.16	Die Anzahl der Einzelmolekülereignisse als Funktion des angelegten Drucks bei einer 5 Minuten Messung. Die Moleküle liegen in einer Konzentration von $\approx 10^{-11} M$ vor und werden mit einer Leistung von $\approx 500 \mu W$ angeregt. . . . .	80

4.17	Mittels FCS bestimmte mittlere Teilchenzahl als Funktion des Ortes entlang des Kanalquerschnitts, dicht ( $50 \mu m \leq x \leq 70 \mu m$ ) oberhalb der Oberfläche. Die Positionen $x$ sind im Abstand von $75 \mu m$ gewählt. Diese Daten wurden in dreifachen, 45-sekündigen Messungen bei einer Laserleistung von $\approx 1 mW$ und einer Farbstoffkonzentration von $[Atto655] \approx 10^{-10} M$ aufgenommen. Außerdem wurde ein konstanter Druck von $\approx 500 pa$ angelegt. . . . .	81
4.18	Eine Zweifarben-Zeitspur von Beads bei Anlegen von Druck ab der 20. Sekunde. Eine Lösung mit einer Konzentration von $\approx 10^{-14} M$ wird ab der 20. Sekunde durch den Mikrokanal gedrückt. Die Laserleistung beträgt hier $\approx 500 \mu W$ . . . . .	83
4.19	Nachweis der parabolischen Geschwindigkeitsverteilung im mikrofluidischen Kanal als Funktion des Ortes entlang des Kanalquerschnitts mit Hilfe von FCS Messungen. Bei einem Druck von $500 pa$ wird eine Lösung mit freien Farbstoffmolekülen einer Konzentration von $[Atto655] \approx 10^{-11} M$ und einer Anregungsleistung von $\approx 1 mW$ durch den Mikrokanal gedrückt und dabei die mittlere Flußgeschwindigkeit (A) und die mittlere Transitzeit (B) aus 4 Messungen ermittelt. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. . . . .	87
4.20	Flußgeschwindigkeit (A) und fokale Transitzeit (B) in Abhängigkeit des angelegten Drucks. Bei einer Anregungsleistung von $\approx 800 \mu W$ werden von einer $10^{-11} M$ Farbstofflösung mit freien Atto655 Molekülen bei verschiedenen Drücken FCS Daten aufgenommen. . . . .	90
4.21	SNR als Funktion des angelegten Drucks in einer 4-fachen, 30-Sekunden langen Einzelmolekülmessung. Die Fehlerbalken werden durch die Standardabweichung repräsentiert. . . . .	92

4.22	Gemessene Standardabweichungen (A) und daraus rekonstruierte (normierte) Verteilungen (B). In (B) sind die verschiedenen Drücke farblich kodiert und die Verteilung wird von lila bis schwarz (von außen nach innen) mit zunehmendem Druck schmaler. . . . .	94
4.23	Signal-Höhen-Verteilungen für 10hPa (A) 20hPa (B) 50hPa (C) und 100hPa (D) einer Einzelmoleküllösung mit einer Konzentration von $[Atto655] \approx 10^{-11} M$ bei einer 45-Sekunden Messung.	95
4.24	Verifizierung der laminaren Strömung durch Bestimmung der Reynoldszahlen. . . . .	96
4.25	FCS Autokorrelationsfunktionen aufgenommen bei drei verschiedenen Drücken 1000 Pa (schwarz), 2000 Pa (rot) und 5000 Pa (grün). Die Probenlösung enthält eine Einzelmolekülkonzentration von Atto655-Molekülen bei $\approx 10^{-11} M$ . Die Messreihe wurde bei einer Anregungsleistung von $\approx 1 mW$ durchgeführt. . . . .	99
4.26	Teilchenzahl als Funktion des Drucks extrahiert aus den Autokorrelationsfunktionen aus Abbildung4.25. . . . .	99
4.27	Zeitspuren für verschiedene Atto647N-Biotin Konzentrationen (A) $[Atto647N - Biotin] \approx 10^{-11} M$ (B) $[Atto647N - Biotin] \approx 10^{-12} M$ und (C) $[Atto647N - Biotin] \approx 10^{-13} M$ in offenem Volumen bei $\approx 500 \mu W$ . Die Beadkonzentration beträgt $\approx 5 \frac{\mu l}{ml}$ .	100
4.28	Die Anzahl der Einzelmolekülereignisse bei einer Messdauer von 120s und einer Anregungsleistung von $\sim 500 \mu W$ . . . . .	101
4.29	Exemplarische Zeitspuren von 45-Sekunden Messungen für mit Biotinfarbstoff (Atto647N) belegte Beads bei einer Farbstoffkonzentration von $10^{-12} M$ (A) und $10^{-15} M$ (B) und einer Anregungsleistung von $\approx 500 \mu W$ . . . . .	103

4.30	Das Verhältnis von roten Einzelmolekülsignalen zu grünen bei konstantem Schwellwert nach einer 180-Sekunden Messung als Funktion der über eine Größenordnung variierenden Atto565-Konzentration. Die Fehlerbalken sind Standardabweichungen aus drei Messungen. . . . .	105
4.31	Fehler (in rot) vor-und nach (in schwarz) der Normmierung auf die Quantenausbeute der beiden Farbstoffe. Die Fehlerbalken sind Standardabweichungen aus drei 3-Minuten Messungen. .	106
4.32	Verhältnis zwischen roten und grünen Einzelmolekülsignalen nach Korrektur auf die Quantenausbeute. Die Fehlerbalken sind Standardabweichungen aus drei 3-Minuten Messungen. . . . .	106
4.33	$\Gamma - Norm$ als Funktion der Abschnitten. . . . .	112
4.35	Simulierte Einzelmoleküldaten verschiedener Verhältnisse aus perfekten koinzidenten Ereignissen und einzelnen Ereignissen auf zwei Kanälen.(A) Einzelmolekülereignisse wurden in $10^5$ bins bei einer konstanten Konzentration von koinzidenten Ereignissen ( $L = 0, 2$ ) und verschiedenen Konzentrationen von einzelnen Bursts (gefüllte Quadrate) simuliert. Die Gesamtzahl von Ereignissen wurde bestimmt (offene Kreise). (B) Die berechnete $\Gamma - Norm$ für jedes $L$ als Mittelwert aus 100 Datensätzen und die Standardabweichung wird durch die Fehlerbalken repräsentiert. . . . .	112
4.34	Simulierte Einzelmoleküldaten auf zwei unabhängigen Kanälen. (A) Einzelne Bursts, simuliert in $10^5$ bins für verschiedene $L$ (Konzentrationen) (ausgefüllte Quadrate) und die Koinzidenzen wurden ermittelt (offene Kreise).(B) Die berechnete $\Gamma - Norm$ für verschiedene $L$ als Mittelwert aus 100 Datensätzen und die Standardabweichung stellt hier die Fehlerbalken dar. . . . .	113

- 
- 4.36 Gemessene Einzelmolekülzeitspuren für verschiedene Atto565-biotin Konzentrationen bei konstanter Atto647N Konzentration. Atto647N ist jeweils in rot und Atto565 ist in grün dargestellt. Die Anregungsleistung beider Laser in jeder Messung war konstant bei  $P \approx 1 \text{ mW}$ . Die Konzentration von Atto565 beträgt in (A)  $[\text{Atto565} - \text{biotin}] \approx 10^{-12} \text{ M}$  (B)  $[\text{Atto565} - \text{biotin}] \approx 3 \cdot 10^{-12} \text{ M}$  (C)  $[\text{Atto565} - \text{biotin}] \approx 7 \cdot 10^{-12} \text{ M}$  und in (D)  $[\text{Atto565} - \text{biotin}] \approx 10^{-11} \text{ M}$ . . . . . 115
- 4.37 Gemessene Einzelmolekülburstraten als Funktion der Atto565 Konzentration (A) und die  $\Gamma - \text{Norm}$  (B) als Funktion der Abschnitte. Die Pfeile im linken Graphen nehmen die Achsenzuweisung vor. Die rote, gepunktete Linie stellt den Mittelwert der Burstrate des roten Farbstoffes dar. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen aus drei Messungen zu je 180 Sekunden. Im rechten Bild sind die einzelnen Farbstoffkonzentrationen farblich in der Legende kodiert. . . . . 117
- 4.38 Verteilung der Interkoinzidenzzeiten bei einer statistischen Probe als Funktion der Konzentration. Die verschiedenen Atto565-Konzentrationen sind farblich kodiert. . . . . 118
- 4.39 Gemessene Einzelmoleküldaten von zwei getrennten Detektionskanälen für einen 20bp poly (A) - poly (T) DNA Duplex, doppelt gelabelt mit Atto647N und Atto565 in PBS. Die Proben wurden gleichzeitig von Lasern der Wellenlänge  $638 \text{ nm}$  und  $532 \text{ nm}$  bei Leistungen von  $600 \mu\text{W}$  und  $900 \mu\text{W}$  angeregt. Der Graph in (A) zeigt die Koinzidenzrate (schwarz), die Burstrate des roten Kanals (rot) und die Burstrate des grünen Kanals (grün) als Funktion der DNA Konzentration. Die Fehlerbalken stellen Standardabweichungen aus vier Messungen dar. Der Graph in (B) zeigt die  $\Gamma - \text{Norm}$  als Funktion der Abschnitte für verschiedene DNA Konzentrationen von  $10^{-12} \text{ M}$  bis  $10^{-10} \text{ M}$ . 120

4.40	Eine Sekunde einer repräsentativen Zwei-Farben Koinzidenzzeitspur mit doppelt markierter DNA bei einer Konzentration von $10^{-11} M$ . . . . .	121
4.41	Zweifارben Zeitspur zeigt ein zeitlich breites, diffusionsabhängiges Fluoreszenzsignal der Beads (A) was durch FCS-Daten (B) bestätigt wird. Der vergrößerte Ausschnitt in (A) zeigt das Fluoreszenzsignal eines durch den Fokus diffundierenden Beads.	122
4.42	Einzelmoleküldaten, gemessen auf zwei spektral getrennten Kanälen für $2,8 \mu m$ M280 Beads, die bei einer Konzentration von $\approx 10^{-14} M$ durch einen Mikrokanal fließen. Die Proben werden gleichzeitig bei $638 nm$ und $532 nm$ mit Anregungsleistungen von $\approx 630 \mu W$ angeregt. (A) zeigt die gemessene Koinzidenzrate als Funktion der Flußgeschwindigkeit (oder Volumenstrom), um künstlich die apparente Konzentration zu erhöhen. Die Fehlerbalken zeigen Standardabweichungen aus drei Messungen. (B) Berechnete $\Gamma - Norm$ als Funktion der Abschnitte und für verschiedene Flußraten von $0 \frac{ml}{h}$ bis $40 \frac{ml}{h}$ .	123
4.43	Koinzidenzwahrscheinlichkeit als Funktion der Flußrate für eine $\approx 10^{-14} M$ Lösung von M280 Beads. . . . .	124
4.44	Verteilungen der Interkoinzidenzzeiten (IKZ) für verschiedene Flußraten. . . . .	125
4.45	Ausschnitte von Fluoreszenzzeitspuren vom M280-Beads im mikrofluidischen Kanal bei (A) $0 \frac{ml}{h}$ und (B) $40 \frac{ml}{h}$ . Die Anregungsleistung beträgt $\approx 600 \mu W$ bei $532 nm$ und $638 nm$ . Das Binning der Photonendaten beträgt $1 ms$ . . . . .	126

- 
- 4.46 Repräsentative Emissionsspektren der beiden Molecular Beacons einer Konzentration von  $\approx 10^{-5} M$  ohne Gegensequenz (gestrichelte Linien) und mit äquimolarer Konzentration der Gegensequenz (durchgezogene Linie). Die wurden jeweils mit Licht der Wellenlängen angeregt, das auch in den Einzelmolekülexperimenten verwendet wurde ( $532 nm$  und  $638 nm$ ). . . . 128
- 4.47 Repräsentative Schmelzkurven der Hairpins in PBS für das grün markierte und für das rot markierte. Die Heiz- und Abkühlraten betragen jeweils  $1 \frac{^{\circ}C}{min}$ . Beide Graphen zeigen, jeweils farblich kodiert, sowohl den Aufheiz- als auch den Abkühlvorgang mit (A,B) und ohne Gegensequenz (C,D). . . . . 129
- 4.48 Der relative Signalanstieg (A) und die Schmelztemperatur (B) als Funktion der *NaCl*-Konzentration bei  $10^{-6} M$  Konzentration der MBs und einer zehnfach höheren Konzentration der Zielsequenz. . . . . 131
- 4.49 Bestimmung der Dissoziationskonstanten (A) für das rot markierte und (B) für das grün markierte Hairpin mit FCS. Die MB Konzentration wird bei  $10^{-9} M$  fixiert und die Konzentration der Gegensequenz wird von  $1 \mu M$  ( $10^{-6} M$ ) bis  $1 pM$  ( $10^{-12} M$ ) titriert. Die beiden Proben wurden jeweils mit einer Leistung von  $\approx 500 \mu W$  bei den entsprechenden Laserwellenlängen von  $532 nm$  für *Atto565* und  $638 nm$  für *Atto647N* angeregt. Die Fehlerbalken stellen Standardabweichungen aus fünf Messungen dar. Die fünfminütigen Messungen wurden in PBS mit zusätzlichen  $800 mM NaCl$  bei Raumtemperatur nach einer ebenfalls bei Raumtemperatur stattfindenden zweistündigen Hybridisierung durchgeführt. . . . . 133

- 4.50 Bestimmung der Dissoziationskonstanten (A) für das rot markierte und (B) für das grün markierte Hairpin mittels Einzelmoleküldetektion. Die MB Konzentration wird bei  $10^{-9} M$  fixiert und die Konzentration der Gegensequenz wird von  $1 \mu M$  ( $10^{-6} M$ ) bis  $1 pM$  ( $10^{-12} M$ ) titriert. Die beiden Proben wurden jeweils mit einer Leistung von  $\approx 500 \mu W$  bei den entsprechenden Laserwellenlängen von  $532 nm$  für *Atto565* und  $638 nm$  für *Atto647N* angeregt. Die Fehlerbalken stellen Standardabweichungen aus fünf Messungen dar. Die fünfminütigen Messungen wurden in PBS mit zusätzlichen  $800 mM NaCl$  bei Raumtemperatur nach einer ebenfalls bei Raumtemperatur stattfindenden zweistündigen Hybridisierung durchgeführt. . . . . 135
- 4.51 Das “Smart-Probe” - Konzept. Die freien, unterschiedlich markierten Hairpins (A) binden durch einen Hybridisierungsschritt an die freie Zielsequenz (B) und formieren einen zweifach markierten Komplex (C), der mittels Koinzidenzdetektion in Lösung nachweisbar ist. . . . . 136
- 4.52 Zehn-Sekunden Ausschnitte der Fluoreszenzzeitspuren zeigen das Signal für eine Probe ohne Gegensequenz (A) und eine Probe mit einer Konzentration von  $10^{-10} M$  der Gegensequenz. Die Anregungsleistungen der roten ( $638nm$ ) und grünen ( $532nm$ ) Linie betragen jeweils  $\approx 350 \mu W$ . Als Binning wurde  $1 ms$  gewählt. 137

4.53	Burstrate in Abhängigkeit von der Targetkonzentration, aufgenommen auf zwei getrennten Kanälen für eine Probe bestehend aus der 100-Basen synthetischer Einzelstrang DNA als Zielsequenz und zwei gelöschten haarnadelförmigen Oligonukleotiden, die an zwei unterschiedlichen Regionen an das selbe Zielmolekül hybridisieren. Die Proben wurden simultan bei $638\text{ nm}$ und $532\text{ nm}$ mit Leistungen von $\approx 550\ \mu\text{W}$ und $\approx 900\ \mu\text{W}$ angeregt. Die auf dem roten und grünen Kanal detektierten Bursraten als Funktion der Konzentration der Gegensequenz sind in (A) entsprechend farblich gekennzeichnet. Die Pfeile markieren die korrespondierenden Achsen. Die Fehlerbalken stellen Standardabweichungen von dreifachen Messungen dar. In (B) wurde $\Gamma - Norm$ als Funktion der Abschnitte für verschiedene Konzentrationen der Zielsequenz berechnet. . . . .	138
4.54	Fluoreszenzzeitspuren einer 30-Sekunden Messung in einem mikrofluidischen Kanal bei einem Druck von $20\text{ hPa}$ zeigen das Signal für eine Probe ohne Gegensequenz (A) und eine Probe mit einer Konzentration von $10^{-10}\text{ M}$ der Gegensequenz. . . .	139
4.55	Burstrate aller Ereignisse (A) und der koinzidenten Ereignisse (B) jeweils als Funktion der Konzentration der Gegensequenz. .	141
1	Format der ASCII-Zeitspuren. . . . .	150
2	Repräsentative Zeitspurliste mit zu prozessierenden Dateinamen.	151
3	Programm - Hauptmenü. . . . .	152
4	Eingabe der Pufferinformationen in der Software. . . . .	152
5	Abgeschlossene Eingaben. . . . .	153
6	Fertiges Messprotokoll mit Auswertungsergebnissen. . . . .	154
7	Bursterkennung mit konstantem Schwellwert. Hier wurden nur zwei Kanäle verwendet. . . . .	155



## Literaturverzeichnis

- [1] V. D. Badwaik, J. J. Bartonojo, J. W. Evans, S. V. Sahi, C. B. Willis, and R. Dakshinamurthy, "Single-step biofriendly synthesis of surface modifiable, near-spherical gold nanoparticles for applications in biological detection and catalysis.," *Langmuir* **27**, pp. 5549–5554, May 2011.
- [2] V. J. Bailey, C. M. Puleo, Y. P. Ho, H. C. Yeh, and T. H. Wang, "Quantum dots in molecular detection of disease.," *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* **2009**, pp. 4089–4092, 2009.
- [3] Z.-S. Wu, J.-H. Jiang, L. Fu, G.-L. Shen, and R.-Q. Yu, "Optical detection of dna hybridization based on fluorescence quenching of tagged oligonucleotide probes by gold nanoparticles.," *Anal Biochem* **353**, pp. 22–29, Jun 2006.
- [4] P. Tinnefeld and M. Sauer, "Neue wege in der einzelmolekül-fluoreszenzspektroskopie: Herausforderungen für die chemie und einfluss auf die biologische," *Angewandte Chemie* **117**(18), pp. 2698–2728, 2005.
- [5] M. Sauer, D. Graham, and P. Tinnefeld, "Advanced markers and labels for life science and biomedical applications.," *J Biophotonics* **4**, pp. 375–376, Jun 2011.
- [6] S. Weiss, "Fluorescence spectroscopy of single biomolecules," *Science* **283**(5408), pp. 1676–1683, 1999.
- [7] P. Haas, "Fast quantitative single-molecule detection at ultralow concentrations," *Anal. Chem.* **82**, p. 6299–6302, 2010.
- [8] L. N. H. Y. C. J. D. Müller, "Dual-color photon counting histogram analy-

- sis of mrfp1 and egfp in living cells,” *Biophysical Journal* **91**, p. 4273–4284, 2006.
- [9] T. Förster, “Zwischenmolekulare energiewanderung und fluoreszenz,” *Annalen der Physik* **437**, pp. 55–75, 1948.
- [10] S. Doose, M. Heilemann, X. Michalet, S. Weiss, and A. N. Kapanidis, “Periodic acceptor excitation spectroscopy of single molecules,” *Eur Biophys J* **36**, pp. 669–674, Jul 2007.
- [11] M. B. Borgia, A. Borgia, R. B. Best, A. Steward, D. Nettels, B. Wunderlich, B. Schuler, and J. Clarke, “Single-molecule fluorescence reveals sequence-specific misfolding in multidomain proteins,” *Nature* **474**, pp. 662–665, Jun 2011.
- [12] M. Heilemann, L. C. Hwang, K. Lympereopoulos, and A. N. Kapanidis, “Single-molecule fret analysis of protein-dna complexes,” *Methods Mol Biol* **543**, pp. 503–521, 2009.
- [13] J. Mukhopadhyay, V. Mekler, E. Kortkhonjia, A. N. Kapanidis, Y. W. Ebricht, and R. H. Ebricht, “Fluorescence resonance energy transfer (fret) in analysis of transcription-complex structure and function,” *Methods Enzymol* **371**, pp. 144–159, 2003.
- [14] I. H. Stein, C. Steinhauer, and P. Tinnefeld, “Single-molecule four-color fret visualizes energy-transfer paths on dna origami,” *J Am Chem Soc* **133**, pp. 4193–4195, Mar 2011.
- [15] C. Eggeling, J. Widengren, L. Brand, J. Schaffer, S. Felekyan, and C. A. M. Seidel, “Analysis of photobleaching in single-molecule multicolor excitation and förster resonance energy transfer measurements,” *J Phys Chem A* **110**, pp. 2979–2995, Mar 2006.
- [16] R. T. Ranasinghe and T. Brown, “Ultrasensitive fluorescence-based methods for nucleic acid detection: towards amplification-free genetic analysis,” *Chemical Communications* **47**, pp. 3717–3735, 2011.
- [17] N. K. Lee, A. N. Kapanidis, Y. Wang, X. Michalet, J. Mukhopadhyay,

- R. H. Ebright, and S. Weiss, "Accurate fret measurements within single diffusing biomolecules using alternating-laser excitation.," *Biophys J* **88**, pp. 2939–2953, Apr 2005.
- [18] N. K. Lee, A. N. Kapanidis, H. R. Koh, Y. Korlann, S. O. Ho, Y. Kim, N. Gassman, S. K. Kim, and S. Weiss, "Three-color alternating-laser excitation of single molecules: monitoring multiple interactions and distances.," *Biophys J* **92**, pp. 303–312, Jan 2007.
- [19] S. Doose, "A close look at fluorescence quenching of organic dyes by tryptophan," *ChemPhysChem* **6**, pp. 2277–85, 2005.
- [20] S. Doose, "Polymer properties of polythymine as revealed by translational diffusion," *Biophysical journal* **93**, p. 1224–1234, August 2007.
- [21] S. Doose, "Importance of backbone and solvent properties for conformational dynamics in polypeptides," *ChemPhysChem* **9**, p. 2687–2689, 2008.
- [22] H. Neuweiler, "Dynamics of unfolded polypeptide chains in crowded environment studied by fluorescence correlation spectroscopy," *J. Mol. Biol.* **365**, p. 856–869, 2007.
- [23] T. Wohland, "The standard deviation in fluorescence correlation spectroscopy," *Biophysical Journal* **80**, pp. 2987–2999, 2001.
- [24] Z. Petrásek, J. Ries, and P. Schwille, "Scanning fcs for the characterization of protein dynamics in live cells.," *Methods Enzymol* **472**, pp. 317–343, 2010.
- [25] A. J. García-Sáez and P. Schwille, "Fluorescence correlation spectroscopy for the study of membrane dynamics and protein/lipid interactions.," *Methods* **46**, pp. 116–122, Oct 2008.
- [26] P. Schwille, "Fluorescence correlation spectroscopy an introduction to its concepts and applications," *Biophysics Textbook Online* -, pp. –, 2004.
- [27] D. T., *Two-Focus Fluorescence Correlation Spectroscopy*. PhD thesis, University of Göttingen, 2007.

- [28] J. R. Fries, "Quantitative identification of different single molecules by selective time-resolved confocal fluorescence spectroscopy," *J. Phys. Chem.* **102**, p. 6601-6613, 1998.
- [29] K. Hassler, "Total internal reflection fluorescence correlation spectroscopy (tir-fcs) with low background and high count-rate per molecule," *OPTICS EXPRESS* **13**, pp. 7415-7423, 2005.
- [30] C. Wu, B. Bull, C. Szymanski, K. Christensen, and J. McNeill, "Multicolor conjugated polymer dots for biological fluorescence imaging," *ACS Nano* **2**, pp. 2415-2423, Nov 2008.
- [31] J. Ross, P. Buschkamp, D. Fetting, A. Donnermeyer, C. M. Roth, and P. Tinnefeld, "Multicolor single-molecule spectroscopy with alternating laser excitation for the investigation of interactions and dynamics," *J Phys Chem B* **111**, pp. 321-326, Jan 2007.
- [32] B. Person, I. H. Stein, C. Steinhauer, J. Vogelsang, and P. Tinnefeld, "Correlated movement and bending of nucleic acid structures visualized by multicolor single-molecule spectroscopy," *Chemphyschem* **10**, pp. 1455-1460, Jul 2009.
- [33] J. Widengren, "Single-molecule detection and identification of multiple species by multiparameter fluorescence detection," *Analytical Chemistry* **78**, p. 2039-2050, 2006.
- [34] C.-Y. Zhang and L. W. Johnson, "Homogenous rapid detection of nucleic acids using two-color quantum dots," *Analyst* **131**, pp. 484-488, Apr 2006.
- [35] A. Orte, R. Clarke, S. Balasubramanian, and D. Klenerman, "Determination of the fraction and stoichiometry of femtomolar levels of biomolecular complexes in an excess of monomer using single-molecule, two-color coincidence detection," *Anal Chem* **78**, pp. 7707-7715, Nov 2006.
- [36] J. L. McKillip and M. Drake, "Molecular beacon polymerase chain reaction

- detection of escherichia coli o157:h7 in milk.," *J Food Prot* **63**, pp. 855–859, Jul 2000.
- [37] A. Chua, C. Y. Yean, M. Ravichandran, B. Lim, and P. Lalitha, "A rapid dna biosensor for the molecular diagnosis of infectious disease.," *Biosens Bioelectron* **9**, p. 3825–3831, Mar 2011.
- [38] S. Sandhya, W. Chen, and A. Mulchandani, "Molecular beacons: a real-time polymerase chain reaction assay for detecting escherichia coli from fresh produce and water.," *Anal Chim Acta* **614**, pp. 208–212, May 2008.
- [39] R. C. van Schie, S. A. Marras, J. M. Conroy, N. J. Nowak, J. J. Catanese, and P. J. de Jong, "Semiautomated clone verification by real-time pcr using molecular beacons.," *Biotechniques* **29**, pp. 1296–300, 1302–4, 1306 passim, Dec 2000.
- [40] A. Agrawal, C. Zhang, T. Byassee, R. A. Tripp, and S. Nie, "Counting single native biomolecules and intact viruses with color-coded nanoparticles.," *Anal Chem* **78**, pp. 1061–1070, Feb 2006.
- [41] M. Foquet, "Focal volume confinement by submicrometer-sized fluidic channels," *Anal. Chem.* **76**, pp. 1618–26, 2004.
- [42] J. Jung, L. Chen, S. Lee, S. Kim, G. H. Seong, J. Choo, E. K. Lee, C.-H. Oh, and S. Lee, "Fast and sensitive dna analysis using changes in the fret signals of molecular beacons in a pdms microfluidic channel.," *Anal Bioanal Chem* **387**, pp. 2609–2615, Apr 2007.
- [43] R. Dylla-Spears, "Single-molecule sequence detection via microfluidic planar extensional flow at a stagnation point," *Lab on a Chip* **10**, pp. 1543–1549, 2010.
- [44] S. M. Stavis, "Single molecule studies of quantum dot conjugates in a submicrometer fluidic channel," *Lab on a Chip* **5**, pp. 337–43, 2005.
- [45] T.-H. Wang, Y. Peng, C. Zhang, P. K. Wong, and C.-M. Ho, "Single-molecule tracing on a fluidic microchip for quantitative detection of

- low-abundance nucleic acids.," *J Am Chem Soc* **127**, pp. 5354–5359, Apr 2005.
- [46] H.-C. Yeh, S.-Y. Chao, Y.-P. Ho, and T.-H. Wang, "Single-molecule detection and probe strategies for rapid and ultrasensitive genomic detection.," *Curr Pharm Biotechnol* **6**, pp. 453–461, Dec 2005.
- [47] A. J. Machen, "Characterization of gold nanoparticles functionalized with thiolated single-stranded dna," *Biological Applications* -, pp. -, 2009.
- [48] E. Dulkeith, "Fluorescence quenching of dye molecules near gold nanoparticles: Radiative and nonradiative effects," *Physical Rev. Letters* **89**, p. 203002, 2002.
- [49] Z. Liang, "A centrifugation-based method for preparation of gold nanoparticles and its application in biodetection," *International Journal of Molecular Sciences* **8**, pp. 526–532, 2007.
- [50] J. Stehr, *Nano-Heizplatten: Optothermisches DNA-Schmelzen mit Gold-Nanopartikeln*. PhD thesis, Ludwig-Maximilians-Universität München, September 2008.
- [51] W. Zhao, "Rapid synthesis of dna-functionalized gold nanoparticles in salt solution using mononucleotide-mediated conjugation," *Bioconjugate Chemistry* **20**, p. 1218–1222, 2009.
- [52] K. Abravaya, J. Huff, R. Marshall, B. Merchant, C. Mullen, G. Schneider, and J. Robinson, "Molecular beacons as diagnostic tools: technology and applications.," *Clin Chem Lab Med* **41**, pp. 468–474, Apr 2003.
- [53] B. Dummitt and Y.-H. Chang, "Molecular beacons for dna binding proteins: an emerging technology for detection of dna binding proteins and their ligands.," *Assay Drug Dev Technol* **4**, pp. 343–349, Jun 2006.
- [54] A. G. Frutos, S. Pal, M. Quesada, and J. Lahiri, "Method for detection of single-base mismatches using bimolecular beacons.," *J Am Chem Soc* **124**, pp. 2396–2397, Mar 2002.
- [55] B. A. Giesendorf, J. A. Vet, S. Tyagi, E. J. Mensink, F. J. Trijbels,

- and H. J. Blom, "Molecular beacons: a new approach for semiautomated mutation analysis.," *Clin Chem* **44**, pp. 482–486, Mar 1998.
- [56] L. J. Kricka, "Stains, labels and detection strategies for nucleic acids assays.," *Ann Clin Biochem* **39**, pp. 114–129, Mar 2002.
- [57] H. Kuhn, V. V. Demidov, J. M. Coull, M. J. Fiandaca, B. D. Gildea, and M. D. Frank-Kamenetskii, "Hybridization of dna and pna molecular beacons to single-stranded and double-stranded dna targets.," *J Am Chem Soc* **124**, pp. 1097–1103, Feb 2002.
- [58] Y. Li, X. Zhou, and D. Ye, "Molecular beacons: an optimal multifunctional biological probe.," *Biochem Biophys Res Commun* **373**, pp. 457–461, Sep 2008.
- [59] J. J. Li, Y. Chu, B. Y.-H. Lee, and X. S. Xie, "Enzymatic signal amplification of molecular beacons for sensitive dna detection.," *Nucleic Acids Res* **36**, p. e36, Apr 2008.
- [60] X. Liu, W. Farmerie, S. Schuster, and W. Tan, "Molecular beacons for dna biosensors with micrometer to submicrometer dimensions.," *Anal Biochem* **283**, pp. 56–63, Jul 2000.
- [61] A. A. Martí, S. Jockusch, N. Stevens, J. Ju, and N. J. Turro, "Fluorescent hybridization probes for sensitive and selective dna and rna detection.," *Acc Chem Res* **40**, pp. 402–409, Jun 2007.
- [62] C.-Y. Zhang and K. Yang, "Accurate detection of on-state quantum dot and biomolecules in a microfluidic flow with single-molecule two-color coincidence detection.," *Anal Bioanal Chem* **397**, pp. 703–708, May 2010.
- [63] K. Munk, *Grundstudium Biologie - Genetik*, Spektrum - Akademischer Verlag, 2001.
- [64] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, vol. 3, Springer, 2006.
- [65] W. Finkelnburg, *Einführung in die Atomphysik*, vol. 11/12, Springer Verlag, 1967.

- [66] R. Winter/F.Noll, *Methoden der Biophysikalischen Chemie*, Teubner Studienbücher, 1998.
- [67] D. Meschede, *Gerthsen Physik*, vol. 21, Springer, 2001.
- [68] D. Magde, E. L. Elson, and W. W. Webb, "Fluorescence correlation spectroscopy. ii. an experimental realization.," *Biopolymers* **13**, pp. 29–61, Jan 1974.
- [69] D. Magde, "Concentration correlation analysis and chemical kinetics.," *Mol Biol Biochem Biophys* **24**, pp. 43–83, 1977.
- [70] O. Krichevsky, "Fluorescence correlation spectroscopy: the technique and its applications," *Rep. Prog. Phys* **65**, p. 251?297, 2001.
- [71] C. Eggeling, S. Berger, L. Brand, J. R. Fries, J. Schaffer, A. Volkmer, and C. A. Seidel, "Data registration and selective single-molecule analysis using multi-parameter fluorescence detection.," *J Biotechnol* **86**, pp. 163–180, Apr 2001.
- [72] J. Enderlein, "Statistics of single-molecule detection," *J. Phys. Chem. B* **101**(101), p. 3626?3632, 1997.
- [73] H. He, C. Xie, and J. Ren, "Nonbleaching fluorescence of gold nanoparticles and its applications in cancer cell imaging.," *Anal Chem* **80**, pp. 5951–5957, Aug 2008.
- [74] J. Vogelsang, "Single-molecule fluorescence resonance energy transfer in nanopipets: Improving distance resolution and concentration range," *Analytical Chemistry A* **79**, p. 7367?7375, 2007.
- [75] J. Ries, "Studying slow membrane dynamics with continuous wave scanning fluorescence correlation spectroscopy," *Biophysical Journal* **91**, p. 1915?1924, 2006.
- [76] W. B. H. S. F. Pedrotti, L.Pedrotti, *Optik für Ingenieure*, vol. 4, Spr, 2008.
- [77] Atto-Tec, "Produkte." online, January 2012.

- 
- [78] M. Sauer, "Single-molecule-sensitive fluorescent sensors based on photo-induced intramolecular charge transfer.," *Angew Chem Int Ed Engl* **42**, pp. 1790–1793, Apr 2003.
- [79] N. C. Cady, A. D. Strickland, and C. A. Batt, "Optimized linkage and quenching strategies for quantum dot molecular beacons.," *Mol Cell Probes* **21**, pp. 116–124, Apr 2007.
- [80] N. C. Cady, "Quantum dot molecular beacons for dna detection.," *Methods Mol Biol* **544**, pp. 367–379, 2009.
- [81] H. Du, "Hybridization-based unquenching of dna hairpins on au surfaces: Prototypical ?molecular beacon? biosensors," *JACS* **125**, pp. 4012–3, 2003.
- [82] X. Zuo, X. Yang, K. Wang, W. Tan, and J. Wen, "A novel sandwich assay with molecular beacon as report probe for nucleic acids detection on one-dimensional microfluidic beads array.," *Anal Chim Acta* **587**, pp. 9–13, Mar 2007.
- [83] K. Wang, Z. Tang, C. J. Yang, Y. Kim, X. Fang, W. Li, Y. Wu, C. D. Medley, Z. Cao, J. Li, P. Colon, H. Lin, and W. Tan, "Molecular engineering of dna: molecular beacons.," *Angew Chem Int Ed Engl* **48**(5), pp. 856–870, 2009.
- [84] Y. Fei, X.-Y. Jin, Z.-S. Wu, S.-B. Zhang, G. Shen, and R.-Q. Yu, "Sensitive and selective dna detection based on the combination of hairpin-type probe with endonuclease/gnp signal amplification using quartz-crystal-microbalance transduction.," *Anal Chim Acta* **691**, pp. 95–102, Apr 2011.
- [85] H.-C. Yeh, Y.-P. Ho, and T.-H. Wang, "Quantum dot-mediated biosensing assays for specific nucleic acid detection.," *Nanomedicine* **1**, pp. 115–121, Jun 2005.
- [86] L. Dyadyusha, "Quenching of cdse quantum dot emission, a new approach for biosensing," *ChemComm* **25**, pp. 3201–3203, 2005.
- [87] D. Horejsh, F. Martini, and M. R. Capobianchi, "Beadcons: detection of

- nucleic acid sequences by flow cytometry.," *Curr Protoc Cytom* **Chapter 13**, p. Unit13.5, Nov 2005.
- [88] P. V. Riccelli, "Melting studies of dangling-ended dna hairpins: effects of end length, loop sequence and biotinylation of loop bases," *Nucleic Acids Research* **30**, pp. 4088–4093, 2002.
- [89] T. Antony and V. Subramaniam, "Molecular beacons: nucleic acid hybridization and emerging applications.," *J Biomol Struct Dyn* **19**, pp. 497–504, Dec 2001.
- [90] N. Dave and J. Liu, "Fast molecular beacon hybridization in organic solvents with improved target specificity.," *J Phys Chem B* **114**, p. 15694–15699, Nov 2010.
- [91] P. W. Stevens, M. R. Henry, and D. M. Kelso, "Dna hybridization on micro-particles: determining capture-probe density and equilibrium dissociation constants.," *Nucleic Acids Res* **27**, pp. 1719–1727, Apr 1999.
- [92] C. Puelo, "Microfluidic means of achieving attomolar detection limits with molecular beacon probes," *Lab on a Chip* **9**, pp. 1065–72, 2009.
- [93] I. Paul, "High throughput single molecule detection for monitoring biochemical reactions," *Analyst* **134**, pp. 97–106, 2009.
- [94] Y. Yin and X. S. Zhao, "Kinetics and dynamics of dna hybridization.," *Acc Chem Res* **44**, p. 1172–1181, Jun 2011.
- [95] S. A. Marras, F. R. Kramer, and S. Tyagi, "Multiplex detection of single-nucleotide variations using molecular beacons.," *Genet Anal* **14**, pp. 151–156, Feb 1999.
- [96] J. A. Vet, A. R. Majithia, S. A. Marras, S. Tyagi, S. Dube, B. J. Poiesz, and F. R. Kramer, "Multiplex detection of four pathogenic retroviruses using molecular beacons.," *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, pp. 6394–6399, May 1999.
- [97] S. Tyagi and F. R. Kramer, "Molecular beacons: Probes that fluoresce upon hybridization," *Nature Biotechnology* **14**, pp. –, 1995.

# Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und dabei keine weiteren als die hier bezeichneten Hilfsmittel verwendet habe.

---