

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der Ruprecht-Karls-Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Physiker Chong-Woo Park

aus Jeon Buk / Südkorea

Tag der mündlichen Prüfung: 16.5.2003

Laserspektroskopische Mehrfachdetektion
einzelner Moleküle
in
Submikrometerkanälen

Gutachter: Prof. Dr. Jürgen Wolfrum
Prof. Dr. Joachim Spatz

Zusammenfassung

Die Einzelmolekülspektroskopie hat sich seit der ersten erfolgreichen Detektion von einzelnen, fluoreszierenden Molekülen in Lösung durch Hirschfeld [Hirschfeld 1976] zu einer eigenständigen Disziplin innerhalb der Fluoreszenzspektroskopie entwickelt.

Im Gegensatz zu Ensemblemessungen, mit denen nur die durchschnittlichen Eigenschaften einer Probe bestimmt werden können, gewinnt man bei Einzelmolekülmessungen Informationen über die Eigenschaften einzelner Moleküle und deren Verteilungen und zeitlichen Fluktuationen, die sonst nicht zugänglich sind. Dies beruht auf der hohen Sensitivität und der betrachteten Zeitskala der Fluoreszenz, die sich typischerweise in der Größenordnung von Nanosekunden abspielt. Während dieser Zeit können in der Umgebung eine Reihe von molekularen Prozessen stattfinden, welche die Fluoreszenzeigenschaften wie Intensität, spektrale Verteilung, Polarisierung und Lebensdauer der angeregten Moleküle beeinflussen. Durch Mehrfachdetektion kann die Beobachtungszeit um mehrere Größenordnungen (Faktor 10^3 - 10^4) erweitert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit ist es erstmals gelungen, einen Fluoreszenzmikroskopaufbau mit zwei konfokalen Detektionseinheiten in Submikrometerkanälen unter Elektrophoresebedingungen zu realisieren. In Mikrokapillaren mit einem Innendurchmesser von 500 ± 200 nm können hiermit einzelne farbstoffmarkierte Analytmoleküle in variablen zeitlichen Abständen doppelt detektiert werden. Da der Innendurchmesser der Kapillare kleiner als der Durchmesser des konfokal beobachteten Laserfokus ($1 \mu\text{m}$) ist, werden alle Analytmoleküle, die sich in diesem Mikrokanal gerichtet bewegen, effizient doppelt nachgewiesen und aufgrund ihrer Fluoreszenzabklingdauer identifiziert. Die zwei Anregungs- bzw. Detektionseinheiten sind mit zueinander variablen Abständen (4 - $10 \mu\text{m}$) aufgebaut, was in elektrophoretischen Versuchen je nach angelegter Spannung variablen Zeitabständen von 5 - 300 ms entspricht.

Der Strahl eines kollimierten, gepulsten Diodenlasers mit einer Repetitionsrate von 64 MHz und der Wellenlänge 639 nm wird über eine Kombination aus Strahlteiler und Spiegel verdoppelt. Die beiden daraus resultierenden Strahlen werden über einen dichroitischen Strahlteiler in ein Mikroskopobjektiv eingekoppelt und in die Spitze einer Submikrometerkapillare fokussiert. Die beiden Fluoreszenzsignale werden über dasselbe Objektiv eingesammelt, in der Zwischenbildebene des Mikroskops durch einen kleinen

Spiegel separiert und mittels zweier Avalanche-Photodioden detektiert, vor denen eine Lochblende positioniert ist. Eine PC Plug-in-Karte zum zeitkorrelierten Einzelphotonen-Zählen registriert die Daten, aus denen mikroskopische und makroskopische Zeitinformationen gewonnen werden. Die zeitaufgelöste Detektion erfolgt in der Kapillare, kurz vor der Öffnung, so dass alle vorbeiwandernden Moleküle mit hoher Sicherheit detektiert werden. Bei negativ geladenen Analytmolekülen befindet sich die Platin-Anode im Glycerintropfen außerhalb und die Platin-Kathode innerhalb des Submikrometerkanals.

Die Doppeldetektion von einzelnen Molekülen in Mikrokanälen ist bisher von einigen Gruppen bis zu einem minimalen Kanaldurchmesser von 10 μm bei einem Abstand von 10 bis 25 μm zwischen den beiden Detektionsvolumina gezeigt worden [Brinkmeier 1999; LeCaptain 2002]. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels einer Hardware-Korrelatorkarte, die ausschließlich eine Kreuzkorrelationsanalyse durchführt. Dieses Analyseverfahren beruht darauf, dass die wechselseitige Beziehung zweier Detektionssignale aufgedeckt wird. Zwei ähnliche Detektionssignale liefern hohe Werte innerhalb der Kreuzkorrelationsfunktion, während niedrige Werte bei nicht korrespondierenden Signalen berechnet werden. Die errechnete Verteilung gibt die Wanderungsgeschwindigkeit der Analytmoleküle zwischen den beiden Detektionsvolumina wieder. Es zeigt sich jedoch, dass die Kreuzkorrelationsanalyse zu einer fehlerhaften Interpretation führt, wenn die Intensität der Bursts einzelner farbstoffmarkierter Analytmoleküle stark in Breite und Höhe variieren. Daher ist ein neues Auswerteverfahren entwickelt worden, das die Formen der Photonenschauer auf Breite und Höhe normiert. Die Ergebnisse belegen, dass die Hardware-basierte Kreuzkorrelation ohne Berücksichtigung der originalen Zeitspuren nicht vertrauenswürdig ist. Diese Aussage gilt umso stärker je geringer die Statistik ist, d. h. je kürzer die Messdauer ist. Die Normierung der Breiten und Höhen der Photonenschauer ist dagegen auch für kürzere Messungen geeignet und liefert darüber hinaus die quantitative Information über die Anzahl der Burstpaare. In Abbildung 1 ist der prinzipielle Unterschied zwischen einer Kreuzkorrelationsanalyse einer Doppeldetektionsmessung mit und ohne Normierung der Bursts auf Höhe und Breite dargestellt. Während die Analyse ohne Normierungen zu dem Resultat führt, dass fälschlicherweise zwei Komponenten mit unterschiedlichen Transitzeiten vorhanden sind (Abb. 1 a), wird bei einer Normierung der Photonenschauer das erwartete einzelne Maximum gefunden.

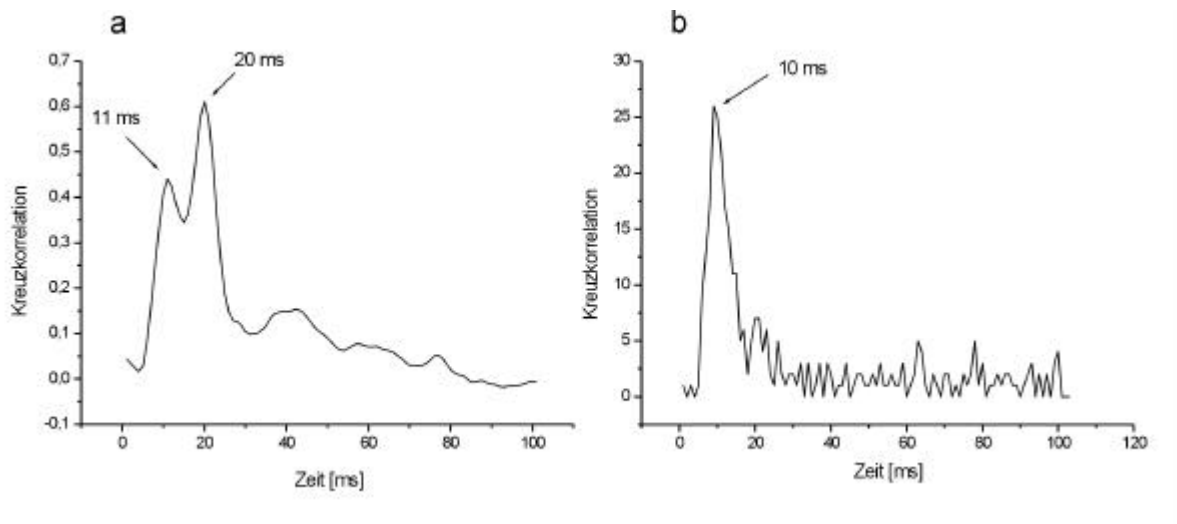


Abb.1 Kreuzkorrelationsfunktion einer Doppeldetektionsmessung a) ohne und b) mit Normierung der Photonenschauer auf Höhe und Breite. Ohne Berücksichtigung originaler Fluoreszenzzeit Spuren führt die Korrelationsanalyse zu falschen Ergebnissen.

Durch die außen angelegte Spannung werden die Molekülgeschwindigkeiten in der Kapillare gesteuert. Hierzu ist eine effiziente Unterdrückung des elektroosmotischen Flusses (EOF) unabdingbar. Der EOF und die unspezifische Adsorption der Analytmoleküle an die Kapillarwände werden durch den Einsatz von dynamischer und statischer Wandbelegungsverfahren unterdrückt. Es konnte gezeigt werden, dass durch Zugabe von Detergenzien eine effiziente dynamische Wandbeschichtung realisierbar ist. Darüber hinaus konnte ein Beschichtungsverfahren von Submikrometerkanälen, das eine statische Wandbeschichtung mit Polyethylenglykol ermöglicht, entwickelt werden. Messungen mit Fibronectin, das als Adhäsionsmolekül in der extrazellulären Matrix bekannt ist, belegen die wirksame Unterdrückung der Adsorption von Analytmolekülen an Glasoberflächen und sogar in Submikrometerkanälen. Dies zeigt, dass auch ultrasensitive Messungen mit biologisch relevanten Proben in Dimensionen von Submikrometern möglich sind. Gleichzeitig werden unerwünschte Wechselwirkungen mit Detergenzien vermieden und Messungen in wässriger Lösung ermöglicht. Durch die Möglichkeit, einzelne Analytmoleküle in statisch beschichteten Submikrometerkanälen zu untersuchen, werden neue biologische Anwendungen und Diagnostikverfahren erschlossen.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
2. Theoretische Grundlagen.....	5
2.1 Spektroskopische Grundlagen.....	5
2.1.1 Absorption.....	5
2.1.2 Emission.....	7
2.1.3 Fluoreszenzquantenausbeute	10
2.1.4 Fluoreszenzlebensdauer.....	10
2.1.5 Fluoreszenzlöschung	12
2.1.6 Dynamische und statische Löschung.....	13
2.2 Kapillarelektrophorese	15
2.2.1 Theoretische Grundlagen der Kapillarelektrophorese.....	18
2.2.2 Der elektroosmotische Fluss (EOF)	19
2.3 Wandbeschichtung – „Coating“	22
2.3.1 Eigenschaften von fused silica Oberflächen.....	23
2.3.2 Charakterisierung der Kapillarwandbeschichtung	23
2.3.3 Dynamische Wandbeschichtung	24
2.3.4 Statische Wandbeschichtung.....	24
2.4 Einzelmoleküldetektion.....	26
2.4.1 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie.....	27
2.4.2 Auflösung.....	28
2.4.3 Anregungsvolumen.....	29
2.4.4 Detektionsvolumen.....	32
2.4.5 Detektionseffizienz.....	33
2.5 Theoretische Grundlagen der Korrelationen.....	36
3. Materialien und Methoden.....	39
3.1 Farbstoffe.....	39
3.2 Polystyrolkugeln – „Beads“.....	42
3.3 Konfokaler Aufbau zur elektrophoretischen Einzelmoleküldetektion in	43
Mikrokapillaren	
3.4 Zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen.....	45

3.5 Femtopuffer	47
3.6 Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie	47
3.6.1 Autokorrelation.....	47
3.6.2 Kreuzkorrelation.....	51
3.6.3 Einfluss des Fluoreszenzsignals auf die Kreuzkorrelation.....	54
3.7 Beschichtung mit Polyethylenglykol (PEG)	59
3.8 Fibronectin.....	60
4. Experimente und Ergebnisse.....	61
4.1 Detektion und Identifizierung einzelner farbstoffmarkierter Analytmoleküle	61
in Mikrokapillaren	
4.2 Aufbau der Apparatur zur Doppeldetektion in Mikrokapillaren.....	65
4.3 Auswerteverfahren zur Doppeldetektion.....	73
4.3.1 „Gleitendes Fenster“	74
4.3.2 Höhennormierung der Photonenschauer	79
4.3.3. Höhen- und Breitenormierung	82
4.3.4 Histogramm der Transitzeiten.....	83
4.4 Doppeldetektion von Polystyrolkugeln in Mikrokapillaren.....	85
4.5 Doppeldetektion von farbstoffmarkierten Mononukleotiden in	100
Mikrokapillaren	
4.6 Glasbeschichtung mit Polyethylenglykol (PEG).....	107
4.6.1 Fibronectin auf der Oberfläche eines Deckglases	107
4.6.2 PEG-Beschichtung der Mikrokapillaren.....	113
4.6.3 Kapillarelektrophorese im submikrometergroßen Femtotip	115
4.6.4 Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie an der inneren	116
Glasoberfläche von Mikrokapillaren	
4.6.5 Adsorptionsmessungen innerhalb der Mikrokapillaren.....	117
5. Diskussion und Ausblick.....	127
6. Anhang.....	137
7. Literatur	140

1. Einleitung

In den letzten Jahren hat die Detektion und Spektroskopie von einzelnen Molekülen eine rasante Entwicklung durchlaufen. Im Gegensatz zu Ensemblemessungen, mit denen nur die durchschnittlichen Eigenschaften einer Probe bestimmt werden können, gewinnt man bei Einzelmolekülmessungen Informationen über die Eigenschaften einzelner Moleküle und damit über Verteilungen und zeitliche Fluktuationen, die sonst nicht zugänglich sind.

Besonders die Detektion von einzelnen, fluoreszierenden Molekülen in Lösung und bei Raumtemperatur hat seit der ersten erfolgreichen Detektion durch Hirschfeld im Jahre 1976 von einzelnen Globulin-Proteinen [Hirschfeld 1976], die mit mehreren Fluorophoren markiert waren, große Fortschritte gemacht.

Die Entwicklung der Einzelmoleküldetektion ist mittlerweile soweit fortgeschritten, dass mehrere Arbeitsgruppen die Detektion von einzelnen Molekülen mit einem Fluorophor, die einen fokussierten Laserstrahl passieren, erfolgreich etablieren konnten [Spera 1990; Soper 1992; Lee 1994; Li 1995; Goodwin 1996; Sauer 1998].

Die am weitesten verbreitete Technik zur Detektion einzelner Moleküle in Lösung ist die konfokale Fluoreszenzmikroskopie [Nie 1994; Nie 1995]. Eine Punkt zu Punkt Abbildung des Anregungs- und Detektionsfokus sorgt für ein exakt definiertes Detektionsvolumen, das typischerweise 10^{-15} l beträgt. Hierbei wird der Laserstrahl über ein Mikroskopobjektiv in das Innere einer Messlösung fokussiert und das Fluoreszenzsignal über dasselbe Mikroskopobjektiv eingesammelt. Streulicht wird räumlich durch eine Lochblende und spektral durch Filter vom Fluoreszenzlicht getrennt, bevor das Signal mit Hilfe einer Avalanche Photodiode detektiert wird. Dieser konfokale Aufbau erlaubt das Arbeiten mit Konzentrationen von 10^{-9} bis 10^{-12} M Lösungen.

Die Einzelmoleküldetektion in Lösung und bei Raumtemperatur ist kompliziert. Sie wird durch mehrere Faktoren beeinflusst: die umgebende Lösung und mögliche Verunreinigungen verursachen ein hohes Untergrundsignal, die Photozerstörung limitiert die Gesamtzahl aller detektierbaren Photonen von einem Molekül, und die Diffusion treibt die Moleküle aus dem Detektionsvolumen heraus oder daran vorbei. Daher ist es für die Realisierung und Optimierung einer Einzelmoleküldetektion essentiell, das Anregungs- und Detektionsvolumen zu minimieren und dafür zu sorgen, dass möglichst nur ein Molekül so lange wie möglich im Detektionsvolumen verweilt, damit seine charakteristischen Fluoreszenzeigenschaften mit hoher Sicherheit detektiert werden können.

In aktuellen Arbeiten der Gruppe am Phys-Chem. Institut der Universität Heidelberg konnte die Detektion und Identifikation von einzelnen Analytmolekülen in Lösung in Submikrometer-Kapillaren mittels des zeitkorrelierten Einzelphotonenzählens gezeigt [Sauer 2001] und ebenfalls erfolgreich in einem Einzelmolekül-Immunoelktrophorese Experiment angewandt werden [Hübner 2002]. Da der Innendurchmesser mit 500 nm an der vorderen Spitze kleiner als der Laserfokus ist, wird jedes passierende, farbstoffmarkierte Analytmolekül mit hoher Sicherheit angeregt und detektiert. Fluorophore können aufgrund ihrer charakteristischen Eigenschaften wie Emissionswellenlänge und Fluoreszenzlebensdauer unterschieden werden. Die Migration der Analytmoleküle in der Kapillare wird durch Anlegen eines elektrischen Feldes erreicht.

Die mit dieser Technik erreichbare Nachweisgrenze für Antikörper liegt bei 10^{-15} M und darunter, was eine enorme Steigerung der Sensitivität gegenüber herkömmlichen Fluoreszenzverfahren wie der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie oder dem ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) in der Größenordnung von 10^{-9} M darstellt. Daher ist die Minimierung bzw. Einschränkung des Probevolumens durch eine Submikrometer-Kapillare in Kombination mit der Einzelmoleküldetektion ein wichtiger Schritt in Richtung Einzelmolekül DNA-Sequenzierung und Einzelmolekül-Diagnostik [Jett 1991; Eigen 1994]. Die Gruppe um Klennerman konnte sogar Experimente mit Einzelstrang DNA-Molekülen in Glaspipetten mit einem Durchmesser von 50 nm durchführen [Ying 2002]. Allerdings wird aufgrund der starken Wechselwirkung zwischen Analytmolekülen und der Oberfläche eine 20-fach längere Diffusionszeit für Einzelstrang DNA-Moleküle in Lösung beobachtet. Auf ähnliche Ergebnisse kommen Lyon und Nie mit dem Farbstoff Rhodamin 6G in einer Glaskapillare mit 500 nm Innendurchmesser [Lyon 1997]. Da das Oberfläche zu Volumen Verhältnis in einer Submikrometer-Kapillare sehr hoch ist, spielt die Reduzierung der Wechselwirkung zwischen Analytmolekülen und Oberfläche eine zentrale Rolle bei der effektiven Kapillarelektrophorese einzelner Moleküle. Zudem muss der so genannte elektroosmotische Fluss berücksichtigt werden, der bei elektrophoretischen Experimenten in Kapillaren ohne Wandbeschichtungen zu einer Gesamtbewegung der Probelösung in Richtung Kathode führt.

In den meisten bisher in Submikrometer großen Dimensionen durchgeführten Experimenten werden die Wandadsorption und der elektroosmotische Fluss durch Hinzugabe von Detergenzien zur Probenlösung reduziert oder sogar ausgenutzt. Diese Beschichtungstechnik ist als dynamisches Coating bekannt [Hjerten 1985].

Daneben gibt es eine Reihe von anderen Verfahren, die als statisches Coating bezeichnet wird, bei denen die Kapillarwand vor dem eigentlichen Experiment permanent beschichtet wird [Horvath 2001]. Unter diesen verspricht die Beschichtung mit Polyethylenglykol ein großes Potential zu haben, um die Sensitivität für die Einzelmolekül-Elektrophorese in wässriger Lösung zu steigern, was auch für biologische Anwendungen von hohem Interesse ist.

Um die Geschwindigkeit bzw. Diffusion von Analytmolekülen in Lösung zu untersuchen, hat sich die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie etabliert. Unter Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS, engl. fluorescence correlation spectroscopy) versteht man die Analyse der zeitlichen Fluktuationen zweier Fluoreszenzsignale [Eelson 1974].

In den meisten Anwendungen der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie wird die Diffusion der Analytmoleküle als physikalischer Parameter verwendet, um Informationen bezüglich der Translation einzelner beobachteter Moleküle zu gewinnen. Der Grund hierfür liegt darin, dass ein Wechsel der Diffusionskonstante eine Veränderung der Molekülgröße bedeutet, die wiederum mit einer chemischen Reaktion in Verbindung gebracht werden kann. Weder eine Information über die Umgebungsstruktur noch über nicht-diffusionale Transportvorgänge werden benötigt oder berücksichtigt. In biotechnologischen Anwendungen, bei denen komplette Reaktionskaskaden auf einem kleinen Chip mit Kanälen und Kammern stattfinden, werden aktive Transportvorgänge der Analytmoleküle aufgezeichnet. Zu diesem Zweck können Flussparameter wie die Geschwindigkeit oder die Flussrichtung durch die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie bestimmt werden. Gleichzeitig können andere Parameter wie Diffusion oder Fluoreszenzintensität aufgenommen werden. Durch die Doppeldetektion einzelner Analytmoleküle an zwei räumlich und damit zeitlich getrennten Anregungs- und Detektionsvolumina wird die Messung dieser Flussparameter enorm verbessert. Dies ist in Hinblick auf eine gesteigerte Sensitivität und Reproduzierbarkeit von großer Bedeutung.

Diese Technik bietet ein großes Potential bei Anwendungen z.B. in der Einzelmolekül-DNA-Sequenzierung [Jett 1991; Harding 1992; Ambrose 1993; Goodwin 1993; Sauer 1997; Sauer 2001], bei der Größenbestimmung von DNA-Fragmenten [Goodwin 1993; Petty 1995; Huang 1996], in der Diagnostik [Eigen 1994; Rigler 1995], bei der Untersuchung von chemischen Kinetiken einzelner Moleküle [Xue 1995; Wang 1995; Wu 1996; Widengren 1997] und der Detektion von geringen Substanzkonzentrationen [Chen 1994; Chen 1996].

Ziel dieser Arbeit ist es, eine effiziente Detektion und Identifikation einzelner farbstoffmarkierter Analytmoleküle in Submikrometer-Kapillaren durch Mehrfachdetektion mit gepulsten Diodenlasern zu realisieren. Gleichzeitig soll die Beschichtung der Kapillaren optimiert werden, damit Messungen von wässrigen Probelösungen ohne Hinzugabe von Detergenzien möglich werden.

2. Theoretische Grundlagen

2.1 Spektroskopische Grundlagen

In der optischen Spektroskopie wird die Lichtaussendung elektronisch angeregter Atome und Moleküle allgemein als Lumineszenz bezeichnet. Unter den vielfältigen Anregungsmöglichkeiten führt die Anregung mittels Lichtbestrahlung zu der so genannten Photolumineszenz. Form und Lage der zugehörigen Absorptions- und Emissionsspektren sind spezifisch für die untersuchten Atome und Moleküle und geben Auskunft über deren Schwingungs- und Rotationszustände. Im folgenden sind die wichtigsten Grundlagen der Fluoreszenzspektroskopie zusammengefasst [Lakowicz 1983].

2.1.1 Absorption

Absorption ist ein Ausdruck der Wechselwirkung zwischen den elektromagnetischen Wellen und der Materie. Der Wechselwirkung liegt das Resonanzverhalten der Oszillatoren in der Materie zugrunde. Bei bestimmten Photonenenergien entziehen die Oszillatoren dem Strahlungsfeld Energie, das heißt, sie absorbieren die Welle und gehen auf einen energetisch höher gelegenen Energiezustand über.

Quantenmechanisch kann ein Elektron bei der Absorption von Licht der Wellenlänge λ unter Aufnahme der Energie ΔE aus dem elektronischen Singulettzustand S_0 auf einen energetisch höher gelegenen elektronischen Singulettzustand S_n unter folgenden Voraussetzungen übergehen:

- a) Die Energie des Photons muss die Bohr'sche Resonanzbedingung erfüllen:

$$\Delta E = h \cdot \nu \quad (\text{Gleichung 2.1})$$

ν ist die Frequenz der Welle und h das Planck'sche Wirkungsquantum ($h = 6,626 \cdot 10^{-34}$ Js). Für den sichtbaren Wellenlängenbereich von etwa 400 - 800 nm entspricht das einer Energie von 1,5-3 eV.

- b) Das entsprechende Übergangsdipolmoment muss eine Projektion auf den elektrischen Feldstärkevektor des Anregungslichts besitzen.

- c) Der Übergang zwischen den beiden Zuständen muss erlaubt sein, d.h. das Übergangsmoment \mathbf{R}_{nm} muss von Null verschieden sein:

$$\mathbf{R}_{nm} = \langle \psi_n | \mu | \psi_m \rangle \neq 0 \quad (\text{Gleichung 2.2})$$

Hierbei sind μ der Dipolmomentoperator, ψ_n und ψ_m die Wellenfunktionen des Ausgangs- bzw. Endzustands.

Im Gegensatz zu Atomspektren sind bei Molekülen neben elektronischen Übergängen zusätzlich Rotations- und Schwingungsübergänge zu beobachten. Das führt dazu, dass die Zahl von Übergängen wesentlich größer wird, und die bei Atomen scharfen Absorptionslinien, deren Breite im Idealfall nur durch die natürliche Linienbreite begrenzt wird, bei Molekülen zu Banden verbreitert sind.

Ein Übergang durch thermische Energiezufuhr zwischen dem elektronischen Grundzustand S_0 und dem ersten elektronisch angeregten Zustand S_1 kann hingegen im allgemeinen vernachlässigt werden, da sich im thermodynamischen Gleichgewicht sehr viel weniger Moleküle im angeregten Zustand als im Grundzustand befinden. Die Boltzmann-Verteilung, die für $E \gg kT$ als Näherung der Fermi-Dirac-Verteilung gesehen werden kann, ergibt für die Energiedifferenz von z.B. 2,2 eV (212,3 kJ/mol) eines Rhodaminfarbstoffs in den ersten elektronisch angeregten Zustand für die Anzahl der Moleküle im Anregungszustand $N(S_1)$ bzw. im Grundzustand $N(S_0)$ bei Raumtemperatur (2,5 kJ/mol):

$$\frac{N(S_1)}{N(S_0)} = e^{-\Delta E / RT} = 1,3 \cdot 10^{-37} \quad (\text{Gleichung 2.3})$$

Dahingegen sind Energiebeträge dieser Größenordnung leicht durch Einstrahlung von sichtbarem Licht (400-800 nm \approx 1,5-3 eV) aufzubringen.

Ein Maß für die Stärke der Lichtabsorption durch ein Farbstoffmolekül ist der Extinktionskoeffizient ϵ , der über das Bouguer-Lambert-Beer'sche Gesetz bestimmt werden kann:

$$OD = \log_{10} \frac{I_0}{I} = \epsilon \cdot c \cdot d \quad (\text{Gleichung 2.4})$$

OD ist die optische Dichte, I_0 und I sind die eingestrahle bzw. die um die Absorption verminderte Intensität, c ist die Konzentration der Lösung, und d ist die durchstrahlte Schichtdicke der Lösung.

Das Bouguer-Lambert-Beer'sche Gesetz gilt für monochromatisches, kollimiertes Licht und verdünnte Lösungen.

Der Extinktionskoeffizient ϵ ist proportional zur Übergangswahrscheinlichkeit P . Sie gibt an, welcher Anteil aller absorbierten Lichtquanten zur elektronischen Anregung führt und ist proportional zum Quadrat des Übergangsmomentes. Bei $P = 1$ bewirkt jedes absorbierte Quant einen Übergang. ϵ ist auch proportional zum Einfangquerschnitt a , der die Flächenausdehnung des chromophoren Systems angibt:

$$\epsilon \propto P \cdot a \quad (\text{Gleichung 2.5})$$

Der maximale Extinktionskoeffizient eines Farbstoffes kann über $\epsilon_{\max} = 9 \cdot 10^{19} \cdot P \cdot a$ abgeschätzt werden. Mit $P = 1$ und $a = 10 \text{ nm}^2$ (typischer Wert für Rhodamine) ergibt sich

$$\epsilon_{\max} = 100000 \frac{L}{\text{mol} \cdot \text{cm}} \quad (\text{Gleichung 2.6})$$

Für die meisten Rhodamine liegt der Wert für ϵ_{\max} tatsächlich um 100000. Einige Cyaninfarbstoffe mit hohem Einfangquerschnitt erreichen sogar Werte bis $250000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.1.2 Emission

Moleküle in elektronisch angeregten Zuständen können unter Emission von Photonen (Lumineszenz) in einen energetisch günstigsten Zustand, den Grundzustand S_0 , übergehen. Innerhalb von 10^{-15} s wird ein Molekül in ein höheres Schwingungsniveau der elektronisch angeregten Zustände angeregt. Weil die elektronische Anregung schneller erfolgt als eine Schwingung dauert (10^{-12} s), bleiben die Kernabstände bei der Anregung gleich (Franck-Condon-Prinzip). Meist geschieht die Anregung in den ersten elektronisch angeregten Singulettzustand S_1 . Selten finden auch Anregungen in höhere elektronische Singulettzustände (S_2, S_3, \dots) statt, die jedoch in Lösungen innerhalb von 10^{-12} s strahlungslos (internal

conversion) unter Abgabe von Schwingungsenergie an Lösungsmittelmoleküle in die Boltzmann-Verteilung der Schwingungszustände des S_1 -Zustandes übergehen. Von hier aus gibt es verschiedene Möglichkeiten für das Molekül, wieder in den Grundzustand S_0 überzugehen. Das Jablonski-Diagramm verdeutlicht diese Übergänge.

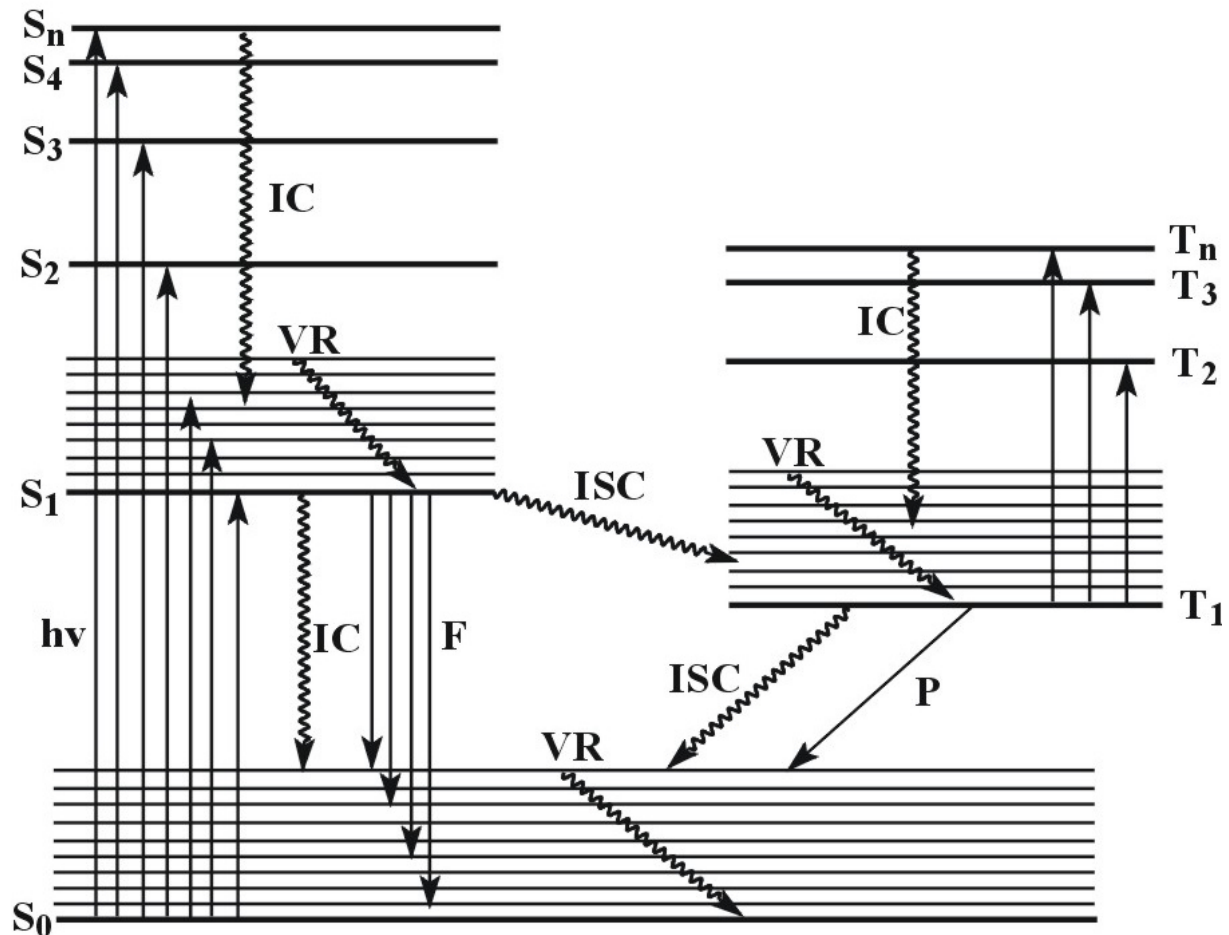


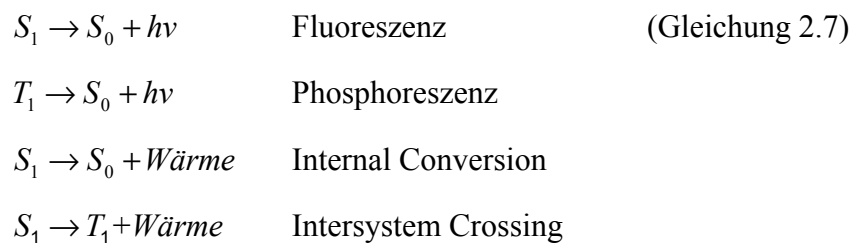
Abb. 2.1 Jablonski-Diagramm ohne Berücksichtigung der Rotationsenergieniveaus. Strahlungslose Übergänge sind geschlängelt. Vorgänge mit Photonen sind als gerade Linien dargestellt. F: Fluoreszenz, P: Phosphoreszenz, IC: Internal Conversion (strahlungslose Desaktivierung), ISC: Intersystem Crossing (Übergang mit verbotener Spinumkehr), S_x : Singulettzustände, T_x : Tripletzustände.

Die strahlungslose Desaktivierung (Internal Conversion) des S_1 -Zustandes verläuft analog zur obigen $S_n \rightarrow S_1$ -Relaxation als isoenergetischer Übergang in Rotations-Schwingungsniveaus von S_0 . Die Schwingungsenergie wird wiederum über Wechselwirkung mit der Umgebung abgegeben, wobei meist Erwärmung zu beobachten ist.

Die für diese Arbeit wichtigste Relaxationsart ist die Fluoreszenz. Der S_1 -Singulettzustand geht innerhalb von Nanosekunden entsprechend dem Übergangsmoment in ein Rotations-

Schwingungs-Niveau des Grundzustandes S_0 über und sendet die überschüssige Energie als Photon $h\nu$ aus. Als weiterer Reaktionsweg ist das Intersystem Crossing (ISC) in einen Triplettzustand möglich. Wegen der wegfallenden Paarungsenergie (Pauli-Prinzip) liegt der Triplettzustand energetisch knapp unterhalb des entsprechenden Singulettzustandes. Der Übergang ist damit energetisch günstig, allerdings ändert sich die Spinmultiplizität, wodurch der Übergang formell „verboten“ ist. Ist das Molekül erst einmal im Triplettzustand (T_1), verweilt es dort oft sehr lange ($\geq 10^{-6}$ s), weil alle weiteren Reaktionen in den Singulettgrundzustand S_0 führen und die Übergänge wiederum „spinverboten“ sind. Außerdem ist die Energiedifferenz für $T_1 \rightarrow S_0$ wesentlich größer als für $S_1 \rightarrow T_1$, was die Lebenszeit im Triplettzustand weiter verlängert. Es konkurriert die strahlungslose Relaxation (IC), die wiederum Wärme erzeugt, mit der Phosphoreszenz, bei der ein Photon emittiert wird. Die Phosphoreszenz tritt fast ausschließlich in Festkörpern auf, weil in Lösung eine Desaktivierung über Stöße mit den Lösungsmittelmolekülen wegen der langen Lebensdauer des Triplettzustandes bevorzugt wird.

Die Relaxationsprozesse sind hier noch einmal zusammengefasst:



Das Emissionsspektrum ist gegenüber dem Absorptionsspektrum rotverschoben, da die angeregten Singulettzustände S_n ($n=1, 2, \dots$) durch strahlungslose Prozesse schnell in die Rotations-Schwingungsenergie-Verteilung des S_1 -Zustandes relaxieren, von welchem dann die Fluoreszenz in höhere Rotations-Schwingungs-Zustände des S_0 erfolgen kann (Kasha-Regel). Daher haben die emittierten Photonen durch diese so genannte Stokes-Verschiebung eine geringere Energie als die absorbierten. Darüber hinaus trägt in Lösungen eine Umorientierung der benachbarten Lösungsmittelmoleküle zur Stokes-Verschiebung bei.

2.1.3 Fluoreszenzquantenausbeute

Während die Stärke der Absorption durch das Bouguer-Lambert-Beer'sche Gesetz angegeben werden kann, wird das Maß der Fluoreszenz über die Quantenausbeute definiert. Die Fluoreszenzquantenausbeute F gibt das Verhältnis der von einem Molekül emittierten zu den absorbierten Photonen wieder:

$$\Phi = \frac{N_{em}}{N_{abs}} \quad (\text{Gleichung 2.8})$$

Die Fluoreszenzquantenausbeute lässt sich auch über die Geschwindigkeitskonstanten aller Desaktivierungsprozesse beschreiben:

$$\Phi = \frac{k_f}{k_f + k_{sl}} \quad (\text{Gleichung 2.9})$$

wobei k_f die Geschwindigkeitskonstante der Fluoreszenz und k_{sl} die Summe aller Geschwindigkeitskonstanten der strahlungslosen Prozesse darstellen.

Zur experimentellen Bestimmung von Quantenausbeuten gibt es verschiedene Methoden, die im Review von Demas und Crosby [Demas 1971] beschrieben werden. Zur Bestimmung von absoluten Quantenausbeuten kann die Methode des Thermal Blooming angewendet werden [Hu 1973; Brannon 1978]. Hierbei wird durch strahlungslose Desaktivierung freiwerdende Wärme über eine Brechungsindexänderung gemessen.

2.1.4 Fluoreszenzlebensdauer

Wird ein angeregtes Molekül vom vibronischen Grundzustand des ersten elektronisch angeregten Zustands S_1 in den elektronischen Grundzustand S_0 via Fluoreszenz überführt, geschieht dies mit einer Lebensdauer τ in der Größenordnung von etwa 10^{-9} s. Die experimentell ermittelte Fluoreszenzlebensdauer ist die über mehrere Übergangszyklen gemittelte Zeit, die ein angeregtes Molekül benötigt, um in den Grundzustand zurückzukehren, wobei zur Zeit τ die Fluoreszenzintensität einer Probe bis auf $1/e \sim 37\%$ des Anfangswertes abfällt. Die Lebensdauer ist für einen Fluoreszenzfarbstoff charakteristisch und lässt sich aus den Geschwindigkeitskonstanten berechnen:

$$\mathbf{t} = \frac{1}{k_f + k_{sl}} \quad (\text{Gleichung 2.10})$$

Als natürliche Lebensdauer τ_n ist die Lebensdauer definiert, die nur durch Fluoreszenz in Abwesenheit strahlungsloser Desaktivierung zustande kommt:

$$\mathbf{t}_n = \frac{1}{k_f} \quad (\text{Gleichung 2.11})$$

Die natürliche Lebensdauer lässt sich grob über $\mathbf{t}_n \approx \frac{1}{10^4 \cdot \mathbf{e}_{\max}}$ abschätzen.

Die Quantenausbeute und die Lebensdauer hängen über die folgende Gleichung zusammen:

$$\Phi = \frac{\mathbf{t}}{\mathbf{t}_n} \quad (\text{Gleichung 2.12})$$

Bei unimolekularer Desaktivierung nimmt die Fluoreszenzaktivität monoexponentiell ab:

$$I(t) = I(0) \cdot e^{-t/\mathbf{t}}, \quad (\text{Gleichung 2.13})$$

wobei $I(t)$ die Fluoreszenzintensität zur Zeit t und $I(0)$ die Intensität zur Zeit $t=0$ ist. Bei komplizierteren Desaktivierungsprozessen nimmt die Intensität mehr exponentiell ab, und die Abklingkurve $I(t)$ kann durch eine Summe von e-Funktionen dargestellt werden:

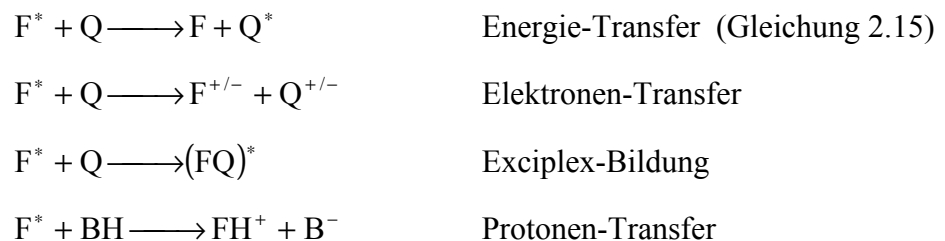
$$I(t) = \sum_i a_i \cdot e^{-t/\mathbf{t}_i}, \quad \sum_i a_i = 1 \quad (\text{Gleichung 2.14})$$

Freie Farbstoffe zeigen oft eine monoexponentielle Fluoreszenzkinetik. Mehr exponentielle Fluoreszenzkinetiken treten z. B. bei gebundenen Farbstoffen, bei Farbstoffen in viskosen Lösungsmitteln oder durch photoinduzierten Elektronentransferreaktionen auf. Durch die Ankopplung eines Farbstoffes an ein Oligonukleotid erhält man meistens eine breite Verteilung von Fluoreszenzlebensdauern entsprechend den verschiedenen Konformationsmöglichkeiten.

2.1.5 Fluoreszenzlöschung

Unter Fluoreszenzlöschung versteht man jeden molekularen Prozess, der zu einer Reduzierung der Fluoreszenzintensität des betrachteten Systems führt. Typische Löschprozesse sind Energie-Transfer, Elektronen- oder Protonentransfer und Komplexbildung.

Folgende bimolekulare Prozesse können zur Fluoreszenzlöschung beitragen:



Mögliche Löschreaktionen eines angeregten Farbstoffs mit einem Löschmolekül.

* symbolisiert angeregte Zustände, F den Farbstoff, Q das Löschmolekül.

Beim Energie-Transfer überträgt ein angeregtes Farbstoffmolekül (Donor) seine Anregungsenergie strahlungslos durch eine Dipol-Dipol-Wechselwirkung (Förster-Transfer) auf ein geeignetes Akzeptor-Molekül, welches sich in räumlicher Nähe befindet [Förster 1948; Stryer 1978]. Für einen effizienten Energie-Transfer muss das Fluoreszenzspektrum des Donor-Moleküls mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptor-Moleküls überlappen. Des Weiteren ist die Effizienz antiproportional zur sechsten Potenz des Abstandes der Moleküle. Ein photoinduzierter Elektronentransfer findet statt, wenn ein angeregter Farbstoff, je nach Redoxpotential, entweder ein Elektron auf ein geeignetes Akzeptormolekül überträgt oder von einem geeigneten Donormolekül ein Elektron aufnimmt. Die Effektivität und die Geschwindigkeit hängen von vielen Faktoren ab, wie zum Beispiel den Redoxpotentialen, der Orientierung der Moleküle zueinander und dem Abstand [Marcus 1956].

Bei der Exciplex-Bildung (aus „excited complex“) entsteht ein Komplex, der nur im angeregten Zustand stabil ist und strahlungslos oder unter Aussendung eines Photons in den entsprechenden Grundzustand der Moleküle zerfällt.

Sind im Fluorophor acide Protonen oder basische Gruppen vorhanden, so besteht die Möglichkeit eines Protonen-Transfers. Die treibende Kraft für diese Säure-Base-Reaktion

sind drastische Änderungen der pK_a -Werte des Fluorophors bei Anregung in den S_1 -Singulettzustand.

2.1.6 Dynamische und statische Löschung

Je nach elektronischem Zustand des Fluorophors unterscheidet man dynamische und statische Löschung [Lakowicz 1983].

Bei der dynamischen Löschung befindet sich der Fluorophor in einem angeregten Zustand und überträgt Energie auf ein Löschmolekül. Anschließend gehen beide Moleküle strahlungslos in den Grundzustand über. Die Fluoreszenzintensität verringert sich. Durch den zusätzlichen Prozess, der S_1 entvölkert, wird auch die Fluoreszenzlebensdauer verkürzt.

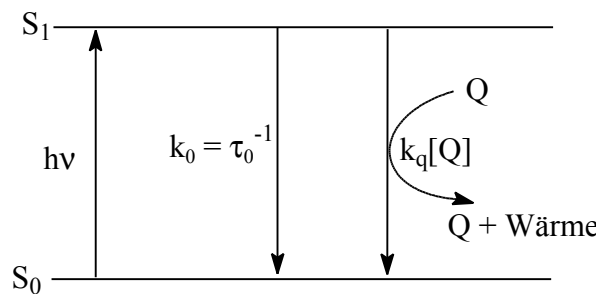


Abb. 2.2 Schema der dynamischen Fluoreszenzlöschung.

Die dynamische Fluoreszenzlöschung wird durch die Stern-Volmer-Gleichung beschrieben:

$$\frac{I_0}{I} = \frac{\tau_0}{\tau} = 1 + k_q \cdot \tau_0 \cdot [Q] = 1 + K_D [Q] \quad (\text{Gleichung 2.16})$$

mit:

I_0 (I): Fluoreszenzintensität in Abwesenheit (Anwesenheit) von Löschmolekülen

τ_0 (τ): Lebensdauer des Fluorophors in Abwesenheit (Anwesenheit) von Löschmolekülen

$[Q]$: Konzentration des Löschmoleküls

k_q : Bimolekularer Geschwindigkeitskoeffizient der Löschung

Die Konzentrationsabhängigkeit der dynamischen Löschung lässt sich durch eine Auftragung von τ_0/τ über der Konzentration der Löschmoleküle darstellen. Aus der Steigung der Geraden lässt sich die Stern-Volmer-Konstante $K_D = k_q\tau_0$ bestimmen.

Im Falle der statischen Löschung tritt der Fluorophor bereits im Grundzustand mit dem Löschmolekül in Wechselwirkung. Die gebildeten Grundzustandskomplexe fluoreszieren nicht oder nur schwach, so dass die Fluoreszenzintensität herabgesetzt wird.

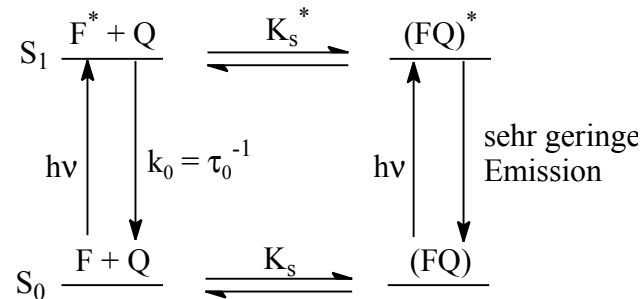


Abb. 2.3 Schema der statischen Fluoreszenzlöschung.

Die Stern-Volmer-Gleichung beschreibt die statische Löschung:

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_s \cdot [Q] \quad \text{mit} \quad K_s = \frac{[(FQ)]}{[F] \cdot [Q]} \quad (\text{Gleichung 2.17})$$

K_s ist die Gleichgewichtskonstante der Komplexbildung zwischen Fluorophor und Löschmolekül.

In den meisten Fällen tritt nicht nur einer der beiden Löschprozesse auf, sondern eine Kombination beider. Für diesen Fall gilt die modifizierte Stern-Volmer-Gleichung:

$$\frac{I_0}{I} = (1 + K_D \cdot [Q]) \cdot (1 + K_s \cdot [Q]) = \frac{t_0}{t} \cdot (1 + K_s \cdot [Q]) \quad (\text{Gleichung 2.18})$$

2.2 Kapillarelektrophorese

Geladene Teilchen wandern in Lösung unter Einfluss eines angelegten elektrischen Feldes mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten in unterschiedliche Richtungen. Diese Ionenwanderung wird als Elektrophorese bezeichnet. Unterschiede in der Wanderungsgeschwindigkeit können zwei Ursachen haben: Unterschiedliche Ladungen erfahren im elektrischen Feld unterschiedliche elektrophoretische Kräfte oder bei gleicher effektiver Ladung können Ionen aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe sich im Reibungswiderstand unterscheiden. Auf diesem Prinzip beruhen die verschiedenen Trennungsmöglichkeiten der Kapillarelektrophorese (capillary electrophoresis = CE) [Engelhardt 1994].

Die erste Trennung in einer offenen Glasröhre gelang 1967 Hjerten, der die Stabilisierung der Lösung durch Rotation des Rohres um seine Achse erreichte [Hjerten 1967]. Jedoch erst mit den Pionierarbeiten gegen Ende der 70er Jahre von Mikkers und Everearts [Mikkers 1979] und von Jorgenson und Lukacs [Jorgenson 1981] zu Beginn der 80er Jahre konnte sich die CE als Analysetechnik durchsetzen. Dies war vor allem darauf zurückzuführen, dass Quarzkapillaren mit einem Innendurchmesser von 50-100 μm hergestellt werden konnten, mit denen hocheffiziente Trennungen von Proteinen möglich wurden. Die enorme Verkleinerung des Innendurchmessers der Quarzkapillaren hatte zur Folge, dass der störende Einfluss der thermisch induzierten Konvektion aufgrund des relativ großen Verhältnisses von Oberfläche zu Volumen stark vermindert war. Zudem führte die Einfachheit der Apparatur, die hohe Trenngeschwindigkeit und Trenneffizienz, die geringe Probenmenge und der automatisierte 24-Stunden-Betrieb der Geräte zum endgültigen Erfolg der HPCE (high performance capillary electrophoresis) als Analysemethode. Die CE stellt heute den am schnellsten wachsenden Zweig der Analysetechnik dar. Primär angesiedelt im Bereich der Makromoleküle der Biochemie und Molekularbiologie hat sie sich auch in der pharmazeutischen Industrie, der Zellbiologie, der Umweltanalytik und der chemischen Großindustrie etabliert.

Eine schematische Darstellung einer CE-Apparatur ist in Abbildung 2.4 gezeigt.

Die dünne Quarzkapillare (Innendurchmesser 25-100 μm) mit einer Länge von 20 bis 100 cm überbrückt die beiden Puffergefäße 1 und 2.

Die Probenaufgabe oder Injektion der Probe erfolgt am anodischen Ende (Pufferreservoir 1) der Kapillare. Nur Lösungen können als Proben aufgegeben werden. Zur Probenaufgabe muss

das Gefäß mit Trennelektrolyt am aufgabeseitigen Ende (Gefäß 1) der Trennkapillare gegen ein Gefäß ausgetauscht werden, das die Probe enthält.

Die Injektion der Probe (einige nl) kann auf verschiedene Weisen erfolgen. Bei Injektion durch Siphon-Effekt (gravity injection) wird das aufgabeseitige Ende der Kapillare gegenüber dem anderen Ende um eine definierte Länge für eine definierte Zeit angehoben. Infolge des dadurch bedingten Flusses in der Kapillare wird ein durch die Probenaufgabeparameter festgelegtes Volumen der Probe als Pfropf in die Kapillare aufgenommen. Bei einem anderen Verfahren (Druckinjektion, hydrodynamic injection) wird eine einstellbare Druckdifferenz für eine festgelegte Zeit zwischen dem aufgabeseitigen Ende und dem anderen Ende der Kapillare erzeugt. Auch bei diesem Verfahren wird ein Fluss in der Kapillare bewirkt, dessen Richtung durch die Druckdifferenz festgelegt ist. Wenn der Druck am aufgabeseitigen Ende höher ist als am anderen Ende, wird ein durch die Probenaufgabeparameter festgelegtes Volumen der Probe als Pfropf in die Kapillare aufgenommen. Bei einem weiteren Verfahren (elektrokinetische Injektion, electrokinetic injection) wird für eine festgelegte Zeit eine einstellbare Spannung zwischen beiden Ende der Kapillare angelegt. Aufgrund elektrokinetischer Effekte wird eine Flüssigkeitsströmung in der Kapillare erzeugt. Auch bei elektrokinetischer Injektion wird ein durch die Probenaufgabeparameter festgelegtes Volumen der Probe als Pfropf am aufgabeseitigen Ende in die Trennkapillare eingeführt.

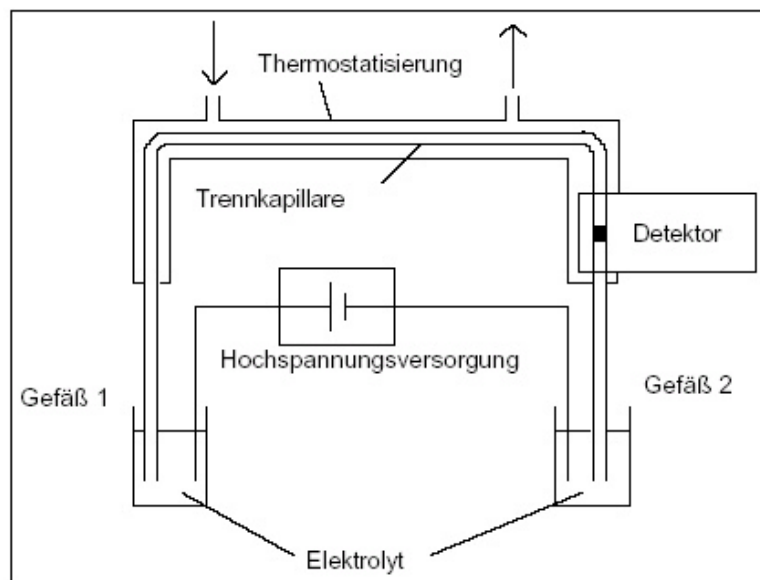


Abb. 2.4 Schematischer Aufbau einer CE-Apparatur

Nach der Probenaufgabe wird das Probengefäß gegen ein Gefäß mit Trennelektrolyt ausgetauscht. In die Elektrolytgefäße an beiden Enden der Kapillare tauchen inerte Platin-

Elektroden. Zwischen diesen Elektroden wird mit Beginn der elektrophoretischen Trennung eine Spannung von bis zu 35 kV angelegt. Die Obergrenze der anlegbaren Spannung ist gerätetechnisch bedingt. Die Trennung der Bestandteile der Probe in Zonen erfolgt während des Laufs bei angelegter Hochspannung. Die Zonen werden meist in einem Segment der Kapillare (on-line) detektiert. Da der so genannte elektroosmotische Fluss (EOF, s. u.) in der einfachsten Konstellation in Richtung zur Kathode gerichtet ist, d.h. aktiv am Transport beteiligt ist, wird in der üblichen Anordnung der Apparatur der Detektor in der Nähe des Kathodenraums angebracht.

Die Trennkapillaren bestehen aus kunststoffumhülltem Quarzglas. Um die bei angelegter Spannung durch Stromfluss in der Kapillare erzeugte Joulesche Wärme in ausreichendem Maße an die Umgebung abführen zu können, müssen die Innendurchmesser der Kapillaren klein gehalten werden, damit gewährleistet ist, dass die Temperaturerhöhung in der Kapillare gegenüber der Temperatur der Umgebung nicht zur Bildung von Gasblasen in der Kapillare führt. Zudem wird in der Regel die Kapillare von einer Kühlflüssigkeit umspült.

Die Detektion der getrennten Substanzen erfolgt am häufigsten durch UV-VIS-Absorptionsmessungen. Die Empfindlichkeit ist jedoch vergleichsweise gering (bis zu 10^{-8} M) [Moring 1993], da die Extinktion proportional zur Schichtdicke ist (mittlerer Kapillarinne Durchmesser). Eine weitaus höhere Nachweisempfindlichkeit von bis zu einigen Yoctomol und Zeptomol ($1 \text{ zmol} = 10^{-21} \text{ mol}$; $1 \text{ ymol} = 10^{-24} \text{ mol}$) lässt sich mittels laserinduzierter Fluoreszenz (LIF) erreichen [Arriaga 1995; Figeys 1994]. Allerdings ist ihre Anwendung auf Substanzen beschränkt, die selbst fluoreszieren, mit Fluoreszenzfarbstoffen interagieren oder an diese gekoppelt werden können. Verschiedenste Laserquellen, Detektoren und Detektoranordnungen machen LIF dennoch zu einer sehr vielseitigen Methode [Lee 1996; Nouadje 1996; Nouadje 1997]. Alternativ zur spektralen Diskriminierung von Fluoreszenzfarbstoffen kann die zeitaufgelöste Fluoreszenzdetektion genutzt werden [Sauer 1997; Müller 1997; Legendre 1996, Sauer 1998; Flanagan 1998; Nunnally 1997; He 1998].

2.2.1 Theoretische Grundlagen der Kapillarelektrophorese

Die Wanderungsgeschwindigkeit eines Analytens im elektrischen Feld wird durch seine elektrophoretische Mobilität festgelegt. Unterscheiden sich zwei Analytionen nicht in ihrer Mobilität, können sie elektrophoretisch nicht getrennt werden. Die Stärke des elektrischen Feldes E und die viskose Reibung F_r , die durch das Stokessche Gesetz angenähert wird, bestimmen die Wanderungsgeschwindigkeit v von Ionen.

$$F_{el} = q \cdot E \quad (\text{Gleichung 2.19})$$

$$F_r = f_c \cdot v = -6 \cdot \boldsymbol{p} \cdot \boldsymbol{h} \cdot r \cdot v \quad (\text{Gleichung 2.20})$$

wobei q der Ladung, f_c dem Reibungskoeffizienten, \boldsymbol{h} der dynamischen Viskosität und r dem Stokes Radius, der die Solvathülle beinhaltet, entspricht. Die Zahl 6 gilt unter der Annahme sphärischer Teilchen und ist kleiner für kleine Ionen, deren Größe den Lösungsmittelmolekülen entspricht.

Im Kräftegleichgewicht wandert das Teilchen mit konstanter Geschwindigkeit:

$$F_{el} = -F_r \quad (\text{Gleichung 2.21})$$

$$v = \frac{z \cdot e \cdot E}{6 \cdot \boldsymbol{p} \cdot \boldsymbol{h} \cdot r} = \boldsymbol{m} \cdot E \quad (\text{Gleichung 2.22})$$

Die Proportionalitätskonstante μ heißt elektrophoretische Mobilität und verbindet die Wanderungsgeschwindigkeit v mit der Feldstärke E .

Die Geschwindigkeit v lässt sich ebenfalls als Quotient aus der Länge bis zum Detektor L_d und der Retentionszeit t_r formulieren. Mit dem elektrischen Feld als Quotient aus der angelegten elektrischen Spannung U und der Gesamtlänge der Kapillare L_{ges} folgt:

$$\boldsymbol{m} = \frac{v}{E} = \frac{L_d \cdot L_{ges}}{t_r \cdot U} \quad (\text{Gleichung 2.23})$$

Gemäß der Debye-Hückel-Theorie sind die Ionen in der Lösung stets von einer Ionenatmosphäre aus gegensätzlich geladenen Teilchen umgeben [Atkins 1990]. Die

Bewegung der Gegenionen im elektrischen Feld überträgt sich auf die Lösungsmittelmoleküle, so dass das Zentralion nicht durch eine stationäre Flüssigkeit, sondern durch eine entgegengesetzt fließende Lösung wandert. Durch diesen so genannten Retardationseffekt sinkt die Wanderungsgeschwindigkeit. Das Anlegen des elektrischen Feldes verzerrt die Ionenwolke, so dass eine zusätzliche bremsende elektrische Kraft auf das Zentralion wirkt. Dieser Effekt heißt Relaxationseffekt. Das Zusammenwirken beider Effekte erklärt, dass die elektrophoretische Mobilität mit steigender Ionenstärke abnimmt.

2.2.2 Der elektroosmotische Fluss (EOF)

Das für Trennkapillaren üblicherweise eingesetzte Material ist Quarz (fused silica), dessen Oberfläche durch Protolyse der Silanolgruppen negativ geladen ist. Positiv geladene Teilchen der Trennmatrix werden dadurch an die Oberfläche konzentriert und ordnen sich in einer starren und in einer beweglichen Doppelschicht auf ihr an. Das sich aufgrund der Ladungsverteilung ausbildende Potential wird nach der Theorie von Stern [Adamson 1982] in zwei Regionen aufgeteilt: (a) in eine lineare Abnahme des Potentials im Bereich der starren Grenzschicht und (b) einer exponentiellen Abnahme in der diffusen Grenzschicht. Letztere wird auch als ζ -Potential bezeichnet und ist verantwortlich für die Elektroosmose.

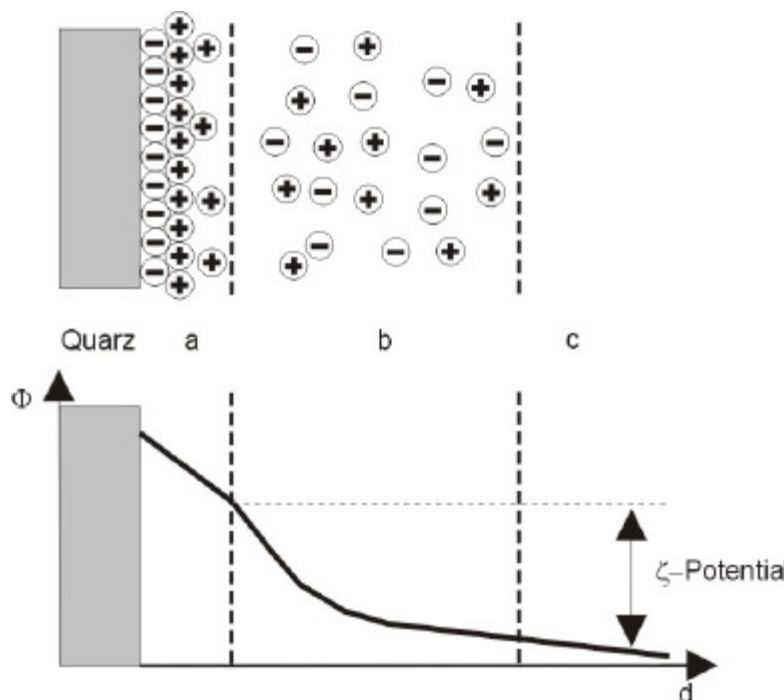


Abb. 2.5 Die Doppelschicht nach dem Sternschen Modell. Während in a eine feste Schicht von positiv geladenen Teilchen an die Quarzoberfläche adsorbiert, bewegen sich die geladenen Teilchen im Bereich b diffus. Das Potential in a fällt linear, in b exponentiell ab.

Liegt parallel zur Oberfläche ein elektrisches Feld an, bewegen sich die positiven Gegenionen der mobilen Schicht in Richtung Kathode und reissen dabei die gesamte Flüssigkeit mit. Der so entstehende Fluss wird als elektroosmotischer Fluss (EOF) bezeichnet.

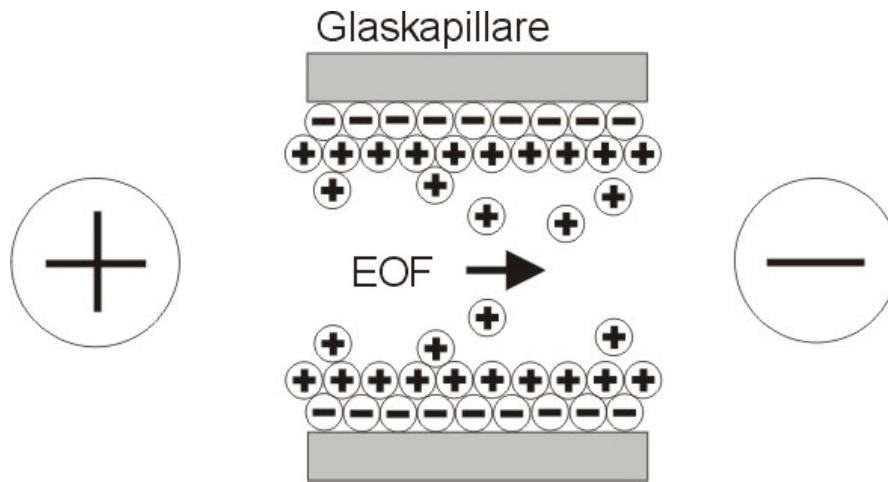


Abb. 2.6 Entstehung des elektroosmotischen Flusses (EOF) in einer Glaskapillare.

Er besitzt ein extrem flaches, stempelförmiges Strömungsprofil und setzt sich deutlich vom laminaren Fluss ab. Aus dem EOF resultiert im Gegensatz zum hydrodynamischen Fluss keine Bandenverbreiterung. Der elektrophoretischen Wanderung ist immer ein mehr oder minder starker EOF überlagert, der aktiv zum Transport der Probezonen, nicht aber zu ihrer Trennung beiträgt.

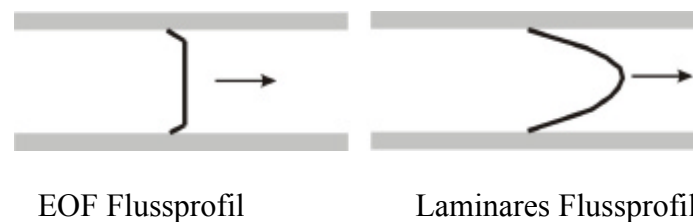


Abb. 2.7 Flussprofile für eine elektrophoretische und hydrodynamische Wanderung.

Die Geschwindigkeit des EOF ist proportional dem ζ -Potential, der elektrischen Feldstärke E sowie der Dielektrizitätskonstante ϵ in der Doppelschicht und umgekehrt proportional der Viskosität η . Sie lässt sich vereinfacht mit Hilfe der so genannten Helmholtz-Gleichung beschreiben:

$$v_{EOF} = \frac{\epsilon \cdot E \cdot \zeta}{4 \cdot \eta} \quad (\text{Gleichung 2.24})$$

Gemessen wird der EOF durch Beobachtung der Migrationszeit eines Neutralmarkers. Der EOF ist abhängig von Art und Konzentration der Pufferionen - hohe Pufferkonzentrationen verkleinern das ζ -Potential und somit auch den EOF - sowie vom pH-Wert, da im sauren pH-Bereich wesentlich weniger Silanolgruppen dissoziiert sind als im alkalischen. Außerdem können oberflächenaktive Detergenzien den EOF beeinflussen.

Unter Kapillarelektrophorese vereint sich eine Vielzahl von Methoden, die die analytische Trennung verschiedenster Substanzklassen erlauben. Die folgenden Methoden sind am weitesten verbreitet [Engelhardt 1994].

- Die Kapillarzonenelektrophorese (CZE) ist die einfachste und am häufigsten angewendete Variante der Kapillarelektrophorese und dient zur Trennung von Molekülen mit verschiedenen Verhältnissen von Ladung und Reibungskoeffizienten. Bei der CZE bleiben der Puffer, der pH-Wert und die elektrische Feldstärke über den Trennbereich konstant.
- Eine Trennmatrix separiert in der Kapillargelelektrophorese (CGE) effektiv gleich geladene Moleküle aufgrund ihrer Größe. Im Gegensatz zur traditionellen Flachbettgelelektrophorese besitzt die CGE eine höhere Trenngeschwindigkeit. Haupteinsatzgebiet der CGE ist die Trennung von DNA-Molekülen.
- Die micellare elektrokinetische Chromatographie (MEKC) trennt elektrisch neutrale und/oder geladene Moleküle durch den Zusatz von Micellenbildnern zum Elektrolyten. Die Stärke der Wechselwirkung mit den Micellen bestimmt die Wanderungsgeschwindigkeit der Substanzen: Moleküle mit starker Wechselwirkung wandern langsamer.
- Die Kapillar-Isoelektrische Fokussierung (CIEF) ermöglicht die Trennung von Proteinen mit unterschiedlichen isoelektrischen Punkten (pI) in einem pH-Gradienten, der durch den Einsatz ampholytischer Substanzen erzeugt wird. Die Analytionen konzentrieren sich aufgrund ihrer verschiedenen pI-Werte in schmalen Zonen, die schließlich hydrodynamisch oder durch Umpolen zum Detektor transportiert werden.

- Die Kapillarelektrochromatographie (CEC) ist mit der Flüssigchromatographie verwandt. Die Analyten werden aufgrund ihrer Verteilung zwischen einer stationären und einer mobilen Phase getrennt. Die mobile Phase wird durch den elektroosmotischen Fluss und nicht durch ein Druckgefälle durch die Kapillare gepresst. Fritten am Ende der Kapillare verhindern, dass der elektroosmotische Fluss die stationäre Phase aus der Kapillare transportiert.
- Die Kapillarisotachophorese (CITP) nutzt zwei verschiedene Elektrophoresepuffer zur Fokussierung der Proben bei konstantem elektrischen Strom aus. Die Ionen des einen Puffers besitzen eine größere Mobilität als die Probeionen (leading buffer), während die Mobilität der Ionen des zweiten Puffers kleiner ist (terminating buffer). Die Analytionen verteilen sich aufgrund ihrer elektrophoretischen Mobilität im elektrischen Feld, bis sich ein Gleichgewicht eingestellt hat und alle Ionen mit der Mobilität des „leading buffer“ migrieren. Der elektroosmotische Fluß (EOF) muß bei der Anwendung dieser Technik vollständig unterdrückt werden.

2.3 Wandbeschichtung - „Coating“

Bei der Kapillarelektrophorese (CE) gilt der chemischen Modifikation der Kapillarwand besonderer Augenmerk. Die Wechselwirkung zwischen Analytmolekülen und Kapillarwand führen zu Adsorptionserscheinungen, die sich störend auf die Laufeigenschaften auswirken und daher möglichst unterdrückt oder sogar gänzlich unterbunden werden sollen. Ebenso kann eine Änderung des EOF zu einer schnelleren Trennung mit höherer Reproduzierbarkeit beitragen. Daher ist es von außerordentlicher Bedeutung, eine geeignete Wandbeschichtung (engl. Coating) zu haben.

Hydrophile Wandbeschichtungen sind in der Regel für Biomoleküle geeigneter, während hydrophobe Oberflächen für andere Anwendungen gebraucht werden. Beiden Oberflächen ist jedoch gemeinsam, dass sie sich stabil unter den gewünschten Trennbedingungen verhalten und einen möglichst großen pH-Bereich abdecken sollen.

In Abhängigkeit von der Bindungsart an die Kapillarwandoberfläche unterscheidet man zwischen dynamischer und statischer Wandbeschichtung. Dynamisches Coating beinhaltet adsorptive sekundäre Wechselwirkungen, während statisches Coating auf kovalenter Bindung

zwischen Kapillarwand und Beschichtungsmaterial beruht. Hybride Beschichtungstechniken kombinieren dynamisches und statisches Coating.

2.3.1 Eigenschaften von fused silica Oberflächen

Es gilt generell als bewiesen, dass es 4-5 Silanolgruppen/nm² auf einer glatten, nichtporösen, hitzestabilisierten, amorphen Glasoberfläche gibt [Iler 1979]. Silanolgruppen ionisieren in einer wässrigen Lösung, hinterlassen dadurch eine negativ geladene Oberfläche, die bei der Kapillarelektrophorese den EOF verursacht. Misst man den EOF in einer unbehandelten Kapillare in Abhängigkeit des pH, so lässt sich zeigen, dass der pK_a – Wert der Silanolgruppen zwischen 2 und 9 liegt [Chiari 1996]. Ebenso konnte festgestellt werden, dass Glaskapillaren eine Hysterese zeigen, bei dem die elektrophoretische Mobilität bei gleichem pH-Wert unterschiedlich ist, je nachdem, ob der vorherige pH-Wert saurer oder basischer war [Lambert 1990]. Über einem pH-Wert von 12 ist der EOF sogar unterdrückt [Malá 1999], was auf eine gesteigerte Viskosität der Doppelschicht zurückgeführt wird.

2.3.2 Charakterisierung der Kapillarwandbeschichtung

Die Charakterisierung von Kapillarwandbeschichtungen ist aufgrund der geringen Größe und Dicke extrem schwierig. Weit verbreitet ist die Methode, den EOF zu messen und seine Abhängigkeit vom pH-Wert des Puffers zu untersuchen [Kohr 1993]. Alternative Techniken wurden für Messungen mit geringem EOF entwickelt. In einer solchen Technik wird das Signal mittels der Elektroosmose eines Neutralmarkers gemessen und anschließend wird unter einem geringem Druck gespült [Matyska 2000, Sandoval 1996, Ermakov 1996]. Eine andere Methode benutzt eine CCD-Kamera, um die Bewegung eines fluoreszierenden neutralen Markers entlang der Kapillarlänge zu verfolgen [Preisler 1996]. Ebenso können Kraftmikroskope (Atomic Force Microscope) benutzt werden, die innere Kapillarwand zu charakterisieren [Barberi 1996, Cifuentes 1998].

2.3.3 Dynamische Wandbeschichtung

Das dynamische Coating wird in der Regel durch eine Spülung der Kapillare vorbereitet. Hierfür wird eine Lösung mit einem Beschichtungsmittel benutzt, was entweder ein Polymer [Horvath 2001] oder eine Verbindung mit geringer Molekularmasse [Righetti 2001] enthält. Da die Art des dynamischen Coatings auf Adsorption beruht, wird dem Trennpuffer eine geringe Menge an Beschichtungskemikalie zugegeben, damit die Beschichtung während der Messung aufrecht erhalten bleibt. Eine selbst beschichtende Siebmatrix kann ebenfalls zum dynamischen Coating von Kapillarwänden genutzt werden. In diesem Fall wird die Kapillare mit einer Polymerlösung gefüllt, die teilweise an die Kapillaroberfläche adsorbiert und gleichzeitig als dreidimensionale Trennmatrix für die Trennung von verschiedenen Molekülen in der CE sorgt. Das in einem Teil der Versuche verwendete neutrale Polymer Polyvinylpyrrolidon (PVP) ist z.B. als effektive Trennmatrix für Sequenzieranwendungen bekannt [Sauer 1997; Gao 1998; Pang 1999]. PVP erhöht die hydrophile Eigenschaft der Oberfläche, was zu einer schwächeren Analytmolekül-Kapillarwand-Wechselwirkung führt, und unterdrückt effektiv den EOF. Gleichzeitig aber ist durch die erhöhte hydrophile Eigenschaft die Stabilität der adsorbierten Beschichtung verringert [Madabhushi 1998].

2.3.4 Statische Wandbeschichtung

Die statische oder permanente Wandbeschichtung kann den EOF und die Probe-Wand-Wechselwirkung effektiv unterdrücken. Das derzeit aufgrund seiner guten Trennleistung am häufigsten verwendete Beschichtungsmaterial ist Acrylamid.

Zwar benötigt der Trennpuffer keinen Zusatz von Beschichtungskemikalien, aber dennoch ist ein statisches Coating üblicherweise mit einiger zusätzlicher Vorbereitung verbunden, die sich aus drei Schritten zusammensetzt: der Vorbehandlung der Kapillare, dem Einführen von Doppelbindungen an die Kapillarwand und dem Binden eines Polymers an diese Zwischenschicht.

Bei der Vorbehandlung muss die Kapillaroberfläche zunächst gereinigt und geätzt oder ausgelaugt werden, bevor es zum eigentlichen Coating Prozess kommt [Cifuentes 1998]. Das Anbringen einer Zwischenschicht aus Polymeren kann z.B. mittels reaktivem bifunktionalem Silan geschehen [Hjerten 1985; Hjerten 1987]. Die Oberflächensilanole reagieren mit den Silangruppen, während die andere funktionale Gruppe Monomere binden, die auf der

Kapillaroberfläche polymerisieren können. Das eigentliche statische Coating wird durch Verankerung einer Polymerschicht mittels einer freien Radikalpolymerisationsreaktion erreicht. Dabei beeinflussen die Konzentration der Monomere, der Initialmoleküle und der Katalysatoren die Polymerisationsbedingungen. Daneben stellen die relativen Verhältnisse, die Temperatur und Zeit wichtige Faktoren dar. Ein vielversprechendes Polymer ist Polyethylenglykol (PEG) [Harris 1992; Schmith 1992; Emoto 1996; Horvath 2001]. Das neutrale hydrophile PEG unterdrückt unspezifische Proteinadsorption und den EOF in verschiedenen Stärken [Nashabeh 1991]. Es konnte sogar die Richtung des EOF in einer PEG-beschichteten Kapillare mit einem Methanolelektrolyten umgekehrt werden [Burns 1995]. Zusätzlich steigert PEG die Benetzbarkeit der Oberfläche. Diese Eigenschaften machen PEG als biokompatibles Coatingmaterial interessant [Harris 1992]. Da PEG in verschiedenen Experimenten dieser Arbeit verwendet wurde, wird auf seine Eigenschaft in dem Kapitel Materialien und Methoden näher eingegangen.

Neben der Möglichkeit, die Wechselwirkung mit der Wand durch Aufbringen einer Oberflächenbeschichtung zu verhindern, gibt es auch Möglichkeiten, die Wandadsorption in unbehandelten Glaskapillaren zu vermindern.

Da Adsorption von Proteinen hauptsächlich auf elektrostatische Wechselwirkungen zwischen positiven Gruppen des Proteins und der negativen Gefäßwand zurückzuführen ist, kann sie durch hohe Salzkonzentrationen vermindert werden, da die positiven Ionen der Salzlösung mit dem Protein um die Adsorptionsplätze konkurrieren. Die Verwendung von zwitterionischen Puffern hat hierbei den Vorteil, dass die Leitfähigkeit der Lösung nicht zu sehr ansteigt [Bushey 1989]. Außerdem kann durch Zusatz von Tensiden eine dynamische Belegung der Oberfläche mit dem Tensid erreicht werden, wodurch die Adsorption ebenfalls verringert wird [Yeung 1997]. Schließlich wird die Adsorption in stark sauren oder basischen Puffern unterdrückt. Bei pH-Werten < 2 sind die Silanolgruppen der Kapillarwand nicht dissoziiert, daher ist die Glaswand nicht negativ geladen. In Puffern, deren pH-Werte über dem isoelektrischen Punkt des zu untersuchenden Proteins liegen, ist die Nettoladung des Proteins ebenfalls negativ, so dass im Idealfall keine Wechselwirkung mit der Kapillarwand erfolgt, da Protein und Wandoberfläche die gleiche Ladung haben.

2.4 Einzelmoleküldetektion

Im Gegensatz zu Ensemblemessungen, mit denen nur die durchschnittlichen Eigenschaften einer Probe bestimmt werden können, gewinnt man bei Einzelmolekülmessungen Informationen über die Eigenschaften einzelner Moleküle und damit über Verteilungen und zeitliche Fluktuationen, die sonst nicht zugänglich sind.

In den letzten Jahren hat die Detektion und Spektroskopie von einzelnen Molekülen eine rasante Entwicklung durchgemacht. Besonders die Detektion von einzelnen fluoreszierenden Molekülen in Lösung und bei Raumtemperatur hat seit der ersten erfolgreichen Detektion durch Hirschfeld im Jahre 1976 von einzelnen Globulin-Proteinen [Hirschfeld 1976], die mit mehreren Fluorophoren markiert waren, große Fortschritte erlebt. Die Einzelmoleküldetektion ist mittlerweile an einem Punkt angelangt, an dem von mehreren Gruppen die Detektion von einzelnen Molekülen mit einem Fluorophor gezeigt werden konnte, die einen fokussierten Laserstrahl passieren [Shera 1990; Soper 1992; Wilkerson 1993; Lee 1994; Rigler 1992; Mets 1994; Nie 1994; Nie 1995; Li 1995; Barnes 1995; Keller 1996; Goodwin 1996]. Diese Technik bietet ein großes Potential bei Anwendungen z.B. in der DNA-Sequenzierung [Jett 1991; Harding 1992; Ambrose 1993; Goodwin 1993; Goodwin 1995, Sauer 1997], bei der Größenbestimmung von DNA-Fragmenten [Goodwin 1993; Petty 1995; Huang 1996], in der Diagnostik [Eigen 1994; Rigler 1995], bei der Untersuchung von chemischen Kinetiken einzelner Moleküle [Xue 1995; Wang 1995; Wu 1996; Widengren 1997] und der Detektion von geringen Substanzkonzentrationen [Chen 1994; Chen 1996]. Die Einzelmoleküldetektion in Lösung und bei Raumtemperatur ist ein schwieriges Unterfangen. Sie wird durch mehrere Faktoren gestört: die umgebende Lösung und mögliche Verunreinigungen verursachen ein hohes Untergrundsignal, Diffusion treibt die Moleküle aus oder am Detektionsvolumen vorbei, und die Photozerstörung limitiert die Gesamtzahl aller detektierbaren Photonen von einem Molekül. Daher ist es für die Realisierung und Optimierung einer Einzelmoleküldetektion essentiell, das Anregungs- und Detektionsvolumen zu minimieren und dafür zu sorgen, dass sich möglichst nur ein Molekül im Detektionsvolumen befindet.

Bei genügend großer Verdünnung einer Lösung von fluoreszierenden Molekülen gibt es nur noch eine gewisse Wahrscheinlichkeit P , mit der sich ein Farbstoffmolekül im Detektionsvolumen befindet. Nur wenn die Wahrscheinlichkeit P , die durch die Poisson-Statistik gegeben ist, kleiner als 1 ist, können einzelne Moleküle detektiert werden. In der Praxis wird mit Konzentrationen von $10^{-9} - 10^{-12}$ M gemessen. Bei dieser Konzentration befinden sich immer noch $6 \cdot 10^{11} - 6 \cdot 10^8$ Moleküle in einem cm^3 Probelösung. Soll die

Fluoreszenz von einzelnen Molekülen herrühren, muss somit das beobachtete Probenvolumen verkleinert werden.

Die am weitesten verbreitete Technik zur Detektion einzelner Moleküle ist die konfokale Fluoreszenzmikroskopie. Eine Punkt zu Punkt Abbildung des Anregungs- und Detektionsfokus sorgt für ein exakt definiertes Detektionsvolumen, das typischerweise 1 fl beträgt. Streulicht wird räumlich durch eine Lochblende und spektral durch Filter vom Fluoreszenzlicht getrennt.

2.4.1 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

Der von Minsky 1957 patentierte konfokale Aufbau konnte die Abbe'sche Auflösungsgrenze eines konventionellen Mikroskops auf unter 1 fl Anregungsvolumen verbessern [Minsky 1957]. In der konventionellen Mikroskopie mit Epi-Illumination wird das gesamte Gesichtsfeld ausgeleuchtet. Dadurch wird die Probe auch in ihrer Tiefe ausgeleuchtet und emittiert aus jeder Schicht Fluoreszenzphotonen. Dieses Licht wird eingesammelt und führt zu einem verwischten Bild mit reduziertem Kontrast und reduzierter Schärfe. Das Prinzip der konfokalen Mikroskopie beruht nun darauf, dass Licht außerhalb des Fokus abgeblockt wird. Dies geschieht auf zwei Wegen. Zum einen wird das Anregungslicht auf einen Punkt fokussiert, so dass rund um den Fokus weniger Anregung stattfindet. Zum anderen wird durch eine Lochblende Licht, das nicht aus der Fokusebene stammt, abgeblockt. Dadurch wird die laterale und axiale Auflösung erhöht.

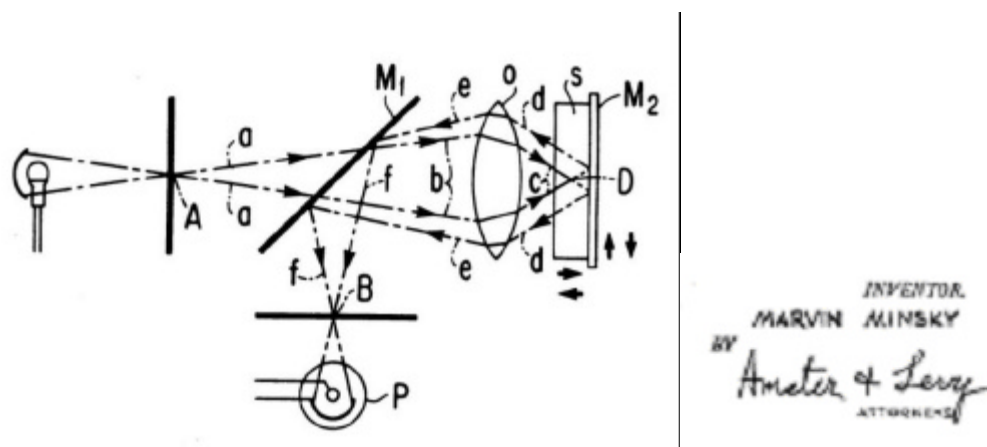


Abb. 2.8 Konfokaler Aufbau nach Minsky (aus: US Patent No. 3013467. Links: Lichtquelle, O: Objektiv, A und B: Lochblende (pinhole), M_1 : Dichroischer Filter, S: Probe, P: Detektor

2.4.2 Auflösung

Das Bild eines infinitesimal kleinen Punktes bildet im Realen keinen Punkt ab, sondern eine Airyscheibe mit einem hellen zentralen Peak und konzentrischen dunklen und hellen Ringen. Daher können zwei Punkte nur bis zu einem minimalen Abstand voneinander als zwei Punkte erkannt werden. Dies ist gerade beim Radius einer Airyscheibe der Fall, wenn der helle Peak des einen Punktes im ersten dunklen Ring des zweiten liegt. Die erreichbare Ortsauflösung, das beugungsbegrenzte Volumen, wird durch das Rayleigh-Kriterium beschrieben [Pawley 1989]. Für den lateralen Abstand d gilt:

$$d = 0,61 \cdot \frac{\lambda}{NA} \quad (\text{Gleichung 2.25})$$

λ ist die Wellenlänge des eingesammelten Lichts und NA die numerische Apertur. In axialer Richtung ist die Auflösung zwar wesentlich besser als in der konventionellen Mikroskopie, aber dennoch schlechter als die laterale:

$$z_{\min} = \frac{2 \cdot \lambda \cdot n}{(NA)^2} \quad (\text{Gleichung 2.26})$$

Die numerische Apertur geht quadratisch ein. Daher ist ein Objektiv mit möglichst hoher numerischer Apertur wichtig.

Das Verhältnis der axialen zu lateralen Auflösung ergibt sich zu:

$$\frac{z_{\min}}{d} = 3,28 \cdot n \cdot NA \quad (\text{Gleichung 2.27})$$

Für ein Wasserobjektiv mit $n = 1,33$ und $NA = 0,9$ errechnet sich für das axiale zu laterale Verhältnis 4,85 und für $n = 1,33$ und $NA = 1,2$ ergibt sich 3,64. Für ein Ölimmersionsobjektiv mit $n(\text{Öl}) = 1,48$ und $NA = 1,4$ erhält man 3,47.

Tabelle 2.1 zeigt einige beugungslimitierte Auflösungen für verschiedene Wellenlängen.

	laterale Auflösung	axiale Auflösung
520nm	352nm ^a / 264nm ^b / 227nm ^c	1707nm ^a / 952nm ^b / 790nm ^c
570nm	386nm ^a / 290nm ^b / 248nm ^c	1871nm ^a / 1043nm ^b / 863nm ^c
635nm	430nm ^a / 322nm ^b / 276nm ^c	2085nm ^a / 1172nm ^b / 958nm ^c
670nm	454nm ^a / 341nm ^b / 292nm ^c	2200nm ^a / 1226nm ^b / 1016nm ^c

Tabelle 2.1 Ideale theoretische laterale und axiale beugungslimitierte Auflösung eines konfokalen Mikroskops. a) $NA=0,9$, Wasserimmersion ($n=1.33$), b) $NA=1.2$, Wasserimmersion ($n=1.33$), c) $NA=1.4$, Ölimmersion ($n=1.48$).

2.4.3 Anregungsvolumen

In der geometrischen Optik ($\lambda \rightarrow 0$) fokussiert eine Bikonvexlinse einen kollimierten Laserstrahl zu einem infinitesimalen kleinen Punkt. Dies ist eine Idealisierung; denn perfekte, aberrationsfreie Linsen und divergenzfreie Laser existieren nicht.

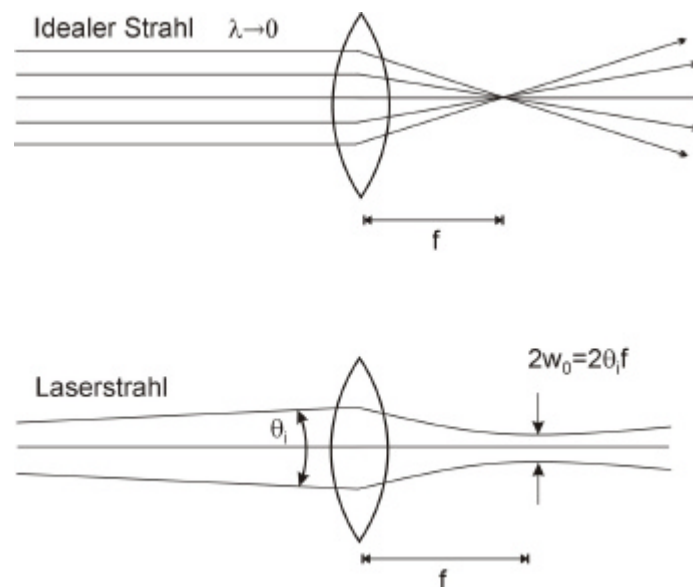


Abb. 2.9 Der Fokus in der geometrischen und Gaußschen Optik.

Vielmehr gilt in der Gaußschen Optik folgende Relation zwischen dem Radius des Laserstrahls und dem Radius des Brennpunktes [Demtröder 1995]:

$$w_0 = \theta \cdot f \cdot \frac{1}{n} = \frac{I}{\mathbf{p} \cdot w_L} \cdot f \cdot \frac{1}{n} \quad (\text{Gleichung 2.28})$$

Hierbei stellt der erste Faktor θ die Strahldivergenz des einfallenden Laserstrahls und f die Brennweite (in unserem Fall die des Messobjektivs) und n den Brechungsindex des Mediums dar, in dem sich der Brennpunkt befindet (Bei Objektiven ist der Immersionsbrechungsindex bereits in der nominellen Brennweite mit berücksichtigt.).

Die Strahldivergenz setzt sich zusammen aus

λ = Vakuumwellenlänge des Anregungslichts

w_L = Radius des in das Objektiv einfallenden Laserstrahles.

Gleichung 2.28 verdeutlicht, dass ein Laserstrahl auf seinen kleinsten Brennpunkt fokussiert werden kann, wenn die Brennweite des Objektivs möglichst gering und die Strahldivergenz minimiert sind. Bei gegebener Eintrittsöffnung eines Objektivs folgt daraus, dass der einfallende Laserstrahl die Öffnung des Objektivs aus- bzw. überstrahlen sollte.

Mit Objektiven hoher Qualität (z.B. das in den Experimenten verwendete Ölimmersionsobjektiv von Olympus, 100 X, numerische Apertur $NA = 1,4$) lassen sich so bei einer Wellenlänge von 635 nm beugungslimitierte Brennpunkte in der Größenordnung von 1 μm Durchmesser erzeugen.

Der Bereich um die Strahltaile, in dem die Strahlen als ebene Wellen angesehen werden können, wird Rayleighzone genannt. Zwischen der halben Tiefe z_0 des Fokus in axialer Richtung und dem Radius w_0 des Brennpunktes besteht folgender Zusammenhang:

$$z_0 = \frac{\mathbf{p} \cdot w_0^2}{I} \quad (\text{Gleichung 2.29})$$

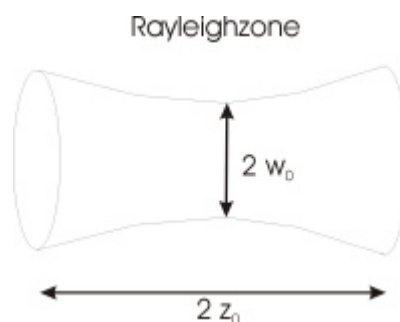


Abb. 2.10 Die Rayleighzone eines fokussierten Laserstrahles

Für einen Strahldurchmesser von $1\ \mu\text{m}$ errechnet sich so bei einer Wellenlänge von $635\ \text{nm}$ eine Fokustiefe von $2,4\ \mu\text{m}$. Dies entspricht einem Fokusvolumen von etwa 2 fl.

Die Strahldivergenz eines Laserstrahles ist in der Regel durch die Bauform des Lasers bestimmt. Sie kann jedoch mittels einer zusätzlichen Optik – eines Strahlteleskops – verringert werden. Abbildung 2.11 zeigt einen kollimierten Laserstrahl mit Durchmesser w_i und Strahldivergenz θ_i , der durch die erste Linse des Strahlteleskops gemäß Gleichung 2,28 auf einen Durchmesser von $2\cdot\theta_i\cdot f_1$ fokussiert wird. Die zweite Linse mit der Brennweite $f_2 > f_1$ sammelt das Licht vom fokussierten Punkt und kollimiert den Strahl anschließend wieder, wobei das Laserprofil gemäß dem Verhältnis der beiden Brennweiten um einen Faktor $M = (f_2/f_1)$ vergrößert ist. Da aufgrund des Prinzips der Reversibilität des Lichts ein umgekehrter Strahl denselben Verlauf zeigt, ist $\theta_i\cdot f_1 = \theta_f\cdot f_2$. Es gilt für die Strahldivergenz:

$$\theta_f = (w_i/w_f)\cdot\theta_i. \quad (\text{Gleichung 2.30})$$

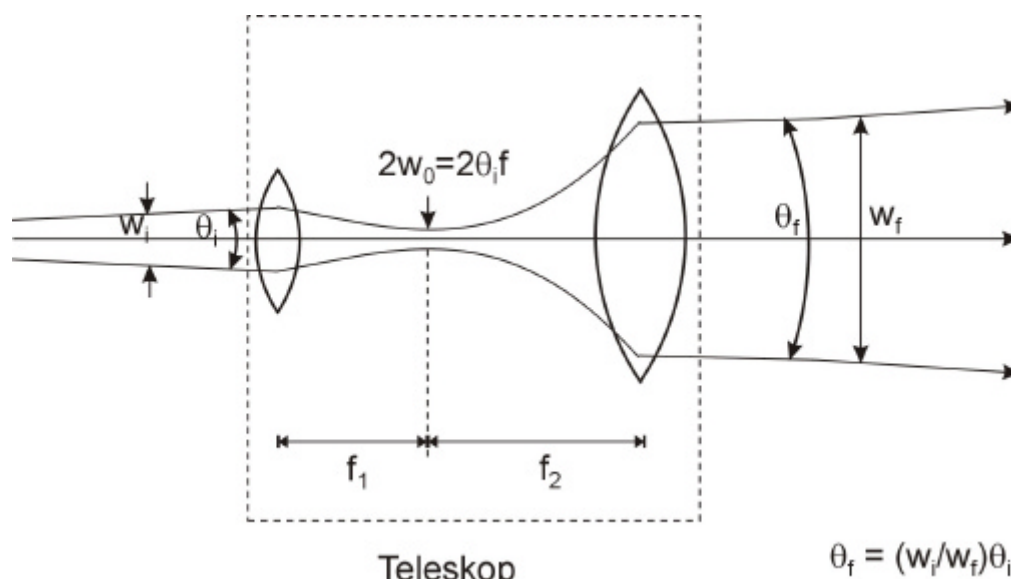


Abb. 2.11 Strahlaufweitung durch ein Teleskop

Ein um den Faktor 10 vergrößerter Strahl zeigt demnach eine um denselben Faktor verringerte Divergenz. Würde dieser Strahl über eine Linse fokussiert, wäre der Fokusbrennpunkt 10 Mal kleiner als ohne Strahlteleskop bei gleicher Linse. Diese 10-fache Verkleinerung des Brennpunktes führt zu einer 100-fachen Verkleinerung der Fokusfläche und bei gegebener Laserleistung zu einer 100-fachen Erhöhung der Strahlleistung im Fokus.

2.4.4 Detektionsvolumen

Trotz der kleinen Dimensionen, mit denen in der konfokalen Mikroskopie gearbeitet wird, muss zwischen Anregungs- und Detektionsvolumen unterschieden werden. Die detektierte Fluoreszenzintensität ist gegeben durch:

$$F(t) = g \cdot Y \cdot \epsilon \int I(r) \cdot C(r, t) \cdot CEF(r) d^3r \quad (\text{Gleichung 2.31})$$

Der Faktor g gibt die Detektionseffizienz der Avalanche-Photodiode (APD) wieder, ϵ und Y den Absorptionskoeffizienten bzw. die Quantenausbeute des Fluorophors. I ist die Laserintensität an der Stelle r , C die Konzentration und CEF die so genannte Funktion der Einsammeleffizienz (engl.: collection efficiency function).

Die Integration der lokalen Laserintensität I über den gesamten Raum ergibt das Anregungsvolumen, welches vom Strahlprofil abhängt. Das Strahlprofil kann in vielen Fällen durch einen fokussierten Gauß-förmigen Laserstrahl beschrieben werden. Die laterale Strahlintensität I eines fokussierten paraxialen Laserstrahles ist gegeben durch

$$I(r) = I_0 \exp\left(-\frac{2}{w^2} r^2\right), \quad (\text{Gleichung 2.32})$$

wobei $I(r)$ die Intensität in einer vom Strahlzentrum entfernten Distanz r , I_0 die Intensität im Strahlzentrum und w der Radius darstellen, bei der I_0 auf I_0/e^2 abgefallen ist. In axialer Richtung ändert sich die Strahltaile w gemäß:

$$w(z) = w_0 \sqrt{1 + \left(\frac{z \cdot \lambda}{\pi \cdot w_0^2}\right)^2} \quad (\text{Gleichung 2.33})$$

$z = 0$ markiert die Position, an der die Strahltaile minimal ($w = w_0$) ist. λ gibt die Wellenlänge des einfallenden Strahles wieder. Mit P_0 , der Gesamtintensität des Laserstrahles, ergibt sich für das Intensitätsprofil in z Richtung [Enderlein 2002]:

$$I(z) = \frac{2P_0}{\pi \cdot w_0^2} \left(1 + \left(\frac{z \cdot \lambda}{\pi \cdot w_0^2}\right)^2\right)^{-1} \quad (\text{Gleichung 2.34})$$

Die Funktion der Einsammeleffizienz (CEF) ist über die Kombination aus Lochblende und Objektiv definiert. Das Produkt aus CEF und lokaler Intensität beschreibt ein Helligkeitsprofil, welches im Falle eines Gauß-Profiles wie folgt geschrieben werden kann:

$$p(r) = I_0 \exp\left(\frac{-2(x^2 + y^2)}{w_1^2}\right) \exp\left(\frac{-2z^2}{w_2^2}\right) \quad (\text{Gleichung 2.35})$$

Das Detektionsvolumen ergibt sich aus der Integration des Helligkeitsprofils.

2.4.5 Detektionseffizienz

Die Detektionseffizienz ist sowohl von der Wahl des angeregten Fluorophors als auch von der Qualität der im Messaufbau verwendeten optischen Komponenten abhängig. Eine grobe Abschätzung lässt sich wie folgt erstellen.

Für den Farbstoff Cy5 liegt die charakteristische Diffusionszeit τ_D in Wasser bei etwa einer Millisekunde. Bei einer Anregung mit einem gepulstem Laser mit einer Pulsrate von 60 MHz im Sättigungsbereich wird ein Molekül 60000 mal pro Millisekunde angeregt. Da die Quantenausbeute von Cy5 etwa 25% beträgt, werden 15.000 Fluoreszenzphotonen emittiert, von den in einem Einzelmolekülexperiment bis zu 200-300 Photonen detektiert werden können [Sauer 1998]. Dies entspricht einer Detektionseffizienz von 1-2%.

Bei einer genaueren Betrachtung müssen die einzelnen optischen Komponenten mit berücksichtigt werden.

- Messobjektiv
- Dichroischer Spiegel
- Emissionsfilter
- Linsen
- Umlenkspiegel
- Lochblende
- Detektor

Die Objektive haben eine Transmission von ca. 80%. Zusätzlich wird bei jedem Objektiv die numerische Apertur (NA) angegeben. Sie gibt den Grad der Lichteinsammeleffizienz wieder und ist abhängig vom Brechungsindex des Mediums zwischen Objektivlinse und Coverslip und dem Sinus des maximalen Winkels θ relativ zur optischen Achse, unter dem noch Photonen in das Objektiv gelangen können.

$$NA = n \cdot \sin\theta \quad (\text{Gleichung 2.36})$$

Beispielsweise ist bei einem Ölimmersionsobjektiv mit $NA = 1,4$ und $n(\text{Öl}) = 1,48$ der maximale Einsammelwinkel $\theta = 71,1^\circ$ und bei einem Wasserobjektiv mit $NA = 1,2$ und $n(\text{Wasser}) = 1,3$ ist $\theta = 64,5^\circ$ und bei $NA = 0,9$ ist $\theta = 42,6^\circ$. Derzeit sind Objektive mit einer numerischen Apertur von 1,6 kommerziell erhältlich. Jedoch benötigen diese spezielle Glasdeckplättchen und spezielle Ölimmersionen.

Der überstrichene Raumwinkel berechnet sich nach

$$\Omega = 2\pi (1 - \cos\theta) \quad (\text{Gleichung 2.37})$$

Die Sammeleffizienz Y beträgt damit

$$Y = (1 - \cos\theta)/2 \quad (\text{Gleichung 2.38})$$

Es ergibt sich, dass selbst bei einer numerischen Apertur von 1,4 die meisten Photonen verloren gehen.

NA	0,9	1,2	1,4
Y	0,132	0,285	0,320

Tabelle 2.2 Sammeleffizienz von Objektiven in Abhängigkeit der numerischen Apertur.

Der effektive Transmissionsgrad des dichroischen Spiegels und der Filter hängt vom Emissionsspektrum des verwendeten Farbstoffes ab. In dem für die Experimente relevanten Bereich werden durch den dichroischen Spiegel etwa 80% und durch einen Bandpassfilter und einen Blockfilter je 80% transmittiert. Die fest im Mikroskopgehäuse eingebaute Linse hat wie die Bikonvexlinse im Strahlengang einen Transmissionsgrad von 95%. Der Verlust

durch den Umlenkspiegel kann vernachlässigt werden. Durch die Lochblende (100 μm) gehen nochmals 20% des Detektionssignals verloren. Mit der Detektionseffizienz des Detektors von 70% ergibt sich somit eine Gesamtdetektionseffizienz für den Messaufbau von

(Gleichung 2.39)

$$0,8 \cdot 0,32 \cdot 0,8 \cdot 0,8^2 \cdot 0,95^2 \cdot 0,8 \cdot 0,7 = 5,3\% \quad \text{für NA} = 1,4$$

$$4,7\% \quad \text{für NA} = 1,2$$

$$\text{und } 2,2\% \quad \text{für NA} = 0,9$$

Bei dieser Berechnung ist die Quantenausbeute des Farbstoffes nicht mit berücksichtigt. Da die Quantenausbeute des Farbstoffs Cy5 etwa 25% beträgt, ergibt sich auch mit dieser genaueren Berechnung eine Detektionseffizienz von 1-2%.

2.5 Theoretische Grundlagen der Korrelationen

Korrelationsanalysen können verborgene Informationen aus Signalen herausbekommen. Dabei ist unter einer Korrelation im weitesten Sinne die wechselseitige Beziehung oder Beeinflussung zweier Funktionen zu verstehen. Mathematisch ähnelt eine Korrelation der Faltung oder Konvolution [Bronstein 1991]. Eine Funktion $f(x)$ wird mit einer zweiten Funktion $g(x)$, die in x verschoben ist, multipliziert und über den gesamten Wertebereich gemittelt (aufsummiert bzw. integriert).

$$f(x) \otimes g(x) = \int_{-\infty}^{+\infty} f(x')g(x-x')dx' \quad (\text{Gleichung 2.40})$$

Gleichung 2.40 gibt das Faltungsintegral wieder, wobei \otimes die Faltungsoperation kennzeichnet. Lediglich die Position von $g(x)$ unterscheidet Korrelation und Faltung voneinander.

Wird $g(x-x')$ nach $g(x'+x)$ verschoben, spricht man von Korrelation.

Die Mittelungseigenschaft von Korrelationen wird oft ausgenutzt, um verrauschte Signale zu glätten. Dabei wird das verrauschte Signal mit einer Funktion bekannter Form wie z.B. einem Rechtecksignal korreliert bzw. gefaltet. Als Ergebnis erhält man eine geglättete Funktion.

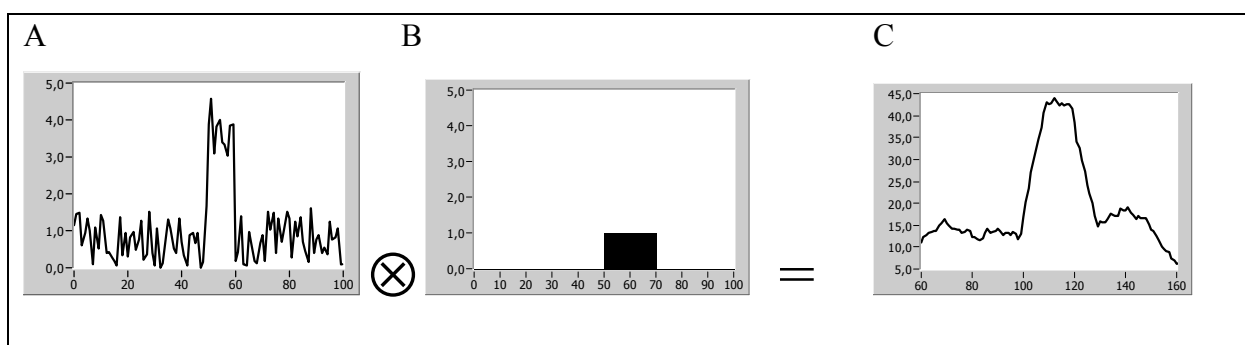


Abb. 2.12 Intensitäten in Abhängigkeit der Zeit in willkürlichen Einheiten. Das verrauschte Signal A wird mit der bekannten Rechteckfunktion in B gefaltet und glättet so das Spektrum. Das Spektrum A wird auf Formeigenschaften bezüglich der Abfragefunktion B hin untersucht.

Rauschsignale sind in der Rechteckfunktion in B nicht enthalten und werden daher in der gefalteten Spur unterdrückt, während die verborgene Rechteckfunktion erkennbar bleibt. Wird statt der Rechteckfunktion eine andere Funktion korreliert, können je nach Form sehr leicht Informationen wie z.B. bezüglich Gaußverteilung, Ableitungen gewonnen werden. Allgemein

kann die Korrelationsmethode als Abfrage des Spektrums auf Formeigenschaften aufgefasst werden, die ähnlich denen der bekannten Abfragefunktion sind. Auf ähnlichem Prinzip beruhen Filter.

Ist die Abfragefunktion gleich der ursprünglichen, spricht man von einer Autokorrelation. Sie gibt Auskunft über die Selbstähnlichkeit und somit auch über die Fluktuationen innerhalb einer Signalspur nach einer verschobenen Zeit τ . Währenddessen können mittels der so genannten Kreuzkorrelation, bei der zwei verschiedene Funktionen korreliert werden, Ähnlichkeit und Zusammenhang zwischen zwei Signalspuren untersucht werden.

Die Abbildungen 2.13 und 2.14 geben Beispiele für Autokorrelation und Kreuzkorrelation. Aufgetragen ist die Intensität über Zeit in willkürlichen Einheiten.

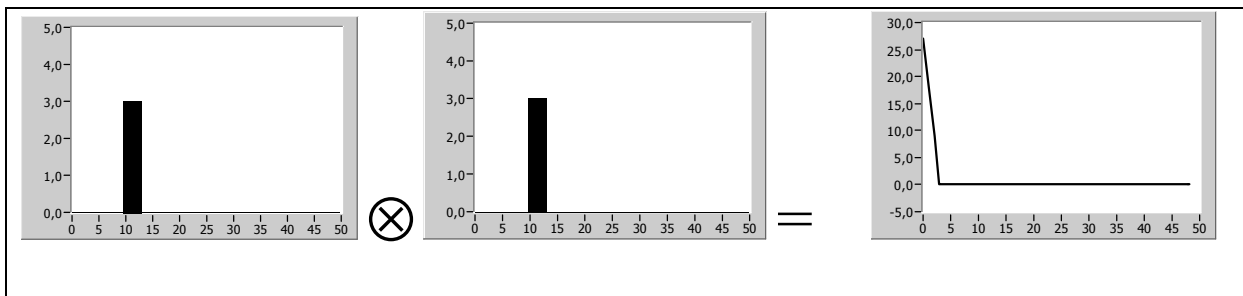


Abb. 2.13 Schematische Darstellung einer Autokorrelation zweier Rechtecksignale. Intensitäten in Abhängigkeit der Zeit sind in willkürlichen Einheiten dargestellt.

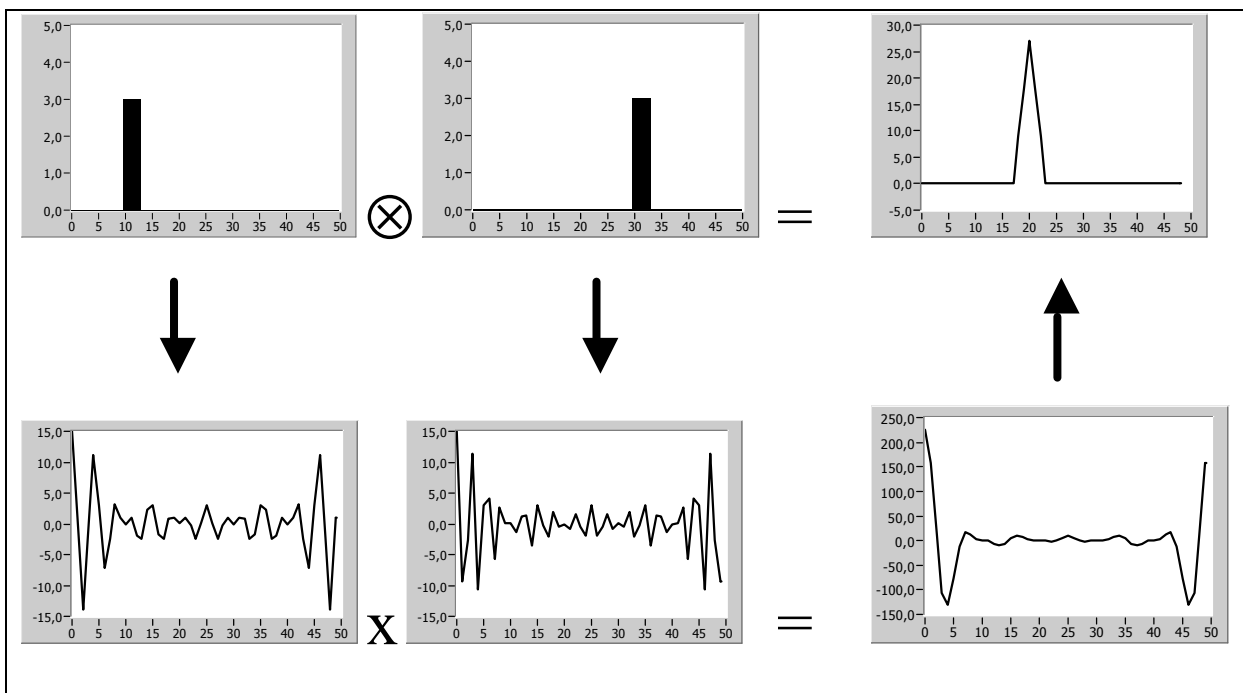


Abb. 2.14 Schematische Darstellung einer Kreuzkorrelation zweier Rechtecksignale. Intensitäten in Abhängigkeit der Zeit sind in willkürlichen Einheiten dargestellt.

Das Beispiel in Abbildung 2.13 zeigt das Ergebnis einer Autokorrelation für zwei identische Spuren mit Rechteckfunktionen. Die Autokorrelationsfunktion liefert hohe Werte nur bei kleinen Korrelationszeiten, die der Breite des Bursts entspricht. Die Kreuzkorrelation zweier verschobener Spuren in Abbildung 2.14 hingegen liefert als Ergebnis eine Dreiecksform mit dem Maximum bei einer Korrelationszeit, die gleich dem zeitlichen Abstand zwischen den beiden Bursts ist.

Theoretisch lässt sich dasselbe Ergebnis mittels eines Theorems berechnen, das besagt, dass die Faltung zweier Funktionen der Multiplikation der beiden Fouriertransformierten im Frequenzraum entspricht [Bronstein 1991]. Eine Rücktransformation des Produkts ergibt dasselbe Ergebnis. Für den Fall B ist dies schematisch im unteren Teil gezeigt.

3. Materialien und Methoden

3.1 Farbstoffe

Das Konzept der Multiplexfarbstoffe beruht auf der Tatsache, dass Farbstoffe mit ähnlichem Absorptions- und Emissionsspektren unterschiedliche Fluoreszenzlebensdauern aufweisen [Sauer 1995]. Der Einsatz solcher Farbstoffe hat gegenüber Farbstoffen mit unterschiedlichen Absorptions- und Emissionsmaxima den Vorteil, dass mit einer einzigen Anregungswellenlänge alle Farbstoffe angeregt werden können. Zur Reduktion des Untergrunds, der unter anderem durch Raman- und Rayleighstreuung verursacht wird, werden Farbstoffe mit langwelligen Absorptionsmaxima zwischen 600 nm und 700 nm verwendet. Dies hat den Vorteil, dass zum einen die Rayleighstreuung reduziert wird, deren Intensität mit ν^4 ansteigt, zum anderen gibt es in biologischen Proben wie z.B. Blutseren in diesem Spektralbereich kaum fluoreszierende Spezies, was für eine Anwendung von auf Fluoreszenz basierenden Verfahren in der klinischen Diagnostik wichtig ist [Hübner 2002].

Die in den Versuchen verwendeten Farbstoffe - der Oxazinfarbstoff MR121 (Boehringer, Mannheim, Deutschland) und der Carbocyaninfarbstoff Cy5 (Amersham Life Science, Braunschweig, Deutschland) - sind typische Vertreter dieser Gattung.

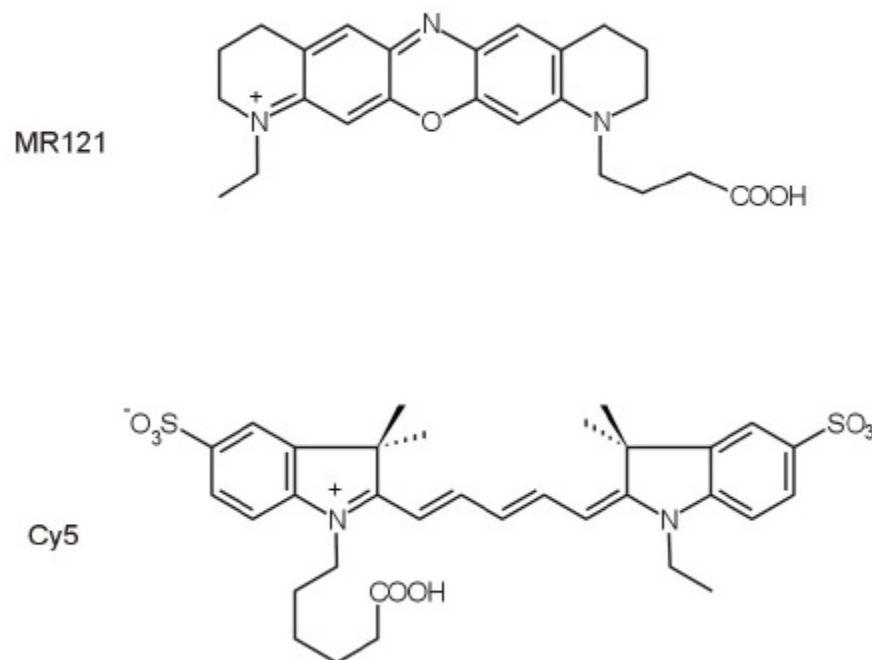


Abb. 3.1 Strukturformeln der Farbstoffe MR121 und Cy5.

In Tabelle 3.1 sind einige spektroskopische Eigenschaften der Farbstoffe zusammengetragen.

Messgröße:	Cy5	MR121
Absorptionsmaximum	649 nm	662 nm
Emissionsmaximum	670 nm	676 nm
Lebensdauer	1,0 ns	1,89 ns
Extinktionskoeffizient	250000 l·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹	≈100000 l·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹

Tab. 3.1 Spektroskopische Eigenschaften der Farbstoffe Cy5 und MR121 gemessen in Wasser und bei Raumtemperatur.

Um möglichst deutliche Effekte in den elektrophoretischen Versuchen beobachten zu können, wurden die Farbstoffe an negativ geladene Mononukleotide gekoppelt. Abbildung 3.2 zeigt die Strukturformeln der beiden farbstoffmarkierten Mononukleotide Cy5-dCTP und MR121-dUTP.

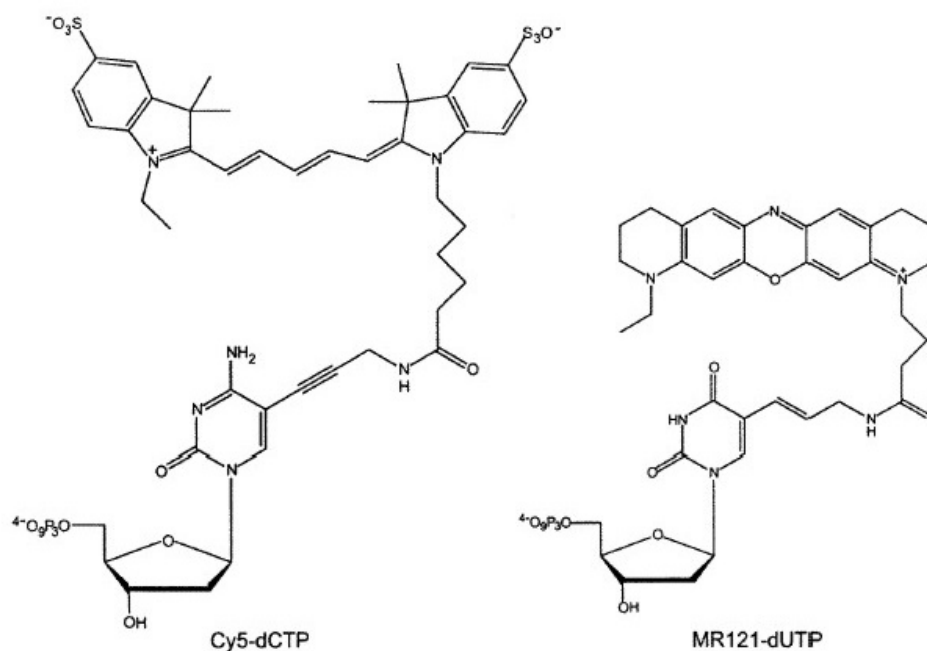


Abb. 3.2 Strukturformeln der farbstoffmarkierten Mononukleotide Cy5-dCTP und MR121-dUTP.

Das fluoreszierende Mononukleotid Cy5-dCTP stammt von Amersham Life Science (Braunschweig, Deutschland). Zur Synthese von MR121-dUTP wurde 5-(3-Aminoallyl)-dUTP [Langer 1981] mit dem entsprechenden N-Hydroxy-Succinimid Ester des MR121 [Boehringer 1991] verwendet. 10 µmol des 5-(3-Aminoallyl)-dUTP wurde in 0,5 ml 0,1 M Kaliumboratpuffer pH 8,5 gelöst, eine 5 µM Lösung des NHS-Ester in 1 ml aminfreies

Dimethylformamid wurde dazugegeben und anschließend wurde die Mischung für 15 h über Nacht bei Raumtemperatur stehengelassen. Die Lösungen wurden der Reihe nach unter Vakuum entfernt, der übrig gebliebene Rest in 2 ml destilliertem Wasser gelöst und auf die high performance liquid chromatography (HPLC) gegeben. Gereinigt wurde über einer RP18-Säule mit einem Gradienten 0-75 % Acetonitril in 0,1 M wassergelöstem Triethylammoniumacetat (TEAA).

Um die Konzentrationen zu bestimmen, wurden die Lösungen in einem UV/VIS-Absorptionsspektrometer (Carey 500 Scan, Varian, Darmstadt, Deutschland) gemessen.

Tabelle 3.2 zeigt einige spektroskopische Eigenschaften der verwendeten Mononukleotide bei 25 °C in Wasser [Sauer 1998]. Abbildung 3.3 zeigt eine Burststatistik über 250 Ereignisse. Aufgetragen sind Fluoreszenzlebensdauer gegen Burstsize, welche die Anzahl aller Photonen pro Burst darstellt.

	Absorptions- maximum [nm]	Emissions- maximum [nm]	Lebensdauer (10^{-8} M) [ns]	Lebensdauer (10^{-11} M) [ns]
Cy5-dCTP	615	670	$1,05 \pm 0,33$	$1,05 \pm 0,33$
MR121-dUTP	668	682	$2,07 \pm 0,59$	$2,04 \pm 0,66$

Tab. 3.2 Spektroskopische Eigenschaften der farbstoffmarkierten Mononukleotide Cy5-dCTP und MR121-dUTP gemessen in Wasser bei 25 °C.

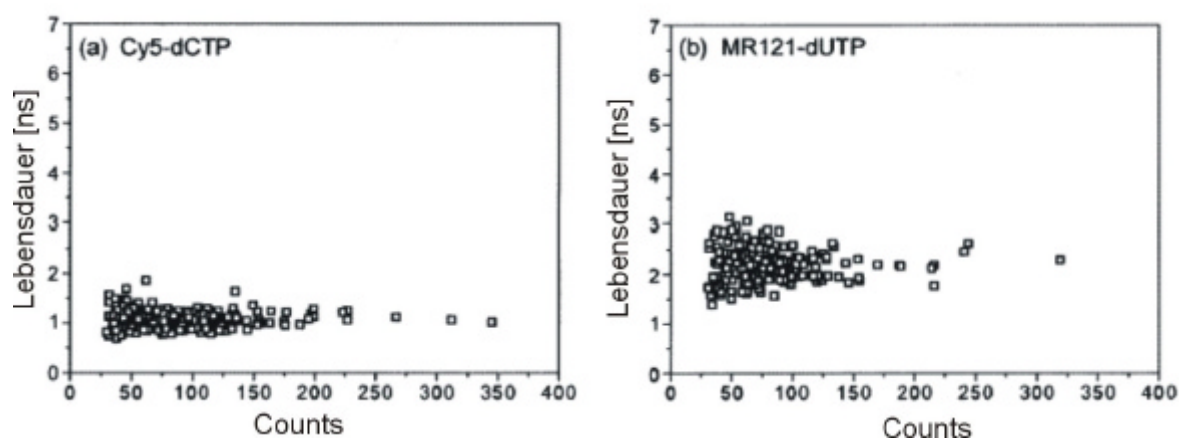


Abb. 3.3 Fluoreszenzlebensdauern aufgetragen gegen die Anzahl der Photonen pro Burst [Sauer 1998]. Die 250 Burstereignisse wurden mittels Maximum-Likelihood-Estimator (MLE) analysiert. Dabei wurden nur Bursts mit mehr als 30 Photonen berücksichtigt.

3.2 Polystyrolkugeln – „Beads“

Die als Beads oder Fluospheres bekannten ultrareinen Polystyrolkugeln sind gefüllt mit einer hohen Anzahl von Farbstoffen, die für die charakteristische Leuchtkraft der Beads sorgt. Durch die Abschirmung von Umgebungseffekten wird zusätzlich das Photobleaching der Farbstoffe reduziert. Diese Stabilität in Kombination mit der chemischen Neutralität der Oberflächenschicht wird oft in der Diagnostik ausgenutzt. So verdrängen beispielsweise fluoreszierende Microspheres in der Bestimmung des Blutflusses die seit 30 Jahren üblichen radioaktiv markierten Mikrospheres als Tracer [Van Oosterhout 1998]. In Versuchen mit Hunden konnte sogar gezeigt werden, dass die Fluospheres sich mehrere Monate im Wirtskörper aufhalten können, ohne dass es zu einem signifikanten Verlust der Auflösung oder der anschließenden Detektierbarkeit gekommen ist [Abel 1993]. Die in den Versuchen verwendeten 0,02 μm großen Beads (crimson fluorescent (625/645) *2% solids*) stammen von Molecular Probes, Netherlands, Europe BV. Die Oberfläche der Fluospheres ist Carboxylat modifiziert und zeigt daher eine negative und relativ hydrophile Oberfläche. Die Beads besitzen ihre effizienteste Anregung bei 633 nm, optimiert für den He-Ne-Laser. Abbildung 3.4 zeigt das Emissionsspektrum einiger Beads. Die Fluoreszenzemission der in den Versuchen verwendeten Beads ist als Nr. 7 markiert.

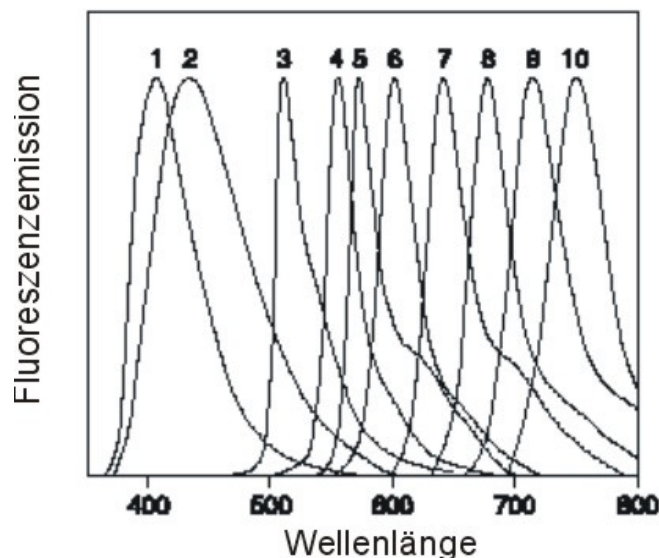


Abb. 3.4 Normalisierte Emissionsspektren verschiedener Fluospheres. Aus dem Produktinformationsblatt über Fluospheres (Molecular Probes, Netherlands). Die Namen geben Anregungs- und Emissionsmaxima in nm an: 1) blue (365/415), 2) blue (350/440), 3) yellow-green (505/515), 4) orange (540/560), 5) red-orange (565/580), 6) red (580/605), 7) crimson (625/645), 8) dark red (660/680), 9) far red (690/720) and 10) infrared (715/755).

3.3 Konfokaler Aufbau zur elektrophoretischen Einzelmoleküldetektion in Mikrokapillaren

Abbildung 3.5 zeigt eine schematische Darstellung des in den Versuchen verwendeten konfokalen Aufbaus zur Einzelmoleküldetektion in Mikrokapillaren (s. a. Kap. 2.4). Ein gepulster Diodenlaser (PDL800; Picoquant, Berlin, Germany) dient als Anregungsquelle. Der Laser emittiert bei einer Wellenlänge von 639 nm mit einer Repetitionsrate von 64 MHz und einer Pulsbreite kleiner 100 ps. Der kollimierte Laserstrahl passiert einen Anregungsfilter (639DF9; Omega Optics, Brattleboro, VT) und wird in ein inverses Mikroskop (modifiziertes Axiovert 35M mit 100 % Ausgang; Zeiss, Jena, Germany) eingekoppelt. Der Laserstrahl wird über einen dichroitischen Strahlteiler (645DLRP; Omega Optics, Brattleboro, VT) in ein Mikroskopobjektiv (100 X; NA = 1.4; Olympus, Tokyo, Japan) eingekoppelt. Die Laserintensität wird über ein OD-Filterrad eingestellt. Die Fluoreszenz wird über dasselbe Objektiv eingesammelt, über zwei Bandpassfilter (675RDF50; Omega Optics, Brattleboro, VT; 680HQ65; AF Analysentechnik, Tübingen, Germany) gefiltert und auf eine Avalanche Photodiode SPCM-AQR14; PerkinElmer, Canada) abgebildet, vor der eine 100 μm Lochblende platziert ist. Das Detektorsignal wird mittels einer PC Plug-in-Karte zum Time-Correlated Single-Photon Counting (TCSPC; SPC-630; Becker-Hickl, Berlin, Germany) im FIFO-Modus (First-In-First-Out) registriert. Der FIFO-Modus gewährleistet die Speicherung der makroskopischen und der mikroskopischen Zeit, aus der die Multi-Channel-Scaler (MCS) Zeitspuren bzw. die Fluoreszenzlebensdauer erstellt werden kann. Die Daten wurden mit einem gemeinsam mit Dr. Weston geschriebenen LabView-Programm aufgenommen und mit einem im Rahmen dieser Arbeit angefertigten Analysesoftware in LabView 5.1 (Evaluation Version 5.1, National Instruments, Germany) ausgewertet (s. Anhang).

Der Durchmesser des Detektionsvolumens ist durch die verwendete Lochblende und das Objektiv zu $\sim 1 \mu\text{m}$ definiert. Um die Detektion aller fluoreszierender Moleküle innerhalb der Glaskapillare zu gewährleisten, wurde ein so genannter „Femtotip“ verwendet. Diese konisch verlaufende Mikroinjektionskapillare (Femtotip I oder II, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Deutschland) mit einem Innendurchmesser von $500 \pm 200 \text{ nm}$ am spitzen Ende dient in der Regel zur Zellinjektion. Hier taucht die Spitze in einen Glyzerintropfen, der sich auf einem Deckglas oberhalb des Mikroskopobjektivs eines konfokalen, inversen Fluoreszenzmikroskops befindet. Die Einzelmolekülprobe wird von hinten in den Femtotip injiziert. Die zeitaufgelöste Detektion erfolgt in der Kapillare, kurz vor der Öffnung, so dass alle vorbeiwandernden Moleküle detektiert werden. Der Femtotip wird mit Hilfe einer CCD-

Kamera und einer x,y,z-Nanometerpositioniereinheit (ESA-CXA-Set; Newport Corporation, Irvine, CA) justiert. Bei negativ geladenen Analytmolekülen befindet sich die Platin-Anode im Glyzerintropfen außerhalb des Femtotips und die Platin-Kathode im Femtotip. Abbildung 3.6 zeigt ein CCD-Bild eines Femtotips. Alle Experimente wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

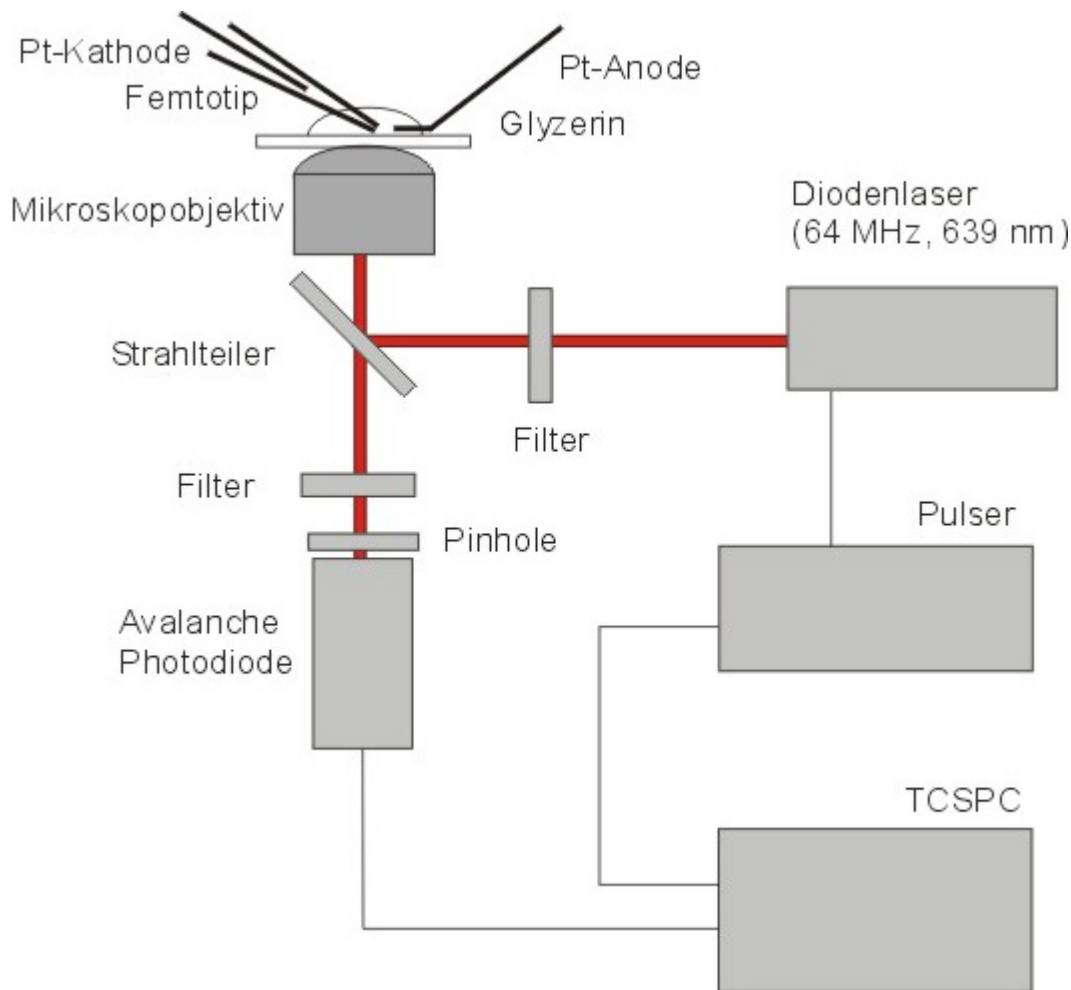


Abb. 3.5 Schematischer Aufbau der Anordnung zur Elektrophorese und Detektion in Mikrokapillaren. Der Laserstrahl eines Diodenlasers wird über einen dichroitischen Strahlteiler in ein Mikroskopobjektiv eingekoppelt. Das Fluoreszenzsignal wird über dasselbe Objektiv eingesammelt und mittels einer Avalanche-Photodiode detektiert, vor der eine Lochblende positioniert ist. Eine PC Plug-in-Karte zum Time-Correlated Single-Photon Counting (TCSPC; SPC-630; Becker-Hickl, Berlin, Germany) registriert die Daten im FIFO-Mode (First-In-First-Out).

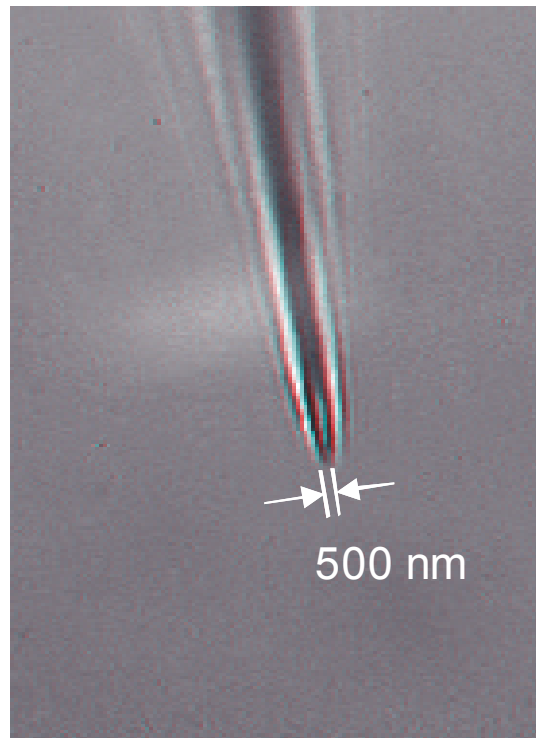


Abb. 3.6 CCD-Aufnahme einer Mikrokapillare. Der Laserstrahl wird auf die vordere Spitze fokussiert. Dadurch ist gewährleistet, dass jedes einzelne Molekül detektiert wird.

3.4 Zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen

Die Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauern basiert auf dem Prinzip des zeitkorrelierten Einzelphotonenzählens (TCSPC) [O'Conner 1984].

Hierbei wird die Zeit gemessen, die ab der Anregung durch einen Laserpuls bis zum Eintreffen des ersten Photons am Detektor verstreicht. Diese Zeit entspricht der Verweilzeit der Moleküle im elektronisch angeregten Zustand. Da die Repetitionsrate der Pulse mit 64 MHz sehr hoch und die Totzeit des Detektors mit etwa 50 ns kurz ist, kann schnell eine statistische Verteilung erstellt werden. Somit wird eine Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer innerhalb einzelner Photonenschauer (engl. Bursts) möglich, sofern eine Mindestanzahl von etwa 30 Photonen gezählt wird. Konzentration und Anregungsleistung sollten so eingestellt sein, dass nur bei jedem zwanzigsten Puls ein Fluoreszenzphoton gemessen wird [O'Connor 1984]. Bei zu großer Anregungsintensität treffen mehr als ein Photon pro Puls auf den Detektor. Das erste auftreffende Photon bestimmt die Lebenszeit, die bei vielen Ereignissen dadurch systematisch zu kürzeren Zeiten verschoben wird und zum so genannten Pile-Up-Effekt führen [Lakowicz 1991]. In den Versuchen wurde im invertierten

Modus gearbeitet, bei dem das detektierte Photon das Startsignal und der Laserpuls das Stoppsignal ist, um die Totzeit der Karte zu umgehen. Die Fluoreszenzlebenszeiten liegen typischerweise im Bereich von Nanosekunden. Abbildung 3.7 zeigt ein Beispiel einer zeitaufgelösten Einzelmolekülmessung in Lösung. Die Auswertung der Abklingkurven der einzelnen angeregten Farbstoffmoleküle (s. Inlet) erfolgt über einen Maximum-Likelihood-Schätzer (MLE), der auf einer monoexponentiellen Beziehung basiert [Soper 1995].

$$1 + \frac{1}{\exp\left(\frac{T}{t}\right) - 1} - \frac{m}{\exp\left(\frac{m \cdot T}{t}\right) - 1} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^m i \cdot N_i \quad (\text{Gleichung 3.1})$$

T repräsentiert die zeitliche Breite der einzelnen Kanäle, m die Anzahl der Kanäle, N die Gesamtzahl der histogrammierten Photonen und N_i die Anzahl der Photonen im Kanal i .

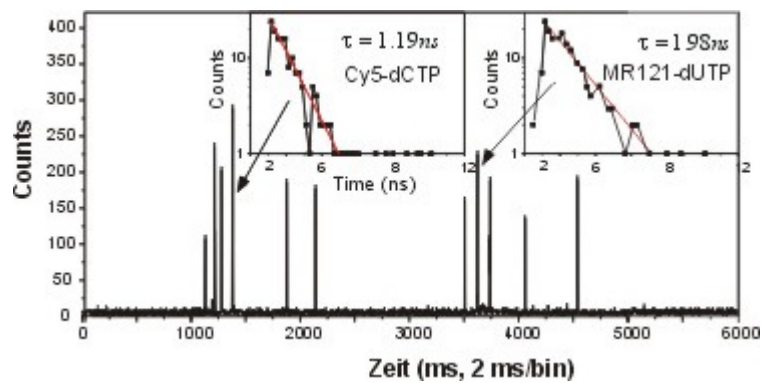


Abb. 3.7 Einzelmolekülereignisse in der Mikrokapillare. Werden die mikroskopischen Zeiten der FIFO-Daten pro Photonenschauer histogrammiert kann die Lebensdauer bestimmt werden. Beispiele für Cy5-dCTP und MR121-dUTP sind gezeigt. Die Messungen sind bei einer Konzentration von 10^{-11} M gemacht.

3.5 Femtopuffer

Für die Femtotipmessungen zur Mehrfachdetektion wurde ein spezieller Puffer verwendet. Durch Zusatz von Polyvinylpyrrolidon (PVP) und Tween 20 werden die Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Molekülen und der Gefäßwand minimiert [Sauer 1997]. Die Verwendung von Tris (Trishydroxymethylaminomethan) und Borsäure als ionische Bestandteile sichert durch die großen Ionen einen geringen Ionenstrom.

- 20 mM Tris-Borat-Lösung pH 8,4
- 3 % Polyvinylpyrrolidon (PVP)
- 30 % Glyzerin
- 0,1 % Tween 20

Alle Pufferlösungen wurden vor Gebrauch über Anotrop™ 10-Filter Whatman® (0,02 µm) gefiltert, zum einen, um die Sterilität der Proben zu gewährleisten, zum anderen, um evt. vorhandene größere Verunreinigungen zu entfernen, die sich sonst in der Mikrokapillare festsetzen könnten.

3.6 Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie

3.6.1 Autokorrelation

Unter Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS, engl. fluorescence correlation spectroscopy) versteht man die Analyse der zeitlichen Fluktuationen zweier Fluoreszenzsignale. Stammen beide Fluoreszenzsignale von einem Detektor - um eine bestimmte Korrelationszeit zueinander verschoben – spricht man von Autokorrelation. Charakteristische Abklingkurven in der Fluoreszenz-Korrelations-Funktion liefern Informationen bezüglich der Diffusionszeit von Analytmolekülen in Lösungen, bezüglich des Intersystem Crossing, über chemische Reaktionen wie Protonierung [Haupts 1998], über Isomerisation [Widengren 2000] und sogar über das Rotationsverhalten von Molekülen [Rigler 1999]. Diese Methoden basieren auf zufälligen Schwankungen im Fluoreszenzsignal. Im Gegensatz dazu, liefert die Autokorrelation eines periodischen Signals die Frequenz dieser Oszillation.

Im Falle zweier Detektoren handelt es sich um die Kreuzkorrelation.

Die Intensitätsfluktuation $\delta F(t)$ ist definiert als Abweichung des von Molekülen emittierten Fluoreszenzlichts $F(t)$ von der durchschnittlichen Intensität:

$$\mathbf{d}F(t) = F(t) - \langle F(t) \rangle \quad (\text{Gleichung 3.2})$$

Darüber definiert sich die normierte Korrelationsfunktion wie folgt:

$$G(\mathbf{t}) = \frac{\langle F_1(t) \cdot F_2(t + \mathbf{t}) \rangle}{\langle F_1(t) \rangle \cdot \langle F_2(t) \rangle} \quad (\text{Gleichung 3.3})$$

oder äquivalent für die Fluoreszenzfluktuationen

$$G(\mathbf{t}) = \frac{\langle \mathbf{d}F_1(t) \cdot \mathbf{d}F_2(t + \mathbf{t}) \rangle}{\langle F_1(t) \rangle \cdot \langle F_2(t) \rangle}. \quad (\text{Gleichung 3.4})$$

Ist $F_1 = F_2$, handelt es sich um eine Autokorrelationsfunktion.

Ist $F_1 \neq F_2$, handelt es sich um eine Kreuzkorrelationsfunktion.

Zur Herleitung der Autokorrelationsfunktion wird zunächst das Fluoreszenzlicht betrachtet:

$$F(t) = g \cdot Y \cdot \epsilon \int I(r) \cdot C(r, t) \cdot CEF(r) d^3r \quad (\text{Gleichung 3.5})$$

Der Faktor g gibt die Detektionseffizienz der Avalanche-Photodiode (APD) wieder, ϵ und Y den Absorptionskoeffizienten bzw. die Quantenausbeute des Fluorophors. I ist die Laserintensität an der Stelle r , C die Konzentration und CEF die so genannte Funktion der Einsammeleffizienz (engl.: collection efficiency function).

Das Produkt im Integral

$$p(r) = I(r) \cdot CEF(r) \quad (\text{Gleichung 3.6})$$

gibt die Molekül-Detektions-Effizienz wieder. Für ein Gaußsches Anregungsprofil ergibt sich

$$p(r) = I_0 \exp\left(\frac{-2(x^2 + y^2)}{w_0^2}\right) \exp\left(\frac{-2z^2}{w_0^2}\right). \quad (\text{Gleichung 3.7})$$

Hier sind I_0 die Intensität im Strahlzentrum und w_0 die Strahltaile im Fokus.

Für eine Autokorrelation gilt dann:

$$G(\mathbf{t}) = 1 + \frac{\iint p(r) \cdot p(r) \cdot \mathbf{f}(r, r', \mathbf{t}) d^3 r \cdot d^3 r'}{\langle C \rangle^2 \cdot \left[\int p(r) d^3 r \right]^2} \quad (\text{Gleichung 3.8})$$

oder ohne die Normierung auf den Mittelwert:

$$G(\mathbf{t}) = \frac{\iint p(r) \cdot p(r) \cdot \mathbf{f}(r, r', \mathbf{t}) d^3 r \cdot d^3 r'}{\langle C \rangle^2 \cdot \left[\int p(r) d^3 r \right]^2} \quad (\text{Gleichung 3.9})$$

mit dem Fluktuationsterm der Konzentration

$$\mathbf{f}(r, r', \mathbf{t}) = \langle \partial C(r, 0) \cdot \partial C(r', \mathbf{t}) \rangle. \quad (\text{Gleichung 3.10})$$

Als Beispiel für die Autokorrelationsfunktion wird im folgenden die Diffusion gemäß dem 2.Fickschen Gesetz betrachtet:

$$\partial_t C(r, t) = D \cdot \Delta C(r, t) \quad (\text{Gleichung 3.11})$$

oder für die Konzentrationsfluktuationen

$$\partial_t \mathbf{d}C(r, t) = D \cdot \Delta \mathbf{d}C(r, t) \quad (\text{Gleichung 3.12})$$

Nach einer Fouriertransformation lässt sich diese Gleichung im k-Raum lösen:

$$\partial_t \mathbf{d}C(k, t) = -D \cdot k^2 \cdot \mathbf{d}C(k, t) \quad (\text{Gleichung 3.13})$$

oder

$$\mathbf{d}C(k, t) = \mathbf{d}C(k, 0) \exp(-D \cdot k^2 \cdot t) \quad (\text{Gleichung 3.14})$$

Für Gleichung 3.10 ergibt sich dann:

$$\mathbf{f}(r, r', t) = F_k^{-1} \left(\exp(-D \cdot k^2 \cdot t) \cdot F_{r''} \left(\langle \partial C(r, 0) \cdot \partial C(r'', 0) \rangle \right) \right) \quad (\text{Gleichung 3.15})$$

Der Index bei der Fouriertransformation kennzeichnet die Integrationsvariable. Zum Zeitpunkt $\tau = 0$ kann diese Gleichung nur von Null verschieden sein, wenn beide Orte zusammenfallen:

$$\mathbf{f}(r, r', 0) = \langle C \rangle \cdot \mathbf{d}(r - r') \quad (\text{Gleichung 3.16})$$

wobei δ die Diracsche Deltafunktion darstellt. Für den Fluktuationsterm mit $\tau > 0$ gilt dann:

$$\mathbf{f}(r, r', t) = \langle C \rangle \cdot (4 \cdot \mathbf{p} \cdot D \cdot t)^{-\frac{3}{2}} \exp\left(-\frac{(r - r')^2}{4 \cdot D \cdot t}\right) \quad (\text{Gleichung 3.17})$$

Diese Gleichung ergibt eingesetzt in Gleichung 3.9 die Autokorrelation für den Fall der Diffusion:

$$G(\mathbf{t}) = \frac{1}{N} \cdot \left(1 + \frac{\mathbf{t}}{\mathbf{t}_D}\right)^{-1} \cdot \left(1 + \frac{w_0^2}{z_0^2} \cdot \frac{\mathbf{t}}{\mathbf{t}_D}\right)^{-\frac{1}{2}} \quad (\text{Gleichung 3.18})$$

mit $\mathbf{t}_D = \frac{w_0^2}{4 \cdot D}$ als der Diffusionszeit und $N = \mathbf{p}^{\frac{3}{2}} \cdot w_0^2 \cdot z_0 \cdot \langle C \rangle$ die Anzahl der Moleküle im Messvolumen.

Bei Diffusionsmessungen muss im allgemeinen die oben stehende Autokorrelationsfunktion noch um den so genannten Tripletterm erweitert werden, da die Zeitbereiche unter $10 \mu\text{s}$ oft durch Tripletzustände gekennzeichnet sind [Widengren 1995]. Die Übergänge in den Triplet können durch ein einfaches Drei-Zustände-Modell beschrieben werden. Dabei steigt die

Amplitude $T_{eq} / (1 - T_{eq})$ mit steigender Laserleistung, bis die Sättigung erreicht ist, während die charakteristische Tripletzeit sinkt. T_{eq} ist die Anzahl der Moleküle im nicht fluoreszierenden Triplet.

$$G(t) = \frac{1}{N} \cdot \left(\left(1 + \frac{t}{t_D} \right)^{-1} \cdot \left(1 + \frac{w_0^2}{z_0^2} \cdot \frac{t}{t_D} \right)^{-\frac{1}{2}} + \frac{T_{eq}}{1 - T_{eq}} \cdot \exp\left(-\frac{t}{t_{eq}}\right) \right) \quad (\text{Gleichung 3.19})$$

mit τ_{eq} als der charakteristischen Tripletzeit.

Da die charakteristische Tripletzeit in Wasser nur einige μs beträgt [Widengren 2001], spielen sie für Kreuzkorrelationsmessungen keine Rolle, da sich die typischen Transitionszeiten zwischen den beiden Detektionsvolumina im ms-Bereich abspielen.

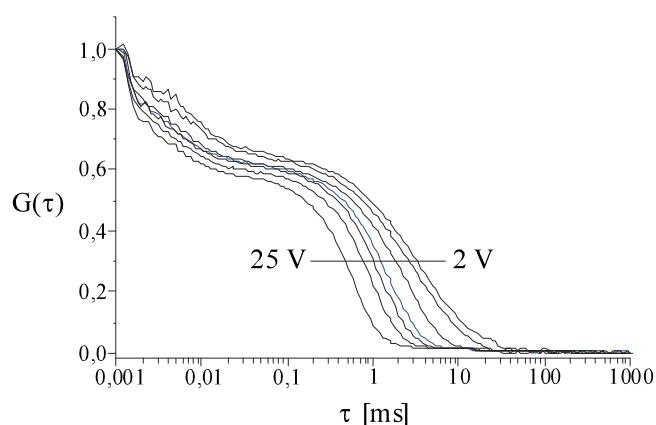


Abb. 3.8 zeigt eine typische Autokorrelationsfunktion einer Kapillarelektrophorese von Cy5 in der Mikrokapillare in Abhängigkeit der angelegten Spannung. Der Wendepunkt um 1 ms gibt die durchschnittliche Diffusionszeit wieder, die sich ein Molekül im Detektionsfokus befindet. Mit steigender Spannung sinkt auch die Verweilzeit der Analytmoleküle im Detektionsvolumen.

3.6.2 Kreuzkorrelation

Ein Beispiel für die Kreuzkorrelation ist die sog. Zweifarben-Korrelation [Bacia 2002]: Das von der Analytprobe emittierte Fluoreszenzlicht wird über einen dichroitischen Strahlteiler in zwei Spektralbereiche aufgeteilt, separat detektiert und dann kreuzkorreliert. Damit lassen sich z. B. zwei spektral unterschiedlich fluoreszenzmarkierte Sonden gleichzeitig messen. Sind die beiden Sonden gleichzeitig im Anregungsvolumen, wird die Kreuzkorrelationsfunktion positiv.

Um Transporterscheinungen zu messen, wird eine räumliche Kreuzkorrelation verwendet. Statt eines Volumenelementes sind zwei vorhanden, die räumlich und damit zeitlich getrennt

sind. In der Strömungsforschung gibt es ein ähnliches Verfahren, die 2-Fokus-Velocimetrie [Schodl 1986], die nach dem Time-of-Flight-Prinzip arbeitet: Ein durch das erste Detektionsvolumen strömende Analytmolekül startet eine Uhr, die gestoppt wird, wenn die zweite Detektionseinheit erreicht ist. Naturgemäß ergibt sich eine Verteilungskurve um eine mittlere Durchflusszeit, da die Detektionsvolumina eine endliche Ausdehnung besitzen und die Trajektorien der Analytmoleküle untereinander variieren. Ein Nachteil dieser Methode ist die relativ hohe Fehlmessungsrate, die dadurch entsteht, dass viele Analytmoleküle nur einen der beiden Detektionsvolumina passieren. Ein zweiter Nachteil ist, dass die Fokaldurchmesser im Vergleich zur Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie mit mindestens 10 μm recht groß sind. Die Korrelationsanalyse besitzt gegenüber den Time-of-Flight-Messungen den Vorteil, statistische Veränderungen des Messsignals bereits im Vorfeld zu berücksichtigen, indem die Transportgleichungen mathematisch als Fluktuationsgleichungen beschrieben werden.

Gemäß Gleichung 3.9 lässt sich die Kreuzkorrelationsfunktion wie folgt schreiben:

$$G(\mathbf{t}) = \frac{\iint p_1(\mathbf{r}) \cdot p_2(\mathbf{r}') \cdot \mathbf{f}(\mathbf{r}, \mathbf{r}', \mathbf{t}) d^3 r \cdot d^3 r'}{\langle C \rangle^2 \cdot \int p_1(\mathbf{r}) \cdot d^3 r \cdot \int p_2(\mathbf{r}') \cdot d^3 r'} \quad (\text{Gleichung 3.20})$$

Bei der räumlichen Kreuzkorrelation unterscheiden sich die Molekül-Detektions-Effizienzen $p_1(\mathbf{r})$ und $p_2(\mathbf{r})$ um den Abstand R zwischen beiden Detektionsvolumina

$$p_1(\mathbf{r}) = I_{01} \exp\left(\frac{-2(x^2 + y^2)}{w_0^2}\right) \exp\left(\frac{-2z^2}{w_0^2}\right) \quad (\text{Gleichung 3.21})$$

$$p_2(\mathbf{r}') = I_{02} \exp\left(\frac{-2(x'^2 + y'^2 - R^2)}{w_0^2}\right) \exp\left(\frac{-2z'^2}{w_0^2}\right) \quad (\text{Gleichung 3.22})$$

Bei dieser Rechnung wird davon ausgegangen, dass sich die z-Komponente nicht ändert. Dies ist allerdings nur der Fall, wenn die Analytmoleküle einen fest vorgeschriebenen Kanal wie z.B. eine Kapillare durchlaufen.

Für den Transport zwischen zwei räumlich getrennten Detektionsvolumina erweitert sich die Diffusionsgleichung um einen Strömungsterm mit der Geschwindigkeit v :

$$\partial_t \mathbf{d}C(r, t) = D \cdot \Delta \mathbf{d}C(r, t) - v \cdot \nabla \mathbf{d}C(r, t). \quad (\text{Gleichung 3.23})$$

Gleichung 3.14 wird dann zu

$$\mathbf{d}C(k, t) = \mathbf{d}C(k, 0) \exp((-D \cdot k^2 + i \cdot v \cdot k) \cdot t) \quad (\text{Gleichung 3.24})$$

und der Fluktuationsterm wird zu

$$f(r, r', t) = \langle C \rangle \cdot (4 \cdot \mathbf{p} \cdot D \cdot \mathbf{t})^{-\frac{3}{2}} \exp\left(-\frac{(r - r' + v \cdot \mathbf{t})^2}{4 \cdot D \cdot \mathbf{t}}\right). \quad (\text{Gleichung 3.25})$$

Setzt man $p_1(r)$, $p_2(r)$ und ϕ in die Kreuzkorrelationsfunktion ein und integriert, ergibt sich:

$$G(\mathbf{t}) = \left(\langle C \rangle \cdot w_0^2 \cdot z_0 \cdot \mathbf{p}^{\frac{3}{2}} \left(1 + \frac{4 \cdot D \cdot \mathbf{t}}{w_0^2} \right) \cdot \sqrt{1 + \frac{4 \cdot D \cdot \mathbf{t}}{z_0^2}} \right)^{-1} \cdot \exp\left(-\frac{(v_{xy} \cdot \mathbf{t} - R)^2}{4 \cdot D \cdot \mathbf{t} + w_0^2} - \frac{v_z^2 \cdot \mathbf{t}^2}{4 \cdot D \cdot \mathbf{t} + z_0^2} \right), \quad (\text{Gleichung 3.26})$$

wobei v_{xy} , v_z die Strömungsgeschwindigkeiten in x, y bzw. in z-Richtung und $R = R_x e_x + R_y e_y$ der Abstandsvektor zwischen den beiden Detektionsvolumina sind.

Berücksichtigt man noch, dass der Fluss in z-Richtung für die Experimente vernachlässigt werden kann, gilt $v_z = 0$ und $v_{xy} = v$.

Mit den Abkürzungen N , τ_D und α - dem Winkel zwischen Flussvektor und Abstandsvektor $R = \tau_F \cdot v$ ergibt sich für die Kreuzkorrelationsfunktion [Brinkmeier 1999]:

$$G(\mathbf{t}) = \left(N \left(1 + \frac{\mathbf{t}}{\tau_D} \right) \sqrt{1 + \frac{w_0^2}{z_0^2} \cdot \frac{\mathbf{t}}{\tau_D}} \right)^{-1} \exp\left(-\frac{v^2}{w_0^2} \cdot \frac{\mathbf{t}^2 + \tau_F^2 - 2 \cdot \mathbf{t} \cdot \tau_F \cdot \cos \alpha}{1 + \frac{\mathbf{t}}{\tau_D}} \right) \quad (\text{Gleichung 3.27})$$

Bei reinem Fluss vereinfacht sich die Kreuzkorrelationsfunktion zu:

$$G(\mathbf{t}) = \frac{1}{N} \exp\left(-\frac{v^2}{w_0^2} \cdot (\mathbf{t}^2 + \tau_F^2 - 2 \cdot \mathbf{t} \cdot \tau_F \cdot \cos \alpha) \right) \quad (\text{Gleichung 3.28})$$

3.6.3 Einfluss des Fluoreszenzsignals auf die Kreuzkorrelation

Um Transporterscheinungen in Mikrokanälen zu messen, wird eine räumliche Kreuzkorrelation verwendet. Statt eines Volumenelementes sind zwei vorhanden, die räumlich und damit zeitlich getrennt sind. Zur Analyse werden die Signale beider Detektoren miteinander kreuzkorreliert [Guenard 1997; Brinkmeier 1999; LeCaptain 2002]. Da jedoch in den meisten Fällen eine Hardware-Korrelatorkarte zum Einsatz kommt, die nur die Kreuzkorrelation angibt, lässt sich ein Einfluss der Originalsignalspur auf die Berechnung der Kreuzkorrelation schwer abschätzen. Im folgenden soll anhand von schematischen Simulationen demonstriert werden, inwiefern die Kreuzkorrelationsfunktion beeinflusst wird durch

- die Höhe der Bursts,
- die Breite der Bursts,
- das Binning der Spuren,
- Normierung der Spuren,
- Längen der Spuren.

Sind die Signale im einfachsten Fall Rechteckpulse der Breite 1 und Höhe 1, dann liefert die Kreuzkorrelation der beiden Spuren gerade die Verschiebung der beiden Signale zueinander, wobei keine Normierung notwendig ist. In Abbildung 3.9 ist die Kreuzkorrelation durch den Faltungoperator \otimes gekennzeichnet. Das Signal in der ersten Spur (ganz links) bei Kanal 3 und das der zweiten Spur bei Kanal 5 (Mitte) ergibt in der Kreuzkorrelation (ganz rechts) einen Peak bei Kanal 2 mit der Breite 1 und der Höhe 1.

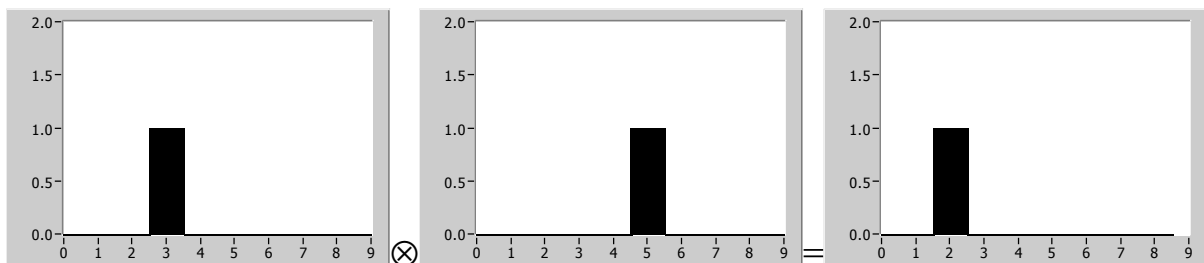


Abb. 3.9 Schematische Simulation der Kreuzkorrelationsfunktion zweier Rechtecksignale. Die Kreuzkorrelation (ganz rechts) errechnet die Verschiebung zwischen Spur 1 und 2.

Da die Kreuzkorrelationsfunktion ein Produkt zweier zueinander verschobener Signale darstellt, ändert sich ihre Höhe, sobald auch die Höhe der Signale variiert. Zählt z.B. ein Burst

mehr als ein Photon, wird dies auch in der Kreuzkorrelation sichtbar. Abbildung 3.10 zeigt den Zusammenhang zwischen Bursthöhen und Höhe des Kreuzkorrelationspeaks. Das Produkt der beiden Bursthöhen spiegelt sich in der Höhe des Kreuzkorrelationspeaks wieder.

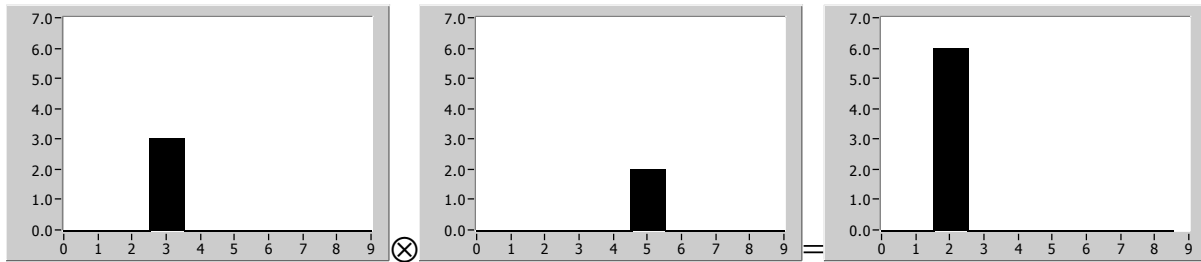


Abb. 3.10 Einfluss der Bursthöhe auf die Kreuzkorrelationsfunktion.

Ebenso kann die Burstbreite variieren, je nachdem z.B. wie lange ein Farbstoff durch den Fokus wandert. Dabei errechnet sich bei gegebenen Burstbreiten n , m die maximale Breite des Kreuzkorrelationspeaks b zu

$$m + (n-1) = b \quad (m \geq n) \quad (\text{Gleichung 3.29})$$

Abbildung 3.11 zeigt die Kreuzkorrelation in Abhängigkeit der Burstbreite. Durch die breiteren Bursts entsteht in der Kreuzkorrelation ein zusätzlicher „Offset“ neben dem Maximum. Außerdem lässt sich im Vergleich mit Abb. 3.9 sehen, dass nun die Höhe des Maximums gestiegen ist.

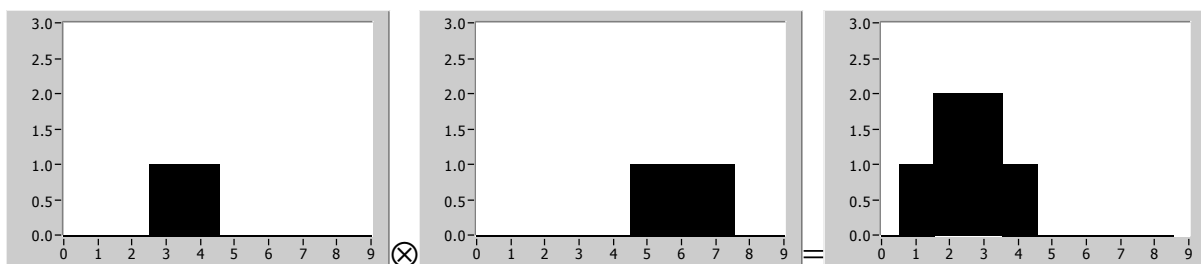


Abb. 3.11 Einfluss der Burstbreite auf die Kreuzkorrelation.

Ein noch stärkerer Einfluss auf die Kreuzkorrelation lässt sich zeigen, wenn Burstbreite und Bursthöhe variiert werden. Da in der Kreuzkorrelation jeder Kanal der ersten Spur mit den Kanälen einer verschobenen zweiten Spur multipliziert und dann aufaddiert wird, kann der Kreuzkorrelationspeak sehr von der einfachsten Form in Abb. 3.9 abweichen. Variiert die Form der Bursts innerhalb der beiden Spuren, so kann dies leicht zu einer Fehlinterpretation

führen. Abbildung 3.12 zeigt eine Kombination aus Burstbreiten-Höhen-Variation im Vergleich zu der einfachsten Form ohne Verbreiterung.

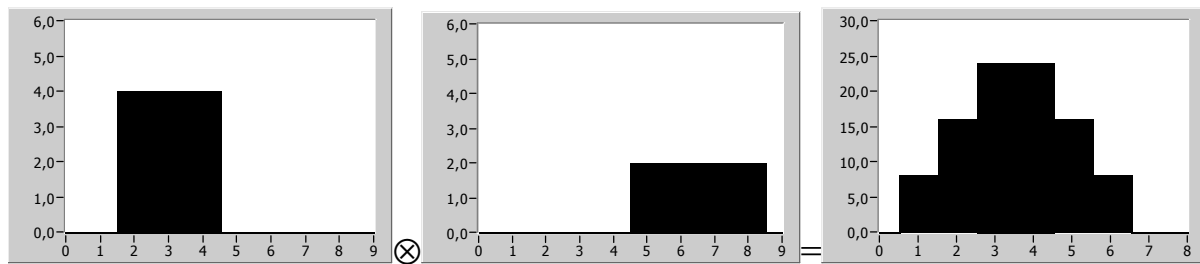


Abb. 3.12 Kreuzkorrelation in Abhängigkeit von Höhe und Breite.

In diesem Beispiel sei angenommen, dass zwei Analytmoleküle zuerst durch den ersten und dann durch den zweiten Detektionsvolumen laufen, wobei für das erste korrespondierende Paar eine Verschiebung von 3 und für das zweite Paar eine von 8 Kanälen simuliert wurde.

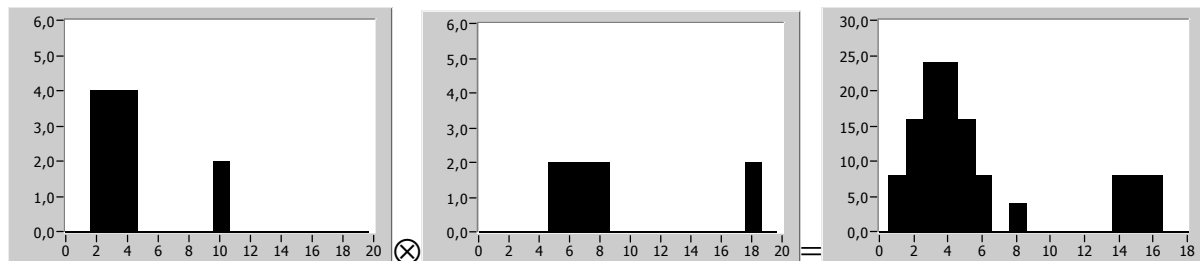


Abb. 3.13 Mögliche Fehlinterpretation der Kreuzkorrelation.

Die Kreuzkorrelation der beiden Spuren demonstriert eindrucksvoll, dass nur die Verschiebung des ersten Paares dominiert, während die Korrelationszeit des zweiten Paares bei Kanal 8 sogar gegen die vermeintlich falsche Kreuzkorrelation bei Kanal 15 zwischen dem ersten Peak der ersten Spur und dem zweiten Peak der zweiten Spur verschwindend gering ist. Ohne Information der Originalspuren könnte die Kreuzkorrelation falsch interpretiert werden. Daher wurden die Auswertungen der Signalspuren nicht von der Hardware-Kreuzkorrelator-Karte übernommen, da hier nur die „fertige“ Kreuzkorrelationsfunktion abgespeichert wurde, sondern mittels eines selbst geschriebenen Programms mit FIFO-Daten (s. Anhang) durchgeführt.

Um sicher zu gehen, dass durch eine Software basierte Auswertung im Gegensatz zur Hardware gestützten Analyse keine Information verloren geht, wurde die Kreuzkorrelation in Abhängigkeit des Binnings simuliert. Da die Korrelatorkarte eine zeitliche Auflösung von etwa 300 ns besitzt, wurde für ihre Simulation eine 10-fach höhere Auflösung als die für die Software basierte Auswertung gewählt. Die Abbildungen 3.14 und 3.15 zeigen die simulierten

Kreuzkorrelationen für je zwei korrespondierende Paare mit einer Verschiebung von 2 bzw. 20 Kanälen. Es zeigt sich, dass die 10-fach höhere Auflösung zwar ein besser aufgelöstes Maximum liefert, aber die Position und das Verhältnis zum zweiten Kreuzkorrelationspeak ist dasselbe. Da in den Experimenten typische Transitzeiten von einigen ms gemessen wurden, sollte eine Software gestützte Auswertung vollkommen ausreichen.

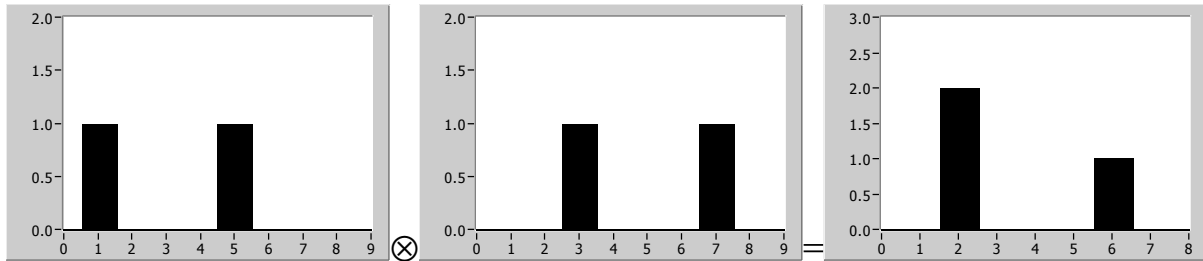


Abb. 3.14 Einfluss des Binnings. Mit den FIFO-Daten ist die zeitliche Auflösung etwa 10 mal größer als mit der Korrelatorkarte.

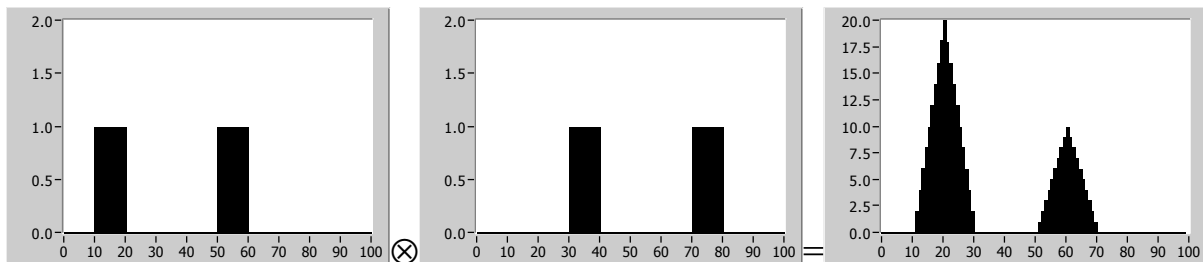


Abb. 3.15 Die Hardware-Korrelation wird durch eine 10-fach höhere Auflösung simuliert.

In der Regel werden Korrelationsfunktionen normiert, damit statistisch häufige Signale verstärkt und alle anderen herausgemittelt werden. Die Simulationen in Abbildung 3.16 und 3.17 zeigen die äquivalenten Ergebnisse. Es fällt auf, dass die nicht korrelierenden Zeiten negative Werte annehmen. Sind die beiden zu korrelierenden Spuren lang genug, mitteln sich die falschen Korrelationspeaks und die nicht korrelierenden Zeiten heraus.

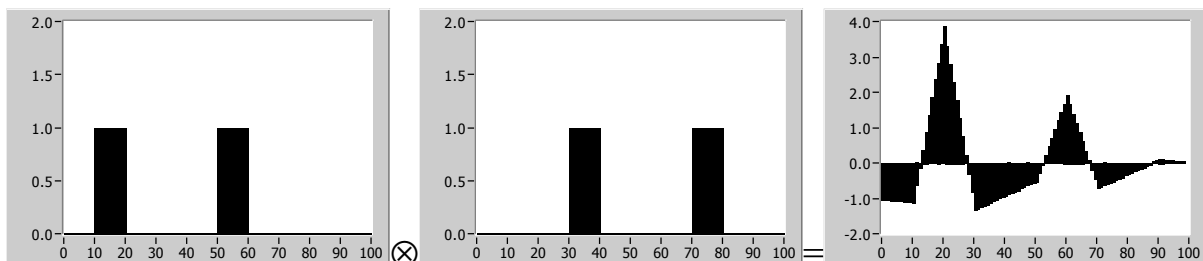


Abb. 3.16 Einfluss der Normierung bei der Hardware-Korrelation.

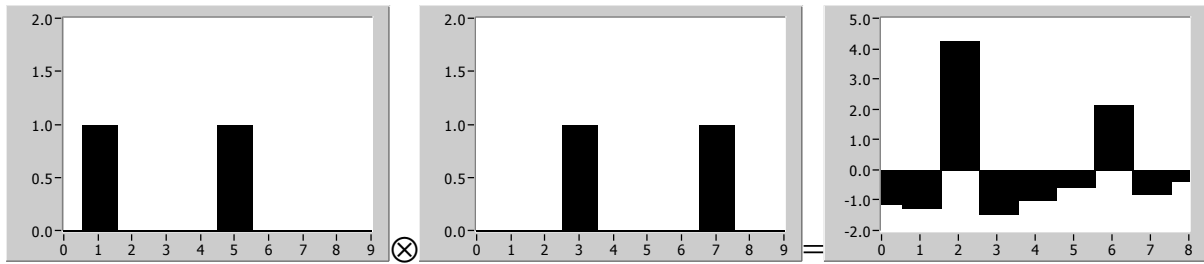


Abb. 3.17 Einfluss der Normierung bei der Software-Korrelation.

Wird die Normierung auf das Beispiel aus Abb. 3.13 angewendet, zeigt sich sogar, dass die Verschiebungszeit von 8 ins Negative verschwindet. Die Normierung verstärkt hier die Unterschiede der Kreuzkorrelationspeaks aufgrund der Burstformen der ursprünglichen Spuren.

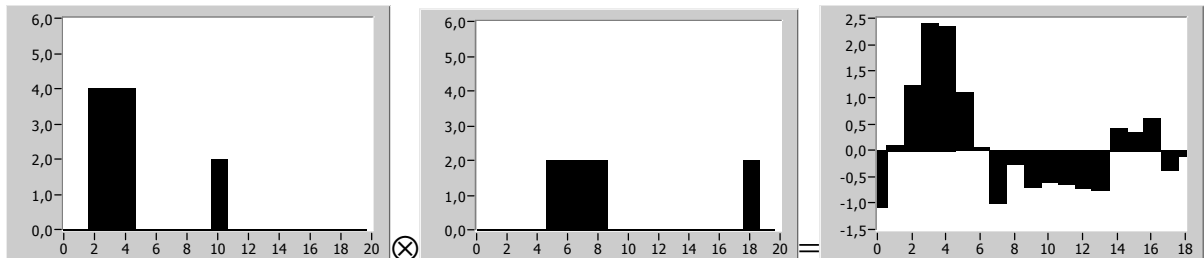


Abb. 3.18 Einfluss der Normierung bei unterschiedlichen Burstformen.

Im letzten Beispiel wird gezeigt, dass unterschiedliche Längen der Spuren das Kreuzkorrelationsergebnis ebenfalls verfälschen können. Hier ist die erste Spur um einen Kanal länger als die zweite.

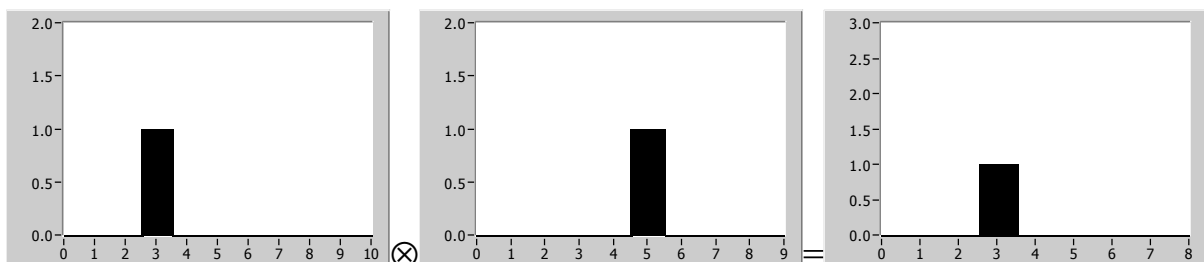


Abb. 3.19 Einfluss von unterschiedlichen Spurlängen auf die Kreuzkorrelation.

3.7 Beschichtung mit Polyethylenglykol (PEG)

In Beschichtungsexperimenten wurde Polyethylenglykol (PEG) verwendet.

4-ärmiges Polyethylenglykol stammt vom PEG-Shop (Südkorea). Das sternenförmige PEG hat ein Molekulargewicht von ~ 10000 g/mol. Das PEG wurde in voll entsalztem Wasser in einer Konzentration von 5 mg/ml gelöst. Das verwendete tetrafunktionale PEG-Isocyanat hat einen Pentaerythritolkern. Die Reinheit beträgt $>83\%$.

Um die Deckgläser mit PEG zu beschichten, d.h. mit ausreichend hoher Vernetzung der PEG-Moleküle, wirkte die PEG-Schicht 24 Stunden lang ein. Die in den Versuchen verwendeten Deckgläser stammen von der Firma Roth (26 x 76cm, Roth, Karlsruhe).

Beschichtet wurde bei Raumtemperatur. Weitere Behandlung mit Chemikalien oder im Ofen waren nicht notwendig.

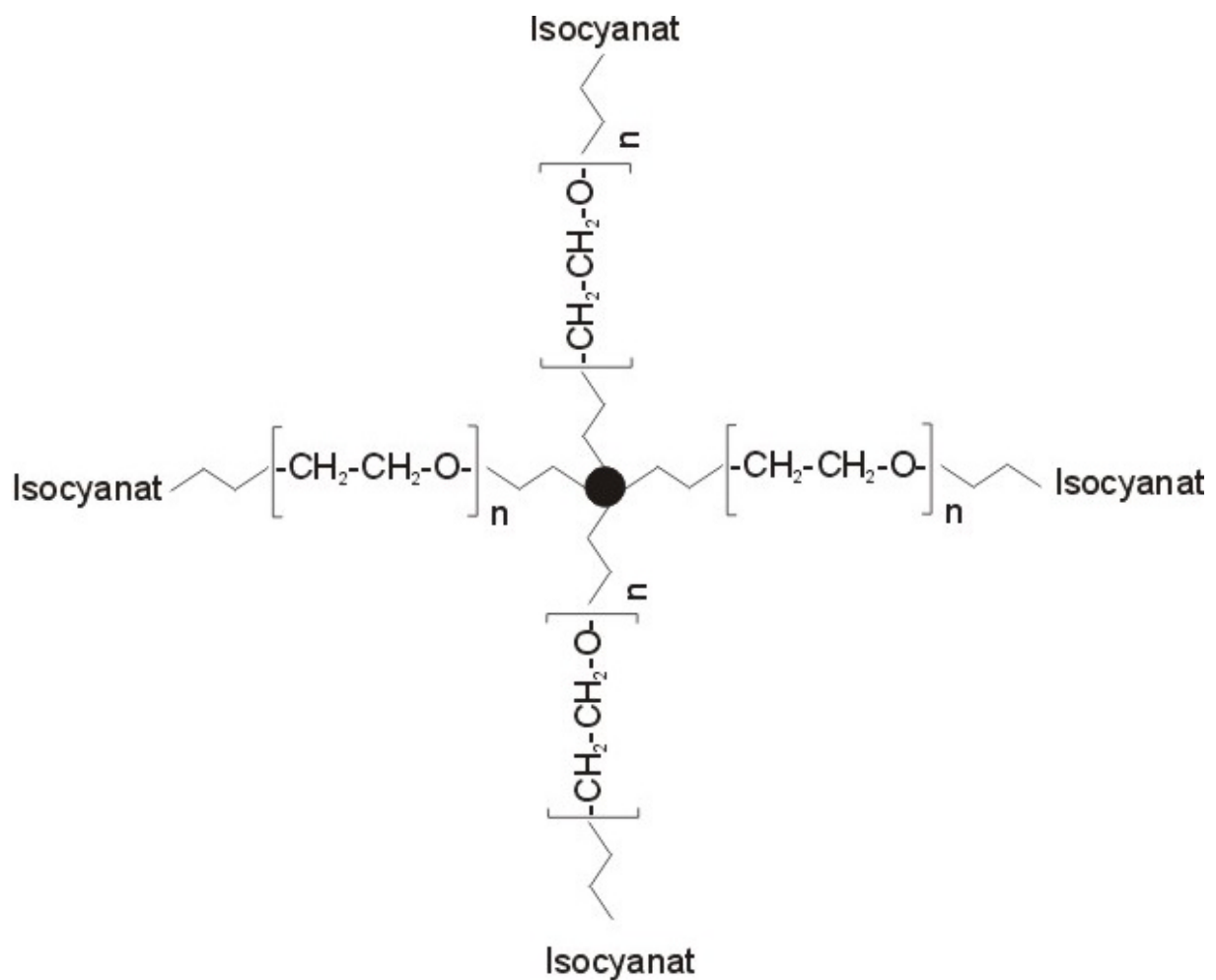


Abb. 3.20 Tetrafunktionales Isocyanat-Polyethylenglykol.

3.8 Fibronektin

PEG-beschichtete Oberflächen reduzieren die Protein- und Zelladsorption. Um die Adsorptionseffekte zu demonstrieren, wurden Experimente mit Farbstoff markiertem Fibronektin durchgeführt. Das Glykoprotein Fibronektin ist als Zelladhäsionsmolekül in der extrazellulären Matrix von tierischem Gewebe identifiziert worden und existiert als kaltes unlösliches Glykoproteindimer. Das verwendete Fibronektin stammt aus Rinderplasma (Sigma, Deutschland). Fibronektin ist negativ geladen und erfüllt somit die Voraussetzung für elektrophoretische Messungen in einer Glaskapillare. Zur Kopplung mit dem Carbocyanin-Farbstoff Cy5 (Amersham, Deutschland) wurde ein Überschuss an Fibronektin in 50 μl Carbonatpuffer (pH 9,0) gelöst und mit dem NHS-Ester des Cy5 in 20 μl Acetonitril vermischt. Nach 1 Stunde wurde das Produkt über eine Sephadex G-15 Säule mit PBS-Puffer getrennt. Abbildung 3.21 zeigt als Beispiel eine leitungsformige Struktur einer Fibronektin Proteinmatrix in einer aortischen Endothelzelle eines Rinds und Abbildung 3.22 zeigt ein Bakterium, das sich an eine Blutzelle heftet.

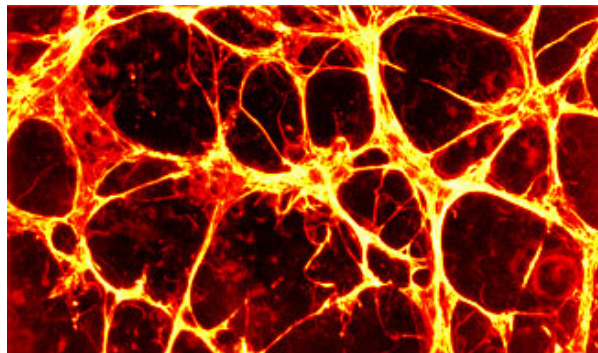


Abb.3.21 Beispiel einer Fibronektin Proteinmatrix einer aortischen Endothelzelle im Rind.



Abb.3.22 Ein Bakterium (rechts) heftet sich an eine Blutzelle an.

4. Experimente und Ergebnisse

4.1 Detektion und Identifizierung einzelner farbstoffmarkierter Analytmoleküle in Mikrokapillaren

Zur effizienten Detektion eines jeden farbstoffmarkierten Analytmoleküls in Lösung, werden derzeit unterschiedliche Strategien in der Literatur diskutiert. Bei Verwendung eines pl-Detektionsvolumens bietet sich ein Flow-System an, in das der Teilchenstrom der Analytmoleküle über eine Mikrokapillare injiziert wird [Jett 1989; Goodwin 1996; Enderlein 1997; Harding 1992]. Eine andere Möglichkeit der Detektion aller passierenden Teilchen liegt im Einsatz einer konventionellen Kapillare mit einem Innendurchmesser von ca. 10 μm [Lee 1994; Guenard 1997]. Der Nachteil des relativ großen Detektionsvolumens liegt im schlechteren Signal-zu-Rausch Verhältnis (Raman bedingter Untergrund). Zur Steigerung des Signal-zu-Rausch Verhältnisses muss das Detektionsvolumen drastisch verringert werden, was in Verbindung mit Mikrokanälen mit erheblichen Schwierigkeiten verbunden ist, da eine effiziente Erfassung aller Moleküle eine Kanalbreite von ca. 1 μm oder weniger voraussetzt. Zusätzlich muss mit starken Streulicht- und Brechungseffekten gerechnet werden, da das Detektionsvolumen in allen Richtungen durch die Kanalwände definiert ist. Ein weiteres Problem stellt die unspezifische Adsorption der Analytmoleküle an den Kanalwänden dar. Beispielsweise wurden bei der Einzelmoleküldetektion in 500 nm ID Mikrokapillaren Diffusionszeiten für Rhodamin 6G von bis zu 60 ms durch ein Femtolitervolumen in wässrigem Milieu gemessen [Lyon 1997]. Beim Wechsel von Wasser zu alkoholischen Lösungsmitteln wird dieser dynamische Adsorptionseffekt nicht beobachtet [Zander 1997]. Eine weitere Möglichkeit zur Detektion jedes Analytmoleküls in einem Mikrokanal mit 10 μm Kanalbreite besteht darin, den gesamten Kanal über mehrere konfokale Detektionsvolumina abzudecken [Dörre 1997].

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass einzelne Analytmoleküle in Mikrokapillaren mit einem Innendurchmesser von 500 nm gesteuert und fluoreszenzspektroskopisch identifiziert werden können, was in Vorarbeiten bereits gezeigt werden konnte [Zander 1998; Becker 1999]. Abbildung 4.1 zeigt schematisch den realisierten Aufbau zur einfachen Einzelmoleküldetektion in Mikrokapillaren. Als Mikrokapillare dient eine konisch verlaufende Mikroinjektionskapillare (Femtotip I, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH) mit einem Innendurchmesser von 500 ± 200 nm am spitzen Ende. Die Spitze taucht in einen Glycerintropfen, der sich auf einem Deckglas oberhalb des Mikroskopobjektivs eines

konfokalen, inversen Fluoreszenzmikroskops befindet. Die Einzelmolekülprobe wird von hinten in den Femtotip injiziert. Die zeitaufgelöste Detektion erfolgt in der Kapillare, kurz vor der Öffnung, so dass alle vorbeiwandernden Moleküle detektiert werden. Der Femtotip wird mit Hilfe einer CCD-Kamera und einer x,y,z-Nanometerpositioniereinheit justiert. Bei negativ geladenen Analytmolekülen befindet sich die Platin-Anode im Glyzerintropfen außerhalb des Femtotips und die Platin-Kathode im Femtotip.

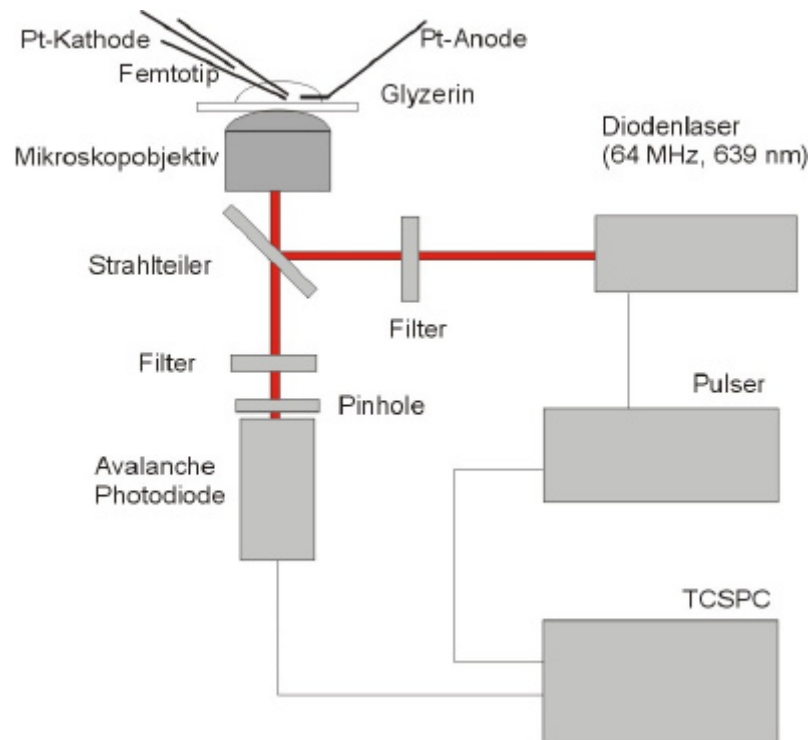


Abb. 4 1 Schematischer Aufbau der Anordnung zur Elektrophorese und Detektion in Mikrokapillaren (TCSPC: Time-correlated single-photon counting)

Zur Unterdrückung des Elektroosmotischen Flusses (EOF) wurde ein dynamisches Coating, bekannt aus der Proteinkapillarelektrophorese mit ionischen und / oder nicht-ionischen Tensiden in unterschiedlichen Konzentrationen verwendet [Towns 1991; Yeung Ken 1997]. Wie in Vorversuchen gezeigt werden konnte, verringert der Zusatz der Detergenzien nicht nur den EOF, sondern auch die unspezifische Adsorption der Analytmoleküle an der Kapillarwand. Zur Reduzierung der Diffusionsgeschwindigkeit der Teilchen befindet sich im Lösungsmittel zusätzlich 30% Glycerin. Damit ist es möglich, die geladenen Teilchen im elektrischen Feld auf das vielfache ihrer Brownschen Molekularbewegungsgeschwindigkeit zu beschleunigen und trotzdem sicher zu detektieren.

In Abbildung 4.2 sind die Fluoreszenzsignale einer 10^{-11} M Lösung des markierten Mononukleotids Cy5-dCTP in 40 mM Tris-Borat-Puffer pH 8.4, 30 Vol.-% Glycerin, 2 Vol.-%

% Tween 20 beim elektrophoretischen Transport durch die Kapillare gezeigt. Der Hintergrund des Lösungsmittels beträgt 2 kHz, so dass ein $S/N > 100$ erreicht wird. Mit steigender angelegter Spannung wächst die Anzahl der detektierten Analytmoleküle, die Dauer der Photonenschauer und Photonenausbeute nimmt hingegen ab (Abb. 4.2). Ab einer angelegten Spannung von ca. 30 V können keine reinen Einzelmolekülereignisse mehr gemessen werden, die Analytmoleküle bewegen sich dann zu schnell durch das Detektionsvolumen. Die Burststatistik der in Abbildung 4.2 gezeigten Daten ergibt eine höhere mittlere Photonenausbeute für die Einzelmolekülereignisse im Femtotip bei geringerer angelegter Spannung (<10 V) im Vergleich zu den Messungen im offenen Volumen (Vergleich Abb. A und B). Dieses Ergebnis zeigt, dass mit Hilfe einer Mikrokapillare mit einem Innendurchmesser $<1 \mu\text{m}$ eine elektrophoretische Steuerung einzelner geladener Analytmoleküle möglich ist.

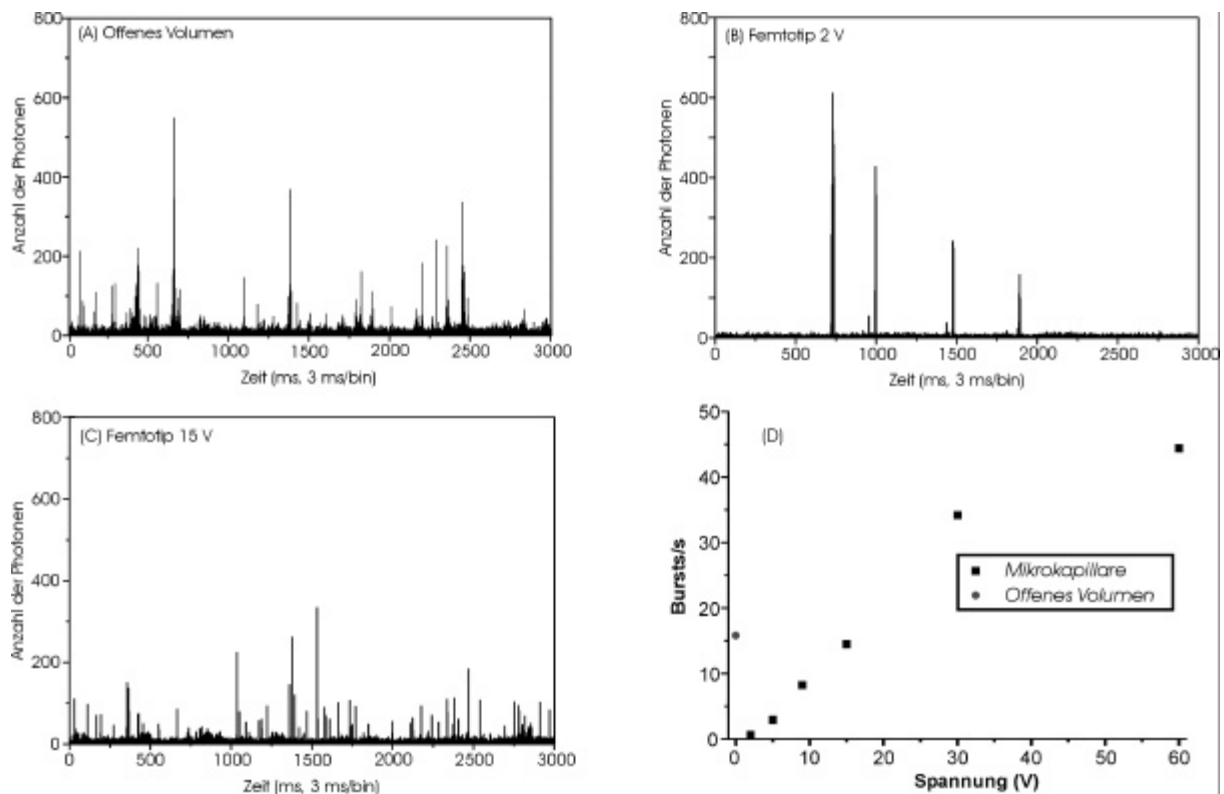


Abb. 4.2 Fluoreszenzsignale einer 10^{-11} M Lösung Cy5-dCTP in 40 mM Tris-Boratpuffer pH 8.4, 30 Vol.-% Glycerin, 2 Vol.-% Tween 20 (a) offenes Volumen, (b,c) Mikrokapillare mit unterschiedlicher Spannung und (d) Abhängigkeit der Burstanzahl von der angelegten Spannung.

Abbildung 4.3 verdeutlicht, dass eine elektrophoretische Steuerung einzelner geladener Analytmoleküle möglich ist.

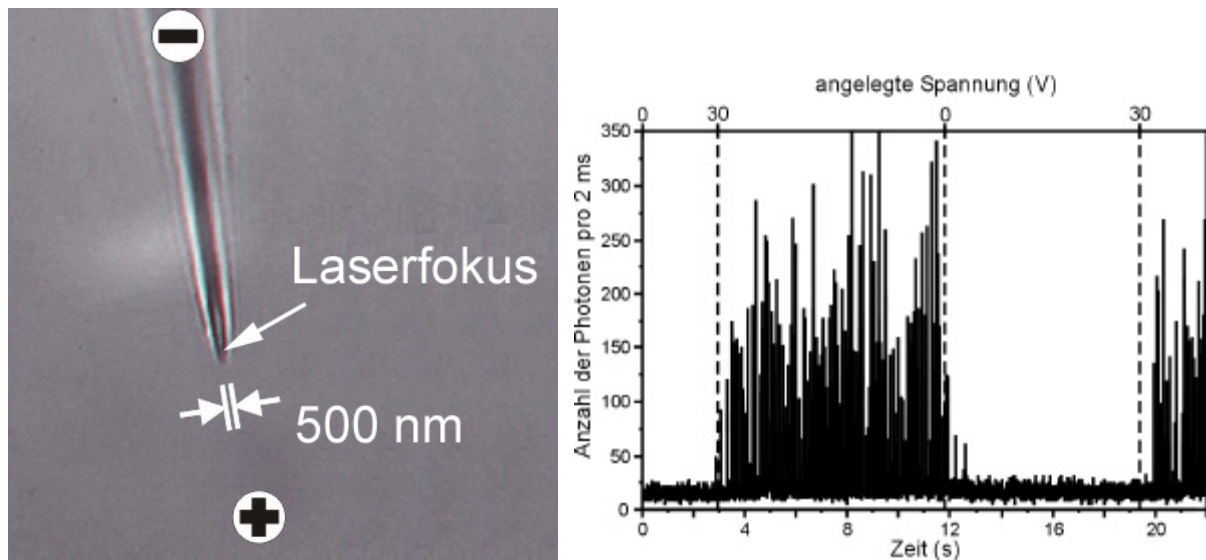


Abb. 4.3 Fluoreszenzsignale einer 10^{-11} M Lösung MR121-dUTP in 40 mM Tris-Boratpuffer pH 8.4, 30 Vol.-% Glycerin, 2 Vol.-% Tween 20 in Abhängigkeit der angelegten Spannung. Das CCD-Bild (links) zeigt das Prinzip der elektrophoretischen Messung.

Zur Charakterisierung der Teilchenbewegung in der Kapillare wurde zusätzlich die Autokorrelation der Messdaten gebildet (Gleichung 3.4).

$$G(t) = G(0) \frac{1}{1 + \frac{t}{t_D}} \exp \left[-\frac{t^2}{t_f^2 \left(1 + \frac{t}{t_D}\right)} \right] \quad (\text{Gleichung 4.1})$$

Hier steht t_f für die charakteristische Aufenthaltszeit des Teilchens aufgrund der Strömung durch das Detektionsvolumen und t_D stellt die Zeit dar, die sich ein Molekül aufgrund der Diffusion im Detektionsvolumen aufhält.

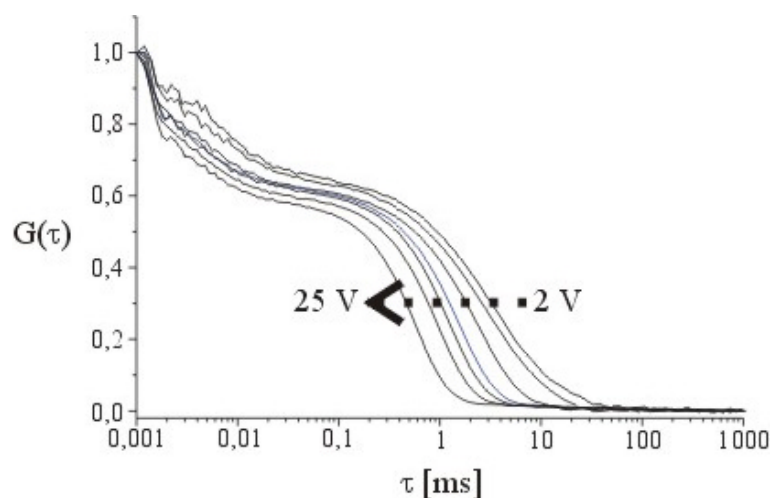


Abb. 4.4 Autokorrelationsfunktion der Fluoreszenzsignale einer 10^{-11} M Lösung Cy5-dCTP in 40 mM Tris-Boratpuffer pH 8.4, 30 Vol.-% Glycerin, 2 Vol.-% Tween 20 in der Mikrokapillare in Abhängigkeit der angelegten Spannung.

Es konnte im Vergleich mit einem 2-dimensionalen Modell gezeigt werden, dass es sich für die Messung innerhalb der Mikrokapillare um eine 1-dimensionale Diffusion handelt, wenn der Kapillardurchmesser deutlich kleiner als der des Detektionsvolumens ist.

Zeitaufgelöste Einzelmolekülmessungen in der Mikrokapillare zeigen, dass zwei unterschiedlich markierte Mononukleotide aufgrund der charakteristischen Fluoreszenzlebensdauer der Marker von $1,19 \pm 0,16$ ns (Cy5-dCTP) und $1,98 \pm 0,14$ ns (MR121-dUTP) mit hoher Sicherheit unterscheidbar sind (Abb. 4.5).

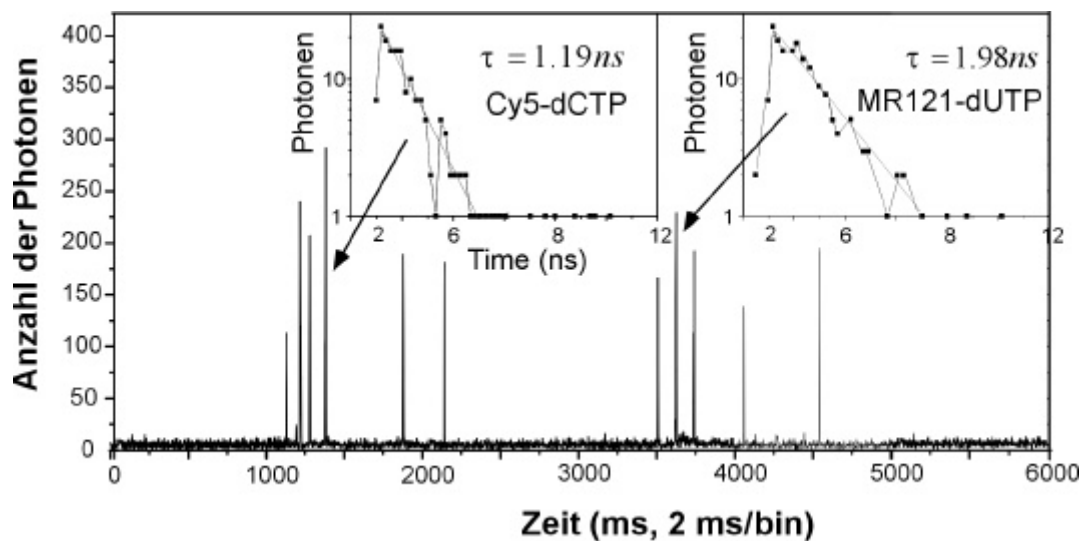


Abb. 4.5 Typische Einzelmolekülereignisse in der Mikrokapillare. Aufgetragen ist die Anzahl der Photonen (Counts) pro 2 ms über die Zeit. In den kleinen Kästen sind die mikroskopischen Zeiten für zwei Photonenschauer (engl. Bursts) histogrammiert.

4.2 Aufbau der Apparatur zur Doppeldetektion in Mikrokapillaren

Durch die an zwei räumlich und damit zeitlich getrennten Stellen der Kapillare vorgesehene zeitaufgelöste Fluoreszenzdetektion können die Farbstoffe zweifach identifiziert werden. Dies eröffnet neue Möglichkeiten für verschiedene Anwendungsfelder, wie z.B. die Einzelmolekül-DNA-Sequenzierung und das Dynamikstudium einzelner markierter Biomoleküle. Bei den erwarteten Flussgeschwindigkeiten von 0,01 – 4 mm/s der Analytmoleküle im elektrischen Feld können so Zeitunterschiede in der Detektion zwischen 1 und 300 ms realisiert werden. Zur Realisierung der zweifachen Detektion wurden 3 verschiedene Ansätze getestet.

Im ersten Ansatz wurde die Mikrokapillare über ein x,y,z-Nanometerpositioniersystem exakt in den Fokus des ersten, fest installierten konfokalen Fluoreszenzmikroskops justiert (Abb. 4.6). Die zweite Mikroskopeinheit wurde an der gegenüberliegenden Seite der Kapillare angebaut und mit Hilfe eines zweiten Nanometerpositioniersystems variabel in verschiedenen Abständen (1-1000 μm) zum Fokus der ersten Einheit positioniert. In beide Mikroskopobjektive wurde jeweils der Strahl eines kollimierten, vorfokussierten gepulsten Diodenlasers der Wellenlänge 639 nm bei einer Repetitionsrate von 64 MHz über einen dichroitischen Strahlteiler eingekoppelt. Das Fluoreszenzlicht sollte über das jeweils gleiche Mikroskopobjektiv gesammelt, spektral gefiltert und auf eine Single-Photon-Avalanche-Photodiode (SPAD) hinter einer 100 μm Lochblende zur räumlichen Filterung abgebildet werden. Dieser Ansatz zum Aufbau der Apparatur zur Mehrfachdetektion erwies sich jedoch nach einiger Vorarbeit als zu schwierig zu realisieren. Die Positionierung der zweiten Detektionseinheit nahe an die Kapillarspitze, ohne Schäden an der Mikrokapillare zu verursachen, führte zu erheblichen Problemen. Zudem ergab sich eine verringerte Detektionseffizienz an der zweiten Detektionseinheit gegenüber der ersten aufgrund der veränderten Folge der Brechungsindizes ohne zusätzlichem Glasdeckplättchen zwischen Mikrokapillare-Glycerin und Mikroskopobjektiv.

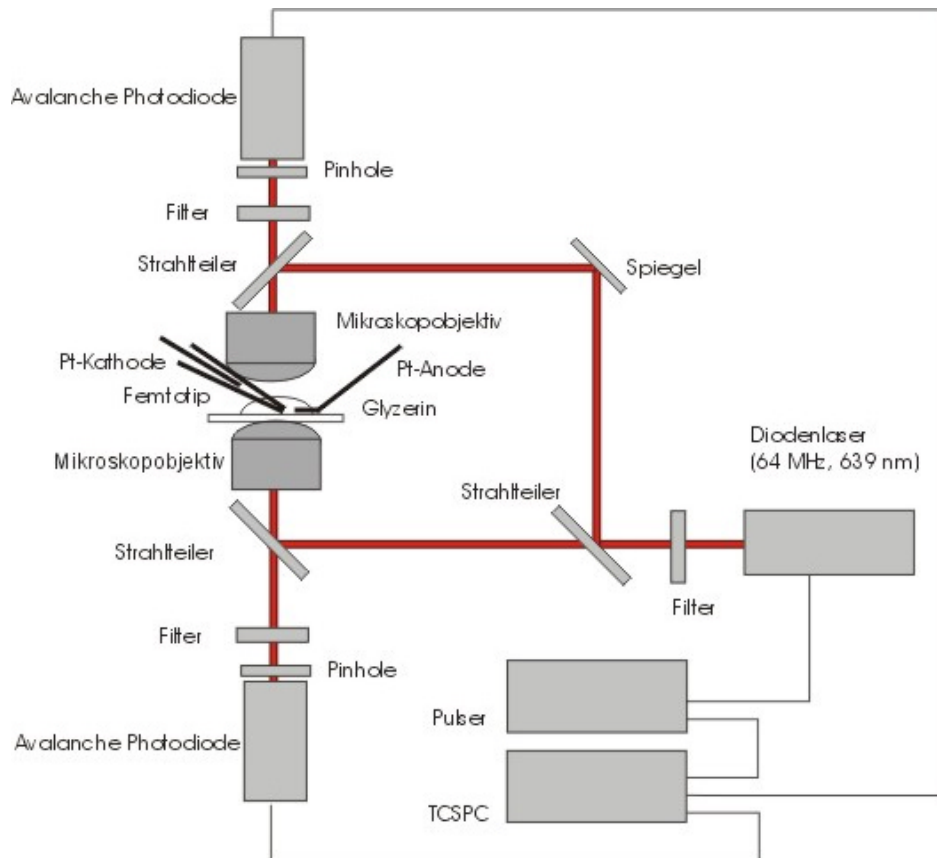


Abb. 4.6 Schematischer Aufbau der Anordnung zur Elektrophorese und Doppeldetektion in Mikrokapillaren mittels zweier Mikroskopeinheiten.

Im zweiten Ansatz wurden zwei Femtotips verwendet, deren Öffnungen zueinander über zwei x,y,z-Nanometerpositioniersysteme gegenüber positioniert wurden (s. Abb. 4.7). Es wurden zwei Strahlen, die über eine Kombination aus Strahlteiler und Spiegel aus einem Strahl eines kollimierten, vorfokussierten gepulsten Diodenlasers der Wellenlänge 639 nm verdoppelt wurden, über einen dichroitischen Strahlteiler in ein Mikroskopobjektiv eingekoppelt und jeweils in die Spitzen der Mikrokapillaren fokussiert. Abbildung 4.7 zeigt eine CCD-Aufnahme von zwei Femtotips. Schematisch sind zwei Foki und die Elektroden eingezeichnet.

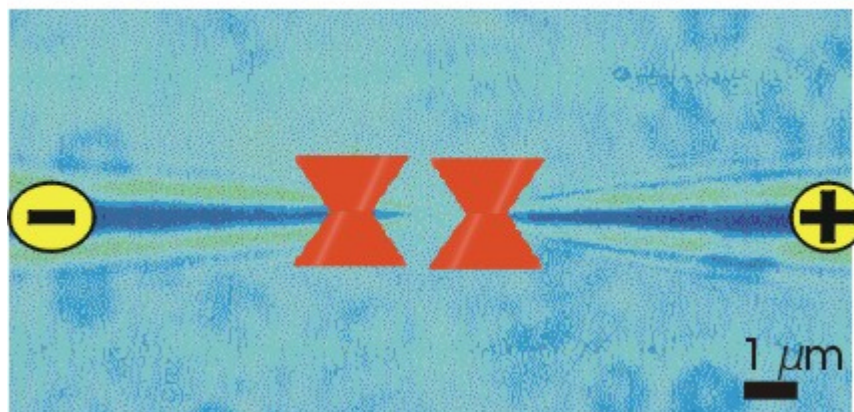


Abb. 4.7 Aufnahme zweier Femtotips mit Hilfe einer CCD-Kamera. Die beiden Foki der Laserstrahlen und die Polaritäten der Pt-Elektroden sind zum besseren Verständnis eingezeichnet.

Mit diesem Aufbau konnten jedoch nicht alle Analytmoleküle, die in der ersten Detektionseinheit erfasst wurden, auch in der zweiten Detektionseinheit beobachtet werden. Abbildung 4.8 zeigt eine mit diesem Aufbau aufgenommene Messung. Die Multichannel Scaler (MCS) Spur des zweiten Detektors ist zur Übersichtlichkeit mit einem Offset von 70 kHz dargestellt. Diese Messung zeigt, dass die Analytmoleküle, die aus dem ersten Femtotip treten, nicht im zweiten Femtotip detektiert werden. Zum einen kann es daran liegen, dass Analytmoleküle im Glyzerintropfen außerhalb der Femtotips „verloren gehen“, zum anderen ist bei einer so niedrigen Konzentration eine exakte Justierung des zweiten Femtotips hinsichtlich des ersten äußerst schwierig zu realisieren, zumal die Kapillarpositionen aufgrund von Instabilitäten und Vibrationen im Labor oder gesamten Gebäude nach wenigen Minuten überprüft und nachjustiert werden mussten.

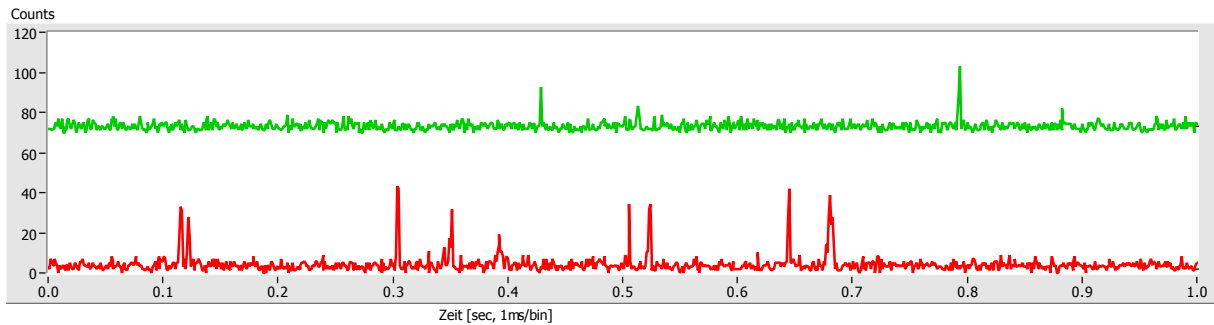
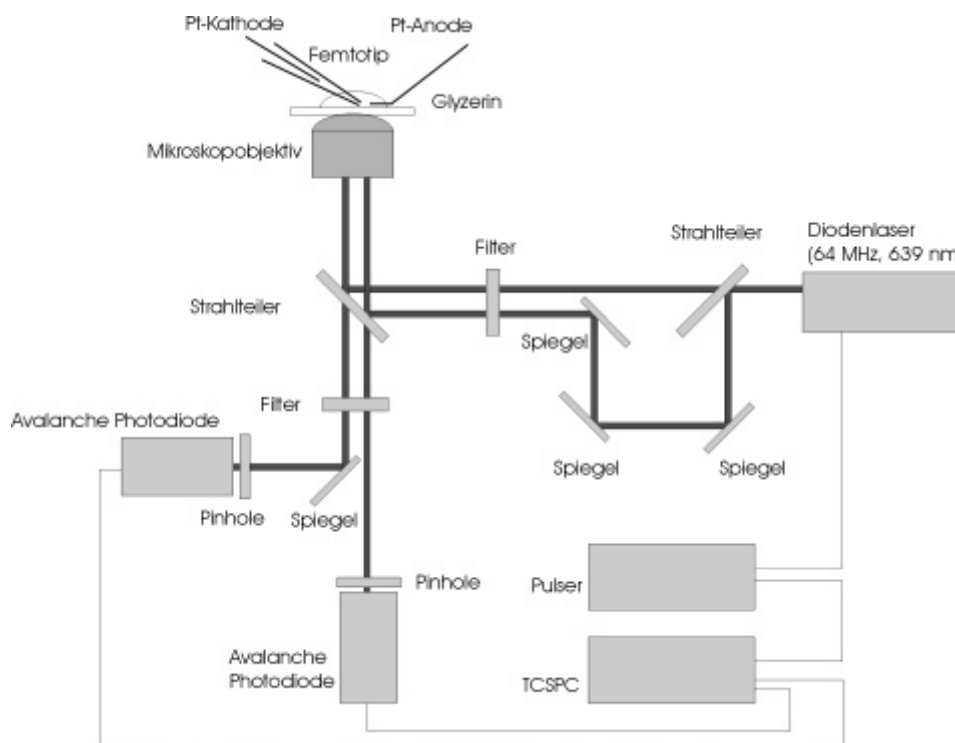


Abb. 4.8 MCS-Spuren der Doppeldetektionsmessung mit zwei Femtotips. Offensichtlich werden im zweiten Fokus (obere Spur) nicht alle Analytmoleküle aus dem ersten Detektionsvolumen gemessen. Um eine Photozerstörung zu verhindern, ist im ersten Anregungsvolumen eine geringe Laserleistung gewählt.

Die Realisierung der Doppeldetektion gelang schließlich mit dem dritten Ansatz.

Zwei Strahlen wurden über eine Kombination aus Strahlteiler und Spiegel aus einem Strahl eines kollimierten, vorfokussierten gepulsten Diodenlasers der Wellenlänge 639 nm verdoppelt. Diese wurden über einen dichroitischen Strahlteiler in ein Mikroskopobjektiv eingekoppelt und in die Spitze einer Mikrokapillare fokussiert. Abbildung 4.9 zeigt den schematischen Aufbau zur Doppeldetektion einzelner Analytmoleküle und ein mit Hilfe einer CCD-Kamera aufgenommenes Bild einer Mikrokapillare, in das zur Verdeutlichung der beiden Detektionseinheiten und der Elektrophorese die beiden Laserfoki und die Polaritäten des angelegten elektrischen Feldes eingezeichnet sind.

a)



b)

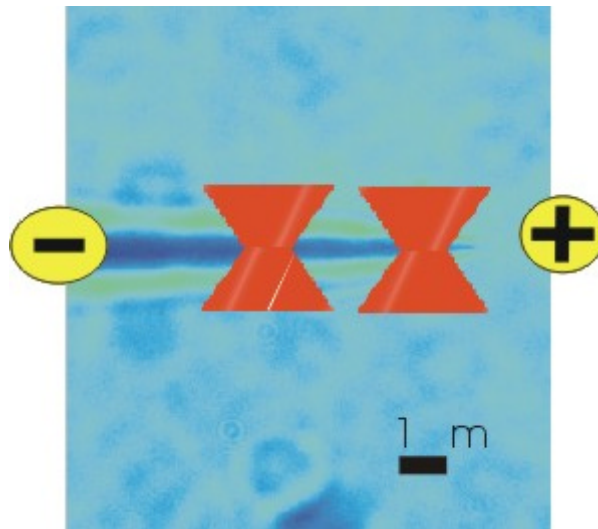


Abb. 4.9 a) Schematischer Aufbau zur Doppeldetektion einzelner Analytmoleküle. Ein kollimierter Laserstrahl eines gepulsten Diodenlasers wird mittels einer Kombination aus Strahlteiler und Spiegeln zu zwei Strahlen verdoppelt und in ein Mikroskopobjektiv (100X, Ölimmersion, NA 1,4) eingekoppelt. Das Fluoreszenzlicht wird durch dasselbe Objektiv eingesammelt und durch Filter und Lochblenden (100 µm) spektral und räumlich gefiltert, bevor es auf zwei Single-Photon-Avalanche Dioden abgebildet wird. b) Aufnahme eines Femtotips mit Hilfe einer CCD-Kamera. Zur Veranschaulichung sind die zwei Laserfoki und die Pole der Pt-Elektroden eingezeichnet.

In Vorarbeiten konnte ebenfalls die Einkopplung der beiden kollimierten Strahlen optimiert werden. Konstruktionsbedingt sind die Strahlprofile von Halbleiterlaserdioden elliptisch geformt. Zur Veranschaulichung sind in Abbildung 4.9 die Strahlprofile als Rechtecke gezeichnet. Eine Verbesserung des Anregungsvolumens konnte erreicht werden, indem zwei elliptische Strahlprofile die Öffnung des Objektivs nur in Richtung parallel zur Strömungsachse in der Mikrokapillare überstrahlen, wodurch die Durchmesser der minimalen Strahlbrennpunkte innerhalb der Mikrokapillare entlang der Strömungsachse minimiert ($< 1\mu\text{m}$), senkrecht zur Mikrokapillarenachse hingegen das Anregungsvolumen aufgeweitet wurden. Dadurch ist auch bei geringer Abweichung einer optimalen Positionierung der Mikrokapillare hinsichtlich der beiden Strahlbrennpunkte gewährleistet, dass alle vorbeiströmenden Analytmoleküle erfasst werden.

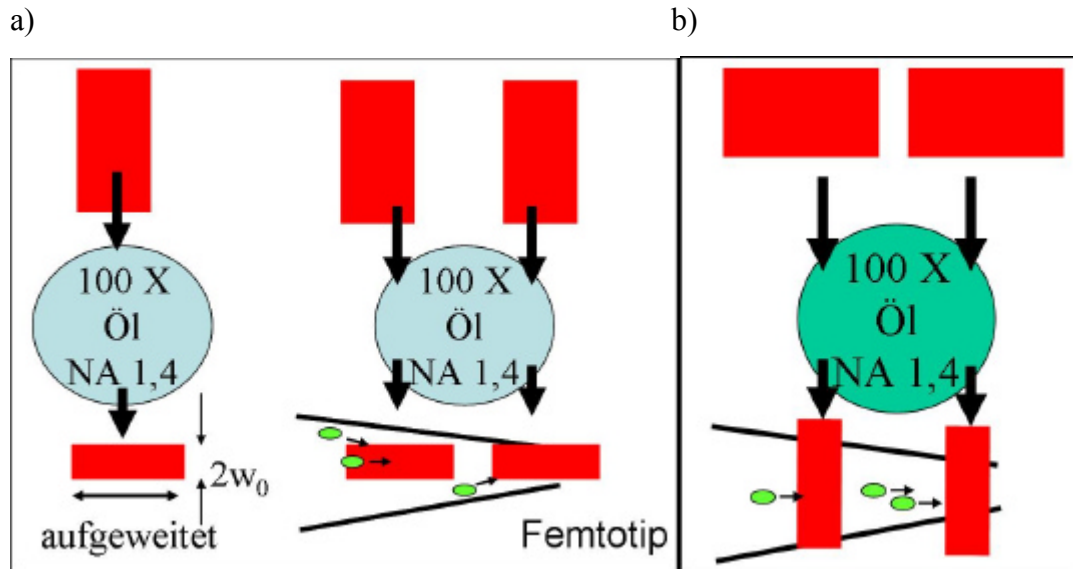


Abb. 4.10 Schematische Darstellung von Laserprofil (oben), Objektivöffnung (Mitte) und Fokus (unten).

a) Links: Wird ein Laserstrahl mit rechteckigem Strahlprofil (oben) in die Apertur eines Mikroskopobjektivs (Mitte) eingekoppelt, wird der Strahl in die Richtung zu seiner kleinst möglichen Strahltaille $2w_0$ fokussiert, in der die Objektivöffnung überstrahlt wird (unten). Senkrecht dazu wird der Brennpunkt aufgeweitet. a) Rechts: Für die Doppeldetektionsmessungen im Femtotip hat dies zur Folge, dass die „intuitiv“ gewählte Einkopplung zu keinem Erfolg führt. Am ersten Detektionsvolumen können Analytmoleküle passieren, ohne detektiert zu werden. b) In dieser Anordnung wird jedes Analytmolekül erfasst. Zudem kommt es nicht zu einem Crosstalk der Fluoreszenzsignale.

Gleichzeitig können die beiden fokussierten Laserbrennpunkte entlang der Kapillarachse entsprechend nahe aneinander positioniert werden, ohne dass eine Detektionseinheit das Fluoreszenz- oder Anregungslicht des anderen Anregungsvolumens sieht, d.h. es wird kein Cross-talk gemessen und eine aufwendige Bearbeitung der Daten entfällt [Brinkmeier 1999]. Dies ist in diesem Aufbau nur durch den minimalen Mindestabstand zur Trennung der beiden Detektionssignale durch einen fein positionierbaren Spiegel in der Zwischenbildebene am Mikroskopausgang limitiert, da dort die beiden Detektionssignale nicht überlappen. Bei einem Mikroskopobjektiv mit 100-facher Vergrößerung lassen sich so im Limit ein $4 \mu\text{m}$ Abstand erreichen, was in den Zwischenbildebene einem Abstand von $0,4 \text{ mm}$ entspricht. Zum anderen ergibt sich durch die konische Form der Mikrokapillare ein maximaler Abstand der beiden Foki zu etwa $15 \mu\text{m}$, bis zu dem eine effiziente Doppeldetektion aufgrund des aufgeweiteten Innendurchmessers überhaupt noch möglich ist, da der Durchmesser der Laserfoki größer als der innere Durchmesser der Mikrokapillare sein muss. Daher musste die volle Länge des optischen Tisches ausgenutzt werden, um die beiden kollimierten Laserstrahlen nahe genug fokussieren zu können. Abbildung 4.10 zeigt schematisch das Prinzip.

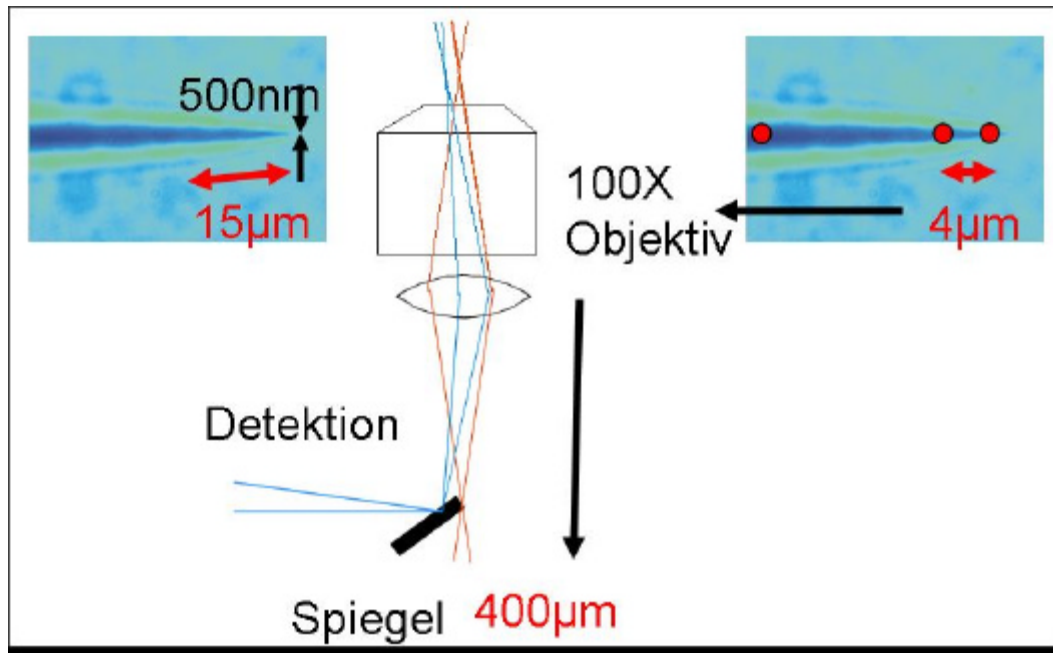


Abb. 4.10 Der durch die konische Form des Femtotips limitierte maximale Abstand für eine Doppeldetektion beträgt etwa $15\ \mu\text{m}$ (links oben). Der minimale Abstand (rechts oben) von $4\ \mu\text{m}$ jedoch wird durch die Trennung beider Detektionssignale durch einen kleinen beweglichen Spiegel in der Zwischenbildebene bestimmt, der die beiden Detektionspfade voneinander trennt (Mitte unten). Mit einem $100\ \text{X}$ Objektiv muss der Spiegel zwei fokussierte Strahlen im Abstand von $400\ \mu\text{m}$ trennen. Dafür musste der verwendete Spiegel schräg angesägt werden.

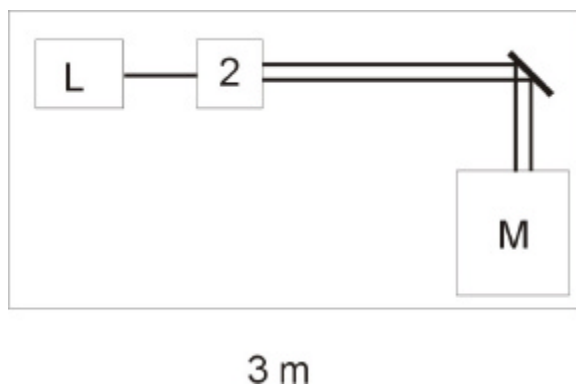


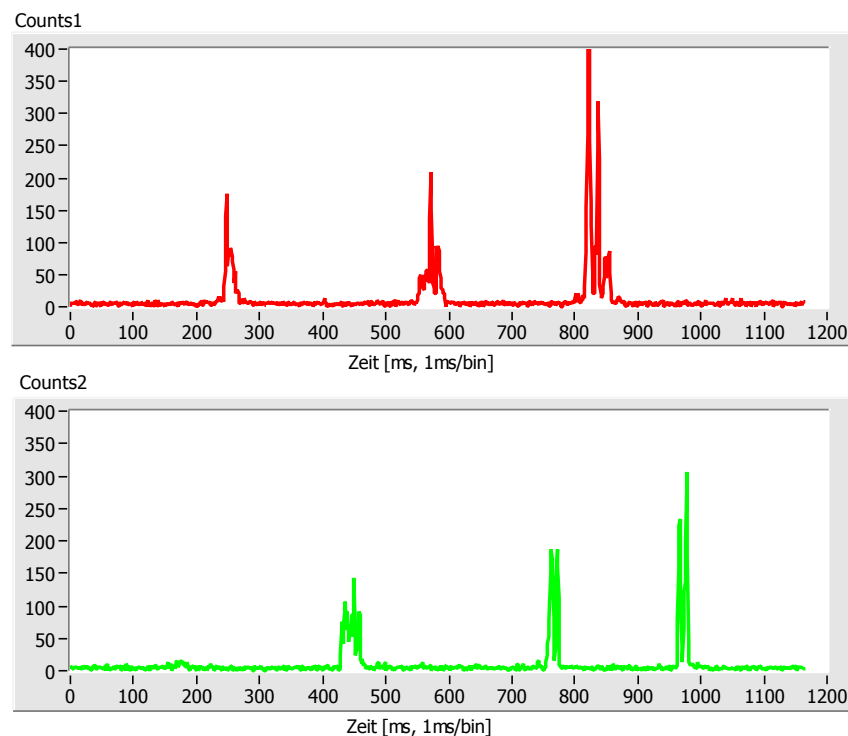
Abb. 4.11 Die Darstellung zeigt eine Aufsicht auf den 3 Meter langen Tisch mit dem experimentellen Setup. Damit zwei Strahlen nahe genug im Fokus liegen, musste die Erzeugung beider Strahlen („2“) möglichst weit weg vom Mikroskop (M) geschehen. (L: Laserdiode)

Ein Überstrahlen der Objektivöffnung sicherte einen beugungslimitierten Strahl im Laserspot und damit ein minimales Detektionsvolumen zur Reduzierung des Hintergrundrauschens, wobei ebenso die vorzeitige photophysikalische Zerstörung der Marker an der ersten Detektionseinheit reduziert werden konnte.

Mit diesem Aufbau ist es im Rahmen dieser Arbeit erstmals gelungen, einzelne Analytmoleküle zweifach in einer Mikrokapillare mit Durchmesser von $500\ \text{nm}$ zu detektieren. Abbildung 4.12 demonstriert eine Doppeldetektion von Analytmolekülen anhand

eines Ausschnitts von MCS-Spuren. Interessanterweise zeigen die MCS-Spuren auch, dass die Messungen „Crosstalk“ frei sind, d. h. beide Detektionssignale werden effizient voneinander getrennt. Dies ist insofern erwähnenswert, da andere Gruppen trotz größerer Abstände ($\sim 10 \mu\text{m}$) Crosstalk sehen. Dies führt dazu, dass die Daten im nachhinein mittels einer so genannten „Pseudo-Autokorrelation“ behandelt werden müssen. Dies ist die Autokorrelation in einem Detektionsvolumen, die von der Kreuzkorrelationsfunktion abgezogen werden muss. Hier entfällt diese Prozedur gänzlich.

a)



b)

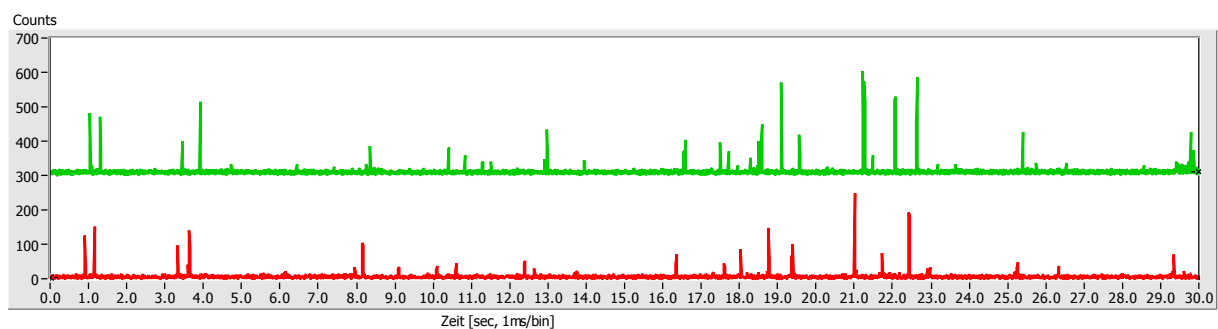


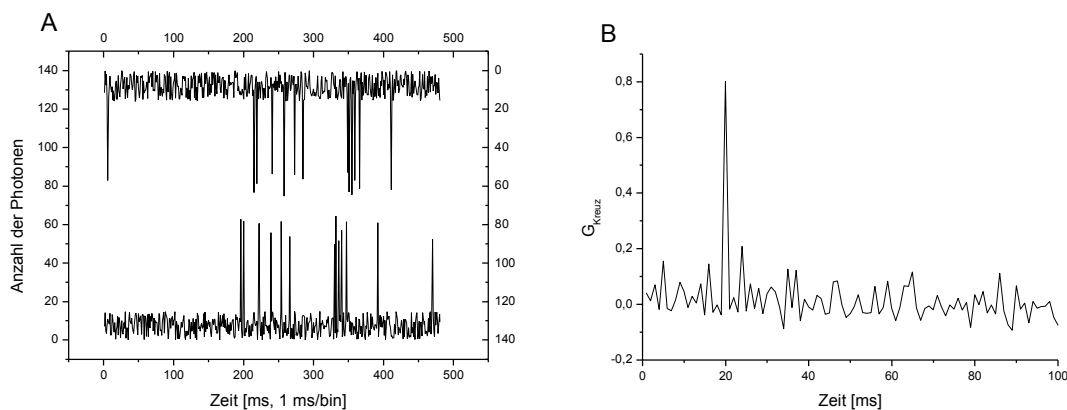
Abb. 4.12 MCS-Spuren einer Doppeldetektionsmessung einzelner Analytmoleküle. Die obere MCS-Spur in a) zeigt die Fluoreszenzsignale des ersten Detektionsvolumens, die untere MCS-Spur stammt vom zweiten Detektor. Zur Messung wurde eine 10^{-11} M Lösung Microspheres (FluoSpheres® carboxylate-modified microspheres, $0.02 \mu\text{m}$, crimson fluorescent (625/645) *2 % solids*) in 40 mM Tris-Borat-Puffer pH 8.4, 30 Vol.-% Glyzerin, 2 Vol.-% Tween 20 verwendet. Die Laserleistung betrug $250/375 \mu\text{W}$ und eine Spannung von 15 V war angelegt. b) zeigt eine längere Spur von 30 s. Für die Signale vom zweiten Detektor ist zur besseren Übersicht ein Offset von 300 kHz gewählt.

4.3 Auswerteverfahren zur Doppeldetektion

Die Doppeldetektion einzelner Analytmoleküle in Kapillaren mit einem Durchmesser von 10 μm und größer wurde schon von verschiedenen Gruppen untersucht [Castro 1995; Guenard 1997; Brinkmeier 1999; LeCaptain 2002]. Die Auswertung der Daten wurde in den meisten Fällen mittels einer Hardware-Korrelatorkarte realisiert. Dies scheint überraschend in Hinblick auf die statistische Normierung der Kreuzkorrelationsanalyse, zumal die veröffentlichten Messungen nie mehr als ein paar Millisekunden bis Sekunden betragen. Die Form der Original MCS-Spuren wurde hingegen nicht in die Auswertung mit einbezogen. Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Auswertetechniken sind Software-basiert und nutzen die von der SPC-630 gespeicherten FIFO-Daten, die es erlauben, mikroskopische und makroskopische Zeiten für Lebensdauerbestimmungen und Zeitspuren zu nutzen. Damit kann auch die individuelle Form der Bursts in den MCS-Spuren mit berücksichtigt werden. Die zeitliche Auflösung ist im Vergleich zu den Hardware-basierten Kreuzkorrelationen um eine Größenordnung geringer, da aber die typischen Transitzeiten zwischen den beiden Detektionsvolumina einige ms und mehr betragen, kann hier auf eine Kreuzkorrelation mittels Hardware-Korrelatorkarte verzichtet werden.

Dass die Auswertung mittels Kreuzkorrelation berechtigt ist, soll folgende Simulation zeigen. Eine in LabView (s. Anhang) programmierte Simulation von Messdaten mit verschieden hohem Hintergrundrauschen verdeutlicht, dass sogar eine Kreuzkorrelation mit stark verrauschtem Signalen möglich ist (Abb. 4.13).

Signalspur (s. Abb. 4.13 A untere Zeitachse) und die um 20 Zeiteinheiten versetzte und invertierte zweite Spur (s. Abb. 4.13 A obere Zeitachse) wurden miteinander kreuzkorreliert (Abb. 4.13 B). Um das Potential der Kreuzkorrelation zu demonstrieren, wurde ein hohes Hintergrundrauschen (S/N=2:1) dazugemischt (Abb. 4.13 C, D).



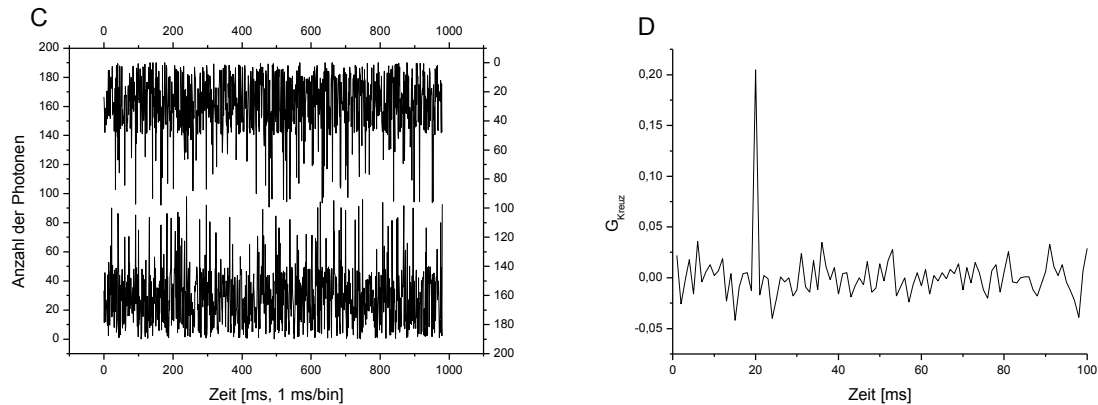


Abb. 4.13 Simulation zweier zeitlicher Intensitätsverläufe. Die generierten Intensitätsbursts der ersten Signalspur (s. Abb. A untere Zeitachse) und die um 20 Zeiteinheiten versetzte und invertierte zweite Spur (s. Abb. A obere Zeitachse) wurden miteinander kreuzkorreliert (Abb. B). Um das Potential der Kreuzkorrelation zu demonstrieren, wurde ein hohes Hintergrundrauschen ($S/N=2:1$) dazugemischt (Abb. C, D).

Die Simulation der Kreuzkorrelation zeigt auch, dass für den Kreuzkorrelationspeak eine symmetrische Form um einen Mittelwert zu erwarten ist.

Um die Doppeldetektionsmessungen auswerten zu können, wurden verschiedene Auswerteverfahren entwickelt. Diese Verfahren beruhen auf einer nachträglichen Software basierten Auswertung der im FIFO-Modus aufgenommenen Daten. Dies hat den Vorteil, dass sowohl auf die mikroskopischen, als auch auf die makroskopischen Zeiten zugegriffen werden kann. Die so erreichbare Auflösung der makroskopischen Zeit mag zwar um eine Größenordnung größer sein, aber erstens, sind die typischen Transitzeiten für die Distanz zwischen den beiden Detektionsvolumina sehr viel länger und zweitens, bleibt der Zugriff auf die Original MCS-Spuren erhalten, was bei einer Hardware-Korrelatorkarte nicht der Fall ist.

Dass die Form der MCS-Spuren sehr wohl einen Einfluss auf die mögliche Interpretation der Kreuzkorrelationsanalyse hat, konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden. Daher werden im folgenden die für diese Arbeit relevanten Verfahren kurz anhand von Beispielmessungen vorgestellt und auf ihre Wirksamkeit hin untersucht.

4.3.1 „Gleitendes Fenster“

Das Prinzip des „Gleitenden Fensters“ wurde im Rahmen dieser Arbeit entwickelt, um auch kürzere MCS-Spuren mittels der Kreuzkorrelationsfunktion zu analysieren. In kurzen Spuren reicht die Statistik oft nicht aus, eine effiziente Normierung der Korrelation zu erreichen (s.a. Materialien und Methoden). Es kann dann leicht zu Fehlinterpretationen kommen, wenn die

Rohdaten nicht zugänglich sind wie im Hardware-basierten Fall. In einfachen Simulationen tauchen je nach Form der Bursts mehrere Kreuzkorrelationspeaks auf oder andere werden zu stark oder schwach gewichtet. Abbildung 4.14 demonstriert diesen Fall für einen kurzen Ausschnitt aus einer Doppeldetektionsmessung. Zu sehen sind jeweils 2 Bursts in den MCS-Spuren, die in der Kreuzkorrelation zu zwei Kreuzkorrelationspeaks der Transitzeit führen. Welcher der beiden der richtige ist oder ob sogar beide korrekt sind, kann nur unter Berücksichtigung der MCS-Spuren entschieden werden. In diesem Fall ist der erste Peak der korrekte, da die beiden korrespondierenden Bursts mit dieser Transitzeit den Abstand zwischen beiden Detektionsvolumina passieren. Der zweite Peak in der Transitzeit stammt von der Kreuzkorrelation des ersten Bursts des ersten Detektionsvolumens mit dem zweiten des zweiten Detektionsvolumens.

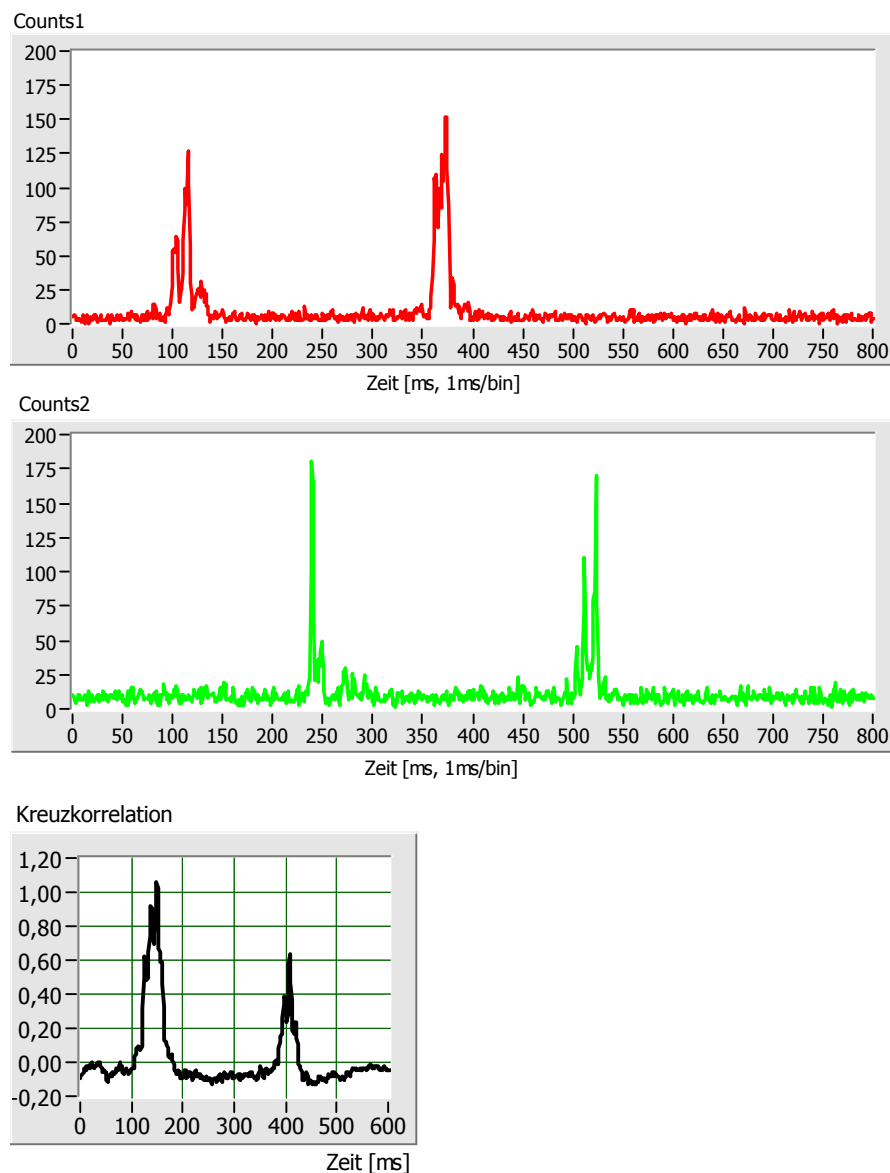


Abb. 4.14 Problematik der Kreuzkorrelation von kurzen MCS-Spuren. Aufgrund der geringen Burststatistik ist die Normierung nicht effizient genug und eine Mehrfachkorrelation kommt zustande. Hier

wird zusätzlich der erste Burst vom Detektor 1 mit dem zweiten Burst vom Detektor 2 korreliert. Das Maximum liegt aber bei einer Transitzeit von 149 ms.

Die Idee eines über MCS-Spuren gleitenden Fensters beruht darauf, dass ein Abschnitt fester Länge betrachtet wird, groß genug gewählt, so dass im Mittel ein korrespondierendes Korrelationspaar darin liegt. Eine Kontrolle erfolgt direkt in den MCS-Spuren. Nun werden diese festen Abschnitte kreuzkorreliert und um einen Kanal in der MCS-Spur verschoben. Die Kreuzkorrelationsfunktionen der einzelnen Fenster werden aufsummiert. Dadurch wird die Gesamtspur gewichtet und Mehrfachkorrelationen werden unterdrückt. Abbildung 4.15 soll das Prinzip verdeutlichen.

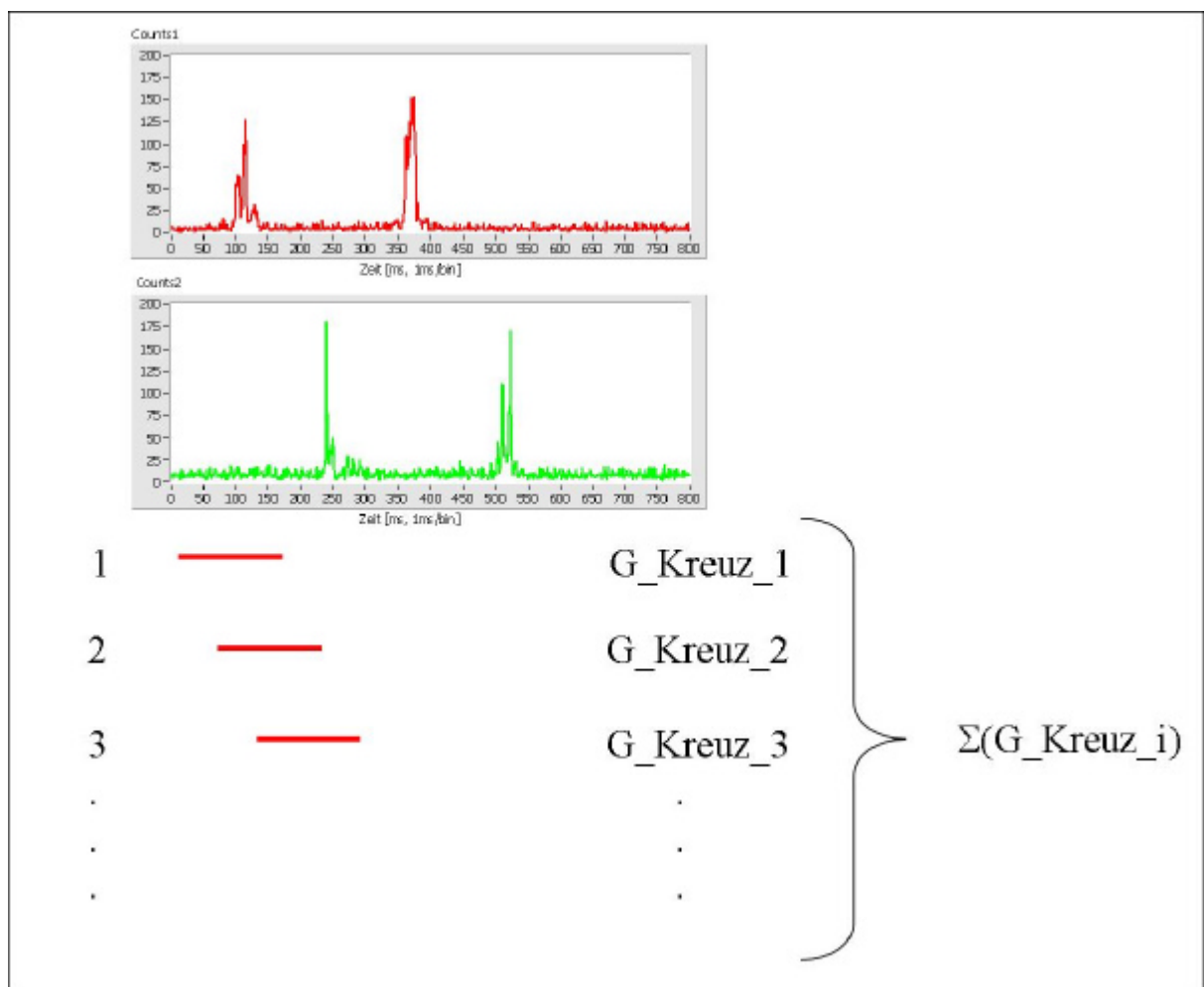


Abb. 4.15 Prinzip des gleitenden Fensters. Ein Zeitfenster fester Breite wird über die MCS-Spuren gelegt. Innerhalb dieses Fensters werden die Spuren kreuzkorreliert. Im nächsten Schritt wird das Fenster um einen Zeitkanal verschoben. Das Ergebnis der zweiten Kreuzkorrelation wird zum vorherigen Ergebnis dazu addiert. So „gleitet“ das Fenster über die gesamte Spur und filtert Mehrfachkorrelationen heraus.

Als Beispiel für das gleitende Fenster werden für den Beispielabschnitt verschiedene Fensterlängen betrachtet. Abbildung 4.16 zeigt die Kreuzkorrelationen bei gleitenden Fenstern der Längen 500, 450, 420 und 400 ms. Es ist deutlich eine Abnahme der Bursthöhe des zweiten Peaks mit Abnahme der Fensterbreite zu sehen.

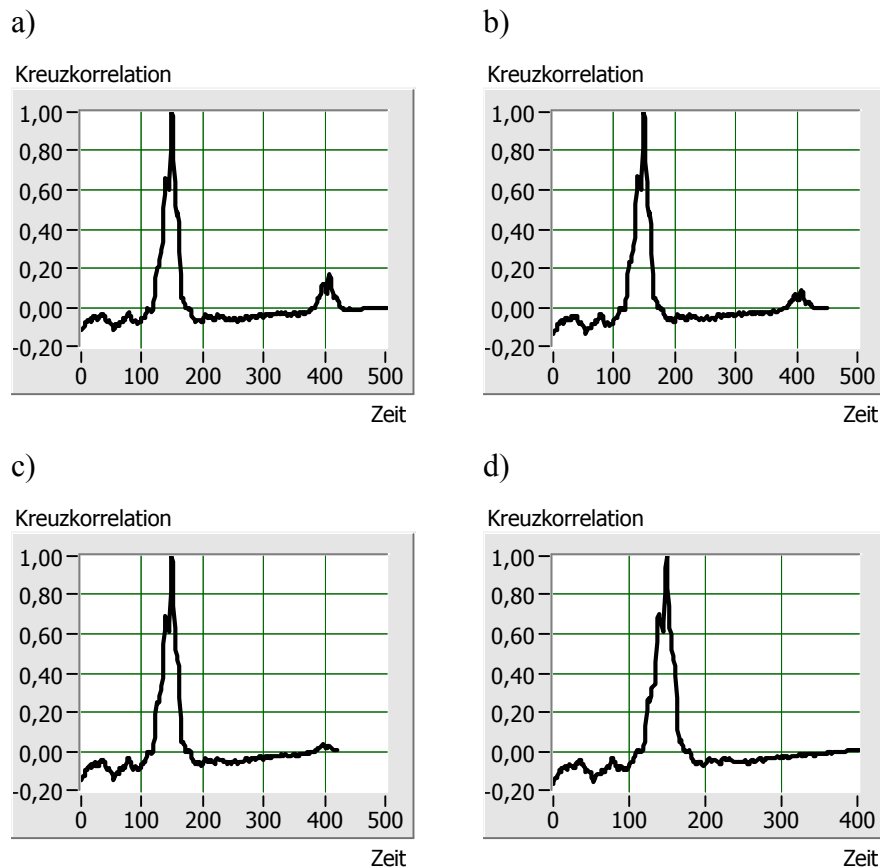
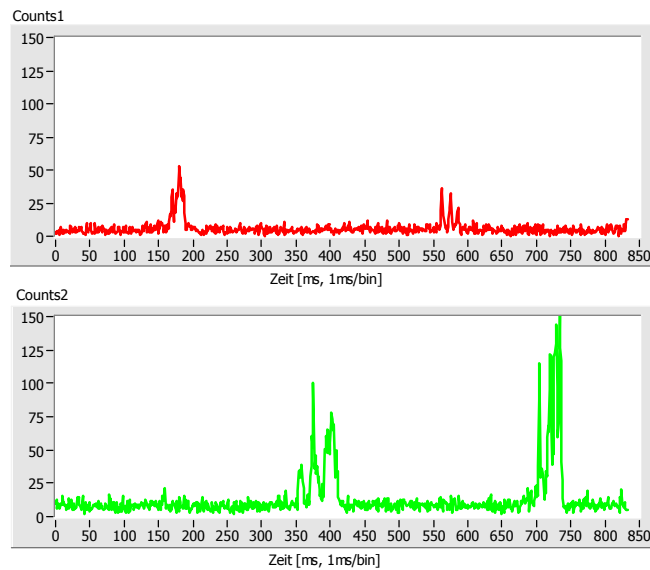


Abb. 4.16 Kreuzkorrelation mit gleitendem Fenster. Gezeigt sind Kreuzkorrelationen bei Fensterlängen von a) 500, b) 450, c) 420 und d) 400 ms.

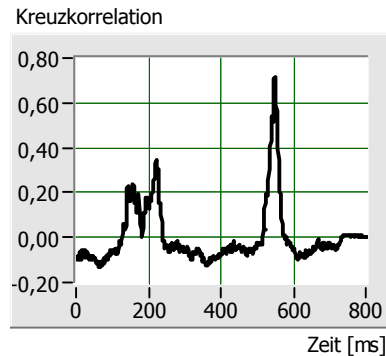
In Abbildung 4.16 ist gezeigt, dass mit abnehmender Fensterlänge der zweite Korrelationspeak abgeschwächt wird.

Ebenso ist ein Beispiel gezeigt, bei dem der zweite Korrelationspeak sehr viel ausgeprägter ist, obwohl der erste korrekt wäre (Abb. 4.17). Durch das gleitende Fenster kann auch dies mit berücksichtigt werden.

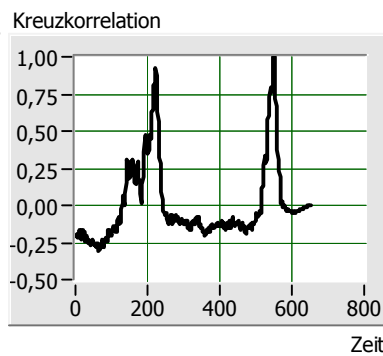
a)



b)



c)



d)

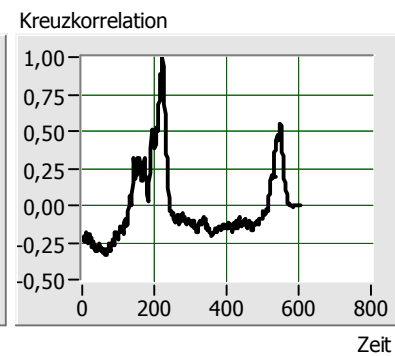


Abb. 4.17 Kreuzkorrelation mit gleitendem Fenster. Die Kreuzkorrelation von obiger Spur (a) führt zu einem Maximum der Transitzeit von 550 ms (b). Eine Fensterlänge von 650 ms (c) gewichtet dieses Ergebnis anders. Ab einer Fensterlänge von 600 ms zeigt sich jedoch, dass das korrekte Maximum bei 220 ms liegt.

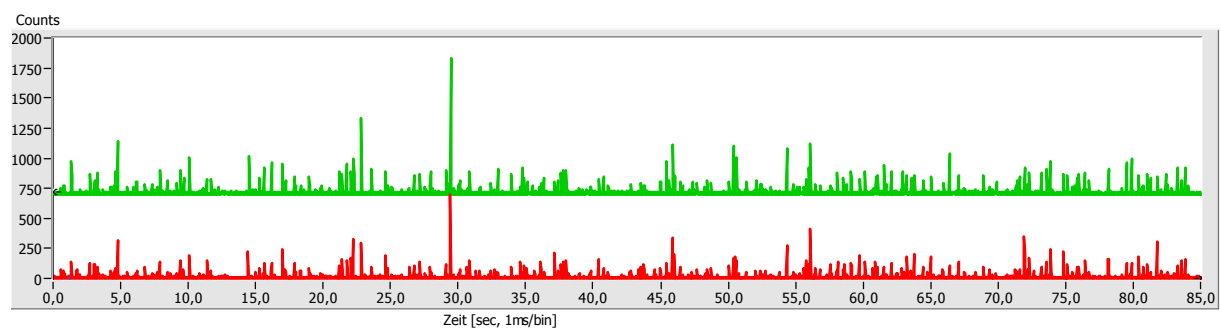
Mehrfachkorrelationen werden durch die Technik des gleitenden Fensters effizient gewichtet. Dies ist für eine kurze MCS-Spur gezeigt worden. Im Falle einer längeren MCS-Spur, d.h. wenn die Statistik groß genug ist, bedeutet das aber, dass die Form des Kreuzkorrelationspeaks zu längeren Transitzeiten bezüglich des Maximums verschoben wird. Die Transitzeitenverteilung steigt schnell zu ihrem Mittelwert an und fällt aufgrund der überlagerten Mehrfachkorrelationen langsam ab. Messungen von Brinkmeier und Eigen [Brinkmeier 1999] zeigen z.B., dass erst bei einer logarithmischen Skalierung der Zeitachse ein symmetrischer Korrelationspeak entsteht. Eine Betrachtung von Mehrfachkorrelationen wird nicht gemacht, obwohl die Messungen nur 5 Sekunden andauern. Das gleitende Fenster kann hier die asymmetrische Form des Kreuzkorrelationspeaks im Linearen verbessern, so dass eine symmetrischere Form errechnet wird.

4.3.2 Höhennormierung der Photonenschauer

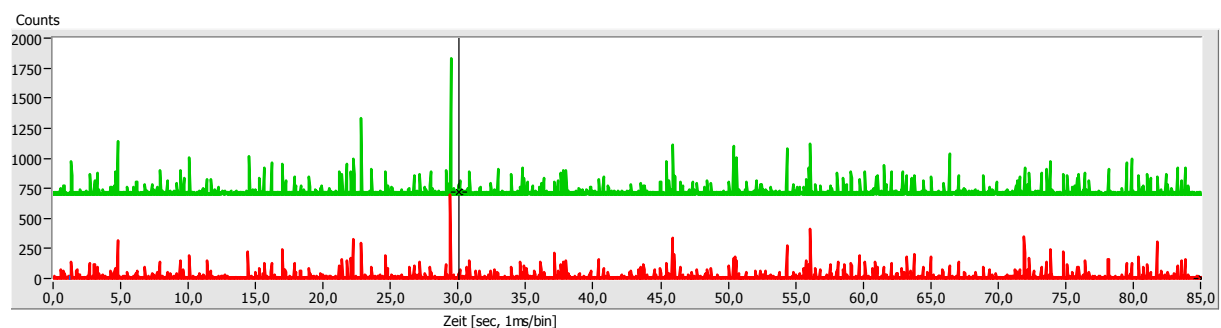
Eine weitere Komplikation bei der Kreuzkorrelation taucht vor allem dann auf, wenn die Bursts unterschiedlich hoch sind. In Simulationen konnte gezeigt werden, dass höhere Bursts trotz Normierung einen stärkeren Einfluss auf die Kreuzkorrelation ausüben als kleinere (s. Materialien und Methoden). Dies kann auch eindrucksvoll für längere Doppeldetektionsmessungen mit einer Dauer von 85 s gezeigt werden. Abbildung 4.18 zeigt die MCS-Spuren einer solchen Messung. Im ersten Fall wurde die gesamte Länge der Spuren kreuzkorreliert, die eine Transitzeiten-Verteilung mit zwei Maxima bei 11 und 20 ms aufweist. Im zweiten Fall wurde der vordere Teil bis 30 s der Spuren nicht berücksichtigt. Das Ergebnis in der Kreuzkorrelationsanalyse weicht stark von dem im ersten Fall ab. Offensichtlich beeinflusst das Burstpaar um 29 s die Kreuzkorrelation so, dass ein zweites Maximum in der Transitzeiten-Verteilung zu sehen ist. Auch die Technik des gleitenden Fensters zeigt, dass der Einfluss des hohen Burstpaars zu sehen bleibt. Das gleitende Fenster hängt daher auch von der Höhe der Bursts ab.

Für solche Zeitspuren wurde eine Höhennormierung eingeführt.

a)



b)



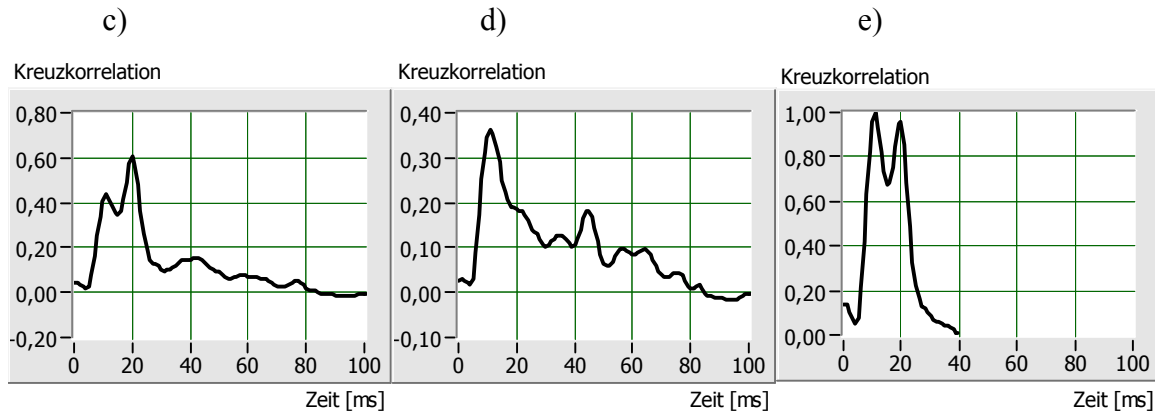
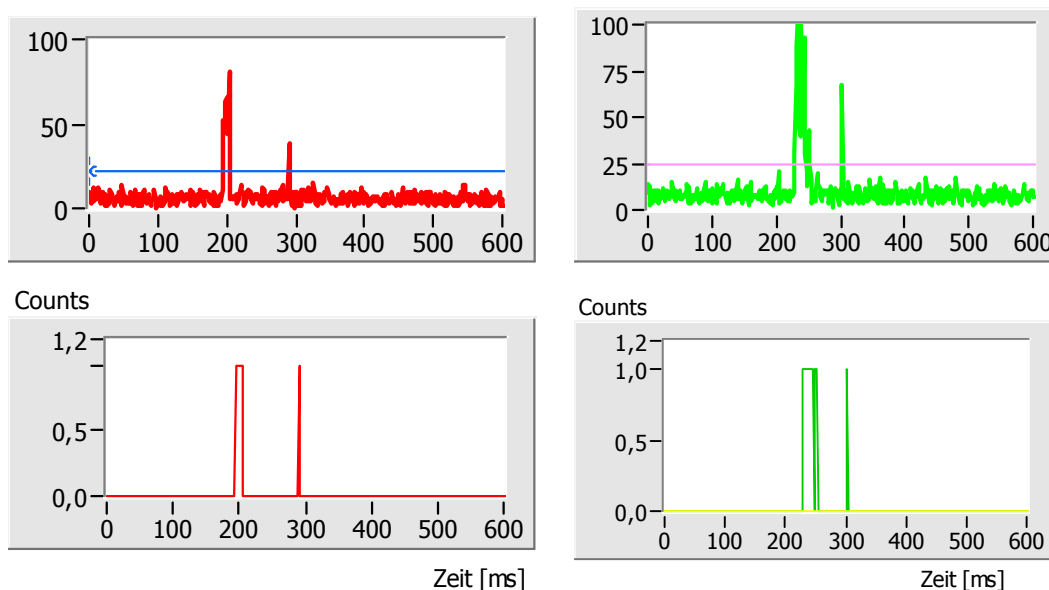


Abb. 4.18 Einfluss von hohen Bursts auf die Kreuzkorrelation. In a, b sind die MCS-Spuren einer Messung mit 10^{-11} M Lösung Microspheres (FluoSpheres® carboxylate-modified microspheres, 0.02 μm , crimson fluorescent (625/645) *2% solids*) in 40 mM Tris-Borat-Puffer pH 8.4, 30 Vol.-% Glyzerin, 2 Vol.-% Tween 20 gezeigt. In b ist die MCS-Spur ab einer Zeit von 30 s zur weiteren Auswertung betrachtet. Dadurch wird das Paar der Photonenschauer mit hoher Fluoreszenzintensität bei etwa 29 s für die Auswertung nicht in Betracht gezogen. Die entsprechenden Kreuzkorrelationen sind in c) und d) gezeigt. Während die Analyse über die gesamte Messdauer eine Verteilung mit zwei Maxima bei 11 und 20 ms liefert, ergibt sich für den Fall b) ein Maximum bei 11 ms. Ein Vergleich mit dem gleitenden Fenster liefert auch zwei Maxima, allerdings mit dem absoluten Maximum bei 11 ms bei einer Fensterlänge von 40 ms. Die Laserleistung an der Probe beträgt 650/950 μW bei einer angelegten Spannung von 34 V.

Das Prinzip der Höhennormierung beruht darauf, dass alle als Bursts erkannten Signale auf den Wert Eins und alle Signale unter der Bursterkennungsschwelle gleich Null gesetzt werden. Die Breite bleibt jedoch erhalten. Werden diese auf Einsen und Nullen normierte MCS-Spuren kreuzkorreliert, sind die hohen Bursts genauso gewichtet wie die kleineren Bursts. Die Kreuzkorrelationsanalyse derselben Spur mit Höhennormierung ist in Abbildung 4.19 gezeigt.



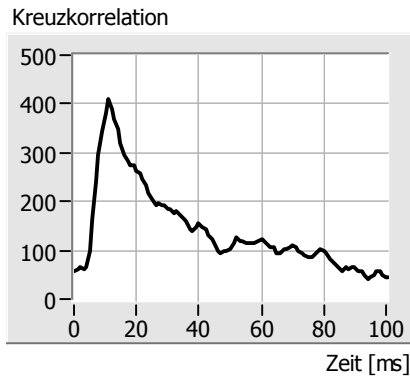


Abb. 4.19 Prinzip der Höhennormierung der Bursts. Alle Bursts werden in ihrer Höhe gleich Eins gesetzt, der Rest auf Null. Die Kreuzkorrelation der so höhennormierten Bursts über die gesamte Dauer der Messung zeigt eine sehr viel eindeutigere Verteilung als bei den Rohdaten. Das Maximum liegt bei 11 ms.

Trotz der verbesserten Auswertung bleibt festzuhalten, dass der Kreuzkorrelationspeak nicht symmetrisch ist, obwohl dies für eine statistische Verteilung um einen Mittelwert zu erwarten wäre. Offensichtlich werden hier noch Mehrfachkorrelationen mit berücksichtigt. Außerdem spielt die Breite der Bursts eine Rolle beim Offset in der Kreuzkorrelation (s. Materialien und Methoden). Erst die Kombination von Höhennormierung und gleitendem Fenster kommt der tatsächlichen Verteilung nahe. Abbildung 4.20 zeigt eine so ausgewertete Kreuzkorrelation.

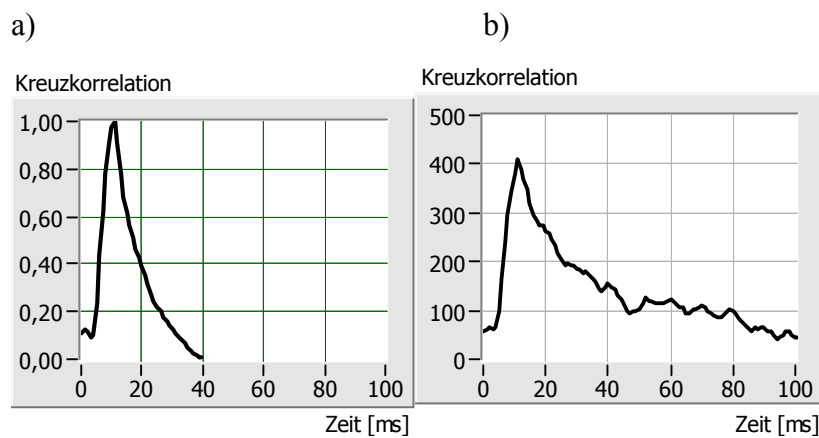


Abb. 4.20 a) Kreuzkorrelationsanalyse mit Höhennormierung und gleitendem Fenster. b) Der Vergleich mit der Kreuzkorrelationsanalyse mittels gleitendem Fenster macht deutlich, dass die rechte, langsam abfallende Flanke ein Artefakt der Burstbreiten ist.

Interessanterweise ergibt sich durch die Kombination von gleitendem Fenster mit einer Länge von 40 ms und der Höhennormierung ein fast symmetrischer Korrelationspeak. Im Vergleich dazu fällt bei reiner Höhennormierung die rechte Flanke langsamer ab.

Die Höhennormierung der Bursts sorgt dafür, dass die Kreuzkorrelationsfunktion von „Ausreißern“ bereinigt wird, da jeder Burst gleich gewichtet wird. Eine Kombination mit dem gleitenden Fenster verbessert sogar das Ergebnis. Damit lassen sich Messungen von mehreren

Sekunden Dauer auf die Korrektheit der mittels Kreuzkorrelationsanalyse der erhaltenen Daten untersuchen.

4.3.3 Höhen- und Breitenormierung

Neben der Höhennormierung der Photonenschauer (engl. Burst) ist eine Breitenormierung möglich. Hierbei müssen die individuellen Formen der Bursts berücksichtigt werden, da die Photonenschauer unterschiedliche Breiten und Schwerpunkte besitzen. Daher wird ein Burst durch folgende drei Größen charakterisiert:

- Burstleft: gibt die Position an, ab der ein Burst beginnt,
- Burstmitte: gibt die Mitte des Bursts an,
- Burstmaximum: gibt die Position des Maximums im Burst wieder.

Abbildung 4.21 zeigt schematisch die charakteristischen Größen eines Bursts. Bemerkenswert ist, dass Burstmaximum und Burstmitte nicht aufeinander liegen müssen. So kann z.B. durch Photozerstörung die Position des Maximums innerhalb des Bursts weiter rechts liegen. Der Schwerpunkt der Fluoreszenz liegt dann rechts von der Burstmitte.

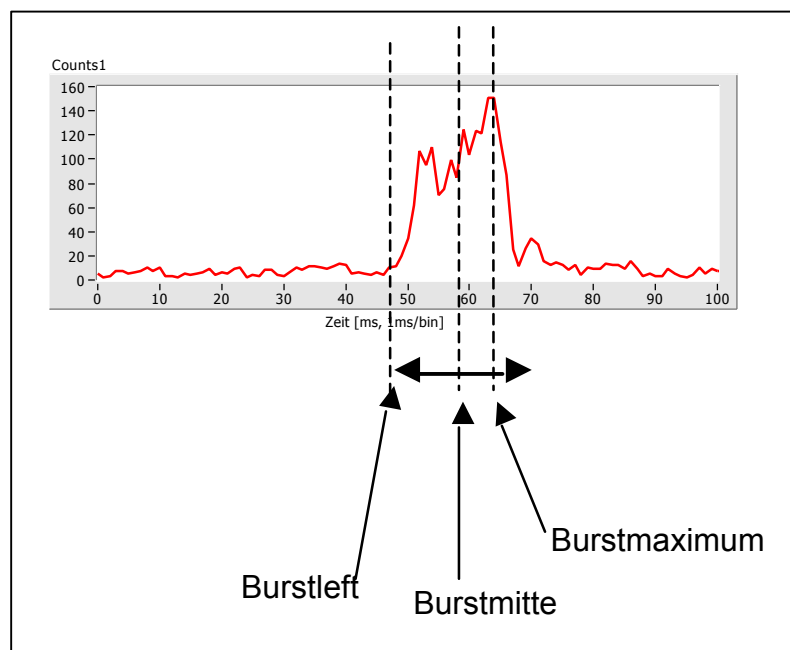


Abb. 4.21 Burstformen und Breitenormierung. Jeder Photonenschauer lässt sich durch mindestens drei Positionen charakterisieren: Burstleft, Burstmitte und Burstmaximum.

Daher wird eine Breitenormierung der Bursts jeweils für alle drei Größen durchgeführt, wobei die Breite eines Bursts auf Eins normiert und auf die Position eines der drei Größen gesetzt wird. Abbildung 4.22 zeigt die Auswertung der obigen Beispielmessung (Abb. 4.18) mit Höhen- und Breitenormierung. Das Ergebnis macht deutlich, dass die Transitzeiten-Verteilung in der Kreuzkorrelation symmetrischer Natur ist und die asymmetrische Form wie z.B. bei der Auswertung der unbehandelten Rohdaten von Mehrfachkorrelationen bzw. durch Burstbreiten verursacht wird. Darüber hinaus lassen sich nun die Anzahl der Ereignisse direkt aus der Kreuzkorrelation herauslesen. Eine zusätzliche Normierung ist nicht mehr notwendig. Aus der Kreuzkorrelation für Burstleft z.B. liest man, dass im Maximum bei 10 ms 30 Ereignisse vorliegen. Das Integral unter dem Peak liefert direkt die Anzahl aller doppelt detektierten Ereignisse. Das sind 350 Burstpaare für diese Beispielmessung.

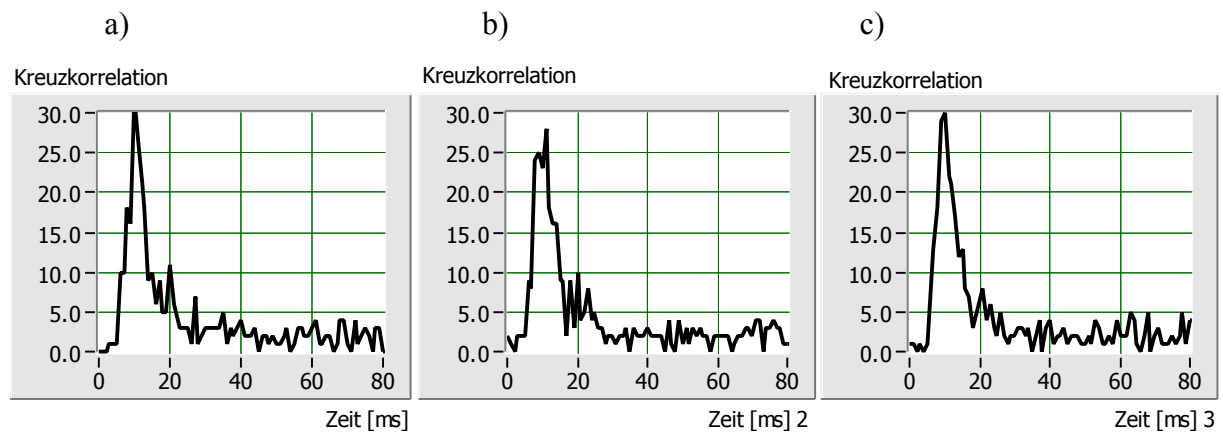


Abb. 4.22 Auswertung der Kreuzkorrelation mit Breiten- und Höhennormierung für die Positionen a) Burstleft, b) Burstmitte und c) Burstmaximum. Es zeigt sich, dass die Maxima für die drei Positionen mit 10, 11 und 10 ms im Rahmen ihrer Halbwertsbreite liegen.

4.3.4 Histogramm der Transitzeiten

Eine weitere Auswertetechnik beruht auf der Verwendung der Original MCS-Spuren. Hierbei werden die Zeitabstände zwischen den korrespondierenden Bursts bestimmt und in einem Histogramm aufgetragen. Dies kann burstweise manuell oder auch - wie hier geschehen - programmiert werden. Dieses Histogramm gibt mit hoher Sicherheit die Verteilung der Transitzeiten wieder. Die Anzahl der Doppeldetektionen in Form des Integrals über das Histogramm kann direkt abgelesen werden. Relative Konzentrationsmessungen, wie sie von LeCaptain [LeCaptain 2002] gemacht wurden, können nun absolut angegeben werden. Ein Vergleich mit der Kreuzkorrelationsanalyse der obigen Beispielmessung zeigt den eklatanten Unterschied. Ohne Kenntnis der MCS-Spuren wäre daher eine Kreuzkorrelationsanalyse

leicht falsch zu interpretieren. Im Falle der Hardware-Korrelation folgt daraus, dass es für solche Messungen empfehlenswert ist, möglichst lange zu messen, um Unregelmäßigkeiten in der Fluoreszenzzeitspur statistisch korrekt zu gewichten. Abbildung 4.23 zeigt für obige Beispielmessung die Histogramme der Abstände zwischen den Burstleft, Burstmitten und Burstmaxima der korrespondierenden Bursts.

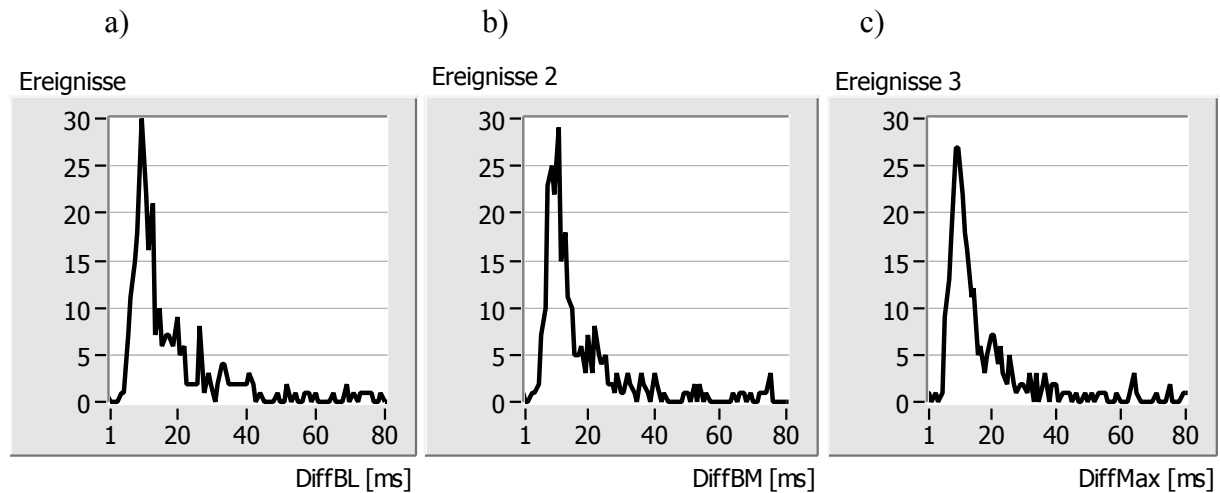


Abb. 4.23 Histogramm der Abstände zwischen den Burstleft (DiffBL), Burstmitten (DiffBM) und Burstmaxima (DiffMax) der korrespondierenden Bursts. Die Maxima liegen bei 10, 11 und 9 ms.

4.4 Doppeldetektion von Polystyrolkugeln in Mikrokapillaren

Die hohe Konzentration von Farbstoffen in Beads vermindert den Einfluss der Photozerstörung. Daher wurden die ersten Versuche mit 20 nm farbstoffmarkierten Polystyrolbeads gemacht, um dadurch die Justierung zur Doppeldetektion zu optimieren. Die Einstellungen konnten dann in den weiteren Versuchen übernommen werden. Der Abstand zwischen den beiden Detektionsvolumina beträgt für alle vorgestellten Ergebnisse 4 μm .

In der Auftragung der Verhältnisse der Burstanzahl beider Detektionssignale in Abhängigkeit der Laserleistung ist die 100%-ige Doppeldetektion ab einer Gesamtlaserleistung von 600 μW ersichtlich (Abb. 4.24). Die Laserleistung war stets so eingestellt, dass im ersten Anregungsvolumen 2/3 der Leistung im zweiten Detektionsvolumen eingestrahlt wurde. Bei 1000 μW Gesamtlaserleistung entspricht das 400 / 600 μW für den ersten / zweiten Anregungsfokus.

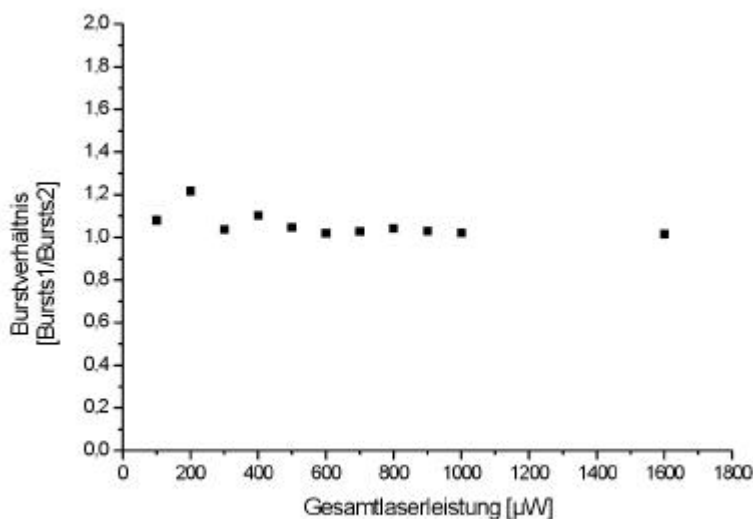


Abb. 4.24 Verhältnis der Burstanzahl beider Detektionssignale in Abhängigkeit der Laserleistung.

Eine Schwierigkeit ergab sich bei der Kreuzkorrelationsanalyse, wenn die Form der Bursts in den MCS-Spuren stark variierte (s. Auswerteverfahren zur Doppeldetektion).

Doppeldetektionsmessungen mit Beads bei drei verschiedenen Laserleistungen belegen das große Potential der entwickelten Verfahren.

Abbildung 4.25 zeigt die MCS-Spuren einer Messung mit einer Laserleistung an der Probe von 650 / 950 μW für die Detektionsvolumina 1 bzw. 2 und einer angelegten Spannung von

+34 V außerhalb des Femtotips. Damit die Farbstoffe nicht schon im ersten Anregungsvolumen gebleicht werden, wurde die Laserleistung für das erste Detektionsvolumen stets etwas geringer gewählt als für das zweite. Dabei gilt in der Regel, dass die Leistung im ersten Anregungsvolumen etwa $2/3$ des im zweiten entspricht.

Zur besseren Übersicht wurde die zweite Spur mit einem Offset von 400 kHz dargestellt.

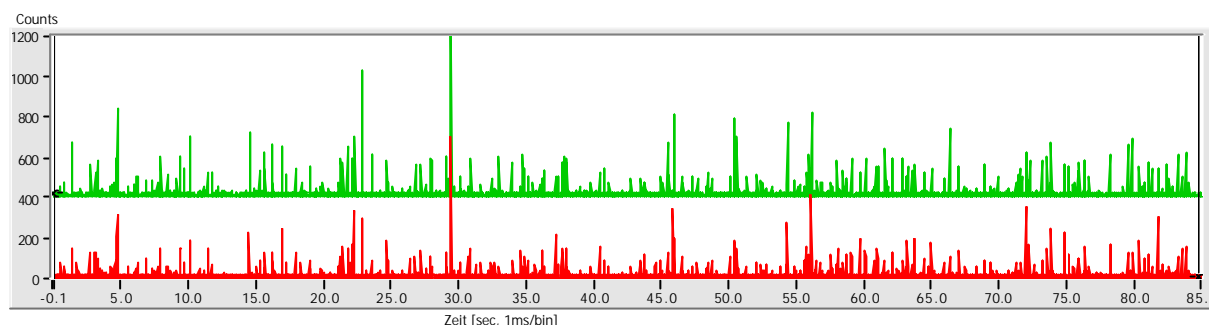
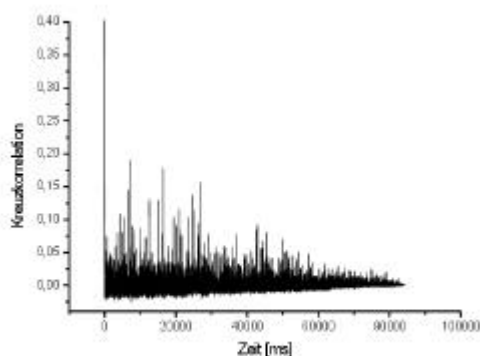


Abb. 4.25 Doppeldetektion Laserleistung an der Probe von $650 / 950 \mu\text{W}$ für die Detektionsvolumina 1 bzw. 2 und einer angelegten Spannung von +34 V außerhalb des Femtotips. Zur Messung ist eine 10^{-11} M Lösung Microspheres (FluoSpheres® carboxylate-modified microspheres, $0.02 \mu\text{m}$, crimson fluorescent (625/645) *2% solids*) in 40 mM Tris-Borat-Puffer pH 8.4, 30 Vol.-% Glycerin, 2 Vol.-% Tween 20 verwendet worden.

Die Auswertung mittels Kreuzkorrelation der erhaltenen Daten liefert zwei Maxima bei $11,0 \pm 2,6$ und $20,0 \pm 4,0$ ms, wie in Abbildung 4.26b gezeigt. Die Fehler stammen von den Halbwertsbreiten der beiden Gauß-Fits. Der vergrößerte Ausschnitt der Kreuzkorrelation zeigt den nach Prüfung der MCS-Spuren relevanten Teil. Interessanterweise zeigt sich, dass die Kreuzkorrelation über die gesamte Spur zu einer Transitzeiten-Verteilung mit sehr vielen lokalen Maxima führt, was auf den Einfluss von mehreren höheren Bursts hindeutet.

a)



b)

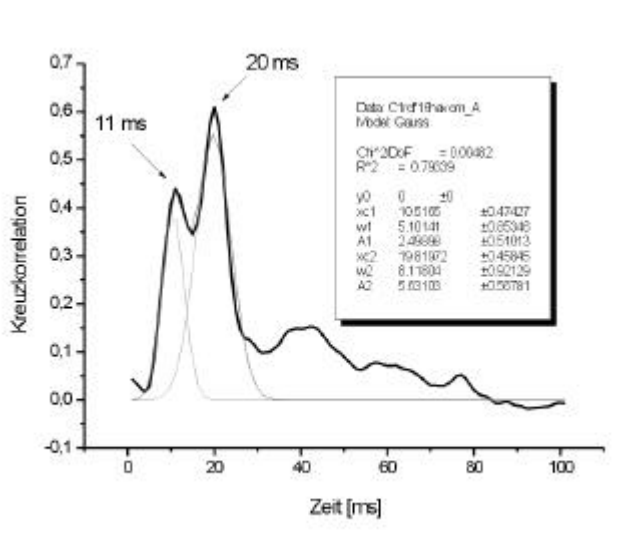


Abb. 4.26 Kreuzkorrelation a) der gesamten MCS-Spuren mit b) vergrößertem Ausschnitt.

Die Kreuzkorrelation mit gleitendem Fenster kann das zweite Maximum zwar geringeren Wichtens, dennoch führt auch diese Transitzeiten-Verteilung zu einer fehlerhaften Interpretation, wie sich im Vergleich zum Histogramm der Zeitabstände zwischen den korrespondierenden Bursts zeigen lässt.

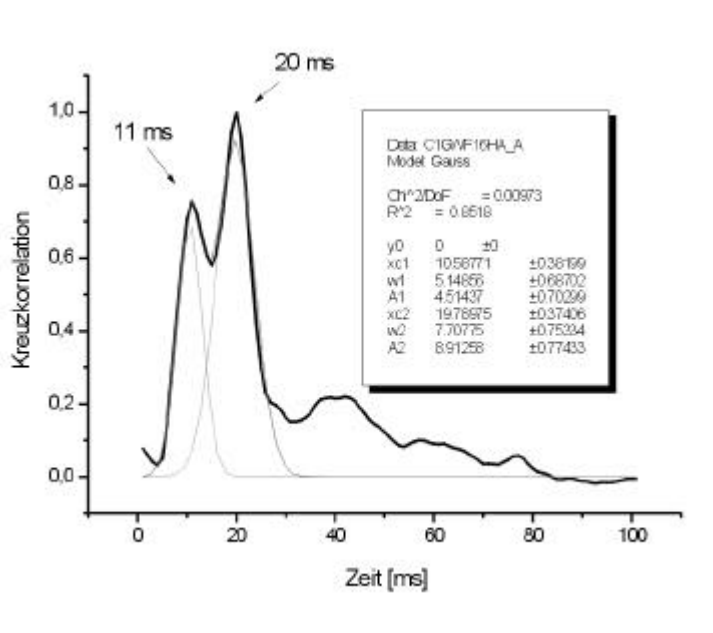


Abb. 4.27 Das Gleitende Fenster liefert ebenfalls zwei Maxima.

Ob der erste oder zweite Peak oder sogar beide korrekt sind, lässt sich durch Betrachten der MCS-Spuren überprüfen. Hier finden sich vermehrt Zeitabstände um 11 ms.

In den Histogrammen für die Zeitabstände zwischen den korrespondierenden Bursts (s. Abb. 4.28) werden jeweils drei charakteristische Größen betrachtet: a) Burstleft, b) Burstmitte und c) Burstmaximum (s. Auswerteverfahren zur Doppeldetektion).

Die drei Verteilungen liegen innerhalb ihrer Halbwertsbreiten und belegen die symmetrische Transitzeitverteilung um ein Maximum. Die Histogramme beweisen aber auch, dass es nur ein Maximum gibt, das bei $10,0 \pm 2,7$ bzw. $11,0 \pm 2,8$ ms liegt.

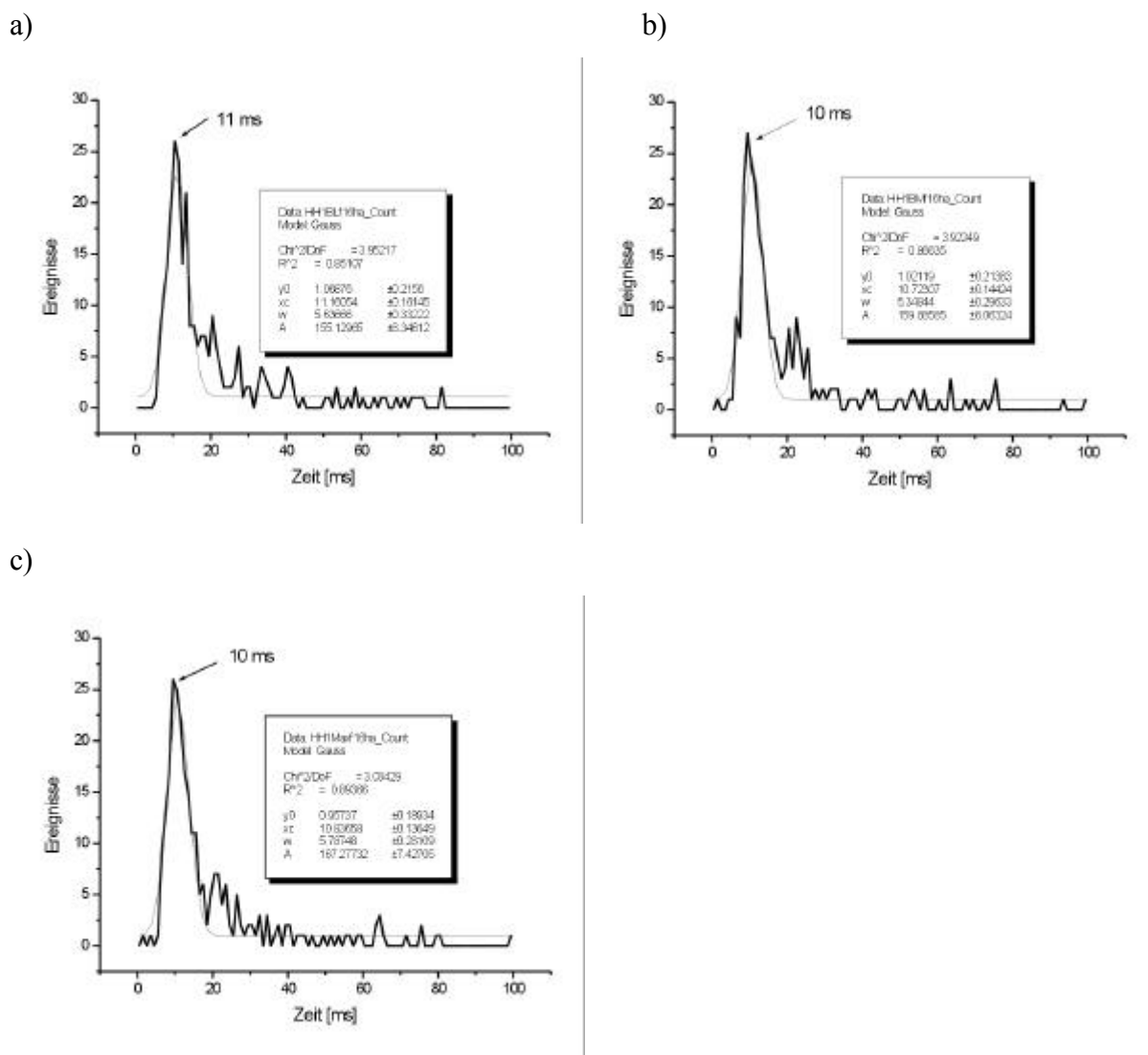


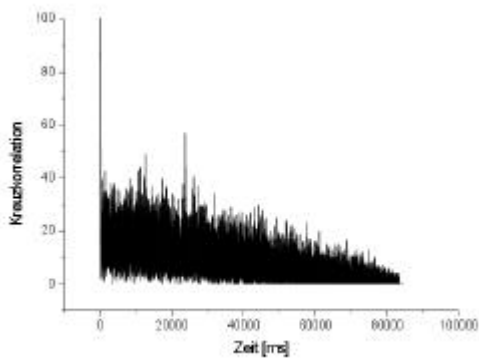
Abb. 4.28 Histogramm der Zeitabstände zwischen korrespondierenden Bursts. Die Zeitabstände zwischen den a) Burstleft, b) Burstmitten und c) Burstmaxima wurden histogrammiert.

Neben der Information über die Position des Maximums in der Transitzeit kann aus den Histogrammen die Anzahl der betrachteten Burstpaare direkt abgelesen werden. So liefert das Integral über die Verteilung ca. 160 Doppeldetektionsereignisse und im Maximum etwa 25 Ereignisse.

Die Kreuzkorrelation mit Höhennormierung der MCS-Spuren ist in Abbildung 4.29 gezeigt. Sie macht im Vergleich zur unbearbeiteten Kreuzkorrelation in Abbildung 4.26 a deutlich, dass relative Maxima von zu hohen Bursts stammen. Zudem ist anhand dieser Analyse

ersichtlich, dass es sich tatsächlich nur um ein Maximum handelt. Das Maximum liegt bei 11 ms.

a)



b)

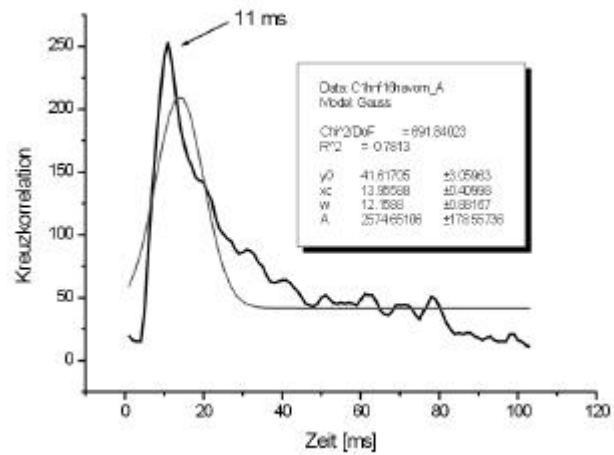


Abb. 4.29 Kreuzkorrelation über a) die gesamte Spur mit Höhennormierung und b) mit vergrößertem Ausschnitt.

Die Kombination aus gleitendem Fenster und Höhennormierung führt zu keinem besseren Ergebnis. In Abbildung 4.30 ist das Ergebnis zu sehen. Auch hier ist nur ein Maximum zu sehen. Beide Verteilungen lassen sich nicht durch einen Gauß-Fit beschreiben.

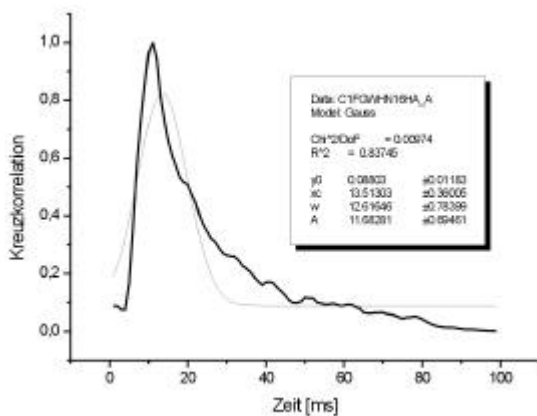
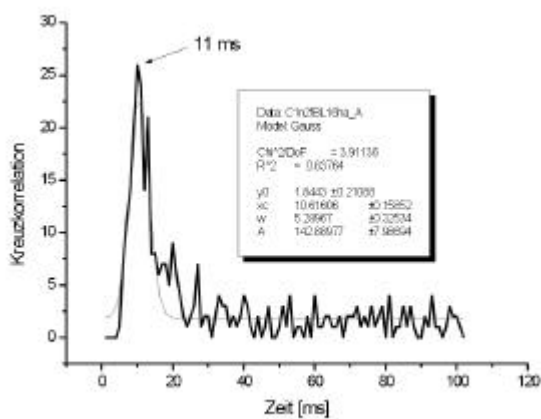


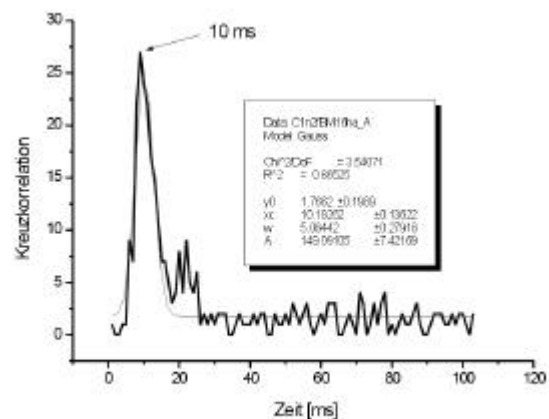
Abb. 4.30 Kreuzkorrelation mit gleitendem Fenster und Höhennormierung.

Um eine verlässliche Kreuzkorrelationsanalyse anwenden zu können, wurden die Bursts im weiteren Schritt neben ihrer Höhennormierung auch auf ihre Breite hin normiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 4.31 zu sehen.

a)



b)



c)

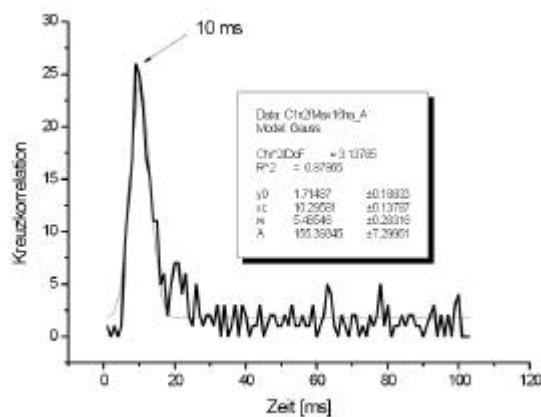


Abb. 4.31 Kreuzkorrelation der höhen- und breitennormierten korrespondierenden Bursts für a) Burstleft, b) Burstmitte und c) Burstmaximum.

Ein weiterer Beweis dafür, dass hohe Bursts die Kreuzkorrelation negativ beeinflussen, ist in Abbildung 4.32 zu sehen. Hier wurde die in Abb. 4.25 gezeigte MCS-Spur erst ab 30 s berücksichtigt.

Ein Vergleich mit der Kreuzkorrelation der gesamten MCS-Spur, verdeutlicht, dass das zweite Maximum bei 20 ms in der Transitzeiten-Verteilung von dem Burstpaar bei 29 s mit hoher Fluoreszenzintensität stammt (s. Abb. 4.25). Zwar ist nun ein Maximum zu sehen, aber die Verteilung ist nicht symmetrisch, was auf den Einfluss von breiteren Bursts hindeutet.

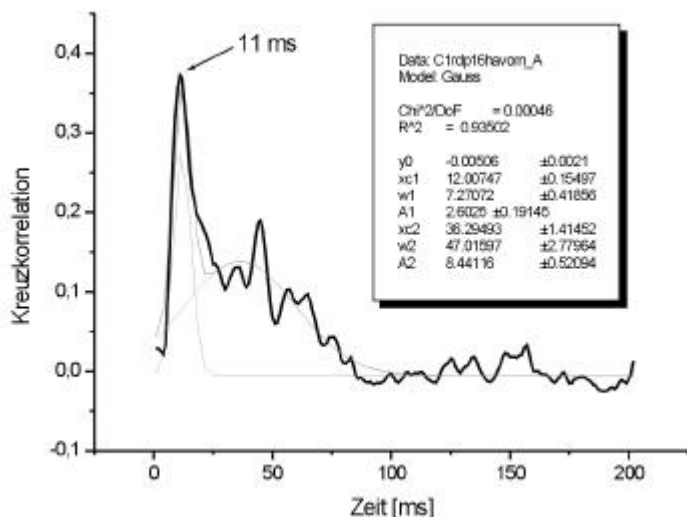


Abb. 4.32 Kreuzkorrelation ohne weitere Auswerteverfahren für obige MCS-Spur ab 30 s.

Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass eine Analyse mittels Kreuzkorrelation nur sinnvoll ist, wenn die Form der Bursts keinen größeren Schwankungen unterworfen ist. Eine Kontrolle lässt sich aber nur im Vergleich mit den Rohdaten – den MCS-Spuren – durchführen.

Neben dieser Messung zeigen auch die bei einer Laserintensität an der Probe von 400 / 600 μW und 200 / 300 μW das gleiche Resultat.

Die Kreuzkorrelationsanalyse einer MCS-Spur (s. Abb. 4.33) von 85 s Dauer bei einer Laserleistung von 400 / 600 μW für die Detektionsvolumina 1 / 2 liefert zwei Maxima bei $6,0 \pm 3,5$ und $29,0 \pm 8,5$ ms, wie in Abbildung 4.34 zu sehen ist.

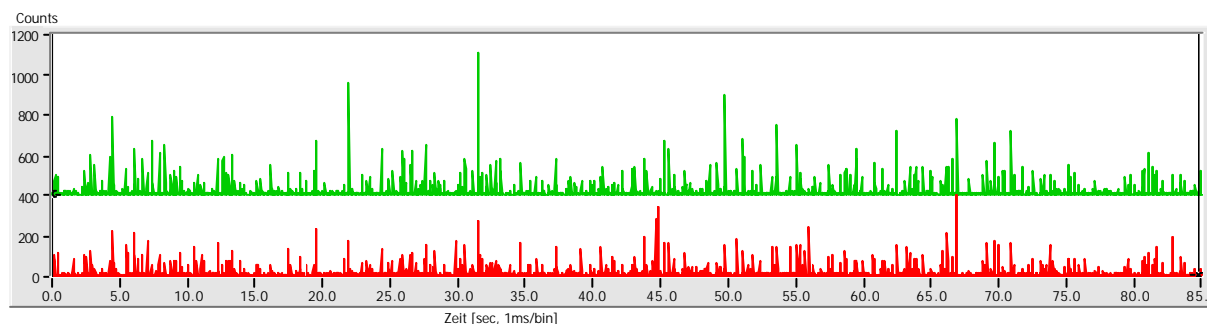


Abb. 4.33 MCS-Spuren bei einer Laserleistung von 400 / 600 μW an der Probe und einer angelegten Spannung von +34 V außerhalb des Femtotips. Zur Messung ist eine 10^{-11} M Lösung Microspheres (FluoSpheres® carboxylate-modified microspheres, 0.02 μm , crimson fluorescent (625/645) *2% solids*) in 40 mM Tris-Borat-Puffer pH 8.4, 30 Vol.-% Glycerin, 2 Vol.-% Tween 20 verwendet worden.

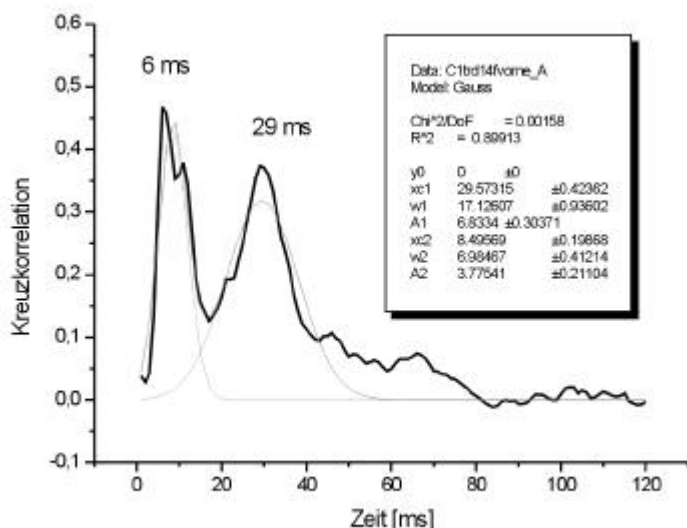
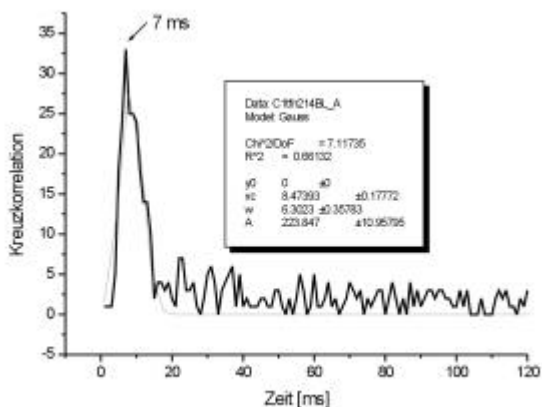


Abb. 4.34 Kreuzkorrelation der gesamten MCS-Spuren bei einer Laserleistung von 400 / 600 μW an der Probe und einer angelegten Spannung von +34 V außerhalb des Femtotips. Zur Messung ist eine 10^{-11} M Lösung Microspheres (FluoSpheres® carboxylate-modified microspheres, 0.02 μm , crimson fluorescent (625/645) *2% solids*) in 40 mM Tris-Borat-Puffer pH 8.4, 30 Vol.-% Glyzerin, 2 Vol.-% Tween 20 verwendet worden.

Da die Kreuzkorrelation mit Höhen- und Breitennormierung verglichen mit dem Histogramm der Transitzeiten bezüglich der Burstleift der korrespondierenden Paare eine ähnliche Verteilung mit dem Maximum bei $7,0 \pm 3,2$ ms ergibt, kann auch hier festgehalten werden, dass die Kreuzkorrelation falsche Resultate liefert, wenn die Burstform nicht berücksichtigt wird (s. Abb. 4.35).

a)



b)

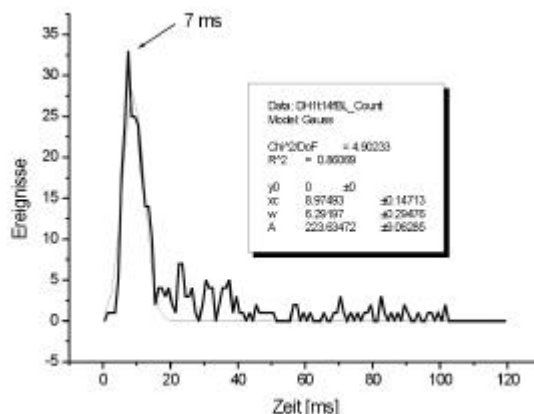


Abb. 4.35 a) Kreuzkorrelation der höhen- und breitennormierten Bursts. b) Histogramm der Transitzeiten.

Eine Auswertung mittels Kreuzkorrelation ab 35 s innerhalb der erhaltenen MCS-Spuren (s. Abb. 4.33) macht den Einfluss durch hohe Bursts ersichtlich. Die zweite Peakhöhe ist deutlich reduziert.

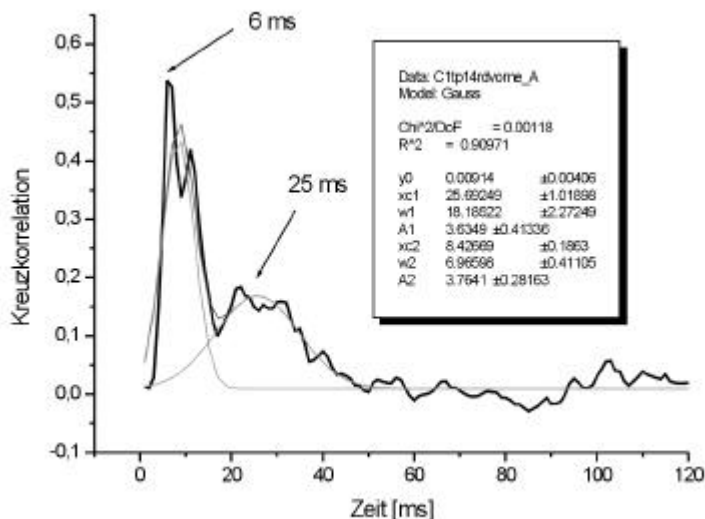


Abb. 4.36 Kreuzkorrelation der MCS-Spuren ab 35 s.

In der Messung mit einer Laserintensität an der Probe von 200 / 300 μW wird ein ähnliches Ergebnis gefunden. Abbildung 4.37 zeigt die MCS-Spuren.

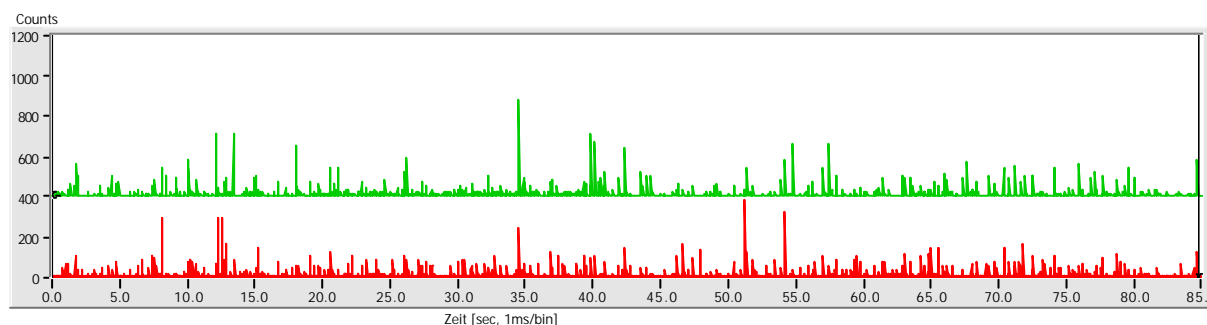
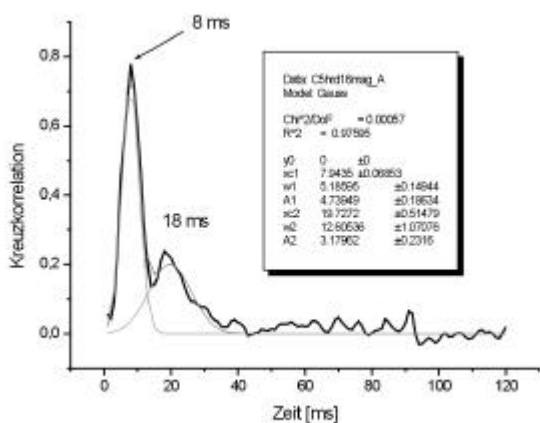


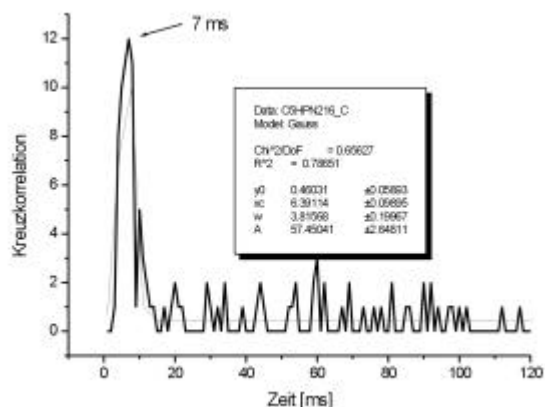
Abb. 4.37 MCS-Spuren bei einer Laserleistung von 200 /300 μW an der Probe und einer angelegten Spannung von +34 V außerhalb des Femtotips. Zur Messung ist eine 10^{-11} M Lösung Microspheres (FluoSpheres® carboxylate-modified microspheres, 0.02 μm , crimson fluorescent (625/645) *2% solids*) in 40 mM Tris-Borat-Puffer pH 8.4, 30 Vol.-% Glycerin, 2 Vol.-% Tween 20 verwendet worden.

Während die Kreuzkorrelation der gesamten MCS-Spur zwei Maxima bei $8,0 \pm 2,6$ und $18,0 \pm 6,0$ ms liefert, ist mit der Höhen- und Breitennormierung bzw. im Histogramm der Transitzeiten nur ein Maximum bei $7,0 \pm 3,2$ und $7,0 \pm 3,4$ zu sehen (s. Abb. 4.38).

a)



b)



c)

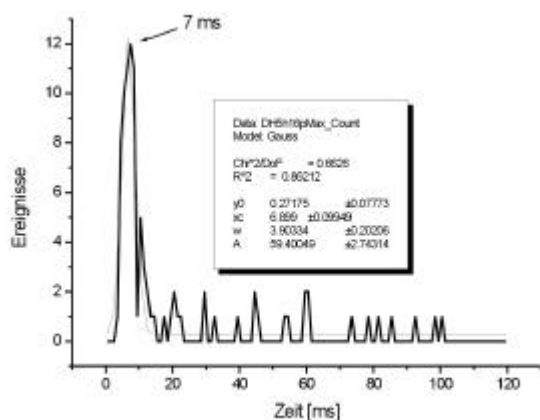


Abb. 4.38 a) Kreuzkorrelation der MCS-Spuren, b) Kreuzkorrelation mit Höhen- und Breitennormierung, c) Histogramm der Transitzeiten.

Offensichtlich ist der Kreuzkorrelationsanalyse für MCS-Spuren mit variierender Burstform nicht ohne weiteres zu vertrauen. Es konnte gezeigt werden, dass die direkt aus den Spuren ablesbaren Transitzeiten nur erreicht werden, wenn die Höhen und Breiten der Bursts normiert werden. Tabelle 4.1 gibt einen Überblick über die Ergebnisse.

Laserleistung [μ W]	200 / 300	400 / 600	650 / 950
KK der Rohdaten [ms]	7,9 \pm 2,6 & 19,7 \pm 6,2	6,8 \pm 3,5 & 29,6 \pm 8,5	11,0 \pm 2,6 & 20,0 \pm 4,0
KK mit Gleitendem Fenster (GW) [ms]	7,9 \pm 2,6 & 19,5 \pm 5,5	8,4 \pm 3,5 & 28,6 \pm 8,0	10,6 \pm 2,5 & 19,8 \pm 3,8
KK mit Höhen- normierung (HN) [ms]	7,6 \pm 2,2 & 16,1 \pm 20,5	9,4 \pm 2,9 & 25,4 \pm 24,5	11,0 \pm 6,0
KK mit GW & HN [ms]	8,4 \pm 4,5	9,8 \pm 4,5	11,0 \pm 6,3
KK mit HN & Breitennormierung [ms]	6,8 \pm 2,4 ^a	8,5 \pm 3,1 ^a	10,6 \pm 2,6 ^a
	6,4 \pm 2,5 ^b	7,8 \pm 3,0 ^b	10,2 \pm 2,5 ^b
	6,6 \pm 2,4 ^c	7,6 \pm 2,9 ^c	10,3 \pm 2,7 ^c
Histogramm der Transitzeiten [ms]	7,3 \pm 2,5 ^a	8,9 \pm 3,1 ^a	11,2 \pm 2,8 ^a
	7,0 \pm 2,6 ^b	8,3 \pm 3,0 ^b	10,7 \pm 2,6 ^b
	7,2 \pm 2,5 ^c	8,1 \pm 2,9 ^c	10,8 \pm 2,8 ^c

Tab. 4.1 Überblick der Ergebnisse. Die Indizes a, b, c stehen für die drei charakteristischen Größen eines Photonenschauers: Burstleft, Burstmitte und Burstmaximum (KK: Kreuzkorrelation, GW: Gleitendes Fenster, HN: Höhennormierung).

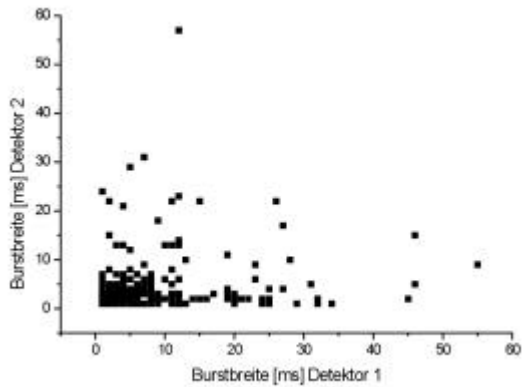
Die Ergebnisse zeigen, dass eine Kreuzkorrelationsanalyse ohne Berücksichtigung der Burstformen zu fehlerhafter Interpretation führt. So konnte gezeigt werden, dass es nur ein Maximum in der Transitzeiten-Verteilung gibt. Ein direkter Vergleich zwischen den Histogrammen der Transitzeiten und der Kreuzkorrelation mit Höhen- und Breitenormierung macht deutlich, dass eine Software-basierte Auswertung zu den tatsächlichen Abständen zwischen korrespondierenden Bursts führt.

Interessanterweise ist das Maximum der Verteilung mit zunehmender Laserleistung zu längeren Zeiten hin verschoben. Die Werte liegen jedoch innerhalb der Halbwertsbreiten aller Messungen.

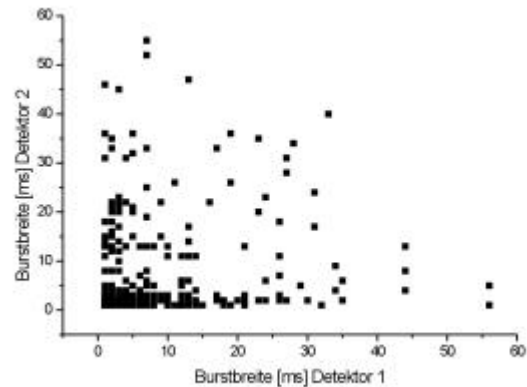
Weitere Informationen aus den Doppeldetektionsmessungen lassen sich erhalten, wenn die Messgrößen beider Detektoren gegenübergestellt werden.

So zeigt sich im Vergleich der Burstbreiten-Verteilung (engl. burst duration), dass bei steigender Laserleistung die statistische Burstbreite im zweiten Detektionsvolumen abnimmt (Abb. 4.39).

a)



b)



c)

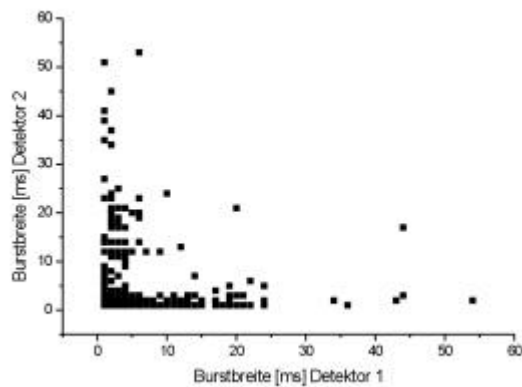


Abb. 4.39 Burstbreiten-Verteilung. Aufgetragen sind die Burstbreiten von Detektor 2 über 1 bei a) 650 / 950, b) 400 / 600 und c) 200 / 300 μW .

In der Verteilung der Burstgrößen (Abb. 4.40), in der die Gesamtzahl aller Photonen pro Burst im Detektionsvolumen 2 über 1 dargestellt wird, ist ein solcher Effekt ebenfalls zu sehen.

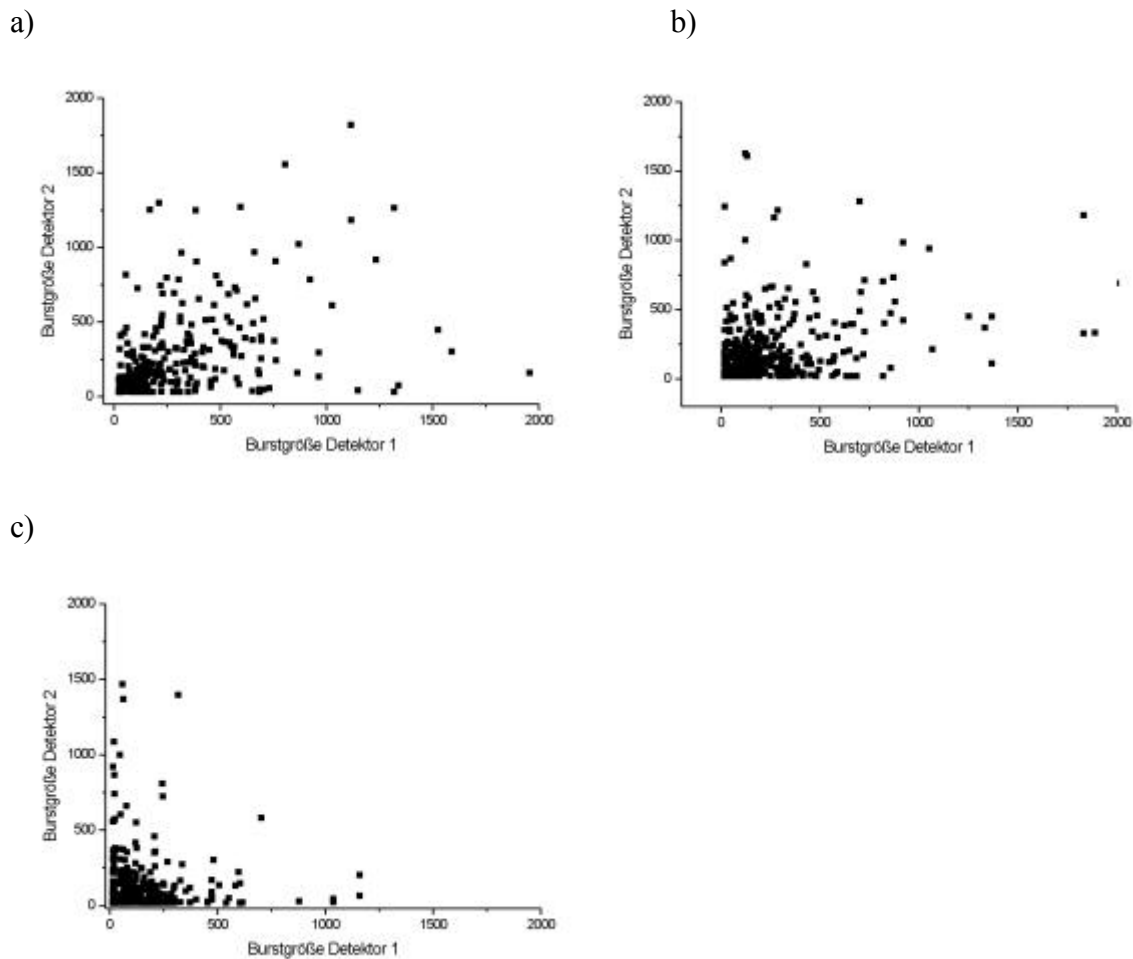
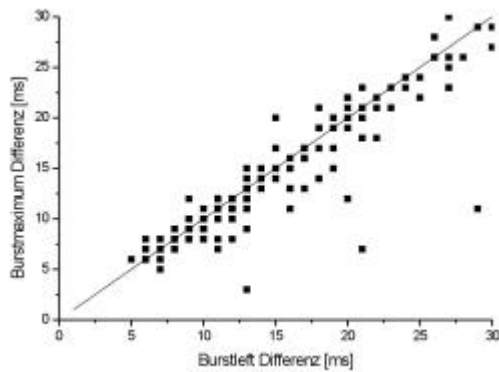


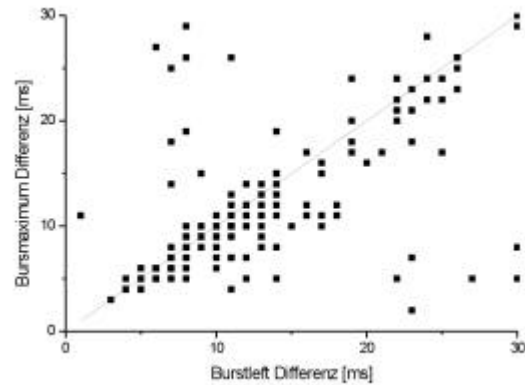
Abb. 4.40 Burstgrößen-Verteilung. Aufgetragen sind die Burstsize von Detektor 2 über Detektor 1 für a) 650 / 950, b) 400 / 600 und c) 200 / 300 μW .

Ein Vergleich der Verteilungen der Zeitabstände zwischen den Burstmaxima (bezeichnet als Burstmaximum Differenz) über den Abständen zwischen den Burstleft (bezeichnet als Burstleft Differenz) für die jeweiligen korrespondierenden Bursts verdeutlicht, dass bei hoher Laserleistung im Mittel die Abstände zwischen den Burstmaxima kleiner oder gleich denen der Burstleft sind, was einen kürzeren zweiten Bursts bzw. das Photobleaching im zweiten Detektionsvolumen indiziert (Abb. 4.41). Im Gegensatz dazu finden sich bei niedrigerer Laserleistung auch längere zweite Bursts.

a)



b)



c)

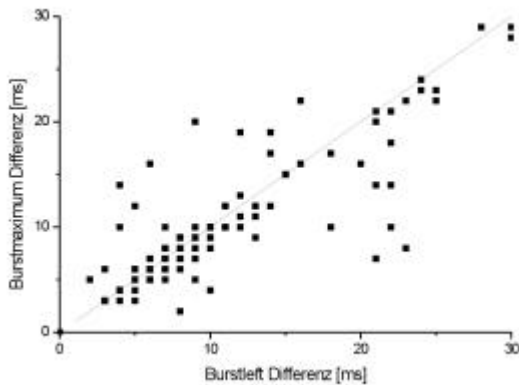


Abb. 4.41 Abstände zwischen den Burstmaxima (bezeichnet als Burstmaximum Differenz) über den Abständen zwischen den Burstleft (bezeichnet als Burstleft Differenz) für die jeweiligen korrespondierenden Bursts, aufgetragen für a) 650 / 950, b) 400 / 600 und c) 200 / 300 μ W.

In weiteren Experimenten wurde die angelegte Spannung variiert. Dabei zeigt sich eine lineare Abhängigkeit der Transitzeiten im Bereich zwischen 13 und 25 V, bei der die Ergebnisse, die aus unbehandelter Kreuzkorrelation (?) und aus den Histogrammen (O) stammen, übereinstimmen (Abb. 4.42). Die Fehler ergeben sich aus den Halbwertsbreiten von Gauß-Fits gekreuzkorrelierter Daten. Die so berechnete elektrophoretische Mobilität ergibt Wanderungsgeschwindigkeiten zwischen 0,02 und 0,05 mm/s.

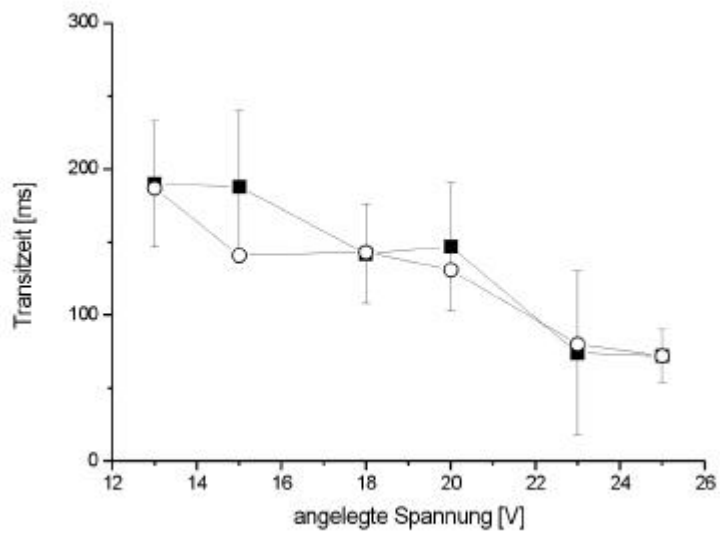


Abb. 4.42 Transitzeiten in Abhängigkeit der angelegten Spannung.

4.5 Doppeldetektion von farbstoffmarkierten Mononukleotiden in Mikrokapillaren

In Abbildung 4.43 sind die zweifach detektierten Fluoreszenzsignale einer 10^{-11} M Lösung des markierten Mononukleotids MR121-dUTP in 40 mM Tris-Borat-Puffer pH 8.4, 30 Vol.-% Glycerin, 2 Vol.-% Tween 20 beim elektrophoretischen Transport durch die Kapillare gezeigt. Bei geeigneter Wahl der Laserleistung und der angelegten Spannung ist eine eindeutige Doppeldetektion der Analytmoleküle in der Mikrokapillare möglich. In der gezeigten Spur finden sich auch einige Bursts innerhalb der ersten MCS-Spur, die keine Entsprechung in der zweiten MCS-Spur haben. Dies ist auf die Photozerstörung des Farbstoffs zurückzuführen, die vermehrt bei höheren Laserleistungen auftritt.

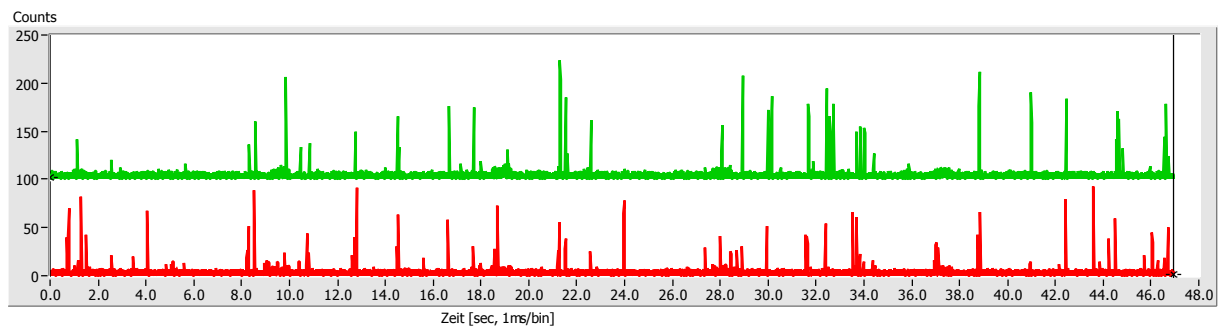


Abb. 4.43 Doppeldetektion einzelner Analytmoleküle einer 10^{-11} M Lösung MR121-dUTP in 40 mM Tris-Boratpuffer pH 8.4, 30 Vol.-% Glycerin, 2 Vol.-% Tween 20. Die untere Spur zeigt die erste Detektion, die obere Spur die zweite bei einer angelegten Spannung von 20 V und einer mittleren Laserleistung an der Probe von 600 / 900 μ W im ersten / zweiten Detektionsvolumen. Der Abstand zwischen den beiden Detektionseinheiten beträgt 4 μ m. Zur Übersichtlichkeit ist die zweite MCS-Spur mit einem Offset von 100 kHz dargestellt.

Die MCS-Spuren in Abbildung 4.44 zeigen bei einer angelegten Spannung von 15 V und einer Gesamtlaserleistung von 1500 μ W, dass viele farbstoffmarkierte Analytmoleküle bereits im ersten Detektionsvolumen gebleicht werden.

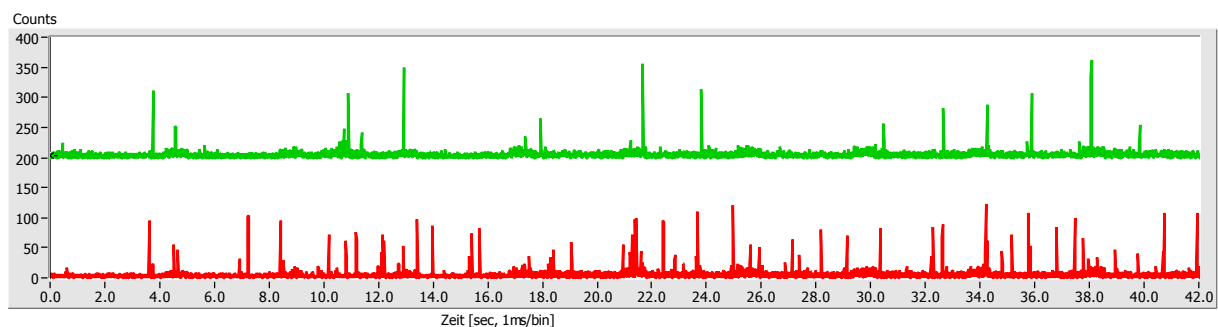


Abb. 4.44 MCS-Spuren einzelner Analytmoleküle einer 10^{-11} M Lösung Cy5-dCTP in 40 mM Tris-Boratpuffer pH 8.4, 30 Vol.-% Glycerin, 2 Vol.-% Tween 20. Die untere Spur zeigt die erste Detektion, die obere Spur die zweite bei einer angelegten Spannung von 13 V und einer mittleren Laserleistung an der Probe von 600 / 900 μ W im ersten / zweiten Detektionsvolumen. Zur Übersichtlichkeit ist die zweite MCS-Spur mit einem Offset von 200 kHz dargestellt.

Das Verhältnis der Burstanzahl der Einzelmolekülereignisse beider Detektionssignale in Abhängigkeit von der Laserleistung ergibt z. B. für eine 10^{-11} M Lösung MR121-dUTP ein Optimum bei etwa 1000 μW mittlerer Gesamtlaserleistung beider Anregungsstrahlen bei einer angelegten Spannung von 20 V (Abb. 4.45). Bis zu diesem Bereich konnten die besten Ergebnisse zur Doppeldetektion gemessen werden. Bei höherer Laserleistung werden die Analytmoleküle bereits im ersten Anregungsvolumen gebleicht und können nicht mehr im zweiten detektiert werden. Die Laserleistung war stets so eingestellt, dass im ersten Anregungsvolumen 2/3 der Leistung im zweiten Detektionsvolumen eingestrahlt wurde. Bei 1000 μW Gesamtlaserleistung entspricht das 400 / 600 μW für den ersten / zweiten Anregungsfokus.

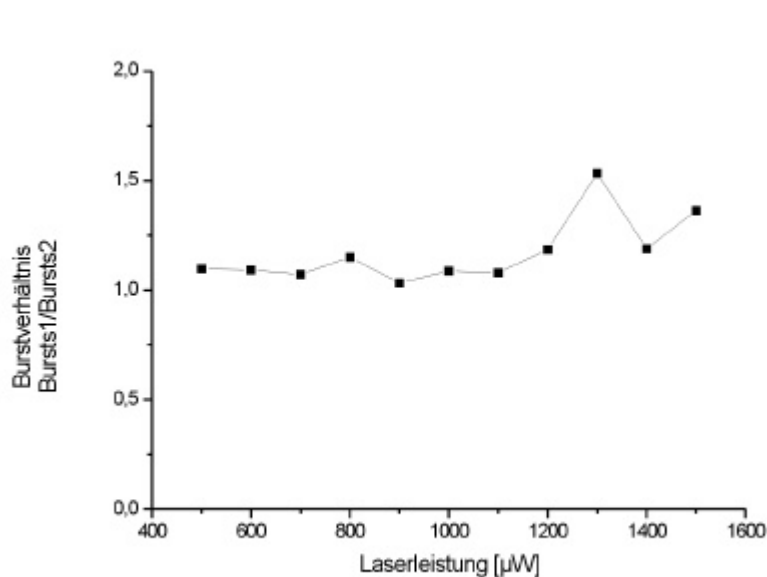


Abb. 4.45 Verhältnis der Burstanzahl beider Detektionssignale in Abhängigkeit der Laserleistung für eine 10^{-11} M Lösung MR121-dUTP in 40 mM Tris-Boratpuffer pH 8.4, 30 Vol.-% Glycerin, 2 Vol.-% Tween 20 in der Mikrokapillare bei einer angelegten Spannung von 20V. Die Laserleistung gibt die Intensität beider Laserstrahlen wieder, wobei der erste Laserstrahl etwa 2/3 der Intensität des zweiten besitzt.

Wird die angelegte Spannung erhöht, so steigt damit auch die Wanderungsgeschwindigkeit der geladenen Analytmoleküle an, so dass die Verweilzeiten innerhalb der Anregungsfoki verkürzt sind. Damit sinkt auch die Wahrscheinlichkeit eines Bleachvorgangs.

Bei einer Spannung von 30 V liegt der optimale Bereich für eine Doppeldetektion zwischen 700 und 1000 μW mit einer Wahrscheinlichkeit von über 85 % (Abb. 4.46).

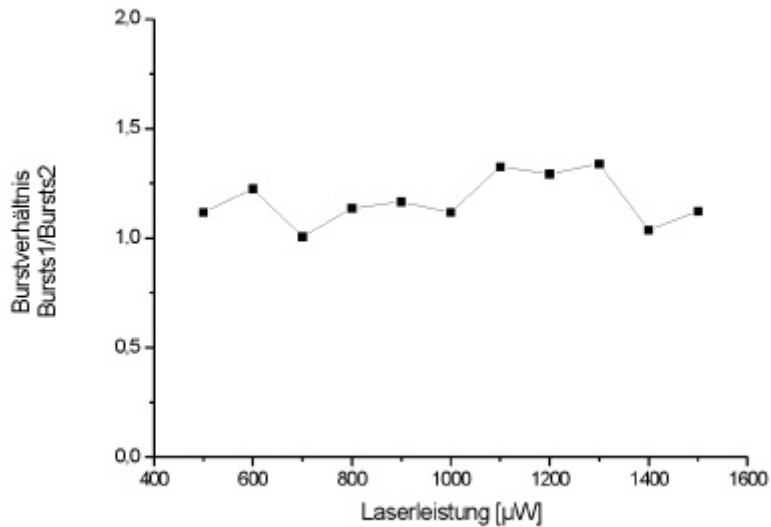


Abb. 4.46 Verhältnis der Burstanzahl beider Detektionssignale in Abhängigkeit der Laserleistung für eine 10^{-11} M Lösung MR121-dUTP in 40 mM Tris-Boratpuffer pH 8.4, 30 Vol.-% Glycerin, 2 Vol.-% Tween 20 in der Mikrokapillare bei einer angelegten Spannung von 30V. Die Laserleistung gibt die Intensität beider Laserstrahlen wieder, wobei der erste Laserstrahl etwa 2/3 der Intensität des zweiten besitzt.

Weiterhin verkürzt wird die Verweilzeit im Fokus bei einer angelegten Spannung von 40 V, so dass eine Photozerstörung unwahrscheinlicher wird (Abb. 4.47). Dies erklärt den breiteren Bereich, in dem eine Doppeldetektion möglich ist. Im Mittel ergibt sich eine 96 %-ige Wahrscheinlichkeit, für eine Doppeldetektion.

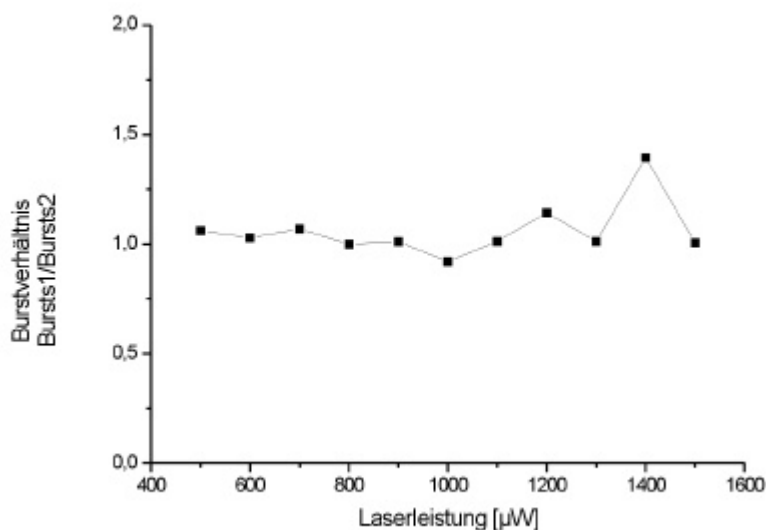


Abb. 4.47 Verhältnis der Burstanzahl beider Detektionssignale in Abhängigkeit der Laserleistung für eine 10^{-11} M Lösung MR121-dUTP in 40 mM Tris-Boratpuffer pH 8.4, 30 Vol.-% Glycerin, 2 Vol.-% Tween 20 in der Mikrokapillare bei einer angelegten Spannung von 40V. Die Laserleistung gibt die Intensität beider Laserstrahlen wieder, wobei der erste Laserstrahl etwa 2/3 der Intensität des zweiten besitzt.

Zur Charakterisierung der Strömungsgeschwindigkeit der Analytmoleküle in der Kapillare wurde die Kreuzkorrelation der Messdaten bei 1000 μW Gesamtlaserleistung mit den entwickelten Auswerteverfahren gebildet. In unterer Tabelle 4.2 sind die Resultate zusammengefasst. Der Vergleich aller Ergebnisse zeigt, dass die Werte innerhalb der Halbwertsbreiten liegen. Dies lässt sich darauf zurückführen, dass die Form der Bursts nicht stark variiert. Allein für die Spannungen bei 20 und 30 V ist in den Histogrammen der Transitzeiten eine leichte Verschiebung des Maximums zu kürzeren Zeiten im Vergleich mit den Ergebnissen aus den Kreuzkorrelationsdaten zu beobachten. Zudem ist auch nur ein Maximum zu sehen. Mit zunehmender Spannung nehmen auch die Halbwertsbreiten ab, was mit der höheren Wanderungsgeschwindigkeit bzw. der kürzeren Verweilzeit im Detektionsvolumen korrespondiert. Bei geringen Spannungen ist die Wanderungsgeschwindigkeit mit der Brownschen Molekularbewegung überlagert. Als Beispiel ist in Abb. 4.48 ein Abschnitt einer MCS-Spur mit drei korrespondierenden Burstpaaren bei einer angelegten Spannung von 15 V gezeigt. Die Transitzeiten variieren in diesem Fall von 15 über 40 bis 61 ms.

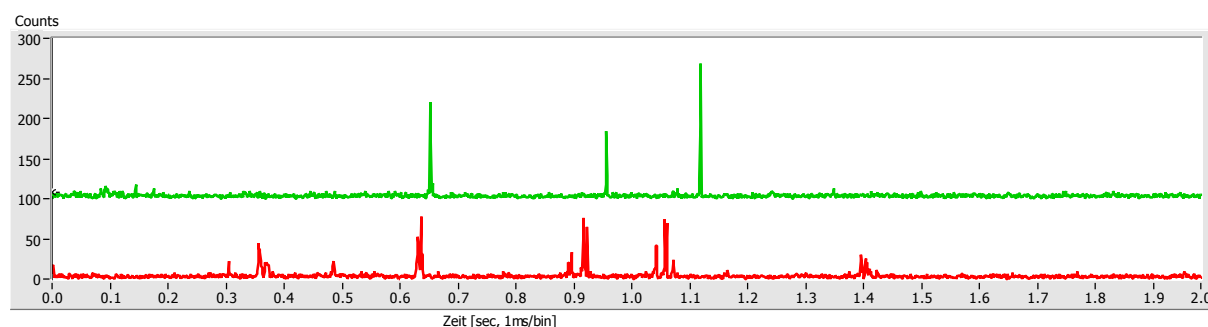


Abb. 4.48 Doppeldetektion einer 10^{-11} M Lösung MR121-dUTP in 40 mM Tris-Boratpuffer pH 8.4, 30 Vol.-% Glycerin, 2 Vol.-% Tween 20 in der Mikrokapillare bei einer angelegten Spannung von 15V.

Spannung [V]	20	30	40
Kreuzkorrelation (KK) der Rohdaten [ms]	40,3±23,2	36,1±8,0	5,5±1,7
KK mit Gleitendem Fenster (GW) [ms]	38,9±16,0	34,3±9,0	5,6±2,7
KK mit Höhennormierung (HN) [ms]	41,7±11,1	36,5±7,5	5,3±1,5

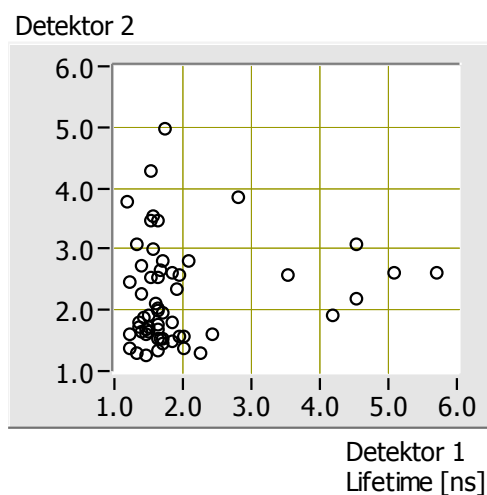
KK mit GW & HN [ms]	38,8±11,3	34,7±9,0	5,3±1,6
KK mit HN & Breitennormierung [ms]	41,4±9,5	32,7±5,5	5,3±1,3
	40,5±9,2	35,0±9,0	5,3±1,4
	44,3±8,0	34,0±11,0	5,0±0,9
Histogramm der Transitzeiten [ms]	41,2±10,5	33,4±6,0	5,8±1,3
	41,2±10,5	34,5±10,5	5,8±1,4
	44,2±9,1	34,5±11,5	5,5±0,9

Tab. 4.2 Transitzeiten bei 1000 μW Gesamtleistung für eine 10^{-11} M Lösung MR121-dUTP in 40 mM Tris-Boratpuffer pH 8.4, 30 Vol.-% Glycerin, 2 Vol.-% Tween 20 in der Mikrokapillare bei einer angelegten Spannung von 20, 30 und 40V. (KK: Kreuzkorrelation, GW: Gleitendes Fenster, HN: Höhennormierung).

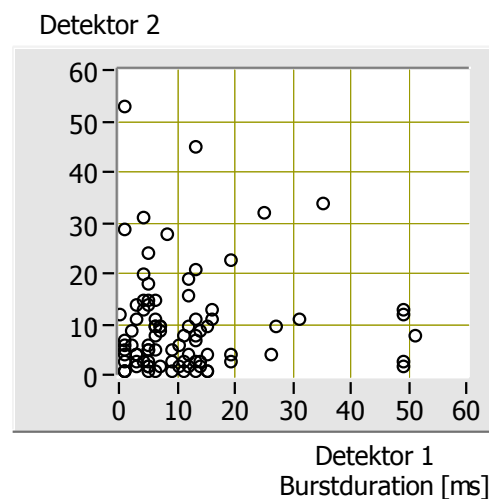
Weitere Informationen lassen sich aus den im FIFO-Modus aufgenommenen Daten erschließen, wenn die üblicherweise für einen Detektor gesammelten Daten denen vom zweiten Detektor gegenübergestellt werden (Abb. 4.49).

So demonstriert eine Doppeldetektionsmessung bei 20 V und 1000 μW , dass die Fluoreszenzlebensdauer mit $1,81\pm 0,30$ und $1,83\pm 0,41$ ns für den ersten bzw. zweiten Detektor sich nicht ändert. Ebenso verhält es sich mit der Burstbreiten-Verteilung und der Verteilung der Counts im Maximum pro Burst. Lediglich in der Burstgrößen-Verteilung macht sich die unterschiedliche Anregungsleistung beider Detektionsvolumina bemerkbar. Es finden sich mehr Bursts im zweiten Detektor mit einer größeren Photonenzahl als im ersten Detektor. Die in unterer Abbildung gezeigten Daten beinhalten korrespondierende Burstpaare. Die hier gezeigten Ergebnisse ändern sich auch bei Änderung der eingestrahelten Laserintensität nicht. Gebleachte Ereignisse wurden nicht berücksichtigt.

a)



b)



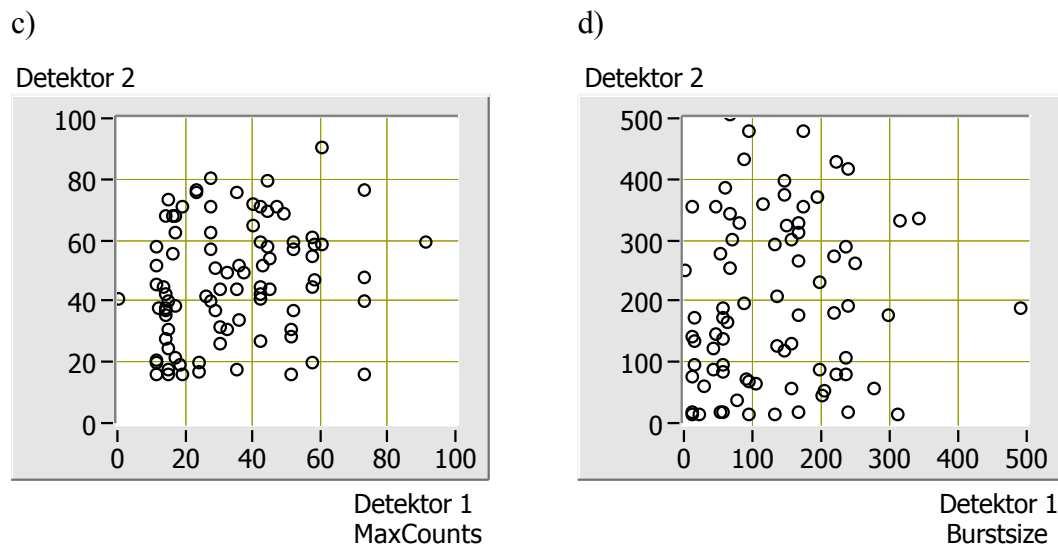


Abb. 4.49 Vergleich der von beiden Detektoren gesammelten Daten für a) die Lebensdauer, b) Burstbreite, c) Counts im Maximum pro Burst und d) Burstgröße.

Die Doppeldetektion einzelner Analytmoleküle konnte auch für Cy5-dCTP gezeigt werden. Untere MCS-Spur zeigt ein Beispiel (Abb. 4.50). Zur besseren Unterscheidbarkeit wurde das zweite Detektionssignal mit einem Offset von 100 kHz dargestellt. Bei einer angelegten Spannung von 13 V liegt die Transitzeit bei 106 ± 30 ms.

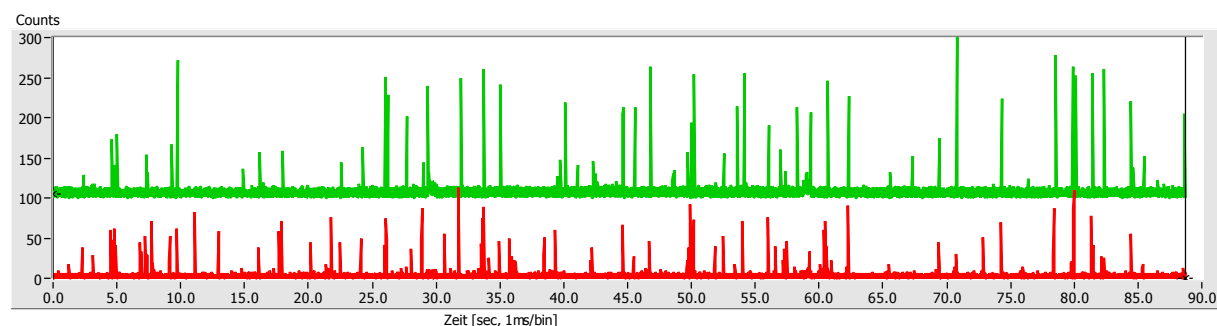


Abb. 4.50 MCS-Spuren einer 10^{-11} M Lösung Cy5-dCTP in 40 mM Tris-Boratpuffer pH 8.4, 30 Vol.-% Glycerin, 2 Vol.-% Tween 20 in der Mikrokapillare bei einer angelegten Spannung von 13 V.

In Abbildung 4.51 ist eine MCS-Spur dargestellt, in der die Spannung von 30V an- und wieder ausgeschaltet wurde. Die ermittelte Transitzeit beträgt 12 ms bei einem Abstand von 4 μm , was einer Wanderungsgeschwindigkeit von 0,33 mm/s entspricht.

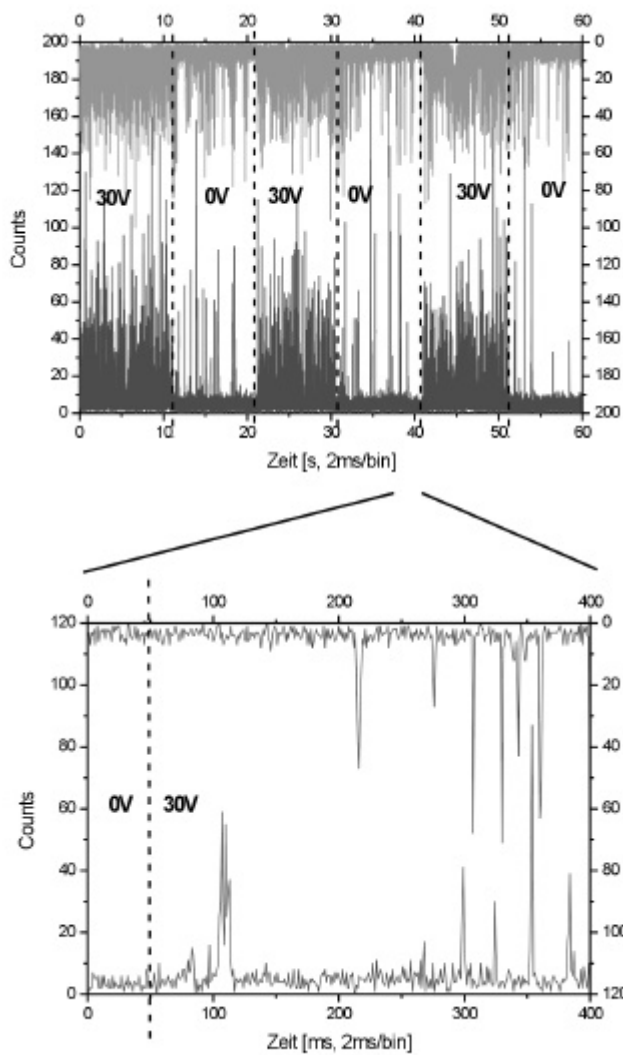


Abb. 4.51 MCS-Spuren einer 10^{-11} M Lösung Cy5-dCTP in 40 mM Tris-Boratpuffer pH 8.4, 30 Vol.-% Glycerin, 2 Vol.-% Tween 20 in der Mikrokapillare bei einer angelegten Spannung von 0 und 30 V. Im unteren Bild ist eine Vergrößerung zu sehen.

Die Ergebnisse zeigen, dass in einer Mikrokapillare mit einem Innendurchmesser $<1 \mu\text{m}$ eine zweifache Detektion und Identifikation einzelner farbstoffmarkierter Mononukleotide möglich ist.

4.6 Glasbeschichtung mit Polyethylenglykol (PEG)

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein neues Nachweisverfahren zur Bestimmung der Adsorption in Mikrokapillaren sowie eine vereinfachte Beschichtungstechnik für eine statische Glasbeschichtung von Submikrometerkanälen mit Polyethylenglykol entwickelt.

Oberflächen gebundene, hydrophile, neutrale Polymere wie Polyethylenglykol (PEG) kontrollieren eine Reihe von Oberflächenphänomenen. Dazu zählen eine reduzierte unspezifische Protein- und Zelladsorption, erhöhte Benetzbarkeit und verstärkte elektrokinetische Effekte. Diese Eigenschaften der Beschichtungen erhöhen die Effizienz bei der analytischen und präparativen Trennung, bei denen die Analyt-Oberflächen-Wechselwirkungen eine Rolle spielen. Darüber hinaus werden PEG-Oberflächen als biokompatible Oberflächen verwendet wie z.B. in Kathetern oder Kontaktlinsen.

Beschichtungen in der Kapillarelektrophorese werden besonders zur verbesserten Trennungseffizienz durch unterdrückte Elektroosmose und Analytadsorption eingesetzt. Es ist sogar möglich, die Größe und Richtung des elektroosmotischen Flusses über Parameter wie Puffer-pH, Pufferkonzentration, Hinzugabe bestimmter Detergenzien oder radiale Felder zu kontrollieren. Bei der wässrigen CE können Oberflächenbeschichtungen je nach Ladung den elektroosmotischen Fluss (EOF) erhöhen, reduzieren oder sogar umkehren. Da die Elektroosmose die Gesamtbeweglichkeit der Analytmoleküle beeinflusst, ist es ein wichtiges Ziel, den EOF zu unterbinden, besonders bei Experimenten, in denen die Einzelmolekül-Elektrophorese in Submikrometer großen Dimensionen durchgeführt wird. Hier sind Störungen durch den Puffer oder die Beschichtungen aufgrund des hohen Oberfläche zu Volumen Verhältnisses besonders gravierend und daher unerwünscht. Das gilt insbesondere für biologische Proben. Der EOF in hydrophilen, neutralen PEG-beschichteten Kapillaren ist reduziert und zu einem geringeren Ausmaß beeinflusst durch oben genannte Parameter.

4.6.1 Fibronectin auf der Oberfläche eines Deckglases

PEG-beschichtete Oberflächen reduzieren die Protein- und Zelladsorption. Um die Adsorptionseffekte zu demonstrieren, wurden Experimente mit farbstoffmarkiertem Fibronectin durchgeführt. Das Glykoprotein Fibronectin ist als Zelladhäsionsmolekül in der extrazellulären Matrix von tierischem Gewebe identifiziert worden. Um einen Vergleich zu erstellen, wurden Messungen mit und ohne PEG-Beschichtung von Deckglasplättchen

gemacht. Das in den Versuchen verwendete PEG ist ein tetrafunktionales Isocyanat-Polyethylenglykol.

Um Adsorptionseffekte direkt beobachten zu können, wurde der Laserstrahl knapp über die entsprechende Oberfläche in eine wässrige Lösung mit 10^{-9} M Cy5-markiertem Fibronectin fokussiert. Der Anregungspfad wurde geblockt und nach ein paar Sekunden wieder freigegeben. Abbildung 4.52 zeigt die dazugehörige Zeitspur der Fluoreszenzintensität, die so genannte Multichannel Scaler (MCS) Spur.

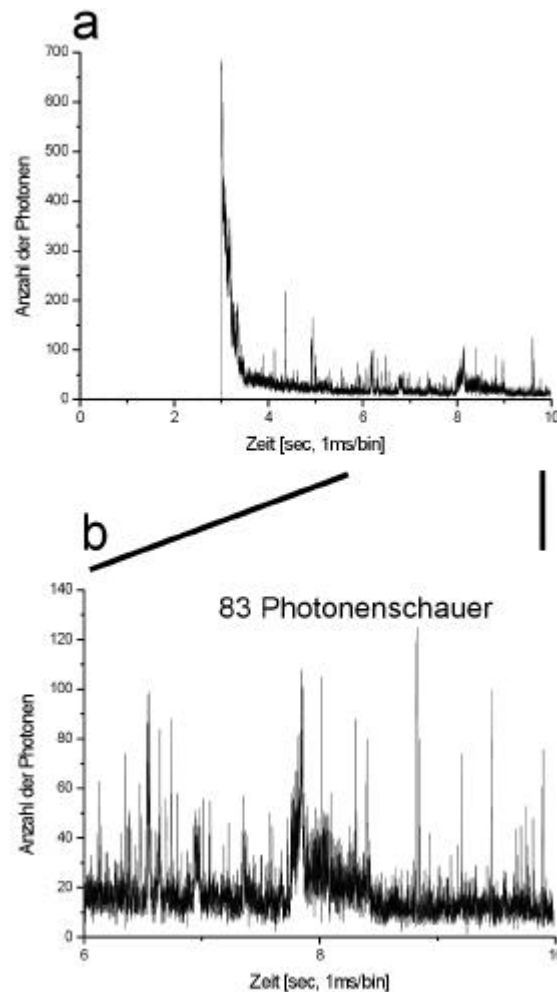


Abb. 4.52 Photobleachexperiment an einer unbeschichteten Deckglasoberfläche. (a) Der in eine 10^{-9} M Cy5 markierte Fibronectin Lösung fokussierte Laserstrahl wird abgeblockt und dann wieder nach einigen Sekunden freigegeben. Die Position des Laserfokus befindet sich auf der Oberfläche. Die Ausschnittsvergrößerung der MCS-Spur mit der Anzahl der Photonenschauer in diesem Zeitfenster ist im unteren Teil gezeigt. Die Laserintensität an der Probe beträgt $60 \mu\text{W}$.

Im unbehandelten Fall macht der Abfall der Fluoreszenzintensität (Abb. 4.52 a) deutlich, dass die Cy5-markierten Fibronectinmoleküle auf der Oberfläche konzentriert sind und nach Einschalten der Laseranregung photobleacht werden. Nach einigen Sekunden ist das Signal auf einen konstanten Wert gesunken. Die folgenden Photonenschauer in derselben Zeitspur

stammen von Molekülen, die aus der Lösung in den Fokus des Lasertrahls an der Oberfläche gelangen. Im beschichteten Fall (Abb. 4.53) ist kein Abfall der Fluoreszenzintensität zu sehen. Einzelne Photonenschauer stammen daher von Molekülen, die aus der Lösung in den Fokus gelangen. Die Proteinadsorption ist gänzlich unterdrückt.

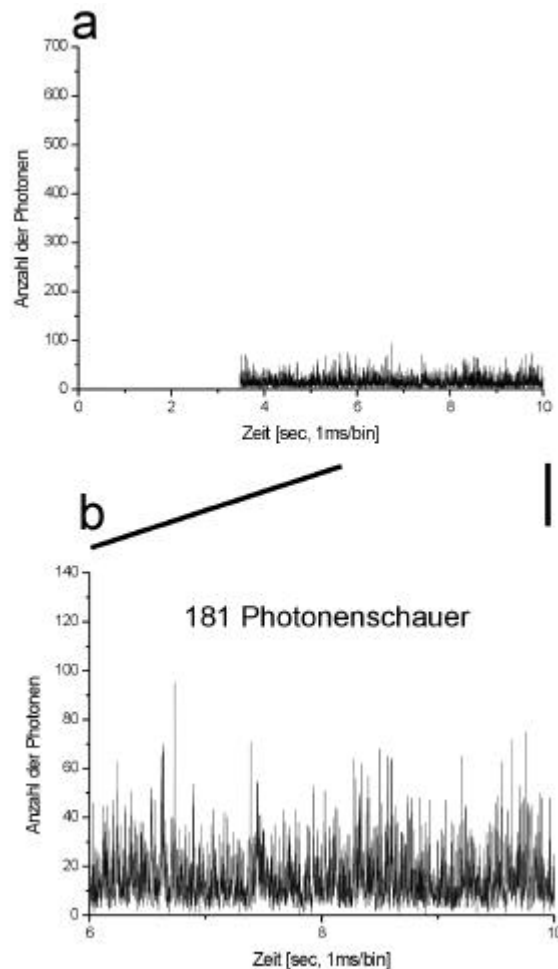


Abb. 4.53 Photobleachexperiment an einer PEG-beschichteten Deckglasoberfläche. (a) Der in eine 10^{-9} M Cy5 markierte Fibronectin Lösung fokussierte Laserstrahl wird abgeblockt und dann wieder nach einigen Sekunden freigegeben. Dabei befindet sich die Position des Laserfokus auf der Oberfläche. Die Ausschnittsvergrößerung der MCS-Spur mit der Anzahl der Photonenschauer in diesem Zeitfenster ist im unteren Teil gezeigt. Die Laserintensität an der Probe beträgt $60 \mu\text{W}$.

In der vergrößerten Sicht der zeitlichen Intensitätsspuren (Abb. 4.52 b und Abb. 4.53 b) zeigt sich ebenso, dass die Photonenschauer im unbehandelten Fall durchschnittlich breiter und höher sind. Dies deutet darauf hin, dass es zu einer starken Wechselwirkung (Adsorption) der Moleküle mit der Glasoberfläche kommt. Im Gegensatz dazu zeigen die mit PEG-beschichteten Glasoberflächen schmalere und kleinere Photonenschauer (Abb. 4.53 b).

Bemerkenswert ist auch die Tatsache, dass die Anzahl der Photonenschauer im gleichen Zeitfenster mit 83 im unbehandelten zu 181 im PEG-behandelten Fall beträgt. Aufgrund

längerer Verweilzeiten der Analytmoleküle auf der unbehandelten Oberfläche werden pro Zeiteinheit weniger als die Hälfte der Photonenschauer-Ereignisse wie mit PEG-Beschichtung gezählt. Dies indiziert ebenso eine Adsorption der Glykoproteine. Im unbehandelten Fall sind die Adsorptionsplätze im Schnitt für etwa 2 ms besetzt, bevor es zu einer erneuten Adsorption kommen kann, während im PEG-beschichteten Fall die reduzierte Adsorption mit der geringeren Verweilzeit an der Deckglasoberfläche korrespondiert.

In Abbildung 4.54 ist eine Statistik der Breiten zu Größen der Photonenschauer für 100 Ereignisse aufgetragen. Sie zeigt, dass die Bursts im Durchschnitt ohne PEG-Behandlung (O) breiter sind und mehr Photonen zählen als mit PEG-Beschichtung (+). Bis zu einer Burstbreite von 75 ms und einer Photonenzahl pro Burst von 500 sind beide Verteilungen vergleichbar. Beim unbehandelten Deckglas sind jedoch breitere und größere Bursts zu finden.

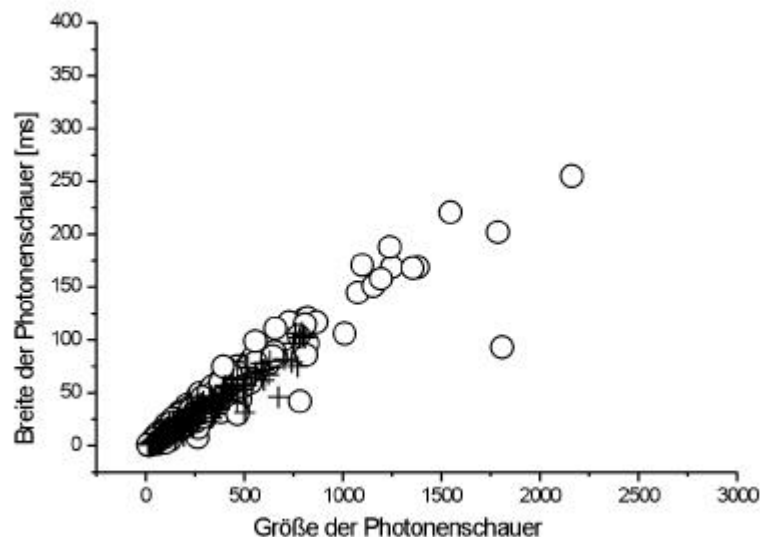


Abb. 4.54 Breite zu Größe der Photonenschauer-Verteilung für ein PEG-beschichtetes (+) und ein unbehandeltes Deckglas (O). 100 Ereignisse gemessen auf der entsprechenden Deckglasoberfläche sind ausgewertet. Die Laserintensität an der Probe beträgt $60 \mu\text{W}$.

Diese Experimente zeigen, dass die Adsorption von Cy5-markierten Fibronectinmolekülen auf einer Glasoberfläche durch eine Beschichtung mit Polyethylenglykol (PEG) stark unterdrückt ist. Breiten der Photonenschauer von bis zu 75 ms deuten aber an, dass es dennoch zu vereinzelt Adsorptionen kommt. Es ist jedoch schwierig mittels dieser Photobleach-Messtechnik quantitative Aussagen über die Dicke der Fibronectinschicht auf der Oberfläche oder über die Dicke der PEG-Beschichtung zu machen.

Dennoch können die mittlere Anzahl der Ereignisse pro Zeiteinheit und die mittlere Fluoreszenzintensität als Indizien dafür angesehen werden, in wie weit und ob Fibronectinmoleküle aus der Lösung auf der Oberfläche konzentriert sind.

Eine weitere Möglichkeit, Adsorptionseffekte aufzudecken, ist das Scannen dieser Oberflächen (s. Abb. 4.55). Dazu wurden die Proben mit Hilfe einer piezoelektronischen x-y-Verfahreinheit (Queensgate NPS 3330 parallel port 4000) mit einer Auflösung von 50 nm pro Pixel gescannt. Die Scanbilder zeigen einen 10 x 10 μm großen Ausschnitt mit 200 Pixeln pro Scanline.

Der direkte Vergleich von unbehandeltem und PEG-beschichtetem Deckglas verdeutlicht die effiziente Reduzierung der Adsorption. Verwendet wurde dieselbe Konzentration von 10^{-9} M Cy5-markiertem Fibronectin.

Während bei der unbehandelten Glasoberfläche neben „langen Fluoreszenzstreifen“, die eine längere Verweilzeit im Detektionsvolumen indizieren, sogar einzelne immobile Moleküle zu sehen sind, ist bei sonst gleichen Versuchsbedingungen im PEG-beschichteten Fall praktisch keine Adsorption zu beobachten. Lediglich ein heller Streifen in der rechten oberen Ecke beweist den Oberflächenscan. Oberflächendefekte können dazu führen, dass sich einzelne Moleküle kurzzeitig an ihnen adsorbieren.

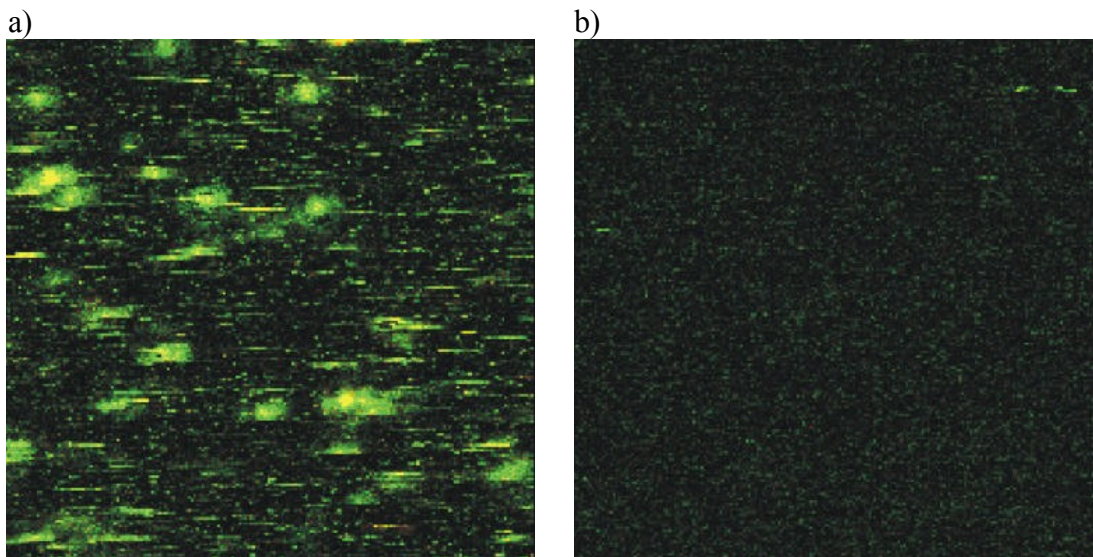


Abb. 4.55 Oberflächenscan einer a) unbehandelten und b) PEG-beschichteten Glasoberfläche. Gemessen ist eine 10^{-9} M Cy5-markierte Fibronectinlösung bei 5 μW Anregungsleistung an der Probe. Der Bereich ist 10 x 10 μm groß. Die Integrationszeit pro Pixel beträgt 5 ms. Der Laserstrahl ist auf die Oberfläche fokussiert.

Eine pixelweise Analyse der Scanbilder zeigt, dass bei einem Schwellenwert von 10 Photonen pro Pixel 2622 Ereignisse für den unbehandelten und 14 Ereignisse für den PEG-bechichteten Fall gefunden werden. Im unbehandelten Fall entspricht das einer Belegung von 6,56 % und im PEG-gecoateten Fall 0,04 %. Damit ergibt sich eine mindestens 187-fach höhere Adsorption bei dem unbehandelten Deckglas, da die berücksichtigten Ereignisse bei der PEG-

Beschichtung auch von unspezifischer Verunreinigung stammen können, zumal die verwendeten Lösungen nicht mit Aktivkohle gereinigt waren.

Bei einer höheren Anregungsleistung von $30 \mu\text{W}$ werden die Fluorophore schneller photozerstört. Abbildung 4.56 zeigt die Scanbilder.

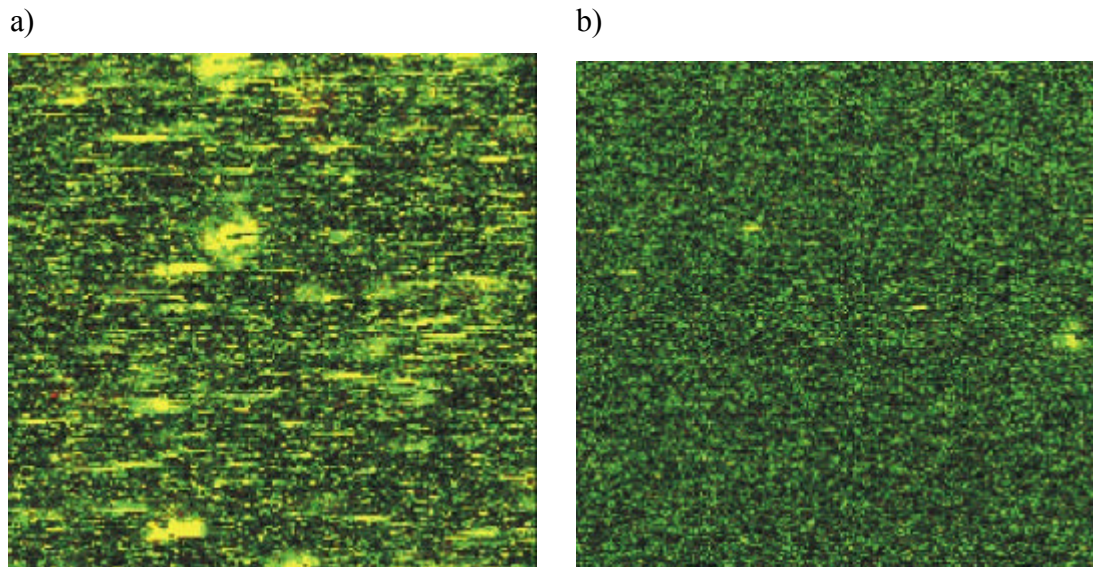


Abb. 4.56 Oberflächenscan einer a) unbehandelten und b) PEG-beschichteten Glasoberfläche. Gemessen ist eine 10^{-9} M Cy5-markierte Fibronectinlösung bei $30 \mu\text{W}$ Anregungsleistung. Der Bereich ist $10 \times 10 \mu\text{m}$ groß. Die Integrationszeit pro Pixel beträgt 5 ms. Der Laserstrahl ist auf die Oberfläche fokussiert.

Im unbehandelten Fall sind sehr viel mehr Wechselwirkungen mit der Oberfläche als bei einer PEG-Beschichtung zu sehen. Dies wiederum bedeutet für den unbehandelten Fall, dass sich mehr Analytmoleküle aus der Lösung auf der Oberfläche konzentrieren und daher der Lösung entzogen werden.

Die Messungen in Lösung belegen dies (s. Abb. 4.57). Bei einer pixelweisen Auswertung mit einem Schwellenwert von 20 Photonen werden bei der PEG-Beschichtung 228 und im unbehandelten Fall 24 Ereignisse gezählt, was einem Verhältnis von 9,5 entspricht.

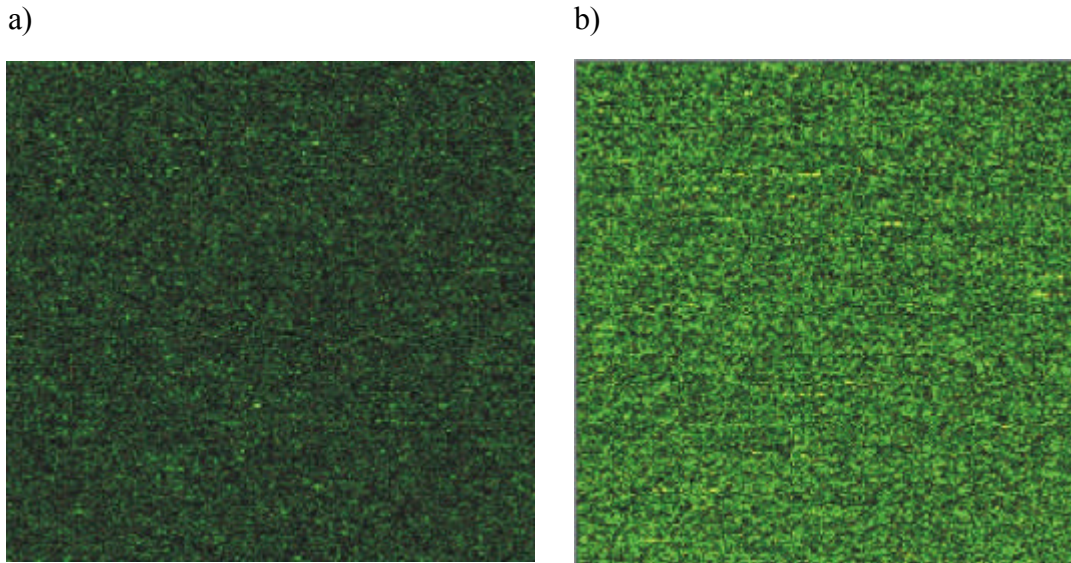


Abb. 4.57 Scan in der Lösung über einer a) unbehandelten und b) PEG-beschichteten Glasoberfläche. Gemessen ist eine 10^{-9} M Cy5-markierte Fibronectinlösung bei $30 \mu\text{W}$ Anregungsleistung. Der Bereich ist $10 \times 10 \mu\text{m}$ groß. Die Integrationszeit pro Pixel beträgt 5 ms. Die Fluoreszenz für den PEG-beschichteten Fall ist deutlich höher. Der Laserstrahl ist in die Lösung fokussiert.

Die Messungen machen deutlich, dass die PEG-Beschichtung einer Mikrokapillare sinnvoll ist. Dies hat den Vorteil, dass Messungen in submikrometergroßen Glaskapillaren ohne Zugabe von speziellen Detergenzien, die im ungünstigen Fall mit den Analytmolekülen wechselwirken, möglich werden. Eine Steigerung der Sensitivität in der Kapillarelektrophorese mit Wasser als Pufferlösung wäre möglich. Zudem bietet diese Beschichtungstechnik den Vorteil, dass sie auf einem statischen Prinzip beruht, d.h. die Oberfläche wird vollständig beschichtet (cross linking), wird dadurch stabil und zeigt keine elektrophoretischen Effekte wie den elektroosmotischen Fluss. Ebenso konnte bei der Beschichtung der Deckgläser gezeigt werden, dass eine aufwendige Beschichtungsprozedur nicht notwendig ist, sondern dass ein einziger Beschichtungsschritt ausreicht, um die Proteinadsorption zu unterdrücken.

4.6.2 PEG-Beschichtung der Mikrokapillaren

Zur Beschichtung von Kapillaren wurden kommerziell erhältliche Glaskapillaren, so genannte „Femtotips“ (Eppendorf-Nether-Hinz, Hamburg, Germany), die einen Innendurchmesser von 500 ± 200 nm an der Spitze besitzen, verwendet. Diese konisch geformten Femtotips werden in der Regel zur Zellinjektion verwendet. Zum Beschichten mit Polyethylenglykol

wurden entgegen der konventionell üblichen Methode für statische Beschichtung [Horvath 2001] im Rahmen dieser Arbeit zwei neue Methoden entwickelt.

Zum einen wurde dazu das zur Zellinjektion übliche Überdruckgerät Femtojet (Eppendorf-Nether-Hinz, Hamburg, Germany) für die Femtotips verwendet. Der Femtojet baut einen konstanten Überdruck von bis zu 6 bar auf. Er kann aber auch einen kurzzeitigen Überdruck erzeugen, der sofort wieder zusammenbricht. Zur PEG-Beschichtung wurde 2-3 Sekunden lang auf den Femtotip, der auf dem Femtojet montiert war und deren Spitze in einen Tropfen mit PEG tauchte, ein Luftüberdruck von 2 bar angelegt. Da nach Zusammenbruch des Drucks die Trägheit der Lösung einen Teil in die Kapillare reindrückt, konnte somit der in eine PEG-Lösung getauchte Femtotip an der Spitze auf etwa $10\ \mu\text{m}$ beschichtet werden. Dieser Vorgang konnte bis zu 10 Mal wiederholt werden, ohne dass der Femtotip verstopft wurde. In Abbildung 4.58 ist schematisch ein Beschichtungsvorgang dargestellt.

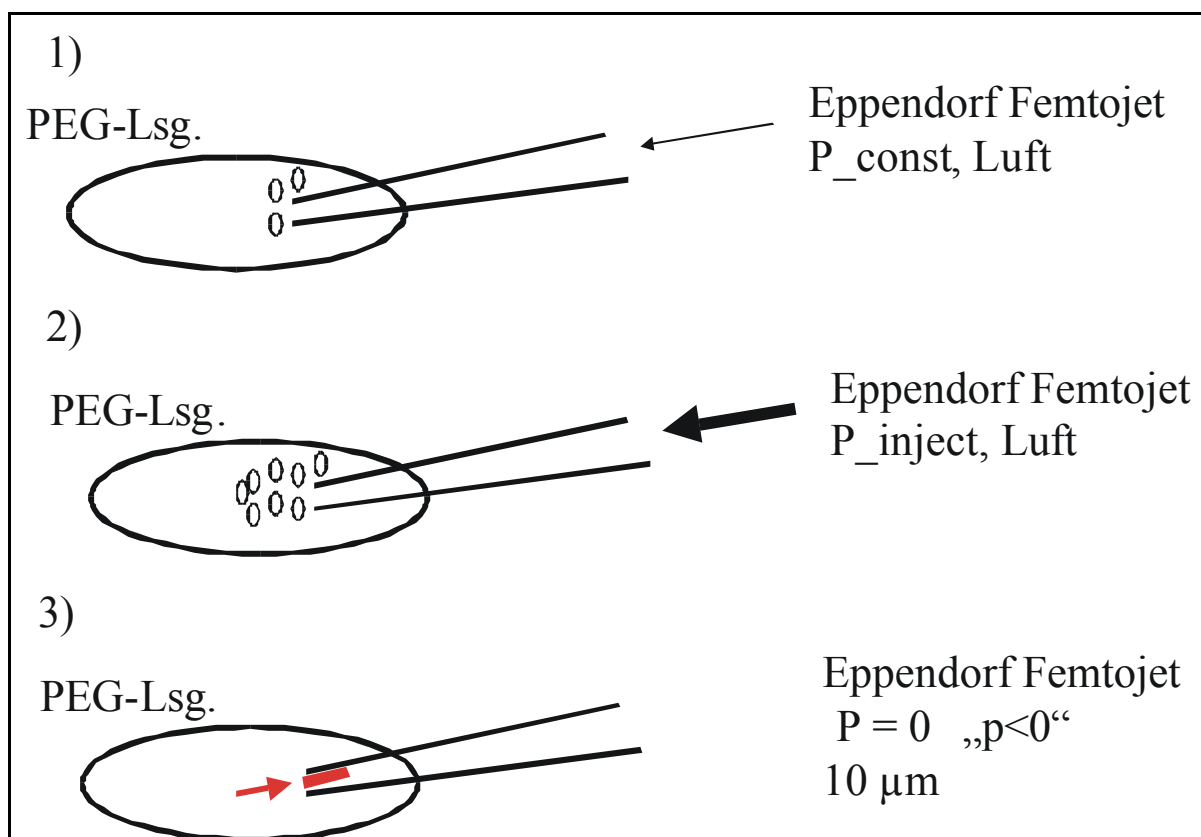


Abb. 4.58 Schematische Darstellung der Beschichtungstechnik im Femtotip mittels des Überdruckgerätes Femtojet.

Eine alternative Beschichtungstechnik beruht darauf, dass ein Unterdruck im Innern des Femtotips erzeugt wird, während die Kapillare in die PEG-Lösung getaucht ist (s. Abb. 4.59). Dazu wurde eine einfache handelsübliche Spritze mittels eines selbst gebauten

Schlauchadapters mit dem Femtotip verbunden. Eine Klemme sorgte dafür, dass ein konstanter Unterdruck über mehrere Minuten aufrecht gehalten wurde.

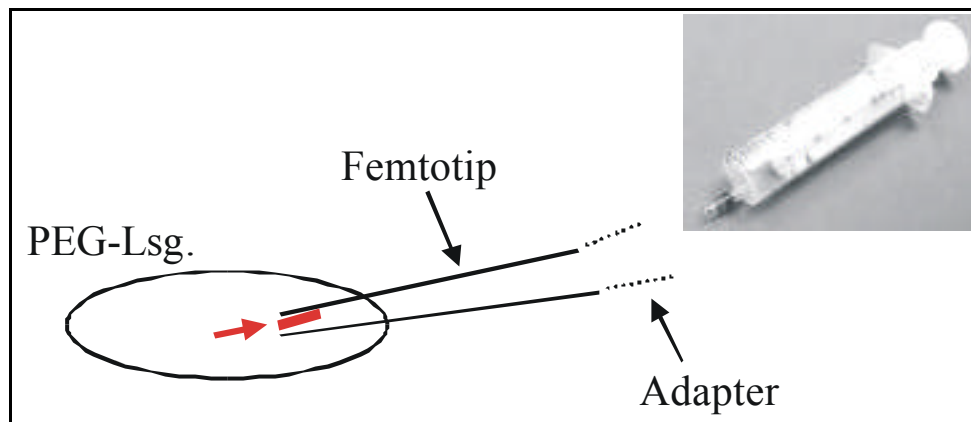


Abb. 4.59 Schematische Darstellung der selbst konstruierten Beschichtungstechnik mittels Spritze.

Beide Beschichtungsverfahren wurden bei Raumtemperatur durchgeführt und benötigen entgegen den üblichen Verfahren [Horvath 2001] keine Nachbehandlung im Ofen oder mit sonstigen Chemikalien. Eine Vorbehandlung zur Aktivierung mittels Chemikalien entfällt ebenfalls und eine Zwischenschicht, an die das PEG sich binden kann, wird auch nicht benötigt.

Mit beiden Verfahren konnte nur der vordere Teil der Kapillarspitze mit PEG beschichtet werden. In den durchgeführten Experimenten konnte trotz stundenlanger Messungen keinerlei Anzeichen dafür gefunden werden, dass sich die gebundene PEG-Schicht wieder löst. Allerdings war diese Fragestellung auch nicht Ziel unserer Untersuchungen. Der Versuch die Mikrokapillare von innen mit einer PEG-Lösung zu beschichten, führte hingegen zu keinem Erfolg.

4.6.3 Kapillarelektrophorese im submikrometergroßen Femtotip

Das in den Versuchen verwendete Cy5-markierte Fibronectin ist aufgrund seiner negativen Ladung für elektrophoretische Messungen geeignet. In einem Ein/Aus-Experiment konnte diese Eigenschaft des Fibronectins im Femtotip demonstriert werden. Bei Einschalten einer Spannung von +10 V, angelegt an der Platinelektrode außerhalb des Femtotips, reagierte die 10^{-9} M Fibronectinlösung sofort (s. Abb. 4.60). Bei Abschalten der Spannung konnten nur vereinzelte Photonenschauer detektiert werden, die durch Diffusion der Analytmoleküle durch das Detektionsvolumen verursacht werden.

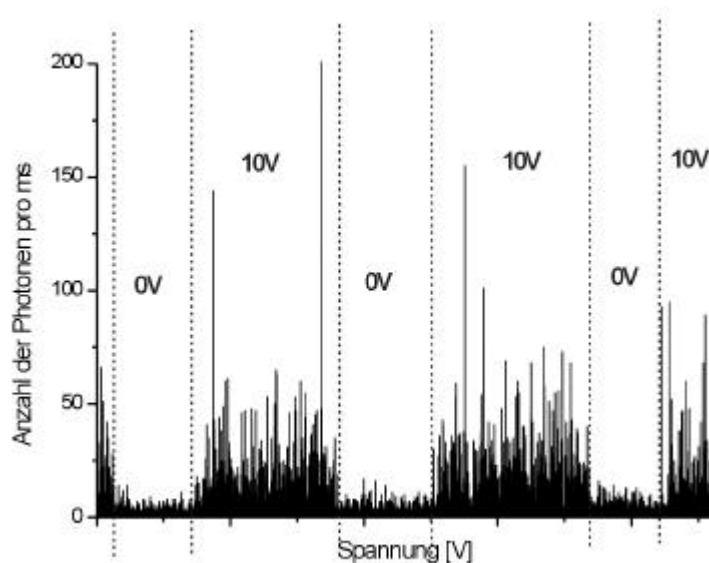


Abb. 4.60 Elektrophorese im unbehandelten Femtotip. Die 10^{-9} M Fibronektinlösung kann durch Ein- und Ausschalten eines elektrischen Feldes manipuliert werden. Die Laserintensität an der Probe beträgt $300 \mu\text{W}$.

4.6.4 Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie an der inneren Glasoberfläche von Mikrokapillaren

Fluoreszenzfluktuationen $dF(t)$ können mittels der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (engl. fluorescence correlation spectroscopy, FCS) analysiert werden [Elson 1974]. Diese Methodik beruht mathematisch auf einer Autokorrelation $G(t)$, wobei t die Korrelationszeit ist.

$$G(t) = \frac{\langle dF(t) \cdot dF(t+t) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \quad (\text{Gleichung 4.2})$$

Charakteristische Abfallkurven in der Korrelationsfunktion können Informationen liefern bezüglich der Diffusionszeit der Analytmoleküle in der Lösung, das intersystem crossing, chemische Reaktionen wie Protonierung [Haupts 1998], die Isomerisation [Widengren 2000] und sogar über das Rotationsverhalten der Moleküle [Mets 2001]. Diese Analyseverfahren basieren auf der Annahme von zufälligen Variationen der Fluoreszenz. Dem gegenüber liefert die Autokorrelation von periodischen Signalen deren Frequenz (Abb. 4.61).

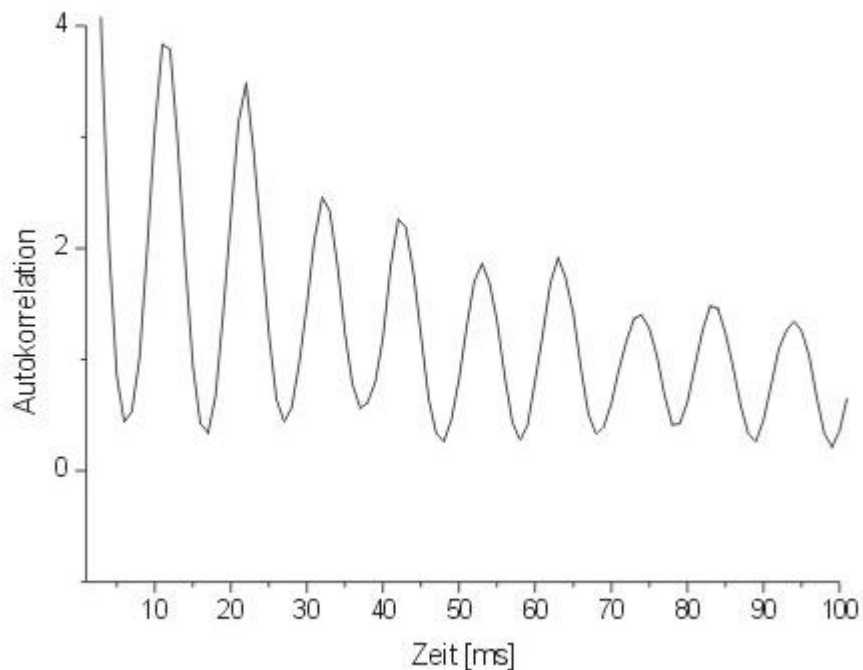


Abb. 4.61 Autokorrelation eines gedämpften periodischen Signals. Die Frequenz beträgt 100 Hz.

4.6.5 Adsorptionsmessungen innerhalb der Mikrokapillaren

In dieser Arbeit wird eine neue Messmethode demonstriert, die Adsorptionseffekte in Glaskapillaren aufzeigt. Dazu wurde die Messapparatur auf einem schwingungsungedämpften Tisch aufgebaut, und alle elektronischen Geräte wurden auf denselben Tisch gestellt, um die Vibrationen aus dem Stromnetz mit der Frequenz von 50 Hz zu verstärken, die aus der Stromversorgung stammt. Eine unbehandelte Mikrokapillare wurde mit einer 10^{-9} M Cy5 markierten Fibronectinlösung befüllt und an einer Piezoverschiebeeinheit montiert.

Um diese Technik zu verdeutlichen wurde der Femtotip mittels der Piezoverschiebeeinheit durch das Anregungsvolumen bewegt. Abbildung 4.62 zeigt einen so entstandenen Querschnitt der Fluoreszenzintensität eines unbehandelten Femtotips mit den entsprechenden Korrelationsfunktionen (Abb. 4.63 a, b, c). Die Zeitachse ist hierbei äquivalent der Position innerhalb des Femtotips. Angelegt war eine Spannung von +5 V. Der Querschnitt zeigt deutlich die drei möglichen Bereiche.

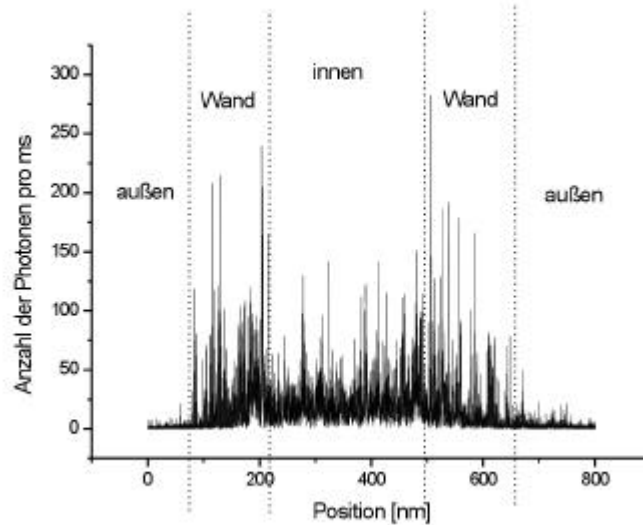
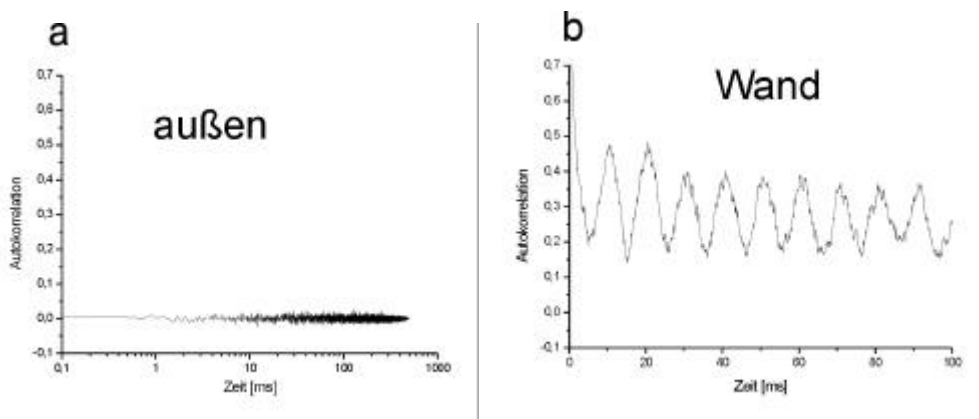


Abb. 4.62 Querschnitt der Fluoreszenzintensität. Ein unbehandelter Femtotip, gefüllt mit einer 10^{-9} M Lösung Cy5-markierter Fibronectinmoleküle, wird mittels Piezoverschiebeeinheit durch den Detektionsbereich gefahren. Die Laserintensität an der Probe beträgt $300 \mu\text{W}$ und eine Spannung von $+5 \text{ V}$ ist außerhalb des Femtotips angelegt.

An der inneren Wand werden höhere Photonenschauer registriert, was auf eine erhöhte Wechselwirkung zwischen Analytmolekülen und Glasoberfläche hinweist. Die mittlere Signalhöhe im Innern ist mit 6 kHz konsistent mit der Tatsache, dass bei einem unbehandelten Femtotip ein großer Teil der 10^{-9} M Fibronectinlösung an der Glaswand weiter innen in der Mikrokapillare adsorbiert.



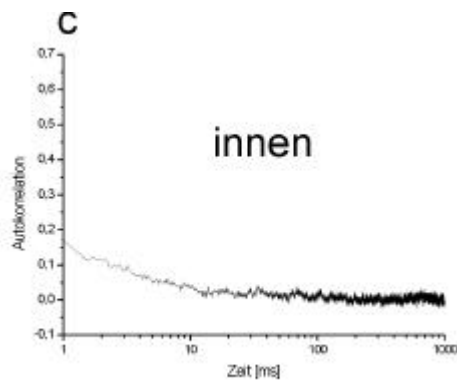


Abb. 4.63 a, b, c. Autokorrelationen der drei Bereiche. Nur an der Innenwand (b) können die periodischen Signale registriert werden.

Es können drei Bereiche, d.h. außerhalb, innerhalb und an der inneren Kapillarwand identifiziert werden. Während die Autokorrelation des äußeren Bereichs (Abb. 4.63 a) keine Korrelation aufweist, gibt die Korrelationsfunktion der Signale von der Kapillarwand (Abb. 4.63 b) deutlich die Schwingungsfrequenz von 50 Hz aus dem Stromnetz wieder. Die Fluoreszenz-Korrelations-Analyse ergibt in diesem Fall eigentlich eine Frequenz von 100 Hz, was mit der Tatsache korrespondiert, dass adsorbierte Moleküle zweimal während einer Oszillationsperiode angeregt werden. Abbildung 4.64 soll dies schematisch illustrieren.

Das Fluoreszenzsignal von der inneren Glasoberfläche ist etwas höher als im Inneren der Kapillare. Dies deutet auf eine erhöhte Wechselwirkung der Analytmoleküle mit der Glasoberfläche hin. Die Autokorrelation des inneren Bereichs (Abb. 4.63 c) errechnet eine Abfallkurve, aus der die Flussgeschwindigkeit ermittelt werden kann.

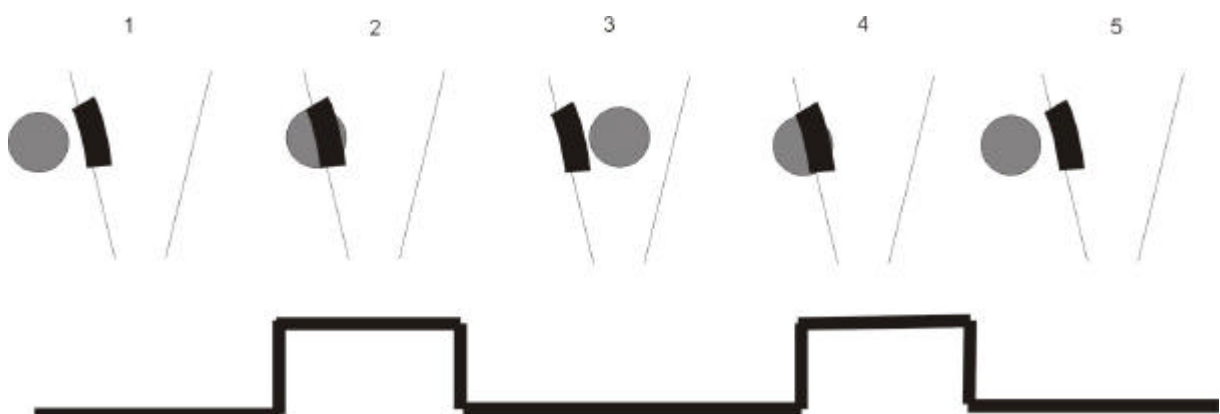


Abb. 4.64 Schematische Darstellung einer Schwingungsperiode. Während einer Schwingung überstreicht die Kapillare mit dem adsorbierten Analytmolekül zweimal (Bild 2 & 4) das Detektionsvolumen. Im unteren Teil ist die zugehörige Fluoreszenz dargestellt.

Da die Messungen mit einem selbst geschriebenen LabView-Programm aufgenommen wurden, konnte die Autokorrelationsfunktion der Fluoreszenzsignale in Echtzeit angezeigt werden, so dass stets ein Feedback über die relative Position der Mikrokapillare bezüglich des Detektionsvolumens gegeben war (s. Anhang). Daher war gewährleistet, dass die Adsorptionsmessungen an der inneren Glaswand des Femtotips gemacht wurden. Abbildung 4.65 zeigt einen Ausschnitt des Messprogramms, in dem die MCS-Spur und die Autokorrelation für eine Messung an der inneren Kapillarwand in Echtzeit dargestellt werden.

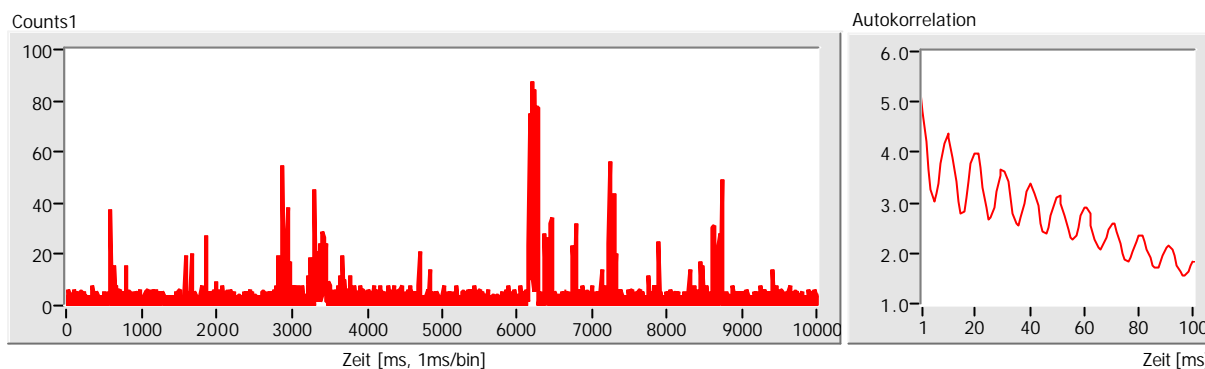


Abb. 4.65 Ausschnitt aus dem Messprogramm. Zu sehen sind die MCS-Spur einer Messung auf der Glasoberfläche eines unbehandelten Femtotips befüllt mit einer 10^{-9} M Fibronectinlösung und die zugehörige Autokorrelationsfunktion. Angelegt ist eine Spannung von +5 V und die Laserintensität an der Probe beträgt $300 \mu\text{W}$. Allein aus der MCS Spur ließe sich keine Aussage über die relative Position der Mikrokapillare bezüglich des Fokus in Echtzeit machen. In Kombination mit der Autokorrelation ist dies jedoch möglich.

Reine MCS Spuren lassen sich aber auch nachträglich ohne Kenntnis der Autokorrelation auf Positionsinformation untersuchen. So kann die von der Wandadsorption herrührende Oszillation durch eine vergrößerte Sicht der MCS Spur sichtbar gemacht werden (s. Abb. 4.66).

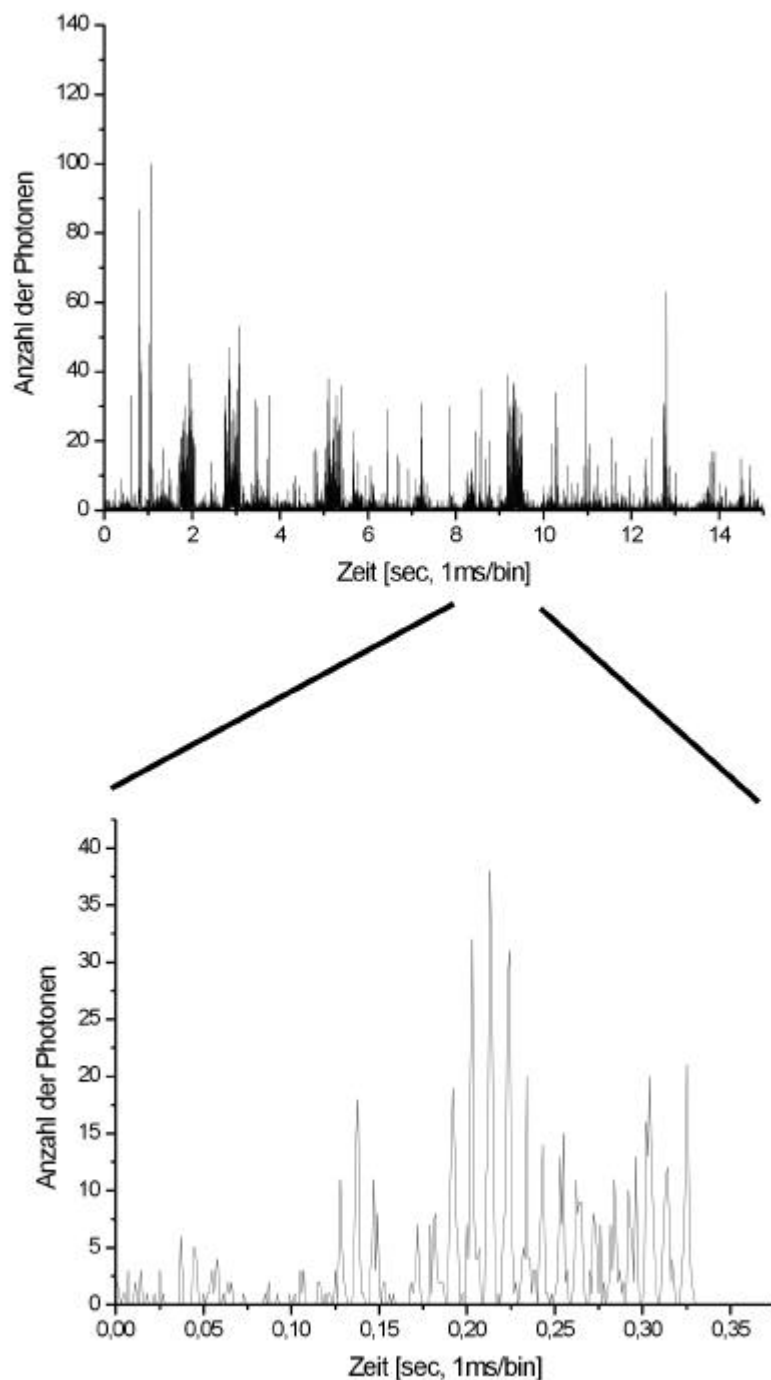


Abb. 4.66 MCS Spur mit vergrößertem Ausschnitt einer 10^{-9} M Lösung Cy5-markierter Fibronectinmoleküle in einem unbehandelten Femtotip gemessen an der Kapillarwand. Die Laserintensität an der Probe beträgt $30 \mu\text{W}$ und eine Spannung von $+1$ V ist außerhalb des Femtotips angelegt.

Ein Vergleich mit einem Querschnitt einer PEG-beschichteten Kapillare verdeutlicht, dass bei gleicher Konzentration der Probe weniger Wechselwirkung mit der Glasoberfläche stattfindet und mehr durch das Innere der Mikrokapillare gelangt (Abb. 4.67). Dies ist insofern bemerkenswert, da nur der vordere Teil des Femtotips von etwa $10 \mu\text{m}$ mit PEG beschichtet werden konnte und eigentlich der Großteil der Probelösung weiter innen an der Kapillarwand

adsorbieren sollte. Bei weiterer Betrachtung des Querschnitts fällt auf, dass im Innern des Femtotips eine nahezu gleichmäßige Intensitätsverteilung vorliegt, die äquivalent einer Geschwindigkeitsverteilung ist. Diese Verteilung der Strömungsgeschwindigkeit ist entgegen dem laminaren Strömungsprofil eher stempelförmig. An der inneren Wand werden bei einer angelegten Spannung von +5 V Signale detektiert, die zum Inneren hin linear innerhalb von etwa 100 nm bis zu einer mittleren Signalhöhe von 60 kHz ansteigen. Im Inneren bleibt die Intensität nahezu konstant. Dies ist von Vorteil für hochsensitive CE-Messungen, da es durch das stempelartige Strömungsprofil nicht zu einer Bandenverbreiterung kommt.

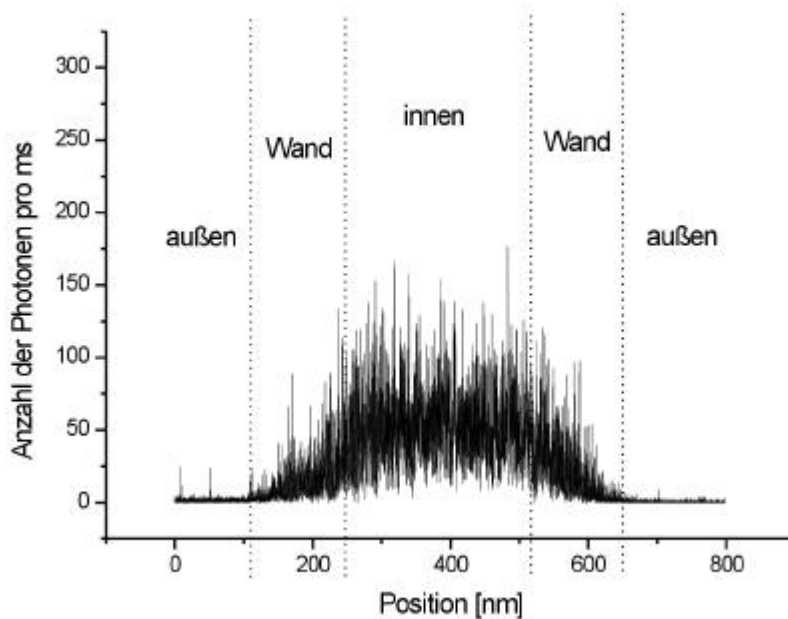


Abb. 4.67 Querschnitt der Fluoreszenzintensität eines PEG-beschichteten Femtotips befüllt mit einer 10^{-9} M Lösung Cy5-markierter Fibronectinmoleküle. Der Femtotip wird mittels Piezoverschiebeinheit durch den Detektionsbereich gefahren. Die Laserintensität an der Probe beträgt $300 \mu\text{W}$ und eine Spannung von +5 V ist außerhalb des Femtotips angelegt.

Dieser Reduktion der Adsorption entsprechend zeigt die MCS Spur eines mit PEG beschichteten Femtotips auch bei Detektion an der inneren Kapillarwand wesentlich schwächere Wechselwirkungen mit der Glasoberfläche (Abb. 4.68).

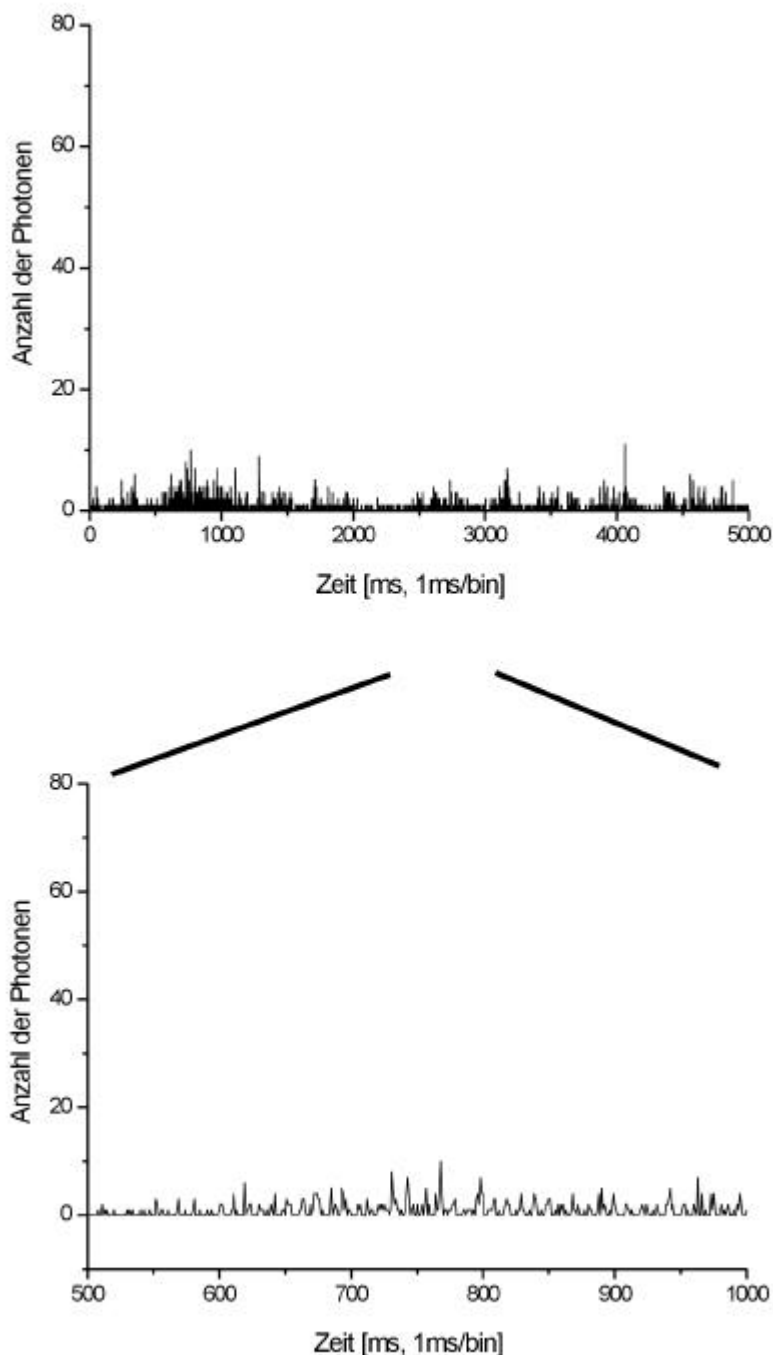


Abb. 4.68 MCS Spur mit vergrößertem Ausschnitt einer 10^{-9} M Lösung Cy5-markierter Fibronectinmoleküle in einem PEG-beschichteten Femtotip gemessen an der Kapillarwand. Die Laserintensität an der Probe beträgt $30 \mu\text{W}$ und eine Spannung von $+1$ V ist außerhalb des Femtotips angelegt.

Abbildung 4.69 vergleicht bei einer Konzentration von 10^{-9} M Lösung Cy5-markierter Fibronectinmoleküle Messungen (a) im offenen Tropfen mit Messungen im Inneren eines (b) PEG-beschichteten und eines (c) unbeschichteten Femtotips, wobei die Laserleistung jeweils $120 \mu\text{W}$ betrug. Für die Messungen im Femtotip war eine Spannung von $+5$ V angelegt.

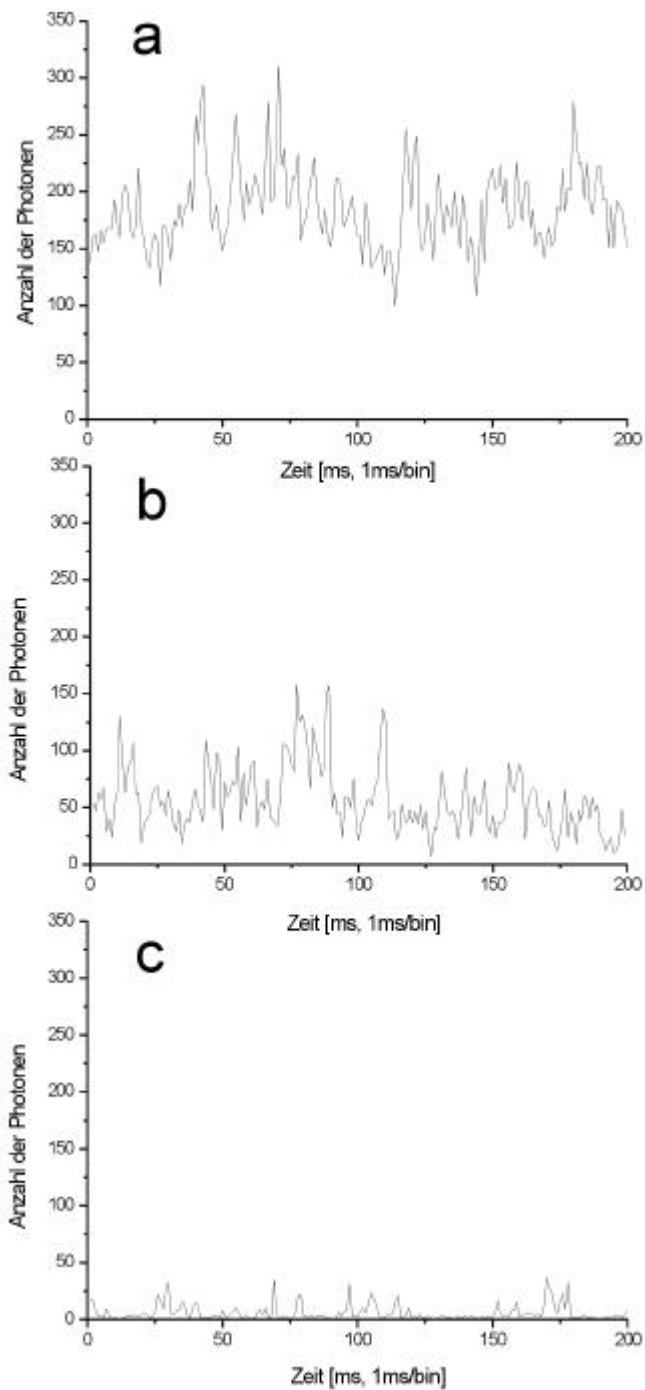


Abb. 4.69 zeigt die MCS Spuren (a) im Tropfen, (b) in der PEG beschichteten und (c) unbeschichteten Kapillare. Ein Vergleich zeigt, dass eine PEG Beschichtung an der vorderen Spitze zu einem etwa 10-fach höheren Durchfluss als im unbehandelten Fall führt. Dennoch sind die Konzentrationen um den Faktor 3 geringer als im offenen Tropfen. Der größte Teil der Analytmoleküle adsorbiert vor Erreichen der Kapillaröffnung an die Kapillarwand. Die Laserintensität an der Probe beträgt $120 \mu\text{W}$ und für die Messungen in der Mikrokapillare ist eine Spannung von $+5 \text{ V}$ angelegt.

Die mittlere Fluoreszenzintensität im Tropfen ist mit ~ 160 kHz etwa dreimal höher als im PEG-beschichteten Femtotip mit ~ 57 kHz, was wiederum zehnmal mehr als im unbeschichteten Fall (~ 6 kHz) ist. Für sensitivere Messungen auf Einzelmolekülniveau wäre es für die in dieser Arbeit vorgestellte Beschichtungstechnik wünschenswert, wenn das gesamte Innere der Kapillare beschichtet werden kann oder wenn eine analytisch relevante Probenkonzentration bis zum beschichteten Bereich an der vorderen Kapillarspitze gebracht werden kann. Es lässt sich jedoch zeigen, dass bereits diese Beschichtung sensitiv genug ist, einzelne Moleküle zu detektieren ohne größeren Verlust durch Adsorption weiter innen in der Kapillare.

Eine Analyse der Breite zu Größe der Photonenschauer-Verteilung zeigt auch, dass der Unterschied im Adsorptionsverhalten deutlich zu erkennen ist. In Abb. 4.70 sind je 100 Ereignisse von Fluoreszenzbursts aufgetragen, die von der inneren Kapillarwand stammen. Die Messungen wurden bei $60 \mu\text{W}$ mit einer angelegten Spannung von $+5$ V durchgeführt.

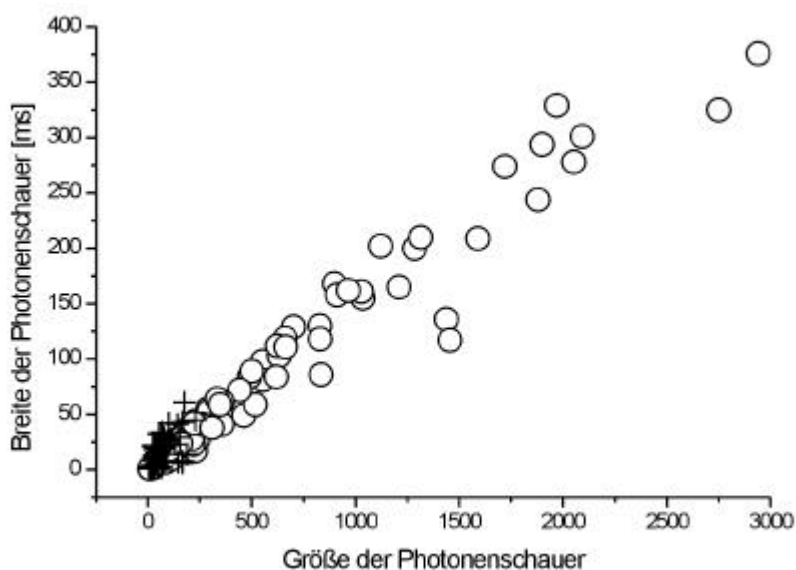


Abb. 4.70 Verteilung der Breite zu Größe der Photonenschauer für den unbeschichteten (O) und PEG-beschichteten (+) Femtotip. Die Laserleistung an der Probe beträgt $60 \mu\text{W}$ und eine Spannung von $+5$ V ist angelegt.

Sehr viel deutlicher als im Fall mit den Deckgläsern lassen sich die Ereignisse dem jeweiligen Femtotip zuordnen. Im unbeschichteten Fall finden sich viele Ereignisse mit hoher Breite und hoher Photonenzahl, während die Messung mit der PEG beschichteten Kapillare praktisch keine Photonenschauer länger als 30 ms bzw. mit einer Photonenzahl von 200 aufweist. Bemerkenswert ist aber auch, dass die Raten der Photonenschauer vergleichbar groß sind. Im

unbehandelten Fall sind es $13,1 \pm 0,5$ Photonenschauer pro Sekunde, im PEG beschichteten $12,5 \pm 0,5$ Photonenschauer pro Sekunde jeweils gemittelt über 6 Messungen. Das liegt daran, dass durch das angelegte elektrische Feld genügend schnell neue Analytmoleküle in das Detektionsvolumen gelangen bzw. abgezogen werden.

Zusätzlich wurde der elektroosmotische Fluss (EOF) im Femtotip mit einer 10^{-11} M Lösung neutraler MR121 Farbstoffe in PBS gemessen. Abbildung 4.71 zeigt die Messungen. Der Unterschied in den MCS Spuren für den unbehandelten und beschichteten Fall bei einer Spannung von -20 V angelegt an der Platinelektrode außerhalb des Femtotips wird deutlich. Während der zur Kathode gerichtete EOF im unbehandelten Fall beobachtet wird (Abb. 4.71 a), sind praktisch keine Fluoreszenzsignale im PEG-beschichteten Femtotip zu sehen (Abb. 4.71 c). Zum Test wurde noch die Spannung in der unbehandelten Mikrokapillare umgepolt (Abb. 4.71 b). Dieses Ergebnis hebt die Unterdrückung des EOF, der mit einer Unterdrückung der Analytadsorption einhergeht, durch die Beschichtung von Polyethylenglykol hervor.

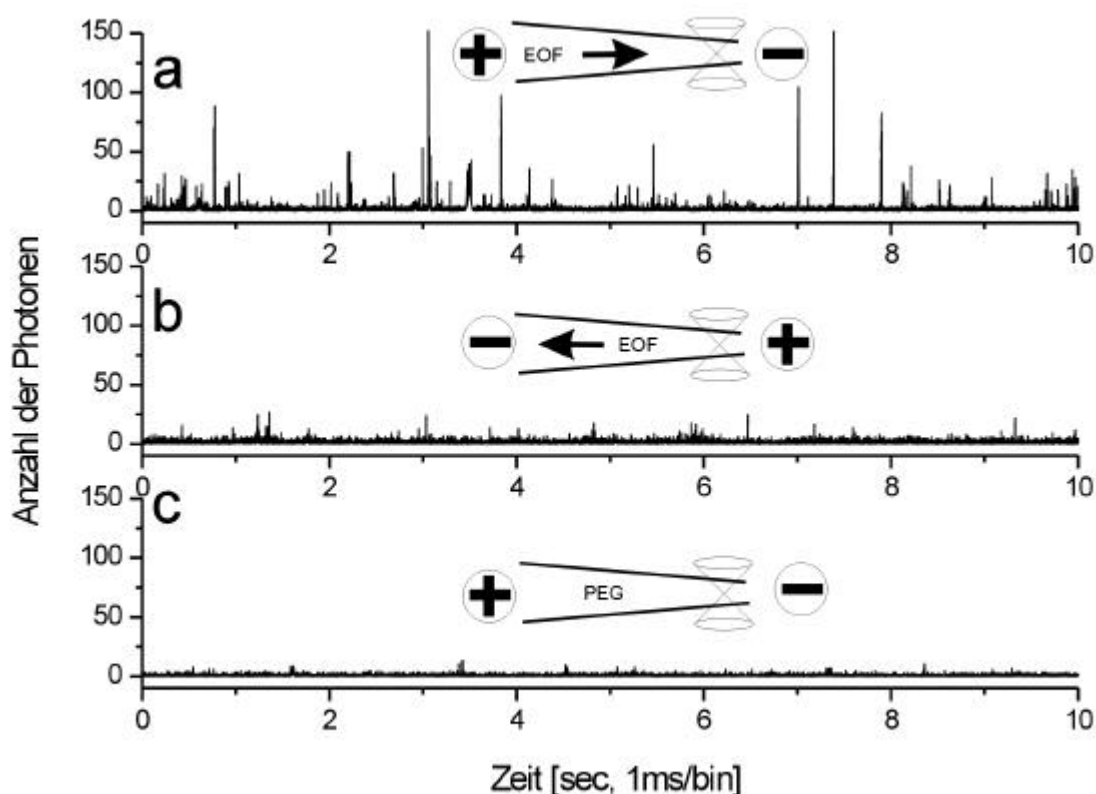


Abb.4.71 EOF Messungen mit 10^{-11} M MR121 in (a, b) unbehandelten und (c) PEG-behandelten Femtotip. Eine Spannung von -20 V ist angelegt, wobei die Messung in b) umgepolt ist. Die Laserintensität an der Probe beträgt $300 \mu\text{W}$.

5. Diskussion und Ausblick

Einzelmolekül-Elektrophorese

Zur effizienten Anregung einzelner farbstoffmarkierter Analytmoleküle in Submikrometerkanälen wurden gepulste Laserdioden verwendet. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes wird die Wanderungsgeschwindigkeit der geladenen Analytmoleküle innerhalb der Submikrometerkanäle gezielt manipuliert. Es ergibt sich eine lineare Beziehung zwischen der Anzahl der detektierten Fluoreszenzphotonenschauer pro Zeiteinheit und der angelegten Spannung. Eine Analyse der Fluoreszenzsignale mittels der Fluoreszenz-Korrelations-Analyse belegt die Spannungsabhängigkeit der Diffusionsgeschwindigkeit. Im Vergleich mit einem 2-dimensionalen Modell konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass es sich für die Messung innerhalb der Mikrokapillare um eine 1-dimensionale Diffusion handelt, wenn der Kapillardurchmesser deutlich kleiner als der des Detektionsvolumens ist. Dies belegt die Tatsache, dass durch den Anregungsfokus mit einem größeren Durchmesser als die Kapillare die Detektion aller passierenden Analytmoleküle mit hoher Sicherheit gewährleistet ist. Dies ist im Hinblick auf die Doppeldetektion von besonderem Interesse. Abbildung 5.1 lässt den Unterschied zu Messungen im offenen Volumen erkennen.

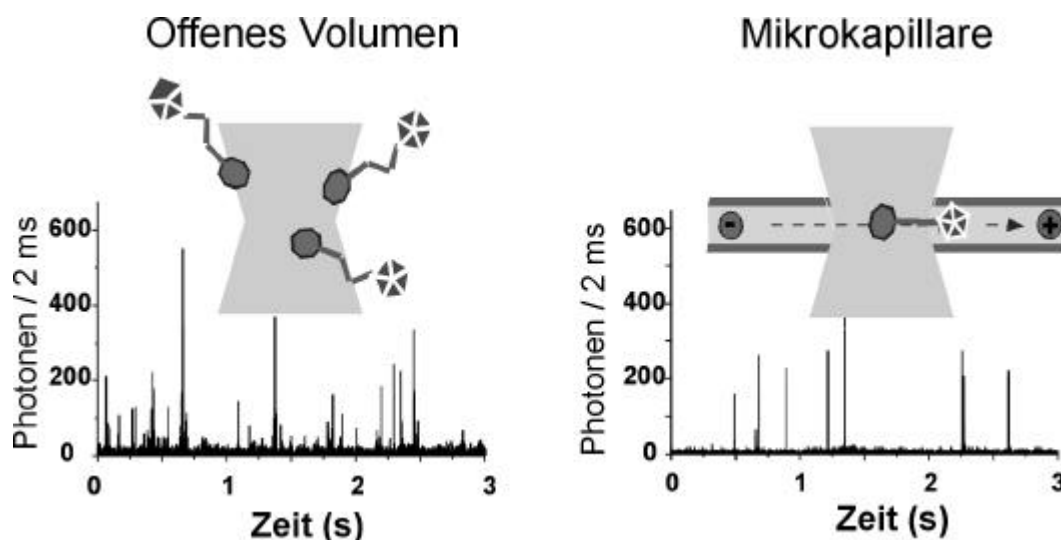


Abb. 5.1 MCS-Spuren im offenen Volumen und in der Mikrokapillare.

Aufbau zur Doppeldetektion

Der Aufbau zur Doppeldetektion einzelner Analytmoleküle in Submikrometerkanälen konnte zum ersten Mal erfolgreich realisiert werden. Drei verschiedene Ansätze waren sehr vielversprechend, von denen sich allerdings nur einer zur routinemäßigen Messung eignet. Hierbei werden zwei Laserstrahlen in ein Mikroskopobjektiv. Durch die konische Form des Femtotips ist es notwendig, die Doppeldetektion innerhalb der ersten 15 μm zu realisieren, da sonst der Kapillarendurchmesser größer als der Laserfokus wird. Zu kürzeren Abständen hingegen limitiert die Trennbarkeit der beiden Detektionssignale in der Zwischenbildebene des Mikroskops den Abstand zwischen den beiden Anregungs- bzw. Detektionsvolumina. So konnte mit einem 100-fach Mikroskopobjektiv im Minimum ein Abstand von 4 μm erreicht werden, was einem Abstand von 400 μm in der Zwischenbildebene entspricht. Ein kleiner, beweglicher Spiegel lenkt ein Detektionssignal auf eine Avalanche-Photodiode um, ohne dass dabei Crosstalk beobachtet wird, d. h. beide Detektionssignale werden effizient voneinander getrennt. Dies ist umso bemerkenswerter, da die Gruppe um Eigen trotz eines größeren Abstands zwischen den Detektionsvolumina von 10 μm aufgrund des Crosstalks eine so genannte Pseudoautokorrelation einführen muss, um die Daten überhaupt auswerten zu können [Brinkmeier 1999]. In diesem Zusammenhang spielt die Optimierung des eingestrahnten Laserprofils eine wichtige Rolle. Eine Verbesserung des Anregungsvolumens konnte erreicht werden, indem zwei elliptische Strahlprofile die Öffnung des Objektivs nur in Richtung parallel zur Strömungsachse in der Mikrokapillare überstrahlen, wodurch die Durchmesser der minimalen Strahlbrennpunkte innerhalb der Mikrokapillare entlang der Strömungsachse minimiert ($< 1 \mu\text{m}$), senkrecht zur Mikrokapillarenachse hingegen das Anregungsvolumen aufgeweitet wurden. Dadurch ist auch bei geringer Abweichung einer optimalen Positionierung der Mikrokapillare hinsichtlich der beiden Strahlbrennpunkte gewährleistet, dass alle vorbeiströmenden Analytmoleküle erfasst werden. Gleichzeitig können die beiden fokussierten Laserbrennpunkte entlang der Kapillarachse entsprechend nahe aneinander positioniert werden, ohne dass eine Detektionseinheit das Fluoreszenz- oder Anregungslicht des anderen Anregungsvolumens sieht, d. h. es wird kein Crosstalk gemessen und eine aufwendige Bearbeitung der Daten entfällt. Eine weitere Schwierigkeit besteht darin, die Mikrokapillare möglichst waagrecht zu positionieren. Kleinste Abweichungen von der optimalen Positionierung führen dazu, dass jeweils nur ein Laserstrahl innerhalb des Femtotips fokussiert werden kann.

Auswerteverfahren zur Doppeldetektion

Die Doppeldetektion von einzelnen Molekülen in Mikrokanälen ist von einigen Gruppen bis zu einem Durchmesser von 10 μm bei einem Abstand von 10 bis 25 μm zwischen den beiden Detektionsvolumina gezeigt worden [Guenard 1997; Brinkmeier 1999]. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels einer Hardware-Korrelatorkarte, die eine Kreuzkorrelationsanalyse durchführt, ohne die gesamte Multichannel Scaler (MCS) Spur abzuspeichern.

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Auswerteverfahren zur Doppeldetektion basieren auf den im FIFO-Modus aufgenommenen Daten, aus denen mikroskopische und makroskopische Zeitinformationen für die Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer und die Erstellung der MCS-Spuren gewonnen werden können. Das Auswerte- sowie das Messprogramm wurden mit LabView 5.1 geschrieben.

Der große Vorteil dieser Software-basierten Analyse gegenüber einer Hardware-basierten besteht darin, dass nicht nur die Kreuzkorrelationsdaten, sondern auch die MCS-Spuren, d. h. die unterschiedlichen Formen der Photonenschauer, berücksichtigt werden können.

Eine Simulation von MCS-Spuren zeigt, dass auch bei hohem Rauschanteil eine Analyse mittels Kreuzkorrelation sinnvoll ist, da durch statistische Normierung nur der Fluoreszenzanteil der Bursts sichtbar gemacht werden kann. Für eine korrekte Normierung ist jedoch ebenso entscheidend, dass die Form der Photonenschauer, d. h. die Fluoreszenzintensität in Höhe und Breite, nicht stark variiert. Andernfalls kann die Kreuzkorrelationsanalyse zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Das Ergebnis verdeutlicht auch, dass die Verteilung der Transitzeit, die ein Analytmolekül für die Durchwanderung der Distanz zwischen den beiden Detektionsvolumina benötigt, um ein Maximum statistisch schwankt.

Anhand von Messdaten wurden verschiedene entwickelte Auswerteverfahren getestet.

Beim Prinzip des „gleitenden Fensters“ wird ein Fenster fester Breite von Kanal zu Kanal über die gesamten MCS-Spuren geschoben und für jedes Fenster die Kreuzkorrelation analysiert. Darauf werden alle Kreuzkorrelationsfunktionen aufsummiert. Dadurch können bei geeigneter Wahl der Fensterbreite Mehrfachkorrelationen, die z.B. aufgrund zu niedriger Statistik auftreten, effektiv unterdrückt werden. Die Fensterbreite wird direkt aus den MCS-Spuren abgelesen. Dieses Verfahren eignet sich besonders für sehr kurze MCS-Spuren.

Um stark variierende Formen der Bursts zu berücksichtigen, wurde die Höhe der Photonenschauer normiert, ohne die Breite zu verändern. Da jedoch die hohen Photonenschauer meist auch breit sind, kann mit diesem Verfahren keine entscheidende

Verbesserung gegenüber dem gleitenden Fenster erzielt werden. Erst mit der Kombination aus beiden Techniken kann eine annähernd symmetrische Transitzeiten-Verteilung berechnet werden. Die zusätzliche Normierung der Breite führt zu einer Einführung von drei charakteristischen Größen, die jeden Photonenschauer beschreiben: Burstleft, Burstmitte und Burstmaximum. Diese drei Größen können je nach Gegebenheit unterschiedlichen Zeiten zugeordnet werden. So wird bei einem Photonenschauer, innerhalb dessen eine Photozerstörung stattfindet, das Maximum zu einer späteren Zeit auftreten als die Mitte, während im nicht photozerstörten Fall beide aufeinander liegen. Die Kreuzkorrelationsanalyse mit Breiten- und Höhennormierung der Photonenschauer deckt die symmetrische Form der Transitzeiten-Verteilung auf und liefert darüber hinaus direkt aus dem Integral unter der Verteilung die Anzahl der korrespondierenden Paare der Photonenschauer. Der Vergleich mit den Histogrammen der Transitzeiten, die aus den MCS-Spuren gewonnen wurden, belegt die Korrektheit des entwickelten Auswerteverfahrens.

Doppeldetektion von farbstoffmarkierten 20 nm großen Polystyrolkugeln

Es konnten erstmals einzelne farbstoffmarkierte 20 nm große Polystyrolbeads in Submikrometerkanälen zweifach detektiert werden. Diese Microspheres wurden gewählt, da aufgrund der hohen Farbstoffkonzentration pro Bead ein Einfluss der Photozerstörung vernachlässigbar gering ist. Zudem konnte die Justierung der Doppeldetektion optimiert und für die weiteren Messungen übernommen werden. Dadurch ist gewährleistet, dass einzelne Analytmoleküle mit hoher Sicherheit zweifach angeregt und detektiert werden. Die Messungen ergeben, dass ein weiter Bereich der Gesamtlaserleistung beider Laserstrahlen von 600 bis 1600 μW in Kombination einer angelegten Spannung in einem Bereich von 13 bis 25 V zur Doppeldetektion geeignet ist. Ebenso konnte demonstriert werden, dass für die Kreuzkorrelationsanalyse die Form der MCS-Spuren entscheidend ist. In der unbehandelten, normierten Kreuzkorrelation dreier exemplarisch gewählter Beispiele finden sich zwei Maxima, die zwei Komponenten mit unterschiedlicher elektrophoretischer Mobilität andeuten. LeCaptain und vanOrden haben gezeigt, dass eine Einzelmolekül-Elektrophorese in Glaskapillaren mit einem Durchmesser von 40 μm zur Unterscheidung von zwei unterschiedlichen Molekülen geeignet ist [LeCaptain 2002]. Obwohl die Auswertung mittels einer Korrelatorkarte ohne Berücksichtigung der MCS-Spuren gemacht wurde, stimmten die Ergebnisse mit der konventionellen Kapillarelektrophorese-Messung überein. Die relativen Verhältnisse wurden über das Verhältnis beider Korrelationsmaxima ermittelt und ließen sich

mit 2-6 % Genauigkeit angeben. Im Gegensatz dazu belegen die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Auswerteverfahren, dass es sich bei den gemachten Messungen mit Beads nur um eine Komponente handelt. So enthüllt die Kreuzkorrelation mit Höhen- und Breitennormierung nur einen Maximum mit einem symmetrischen Profil. Die Kreuzkorrelationsanalyse ohne hohe Photonenschauer lässt ein ähnliches Ergebnis erkennen. Eine asymmetrische Form des Maximums, wie sie von Eigen und Mitarbeitern gefunden wurde, muss daher von der unterschiedlichen Form der Photonenschauer oder durch Mehrfachkorrelationen herrühren [Brinkmeier 1999]. Die Abweichung ist umso stärker, je kürzer die Messungen sind bzw. geringer die Statistik ist. Da die bisher veröffentlichten Messungen zur Doppeldetektion nie länger als ein paar Sekunden dauerten, kann davon ausgegangen werden, dass die geringe Statistik die Kreuzkorrelationsanalyse verfälscht.

Neben der Frage, ob es sich um ein, zwei oder mehr Komponenten handelt, kann darüber hinaus die Anzahl der korrespondierenden Paare der Photonenschauer direkt aus dem Integral unter der Transitzeiten-Verteilung berechnet werden. Bei Messungen mit mehreren Komponenten sind daher mit dem entwickelten Auswerteverfahren nicht nur relative, sondern auch absolute Konzentrationsbestimmungen möglich.

Der Vergleich von Messungen mit unterschiedlicher Laserleistung lässt erkennen, dass das Maximum der Transitzeit mit zunehmender Laserleistung zu längeren Zeiten hin verschoben ist (Tab.4.1). Allerdings liegen die Werte innerhalb der Halbwertsbreiten, so dass die Aussage nicht eindeutig ist. Weitere Untersuchungen scheiterten an der limitierenden Leistung der verwendeten Laserdiode. Einen ähnlichen Effekt bei Beads und anderen fluoreszierenden Partikeln konnten Kunst et al. beobachten, die diese Verlangsamung der Flussgeschwindigkeit auf optische Kräfte des Laserstrahles zurückführen [Kunst 2002].

Weitere Informationen konnten durch Gegenüberstellung der gefundenen Größen aus dem Detektionsvolumen 1 und 2 gewonnen werden. Mit zunehmender Laserleistung zeigte sich, dass die Dauer der Photonenschauer im zweiten Detektionsvolumen abnimmt, was auf eine Photozerstörung im zweiten Fokus hindeutet. Ein Vergleich der Größen-Verteilung der Photonenschauer beider Detektionssignale unterstreicht dieses Ergebnis. Mit zunehmender Leistung sinkt die Anzahl der detektierten Photonen pro Photonenschauer im zweiten Volumen. Eine Auswertung der Abstände zwischen den Positionen der Maxima der Photonenschauer und zu den Burstleft der korrespondierenden Photonenschauer erbringt einen weiteren Nachweis für die leistungsabhängige Photozerstörung. So verdeutlicht diese Auftragung, dass bei hoher Laserleistung im Mittel die Abstände zwischen den Maxima der

Photonenschauer kleiner oder gleich denen der Burstleift sind, was einen kürzeren zweiten Photonenschauer bzw. die Photozerstörung im zweiten Detektionsvolumen indiziert.

Doppeldetektion von Mononukleotiden

Es ist zum ersten Mal gelungen, einzelne farbstoffmarkierte Mononukleotide in Submikrometerkanälen zweifach zu detektieren. Dabei musste stärker als bei den Messungen mit Beads darauf geachtet werden, dass die Verweilzeit der Analytmoleküle in den beiden Foki optimiert wird, um die Photozerstörung zu vermeiden. Ein Zusammenspiel zwischen Laserleistung und angelegter Spannung war daher von entscheidender Bedeutung für das Gelingen der Messungen. Für drei Spannungen wurde das Verhältnis der Anzahl der Photonenschauer von Spur 1 zu Spur 2 in Abhängigkeit von der Gesamtlaserleistung dargestellt, um die Rate der Doppeldetektion zu bestimmen. Die Messungen stammen von zweifach detektierten Fluoreszenzsignalen einer 10^{-11} M Lösung des markierten Mononukleotids MR121-dUTP in 40 mM Tris-Borat-Puffer pH 8.4, 30 Vol.-% Glycerin, 2 Vol.-% Tween 20 beim elektrophoretischen Transport durch die Kapillare. Während bei 20 V der Bereich von 900 bis 1000 μ W optimal ist, sind bei 30 und 40 V die Bereiche zwischen 700 bis 1000 μ W bzw. 500 bis 1000 μ W mit einer Wahrscheinlichkeit von 96 % für Messungen zur Doppeldetektion geeignet. Bei kleineren Spannungen konnte gezeigt werden, dass der Einfluss der Brownschen Molekularbewegung zunimmt. Dies spiegelt sich auch in der Halbwertsbreite des Korrelationsmaximums wieder. Mit abnehmender Spannung wird die gerichtete Bewegung schwächer und somit die Halbwertsbreite größer.

Bei der Betrachtung von Fluoreszenzlebensdauer, Dauer, Größe und Maxima der Photonenschauer der beiden Detektionsvolumina konnten keine Änderungen beobachtet werden. Hier ließe sich aufgrund der doppelten Information eine Reduzierung des Fehlers bei der Identifizierung einzelner Moleküle um etwa einen Faktor 4 erreichen [Enderlein 1997b]. Die gefundenen Ergebnisse wurden durch die Messungen mit Cy5-dCTP bestätigt.

Die in den Versuchen zur Doppeldetektion verwendete Beschichtung der inneren Kapillarwand beruht auf einem dynamischen Prinzip [Hjerten 1985]. Dabei werden der Probelösung Detergenzien zur Unterdrückung der Adsorption und des elektroosmotischen Flusses zugemischt. Mit den Messungen zur Doppeldetektion konnte eindrucksvoll belegt werden, dass diese dynamische Beschichtung effizient ist. Dennoch wäre es besonders im Hinblick auf biologische Anwendungen, wo jegliche Wechselwirkung zwischen Analytmolekül und Pufferlösung unerwünscht ist, sinnvoll, eine statische Wandbeschichtung

anzustreben. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit versucht, eine statische Art von Beschichtung der Submikrometerkanäle einzusetzen.

Statische Wandbeschichtung mit Polyethylenglykol

Oberflächen gebundene, hydrophile, neutrale Polymere wie Polyethylenglykol (PEG) kontrollieren eine Reihe von Oberflächenphänomenen. Dazu zählen eine reduzierte unspezifische Protein- und Zelladsorption, erhöhte Benetzbarkeit und verstärkte elektrokinetische Effekte. Diese Eigenschaften konnten auch auf Einzelmolekülebene demonstriert werden. Als Analytmolekül wurde farbstoffmarkiertes Fibronectin verwendet, das als Zelladsorptionsmolekül der extrazellulären Matrix bekannt ist. Ein Vergleich der Analytadsorption auf PEG-beschichteten und unbehandelten Deckglasplättchen belegt die hohe Effizienz der Wandbeschichtung. Die Bleach-Experimente auf der unbehandelten Deckglasoberfläche lassen die hohe Adsorptivität des Fibronectins erkennen, während bei PEG-Beschichtung nahezu keine Adsorption beobachtet werden konnte. Die Analyse der Dauer und Größe der Photonenschauer zeigt ebenfalls den Unterschied. Während bei PEG-Beschichtung nur vereinzelt Ereignisse mit Photonenzahlen größer 500 zu sehen sind, finden sich im unbehandelten Fall auch sehr viel breitere und größere Photonenschauer. Die Rate der Photonenschauer unterstreicht dieses Ergebnis. Im unbehandelten Fall werden beispielsweise pro Zeiteinheit 83 Ereignisse von Photonenschauern gezählt, während bei PEG-Beschichtung 181 Photonenschauer in derselben Zeit registriert werden, was als längere Verweilzeit an der Oberfläche im unbehandelten Fall gedeutet werden kann. Oberflächenscans wurden ebenfalls durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass bei gleicher Konzentration von 10^{-9} M Fibronectin-Lösung durch die PEG-Beschichtung eine 187-fache Unterdrückung der Adsorption stattfindet. Auf die Deckglasfläche normiert entspricht dies einer 0,04%-igen Belegung. Messungen, bei der in die Lösung fokussiert wurde, belegen die hohe Adsorptivität des Fibronectins, da eine etwa 10-fach höhere Fluoreszenzintensität für den PEG Fall gemessen wurde.

Ein neues Verfahren zur PEG-Beschichtung einer Submikrometerkapillare konnte erstmals entwickelt und erfolgreich getestet werden. So zeigte die Beschichtung auch nach stundenlanger Messung keine merkbaren Verluste. Um die Adsorptionseffekte sichtbar zu machen, gibt es in der Literatur einige Ansätze. Es können beispielsweise Kraftmikroskope eingesetzt werden, um die innere Kapillarwand zu charakterisieren [Barberi 1996, Cifuentes

1998]. Bei einer anderen Technik werden CCD-Kameras benutzt, um die Bewegung eines fluoreszierenden neutralen Markers entlang der Kapillarlänge zu verfolgen [Preisler 1996]. Am weitesten verbreitet ist die Methode, den elektroosmotischen Fluss zu messen [Kohr 1993]. Allen Methoden ist gemeinsam, dass die Charakterisierung von Kapillarwandbeschichtungen aufgrund der geringen Größe und Dicke extrem schwierig ist.

Die Analytadsorption in Submikrometerkanälen konnte im Rahmen dieser Arbeit auf direktere Art sichtbar gemacht werden. Mittels der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) in Kombination mit der Vibration der Submikrometerkanäle, die durch Schwingungen aus dem Stromnetz verursacht wurden, konnte bei Adsorption von Analytmolekülen an der inneren Kapillarwand die Schwingungsperiode, mit der die Mikrokapillare oszilliert, in Echtzeit sichtbar gemacht werden. Dadurch konnte kontrolliert werden, ob die Messungen an der Kapillarwand gemacht wurden. Ein Querschnitt der Fluoreszenzintensität über eine Mikrokapillare macht drei Bereiche ersichtlich, die sich mittels FCS identifizieren lassen: (a) außerhalb, (b) auf der Wand und (c) in der Kapillare. Die Analyse der Dauer und Größe der Photonenschauer lässt sehr viel deutlicher als im Fall der Deckgläser den Unterschied in der Wandbeschichtung erkennen. Bei PEG-Beschichtung finden sich praktisch keine längeren Photonenschauer als 30 ms bzw. Photonenzahl von 200. Zusätzlich wurde der elektroosmotische Fluss in der Mikrokapillare mit einer 10^{-11} M Lösung neutraler MR121 Farbstoffe gemessen. Die Messungen beweisen, dass der elektroosmotische Fluss effizient unterdrückt wird.

Ausblick

Die Kombination aus Mikroelektrophorese und Einzelmolekülempfindlichkeit bietet ein breites Feld an Anwendungen. So sind am Phys.-Chem. Institut der Universität Heidelberg bereits Messungen mit Antikörper / Antigen-Komplexen gemacht worden. Bei dieser Immunoelektrophorese wurden die Antikörper mit Hilfe von molekularen Sonden markiert und konnten *in vitro* bis zu einer Konzentration von 10^{-15} M nachgewiesen werden. Dies ist sehr viel empfindlicher als die herkömmlichen ELISA-Tests (10^{-9} M). Desweiteren gelang der spezifische Nachweis von humanen Autoantikörpern im Blutserum von Patienten [Hübner 2002].

Das Prinzip beruht darauf, dass bei einer Bindung zwischen Sonde und Antikörper die negative Ladung des Antikörpers die positive Ladung der Sonde kompensiert und der

entstehende Komplex negativ geladen ist. Sonde und Komplex besitzen somit eine entgegengesetzte Wanderungsrichtung im elektrischen Feld und können vor der Detektion räumlich getrennt werden.

Eine Steigerung der Empfindlichkeit könnte durch die spektrale Auflösung der Analytmoleküle erreicht werden. Dazu müssten Antikörper und Sonde mit Farbstoffen unterschiedlicher Emissionswellenlänge markiert werden, die beide von ein und derselben Wellenlänge angeregt werden. Zusätzlich kann die Information der Fluoreszenzlebensdauer hinzugezogen werden.

Eine weitere Verbesserung dieser Technik könnte durch eine spektral gesteuerte Justage der Mikrokapillare erreicht werden, indem der Probelösung eine Lösung hoher Farbstoffkonzentration hinzugemischt wird, die spektral von der Probe getrennt ist. Das hohe Fluoreszenzsignal der „Justierlösung“ kann dann zu einer Automatisierung der aufwendigen Kapillarjustage ausgenutzt werden.

Durch die Detektion jedes einzelnen am Fokus vorbeiwandernden Analytmoleküls ist auch die gezielte Manipulation einzelner Moleküle denkbar. Die Gruppe um Klenerman konnte z. B. kontrolliert biotinylierte DNS als etwa 1 μm große Spots auf eine streptavidin-beschichtete Glasoberfläche absetzen [Bruckbauer 2002]. Dazu wurden Nanopipetten mit einem Durchmesser von 100 nm mit einer 10^{-7} M Lösung DNS befüllt und 100 nm über eine zu spottenden Oberfläche positioniert. Das kontrollierte Absetzen von Molekülen geschieht durch Anlegen einer Spannung. Damit lassen sich pro Spot etwa 46000 ± 12000 Moleküle absetzen. Durch Kombination mit der in dieser Arbeit entwickelten Technik könnten auch einzelne Moleküle auf Oberflächen abgesetzt werden.

Durch die Doppeldetektion von einzelnen Analytmolekülen wird die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Messungen erhöht. Es wäre daher wünschenswert, einzelne Analytmoleküle nicht nur zweifach, sondern mehrfach zu detektieren und im besten Falle einzufangen. Während bei der Diffusion eines Farbstoffmoleküls die Verweilzeit im Detektionsvolumen in Wasser ca. 1 ms beträgt, kann die Beobachtungszeit der Analytmoleküle durch Immobilisierung auf einer Glasoberfläche auf bis zu mehrere Sekunden erhöht werden. Andererseits bestehen hinsichtlich der Immobilisierung der Analytmoleküle auf Glasoberflächen ohne Wechselwirkungen mit der Oberfläche berechtigte Zweifel. Es stellt sich daher sicher die Frage, ob es möglich ist, ein Verfahren zu entwickeln, dass es ermöglicht ein einzelnes Molekül ohne Wechselwirkungen mit Oberflächen, d. h.

ohne Immobilisierung, über längere Zeiträume zu beobachten. Dies ist jedoch in Lösung bisher noch nicht realisiert worden. Es wäre denkbar, ein einzelnes Analytmolekül durch ein oszillierendes elektrisches Feld über mehrere Sekunden bis zu Minuten im Detektionsvolumen eines Submikrometerkanals zu halten und dadurch die Sensitivität und Genauigkeit bei der Bestimmung von charakteristischen Fluoreszenzeigenschaften einzelner Moleküle in Lösung zu erhöhen.

Die Doppeldetektion einzelner Analytmoleküle setzt eine optimale Kombination aus angelegter Spannung und Laserleistung voraus. Andererseits könnte gerade eine Abweichung von den idealen Bedingungen ausgenutzt werden, um z. B. Photobleach-Experimente an einzelnen Molekülen durchzuführen. In diesem Zusammenhang konnte bereits in der Arbeit gezeigt werden, dass sich die Photozerstörung innerhalb der Photonenbursts bemerkbar macht. Eine eingehende Studie über die Form jedes Photonenschauers, die möglicherweise Informationen aus den Fluktuationen innerhalb eines Bursts herausfiltern kann, wäre daher sinnvoll. Ebenso wäre es interessant, den Einfluss der Burstformen auf die Autokorrelation der Fluoreszenzsignale zu untersuchen. Die vorgelegte Arbeit induziert die Notwendigkeit einer Berücksichtigung der MCS-Spuren zur Korrelationsanalyse. Möglicherweise wird auch dort in einigen Fällen eine Burstnormierung nötig sein, um Fehlinterpretationen zu vermeiden.

6. Anhang

Die Implementierung der Mess- und Auswertprogramme wurde in LabVIEW 5.1 (National Instruments) durchgeführt.

Die Initialisierungssoftware wurde von Dr. Kenneth Weston geschrieben und umfasst die Programme *SPCM_initialize.vi* und *TAC_setup_v5.vi*, die für die Kommunikation mit der SPC-630 Karte und das Auslesen der Daten im FIFO-Modus sorgen. Folgende Programme wurden im Rahmen dieser Arbeit angefertigt.

Messprogramm: *BurstMeasure_forCrossCorrelationCWP.vi*

Dieses Programm stellt die Daten in Echtzeit als Multichannel Scaler (MCS) Spur, als Autokorrelations- und Kreuzkorrelationsfunktion dar (Abb. 6.1). Desweiteren werden die Fluoreszenzlebensdauern als Histogramme dargestellt. Die Binweite der makroskopischen Zeitinformation kann beliebig (minimal bis 150 ns) gewählt werden.

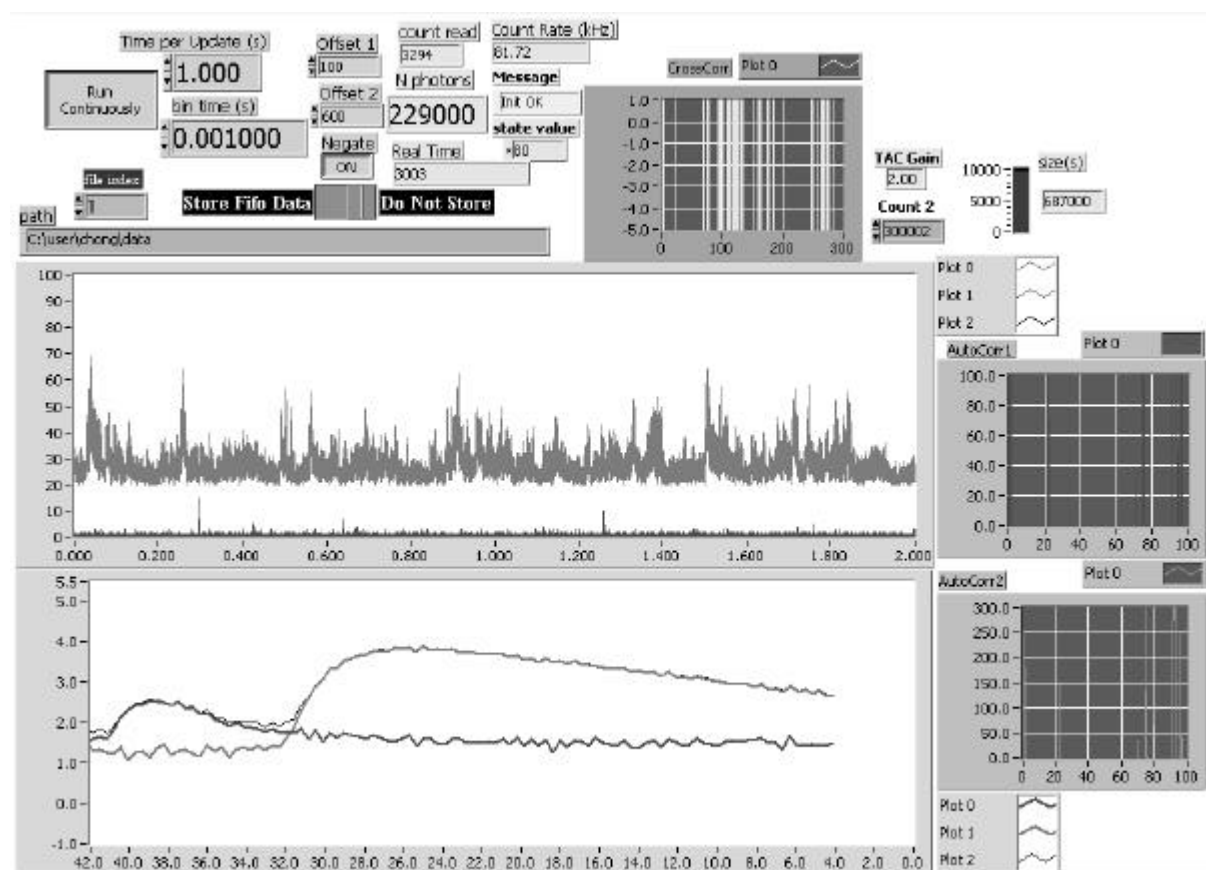


Abb. 6.1 LabVIEW-Messprogramm zur Aufnahme der Fluoreszenzdaten im FIFO-Modus

Auswertprogramm: *Chongalyzer.vi* (aktuellste Version 4.14)

Die Analyse der Daten umfasst die Erstellung der MCS-Spuren beider Detektionssignale. Mittels Cursor werden Teilbereiche ausgewählt, in denen die Autokorrelation, Kreuzkorrelation und verschiedene entwickelte Verfahren eingesetzt werden können (s. Auswertverfahren zur Doppeldetektion). Abbildung 6.2 a, b zeigt einen Überblick des Programms.

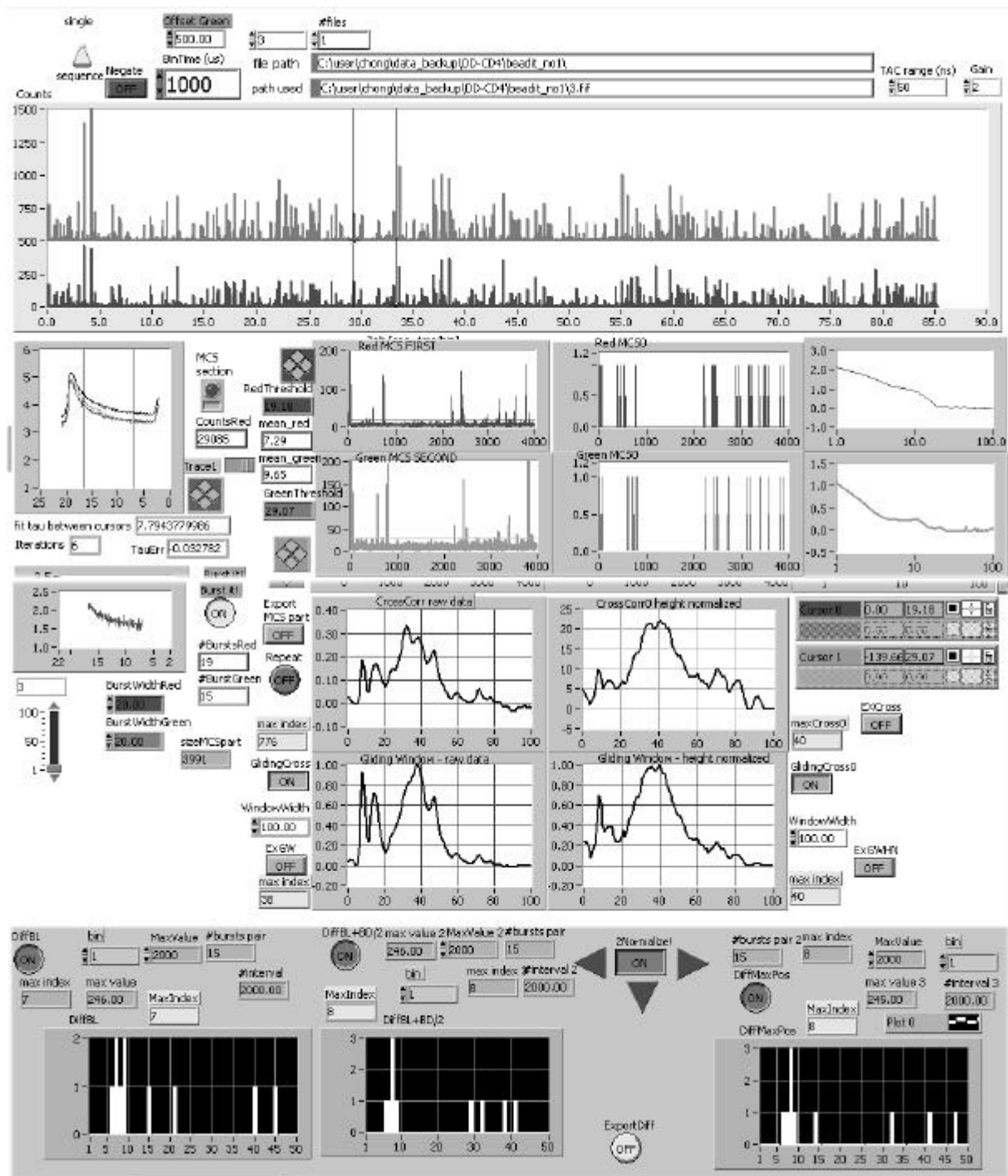


Abb. 6.2 a Überblick des Analyseprogramms

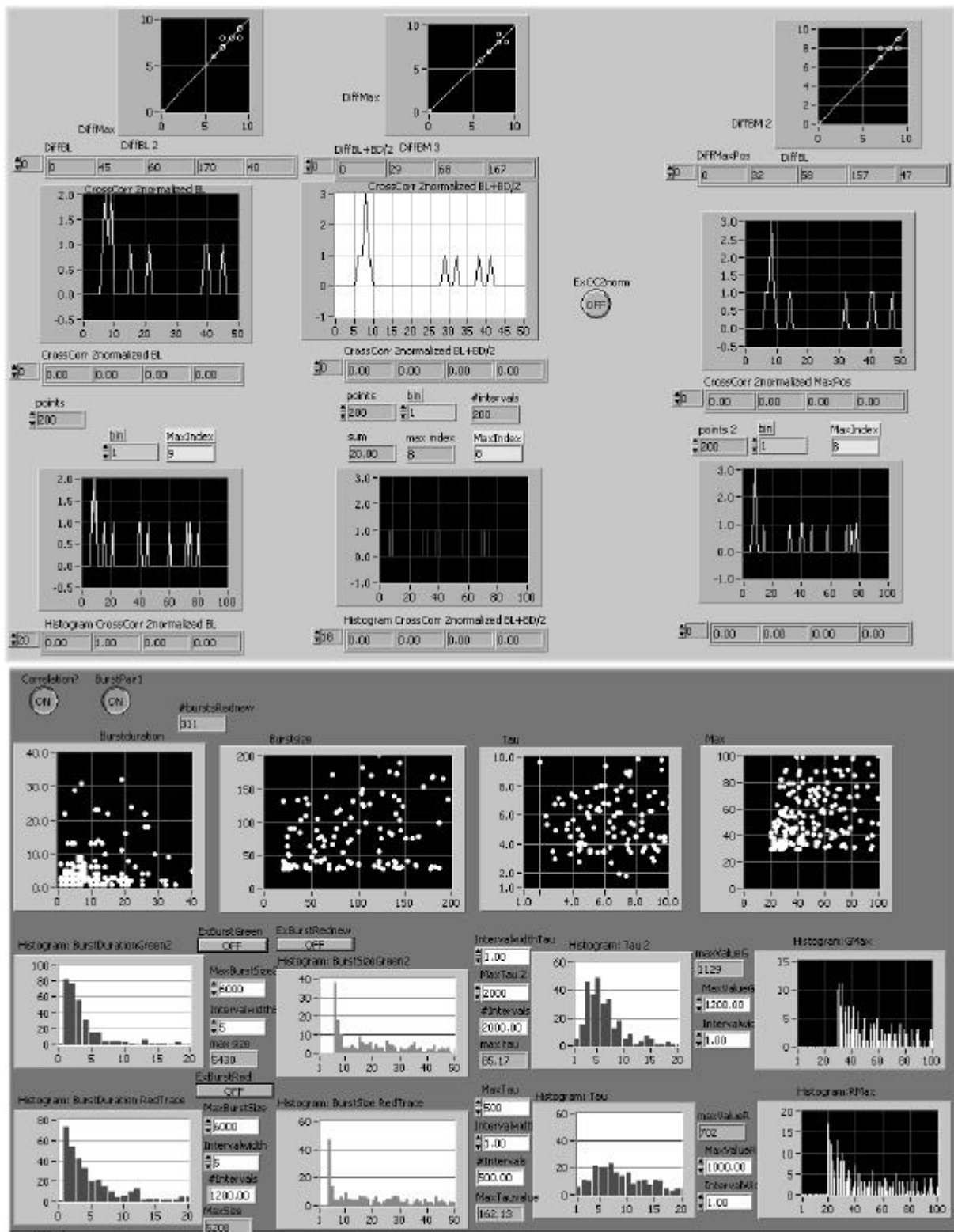


Abb. 6.2 b LabView-Auswerteprogramm

7. Literatur

- [Abel 1993] Abel, F. L., Cooper, R. H., Beck, R. R., *Circ Shock* **1993**, *41*, 156-61.
- [Adamson 1982] Adamson, A. W., *Physical Chemistry of Surfaces* (4th Ed.), Wiley & Son, New York **1982**.
- [Ambrose 1993] Ambrose, W. P., Goodwin, P. M., Jett, J. H., Johnson, M. E., Martin, J. C., Marrone, B. L., Schecker, J. A., Wilkerson, C. W., Keller, R. A., Haces, A., Shih, P.-J., and Harding, J. D. *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 1535–42.
- [Arriaga 1995] Arriaga, E. A., Zhang, Y., Dovichi, N. J. *Anal. Chim. Acta* **1995**, *299*, 319-26.
- [Atkins 1990] Atkins, P. W.: „*Physikalische Chemie*“, VCH Weinheim, 2. korr. Nachdruck, **1990**.
- [Bacia 2002] Bacia, K., Majoul, I. V., and Schwille, P., *Biophys. J.* **2002**, *83*, 1184-93.
- [Barberi 1996] Barberi, R., Bonvent, J. J., Bartolino, R., Roeraade, J., Capelli, L., Righetti, P. G., *J. Chromatogr. B* **1996**, *683*, 3-13.
- [Barnes 1995] Barnes, M. D., Whitten, W. B., and Ramsey, J. M. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 418–23A.
- [Becker 1999] Becker, W., Hickl, H., Zander, C., Drexhage, K. H., Sauer, M., Siebert, S., Wolfrum, J., *Rev. Sci. Instru.* **1999**, *70*, 1835.
- [Boehringer 1991] Boehringer Mannheim **1991**, *German Patent* DE 4137934.
- [Brannon 1978] Brannon, J. H.; Magde, D. *J. Phys. Chem.* **1978**, *82*, 705-9.
- [Brinkmeier 1999] Brinkmeier, M., Dörre, K., Stephan, J., Eigen, M., *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 609-16.
- [Bronstein 1991] Bronstein I. N. , Semendjajew K. A., Taschenbuch der Mathematik, B.G. Teubner **1991**.
- [Bruckbauer 2002] Bruckbauer, A., Ying, L., Rothery, A. M., Zhou, D., Shevchuk, A. I., Abell, C., Korchev, Y. E., Klenerman, D., *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 8810-1.
- [Burns 1995] Burns, N. L., Vanalstine, J. M., Harris, J. M., *Langmuir* **1995**, *11*, 2768-76.
- [Bushey 1989] Bushey, M. M., Jorgenson, J. W., *J. Chromatogr.* **1989**, *480*, 301-10.
- [Chen 1994] Chen, D. Y., Adelhelm, K., Cheng, X. L., and Dovichi, N. J., *Analyst* **1994**, *119*, 349–52.
- [Chen 1996] Chen, D. Y., and Dovichi, N. J., *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 690–6.

- [Chiari 1996] Chiari, M., Nesi, M., Righetti, P. G., in: Righetti, P. G. (Ed.), *Capillary Electrophoresis in Analytical Biotechnology*, CRC Press, Boca Raton, FL **1996**, 1-36.
- [Cifuentes 1998] Cifuentes, A., Canalejas, P., Ortega, A., DiezMasa, J. C., *J. Chromatogr. A* **1998**, 823, 561-71.
- [Cifuentes 1998] Cifuentes, A., DiesMasa, J. C., Fritz, J., Anselmetti, D., Bruno, A. E., *Anal. Chem.* **1998**, 70, 3458-62.
- [Demas 1971] Demas, J. N., Crosby, G. A., *J. Phys. Chem.* **1971**, 75, 991-1024.
- [Demtröder 1995] Demtröder, W., Kap. 5.9: *Gaussian Beams in Laser Spectroscopy* Springer Verlag **1995**.
- [Dörre 1997] Dörre, K., Brakmann, S., Brinkmeier, M., Han, K.T., Riebeseel, K., Schwille, P., Stephan, J., Wetzel, T., Lapczynska, M., Stuke, M., Bader, R., Hinz, M., Seliger, H., Holm, J., Eigen, M., and Rigler, R., *Bioimaging* **1997**, 5, 139-52.
- [Eigen 1994] Eigen, M., and Rigler, R., *Proc. Natl Acad. Sci., USA* **1994**, 91, 5740-7.
- [Elson 1974] Elson, E. L., Magde, D., *Biopolymers* **1974**, 13, 1-27.
- [Emoto 1996] Emoto, K., Harris, J. M., Vanalstine, J. J., *Anal. Chem.* **1996**, 68, 3751-7.
- [Enderlein 1997] Enderlein, J., Robbins, D.L., Ambrose, W. P., Goodwin, P.M., Keller, R. A., *Bioimaging* **1997**, 5, 88-98.
- [Enderlein 1997b] Enderlein, J., Keller, R. A., *Applied Optics* **1997**, 36, 443-446.
- [Enderlein 2002] Enderlein, J., Zander, C., *Theoretical foundations of single molecule detection in solution*, in: Single molecule detection in solution (C. Zander, J. Enderlein, R.A. Keller, Ed.), Wiley VCH, Berlin **2002**.
- [Engelhardt 1994] Engelhardt, H., Beck, W., Schmitt, T. in „Kapillarelektrophorese“, Vieweg-Verlag, **1994**.
- [Ermakov 1996] Ermakov, S. V., Capelli, L., Righetti, P. G., *J. Chromatogr. A* **1996**, 744, 55-61.
- [Figeys 1994] Figeys, D., Arriaga, E. A., Renborg, A., Dovichi, N. J. *J. Chromatogr. A* **1994**, 669, 205-216.
- [Flanagan 1998] Flanagan, Jr., J. H., Owens, C. V., Romero, S. E., Waddell, E., Kahn, S. H., Hammer, R. P., Soper, S.A., *Anal. Chem.* **1998**, 70, 2676-2684.
- [Förster 1948] Förster T., *Ann. Phys.* **1948**, 17, 55-75.
- [Gao 1998] Gao, Q. F., Yeung, E. S., *Anal. Chem.* **1998**, 70, 1382-88.

- [Goodwin 1993] Goodwin, P. M., Johnson, M. E., Martin, J. C., Ambrose, W. P., Marrone, B. L., Jett, J. H., and Keller, R. A., *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 803–6.
- [Goodwin 1993] Goodwin, P. M., Schecker, J. A., Wilkerson, C. W., Hammond, M. L., Ambrose, W. P., Jett, J. H., Martin, J. C., Marrone, B. L., Keller, R. A., Haces, A., Shih, P.-J., and Harding, J. D., *Proc. SPIE* **1993**, *1891*, 127–31.
- [Goodwin 1995] Goodwin, P. M., Affleck, R. L., Ambrose, W. P., Demas, J. N., Jett, J. H., Martin, J. C., Reha-Krantz, L. J., Semin, D. J., Schecker, J. A., Wu, M., and Keller, R. A., *Exp. Tech. Phys.* **1995**, *41*, 279–94.
- [Goodwin 1996] Goodwin, P. M., Ambrose, W. P., and Keller, R. A., *Acc. Chem. Res.* **1996**, *29*, 607–13.
- [Guenard 1997] Guenard, R. D., King, L.A., Smith, B. W., Winefordner, J. D., *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 2426-33.
- [Harding 1992] Harding, J. D., and Keller, R. A., *Trends Biotech.* **1992**, *10*, 55–61.
- [Harris 1992] Harris, J. M., *Poly(ethylene glycol) Chemistry*, Plenum Press, New York **1992**.
- [Haupts 1998] Haupts, U., Maiti, S., Schwille, P., Webb, W. W., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1998**, *95*, 13573-8.
- [He 1998] He, H., Nunnally, B. K., Li, L.-C., McGown, L. B. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 3413-8.
- [Hirschfeld 1976] Hirschfeld, T., *Appl. Opt.* **1976**, *15*, 2965–6.
- [Hjerten 1967] Hjerten, S., *Chromatogr. Rev.* **1967**, *9*, 122.
- [Hjerten 1985] Hjerten, S., *J. Chromatogr.* **1985**, *347*, 191-8.
- [Hjerten 1987] Hjerten, S., US Patent 4, **1987**, 680, 201.
- [Horvath 2001] Horvath, J., Dolnik, V., *Electrophoresis* **2001**, *22*, 644-55.
- [Hu 1973] Hu, C.; Whinnery, J. R., *Appl. Opt.* **1973**, *12*, 72-9.
- [Huang 1996] Huang, Z., Petty, J. T., O'Quinn, B., Longmire, J. L., Brown, N. C., Jett, J. H., and Keller, R. A., *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 4202–9.
- [Hübner 2002] Hübner, T. **2002**, Dissertation Universität Heidelberg.
- [Iler 1979] Iler, K. R., *The Chemistry of Silica*, John Wiley & Sons, New York **1979**.
- [Jett 1989] Jett, J. H., Keller, R. A., Martin, J. C., Marrone, B. L., Moyzis, R. K., Ratliff, R. L., Seizinger, N. K., Shera, E. B., Stewart, C. C., *J. Biomol. Struc. Dynam.* **1989**, *7*, 301.

- [Jett 1991] Jett, J. H., Keller, R. A., Martin, J. C., Marrone, B. L., Moyzis, R. K., Ratliff, R. L., Seitzinger, N. K., Shera, E. B., and Stewart, C. C., *J. Biomol. Struct. Dynam.* **1991**, 7, 301–9.
- [Jorgenson 1981] Jorgenson, J. W., Lukacs, K. D., *Anal. Chem.* **1981**, 53, 1298-302.
- [Keller 1996] Keller, R. A., Ambrose, W. P., Goodwin, P. M., Jett, J. H., Martin, J. C., and Wu, M., *Appl. Spectrosc.* **1996**, 50, 12–32A.
- [Kohr 1993] Kohr, J., Engelhardt, H., *J. Chromatogr.* **1993**, 652, 309-16.
- [Kunst 2002] Kunst, B. H., Schots, A., Visser, A. J. W. G., *Anal. Chem.* **2002**, 74, 5350-7.
- [Lakowicz 1983] Lakowicz, J.R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Plenum Press, New York **1983**.
- [Lakowicz 1991] Lakowicz, J. R., *Topics in Fluorescence Spectroscopy, Volume 1, Techniques* Plenum Press, New York, **1991**.
- [Lambert 1990] Lambert, W. J., Middleton, D. L., *Anal. Chem.* **1990**, 62, 1585-7.
- [Langer 1981] Langer, P. R., Waldrop, A. A., and Ward, D. C., *Proc. Natl Acad. Sci., USA*, **1981**, 78, 6635–7.
- [LeCaptain 2002] LeCaptain, D. J.; Van Orden, A., *Anal. Chem.* 2002, 74, 1171-6.
- [Lee 1994] Lee, Y. H., Maus, R. G., Smith, B. W., and Winefordner, J. D., *Anal. Chem.* **1994**, 66, 4142–9.
- [Lee 1996] Lee, T. T., Yeung, E. S., *Methods Enzymol.* **1996**, 270, 419-49.
- [Legendre 1996] Legendre, B. L., Williams, D. C., Soper, S. A., Erdmann, R., Ortmann, U., Enderlein, J., *Review of Scientific Instr.* **1996**, 67, 3984-9.
- [Li 1995] Li, L.-Q., and Davis, L. M., *Appl. Opt.* **1995**, 34, 3208–17.
- [Lyon 1997] Lyon, W. A., Nie, S., *Anal. Chem.* **1997**, 69, 3400-5.
- [Madabushi 1998] Madabushi, R. S., *Electrophoresis* **1998**, 19, 224-30.
- [Malá 1999] Malá, Z., Klepárník, K., Bocek, P., *J. Chromatogr. A* **1999**, 853, 371-9.
- [Marcus 1956] Marcus, R. A., Siders, P., *J. Chem. Phys.* **1956**, 24, 966-78.
- [Matyska 2000] Matyska, M. T., Resek, J. J., Sandoval, J. E., Parkar, U., Liu, X. L., *J. Liq. Chromatogr.* **2000**, 23, 97-111.
- [Mets 1994] Mets, Ü., and Rigler, R., *J. Fluoresc.* **1994**, 4, 259–64.
- [Mikkers 1979] Mikkers, F. E. P., Eveaerts, F. M., Verheggen T. P. E. M., *J. Chromatogr.* **1979**, 169, 11.
- [Minsky 1957] Minsky, M.; *Microscopy Apparatus*; U.S. Patent #3013467 **1957**.
- [Minsky 1988] Minsky, M.; *Scanning*; **1988**, 10, 128-38.
- [Moring 1993] Moring, S. E., Reel, R. T., van Soest, R. E. J., *Anal. Chem.* **1993**, 65, 3454-9.

- [Müller 1997] Müller, R. **1997**, Dissertation Universität Heidelberg.
- [Nashabeh 1991] Nashabeh, W., El Rassi, Z., *J. Chromatogr.* **1991**, 559, 367-83.
- [Nie 1994] Nie, S., Chiu, D. T., and Zare, R. N., *Science* **1994**, 266, 1018–21.
- [Nie 1995] Nie, S., Chiu, D. T., and Zare, R. N., *Anal. Chem.* **1995**, 67, 2849–57.
- [Nouadje 1996] Nouadje, G., Simeon, N., Nertz, M., Couderc, F., *Analisis* **1996**, 24, 360-70.
- [Nouadje 1997] Nouadje, G., Amsellen, J., Couderc, B., Verdeguer, P., Couderc, F., *Prog. HPLC-HPCE* **1997**, 5, 49-72.
- [Nunnally 1997] Nunnally, B. K., He, H., Li, L.-C., Tucker, S.A., McGown, L. B. *Anal. Chem.* **1997**, 69, 2392-7.
- [O'Conner 1984] O'Conner, D. V., Phillips, D., *Time-Correlated Single Photon Counting* Academic Press **1984**.
- [Pang 1999] Pang, H. M., Pavli, V., Yeung, E. S., *J. Biochem. Biophys. Methods* **1999**, 41, 121-32.
- [Pawley 1989] Pawley, J., *Handbook of biological confocal microscopy* Plenum Press, New York **1989**.
- [Petty 1995] Petty, J. T., Johnson, M. E., Goodwin, P. M., Martin, J. C., Jett, J. H., and Keller, R. A., *Anal. Chem.* **1995**, 67, 1755–61.
- [Preisler 1996] Preisler, J., Yeung, E. S., *Anal. Chem.* **1996**, 68, 2885-9.
- [Righetti 2001] Righetti, P.G., *Electrophoresis* **2001**, 22, 603-11.
- [Rigler 1992] Rigler, R., Widengren, J. and Mets, Ü. *Fluorescence Spectroscopy* ed O. S. Wolfbeis (Berlin: Springer) **1992**, 13–24.
- [Rigler 1995] Rigler, R., *J. Biotechnol.* **1995**, 41, 177–86.
- [Rigler 1999] Rigler, R., Pramanik, A., Jonasson, P., Kratz, G., Jansson, O.T., Nygren, P.-Å., Ståhl, S., Ekberg, K., Johansson, B.-L., Uhlén, S., Uhlén, M., Jörnvall; H., Waren, J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1999**, 96, 13318-23.
- [Sandoval 1996] Sandoval, J. E., Chen, S.-M., *Anal. Chem.* **1996**, 68, 2771-5.
- [Sauer 1995] Sauer, M. **1995**, Dissertation Universität Heidelberg.
- [Sauer 1997] Sauer, M., Arden-Jacob, J., Drexhage, K. H., Marx, N. J., Karger, A. E., Lieberwirth, U., Müller, R., Neumann, M., Nord, S., Paulus, A., Schulz, A., Seeger, S., Zander, C., Wolfrum, *J. Biomed. Chromatogr.* **1997**, 11, 81-82.
- [Sauer 1998] Sauer, M., Arden-Jakob, J., Drexhage, K.H., Göbel, F., Lieberwirth, U., Mühlegger, K., Müller, R., Wolfrum, J., Zander, C., *Bioimaging* **1998**, 6, 14-24.

- [Sauer 2001] Sauer, M., Angerer, B., Ankenbauer, W., Földes-Papp, Z., Göbel, F., Han, K.-T., Rigler, R., Schulz, A., Wolfrum, J., Zander, C., *J. Biotech.* **2001**, *86*, 181-201.
- [Schodl 1986] Schodl, R., Laser-two-focus velocimetry *AGARD Conf. Proc.* **1986**, *399*, 7.1-7.31.
- [Shera 1990] Shera, E. B., Seitzinger, N. K., Davis, L. M., Keller, R. A., and Soper, S. A., *Chem. Phys. Lett.* **1990**, *174*, 553-7.
- [Smith 1992] Smith, J. T., El Rassi, Z., *J. High Resol. Chromatogr.* **1992**, *15*, 573-8.
- [Soper 1992] Soper, S. A., Davis, L. M., and Shera, E. B., *J. Opt. Soc. Am. B* **1992**, *9* 1761-9.
- [Soper 1995] Soper, S. A., Legendre Jr., B. L., Williams, D.C., *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 4358-65.
- [Stryer 1978] Stryer, L., *Ann. Rev. Biochem.* **1978**, *47*, 819-846.
- [Towns 1991] Towns, J. K., Regnier, F.E., *Anal. Chem.* **1991**, *63*, 1126-31.
- [Van Osterhout 1998] Van Oosterhout, M. F., Prinzen, F. W., Sakurada, S., Glenny, R. W., Hales, J. R., *Am J Physiol* **1998**, *275*, H110-H115.
- [Wang 1995] Wang, J., and Wolynes, P., *Phys. Rev. Lett.* **1995**, *74*, 4317-20.
- [Widengren 1995] Widengren, J., Mets, Ü., Rigler, R., *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 13368-79.
- [Widengren 1997] Widengren, J., Dapprich, J., and Rigler, R., *Chem. Phys.* **1997**, *216*, 417-26.
- [Widengren 2000] Widengren, J., Schwille, P., *J. Phys. Chem. A*, **2000**, *104*, 6416-28.
- [Widengren 2001] Widengren, J., *Photophysical aspects of FCS measurements*, in: *Fluorescence Correlation Spectroscopy, theory and applications* (R. Rigler, E.S. Elson ed.), Springer, Berlin **2001**.
- [Wilkerson 1993] Wilkerson, C. W. Jr., Goodwin, P. M., Ambrose, W. P., Martin, J. C., and Keller, R. A., *Appl. Phys. Lett.* **1993**, *62*, 2030-2.
- [Wu 1996] Wu, M., Goodwin, P. M., Ambrose, W. P., and Keller, R. A., *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 17 406-9.
- [Xue 1995] Xue, Q., and Yeung, E. S., *Nature* **1995**, *373*, 681-3.
- [Yeung 1997] Yeung, K. K. C., Lucy, C. A., *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 3435-41.
- [Ying 2002] Ying, L., Bruckbauer, A., Rothery, A. M., Korchev, Y. E., Klenerman, D., *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 1380-5.
- [Zander 1997] Zander, C., Drexhage, K. H., *J. Fluoresc.* **1997**, *7*, 37S.

- [Zander 1998] Zander, C., Drexhage, K. H., Han, K.-T., Wolfrum, J., Sauer, M., *Chem. Phys. Lett.* **1998**, 286, 457.

Danksagung

Ich danke allen, die diese Arbeit durch ihre Unterstützung ermöglicht haben. Mein besonderer Dank gilt:

Prof. Dr. Jürgen Wolfrum und Hochschuldozenten Dr. Markus Sauer für die interessante Themenstellung und ihre stetige Unterstützung,

Prof. Dr. Joachim Spatz für die Begutachtung der Arbeit,

Prof. Dr. Kenneth Weston für die Einführung in die LabView-Programmierung und die Programmierung eines Teils des Messprogramms, durch die das Implementieren eigener Ideen ermöglicht wurde,

Dr. Jens-Peter Knemeyer und Dr. Nicole Marmé für ihre freundliche Zusammenarbeit bei der Glasbeschichtung und ihre tatkräftige Unterstützung beim Binden der Arbeit,

Dr. Thomas Hübner für die angenehme Zusammenarbeit bei der Immunoelktrophorese und viele hilfreiche Diskussionen chemischer Fragen,

Florian Göbel, Dr. Dirk-Peter Herten, Christian Müller und Dr. Philip Tinnefeld für viele stimulierende Diskussionen mathematischer und optischer Natur,

Dr. Volker Buschmann und Oliver Piestert für viele hilfreiche Diskussionen chemischer Fragestellungen,

Andreas Biebricher für seine Unterstützung bei Messungen mit dem Kraftmikroskop,

Thomas Bohm und Nurit Ditzian für viele hilfreiche und stimulierende Diskussionen und für die Unterstützung linguistischer und formatierungstechnischer Fragen,

Johann v. Saldern, Dr. Andreas Schulz für den Support bei Netzwerkproblemen,

Hannes Barsch, Dr. Chris Bieler, Dr. Kyung-Tae Han, Mike Heilemann, Thomas Heinlein,
Dr. Hannes Neuweiler, Christian Roth und John Wallis für ihre freundliche Zusammenarbeit,

Gerhard Schodt und Uwe Branczyk für ihre Unterstützung bei elektronischen Problemen,

Meister Werner Weis und seinen Mitarbeitern aus der Feinmechanikwerkstatt für die
Konstruktion verschiedenster Bauteile,

Herrn Hans Wolfbeisz für die Unterstützung bei glastechnischen Problemen und

Dr. Markus Sauer, Thomas Bohm, Dr. Nicole Marmé, Oliver Piestert für das Korrekturlesen
der Arbeit.

Schließlich danke ich meiner Familie. Meinen Eltern danke ich dafür, dass sie mir das
Studium ermöglicht haben.

Meiner Frau You-Hyun und meinen beiden Kindern Chan-U und Youbin danke ich für ihren
liebvollen Rückhalt.

„Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unerlaubte Hilfe durchgeführt habe.“

Heidelberg, April 2003

Chong-Woo Park