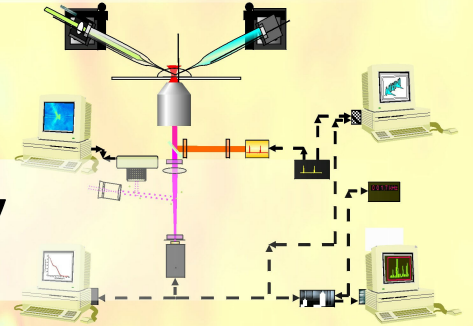
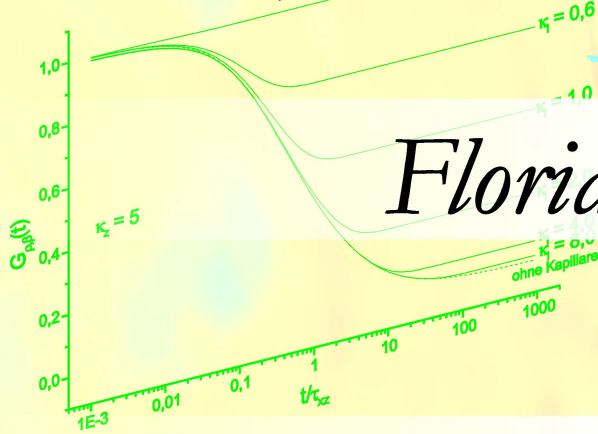


$$G_{\mu,\nu}(t) = \frac{\sum_{\alpha=1}^{\infty} \exp\left(-\frac{D\tau}{L^2} k_{0,\alpha}^2\right) R_{0,\alpha}^2 + 2 \sum_{\alpha=1}^{\infty} \sum_{\beta=1}^{\infty} \exp\left(-\frac{D\tau}{L^2} k_{2\alpha,\beta}^2\right) R_{2\alpha,\beta}^2}{\sum_{\alpha=1}^{\infty} R_{0,\alpha}^2 + 2 \sum_{\alpha=1}^{\infty} \sum_{\beta=1}^{\infty} R_{2\alpha,\beta}^2}$$

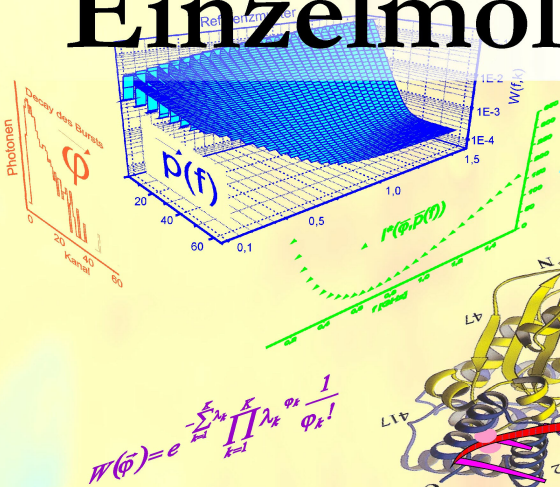
$$R_{2\alpha,\beta} = (-1)^{\beta-1} \frac{\int_0^1 \exp\left[-L^2 \rho^2 \left(\frac{1}{\omega_x^2} + \frac{1}{\omega_y^2}\right)\right] J_{2\alpha}(k_{2\alpha,\beta} \rho) J_{\beta}\left(L \rho \sqrt{\frac{1}{\omega_x^2} + \frac{1}{\omega_y^2}}\right) \rho^3 d\rho}{\sqrt{1 - \frac{4\eta^2}{k_{2\alpha,\beta}^2}} J_{2\alpha}(k_{2\alpha,\beta})}$$

Dissertation

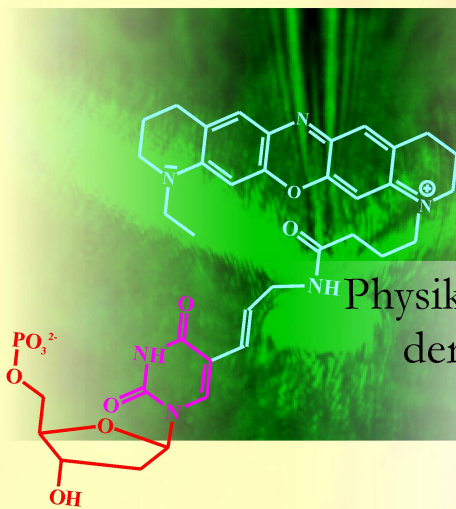
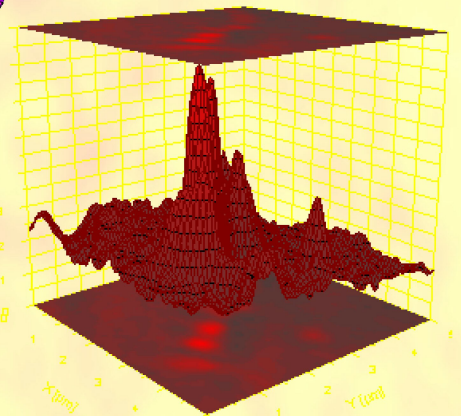
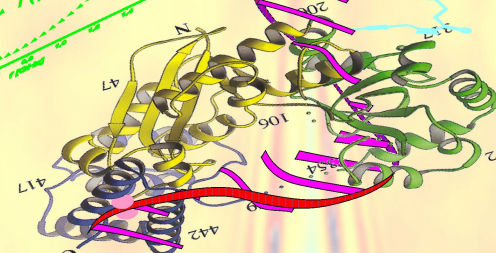
Florian Göbel



DNS-Sequenzierung durch Einzelmolekülhydrolyse

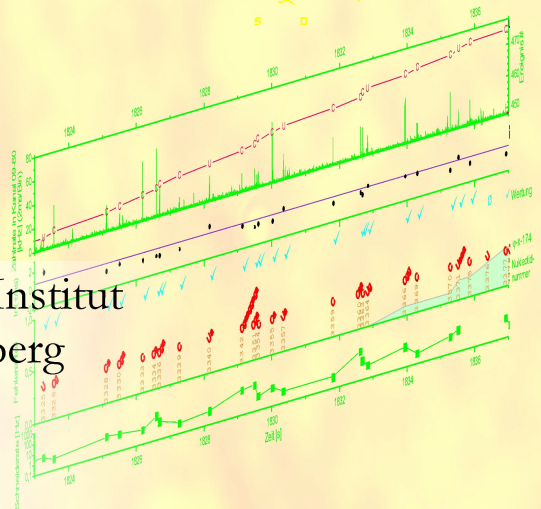


$$W(\vec{\phi}) = e^{-\sum_{k=1}^K \lambda_k \phi_k} \prod_{k=1}^K \frac{1}{\phi_k!}$$



Physikalisch-Chemisches Institut
der Universität Heidelberg
A.K. Wolfrum

2005



Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der Ruprecht-Karls-Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Chemiker Florian Göbel

aus Jugenheim (Bergstraße)

Tag der mündlichen Prüfung: 15.04.2005

DNS-Sequenzierung durch Einzelmolekülhydrolyse

Gutachter: Prof. Dr. Jürgen Wolfrum
Prof. Dr. Markus Sauer

Ich erkläre hiermit an Eides statt, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel durchgeführt habe.

Heidelberg im Dezember 2004

Für Virág.

Kurzzusammenfassung

Das Ziel der Einzelmolekülexperimente in dieser Arbeit ist, Lösungen auf dem Weg zu einer Einzelmolekül-DNS-Sequenzierung zu finden.

Zunächst wird die Frage nach der Ausdehnung des Detektionsvolumens in Relation zur Kapillare mit Hilfe der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie beantwortet. Dazu wird eine Theorie der FCS mit einem ellipsoid-gaussförmigen Detektionsvolumen unter der Randbedingung zylindrischer, undurchdringbarer Wände abgeleitet. Die entwickelte Modellfunktion wird gemessenen Korrelationskurven angepaßt. Das Ergebnis ist, daß die Detektionsempfindlichkeit am oberen und unteren Kapillarrand auf etwa 68 %, an den seitlichen Kapillarrändern auf 19 % des Maximalwertes abgefallen ist.

Bei den eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffen Cy5 und Mr121 ist es mit der entwickelten Ereigniserkennungssoftware demnach möglich, mehr als 99 % der aus der Kapillare austretenden Moleküle zu erfassen. Dank des niedrigen Untergrundsignals und der Rauschunterdrückung durch geeignete Filter ist die Zählrate falsch-positiver Ereignisse mit $7,9 \times 10^{-19}$ Hz vernachlässigbar.

Es wurde ein Verfahren zur elektrophoretischen Selektion einzelner DNS-Stränge erprobt.

Die Sequenziersuche an Modelloligonucleotiden, statistisch markierten PCR-Produkten und an zwei Basen vollständig markierter DNS ergab mittlere Schneideraten von E. coli-Exonuclease I am Einzelmolekül von 280 Hz bei 3,6 % Markierungsdichte und 3 Hz bei 50 % Markierungsdichte. Es konnte auf einem 99,75 %-Signifikanzniveau nachgewiesen werden, daß die gemessene Sequenz Information aus der abgebauten Sequenz enthält, die erreichte Leselänge betrug 31 Basen.

In der vorliegenden Arbeit konnten wichtige Ergebnisse auf dem Weg zur Einzelmolekülsequenzierung erzielt werden, die Steigerung der Leselänge bleibt aber ein wichtiger Bestandteil zukünftiger Forschung.

Abstract

The aim of the single-molecule experiments described in this thesis is to develop techniques which enable single-molecule-DNA-sequencing.

The first task accomplished was to compare the dimensions of the detection volume with those of the capillary. A theory of fluorescence correlation spectroscopy (FCS) in microcapillaries intersected by a gaussian detection volume has been derived. Fitting the model function to measured FCS-curves revealed that the detection efficiency has decreased to 68 % at the vertical and to 19 % at the horizontal fringes of the capillary.

It is possible to detect more than 99 % of the dyes (Mr121 and Cy5) leaving the capillary. As the background signal is low, the count rate of false positive events ($4,1 \times 10^{-12}$ Hz) is negligible.

A method for electrophoretic single molecule handling has been demonstrated.

Single molecule sequencing experiments with model-oligonucleotides, statistically labeled PCR-Products and completely labeled (at C and U) DNA showed cleavage rates of E. Coli Exonuclease I of 280 Hz at 3,6 % label-density and 3 Hz at 50 % label-density. It has been shown with 99,75 % significance, that the measured sequence contains information of the sequence of the degraded DNA. The reading length achieved was 31 bases.

Important advances towards single molecule DNA sequencing were achieved in the thesis presented. Improving the reading length remains an important task to future research.

Zusammenfassung

Die Einzelmolekül-DNS-Sequenzierung stellt eine der zuerst vorgeschlagenen und zugleich anspruchsvollsten Anwendungen der Einzelmolekülspektroskopie dar. Die Schwierigkeit besteht zum einen darin, einen vollständig markierten DNS-Strang zu synthetisieren, zum anderen in der gezielten Selektion eines Einzelstranges und dem 100%-igen Nachweis jedes abgespaltenen Mononucleotids und dessen fehlerfreier Identifizierung.

Ziel dieser Arbeit ist es, Methoden zur Lösung der Probleme auf der Detektionsseite zu finden. Um alle freigesetzten Moleküle nachweisen zu können, müssen die Teilchen auf eine Strömung durch das Detektionsvolumen gezwungen werden. Hierzu wurden kommerziell erhältliche Mikrokapillaren, die sich auf eine Auslaßöffnung von $L = 0,25 \mu\text{m}$ Radius verjüngen, sogenannte „Femtotips“, verwendet. Da die Mononucleotide negativ geladen sind, wird das Kapillarinere mit einer Kathode versehen und die freigesetzten Moleküle elektrophoretisch zur im Außenraum befindlichen Anode gezogen. Der Durchmesser des Volumens, aus dem Fluoreszenzlicht gesammelt wird, ergibt sich aus dem Durchmesser der Lochblende vor dem Detektor und der Vergrößerung des Objektivs zu etwa $1 \mu\text{m}$. Das Anregungsvolumen des Lasers ist bei der hier verwendeten Apparatur theoretisch kaum zu ermitteln, weil ein Diodenlaser benutzt wurde. Im Gegensatz zu Gaslasern schwingt dieser nicht im wohldefinierten TEM_{00} -Mode mit radial-Gauß-förmigen Strahlprofil, sondern zeigt ein elliptisches Strahlprofil mit komplizierter Intensitätsverteilung. Durch Auswertung der Korrelationsfunktion bei freier Diffusion erhält man bei Annahme eines Gauß-förmig-ellipsoiden Detektionsvolumens $1/e^2$ -Achsenabschnitte von $\omega_x \approx 0,3 \mu\text{m}$; $\omega_y \approx 0,8 \mu\text{m}$ und $\omega_z \approx 1,6 \mu\text{m}$. Wenn das Detektionsvolumen durch die Kapillare nicht verändert würde, müßte es demnach möglich sein, jedes austretende Molekül zu detektieren.

Eine genauere Analyse zeigte jedoch, daß die Gaußsche Näherung für die Amplitude der Korrelationsfunktion zu kleine Werte ergibt.

Um zu verstehen, was sich durch die Brechung an der Kapillarwand ändert, wurden auch Korrelationsfunktionen in der Mikrokapillare gemessen. Zur Auswertung der Funktionen mußte die Fluoreszenzkorrelationsfunktion unter der Randbedingung von zylindrischen undurchdringbaren Wänden theoretisch abgeleitet werden. Die Analyse der gemessenen Funktion mit der entwickelten Theorie ergab an der Sequenzierapparatur mit einem Kapillarparameter $\kappa_1 = L / \sqrt{\omega_x \omega_z} \approx 0,4$ und einer Elliptizität $\kappa_2 = \omega_z / \omega_x \approx 4,3$ als $1/e^2$ -Achsenabschnitte quer zur Kapillarachse das 1,2-fache und das 5,2-fache des Kapillarradius. Demnach ist die Detektionseffizienz am seitlichen Rand der Kapillare auf etwa 19 % des Maximalwertes abgefallen, am oberen bzw. unteren Kapillarrand auf 68 %. Daraus ergibt sich, daß bei optimal justierter Apparatur mehr als 99 % der austretenden Moleküle erfaßt werden können. Die Zählrate an falsch-positiven Ereignissen ist mit $7,9 \times 10^{-19}$ Hz zu vernachlässigen (Kapitel 4.3.5).

Die DNS muß in der Kapillare fixiert werden, damit sie nicht durch das elektrische Feld nach außen gezogen wird. Dies geschieht durch Bindung des am 5'-Ende der DNS gebundenen Biotins an eine streptavidinierte Glasfaser. Um die Oberfläche und die Bindung der DNS an diese zu untersuchen, wurde ein optisches Nahfeldmikroskop (Kapitel 4.7) so umgebaut, daß damit die Beobachtung einzelner Moleküle gelang.

Durch Auswertung von Ereignisabstandsverteilungen (Kapitel 4.4) wurde deutlich, daß sich das höher geladene Cy5-dCMP³⁻ erwartungsgemäß etwa 3× so schnell im elektrischen Feld bewegt wie Mr121-dUMP¹⁻.

Diese Erkenntnis erforderte, den Abstand zwischen der Reaktions- und der Detektions- Zone bei der Einzelmolekülsequenzierung zu verkürzen. Dies gelang durch die Verwendung speziell geätzter streptavidinierter Faserspitzen. Mit dem in dieser Arbeit entwickelten Ätzverfahren wurden Spitzen hergestellt, die man aus der 500 nm weiten Auslaßöffnung des Femtotips heraus schieben kann (Abbildung 4.6.6-3).

In der dünnen Spitze des Femtotips ist es nicht möglich, die Reaktion durch Zugabe (aktiver) Exonuclease I zu starten. Deshalb wurde ein neues Verfahren erprobt, bei dem die Exonuclease von Anfang an im Sequenzierpuffer vorhanden ist, jedoch durch EDTA inhibiert wird. Der Reaktionsstart erfolgt durch Zugabe eines großen Überschusses Magnesiumacetat in den Kapillaraußenraum. Die positiv geladenen Mg⁺⁺-Ionen werden elektrophoretisch ins Innere der Kapillare gezogen und aktivieren dort das Enzym.

Die Selektion der DNS geschah zu Beginn der Experimente statistisch durch Eintauchen der streptavidinierten Faserspitze in eine hochverdünnte Lösung der DNS. Da es bei dieser Methode nur mit viel Glück gelingt, einen einzelnen Strang zu binden, wurden im Verlauf der Arbeit Methoden erprobt, die eine bessere Kontrolle über die Menge der gebundenen DNS ermöglichen sollen.

Dazu wurde zunächst versucht, die Faser in das Nahfeldmikroskop einzubauen und die Bindung der DNS über eine Änderung der Scherkraft an der schwingenden Spitze zu beobachten. Diese „Angelversuche“ müssen jedoch leider als gescheitert betrachtet werden, da das Signal für eine Auswertung viel zu verrauscht ist und die durch das Binden der DNS auftretenden Kräfte wohl sehr klein sind.

In mehreren Versuchsreihen mit farbstoffmarkierten Mononucleotiden (Kapitel 4.5) wurde gezeigt, daß es möglich ist, Farbstoffionen aus einer mit Farbstoff gefüllten zweiten Mikrokapillare in eine mit reinem Puffer gefüllte Kapillare zu ziehen, und diese durch Anlegen einer Gegenspannung anschließend wieder zu entfernen. Die Selektion der DNS sollte damit kontrollierbar werden: In die Mikrokapillare wird eine unbeladene streptavidinierte Glasfaser eingeführt. Anschließend wird die DNS aus einer zweiten Kapillare durch die Kapillaröffnung eingesaugt. Die Anzahl der eintretenden Moleküle wird dabei in Echtzeit an einer MCS-Karte beobachtet. Nicht gebundene DNS wird durch Umpolen anschließend wieder entfernt und die Zahl der austretenden Moleküle beobachtet. Die Zahl der gebundenen DNS-Stränge ergibt sich dann als Differenz.

Die Einzelmolekül-Sequenzierungsversuche (Kapitel 4.6) an Modelloligonucleotiden, statistisch markierten PCR-Produkten und an vollständig markierter DNS (vollständiger Austausch von C gegen Cy5-C und von T gegen Mr121-U) ergaben prozessive Schneideraten von *E. Coli* – Exonuclease I an farbstoffmarkierter, einzelsträngiger DNS von ca. 3 Hz bei 50% Markierungsdichte und ca. 280 Hz bei 3,6 % Markierungsdichte. In der Literatur wurden 275 Hz an unmarkierter DNS und 44 Hz bei 25 % Markierungsdichte angegeben.

Die Analyse der Stufen, die bei den Experimenten mit den PCR-Produkten auftreten, deutet darauf hin, daß Exonuclease I auch an markierter DNS prozessiv arbeitet, jedoch immer wieder „Pausen“ einlegt.

Die Analyse der gemessenen Sequenzen von Cs und Us ergab bei den Modelloligonucleotiden drei „Treffer“ mit der erwarteten Sequenz. Diese sind wegen der zu kurzen Sequenzlänge von nur 12 Basen jedoch statistisch wenig signifikant. Bei der

vollständig markierten DNS ergab sich ein statistisch signifikanter „Treffer“ (0,25 % Wahrscheinlichkeit, daß dieser „Treffer“ Zufall war) von 31 markierten Basen Länge.

Die gemessenen Schneiderate von 3 Hz entspricht bei 50 % Markierungsdichte 1,5 Hz Ereignisfrequenz. Die Untergrund-Ereignisfrequenz beträgt etwa 0,3 Hz, wenn die Faser eingebaut ist. Daraus ergibt sich in der Sequenz ein Untergrundanteil von 17 %.

Da auch Moleküle, die das Detektionsvolumen nicht zentral passieren, detektiert und klassifiziert werden müssen, hat sich das bislang in der Arbeitsgruppe verwendete Programm als nicht ausreichend erwiesen. Deshalb wurde umfangreiche Software zur Fluoreszenzereigniserkennung und –klassifizierung neu geschrieben. Mit dieser Software ist durch die Möglichkeit, nur bestimmte Kanäle zur Ereigniserkennung heranzuziehen („gating“) und die gewonnenen Spuren durch Glättfilter von Rauschen zu befreien, die Fluoreszenzereigniserkennung verbessert worden. Die Randdurchtritte ergeben Ereignisse mit nur wenigen (ca. 20-30) Photonen. Da auch diese möglichst fehlerfrei klassifiziert werden müssen, ist es nicht vertretbar, bei der Abklingdauerbestimmung etwa 30% der Fluoreszenzphotonen zu verwerfen, weil diese mit dem Laserpuls zusammenfallen. Um auch diese Photonen zu nutzen, wurde es notwendig, sowohl die Faltung des Laserpulses mit der Fluoreszenzabklingkurve als auch den Untergrundanteil zu berücksichtigen. Damit ist es gleichzeitig gelungen, den „kosmetischen“ Fehler, daß durch den vernachlässigten Untergrund die Fluoreszenzabklingdauern bei Einzelmolekülexperimenten im Mittel um etwa 0,05 ns – 0,1 ns zu lang waren, zu beheben. Mit der verbesserten Software gelang es, die Ereignisklassifizierung soweit zu verbessern, daß die Fehlerwahrscheinlichkeit (über alle Ereignisse) bei etwa 14 % liegt. Dieser Wert scheint im Vergleich mit Literaturangaben hoch zu sein. Dabei muß jedoch beachtet werden, daß dort nur Ereignisse mit ausreichender Photonenzahl histogrammiert und der Rest verworfen wurde, während hier alle Ereignisse klassifiziert werden.

Die Gesamtfehlerwahrscheinlichkeit ergibt sich bei 14 % Verwechslungen und 17 % Untergrundanteil zu 28,6 %; die Wahrscheinlichkeit, eine abgebaute Sequenz der Länge L auch tatsächlich in der Auswertung wiederzufinden, beträgt demnach $0,714^L$, während die Wahrscheinlichkeit, die Sequenz zufällig zu finden, bei $0,5^L$ liegt. Um mit Hilfe der Einzelmolekülsequenzierung eine unbekannt Sequenz aufzuklären, muß in Zukunft offensichtlich sowohl der Untergrundanteil als auch die Fehlklassifizierungswahrscheinlichkeit gesenkt werden.

Inhalt

1. Einleitung	001
2. Theoretische Grundlagen	003
2.1 Spektroskopische Grundlagen	
2.1.1 Absorption und Emission von Farbstoffen	
2.1.2 Fluoreszenzanisotropie	
2.1.3 Fluoreszenzlebensdauer und –quantenausbeute	
2.1.4 Fluoreszenzsättigung und Photozerstörung	
2.2 Biologische Grundlagen	018
2.2.1 Lebensformen	
2.2.2 Struktur des Erbguts	
2.2.3 DNS verarbeitende Enzyme	
2.2.4 Darstellung von DNS	
2.2.5 Sequenzanalyse	
2.3 Detektionsvolumen	033
2.3.1 Anregungsprofil des Lasers	
2.3.2 Sammeleffizienzfunktion des Mikroskopsystems	
2.3.3 Detektionsempfindlichkeit	
2.4 Diffusion	044
2.4.1 Phänomänologische Beschreibung	
2.4.2 Irrfahrtsprozess als statistisches Modell	
2.4.3 Anwendungen	
2.5 Elektrophorese und Elektroosmose	060
2.6 FCS	063
2.6.1 FCS im Tropfen (diffusiv)	
2.6.2 FCS in Strömungssystemen	
2.6.3 Photochemische Prozesse	
2.6.4 Untergrund	
2.6.5 Korrelationsfunktionen von Mischungen	
2.7 Zufallszahlen	088
2.7.1 Zufallszahlengeneratoren	
2.7.2 Verteilungsfunktionen	
2.7.3 Exponentiell verteilte Zufallszahlen	
2.7.4 Lorentzverteilte Zufallszahlen	
2.7.5 Normalverteilte Zufallszahlen	

2.8 Zeitkorreliertes Einzelphotonenzählen (TCSPC)	092
2.8.1 TTTR	
2.8.2 Histogrammmethode	
2.9 Fluoreszenzereignisse	095
2.9.1 Einzelmolekülexperimente	
2.9.2 Schwellen	
2.9.3 Gating und Glätten	
2.10 Mustererkennung	099
2.10.1 Verteilungsfunktion der Zählrate in einem Einzelkanal.	
2.10.2 Verteilungsfunktion für die Zählraten in K Kanälen, Likelihood	
2.10.3 Kullback-Leibler-Diskriminierungsinformation	
2.10.4 Unterscheidung von Molekülen	
2.10.5 Muster 1: Anregung von monoexponentiell abklingender Fluoreszenz durch einen Deltapuls bei vernachlässigbarem Untergrund	
2.10.6 Muster 2: Berücksichtigung von Untergrundlicht	
2.10.7 Muster 3: Faltung des Fluoreszenzzerfalls mit dem Laserpuls unter Berücksichtigung von Untergrund- und Streulicht	
2.10.8 Parameterschätzung, MLE	
2.10.9 Cramérsche Ungleichung	
2.11 Elektrodynamik und Optik	124
2.11.1 elektrische und magnetische Felder	
2.11.2 elektromagnetische Wellen	
2.11.3 Ausstrahlung elektromagnetischer Wellen: Nahfeld und Fernfeld	
2.11.4 Lichtwellenleiter	
2.11.5 Nahfeld-Spitzen	
2.11.6 Mikroskope und Auflösungsvermögen	
3. Material und Methoden	145
3.1 Sequenzierapparatur	145
3.1.1 Komponenten	
3.2 Nahfeldmikroskop	147
3.2.1 Komponenten	
3.2.2 Nahfeld-Spitzen	
3.3 Fluoreszenzfarbstoffe	152
3.4 Lösungsmittel und Chemikalien	154
3.4.1 Femto-Puffer	
3.4.2 Sequenzierpuffer	
3.5 Sequenzierspitzen	159
3.6 Standardgeräte und Standardsoftware	161
3.7. Software des Arbeitskreises und. selbst geschriebene Software	162
3.7.1 Software des Arbeitskreises	
3.7.2 selbst geschriebene Programme	

4. Experimente, Ergebnisse und Diskussion	168
4.1. Abschätzung des Feldverlaufs im Femtotip	168
4.2. FCS in Mikrokapillaren	174
4.2.1 Allgemeiner Lösungsansatz	
4.2.2 Ellipsoid-Gauß-förmiges Detektionsvolumen	
4.2.3 Abhängigkeit der Teilfunktionen von den Parametern	
4.2.4 Analytische Näherungsfunktion	
4.2.5 Experiment	
Filter	
MR121	
Cy5	
4.2.6 Diskussion	
4.3. Fluoreszenzereigniserkennung	258
4.3.1 Gate	
4.3.2 Glätten	
4.3.3 Schwellen	
4.3.4 Ereignisparametrisierung	
4.3.5 Erfassungswahrscheinlichkeit	
4.4. Verteilungsfunktionen der Fluoreszenzparameter	275
4.4.1 Ereignisabstand	
4.4.2 Ereignisbreite	
4.4.3 Gesamtphotonenzahl	
4.4.4 Maximalfrequenz	
4.4.5 Schiefe	
4.4.6 Fluoreszenzabklingdauer	
4.5. Elektrophoretische Handhabung von Einzelmolekülen	293
4.5.1 Symmetrieparametrisierung durch Kreuzkorrelation	
4.5.2 Cy5-dCTP	
4.5.3 MR121-dUTP	
4.5.4 JA133-dCTP	
4.5.5 JA242-ddATP	
4.5.6 Cy5-dCTP+MR121-dUTP	
4.5.7 PCR-Mischung	
4.5.8 Diskussion	
4.6 Einzelmolekülsequenzierung	373
4.6.1 Techniken	
4.6.2 Versuch mit Modell-DNS:	
4.6.3 Versuche mit statistisch markierten PCR-Produkten	
4.6.4 Versuch mit vollständig markierter- ϕ x174-DNS	
4.7 Experimente am Nahfeldmikroskop	450
4.7.1 Umbau der Apparatur	
4.7.2 Entwicklung des Integrators und Kalibrierung der Optik	

4.7.3 Kalibrierung des Scanners	
4.7.4 Auflösungsvermögen	
4.7.5 Einzelmolekülaufnahmen von JF9A	
5. Ausblick	466
6. Literatur	467
7. Liste der Veröffentlichungen und Präsentationen	486

1. Einleitung

Das Ziel des 1990 begonnenen Humangenomprojektes war, eine Referenzsequenz des menschlichen Erbguts zu finden. Dadurch hofft man:

- 1.) Die individuelle Disposition für bestimmte Erbkrankheiten besser einschätzen und durch Prophylaxe deren Ausbruch hinauszögern bzw. deren Verlauf abmildern zu können.
- 2.) Ansatzpunkte („Targets“) für neue Medikamente zu finden.
- 3.) Die Nebenwirkungen und die Wirksamkeit von Medikamenten am individuellen Patienten besser einschätzen zu können.
- 4.) Die Ursachen bestimmter Erkrankungen aufzuklären.
- 5.) Durch die Reparatur defekter Gene Krankheiten heilen zu können.

Das menschliche Genom besteht aus 2×23 einzelnen DNS-Molekülen, den Chromosomen. Die Information in der DNS ist durch die Abfolge (Sequenz) der vier Nucleotide Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin gespeichert. Die Größe der Chromosomen unterscheidet sich: das kleinste (Chromosom 20) enthält 50×10^6 Basenpaare, das größte (Chromosom 1) enthält 263×10^6 Basenpaare. Das gesamte Genom besteht aus $2,85 \times 10^9$ Basenpaaren [IHGSC 2004]. Jedes Chromosom enthält viele Gene.

Ein Gen [übersetzt aus Kahl 1995] ist die fundamentale physikalische und funktionelle Einheit der Vererbung, die Information von einer Generation an die nächste weitergibt. Ein Gen ist eine spezifische Sequenz von Nucleotiden in der DNS (in bestimmten Viren auch in der RNS), welche die Nucleotidsequenz von Transfer-RNS, Ribosomaler-RNS oder die Aminosäuresequenz eines Proteins enthält. Jedes Gen besetzt eine spezifische Stelle (Locus) auf dem Chromosom. Wenn es exprimiert wird, hat es eine oder auch mehrere spezifische Auswirkungen auf den Phänotyp des Organismus.

Im Jahr 2001 wurde ein Sequenz – „Entwurf“ (draft sequence) des menschlichen Genoms vorgestellt [Lander 2001], [Venter 2001]. Seit September 2004 [IHGSC 2004] ist auch die Sequenz des letzten Chromosoms (Chromosom 5) bekannt.

Das Problem bei der ermittelten Sequenz ist, daß sie nicht vollständig, sondern nur zu 99 % bekannt und mit einer Fehlerrate von 10^{-5} behaftet ist. Diese Probleme rühren von der verwendeten „Schrotflinten“-Sequenzierung her, die bei hochrepetitiven Sequenzen versagt [She 2004].

Mit Abschluß des Humangenomprojektes ist das Genom von fünf Menschen entschlüsselt worden. Dabei zeigte sich, daß

- 1.) sich das Erbgut unterschiedlicher Menschen in nur 0,1 % der Basen unterscheidet.
- 2.) die Unterschiede oft nur im Austausch einer einzelnen Base bestehen.
- 3.) die Zahl der Gene mit 20000-25000 viel kleiner ist, als ursprünglich angenommen.
- 4.) 50 % des menschlichen Erbguts aus hochrepetitiven Sequenzen besteht
- 5.) Weniger als 2 % des Erbguts in Genen enthalten ist.

Die heute verwendeten Methoden zur Genomanalyse beruhen alle auf der Kettenabbruchreaktion nach Sanger. Man erhält ein Gemisch unterschiedlich langer DNS-Fragmente, von denen die Startsequenz und das letzte eingebaute Nucleotid, der Terminator, bekannt ist. Die Fragmente werden der Größe nach aufgetrennt. Dabei stellt man fest, daß sich Fragmente die länger als typischerweise 600 Basen sind, nicht trennen lassen. Das heißt, die Leselänge der Sangersequenzierung umfaßt nur etwa 4×10^{-6} der durchschnittlichen Chromosomenlänge. Bei der Schrotflintenanalyse umgeht man das Problem dadurch, daß man riesige Bibliotheken mit Zufallsbruchstücken erstellt, die die Sequenz etwa $10\times$ enthalten. Die Gesamtsequenz wird dadurch erhalten, daß man die Bruchstücke durch Überlappung aneinander fügt. Dabei werden jedoch Gene, die von langen, sich wiederholenden Sequenzen umgeben sind, nicht erfaßt [She 2004].

Das andere Verfahren besteht in der Aufspaltung der DNS mittels Restriktionsendonucleasen und anschließender Klonierung der Bruchstücke in Bakterien. Dieses Verfahren ergibt längere Sequenzen, ist jedoch sehr teuer und langsam.

Die heutigen Verfahren sind für vergleichende Genomstudien einer großen Anzahl von Menschen oder gar für den klinischen Routineeinsatz daher völlig ungeeignet.

Abgesehen davon reichen 99% des Genoms nicht aus, um alle fehlerhaften Gene zu erfassen, wenn man sich vor Augen hält, daß der Mensch und der Schimpanse auch 99 % übereinstimmende Gene haben.

Mit der Einzelmolekül-DNS-Sequenzierung [Jett 1989] fällt das Hauptproblem der Sangersequenzierung, die unzureichende Leselänge, weg. Gelingt es, ein gesamtes Chromosom vollständig zu markieren, so könnte es mit der Einzelmolekülsequenzierung in einem Stück sequenziert werden. Legt man die Schneiderate von Exonucleasen an unmarkierter DNS von typischerweise 10^2 Hz zugrunde, so wäre ein komplettes Chromosom mit 10^8 Basen in nur 17 Tagen vollständig sequenziert.

2. Theoretischer Teil

2.1 Spektroskopische Grundlagen

2.1.1 Absorption und Emission von Farbstoffen

Absorption

Die Energie zwischen dem elektronischen Grundzustand S_0 und dem ersten elektronisch angeregten Zustand S_1 ist im allgemeinen so beträchtlich, daß sie thermisch nicht aufgebracht werden kann. Für eine Energiedifferenz von z.B. 2,2 eV (212,3 kJ/mol) - entsprechend etwa der Anregungsenergie eines Rhodaminfarbstoffes - ergibt die Boltzmann-Formel für die Anzahl der Moleküle im Anregungszustand $N(S_1)$ bzw. im Grundzustand $N(S_0)$ bei Raumtemperatur ($R \times T \approx 2,5$ kJ/mol):

$$\frac{N(S_1)}{N(S_0)} = e^{-\frac{\Delta E}{RT}} \approx 1,3 \times 10^{-37} \quad (2.1.1-1)$$

Abgesehen von der thermischen Zersetzung würden sich selbst bei so extrem hohen Temperaturen wie z.B. 7000 K erst 2% der Moleküle im angeregten Zustand befinden. Im Gegensatz dazu sind Energiebeträge dieser Größenordnung leicht durch Einstrahlung von sichtbarem Licht ($\lambda = 400 - 800$ nm 1,5-3,0 eV) aufzubringen.

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

1. Die Energie des Photons muß die Resonanzbedingung (2.1.1-2) erfüllen.

$$h\nu = \Delta E \quad (2.1.1-2)$$

2. Der Vektor der elektrischen Feldstärke der Erregerwelle muß einen zum elektrischen Übergangsdipolmoment parallel orientierten Anteil besitzen.

3. Der Übergang muß erlaubt sein, d.h. das Übergangsdipolmoment muß von Null verschieden sein.

Außer den Elektronenübergängen werden auch Schwingungen und Rotationen mit angeregt. Deshalb liegt vor allem bei größeren Molekülen eine Vielzahl von Übergängen eng beieinander.

Diese werden durch Wechselwirkungen mit dem Lösungsmittel verbreitert, so daß nur noch eine breite Absorptionsbande zu beobachten ist.

Ein Maß für die Wahrscheinlichkeit des Elektronenüberganges aus dem elektronischen Grundzustand in einen elektronisch angeregten Zustand liefert der integrale Absorptionskoeffizient A (Gleichung 2.1.1-3), wobei ϵ_ν der molare Extinktionskoeffizient bei der Frequenz ν ist. Mit Hilfe des experimentell zugänglichen integralen Absorptionskoeffizienten A läßt sich die dimensionslose Oszillatorstärke f (Gleichung 2.1.1-4) berechnen. Die Größenordnung der Oszillatorstärke für erlaubte Elektronenübergänge ist in den meisten Farbstoffmolekülen etwa 1.

$$A = \int_0^{\infty} \epsilon_\nu d\nu \quad (2.1.1-3)$$

$$f = \frac{4m_e c \epsilon_0}{N_A e^2} A \approx 1 \quad (2.1.1-4)$$

Bei isolierten Absorptionsbanden kann näherungsweise der integrale Absorptionskoeffizient A als Produkt von ϵ_ν und der Halbwertsbreite der Absorptionsbande $\Delta\nu_{1/2}$ abgeschätzt werden.

Die Oszillatorstärke (und damit der Extinktionskoeffizient) wird wesentlich durch das Übergangsdipolmoment bestimmt. Das Übergangsdipolmoment gibt die Änderung der Ladungsverteilung an, die mit dem Übergang des Elektrons vom Grundzustand in den angeregten Zustand während der Lichtabsorption verbunden ist. Nur Übergänge, bei denen sich die Ladungsverteilung im Molekül ändert, haben ein von Null verschiedenes Übergangsdipolmoment und somit eine gewisse Wahrscheinlichkeit. Das Übergangsdipolmoment $\vec{\mu}$ ist ein Vektor, der sich aus den Komponenten entlang der drei Koordinatenachsen zusammensetzt:

Ein elektronischer Übergang kann nur stattfinden, wenn mindestens eine Komponente des Übergangsmomentes entlang einer Koordinatenachse von Null verschieden ist. Das Verhältnis der drei Komponenten zueinander legt die Richtung fest, in der der Elektronenübergang im Molekül polarisiert ist (Polarisationsrichtung).

Struktur und Farbe

Die Frage nach dem Zusammenhang zwischen Struktur und Farbe reicht über 100 Jahre zurück, als O.N. Witt im Jahre 1876 seine Theorie chromophorer und auxochromer Gruppen vorstellte [Witt 1876]. 50 Jahre später entwickelte W. König das Konzept der Polymethinfarbstoffe [König 1926]. Hierbei wurde eine allgemeine Formel abgeleitet, die die Grundlage für eine Systematik in der Farbstoffchemie gab. Ein Meilenstein der weiteren Entwicklung war die in den dreißiger Jahren aufkommende Mesomerielehre, als E. Hückel das

Konzept der Linearkombination von Atomorbitalen ableitete und L. Pauling das VB-Modell einführte.

Mit dem Beginn der Anwendung der Quantenmechanik auf organische Moleküle wurde 1948 von H. Kuhn das Elektronengasmodell eingeführt [Kuhn 1948/1949]. Es gestattet sowohl die Berechnung der Absorptionswellenlänge als auch der Oszillatorstärke für Cyaninfarbstoffe bestimmter Kettenlänge. Eine Verfeinerung seiner Theorie des Elektronengases führte zur Hypothese einer Ladungsdichtealternanz an den Zentren einer Polymethinkette. Dies wurde Anfang der sechziger Jahre durch ^{13}C -NMR Messungen experimentell nachgewiesen. Die Lichtabsorption ungesättigter organischer Verbindungen wird im wesentlichen durch die Eigenschaften des dem Molekül zugrundeliegenden π -Elektronensystems bestimmt. Aromatische Moleküle mit $(4n+2)$ π -Elektronen und hoher Mesomerieenergie sind in der Regel farblos und als Farbstoffe ebenso ungeeignet wie Polyene. Polyene besitzen eine bestimmte Zahl n konjugierter Doppelbindungen und sind für $n > 6$ farbig, ihre langwelligste Absorptionsbande konvergiert jedoch für $n \rightarrow \infty$ gegen 500nm, was sie für den Einsatz mit Diodenlasern unbrauchbar macht. Desweiteren erscheint es sinnvoll, sich auf Moleküle mit planarem, möglichst starrem Molekülgerüst zu konzentrieren, da diese vergleichsweise einfache, überschaubare Zusammenhänge zwischen Struktur und strahlungsloser Desaktivierung erwarten lassen. In dieser Hinsicht sind Xanthen-, Oxazin- und Carbazinfarbstoffe besonders gut geeignet. Sie verfügen über eine hohe Mesomerieenergie, gleichartige π -Bindungsordnungen und eine alternierende Elektronendichteverteilung an den Zentren. Im Gegensatz zu den offenkettigen Cyaninfarbstoffen weist das Molekülskelett dieser Farbstoffe kaum Bindungen mit freier Drehbarkeit auf. Außerdem zeichnen sie sich durch hohe Extinktionskoeffizienten (ca. $10^5 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) bzw. hohe Oszillatorstärken aus.

Da der Absorptionsvorgang binnen ca. 10^{-15} s abgeschlossen ist, kann für eine theoretische Beschreibung das Franck - Condon - Prinzip (Prinzip der vertikalen Übergänge) zugrunde gelegt werden. Das Frank- Condon- Prinzip beruht auf der Überlegung, daß die schweren und trägen Kerne sich so langsam bewegen, daß sie ihre geometrische Anordnung während des Überganges praktisch nicht verändern. Da sich aber, wie in Abbildung 2.1.1-1 exemplarisch dargestellt, die Bindungsabstände, d.h. das Minimum auf der Potentialhyperfläche während des Überganges im allgemeinen ändert, liegt das Molekül nach dem Übergang in einem nicht nur elektronisch sondern auch schwingungsangeregten Zustand vor.

Die Potentialhyperflächen der Zustände können unter Annahme der Born-Oppenheimer-Näherung berechnet werden, die Gesamtwellenfunktion eines Systems als Produkt aus einer elektronischen und einer Kernwellenfunktion beschreibt. Eine dynamische Kopplung zwischen Kern- und Elektronenbewegung wird hierbei vernachlässigt. Diese Approximation ist insofern physikalisch gerechtfertigt, als sich die schnelle Elektronenbewegung in den meisten Fällen den vergleichsweise langsamen Gerüstschwingungen flexibel anpassen kann (adiabatische Näherung).

Unter Zugrundelegung des Frank- Condon- Prinzips lassen sich Auswahlregeln herleiten, mit denen man die Absorptionsspektren vieler Moleküle analysieren und verstehen kann. Voraussetzung hierfür ist die Verfügbarkeit quantenmechanischer Rechenmethoden, wie ab-

initio- oder semiempirischer Verfahren, die die Berechnung adiabatischer elektronischer Zustände erlauben. Bei den sogenannten verbotenen Übergängen, die im Rahmen der einfachen Auswahlregeln nicht erklärt werden können, müssen vibronische Kopplungen (d.h. Übergänge aus dem schwingungsangeregten elektronischen Grundzustand) mit berücksichtigt werden.

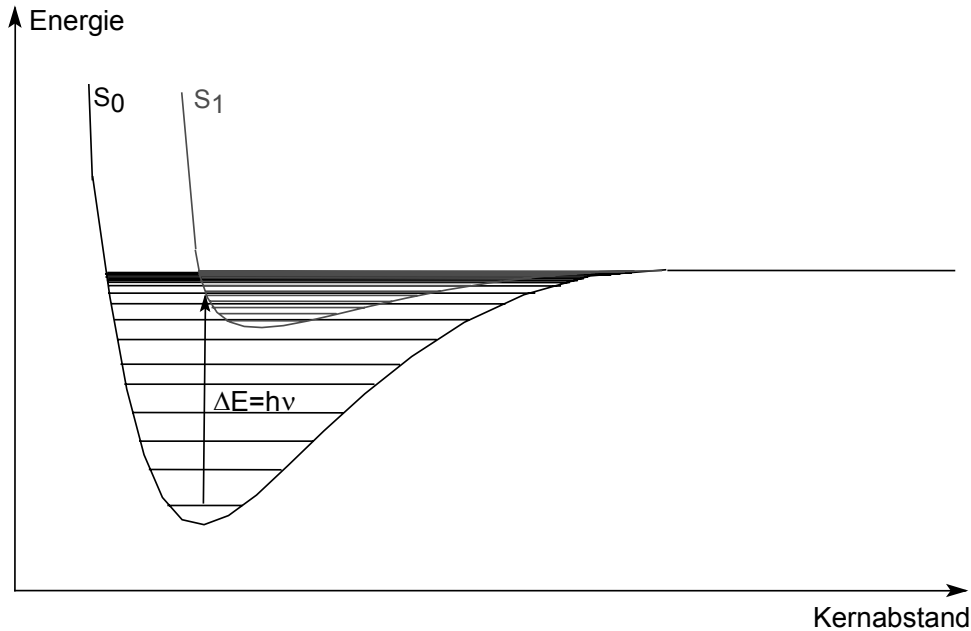


Abbildung 2.1.1-1 Franck-Condon-Prinzip am Beispiel eines zweiatomigen Moleküls

Emission

Im Folgenden wird anhand eines einfachen Energieniveauschemas dargestellt, welche Möglichkeiten einem vielatomigen Molekül offenstehen, nach Anregung in einen elektronisch angeregten Singulettzustand (S_n) in den elektronischen Grundzustand (S_0) zurückzukehren (Abbildung 2.1.1-2).

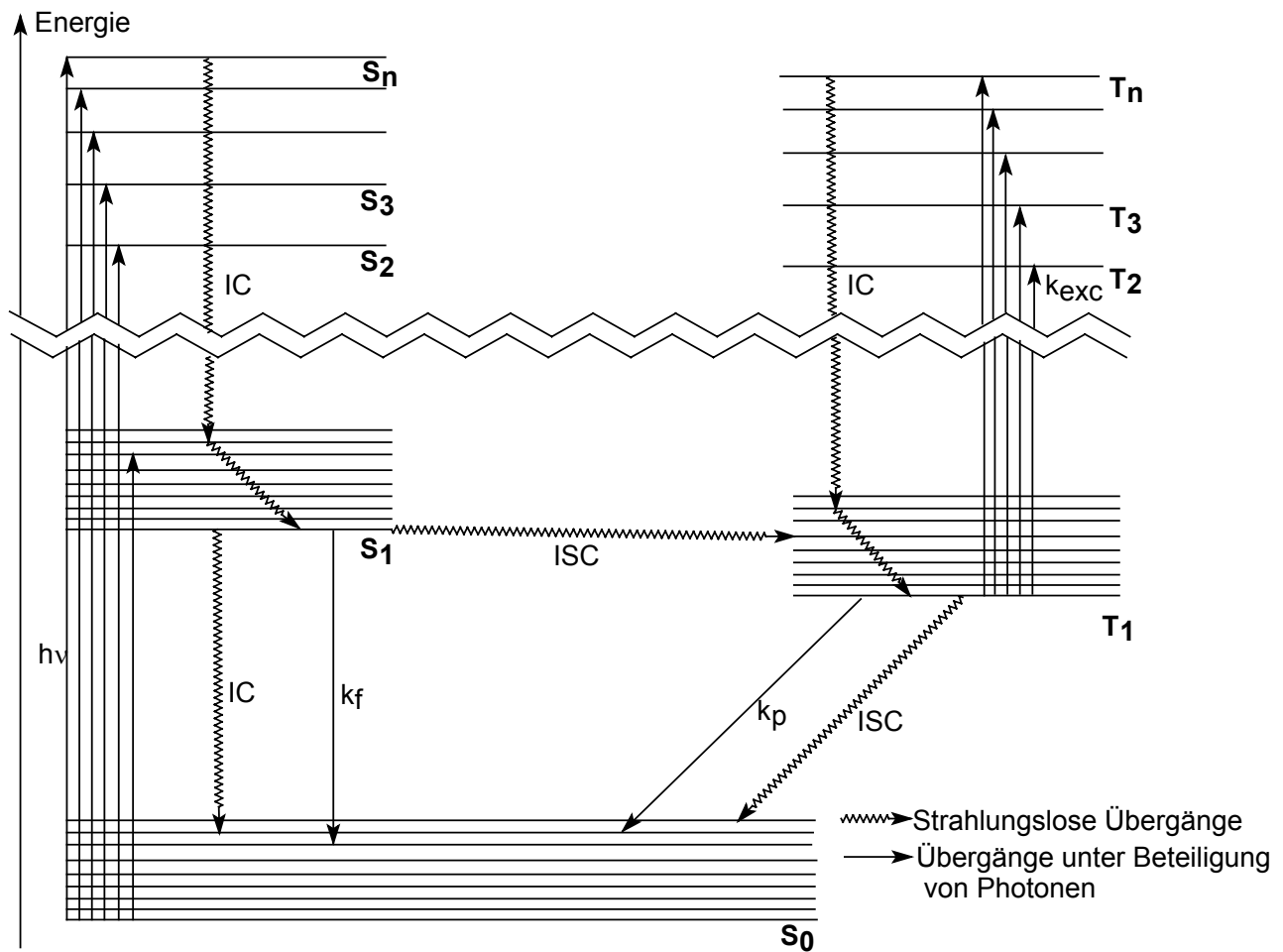


Abbildung 2.1.1-2 Vereinfachtes Energieniveauschema für organische Farbstoffmoleküle (IC: internal conversion (strahlungslose Desaktivierung); ISC: intersystem crossing (Änderung der Multiplizität); VR: vibrational relaxation (Schwingungsrelaxation); $h\nu$: elektronische Anregung, ca. 10^{15} s^{-1} ; k_f : Geschwindigkeitskonstante der Fluoreszenz, ca. 10^8 - 10^9 s^{-1} ; k_p : Geschwindigkeitskonstante der Phosphoreszenz, bis zu einigen s^{-1}).

Nach erfolgter Anregung mit Licht geeigneter Wellenlänge befindet sich ein Farbstoffmolekül in den meisten Fällen in höheren Schwingungsniveaus des ersten angeregten elektronischen Singulettzustandes S₁. Falls Photonen ausreichender Energie eingestrahlt werden, finden auch Anregungen in den S₂ und in höher gelegene Singulettzustände statt, die jedoch in Farbstofflösungen schnell ($k_{IC} = 10^{11} - 10^{13} \text{ s}^{-1}$) strahlungslos in den S₁-Zustand übergehen. Befindet sich ein Farbstoffmolekül in höheren Schwingungsniveaus von S₁, relaxiert es sehr schnell, d.h. in Zeiten < 1ps, in die Boltzmann-Verteilung der Schwingungszustände des S₁-Zustandes ($k_{VR} > 10^{12} \text{ s}^{-1}$). Die Energie wird hierbei durch Stöße an Nachbarmoleküle abgegeben. Im elektronisch angeregten Zustand gibt es neben chemischen Reaktionen verschiedene photophysikalische Wege für die Depopulation, die in Abbildung 2.1.1-3 zusammengefaßt sind.

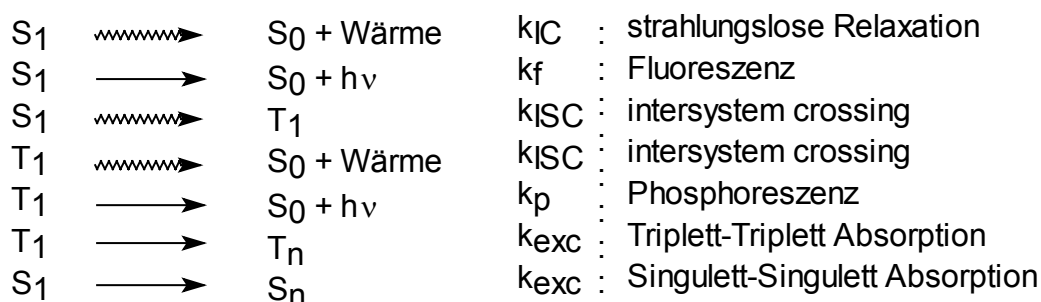


Abbildung 2.1.1-3 Übersicht über die Relaxationsprozesse eines Farbstoffmoleküls im elektronisch angeregten Zustand.

Strahlungslose Relaxation IC (internal conversion)

Die strahlungslose Desaktivierung bezeichnet den Übergang aus der Nullpunktsschwingung des S_1 in isoenergetische, hoch angeregte Rotationsschwingungsniveaus des elektronischen Grundzustandes. Die zugehörige Geschwindigkeitskonstante k_{IC} setzt sich im Allgemeinen aus mehreren Einzelbeiträgen zusammen.

Intersystem crossing ISC

Das „Intersystem Crossing“ bezeichnet den Übergang des Systems in einen Zustand anderer Spinmultiplizität. Da der zu einer Elektronenkonfiguration gehörende Triplettzustand nach den Hundschen Regeln unterhalb des entsprechenden Singulettzustands liegt, ist der Übergang $S_1 \rightarrow T_1$ energetisch immer möglich, allerdings ist er spinverboten. Aufgrund der Spin-Bahn-Kopplung gilt dieses Verbot jedoch nicht streng, in vielen Systemen erreicht die ISC-Rate die gleiche Größenordnung wie die Fluoreszenzrate k_f (10^{-8} - 10^{-9} s $^{-1}$). Der Übergang von T_1 nach S_0 kann strahlungslos oder unter Aussendung von Licht (Phosphoreszenz) mit der Phosphoreszenzrate k_p geschehen, wobei beide Prozesse wieder spinverboten sind.

Ein interessantes Beispiel für eine hohe Triplettausbeute ist Benzophenon, bei dem 100 % der angeregten Moleküle in den Triplettzustand übergehen [Moore 1961]. Die Geschwindigkeitskonstante k_{ISC} bzw. die Potentialdifferenz $S_1 - T_1$ kann stark durch das Lösungsmittel beeinflusst werden. Für den Farbstoff Carbostyryl-124 wurde in DMF eine Triplettquantenausbeute von 23% gegenüber 8% in Wasser gefunden [Seidel 1992].

Jeder Farbstoff zeigt ein spezifisches T_1 - T_n -Absorptionsspektrum [Labhart 1981], [Schäfer 1977], das sich in der Regel über einen großen Wellenlängenbereich erstreckt und in praktisch allen Fällen mehr oder weniger stark mit seiner Fluoreszenz überlappt. Einerseits kann durch diese Prozesse die Fluoreszenzintensität drastisch verringert werden, andererseits kann die Triplett-Triplett-Absorption zur irreversiblen Photozerstörung des Farbstoffmoleküls führen, da, wie ein Blick auf die Mechanismen der Photoreaktionen [Liphardt 1981, Liphardt 1982, Lamola 1969] zeigt, sehr viele Photozerstörungsreaktionen ihren Ausgang vom langlebigen Triplett-Niveau T_1 nehmen. Die T_1 - T_n -Absorption ist um so stärker,

(a) je mehr Moleküle von S_1 nach T_1 übergehen, d.h. je höher die ISC-Rate des $S_1 \rightarrow T_1$ - Überganges ist,

(b) je größer die Extinktionskoeffizienten $\epsilon_T(\nu)$ des T_1 - T_n -Absorptionsspektrums im Bereich des Fluoreszenzspektrums sind und

(c) je länger die Lebensdauer τ_T der Moleküle im T_1 -Niveau des Farbstoffes ist.

Um die Triplett-Triplett-Absorption zu unterbinden, muß verhindert werden, daß sich Farbstoffmoleküle im T_1 -Zustand befinden. Da man den Übergang von S_1 nach T_1 bei einem vorgegebenen Farbstoff in einem bestimmten Lösungsmittel nicht beeinflussen kann, muß das T_1 -Niveau schnell und effektiv entvölkert werden. Eine Möglichkeit der Triplettlöschung besteht darin, der Farbstofflösung sog. "Triplettlöscher" wie Cyclooctatetraen (COT) oder molekularen Sauerstoff zuzusetzen, die beide ein energetisch tief liegendes Triplett-niveau besitzen. Ihre Wirkungsweise liegt darin, daß durch intermolekularen Triplett-Triplett-Energietransfer (k_{ET}^T) vom Farbstoff auf den Triplettlöscher die nach T_1 übergegangenen Farbstoffmoleküle wieder in ihren Grundzustand S_0 überführt werden. Um eine wirksame Triplettlöschung zu erreichen, muß die Löschesubstanz in relativ hoher Konzentration (ca. 10^{-2} - 10^{-3} M) zugesetzt werden, weil nur so die für eine intermolekulare Triplett-Triplett-Übertragung erforderlichen kleinen Abstände häufig genug erreicht werden. Dies birgt jedoch die Gefahr, daß Löschmoleküle ihrerseits das Anregungs- oder Emissionslicht durch verschiedene Absorptionsvorgänge schwächen. In der Hauptsache ist hierbei an S_1 - S_n - und T_1 - T_n - Übergänge zu denken, die sich wegen der hohen Konzentration der Triplettlöscher schon bei sehr kleinen Extinktionskoeffizienten ϵ im Bereich der Farbstofffluoreszenz negativ auf dessen Fluoreszenzintensität auswirken.

Andererseits kann ein Triplettlöscher über eine kurze aliphatische Kette kovalent an den Farbstoff gekoppelt werden, wodurch ein intramolekularer Energietransfer vom Farbstoff zum Triplettlöscher resultiert [Liphardt 1982]. Als Triplettlöscher bieten sich hierbei verschiedene Stilben-, Naphtalin- oder Anthracenderivate mit tiefliegendem T_1 -Niveau an. Im intramolekularen Fall können bessere Löscheffizienzen erzielt werden, da hierbei jedem Farbstoffmolekül genau ein Löschmolekül zugeordnet ist, das zudem in einem für den $T \rightarrow T$ -Energietransfer notwendigen sehr geringen Abstand fixiert ist.

Stokes-Verschiebung und Lösungsmittelrelaxation

Betrachtet man die Fluoreszenz detaillierter, so wird deutlich, wie es zu den relativ breiten Fluoreszenzbanden organischer Farbstoffe kommt: Bedingt durch die große Anzahl von Atomen (ca. 50-100 Atome) im Farbstoffmolekül ist das Schwingungsspektrum entsprechend vielfältig. Nach der Anregung hat das Farbstoffmolekül demnach eine große Anzahl energetisch verschiedener Übergangsmöglichkeiten in den elektronischen Grundzustand. Nach dem bisher Beschriebenen würde man ein Fluoreszenzspektrum mit ausgeprägter, zum Teil überlappender Schwingungsstruktur erwarten. Die Farbstoffmoleküle sind von einer Solvathülle umgeben, die für jedes Molekül anders strukturiert ist und sich zeitlich für jedes einzelne Molekül ändert. Die damit verbundenen Wechselwirkungen zwischen Solvens- und Farbstoffmolekülen verbreitern die Schwingungsübergänge stark, und es kann zumindest bei Zimmertemperatur in Lösung kein

Linienspektrum beobachtet werden. Regt man dagegen Farbstoffe in festen Lösungen bei 4K an, so werden nur solche Moleküle angeregt, die die gleiche energetische Beeinflussung durch die Solvathülle erfahren. Da die Moleküle sich während der Anregung nicht mehr umorientieren können, emittieren sie ein Linienspektrum.

Die gesamte Verschiebung der Fluoreszenzemissionsbande gegenüber der Absorptionsbande aufgrund der strahlungslosen Relaxationsprozesse (VR im S_1) wird als Stokes-Verschiebung (Stokes-shift) bezeichnet.

Die langwelligste Absorption bei der Anregung bzw. die kurzwelligste Emission bei der Fluoreszenz entspricht dem 0,0-Übergang, d.h. dem Übergang zwischen den Schwingungsgrundzuständen der beiden elektronischen Zustände. Dieser Übergang sollte, wenn man Lösungsmiteleinflüsse außer Acht läßt, identisch mit dem in Gasphasenexperimenten beobachteten 0,0-Übergang sein.

Aufgrund der geänderten Elektronenverteilung im angeregten Zustand ergeben sich andere intramolekulare Bindungskräfte und ein geändertes Dipolmoment. Die Lösungsmoleküle stellen sich darauf in einer Picosekunden-Kinetik ein. Der elektronische Übergang findet jedoch auf einer Femtosekunden-Zeitskala statt, so daß das Molekül direkt nach der Anregung durch die Wechselwirkung mit dem Lösungsmittel nicht so stark stabilisiert wird wie das Molekül im Grundzustand. Daraus ergibt sich eine Blauverschiebung des Überganges. Das Molekül befindet sich typischerweise einige Nanosekunden im angeregten Zustand, bevor es unter Aussendung des Fluoreszenzlichtes in den elektronischen Grundzustand zurückkehrt. Während dieser Zeit stellen sich die Lösungsmittelmoleküle auf die geänderten Bedingungen ein. Der obigen Argumentation folgend, wird das Molekül direkt nach seiner Rückkehr in den Grundzustand nicht so gut durch das Lösungsmittel stabilisiert wie es vor der Anregung war. Daraus resultiert eine Rotverschiebung des Fluoreszenzlichtes gegenüber dem Übergang in der Gasphase. Dieser Effekt wird als Lösungsmittel-Stokes-Verschiebung bezeichnet [Lakowicz 1983].

Mit entsprechender Picosekunden-Zeitauflösung kann die Kinetik der dielektrischen Relaxation direkt an der zeitabhängigen Verschiebung der Fluoreszenz beobachtet werden [Maroncelli 1987/1989], [Jarzaba 1988], [Akesson 1991], [Jiang 1994]. Wird ein fluoreszierendes Molekül, das sich mit dem umgebenden Lösungsmittel im Gleichgewicht befindet, aus einem schwach polaren Grundzustand in einen stark polaren Zustand angeregt, dann stellt sich die elektronische Polarisierung des Lösungsmittels (Verschiebung der Elektronenwolke) instantan auf die neue Ladungsverteilung im Molekül ein. Dagegen ändert sich die Orientierungspolarisation bei der Anregung nicht und befindet sich daher nicht im Gleichgewicht mit dem angeregten Molekül. Das Lösungsmittel reagiert darauf durch dielektrische Relaxation, bis sich die dem angeregten Zustand entsprechende Gleichgewichtskonfiguration eingestellt hat. Bei der anschließenden Fluoreszenz bleibt die Orientierungspolarisation im Augenblick des quasi instantanen optischen Überganges wiederum erhalten. Das Fluoreszenzspektrum erfährt deshalb eine zeitabhängige Rotverschiebung, die man üblicherweise mit der Funktion $C(t)$ (Gleichung 2.1.1-5) ausdrückt.

$$C(t) = \frac{\nu(t) - \nu(\infty)}{\nu(0) - \nu(\infty)} \quad (2.1.1-5)$$

Dabei geben $\nu(0)$, $\nu(t)$ und $\nu(\infty)$ die Frequenz des Intensitätsmaximums unmittelbar nach der Anregung, zur Zeit t bzw. nach vollständiger Relaxation an. Derartige Untersuchungen haben gezeigt, daß die dielektrische Relaxation in den meisten gebräuchlichen Lösungsmitteln innerhalb von 10 ps und weniger abläuft.

Solvatochromie

Aufgrund der geänderten Eigenschaften der Farbstoffe im angeregten Zustand ergibt sich in Abhängigkeit von der Dipolmomentsänderung zwischen Grund- und angeregtem Zustand $\Delta\mu = \mu_e - \mu_g$ eine Verschiebung der Absorptions- und Emissionsbanden mit der Lösungsmittelpolarität (Solvatochromie). Besonders starke Solvatochromieeffekte findet man daher bei Charge-Transfer-Komplexen, wie z.B. Pyridinophenolat, bei denen durch den Ladungsübergang während der Anregung eine besonders große Änderung des Dipolmomentes auftritt. Diese Solvatochromieeffekte wurden umgekehrt dazu genutzt, um Parameter der Lösungsmittelpolarität aufzustellen [Reichardt 1979]. Für die Beschreibung der Prozesse sind neben der Dipolmomentsänderung des Farbstoffes bei Anregung $\Delta\mu$ die statische Dielektrizitätskonstante ϵ_s und der Brechungsindex n des Lösungsmittels wichtig. Mit Hilfe der Lippert-Gleichung [Lippert 1957], [Suppan 1990] (Gleichung 2.1.1-6) kann die Stokes-Verschiebung $\nu_{abs} - \nu_{em}$ als Funktion der Lösungsmittleigenschaften und der Dipolmomente des Farbstoffs μ_g und μ_e im Grund- bzw. angeregten Zustand beschrieben werden, wobei c die Lichtgeschwindigkeit, h das Plancksche Wirkungsquantum und a den Onsager-Hohlraumradius des Farbstoffes im Lösungsmittel (das sind ca. 60% der Längsachse des Farbstoffmoleküls) darstellt.

$$\nu_{abs} - \nu_{em} = \frac{2(\mu_g - \mu_e)^2}{a^3 \cdot c \cdot h} \left[\frac{2(\epsilon_s - 1)}{2\epsilon_s + 1} - \frac{2(n^2 - 1)}{2n^2 + 1} \right] \quad (2.1.1-6)$$

Die Unsicherheit in der Bestimmung des Onsager-Radius kann zu größeren Fehlern bei der Bestimmung von $\Delta\mu$ aus der Stokes-Verschiebung führen. Bei einer Zunahme des Dipolmomentes bei der Anregung, wie z.B. im Falle der Coumarine, steigt die Stokes-Verschiebung mit steigender Lösungsmittelpolarität. Sowohl Absorptions- als auch Emissionsmaximum werden bathochrom verschoben, wobei die Verschiebung der Emission größer als die der Absorption ist. Rhodaminfarbstoffe zeichnen sich hingegen durch eine vernachlässigbare Dipolmomentsänderung bei der Anregung aus, so daß keine Solvatochromie beobachtet wird. Nimmt das Dipolmoment bei der Anregung dagegen ab, wie im Fall des Pyridinophenolates, tritt eine negative Solvatochromie auf.

2.1.2 Fluoreszenzanisotropie

Wird eine fluoreszierende Probe mit linear polarisiertem Licht (wie z.B. den in dieser Arbeit verwandten Diodenlasern) angeregt, dann werden bevorzugt Fluorophore angeregt, deren Übergangsdipolmoment parallel zur Polarisationssebene (das ist die Ebene, die durch den Vektor des elektrischen Feldes und die Ausbreitungsrichtung des Lichtes aufgespannt wird) des Anregungslichtes ist. Diese Photo Selektion führt zu einer ebenfalls polarisierten Fluoreszenzemission, wodurch Fluoreszenzlebensdauer messungen erheblich beeinflusst werden können [Lakowicz 1983], [Fleming 1976]. Die Fluoreszenzanisotropie r ist durch die Probenfluoreszenz $I_{||}$ und I_{\perp} die parallel bzw. senkrecht zur Anregungspolarisation steht, definiert (Gleichung 2.1.2-1).

$$r = \frac{I_{||} - I_{\perp}}{I_{||} + 2I_{\perp}} \quad (2.1.2-1)$$

Ist die Rotationskorrelationszeit ϕ des angeregten Moleküls sehr viel kürzer als die Fluoreszenzlebensdauer ($\phi \ll \tau$), dreht sich das Molekül also sehr oft, bis es fluoresziert, so wird die Fluoreszenz depolarisiert, d.h. es ist keine Anisotropie meßbar ($I_{||}=I_{\perp}$ und $r = 0$). Die maximal mögliche Anisotropie r_0 , das entspricht dem Grenzwert, der für eine glasartig erstarrte Lösung beobachtet wird, ist selten meßbar. Neben der Rotationsdiffusion führen auch Energieübertragungen, wie beispielsweise Reabsorptionsprozesse zu einer Depolarisation der Probe.

Ein kompletter Verlust der Anisotropie tritt ein, wenn der Winkel γ des Emissionsdipoles relativ zur Polarisationsrichtung des Anregungslichtes 54.7° („magic angle“) entspricht (Gleichung 2.1.2-2).

$$r = \frac{3 \cos^2 \gamma - 1}{2} \quad (2.1.2-2)$$

Zeitabhängige Anisotropieuntersuchungen werden entsprechend den Fluoreszenzlebensdauer messungen ausgeführt, wobei die Anregung und Detektion mit entsprechenden Polarisatoren durchgeführt werden muß. Durch Aufnahme des Abklingverhaltens der parallelen ($||$) und senkrechten (\perp) Fluoreszenzintensitäten kann der zeitabhängige Verlauf der Anisotropie $r(t)$ mit der Rotationskorrelationszeit Φ dargestellt werden. Bei einem kugelsymmetrischen Molekül, welches ungehindert in allen drei Raumrichtungen rotiert, kann das Abklingverhalten monoexponentiell beschrieben werden (Gleichung 2.1.2-3).

$$r(t) = r_0 e^{-\frac{t}{\phi}} \quad (2.1.1-3)$$

Ein multiexponentielles Abklingverhalten der Anisotropie deutet darauf hin, daß das Molekül unsymmetrisch gebaut ist. Mit Hilfe der gemessenen Rotationskorrelationszeit ϕ kann das Rotationsvolumen V des Moleküls im Lösungsmittel mit der Viskosität η bei der Temperatur T über Gleichung 2.1.2-4 bestimmt werden, wobei R die Gaskonstante ist.

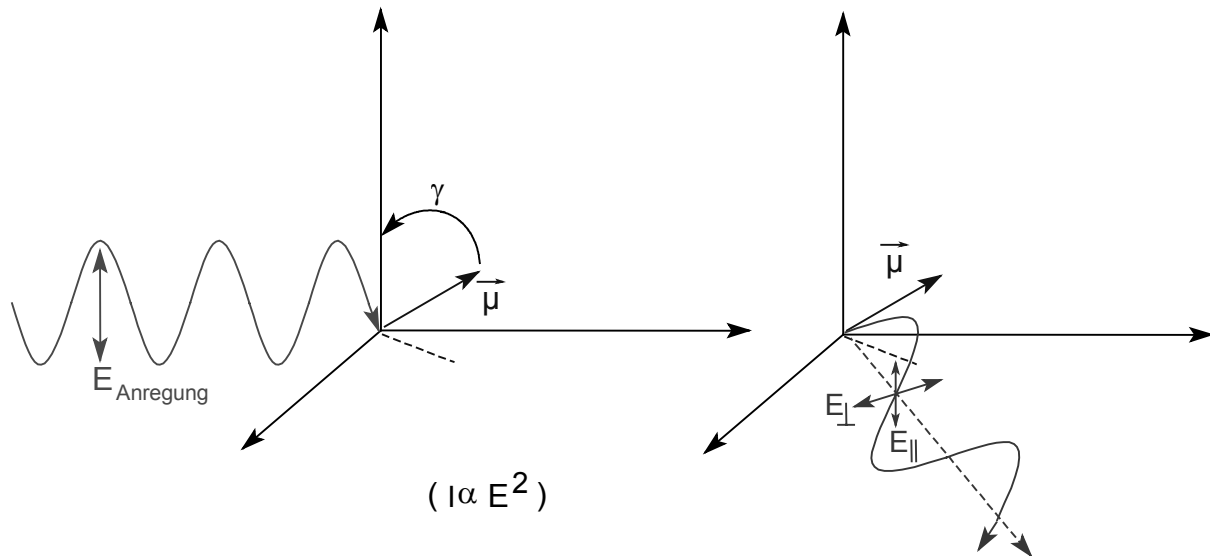


Abbildung 2.1.2-1 Zur Anisotropie: E : Elektrische Feldstärke während der Anregung, I : Intensität, μ : Übergangsmoment

Im gezeigten Beispiel hat das Molekül seine Lage nicht verändert. Für ein Molekül, dessen Übergangsdipolmoment μ parallel zur anregenden elektrischen Feldstärke stünde, wäre die Anregungswahrscheinlichkeit größer; für eines, dessen Übergangsdipolmoment in der Ebene senkrecht dazu läge, wäre es Null. Die Fluoreszenzstrahlung breitet sich senkrecht zu μ aus, ihre elektrische Feldstärke ist parallel zu μ . Sie kann als Vektor durch eine Linearkombination der beiden Vektoren E_{\parallel} und E_{\perp} dargestellt werden.

$$\phi = \frac{\eta V}{RT} \quad (2.1.2-4)$$

Die Bestimmung der Rotationskorrelationszeit kann daher bei der Untersuchung von Strukturveränderungen in Makromolekülen (DNS, Proteine, Polymere) von erheblichem Nutzen sein.

Bei kleinen Farbstoffmolekülen, wie etwa Coumarinen, betragen die Rotationskorrelationszeiten nur 100-200 ps [Maroncelli 1987], [Seidel 1992], [Seidel 1995].

Hingegen wurden bei Coumarin-Oligonukleotidkonjugaten Rotationskorrelationszeiten bis zu 600 ps [Rittinger 1991], bei den hier verwendeten Rhodaminfarbstoffen und Farbstoffkonjugaten sogar bis zu 1000 ps [Sauer (Diss.) 1995] gemessen.

2.1.3 Fluoreszenzlebensdauer und - quantenausbeute

Da die strahlungslosen Desaktivierungsprozesse höher angeregter Zustände schnell (\approx ps) verlaufen, geht die Fluoreszenzemission meistens vom untersten Schwingungsniveau des ersten angeregten Singulettzustands S_1 aus (eine Ausnahme ist z.B. Azulen). Wäre die Born-Oppenheimer-Näherung eine exakte Beschreibung für die Emissionsprozesse, gäbe es kaum strahlungslose Desaktivierung, d.h. die Mehrzahl elektronisch angeregter Moleküle könnte nur unter Aussendung eines Lichtquants in den elektronischen Grundzustand relaxieren. Es ist jedoch bekannt, daß die meisten organischen Moleküle kleine Fluoreszenzquantenausbeuten besitzen. Die strahlungslose Desaktivierung ist offensichtlich um so stärker, je größer und komplexer die Moleküle werden. Es können jedoch einige Anforderungen an die Molekülstruktur formuliert werden, die die Fluoreszenzeigenschaften des Farbstoffes fördern:

Das Farbstoffmolekül muß eine relativ starre Struktur haben, damit die strahlungslose Desaktivierung aufgrund von rotierenden oder sich bewegenden Gruppen des Moleküls unterdrückt wird.

Die Spin-Bahn-Kopplung muß klein sein, damit der Übergang in das Triplett-System unwahrscheinlich ist (z.B. Schweratomeffekt).

Moleküle, die durch einen Elektronendonator und einen -akzeptor substituiert sind, demzufolge im wesentlichen charge-transfer-angeregt sind, fluoreszieren häufig gut (z.B. Coumarine).

Die Geschwindigkeitskonstante für die strahlende Relaxation k_f kann unter Vernachlässigung aller nicht strahlenden Prozesse näherungsweise nach der Strickler-Berg-Beziehung [Strickler 1962] aus den spektralen Daten des Farbstoffes bestimmt werden (Gleichung 2.1.3-1).

$$k_f = 2,88 \cdot 10^{-9} \nu_0 n^2 \frac{g_g}{g_e} \int \varepsilon(\nu) d\nu \quad (2.1.3-1)$$

Dabei ist k_f die Fluoreszenzrate, ν_0 die Frequenz am Absorptionsmaximum, n der Brechungsindex der Lösung, g_g bzw. g_e die Entartung des Grund- bzw. angeregten Zustandes und $\varepsilon(\nu)$ der Extinktionskoeffizient bei der Frequenz ν . Das Integral reicht über die gesamte Absorptionsbande.

Fluoreszenzlebensdauer

Die Fluoreszenzlebensdauer oder - abklingzeit τ eines Farbstoffes kann über die nach optischer Anregung mit einem infinitesimal kurzen Puls (δ -Puls) erfolgende Abnahme der Anzahl angeregter Farbstoffmoleküle F^* mit der Zeit beschrieben werden (Gleichung 2.1.3-2-2.1.3-6) Das Geschwindigkeitsgesetz für die Abnahme der Konzentration $[F(t)^*]$ angeregter Moleküle kann durch Gleichung 2.1.3-2 beschrieben werden:

$$\frac{d}{dt}[F^*] = -(k_f + k_{IC} + k_{ISC})[F^*] = -k[F^*] \quad (2.1.3-2)$$

Dabei sind k_f , k_{IC} und k_{ISC} die Geschwindigkeitskonstanten der Fluoreszenz, der strahlungslosen Relaxation aus dem S_1 in den S_0 (internal conversion) und des Überganges in den Triplettzustand T_1 (intersystem crossing). Die Fluoreszenzabklingdauer τ ist der Kehrwert der Gesamtgeschwindigkeitskonstanten k .

$$\tau = \frac{1}{k} = \frac{1}{k_f + k_{IC} + k_{ISC}} \quad (2.1.3-3)$$

Die Integration der Differentialgleichung (2.1.3-2) liefert das Zeitgesetz:

$$[F^*](t) = [F^*]_0 e^{-t/\tau} \quad (2.1.3.4)$$

Dabei ist $[F^*]_0$ die Konzentration an Molekülen, die angeregt wurde. Da die beobachtbare Fluoreszenzintensität proportional zur Zahl der angeregten Moleküle ist, folgt aus Gleichung 2.1.3.4 Gleichung 2.1.3.5:

$$I(t) = I_0 e^{-t/\tau} \quad (2.1.3.5)$$

Die Fluoreszenzlebensdauer τ kann durch experimentelle Bestimmung der Zeit, bis zu der die Fluoreszenzintensität auf $1/e$ ihres Anfangswertes abgesunken ist, gemessen werden. Sie ist gleich der mittleren Verweilzeit der Moleküle im angeregten Zustand.

Gleichung 2.1.3-5 gilt nur für ein monoexponentielles Abklingverhalten der Fluoreszenz. Gerade in biologisch relevanten Systemen findet man aber häufig ein Fluoreszenzabklingverhalten, das nicht mehr mit einer Exponentialfunktion beschrieben werden kann. In diesen Fällen werden die beobachteten Kurven durch eine Linearkombination mehrerer Exponentialfunktionen beschrieben (Gleichung 2.1.3-6):

$$I(t) = I_0 \sum_j a_j e^{-\frac{t}{\tau_j}} \quad \text{wobei} \quad \sum_j a_j \equiv 1 \quad (2.1.3-6)$$

In Gleichung 2.1.3.9 stellt der präexponentielle Faktor a_j die Amplitude der j -ten Komponente im angeregten Zustand dar.

An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, daß die so berechneten Amplitudenanteile und Fluoreszenzlebensdauern nicht unbedingt eine physikalische Bedeutung haben müssen. In der Regel kann eine gemessene Fluoreszenzabklingkurve durch Gleichung 2.1.3-6 mit zwei oder drei Komponenten zufriedenstellend beschrieben werden. Die berechneten, das heißt den Meßwerten angepaßten, Amplitudenanteile und Fluoreszenzlebensdauern können aber nicht direkt mit verschiedenen Fluorophoren, d.h. Molekülen oder Molekülkonformationen in

Beziehung gesetzt werden. Die Amplitudenanteile und Fluoreszenzlebensdauern können ebenso das Ergebnis der mathematischen Anpassung an eine (stetige) Fluoreszenzlebensdauer-Verteilung $a(\tau)$ sein (Gleichung 2.1.3.11). Für den Fall mehrerer verschiedener Fluorophore, die nicht miteinander in Wechselwirkung stehen und bereits im Grundzustand vorhanden sind, oder eines Fluorophors in wechselnder Umgebung, besitzen die berechneten Amplitudenanteile und Fluoreszenzlebensdauern eine physikalische Bedeutung. Die τ_i -Werte stellen dann die Fluoreszenzlebensdauern der einzelnen individuellen Spezies (Fluorophore) dar. Die fluorenszengewichteten Anteile f_j jeder Spezies können dann nach Gleichung 2.1.3-7 berechnet werden.

$$f_j = \frac{a_j \tau_j}{\sum_i f_i \tau_i} \quad (2.1.3-7)$$

Es gibt auch Fälle, bei denen eine zufriedenstellende Beschreibung der gemessenen Kurven durch eine diskrete Verteilung von Lebensdauern nach Gleichung 2.1.3-6 nicht gelingt. Dann beschreibt man das Fluoreszenzabklingverhalten durch eine (stetige) Fluoreszenzlebensdauer-Verteilung $a(\tau)$ (Gleichung 2.1.3-8):

$$I(t) = I_0 \int_0^{\infty} a(\tau) \cdot e^{-\frac{t}{\tau}} d\tau \quad \text{wobei} \quad \int_0^{\infty} a(\tau) d\tau = 1 \quad (2.1.3-8)$$

Fluoreszenzlebensdauer-Verteilungen können mit Hilfe der Maximum Entropy Method (MEM) [Siemiarczuk 1989], [Siemiarczuk 1990] aus den gemessenen Fluoreszenzabklingkurven berechnet werden.

Fluoreszenzquantenausbeute

Die beobachtete Fluoreszenzlebensdauer τ eines elektronisch angeregten Zustandes ist aufgrund der diskutierten strahlungslosen Desaktivierungsprozesse kleiner als die natürliche Fluoreszenzlebensdauer τ_0^n . τ_0^n entspricht der Lebensdauer ohne strahlungslose Prozesse. Demnach ist die Fluoreszenzquantenausbeute Φ_f nach Gleichung 2.1.3-9 definiert:

$$\Phi_f = \frac{\tau}{\tau_0^n} = \frac{k_f}{k_f + k_{nr}} \quad (2.1.3-9)$$

Dabei ist k_f die Geschwindigkeitskonstante der Fluoreszenz und k_{nr} die Summe aus allen Geschwindigkeitskonstanten, die zur strahlungslosen Desaktivierung beitragen.

Anschaulich stellt die Fluoreszenzquantenausbeute das Verhältnis der Zahlen von emittierten zu absorbierten Photonen dar [Becker 1983].

2.1.4 Fluoreszenzsättigung und Photozerstörung

Die Intensität der Fluoreszenzstrahlung ist von entscheidender Bedeutung für die Unterscheidbarkeit von Einzelmolekülen aufgrund ihrer Fluoreszenzlebensdauer. So benötigt man bei Einsatz eines geeigneten Maximum-Likelyhood-Schätzers unter Einsatz von Mustererkennungs-Software zur Unterscheidung zweier Moleküle, deren Fluoreszenzlebensdauern 2 ns und 4 ns betragen bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $< 1\%$ mindestens 86 Photonen im Ereignis, während es bei einer Unterscheidung von Molekülen mit 3 ns und 4 ns bei gleicher Irrtumswahrscheinlichkeit bereits 237 Photonen sind [Köllner 1996].

Leistungsabhängigkeit

Je intensiver die Anregungsstrahlung ist, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, einen Übergang aus dem Grund- in einen angeregten Zustand zu induzieren [Nie 1994], [Schmidt 1995]. Da die Wahrscheinlichkeit nicht über Eins wachsen kann, die Raman-Streuung des Lösungsmittels, welche einen großen Teil des Rauschens verursacht, jedoch der eingestrahlten Leistung proportional ist, ist ein Leistungsoptimum zu erwarten, bei dessen Überschreitung das Rauschen überproportional zum Signal wächst und das Signal-zu-Rausch-Verhältnis abfällt. Bei sehr hohen Leistungsdichten und großen Diffusionszeiten (etwa in hochviskosen Lösungsmitteln) muß zudem mit der Photozerstörung des Farbstoffes gerechnet werden. Die Photozerstörung tritt in der Regel aus hoch angeregten Triplettzuständen heraus ein [Eggeling 1998]. Der Übergang in das Triplett-System findet aus dem S_1 heraus statt. Die Wahrscheinlichkeit dafür wächst mit dem Populationsgrad des S_1 , also mit der Anregungsleistung. [Dornboos 1997]

Abhängigkeit von der Pulsfrequenz des Anregungslasers

Zunächst steigt die Zahl der Fluoreszenzphotonen mit der Anregungsfrequenz an, denn je öfter der Farbstoff während der kurzen Zeit (ca. 0.1 - 3 ms), in der er sich diffusionsbedingt im Detektionsvolumen befindet, angeregt wird, desto häufiger besteht die Chance, ein Fluoreszenzphoton zu „fangen“. Das findet jedoch seine Grenze, sobald der zeitliche Abstand aufeinanderfolgender Pulse in die Größenordnung der Fluoreszenzlebensdauer kommt. Nach $\Delta t = 3\tau$ beträgt die Wahrscheinlichkeit dafür, daß das Molekül in seinen Grundzustand zurückgekehrt ist etwa 95%. Daraus ergibt sich bei einer Lebensdauer von 4 ns eine maximal sinnvolle Pulsfrequenz von etwa 80MHz.

2.2 Biologische Grundlagen

2.2.1 Lebensformen

Man unterscheidet drei Domänen von Lebensformen: **Bakterien**, **Archaea** und **Eukaryoten** (z.B. [Knippers 2001]). Bakterien und Archaea haben keinen Zellkern, bei ihnen liegt das Erbgut ungeschützt im Cytoplasma vor. Sie werden zusammenfassend **Prokaryoten** genannt. Eukaryoten haben einen von einer Kernmembran umgebenen Zellkern (lat. „nucleus“, griech. „κάρυοσ“), in dem das Erbgut aufbewahrt wird. Die Kernmembran ist für viele Stoffe undurchlässig, der Transport von Material in bzw. aus dem Kern geschieht durch Kernporen. Archaea stehen entwicklungsgeschichtlich zwischen den Bakterien und den Eukaryoten. Sie besitzen zwar wie die Bakterien weder einen Zellkern noch sonstige Organellen und ihr Stoffwechsel ähnelt dem der Bakterien, der Aufbau ihrer Gene, deren Regulation und deren Weitergabe an die nächste Generation entspricht aber dem der Eukaryoten. Alle höheren Organismen und viele Einzeller sind Eukaryoten. Die einfachsten Eukaryoten sind Hefezellen. Tierzellen besitzen neben dem genetischen System im Zellkern ein weiteres in den Mitochondrien. Pflanzenzellen haben außer den beiden Systemen im Kern und den Mitochondrien noch ein drittes System in den Chloroplasten.

Neben den drei genannten Lebensformen gibt es **Viren**, die aus Erbgut und einem Hüllprotein bestehen. Viren haben keinen eigenen Stoffwechsel und können sich nicht selbständig vermehren; sie zählen daher nicht zu den Lebewesen. Viren sind infektiöse Partikel die eine befallene Zelle zu ihrer Reproduktion verwenden. Dazu verwenden sie zum Teil Enzyme, die in der Wirtszelle vorhanden sind und zum Teil Enzyme, die auf der Viren-DNS codiert sind. Die Erbinformation in Viren kann als DNS oder RNS vorliegen. Ein spezieller Virustyp sind die Retroviren, sie enthalten RNS und ein Enzym, das die RNS in DNS transkribiert. Normalerweise wird DNS in RNS transkribiert, um dann zu Proteinen translatiert zu werden, daher „Retro“.

Viren, die Bakterien befallen, werden Phagen genannt. Die für die Sequenziersuche in dieser Arbeit verwendeten DNS-Sequenzen wurden aus den Phagen M13, Lambda und ϕ -x-174 gewonnen, die alle das Bakterium Escheria Coli befallen.

Plasmide sind relativ kleine (1 kBp – 200 kBp), kreisförmig geschlossene, „extrachromosomale“ DNS-Doppelstränge, die in Bakterien mit dem eigentlichen Bakteriengenom koexistieren. Sie vermehren sich unabhängig vom Bakteriengenom und können in bis zu mehreren hundert Kopien in einer Bakterienzelle vorkommen. Plasmide verschaffen der Zelle Vorteile (wie z.B. Antibiotikaresistenzen), sind aber nicht lebensnotwendig. Im Gegenzug erlaubt die Bakterienzelle dem Plasmid, sich zu vermehren. Auch Mitochondrien und Plastide in eukaryotischen Zellen enthalten Plasmide.

2.2.2 Struktur des Erbguts

Primärstruktur der DNS

Das Erbgut aller Lebewesen besteht aus Desoxyribonucleinsäure (DNS, engl. DNA), einem Polyester aus Phosphorsäure und am C1 glykosidisch derivatisierter 2'-Desoxyribose. Die Esterverknüpfungen gehen vom C5 des einen Zuckers über die Phosphorsäure zum C3 des nächsten; ein DNS-Molekül besitzt daher ein definiertes 3'- und 5'- Ende. Die dritte Hydroxylgruppe der Phosphorsäure ist bei neutralem pH deprotoniert; DNS ist daher negativ geladen.

Ribonucleinsäure (RNS, engl. RNA) ist im Prinzip analog aufgebaut, ihr Rückgrat besteht aus Ribose und Phosphorsäure.

Die Derivatisierung am C1 ist eine N-glykosidische Verknüpfung zu einer der Basen Adenin, Cytosin, Guanin oder Thymin. In RNS ist Thymin durch Uracil ersetzt, ihm fehlt die Methylgruppe am C5. Die Information in DNS und RNS ist durch die Reihenfolge (Sequenz) der vier Basen gespeichert.

Sekundärstruktur der DNS

DNS liegt in der Zelle als Dimer vor. Die beiden Einzelstränge laufen in entgegengesetzte Richtungen (antiparallel) und werden durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen zusammengehalten. Daneben spielen hydrophobe Wechselwirkungen und Wechselwirkungen der π -Systeme zwischen den aufeinander liegenden Basen eine Rolle. Jedem Adenin steht ein Thymin gegenüber und jedem Cytosin ein Guanin (komplementäre Basen), da dadurch die stärksten Wasserstoffbrücken gebildet werden können. Ist die Sequenz eines DNS-Strangs bekannt, so ergibt sich der Gegenstrang dadurch, daß man die Reihenfolge umkehrt und jede Base durch die zu ihr komplementäre Base ersetzt. Die Sequenz wird konventionsgemäß in 5' \rightarrow 3'-Richtung angegeben. Adenin und Guanin werden als Purinbasen, Thymin, Uracil und Cytosin als Pyrimidinbasen zusammengefaßt (Abbildung 2.2.2-1, links). Die Wasserstoffbrücken zwischen je zwei Basen sind an sich nicht besonders stabil, sie müssen im Stoffwechsel auch von Enzymen getrennt werden können, um mit der DNS zu arbeiten. Die Stabilität des Dimers kommt also durch die große Zahl an Basenpaarungen und nicht durch die Stabilität des einzelnen Paares zustande. Zwischen Cytosin und Guanin bestehen drei Wasserstoffbrücken, zwischen Adenin und Thymin nur zwei (Abbildung 2.2.2-1, rechts).

Dementsprechend ist die C-G- Bindung etwas stabiler als die A-T- Bindung. Die Temperatur, bei der die Hälfte der DNS-Doppelstränge in Einzelstränge dissoziiert ist, wird als „Schmelzpunkt“ der DNS bezeichnet. Der Schmelzpunkt der DNS hängt in erster Linie von ihrem GC-Anteil ab; je höher dieser ist, desto höher der Schmelzpunkt. Daneben spielen der pH-Wert, die Ionenstärke und der Anteil an organischen Lösungsmitteln eine Rolle: Hoher pH-Wert, niedrige Salzkonzentration und organische Moleküle wie Formamid oder Harnstoff erleichtern die Dissoziation, senken also den Schmelzpunkt.

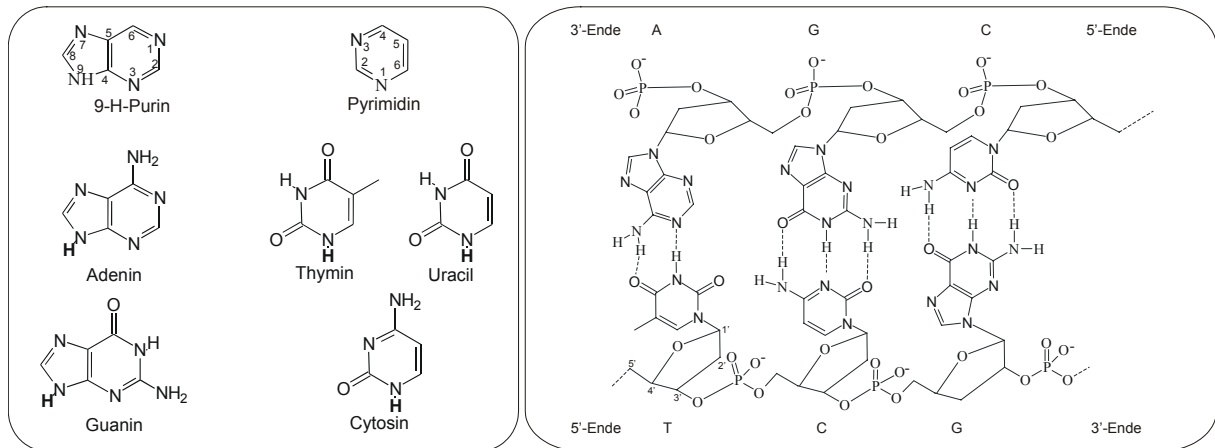


Abbildung 2.2.2-1 Strukturen der Nucleobasen und Ausschnitt aus einem DNS-Dimer mit H-Brücken

Die Länge der Stränge spielt nur bei kurzen ($n < 100$ Basen) DNS-Strängen eine Rolle. Da die Bindungsenthalpie mit der Anzahl der Basenpaare wächst, bedeutet dies, daß die Entropiezunahme ebenfalls linear mit der Basenzahl wächst. Das leuchtet auch ein, denn die im Dimer gepaarten Basen können sich in den Einzelsträngen freier bewegen. Die längenunabhängige Entropiezunahme durch die Entstehung zweier Monomere aus einem Dimer hat bei kurzen DNS-Stücken natürlich ein höheres Gewicht als die intermolekulare Entropiezunahme durch die größere Beweglichkeit der einzelnen Basen. Bei neutralem pH in Abwesenheit organischer Moleküle gilt für die Schmelztemperatur T_m näherungsweise:

$$T_m = \left(81,5 + 16,6 \lg(c_{Na^+}) + 0,41 \cdot \% (GC) - \frac{500}{n} \right) ^\circ C \quad (2.2.2-1)$$

Für $n > 100$ fällt der Term $-500/n$ weg. Die Dissoziation des DNS-Doppelstranges in zwei Einzelstränge ist ein reversibler Prozeß; sinkt die Temperatur unter den Schmelzpunkt, so dimerisieren die Einzelstränge wieder. Die Reassoziaton ist ein Zwei-Schritt-Prozeß: im ersten, als Nucleation bezeichneten und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt, treffen kurze passende Sequenzen aufeinander und bilden die ersten Basenpaare. Anschließend Paaren sich die übrigen Basen der Stränge sehr schnell. Die Geschwindigkeit der Reassoziaton hängt von der Kationenkonzentration, der Temperatur (maximale Geschwindigkeit etwa $25^\circ C$ unter dem Schmelzpunkt), der Länge der DNS und der Ausgangskonzentration an einzelsträngiger DNS, c_0 , ab. Für die Einzelstrangkonzentration c einfacher Sequenzen ohne hochrepetitive Sequenzen (wie Bakterien-DNS) zum Zeitpunkt t gilt folgendes Geschwindigkeitsgesetz:

$$\frac{c}{c_0} = \frac{1}{1 + k \cdot c_0 t} \quad (2.2.2-2)$$

Der $c_0 t_{1/2}$ -Wert gibt an, wann die Hälfte der ursprünglich vorhandenen Einzelstrang - DNS dimerisiert ist. Je größer die DNS ist, desto länger braucht sie zur Dimerisierung. Säugetier - DNS zeigt eine kompliziertere Kinetik: ein Teil der DNS dimerisiert wegen der sich wiederholenden Sequenzen bei einem sehr geringen $c_0 t$ -Wert, der Rest erst bei einem der Genomgröße entsprechenden Wert.

Das bandförmige DNS-Dimer ist nicht, wie in Abbildung 2.2.2-1 zur besseren Übersicht dargestellt, eben, sondern schraubenförmig verdrillt. Da sich die beiden glykosidischen Bindungsstellen der Basenpaare an die Polydesoxyribosephosphatketten nicht gegenüberliegen sondern zwei unterschiedlich große Winkel einschließen, kommt es zur Ausbildung einer großen und einer kleinen Furche (engl. major / minor groove).

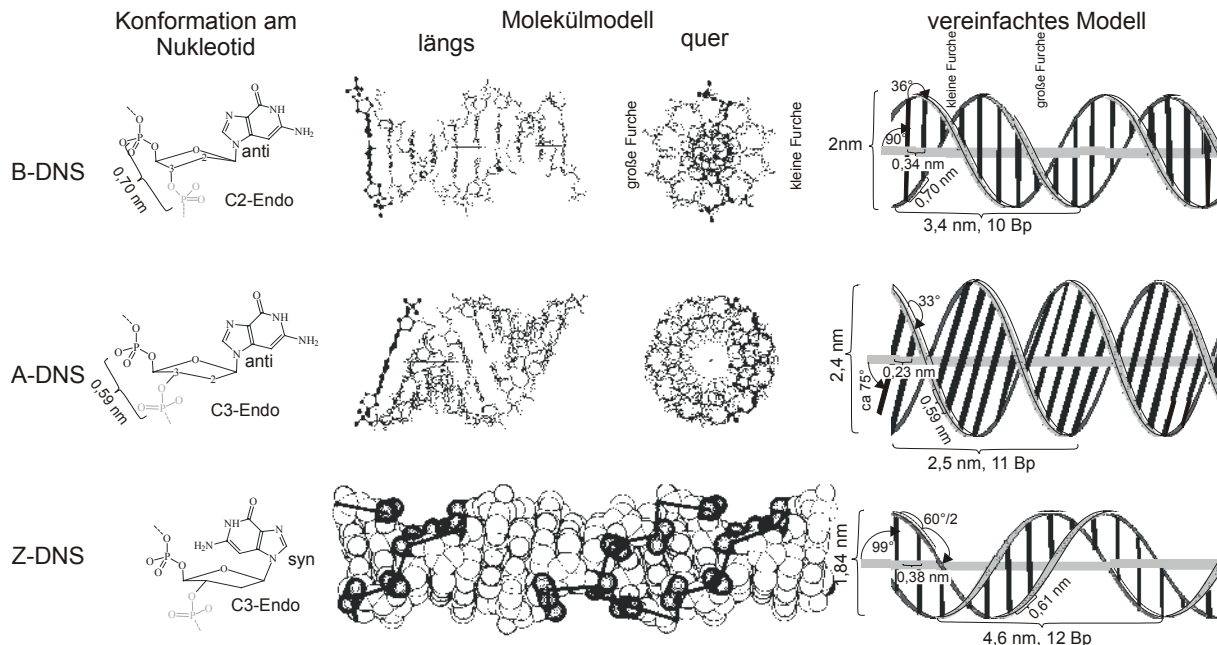


Abbildung 2.2.2-2 Sekundärstrukturen des DNS-Dimers:

B-DNS stellt die Standardform dar, A-DNS entsteht aus der B-DNS bei Wasserverlust. Dimere RNS liegt immer in der A-Form vor. Z-DNS ist im Unterschied zu A- und B-DNS linksgewunden. Sie entsteht bei hohem Salzgehalt in Bereichen der DNS, die abwechselnd G und C enthalten. Die Molekülmodelle in der Mitte sind aus [Knippers 2001] übernommen.

Eigenschaft	Helixtyp		
	B	A	Z
Gesamteindruck	zwischen A und Z	kurz und dick	gestreckt und dünn
Anstieg der Helix pro Basenpaar	0,33 nm	0,23 nm	0,38 nm
Helixdurchmesser	2,37 nm	2,55 nm	1,84 nm
Drehsinn	rechts	rechts	links
Basen pro Drehung	ca. 10	ca. 11	12
Drehwinkel pro Bp	35,9°	33,6°	-60° pro 2 Bp
Gewindesteigung der Helix (Anstieg pro Umlauf)	3,32 nm	2,46 nm	4,56 nm
Verkipfung der Normalen der Basenpaare zur Helixachse (engl. „tilt“)	-1,2°	+19°	- 9°
Mittlerer Winkel zwischen den Basennormalen eines Paares (engl. „Base-pair mean propeller twist“)	+16°	+18°	ca. 0°
Position der Helixachse	durch Basenpaare	große Furche	kleine Furche
Abmessungen der großen Furche	breit und mäßig tief	sehr schmal und tief	abgeflacht auf der Helixoberfläche
Abmessungen der kleinen Furche	schmal und mäßig tief	sehr breit und flach	sehr eng und tief
Konformation der Ribofuranose	C2'-Endo	C3'-Endo	C: C2'-Endo G: C3'-Endo
Konformation der Glykosylbindung	anti	anti	C: anti G: syn

Tabelle 2.2.2-1 Strukturmerkmale der wichtigsten DNS-Helices

Die Daten stellen Mittelwerte aus Röntgenstrukturanalysen an Einkristallen dar. Aus [Watson 2004] und [Knippers 2001].

Es gibt verschiedene mögliche Sekundärstrukturen der DNS; Abbildung 2.2.2-2 zeigt neben der wichtigsten, der B-Helix die A- und die Z-Helix. Tabelle 2.2.2-1 faßt die Strukturmerkmale der drei DNS-Formen zusammen.

Die angegebenen Strukturen stellen idealisierte Mittelwerte dar. Abhängig von der genauen Sequenz und der Umgebung treten mehr oder weniger große Abweichungen davon auf.

Im Gegensatz zu DNS liegt RNS oft einzelsträngig vor. Doppelsträngige RNS nimmt die Form der A-Helix an, während DNS in der B-Form vorliegt. Einzelsträngige RNS stellt aber kein gestrecktes Molekül dar, sondern es bildet Schleifen, wo immer dies aufgrund der Sequenz möglich ist, um mit sich selbst die stabilere Helixkonformation zu bilden.

Ein Teil der Adenin- und Cytosin- Reste in der DNS ist durch Methylierung an der C⁶-NH₂ – Gruppe (N-6-Methyladenin) bzw. am C⁵ (5-Methylcytosin) modifiziert. Durch diese Modifikation wird arteigene von artfremder DNS unterschieden und die arteigene DNS vor dem Abbau durch Restriktionsendonucleasen (s.u.) geschützt.

Tertiärstruktur der DNS

Das DNS-Molekül in den eukaryotischen Chromosomen ist linear, d.h. ein Faden mit zwei Enden. In den meisten Bakterien, den Mitochondrien, den Chloroplasten sowie einigen Viren liegt die DNS dagegen kreisförmig geschlossen als „Plasmid“ vor. Durch die Verdrillung der DNS zur Helix können sich die Einzelstränge des Plasmids nicht ohne Bruch einer der Polydesoxyribosephosphatketten trennen. In einem entspannten Ring aus B-DNS kommt auf 10,5 Basenpaare eine Umdrehung (engl. „Twist“ **Tw**) der Helix. Abweichungen von diesem Wert, der Verknüpfungszahl (engl. „linking number“ **Lk**) resultieren nicht in einer veränderten Ganghöhe sondern einer Überdrehung (engl. „writhe“ **Wr**, „supercoils“) der Helixachse um sich selbst. Es gilt:

$$Lk = \frac{N}{10,5} = Tw + Wr \quad (2.2.2-3)$$

Natürliche DNS weist normalerweise „negative Supercoils“ ($Wr < 0$) auf (ist „unterwunden“), d.h. die Zahl der Helixwindungen (Tw) unterschreitet die des entspannten Ringes (Lk). Durch die Supercoils wird die DNS erheblich kompakter. Um die Überdrehung der DNS zu ändern, muß einer der beiden Einzelstränge geschnitten und nach der Änderung wieder verschmolzen werden. Die Enzyme, die diese Aufgabe erfüllen, werden **Topoisomerasen** genannt.

Auch die lineare DNS in den Chromosomen eukaryotischer Zellen ist nicht gestreckt, sondern die B-Helix (Durchmesser ca. 2 nm, 10 Basenpaare / Windung) windet sich in negativen Supercoils um spezielle Proteine, die Histone heißen. Diese im Elektronenmikroskop an Perlenketten (Durchmesser etwa 10 nm, 80 Basenpaare / Komplex) erinnernden DNS-Histon-Komplexe werden als **Nucleosomen** bezeichnet. Die Nucleosomen sind ihrerseits spiralförmig zu einem **Chromatinfaden** von etwa 30 nm Durchmesser mit 1200 Basenpaaren pro Windung gedreht. Der Chromatinfaden bildet wiederum **Chromatinschleifen** von 250 nm Weite mit etwa 100000 Basenpaaren pro Schleife (s. z.B. [Knippers 2001, S.153]).

Die Kerne eukaryotischer Zellen enthalten mehrere solcher Chromatinfäden, die jeweils ein bestimmtes **Chromosomen-Territorium** im Kern einnehmen. Gene, die exprimiert werden, d.h. DNS Stücke, die Proteine codieren, die in der Zelle synthetisiert werden, liegen an der Außenseite der Chromosomen-Territorien, nicht exprimierte „stumme“ Gene liegen im Inneren. Die genaue Organisation des Zellkerns ist noch immer Gegenstand der Forschung. Bei der Zellteilung werden die Chromatinfäden als **Chromosomen** sichtbar. Der Mensch besitzt $2 \times 22 + 2$ Chromosomen, je eine Kopie von Mutter und Vater.

Der genetische Code

Je drei Basen codieren eine Aminosäure, neben den Trippeln (engl. „Codons“), die einer Aminosäure entsprechen, gibt es Codons, die für den Anfang und das Ende eines Proteins stehen. Ein DNS-Abschnitt, der die Information zur Synthese eines Proteins trägt, wird als **Gen** bezeichnet. Das **Genom** ist die Gesamtheit aller Gene eines Organismus.

Es gibt $4^3 = 64$ unterschiedliche Basentriplettel aber es werden nur 20 Aminosäuren verwendet, daher stehen teilweise unterschiedliche Trippel für die gleiche Aminosäure. Es ist bemerkenswert, daß diese Codons in allen Lebewesen (außer den Mitochondrien, bei denen es Abweichungen gibt) für jeweils die gleiche Aminosäure stehen.

In Bakterien und Viren folgen die Gene in dichter Folge auf der DNS; in Eukaryoten liegen zwischen den Genen lange Abschnitte, deren Funktion noch nicht geklärt ist. Wahrscheinlich erfüllen diese Bereiche Aufgaben bei der Organisation des Erbguts. Die menschliche DNS besteht z.B. nur zu etwa 2 % aus Genen.

DNS und RNS

Die DNS hat die Aufgabe, die Erbinformation zu speichern. Während des normalen Zellstoffwechsels wird keine DNS synthetisiert, es sei denn, die Zelle kopiert ihr Erbgut, um sich zu teilen.

RNS hat in der Zelle unterschiedliche Aufgaben:

m-RNS (messenger RNS) ist eine Arbeitskopie eines DNS-Stückes, die als Vorlage zur Synthese eines Proteins verwendet wird. m-RNS wird ständig in der Zelle synthetisiert und von anderen Enzymen wieder abgebaut.

t-RNS (transfer RNS) sind relativ kurze (74-94 Basen) RNS-Stücke, deren Aufgabe es ist, den Basentripletteln auf der m-RNS die richtige Aminosäure zuzuordnen. Zu jeder Aminosäure gibt es mindestens eine zugehörige t-RNS. Die Zuordnung der t-RNS, und damit der Aminosäure zum Trippel auf der m-RNS, geschieht über das komplementäre Anticodon, das auf einer exponierten Schleife der t-RNS liegt. t-RNS enthält neben den normalen Basen A,C,G,U auch die sogenannten „seltene“ Nucleotide Ribothymidin (T), Pseudouridin (Ψ), 4-Thiouridin (S^4U), Dihydrouridin (D), 3-Methylcytidin (m^3C), Inosin (I), N⁶-Isoprenyladenosin (iA) und Queuosin (Q).

r-RNS (ribosomale RNS) ist zusammen mit verschiedenen Proteinen Bestandteil der Ribosomen, jenes Enzymsystems, in dem die Proteinsynthese aus der m-RNS und den mit Aminosäuren beladenen t-RNSen erfolgt. Ein Ribosom besteht aus zwei Untereinheiten. An der kleinen Untereinheit treffen sich t-RNS und m-RNS, an der großen erfolgt die kovalente Verknüpfung der Aminosäuren zum Peptid. Jede Untereinheit besteht aus 1-3

RNS- Molekülen und vielen verschiedenen Proteinen. Das Ribosom besteht aus etwa 60 Gew. % RNS und 40 % Protein.

2.2.3 DNS-verarbeitende Enzyme

Enzyme, die Nucleotide zu DNS-Molekülen verknüpfen, heißen **Polymerasen**. Da die Hydrolyse der DNS exergonisch ist, verarbeiten die Polymerasen nicht die Nucleotide (=Nucleosid-Monophosphate), sondern die energiereicheren Nucleosidtriphosphate. Polymerasen benötigen zu ihrer Arbeit nicht nur die Nucleosidtriphosphate, sondern auch einen Gegenstrang „**Template**“, der zu dem aufgebauten Strang komplementär ist, sowie eine kurze, „**Primer**“ genannte, zum Template komplementäre Startsequenz, an dessen 3'-Ende die Polymerase die weiteren Nucleotide anheftet.

Ligasen verknüpfen zwei DNS-Stränge, indem sie eine Veresterung der 3'-OH-Gruppe des einen Stranges mit der 5'-OPO₃²⁻-Gruppe des anderen Stranges herbeiführen.

Enzyme, die die Phosphodiesterbindung hydrolisieren, heißen **Phosphodiesterasen**. Die **Topoisomerasen**, welche einen ringförmigen DNS-Strang spalten, um ihn nach einer Entwindung wieder zu Verknüpfen, wurden bereits erwähnt. **Helicasen** trennen (entwinden) ein DNS-Dimer lokal und hydrolisieren je getrenntem Basenpaar zwei ATP-Moleküle.

Phosphodiesterasen, die nur endständige Nucleotide abspalten, werden als **Exonucleasen**, solche die das DNS-Molekül in der Mitte spalten, als **Endonucleasen** bezeichnet. Für die Sequenzanalyse sind besonders die **Restriktionsendonucleasen** bedeutsam, die die DNS nur an bestimmten Sequenzen schneiden und so die definierte Spaltung eines großen DNS-Moleküls in mehrere kleinere ermöglichen. DNA-**Methyltransferasen** methylieren Adenin- und Cytosin- Reste an bestimmten Sequenzen und schützen so die DNS vor einem Angriff durch die eigenen Restriktionsendonucleasen. Enzyme, die DNS hydrolisieren, nennt man zusammenfassend **DNA-sen**, solche, die RNS abbauen, **RNA-sen**. Die meisten Polymerasen enthalten eine als Exonuclease wirkende Untereinheit, die falsch eingebaute Nucleotide wieder abzubauen vermag (Korrekturlesefunktion).

Man unterscheidet **prozessive** Exonucleasen von **nichtprozessiven** Exonucleasen. Prozessive Exonucleasen bauen den DNS-Strang, an den sie gebunden sind, vollständig ab und binden sich erst anschließend an einen neuen DNS-Strang. Nichtprozessive Exonucleasen fallen nach wenigen abgespaltenen Nucleotiden von der DNS ab und können an einen anderen Strang binden.

Prozessive Exonucleasen umschließen den DNS-Strang entweder vollständig (ringförmig) oder partiell und können am Strang entlanggleiten. Voraussetzung für die Gleitfähigkeit ist eine unspezifische und mehrfache Bindung an den Strang [Breyer 2001].

Tabelle 2.2.3-1 gibt einen Überblick über die wichtigsten Phosphodiesterasen:

Typ	Bezeichnung	Herkunft	DNA-Substrat Abbaurichtung	Besonderheiten (Wenn nicht anders vermerkt, benötigen die Enzyme Magnesium-Salze und produzieren 5'-Phosphatenden)
Endonuclease	DNase I	Pankreas	einzelsträngig doppelsträngig	bevorzugtes Abbauprodukt: Tetranucleotide
	DNase II	Thymus	einzelsträngig doppelsträngig	Mg ²⁺ -unabhängig; produziert 3'-Phosphatenden
	Mikrokokken-Nuclease	<i>Staphylococcus</i>	einzelsträngig doppelsträngig	benötigt Ca ²⁺ , produziert 3'-Phosphatenden; wirkt auch auf RNA
	Endonuclease I	<i>E. coli</i>	einzelsträngig doppelsträngig	bevorzugstes Abbauprodukt: Oligomere mit 7 Bausteinen
	Endonuclease II	<i>E. coli</i>	AP- Endonuclease	(Abb. 9.10, S. 259)
	Endonuclease	<i>Neumspora crassa</i>	einzelsträngig	wirkt auch auf RNA
	S1-Endonuclease	<i>Aspergillus oryzae</i>	einzelsträngig	wirkt auch auf RNA
Exonuclease	Exonuclease I	<i>E. coli</i>	3' → 5'	einzelstrangspezifisch
	Exonuclease II	<i>E. coli</i>	3' → 5'	Korrekturfunktion (3'-5'-Exonuclease der DNA-Polymerase I)
	Exonuclease III	<i>E. coli</i>	3' → 5'	doppelstrangspezifisch; dazu noch weitere Funktionen: 1. Phosphomonoesterase an 3'-Phosphat-Gruppen 2. Endonuclease an apurinischen und apyrimidinischen Stellen; AP-Endonuclease
	Exonuclease IV	<i>E. coli</i>	3' → 5'	einzelstrangspezifisch
	Exonuclease V	<i>E. coli</i>	3' → 5' 5' → 3'	RecBC-Nuclease
	Exonuclease VI	<i>E. coli</i>	3' → 5' 5' → 3'	nicht abhängig von Magnesium-Salzen: produziert Oligonucleotide
	Schlangengift-Phosphodiesterase	<i>Crotolus adamanteus</i>	3' → 5'	wirkt auch auf RNA
	Milz-Phosphodiesterase	Milz	5' → 3'	produziert 3'-Mononucleotide; wirkt auch auf RNA
	Lambda-Exonuclease	Phage Lambda	5' → 3'	bevorzugt doppelsträngige DNA; ein Lambda-Rekombinationsenzym
	T7-Exonuclease	Phage T7	5' → 3'	doppelstrangspezifisch
	Bezeichnung	Herkunft	Erkennungssequenz (Pu = A,G; Py = C,T; N = A,C,G,T; A*=Methyl-A) Schnittstelle ()	
Restriktionsendonuclease	<i>Alu</i> I	<i>Arthrobacter luteus</i>	A G C T T C G A	
	<i>Bal</i> I	<i>Brevibacterium albidum</i>	T G G C C A A C C G G T	
	<i>Bam</i> H I	<i>Bacillus amyloliquefociens</i>	G G A T C C C C T A G G	
	<i>Bcl</i> I	<i>Bacillus caldolyticus</i>	T G A T C A A G T A G T	
	<i>Dpnl</i>	Diplococcus pneumoniae	G A* T C C T A*G	
	<i>Eco</i> RI	<i>Escherichia coli</i> , Stamm RY13	G A A T T C C T T A A G	
	<i>Eco</i> RV	<i>Escherichia coli</i> , Stamm J62	G A T A T C C T A T A G	
	<i>Hae</i> III	<i>Haemophilus aegyptius</i>	G G C C C C G G	
	<i>Hind</i> III	<i>Haemophilus influenzae</i> , Stamm Rd	A A G C T T T T C G A A	

Restriktionsendonuclease	<i>Hpa</i> I	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	G T T A A C C A A T T G
	<i>Kpn</i> I	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	G G T A C C C C A T G G
	<i>Nco</i> I	<i>Nocardia corallina</i>	C C A T G G G G T A C C
	<i>Pvu</i> I	<i>Proteus vulgaris</i>	C G A T C G G C T A G C
	<i>Pvu</i> II	<i>Proteus vulgaris</i>	C A G C T G G T C G A C
	<i>Sal</i> I	<i>Streptomyces albus</i>	G T C G A C C A G C T G
	<i>Sau</i> 3A	<i>Staphylococcus aureus</i> , Stamm 3A	G A T C C T A G
	<i>Sau</i> 96	<i>Staphylococcus aureus</i> , Stamm PD96	G G N C C C C N G G
	<i>Taq</i> I	<i>Thermus aquaticus</i>	T C G A A G C T
	<i>Xho</i> II	<i>Xanthomonas holcicola</i>	Pu G A T C Py Py C T A G Pu
	<i>Xma</i> I	<i>Xanthomonas malvaceum</i>	C C C G G G G G G C C C
	<i>Bgl</i> I	<i>Bacillus globigii</i>	G C C N N N N N G G C C G G N N N N N C C G

Tabelle 2.2.3-1 Einige Phosphodiesterasen (aus [Knippers 2001])

Die in dieser Arbeit verwendete **Exonuclease I** (Exo I) des Bakteriums *Escheria Coli* ist an langen Einzelsträngen hochprozessiv. Sie baut den gebundenen Strang bis auf ein Oligomer mit 10-2 Nucleotiden vollständig ab, bevor sie sich an einen neuen Strang bindet [Brody 1986]. Trifft das Enzym auf einen dimeren Bereich, so fällt es ab [Thomas 1978]. Exo I ist ein monomeres Polypeptid mit einer relativen Masse von 55000 g/mol und einem Stokes-Radius von 3,12 nm [Prasher 1983]. Daraus ergibt sich in dem verwendeten Puffer mit $\eta = 3,2$ cP unter Verwendung der Stokes-Einstein-Gleichung (Gl. 2.4.1-11) ein Diffusionskoeffizient von $D = 2,2 \times 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$.

In Abwesenheit von Mg^{++} -Ionen (20 mM EDTA) ist Exonuclease I inaktiv; im Konzentrationsbereich von $1,5 \times 10^{-3} \text{ M}$ - $3 \times 10^{-2} \text{ M}$ Mg^{++} ändert sich die Aktivität nicht; der optimale pH-Wert liegt bei 9,2-9,8 (20% bei 7,5; 60% bei 8,5; 30 % bei 10,7) [Lehman 1960]. Doppelsträngige DNS wird von Exo I nicht (bzw. $< 40000\times$ langsamer als einzelsträngige DNS) angegriffen [Lehman 1964].

Röntgenstrukturanalysen von Exonuclease I [Breyer 2000] zeigen, daß das Molekül die Form des Buchstabens C annimmt (Abbildung 2.2.3-1, links), wobei die Enden von einer flexiblen Peptidkette überspannt werden. Exo I umschließt die DNS also vollständig. Der Innenraum des Enzyms trägt positive Partialladungen [Breyer 2000] und vermittelt auf diese Weise eine unspezifische Bindung an die negativ geladenen Phosphatgruppen der DNS. Das aktive Zentrum (Abbildung 2.2.3-1, rechts) des Enzyms liegt am N-terminalen Ende (Abbildung 2.2.3-1, Mitte) in der Mitte der Furche; die Furche kann einen maximal 13 Nucleotide langen DNS-Einzelstrang aufnehmen, was auch erklärt, warum das Enzym an kürzeren Strängen nicht mehr prozessiv arbeitet. Das aktive Zentrum enthält zwei Mg^{++} -Ionen die von den sauren Aminosäuren mit den Nummern 15 (Asparaginsäure), 17 (Glutaminsäure), 108 (Asparaginsäure) und 186 (Asparaginsäure) gebunden werden.

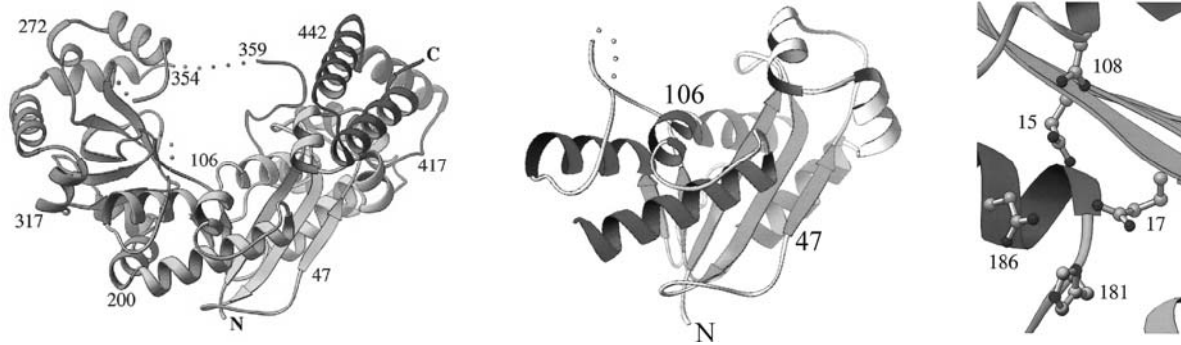


Abbildung 2.2.3-1 Struktur von *E. Coli* Exonuclease I

links: Gesamtes Molekül
(aus [Breyer 2000])

Mitte: N-Terminus

mit aktivem Zentrum (rechts)

2.2.4 Darstellung von DNS

Chemische Synthese

Für Oligonucleotide mit bis zu 30 Basen Länge stehen chemische Synthesen an Trägern nach Art der Merrifield-Synthese zur Verfügung. Moleküle mit einer Länge über etwa 100 Nucleotiden lassen sich auf diese Art allerdings wegen der bei jedem Zyklus auftretenden

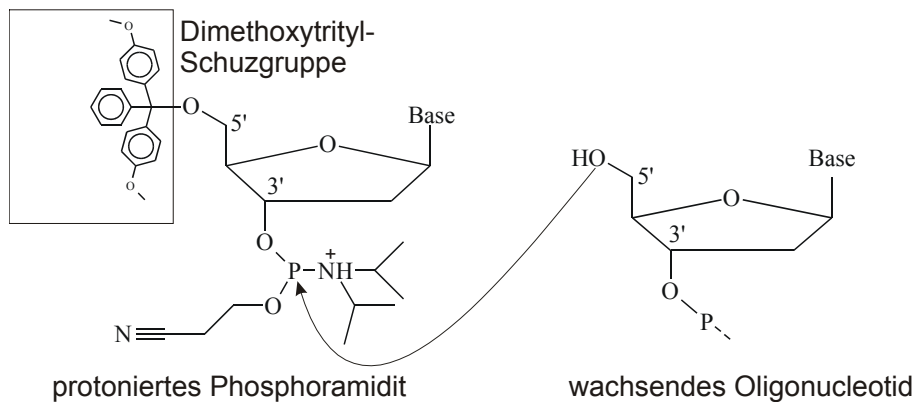


Abbildung 2.2.4-1 Phosphoramidit

Nebenreaktionen nicht herstellen. Der Strang wird dabei im Gegensatz zur Biosynthese in 3'->5'-Richtung aufgebaut. Zum Anhängen eines Nucleotides an eine 5'-OH-Gruppe dient ein an der 5'-Gruppe mit Dimethoxytrityl geschütztes Phosphoramidit

(Abbildung 2.2.4-1). Die chemische Synthese von Oligonucleotiden ist für die Synthese von Primern und für die Einführung gezielter Mutationen bedeutsam.

Primerverlängerung (primer extension)

Längere DNS-Stücke lassen sich enzymatisch synthetisieren. Dazu braucht man neben der Polymerase und den als Triphosphaten vorliegenden Mononucleotiden die zur gewünschten Sequenz komplementäre Gegensequenz (Template) und ein kurzes Startstück (Primer). Das Enzym gewinnt die zur Veresterung notwendige Energie durch Verwendung von Triphosphaten, die bei der Veresterung zu Monophosphaten hydrolysiert werden. Die DNA-

Polymerase hängt das Phosphat am 5'-Ende des neuen Nucleotids an die Hydroxylgruppe am 3'-Ende des wachsenden Polynucleotids (Abbildung 2.2.4-2):

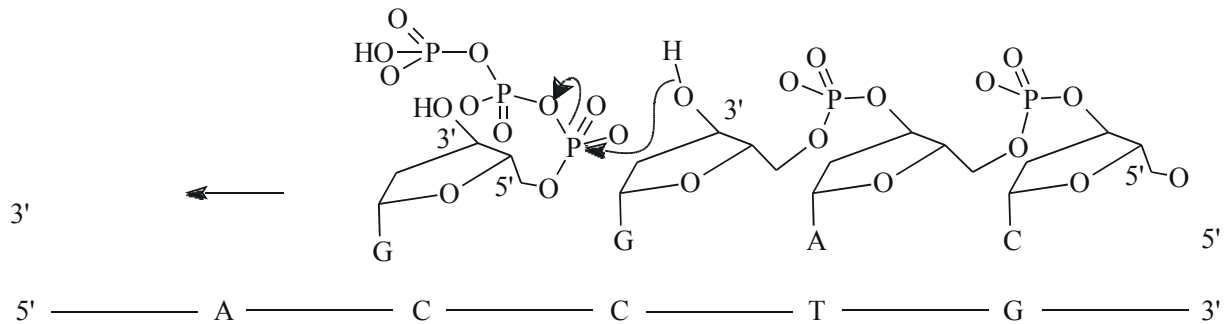


Abbildung 2.2.4-2 Primerverlängerung (schematisch)

Polymerase Kettenreaktion

Bei der Primerverlängerung erhält man aus einem DNS-Einzelstrang einen Doppelstrang. Denaturiert man diesen zu zwei Einzelsträngen und wiederholt die Reaktion, so wird die Anzahl der DNS-Moleküle bei jedem Zyklus verdoppelt. Sinnvollerweise setzt man dabei eine Polymerase ein, die bei der Denaturierung der DNS ihre Aktivität nicht einbüßt. Solche Polymerasen lassen sich aus hitzeliiebenden Bakterien wie *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase) gewinnen. Bei der Polymerase-Kettenreaktion („polymerase chain reaction“, **PCR**) liegen neben den Triphosphaten, aus denen die neue DNS synthetisiert wird, stöchiometrische Mengen von zwei Primern sowie katalytische Mengen der zu synthetisierenden DNS-Sequenz vor. Die Primer sind 10-30 Nucleotide lang, und binden sich an komplementäre Stränge. Amplifiziert wird die Sequenz, die zwischen den Primern liegt. Nach 25 Zyklen hat sich die ursprünglich vorhandene DNS-Masse in etwa um den Faktor 10^6 vervielfacht. Erreichbar sind Faktoren von ca. 10^8 ; bei weiterer Vervielfältigung akkumulieren sich Fehler, die zu unerwünschten Nebenprodukten führen [Kahl 1995]. Abbildung 2.2.4-3 illustriert das Verfahren:

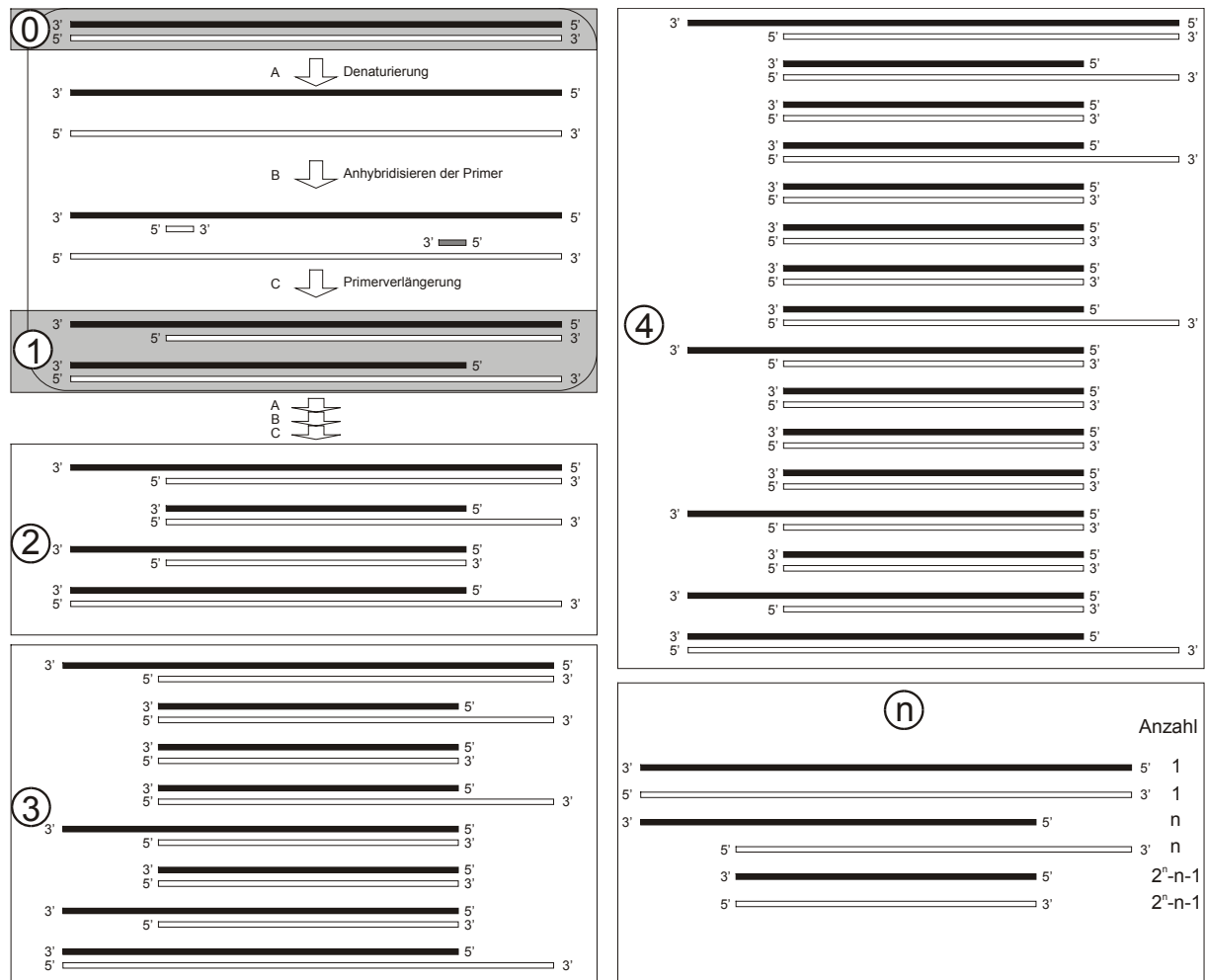


Abbildung 2.2.4-3 Polymerase-Kettenreaktion

Klonierung

Die im bisher besprochenen Verfahren laufen *in vitro*, also außerhalb lebender Organismen ab. Man kann aber DNS auch von lebenden Zellen herstellen lassen. Durch Einwirkung von Restriktionsendonucleasen werden Plasmide oder die DNS von Bakteriophagen (sog. **Vektoren**) spezifisch geschnitten. Mit Hilfe von Ligasen wird in diese Schnittstellen die zu amplifizierende Sequenz eingefügt. Die entstehende Hybrid-DNS wird als **rekombinante DNS** bezeichnet. Die Hybrid-DNS kann sich wie der Phage oder das Plasmid in einer Bakterienzelle vermehren. Die Nachkommen einer solchen Zelle werden als **Klone** bezeichnet, sie enthalten die rekombinante DNS, die in diesem Zusammenhang **DNA-Klon** genannt wird. Durch den Einbau in bestimmte Phagen, deren DNS einzelsträngig ist (z.B. M13), kann gezielt einzelsträngige DNS synthetisiert werden.

2.2.5 Sequenzanalyse

Zunächst wird die DNS als Doppelstrang aus der Zelle isoliert. Die DNS eines einzelnen Chromosoms ist mit ihren durchschnittlich 65 Millionen Basenpaaren viel zu lang, zur Entschlüsselung mit Hilfe eines der heutigen Verfahren. Durch Restriktionsendonucleasen wird die DNS deshalb zunächst in kleinere, sequenzierbare Fragmente zerlegt. Dabei entstehen definierbare Bruchstücke von etwa 100 bis 1000 Basenpaaren Länge. Die richtige Reihenfolge der Fragmente in der DNS findet man dadurch heraus, daß die Fragmente zum Teil überlappen, so daß aus der Sequenz der Basen in den einzelnen Fragmenten auf die Reihenfolge derselben zurückgeschlossen werden kann.

Maxam-Gilbert-Verfahren

Vor der Denaturierung wird das DNS-Fragment enzymatisch mit Oligonucleotidkinase an beiden 5'- Enden mit radioaktivem Phosphat (^{32}P) phosphoryliert. Das Maxam-Gilbert-Verfahren [z.B. Habermehl 1992] beruht auf der bevorzugten chemischen Spaltung der Esterverknüpfung an einer der vier Basen. Die Reaktionsbedingungen werden dabei so gewählt, daß nur jeweils eine Base von hundert möglichen reagiert. Es entsteht ein Gemisch aller Kettenlängen mit der markierten radioaktiven ersten Base als Anfang und dem Vorgänger der durch die Spaltungsreaktion bestimmten Base. Dieses Gemisch wird gelelektrophoretisch nach der Kettenlänge aufgetrennt. Die Detektion erfolgt nach Belichtung eines Films durch den radioaktiven Phosphor.

Die Wiederholung dieses Experimentes mit der Spaltreaktion an jeweils einer anderen Base erlaubt es, die Sequenz des Fragmentes aufzuklären.

Sanger-Verfahren

Das Sanger-Verfahren [z.B. Stryer 1990] beruht im Gegensatz zum Maxam-Gilbert-Verfahren nicht auf einer chemischen Abbaureaktion, sondern auf einem enzymatischen Aufbau des Gegenstranges über eine Primerverlängerung. Der Primer trägt eine Markierung. Da das Arbeiten mit Radioaktivität mit Risiken verbunden und die Entsorgung der Abfälle problematisch ist, verwendet man heute Fluoreszenzfarbstoffe.

Der erste Schritt der Sanger-Sequenzierung besteht in der Amplifikation des zu sequenzierenden DNS-Einzelstranges durch Klonierung im Genom des Phagen M13.

Zur gesuchten Sequenz wird neben dem markierten Primer die Polymerase und eine Mischung aller vier Nucleosidtriphosphate zugesetzt. Außerdem erfolgt ein Zusatz einer der vier Nucleosidtriphosphate, dem die OH-Gruppe am C3 fehlt, also ein 2,3-Didesoxynucleosidtriphosphat in geringer Konzentration (Terminator). Wird das Didesoxynucleotid eingebaut, so erfolgt ein Kettenabbruch. Man erhält also wie beim Maxam-Gilbert-Verfahren ein Gemisch aller möglicher Kettenlängen mit einem definierten Ende. Man führt die Reaktion wieder jeweils unter Zusatz eines anderen Didesoxynucleosids durch und erhält auf diese Weise die gewünschte Information für jede der vier Basen.

Man kann die vier Reaktionsmischungen entweder alle mit dem gleichen Farbstoff markieren und jeweils auf einer eigenen Bahn auftrennen (4-Bahnen-1-Farbstoff-Prinzip) oder die Primer mit jeweils einem anderen Farbstoff markieren und alle vier Reaktionsmischungen auf der gleichen Bahn auftrennen (1-Bahn-4-Farbstoffe-Prinzip). Die Farbstoffe werden entweder spektral oder anhand ihrer unterschiedlichen Fluoreszenzabklingdauern (Multiplexverfahren) unterschieden. Beim 1-Bahn-4-Farbstoffe-Prinzip trennt man die DNS-Stücke inzwischen durch Kapillargelelektrophorese auf.

Die Kombination aus Sanger-Sequenzierung und Polymerase-Kettenreaktion wird als Cycle-Sequencing bezeichnet [Sanger 1977]. Man kommt dabei wegen der starken Amplifikation durch die PCR mit viel weniger DNS aus.

Schrotflinten-Sequenzanalyse („shotgun sequencing“)

(Aus [Neumann 1999])

Bei der Schrotflinten-Methode zur Sequenzierung des Erbguts eines Organismus werden von dem Genom zwei Bibliotheken von Zufallsbruchstücken erzeugt: eine mit kurzen Fragmenten, die in Plasmiden vervielfältigt werden, und eine mit etwas größeren Fragmenten, die in Bakteriophagen (meist Lamdaphagen) kloniert werden. Die erste Bibliothek wird ansequenziert, d. h. es werden jeweils die ersten 500 Basen der Fragmente bestimmt. Ein Computerprogramm sucht nach Überlappungen der bestimmten Sequenzen und rekonstruiert zusammenhängende Bereiche, sogenannte Contigs. Mit Hilfe der zweiten Bibliothek können die Lücken zwischen den Contigs geschlossen werden und das Gesamtgenom rekonstruiert werden. Dazu werden die größeren Fragmente ebenfalls ansequenziert und die erhaltenen Sequenzen mit den Contigs verglichen. Nachdem eine vollständige Kette von Fragmenten vorliegt, werden die noch unbekannteren mittleren Abschnitte der Fragmente sequenziert.

Die Schrotflinten-Sequenzanalyse ist heute eine der wichtigsten Methoden zur Sequenzierung der DNS vergleichsweise kleiner Genome und wird in vielen Sequenzier-Projekten erfolgreich eingesetzt. Verglichen mit der mühsamen Sequenzierung einzelner Klone liefert die Schrotflintenmethode wesentlich schneller die Sequenz der DNS-Fragmente und deren Abfolge. Die Anwendung zur Sequenzierung großer Genome ist jedoch sehr umstritten. [Weber 1997, Green 1997].

Inzwischen sind zahlreiche Varianten des Sanger-Verfahrens im Einsatz; eine Übersicht ist z.B. in [Meldrum 2000^{1,2}] erschienen.

Alternative Verfahren

Massenspektrometrie

Zur Trennung und Identifizierung kurzer (bis 670 Basen [Fu 1998]) nach dem Sanger-Verfahren hergestellter DNS-Fragmente eignet sich die flugzeitaufgelöste Massenspektroskopie. Die Ionisierung erfolgt dabei über matrixunterstützte Laserdesorptions-ionisation, MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption–Ionization, Time-of-Flight)

Sequenzierung durch Hybridisierung

Bei diesem Verfahren werden alle möglichen Oligonucleotide einer bestimmten Länge an definierten Positionen auf einer Oberfläche immobilisiert. Bei 8 Basen Länge sind das $4^8 = 65536$ mögliche Variationen. Ist ein Oligonucleotid komplementär zu einem Abschnitt der zu ermittelnden, am Primer fluoreszenzmarkierten Sequenz, wird diese daran gebunden. Der Nachweis erfolgt über eine CCD-Kamera; die Sequenz wird anschließend kombinatorisch errechnet.

Einzelmolekülelektrophorese

Bei der Einzelmolekülelektrophorese [Akeson 1999], [Andersen 1999] wird ein DNS-Strang elektrophoretisch durch einen α -Hemolysinkanal gezogen. Die Ionenleitfähigkeit des Kanals wird dabei in Abhängigkeit von der gerade durchtretenden Base herabgesetzt.

Einzelmolekülhydrolyse

Bei der Einzelmolekülhydrolyse [Jett 1989], [Soper 1993], [Ambrose 1993] [Sauer 2001] [Werner 2003] wird ein an mindestens zwei Basen vollständig (und unterscheidbar) markierter DNS-Strang in einem Flußsystem durch eine Exonuclease abgebaut (s. auch Kapitel 4.6). Die freigesetzten Mononucleotide werden in der Reihenfolge detektiert, in der sie abgebaut wurden und liefern so die Sequenzinformation. Werden nur zwei Basen markiert, so müssen alle 6 Kombinationen durchgespielt werden, um die vollständige Sequenz zu erhalten. Die ursprüngliche Idee zur Markierung der DNS bestand darin, eine der beiden Basen mit einer Hydroxylgruppe, die andere mit einer Mercaptogruppe zu modifizieren und erst anschließend diese Gruppen mit Farbstoffen zu markieren (**post-labeling**) [Jett 1989], [Jett 1995]. Das hat den Vorteil, daß bei der DNS-Synthese die Basenpaarung nicht durch sperrige Substituenten behindert wird. Da der Markierungsgrad wegen der unvollständig ablaufenden Farbstoffankopplung nicht die notwendigen 100% erreicht, setzt man inzwischen markierte Triphosphate bei der DNS-Synthese ein (**pre-labeling**). An künstlichen Sequenzen gelingt die Synthese mit natürlichen Polymerasen wie dem Klenow-Fragment der *Eco* - Polymerase I [Brakmann 2001], [Földes-Papp 2001^{a,b}]. Bei Wildtyp-Sequenzen werden mutierte Polymerasen [Reha-Krantz 1999^{a,b}] eingesetzt.

Einzelmolekülsynthese

Im Unterschied zur Einzelmolekülhydrolyse wird der DNS-Strang bei der Einzelmolekülsynthese auf- und nicht abgebaut. Die Markierung erfolgt an der terminalen Phosphatgruppe der eingesetzten Nucleosidtriphosphate. Sie wird bei der Synthese zusammen mit dem Pyrophosphat abgespalten, findet sich also nicht im aufgebauten Strang wieder. Der Nachweis erfolgt beim Einbau des Triphosphates durch Detektion am Synthesort [Korlach 2001].

Eine andere Variante [Kartalov 2004] baut die Markierungen mit in die DNS ein und photozerstört sie nach der Detektion gezielt.

2.3 Detektionsvolumen

Das Detektionsvolumen ist der Bereich der Probe, der vom Laser angeregt wird und aus dem die emittierte Fluoreszenz detektiert wird. Ein kleines Detektionsvolumen erleichtert den Nachweis einzelner Moleküle, da der überwiegend aus Raman-Streuung stammende Untergrund der Zahl der Lösungsmittelmoleküle und damit dem Volumen proportional ist, während die Signalintensität der Verweilzeit des Moleküls und damit dem Durchmesser des Detektionsvolumens also $V^{1/3}$ proportional ist.

2.3.1 Anregungsprofil des Lasers

Das Anregungsprofil des Lasers ist für die hier verwendeten Multimode-Diodenlaser nicht ohne weiteres anzugeben. Für Laser in der Grundmode ist das Strahlprofil zylindersymmetrisch und nimmt von der Strahlmitte nach außen hin Gauss-förmig ab. Der Strahl fällt auf der Optischen Achse ins Objektiv und wird von diesem fokussiert. Für den Fall, daß der Strahl so dünn ist, daß er von der Pupille des Objektivs nicht eingengt wird, findet man in der Literatur [Rigler 1993] folgende Beschreibung für das Intensitätsprofil (angegeben in Zylinderkoordinaten, der Ursprung ist der Fokus):

$$I(r, z) = \frac{2P}{\pi(\omega_0^2 + z^2 \tan^2 \delta)} \exp\left(-2 \frac{r^2}{(\omega_0^2 + z^2 \tan^2 \delta)}\right) \quad (2.3.1-1)$$

Dabei ist r der Abstand von der optischen Achse und z der Abstand von der Fokalebene. P ist die Leistung des Laserstrahls und

$$\delta = \arctan \frac{R_{\text{Strahl}}}{f_{\text{Objektiv, objektseitig}}} \quad (2.3.1-2)$$

ist der halbe Öffnungswinkel des Laserstrahls (mit Radius R_{Strahl} an der Eintrittspupille) im Fokus bei einer Intensität von $1/e^2$ (s. Abbildung 2.3.1-1).

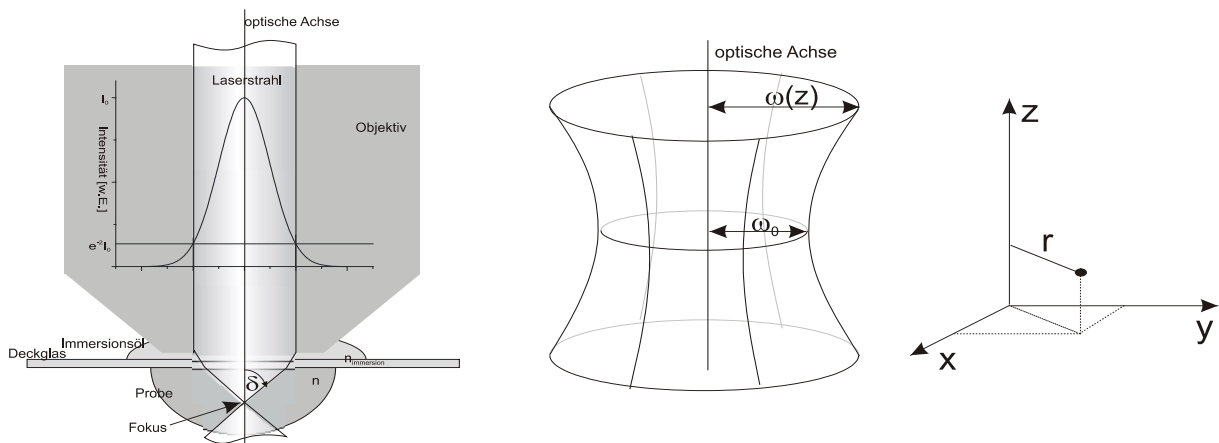


Abbildung 2.3.1-1 Zur Definition des Strahlöffnungswinkels δ .

Je größer δ , desto schärfer ist der Fokus sowohl quer als auch längs zur Achse begrenzt.

Die objektseitige Brennweite des Objektivs errechnet sich nach

$$f_{\text{Objektiv, objektseitig}} = \frac{n \cdot t}{M} \quad (2.3.1-3)$$

, wobei n der Brechungsindex im Objektraum, t die Tubuslänge und M die Vergrößerung des Objektivs ist.

Das Intensitätsprofil fällt vom Fokus aus entlang der optischen Achse Lorentz-förmig ($1/\{1+[(x-\mu)^2/w^2]\}$) ab, während es quer dazu Gauss-förmig abfällt ($\exp[-(x-\mu)^2/w^2]$). Die Breite der Gaussfunktion ist dabei im Fokus minimal und nimmt entlang der z-Achse quadratisch zu. Für den Strahlradius im Fokus, ω_0 , gibt die selbe Literaturstelle ([Rigler 1993]) folgende Formel an:

$$\omega_0 = \frac{\lambda_{\text{Vak}}}{n\pi \tan \delta} \quad (2.3.1-4)$$

Für den Winkel δ wird dabei vorausgesetzt, daß $\delta \leq \alpha/2$, wobei α der maximale halbe Öffnungswinkel des Objektivs und n der Brechungsindex der Probe ist. Die Numerische Apertur des Objektivs ist durch $NA = n \sin \alpha$ gegeben. λ_{Vak} ist die Anregungswellenlänge im Vakuum. Substitution von Gleichungen 2.3.1-2 und 2.3.1-3 in 2.3.1-4 führt über $\tan \delta = R_{\text{Strahl}} / f_{\text{Objektiv}} = R_{\text{Strahl}} \cdot M / (n \cdot t)$ auf

$$\omega_0 = \frac{\lambda_{\text{Vak}} t}{\pi R_{\text{Strahl}} M} \quad (2.3.1-5)$$

, wobei sich der Brechungsindex der Probe wegekürzt.

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Objektiven handelt es sich im Ölimmersionsobjektive mit einer numerischen Apertur von 1,45 und einem Abbildungsmaßstab von 100× bei einer Tubuslänge von 160mm. Der Strahldurchmesser war elliptisch mit einer langen Halbachse von ca. 2 mm und einer kurzen von ca. 1 mm. Setzt man diese Werte in Gl. 2.3.1-5 ein, so erhält man mit $\lambda = 0,65 \mu\text{m}$ und $R = 1 \text{ mm}$ $\omega_0 = 0,331 \mu\text{m}$; mit $R = 2 \text{ mm}$ entsprechend $\omega_0 = 0,166 \mu\text{m}$. Beide Werte liegen unterhalb der Auflösungsgrenze des Objektivs ($\lambda/NA = 0,65 \mu\text{m} / (1,37 \cdot 1,45) = 0,327 \mu\text{m}$) und sind deshalb unrealistisch klein.

Im Lehrbuch von Kneubühl und Sigrist [Kneubühl 1999, Gleichungen 1.18, 1.19] wird für die minimale Brennfleckgröße

$$A_{\text{min}} = \pi \omega_0^2 = \frac{3,67 \lambda^2}{\Omega} = \frac{3,67 \lambda^2}{\pi \arctan^2 \left(\frac{R_{\text{Strahl}}}{f} \right)}$$

angegeben. Ω ist dabei der Raumwinkel den der durch das Objektiv fokussierte Laserstrahl einnimmt.

Auflösen nach ω_0 ergibt und Einsetzen von Gl. 2.3.1-3 ergibt mit $\lambda = \lambda_{\text{Vak}}/n$:

$$\omega_0 = \sqrt{3,67} \frac{\lambda_{Vak}}{\pi n \arctan \frac{R_{Strahl} M}{nt}} \quad (2.3.1-6)$$

Das ergibt mit einem geschätzten Brechungsindex des Puffers von $n \approx 1,37$ für die oben verwendeten Strahlradien

$$\omega_0 = 0,676 \mu\text{m} (@R=1\text{mm}) \text{ und } \omega_0 = 0,391 \mu\text{m} (@R=2\text{mm})$$

Die Strahlöffnungswinkel errechnen sich entsprechend mit $f = 1,37 \times 160\text{mm} / 100 = 2,19$ mm zu

$$\delta = 0,428 \text{ Rad} = 24,5^\circ (@R=1\text{mm}) \text{ und } \delta = 0,740 \text{ Rad} = 42,4^\circ (@R=2\text{mm})$$

Abbildung 2.3.1-2 stellt nach Gl. 2.3.1-1 errechnete Schnitte durch das Anregungsprofil des Lasers graphisch dar:

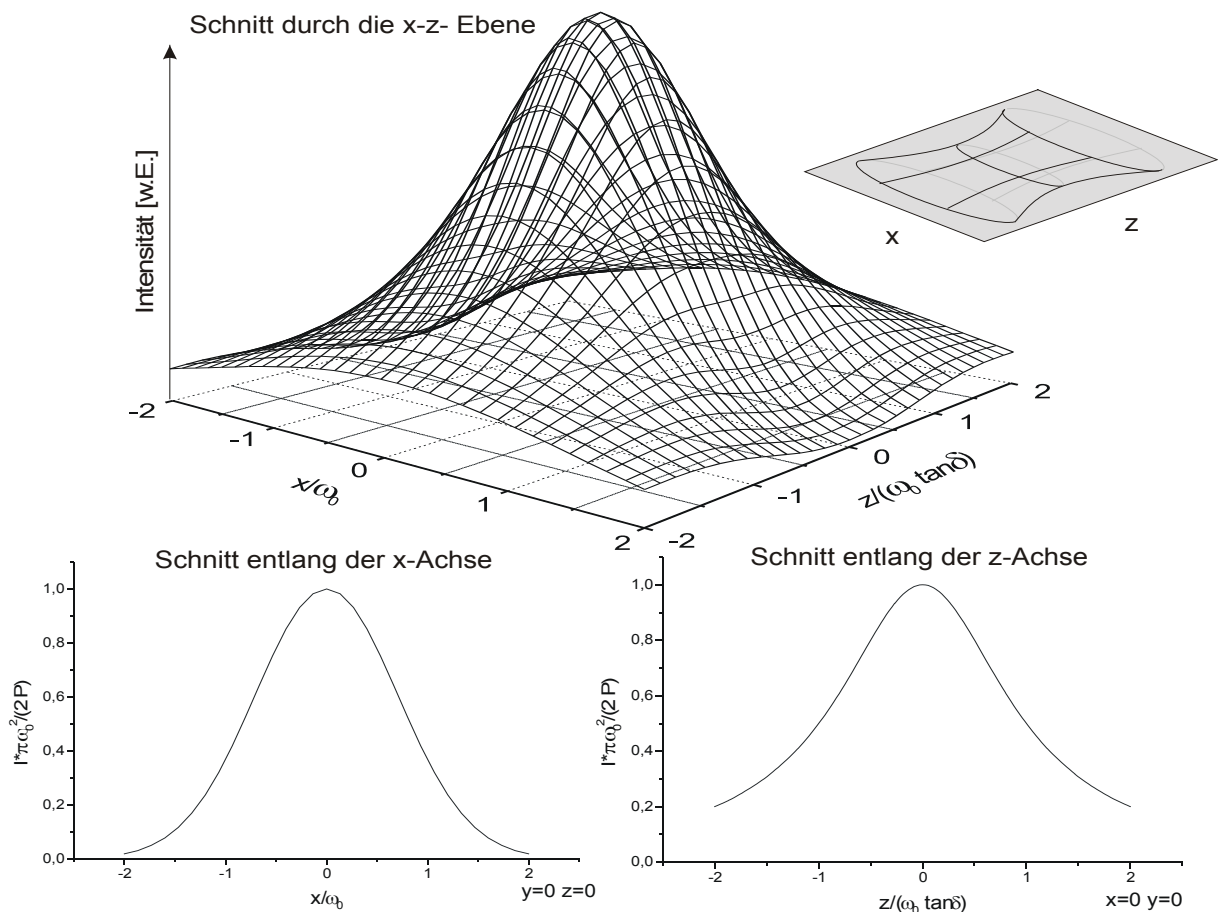


Abbildung 2.3.1-2 Schnitte durch das Strahlprofil im Fokalbereich

Im oberen Teil der Abbildung ist ein Schnitt durch die x-z-Ebene dargestellt. Da die Anregungsintensität zylindersymmetrisch ist, entspricht sie dem Schnitt durch jede beliebige Ebene, die die z-Achse enthält. Unten links ist das Gauss-förmige Profil bei einem Schnitt quer zur optischen Achse durch den Fokus dargestellt; unten rechts das Lorentz-förmige Profil entlang der optischen Achse.

2.3.2 Sammeleffizienzfunktion des Mikroskopsystems

Die Sammeleffizienzfunktion („Collection Efficiency Function“), $CEF(r',z)$, gibt an, welcher Anteil des Lichtes, der von einer isotrop strahlenden Punktlichtquelle am Ort (r',z) ausgeht, durch die Lochblende vor dem Detektor fällt und diesen erreicht. Sie ist gegeben durch den Anteil des Bildes des Lichtpunktes der auf die Öffnung der Lochblende fällt [Quian 1991]:

$$CEF(r',z) = \beta \iint_{\text{Bildebene}} T(r) PSF(r,r',z) dA. \quad (2.3.2-1)$$

Dabei ist β der Anteil des Lichtes der Lichtquelle, der durch das Objektiv fällt und die Bildebene erreicht. Die PSF („Pointspreadfunction“ = Punktbildfunktion) gibt die Intensitätsverteilung des Bildes des Lichtpunktes (r',z) in der Bildebene wieder. r' gibt den Abstand des Lichtpunktes von der optischen Achse an, z den Abstand von der Fokalebene. Das Integral läuft über die gesamte Bildebene. $T(r)$ gibt an, ob das Flächenelement in der Öffnung der Lochblende liegt.

$$T(r) = \begin{cases} 1 & \text{falls } r \leq r_b \\ 0 & \text{falls } r > r_b \end{cases} \quad (2.3.2-2)$$

Dabei ist r_b der Radius der Lochblendenöffnung. $PSF(r,r',z)$ gibt die Punktbildfunktion des Mikroskopobjektivs an.

Das Integral wird wegen der Zylindersymmetrie vorteilhaft in Polarkoordinaten ausgedrückt. Mit Hilfe der Jacobi-Determinante ergibt sich:

$$dA = dx dy = \begin{vmatrix} \frac{dx}{dr} & \frac{dy}{dr} \\ \frac{dx}{d\varphi} & \frac{dy}{d\varphi} \end{vmatrix} dr d\varphi = \begin{vmatrix} \cos \varphi & \sin \varphi \\ -r \sin \varphi & r \cos \varphi \end{vmatrix} dr d\varphi = (r \cos^2 \varphi + r \sin^2 \varphi) dr d\varphi = r dr d\varphi$$

Zum Integral tragen wegen $T(r)$ nur Radien $< r_b$ bei. Das Winkelintegral läuft über den gesamten Kreis, also von 0 bis 2π .

$$CEF(r',z) = \beta \int_0^{r_b} \int_0^{2\pi} r PSF(r,r',z) d\varphi dr$$

Da die PSF nicht von der Winkelcoordinate abhängt, läßt sich das Integral vereinfachen:

$$CEF(r',z) = 2\pi\beta \int_0^{r_b} r PSF(r,r',z) dr \quad (2.3.2-3)$$

Angenähert kann man die PSF, wie die Lochblende, als Scheibenfunktion betrachten. D.h. der Lichtpunkt ergibt als Bild näherungsweise ein Scheibchen konstanter Helligkeit:

$$PSF(r, r', z) \approx \frac{\text{circ}\left(\frac{r - Mr'}{M\sqrt{(R_0^2 + z^2 \tan^2 \alpha)}}\right)}{\pi M^2 (R_0^2 + z^2 \tan^2 \alpha)} \quad \text{mit } \text{circ}(x) = \begin{cases} 1 & \text{falls } x \leq 1 \\ 0 & \text{falls } x > 1 \end{cases} \quad (2.3.2-4)$$

r ist der Abstand des Zentrums des Bildscheibchens vom Schnittpunkt der optischen Achse mit der Bildebene; r' ist der Abstand des Leuchtpunktes von der optischen Achse (im Objektraum), z der Abstand des Leuchtpunktes von der Ebene des Objektraumes, die scharf abgebildet wird. M ist der Abbildungsmaßstab (Vergrößerungsfaktor) des Objektivs. Der Faktor $M(R_0^2 + z^2 \tan^2 \alpha)^{1/2}$ gibt den Radius des Bildscheibchens wieder. Der Nenner gibt den Flächeninhalt der Bildscheibe an, dient also der Normierung. $\alpha \approx \arcsin(NA/n)$ ist der halbe Öffnungswinkel der vom Leuchtpunkt ausgehenden Randstrahlen, die das Objektiv gerade noch einfängt. Falls der Leuchtpunkt sich im Fokus befindet, gilt die Gleichung genau. R_0 ist das Auflösungsvermögen des Objektivs. Nimmt man für R_0 den Radius des „Airy-Scheibchens“ an, so erhält man für R_0 :

$$R_0 = 1,22 \frac{\lambda}{2n \sin \alpha} = 0,66 \frac{\lambda}{NA} \quad (2.3.2-5)$$

Das Airy-Scheibchen stellt das (kreisförmige) erste Minimum der Beugungsfigur eines runden Loches dar. λ ist die Laserwellenlänge im Vakuum, n der Brechungsindex der Probe und α der halbe Öffnungswinkel des Objektivs. NA ist die numerische Apertur des Objektivs.

Befindet sich der Leuchtpunkt nicht in der Fokalebene des Objektivs, so nimmt der Radius der PSF mit wachsendem Abstand zu, da dann, wie Abbildung 2.3.2-1 veranschaulicht, der Bildpunkt außerhalb der Bildebene liegt, die Strahlen in der Bildebene also bereits wieder auseinanderlaufen ($z > 0$) oder noch nicht zusammengelaufen sind ($z < 0$).

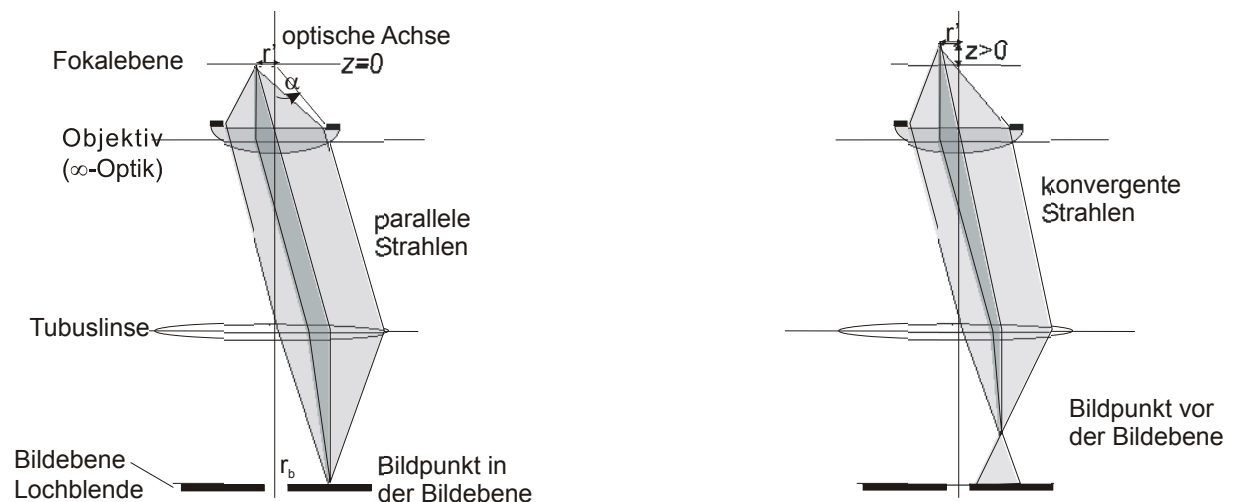


Abbildung 2.3.2-1 Vereinfachtes Strahlverlaufsschema für einen Lichtpunkt innerhalb und außerhalb der Fokalebene des Objektivs. Im rechten Teil der Abbildung laufen die Strahlen bereits wieder auseinander, wenn sie die Bildebene erreichen. In diesem Fall ist das Bildscheibchen also nicht beugungsbegrenzt, sondern weniger scharf. Die PSF hat einen größeren Radius.

Das Integral in Gleichung 2.3.2-3 gibt den Anteil der PSF, die in das Loch der Blende fällt wieder. Die CEF ist also das Produkt aus der ortsunabhängigen Konstante $2\pi\beta$ und dem Anteil des Flächeninhaltes der Schnittmenge der beiden Kreise T und PSF (Abbildung 2.3.2-2) am Gesamtflächeninhalt der PSF. Offensichtlich gibt es drei Fälle:

- 1) Wenn die PSF vollständig innerhalb der Blendenöffnung liegt, beträgt der Quotient 1.
- 2) Wenn die PSF die Blendenöffnung schneidet oder die Blendenöffnung innerhalb der PSF liegt, ergibt sich eine Zahl zwischen 0 und 1.
- 3) Schneiden sich die beiden Kreise nicht, so beträgt die CEF 0.

Die Schnittfläche der Kreise ist vom Abstand der Kreismittelpunkte und von den Radien der Kreise abhängig. Der Radius der Lochblende ist durch r_0 gegeben der der PSF durch $R_{psf} = M(R_0^2 + z^2 \tan^2 \alpha)^{1/2}$. Ist der Abstand des Zentrums des Bildscheibchens von der Blendenmitte, Mr' , kleiner als die Differenz $r_b - R_{psf}$ und ist $r_b \geq R_{psf}$, so liegt der erste der drei oben genannten Fälle vor. Ist der Abstand größer als die Differenz aber kleiner als die Summe beider Radien, so liegt der zweite Fall vor. Ist der Abstand schließlich größer als die Summe, liegt der dritte Fall vor.

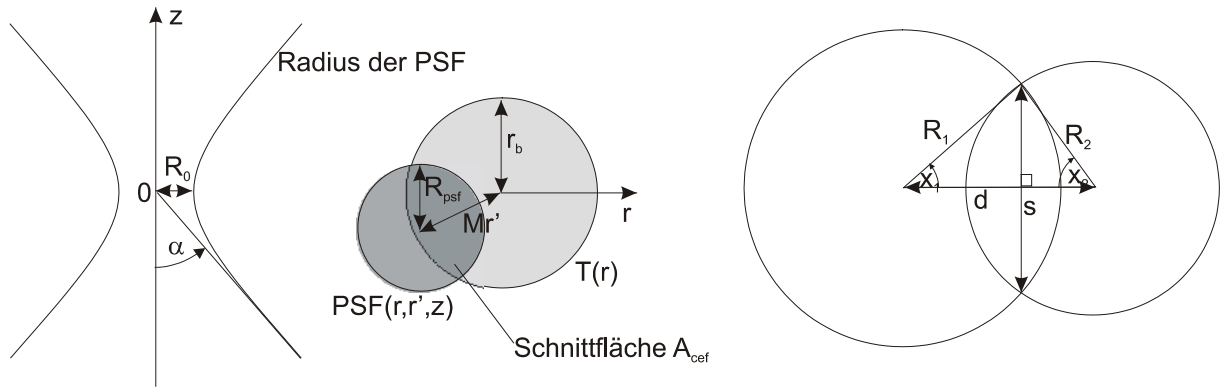


Abbildung 2.3.2-2 Verlauf des PSF-Radius und Veranschaulichung der CEF.

Der Abstand des Mittelpunkts der PSF in der Bildebene ist durch Mr' gegeben. Der Radius durch $R_{psf} = M(R_0^2 + z^2 \tan^2 \alpha)^{1/2}$. Die Schnittfläche der beiden Kreise ist die Summe der beiden durch die Sehne s getrennten Kreissegmente. x_1 und x_2 sind die halben Zentriwinkel der Sehne s in den beiden Kreisen mit den Radien R_1 und R_2 . Der Abstand der Kreismittelpunkte ist durch d gegeben.

Die Schnittfläche der beiden Kreise, A_{csf} , ist die Summe der Flächen der durch die Sehne s definierten Kreissegmente, die sich mit elementarer Geometrie berechnen lassen. Es gilt:

$$A_{csf} = x_1 R_1^2 + x_2 R_2^2 - \frac{1}{2} \sqrt{2(R_1^2 R_2^2 + R_1^2 d^2 + R_2^2 d^2) - (R_1^4 + R_2^4 + d^4)} \quad \text{mit } x_1 = \arccos \frac{R_1^2 - R_2^2 + d^2}{2R_1 d}$$

und $x_2 = \arccos \frac{R_2^2 - R_1^2 + d^2}{2R_2 d}$, wobei die x in Radian einzusetzen sind.

Zusammenfassend ergibt sich für die Sammeleffizienzfunktion:

- 1) β falls $Mr' \leq r_b - R_{psf}$
- 2a) $\beta \frac{r_b^2}{R_{psf}^2}$ falls $Mr' \leq R_{psf} - r_b$

$$2b) \quad \beta = \frac{x_b r_b^2 + x_{psf} R_{psf}^2 - \frac{1}{2} \sqrt{2(r_b^2 R_{psf}^2 + r_b^2 (Mr')^2 + R_{psf}^2 (Mr')^2) - (r_b^4 + R_{psf}^4 + (Mr')^4)}}{\pi R_{psf}^2} \quad \text{falls } |R_{psf} - r_b| < Mr' < R_{psf} + r_b$$

$$3) \quad 0 \quad \text{falls } R_{psf} + r_b \leq Mr'$$

(2.3.2-6)

Wobei $\beta = \frac{1 - \cos \alpha}{2}$ der Raumwinkel ist, innerhalb dessen das Objektiv Licht einfängt.

Der Radius des Bildscheibchens ist $R_{psf} = M \sqrt{R_0^2 + z^2 \tan^2 \alpha}$, der der Blende ist r_b . R_0 , die Auflösungsgrenze des Objektivs, ist durch Gleichung 2.3.2-5 gegeben. M ist sein Abbildungsmaßstab. Die Abweichung des Leuchtpunktes von der optischen Achse (im Objektraum) ist mit r' bezeichnet, der Abstand zur Fokalebene mit z . Der Öffnungswinkel α des Objektivs ist durch $\arcsin NA/n$ gegeben. Die Zentrihalbwinkel der Blende und des Bildscheibchens x_b und x_{psf} sind durch

$$x_b = \arccos \frac{r_b^2 - R_{psf}^2 + (Mr')^2}{r_b Mr'} \quad \text{und} \quad x_{psf} = \arccos \frac{R_{psf}^2 - r_b^2 + (Mr')^2}{R_{psf} Mr'}$$

gegeben.

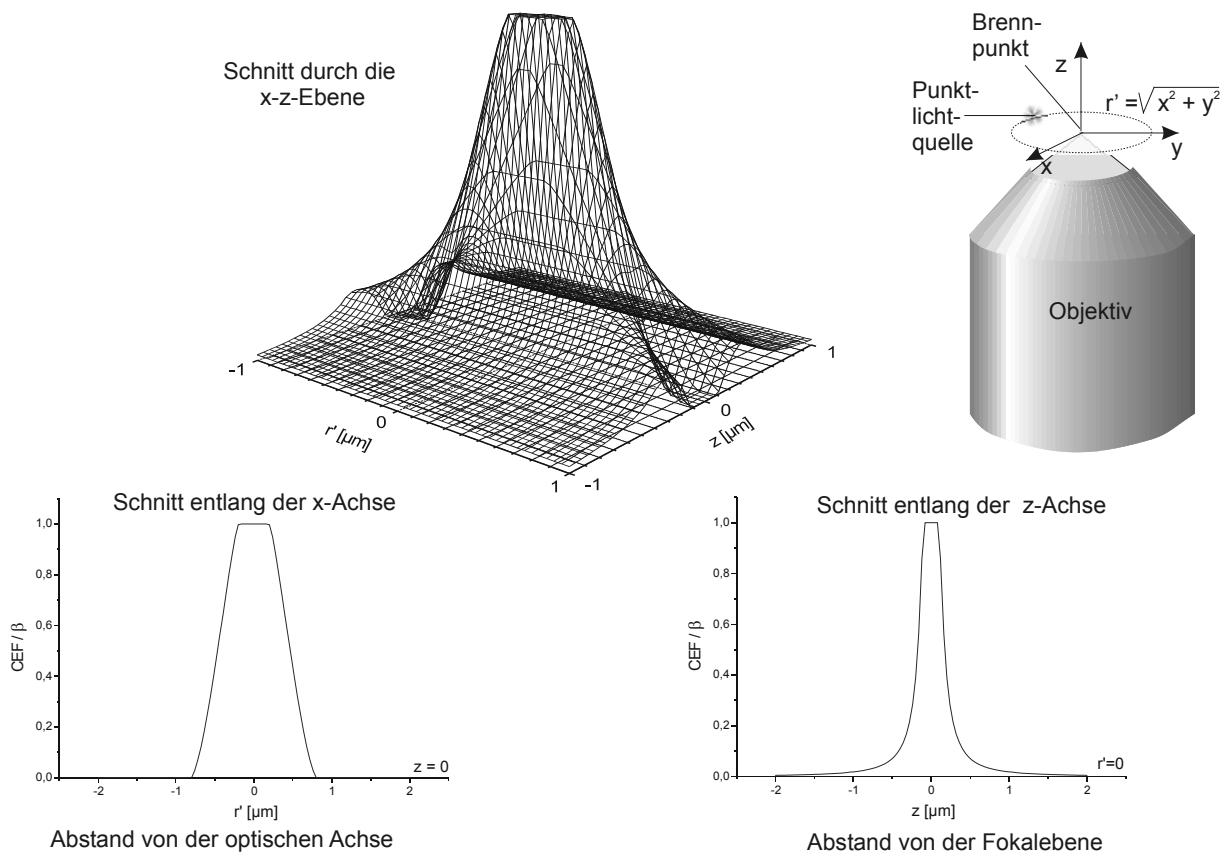


Abbildung 2.3.2-3 Sammeleffizienzfunktion in Abhängigkeit von der Position der Lichtquelle. Das Plateau um den Koordinatenursprung, der im Brennpunkt des Objektivs liegt entspricht dem Fall, bei dem das gesamte Bild des Leuchtpunktes in die Blendenöffnung fällt (Fall 1). Die CEF wurde nach Gl. 2.3.2-6 für $r_b = 50 \mu\text{m}$ (100 μm -Pinhole), 100x Objektiv 1,40 NA berechnet. Der Schnitt entlang der optischen Achse entspricht dem Fall 2a; der quer dazu dem Fall 2b der Gl. 2.3.2-6.

Abbildung 2.3.2-3 gibt die durch die Gleichungen 2.3.2-6 definierte Sammeleffizienzfunktion in Abhängigkeit von der Position der Punktlichtquelle graphisch wieder. Der Koordinatenursprung entspricht dem Brennpunkt des Objektivs.

Abschließend sei bemerkt, das die hier berechnete Sammeleffizienzfunktion rein geometrischer Natur ist. Sie gibt also nicht direkt die Wahrscheinlichkeit wieder, daß ein am Punkt (r',z) im Objektraum in zufälliger Richtung emittiertes Photon tatsächlich detektiert wird. Um diese Funktion zu erhalten, muß man die CEF mit den Transmissionswahrscheinlichkeiten der optischen Komponenten (Objektiv, Strahlteiler, Linsen und Emissionsfilter) für ein Photon der betrachteten Wellenlänge und mit der Quantenausbeute des Detektors multiplizieren. Da diese Faktoren jedoch ortsunabhängig sind, gibt die CEF relative Werte für die Detektionswahrscheinlichkeit wieder.

2.3.3 Detektionsempfindlichkeit

Die Detektionsempfindlichkeit ergibt sich aus dem Produkt von Anregungswahrscheinlichkeit der Moleküle, Fluoreszenzquantenausbeute und der Wahrscheinlichkeit das emittierte Photon zu detektieren.

Falls man deutlich unterhalb der Sättigungsintensität arbeitet, ist die Anregungswahrscheinlichkeit für ein bestimmtes Molekül der Anregungsleistung des Lasers proportional. Als ortsabhängige Detektionsempfindlichkeit, De , bleibt daher das Produkt aus der Anregungsintensität $I(r,z)$ und der Sammeleffizienz $CEF(r,z)$:

$$De(r,z) \propto I(r,z) \cdot CEF(r,z) \quad (2.3.3-1)$$

Arbeitet man oberhalb der Sättigungsintensität, gilt die Proportionalität für I nicht mehr. Abbildung 2.3.3-1 zeigt Schnitte durch das Detektionsvolumen für ein Ölimmersionsobjektiv ($n=1,5$) mit einer numerischen Apertur von 1,4 und einer 100- μm Lochblende ($r_b = 50\mu\text{m}$) vor dem Detektor bei einer Wellenlänge von 650 nm. Die Winkel δ ergeben sich aus dem Arcustangens des Quotienten aus Strahlradius und objektseitiger Brennweite des Objektivs. Für ein Objektiv mit dem Abbildungsmaßstab M bei einer Tubuslänge t gilt [Bergmann / Schäfer 1987]:

$$f_{\text{Objektiv,bildseitig}} = \frac{t}{M} = \frac{f_{\text{Objektiv,objektseitig}}}{n}$$

Die Tubuslänge des Mikroskops beträgt 160 mm, woraus sich für das Objektiv 1,6 mm bildseitige und 2,4 mm objektseitige Brennweite ergeben.

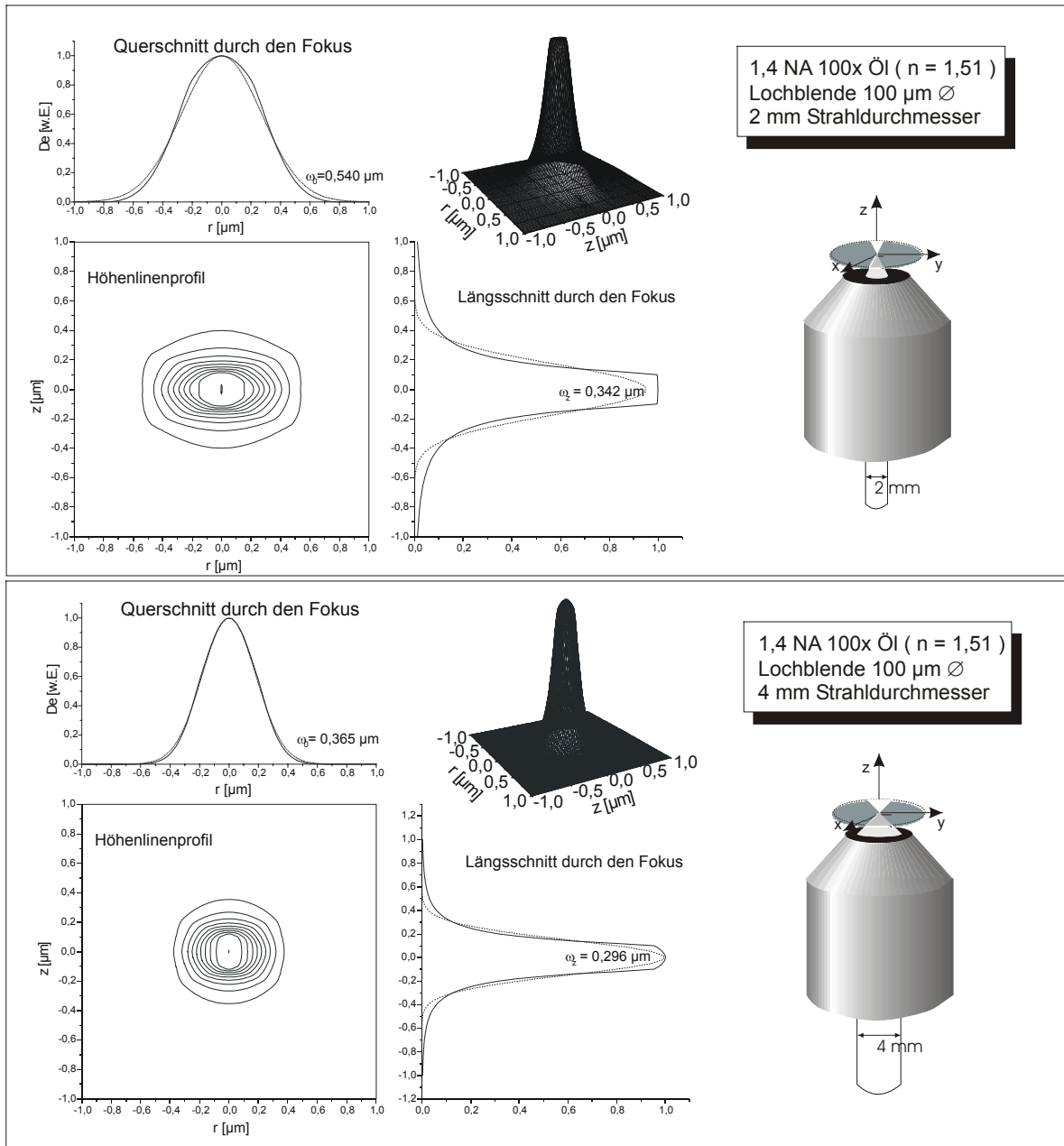


Abbildung 2.3.3-1 Detektionseffizienz als Funktion der Position des Fluorophors.

Die obere Hälfte zeigt die Empfindlichkeit der Apparatur bei einem Strahldurchmesser des Anregungslasers (e^{-2} Intensität) von 2mm die untere bei 4mm. Im zweiten Fall ist das Detektionsvolumen deutlich kleiner als im ersten. Außerdem verkleinert sich das Verhältnis von Länge zu Durchmesser mit wachsendem Strahldurchmesser. Die zugrundegelegte Wellenlänge beträgt 650 nm. Der Öffnungswinkel des Laserstrahls, δ , ergibt sich nach $\tan \delta = \text{Strahldurchmesser} / (2 \cdot \text{Objektivbrennweite})$. Die Detektionseffizienz ist durch Multiplikation der Gl. 2.3.1-1 (Anregungsintensität) mit der Gl. 2.3.2-6 an jedem Punkt des Objektraumes gegeben. Das Strahlprofil des Lasers wurde als zylindersymmetrisch angenommen, daher ist auch die Detektionsempfindlichkeit rotationssymmetrisch um die optische Achse (z-Koordinate). Die Flächen der Rotationskörper, die man erhält, wenn man die Höhenlinien um die z-Achse rotieren lässt stellen also Flächen dar, auf denen die Moleküle gleich hell detektiert werden. In der Mitte ist die Empfindlichkeit maximal. Die äußerste Linie entspricht 10% der maximalen Empfindlichkeit, die nächstinnere 20% usw.

Die Höhenlinien der Abbildung 2.3.3-1 kann man angenähert entweder als Rechtecke oder auch als Ellipsen ansehen. Rechteckige Höhenlinien ergeben zylinderförmige Rotationskörper, weshalb man auch von einem „quasizylindrischen“ Detektionsvolumen spricht [Kneipp 1998], [Rompae 2000].

Betrachtet man in die Höhenlinien als Ellipsen, kann man das Detektionsvolumen in allen drei Raumrichtungen als Gauss-förmig annehmen [Aragon 1976], [Widengren 1995], was die Voraussetzung für die in Abschnitt 2.6 angegebenen Formeln für die Autokorrelationsfunktion (Gleichungen 2.6.1-14 bis 2.6.1-18 und 2.6.2-14 und 2.6.2-15) ist:

Eine Ellipse in der r, z –Ebene ist durch die Gleichung $\left(\frac{r}{w_{xy}}\right)^2 + \left(\frac{z}{w_z}\right)^2 = const$ gegeben.

Offensichtlich wird diese Gleichung durch ein Produkt von Gaussfunktionen erfüllt:

$$\exp\left[-2\left(\frac{x}{\omega_{xy}}\right)^2\right] \cdot \exp\left[-2\left(\frac{y}{\omega_{xy}}\right)^2\right] \cdot \exp\left[-2\left(\frac{z}{\omega_z}\right)^2\right] = \exp\left\{-2\left[\frac{x^2 + y^2}{\omega_{xy}^2} + \left(\frac{z}{\omega_z}\right)^2\right]\right\}$$

Im Gegensatz zu den kreisförmigen Strahlquerschnitten von Gaslasern haben Diodenlaser elliptische Strahlprofile. Daher wird die Zylindersymmetrie gebrochen und $\omega_x = \omega_y$ gilt nicht mehr. Man erhält für alle drei Raumrichtungen eine Gaussfunktion mit jeweils einer anderen Breite.

$$De(x, y, z) \approx De_{\max} \exp\left\{-2\left[\left(\frac{x}{\omega_x}\right)^2 + \left(\frac{y}{\omega_y}\right)^2 + \left(\frac{z}{\omega_z}\right)^2\right]\right\} \quad (2.3.3-2)$$

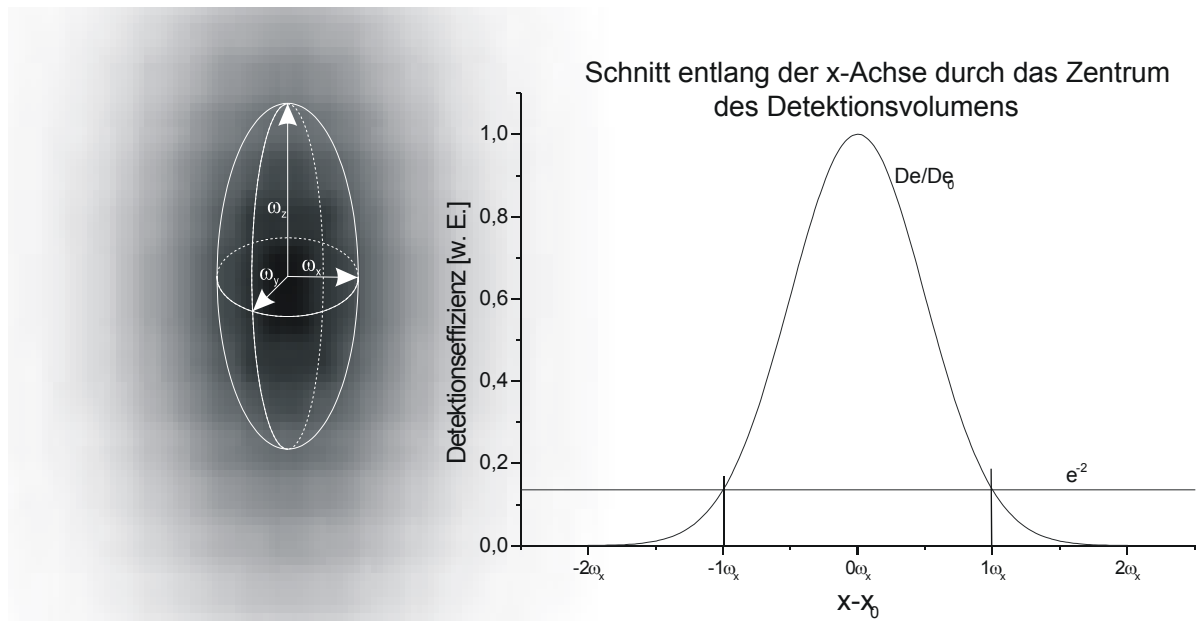


Abbildung 2.3.3-2 räumliche Darstellung des Detektionsvolumens

Im linken Teil der Abbildung ist die Detektionseffizienz in einer linearen Graustufenskala dargestellt. Weiß bedeutet keine Empfindlichkeit, schwarz maximale. Das Ellipsoid, an dessen Fläche die Detektionseffizienz auf $1/e^2$ des Maximalwertes abgefallen ist, wurde mit weißen Linien skizziert. Im rechten Teil der Abbildung ist die Detektionseffizienz entlang der x - Achse aufgetragen.

ω_z ist um so kleiner, je kleiner die Lochblende, je größer die numerische Apertur des Objektivs und je größer der mittlere Strahldurchmesser ist. ω_x und ω_y sind bei einem gegebenen Objektiv in erster Linie vom Strahldurchmesser in x- bzw. y-Richtung abhängig. Je dicker der Strahl, desto kleiner das Detektionsvolumen.

Auf der durch $1 = \left(\frac{x}{\omega_x}\right)^2 + \left(\frac{y}{\omega_y}\right)^2 + \left(\frac{z}{\omega_z}\right)^2$ definierten Ellipsoidfläche (Abbildung 2.3.3-2) ist die Detektionseffizienz auf $1/e^2$ des Maximums (im Fokus) abgefallen

Im oberen Fall der Abbildung 2.3.3-1 ergibt sich mit 2 mm Strahldurchmesser $\omega_{xy} \approx 540$ nm und $\omega_z \approx 342$ nm. Im unteren Teil ergibt sich mit 4 mm Strahldurchmesser $\omega_{xy} \approx 365$ nm und $\omega_z \approx 295$ nm.

Tatsächlich weist der Laserstrahl einen angenähert elliptischen Strahlquerschnitt mit einer langen Halbachse in x-Richtung von etwa 4mm und einer kurzen in y-Richtung von etwa 2mm auf. Damit ergibt sich als Abschätzung

$$\omega_x \approx 340 \text{ nm,}$$

$$\omega_y \approx 540,$$

$$\omega_z \approx 300 \text{ nm.}$$

Der Wert in z-Richtung fällt dabei deutlich zu klein aus (Kapitel 4.2.5). Er ergibt sich wegen der steilen Flanken durch einen least-square Fit einer Gausskurve an den Schnitt der Detektionseffizienz in z-Richtung (Abbildung 2.3.3-1).

2.4 Diffusion

Die Diffusionszeit der Moleküle durch das Detektionsvolumen stellt in Lösung bei nicht zu hoher Laserintensität normalerweise den limitierenden Faktor für die Beobachtungszeit dar. Die Ursache der Diffusion, die Brown'sche Molekularbewegung spielt eine bedeutende Rolle bei der mikroskopischen Bewegung der Teilchen. Die translatorische thermische Energie eines Partikels beträgt nach dem Gleichverteilungssatz $3/2 kT$, also etwa $4,1 \times 10^{-21}$ J bei 25°C . Aufgrund der kleinen Masse der Moleküle (z.B. $\text{Mr}121$ ($\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{N}_3\text{O}_3^+$), $m = 6,74 \times 10^{-24}$ kg) ergeben sich nach $v = (2E/m)^{1/2}$ große quadratisch gemittelte Geschwindigkeiten (ca. 25 m/s). In flüssiger Phase haben die Teilchen jedoch praktisch keine freie Weglänge, sie wechseln also ständig die Richtung. Von der rasanten Zitterbewegung des Teilchens in seinem Lösungsmittelkäfig bleibt nur eine quadratisch gemittelte Verschiebung von $2 \times (3 \times D \times t)^{1/2}$ (Gl.2.4.2-13), wobei D die Diffusionskonstante (ca. 5×10^{-11} m²/s) und t die Zeit ist. Um das kleine Detektionsvolumen mit Durchmessern d von ca. 10^{-6} m zu durchwandern braucht das Molekül bei rein diffusivem Transport also nur etwa $d^2/(12 \times D) = 10^{-12} \text{ m}^2 / (12 \times 5 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}) = 1,5$ ms.

2.4.1 Phänomenologische Beschreibung

Ist in einer Lösung ein Konzentrationsgradient gegeben, so baut sich dieser mit der Zeit nach dem zweiten Fickschen Gesetz ab:

$$\frac{dc}{dt} = D \text{div grad } c = D \Delta c = D \left(\frac{\partial^2 c}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 c}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 c}{\partial z^2} \right) \quad (2.4.1.1)$$

Die Proportionalitätskonstante D heißt Diffusionskoeffizient und hat die Dimension Länge²/Zeit.

Treibende Kraft der Diffusion ist die Zunahme der Entropie, bzw. durch das chemische Potential μ ausgedrückt, die Abnahme desselben. Der Gradient des chemischen Potentials hat die Dimension einer stoffmengenbezogenen Kraft [N/mol] "Thermodynamische Kraft" F_{TH}

$$\vec{F}_{TH} = -\text{grad } \mu \quad (2.4.1.2)$$

Damit sich die Konzentration zeitlich ändert muß ein Stofftransport stattfinden. Die Teilchen erfahren eine Reibungskraft, die sich diesem Strom entgegenstellt. In erster Näherung kann man ansetzen, daß die Reibungskraft F_R der Teilchengeschwindigkeit v proportional ist.

$$\vec{F}_R = -\zeta \vec{v} \quad (2.4.1.3)$$

Führt man die Stoffmengenstromdichte $j = \Delta N / (N_A A \Delta t)$ (Zahl der durchtretenden Teilchen / (Avogadrokonstante \times Fläche \times Zeit)) ein, so läßt sich die Geschwindigkeit substituieren:

$$\vec{j} = c \vec{v}$$

$$\vec{F}_R = -\frac{\xi}{c} \vec{j} \quad (2.4.1.4)$$

Dabei ist c die Konzentration.

Im Gleichgewicht, bei konstanter Wanderungsgeschwindigkeit, gleichen sich beide Kräfte aus. Da F_{TH} stoffmengenbezogen, F_R nach Gl. 2.4.1.3 jedoch teilchenbezogen ist, muß man F_{TH} durch die Avogadro-Konstante dividieren, bevor beide Kräfte gleich gesetzt werden.

$$\vec{F}_R = \frac{1}{N_A} \vec{F}_{TH} \quad (2.4.1.5)$$

Zwischen dem chemischen Potential μ und der Aktivität a besteht ein Zusammenhang:

$$\mu = \mu^\ominus + RT \ln a \quad (2.4.1.6)$$

Dabei ist μ^\ominus das Standardpotential, R die Gaskonstante und T die Temperatur. In ideal verdünnten Lösungen kann die Aktivität a näherungsweise durch die Konzentration c/c^\ominus substituiert werden, wobei c^\ominus die Standardkonzentration ist. Damit ergibt sich:

$$\begin{aligned} \vec{F}_{TH} &= -\text{grad} \left(\mu^\ominus + RT \ln \frac{c}{c^\ominus} \right) = -RT \text{grad} \left(\ln \frac{c}{c^\ominus} \right) = -RT \frac{c^\ominus}{c} \text{grad} \left(\frac{c}{c^\ominus} \right) \\ \vec{F}_{TH} &= -\frac{RT}{c} \text{grad}(c) \end{aligned} \quad (2.4.1.7)$$

Setzt man die Gleichungen 2.4.1.4 und 2.4.1.7 in Gl. 2.4.1.5 ein, so erhält man mit der Boltzmann-Konstante $k = R/N_A$:

$$\frac{\xi}{c} \vec{j} = -\frac{1}{N_A} \frac{RT}{c} \text{grad}(c)$$

Nach Kürzen durch c :

$$\xi \vec{j} = kT \text{grad}(c) \quad (2.4.1.6)$$

Diese Gleichung ist das erste Ficksche Gesetz. Bildet man davon die Divergenz, so erhält man mit dem Laplace-Operator $\Delta = \text{div grad}$:

$$\xi \text{div}(\vec{j}) = kT \Delta(c) \quad (2.4.1.7)$$

Da die Teilchenzahl bei der Diffusion eine Erhaltungsgröße ist, gilt:

$$\text{div}(\vec{j}) = -\frac{dc}{dt} \quad (2.4.1.8)$$

Damit geht Gleichung 2.4.1.7 in das zweite Ficksche Gesetz (Gl. 2.4.1.1) über:

$$\frac{dc}{dt} = \frac{kT}{\xi} \Delta(c) = D\Delta(c) \quad (2.4.1.9)$$

Bei kugelförmigen Teilchen mit Radius r in einem Lösungsmittel der Viskosität η läßt sich der Reibungsparameter ξ aus dem Stokes-Gesetz (2.4.1.10) berechnen:

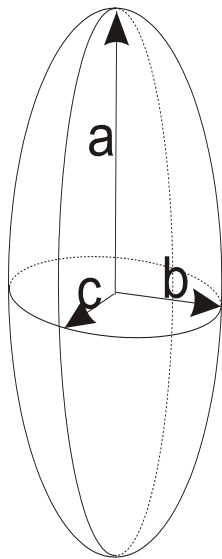
$$F_R = -6\pi\eta r \vec{v} \quad (2.4.1.10)$$

Das liefert für den Diffusionsquotienten:

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta r} \quad (2.4.1.11)$$

Diese Beziehung ist die Stokes-Einstein-Gleichung.

Für nicht kugelförmige Moleküle wird statt des Molekülradius ein Effektivradius in Gl. 2.4.1.11 eingesetzt. Tabelle 2.4.1-1 gibt die Formeln zur Berechnung des Effektivradius für zwei Ellipsoide an.



	b	r_{effektiv}
Kugel $a=b=c$	a	b
gestrecktes Ellipsoid $a \gg b > c$	$\sqrt[3]{ac^2}$	$\frac{\sqrt{1 - \frac{c^2}{a^2}}}{\left(\frac{c}{a}\right)^{\frac{2}{3}} \left[\ln \left(1 + \sqrt{1 - \frac{c^2}{a^2}} \right) - \ln \frac{c}{a} \right]} b$
kurzes Ellipsoid $a > b \gg c$	$\sqrt[3]{a^2c}$	$\frac{\sqrt{\frac{a^2}{c^2} - 1}}{\left(\frac{a}{c}\right)^{\frac{2}{3}} \arctan \sqrt{\frac{a^2}{c^2} - 1}} b$

Tab. 2.4.1-1 Korrekturfaktoren in der Stokes-Einstein-Gleichung für Elliptische Moleküle. (Übernommen aus [Atkins 1990]). a bezeichnet die lange, b die mittlere und c die kurze Halbachse. In der Stokes-Einstein-Gleichung ist für r der Wert von r_{effektiv} einzusetzen.

2.4.2 Irrfahrtsprozeß als statistisches Modell

Die Grundidee des Irrfahrtsprozesses („random walk“), ist, daß die Moleküle zufällige Bewegungen ausführen. Man erhält numerisch durch Monte-Carlo-Simulation einen Satz zufällig erzeugter Trajektorien, die statistisch ausgewertet werden. Alternativ können durch theoretische Analyse des Modells Differentialgleichungen erhalten werden, die unter

Umständen sogar analytisch gelöst werden können [Courant 1928]. Am einfachsten ist die Annahme, die Moleküle hüpfen nach einer festgelegten Zeit um einen konstanten Betrag in zufälliger Richtung parallel zu einer der drei Koordinatenachsen. Das entspricht der zufälligen Bewegung des Teilchens in einem kartesischen Gitter. Es gibt jedoch auch Modelle, die ohne ein starres Gitter auskommen (z.B. [Siegel 1986]). Da die Bewegung entlang der drei orthogonalen Richtungen unabhängig voneinander ist, kann man das dreidimensionale Problem in drei eindimensionale separieren. Wir betrachten ein Molekül, das zum Zeitpunkt $t=0$ bei $x=0$ startet. Nach jeweils der Zeit t_s springt das Teilchen um den Betrag x_s , wobei jedoch zufällig ist, ob es nach links oder nach rechts hüpfet (Abbildung 2.4.2-1)

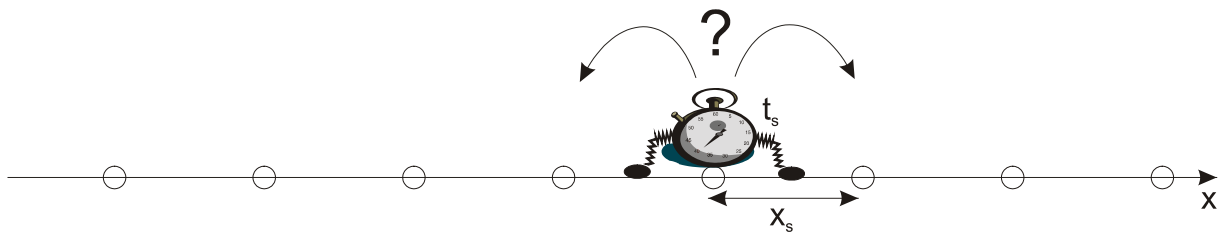


Abbildung 2.4.2-1 Irrfahrtsprozeß

Das Molekül springt nach der Zeit t_s um die Wegstrecke x_s . Dabei ist es jedoch Zufall, ob der Sprung nach links oder nach rechts erfolgt.

Nach der Zeit t hat das Molekül

$$N = t/t_s \quad (2.4.2-1)$$

Sprünge vollführt. Wenn von diesen N Sprüngen N_R nach rechts erfolgt sind und $N-N_R$ nach links, so hat das Teilchen anschließend die Position

$$x = x_s N_R - (N - N_R) x_s = (2N_R - N) x_s. \quad (2.4.2-2)$$

Da die Sprünge unabhängig voneinander und immer entweder nach links oder nach rechts erfolgen, handelt es sich bei diesem Zufallsexperiment um eine Bernoulli-Kette. Die Zahl der Sprünge nach rechts ist also Binomialverteilt. Da der Sprung mit gleicher Wahrscheinlichkeit nach links oder rechts erfolgen soll, ist $p=q=1/2$.

$$W(N_R) = \frac{N!}{N_R!(N - N_R)!} \left(\frac{1}{2}\right)^N \quad (2.4.2-3)$$

Da das Molekül ständig in Kontakt mit seinen Nachbarn ist und herumgestoßen wird, läuft t_s gegen Null und N gegen unendlich. Für große N kann man aber die Binomialverteilung durch die Normalverteilung ersetzen. Damit erhält man mit $\mu = Np = 0.5N$ und $\sigma^2 = Npq = N/4$

$$W(N_R) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \frac{2}{\sqrt{N}} e^{-\frac{1}{2} \left(\frac{N_R - \frac{1}{2}N}{\frac{1}{2}\sqrt{N}} \right)^2} = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \frac{2}{\sqrt{N}} e^{-\frac{1}{2} \left(\frac{2N_R - N}{\sqrt{N}} \right)^2} \quad (2.4.2-4)$$

Substituiert man in dieser Gleichung N durch t/t_s sowie $2N_R - N$ durch x/x_s so erhält man mit $N_R = \frac{1}{2}(x/x_s + t/t_s)$:

$$W\left(\frac{1}{2}\left(\frac{x}{x_s} + \frac{t}{t_s}\right)\right) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \frac{2}{\sqrt{t/t_s}} e^{-\frac{1}{2}\left(\frac{x/x_s}{\sqrt{t/t_s}}\right)^2}$$

Um die Wahrscheinlichkeitsdichte von x zu bekommen, muß man gemäß $W(y(x))dy = W(x)dx$ die Wahrscheinlichkeitsdichte mit der Ableitung dN_R/dx multiplizieren:

$$W(x) = \frac{1}{2x_s} \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \frac{2}{\sqrt{t/t_s}} e^{-\frac{1}{2}\left(\frac{x/x_s}{\sqrt{t/t_s}}\right)^2}$$

$$W(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \frac{1}{\sqrt{t \frac{x_s^2}{t_s}}} \exp\left[-\frac{1}{2}\left(\frac{x}{\sqrt{t \frac{x_s^2}{t_s}}}\right)^2\right] \quad (2.4.2-5)$$

Das ist eine auf den Startpunkt zentrierte Gaußkurve, deren Breite mit $t^{1/2}$ anwächst.

Da das Ergebnis in y - und z - Richtung aufgrund der Isotropie des Raumes analog zu Gl. 2.4.2-5 sein muß, erhält man mit $W(x,y,z)dV = W(x) dx W(y)dy W(z)dz$:

$$W(x,y,z)dV = \frac{1}{(2\pi)^{3/2}} \frac{1}{\left(t \frac{x_s^2}{t_s}\right)^{3/2}} \exp\left[-\frac{1}{2} \frac{x^2 + y^2 + z^2}{t \frac{x_s^2}{t_s}}\right] dx dy dz \quad (2.4.2-6)$$

$W(x,y,z) dV$ ist die Wahrscheinlichkeit, das Molekül im Volumenelement dV um den Ort (x,y,z) zu finden. W ist damit auf Einzelmolekülebene das Analogon zur Teilchenzahldichte im Ensemble. Gleichung 2.4.2-5 muß daher das zweite Ficksche Gesetz erfüllen, also eine Lösung der Differentialgleichung 2.4.1-9 sein.

Mit

$$\Delta W = \frac{W}{t \frac{x_s^2}{t_s}} \left[\frac{x^2 + y^2 + z^2}{t \frac{x_s^2}{t_s}} - 3 \right] \quad \text{und} \quad \frac{dW}{dt} = \frac{W}{2t} \left[\frac{x^2 + y^2 + z^2}{t \frac{x_s^2}{t_s}} - 3 \right] \quad \text{folgt:}$$

$$D \frac{W}{t \frac{x_s^2}{t_s}} \left[\frac{x^2 + y^2 + z^2}{t \frac{x_s^2}{t_s}} - 3 \right] = \frac{W}{2t} \left[\frac{x^2 + y^2 + z^2}{t \frac{x_s^2}{t_s}} - 3 \right], \quad \text{bzw. nach kürzen} \quad D \frac{1}{x_s^2/t_s} = \frac{1}{2}.$$

$$D = \frac{x_s^2}{2t_s} \quad (2.4.2-7)$$

Damit lassen sich in den Gleichungen 2.4.2-5 und 2.4.2-6 die Sprungweite x_s und die Sprungzeit t_s durch die Diffusionskonstante ersetzen:

$$W(x)dx = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \frac{1}{\sqrt{2Dt}} \exp\left[-\frac{1}{2}\left(\frac{x}{\sqrt{2Dt}}\right)^2\right] dx = \frac{1}{2\sqrt{\pi Dt}} e^{-\frac{x^2}{4Dt}} \quad (2.4.2-8)$$

$$W(x, y, z)dV = \frac{1}{8(\pi Dt)^{3/2}} \exp\left[-\frac{x^2 + y^2 + z^2}{4Dt}\right] dx dy dz \quad (2.4.2-9)$$

Diese Funktion ist Kugelsymmetrisch. Mit $dV=4\pi r^2 dr$ kann man die Wahrscheinlichkeit angeben, das Molekül nach einer Zeit t im Abstand r zu finden:

$$W(r)dr = \frac{r^2}{2\sqrt{\pi}(Dt)^{3/2}} \exp\left[-\frac{r^2}{4Dt}\right] dr \quad (2.4.2-10)$$

Durch Ableiten von Gl. 2.4.2-10 nach r und Nullsetzen ergibt sich für den wahrscheinlichsten Abstand r^* des Moleküls vom Startpunkt bei Diffusion in allen drei Raumrichtungen:

$$\frac{dW(r)}{dr} = W(r) \left(\frac{2}{r} - \frac{r}{2Dt} \right)$$

$$r^* = 2\sqrt{Dt} \quad (2.4.2-11)$$

Für den mittleren Abstand ergibt sich nach $\langle r \rangle = \int_0^\infty rW(r)dr$

$$\langle r \rangle = \frac{4}{\sqrt{\pi}} \sqrt{Dt} \quad (2.4.2-12)$$

Für den Quadratisch gemittelten Abstand ergibt sich mit $\langle r^2 \rangle = \int_0^\infty r^2 W(r)dr$;

$$\langle r^2 \rangle^{1/2} = 2\sqrt{3}\sqrt{Dt} \quad (2.4.2-13)$$

Ist die Diffusion auf eine Ebene, also z.B. auf einen dünnen Flüssigkeitsfilm oder eine Membran beschränkt erhält man Analog zu den Gleichungen 2.4.2-9 – 2.4.2-13:

$$W(x, y)dA = \frac{1}{4\pi Dt} \exp\left[-\frac{x^2 + y^2}{4Dt}\right] dx dy \quad (2.4.2-9_{\text{Ebene}})$$

$W(x,y)dA$ stellt dabei die Wahrscheinlichkeit dar, das Molekül im Flächenelement dA zu finden. Der Abstand zum Startpunkt ist durch $\rho = \sqrt{x^2 + y^2}$ gegeben. Mit $dA=2\pi\rho d\rho$ ergibt sich damit:

$$W(\rho)d\rho = \frac{\rho}{2Dt} \exp\left[-\frac{\rho^2}{4Dt}\right] d\rho \quad (2.4.2-10_{\text{Ebene}})$$

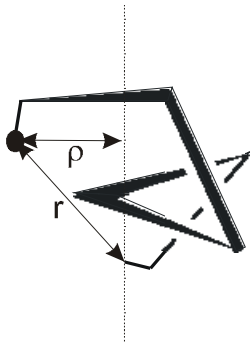
Für den wahrscheinlichsten Abstand des Moleküls vom Startpunkt in der Ebene ρ^* folgt mit

$$\frac{dW}{d\rho} = W\left(\frac{1}{\rho} - \frac{2\rho}{4Dt}\right):$$

$$\rho^* = \sqrt{2}\sqrt{Dt} \quad (2.4.2-11_{\text{Ebene}})$$

$$\langle \rho \rangle = \sqrt{\pi}\sqrt{Dt} \quad (2.4.2-12_{\text{Ebene}})$$

$$\langle \rho^2 \rangle^{1/2} = 2\sqrt{Dt} \quad (2.4.2-13_{\text{Ebene}})$$



Man kann die Gleichungen auch für dreidimensionale Probleme anwenden: Startet das Molekül beispielsweise im Fokus, so gibt ρ den Abstand zur optischen Achse an (s. Abbildung rechts).

2.4.3 Anwendungen

Man kann mit diesen Methoden Aussagen über die Verteilungsfunktion der Fluoreszenzereignisbreiten [Ko 1997], über die Wiedereintrittswahrscheinlichkeit und damit über die Abstandsverteilung der Ereignisse [Chiu 1996], [Fister 1998] und über den Verlauf der Autokorrelationsfunktion des Detektorsignals (s. Abschnitt 2.5) machen.

2.4.3.1 Fluoreszenzereignisbreite

Bei Kenntnis der Größe des Detektionsvolumens kann man nicht nur aus der Analyse der Autokorrelationsfunktion, sondern auch aus der Verteilungsfunktion der Fluoreszenzereignisbreite auf die Diffusionskonstante schließen [Ko 1997].

Die Ereignisbreite eines Moleküls, das während des Aufenthalts im Detektionsvolumens nicht photozerstört wird, ist durch die Wahrscheinlichkeitsverteilung des Erstdurchtritts durch die Grenze des Detektionsvolumens gegeben. Die Grenze des Detektionsvolumens ist durch diejenige Fläche gegeben, an der die Detektionseffizienz soweit abgesunken ist, daß die Zählrate die Startschwelle der Fluoreszenzereigniserkennung (s. Abschnitt 2.7) unterschreitet.

Zur Vereinfachung wird angenommen, daß das Detektionsvolumen durch einen langgestreckten Zylinder gegeben ist. Dann ist die Austrittswahrscheinlichkeit durch die Deckel- und Bodenfläche vernachlässigbar gegen die Austrittswahrscheinlichkeit durch die Mantelfläche und man kann das Problem zweidimensional behandeln. Der Radius des Zylinders betrage ω_0 und die Höhe $2z_0$, wobei $z_0 \gg \omega_0$.

Das Molekül befinde sich zum Zeitpunkt 0 im Abstand r vom Zentrum des Detektionsvolumens. Die kumulative Erstdurchtrittswahrscheinlichkeit $P(r,t)$ („cumulative first passage time distribution function, PTFD“), gibt die Wahrscheinlichkeit dafür an, daß ein Molekül, welches bei $t=0$ im Abstand r vom Zentrum war, bis zum Zeitpunkt t die Grenze des Detektionsvolumens mindestens einmal überquert hat.

Man kann zeigen, daß $P(r,t)$ die Diffusionsgleichung, Gl. 2.4.1-1 erfüllen muß [Siegel 1986]:

$$\frac{\partial P}{\partial t} = D \nabla^2 P \quad (2.4.3.1-1)$$

Um die ortsabhängige Funktion berechnen zu können, muß zunächst der Laplace-Operator in Polarkoordinaten ausgedrückt werden. Es gilt:

$$\nabla^2 \Psi = \frac{\partial^2 \Psi}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial \Psi}{\partial r} + \frac{1}{r^2} \frac{\partial^2 \Psi}{\partial \varphi^2}$$

Da aufgrund der Zylindersymmetrie die Funktion winkelunabhängig ist, fällt der dritte Summand weg ($d\Psi/d\varphi=0$). Man erhält damit für die Differentialgleichung:

$$\frac{\partial P}{\partial t} = D \left(\frac{\partial^2 \Psi}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial \Psi}{\partial r} \right) \quad (2.4.3.1-2)$$

Berücksichtigt man die Randbedingungen des Systems, welche besagen, daß für ein Molekül auf der Randlinie die kumulative Erstdurchtrittswahrscheinlichkeit eins ist

$$P(\omega_0, t) = 1$$

und daß für ein Molekül im Inneren des Detektionsvolumens zum Zeitpunkt 0 die kumulative Erstdurchtrittswahrscheinlichkeit null ist

$$P(r, t=0) = 0 \quad (r < \omega_0)$$

, so erhält man als Lösung für das System [Crank 1975]:

$$P(r, t) = 1 - 2 \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{\alpha_n} \frac{J_0\left(\frac{r}{\omega_0} \alpha_n\right)}{J_1(\alpha_n)} \exp\left(-\frac{\alpha_n^2 D}{\omega_0^2} t\right) \quad (2.4.3.1-3)$$

α_n ist die n-te Nullstelle der Besselfunktion erster Gattung nullter Ordnung, d.h. $J_0(\alpha_n)=0$. J_1 ist entsprechend die Besselfunktion erster Gattung erster Ordnung (s. Abbildung 2.4.3.1.-1). Diese Besselfunktionen sind durch

$$J_0(x) = \frac{2}{\pi} \int_0^{\pi/2} \cos(x \sin \varphi) d\varphi \quad \text{und} \quad J_1(x) = \frac{2}{\pi} \int_0^{\pi/2} \sin(x \sin \varphi) \sin(\varphi) d\varphi$$

gegeben [Bronstein 2001, S. 528].

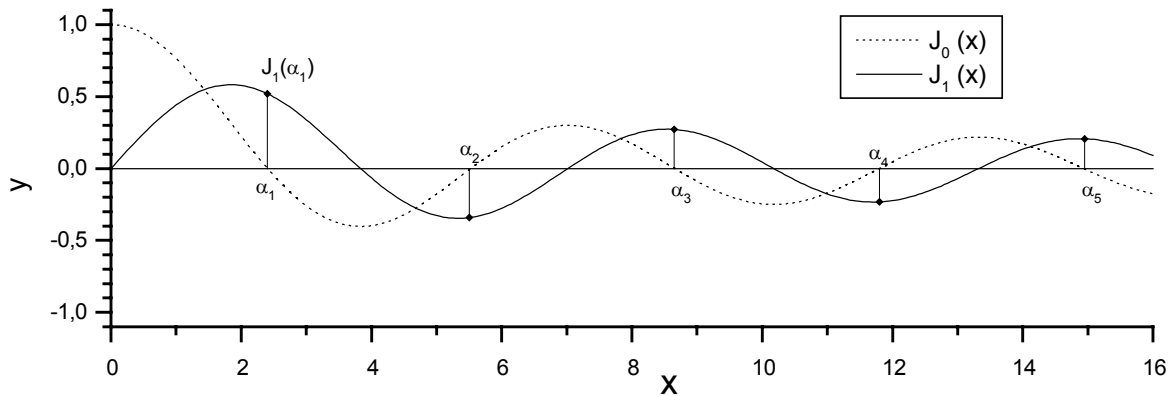


Abbildung 2.4.3.1-1 Besselfunktionen der Ordnungen 0 und 1

Die Besselfunktionen zeigen einen oszillierenden Verlauf. Die Besselfunktion der Ordnung Null, J_0 ist gerade, während die Funktion der Ordnung 1 ungerade ist. Die α_n sind die Nullstellen von J_0 .

Die mittlere Zeit \bar{t} quer, die ein Molekül braucht um von einem Punkt im Abstand r von der Kreismitte zum Rand des Kreises ω_0 zu gelangen ist durch (Gl. 2.4.3.1-4) gegeben:

$$\bar{t}(r) = \frac{\omega_0^2 - r^2}{4D} \quad (2.4.3.1-4)$$

Für ein Molekül, das aus der Mitte des Detektionsvolumens kommt, ist $r=0$. Mit $J_0(0)=1$ erhält man daher:

$$P(0,t) = 1 - 2 \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{\alpha_n} \frac{1}{J_1(\alpha_n)} \exp\left(-\frac{\alpha_n^2 D}{\omega_0^2} t\right) \quad (2.4.3.1-5)$$

Für die mittlere Zeit \bar{t} quer, die ein Molekül braucht um aus der Mitte zum Rand zu kommen, ergibt sich:

$$\bar{t}(r=0) = \frac{\omega_0^2}{4D} \quad (2.4.3.1-6)$$

Das selbe Ergebnis erhält man, wenn man in Gleichung 2.4.2-13_{Ebene} für $\langle r^2 \rangle = \omega_0^2$ einsetzt und nach t auflöst.

Um die Erstdurchtrittszeitverteilungsfunktion („first passage time distribution function“, PTDF) also die Wahrscheinlichkeit dafür zu erhalten, daß ein Molekül aus der Kreismitte innerhalb eines Zeitraumes dt um t die Kreislinie erstmals übertritt, muß die kumulative Funktion der Gl.2.4.3.1-5 nach t differenziert werden. Man erhält:

$$PTDF(t) = \sum_{n=1}^{\infty} \frac{2\alpha_n D}{\omega_0^2 J_1(\alpha_n)} \exp\left(-\frac{\alpha_n^2 D}{\omega_0^2} t\right) \quad (2.4.3.1-7)$$

Die PTFD(t) gibt die Wahrscheinlichkeitsdichte dafür an, daß ein Molekül aus der Mitte den Rand des Detektionsvolumens nach der Zeit t erreicht. Da ein Ereignis aber nicht mit damit beginnt, daß das Molekül in der Mitte des Detektionsvolumens ist, sondern das Molekül zunächst vom Rand des Detektionsvolumens ins Zentrum gelangen muß, um es anschließend wieder über den Rand zu verlassen, stellt t die halbe Ereignisbreite τ dar. Mit $\tau=2t$ und $d\tau/2=dt$ erhält man als Verteilungsfunktion der Ereignisbreite bei einem Durchtritt durch das Zentrum

$$W(\tau)d\tau = \sum_{n=1}^n \left[\frac{\alpha_n D}{\omega_0^2 J_1(\alpha_n)} \exp\left(-\frac{\alpha_n^2 D}{2\omega_0^2} \tau\right) \right] d\tau \quad (2.4.3.1-8)$$

Da die α_n rasch anwachsen ($\alpha_0=2,406$; $\alpha_1=5,521$; $\alpha_3=5,603$; ...) fällt der Exponentialterm $\exp(-\alpha_n^2 D \tau / (2\omega_0^2))$ für große und mittlere Zeiten extrem schnell ab. Man kann daher, außer für $\tau \ll D/(2\omega_0^2)$, die Reihe nach dem ersten Glied abbrechen.

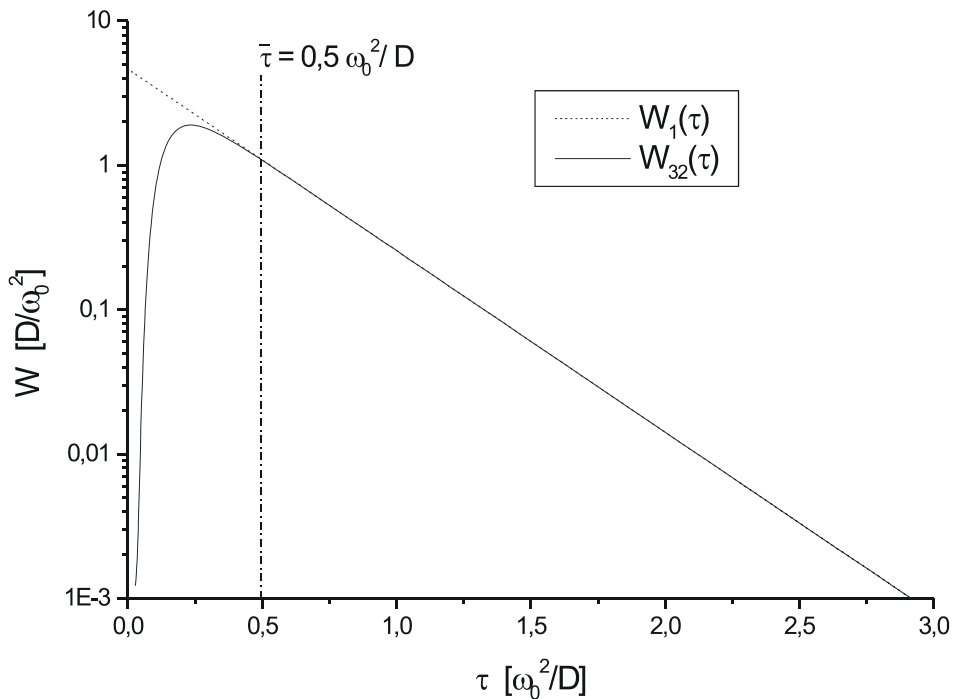


Abbildung 2.4.3.1-1 Verteilungsfunktion der Fluoreszenzereignisbreite

Moleküle, die durch das Zentrum des Detektionsvolumens diffundieren, haben die abgebildete Verteilungsfunktion der Ereignisbreite, falls man das Detektionsvolumen als langgestreckten Zylinder betrachten kann. W_1 bedeutet, daß die Reihe der Gl. 2.4.3.1-8 nach dem ersten Glied abgebrochen wurde, W_{32} gibt die Funktion an, wenn die Reihe nach dem 32ten Glied abgebrochen wird. Ab etwa dem 12ten Glied ist keine Veränderung mehr sichtbar. Mit $\alpha_{32} = 99,75$ tragen die höheren Glieder für $\tau > 0,001 \omega_0^2/D$ nichts mehr bei.

Für große τ erhält man daher eine monoexponentiell abfallende Funktion:

$$W(\tau) = W_0 \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_0}\right) \text{ mit } \tau_0 = \frac{2\omega_0^2}{\alpha_1^2 D} \text{ und } W_0 = \frac{\alpha_1}{J_1(\alpha_1)} \frac{D}{\omega_0^2}$$

Ein Molekül, das nicht bis zur Mitte des Detektionsvolumens vordringt, hat eine kürzere Verweildauer. Die Ereignisbreitenverteilung ist entsprechend zu kürzeren Zeiten verschoben. Abbildung 2.4.3.1-2 zeigt die Ereignisbreitenverteilung in Abhängigkeit von der Eindringtiefe.

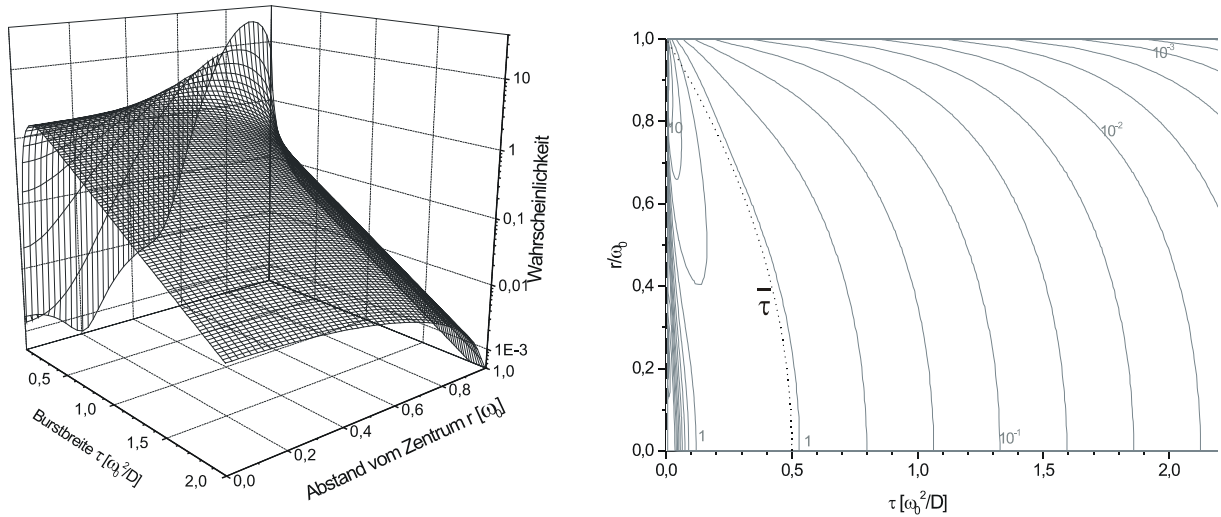


Abbildung 2.4.3.1-2 Fluoreszenzereignisbreitenverteilung in Abhängigkeit von der Eindringtiefe
 Je näher die Moleküle dem Zentrum kommen, desto breiter werden die Ereignisse. Die Verteilungsfunktion ist sowohl links als auch rechts logarithmisch aufgetragen. Im rechten Teil der Abbildung ist ein Höhenliniendiagramm dargestellt, in das die mittlere Verweildauer τ quer bei verschiedenen Eindringtiefen eingezeichnet wurde. Wie man der Abbildung entnehmen kann, ist der Effekt auf Moleküle die zwischen etwa 80 % und 100 % Eindringtiefe ($r/\omega_0 = 0,2 - 1$) nur gering; solche Moleküle sollten also in etwa gleich breite Ereignisse liefern.

Die mittlere Fluoreszenzereignisbreite nimmt zum Rand hin quadratisch ab:

$$\bar{\tau} = 2\bar{l} = \frac{\omega_0^2}{2D} \left(1 - \frac{r^2}{\omega_0^2} \right) \tag{2.4.3.1-9}$$

Um die Gesamtverteilung der Fluoreszenzereignisbreiten zu beschreiben, braucht man noch die Verteilungsfunktion der Eindringtiefen. Um eine Vorstellung davon zu erhalten, wurde eine Monte-Carlo-Simulation ohne festes Gitter vorgenommen. Wie Abbildung 2.4.3.1-3 illustriert, startet das Molekül bei $t=0$ am Rand des Detektionsvolumens, im Punkt $(x=\omega_0, y=0)$ in kartesischen Koordinaten bzw. $(\rho=\omega_0, \varphi=0)$ in Polarkoordinaten. Das Molekül führt anschließend in festen zeitlichen Abständen t_s Sprünge in x- und in y- Richtung aus. Die Sprungweite in jeder Richtung wird dabei durch je eine normalverteilte

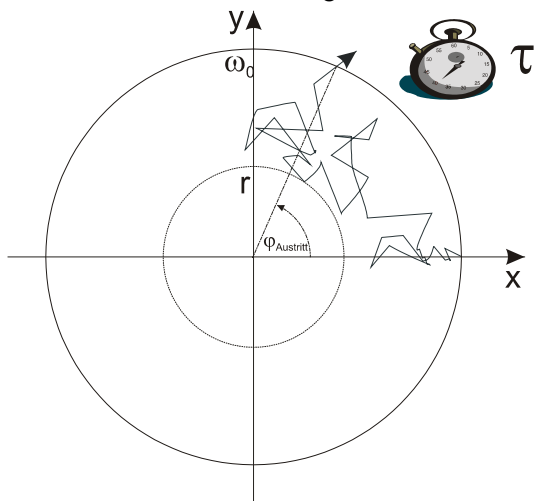


Abbildung 2.4.3.1-3 Monte-Carlo-Simulation

Zufallsvariable $W(s) \propto \exp\left(-\left(\frac{s-\mu}{\sigma}\right)^2\right)$ [Wohland 2001] mit $\mu=0$ und $\sigma=2(Dt_s)^{1/2}$ (Gl. 2.4.2-8)

gegeben. Dies hat gegenüber dem starren Gitter mit gleichverteilter Sprungwahrscheinlichkeit in jeder Richtung (Abschnitts 2.4.2) den Vorteil, daß viel weniger Sprünge simuliert werden müssen, daß also t_s größer gewählt werden darf.

Sobald sich das Molekül weiter als ω_0 vom Koordinatenursprung entfernt, endet die Simulation des Ereignisses. Während der Simulation wird der minimale Abstand zum Koordinatenursprung festgehalten. Dieser Wert entspricht dem gesuchten r . Außerdem wird

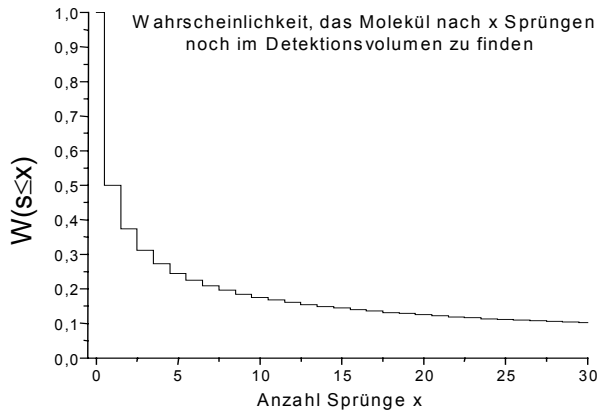


Abbildung 2.4.3.1-4 kumulative Dichtefunktion der Austrittswahrscheinlichkeit.

die Zahl der Sprünge bis zum Austritt und die Azimut-Koordinate des Austrittspunktes $\varphi_{\text{Austritt}}$ festgehalten. Anschließend beginnt das nächste Ereignis wieder bei $(x=\omega_0, y=0)$. Das wird wiederholt, bis eine bestimmte Anzahl simulierter Ereignisse erreicht ist. In der Simulation wurde $t_s = \sigma^2/4D$ so gewählt, daß $\sigma = 10^{-3} \omega_0$.

Wie nicht anders zu erwarten, läuft die Hälfte der Moleküle in die falsche Richtung, diese „Ereignisse“ enden also bereits mit dem ersten Sprung. Nach 30 Sprüngen befinden sich noch 10,2% der

2×10^6 simulierten Ereignisse im Detektionsvolumen, nach 100 Sprüngen noch 5,6% (Abbildung 2.4.3.1-4).

Für die Simulation der Eindringtiefe, der Ereignisbreite und des Austrittswinkels (Abbildung 2.4.3.1-5) wurden nur solche Moleküle ausgewertet, die zunächst in das Detektionsvolumen hindiffundieren.

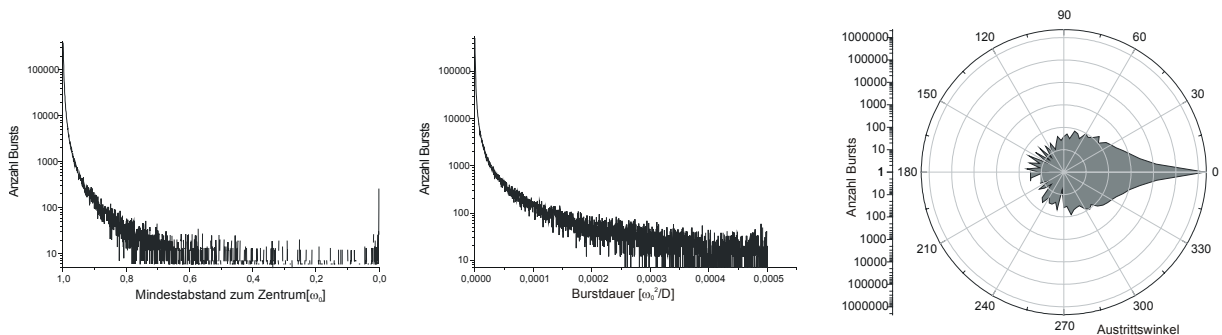


Abbildung 2.4.3.1-5 Monte-Carlo-Simulation

Es wurden 2×10^6 Ereignisse mit normalverteilten Sprungweiten ($\sigma = 0,001 \omega_0$) in der x - y -Ebene simuliert. Links ist die Verteilungsfunktion der Eindringtiefe dargestellt. Ein Wert von 1 bedeutet dabei, daß das Molekül nicht eindringt ein Wert von 0, daß es bis ins Zentrum kommt. Die Ereignisdauer ist in der Mitte wiedergegeben, der Austrittswinkel (vgl. Abb.2.4.3.1-3) rechts. Alle Verteilungsfunktionen sind zur besseren Darstellung logarithmisch aufgetragen.

Zunächst fällt auf, daß die überwältigende Mehrzahl der Moleküle das Detektionsvolumen nur am Rand streift. 90% der simulierten 2000000 Molekültrajektorien, die ins Detektionsvolumen eintreten, kommen dem Zentrum nicht näher als $0,987 \omega_0$, 99% nicht näher als $0,872 \omega_0$. Nur 0,05% der Ereignisse kommen dem Zentrum näher als $0,1 \omega_0$ und

0,11% näher als $0,3 \omega_0$. Entsprechend sind die meisten Ereignisse nur von kurzer Dauer (Abb. 2.4.3.1-5, Mitte) und nur sehr wenige treten an einer anderen Seite des Detektionsvolumens aus, als sie eingetreten sind (Abbildung 2.4.3.1-5 rechts).

2.4.3.2 Fluoreszenzereignisabstandsverteilung

Wenn die aufeinanderfolgende Moleküle in einer zufälligen diskreten Weise in das Detektionsvolumen eintraten, wäre die Verteilungsfunktion der Ereignisabstände durch eine monoexponentiell abfallende Funktion gegeben [Kung 1998] [Hungerford 1986]. In freier Lösung muß jedoch ein 3d-Irrfahrtsprozess zugrundegelegt werden, das besagt das etwa 34 % der Moleküle irgendwann in das Detektionsvolumen zurückkehren [Mc Crea 1940] [Feller 1957 S. 327-330] Diese Wiedereintritte verzerren die Abstandsverteilungsfunktion zugunsten kürzerer Werte. Hinzu kommt der Effekt der „optischen Pinzette“ [Ashkin 1986], [Block1990], der größere Moleküle im Detektionsvolumen festhalten kann [Chiu 1996]. Die Abweichungen von der monoexponentiellen Abstandsverteilungsfunktion verschwinden bei größeren Zeiten. Für Rhodamin6G – Moleküle in Wasser wird eine Abweichung für Zeiten $< 3,5$ ms angegeben [Fister 1998], während für 14 nm große gefärbte Polystyrol-Partikel 600 ms berichtet werden [Chiu 1996].

Mc Crea gibt als Wahrscheinlichkeit dafür, daß ein Molekül, welches im Ursprung startet einen bestimmten Gitterpunkt (x,y,z) , wobei x,y,z ganze Zahlen sind, irgendwann erreicht, folgende Formel an:

$$W(x, y, z) = F(x, y, z) - 1, \text{ wobei}$$

$$F(x, y, z) = \frac{3}{\pi^2} \int_0^\pi \int_0^\pi \cos(x\lambda) \cos(y\mu) \frac{e^{-|z|\nu}}{\sinh \nu} d\lambda d\mu \quad \text{mit} \quad \cos \lambda + \cos \mu + \cosh \nu = 3$$

Für die Wahrscheinlichkeit, daß das Molekül mindestens einmal in den Ursprung zurückläuft erhält er mit $F(0,0,0) = 1,54$

$$W_R = \frac{F(0,0,0) - 1}{F(0,0,0)} \approx 0,34 \quad (2.4.3.2-1)$$

Leider sind in der Literatur keine theoretischen Vorhersagen über den zeitlichen Verlauf der Wiedereintrittsfunktion zu finden.

Dem Modell von Mc Crea folgend, wird ein dreidimensionales Gitter mit der Gitterkonstante $2 \omega_0$ eingeführt. Als Startpunkt dient der Koordinatenursprung. Er liegt als einziger Gitterpunkt innerhalb des Detektionsvolumens, in dessen Mitte. Das Gitter erstreckt sich in allen drei Dimensionen von $-\infty$ bis $+\infty$. Das Molekül springt von seinem Gitterpunkt aus mit gleicher Wahrscheinlichkeit zu einem seiner 6 Nachbarplätze. Der Rückkehr ins Detektionsvolumen entspricht daher das Wiedererreichen des Startpunktes. Löst man Gl. 2.4.2-7 nach t_s auf und substituiert für $x_s = 2\omega_0$, so erhält man für die Sprungperiode:

$$t_s = 2 \frac{\omega_0^2}{D} \quad (2.4.3.2-2)$$

Die Zeit bis zum Wiedereintritt des Moleküls ist durch das Produkt aus Sprunganzahl und Sprungperiode gegeben.

Damit die Simulation nicht hängenbleibt, wenn das Molekül nicht zurückkehrt, muß eine Grenze gewählt werden, bei deren Übertritt die Simulation mit dem Ergebnis „nicht zurückgekehrt“ abbricht. In der Simulation wurden 10^6 Trajektorien mit einer Grenze von $x^2 +$

$y^2+z^2 \leq 100^2$ und 10^5 Trajektorien mit einer Grenze von $r^2 \leq 1000^2$ bestimmt. In beiden Fällen ergibt sich für lange Zeiten eine Wiedereintrittswahrscheinlichkeit von 33,8 % (Abbildung 2.4.3.2-1 oben), was zum einen belegt, daß die Grenze groß genug gewählt wurde und zum anderen mit dem Wert von 0.34 aus der Arbeit von Mc Crea übereinstimmt. Das Molekül kann nur bei geraden Sprungzahlen zurückkehren, da jedem Sprung in $+x$ -Richtung ein Sprung in $-x$ -Richtung usw. entsprechen muß. Die Wahrscheinlichkeit, daß das Molekül mit dem zweiten Sprung zurückkehrt beträgt $1/6$, da das Molekül dann genau in die Richtung springen muß, aus der es kam. Für größere Sprungzahlen ergibt sich sehr schnell eine große Anzahl von möglichen Trajektorien, die mit der gleichen Anzahl Sprünge vom selben Startpunkt zum selben Zielpunkt führen.

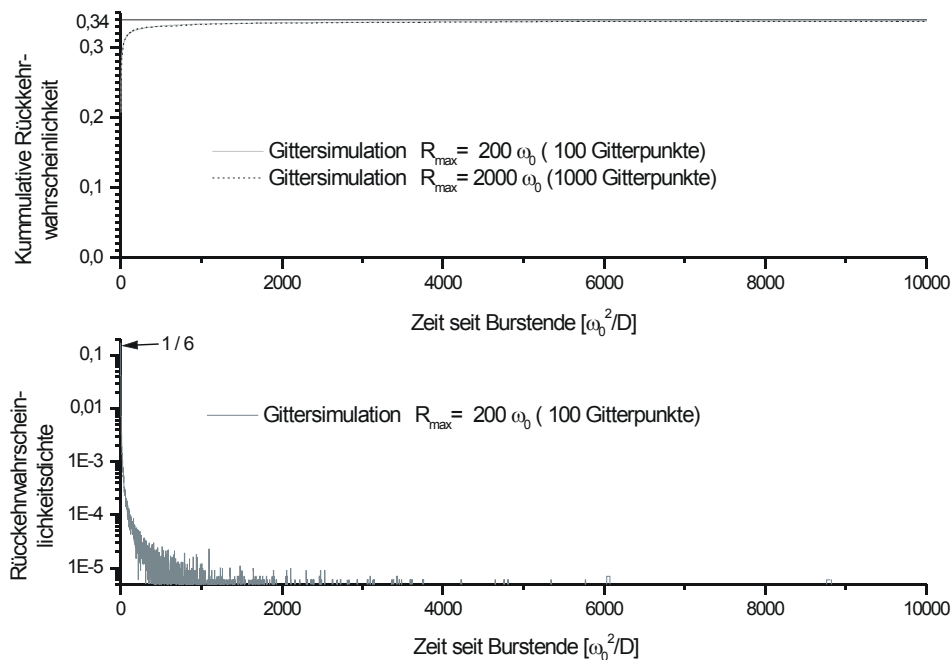


Abbildung 2.4.3.2-2 Monte-Carlo-Simulation mit festem Gitter.

Die Gitterpunkte haben einen Abstand von $2 \omega_0$. Das Molekül springt mit einer Periode von $2 \omega_0^2/D$ zu einem seiner 6 Nachbarpunkte. Die kumulative Rückkehrwahrscheinlichkeit (oben) gibt die Wahrscheinlichkeit dafür an, daß das Molekül bis zum Zeitpunkt t mindestens einmal wieder zum Ursprung zurückgekehrt ist. Die Rückkehrwahrscheinlichkeitsverteilung gibt die Wahrscheinlichkeitsdichte dafür an, daß das Molekül Zwischen $t-dt/2$ und $t+dt/2$ zurückkehrt. Es wurden 1.000.000 Trajektorien bis zu einem maximalen Abstand von 100 Gitterpunkten und 100.000 Trajektorien bis zu einem maximalen Abstand von 1000 Gitterpunkten simuliert.

Für den Anfangsbereich der Abstandsverteilungsfunktion ist dieses Modell zu grob. Für Zeiten $< 30 \omega_0^2/D$ wird daher die Simulation mit dem dreidimensionalen Analogon des langsameren Modell des Abschnitts 2.4.3.1 wiederholt. Das Molekül startet am Rand des (kugelförmigen) Detektionsvolumens. Wenn es in das Detektionsvolumen hineindiffundiert, wird die Trajektorie innerhalb des Detektionsvolumens simuliert und die Nummer des Sprunges festgehalten, bei dem es am weitesten eindringt. Nach dem das Molekül das Detektionsvolumen wieder verlassen hat, wird die Trajektorie außerhalb simuliert, wobei eine maximale Anzahl von Sprüngen bis zur möglichen Rückkehr festgesetzt wird. Kehrt das Molekül zurück, wird das nächste Ereignis simuliert und wieder der Sprung der dem Zentrum

am nächsten ist, festgehalten. Als Ereignisabstand ergibt sich dann die Zahl der Sprünge zwischen diesen beiden Sprüngen mit minimalem Abstand zum Zentrum (das entspricht den Ereignismaxima in der MCS-Spur). Die maximale Zahl der Sprünge bis zum Wiedereintritt wurde auf 200000 bei einer mittleren Sprungweite σ von $0,05 \omega_0$ gewählt wurde. Die Zeit zwischen zwei Einzelsprüngen ergibt sich damit zu $(0,05 \times \omega_0)^2 / (4D) = 0,000625 \omega_0^2 / D$ bei einem maximal simulierten Ereignisabstand vom $125 \omega_0^2 / D$.

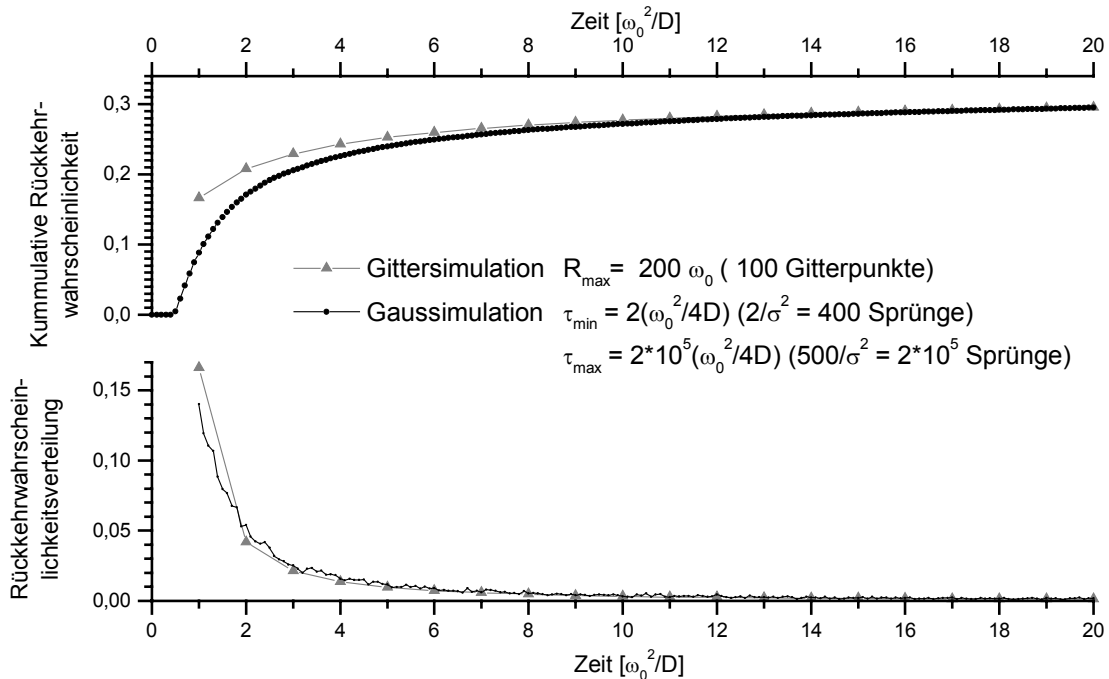


Abbildung 2.4.3.2-2 Monte-Carlo-Simulation ohne Gitter

Es wurden 200.000 Trajektorien mit Normalverteilten Sprungweiten ($\mu=0$, $\sigma = 0.005 \omega_0$, $t_s = 6,25 \times 10^{-4} \omega_0^2 / D$) in drei Dimensionen simuliert. Das Detektionsvolumen ist sphärisch mit einem Radius von ω_0 . Um den Vergleich mit dem Gittermodell zu ermöglichen, wurde gefordert, daß der Zeitabstand zwischen Austritt und Wiedereintritt mindestens der Sprungperiode beim Gitter entspricht ($0,5 \omega_0^2 / D$ oder 400 Sprünge).

Um die Ergebnisse mit der Gittersimulation vergleichen zu können, werden zwei Ereignisse, die um weniger als $2(\omega_0/\sigma)^2 = 800$ Sprünge getrennt sind als eines angesehen. Im Fall des Gitters muß sich das Molekül ja auch um mindestens $2\omega_0$, dem Abstand des nächsten Gitterpunktes, aus dem Detektionsvolumen entfernen. Führt man diese Bedingung nicht ein, so finden bei kleinen Zeiten extrem viele Übertritte statt und man erhält zwischen $t = 6,25 \times 10^{-4} \omega_0^2 / D$ und $t = 1 \omega_0^2 / D$ eine Wiedereintrittswahrscheinlichkeit von etwa 91,7%, die für lange Zeiten auf etwa 93,7% ansteigt. Die Bedingung „Sprungzahl $> 2(\omega_0/\sigma)^2$ “ entspricht der Bedingung „Ereignisabstand $> \omega_0^2 / 2D$ “. Das ist der Mittelwerte der Breite eines Ereignisses, der durch ein Molekül verursacht wird, das durch das Zentrum des Detektionsvolumens läuft (Gl.2.4.3.1-9). Um beurteilen zu können, wie wahrscheinlich es ist, daß das Molekül zurückkommt, nachdem es schon eine Zeit t abwesend war, muß man die kumulative Rückkehrwahrscheinlichkeit $W(x \leq t)$ der Abb. 2.4.3.2-2 gemäß $W(x > t) = W(x < \infty) - W(x \leq t)$ umrechnen, wobei $W(x < \infty)$ die Wahrscheinlichkeit dafür ist, daß das Molekül überhaupt zurückkommt.

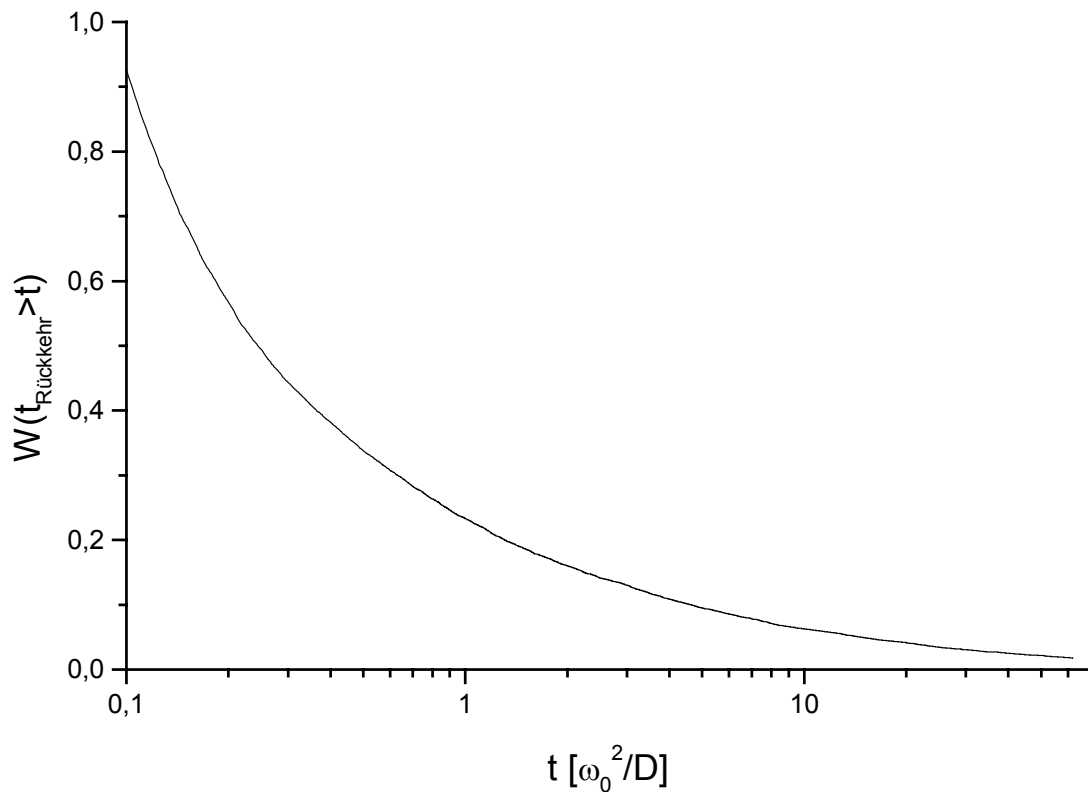


Abbildung 2.4.3.2-3 Rückkehrwahrscheinlichkeit

Je länger das Molekül das Detektionsvolumen verlassen hat, desto unwahrscheinlicher ist es, daß es wieder zurückkehrt.

Abbildung 2.4.3-3 stellt diese Wahrscheinlichkeit graphisch dar. So beträgt die Wahrscheinlichkeit für ein Molekül, das das Detektionsvolumen vor der Zeit $0.1 \omega_0^2/D$ verlassen hat über 90%, während es bei $0.5 \omega_0^2/D$ noch 34 % sind um bei $2\omega_0^2/D$ auf 16% abzufallen; aber selbst bei $10 \omega_0^2/D$ sind es noch 6,3%.

2.5 Elektrophorese und Elektroosmose

2.5.1 Elektrophorese

Mit Elektrophorese wird die Wanderung geladener Teilchen unter dem Einfluß eines elektrischen Feldes bezeichnet. Dieser gerichteten Bewegung ist die ungeordnete Diffusion (Abschnitt 2.4) überlagert.

Die Kraft F_{el} die ein elektrisches Feld der Feldstärke E auf ein Teilchen der Ladung q ausübt, ist durch

$$\vec{F}_{el} = q\vec{E} \quad (2.5.1-1)$$

gegeben.

Dieser Kraft wirkt die Reibung F_R entgegen, die das Teilchen bei der Geschwindigkeit v erfährt entgegen (=Gl. 2.4.1-3).

$$\vec{F}_R = -\xi\vec{v} \quad (2.5.1-2)$$

Wobei der Reibungskoeffizient ξ durch die Diffusionskonstante D ausgedrückt werden kann (Abschnitt 2.4.1):

$$\vec{F}_R = -\frac{kT}{D}\vec{v} \quad (2.5.1-3)$$

Man erhält damit folgenden Zusammenhang zwischen Ladung q , Feldstärke E , Diffusionskonstante D und Wanderungsgeschwindigkeit v („Einsteinsche Beziehung“):

$$\vec{v} = \frac{Dq}{kT}\vec{E} \quad (2.5.1-4)$$

Dabei ist T die Temperatur und k die Boltzmann-Konstante.
Die Konstante

$$\mu = \frac{Dq}{kT} \quad (2.5.1-5)$$

wird als elektrophoretische Mobilität bezeichnet.

Die Wanderungsgeschwindigkeit bezieht sich dabei auf das Lösungsmittel. Findet gleichzeitig zur Elektrophorese eine Strömung des Lösungsmittels wie z.B. ein elektroosmotischer Fluß (s.u.) statt, muß also die Strömungsgeschwindigkeit zur Wanderungsgeschwindigkeit addiert werden. Es sei bemerkt, daß nach Debye das Ion von einer zusätzlichen elektrostatischen Kraft, die aus der Retardierung der das Teilchen

umgebenden entgegengesetzt geladenen „Ionenwolke“ resultiert, gebremst wird. Diese Kraft ist von der Ionenstärke der Lösung abhängig (s. hierzu z.B. [Atkins 1990]).

2.5.2 Elektroosmotischer Fluß

Arbeitet man in Glaskapillaren, so tritt beim Anlegen des Feldes eine Strömung des Lösungsmittels auf. Dieser „elektroosmotische Fluß“ (EOF) ist ein Grenzflächeneffekt: Das Glas trägt, abhängig vom pH-Wert, gebundene anionische Silikatgruppen an seiner Oberfläche. Diese werden durch eine entsprechende Anzahl Kationen ausgeglichen. Diese Kationen organisieren sich nach dem Stern-Modell in zwei Schichten. An eine starre Doppelschicht schließt sich eine diffusive Schicht an. In der starren Schicht, die von der Dicke dem Ionendurchmesser entspricht, fällt das elektrische Potential linear auf den Wert Φ_δ ab, um anschließend in der diffusen Schicht exponentiell auf Null zu fallen. Legt man nun ein elektrisches Feld an, so wandern die Kationen der diffusiven Schicht zum negativ geladenen Pol, ohne daß ihnen an der Silikatschicht eine entsprechende Anionenbewegung entgegengesetzt wäre. In der Folge reißen nur Kationen mit ihren Hydrathüllen das Lösungsmittel mit und bewirken einen makroskopischen Materiestrom zur Kathode. Der EOF erhöht also die Wanderungsgeschwindigkeit der Kationen und vermindert die der Anionen. Bei großen Anionen ist es sogar möglich, ihre Bewegungsrichtung umzukehren. Der EOF steigt mit zunehmendem pH-Wert, da damit die Si-OH Gruppen deprotoniert werden und somit die Oberflächenladung steigt. Der EOF nimmt mit steigender Ionenstärke ab, da die diffusive Schicht um so weiter in die Lösung hineinreicht, je geringer die Ionenstärke ist. Die Geschwindigkeit v_{EOF} des EOF ist durch die Helmholtz-Gleichung gegeben:

$$v_{EOF} = \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_r \zeta}{4\pi\eta} E \quad (2.5.2-1)$$

Dabei ist ε_0 die Vakuumdielektrizitätskonstante ε_r die relative Dielektrizitätskonstante der Lösung η die dynamische Viskosität und ζ das „Zeta-Potential“. Das ζ -Potential entspricht in etwa dem Potential Φ_δ , das hinter der starren Doppelschicht herrscht.

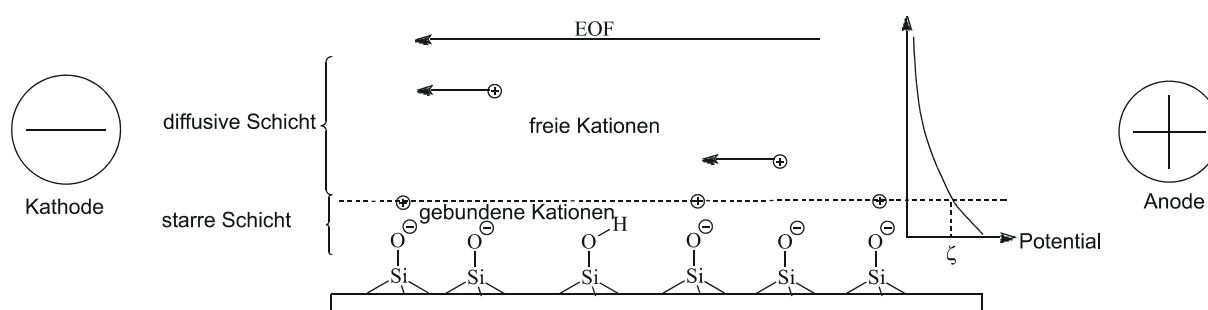


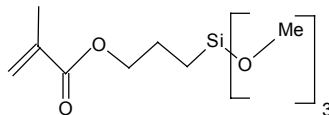
Abbildung 2.5.2-1 Elektroosmotischer Fluß

Ein Teil der Kationen, die die negative Ladung der Grenzfläche ausgleichen ist beweglich. Liegt ein elektrisches Feld an, so fließen diese zur Kathode. Sie reißen Lösungsmittel mit und bewirken so den EOF.

Der EOF ist eine Strömung des Lösungsmittels, er wirkt sich also auch auf neutrale Teilchen aus.

Da der EOF von der Oberflächenladung abhängt, kann man ihn durch Modifikation der Oberfläche beeinflussen. So kann man ihn durch eine geeignete Belegung kontrollieren, unterdrücken oder umkehren. Man unterscheidet zwischen einer kovalent an das Glas gebundenen statischen Beschichtung („Coating“) und einer adsorptiven dynamischen Belegung.

So wird bei dem Verfahren nach Hjertén [Hjertén 1985] γ -Methacryloxypropyltrimethoxysilan,



kovalent über Si-O-Si –Bindungen an die Kapillarwand gebunden. Anschließend wird die C=C- Doppelbindung mit Acrylamid oder einem seiner Derivate copolymerisiert. Andere statische Verfahren binden Polyacrylamid (durch Si-C-Bindungen) [Cobb 1990] oder 3-Glycidoxypropyl-trimethoxysilan [Jorgenson 1983].

Bei der Dynamischen Belegung adsorbieren Makromoleküle an die Wand und schirmen so die Ladung ab. Dazu eignen sich z.B. Methylcellulose [Hjertén 1985], Poly-N,N-dimethylacrylamid (pDMA) [Madabhushi 1996], [Rosenblum 1997], Poly-N-isopropylacrylamid [Madabhushi 1998], Polyethylenoxid (PEO) [Fung 1995] und Polyvinylpyrrolidon (PVP) [Mc Cormick 1988], [Gao 1998]. Die letzte Verbindung wird auch in dieser Arbeit dafür eingesetzt.

2.6 Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS)

Die Korrelationsanalyse von Datenströmen wurde von Wiener [Wiener 1949] zur Rauschunterdrückung und statistischen Datenanalyse eingeführt. Die Anwendung dieser Methode auf den Signalverlauf eines Fluoreszenzdetektors bezeichnet man als Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie.

Die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie ist ein statistisches Verfahren, das 1974 von Elson und Magde [Elson 1974^{1,2}] entwickelt wurde. Es beruht auf der Tatsache, daß Abweichungen vom thermodynamischen Gleichgewicht stets nach denselben Gesetzen und mit den gleichen phänomenologischen Konstanten relaxieren, unabhängig davon, ob die Abweichung durch eine spontane Schwankung oder durch eine makroskopische Störung hervorgerufen wurde [de Groot 1962]. Daher muß für die Abweichungen der Konzentration δC am Ort \vec{r} und zur Zeit t das zweite Ficksche Gesetz (Gleichung 2.4.1-1) gelten:

Normalerweise sind die relativen Schwankungen thermodynamischer Größen aufgrund statistischer Abweichungen vom Gleichgewicht wegen der sehr großen Zahl von Teilchen im System nicht beobachtbar. Geht man jedoch zu kleinen Teilchenzahlen über, so beginnen thermodynamische Größen, wie z.B. die Konzentration, zu fluktuieren. Die FCS wertet die Schwankungen der Fluoreszenzintensität, die durch Konzentrationsfluktuationen aufgrund von Diffusion, chemischen oder photophysikalischen Reaktionen auftreten, statistisch aus.

Die normierte Autokorrelationsfunktion $G(\tau)$ der Schwankung der Signalintensität $\delta I(t)$ ist definiert als:

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta I(t) \delta I(t + \tau) \rangle}{\langle I \rangle^2} \quad (2.6-1)$$

,wobei $\delta I(t) = I(t) - \langle I \rangle$. Die Klammern $\langle \rangle$ bezeichnen eine Ensemble-Mittelung. Mit $\langle I \rangle = \bar{I}$ erhält man:

$$\begin{aligned} G(\tau) &= \frac{\langle (I(t) - \bar{I})(I(t + \tau) - \bar{I}) \rangle}{\bar{I}^2} = \frac{\langle I(t)I(t + \tau) - \bar{I}I(t) - \bar{I}I(t + \tau) + \bar{I}^2 \rangle}{\bar{I}^2} \\ &= \frac{\langle I(t)I(t + \tau) \rangle - \bar{I}\langle I(t) \rangle - \bar{I}\langle I(t + \tau) \rangle + \bar{I}^2}{\bar{I}^2} = \frac{\langle I(t)I(t + \tau) \rangle - \bar{I}\bar{I} - \bar{I}\bar{I} + \bar{I}^2}{\bar{I}^2} = \frac{\langle I(t)I(t + \tau) \rangle - \bar{I}^2}{\bar{I}^2} \end{aligned}$$

$$G(\tau) = \frac{\langle I(t)I(t + \tau) \rangle}{\langle I \rangle^2} - 1 \quad (2.6-2)$$

Um die Korrelationskurve interpretieren zu können, muß sie zu einem Modell in Bezug gesetzt werden.

Die Intensität des Detektorsignals ist durch $I(t) = \iiint De(x, y, z)C(x, y, z, t) dx dy dz$ gegeben, wobei $De(\mathbf{r})$ die in Abschnitt 2.3 definierte Detektionseffizienz am Ort \mathbf{r} und $C(\mathbf{r}, t)$ die Teilchenzahldichte an diesem Ort zur Zeit t ist. Die Integrale laufen über alle Bereiche, in

denen sowohl C als auch De ungleich Null sind; d.h. über alle Volumenelemente, die etwas zum Signal beitragen. In vektorieller Schreibweise nimmt die Gleichung folgende Form an:

$$I(t) = \iiint De(\vec{r})C(\vec{r},t)d^3\vec{r} \quad (2.6-3)$$

Für die Schwankung der Intensität zur Zeit t gilt entsprechend:

$$\delta I(t) = \iiint De(\vec{r})\delta C(\vec{r},t)d^3\vec{r} \quad (2.6-4a)$$

$$\delta I(t + \tau) = \iiint De(\vec{r}')\delta C(\vec{r}',t)d^3\vec{r}' \quad (2.6-4b)$$

Setzt man diese beiden Gleichungen in Gleichung 2.6-1 ein, so erhält man:

$$\langle I \rangle^2 G(\tau) = \left\langle \iiint De(\vec{r})\delta C(\vec{r},t)d^3\vec{r} \iiint De(\vec{r}')\delta C(\vec{r}',t)d^3\vec{r}' \right\rangle$$

Da die Funktionen im ersten Integral nur von r während die im zweiten nur von r' abhängen, kann man die beiden dreifach-Integrale zu einem sechsfach-Integral zusammenfassen (Gleichung 2.6-5).

Um die Autokorrelationsfunktion zu berechnen, müssen also die Schwankungen der Teilchenzahldichte an allen Orten r zur Zeit t mit den Schwankungen der Teilchenzahl an allen Orten r' zur Zeit t+τ korreliert werden. Die Detektionseffizienz dient dabei als Wichtungsfaktor:

$$G(\tau)\bar{I}^2 = \left\langle \iiint_{\vec{r}} \iiint_{\vec{r}'} De(\vec{r})\delta C(\vec{r},t)De(\vec{r}')\delta C(\vec{r}',t+\tau)d^3\vec{r}'d^3\vec{r} \right\rangle \quad (2.6-5)$$

Da sowohl die Ensemble-Mittelung als auch die Integration lineare Operationen sind, kann ihre Reihenfolge vertauscht werden ($\sum_i \int f_i = \int \sum_i f_i$):

$$G(\tau)\bar{I}^2 = \iiint_{\vec{r}} \iiint_{\vec{r}'} De(\vec{r})De(\vec{r}')\langle \delta C(\vec{r},t)\delta C(\vec{r}',t+\tau) \rangle d^3\vec{r}'d^3\vec{r}$$

Dabei entspricht der Mittelwert im Integral der Teilchenzahldichtekorrelation $\varphi(\mathbf{r},\mathbf{r}',\tau)$.

$$G(\tau)\bar{I}^2 = \iiint_{\vec{r}} \iiint_{\vec{r}'} De(\vec{r})De(\vec{r}')\varphi(\vec{r},\vec{r}',\tau)d^3\vec{r}'d^3\vec{r} \quad (2.6-6)$$

Die Teilchenzahldichtekorrelation $\varphi(\mathbf{r},\mathbf{r}',\tau)$ gibt an, wie eine Konzentrationsschwankung am Ort r sich auf die Konzentrationsschwankung am Ort r' nach einem zeitlichen Abstand τ auswirkt.

$$\varphi(\vec{r},\vec{r}',\tau) = \langle \delta C(\vec{r},t)\delta C(\vec{r}',t+\tau) \rangle$$

Das Prinzip der mikroskopischen Reversibilität fordert, daß $\varphi(\mathbf{r}, \mathbf{r}', \tau) = \varphi(\mathbf{r}, \mathbf{r}', -\tau)$. Wenn die Probe stationär ist, sind ihre Durchschnittseigenschaften zeitunabhängig. Daher hängt φ nur vom Zeitabstand τ , aber nicht von der absoluten Zeit t ab.

$$\varphi(\vec{r}, \vec{r}', \tau) = \langle \delta C(\vec{r}, t) \delta C(\vec{r}', t + \tau) \rangle = \langle \delta C(\vec{r}, 0) \delta C(\vec{r}', \tau) \rangle \quad (2.6-7)$$

2.6.1 FCS ohne Fluß

Im ersten Beispiel soll die Probe ruhen, und die Abmessungen des Probevolumens sollen groß gegen die Abmessungen des Detektionsvolumens sein. Außerdem sollen die Moleküle keine Reaktionen eingehen, die ihre Fluoreszenzeigenschaften oder ihre Anzahl verändern. Die Entwicklung der Gleichungen folgt dabei im wesentlichen der Veröffentlichung von Elson und Magde [Elson 1974¹], wobei jedoch die Probengeometrie und die räumliche Verteilung der Detektionseffizienz (Abschnitt 2.3) dem hier verwendeten konfokalen Aufbau angepaßt wurden.

Wie bereits zu Beginn dieses Kapitels erwähnt, müssen die Konzentrationsschwankungen (bzw. die den Konzentrationsschwankungen proportionalen Teilchenzahldichteschwankungen) das zweite Ficksche Gesetz erfüllen. Sie müssen also Lösungen der partiellen Differentialgleichung 2.6.1-1 sein.

$$\frac{\partial \delta C(\vec{r}, t)}{\partial t} = D \nabla^2 \delta C(\vec{r}, t) \quad (2.6.1-1)$$

Um die Korrelationsfunktion φ zu errechnen muß δC als Lösung von Gleichung 2.6.1-1 ausgedrückt werden. Der experimentelle Aufbau gibt dabei die Randbedingungen vor, also z.B. Wände, an denen die Ableitung der Schwankung senkrecht dazu verschwinden muß, weil sie undurchdringlich sind. Da das Probevolumen groß gegen das Detektionsvolumen sein soll, kann man annehmen, daß die Wände, die die Probe einschließen, im Unendlichen liegen. An den Wänden findet keine Diffusion statt. Man erhält daher als Randbedingung:

$$\delta C(x, y, z, t) = 0 \quad \text{bei} \quad x = \pm\infty \vee y = \pm\infty \vee z = \pm\infty \quad (2.6.1-2)$$

Berechnung der Teilchenzahldichtekorrelationsfunktion φ

Ein gängiges Verfahren zur Lösung partieller Differentialgleichungen besteht darin, auf einem Teil der Variablen eine Fouriertransformation durchzuführen. Da eine Differentiation der Originalfunktion auf eine Multiplikation mit iv (v ist die transformierte Variable im Bildbereich und i ist die imaginäre Einheit) im Bildbereich projiziert wird, ergibt sich durch dieses Verfahren eine gewöhnliche Differentialgleichung in den transformierten Koordinaten

[Bronstein 2001, S.749 und 753ff]. $\mathfrak{F}_\nu \left[\frac{d^n}{dx^n} f(x) \right] = (i\nu)^n \mathfrak{F}_\nu [f(x)] = (i\nu)^n g(\nu)$, wobei die

Fouriertransformation durch $\mathfrak{F}_\nu [f(x)] = g(\nu) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{\infty} e^{i\nu x} f(x) dx$ definiert ist.

Man löst die Differentialgleichung in den transformierten Koordinaten und führt anschließend eine Rücktransformation der Lösung mittels $\mathfrak{F}_\nu^{-1} [g(\nu)] = f(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{\infty} e^{-i\nu x} g(\nu) d\nu$ aus.

Im Fall der Gleichung 2.6.1-1 wird die Transformation entlang der drei Raumkoordinaten durchgeführt, während die Zeitachse nicht angetastet wird:

$$\tilde{C}(\vec{\nu}, t) = \mathfrak{F}_{\vec{r}} [\delta C(\vec{r}, t)] = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} \delta C(x, y, z, t) \exp\{i(x\nu_x + y\nu_y + z\nu_z)\} dx dy dz \quad (2.6.1-3)$$

bzw.

$$\delta C(\vec{r}, t) = \mathfrak{F}_{\vec{r}}^{-1} [\tilde{C}(\vec{\nu}, t)] = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} \tilde{C}(\nu_x, \nu_y, \nu_z, t) \exp\{i(x\nu_x + y\nu_y + z\nu_z)\} d\nu_x d\nu_y d\nu_z \quad (2.6.1-4)$$

Durch Fouriertransformation von Gleichung 2.6.1-1 erhält man

$$\mathfrak{F}_\nu \left[\frac{\partial \delta C(\vec{r}, t)}{\partial t} \right] = D \mathfrak{F}_{\vec{r}} [\nabla^2 \delta C(\vec{r}, t)]$$

Die Fouriertransformation in den Raumkoordinaten wirkt sich auf die Zeitachse nicht aus. Daher kann man auf der linken Seite der Gleichung Differenzierung und Fouriertransformation vertauschen. Auf der rechten Seite wird die Rechenregel für die Differenzierung im Originalbereich angewandt, da der Laplace-Operator die zweite Ableitung nach den Raumkoordinaten darstellt:

$$\frac{\partial}{\partial t} \mathfrak{F}_{\vec{r}} [\delta C(\vec{r}, t)] = D (i\vec{\nu})^2 \mathfrak{F}_{\vec{r}} [\delta C(\vec{r}, t)]$$

Man erhält mit $i^2 = -1$, $\vec{\nu}^2 = \nu^2 = \nu_x^2 + \nu_y^2 + \nu_z^2$ und Gleichung 2.6.1-3:

$$\frac{\partial}{\partial t} \tilde{C}(\vec{\nu}, t) = -D \nu^2 \tilde{C}(\vec{\nu}, t) \quad (2.6.1-5)$$

Das ist eine gewöhnliche lineare homogene Differentialgleichung erster Ordnung. Umsortieren ergibt:

$$\frac{d\tilde{C}}{\tilde{C}} = d \ln \tilde{C} = -D \nu^2 dt$$

Nach Integration von 0 bis τ erhält man die Lösung im transformierten Raum:

$$\ln \frac{\tilde{C}(\vec{v}, \tau)}{\tilde{C}(\vec{v}, 0)} = -Dv^2\tau$$

bzw.

$$\tilde{C}(\vec{v}, \tau) = \tilde{C}(\vec{v}, 0) e^{-Dv^2\tau} \quad (2.6.1-6)$$

Um aus dieser Funktion den Verlauf der Konzentrationsschwankung zu bestimmen, müßte Gleichung 2.6.1-6 nach Gleichung 2.6.1-4, $\delta C(\vec{r}', \tau) = \mathfrak{F}_{\vec{r}'}^{-1}[\tilde{C}(\vec{v}, \tau)]$ rücktransformiert werden. Dazu ist eine Spezifikation der Startwerte $\check{C}(\vec{v}, 0)$ notwendig. Da die gesuchte Funktion aber nicht δC sondern φ ist, substituiert man direkt $\delta C(\vec{r}', \tau) = \mathfrak{F}_{\vec{r}'}^{-1}[\tilde{C}(\vec{v}, 0)\exp(-Dv^2\tau)]$ in Gleichung 2.6-7. Man erhält für die Teilchenzahldichte-korrelationsfunktion:

$$\varphi(\vec{r}, \vec{r}', \tau) = \langle \delta C(\vec{r}, 0) \mathfrak{F}_{\vec{r}'}^{-1}[\tilde{C}(\vec{v}, 0) e^{-Dv^2\tau}] \rangle \quad (2.6.1-7)$$

Die Fouriertransformation $\mathfrak{F}_{\vec{r}'}^{-1}$ wirkt sich nur auf \vec{v} aus, daher kann man $\delta C(\vec{r}, 0)$ in die Transformation hineinziehen:

$$\varphi(\vec{r}, \vec{r}', \tau) = \langle \mathfrak{F}_{\vec{r}'}^{-1}[\delta C(\vec{r}, 0) \tilde{C}(\vec{v}, 0) e^{-Dv^2\tau}] \rangle$$

Da sowohl Fouriertransformation als auch Ensemble-Mittelung lineare Operationen sind, darf ihre Reihenfolge vertauscht werden ($\sum_i \mathfrak{F}_v[f_i(x)] = \mathfrak{F}_v[\sum_i f_i(x)]$):

$$\varphi(\vec{r}, \vec{r}', \tau) = \mathfrak{F}_{\vec{r}'}^{-1}[\langle e^{-Dv^2\tau} \delta C(\vec{r}, 0) \tilde{C}(\vec{v}, 0) \rangle] = \mathfrak{F}_{\vec{r}'}^{-1}[e^{-Dv^2\tau} \langle \delta C(\vec{r}, 0) \tilde{C}(\vec{v}, 0) \rangle]$$

Schreibt man für $\tilde{C}(\vec{v}, 0) = \mathfrak{F}_{\vec{v}}[\delta C(\vec{r}'', 0)]$, so erhält man

$$\varphi(\vec{r}, \vec{r}', \tau) = \mathfrak{F}_{\vec{r}'}^{-1}[e^{-Dv^2\tau} \langle \delta C(\vec{r}, 0) \mathfrak{F}_{\vec{v}}[\delta C(\vec{r}'', 0)] \rangle]$$

Zieht man $\delta C(\vec{r}, 0)$ in die innere Fouriertransformation (wobei zu beachten ist, daß $\mathfrak{F}_{\vec{v}}$ nur auf \vec{r}'' wirkt) und vertauscht die Transformation wieder mit der Ensemble-Mittelung, so erhält man:

$$\varphi(\vec{r}, \vec{r}', \tau) = \mathfrak{F}_{\vec{r}'}^{-1}[e^{-Dv^2\tau} \langle \mathfrak{F}_{\vec{v}}[\delta C(\vec{r}, 0) \delta C(\vec{r}'', 0)] \rangle] = \mathfrak{F}_{\vec{r}'}^{-1}[e^{-Dv^2\tau} \mathfrak{F}_{\vec{v}}[\langle \delta C(\vec{r}, 0) \delta C(\vec{r}'', 0) \rangle]]$$

bzw. wenn die innere Transformation aus Gründen der Eindeutigkeit ausformuliert wird:

$$\varphi(\vec{r}, \vec{r}', \tau) = \mathfrak{F}_{\vec{r}'}^{-1} \left[e^{-Dv^2\tau} \frac{1}{\sqrt{2\pi}^3} \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} \exp(i\vec{v} \cdot \vec{r}'') \langle \delta C(\vec{r}, 0) \delta C(\vec{r}'', 0) \rangle d^3\vec{r}'' \right] \quad (2.6.1-8)$$

Die Lösungen in einem FCS-Experiment sind sehr stark verdünnt ($c < 10^{-9}$ M). Man kann sie daher als ideal ansehen. In idealen Lösungen treten aber keine Wechselwirkungen zwischen den gelösten Teilchen auf. Daher kann die Konzentration an einem Ort \vec{r} die Konzentration an einem Ort \vec{r}'' zur gleichen Zeit nur dann beeinflussen, wenn die Orte identisch sind. Mathematisch wird das mit Hilfe der Diracschen Deltafunktion ausgedrückt. Die Deltafunktion ist definiert als eine Funktion mit der Eigenschaft $\int f(x) \delta(x - x_0) dx \equiv f(x_0)$, wobei das Integral die Stelle x_0 einschließen muß und $f(x)$ eine beliebige an der Stelle x_0 definierte Funktion ist. Die Deltafunktion $\delta(x)$ ist für $x=0$ unendlich und sonst überall gleich null. Man erhält:

$$\langle \delta C(\vec{r}, 0) \delta C(\vec{r}'', 0) \rangle = \langle C \rangle \delta(\vec{r} - \vec{r}'') \quad (2.6.1-9)$$

Der Faktor $\langle C \rangle = \bar{C}$ folgt aus der Poisson-Statistik, die verlangt, daß die mittlere quadratische Schwankung $\langle (\delta C)^2 \rangle$ der Teilchenzahl in einem Einheitsvolumen gleich dem Mittelwert $\langle C \rangle$ der Teilchenzahl in diesem Volumen ist [Kirkwood 1950].

Durch die Deltafunktion vereinfacht sich die Gleichung erheblich:

$$\begin{aligned} \varphi(\vec{r}, \vec{r}', \tau) &= \mathfrak{F}_{\vec{r}'}^{-1} \left[e^{-Dv^2\tau} \frac{1}{\sqrt{2\pi}^3} \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} \exp(i\vec{v} \cdot \vec{r}'') \bar{C} \delta(\vec{r} - \vec{r}'') d^3\vec{r}'' \right] \\ \varphi(\vec{r}, \vec{r}', \tau) &= (2\pi)^{-3/2} \bar{C} \mathfrak{F}_{\vec{r}'}^{-1} \left[e^{-Dv^2\tau} \exp(i\vec{v} \cdot \vec{r}) \right] \end{aligned} \quad (2.6.1-10)$$

Schließlich muß noch die Rücktransformation durchgeführt werden:

$$\begin{aligned} \varphi(\vec{r}, \vec{r}', \tau) &= (2\pi)^{-3/2} \bar{C} \frac{1}{\sqrt{2\pi}^3} \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} \exp(-i\vec{v} \cdot \vec{r}') e^{-Dv^2\tau} \exp(i\vec{v} \cdot \vec{r}) d^3\vec{v} \\ \varphi(\vec{r}, \vec{r}', \tau) &= (2\pi)^{-3} \bar{C} \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} e^{-Dv^2\tau} \exp(i\vec{v} \cdot (\vec{r} - \vec{r}')) d^3\vec{v} \end{aligned} \quad (2.6.1-11)$$

Spaltet man den Vektor in seine Komponenten auf und zieht die Integrale auseinander, so erhält man:

$$\begin{aligned} \varphi(\vec{r}, \vec{r}', \tau) &= (2\pi)^{-3} \bar{C} \int_{-\infty}^{\infty} \exp[-Dv_x^2\tau + i v_x(x - x')] d v_x \int_{-\infty}^{\infty} \exp[-Dv_y^2\tau + i v_y(y - y')] d v_y \\ &\quad \times \int_{-\infty}^{\infty} \exp[-Dv_z^2\tau + i v_z(z - z')] d v_z \end{aligned}$$

Die Integranden werden durch Aufsuchen der quadratischen Ergänzung im Exponenten in Gaußfunktionen umgewandelt. Damit ergibt sich:

$$\begin{aligned}\varphi(\vec{r}, \vec{r}', \tau) &= (2\pi)^{-3} \bar{C} \left(\sqrt{\frac{\pi}{D\tau}} \right)^3 \exp \left\{ -\frac{(x-x')^2 + (y-y')^2 + (z-z')^2}{4D\tau} \right\} \\ \varphi(\vec{r}, \vec{r}', \tau) &= \frac{\bar{C}}{8(\sqrt{\pi D\tau})^3} \exp \left\{ -\frac{(\vec{r}-\vec{r}')^2}{4D\tau} \right\}\end{aligned}\quad (2.6.1-12)$$

Berechnung der Signalkorrelationsfunktion $G(\tau)$

Mit der Teilchenzahldichtekorrelationsfunktion φ lässt sich nach Gleichung 2.6-6 die Autokorrelation des Detektorsignals G berechnen

$$G(\tau)\bar{I}^2 = \iiint_{\vec{r}} De(\vec{r}) \iiint_{\vec{r}'} De(\vec{r}') \frac{\bar{C}}{8(\sqrt{\pi D\tau})^3} \exp \left\{ -\frac{(\vec{r}-\vec{r}')^2}{4D\tau} \right\} d^3\vec{r}' d^3\vec{r} \quad (2.6.1-13)$$

Nimmt man für $De(\vec{r})$ eine vom Zentrum aus Gauß-förmig abfallende Detektionseffizienz an (Abschnitt 2.3),

$$De(\vec{r}) = De(x, y, z) = De_0 \exp \left\{ -2 \left[\left(\frac{x}{\omega_x} \right)^2 + \left(\frac{y}{\omega_y} \right)^2 + \left(\frac{z}{\omega_z} \right)^2 \right] \right\}$$

so erhält man nach Aufspalten der Dreifachintegrale und Sortieren der Richtungen:

$$\begin{aligned}G(\tau)\bar{I}^2 &= \frac{\bar{C}De_0^2}{8(\sqrt{\pi D\tau})^3} \int_{-\infty}^{\infty} \exp \left\{ -2 \left(\frac{x}{\omega_x} \right)^2 \right\} \int_{-\infty}^{\infty} \exp \left\{ -2 \left(\frac{x'}{\omega_x} \right)^2 \right\} \exp \left\{ -\frac{(x-x')^2}{4D\tau} \right\} dx' dx \\ &\quad \int_{-\infty}^{\infty} \exp \left\{ -2 \left(\frac{y}{\omega_y} \right)^2 \right\} \int_{-\infty}^{\infty} \exp \left\{ -2 \left(\frac{y'}{\omega_y} \right)^2 \right\} \exp \left\{ -\frac{(y-y')^2}{4D\tau} \right\} dy' dy \quad (2.6.1-14) \\ &\quad \int_{-\infty}^{\infty} \exp \left\{ -2 \left(\frac{z}{\omega_z} \right)^2 \right\} \int_{-\infty}^{\infty} \exp \left\{ -2 \left(\frac{z'}{\omega_z} \right)^2 \right\} \exp \left\{ -\frac{(z-z')^2}{4D\tau} \right\} dz' dz\end{aligned}$$

Stellvertretend soll das Integral in x- Richtung berechnet werden. Aufsuchen der quadratischen Ergänzung im inneren Integral (über x') und Integration über x' führt zu:

$$\begin{aligned}&\int_{-\infty}^{\infty} \exp \left\{ -2 \left(\frac{x}{\omega_x} \right)^2 \right\} \int_{-\infty}^{\infty} \exp \left\{ -2 \left(\frac{x'}{\omega_x} \right)^2 \right\} \exp \left\{ -\frac{(x-x')^2}{4D\tau} \right\} dx' dx \\ &= \frac{2\sqrt{D\tau}\omega_x}{\sqrt{8D\tau + \omega_x^2}} \sqrt{\pi} \int_{-\infty}^{\infty} \exp \left\{ -\left(\frac{2(8D\tau + 2\omega_x^2)}{\omega_x^2(8D\tau + \omega_x^2)} \right) x^2 \right\} dx.\end{aligned}$$

$$= \frac{\pi\sqrt{D\tau}\omega_x^2}{\sqrt{4D\tau + \omega_x^2}}.$$

Für die y- und z-Richtung ergibt sich entsprechend $\frac{\pi\sqrt{D\tau}\omega_y^2}{\sqrt{4D\tau + \omega_y^2}}$ und $\frac{\pi\sqrt{D\tau}\omega_z^2}{\sqrt{4D\tau + \omega_z^2}}$.

Durch Substitution der Doppelintegrale in Gleichung 2.6.1-14 erhält man:

$$G(\tau) = \frac{\bar{C}}{\bar{I}^2} De_0^2 \omega_x \omega_y \omega_z \left(\frac{\sqrt{\pi}}{2} \right)^3 \frac{1}{\sqrt{\frac{4D\tau}{\omega_x^2} + 1}} \frac{1}{\sqrt{\frac{4D\tau}{\omega_y^2} + 1}} \frac{1}{\sqrt{\frac{4D\tau}{\omega_z^2} + 1}}$$

$$G(\tau) = G(0) \frac{1}{\sqrt{\frac{4D\tau}{\omega_x^2} + 1}} \frac{1}{\sqrt{\frac{4D\tau}{\omega_y^2} + 1}} \frac{1}{\sqrt{\frac{4D\tau}{\omega_z^2} + 1}} \quad (2.6.1-15)$$

$$G(0) = \frac{\bar{C}}{\bar{I}^2} De_0^2 \omega_x \omega_y \omega_z \left(\frac{\sqrt{\pi}}{2} \right)^3 \quad (2.6.1-16)$$

Gleichung 2.6.1-15 beschreibt die Korrelationsfunktion einer Lösung der Teilchenzahldichte \bar{C} , wenn die Wände des Probevolumens sehr weit vom Detektionsvolumen entfernt sind und die Detektionseffizienz im ellipsoiden Detektionsvolumen in allen drei Raumrichtungen Gauß-förmig abfällt. $\omega_{x,y,z}$ sind dabei die Achsenabschnitte des Ellipsoids, bei dem die Detektionseffizienz auf $1/e^2$ des Wertes im Zentrum, De_0 , abgefallen ist, mit der x,y und z-Achse eines kartesischen Koordinatensystems. Der Koordinatenursprung liegt dabei im Brennpunkt des Objektivs. Die Richtungen der Achsen sind durch die optische Achse des Mikroskops sowie durch die lange und die kurze Halbachse des als ellipsoid- Gauß-förmig angenommenen Strahlprofils des Lasers gegeben.

Diese Gleichung geht für den Spezialfall eines rotationssymmetrischen Detektionsvolumens d.h. $\omega_x = \omega_y = \omega_\perp$ und $\omega_z = \omega_\parallel$ in die von Aragón und Pecora veröffentlichte Form [Aragón 1976] über, wobei $\omega_\perp^2/4D = \tau_\perp$ und $\omega_\parallel^2/4D = \tau_\parallel$ gesetzt wird. Man erhält:

$$G(\tau) = G(0) \left(1 + \frac{\tau}{\tau_\perp} \right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_\parallel} \right)^{-1/2}$$

Der zeitliche Abfall der Korrelationsfunktion ist durch das Produkt der Wurzelterme der Gleichung 2.6.1-15 gegeben. Die Amplitude $G(0)$ für $\tau \rightarrow 0$ ist in Gleichung 2.6.1-16 berechnet. Nach Gleichung 2.6.3 ist die Intensität der Konzentration proportional daher gilt:

$$\langle I \rangle = \iiint_{\vec{r}} De(\vec{r}) \langle C \rangle d^3\vec{r} = \langle C \rangle \iiint_{\vec{r}} De(\vec{r}) d^3\vec{r} \quad (2.6.1-17)$$

Das Dreifachintegral wird wieder in die Raumrichtungen aufgespalten. Für die x-Richtung erhält man:

$$\int_{-\infty}^{\infty} e^{-2\left(\frac{x}{\omega_x}\right)^2} dx = \int_{-\infty}^{\infty} \exp\left(-\left(\frac{\sqrt{2}}{\omega_x} x\right)^2\right) dx = \frac{\omega_x}{\sqrt{2}} \int_{-\infty}^{\infty} \exp\left(-\chi^2\right) d\chi = \sqrt{\frac{\pi}{2}} \omega_x$$

Für die y- und z-Richtung ergeben sich analoge Formeln. Einsetzen in Gleichung 2.6.1-17 führt zu:

$$\langle I \rangle = \bar{I} = De_0 \left(\sqrt{\frac{\pi}{2}} \right)^3 \omega_x \omega_y \omega_z$$

Damit folgt nach Gleichung 2.6.1-16 für die Amplitude:

$$G(0) = \frac{\bar{C}}{\bar{I}^2} De_0^2 \omega_x \omega_y \omega_z \left(\frac{\sqrt{\pi}}{2} \right)^3 = \frac{\bar{C} De_0^2 \omega_x \omega_y \omega_z}{\bar{C}^2 \left[De_0 \left(\sqrt{\frac{\pi}{2}} \right)^3 \omega_x \omega_y \omega_z \right]^2} \left(\frac{\sqrt{\pi}}{2} \right)^3 = \frac{\bar{C} De_0^2 \omega_x \omega_y \omega_z}{\bar{C}^2 De_0^2 \left(\frac{\pi}{2} \right)^3 \omega_x^2 \omega_y^2 \omega_z^2} \left(\frac{\sqrt{\pi}}{2} \right)^3$$

$$G(0) = \frac{1}{\bar{C} (\sqrt{\pi})^3 \omega_x \omega_y \omega_z} \quad (2.6.1-18)$$

bzw.

$$G(\tau) = \frac{1}{\bar{C} (\sqrt{\pi})^3 \omega_x \omega_y \omega_z} \frac{1}{\sqrt{\frac{4D\tau}{\omega_x^2} + 1}} \frac{1}{\sqrt{\frac{4D\tau}{\omega_y^2} + 1}} \frac{1}{\sqrt{\frac{4D\tau}{\omega_z^2} + 1}} \quad (2.6.1-19)$$

Der Faktor

$$(\sqrt{\pi})^3 \omega_x \omega_y \omega_z = \frac{(\sqrt{2})^3}{De_0} \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} De(\vec{r}) d^3\vec{r}$$

hat die Dimension eines Volumens, er wird manchmal als „effektives Detektionsvolumen“ bezeichnet. Sein Zahlenwert entspricht der Größe eines hypothetischen endlichen Volumens, das bei einer konstant gedachten Detektionseffizienz von $De_0 / 2^{3/2}$ ($\approx 0,354 De_0$) die gleiche mittlere Signalintensität liefert wie das Gaußsche, bis ins unendliche reichende Detektionsvolumen mit einer vom Wert De_0 im Zentrum aus abfallenden Detektionseffizienz. Der Nenner der Gleichung 2.6.1-19 enthält außer diesem Volumen noch die mittlere Teilchenzahldichte. Die Amplitude der Korrelationsfunktion ist daher, wenn der Untergrund vernachlässigbar gegen die Signalintensität ist und die Diffusion der einzige Prozeß ist, der zu Intensitätsschwankungen führt, der Kehrwert der mittleren Teilchenzahl $\langle N \rangle$ im endlich gedachten Detektionsvolumen.

$$G(\tau) = \frac{1}{\langle N \rangle} \left(\sqrt{\frac{4D\tau}{\omega_x^2} + 1} \sqrt{\frac{4D\tau}{\omega_y^2} + 1} \sqrt{\frac{4D\tau}{\omega_z^2} + 1} \right)^{-1} \quad (2.6.1-20)$$

Würde man für die konstante Detektionseffizienz De_0 anstelle von $De_0 / 2^{3/2}$ einsetzen, so erhielte man für die Amplitude [Thomson 1991, S.341]

$$G(0) = \frac{\gamma}{\langle N^2 \rangle} \quad \text{mit} \quad \gamma = \frac{\iiint \left(\frac{De(\vec{r})}{De_0} \right)^2 d^3\vec{r}}{\iiint \frac{De(\vec{r})}{De_0} d^3\vec{r}} = \frac{\left(\frac{\sqrt{\pi}}{2} \right)^3 \omega_x \omega_y \omega_z}{\left(\sqrt{\frac{\pi}{2}} \right)^3 \omega_x \omega_y \omega_z} = \frac{1}{\sqrt{8}}$$

Der Faktor γ wird dabei als Strukturfaktor des Detektionsvolumens bezeichnet.

Die Flächen gleicher Detektionseffizienz beim tatsächlichen Detektionsvolumen sind unter der Voraussetzung, daß die Detektionseffizienz Gauß-förmig abfällt, durch Ellipsoide gegeben. Das Volumen eines Ellipsoids mit den Halbachsenlängen $\alpha\omega_x$, $\alpha\omega_y$ und $\alpha\omega_z$ ist durch

$$V = \frac{4\pi}{3} \alpha^3 \omega_x \omega_y \omega_z$$

gegeben [Bronstein 2001, S. 228]. Setzt man dieses Volumen dem Volumen aus Gleichung 2.6.1-18 gleich, so erhält man:

$$\pi \sqrt{\pi} \omega_x \omega_y \omega_z = \frac{4\pi}{3} \alpha^3 \omega_x \omega_y \omega_z \quad \text{oder} \quad \frac{3}{4} \sqrt{\pi} = \alpha^3$$

Die Detektionseffizienz bei $x = \alpha\omega_x$, $y=0$, $z=0$ ist durch

$$De_0 \exp \left\{ -2 \left(\frac{\sqrt[3]{\frac{3}{4} \sqrt{\pi} \omega_x}}{\omega_x} \right)^2 \right\} = De_0 \exp \left\{ -2 \sqrt[3]{\frac{9}{16} \pi} \right\} = \exp \left\{ -3 \sqrt[3]{\frac{9\pi}{2}} \right\} \approx De_0 \exp \{-2,418\} \approx 0,0891 De_0$$

gegeben.

D.h., daß am Begrenzungsellipsoid des hypothetischen endlichen Detektionsvolumens der Gleichung 2.6.1-19 die Detektionseffizienz des Gauß-förmigen Detektionsvolumens auf etwa 8,9% des Maximalwertes gefallen ist.

Wählt man die Grenze des Detektionsvolumens anders, so erhält man natürlich andere mittlere Teilchenzahlen. So ergibt sich bei einer Grenze von $e^{-2} De_0$ für die mittlere Teilchenzahl:

$$\bar{N}(e^{-2} De_0) = \frac{4}{3\sqrt{\pi}} \frac{1}{G(0)} \approx \frac{0,752}{G(0)} \quad (2.6.1-21)$$

Trägt man $G(\tau)$ gegen $\ln(\tau)$ auf, so zeigt sich ein Wendepunkt bei einer charakteristischen Korrelationszeit: $d^2G(\tau)/d\ln\tau = \tau dG(\tau)/d\tau + \tau^2 d^2G(\tau)/d\tau^2 = 0$ @ $\tau = \tau_{WP}$.

Im Fall eines unendlich langen zylindersymmetrischen Detektionsvolumens liegt der

Wendepunkt bei $\tau_{WP} = \tau_{xy} = \frac{\omega_x^2}{4D} = \frac{\omega_y^2}{4D}$ wenn $\tau_z = \infty$.

Im Fall des allgemeinen Gaußschen Detektionsvolumens gilt: $\tau_{WP} = \tau_x f(k_y, k_z)$ mit

$k_y = \sqrt{\frac{\tau_y}{\tau_x}} = \frac{\omega_y}{\omega_x}$ und $k_z = \sqrt{\frac{\tau_z}{\tau_x}} = \frac{\omega_z}{\omega_x}$. Sortiert man die Raumrichtungen so, daß $\tau_x < \tau_y < \tau_z$,

so ist $1 \leq k_y \leq k_z \leq \infty$. Man erhält im einen Extremfall mit $k_x = k_y = 1$, also für ein kugelförmiges Detektionsvolumen, einen Faktor von 2/3, im anderen Extremfall mit $k_x = k_y = \infty$ (ebenes Detektionsvolumen) einen Faktor von 2.

Der Faktor $f(k_y, k_z) = x$ ergibt sich als die positive reelle Lösung der Gleichung

$$0 = 9x^5 + 10(k_y^2 + k_z^2 + 1)x^4 + [4(k_y^4 + k_z^4) + 6(k_y^2 + k_y^2 k_z^2 + k_z^2)]x^3 + 2(k_y^4 + k_y^4 k_z^2 + k_y^2 + 3k_y^2 k_z^2 + k_y^2 k_z^2 + k_z^2 + k_z^4)x^2 + [(k_y^4 + k_z^4 + k_y^4 k_z^4) - 6k_y^2 k_z^2 (k_y^2 + k_z^2 + 1)]x - 2k_y^2 k_z^2 (k_y^2 + k_z^2 + k_y^2 k_z^2)$$

(die Gleichung hat für $1 \leq k_y \leq k_z \leq \infty$ zwei komplexe, zwei negativ- und eine positiv- reelle Lösungen.)

Die Lösung läßt sich nicht analytisch angeben, Abbildung 2.6.1-1 gibt die numerisch errechnete Lösung im Bereich $1 \leq k_y \leq k_z \leq 10$.

Die Lage des Wendepunktes wird in erster Linie durch die kürzeste Diffusionszeit bestimmt.

Die Diffusion in den beiden anderen Raumrichtungen trägt einen Faktor $2/3 \leq f(k_y, k_z) \leq 2$ bei.

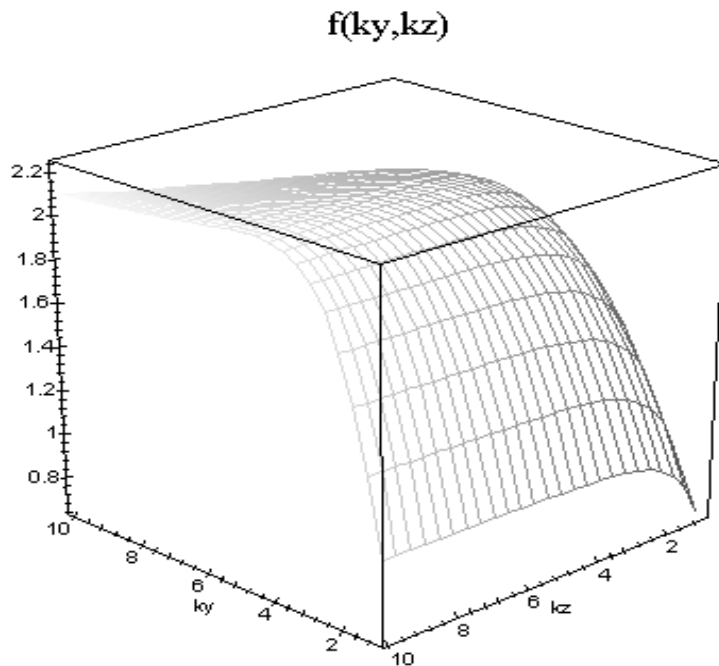


Abbildung 2.6.1-1 Lage des Wendepunktes von $G(\ln\tau)$ in Abhängigkeit von der Elliptizität des Detektionsvolumens. $\tau_{WP} = f(k_y, k_z) \tau_x$

2.6.2 FCS in bewegten Systemen

Findet zusätzlich zur ungerichteten Diffusion ein gerichteter Transport, z. B. durch eine Strömung, durch Elektrophorese oder durch Bewegung der gesamten Probe oder des Laserstrahles statt, so muß die Diffusionsgleichung modifiziert werden. Man erhält für die Teilchenstromdichte \vec{j} einen zusätzlichen Term $\vec{v}c$ der den Einfluß des Geschwindigkeitsfeldes $\mathbf{v}(\mathbf{r})$ widerspiegelt:

$$\vec{j} = -D\nabla c + \vec{v}c \quad (2.6.2-1)$$

Setzt man diese Gleichung in die Erhaltungsgleichung

$$\frac{\partial c}{\partial t} = -\nabla \vec{j}$$

ein, so erhält man:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D\nabla^2 c - c\nabla \vec{v} - \vec{v}\nabla c \quad (2.6.2-2)$$

Die Schwankung δC muß, wie zu Beginn des Abschnitts 2.6 erwähnt, diese Differentialgleichung ebenfalls erfüllen:

$$\frac{\partial \delta C(\vec{r}, t)}{\partial t} = D\nabla^2 \delta C(\vec{r}, t) - \delta C(\vec{r}, t)\nabla \vec{v}(\vec{r}) - \vec{v}(\vec{r})\nabla \delta C(\vec{r}, t) \quad (2.6.2-3)$$

δC ist dabei die Abweichung von der Durchschnittskonzentration, t die Zeit, \mathbf{r} der Ort, D die Diffusionskonstante und \mathbf{v} die (zeitlich unveränderliche) Strömung.

Magde hat dieses Problem für den Fall einer strömenden Schicht zwischen zwei parallelen Platten für ortsunabhängige (einheitliche) und für laminare Strömungen behandelt [Magde 1978]. Korrelationsfunktionen einheitlicher Strömungen und solche, bei denen die Probe mit konstanter Geschwindigkeit verschoben wird, sind mathematisch äquivalent.

Andere Autoren waren nur an der Amplitude der Korrelationsfunktion interessiert (um die Teilchenzahldichte zu bestimmen) und haben die Probe gezielt bewegt, um bei langsam diffundierenden Molekülen oder sehr stark verdünnten Proben die Meßzeit zu verkürzen. Dabei ließ man die Probe rotieren [Weissman 1976], oder bewegte sie linear [Petersen 1986]. Asai nutzte dagegen den zeitlichen Verlauf der Korrelationsfunktion, um den Teilchenfluß zu bestimmen [Asai 1980]. Van Orden und LeCaptain nutzten die unterschiedliche elektrophoretische Mobilität von DNS-Protein-Komplexen und DNS um mit rein diffusiver FCS nicht unterscheidbare Komplexe zu untersuchen [Van Orden 1998], [LeCaptain 2001]. Brinkmeier benutzt einen Aufbau mit zwei Detektionsvolumina in kurzem Abstand innerhalb einer Mikrostruktur. Durch Kreuzkorrelation der Signale lassen sich u.a. Aussagen über die Strömungsverhältnisse machen [Brinkmeier 1997], [Brinkmeier 1999].

Berechnung von φ

Wenn wir annehmen, die Probe aus Abschnitt 2.6.1 fließe mit konstanter Geschwindigkeit in y-Richtung bzw. die Probe werde in dieser Richtung verschoben, so vereinfacht sich Gleichung 2.6.2-3: Da eine homogene Strömung divergenzfrei ist, fällt der mittlere Term weg. Vom Gradienten der Konzentrationsschwankung bleibt bei der Skalarmultiplikation mit \mathbf{v} nur der Term in y-Richtung:

$$\frac{\partial \delta C(\vec{r}, t)}{\partial t} = D \nabla^2 \delta C(\vec{r}, t) - V \frac{\partial \delta C(\vec{r}, t)}{\partial y} \quad (2.6.2-4)$$

Man führt wieder die Fouriertransformation der Gleichung 2.6.1-3 durch und erhält entsprechend mit dem Diffusionskoeffizient D und der Geschwindigkeit V im reziproken Raum \mathbf{v} :

$$\frac{d\tilde{C}(\vec{v}, t)}{dt} = -D v^2 \tilde{C}(\vec{v}, t) - V i v_y \tilde{C}(\vec{v}, t) \quad (2.6.2-5)$$

Sortieren nach C und t und Integration ergibt

$$\tilde{C}(\vec{v}, \tau) = \tilde{C}(\vec{v}, 0) e^{-(D v^2 + V i v_y) \tau} \quad (2.6.2-6)$$

Einsetzen in Gleichung 2.6-7 führt in Analogie zu Gleichung 2.6.1-7 zu

$$\varphi(\vec{r}, \vec{r}', \tau) = \left\langle \delta C(\vec{r}, 0) \mathfrak{F}_{\vec{r}'}^{-1} \left[\tilde{C}(\vec{v}, 0) e^{-(D v^2 + V i v_y) \tau} \right] \right\rangle \quad (2.6.2-7)$$

Man zieht wieder $\delta C(\mathbf{r}, 0)$ in die Transformation hinein, vertauscht Ensemble- Mittelung und Fouriertransformation. Anschließend wird wieder $\tilde{C}(\vec{v}, \tau) = \mathfrak{F}_{\vec{v}}[\delta C(\vec{r}'', \tau)]$ gesetzt. Man erhält völlig analog zu Gleichung 2.6.1-8:

$$\varphi(\vec{r}, \vec{r}', \tau) = \mathfrak{F}_{\vec{r}'}^{-1} \left[e^{-(D v^2 + V i v_y) \tau} \frac{1}{\sqrt{2\pi}^3} \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} \exp(i \vec{v} \cdot \vec{r}'') \langle \delta C(\vec{r}, 0) \delta C(\vec{r}'', 0) \rangle d^3 \vec{r}'' \right] \quad (2.6.2-8)$$

Beachtet man nun Gleichung 2.6.1-9, welche besagt, daß eine Schwankung am Ort \mathbf{r} eine Schwankung am Ort \mathbf{r}' nur dann instantan beeinflussen kann, wenn die Orte identisch sind, so erhält man:

$$\varphi(\vec{r}, \vec{r}', \tau) = (2\pi)^{-3/2} \bar{C} \mathfrak{F}_{\vec{r}'}^{-1} \left[e^{-D(v^2 + V i v_y) \tau} \exp(i \vec{v} \cdot \vec{r}) \right] \quad (2.6.2-9)$$

Die verbleibende Rücktransformation ergibt in x- und z- Richtung die gleichen Terme wie Gleichung 2.6.1-11 in y-Richtung unterscheidet sich der Term jedoch:

$$\begin{aligned} \varphi(\vec{r}, \vec{r}', \tau) = & (2\pi)^{-3} \bar{C} \int_{-\infty}^{\infty} \exp[-Dv_x^2\tau + iv_x(x-x')]dv_x \int_{-\infty}^{\infty} \exp[-Dv_z^2\tau + iv_z(z-z')]dv_z \\ & \times \int_{-\infty}^{\infty} \exp[-Dv_y^2\tau - Vv_y\tau + iv_y(y-y')]dv_y \end{aligned} \quad (2.6.2-10)$$

Die Ergebnisse der Integrale in x- und z-Richtung können daher aus dem Abschnitt 2.6.1 übernommen werden. In y-Richtung ergibt sich:

$$\int_{-\infty}^{\infty} \exp[-Dv_y^2\tau - Vv_y\tau + iv_y(y-y')]dv_y = \int_{-\infty}^{\infty} \exp[-Dv_y^2\tau + iv_y(y-V\tau-y')]dv_y$$

Durch Aufsuchen der quadratischen Ergänzung und Integration des verbleibenden Gaußintegrals erhält man

$$\sqrt{\frac{\pi}{D\tau}} \exp\left[-\frac{(y-V\tau-y')^2}{4D\tau}\right]$$

Setzt man diesen Term zusammen mit den aus Abschnitt 2.6.1 bekannten Termen für die x- und z- Richtung in Gleichung 2.6.2-10 ein, so erhält man für die Teilchenzahldichtekorrelationsfunktion folgendes Ergebnis:

$$\begin{aligned} \varphi(\vec{r}, \vec{r}', \tau) = & (2\pi)^{-3} \bar{C} \left(\sqrt{\frac{\pi}{D\tau}}\right)^3 \exp\left\{-\frac{(x-x')^2 + (y-V\tau-y')^2 + (z-z')^2}{4D\tau}\right\} \quad (2.6.2-11) \\ \varphi(\vec{r}, \vec{r}', \tau) = & \frac{\bar{C}}{8(\sqrt{\pi D\tau})^3} \exp\left\{-\frac{(\vec{r} - \vec{r}' - V\hat{y}\tau)^2}{4D\tau}\right\} \end{aligned}$$

\hat{y} stellt dabei den Einheitsvektor in y-Richtung dar.

Berechnung von G

Um die Signalkorrelationsfunktion $G(\tau)$ zu erhalten, muß $\varphi(\mathbf{r}, \mathbf{r}', \tau)$ in Gleichung 2.6-6 eingesetzt und die Integration ausgeführt werden.

Die Terme in x- und z- Richtung können direkt aus Abschnitt 2.6.1 übernommen werden.

Für den Term in y-Richtung ergibt sich abweichend von Gleichung 2.6.1-14:

$$\begin{aligned} \iint \dots dy' dy = & \int_{-\infty}^{\infty} \exp\left\{-2\left(\frac{y}{\omega_y}\right)^2\right\} \int_{-\infty}^{\infty} \exp\left\{-2\left(\frac{y'}{\omega_y}\right)^2\right\} \exp\left\{-\frac{(y-V\tau-y')^2}{4D\tau}\right\} dy' dy \\ = \exp\left\{-\left[\frac{V^2\tau^2}{4D\tau}\right]\right\} & \int_{-\infty}^{\infty} \exp\left\{-\left[\frac{2y^2}{\omega_y^2} + \frac{y^2 - 2yV\tau}{4D\tau}\right]\right\} \int_{-\infty}^{\infty} \exp\left\{-\left[\frac{2y'^2}{\omega_y^2} + \frac{y'^2 - 2yy' + 2y'V\tau}{4D\tau}\right]\right\} dy' dy \end{aligned} \quad (2.6.2-12)$$

Aufsuchen der quadratischen Ergänzung im inneren Integral (über y') und Integration ergibt:

$$\int_{-\infty}^{\infty} \exp\left\{-\left[\frac{2y'^2}{\omega_y^2} + \frac{y'^2 - 2yy' + 2y'V\tau}{4D\tau}\right]\right\} dy'$$

$$= \frac{2\sqrt{D\tau}\omega_y}{\sqrt{8D\tau + \omega_y^2}} \exp\left\{+\frac{\omega_y^2 y^2 - 2\omega_y V\tau y + \omega_y^2 V^2 \tau^2}{4D\tau(8D\tau + \omega_y^2)}\right\} \sqrt{\pi}$$

Dieses Zwischenergebnis wird in Gleichung 2.6.2-12 eingesetzt und führt zu

$$\iint \dots dy' dy$$

$$= \frac{2\sqrt{\pi D\tau}\omega_y}{\sqrt{8D\tau + \omega_y^2}} \exp\left\{-\left[\frac{V^2 \tau^2}{4D\tau}\right]\right\} \int_{-\infty}^{\infty} \exp\left\{-\left[\frac{(8D\tau + \omega_y^2)y^2 - 2\omega_y V\tau y}{4D\tau\omega_y^2} - \frac{\omega_y^2 y^2 - 2\omega_y V\tau y + \omega_y^2 V^2 \tau^2}{4D\tau(8D\tau + \omega_y^2)}\right]\right\} dy$$

Der Exponent im verbleibenden Integral wird zusammengefaßt:

$$= \frac{2\sqrt{\pi D\tau}\omega_y}{\sqrt{8D\tau + \omega_y^2}} \exp\left\{-\left[\frac{V^2 \tau^2}{4D\tau}\right]\right\} \int_{-\infty}^{\infty} \exp\left\{+4\frac{(4D\tau + \omega_y^2)y^2 - \omega_y^2 V\tau y}{(8D\tau + \omega_y^2)\omega_y^2}\right\} \exp\left\{-\frac{\omega_y^2 V^2 \tau^2}{4D\tau(8D\tau + \omega_y^2)}\right\} dy$$

Der letzte Term hängt nicht von y ab und darf daher vor das Integral gezogen werden. Anschließend wird die quadratische Ergänzung im Zähler des Exponenten des verbleibenden Integrals aufgesucht und die Gaußfunktion integriert.

$$\iint \dots dy' dy = \frac{\pi\sqrt{D\tau}\omega_y^2}{\sqrt{(4D\tau + \omega_y^2)}} \exp\left\{-\left[\frac{V^2 \tau^2}{4D\tau + \omega_y^2}\right]\right\} \quad (2.6.2-13)$$

Durch Austausch des Faktors

$$\frac{\pi\sqrt{D\tau}\omega_y^2}{\sqrt{4D\tau + \omega_y^2}},$$

der in Gleichung 2.6.1-15 das Doppelintegral in y-Richtung bei ruhender Probe (V=0) wiedergibt durch den rechten Term der Gleichung 2.6.2-14 wird also der Term

$$\exp\left\{-\left[\frac{V^2 \tau^2}{4D\tau + \omega_y^2}\right]\right\}$$

neu eingeführt. Man erhält also Gleichung 2.6.2-15 statt Gleichung 2.6.1-19 für die Korrelationsfunktion:

$$G(\tau) = \frac{1}{\bar{C}(\sqrt{\pi})^3 \omega_x \omega_y \omega_z} \frac{1}{\sqrt{\frac{4D\tau}{\omega_x^2} + 1}} \frac{1}{\sqrt{\frac{4D\tau}{\omega_y^2} + 1}} \frac{1}{\sqrt{\frac{4D\tau}{\omega_z^2} + 1}} \exp\left\{-\left[\frac{\frac{V^2}{\omega_y^2} \tau^2}{\frac{4D\tau}{\omega_y^2} + 1}\right]\right\} \quad (2.6.2-14)$$

Dabei ist \bar{C} die mittlere Teilchenzahldichte D die Diffusionskonstante V die einheitliche Geschwindigkeit, mit der sich die Probe in y -Richtung bewegt und $\omega_x, \omega_y, \omega_z$, sind die Achsenabschnitte des Ellipsoids, an dem die Detektionseffizienz auf $1/e^2$ des Maximalwertes im Zentrum gefallen ist.

Man kann Gleichung 2.6.2-14 umformulieren, so daß statt der Achsenabschnitte des Detektionsellipsoids charakteristische Diffusions- bzw. Durchtrittszeiten als Parameter in der Gleichung stehen:

$$G(\tau) = G(0) \frac{1}{\sqrt{\frac{\tau}{\tau_x} + 1}} \frac{1}{\sqrt{\frac{\tau}{\tau_y} + 1}} \frac{1}{\sqrt{\frac{\tau}{\tau_z} + 1}} \exp \left\{ - \left[\frac{\frac{\tau^2}{\tau_f^2}}{\frac{\tau}{\tau_y} + 1} \right] \right\}$$

Die Diffusionszeiten sind bzw. die Durchtrittszeit ist dabei durch

$$\tau_\alpha = \frac{\omega_\alpha^2}{4D}, \quad \alpha = x, y, z \quad \tau_f = \frac{\omega_y}{V}$$

definiert.

Die Amplitude der Funktion $G(0)$ ist unabhängig von der Geschwindigkeit und wird durch die Strömung nicht beeinflusst. Das muß auch so sein: Da die angenommene homogene Strömung divergenzfrei ist, müssen genauso viele Teilchen in das Detektionsvolumen eintreten wie herausströmen. Diese Situation wird sich freilich ändern, wenn die Fluorophore im Detektionsvolumen photozerstört werden, denn dann stellt das Detektionsvolumen eine Senke dar und die Strömung liefert frische Teilchen nach, was zu einem erhöhten Besetzungsgrad des Detektionsvolumens im Vergleich zur ruhenden Probe führt.

Da die Geschwindigkeit nur quadratisch in der Funktion steht, kann man nicht unterscheiden, ob die Bewegung in positiver oder in negativer y -Richtung erfolgt. Da die Ausdehnung des Detektionsvolumens in Strömungsrichtung im geschwindigkeitsabhängigen Term steht, sollte man, falls die Ausdehnung des Detektionsvolumens entlang der Raumachsen unterschiedlich ist, jedoch unterscheiden können, in welcher Raumrichtung sich die Probe bewegt [Asai 1980].

Mit

$$\tau_x = \frac{\omega_x^2}{4D} \quad k_y = \sqrt{\frac{\tau_y}{\tau_x}} = \frac{\omega_y}{\omega_x} \quad k_z = \sqrt{\frac{\tau_z}{\tau_x}} = \frac{\omega_z}{\omega_x} \quad k_f = \frac{\tau_x}{\tau_f} = \frac{\omega_x^2 V}{4D \omega_y} = \frac{\omega_x V}{4D k_y}$$

erhält man aus Gleichung 2.6.2-14:

$$G(\tau) = G(0) \frac{1}{\sqrt{\frac{\tau}{\tau_x} + 1}} \frac{1}{\sqrt{\frac{\tau}{k_y^2 \tau_x} + 1}} \frac{1}{\sqrt{\frac{\tau}{k_z^2 \tau_x} + 1}} \exp \left\{ - \left[\frac{k_f^2 \frac{\tau^2}{\tau_x^2}}{\frac{\tau}{k_y^2 \tau_x} + 1} \right] \right\}$$

Der ruhenden Probe entspricht $k_f = 0$.

Die Lage des Wendepunktes des Graphen von $G(\tau)$ gegen $\ln\tau$ ist bei einer bewegten Probe gegenüber der ruhenden Probe zu kürzeren Zeiten verschoben. Man kann τ_{WP} als

$$\tau_{WP} = f(k_y, k_z, k_f)\tau_x$$

ausdrücken:

Das Nullsetzen der zweiten Ableitung $d^2G(\tau)/d\ln\tau^2$ führt nach Kürzen durch τ_x auf ein längliches Polynom neunten Grades dessen positive reelle Lösung $f(k_y, k_z, k_f)$ angibt. Abbildung 2.6.2-1 gibt den numerisch errechneten Faktor $f(k_y, k_z, k_f) = \tau_{WP}/\tau_x$ Wendepunkt für $k_y=1$ bei verschiedenen Werten $k_z = 1..10$ und $k_f=0..3$ an.

Erstaunlicherweise verschiebt sich der Wendepunkt mit steigender Geschwindigkeit zunächst zu längeren Zeiten. Erst ab einer Flußgeschwindigkeit, die zu einer Durchtrittszeit führt, welche in etwa so groß wie die Diffusionszeit ist, sinkt $f(k_y, k_z, k_f)$ und der Wendepunkt verschiebt sich zu kürzeren Zeiten als bei Abwesenheit des Flusses. Die Lage des Maximums ist abhängig von k_y (und weniger stark auch von k_z). In Abb. 2.6.2 liegt es in etwa zwischen $k_f = 0,5$ und $k_f = 0,7$. Ab $k_f > 0,9$ verschiebt der Fluß den Wendepunkt zu kürzeren Zeiten. Im Maximum erreicht f Werte bis 1,1, d.h. $\tau_{WP} = 1,1 \times \tau_x$.

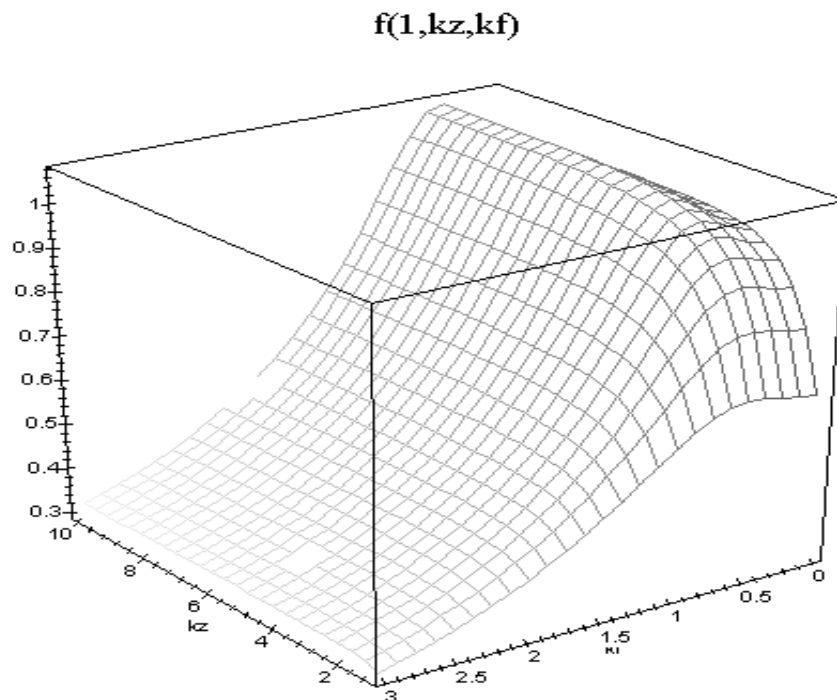


Abbildung 2.6.2-1 Lage des Wendepunktes $\tau_{WP} = f(k_y, k_z, k_f) \times \tau_x$ der Korrelationsfunktion bei einem zylindersymmetrischen ($\omega_x = \omega_y = \omega_{xy}$) Detektionsvolumen für verschiedene Achsenverhältnisse $k_z = \omega_z/\omega_{xy}$ und Strömungsgeschwindigkeiten $k_f = V\omega_{xy}/(4D)$.

2.6.3 Photochemische Prozesse

Sind die photochemischen Prozesse schnell gegenüber der Diffusion, oder beeinflussen sie die Diffusionskonstante nicht, so läßt sich die Gesamtkorrelationsfunktion in einen diffusiven und einen photochemischen Term aufspalten:

$$G(\tau) = G_{Diff}(\tau) \cdot G_{fast}(\tau) \quad (2.6.3-1)$$

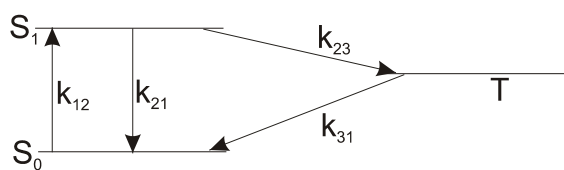
$G_{fast}(\tau)$ beschreibt dabei die schnellen Prozesse und G_{Diff} den diffusiven Anteil nach Abschnitt 2.6.1 oder 2.6.2.

Tripletzustand

Finden außer der Diffusion noch Übergänge in den Tripletzustand statt, führt dies bei kleinen Korrelationszeiten zu einem weiteren Anstieg der Korrelationsfunktion [Widengren 1994 und Widengren 1995]. Ursache dafür ist, daß die Moleküle während der Verweildauer im Tripletzustand nicht fluoreszieren können. Die Moleküle flackern auf einer schnellen Zeitskala ($\sim \mu\text{s}$), verursachen also eine zusätzliche Schwankung der Fluoreszenzintensität. Man erhält:

$$G(\tau) = \frac{1 - T_{Eq} (1 - e^{\lambda_3 \tau})}{1 - T_{Eq}} G_{Diff}(\tau) \quad (2.6.3-2)$$

Die konstante λ_3 entspricht dabei in etwa der Populationsrate des Tripletzustands im stationären Grenzfall und T_{Eq} dem Anteil der Moleküle im Tripletzustand. Es gilt :



$$\lambda_3 \approx -k_{31} - \frac{k_{12}k_{23}}{k_{12} + k_{21}} \quad \text{und}$$

$$T_{Eq} = \frac{k_{23}k_{12}}{k_{12}(k_{23} + k_{31}) + k_{31}(k_{21} + k_{23})}$$

Diese Terme enthalten die Anregungsrate k_{12} , d.h. sie sind leistungsabhängig. Außerdem werden sie durch die Anwesenheit von Tripletquenchern, wie z.B. Sauerstoff, beeinflusst [Widengren 1995]. Mit zunehmender Leistung wächst T_{Eq} und damit die Amplitude des Tripletanteils an der Korrelationsfunktion.

Isomerisierung

Das in dieser Arbeit verwendete Farbstoffmolekül Cy5 unterliegt neben dem Übergang in

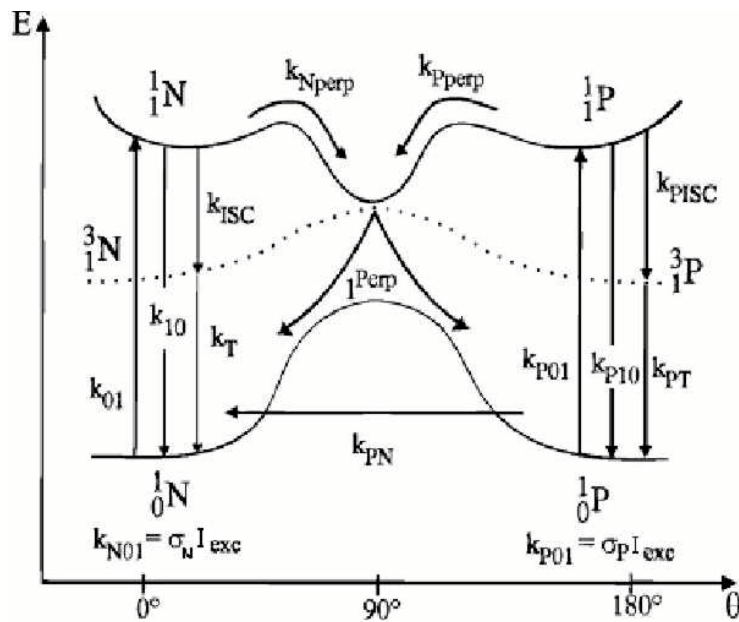


Abbildung 2.6.3-1 Reaktionsprofil für die Isomerisierung
Als Abszisse ist der Torsionswinkel um die isomerisierende Bindung aufgetragen. (Kopiert aus [Widengren 2000].)

den Tripletzustand einer photoinduzierten Trans-Cis-Isomerisierung [West 1967]. Die Isomerisierung erfolgt aus dem ersten angeregten Singulettzustand [Widengren 2000] der All-Trans-Form heraus an einer der Doppelbindungen der Pentamethinkette zwischen den beiden Indolinköpfen. Die Isomerisierung ist zwar auch thermisch möglich, k_{PN} in Abbildung 2.6.3-1, weil wegen der Konjugation der Doppelbindungen die Bindungsordnung und damit die Rotationsbarriere herabgesetzt ist; der photoinduzierte Vorgang ist jedoch bei den verwendeten Strahlungsintensitäten um etwa drei Zehnerpotenzen schneller. Auf

der Hyperfläche des Grundzustandes stellt die rechtwinklige Konformation (Abbildung 2.6.3-2) einen Übergangszustand dar, im angeregten Zustand dagegen ein Energieminimum $^1_1\text{Perp}$. Aus diesem Minimum heraus kann das Molekül entweder in den Grundzustand der All-Trans-Form oder in das Mono-Cis-Isomer relaxieren.

Das Cis-Isomer relaxiert aus dem angeregten Zustand ^1_1P strahlungslos. Die Isomerisierung führt also, wie der Übergang in den Tripletzustand, zu einer relativ langlebigen (μs -Zeitskala) nicht fluoreszierenden Spezies. Dadurch ergibt sich eine zusätzliche Schwankung der Intensität, und man erhält einen weiteren Anstieg der Korrelationskurve für kleine Zeitverschiebungen τ .

Im Gegensatz zum Anstieg der Korrelationsfunktion durch den Übergang in den Tripletzustand ist jedoch die Amplitude dieses Anstiegs in weiten Bereichen leistungsunabhängig, da sowohl Hin- als auch Rückreaktion durch die Anregung beschleunigt werden. Die Abklingzeit ist dagegen stark leistungsabhängig. Die Amplitude liegt in etwa in der Größenordnung der Amplitude des Diffusionsanteils der Korrelationsfunktion. Sie macht also etwa 50% der Gesamtamplitude aus, was bedeutet, daß etwa 50% der Cy5-Moleküle im Fokus in der nicht fluoreszierenden Cis-Form vorliegen [Widengren 2001].

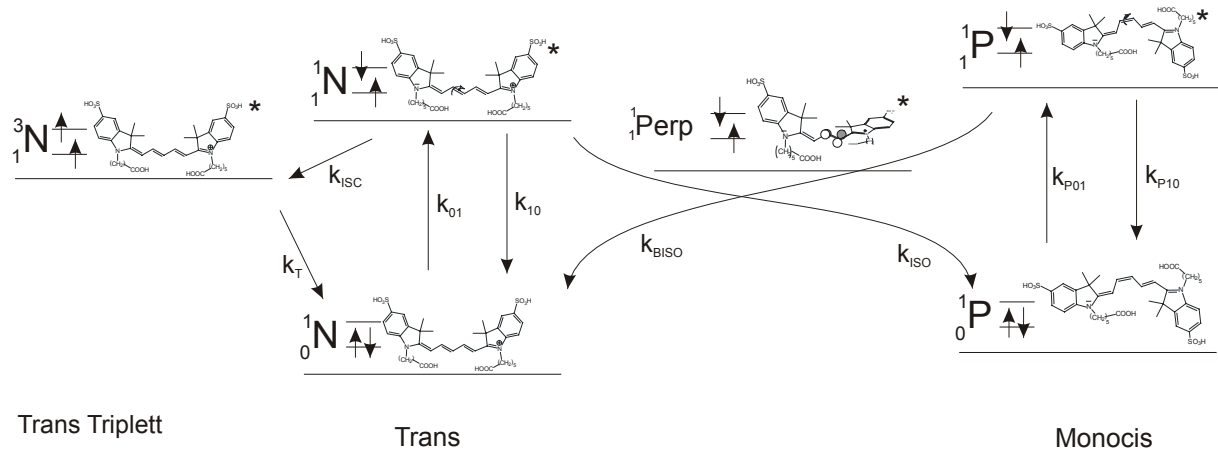


Abbildung 2.6.3-2 Photoisomerisierung und Triplettbildung bei Cy5

Unter der vereinfachenden Annahme, daß die Anregungsintensität im Detektionsvolumen konstant sei, erhält man für die Korrelationsfunktion [Widengren 2000, Gleichung 24]:

$$G(\tau) = \frac{\langle I(0)I(\tau) \rangle}{\langle I \rangle^2} - 1 = G_{Diff}(\tau) \times \left[1 + \frac{B_2}{B_1} \exp(\lambda_2 \tau) + \frac{B_3}{B_1} \exp(\lambda_3 \tau) \right] \quad (2.6.3-3)$$

Die konstanten B und λ hängen dabei folgendermaßen mit den Geschwindigkeitskonstanten der Reaktionen zusammen:

$$B_1 = \langle {}^1N \rangle = \frac{k_T}{\alpha} k'_{BISO} \quad B_2 = \frac{(\beta + \gamma)(k_T \gamma + \delta)}{4\alpha\gamma} \quad B_3 = \frac{(\beta - \gamma)(k_T \gamma - \delta)}{4\alpha\gamma}$$

$$\lambda_2 = -\frac{k'_{ISC} + k_T + k'_{ISO} + k'_{BISO}}{2} + \sqrt{\left(\frac{k'_{ISC} + k_T + k'_{ISO} + k'_{BISO}}{2} \right)^2 - k'_{ISO} k_T - k'_{ISC} k'_{BISO} - k_T k'_{BISO}}$$

$$\lambda_3 = -\frac{k'_{ISC} + k_T + k'_{ISO} + k'_{BISO}}{2} - \sqrt{\left(\frac{k'_{ISC} + k_T + k'_{ISO} + k'_{BISO}}{2} \right)^2 - k'_{ISO} k_T - k'_{ISC} k'_{BISO} - k_T k'_{BISO}}$$

(In der Originalliteratur werden die B_i als $A_i v_i(1)$ bezeichnet [Widengren2000, Gleichung 20a-c und Gleichung 19].)

Dabei ist

$$k'_{ISC} = \frac{k_{01}}{k_{01} + k_{10}} k_{ISC} = \frac{\sigma_N I_{exc}}{\sigma_N I_{exc} + k_{10}} k_{ISC} \quad k'_{ISO} = \frac{k_{01}}{k_{01} + k_{10}} k_{ISO} = \frac{\sigma_N I_{exc}}{\sigma_N I_{exc} + k_{10}} k_{ISO}$$

$$k'_{BISO} = \frac{k_{P01}}{k_{P10} + k_{P01}} k_{BISO} \approx \sigma_{BISO} I_{exc} \quad [\text{Widengren2000, Gleichung 13-15}]$$

und

$$\alpha = k'_{ISO} k_T + k'_{ISC} k'_{BISO} + k'_{BISO} k_T \quad \beta = k'_{ISC} + k'_{ISO} + k_T - k'_{BISO}$$

$$\gamma = \sqrt{(k'_{ISC} + k'_{ISO})^2 + (k'_{BISO} - k_T)^2 + 2(k'_{ISO} - k'_{ISC})(k'_{BISO} - k_T)}$$

$$\delta = k_T (k'_{ISO} + k'_{BISO} - k_T - k'_{ISC}) + 2k'_{ISC} k'_{BISO}$$

(2.6.3-4)

Die k-Werte sind die Geschwindigkeitskonstanten der Reaktionen, die in den Abbildungen 2.6.3-1 und 2.6.6-2 eingezeichnet sind. I_{exc} ist die mittlere Anregungsintensität im effektiven Detektionsvolumen, $(\sqrt{\pi})^3 \omega_x \omega_y \omega_z$, für ein Gaußsches Intensitätsprofil in freier Lösung (Vergl. Gleichung 2.6.1-18). σ_N und σ_P sind die Absorptionsquerschnitte des All-Trans-Isomers bzw. der photoisomerisierten Mono-Cis-Form.

Außer von der Anregungsleistung hängt die Isomerisierung noch von der Viskosität des Lösungsmittels ab. Mit steigender Viskosität wächst die Korrelationszeit der Isomerisierung während die Amplitude sinkt.

Photozerstörung

Im Unterschied zu den beiden vorangegangenen Reaktionen ist die Photozerstörung irreversibel. Die Photozerstörung führt daher nicht zu einem Flackern und damit zu einem Anstieg der Korrelationsfunktion, sondern zu einer scheinbaren Abnahme der Diffusionszeit [Widengren 1996], [Eggeling 1998], da die Moleküle erlöschen, bevor sie das Detektionsvolumen verlassen haben. Ursache der Photozerstörung ist, daß die angeregten Moleküle

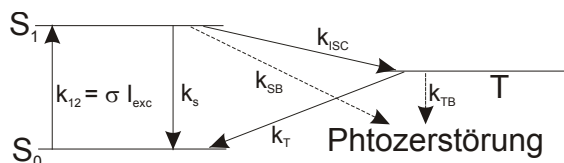


Abbildung 2.6.3-4 Reaktionsschema für die Photozerstörung

viel reaktiver sind als die Moleküle im Grundzustand und daher leichter Reaktionen eingehen, die zu ihrer Zerstörung führen, wie z.B. Oxidation durch gelösten Sauerstoff oder Reaktionen mit dem Lösungsmittel. Moleküle im Triplettsystem können außerdem in Kontakt mit Sauerstoff zur Bildung des sehr aggressiven Singulett-Sauerstoffs führen, der die Moleküle

anschließend zerstört. Abbildung 2.6.3-4 gibt ein vereinfachtes Reaktionsschema wieder: Die Moleküle haben nach diesem Schema zwei mögliche Wege photozerstört zu werden: Entweder direkt aus dem ersten angeregten Singulettzustand, S_1 , oder, nach einem Übergang ins Triplettsystem, aus dem niedrigsten Triplettsystem, T.

Falls man mit Anregungsintensitäten mißt, bei denen Photozerstörung während des Durchtritts des Moleküls durch das Detektionsvolumen auftritt, erhält man einen zusätzlichen Term in der Korrelationsfunktion:

$$G(\tau) = \frac{\langle I(0)I(\tau) \rangle}{\langle I \rangle^2} - 1 = G_{\text{Diff}}(\tau) G_{\text{Fast}}(\tau) \times \left[1 - \sum_i C_i (1 - e^{-k_{PD,i}\tau}) \right] \quad (2.6.3-5)$$

Je nach Farbstoff benötigt man mehr oder weniger Exponentialterme, um den Verlauf der Korrelationsfunktion befriedigend zu beschreiben. So genügt bei dem Farbstoff Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) ein Term, während bei Rhodamin 6G (R6G) zwei Terme benötigt werden [Widengren 1996].

Für die Quantenausbeute der Photozerstörung, Φ_{PD} , also den Anteil der angeregten Moleküle die photozerstört werden, gilt:

$$\Phi_{PD} = \frac{1}{\bar{S}_1 (k_S + k_{ISC})} \frac{\sum_i C_i}{\sum_i (C_i / k_{PD,i})} \quad (2.6.3-6)$$

Dabei ist \bar{S}_1 die mittlere Konzentration der Moleküle im $\langle S_1 \rangle$:

$$\bar{S}_1 = \frac{\sigma I_{exc} k_T}{\sigma I_{exc} (k_T + k_{ISC}) + k_S k_T}.$$

I_{exc} bezeichnet die Anregungsintensität, die Bedeutung der Geschwindigkeitskonstanten k ist Abbildung 2.6.3-4 zu entnehmen.

2.6.4 Untergrund

Ist dem Fluoreszenzsignal $F(t)$ ein unkorrelierter Untergrund $U(t)$ überlagert, so sinkt die Amplitude der Korrelationsfunktion, wie folgende Rechnung zeigt:

Setzt man in Gleichung 2.6-2

$$I(t) = U(t) + F(t) \quad (2.6.4-1)$$

ein, so erhält man für $G(\tau)$:

$$G(\tau) = \frac{\langle [U(t) + F(t)][U(t+\tau) + F(t+\tau)] \rangle - 1}{\langle U + F \rangle^2} \quad (2.6.4-2)$$

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

$$G(\tau) = \frac{\langle U(t)U(t+\tau) \rangle + \langle F(t)U(t+\tau) \rangle + \langle U(t)F(t+\tau) \rangle + \langle F(t)F(t+\tau) \rangle - \langle U \rangle^2 - 2\langle UF \rangle - \langle F \rangle^2}{\langle U + F \rangle^2} \quad (2.6.4-3)$$

Nach der oben gemachten Voraussetzung ist der Untergrund unkorreliert, es gilt daher:

$$\langle U(t)U(t+\tau) \rangle = \langle U^2 \rangle = \langle U \rangle^2 \quad \text{sowie} \quad \langle U(t)F(t+\tau) \rangle = \langle U(t+\tau)F(t) \rangle = \langle UF \rangle = \langle U \rangle \langle F \rangle.$$

($\langle U^2 \rangle = \langle U \rangle^2$ folgt aus der Tatsache, daß Zählraten Poisson-verteilt sind.)

Damit vereinfacht sich Gleichung 2.6.4-3 zu:

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

$$G(\tau) = \frac{\langle F(t)F(t+\tau) \rangle - \langle F \rangle^2}{\langle F \rangle^2} \frac{\langle F \rangle^2}{\langle U + F \rangle^2} \quad (2.6.4-4)$$

Der erste Faktor beschreibt die reine Fluoreszenzkorrelationsfunktion ohne Untergrund, während der zweite Faktor die Dämpfung der Amplitude wiedergibt. Da der zweite Faktor zeitunabhängig ist, hat der Untergrund keinen Einfluß auf die aus der Korrelationsfunktion gewonnene Diffusionszeit, Triplettübergangsrate, Flußgeschwindigkeit etc.

Durch kürzen durch $\langle F \rangle^2$ läßt sich der Amplitudenfaktor auf die 1974 von Koppel veröffentlichte Form bringen [Koppel 1974]:

$$G(\tau) = \frac{\langle F(t)F(t+\tau) \rangle - \langle F \rangle^2}{\langle F \rangle^2} \frac{1}{\left(\frac{\langle U \rangle}{\langle F \rangle}\right)^2 + 1} = \frac{\langle F(t)F(t+\tau) \rangle - \langle F \rangle^2}{\langle F \rangle^2} \frac{\left(\frac{\langle F \rangle}{\langle U \rangle}\right)^2}{1 + \left(\frac{\langle F \rangle}{\langle U \rangle}\right)^2} \quad (2.6.4-5)$$

Beim Signal-zu-Rausch-Verhältnis F/U ist dabei jedoch zu berücksichtigen, daß damit das Verhältnis über die gesamte Messung (und nicht nur innerhalb eines Ereignisses) gemeint ist. Da F/U proportional zu \bar{C} ist, läuft der Amplitudenfaktor für $c \rightarrow 0$ wie $c^2 + O(c^4)$ schneller gegen Null als $G_{\text{nur Fluoreszenz}}(0) (\propto 1/c)$ wächst. Daher strebt die Amplitude der FCS bei kleinen Konzentrationen gegen Null, statt wie man bei einer Betrachtung von Gleichung 2.6.1-20 annehmen könnte, anzuwachsen. Die größte Amplitude erreicht die FCS, wenn die aus der Fluoreszenz her rührende Signalintensität gerade genauso groß ist, wie der Untergrund [Rigler 1990].

Eggeling et. al. zweifeln diese Formel an [Eggeling 2001]. Da sie jedoch modellunabhängig entwickelt wurde und ohne Näherungen auskommt, muß die Diskrepanz zwischen dem dort berichteten Experiment und Koppels Formel wohl zeitlichen Schwankungen im Untergrund während des Experiments oder einer fehlerhaften F/U -Bestimmung zugeschrieben werden.

2.6.5 Korrelationsfunktionen von Mischungen

In einer Mischung zweier Fluorophore setzt sich die gemessene Signalintensität aus den Teilbeiträgen beider Spezies zusammen:

$$I(t) = F_1(t) + F_2(t) \quad (2.6.5-1)$$

Setzt man dies in Gleichung 2.6-2 ein, so erhält man

$$G(\tau) = \frac{\langle [F_1(t) + F_2(t)][F_1(t+\tau) + F_2(t+\tau)] \rangle - 1}{\langle F_1 + F_2 \rangle^2} \quad (2.6.5-2)$$

$$\begin{aligned} G(\tau) &= \frac{\langle F_1(t)F_1(t+\tau) + F_2(t)F_1(t+\tau) + F_1(t)F_2(t+\tau) + F_2(t)F_2(t+\tau) \rangle - \langle F_1 + F_2 \rangle^2}{\langle F_1 + F_2 \rangle^2} \\ &= \frac{\langle F_1(t)F_1(t+\tau) \rangle + \langle F_2(t)F_1(t+\tau) \rangle + \langle F_1(t)F_2(t+\tau) \rangle + \langle F_2(t)F_2(t+\tau) \rangle - \langle F_1 \rangle^2 - 2\langle F_1F_2 \rangle - \langle F_2 \rangle^2}{\langle F_1 + F_2 \rangle^2} \end{aligned} \quad (2.6.5-3)$$

Wenn die Spezies nicht miteinander reagieren, und physikalische Wechselwirkungen zwischen ihnen vernachlässigbar sind, was aufgrund der starken Verdünnung im Allgemeinen vorausgesetzt werden darf, so sind F_1 und F_2 unkorreliert und es gilt:

$$\langle F_1(t)F_2(t+\tau) \rangle = \langle F_1(t+\tau)F_2(t) \rangle = \langle F_1F_2 \rangle = \langle F_1 \rangle \langle F_2 \rangle$$

Damit vereinfacht sich Gleichung 2.6.5-3 zu

$$G(\tau) = \frac{\langle F_1(t)F_1(t+\tau) \rangle + \langle F_2(t)F_2(t+\tau) \rangle - \langle F_1 \rangle^2 - \langle F_2 \rangle^2}{\langle F_1 + F_2 \rangle^2} \quad (2.6.5-4)$$

$$G(\tau) = \frac{\langle F_1(t)F_1(t+\tau) \rangle - \langle F_1 \rangle^2}{\langle F_1 + F_2 \rangle^2} + \frac{\langle F_2(t)F_2(t+\tau) \rangle - \langle F_2 \rangle^2}{\langle F_1 + F_2 \rangle^2}$$

$$G(\tau) = \frac{\langle F_1(t)F_1(t+\tau) \rangle - \langle F_1 \rangle^2}{\langle F_1 \rangle^2} \frac{\langle F_1 \rangle^2}{\langle F_1 + F_2 \rangle^2} + \frac{\langle F_2(t)F_2(t+\tau) \rangle - \langle F_2 \rangle^2}{\langle F_2 \rangle^2} \frac{\langle F_2 \rangle^2}{\langle F_1 + F_2 \rangle^2}$$

Bezeichnet man mit $G_{N,i}(\tau)$ die auf $G_{N,i}(0)=1$ normierte zeitabhängige Korrelationsfunktion der Spezies i , so kann man dies umformulieren zu:

$$G(\tau) = \frac{\langle F_1 \rangle^2}{\langle F_1 + F_2 \rangle^2} G_1^0 G_{N,1}(\tau) + \frac{\langle F_2 \rangle^2}{\langle F_1 + F_2 \rangle^2} G_2^0 G_{N,2}(\tau)$$

$$G(\tau) = A_1 G_{N,1}(\tau) + A_2 G_{N,2}(\tau) \quad (2.6.5-5)$$

In Worten bedeutet das, daß die Korrelationsfunktion der Mischung eine Linearkombination der Korrelationsfunktionen der Komponenten ist.

Vorausgesetzt, die Fluorophore besitzen zwar unterschiedliche absolute Detektionseffizienzen $De_{0,1} \neq De_{0,2}$ Form des Detektionsvolumens ist aber für beide Spezies gleich $De_1(\vec{r})/De_{0,1} = De_2(\vec{r})/De_{0,2}$ (wenn man bedenkt, daß die Fluorophore sich in ihrer Emissionswellenlänge und in ihrem Sättigungsverhalten unterscheiden können, ist das nicht so selbstverständlich, wie es zunächst scheinen mag), so kann man die Teilamplituden G_i^0

mit Hilfe des Detektionsvolumens $V = \iiint \left(\frac{De(\vec{r})}{De_0} \right) d^3r$ und des Strukturfaktors

$\gamma = \iiint \left(\frac{De(\vec{r})}{De_0} \right)^2 d^3r / V$ substituieren:

$$G(\tau) = \frac{1}{\left(1 + \left\langle \frac{F_2}{F_1} \right\rangle\right)^2} \frac{\gamma}{c_1 V} G_{N,1}(\tau) + \frac{1}{\left(\left\langle \frac{F_1}{F_2} \right\rangle + 1\right)^2} \frac{\gamma}{c_2 V} G_{N,2}(\tau)$$

Die Signalintensitäten sind durch $F_i = De_{0,i} c_i V$ gegeben:

$$G(\tau) = \frac{1}{\left(1 + \frac{De_{0,2} c_2}{De_{0,1} c_1}\right)^2} \frac{\gamma}{c_1 V} G_{N,1}(\tau) + \frac{1}{\left(1 + \frac{De_{0,1} c_1}{De_{0,2} c_2}\right)^2} \frac{\gamma}{c_2 V} G_{N,2}(\tau) \quad (2.6.5-6)$$

Vergleicht man dieses Ergebnis mit Gleichung 2.6.5-5, so erkennt man daß sich die Amplituden der Teilfunktionen wie

$$\frac{A_1}{A_2} = \frac{De_{0,1}^2 c_1}{De_{0,2}^2 c_2} \quad (2.6.5-7)$$

verhalten.

2.7 Zufallszahlen

In dieser Arbeit wurden zur Simulation von Irrfahrtsprozessen, zur Erzeugung zufälliger Sequenzen und Ereignisabstände sowie zur Permutation von Ereignislisten Zufallszahlen benötigt. Wirkliche Zufallszahlen können mit arithmetischen Methoden aus prinzipiellen Gründen nicht erzeugt werden [Numerical Recipes in C, Kap. 7, Hartung 1991 S. 193 f.], wie J. von Neumann bereits im Jahr 1951 erkannte.

2.7.1 Zufallszahlengeneratoren

Zufallszahlengeneratoren auf Computern liefern Pseudozufallszahlen. Sie wiederholen sich nach einer bestimmten Periode. Die Ansi-C-Funktion `rand()` wiederholt sich z.B. beim in dieser Arbeit verwendeten Microsoft C++ 6.0, bereits nach 65536 Aufrufen. Sie basiert auf einem Verfahren, das als lineare Kongruenzmethode bezeichnet wird. Die lineare Kongruenzmethode liefert positive ganzzahlige Pseudozufallszahlen zwischen 0 und `RAND_MAX` (= $m-1$). Sie basiert auf folgender Rekursionsformel:

$$z_{n+1} = (a \cdot z_n + c) \bmod m \quad (2.7-1)$$

Der Startwert z_0 wird vom Programmierer über die Funktion `srand()` vorgegeben. a , c und m sind positive ganze Zahlen. Sie tragen die Bezeichnungen Multiplikator, Inkrement und Modulus. Die Sequenz der Pseudozufallszahlen ist von einem bestimmten Startwert ausgehend, immer dieselbe. Ein Nachteil dieser Methode liegt darin, daß die Zufallszahlen nicht unabhängig voneinander sind, sondern ihre Sequenz Korrelationen aufweist: Benutzt man jeweils k Zufallszahlen um einen Punkt im k -dimensionalen Raum zu wählen, so liegen die Punkte nicht gleichmäßig im Raum verteilt, sondern auf maximal $m^{1/k}$ $(k-1)$ -dimensionalen Ebenen in diesem Raum. Die genaue Anzahl dieser Ebenen hängt von den Parametern a , c und m ab.

In dieser Arbeit wurde nicht die vom Compiler mitgelieferte Bibliotheksfunktion zur Erzeugung der Pseudozufallszahlen verwendet, sondern der von der Keio-Universität (Yokohama, Japan) (<http://www.math.keio.ac.jp/~matumoto/emt.html>) oder der Universität Salzburg (<http://random.mat.sbg.ac.at/news/>) herunterladbare „Mersenne Twister“ [Matsumoto 1998]. Die Funktion `genrand()` liefert nach Initialisierung mit `sgenrand()` gleichverteilte Zufallszahlen im Intervall $[0,1]$. Die Periodenlänge dieses Generators beträgt $2^{19937}-1$, seine Gleichverteilungseigenschaft („equidistribution property“) bei 32 Bit Genauigkeit ist 623-dimensional. Das bedeutet anschaulich, daß man die Achsen eines 623-dimensionalen Einheitswürfels in 2^{32} Teilstrecken unterteilen kann und daß nach Ablauf einer vollen Periode des Generators, bei der zufällig Punkte im Einheitswürfel ausgewählt werden, jeder der $2^{32 \times 632}$ so entstandenen Teilwürfel gleich viele Punkte enthält [Matsumoto 1998].

2.7.2 Verteilungsfunktionen

Die Verteilungsfunktion $f(x)$ einer Zufallsvariablen x , die ein Kontinuum durchläuft, gibt die Wahrscheinlichkeitsdichte dafür an, daß die Variable einen Wert in der infinitesimalen Umgebung dx um x annimmt:

$$f(x)dx = W(x \leq x_i \leq x + dx) \quad \text{mit} \quad \int_{-\infty}^{+\infty} f(x)dx \equiv 1 \quad (2.7.2-1)$$

Im Intervall $[0, 1]$ gleichverteilte Zufallszahlen haben die Verteilungsfunktion

$$f(x) \cdot dx = \begin{cases} 1 \cdot dx & \text{für } 0 \leq x \leq 1 \\ 0 & \text{für } x < 0 \vee 1 < x \end{cases} \quad (2.7.1-2)$$

Zufallszahlengeneratoren liefern gleichverteilte Pseudozufallszahlen. Andere als gleichverteilte Zufallszahlen lassen sich nach der Transformationsmethode gewinnen. Wendet man auf die gleichverteilten Zufallszahlen x_i in eine nichtlineare Funktion $y = g(x)$ an, so sind die y_i nicht mehr gleichverteilt:

$$\tilde{f}(y)dy = W(y \leq y_i \leq y + dy)$$

$$\tilde{f}(y)dy = W(g(x) \leq g(x_i) \leq g(x) + g'(x)dx)$$

Unter der Voraussetzung, daß $g(x)$ streng monoton steigt oder fällt, ist die Aussage $g(x) \leq g(x_i) \leq g(x) + g'(x)dx$ äquivalent zu der Aussage $x \leq x_i \leq x + dx$, wovon man sich durch Anwendung der Umkehrfunktion überzeugen kann.

Daher gilt:

$$\tilde{f}(y) = f(x) \left| \frac{dx}{dy} \right| \quad (2.7.1-3)$$

Die Betragsstriche sorgen dafür, daß auch bei fallenden Funktionen $g(x)$ das Vorzeichen der Verteilungsfunktion positiv bleibt. Setzt man nach Gleichung 2.7.2-2 $f(x)dx = dx$, so erhält man die Differentialgleichung

$$\tilde{f}(y) = \frac{dx}{dy}$$

Integration über y ergibt die kumulative Dichtefunktion, deren Umkehrfunktion die gesuchte Abbildungsfunktion g ist:

$$W(y_i \leq y) = \int_{-\infty}^y \tilde{f}(v)dv = \tilde{F}(y) = x(y) = g^{-1}(y) \quad (2.7.2-4)$$

Mehrdimensionale Verteilungsfunktionen können mit Hilfe der Jacobi-Determinante transformiert werden. Das mehrdimensionale Analogon zu Gleichung 2.7.2-3 lautet:

$$\tilde{f}(y_1, y_2, \dots) = \left| \begin{array}{ccc} \left(\frac{\partial x_1}{\partial y_1} \right)_{y_2, \dots} & \left(\frac{\partial x_2}{\partial y_1} \right)_{y_2, \dots} & \dots \\ \left(\frac{\partial x_1}{\partial y_2} \right)_{y_1, y_3, \dots} & \left(\frac{\partial x_2}{\partial y_2} \right)_{y_1, y_3, \dots} & \dots \\ \dots & \dots & \dots \end{array} \right| f(x_1, x_2, \dots) \quad (2.7.2-5)$$

2.7.3 Exponentiell verteilte Zufallszahlen

Als Beispiel wird die Transformationsmethode für exponentiell verteilte Zufallszahlen ausführlich gerechnet. Mit der Verteilungsfunktion

$$\tilde{f}(y)dy = \begin{cases} \lambda e^{-\lambda y} dy & \text{für } y \geq 0 \\ 0 & \text{für } y < 0 \end{cases} \quad (2.7.3-1)$$

erhält man als kumulative Dichtefunktion

$$\tilde{F}(y) = \int_{-\infty}^y \tilde{f}(v)dv = \int_0^y \lambda e^{-\lambda v} dv = \left[-e^{-\lambda v} \right]_{v=0}^{v=y} = 1 - e^{-\lambda y} = x$$

Löst man die letzte Gleichung nach y auf, so erhält man für die Transformationsfunktion $y = g(x)$:

$$g(x) = y = -\frac{\ln(1-x)}{\lambda} \quad (2.7.3-2)$$

Wenn x auf dem Intervall $[0,1]$ gleichverteilt ist, so ist $1-x$ auf diesem Intervall ebenfalls gleichverteilt, so daß man die Transformationsfunktion mit

$$y = -\frac{\ln(x)}{\lambda}$$

auch einfacher wählen kann.

2.7.4 Lorentz-verteilte Zufallszahlen

Die Lorentzverteilung ist durch

$$\tilde{f}(y)dy = \frac{1}{\pi w} \frac{1}{1 + \left(\frac{y}{w}\right)^2} dy \quad (2.7.4-1)$$

gegeben. Daraus errechnet sich eine kumulative Verteilungsfunktion

$$\tilde{F}(y) = \frac{1}{2} + \frac{1}{\pi} \arctan\left(\frac{y}{w}\right) = x \quad (2.7.4-2)$$

Auflösen nach y ergibt wiederum die Transformationsfunktion:

$$y = w \cdot \tan\left(\pi x - \frac{\pi}{2}\right) \quad (2.7.4-3)$$

2.7.5 Normalverteilte Zufallszahlen

Da die Gaußfunktion keine analytische Stammfunktion hat, läßt sich die Transformationsmethode hier nicht direkt anwenden. Man kann aber ein Paar gleichverteilter Zufallszahlen in ein Paar normalverteilter Zufallsvariablen transformieren (Box-Muller-Methode). Sind x_1 und x_2 zwei unabhängige, auf $[0, 1]$ gleichverteilte Zufallszahlen, so sind

$$y_1 = \sqrt{-2 \ln(x_1)} \cdot \cos(2\pi x_2) \quad (2.7.5-1a)$$

$$y_2 = \sqrt{-2 \ln(x_1)} \cdot \sin(2\pi x_2) \quad (2.7.5-1b)$$

zwei unabhängige, standardnormalverteilte Zufallszahlen mit der Verteilungsfunktion

$$\tilde{f}(y) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{y^2}{2}} \quad (2.7.5-2)$$

Statt des Punktes (x_1, x_2) im Einheitsquadrat wählt man besser einen Punkt $(v_1=2x_1-1, v_2=2x_2-1)$ im Einheitskreis, d.h. man verwirft alle Paare (v_1, v_2) mit $v_1^2 + v_2^2 = R^2 \geq 1$.

Damit erhält man [Numerical Recipes in C, Kap. 7.2]:

$$v_1 = 2 \cdot x_1 - 1 \quad v_2 = 2 \cdot x_2 - 1 \quad 0 < R^2 = v_1^2 + v_2^2 < 1$$

$$y_1 = \sqrt{\frac{-2 \ln R^2}{R^2}} \cdot v_1 \quad y_2 = \sqrt{\frac{-2 \ln R^2}{R^2}} \cdot v_2$$

2.8 Zeitkorreliertes Einzelphotonenzählen

Beim zeitkorrelierten Einzelphotonenzählen wird eine gepulste Lichtquelle verwendet und der zeitliche Abstand zwischen dem detektierten Photon und dem Laserpuls gemessen. Da die Frequenz der Laserpulse (64 MHz) die der detektierten Photonen (max. 1 MHz) um ein vielfaches übersteigt, ist es sinnvoll, die Zeitmessung durch das Detektorsignal zu starten und den Abstand zum nächsten Laserpuls zu messen („invertierter Modus“). Da der Laser mit einer konstanten Repetitionsrate betrieben wird, kann auf den Abstand zum vorhergehenden Puls zurückgeschlossen werden. Die Methode hat außerdem den Vorteil daß dem möglichen Ereignis „Photon trifft ein“ immer das sichere Ereignis „Laserpuls“ folgt, so daß der Zeitmesser nicht bei jedem neuen Laserpuls zurückgesetzt werden muß, falls dem Puls kein Photon folgte. Der Zeitmesser ist ein „Time-to-Amplitude-Converter“ (TAC). Der Startpuls löst einen Ladevorgang an einem Kondensator aus. Der Stoppuls („Sync“) beendet diesen. Die im Kondensator akkumulierte Ladung und damit die an ihm abfallende Spannung ist der Ladezeit proportional. Die Stromstärke, mit der der Kondensator geladen wird, bestimmt die Proportionalitätskonstante „gain“. Die Maximale Ladespannung „range“ gibt zusammen mit dem „gain“ das Zeitfenster vor, in dem Start- und Stoppuls liegen müssen. Die gemessene Spannung wird digitalisiert und auf diese Weise in Kanäle eingeteilt. Die Kanalbreite ist um so kleiner, je größer die Datentiefe. Bei einer Datentiefe von 6 Bit ergeben sich z.B. 64 Kanäle. Bei einer „Range“ von 5×10^{-8} s und einem „gain“ von 4, ein Zeitfenster von 12,5 ns; bei 64 Kanälen ergibt sich so eine Kanalbreite von etwa 195 ps. Die Größe des Zeitfensters Richtet sich nach der Abklingdauer der zu untersuchenden Moleküle und nach der Repetitionsfrequenz des Lasers. Bei einer Pulsfrequenz von 64 MHz sollte dementsprechend das Zeitfenster kleiner als 15,6 ns sein, damit eine Synchronisierung von Laser und Zeitfenster möglich ist.

Die Lage von Start- und Stoppuls wird von einem „Constant Fraction Discriminator“ (CFD) festgestellt. Das Gerät bestimmt den Pulszeitpunkt durch Aufsuchen des Vorzeichenwechsels der zeitlichen Ableitung des Pulssignals. Um Fehlstarts auszuschließen werden für die Signalhöhe zum Pulszeitpunkt Schwellen festgelegt „ZC-Level“.

2.8.1 TTTR-Modus

Beim „time-tagged-time-resolved“ (TTTR)- Modus wird für jedes Photon die Zeit seit dem letzten Laserpuls (mikroskopische Zeit) und die Zeit seit Versuchsbeginn (makroskopische Zeit) aufgezeichnet und abgespeichert (Abbildung 2.8.1-1). Dies führt zu einer großen Datenmenge, die allerdings auch die vollständige Information enthält.

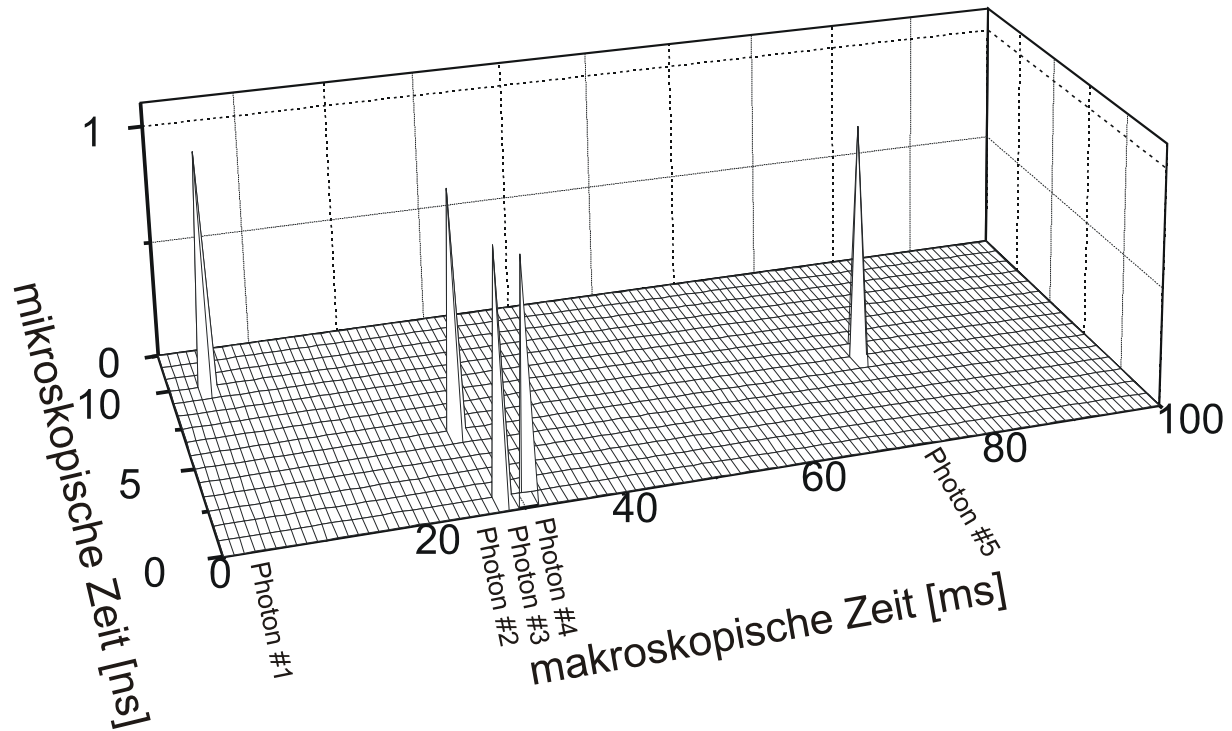


Abbildung 2.8.1-1 Graphische Darstellung des ttr-Verfahrens

Zu jedem Photon werden die Zeit seit Versuchsbeginn und die Zeit seit dem letzten Laserpuls gespeichert.

2.8.2 Histogrammverfahren

Bei der zweiten Methode („Continuous Mode“ oder „Time Correlated Histogramming“ (THC)) werden die Photonen nach ihrer Ankunftszeit seit dem letzten Laserpuls in Kanäle sortiert. Man erhält so ein Histogramm über die Häufigkeit, mit der die Photonen in einem bestimmten Abstand vom Laserpuls eintreffen. Die Breite der einzelnen Kanäle liegt im Bereich von etwa 70 ps-3 ns, der vom Histogramm abgedeckte Zeitbereich (mikroskopische Zeitskala) beträgt etwa 10 bis 50 ns.

Nach einer bestimmten Sammelzeit (Binweite) wird ein neues Histogramm erstellt. Bei dieser Methode ist die makroskopische Zeit eines Einzelphotons nicht mehr genau nachzuvollziehen. Man kann dann nur sagen, daß das Photon innerhalb der Akkumulationszeit des Histogrammes eingetroffen ist. Die Makroskopische Zeitskala beträgt einige Minuten bis Stunden bei einer Auflösung von 10^5 bis 10^7 Bins (mindestens 400 μ s/Bin bei den hier verwendeten Meßkarten).

Nach $2048=2^{10}$ (SPC-430) bzw. $4096=2^{11}$ (SPC-630) Bins wird eine neue Datei angelegt, so daß die Dateien mit einer Größe unter 1Mb noch handhabbar bleiben.

Der Vorteil des Histogrammverfahrens ist, daß praktisch unbegrenzt lange (bis die Festplatte voll ist) gemessen werden kann und, daß die Messung im Gegensatz zum TTTR-Modus (jedenfalls mit der verfügbaren „Timeharp“-Karte) zuverlässig erfolgt.

Abbildung 2.8.2-1 veranschaulicht die Struktur anhand experimentell gewonnener Daten graphisch. Sie zeigt die zeitaufgelöste Spur eines Tropfens einer 5×10^{-11} M Lösung von Cy5-dCTP in Femtopuffer (s. Kapitel 3.4.1). Im gezeigten Abschnitt fanden zwei Fluoreszenzereignisse („Bursts“) (s. Kapitel 4.3) statt.

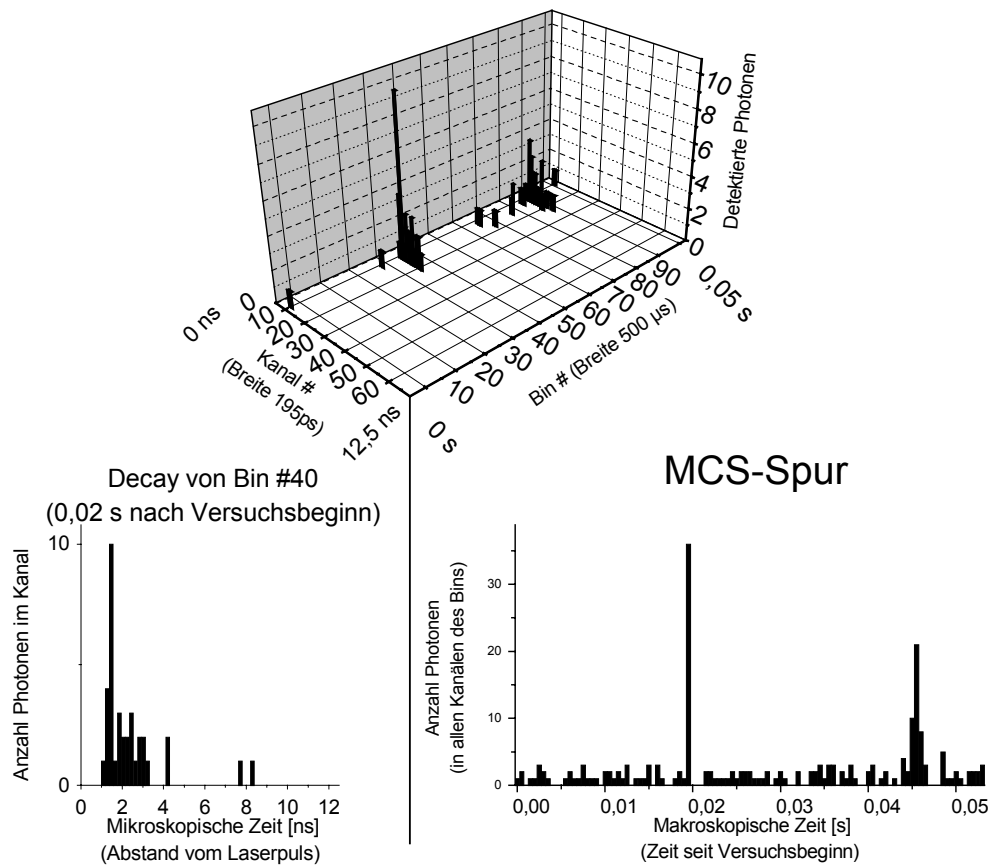


Abbildung 2.8.2-1:

Die Meßdaten haben eine zweidimensionale Struktur. Auf der ersten unabhängigen Achse ist die Zeit seit Versuchsbeginn (Bins) aufgetragen, auf der zweiten Achse der Abstand zu den Laserpulsen (Kanäle). Die Abbildung zeigt Rohdaten eines Experimentes bei dem ein Tropfen einer Lösung von Cy5-dCTP in „Sequenzierpuffer“ auf einem Deckglas über dem Objektiv lag. Die Binweite betrug 500 μ s, der gezeigte Abschnitt ist 50 ms lang. Bei einem mikroskopischen Zeitfenster von 12,5 ns und 64 Kanälen Auflösung ergibt sich eine Kanalbreite von 195 ps. Der Laser wird gepulst mit einer Repetitionsrate von 64 MHz betrieben.

2.9 Fluoreszenzereignisse

Da bei Einzelmolekülexperimenten meistens keine Fluorophore im Detektionsvolumen (s. Abschnitt 2.3) sind, erhält man im zeitlichen Verlauf des Detektorsignals (Spur) einen relativ konstanten geringen Wert, der von intensiven Photonenschauern (Fluoreszenzereignissen oder „Bursts“) überlagert wird, sobald ein Fluorophor durch Diffusion, durch einen Lösungsmittelfluß oder durch Elektrophorese in das Detektionsvolumen gelangt. Das Ziel der Fluoreszenzereigniserkennung ist, diese vom Untergrund zu separieren. Um Moleküle absolut zu zählen, was eine Voraussetzung für eine Sequenzangabe ist, muß also nicht nur jedes Molekül durch das Detektionsvolumen treten, sondern jedem Fluoreszenzereignis muß exakt ein Molekül zugeordnet werden. Die Ereignisse dürfen also weder verschmelzen noch zerhackt werden. Ein Problem stellt dabei die Tatsache dar, daß ein soeben detektiertes Molekül sich noch in der Nähe des Detektionsvolumens aufhält, also eine erhöhte Wahrscheinlichkeit hat, wieder in dieses einzutreten. Für einen rein diffusiven Transport in einem offenen Volumen beträgt diese Wiedereintrittswahrscheinlichkeit immerhin 35% [Mc Crea 1940]. In Flußsystemen ist dieser Anteil mit Sicherheit kleiner; zu vernachlässigen ist er dennoch nicht [Fister 1998].

Für relative Zählungen, also um Anteile einzelner Spezies zu bestimmen sind diese Forderungen weit weniger stringent, da sich die Fehler zum größten Teil ausgleichen.

2.9.1 Einzelmolekülexperimente

Da das Detektionsvolumen klein gegen das Probevolumen ist, ist die Zahl der Moleküle N im Detektionsvolumen V Poisson-verteilt [Chandrashekar 1943].

$$W(N) = e^{-\lambda} \frac{\lambda^N}{N!} \quad \text{mit} \quad \lambda = \langle N \rangle = c N_A V \quad (2.9.1-1)$$

$W(N)$ gibt die Wahrscheinlichkeit dafür an, daß sich N Moleküle gleichzeitig im Detektionsvolumen aufhalten.

Mit sinkender Konzentration c sinkt der Erwartungswert λ für diese Zahl. N_A ist die Avogadro-Konstante. Bei Erwartungswerten, die sehr viel kleiner als eins sind, ist die Wahrscheinlichkeit, gleichzeitig mehr als ein Molekül im Detektionsvolumen zu finden, sehr gering. Beobachtet man bei einem solchen Experiment ein Fluoreszenzereignis, kann man mit hoher Sicherheit annehmen, daß er von einem Einzelmolekül stammt. Da nach dem Ergodentheorem das Zeitmittel dem Ensemblemittel entspricht gilt $\langle N \rangle = \langle N(t) \rangle$. Wenn sich aber maximal ein Molekül im Detektionsvolumen befindet ist $\langle N(t) \rangle$ der Fluoreszenzereignisanteil der Spur, also der Quotient aus der Anzahl Bins, die Teil eines Ereignisses sind und der Gesamtzahl der Bins. Im Umkehrschluß bedeutet das, daß zwischen den Fluoreszenzereignissen Abschnitte liegen müssen, die die Ereignisbreite um ein vielfaches übertreffen.

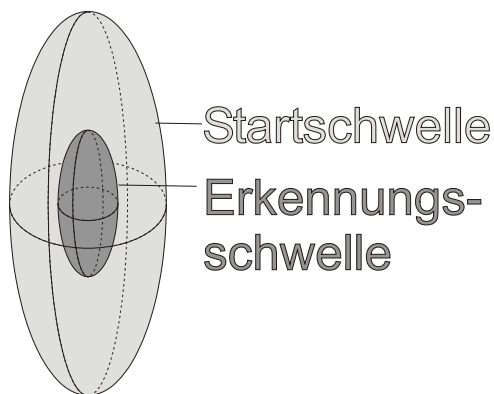
Die Wahrscheinlichkeit, daß während einer Zeitspanne t N Moleküle in das Detektionsvolumen eintreten ist ebenfalls Poisson-verteilt und hängt außer von der mittleren Zahl der Moleküle im Detektionsvolumen noch von der mittleren Durchtrittszeit der Moleküle $\langle t_i \rangle$ durch das Detektionsvolumen ab [Edman 1996]:

$$W(N, t) = e^{-\langle N \rangle \frac{t}{\langle t_i \rangle}} \frac{\left(\langle N \rangle \frac{t}{\langle t_i \rangle} \right)^N}{N!} \quad (2.9.1-2)$$

2.9.2 Schwellen

Das Ziel der Fluoreszenzereigniserkennung ist, Abschnitte, in denen sich ein Fluorophor im Detektionsvolumen befindet, zu erfassen und zu separieren. Die Fluoreszenzabklingkurven (Decays) dieser Abschnitte werden anschließend zusammengefaßt und einer Mustererkennung unterworfen, um die Ereignisse auf diese Weise zu unterscheiden und zu klassifizieren (Kapitel 2.4.3).

Die Ereigniserkennung geschieht, da ein „Burst“ ein Bereich der Spur mit erhöhter Zählrate ist, mit Hilfe von Schwellen. Zunächst wird die Spur nach einem Bin abgesucht, indem die



Erkennungsschwelle überschritten wird. Der Bereich um dieses Bin, in dem eine höhere Zählrate als die **Startschwelle** herrscht, wird als Bestandteil des Ereignisses angesehen. Da Flächen gleicher Detektionseffizienz nach Gleichung 2.4.1-1 durch Ellipsoide gegeben sind, werden die Schwellen überschritten, sobald ein Molekül in das entsprechende Ellipsoid gerät (s. Abbildung rechts).

Das Detektionsvolumen wird bei einer gegebenen Apparatur durch die Erkennungsschwelle definiert.

Die niedrigere Startschwelle dient dazu, bei der

Mustererkennung auch die Photonen mit zu nutzen, die der Fluorophor in der in weniger empfindlichen Umgebung des Detektionsvolumens emittiert.

Gibt es innerhalb des Fluoreszenzereignisses einen Einbruch in der Zählrate, so wird das Ereignis gespalten, um bei etwas konzentrierteren Lösungen zu vermeiden, daß Bursts von zwei verschiedenen Molekülen zusammengefaßt werden. Eine Ereignisgruppe wird gespalten, wenn das Minimum kleiner ist als das Produkt aus **Trennschwelle** und dem kleineren der beiden Maxima ist und falls beide Maxima größer als die Erkennungsschwelle sind. Auf die Festlegung der Schwellen sollte große Sorgfalt verwandt werden, da sie das Ergebnis eines Experimentes stark beeinflussen können.

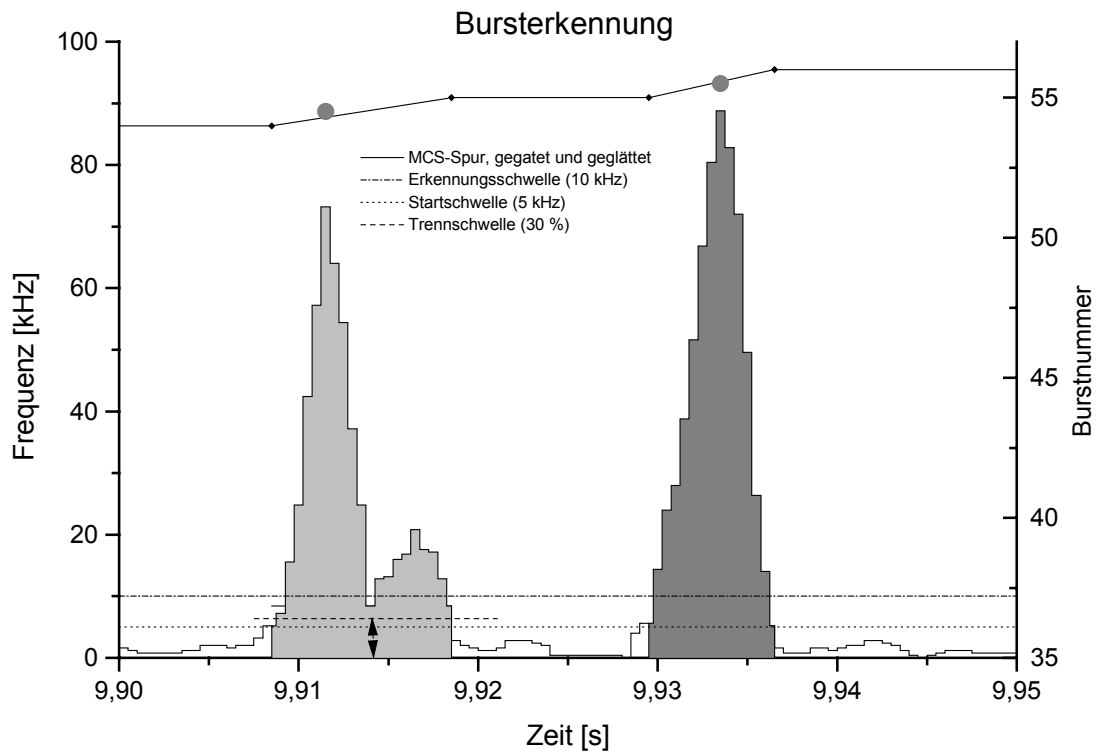


Abbildung 2.9-1 *Fluoreszenzereigniserkennung und Bedeutung der Schwellen*
 Das Minimum in Ereignis #54 unterschreitet die Trennschwelle (30% des kleineren Maximums) nicht, daher wird das Ereignis nicht gespalten.

Um zu überprüfen, ob die Schwellen gut gewählt wurden, stehen mehrere Methoden zur Verfügung:

1. Vergleich mit Ergebnissen der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS):
 Die aus der FCS ermittelte mittlere Anzahl an Molekülen im Detektionsvolumen sollte den Anteil der Bins, die Bestandteil von Fluoreszenzereignissen sind, wiedergeben (Zeitmittel = Ensemblemittel).
 Die aus der FCS ermittelte Diffusionszeit sollte mit der Ereignisbreite korrelieren.
2. Die Statistik der Ereignisabstände sollte dem theoretisch zu erwartenden Wert nahe kommen.
3. Bei Mischungen sollte die Wahrscheinlichkeit, zweimal hintereinander ein Molekül der selben Spezies zu detektieren, seinem Anteil in der Mischung zuzüglich der theoretisch errechneten Wiedereintrittswahrscheinlichkeit sein.
4. Bei Mischungen sollte das Histogramm über die Fluoreszenzabklingdauern bei Ereignissen der gleichen Photonenzahl eine möglichst gute Trennung der beiden Maxima ergeben.
5. Die Ereignisanzahl pro Zeiteinheit sollte der Konzentration der Fluorophore proportional sein

2.9.3 Gating und Glätten

Der Untergrund besteht überwiegend aus Streulicht, das ohne zeitliche Verzögerung zum Laserpuls auftritt. Das Maximum der Fluoreszenz liegt dagegen unmittelbar nach dem Puls. Die Fluoreszenzintensität fällt von diesem Maximum aus langsam ab. Um ein besseres Signal- zu Rauschverhältnis zu erhalten werden daher nur die Kanäle nach dem Laserpuls bis zum Abklingen der Fluoreszenz zur Ereigniserkennung herangezogen. Die betreffenden Kanäle werden zu einer gegateten MCS-Spur aufaddiert.

Anschließend wird die Spur mit einem mathematischen Filter geglättet, um zu verhindern, daß Ereignisse aufgrund von Inhomogenitäten im Detektionsvolumen, photochemischen Prozessen („blinking“) oder statistischen Schwankungen der Poisson-verteilten Zählrate gespalten werden. In der Literatur werden hierfür Lee-Filter (Gl.2.9.3-2) [Enderlein 1997²], Fast-Fourier-Niedrigpassfilter [Haab 1995], [Keller 1996], Gaußfilter [Chen 1996] und der gleitende Durchschnitt (Gl.2.9.3-1) [Li 1995], [Hänninen 1997], [Fries 1998] eingesetzt.

Der gleitende Durchschnitt (Gl. 2.9.3-1) ist unter ihnen nicht nur der einfachste, er hat auch den Vorteil, daß durch Multiplikation mit der Fensterbreite die Zählraten ganzzahlig bleiben, was programmiertechnisch vorteilhaft ist. Deshalb wurde er auch in dieser Arbeit eingesetzt.

$$f_n' = \mu_g(n) = \frac{1}{2g+1} \sum_{j=-g}^g f_{n+j} \quad (2.9.3-1)$$

Der Lee-Filter berücksichtigt außer dem lokalen Mittelwert μ_g auch die lokale

Standardabweichung σ_g :

$$\sigma_g^2(n) = \frac{1}{2g+1} \sum_{j=-g}^g [f_{n+j} - \mu_g(n)]^2$$

$$f_n' = \mu_g(n) + (f_n - \mu_g(n)) \frac{\sigma_g^2(n)}{\sigma_g^2(n) + s_0^2} \quad (2.9.3-2)$$

Die Glättparameter g bzw. g und s_0 müssen dabei vorgegeben werden.

Für $s_0 \rightarrow \infty$ geht der Lee-Filter in den gleitenden Durchschnitt über, für $s_0 \rightarrow 0$ läßt er die Rohdaten unverändert

Ein Molekül, das das Detektionsvolumen gerade verlassen hat, befindet sich anschließend noch in dessen Umgebung. Bei freier Diffusion ergeben theoretische Analysen eines Irrfahrtprozesses, daß etwa 35% der Moleküle wieder in das Detektionsvolumen eintreten [Mc Crea 1940]. Sofern diese Moleküle nicht beim Durchtritt photozerstört werden, werden diese dann mehrfach detektiert. Die Wiedereintrittswahrscheinlichkeit fällt jedoch schnell mit der Zeit ab, die das Molekül außerhalb des Detektionsvolumens zubringt. So haben R6G Moleküle nur bis etwa 3,5 ms nach dem Austritt eine signifikant erhöhte Wahrscheinlichkeit in das Detektionsvolumen zurückzukehren [Fister 1998]. Durch geeignete Wahl des Glättparameters lassen sich solche Ereignisfolgen zusammenfassen, um dem für eine Sequenzanalyse notwendigen Ziel „ein Molekül = ein Ereignis“ näher zu kommen. Durch die der Diffusion überlagerte elektrophoretische Bewegung der Moleküle dürfte bei Experimenten in Mikrokapillaren die Wiedereintrittswahrscheinlichkeit niedriger ausfallen und auch rascher abklingen als bei freier Diffusion.

2.10 Mustererkennung

In dieser Arbeit werden die Farbstoffe aufgrund ihrer unterschiedlichen Fluoreszenzkinetik unterschieden. Die Fluoreszenzabklingdauer wird allein durch die Photophysik des Moleküls und seiner Umgebung bestimmt und nicht durch Apparateparameter wie z.B. die Laserintensität oder die Spektren der verwendeten Filter.

Die unterschiedlichen Fluoreszenzlebensdauern der Farbstoffe führen zu unterscheidbaren Fluoreszenzabklingkurven („Decays“), die sich mit Hilfe der Mustererkennung klassifizieren lassen.

2.10.1 Verteilungsfunktion der Zählrate in einem Einzelkanal

Während der Dauer eines Bins gibt der Laser eine bestimmte Anzahl von Pulsen ab. Beträgt z.B. die Binweite 500 μs und die Repetitionsrate 64 MHz, so liegen in einem Bin 32000 Laserpulse. Jeder dieser Pulse führt mit einer für den betrachteten Kanal konstanten Wahrscheinlichkeit dazu, daß der Zähler für diesen Kanal inkrementiert wird oder nicht. Dieses Bernoulli-Experiment (ein Experiment mit zwei möglichen Ausgängen) wird im oben genannten Beispiel 32000 mal wiederholt, die beobachtete Zählrate ist also das Ergebnis einer Bernoulli-Kette mit $N = \text{Binweite} \times \text{Repetitionsfrequenz}$ Einzelversuchen wobei das positive Ereignis „Photon in Kanal k detektiert“ mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit $p'(k)$ eintritt. Die Verteilungsfunktion des Ergebnisses einer solchen Kette ist die Binomialverteilung:

$$W(\varphi_k) = \binom{N}{\varphi_k} (p'_k)^{\varphi_k} (1 - p'_k)^{N - \varphi_k} \quad (2.10.1-1)$$

$W(\varphi_k)$: Wahrscheinlichkeit φ_k Photonen in Kanal k zu finden.

N: Anzahl Laserpulse während der Aufnahme des Decays.

p'_k : Wahrscheinlichkeit, daß ein einzelner Laserpuls ein Photon auslöst, das in Kanal k einsortiert wird.

Die Photonenanzahl in einem einzelnen Kanal ist mit maximal etwa 100 sehr viel kleiner als die Anzahl der Pulse, woraus folgt daß ein Einzelereignis sehr unwahrscheinlich ist $p'_k < 100/32000 = 0,0031$. Man kann, da $N \gg 50$ und $p'_k \ll 0,05$, die Binomialverteilung in sehr guter Näherung durch eine Poissonverteilung approximieren:

$$W(\varphi_k) = e^{-\lambda_k} \lambda_k^{\varphi_k} / \varphi_k! \quad \text{mit} \quad \lambda_k = \langle \varphi_k \rangle = N p'_k \quad (2.10.1-2)$$

λ_k ist dabei der Erwartungswert für die Anzahl φ_k der Photonen in Kanal k.

2.10.2 Verteilungsfunktion für die Zählraten in K Kanälen, Likelyhood

Die Wahrscheinlichkeit, in Kanal 1 φ_1 , in Kanal 2 φ_2 usw. Photonen zu finden, ergibt sich aus dem Produkt der Einzelwahrscheinlichkeiten, bei K Kanälen:

$$W(\varphi_1, \varphi_2, \dots, \varphi_K) = W(\vec{\varphi}) = W(\varphi_1)W(\varphi_2) \dots W(\varphi_K) = \prod_{k=1}^K W(\varphi_k)$$

$$W(\vec{\varphi}) = \prod_{k=1}^K e^{-\lambda_k} \lambda_k^{\varphi_k} \frac{1}{\varphi_k!} \quad (2.10.2-1)$$

$$W(\vec{\varphi}) = e^{-\sum_{k=1}^K \lambda_k} \prod_{k=1}^K \lambda_k^{\varphi_k} \frac{1}{\varphi_k!} \quad (2.10.2-2)$$

Die Summe über die Erwartungswerte in den einzelnen Kanälen, die im Exponenten des Vorfaktors steht, ist gleich dem Erwartungswert für die Gesamtzahl Φ der Photonen in der Fluoreszenzabklingkurve:

$$\sum_{k=1}^K \lambda_k = \sum_{k=1}^K \langle \varphi_k \rangle = \left\langle \sum_{k=1}^K \varphi_k \right\rangle = \langle \Phi \rangle = \Lambda \quad (2.10.2-3)$$

$$W(\vec{\varphi}) = e^{-\Lambda} \prod_{k=1}^K \lambda_k^{\varphi_k} \frac{1}{\varphi_k!} \quad (2.10.2-4)$$

Diese Gesamtwahrscheinlichkeit eine bestimmte Verteilung $\vec{\varphi}$ zu finden läßt sich in ein Produkt zweier Wahrscheinlichkeiten aufspalten:

Der erste Faktor gibt die Wahrscheinlichkeit an, im gesamten Decay Φ Photonen zu finden, wobei der Erwartungswert für diese Anzahl durch Λ gegeben ist.

Der zweite Faktor gibt die Wahrscheinlichkeit dafür an, daß die Φ Photonen eine bestimmte Verteilung $\vec{\varphi}$ der $\binom{\Phi + K - 1}{\Phi}$ möglichen Verteilungen der Φ Photonen über K Kanäle

haben. Die Zahl der möglichen Verteilungen ergibt sich aus der Anzahl der Kombinationen mit Wiederholung von K Elementen zur Φ -ten Klasse. Die Erwartungswerte für die Anzahl der Photonen in den einzelnen Kanälen sind dabei durch den K-dimensionalen Vektor $\vec{\lambda}$ gegeben.

$$W(\vec{\varphi}) = \Lambda^\Phi \Lambda^{-\sum_{k=1}^K \varphi_k} \frac{\Phi!}{\Phi!} e^{-\Lambda} \prod_{k=1}^K \lambda_k^{\varphi_k} \frac{1}{\varphi_k!}$$

$$W(\vec{\varphi}) = \Lambda^\Phi e^{-\Lambda} \frac{1}{\Phi!} \bullet \Phi! \Lambda^{-\sum_{k=1}^K \varphi_k} \prod_{k=1}^K \lambda_k^{\varphi_k} \frac{1}{\varphi_k!}$$

$$W(\vec{\varphi}) = \Lambda^\Phi e^{-\Lambda} \frac{1}{\Phi!} \cdot \Phi! \prod_{k=1}^K \lambda_k^{\varphi_k} \Lambda^{-\varphi_k} \frac{1}{\varphi_k!}$$

$$W(\vec{\varphi}) = \Lambda^\Phi e^{-\Lambda} \frac{1}{\Phi!} \cdot \Phi! \prod_{k=1}^K \left(\frac{\lambda_k}{\Lambda} \right)^{\varphi_k} \frac{1}{\varphi_k!} \quad (2.10.2-5)$$

1. Faktor:

Wahrscheinlichkeit,
insgesamt Φ
Photonen zu finden

2. Faktor:

Wahrscheinlichkeit, daß die Φ
gefundenen Photonen die Anordnung
($\varphi_1, \varphi_2, \dots, \varphi_K$) annehmen.

Der erste Faktor, also die Gesamtzahl der Photonen in der Fluoreszenzabklingkurve Φ ist Poisson-verteilt. Der zweite Faktor, die Wahrscheinlichkeit für eine bestimmte Verteilung der Photonen auf die Kanäle unter der Voraussetzung, daß es insgesamt Φ Photonen sind, ist multinomialverteilt.

Der Erwartungswert Λ für die Gesamtzahl der Photonen hängt nicht nur von photophysikalischen Parametern (Extinktionskoeffizient des Farbstoffes bei der Anregungswellenlänge und Fluoreszenzquantenausbeute) und Apparatfunktionen (Detektionseffizienz, Anregungsleistung) ab, sondern entscheidend von der Trajektorie des Moleküls durch das Detektionsvolumen. Diese Trajektorie ist weitgehend substanzunabhängig, (wenn auch der Diffusionskoeffizient die Wanderungsgeschwindigkeit bestimmt) und stochastischer Natur. Die Gesamtzahl an Photonen im Fluoreszenzereignis ist also stark schwankend und im vorliegenden Fall ähnlicher Fluoreszenzquantenausbeuten und Extinktionskoeffizienten sowie bei freier Diffusion nicht geeignet, Moleküle zu unterscheiden. Engt man die Trajektorienschar hingegen z.B. mit Hilfe eines Hüllstroms ein, so lassen sich z.B. DNS-Fragmente unterschiedlicher Länge, dadurch unterscheiden, daß längere Fragmente mehr Farbstoff interkalieren können und deshalb heller leuchten [Huang 1996].

Der zweite Faktor, die Wahrscheinlichkeit für die gemessenen Anteile der einzelnen Kanäle, setzt sich zusammen aus den erwartungswertunabhängigen Multinomialkoeffizienten $\Phi! \prod 1/\varphi_k!$ und einer erwartungswert-, d.h. spezies- abhängigen Funktion, die man als Likelihood bezeichnet und mit L abkürzt:

$$W_{\vec{p}}(\vec{\varphi} | \Phi) = \Phi! \prod_{k=1}^K \left[\frac{1}{\varphi_k!} \right] \cdot \prod_{k=1}^K [p_k^{\varphi_k}] \quad \text{mit} \quad p_k = \frac{\lambda_k}{\Lambda}$$

$$L_{\vec{p}}(\vec{\varphi}) = \prod_{k=1}^K [p_k^{\varphi_k}] \quad (2.10.2-6)$$

p_k bezeichnet die Wahrscheinlichkeit dafür, daß ein gemessenes Photon im Kanal k landet (und nicht in einem der übrigen Kanäle). Sie darf nicht mit der weiter oben verwendeten Wahrscheinlichkeit p'_k , daß ein Laserpuls zu einem Photon in Kanal k führt, verwechselt werden.

Die Likelihood ist unabhängig vom Erwartungswert der Gesamtphotonenzahl und damit der Molekültrajektorie. Sie hängt nur von den relativen Anteilen der Photonen in den einzelnen Kanälen ab, die eine Funktion der Photophysik des Moleküls und einer Apparatekonstanten sind.

2.10.3 Kullback-Leibler-Diskriminierungsinformation

Um die Übereinstimmung eines gemessenen Musters $\vec{p}_E = \frac{\vec{\varphi}}{\Phi}$ mit einem Referenzmuster

$\vec{p}_A = \frac{\vec{\lambda}_A}{\Lambda_A} = \left\langle \frac{\varphi}{\Phi} \right\rangle_A$ zu beschreiben, vergleicht man deren Wahrscheinlichkeit bzw. die ihr proportionale Likelihood L_E bzw. L_A .

$$W_{A|\Phi}(\vec{\varphi}) = \Phi! \prod_{k=1}^K p_{A,k}^{\varphi_k} \frac{1}{\varphi_k!} = \Phi! \prod_{k=1}^K \left[\frac{1}{\varphi_k!} \right] \cdot \prod_{k=1}^K p_{A,k}^{\varphi_k} = \Phi! \prod_{k=1}^K \left[\frac{1}{\varphi_k!} \right] \cdot L_A(\vec{\varphi}) \quad (2.10.3-1)$$

$$W_{E|\Phi}(\vec{\varphi}) = \Phi! \prod_{k=1}^K \left[\frac{1}{\varphi_k!} \right] \cdot \prod_{k=1}^K \left(\frac{\varphi_k}{\Phi} \right)^{\varphi_k} = \Phi! \prod_{k=1}^K \left[\frac{1}{\varphi_k!} \right] \cdot L_E(\vec{\varphi}) \quad (2.10.3-2)$$

$W_{A|\Phi}(\vec{\varphi})$ ist die Wahrscheinlichkeit, daß die Φ Photonen in der festgestellten Art $\vec{\varphi}$ über die Kanäle verteilt sind, unter der Bedingung, daß die Wahrscheinlichkeit für ein registriertes Photon, in Kanal k zu landen, durch $p_{A,k}$ gegeben ist. $W_{E|\Phi}(\vec{\varphi})$ ist die entsprechende Wahrscheinlichkeit unter der Bedingung, daß die Wahrscheinlichkeit für ein Photon, in Kanal k zu landen, durch die beobachtete relative Häufigkeit φ_k/Φ dieses Ereignisses gegeben ist. Es wird zunächst der Quotient der Wahrscheinlichkeiten, bzw., da sich die Multinomialkoeffizienten wegkürzen, der Likelihoods L_E/L_A gebildet.

$$L_E(\vec{\varphi})/L_A(\vec{\varphi}) = \prod_{k=1}^K \left(\frac{\varphi_k}{\Phi p_{A,k}} \right)^{\varphi_k} \quad (2.10.3-3)$$

Je kleiner dieser Quotient ist, desto besser stimmt das gemessene Muster mit dem Vergleichsmuster überein.

Man kann, da der Logarithmus im Wertebereich des Quotienten streng monoton ist, die Rechnung vereinfachen, indem man den Quotienten logarithmiert:

$$I^*(\vec{\varphi}, \vec{p}_A) = \ln(L_E(\vec{\varphi})/L_A(\vec{\varphi})) = \sum_{k=1}^K \varphi_k \ln \left(\frac{\varphi_k}{\Phi p_{A,k}} \right) \quad (2.10.3-4)$$

Dabei ist

K Die Anzahl der Kanäle

φ_k Die beobachtete Photonenzahl in Kanal k .

Φ Die beobachtete Photonenzahl in allen Kanälen
 $p_{A,k}$ Die zu testende modellierte Wahrscheinlichkeit dafür, ein Photon in Kanal k zu finden.

I^* heißt Kullback-Leibler-Diskriminierungsinformation [Kullback 1959]. Für Poisson-verteilte Meßwerte ist sie um so kleiner, je besser die Messung $\vec{\varphi}$ zum Modell \vec{p}_A paßt.

2.10.4 Unterscheidung von Molekülen

Ziel ist, zu entscheiden, ob ein unbekanntes Molekül vom Typ A oder B ist. Dazu kann man z.B. die Fluoreszenzabklingzeit mit dem in Abschnitt 2.10.8 beschriebenen Parameterschätzverfahren bestimmen und anhand der bekannten Fluoreszenzabklingzeiten der Substanzen A und B, eine Zuordnung treffen [Müller 1996], [Zander 1996], [Sauer 1998].

Einfacher ist es jedoch, Referenzmuster \vec{p}_A, \vec{p}_B der Substanzen A und B mit dem gemessenen Muster $\vec{\varphi}$ der unbekanntes Substanz zu vergleichen. Der Mustervergleich geschieht mittels der Kullback-Leibler-Diskriminierungsinformation. Das einzuordnende Muster wird demjenigen Referenzmuster zugeordnet, das die kleinste Diskriminierungsinformation I^* ergibt [Köllner 1992], [Köllner 1996].

Das Molekül wird der Spezies A zugeordnet, wenn $I^*(\vec{\varphi}, \vec{p}_A) - I^*(\vec{\varphi}, \vec{p}_B) < 0$ und der Spezies B, wenn $I^*(\vec{\varphi}, \vec{p}_A) - I^*(\vec{\varphi}, \vec{p}_B) > 0$. Falls die Differenz Null ergibt, ist eine Entscheidung nicht möglich. Für Mustervektoren $\vec{\varphi}$, deren Komponenten φ_k Poisson-verteilt und statistisch unabhängig sind, ist dies die bestmögliche Zuordnung [Enderlein 1998] [Enderlein 2001].

Die Referenzmuster können entweder experimentell (durch eine Referenzmessung) bestimmt werden, oder sie können aus bekannten Parametern (Literaturwerten) und (gemessenen) Apparatekonstanten berechnet werden, falls das zugrundeliegende Naturgesetz bekannt ist.

Experimentell bestimmte Muster haben den Vorteil, daß sie ohne die Annahme eines Modells auskommen, sondern allein auf dem tatsächlichen Naturgesetz beruhen. Allerdings muß das Referenzmuster sehr oft (bzw. lange) aufgenommen werden, damit es nicht statistisch schwankt.

Ein Nachteil gemessener Referenzmuster ist, daß sie nicht flexibel sind. Ändert sich etwas an den Parametern der Apparatur, muß die Referenzmessung wiederholt werden.

Ein weiterer Nachteil ist, daß aufgrund unterschiedlicher Trajektorien der Analytmoleküle durch das Detektionsvolumen der Anteil von Fluoreszenz- Untergrund- und Streulicht von Ereignis zu Ereignis schwankt. Mit gemessenen Mustern ist das schwierig zu berücksichtigen.

Die Abschnitte 2.10.5-2.10.7 befassen sich daher mit der Berechnung synthetischer Muster

2.10.5 Muster 1: Anregung von monoexponentiell abklingender Fluoreszenz durch einen Deltapuls bei vernachlässigbarem Untergrund

Das einfachste Muster besteht aus einem monoexponentiellen Fluoreszenzabklingvorgang ohne Untergrundlicht. Die Intensität des Fluoreszenzlichtes folgt dann der Formel

$$I(t) = I_0 e^{-ft} \quad \text{mit} \quad f = \frac{1}{\tau} \quad (2.10.5-1)$$

I_0 ist die Intensität bei der Zeit $t=0$, f ist die Fluoreszenzrate bzw. τ die Fluoreszenzabklingdauer.

Die Zahl der detektierten Photonen pro Zeiteinheit (Zählrate) ist dieser Intensität proportional. Der erste Kanal dauert von $t = 0$ bis $t = \vartheta$, wobei ϑ die Breite eines Kanals ist. Die Anzahl detektierter Photonen ergibt sich aus dem Integral über die Zählrate. Für den Erwartungswert λ_k der Photonen in Kanal k gilt demnach:

$$\lambda_k = \text{const} \int_{\vartheta(k-1)}^{\vartheta k} I_0 e^{-ft} dt = \text{const} I_0 \frac{-e^{-f\vartheta k} + e^{-f\vartheta(k-1)}}{f} = \frac{\text{const} I_0}{f} e^{-f\vartheta(k-1)} (1 - e^{-f\vartheta})$$

Für den Erwartungswert der Anzahl der Photonen im gesamten Zeitfenster $\Theta = K\vartheta$, Λ , ergibt sich analog:

$$\Lambda = \sum_{k=1}^K \lambda_k = \text{const} \int_0^{\Theta} I_0 e^{-ft} dt = \text{const} \frac{I_0}{f} (1 - e^{-f\Theta})$$

Abbildung 2.10.5-1 veranschaulicht dies graphisch:

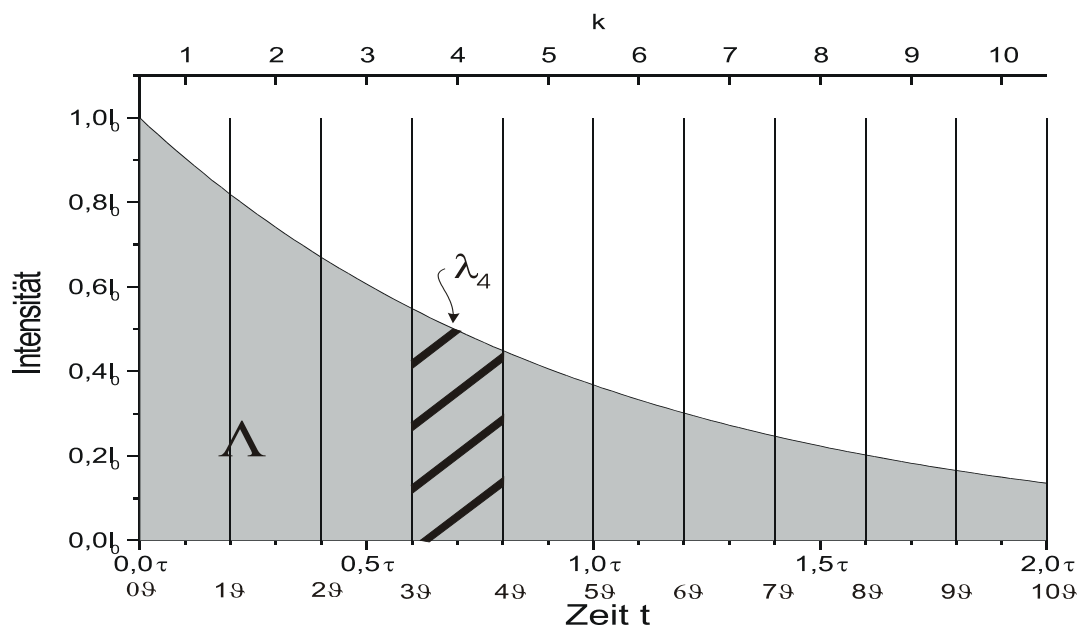


Abbildung 2.10.5-1 Die Zählraten sind der Fluoreszenzintensität proportional. Da die Zählrate die zeitliche Ableitung der Anzahl der detektierten Photonen ist, erhält man diese durch Integration. Die graue Fläche Λ stellt den Erwartungswert für die Anzahl der Photonen im gesamten Zeitfenster dar, die schraffierte Fläche den Erwartungswert für die Anzahl der Photonen in einem einzelnen Kanal.

Das zu erzeugende Muster besteht aus den Wahrscheinlichkeiten $p_k = \lambda_k/\Lambda$, mit denen die Photonen auf die einzelnen Kanäle 1 bis K verteilt werden:

$$p_k = e^{-f\vartheta(k-1)} \frac{1 - e^{-f\vartheta}}{1 - e^{-f\vartheta}} \quad (2.10.5-2)$$

Restfluoreszenz

Der Laser läuft mit einer bestimmten Repetitionsrate R. Bei R = 64 MHz entspricht das einem Pulsabstand von 15,6 ns. Nach dieser Zeit ist die Fluoreszenz noch nicht vollständig abgeklungen, sondern weist noch einen bestimmten Restbetrag auf. Die gemessene Fluoreszenzabklingkurve entspricht daher der Summe der Kurven aller vorangegangenen Pulse, solange das Molekül im Fokus war (Abbildung 2.10.5-2).

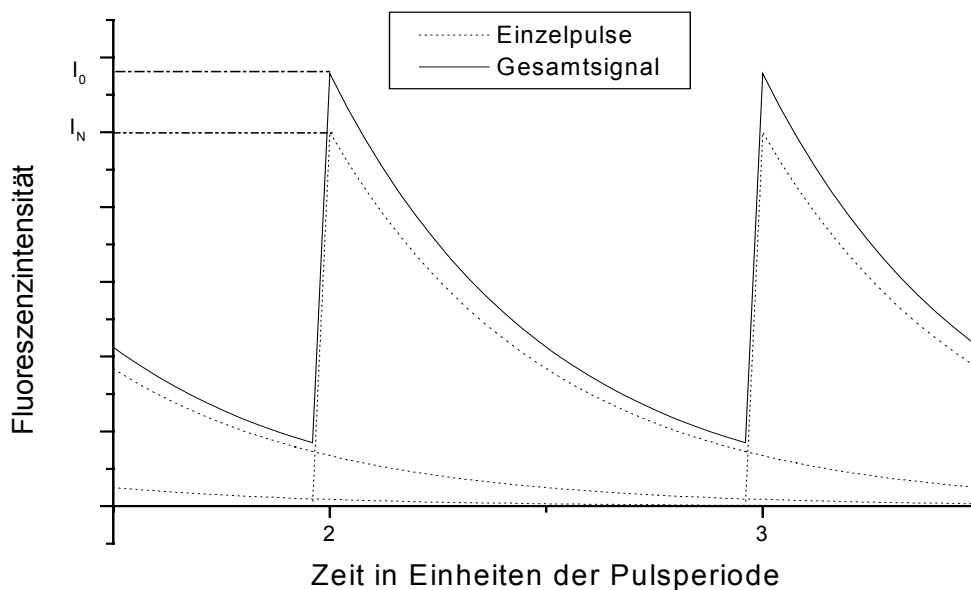


Abbildung 2.10.5-2 Restfluoreszenz

Die Restfluoreszenz ändert die Form des Signals bei monoexponentiellem Abklingverhalten nicht, nur die Amplitude wird erhöht.

Beträgt das von einem einzelnen Puls erzeugte Signal $I^1(t) = I_N e^{-f(t-t_N)}$, wobei $t_n = n/R$ der Zeitpunkt des betreffenden Laserpulses ist, so summiert sich das Gesamtsignal zu:

$$I(t-t_0) = \sum_{n=-N}^0 I_n e^{-f(t-n/R)} = e^{-ft} \sum_{n=-N}^0 I_n e^{-n/R} = e^{-ft} I_0 \quad (2.10.5-3)$$

$t-t_0$ gibt dabei den zeitlichen Abstand zum letzten Laserpuls und N die Anzahl der Pulse, die das Molekül bisher getroffen haben, an.

Offensichtlich führt die Restfluoreszenz im Falle eines monoexponentiellen Abklingverhaltens nur zu einer Erhöhung der Amplitude, nicht jedoch zu einer Veränderung des Musters. Da sich das Molekül im Verhältnis zur Repetitionsrate nur sehr langsam bewegt, kann man die I_n als konstant annehmen und die Summe über unendlich viele Pulse laufen lassen. Dann stellt die Summe die geometrische Reihe dar, und man kann das Verhältnis von neu erzeugter Fluoreszenz I_n zum Gesamtsignal I_0 angeben:

$$I_0 = I_n \sum_{n=0}^{\infty} e^{-\frac{f}{R}n} = I_n \frac{1}{1 - e^{-\frac{f}{R}}} \quad (2.10.5-4)$$

Ist das Fluoreszenzverhalten mehrerponentiell, so verschiebt sich durch die Restfluoreszenz das Verhältnis der Amplituden der einzelnen Komponenten, und das Muster ändert sich.

Aus einer völlig analogen Überlegung heraus kann man auf eine Faltung der (monoexponentiellen!) Fluoreszenzabklingkurve mit dem Anregungspuls verzichten, wenn das Zeitfenster für das Muster so gewählt wird, daß innerhalb desselben keine Anregung stattfindet: Die Fluoreszenz, die zu Beginn des Pulses angeregt wurde ist zwar schon stärker abgeklungen, als jene, die später angeregt wurde, nachdem jedoch keine Anregung mehr stattfindet, zerfällt die dann vorhandene Fluoreszenz nach dem gleichen monoexponentiellen Zeitgesetz, als wäre die Anregung durch einen δ -Puls erfolgt. Die Form und Lage des Pulses hat nur einen Einfluß auf die Amplitude. Der Grund dafür ist, daß sich der Exponentialterm im Faltungsintegral (s. Abschnitt 2.4.3.7) als Produkt zweier Exponentialfunktionen schreiben läßt, von denen sich der zeitabhängige Teil vor das Integral ziehen läßt:

$$\int_0^t a(x) e^{-f(t-x)} dx = \int_{\text{Pulsanfang}}^{\text{Pulsende}} a(x) e^{-ft} e^{fx} dx = e^{-ft} \int_{\text{Pulsanfang}}^{\text{Pulsende}} a(x) e^{fx} dx = e^{-ft} I_0$$

Voraussetzung ist, daß $t > \text{Pulsende}$ und die Anregungsfunktion $a(t)$ außerhalb des Pulses Null ist.

2.10.6 Muster 2: Berücksichtigung von Untergrundlicht

Liegt unter dem Fluoreszenzsignal ein gleichverteilter Untergrund, wie er z.B. durch Raumlicht und die Dunkelzählrate der SPAD verursacht wird, so muß das Muster dies berücksichtigen, sonst wird bei der Klassifizierung der Ereignisse die Spezies mit der längeren Lebensdauer systematisch bevorzugt [Enderlein 1998].

Das monoexponentielle Zerfallsgesetz (Gleichung 2.10.5-1) wird daher durch Addition eines konstanten Untergrundterms $U \times W$ modifiziert:

$$I(t) = I_0 e^{-ft} + UW \quad (2.10.6-1)$$

W ist die Ereignisbreite (in Sekunden) und U eine Konstante, die den Untergrund beschreibt: $U \times \Theta \times R$ ergibt die Untergrundzählrate, das heißt die Zählrate, die man bei abgeschaltetem Laser mißt. Θ ist das Zeitfenster und R die Repetitionsrate des Lasers.

Integration über t von $(k-1)\vartheta$ bis $k\vartheta$ liefert den Erwartungswert für die Photonenzahl in Kanal k:

$$\lambda_k = \int_{(k-1)\vartheta}^{k\vartheta} I_0 e^{-ft} + UW dt = -\frac{I_0}{f} e^{-ft} + UWt \Big|_{(k-1)\vartheta}^{k\vartheta} = \frac{I_0}{f} e^{-f(k-1)\vartheta} (1 - e^{-f\vartheta}) + UW\vartheta \quad (2.10.6-2)$$

Integration über das gesamte Zeitfenster (0- Θ), ergibt den Erwartungswert Λ für die gesamte Photonenzahl in allen Kanälen des Zeitfensters:

$$\Lambda = \int_0^{\Theta} I_0 e^{-ft} + UW dt = \frac{I_0}{f} (1 - e^{-f\Theta}) + UW\Theta \quad (2.10.6-3)$$

Der erste Term stellt die Zahl der Fluoreszenzphotonen dar, während der zweite Term die Untergrundphotonen wiedergibt.

Definiert man das Untergrund-zu-Fluoreszenz-Verhältnis B als Quotient dieser beiden Terme, so ergibt sich:

$$B = \frac{UW\Theta}{\frac{I_0}{f} (1 - e^{-f\Theta})} = \frac{UW\Theta}{\Lambda - UW\Theta} \quad (2.10.6-4)$$

$UW\Theta$ ist dabei die Anzahl der Untergrundphotonen im Ereignis und Λ der Erwartungswert für die Gesamtzahl der Photonen im Zeitfenster.

$$\begin{aligned} \lambda_k &= \frac{I_0}{f} e^{-f(k-1)\vartheta} (1 - e^{-f\vartheta}) + U \frac{\Theta}{K} = \frac{I_0}{f} e^{-f(k-1)\vartheta} (1 - e^{-f\vartheta}) + \frac{\frac{I_0}{f} (1 - e^{-f\Theta}) B}{K} \\ \lambda_k &= \frac{I_0}{f} (1 - e^{-f\Theta}) \left[e^{-f(k-1)\vartheta} \frac{(1 - e^{-f\vartheta})}{(1 - e^{-f\Theta})} + \frac{B}{K} \right] \\ \Lambda &= \frac{I_0}{f} (1 - e^{-f\Theta}) [1 + B] \\ p_k &= \frac{\lambda_k}{\Lambda} = \frac{e^{-f(k-1)\vartheta} \frac{(1 - e^{-f\vartheta})}{(1 - e^{-f\Theta})} + \frac{B}{K}}{1 + B} \end{aligned} \quad (2.10.6-5)$$

Der erste Term im Zähler gibt den Fluoreszenzanteil wieder; er gleicht dem p_k ohne Untergrund. Der zweite Term im Zähler gibt die Wahrscheinlichkeit dafür an, daß in dem

Kanal ein Untergrundphoton landet. Der Nenner normiert die Wahrscheinlichkeiten, so daß die Summe über die p_k 1 ergibt.

Der Wert von B schwankt von Ereignis zu Ereignis, da die Moleküle unterschiedliche Wege durch das Detektionsvolumen zurücklegen. Im Beispiel der Abbildung 2.10.6-1 nimmt Molekül A einen direkten Weg durch das Zentrum des Detektionsvolumens. Es entsteht viel Fluoreszenz und wenig Untergrund, da das Ereignis schmal ist. Molekül B verursacht hingegen ein breites Fluoreszenzereignis. Die Abklingkurve enthält mehr (bzw. mit höherer Wahrscheinlichkeit) Untergrundphotonen.

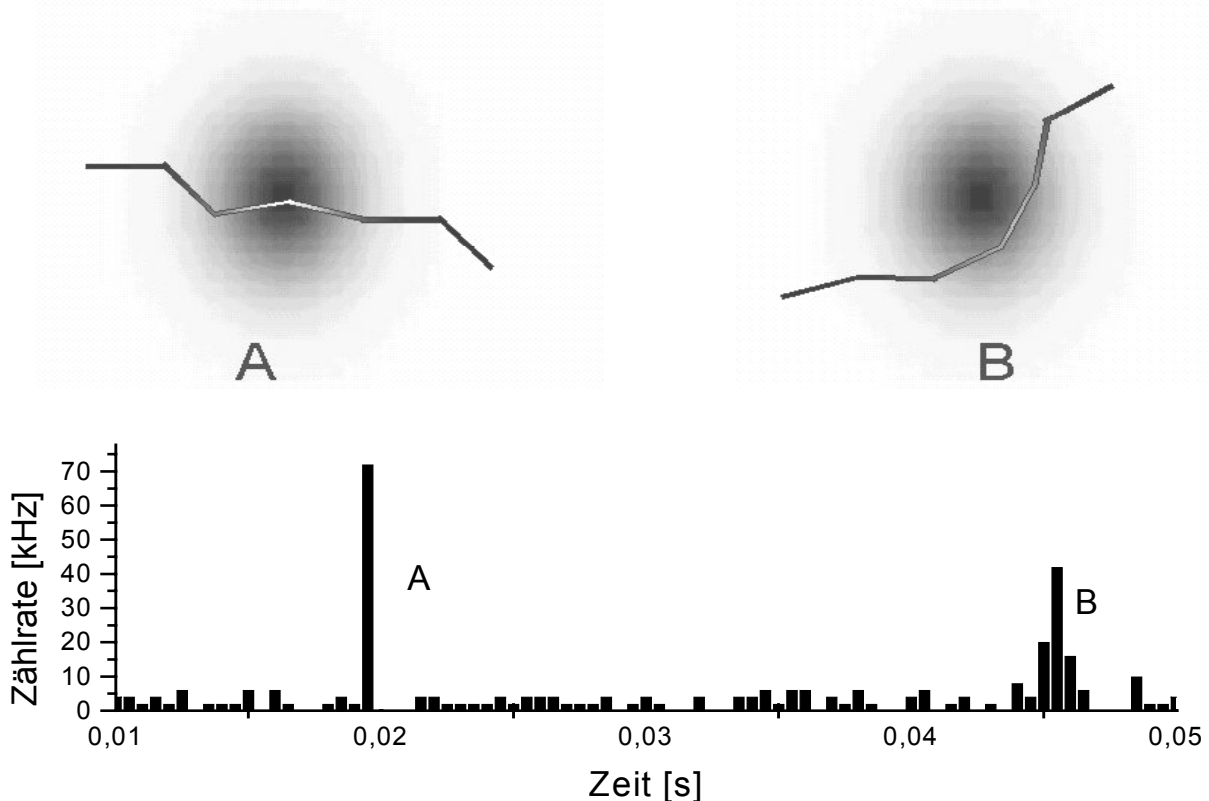


Abbildung 2.10.6-1 Verschiedene Ereignisse haben unterschiedliche Untergrundanteile

Postulierte Trajektorien zweier Moleküle durch das Detektionsvolumen (Je dunkler, desto höher ist die Detektionseffizienz): Molekül A durchquert das Detektionsvolumen relativ geradlinig und zentral; das Ergebnis ist ein schmales, hohes Ereignis. Molekül B verfehlt das Zentrum des Detektionsvolumens und verbleibt dafür längere Zeit im Randbereich. Das Ergebnis ist ein breites, flaches Ereignis. Die MCS-Spur wurde gemessen; sie entstand bei der Aufnahme einer 5×10^{-11} M Lösung von Cy5-dCTP in Sequenzierpuffer im offenen Volumen.

Bestimmung des Untergrundanteils

Den Untergrundanteil kann man aus der gemessenen Instrumentenfunktion oder, bei Experimenten in Kapillaren aus den fluoreszenzereignisfreien Bereichen der Messung bestimmen. Im offenen Volumen enthalten auch die ereignisfreien Bereiche einen Fluoreszenzanteil, so daß dies hier nicht möglich ist. Abbildung 2.10.6-2 veranschaulicht das Verfahren: Die Kurve zeigt die Raman-Streuung von Glycerin, die während 50 s akkumuliert wurde. Nach dem Laserpuls enthalten die Kanäle im Mittel 61,1 Photonen. Daraus errechnet

sich ein Untergrund je Kanal von $U\vartheta = 1,222$ Hz. Beträgt die Basisbreite eines Ereignisses z.B. 2,5 ms (5 Bins à 500 μ s) so ergibt sich je Kanal ein Erwartungswert von $U\vartheta W = 3 \times 10^{-3}$ Photonen. Liegen im Zeitfenster 55 Kanäle, so liegt der Erwartungswert für die Gesamtzahl an Untergrundphotonen bei $U\vartheta W = 0,165$ Photonen. Sind im Fenster insgesamt $\Phi = \Lambda = 40$ Photonen detektiert worden, so ergibt sich $B=0,165/39,835= 4,1 \times 10^{-3}$. Bei einem typischen Fluoreszenzereignis ist der Fehler bei Vernachlässigung des Untergrundes daher relativ klein.

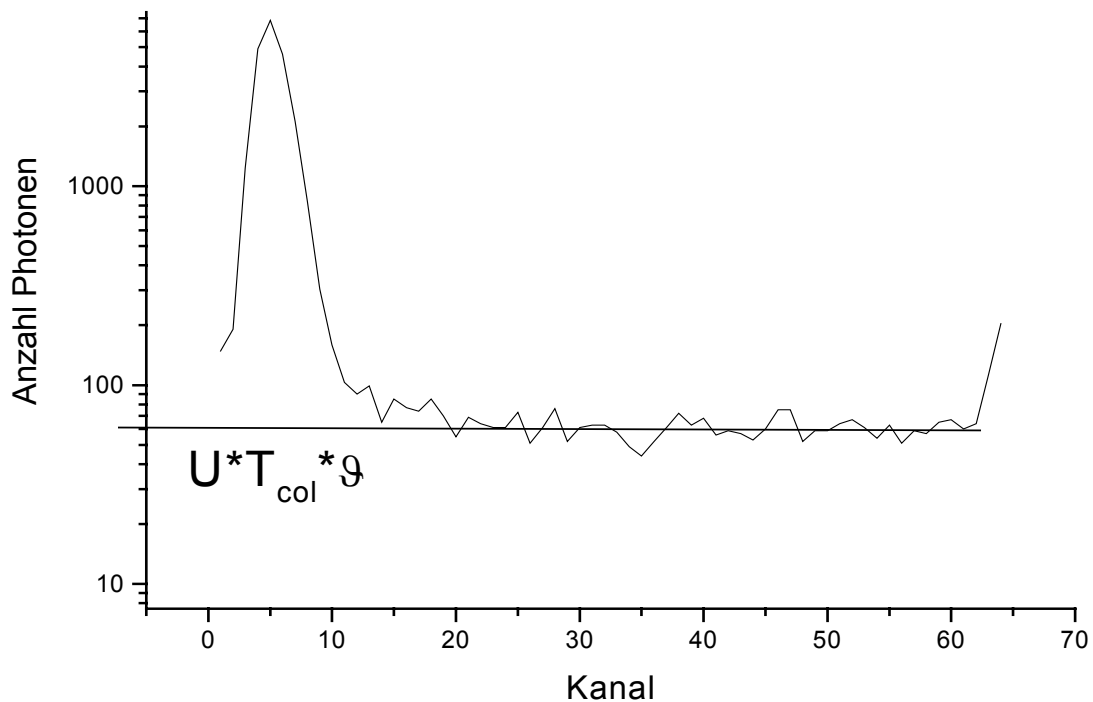


Abbildung 2.10.6-2 Instrumentenfunktion

Raman-Streuung von Glycerin. Die eingezeichnete Gerade liegt bei 61,1 Photonen. Bei einer Sammelzeit T_{col} von 50 s entspricht das einem Wert von $U\vartheta=1,222$ Hz.

Man könnte den Parameter B als zweiten Parameter neben f mit dem MLE (Abschnitt 2.10.8) durch Anpassung an die Fluoreszenzabklingkurve optimieren ([Brand 1997], [Fries 1998]). Das Problem besteht darin, daß wegen der geringen Anzahl detektierter Photonen in einem Einzelmolekülexperiment bereits bei einem anzupassenden Parameter eine erhebliche Unsicherheit besteht. Bei zwei frei anzupassenden Parametern wird diese noch größer. Für den Untergrundparameter stehen zudem wesentlich weniger Photonen zur Verfügung, als für die Abschätzung der Fluoreszenzabklingdauer, da die meisten der detektierten Photonen der Fluoreszenz und nicht dem Untergrund entstammen.

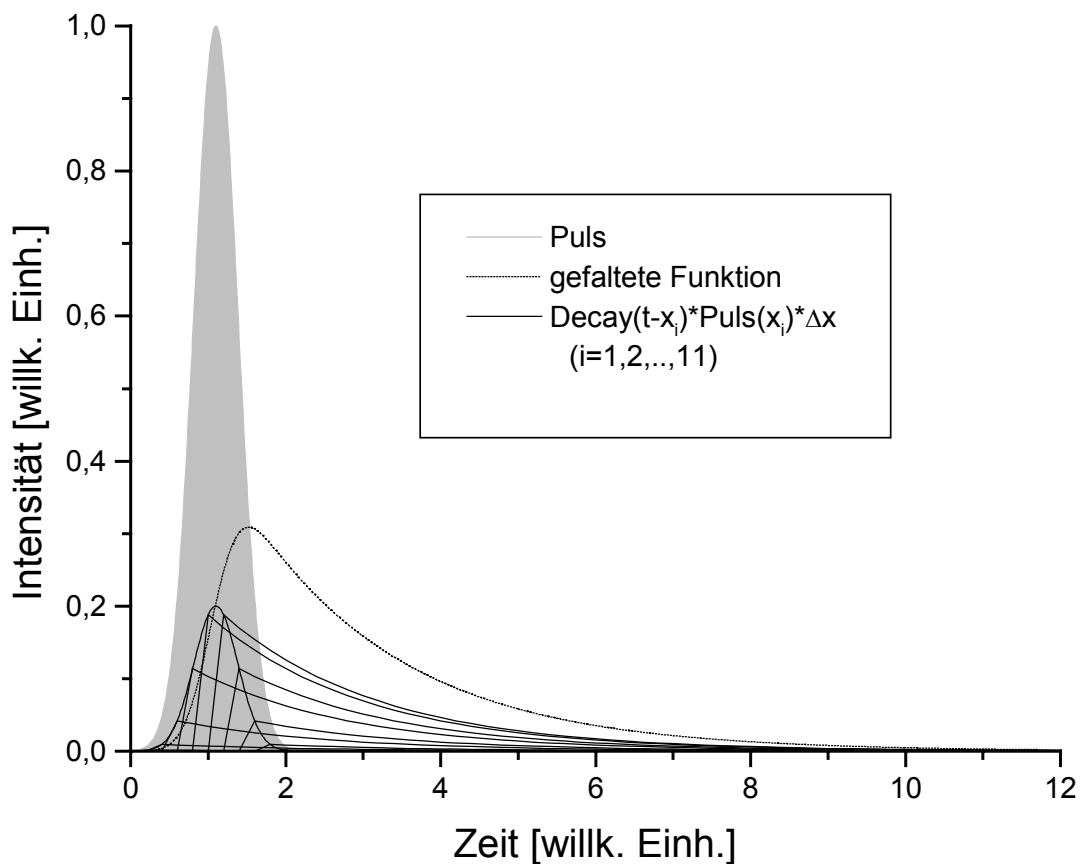
Das Verfahren zur Untergrundabschätzung anhand der Ereignisbreite ist daher nicht nur einfacher, sondern auch numerisch stabiler und schneller. Deshalb wird in dieser Arbeit der Untergrund ausschließlich über die Ereignisbreite ermittelt und nicht durch eine Parameteroptimierung an der Fluoreszenzabklingkurve.

2.10.7 Muster 3: Faltung des Fluoreszenzzerfalls mit dem Laserpuls unter Berücksichtigung von Untergrund- und Streulicht

Faltung

Wird die Fluoreszenz nicht schlagartig, also durch einen δ -Puls angeregt, so emittiert ein Teil der angeregten Moleküle bereits, während andere noch angeregt werden. Man kann sich die Anregungsfunktion jedoch als eine Summe (bzw. ein Integral) von δ -Pulsen vorstellen, von denen jeder zum Ausgangspunkt einer Abklingkurve wird. Die gefaltete Funktion ist dann die Summe (bzw. das Integral) über diese Abklingkurven (Abbildung 2.10.7-1).

Abbildung 2.10.7-1 Faltungsintegral



Jeder Punkt des Laserpulses wird zum Ausgangspunkt einer Abklingkurve. Die gefaltete Funktion ergibt sich aus dem Integral über diese Abklingkurven. Im Beispiel ist der Laserpuls Gauß-förmig, das Pulsmaximum liegt bei 1,1 Zeiteinheiten, die „Standardabweichung“ beträgt 0,4, die Fluoreszenzabklingdauer 2 Zeiteinheiten. Die gefaltete Funktion wird numerisch berechnet, wobei die Schrittweite der Integration 10^{-7} ZE beträgt. Das Faltungsintegral entspricht näherungsweise dem Produkt aus der Summe der Einzelkurven und dem zeitlichen Abstand zwischen ihren Startpunkten (0,2 ZE), wobei die Näherung um so besser wird, je kleiner der Abstand zwischen den Startpunkten ist.

Die Anregungsfunktion (Laserpuls) sei definiert durch $a(t)$. Man zerlegt $a(t)$ in eine Folge von Deltapulsen, wobei die Deltafunktion folgendermaßen definiert ist (siehe z.B. [Zachmann 1984]):

$$a(t) = \int_{x_0 < t}^{x_1 > t} a(t-x)\delta(x)dx \quad \delta(x) = \begin{cases} 0 & \text{für } x \neq 0 \\ \infty & \text{für } x = 0 \end{cases}$$

Jeder dieser Deltapulse wird zum Ausgangspunkt einer Abklingkurve $g(t)$. Die gefaltete Funktion $I(t)$ setzt sich aus der Summe über diese Abklingkurven zusammen, wobei die Abklingkurven mit der Fläche unter der Anregungsfunktion gewichtet werden:

$$I(t) = \sum_i g(t-x_i)a(x_i)(x_i-x_{i-1}) = \sum_i g(t-x_i)a(x_i)\Delta x$$

Man läßt den Abstand Δx zwischen den Startpunkten gegen Null laufen und erhält so das Faltungsintegral:

$$I(t) = \int_0^t g(t-x)a(x)dx \quad (2.10.7-1)$$

Im Fall einer monoexponentiellen Abklingkurve $g(t) = e^{-ft}$ kann man das Integral vereinfachen, indem man $g(t)$ vor das Integral zieht:

$$I(t) = \int_0^t e^{-f(t-x)}a(x)dx = e^{-ft} \int_0^t e^{fx}a(x)dx \quad (2.10.7-2)$$

Restfluoreszenz

Zu der neu erzeugten Fluoreszenz kommt noch die Restfluoreszenz früherer Pulse (vgl. Abschnitt 2.10.5):

$$I(t) = I_R e^{-ft} + e^{-ft} \int_0^t e^{fx}a(x)dx \quad (2.10.7-3)$$

Die von diesem Puls noch verbleibende Restfluoreszenz zu Beginn des nächsten Pulses, entspricht der Fluoreszenz zum Zeitpunkt $t = 1/R$, wobei R die Repetitionsrate des Lasers ist.

$$I\left(\frac{1}{R}\right) = e^{-\frac{f}{R}} \int_0^{\frac{1}{R}} e^{fx}a(x)dx = e^{-\frac{f}{R}} I_n$$

$$I_n = \int_0^{\frac{1}{R}} e^{fx}a(x)dx$$

Das Integral entspricht der Fläche I_n eines Deltapulses der, zum Zeitpunkt $t=0$ erfolgt, zur gleichen Restfluoreszenz führt, wie der tatsächliche Puls.

$$I_R = \sum_{n=1}^{\infty} e^{-\frac{f}{R}n} I_n = I_n \sum_{n=1}^{\infty} e^{-\frac{f}{R}n} = I_n \left(\frac{1}{1 - e^{-f/R}} - 1 \right) = \frac{1}{e^{+f/R} - 1} I_n$$

$$I_R = \frac{1}{e^{+f/R} - 1} \int_0^{\frac{1}{R}} e^{fx} a(x) dx \quad (2.10.7-4)$$

Da $a(x)$ nur während des Laserpulses ungleich Null ist, ergibt sich für I_R der selbe Wert, wenn nur über die Dauer des Pulses integriert wird.

Damit ergibt sich die Gesamtfluoreszenz zu

$$I(t) = e^{-ft} \left(\frac{I_n}{e^{f/R} - 1} + \int_0^t e^{fx} a(x) dx \right)$$

Beschränkt man das Zeitfenster auf die Zeit nach dem Puls, so wird $a(x) = 0$, und das Integral nimmt einen konstanten Wert an. Da auch der Summand für die Restfluoreszenz zeitunabhängig ist, erhält man dann einen monoexponentiellen Fluoreszenzabfall, muß aber auf einen Teil der gesammelten Photonen verzichten. Im (realistischen) Beispiel der Abbildung 2.10.7-1 verzichtet man bei einem Zeitfenster von 2-12 Zeiteinheiten auf 36,9% der insgesamt detektierten Fluoreszenzphotonen. Gemäß der Cramérschen Ungleichung (Abschnitt 2.10.9) steigt die Zuordnungssicherheit exponentiell mit der Anzahl der berücksichtigten Photonen. Man erkaufte sich also eine vereinfachte (und damit schnellere) Auswertung mit einer größeren Unsicherheit.

Untergrund- und Streulicht

Untergrundlicht wird, wie in Abschnitt 2.10.6, durch einen der Ereignisbreite proportionalen, auf der mikroskopischen Zeitskala konstanten Term dargestellt.

Streulicht kommt in erster Linie durch Raman-Streuung an Lösungsmittelmolekülen und durch Reflexionen des Lasers an Grenzschichten wie z.B. Kapillarwänden zustande. Es ist auf der mikroskopischen Zeitskala veränderlich und der Anregungsfunktion proportional. Die Proportionalitätskonstante soll mit S bezeichnet werden. Sie beschreibt, wie stark das Laserlicht relativ zur Fluoreszenzanregung gestreut wird und ist daher für jede Molekültrajektorie unterschiedlich. Die Streuphotonen nehmen, wie die Untergrundphotonen, linear mit der Ereignisbreite zu.

Die Gesamtintensität addiert sich zu:

$$I(t) = e^{-ft} \left(\frac{I_n}{e^{f/R} - 1} + \int_0^t e^{fx} a(x) dx \right) + (U + S a(t))W \quad (2.10.7-5)$$

Entwicklung des Modells

Um die Erwartungswerte λ_k zu bekommen, muß $I(t)$ wieder in den Grenzen der Kanäle über t integriert werden:

$$\lambda_k = \int_{(k-1)g}^{kg} I(t) dt \quad (2.10.7-6)$$

mit $I_R = \frac{\int_0^{f/R} e^{fx} a(x) dx}{e^{f/R} - 1}$ (Gleichung 2.10.7-4) ergibt sich für λ_k :

$$\lambda_k = \int_{(k-1)g}^{kg} e^{-ft} \left(I_R + \int_0^t e^{fx} a(x) dx \right) + W(U + S a(t)) dt \quad (2.10.7-7)$$

$$\lambda_k = \int_{(k-1)g}^{kg} e^{-ft} I_R dt + \int_{(k-1)g}^{kg} e^{-ft} \int_0^t e^{fx} a(x) dx dt + \int_{(k-1)g}^{kg} UW dt + SW \int_{(k-1)g}^{kg} a(t) dt$$

$$\lambda_k = \frac{I_R}{f} e^{-f(k-1)g} (1 - e^{-fg}) + \int_{(k-1)g}^{kg} e^{-ft} \int_0^t e^{fx} a(x) dx dt + UWg + SW \int_{(k-1)g}^{kg} a(t) dt$$

Das verschachtelte Faltungsintegral läßt sich durch Produktintegration ($\int v'u = uv - \int vu'$) entflechten:

$$\begin{aligned} \int_{(k-1)g}^{kg} e^{-ft} \int_0^t e^{fx} a(x) dx dt &= \int_{(k-1)g}^{kg} \left(\frac{e^{-ft}}{f} \int_0^t e^{fx} a(x) dx \right) dt + \int_{(k-1)g}^{kg} \frac{e^{-ft}}{f} e^{ft} a(t) dt \\ &= -\frac{e^{-fk}g}{f} \int_0^{kg} e^{fx} a(x) dx + \frac{e^{-f(k-1)g}}{f} \int_0^{(k-1)g} e^{fx} a(x) dx + \frac{1}{f} \int_{(k-1)g}^{kg} a(t) dt \\ &= \frac{e^{-f(k-1)g}}{f} \left(\int_0^{(k-1)g} e^{ft} a(t) dt - e^{-fg} \int_0^{kg} e^{ft} a(t) dt \right) + \frac{1}{f} \int_{(k-1)g}^{kg} a(t) dt \end{aligned}$$

Führt man die Streuintegrale

$$s_k = S \int_{(k-1)\mathcal{G}}^{k\mathcal{G}} a(t) dt$$

und die Faltintegrale

$$\xi_k = \int_{(k-1)\mathcal{G}}^{k\mathcal{G}} e^{ft} a(t) dt$$

ein, so ergibt sich

$$\lambda_k = \frac{I_R}{f} e^{-f\mathcal{G}(k-1)} (1 - e^{-f\mathcal{G}}) + \frac{1}{fS} \left(e^{-kf\mathcal{G}} (e^{f\mathcal{G}} - 1) \sum_{j=1}^{k-1} (S\xi_j) - e^{-kf\mathcal{G}} S\xi_k + s_k \right) + WU\mathcal{G} + W s_k \quad (2.10.7-8)$$

Streuintegrale s_k

Zur Modellierung müssen die Anteile von Streu-, Untergrund- und Fluoreszenzlicht bestimmt werden. Streu- und Untergrundintensität ergeben sich aus einer Blindprobe ohne Farbstoff bzw. bei zweifelsfreier Ereigniserkennung aus den ereignisfreien Abschnitten. Der Fluoreszenzanteil ergibt sich aus der Differenz der Photonenzahl im Ereignis und der

errechneten Anzahl an Untergrund- und Streuphotonen. Die Integrale $b_k = \int_{(k-1)\mathcal{G}}^{k\mathcal{G}} Sa(t) dt + U\mathcal{G}$

sind aus der Blindmessung direkt zugänglich. Der konstante Term $U\mathcal{G}$ wird aus dem Bereich der Abklingkurve der Blindprobe bestimmt, der nach dem Puls kommt (s. Abb. 2.10.6-2). Die

Streuintegrale $s_k = \int_{(k-1)\mathcal{G}}^{k\mathcal{G}} Sa(t) dt = b_k - U\mathcal{G}$ lassen sich also aus der Blindprobe bestimmen.

Faltintegrale ξ_k

Die Bestimmung der Faltintegrale $\xi_k = \int_{(k-1)\mathcal{G}}^{k\mathcal{G}} e^{ft} a(t) dt$ ist nicht ohne weiteres möglich, da die

Funktion $a(t)$ nicht direkt gemessen wird. Man kann für $a(t)$ eine Modellfunktion, wie z.B. eine Gaußkurve annehmen und deren Parameter mit der in Abschnitt 2.4.3.8 beschriebenen Methode optimieren, um anschließend die Faltintegrale numerisch zu ermitteln. Der Nachteil dieser Methode liegt in dem großen Rechenaufwand, sowohl für die Optimierung der Parameter als auch für die anschließende Integration.

Hier wird für $a(t)$ statt dessen eine lokale Näherung zweiter Ordnung verwendet, die hinreichend genaue Ergebnisse bei sehr stark reduziertem Rechenaufwand liefert.

Zunächst wird angesetzt, daß sich die Anregungsfunktion abschnittsweise aus Parabeln zusammensetzen läßt, daß also gilt:

$$a(t) \approx \alpha_0 + 2\alpha_1 t + 3\alpha_2 t^2. \quad (2.10.7-9)$$

Da drei Meßwerte für die Bestimmung der drei α berücksichtigt werden müssen, lautet also die Forderung daß die α_i im Bereich von drei Kanälen näherungsweise als konstant anzunehmen sind.

Dieser Ansatz hat außerdem den Vorteil, daß das Faltintegral durch zweifache Produktintegration analytisch lösbar ist:

$$\begin{aligned}\int a(t)e^{ft} dt &= a(t) \frac{e^{ft}}{f} - \int \frac{e^{ft}}{f} a'(t) dt = a(t) \frac{e^{ft}}{f} - \frac{e^{ft}}{f^2} a'(t) + \int \frac{e^{ft}}{f^2} a''(t) dt \\ &= a(t) \frac{e^{ft}}{f} - \frac{e^{ft}}{f^2} a'(t) + \frac{e^{ft}}{f^3} a''(t) - \int \frac{e^{ft}}{f^3} a'''(t) dt\end{aligned}$$

Da in der quadratischen Näherung $a'''=0$ ist, verschwindet das letzte Integral. Man erhält damit

$$\int a(t)e^{ft} dt \approx e^{ft} \left(\frac{\alpha_0 + 2\alpha_1 t + 3\alpha_2 t^2}{f} - \frac{2\alpha_1 + 6\alpha_2 t}{f^2} + \frac{6\alpha_2}{f^3} \right)$$

Die α_i sind dabei für jeden Kanal unterschiedlich, da es sich ja um eine lokale Näherung handelt.

$$\begin{aligned}\xi_j &= \int_{(j-1)\vartheta}^{j\vartheta} a(t)e^{ft} dt \approx \left[e^{ft} \left(\frac{\alpha_0(j) + 2\alpha_1(j)t + 3\alpha_2(j)t^2}{f} - \frac{2\alpha_1(j) + 6\alpha_2(j)t}{f^2} + \frac{6\alpha_2(j)}{f^3} \right) \right]_{t=(j-1)\vartheta}^{j\vartheta} \\ \xi_j &\approx e^{fj\vartheta} \left(\frac{\alpha_0(j) + 2\alpha_1(j)j\vartheta + 3\alpha_2(j)(j\vartheta)^2}{f} - \frac{2\alpha_1(j) + 6\alpha_2(j)j\vartheta}{f^2} + \frac{6\alpha_2(j)}{f^3} \right) \\ &\quad - e^{f(j-1)\vartheta} \left(\frac{\alpha_0(j) + 2\alpha_1(j)(j-1)\vartheta + 3\alpha_2(j)((j-1)\vartheta)^2}{f} - \frac{2\alpha_1(j) + 6\alpha_2(j)(j-1)\vartheta}{f^2} + \frac{6\alpha_2(j)}{f^3} \right) \\ \xi_j &\approx \frac{e^{f(j-1)\vartheta}}{f^3} \cdot \\ &\quad \left\{ \alpha_0(j)e^{f\vartheta} f^2 + 2\alpha_1(j)e^{f\vartheta} f^2 j\vartheta + 3\alpha_2(j)e^{f\vartheta} f^2 (j\vartheta)^2 - 2\alpha_1(j)e^{f\vartheta} f + 6\alpha_2(j)e^{f\vartheta} f j\vartheta + 6\alpha_2(j)e^{f\vartheta} \right. \\ &\quad \left. - \alpha_0(j)f^2 - 2\alpha_1(j)f^2(j-1)\vartheta - 3\alpha_2(j)f^2((j-1)\vartheta)^2 + 2\alpha_1(j)f - 6\alpha_2(j)f(j-1)\vartheta + 6\alpha_2(j) \right\} \\ \xi_j &\approx \frac{e^{f(j-1)\vartheta}}{f^3} \cdot \left\{ \alpha_0(j)(e^{f\vartheta} - 1)f^2 + 2\alpha_1(j)[e^{f\vartheta} f^2 j\vartheta - e^{f\vartheta} f - f^2 j\vartheta + f^2 \vartheta + f] + \right. \\ &\quad \left. 3\alpha_2(j)[e^{f\vartheta} f^2 j^2 \vartheta^2 + 2e^{f\vartheta} f j\vartheta + 2e^{f\vartheta} - f^2 j^2 \vartheta^2 + 2f^2 j\vartheta^2 - f^2 \vartheta^2 - 2fj\vartheta + 2f\vartheta - 2] \right\} \\ \xi_j &\approx \frac{e^{f(j-1)\vartheta}}{f^3} \cdot \left\{ \alpha_0(j)(e^{f\vartheta} - 1)f^2 + \right. \\ &\quad \left. 2\alpha_1(j)[(e^{f\vartheta} - 1)(f^2 j\vartheta - f) + f^2 \vartheta] + \right. \\ &\quad \left. 3\alpha_2(j)[(e^{f\vartheta} - 1)(f^2 j^2 \vartheta^2 + 2f j\vartheta + 2) + 2f^2 j\vartheta^2 - f^2 \vartheta^2] \right\}\end{aligned}\tag{2.10.7-11}$$

Bestimmung der Parameter α_0 , α_1 und α_2 für die Näherungsparabeln

Die Bestimmung der α_i erfolgt aus den Streuintegralen:

Mit $\int a(t)dt \approx \int \alpha_0 + 2\alpha_1 t + 3\alpha_2 t^2 dt = \alpha_0 t + \alpha_1 t^2 + \alpha_2 t^3$ folgt für die Streuintegrale:

$$s_k = S \int_{(k-1)\vartheta}^{k\vartheta} a(t)dt$$

$$s_{k-1} \approx S \left\{ \alpha_0 \vartheta + \alpha_1 \vartheta^2 [(k-1)^2 - (k-2)^2] + \alpha_2 \vartheta^3 [(k-1)^3 - (k-2)^3] \right\}$$

$$s_k \approx S \left\{ \alpha_0 \vartheta + \alpha_1 \vartheta^2 [k^2 - (k-1)^2] + \alpha_2 \vartheta^3 [k^3 - (k-1)^3] \right\} \quad (2.10.7-12)$$

$$s_{k+1} \approx S \left\{ \alpha_0 \vartheta + \alpha_1 \vartheta^2 [(k+1)^2 - k^2] + \alpha_2 \vartheta^3 [(k+1)^3 - k^3] \right\}$$

Dies ist ein lineares Gleichungssystem mit drei Unbekannten. Seine Lösung ergibt:

$$\alpha_2(k) \approx \frac{s_{k-1} - 2s_k + s_{k+1}}{6S\vartheta^3} \quad (2.10.7-13a)$$

$$\alpha_1(k) \approx \frac{-ks_{k-1} + (2k-1)s_k + (1-k)s_{k+1}}{2S\vartheta^2} \quad (2.10.7-13b)$$

$$\alpha_0(k) \approx \frac{(3k^2-1)s_{k-1} - (6k^2-6k-5)s_k + (3k^2-6k+2)s_{k+1}}{6S\vartheta} \quad (2.10.7-13c)$$

Die Gleichungen 2.10.7-13 können für den ersten und den letzten Kanal des Musters nicht verwendet werden, da der Vorgänger s_0 des ersten Kanals bzw. der Nachfolger s_{K+1} des letzten Kanals nicht definiert sind. Für diese beiden Kanäle wird daher eine lineare Näherung angewandt. Es gilt also

$$\alpha_2(1) = \alpha_2(K) = 0 \quad \frac{s_k}{S} = \alpha_0 \vartheta + \alpha_1 \vartheta^2 (2k-1)$$

Für den ersten Kanal:

$$\alpha_1(k=1) = \frac{s_2 - s_1}{2S\vartheta^2} \quad \alpha_0(k=1) = \frac{3s_1 - s_2}{2S\vartheta} \quad (2.10.7-13d,e)$$

Für den letzten Kanal:

$$\alpha_1(k=K) = \frac{s_K - s_{K-1}}{2S\vartheta^2} \quad \alpha_0(k=K) = \frac{(2K-1)s_{K-1} - (2K-3)s_K}{2S\vartheta} \quad (2.10.7-13f,g)$$

Abbildung 2.10.7-2 illustriert das Ergebnis graphisch. Obwohl die Parabelsegmente erkennbar von der tatsächlichen Anregungskurve abweichen, stimmen die mit Gleichung 2.10.7-11 berechneten ξ_k sehr gut mit den numerisch errechneten überein. Die mit den ξ_k nach Gleichung 2.10.7-15 errechneten λ_k weisen gegenüber den numerisch integrierten λ_k

Abweichungen auf, die zwei Größenordnungen kleiner als die Werte sind (Abbildung 2.10.7-3).

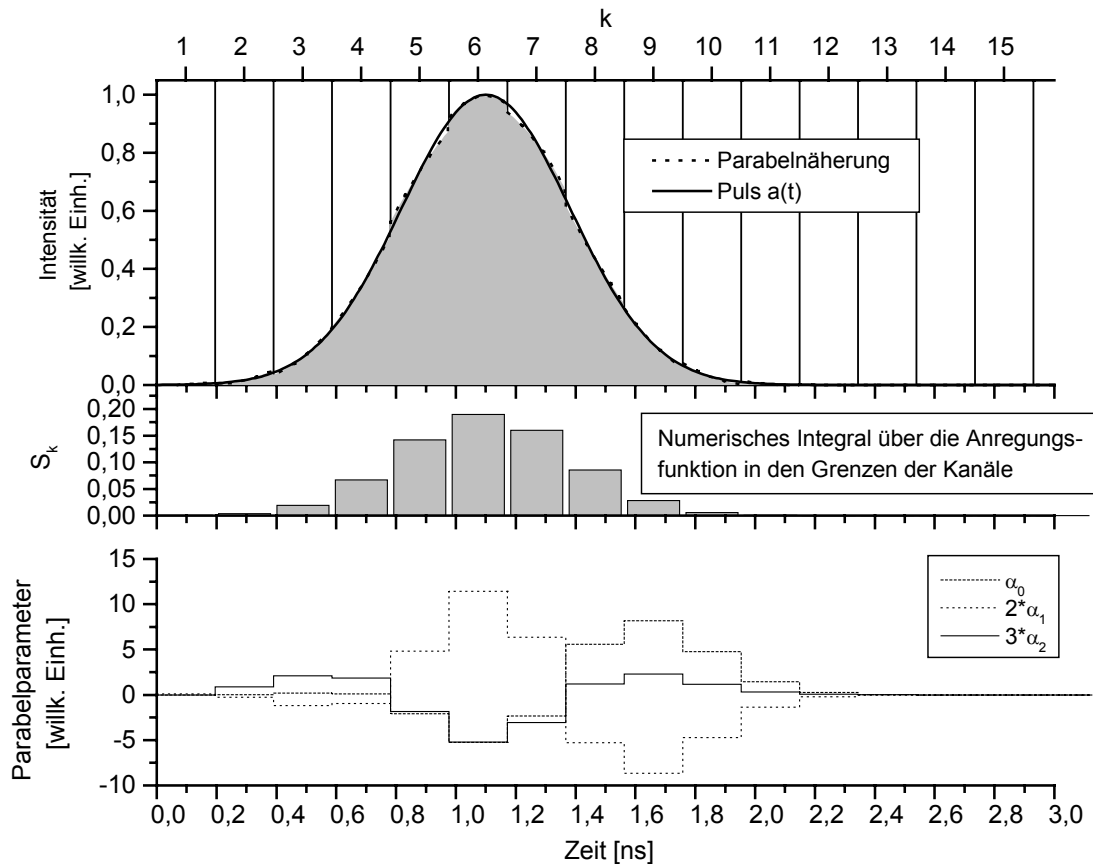


Abbildung 2.10.7-2 Abschnittsweise Approximation des Intensitätsverlaufes durch Parabelsegmente: Der tatsächliche Intensitätsverlauf des Modellpulses ist Gauß-förmig (durchgezogene Linie oben). Die Parabelsegmente (gepunktete Linie über grau gefärbter Fläche) geben diesen näherungsweise wieder. Die Streuintegrale S_k zur Berechnung der Parabelparameter nach Gleichung 2.10.7-13 wurden numerisch mit $dx = 10^{-7}$ ns berechnet (Mitte). Der Verlauf der Parabelparameter ist im unteren Teil der Abbildung dargestellt.

Setzt man die Gleichungen 2.10.7-13 in die Gleichung 2.10.7-11 ein, so erhält man für die Faltintegrale:

$$\xi_j \approx \frac{e^{f(j-1)g}}{f^3} \left\{ \left(\frac{(3j^2 - 1)s_{j-1} - (6j^2 - 6j - 5)s_j + (3j^2 - 6j + 2)s_{j+1}}{6Sg} \right) f^2 (e^{fg} - 1) \right. \\ \left. + 2 \left(\frac{-js_{j-1} + (2j-1)s_j + (1-j)s_{j+1}}{2Sg^2} \right) [(jg f^2 - f)(e^{fg} - 1) + g f^2] \right. \\ \left. + 3 \left(\frac{s_{j-1} - 2s_j + s_{j+1}}{6Sg^3} \right) [(j^2 g^2 f^2 - 2jg f + 2)(e^{fg} - 1) + (2jg^2 f^2 - g^2 f^2 - 2gf)] \right\}$$

oder

$$\begin{aligned} \xi_j S \approx \frac{e^{f(j-1)g}}{6g^3 f^3} \{ & [(-g^2 f^2 + 6)(e^{fg} - 1) - 3gf(gf + 2)]s_{j-1} \\ & + [(5g^2 f^2 + 6fg - 12)(e^{fg} - 1) + 12gf]s_j \\ & + [(2g^2 f^2 - 6fg + 6)(e^{fg} - 1) + 3gf(gf - 2)]s_{j+1} \} \end{aligned} \quad (2.10.7-14a)$$

Diese Gleichung enthält auf der rechten Seite, außer der Fluoreszenzrate f und der Kanalbreite g nur noch die gemessenen Streuphotonenzahlen s_j in den einzelnen Kanälen.

Für ξ_1 ergibt sich in nullter Näherung ($\alpha_2 = \alpha_1 = 0$ $\alpha_0 = s_1/g$):

$$\xi_1 S \approx \frac{s_1 (e^{fg} - 1)}{gf} \quad (2.10.7-14b)$$

Für ξ_K ergibt sich in erster Näherung:

$$\xi_K S \approx \frac{e^{f(K-1)g}}{2g^2 f^2} \{ [(2 - fg)(e^{fg} - 1) - fg]s_{K-1} + [(3fg - 2)(e^{fg} - 1) + fg]s_K \} \quad (2.10.7-14c)$$

Die $\xi_j S$ werden wiederum in Gleichung 2.10.7-8 eingesetzt, um die Erwartungswerte für die Photonenzahlen in den einzelnen Kanälen zu bekommen. Mit der Restfluoreszenz

$$I_R = \frac{1}{S} \frac{1}{e^{f/R} - 1} \sum_{j=1}^K \xi_j S$$

erhält man:

$$\lambda_k = \frac{1}{fS} e^{-kf g} \left(\frac{e^{fg} - 1}{e^{f/R} - 1} \sum_{j=1}^K \xi_j S + (e^{fg} - 1) \sum_{j=1}^{k-1} (S \xi_j) - S \xi_k + e^{kf g} s_k \right) + W(Ug + s_k) \quad (2.10.7-15)$$

Dabei ist

- f Die reziproke Fluoreszenzabklingdauer [MHz]
- S Eine dimensionslose Konstante, die die Streulichintensität in Relation zur Fluoreszenzintensität angibt
- g die Breite eines Kanals [ps]
- R die Repetitionsfrequenz des Lasers [MHz]
- $\xi_j S$ die nach Gl. 2.10.7-14 berechneten Faltintegrale
- W die Fluoreszenzereignisbreite [ms]
- Ug Die Untergrundfrequenz je Kanal [kHz]. Das ist die Anzahl der Untergrundphotonen in einem Kanal eines Bins dividiert durch die Binweite [ms].
- s_k Die Streufrequenz in Kanal k [kHz]. Das ist die Anzahl der Streuphotonen im Kanal k eines Bins dividiert durch die Binweite [ms].

K Die Anzahl der Kanäle

Abbildung 2.10.7-3 stellt eine Beispielrechnung für die Faltintegrale ξ_k und die Fluoreszenzphotonen λ_k und (ohne Untergrundanteil) mit realistischen Parametern ($\vartheta = 0,195$ ns, $K = 64$, $R = 0,064$ GHz, $f = 0,5$ GHz) graphisch dar; die Abweichung der Näherung vom numerisch berechneten Wert beträgt unter 1%.

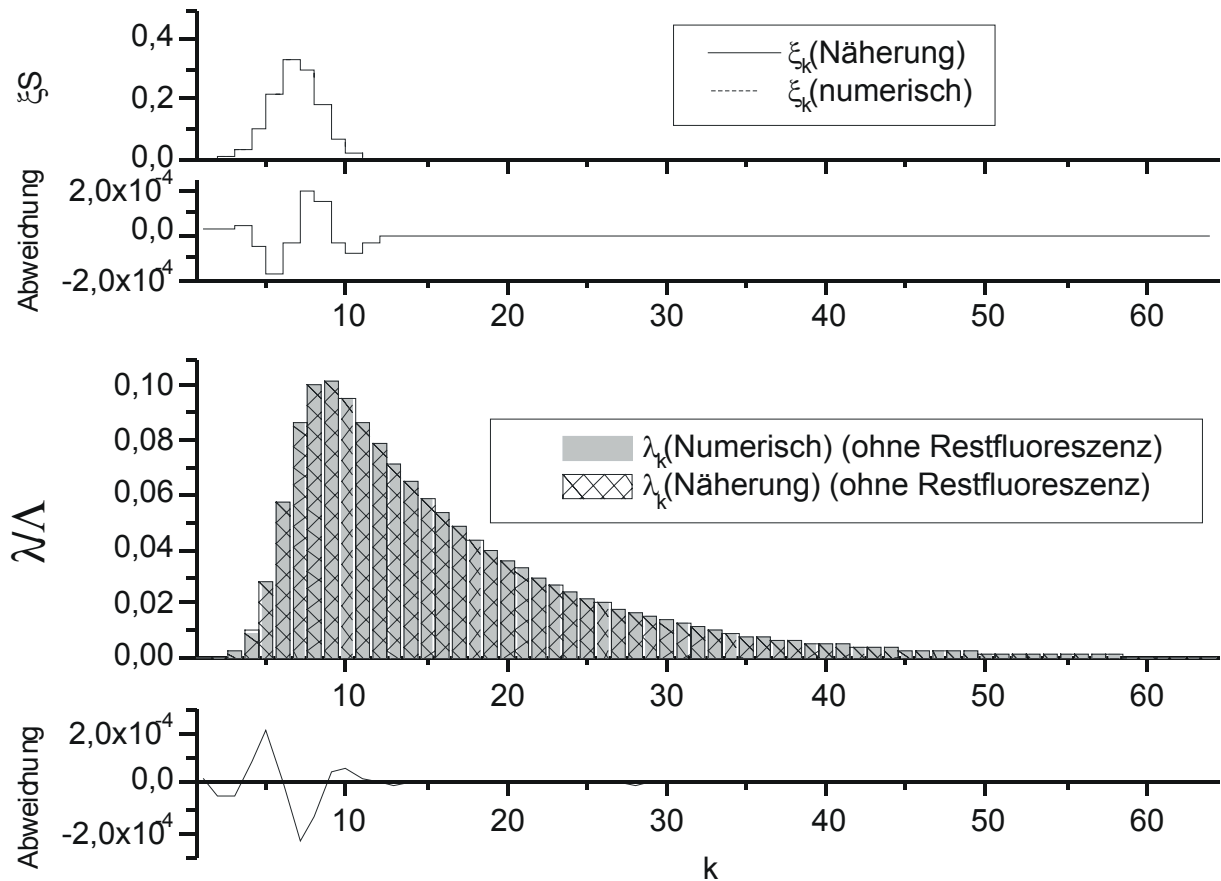


Abbildung 2.10.7-3 Die Faltintegrale $\xi_k = \int_k e^{ft} a(t) dt$ und die damit errechneten Erwartungswerte für die Photonenzahlen λ_k . Die Abweichungen zwischen den in dieser Arbeit entwickelten Näherungen und dem numerischen Wert sind vernachlässigbar klein.

Um das gesuchte Wahrscheinlichkeitsmuster zu erhalten, muß noch der Erwartungswert Λ für die Gesamtzahl der Photonen gefunden werden. Dieser ist durch die Summe über die λ_k , oder gleichbedeutend, das Integral von 0 bis Θ gegeben.

$$\Lambda = \frac{I_R}{f} (1 - e^{-f\Theta}) - \frac{e^{-f\Theta}}{f} \int_0^{\Theta} e^{ft} a(t) dt + \frac{1}{f} \int_0^{\Theta} a(t) dt + UW\Theta + SW \int_0^{\Theta} a(t) dt \quad (2.10.7-16)$$

Das Integral $\int_0^{\Theta} e^{ft} a(t) dt$ entspricht der Startintensität I_0 bei hypothetischer Anregung durch einen Deltapuls. Das normierte Wahrscheinlichkeitsmuster p_k ist durch den Quotient aus λ_k und Λ gegeben:

$$p_k = \frac{\lambda_k}{\Lambda} = \frac{\lambda_k}{\sum_{j=1}^K \lambda_j}$$

Die aufwendige Faltung wird für das Muster nur einmal berechnet. Das gefaltete Muster, das nur die Fluoreszenz enthält, wird anschließend mit dem für jedes Fluoreszenzereignis unterschiedlichen Streu- und Untergrundlicht gemischt.

Faltung ohne Streu- und Untergrundphotonen:

$$\lambda_{k,fluor} \cdot fS = \frac{e^{-f\vartheta(k-1)}(1-e^{-f\vartheta})}{e^{f/R}-1} \sum_{j=1}^K \xi_j + e^{-f(k-1)\vartheta} \left((1-e^{-f\vartheta}) \sum_{j=1}^{k-1} \xi_j - e^{-f\vartheta} \xi_k \right) + s_k$$

$$\Lambda_{fluor} \cdot fS = \frac{(1-e^{-f\Theta})}{e^{f/R}-1} \sum_{j=1}^K \xi_j - e^{-f\Theta} \sum_{j=1}^K \xi_j + \sum_{j=1}^K s_j$$

$$p_{k,fluor} = \frac{e^{-f(k-1)\vartheta} \left(\frac{1-e^{-f\vartheta}}{e^{f/R}-1} \sum_{j=1}^K \xi_j + \sum_{j=1}^{k-1} \xi_j - e^{-f\vartheta} \sum_{j=1}^k \xi_j \right) + s_k}{\frac{(1-e^{-f\Theta})}{e^{f/R}-1} \sum_{j=1}^K \xi_j - e^{-f\Theta} \sum_{j=1}^K \xi_j + \sum_{j=1}^K s_j} \quad (2.10.7-17)$$

Das Gesamtmuster lässt sich aus dem Fluoreszenzmuster einfach berechnen:

$$p_k = \frac{\left(\phi - W \left(UK\vartheta + \sum_{j=1}^K s_j \right) \right) p_{k,fluor} + W(U\vartheta + s_k)}{\Phi} \quad (2.10.7-18)$$

Dabei bedeutet:

- Φ Gesamtzahl der Photonen im gemessenen Ereignis
- W Die Ereignisbreite [ms]
- $U\vartheta$ Die Untergrundfrequenz pro Kanal [kHz].
- s_k Die Streufrequenz in Kanal k [kHz].
- K Die Anzahl der Kanäle
- f Die reziproke Fluoreszenzabklingdauer

2.10.8 Parameterschätzung, MLE

Das Ziel der Parameterschätzung ist, diejenigen Parameter eines theoretischen Modells ($\sigma_1, \sigma_2, \dots$) zu finden, die das Experiment möglichst gut wiedergeben. Das Referenzmuster \vec{p} der Kullback-Leibler-Diskriminierungsinformation wird aus einem theoretischen Modell entwickelt und so eine Funktion der Parameter dieses Modells $\vec{p}(\sigma_1, \sigma_2, \dots)$. Für den optimalen Parametersatz wird die Kullback-Leibler-Diskriminierungsinformation $I^*(\vec{\varphi}, \vec{p}(\sigma_1, \sigma_2, \dots))$ minimal („Log-Likelihood-Ratio-Test“) [Soper 1992], [Wilkerson 1993], [Grabec 1997].

$$\min_{\sigma_1, \sigma_2, \dots} I^*(\vec{\varphi}, \vec{p}(\sigma_1, \sigma_2, \dots)) = \sum_{k=1}^K \varphi_k \ln \left(\frac{\varphi_k}{\Phi p_k(\sigma_1, \sigma_2, \dots)_{optimal}} \right) \quad (2.10.8-1)$$

Dieses Minimum erhält man, indem man die partiellen Ableitungen nach den Parametern $\sigma_1, \sigma_2, \dots$ bildet (Das ist der Gradient von I^* im Parameterraum) und diesen Gradienten Null setzt. Das erhaltene Gleichungssystem ist anschließend (in der Regel numerisch) zu lösen.

$$0 = \left(\frac{\partial}{\partial \sigma_1} \right)_{\sigma_2, \sigma_3, \dots} I^*(\vec{\varphi}, \vec{p}(\sigma_1, \sigma_2, \dots)), 0 = \left(\frac{\partial}{\partial \sigma_2} \right)_{\sigma_1, \sigma_3, \dots} I^*(\vec{\varphi}, \vec{p}(\sigma_1, \sigma_2, \dots)), \dots$$

$$\begin{aligned} 0 &= \left(\frac{\partial}{\partial \sigma_n} \right)_{\sigma_{m \neq n}} \sum_{k=1}^K \varphi_k \ln \left(\frac{\varphi_k}{\Phi p_k(\sigma_1, \sigma_2, \dots)} \right) \\ &= \left(\frac{\partial}{\partial \sigma_n} \right)_{\sigma_{m \neq n}} \sum_{k=1}^K \left[\varphi_k \ln \left(\frac{\varphi_k}{\Phi} \right) - \varphi_k \ln(p_k(\sigma_1, \sigma_2, \dots)) \right] \\ &= - \sum_{k=1}^K \varphi_k \frac{1}{p_k(\sigma_1, \sigma_2, \dots)} \left(\frac{\partial}{\partial \sigma_n} \right)_{\sigma_{m \neq n}} p_k(\sigma_1, \sigma_2, \dots) \end{aligned} \quad (2.10.8-2)$$

Das gleiche Ergebnis erhält man, wenn man anstatt die Diskriminierungsinformation zu minimieren, die Likelihood maximiert („Maximum Likelihood Estimator“, MLE) [Tellinghuisen.1994].

Im Fall des einfachsten Modells, des monoexponentiellen Fluoreszenzzerfalls ohne Untergrundlicht und Faltung (s. Abschnitt 2.10.5) ergibt sich für das Referenzmuster:

$$p_k = e^{-f^g(k-1)} \frac{1 - e^{-f^g}}{1 - e^{-f^g}}$$

Die Ableitung nach dem anzupassenden Parameter f ergibt:

$$\begin{aligned}
\frac{d}{df} p_k &= -g(k-1)e^{-fg(k-1)} \frac{1-e^{-fg}}{1-e^{-f\Theta}} + e^{-fg(k-1)} \frac{ge^{-fg}(1-e^{-f\Theta}) - \Theta e^{-f\Theta}(1-e^{-fg})}{(1-e^{-f\Theta})^2} \\
&= e^{-fg(k-1)} \frac{1-e^{-fg}}{1-e^{-f\Theta}} \left(-g(k-1) + \frac{ge^{-fg}(1-e^{-f\Theta}) - \Theta e^{-f\Theta}(1-e^{-fg})}{(1-e^{-f\Theta})(1-e^{-fg})} \right) \\
&= p_k \left(-g(k-1) + \frac{ge^{-fg}}{(1-e^{-fg})} - \frac{\Theta e^{-f\Theta}}{(1-e^{-f\Theta})} \right)
\end{aligned}$$

Da nur ein Parameter anzupassen ist, besteht das zu lösende „Gleichungssystem“ dementsprechend aus nur einer Gleichung:

$$0 = \sum_{k=1}^K \varphi_k \frac{1}{p_k} \frac{d}{df} p_k \quad (2.10.8-3)$$

$$0 = \sum_{k=1}^K \varphi_k \left(-g(k-1) + \frac{ge^{-fg}}{(1-e^{-fg})} - \frac{\Theta e^{-f\Theta}}{(1-e^{-f\Theta})} \right)$$

$$0 = \left(\frac{ge^{-fg}}{(1-e^{-fg})} - \frac{\Theta e^{-f\Theta}}{(1-e^{-f\Theta})} \right) \Phi - \sum_{k=1}^K g(k-1)\varphi_k$$

$$0 = \frac{g}{(e^{fg} - 1)} - \frac{\Theta}{(e^{f\Theta} - 1)} - \frac{\sum_{k=1}^K g(k-1)\varphi_k}{\Phi} \quad (2.10.8-4)$$

Diese Gleichung enthält f als einzige unbekannte; sie lässt sich beispielsweise mit Hilfe der Newton-Iteration numerisch lösen.

2.10.9 Cramérsche Ungleichung

Nach Abschnitt 2.10.4 werden die Moleküle in der Weise klassifiziert, daß ein unbekanntes Molekül derjenigen Spezies zugerechnet wird, die bei einem Mustervergleich die kleinste Kullback-Leibler-Diskriminierungsinformation ergibt.

Dabei stellt sich nun die Frage, wie wahrscheinlich eine Fehlzurordnung ist [Köllner 1993], [Soper 1994]. Einer Fehlzurordnung entspricht dabei das Ereignis „Die Kullback-Leibler-Diskriminierungsinformation für ein Molekül mit dem Referenzmuster der Spezies B ist kleiner als diejenige mit dem Referenzmuster der Spezies A, obwohl das Molekül in Wirklichkeit der Spezies A angehört“. Die Fehlzurordnungswahrscheinlichkeit ist also $P(B | A) = W(I^*(\vec{\varphi}_A, \vec{p}_A) > I^*(\vec{\varphi}_A, \vec{p}_B))$. Eine Obergrenze dafür ist durch die Cramérsche Ungleichung gegeben [Köllner 1992],[Chernoff 1952], [Varadhan 1984].

$$P(B | A) \leq \alpha_{BA}^{\Phi} \quad (2.10.9-1)$$

α gibt dabei an, wie ähnlich sich die Referenzmuster von A und B sind. Sind die Muster ununterscheidbar, so ist $\alpha=1$ und die Obergrenze ergibt 100%. Je stärker die Referenzmuster sich unterscheiden, desto stärker weicht α von 1 ab (Abbildung 2.10.9-1) und desto weniger Photonen Φ braucht man, um die Zuordnung mit einer bestimmten Irrtumswahrscheinlichkeit $P(B|A)$ durchzuführen.

$$\alpha_{BA} = \min_{0 < \vartheta < 1} \sum_{k=1}^K p_{A,k}^{\vartheta} p_{B,k}^{1-\vartheta} \quad (2.10.9-2)$$

$p_{A,k}$ ist dabei die Wahrscheinlichkeit des Referenzmusters A, daß ein Photon im Kanal k detektiert wird und nicht in einem der übrigen $K-1$ Kanäle.

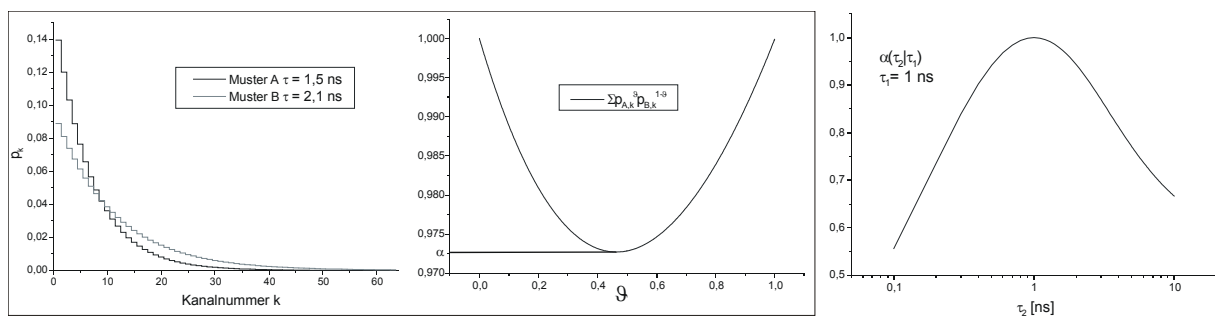


Abbildung 2.10.9-1 Unterscheidbarkeitsparameter α_{AB} .

links: Muster A mit 1,5 ns Abklingdauer und Muster B mit 2,1 ns Abklingdauer bei einer Kanalbreite von 195 ps und einer Anzahl von 64 Kanälen

Mitte: Der Unterscheidbarkeitsparameter α_{AB} entspricht dem Minimum $\min_{0 < \vartheta < 1} \sum_{k=1}^K p_{A,k}^{\vartheta} p_{B,k}^{1-\vartheta}$

rechts: Unterscheidbarkeitsparameter α monoexponentieller Muster bei konstant gehaltenem $\tau_1 = 1$ ns in Abhängigkeit von τ_2 .

2.11 Elektrodynamik und Optik

2.11.1 Elektrische und magnetische Felder

E-Feld

Es gibt zwei Feldgrößen zur Beschreibung des elektrischen Feldes. Die **elektrische Feldstärke** \vec{E} definiert das Feld als Kraftwirkung \vec{F} (Coulomb-Kraft) auf eine Probeladung Q .

$$\vec{E} = \frac{\vec{F}}{Q} \quad (2.11.1-1)$$

Umgekehrt gehen von jeder Ladung Feldlinien aus. Das ist der Ausgangspunkt zur Definition der **Verschiebungsdichte** \vec{D} . Das Integral der Verschiebungsdichte über eine geschlossene Fläche S ist gleich der eingeschlossenen Ladung bzw. die Quelldichte $\text{div } \vec{D}$ der Verschiebungsdichte ist gleich der Ladungsdichte ρ (Coulomb-Gesetz). Die Äquivalenz zur differentiellen Formulierung folgt aus dem Gaußschen Satz der Vektoranalysis. Gl. 2.11.1-2 stellt die erste der vier Maxwell'schen Gleichungen dar.

$$\oiint \vec{D} \cdot d\vec{S} = Q \Leftrightarrow \nabla \cdot \vec{D} = \frac{dQ}{dV} = \rho \quad (2.11.1-2)$$

$$d\vec{D} = \frac{dQ(\vec{r})}{4\pi r^2} \frac{\vec{r}}{r}$$

Die letzte Gleichung ist eine etwas umständliche Formulierung des Coulomb-Gesetzes, die hier gewählt wurde, damit die Analogie zum Biot-Savart-Gesetz (Gl. 2.11.1-9) deutlich wird. Im Vakuum gilt eine einfache Proportionalität zwischen elektrischer Feldstärke und Verschiebungsdichte.

$$\vec{E} = \frac{1}{\epsilon_0} \vec{D} \quad (2.11.1-3)$$

Dabei ist $\epsilon_0 = \frac{10^7 \text{ A} \cdot \text{m} \cdot \text{V}^{-1} \text{ s}^{-1}}{4\pi c_0^2} = 8,85419 \times 10^{-12} \text{ CV}^{-1} \text{ m}^{-1}$ die sog. Influenzkonstante

[Gerthsen 1993] (auch elektrische Feldkonstante [Bergmann-Schaefer 1999] oder Dielektrizitätskonstante des Vakuums [Jackson 2002]), c_0 ist die Vakuumlichtgeschwindigkeit.

In homogener Materie gilt die Proportionalität mit Ausnahme des Bereichs der nichtlinearen Optik immer noch, aber die Proportionalitätskonstante $\varepsilon = \varepsilon_0 \varepsilon_r$ („Permittivität“) [Bergmann-Schaefer 1999] ändert sich. Der tiefere Grund hierfür liegt darin, daß zur Verschiebungsdichte nur die freien Ladungen beitragen, zur elektrischen Feldstärke jedoch sowohl freie als auch gebundene Ladungen. Die gebundenen Ladungen drücken sich in der dielektrischen Polarisation \vec{P} des Materials aus. Diese ist dem angelegten Feld entgegen gerichtet, so daß

$$\vec{E} = \frac{1}{\varepsilon_0} (\vec{D} - \vec{P}) = \frac{1}{\varepsilon_r \varepsilon_0} \vec{D} \quad \text{mit} \quad \vec{P} = (\varepsilon_r - 1) \varepsilon_0 \vec{E} = \chi_p \vec{E} \quad (2.11.1-4)$$

gilt.

Die Materialkonstante $\varepsilon_r (>1)$ wird Dielektrizitätskonstante [Gerthsen 1993] oder „relative Permittivitätszahl“ [Bergmann-Schaefer 1999] genannt. Die Konstante χ_p heißt dielektrische Suszeptibilität [Gerthsen 1993].

Das elektrostatische Feld ist wirbelfrei, d.h. es zeigt keine Rotation. Es läßt sich daher als Gradient eines Potentials U darstellen (Potentialfeld):

$$\nabla \times \vec{E}_{Stat} = \vec{0} \quad \vec{E}_{Stat}(\vec{r}) = -\nabla U(\vec{r}) \quad (2.11.1-5)$$

An der Grenzfläche zweier Medien mit unterschiedlicher Dielektrizitätskonstante wird die elektrische Feldstärke gebrochen, denn die Komponente von \vec{E} , die senkrecht auf der Grenzfläche steht, E_{\perp} , wird durch die Polarisation des Materials verändert, während die Tangentialkomponente E_{\parallel} (wegen der Wirbelfreiheit) konstant bleiben muß (Gl. 2.11.1-6 und Abb. 2.11.1-1) [Bergmann-Schaefer 1999, S.79]. Gleichung 2.11.1-6 gibt das **Brechungsgesetz** für elektrische Felder an. Das bekannte Snelliussche Brechungsgesetz für Lichtstrahlen (Gl. 2.11.4-1) folgt daraus.

$$\varepsilon_{r,1} E_{\perp,1} = \varepsilon_{r,2} E_{\perp,2} \quad E_{\parallel,1} = E_{\parallel,2} \quad (2.11.1-6)$$

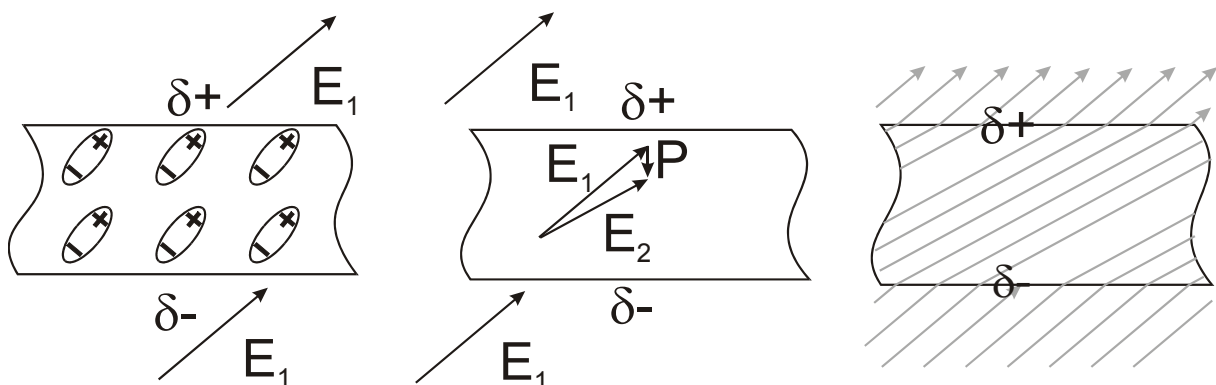


Abbildung 2.11.1-1 Brechung des E-Feldes an einer dielektrischen Platte.

links: Polarisation des Materials

Mitte: Konstruktion der el. Feldstärke

rechts: Feldlinien des E-Feldes

B-Feld

Es gibt analog zum elektrischen Feld zwei Feldgrößen zur Beschreibung des Magnetfeldes. Die **magnetische Flußdichte** (auch magnetische Induktion) \vec{B} definiert sich über die Kraftwirkung (Lorentz-Kraft) auf eine bewegte Ladung:

$$\vec{F} = Q \cdot \vec{v} \times \vec{B} \quad (2.11.1-7)$$

So wie das elektrische Feld durch Ladungen erzeugt wird, wird das magnetische Feld durch Ladungsbewegungen, also Ströme erzeugt. Daraus wird die **magnetische Feldstärke** \vec{H} abgeleitet. Die magnetischen Feldlinien umkreisen die Ströme auf geschlossenen Bahnen. Das Integral der magnetischen Feldstärke über eine geschlossene Kurve ist gleich dem eingeschlossenen Strom (solange keine zeitabhängigen E-Felder die von der Kurve eingeschlossene Fläche durchsetzen) (Ampère-Gesetz). Das ist äquivalent zu der Aussage, daß die Rotation der magnetischen Feldstärke, d.h. ihre Wirbeldichte, gleich der Stromdichte ist (Satz von Stokes).

$$\oint \vec{H} d\vec{s} = I \Leftrightarrow \nabla \times \vec{H} = \vec{j} \quad (2.11.1-8)$$

$$d\vec{H} = \frac{I}{4\pi r^2} \frac{d\vec{l} \times \vec{r}}{r} \quad (2.11.1-9)$$

Gleichung 2.11.1-9 heißt Gesetz von Biot-Savart. \vec{H} ist die magnetische Feldstärke im Ursprung des Koordinatensystems, I ist die Stromstärke durch $d\vec{l}$, ein infinitesimal kurzes Leiterstück (Vektor, da richtungsbehaftet) und \vec{r} der Ortsvektor zum Leiterstück.

Man beachte, daß die „Feldstärke“ H beim Magnetfeld aus der Felderzeugung abgeleitet wird, während beim elektrischen Feld der „Feldstärke“ E die Kraftwirkung zugrunde liegt. Möglicherweise ist das auch der Grund für die uneinheitliche Verwendung des Begriffs „magnetische Feldstärke“ in verschiedenen Lehrbüchern z.B. [Gerthsen 1997] und [Bergmann-Schaefer 1999]; die Verwendung der Symbole B und H ist hingegen in allen für diese Arbeit verwendeten Lehrbüchern gleich.

Im Vakuum ist die magnetische Flußdichte B der magnetischen Feldstärke H proportional:

$$\vec{B} = \frac{1}{\epsilon_0 c_0^2} \vec{H} = \mu_0 \vec{H} \quad (2.11.1-10)$$

Dabei ist c_0 die Vakuumlichtgeschwindigkeit. Die Konstante μ_0 heißt magnetische Feldkonstante. Sie ist (im SI-System) auf den Wert $4\pi \times 10^{-7} \text{ VsA}^{-1}\text{m}^{-1}$ definiert.

Die Proportionalität zwischen B und H gilt auch in vielen Materialien, aber z.B. nicht in ferromagnetischen Stoffen.

$$\vec{B} = \mu_r \mu_0 \vec{H}$$

Die Konstante μ_r heißt Permeabilität des Materials. Im Gegensatz zur Dielektrizitätskonstanten ϵ_r , die für alle Stoffe größer als 1 ist, ist μ_r für die meisten Materialien kleiner 1 (**diamagnetische Stoffe**). Nur Stoffe mit bereits vorhandenen Elementarmagneten, die durch das angelegte Feld lediglich ausgerichtet werden, sind **paramagnetisch**.

Die Ursache für den Diamagnetismus sind vom angelegten Feld induzierte gebundene (und daher verlustfreie) Kreisströme. Diese Kreisströme bewirken ein magnetisches Moment \vec{p}_m . Den Quotienten aus dem magnetischen Moment und dem Volumen nennt man Magnetisierung \vec{J} der Materie. Nach der Lenzschen Regel ist diese induzierte Magnetisierung dem angelegten Magnetfeld entgegengesetzt. Zu H tragen nur die freien (d.h. meßbaren) Ströme bei, zu B dagegen auch die gebundenen [Gerthsen 1997, S.360].

$$\vec{B} = \mu_0 (\vec{H} + \vec{J}) = \mu_0 (1 + \chi) \vec{H} = \mu_0 \mu_r \vec{H} \quad (2.11.1-11)$$

Die magnetische Suszeptibilität χ ist für diamagnetische Stoffe negativ, für paramagnetische positiv.

Wie das elektrische Feld wird auch das magnetische Feld beim Durchtritt durch eine Grenzfläche zwischen Materialien unterschiedlicher Permeabilität gebrochen. Die Normalkomponente von \vec{B} (B_{\perp}) muß wegen der Quellenfreiheit des B-Feldes stetig durch die Grenzfläche treten, während die Tangentialkomponente (B_{\parallel}) durch die gebundenen Ströme verändert wird:

$$B_{\perp,1} = B_{\perp,2} \quad \frac{B_{\parallel,1}}{\mu_{r,1}} = \frac{B_{\parallel,2}}{\mu_{r,2}} \quad (2.11.1-12)$$

Das Magnetfeld ist als reines Wirbelfeld divergenzfrei (zweite Maxwellsche Gleichung):

$$\nabla \cdot \vec{B} = 0 \quad \Leftrightarrow \quad \oiint \vec{B} d\vec{S} = 0 \quad (2.11.1-13)$$

In Analogie zum elektrostatischen Potentialfeld läßt sich das Magnetfeld als Rotation eines Vektorpotentials \vec{A} darstellen:

$$\vec{B} = \nabla \times \vec{A} \quad (2.11.1-14)$$

Dynamische Felder

Während das elektrostatische Feld rotationsfrei ist, treten elektrische Wirbelfelder auf, sobald sich die magnetische Flußdichte zeitlich ändert. Das Integral der elektrischen Feldstärke über eine geschlossene Kurve s ist gleich der zeitlichen Ableitung des durch die von der Kurve eingeschlossenen Fläche S tretenden magnetischen Flusses (Faradaysches Induktionsgesetz, dritte Maxwellsche Gleichung):

$$\oint \vec{E} \cdot d\vec{s} = -\frac{\partial}{\partial t} \int \vec{B} \cdot d\vec{S} \Leftrightarrow \nabla \times \vec{E} + \frac{\partial \vec{B}}{\partial t} = \vec{0} \quad (2.11.1-15)$$

Das Ampèresche Durchflutungsgesetz ,Gl. 2.11.1-6 , gilt nur für Gleichströme. In dynamischen elektrischen Feldern wird ein zusätzliches magnetisches Feld erzeugt, dessen Ursache ein vom sich ändernden E-Feld getriebener „Verschiebungsstrom“ ist, der unabhängig von der Anwesenheit eines Leiters durch den Raum fließt. Man erhält damit die vierte Maxwellsche Gleichung:

$$\oint \vec{H} \cdot d\vec{s} = I + \frac{d}{dt} \int \vec{D} \cdot d\vec{S} \Leftrightarrow \nabla \times \vec{H} = \vec{j} + \frac{\partial \vec{D}}{\partial t} \quad (2.11.1-16)$$

Im Vakuum kann man dafür auch schreiben:

$$\oint \vec{B} \cdot d\vec{s} = \frac{1}{\epsilon_0 c_0^2} I + \frac{1}{c_0^2} \frac{d}{dt} \int \vec{E} \cdot d\vec{S} \Leftrightarrow \nabla \times \vec{B} = \frac{\vec{j}}{\epsilon_0 c_0^2} + \frac{1}{c_0^2} \frac{\partial \vec{E}}{\partial t} \quad (2.11.1-16a)$$

Die vier Maxwellschen Gleichungen stellen einen Satz von vier partiellen und gekoppelten Differentialgleichungen dar. Durch Verwendung des Vektorpotentials \vec{A} statt der magnetischen Flußdichte \vec{B} ist die zweite Maxwellsche Gleichung automatisch erfüllt. Das Induktionsgesetz (dritte Maxwellsche Gleichung) kann man durch die Forderung nach der Existenz eines skalaren Potentials Φ mit der Eigenschaft

$$\vec{E} + \frac{\partial}{\partial t} \vec{A} = \nabla \Phi$$

erfüllen. Mit den Potentialen \vec{A} und Φ werden aus dem Coulomb-Gesetz (erste Maxwellsche Gleichung) und dem Durchflutungsgesetz (Gl. 2.11.1-13) zwei gekoppelte partielle Differentialgleichungen zweiten Grades, die sich durch sogenannte Eichtransformationen entkoppeln lassen. Eine ausführliche (und daher relativ verständliche) Darstellung findet man z.B. in [Jackson 2002, S. 277-282] oder in [Greiner 2002, S. 189-197 und S. 381-385].

Energiedichte der Felder

Volumina, die von elektrischen oder magnetischen Feldern durchsetzt sind, enthalten Energie. So muß man z.B. Arbeit verrichten, um den Abstand zwischen den Platten eines geladenen Kondensators zu vergrößern oder die Induktionsspannung überwinden, um die Stromstärke durch einen Elektromagneten zu erhöhen. Die Energiedichten w = Energie / Volumen des elektrischen bzw. magnetischen Feldes sind durch Gl. 2.11.1-17 bzw. Gl. 2.11.1-18 gegeben:

$$w_{el} = \frac{1}{2} E \cdot D, \text{ im Vakuum } w_{el} = \frac{\epsilon_0}{2} E^2 \quad (2.11.1-17)$$

$$w_{\text{magn}} = \frac{1}{2} \mathbf{B} \cdot \mathbf{H}, \text{ im Vakuum } w_{\text{magn}} = \frac{1}{2\mu_0} B^2 \quad (2.11.1-18)$$

2.11.2 Elektromagnetische Wellen

In diesem Abschnitt soll die Ausbreitung elektromagnetischer Wellen kurz dargestellt werden. In einem Volumenelement ohne freie Ladungen, also z.B. im Vakuum, können außer elektrostatischen Feldern mit verschwindender Quelledichte nur elektrische Wirbelfelder auftreten, da die elektrische Ladungsdichte ρ definitionsgemäß Null ist. Daher gilt nach den Gleichungen 2.11.1-2 und 2.11.1-12:

$$\text{div } \vec{E} = \frac{\rho}{\varepsilon_0} = 0 \text{ und } \text{rot } \vec{E} = -\frac{\partial}{\partial t} \vec{B}. \quad (2.11.2-1a,b)$$

Andererseits treten in Abwesenheit eines elektrischen Leiters auch keine freien Ströme, sondern nur Verschiebungsströme auf. Mit $\vec{j} = 0$ ergibt sich nach Gleichung 2.11.1-13a für das Magnetfeld:

$$\text{rot } \vec{B} = \frac{1}{c^2} \frac{\partial}{\partial t} \vec{E} \quad (2.11.2-2)$$

Wellengleichung

Bildet man vom Induktionsgesetz (Gl. 2.11.2-1b) auf beiden Seiten die Rotation, so erhält man (die Vertauschbarkeit von $\partial/\partial t$ und rot gilt immer, da beide Operatoren linear sind):

$$\text{rot}(\text{rot } \vec{E}) = \text{rot}\left(-\frac{\partial}{\partial t} \vec{B}\right) = -\frac{\partial}{\partial t} \text{rot } \vec{B} \quad (2.11.2-3)$$

Setzt man Gleichung 2.11.2-2 in 2.11.2-3 ein, so hat man das B-Feld aus den Gleichungen eliminiert:

$$\text{rot}(\text{rot } \vec{E}) = -\frac{\partial}{\partial t} \left(\frac{1}{c^2} \frac{\partial}{\partial t} \vec{E} \right) = -\frac{1}{c^2} \frac{\partial^2}{\partial t^2} \vec{E}$$

Für $\text{rot}(\text{rot } \vec{E})$ kann man nach einem allgemeinen Satz der Vektoranalysis (z.B. [Bronstein 2001, Gl. 13.96]) mit dem Laplace-Operator $\Delta = \nabla^2$ auch schreiben:

$$\text{rot}(\text{rot } \vec{E}) = \text{grad}(\text{div } \vec{E}) - \nabla^2 \vec{E}$$

Da E nach Gleichung 2.1.2-1a divergenzfrei ist, fällt der erste Term weg, und man erhält die sogenannte Wellengleichung:

$$\left(\nabla^2 - \frac{1}{c^2} \frac{\partial^2}{\partial t^2} \right) \vec{E} = \vec{0} \quad (2.11.2-4)$$

Für das B-Feld erhält man durch Eliminierung von E aus den Gleichungen 2.11.2-1 und 2.11.2-2 die gleiche Wellengleichung. In kartesischen Koordinaten lautet sie für das E-Feld:

$$\begin{aligned} \frac{\partial^2}{\partial x^2} E_x + \frac{\partial^2}{\partial y^2} E_x + \frac{\partial^2}{\partial z^2} E_x &= \frac{1}{c^2} \frac{\partial^2}{\partial t^2} E_x \\ \frac{\partial^2}{\partial x^2} E_y + \frac{\partial^2}{\partial y^2} E_y + \frac{\partial^2}{\partial z^2} E_y &= \frac{1}{c^2} \frac{\partial^2}{\partial t^2} E_y \\ \frac{\partial^2}{\partial x^2} E_z + \frac{\partial^2}{\partial y^2} E_z + \frac{\partial^2}{\partial z^2} E_z &= \frac{1}{c^2} \frac{\partial^2}{\partial t^2} E_z \end{aligned}$$

Wenn man z.B. annimmt, daß die Welle sich in x-Richtung ausbreitet, so folgt aus der Forderung $\text{div } \vec{E} = 0$, daß die Komponente in x-Richtung, E_x , konstant ist. Elektromagnetische Raumwellen müssen transversal sein, denn bei longitudinalen Wellen treten Quelldichteschwankungen auf, was mit $\rho = 0$ unvereinbar ist.

Helmholtz-Gleichung

Die Wellengleichung läßt sich vereinfachen, wenn man monochromatische Wellen

$$\vec{E}(\vec{r}, t) = \text{Re} \left[\vec{E}(\vec{r}) e^{-i\omega t} \right] \quad (2.11.2-5)$$

($\omega = \text{const.}$) betrachtet. Dann ist $\frac{\partial^2}{\partial t^2} \vec{E}(\vec{r}, t) = -\omega^2 \vec{E}(\vec{r}, t)$. Man führt den **Wellenvektor** \vec{k} ein, der in die Ausbreitungsrichtung der Welle zeigt und für dessen Betrag gilt $|\vec{k}| = \omega c$. Setzt man das in die Wellengleichung (Gl. 2.11.2-4) ein, so erhält man die Helmholtz-Gleichung:

$$\left(\nabla^2 + \vec{k}^2 \right) \vec{E}(\vec{r}) = \vec{0} \quad (2.11.2-6)$$

Sie hängt nur noch vom Ort ab, die Zeitabhängigkeit ist eliminiert. [z.B. Meschede 1999, S. 47]

Die Beschränkung auf monochromatische Wellen stellt kein prinzipielles Problem dar: Da die Wellengleichung linear ist, ist die Summe beliebiger Lösungen der Wellengleichung auch eine Lösung der Wellengleichung (**Superpositionsprinzip**). Durch eine Fouriertransformation auf der Zeitskala läßt sich aber jede zeitliche Entwicklung des E-Feldes als eine Summe (bzw. ein Integral) monochromatischer E-Felder darstellen.

Ebene Welle

Eine mögliche Lösung von Gl. 2.11.2-4 ist z.B.

$$\vec{E} = E_0 \begin{pmatrix} 0 \\ \cos(\omega t - kx) \\ 0 \end{pmatrix} \quad \text{mit} \quad kc = \omega \quad (2.11.2-7)$$

Das ist die Gleichung einer ebenen Welle. Durch Bildung der Rotation von E erhält man für die magnetische Flußdichte:

$$-\frac{\partial}{\partial t} \vec{B} = \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ E_0 k \sin(\omega t - kx) \end{pmatrix}$$

Durch Integration über t erhält man B:

$$\vec{B} = E_0 \frac{k}{\omega} \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ \cos(\omega t - kx) \end{pmatrix} = \frac{E_0}{c} \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ \cos(\omega t - kx) \end{pmatrix} \quad (2.11.2-8)$$

Die Phasengeschwindigkeit der Welle ergibt sich aus $\omega t = kx$ zu $x/t = \omega/k = c$.

Zusammenfassend kann man über elektromagnetische Raumwellen sagen:

- 1) \vec{E} steht senkrecht auf der Ausbreitungsrichtung und senkrecht auf \vec{B} .
- 2) \vec{B} steht senkrecht auf der Ausbreitungsrichtung und senkrecht auf \vec{E} .
- 3) \vec{E} und \vec{B} schwingen phasengleich.

Energiedichte und Energiestrom

Aus der dritten Aussage folgt, daß die Energiedichte des Raumes oszilliert, denn die Energiedichten beider Felder nehmen gleichzeitig ihr Maximum bzw. Minimum an. Im Fall der ebenen Welle aus Gl. 2.11.2-5-6 ist die Energiedichte in der y-z-Ebene (und dazu parallelen Ebenen) konstant. Die Energie der ebenen Welle ist in plattenförmigen, parallelen, ebenen Bündeln konzentriert.

$$w_{el} = \frac{\epsilon_0}{2} E_0^2 \cos^2(\omega t - kx)$$

$$w_{magn} = \frac{1}{2\mu_0} \left(\frac{E_0}{c} \right)^2 \cos^2(\omega t - kx) = \frac{\epsilon_0}{2} E_0^2 \cos^2(\omega t - kx)$$

Die Energie der Welle steckt je zur Hälfte im elektrischen und im magnetischen Feld.

Maxima in der Energiedichte treten bei $\omega t - kx = n \frac{\pi}{2}$ auf, Minima bei $\omega t - kx = n \frac{\pi}{2} + \frac{\pi}{4}$.

Die Energiestromdichte S ergibt sich als Produkt der Gesamtenergiedichte mit der Phasengeschwindigkeit:

$$S = (w_{el} + w_{magn})c = c \varepsilon_0 E_0^2 \cos^2(\omega t - kx) = (E_0 \cos(\omega t - kx))(E_0 c \varepsilon_0 \cos(\omega t - kx)) = |\vec{E}| \cdot |\vec{H}|$$

Da \vec{E} und \vec{H} senkrecht aufeinander stehen und beide wiederum senkrecht auf der Ausbreitungsrichtung, kann man dafür auch vektoriell schreiben:

$$\vec{S} = \vec{E} \times \vec{H} \quad (2.11.2-9)$$

\vec{S} heißt **Poynting-Vektor**. Er beschreibt ganz allgemein, also nicht nur für ebene monochromatische Wellen, die Energiestromdichte im elektromagnetischen Feld.

2.11.3 Ausstrahlung elektromagnetischer Wellen: Nahfeld und Fernfeld

Die vier Maxwell'schen Differentialgleichungen stellen eine vollständige Beschreibung des elektromagnetischen Feldes im Vakuum dar. In dieser Betrachtungsweise ist eine Strahlungsquelle ein Randwertproblem. Die einfachste Strahlungsquelle ist ein schwingender elektrischer Dipol: Der Hertz'sche Dipol besteht aus einem Stück Draht. Man kann ihn als Schwingkreis auffassen. Die Kapazität wird durch die Enden des Drahtes dargestellt, die Induktivität durch den Draht selbst. Wird der Draht durch eine Wechselstromquelle zu Schwingungen angeregt, so fließt in ihm ein Strom. Der Strom wird von einem (primären) Magnetfeld umkreist. Er führt zu Ladungsanhäufungen an den Drahtenden und erzeugt dadurch ein (primäres) elektrisches Feld. Wie bei jedem Schwingkreis sind Strom und Spannung phasenverschoben: Der Strom durchläuft sein Extremum, wenn die Spannung ihren Nulldurchgang hat und umgekehrt.

Die Felder breiten sich nur mit einer endlichen Geschwindigkeit, der Lichtgeschwindigkeit c , in den Raum aus. Betrachtet man den Dipol zur Zeit t aus der Entfernung r , so sieht man nicht den momentanen Zustand des Dipols, sondern man beobachtet den Dipol, wie er zur Zeit $t-r/c$ vorlag (**retardierender Effekt**).

Da sich Strom und Spannung zeitlich ändern, sind auch das primäre elektrische Feld und das primäre Magnetfeld zeitlich veränderlich. Ein zeitabhängiges Magnetfeld erzeugt aber seinerseits wiederum ein sekundäres elektrisches Wirbelfeld, welches wiederum zeitabhängig ist und daher ein Magnetfeld erzeugt usw.

Im Gegensatz zum primären wirbelfreien elektrischen Feld, das die Ladungen an den Drahtenden erzeugt, sind die Feldlinien des sekundären E-Feldes in sich geschlossen. Die Feldlinien des sekundären E-Feldes haften also nicht an Ladungen, die es erzeugen. Sie lösen sich vom Dipol und entziehen ihm Energie, die in den Raum abgestrahlt wird.

Für Strahlungsquellen, deren lineare Ausdehnung d sehr viel kleiner als die Wellenlänge der Strahlung λ ist, unterscheidet man in Abhängigkeit vom Abstand r zur Strahlungsquelle drei Raumgebiete:

Nahzone:	d	\ll	r	\ll	λ
Zwischenzone	d	\ll	r	\approx	λ
Fernzone, Wellenzone	d	\ll	λ	\ll	r

Eine eher qualitative Diskussion dieses Themas findet man z.B. in [Gerthsen 1993, S. 402-408], in [Jackson 2002, S. 471-477] ist eine quantitative Beschreibung nachzulesen, hier soll nur das Ergebnis übernommen werden:

$$\vec{H}(t, \vec{r}) = \text{Re} \left[\underbrace{\left\{ \frac{ck^2}{4\pi r} e^{ikr} \overbrace{\left(\frac{\vec{r}}{r} \times \vec{p}(t) \right)}^{\perp \vec{r}} \right\}}_{\text{Fernfeld}} + \underbrace{\left\{ \frac{ick}{4\pi r^2} e^{ikr} \overbrace{\left(\frac{\vec{r}}{r} \times \vec{p}(t) \right)}^{\perp \vec{r}} \right\}}_{\text{Nahfeld}} \right] \quad (2.11.3-1)$$

$$\vec{E}(t, \vec{r}) = \text{Re} \left[\underbrace{\left\{ \frac{k^2}{4\pi\epsilon_0 r} e^{ikr} \overbrace{\left(\frac{\vec{r}}{r} \times \vec{p}(t) \right) \times \frac{\vec{r}}{r}}^{\perp \vec{r}} \right\}}_{\text{Fernfeld}} + \underbrace{\left\{ \frac{1}{4\pi\epsilon_0} e^{ikr} \left(3 \frac{\vec{r}}{r} \overbrace{\left(\frac{\vec{r}}{r} \bullet \vec{p}(t) \right)}^{\parallel \vec{r}} - \vec{p}(t) \right) \left(\frac{1}{r^3} - \frac{ik}{r^2} \right) \right\}}_{\text{Nahfeld}} \right] \quad (2.11.3-2)$$

Der schwingende Dipol (Dipolmoment $\vec{p}(t) = \vec{p}_0 \cos(\omega t) = \text{Re}[\vec{p}_0 e^{i\omega t}]$) befindet sich im Koordinatenursprung. \vec{r} ist der Ortsvektor des Beobachters, $r = |\vec{r}|$ sein Abstand vom Dipol $k = \omega/c = 2\pi/\lambda$ die Wellenzahl.

Während das H-Feld überall senkrecht auf dem Ortsvektor steht, sind in der Nahzone auch Komponenten des E-Feldes vorhanden, die in der Beobachtungsrichtung liegen.

Nahfeld

Für $kr \ll 1$ dominieren in den Gleichungen 2.11.3-1 und 2.11.3-2 die Terme mit den kleinsten Potenzen in r ; d.h. für das H-Feld r^{-2} und für das E-Feld r^{-3} , Terme mit höheren Potenzen können vernachlässigt werden. Außerdem gilt $ikr \approx 0$, d.h. der retardierende Faktor e^{ikr} kann 1 gesetzt werden. Im Nahfeld spielen retardierende Effekte keine Rolle. Für das Nahfeld gelten folgende Näherungen:

$$\vec{H} = \text{Re} \left[\frac{i\omega}{4\pi} \frac{1}{r^2} \left(\frac{\vec{r}}{r} \times \vec{p}(t) \right) \right] \quad (2.11.3-3)$$

$$\vec{E} = \text{Re} \left[\frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{1}{r^3} \left(3 \frac{\vec{r}}{r} \left(\frac{\vec{r}}{r} \bullet \vec{p}(t) \right) - \vec{p}(t) \right) \right] \quad (2.11.3-4)$$

Das Verhältnis der maximalen Energiedichten des E- und H-Feldes in der Normalebene zum Dipol beträgt $1/(kr)^2$. Wegen $kr \ll 1$ bedeutet das, daß das Nahfeld überwiegend elektrischer Natur ist [Jackson 2002, S.475]. Der Faktor $i\omega$ bewirkt die Phasenverschiebung des H-Feldes gegenüber dem Dipolmoment (und damit dem E-Feld) von 90° . Das E-Feld nach Gl. 2.11.3-4 entspricht, bis auf die Zeitabhängigkeit von $p(t)$, dem Feld eines statischen Dipols.

Der Poynting-Vektor im Nahfeld ergibt sich nach $\vec{S} = \vec{E} \times \vec{H}$ aus Gl. 2.11.3-3 und 2.11.3-4 mit $\vec{p}(t) = \vec{p}_0 \text{Re}[e^{-i\omega t}]$:

$$\begin{aligned} \vec{S} &= \frac{\omega}{16\pi^2 \epsilon_0 r^5} \cos(\omega t) \sin(\omega t) \left[3 \left(\frac{\vec{r}}{r} \bullet \vec{p}_0 \right) \frac{\vec{r}}{r} - \vec{p}_0 \right] \times \left[\frac{\vec{r}}{r} \times \vec{p}_0 \right] \\ \vec{S} &= \frac{\omega}{16\pi^2 \epsilon_0 r^5} \cos(\omega t) \sin(\omega t) \left[\left(3 \left(\frac{\vec{r}}{r} \bullet \vec{p}_0 \right)^2 - p_0^2 \right) \frac{\vec{r}}{r} - 2 \left(\frac{\vec{r}}{r} \bullet \vec{p}_0 \right)^2 \vec{p}_0 \right] \end{aligned}$$

Beträgt der Winkel zwischen dem Ortsvektor des Beobachters und dem Dipol ϑ , so kann man das Skalarprodukt $\frac{\vec{r}}{r} \bullet \vec{p}_0 = p_0 \cos \vartheta$ setzen. Damit erhält man:

$$\vec{S} = \frac{\omega p_0^2}{16\pi^2 \epsilon_0 r^5} \cos(\omega t) \sin(\omega t) \left[(3 \cos^2 \vartheta - 1) \frac{\vec{r}}{r} - 2 \cos^2 \vartheta \frac{\vec{p}_0}{p_0} \right] \quad (2.11.3-5)$$

Der Energiefluß im Nahfeld eines schwingenden Dipols nimmt mit r^{-5} viel steiler ab als im Fernfeld (r^{-2} , s.u.). Im Mittel fließt aus dem Nahfeld keine Energie ab: die Energie, die in der Viertelperiode $0 < t < \pi/(2\omega)$ in den Raum flutet, fließt in der nächsten Viertelperiode wieder in den Dipol zurück [Greiner 2002, S. 404]. Das ist auch ohne große Rechnung einleuchtend: Das E-Feld schwingt wie $\cos(\omega t)$, das H-Feld ist um 90° phasenverschoben, schwingt also wie $\sin(\omega t)$. Da Sinus und Cosinus zueinander orthogonal sind, muß ihr Produkt im Mittel über eine Periode verschwinden.

Fernfeld

Für $kr \gg 1$ dominieren in den Gleichungen 2.11.3-1 und 2.11.3-2 die Terme mit den größten Potenzen in r ; d.h. für das H-Feld und für das E-Feld r^{-1} , Terme mit kleineren Potenzen können vernachlässigt werden.

$$\vec{H} = \text{Re} \left[\frac{ck^2}{4\pi r} e^{ikr} \left(\frac{\vec{r}}{r} \times \vec{p}(t) \right) \right] \quad (2.11.3-6)$$

$$\vec{E} = \operatorname{Re} \left[\frac{k^2}{4\pi\epsilon_0 r} e^{ikr} \left(\frac{\vec{r}}{r} \times \vec{p}(t) \right) \times \frac{\vec{r}}{r} \right] = \sqrt{\frac{\mu_0}{\epsilon_0}} \vec{H} \times \frac{\vec{r}}{r} \quad (2.11.3-7)$$

Der Poynting-Vektor ergibt sich mit $\vec{p}(t) = \vec{p}_0 \operatorname{Re}[e^{-i\omega t}]$ zu

$$\begin{aligned} \vec{S} &= \left[\frac{k^2 p_0}{4\pi\epsilon_0 r} \cos(\omega t - kr) \left(\frac{\vec{r}}{r} \times \frac{\vec{p}_0}{p_0} \right) \times \frac{\vec{r}}{r} \right] \times \left[\frac{ck^2 p_0}{4\pi r} \cos(\omega t - kr) \left(\frac{\vec{r}}{r} \times \frac{\vec{p}_0}{p_0} \right) \right] \\ \vec{S} &= \frac{ck^4 p_0^2}{16\pi^2 \epsilon_0 r^2} \cos^2(\omega t - kr) \left[\left(\frac{\vec{r}}{r} \times \frac{\vec{p}_0}{p_0} \right) \times \frac{\vec{r}}{r} \right] \times \left(\frac{\vec{r}}{r} \times \frac{\vec{p}_0}{p_0} \right) \\ \vec{S} &= \frac{ck^4 p_0^2}{16\pi^2 \epsilon_0 r^2} \cos^2(\omega t - kr) \left(\frac{\vec{r}}{r} \times \frac{\vec{p}_0}{p_0} \right)^2 \frac{\vec{r}}{r} \end{aligned}$$

Bezeichnet ϑ wiederum den Beobachtungswinkel, so kann man $\left(\frac{\vec{r}}{r} \times \frac{\vec{p}_0}{p_0} \right)^2 = \sin^2 \vartheta$ schreiben:

$$\vec{S} = \frac{ck^4 p_0^2}{16\pi^2 \epsilon_0 r^2} \cos^2(\omega t - kr) \sin^2(\vartheta) \frac{\vec{r}}{r} \quad (2.11.3-8)$$

Der Poynting-Vektor des Fernfeldes weist radial von der Strahlquelle weg. In Richtung der Achse des Dipols wird keine Energie abgestrahlt, senkrecht zu ihr ist die Abstrahlung maximal. Im Gegensatz zum Nahfeld ergibt das Mittel über eine Schwingungsperiode nicht

Null. Mit $\frac{\omega}{2\pi} \int_0^{2\pi/\omega} \cos^2(\omega t) dt = \frac{1}{2}$ erhält man als zeitlichen Mittelwert der Strahlungsintensität:

$$\langle \vec{S} \rangle_t = \frac{ck^4 p_0^2}{32\pi^2 \epsilon_0 r^2} \sin^2(\vartheta) \frac{\vec{r}}{r}$$

Diese r^{-2} - Abhängigkeit der Strahlungsintensität ist auch aus dem Energieerhaltungssatz zu erwarten: Legt man um den Strahler eine Kugel mit dem Radius r , so ist die durch die Kugelfläche tretende Leistung das Produkt aus der über den Raumwinkel gemittelten Intensität und der Oberfläche der Kugel. Die Kugeloberfläche wächst mit r^2 , die Leistung muß nach dem Energiesatz konstant sein, also sinkt die Intensität mit r^2 .

Die Intensität des Dipol-Nahfeldes sinkt dagegen mit r^{-5} ; dies verletzt den Energiesatz nicht, da im Mittel keine Energie aus dem Nahfeld abgestrahlt wird. Vielmehr dient der mit r^3 wachsende Raum um den Strahler als Energiespeicher, der periodisch ge- und entladen wird.

Das Verhältnis der elektrischen Feldstärken von Nah- und Fernfeld bei $\vartheta = 90^\circ$ ergibt sich zu $(2\pi r/\lambda)^2$. Mit $\lambda = 630 \text{ nm}$ ($k = 10^7 \text{ m}^{-1}$) und $r = 50 \text{ nm}$ ist das Nahfeld demnach $4 \times$ stärker als das Fernfeld, bei $r = 10 \text{ nm}$ ist das Nahfeld $100 \times$ stärker.

2.11.4 Lichtwellenleiter

Brechungsgesetz

Tritt ein Lichtstrahl aus einem Medium mit der Brechzahl n_1 in ein Medium mit der Brechzahl n_2 , so wird er an der Grenzfläche gebrochen:

$$n_1 \sin \alpha_1 = n_2 \sin \alpha_2 \quad (2.11.4-1)$$

α_1 und α_2 geben jeweils den Winkel in Medium 1 bzw. 2 gegen die Flächennormale der Grenzfläche in dem Punkt an, an dem der Strahl auftrifft.

Neben dem gebrochenen Strahl gibt es auch einen reflektierten Strahl. Welcher Anteil reflektiert bzw. gebrochen wird, hängt vom Einfallswinkel, dem Verhältnis der Brechungsindices und von der Polarisationsrichtung des Lichtes ab (Fresnelsche Formeln z.B. [Bergmann-Schaefer 1987, S.493-502]).

Die Brechzahl des Vakuums beträgt definitionsgemäß 1. Die Brechzahl n hängt mit der Phasengeschwindigkeit c zusammen.:

$$n_1 c_1 = n_2 c_2 = c_0 \quad (2.11.4-2)$$

Die Phasengeschwindigkeit c ergibt sich aus den Maxwell-Gleichungen zu

$$c = \frac{1}{\sqrt{\mu_r \mu_0 \varepsilon_r \varepsilon_0}} = \frac{c_0}{\sqrt{\mu_r \varepsilon_r}}$$

Da μ_r für transparente Stoffe praktisch 1 ist, gilt näherungsweise

$$n \approx \frac{1}{\sqrt{\varepsilon_r}}$$

Dabei darf für ε_r allerdings nicht der elektrostatische Wert der Dielektrizitätskonstante eingesetzt werden, sondern es muß die Frequenzabhängigkeit $\varepsilon_r(\omega)$ berücksichtigt werden.

Totalreflektion

Tritt das Licht aus einem optisch dichteren Medium in ein optisch dünneres Medium, d.h. in ein Medium mit kleinerer Brechzahl, so gibt es einen Winkel α_T , ab dem das Brechungsgesetz nicht mehr erfüllt werden kann. Das ist der Fall, wenn

$$\sin \alpha_1 > \frac{n_2}{n_1} \quad (2.11.4-3)$$

Strahlen, die unter einem steileren Winkel als $\alpha_T = \arcsin(n_2/n_1)$ gegen das Lot, d.h. einem flacheren Winkel gegen die Grenzfläche einfallen, werden nicht gebrochen, sondern vollständig reflektiert.

Die Tatsache, daß sich die Welle bei der Totalreflektion im optisch dünneren Medium nicht ausbreiten kann, bedeutet nicht, daß sie nicht in dieses eindringt: Im optischen Nahfeld der Grenzfläche existiert ein **evaneszentes Feld**. Die Welle kann daher wie beim Tunneleffekt kurze Bereiche überbrücken, in denen sie klassisch „verboten“ ist. Die elektrische Feldstärke des evaneszenten Feldes klingt exponentiell ab. Die Abklingkonstante hängt von der Wellenlänge des Lichtes im dünneren Medium, dem Brechungsindex des dichteren Mediums und dem Einfallswinkel ab. [z.B. Ohtsu 2004, S.16-19]

Optische Fasern

Die einfachste Form des Lichtwellenleiters besteht aus einem zylindrischen Stab mit einem höheren Brechungsindex als der Umgebung. Der geführte Lichtstrahl wird durch Totalreflektion im Inneren des Leiters gehalten. Da Unregelmäßigkeiten wie z.B. Kratzer auf der Oberfläche des Leiters zu starken Verlusten führen, wird der Leiter (Kern) mit einem Mantel aus einem Material mit geringerem Brechungsindex umgeben. Der Mantel kann wiederum mit einem Polymer überzogen werden, um der Faser Flexibilität zu verleihen. Der aus Kern und Mantel von jeweils homogener Brechzahl bestehende Fasertyp wird als **Stufenindex-Faser** bezeichnet. Sinkt die Brechzahl dagegen stetig von der Mitte zum Rand hin ab, so liegt eine **Gradientenindex-Faser** vor. In dieser Arbeit wurden ausschließlich Stufenindex-Fasern verwendet, so daß der Gradientenindextyp hier nicht besprochen wird. Schneidet der Strahl die Faserachse, so läuft er innerhalb des Kerns zickzackförmig hin und her (Abbildung 4.11.4-1). Strahlen, die die Achse nicht schneiden, laufen auf einem Polygon spiralförmig um die Achse.

Damit der Strahl geführt wird, muß der Einfallswinkel bei der Einkopplung (Abbildung 4.11.4-4) ausreichend klein gewählt werden. Man erhält mit der Bedingung für die Totalreflektion (Gl. 2.11.4-3)

$$\sin \alpha_G = \cos \theta_c = \frac{n_2}{n_1}$$

Nach dem Brechungsgesetz erhält man bei der Einkopplung für den Akzeptanzwinkel θ_a :

$$\sin \theta_a = n_1 \sin \theta_c$$

Kombiniert man die beiden Gleichungen, so ergibt sich:

$$\sin \theta_a = n_1 \sqrt{1 - \cos^2 \theta_c} = \sqrt{n_1^2 - n_2^2} = NA \quad (2.11.4-4)$$

Der Sinus des Akzeptanzwinkels θ_a wird auch als Numerische Apertur (NA) der Faser bezeichnet. Typisch ist ein Wert $NA = 0,14$. Das heißt, nur Strahlen die innerhalb eines

Kegels von einer Öffnungshalbweite von etwa 8° in den Kern eintreten, werden geführt. Die anderen Strahlen treten in den Mantel ein und verlassen die Faser seitlich.

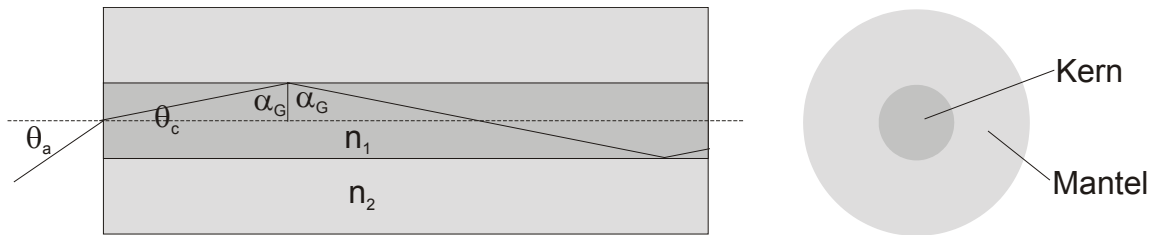


Abbildung 4.11.4-1 Strahlführung in einer Stufenindex-Faser

Die wellenoptische Beschreibung der Faser läuft auf eine Lösung der Helmholtz-Gleichung in Zylinderkoordinaten hinaus. Mit der Radialkoordinate r , dem Azimut φ und der Axialkoordinate z erhält man für den Kern (Kernradius a) mit der Brechzahl n_1 bzw. den (unendlich dick angenommenen) Mantel mit der Brechzahl n_2 :

$$\begin{aligned}
 \text{Kern} \quad & \left(\nabla^2 + \left(\omega \frac{n_1}{c_0} \right)^2 \right) \vec{E}_1(\rho, \varphi, z) = \vec{0} \quad \rho \leq a \\
 \text{Mantel} \quad & \left(\nabla^2 + \left(\omega \frac{n_2}{c_0} \right)^2 \right) \vec{E}_2(\rho, \varphi, z) = \vec{0} \quad \rho > a
 \end{aligned} \tag{2.11.4-5}$$

Als **Randbedingungen** ergeben sich aus der 2π -Symmetrie

$$\vec{E}(\rho, \varphi, z) = \vec{E}(\rho, \varphi + 2\pi, z) \tag{2.11.4-6a}$$

Aus dem Brechungsgesetz (Gl. 2.11.1-6) ergibt sich für die elektrische Feldstärke an der Grenzfläche:

$$\begin{aligned}
 n_1 E_{1,\rho}(\rho = a, \varphi, z) &= n_2 E_{2,\rho}(\rho = a, \varphi, z) \\
 E_{1,\varphi}(\rho = a, \varphi, z) &= E_{2,\varphi}(\rho = a, \varphi, z) \\
 E_{1,z}(\rho = a, \varphi, z) &= E_{2,z}(\rho = a, \varphi, z)
 \end{aligned} \tag{2.11.4-6b}$$

Die Randbedingungen führen anschaulich gesprochen dazu, daß nicht mehr alle Winkel der Strahlen gegen die Achse erlaubt sind, sondern nur noch diskrete [Gerthsen 1993, S 458]. Das entspricht den Randbedingungen in der Wellenmechanik, die zur Einführung von Quantenzahlen führen. Die Lösungen der Helmholtz-Gleichung, welche die Randbedingungen erfüllen werden **Moden** oder Eigenwellen der Faser genannt. Man unterscheidet **geführte Moden**, das sind Lösungen, die im Kern oszillieren und im Mantel exponentiell abklingen von ungeführten Moden, d.h. Lösungen, die im Mantel oszillieren und daher dem Kern Energie entziehen.

Eine andere Klassifizierung der Moden geht von deren Symmetrie bezüglich des Azimuts aus. Azimutalsymmetrische Eigenwellen (das sind Wellen mit Zylindersymmetrie) tragen die Bezeichnungen TE und TM [Jackson 2002, S.450]. **TE** steht für **transversal elektrisch**, was bedeutet, daß E_z überall Null ist. **TM** steht für **transversal magnetisch** ($B_z=0$) [Jackson 2002, S.415]. TE- und TM- Wellen entsprechen Strahlen, die die Faserachse schneiden und daher zickzackförmig hin und her laufen. Daneben gibt es sogenannte **Hybridmoden (HE , EH)**, bei denen longitudinale Komponenten sowohl im E- als auch im B- Feld auftreten ($E_z \neq 0$, $B_z \neq 0$). Hybridmoden sind nicht azimutalsymmetrisch, sondern sie variieren etwa mit $\sin(m\varphi)$ oder $\cos(m\varphi)$. Sie entsprechen Strahlen, die die Faserachse nicht schneiden sondern diese spiralg umrunden. Besonders wichtig ist der HE_{11} -Mode, da er als einzige keine **Abschneidefrequenz** besitzt, die die Leitung langer Wellen unterbindet.

Wenn der Winkel der Strahlen gegen die Faserachse nur diskrete Werte annehmen kann, andererseits der Winkel kleiner als θ_c bleiben muß, um Totalreflektion zu gewährleisten, folgt daraus, daß die Anzahl der geführten Moden endlich ist. Wie viele Moden eine **Multimode-Faser** führen kann, hängt vom sogenannten Faserparameter V [Jackson 2002, S.446] ab.

$$V = \frac{\omega}{c_0} a \sqrt{n_1^2 - n_2^2} \quad (2.11.4-7)$$

Für $V < 2,405$ ($J_0(2,405)=0$) kann die Faser nur noch den HE_{11} -Mode führen: **Monomode-Faser**. Der HE_{11} -Mode hat ein glockenförmiges Profil, das dem freien TEM_{00} -Gaußmode ähnelt [Meschede 1999, S.98]. Theoretisch kann der HE_{11} -Mode von einem beliebig dünnen Kern geführt werden. Dabei ist jedoch zu beachten, daß das evaneszente Feld um so weiter in den Mantel reicht, je dünner der Kern wird. Bei $V = 0$ reicht das evaneszente Feld unendlich weit. Da in der Praxis der Mantel nur eine endliche Dicke hat, kann der Kern nicht beliebig dünn werden.

Eine Monomode-Faser kann immer noch zwei orthogonale Polarisationszustände führen. Das führt dazu, daß selbst, wenn die Polarisationsrichtung beim Einkoppeln bekannt ist, diese am anderen Ende der Faser nicht mehr vorhersagbar ist. Durch Wahl eines elliptischen Faserquerschnitts lassen sich **polarisationserhaltende Fasern** realisieren. Um die polarisationserhaltende Eigenschaft zu nutzen, muß die Polarisationsrichtung beim Einkoppeln parallel zu einer der Hauptachsen des Faserquerschnitts liegen.

2.11.5 Nahfeld-Spitzen

Optische Nahfelder können anders als Nahfelder von Radiowellen nicht elektronisch durch Erregung einer Antenne erzeugt werden, da die sehr hohen Frequenzen ($\nu \approx 6 \times 10^{16}$ Hz) des sichtbaren Lichtes weit außerhalb der (mit Tricks) erreichbaren Schaltfrequenzen von Transistoren oder Elektronenröhren (ca. 3×10^{11} Hz) liegen und die Leitungsinduktivität und –kapazität nicht beliebig verringert werden kann.

Bringt man ein beliebiges Dielektrikum oder einen Leiter in ein optisches Strahlungsfeld, so entsteht an seiner Oberfläche ein optisches Nahfeld, denn das E-Feld der Strahlung influenziert im Dielektrikum Dipole, die mit der Anregungsfrequenz schwingen. Ist die

Ausdehnung des Dielektrikums, der „Sonde“ (engl. „Probe“), klein gegen die Wellenlänge der Strahlung, so schwingen die beeinflussten Dipole alle mit der gleichen Phase und überlagern sich zu einem mit der Anregungsfrequenz schwingenden Gesamtdipolmoment, welches sowohl ein optisches Nahfeld als auch ein Fernfeld erzeugt (Abbildung 2.11.5-1). Die Reichweite des Nahfeldes ist dabei von der Größenordnung der Sondenausdehnung [Ohtsu 2004, S. 13].

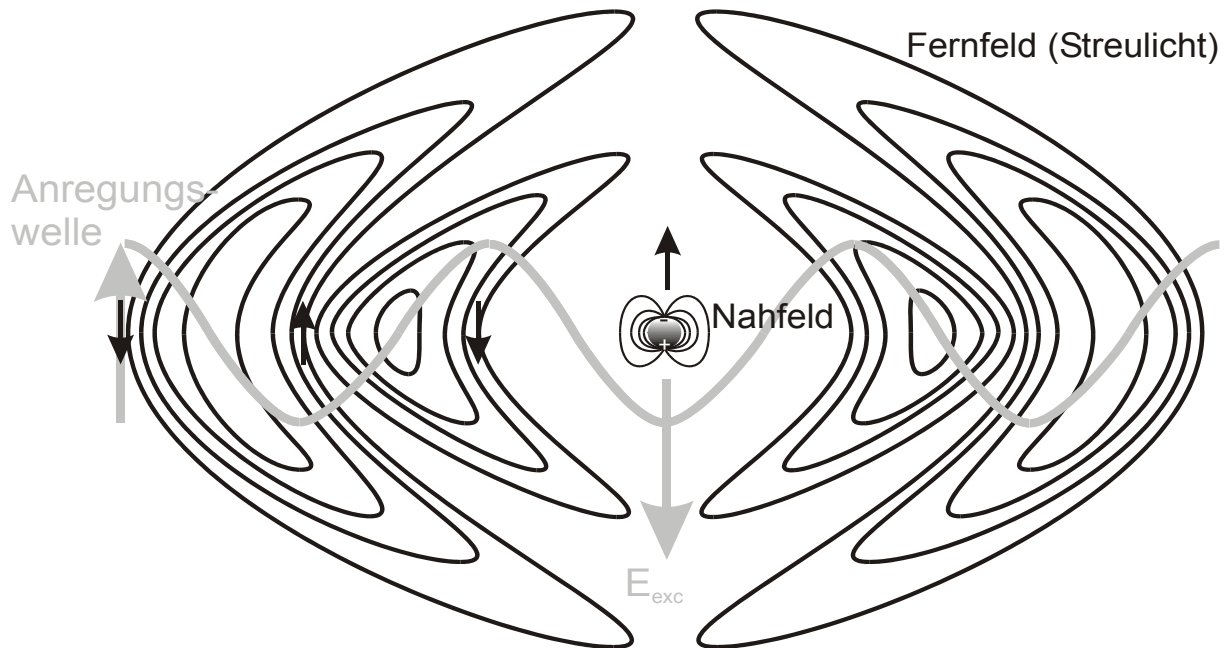


Abbildung 2.11.5-1 Lichtstreuung und Nahfeld des Streulichtes an einem Dielektrikum
Bei der Streuung tritt ein Phasensprung von π auf, da die Polarisierung des Dielektrikums der einflussierenden Feldstärke entgegen gerichtet ist

Als Sonde dienen in der Regel Spitzen aus Metall [Dickmann 1996],[Jersch 1998], die seitlich beleuchtet werden (**aperturlose Sonden**) oder (häufiger) angespitzte Glasfasern, in die das Licht vom anderen Ende eingekoppelt wird.

Die Glasfaserenden werden mit Metall (meist Aluminium) umhüllt, um zu verhindern, daß das Anregungslicht seitlich aus dem Kern ausbricht, sobald dieser zu dünn wird, um das Licht zu führen. Ließe man dies zu, so würde das Nahfeld der Spitze vom Anregungslicht überstrahlt. Die Metallhülle muß an der Spitze eine **Apertur** (d.h. ein Loch) aufweisen, denn sonst würde die eingestrahelte Leistung vollständig reflektiert. Die Apertur muß aber in jedem Fall kleiner als die Wellenlänge des Lichtes sein, sonst ist ihre Transmission zu groß. Das Anregungslicht kann, da die Apertur zu klein ist, diese nicht passieren; es bildet sich jedoch ein evaneszentes Feld aus, das aus der Apertur leckt. Das evaneszente Feld erregt die Glasspitze, welche (neben einem Fernfeld) ein optisches Nahfeld erzeugt (Abbildung 2.11.5-2). Die Ausdehnung des Nahfeldes und damit die mit der Sonde erreichbare Auflösung hängt in erster Linie vom Krümmungsradius der Spitze und nicht vom Aperturdurchmesser (solange dieser klein gegen die Wellenlänge ist) ab [Ohtsu 2004, S. 186].

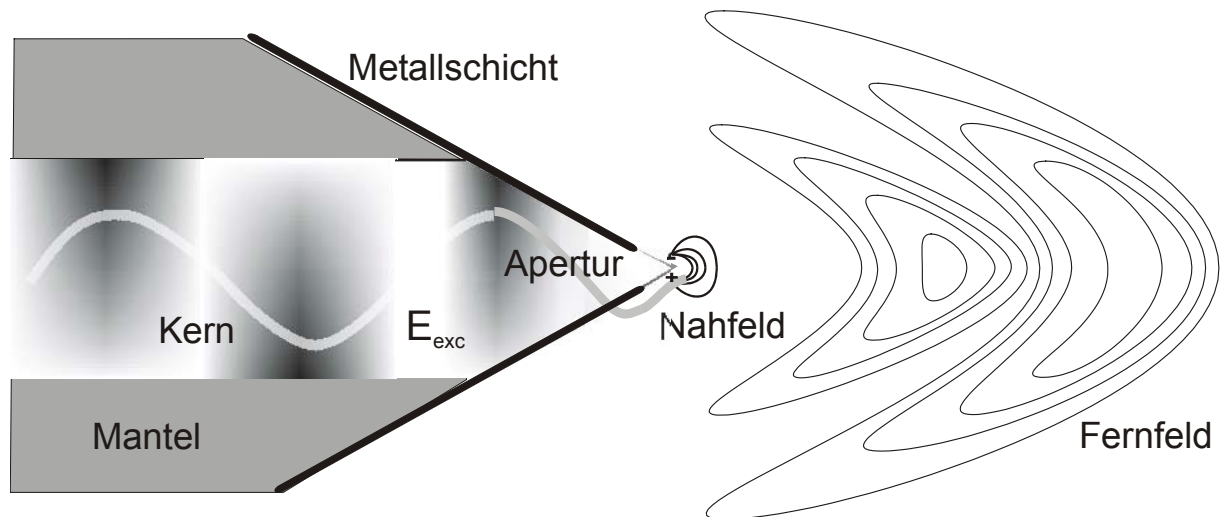


Abbildung 2.11.5-2 Nahfeld-Spitze

Das Anregungslicht kann wegen der kleinen Apertur die Faser nicht direkt verlassen. Nah- und Fernfeld entstehen durch die oszillierende Polarisation der Spitze

Da die erreichbare Auflösung allein von der Ausdehnung des Nahfeldes und damit der Spitze abhängt, spielt die Anregungswellenlänge keine Rolle. Mit einem Rasternahfeldmikroskop können daher weit höhere Auflösungen ($< 10\text{nm}$) erzielt werden als mit einem konventionellen optischen Mikroskop (ca. 300nm).

Obwohl aus dem optischen Nahfeld keine Energie in den Raum abgestrahlt wird, kann das Nahfeld beobachtet werden, wenn sich ein zweites Dielektrikum, eine Probe (engl. „Sample“), in seiner Reichweite befindet: Durch das Nahfeld der Sonde werden in der Probe oszillierende Dipole beeinflusst, die sich durch ein meßbares Fernfeld nachweisen lassen. In Anwesenheit der Strahlung sind die Nahfelder von Sonde und Probe gekoppelt. Ohne die Strahlung existieren keine Nahfelder, Sonde und Probe sind unabhängig („**mesoskopische Bedingung**“).

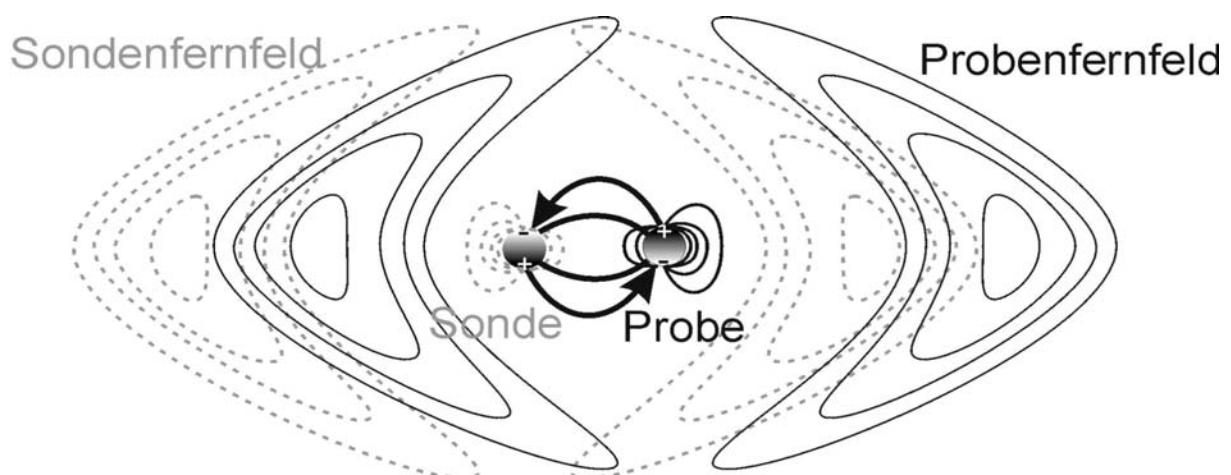


Abbildung 2.11.5-3 Mesoskopische Bedingung

Die optischen Nahfelder von Sonde und Probe sind gekoppelt. In Anwesenheit der Probe ist neben dem Sondenfernfeld ein Probenfernfeld meßbar.

2.11.6 Mikroskope und Auflösungsvermögen

Mit dem bloßen Auge kann man zwei Punkte in 25 cm Abstand, der „Bezugssehweite“ s_0 , noch getrennt wahrnehmen, wenn ihr Abstand größer als $100 \mu\text{m}$ ist. Kleinere Strukturen lassen sich auflösen, wenn das Objekt näher an das Auge gebracht wird. Da die Augenlinse aber keine beliebig kurzen Brennweiten annehmen kann, d.h. ihre Akkomodationsfähigkeit begrenzt ist, muß dann eine Sammellinse (**Lupe**) zwischen das Auge und das Objekt gebracht werden. Mit einfachen Lupen lassen sich Vergrößerungen von etwa $30\times$ erreichen, d.h. zwei Punkte im Abstand von $3 \mu\text{m}$ sind noch getrennt wahrnehmbar. Stärkere Vergrößerungen lassen sich mit zweistufigen **Mikroskopen** erreichen: Das Objektiv projiziert vom Objekt ein vergrößertes Zwischenbild, welches durch das als Lupe fungierende Okular betrachtet wird. Objektive und Okulare sind zur Korrektur von Abbildungsfehlern meist aus mehreren Linsen zusammengesetzt.

Die maximal sinnvolle Vergrößerung wird durch die Auflösung des Zwischenbildes bestimmt.

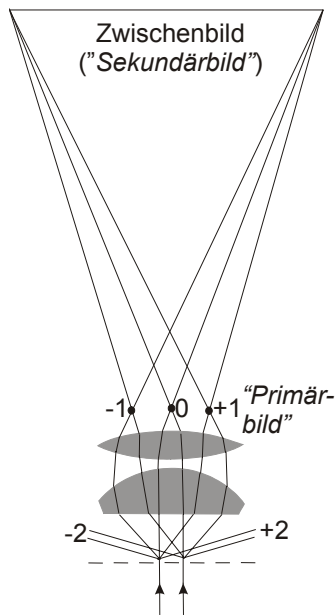


Abbildung 2.11.6-1 Bildentstehung nach Abbe

Die **Abbesche Theorie** des Mikroskops (z.B. [Bergmann-Schaefer III 1987, S. 438-445]) geht von einer punktförmigen Lichtquelle im Unendlichen aus. Eine solche Lichtquelle wird z.B. durch eine von hinten beleuchtete kleine Lochblende im Fokus einer Sammellinse oder durch einen Laserstrahl realisiert. Das Objekt wird von einer kohärenten ebenen Welle getroffen und diese wird von ihm gebeugt. In der okularseitigen Brennebene des Objektivs entsteht ein punktförmiges Bild der Lichtquelle, das als Zentralbild der Beugungserscheinung aufzufassen ist (s. Abbildung 2.6.11-1 (übernommen aus [Bergmann-Schaefer III 1987])). Diese Beugungserscheinung wird von Abbe als „Primärbild“ bezeichnet, während das reelle Zwischenbild des Objektes (in der Brennebene des Okulars) als „Sekundärbild“ bezeichnet wird. Das Zwischenbild des Objektes erscheint um so schärfer, je mehr Beugungsordnungen das „Primärbild“ enthält. Damit überhaupt eine Struktur im Zwischenbild erkennbar wird, müssen mindestens die Beugungsmaxima erster Ordnung im Primärbild enthalten sein. Der Winkel, unter dem die Beugungsmaxima erscheinen, ist um so größer, je kleiner die Struktur und je größer

die Wellenlänge im Objektraum ist. Hat das Objektiv einen Öffnungshalbwinkel α (das ist der Winkel den die vom Objektiv erfaßten Randstrahlen mit der optischen Achse einschließen), der Objektraum eine Brechzahl n und das Licht im Vakuum eine Wellenlänge λ , so sind die ersten Beugungsordnungen im Primärbild enthalten, wenn die Punkte im Objekt einen Abstand d haben für den gilt:

$$d \geq \frac{\lambda}{n \sin \alpha} \quad (2.11.6-1)$$

Die besten kommerziell verfügbaren Objektive haben eine Numerische Apertur von $n \times \sin \alpha = 1,4$. Daraus ergibt sich mit $\lambda = 500 \text{ nm}$ (grünes Licht) nach Gl. 2.11.6-1 ein Auflösungsvermögen von $0,36 \mu\text{m}$.

Helmholtz wählte einen anderen Ansatz: er untersuchte die Beugung, die die von einem selbstleuchtenden Punkt des Objektes ausgehende Welle an der kreisförmigen Eintrittsöffnung des Objektivs erfährt. Diese Beugungserscheinung im Zwischenbild wird als **Airy-Scheibchen** bezeichnet. Denkt man sich das Airy-Scheibchen ins Objekt projiziert, so ergibt sich als Intensität im Abstand d vom Zentrum des Scheibchens:

$$I(v(d)) = I_0 \left(\frac{2J_1(v)}{v} \right)^2 \quad \text{mit} \quad v = \frac{2\pi}{\lambda} n \cdot \sin(\alpha) \cdot d \quad (2.11.6-2)$$

Dabei ist n wieder der Brechungsindex im Objektraum, λ die Wellenlänge des Lichtes im Vakuum und α der Öffnungshalbwinkel des Objektivs. Gleichung 2.11.6-2 ist aus [Bradl 1995] übernommen. J_1 ist die Besselfunktion erster Ordnung und erster Gattung (z.B. [Bronstein 2001, S.527, Gl. 9.52a]). In Abbildung 4.2.1-3 ist ihr Verlauf gezeigt. J_1 oszilliert. Die erste Nullstelle von J_1 und damit das erste Minimum von Gleichung 2.11.6-2 befindet sich bei $x = 3,83171$. Das **Rayleigh-Kriterium** für die Auflösung eines optischen Instrumentes besagt, daß zwei Punkte noch getrennt wahrnehmbar sind, wenn das zentrale Maximum des einen Beugungsscheibchens in das erste Minimum des zweiten fällt. Setzt man $v = 3,83171$ in den rechten Teil von Gl. 2.11.6-2 ein und löst nach d auf, so ergibt sich, daß zwei Punkte aufgelöst werden, wenn für ihren Abstand d gilt:

$$d \geq 0,61 \frac{\lambda}{n \sin \alpha} \quad (2.11.6-3)$$

Diese Gleichung stimmt bis auf den konstanten Faktor 0,61 mit Gleichung 2.11.6-1 überein. Die Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse beruht darauf, daß Abbe von kohärenter Anregung ausgeht, die Beugungsscheibchen also miteinander interferieren. Helmholtz geht dagegen von inkohärenter Anregung aus, so daß die Intensität der beiden Beugungsscheibchen einfach addiert wird.

Man erreicht schärfere Abbildungen, wenn man nicht mit einem kollimierten (d.h. parallelen) Lichtstrahl anregt, sondern das Anregungslicht in der Objektebene fokussiert. Diesen Aufbau bezeichnet man als **konfokales Mikroskop**. Bei konfokaler Beleuchtung muß man im Vergleich zur Weitfeldbeleuchtung die Formeln für den Intensitätsverlauf quadrieren, was auch intuitiv zu erwarten ist, denn das beleuchtende Objektiv hat bei dem in der Mitte von Abbildung 2.11.6-2 gezeigten symmetrischen Aufbau die gleiche Punktbildfunktion wie das abbildende. Bei konfokaler Beleuchtung erhält man demnach folgende laterale Intensitätsverteilung:

$$I(v(d)) = I_0 \left(\frac{2J_1(v)}{v} \right)^4 \quad \text{mit} \quad v = \frac{2\pi}{\lambda} n \cdot \sin(\alpha) \cdot d \quad (2.11.6-4)$$

Das Bild wird durch die Quadrierung der Intensitätsverteilung etwas schärfer, obwohl sich die Nullstelle, also das Intensitätsminimum natürlich nicht verschiebt. Der Hauptvorteil der konfokalen Beleuchtung liegt darin, daß die Tiefenschärfe wesentlich geringer ist, so daß

man einzelne Ebenen des Objekts abbilden kann. Für die axiale Intensitätsverteilung [Bradl 1995, S. 23] erhält man im Fall der Weitfeldbeleuchtung:

$$I(u) = I_0 \left(\frac{\sin(u)}{u} \right)^2 \quad \text{mit} \quad u = \frac{z}{4} \frac{2\pi}{\lambda} n \sin^2(\alpha) \quad (2.11.6-5)$$

und für die konfokale Beleuchtung:

$$I(u) = I_0 \left(\frac{\sin(u)}{u} \right)^4 \quad \text{mit} \quad u = \frac{z}{4} \frac{2\pi}{\lambda} n \sin^2(\alpha) \quad (2.11.6-6)$$

Für ein **Nahfeldmikroskop** gelten diese Beschränkungen bezüglich der erreichbaren Auflösung nicht. Die elektrische Feldstärke des Nahfeldes fällt mit r^{-3} ab, die Intensität des von der Probe abgestrahlten Feldes ist dem Quadrat der elektrischen Feldstärke des Anregungsfeldes proportional, sinkt also mit r^{-6} sehr steil und wellenlängenunabhängig. Bestimmend für das Auflösungsvermögen eines Nahfeldmikroskops ist die Ausdehnung der Sonde. Im rechten Teil von Abbildung 2.11.6-2 ist zum Vergleich mit den Fernfeldmikroskopen (mit 1,4 NA- Objektiven und $\lambda = 630 \text{ nm}$) die Auflösung eines Nahfeldmikroskops mit einer 10 nm- Sonde gegenübergestellt:

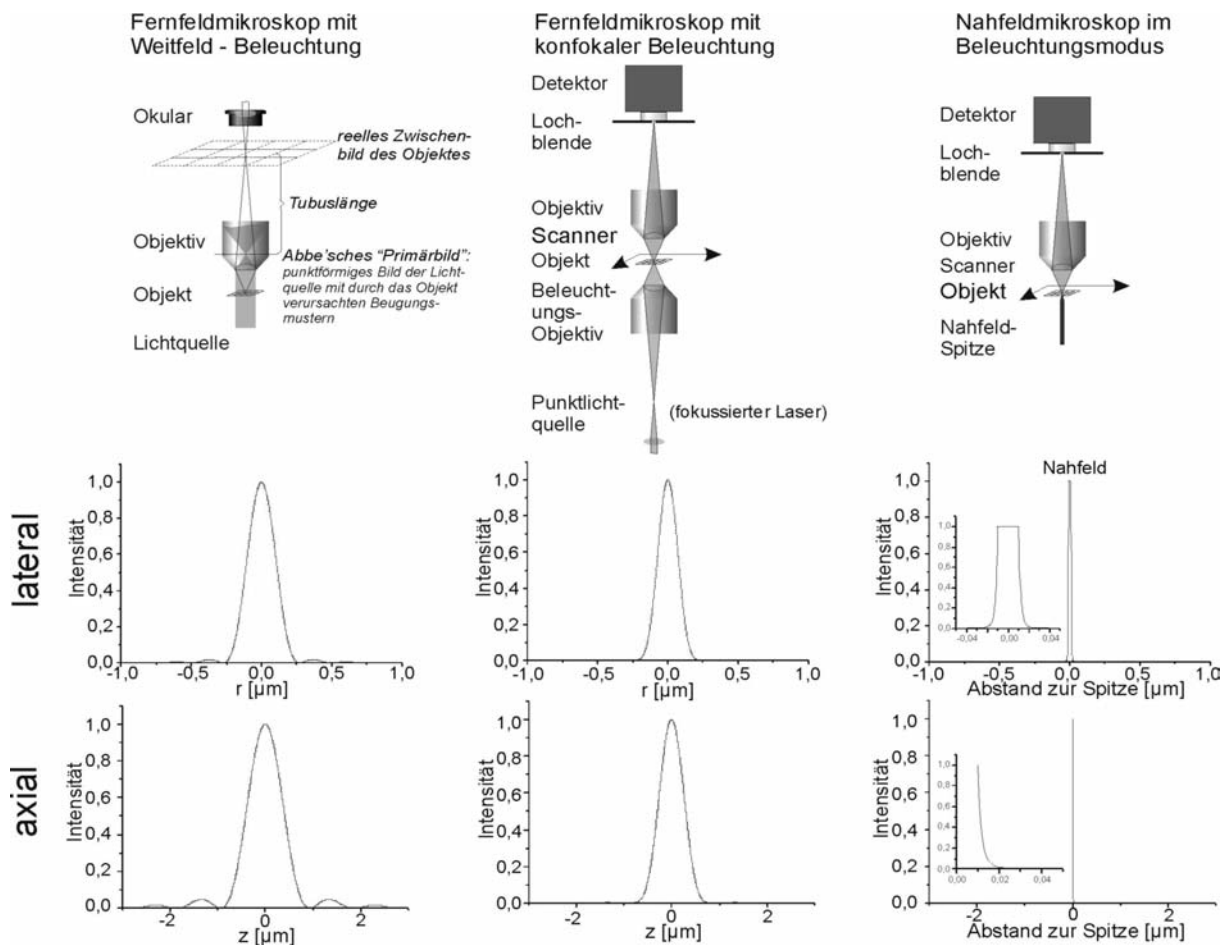


Abbildung 2.11.6-2 Strahlengang und Auflösungsvermögen von verschiedenen Mikroskopsystemen.

3. Material und Methoden

3.1 Sequenzierapparat

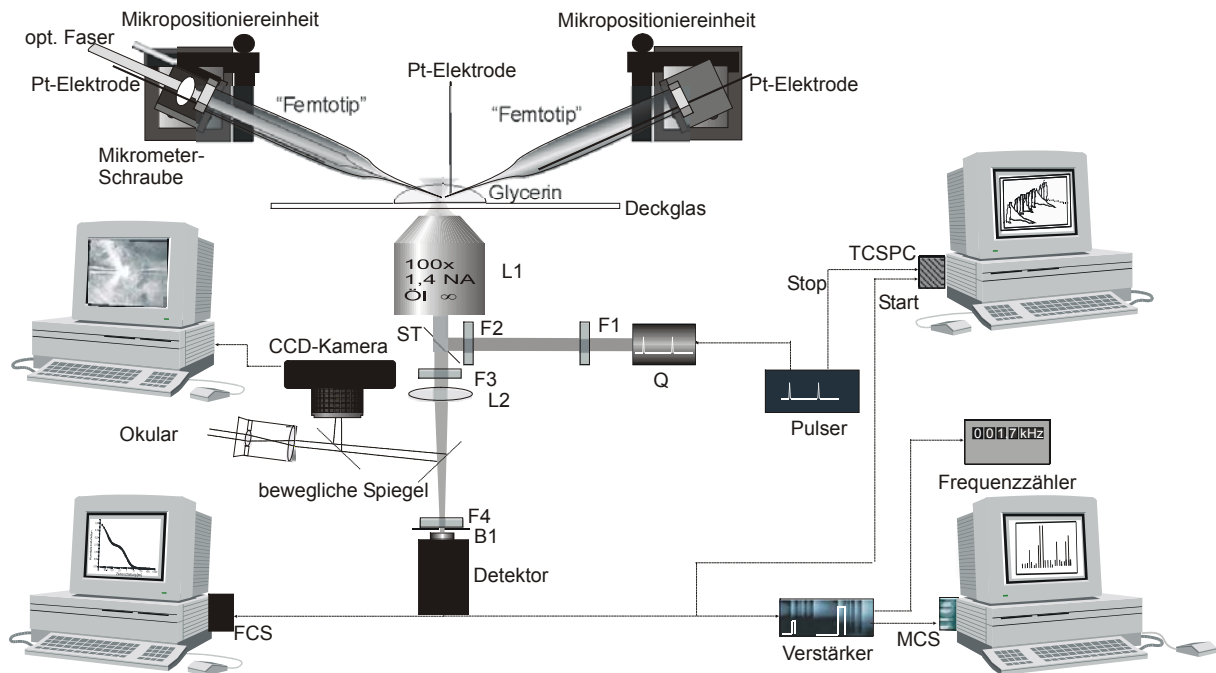


Abbildung 3.1-1 Aufbau der Sequenzierapparat

Der Diodenlaser Q erzeugt einen kollimierten Strahl, von elliptischem Querschnitt mit 2 mm und 4 mm Achsenlänge. Die Laserstrahlung ist stark polarisiert. Über den Polfilter F1 wird die Anregungsleistung geregelt. Der Anregungsfilter F2 hat die Aufgabe, das breite Frequenzspektrum des Diodenlasers soweit einzuengen, daß das Laserlicht effektiv spektral gegenüber dem Fluoreszenzlicht diskriminiert werden kann. Der dichroitische Strahlteiler ST wirkt für Licht der Emissionswellenlänge des Lasers reflektiv. Das Objektiv L1 fokussiert das Anregungslicht im objektseitigen Brennpunkt und regt die Probe zur Fluoreszenz an. Das selbe Objektiv sammelt auch das Fluoreszenzlicht. Das Detektionsvolumen hat eine Größe von einigen fl bei einer Länge von etwa 5 μm und einem Durchmesser von etwa 1 μm . Das aus dem Detektionsvolumen reemittierte Licht besteht aus reflektiertem und gestreutem Laserlicht, der Raman-Streuung des Lösungsmittels und dem Fluoreszenzlicht eventuell vorhandener Farbstoffmoleküle. Das Fluoreszenzlicht ist gegenüber dem Laser rotverschoben und kann den Strahlteiler ST passieren. Die Emissionsfilter F3 und F4 absorbieren reflektiertes Laserlicht und Raman-Licht. Die im Mikroskop eingebaute Tubuslinse L2 fokussiert das Fluoreszenzlicht in die Öffnung der Lochblende B₁, die sich unmittelbar vor der aktiven Fläche (ca. 200 μm x 200 μm Ausdehnung) der Einzelphotonenlawinendiode (SPAD) (= Detektor) befindet.

Die Laserdiode wird von einem elektronischen Pulser angesteuert, der sie bei einer Wiederholungsrate von 64 MHz zu Pulsen von weniger als 400 ps (Halbwertsbreite) Dauer anregt. Der Pulser liefert dabei gleichzeitig das Startsignal für den Time-to-Amplitude-Converter (TAC), der auf der Time-correlated-single-photon-counting- Karte (TCSPC)

integriert ist. Das Ausgangssignal der SPAD wird zunächst verzweigt, und einer der Zweige dem TAC als Stoppsignal zugeführt. Der andere Zweig wird vor einer erneuten Verzweigung verstärkt. Einer der Zweige führt zu einem Frequenzzähler, während der andere zu einer Multi-Channel-Scaler (MCS) - Karte führt. TCSPC- und MCS- Karte werden je von einem Computer ausgelesen. Alternativ zur TCSPC-Karte kann eine Korrelatorkarte (FCS) angeschlossen werden.

Im Mikroskop sind zwei verschiebbare Spiegel eingebaut, die es erlauben, den Strahl anderen Ausgängen zuzuführen. An einem Ausgang befindet sich ein Okular, an einem weiteren eine CCD-Kamera.

Die Mikrokapillaren (Femtotips) müssen sehr genau justierbar sein. Dies wird durch Verwendung zweier elektronisch ansteuerbarer Mikropositioniereinheiten erreicht. Die optische Faser im linken Femtotip dient zum Binden der DNS. Sie ist mit etwas Knetmasse an einer Mikrometerschraube fixiert. Mit der Mikrometerschraube kann die Faser im Femtotip verschoben werden

3.1.1 Komponenten

Mikroskopsystem: Axiovert 100 TV (Zeiss)

Q: gepulster Diodenlaser (Emissionswellenlänge 638 nm) (Picoquant)

F1: Folienpolfilter 03FPG03 (Melles Griot)

F2: Anregungsfilter 639DF9 (Omega Optics)

ST: Strahlteiler 645DRLP (Omega Optics)

L1: Mikroskopobjektiv 100×, 1,4 NA Ölimmersion (Olympus)

L2: Tubuslinse $f = 160$ mm des Mikroskops (Zeiss)

F3: Emissionsfilter 675RDF50 (Omega Optics)

F4: Emissionsfilter 680HQ65 (AF Analysetechnik)

B1: Lochblende 100 μ m (Owis)

Detektor: Einzelphotonenlawinendiode SPAD AQ-131 (Laser Components)

Kamera: CCD-Kamera Imager 3 (La Vision)

Mikropositioniereinheiten: dreiachsige elektrostriktive Positioniereinheit mit 20 nm Auflösung
ESA-CXA (Newport)

Kapillaren: Femtotip I (Eppendorf)

Glasfaser: SMCA0630B, (Laser Components)

Glycerin: Glycerin „für die Molekularbiologie“ (Fluka)

Deckglas: Deckglas (#1) 26 mm \times 76 mm \times 0,13 mm (Menzel)

Immersionöl: $n = 1,51$

Elektroden: Platindraht mit Durchmesser 0,65 mm

Pulser: PDL800 (Picoquant)

Verstärker: Stanford-Uhr

TCSPC-Karte: SPC-430 (Becker&Hickl)

FCS-Karte: ALV 5000 (ALV)

MCS-Karte: Eigenkonstruktion von D.S. Ko [Ko1997^{2,3}]

3.2 Nahfeldmikroskop

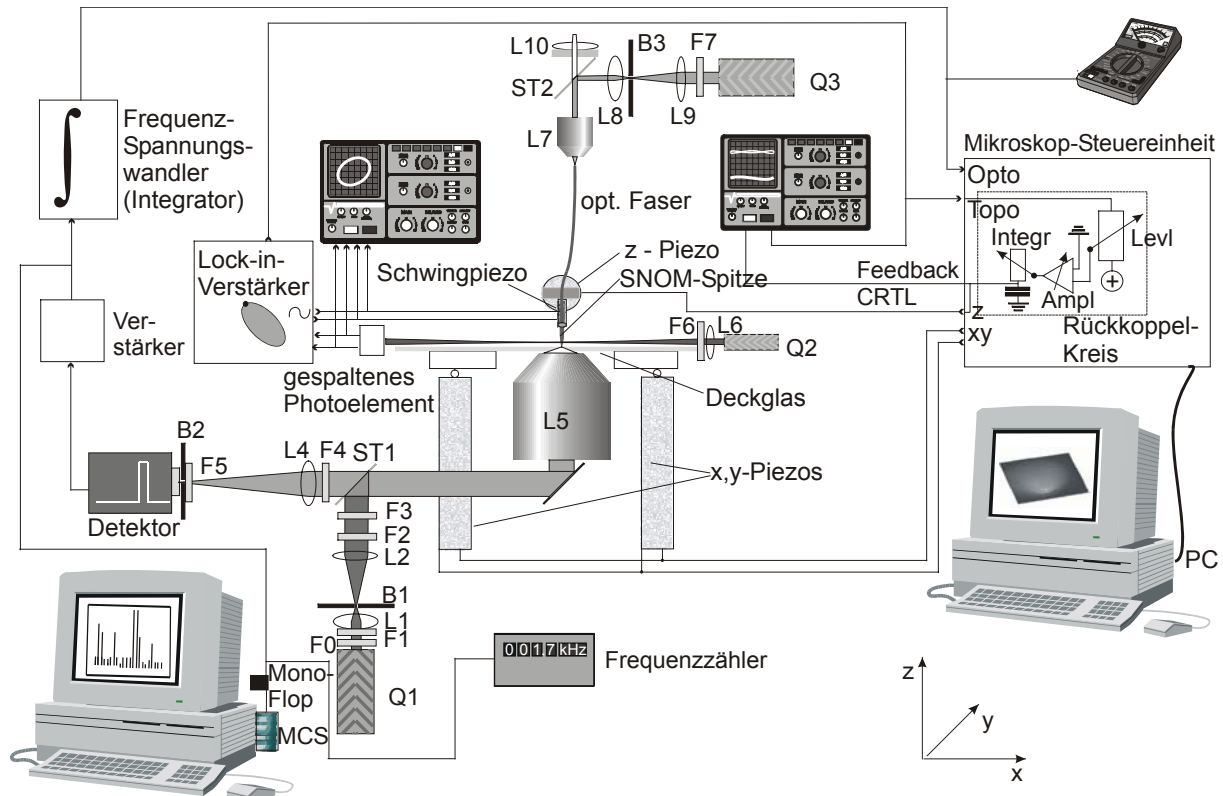


Abbildung 3.2-1 Aufbau des Nahfeldmikroskops

Nahfeld-Anregung

Der Diodenlaser Q3 (der konfokale Laser Q1 ist abgeschaltet) erzeugt einen kollimierten Strahl von elliptischem Querschnitt mit etwa 3 mm und 4 mm Achsenlänge. Der Nahfeld-Anregungsfilter F7 hat die Aufgabe, das breite Frequenzspektrum des Diodenlasers soweit einzuengen, daß das Laserlicht effektiv spektral gegenüber dem Fluoreszenzlicht diskriminiert werden kann. Die Linse L9 fokussiert den Laser auf die Lochblende B3. Die Linse L8 kollimiert das von B3 kommende Licht zu einem Strahl mit kreisförmigem Querschnitt und ca. 0,5 mm Durchmesser. Der dichroitische Strahlteiler ST2 wirkt für Licht der Emissionswellenlänge des Lasers reflektiv. Das Objektiv L7 koppelt das Anregungslicht in die optische Faser ein. Die Tubuslinse L10 entwirft ein Bild vom Faserende (nicht eingezeichnet). Bringt man den Detektor in den Brennpunkt von L10, sind Messungen im „collection Mode“ und im „shared Aperture Mode“ möglich. Außerdem ist dieses Bild sehr hilfreich bei der Grobjustage. Die Stirnfläche am Faserende muß absolut eben sein und senkrecht zur Faserachse stehen, um den Laser effektiv einkoppeln zu können. Hierzu wird die PMMA-Hülle am Faserende mit Dichlormethan entfernt und die Glasfaser mit einer Diamantklinge angeritzt. Durch mechanischen Zug reißt die Faser an der geritzten Stelle. Mit etwas Übung gelingt es, gerade Bruchkanten (Überprüfung unter dem Mikroskop bei 100× Vergrößerung) zu erhalten.

Am anderen Ende der Faser befindet sich die Nahfeld-Spitze. Das Anregungslicht kann die Spitze nicht einfach verlassen, da sie verspiegelt ist. Das evaneszent aus der Apertur

tretende Licht regt jedoch die Spitze an, um die sich (neben einem schwachen Fernfeld) ein optisches Nahfeld ausbildet.

Befinden sich Fluorophore im Nahfeld der Spitze, so entziehen sie ihr Energie und werden angeregt. Das emittierte Fluoreszenzlicht wird vom Objektiv L5 gesammelt und von einem Spiegel umgelenkt. Es passiert den dichroitischen Strahlteiler ST1, wird durch die Emissionsfilter F4 und F5 spektral vom Anregungslicht und der Raman-Streuung befreit und von der Tubuslinse L4 in die Öffnung der Lochblende B2 fokussiert. Hinter B2 befindet sich die 200 μm \times 200 μm große aktive Fläche der Einzelphotonenlawinendiode (SPAD).

Konfokale Anregung

Bei der konfokalen Anregung ist der Laser Q3 abgeschaltet. Q1 emittiert einen Strahl von kreisförmigem Querschnitt mit ca. 3 mm Durchmesser. Er wird durch das aus L1 und L2 bestehende Teleskop auf 6 mm Durchmesser aufgeweitet und durch B1 räumlich gefiltert. Wegen des hohen Untergrundes werden drei Anregungsfilter F1, F2 und F3 eingesetzt. Der dichroitische Strahlteiler ST1 reflektiert das Anregungslicht. Es wird von einem Spiegel in das Objektiv L3 gelenkt. Das Fluoreszenzlicht eventuell im Brennpunkt vorhandener Fluorophore wird von L3 gesammelt und über den Spiegel auf den Strahlteiler ST1 gelenkt. Für das gegenüber dem Anregungslicht rotverschobene Fluoreszenzlicht ist ST1 durchlässig. Das Fluoreszenzlicht passiert die Emissionsfilter F4 und F5 und wird von der Tubuslinse L4 in die Öffnung der Lochblende B2 fokussiert.

Verarbeitung des Detektorsignals

Die Einzelphotonenlawinendiode (SPAD) gibt TTL-Pulse ab. Diese werden zunächst verstärkt und anschließend auf drei Ausgänge verzweigt.

Der erste Ausgang wird einem Frequenz-Spannungswandler zugeführt, welcher das Signal für den optischen Informationskanal des Mikroskops liefert.

Der zweite Ausgang wird einer MCS-Karte zugeführt. Zuvor müssen die TTL-Pulse jedoch mit einem „Monoflop“ verbreitert werden.

Der dritte Ausgang wird mit einem Frequenzzähler verbunden.

Die MCS-Karte ist für die Justage der Anlage notwendig. Während der eigentlichen Messung wird sie nicht gebraucht.

Mechanischer Regelkreis

Die x,y- Piezos sind piezokeramische Röhre von ca. 1 cm Durchmesser und 6 cm Länge. Sie sind mit 4 Kontaktflächen versehen. Am unteren Ende sind die Röhren mit dem Mikroskop verbunden, auf dem oberen Ende liegt der Probenenträger. Durch Anlegen von einigen hundert Volt Spannung an die Kontaktflächen der Piezos verbiegen sich die Röhren und bewegen so die Probe seitlich im μm -Bereich.

Der z-Piezo hat die gleichen Abmessungen wie die x,y –Piezos, verfügt aber nur über zwei Kontaktflächen. Das hintere Ende des z-Piezos ist mit dem Mikroskop verbunden. Am

vorderen Ende ist der Schwingpiezo mit der Nahfeld-Spitze befestigt. Der z-Piezo verbiegt sich, wenn Spannung an seine Kontakte gelegt wird und bewegt so die Nahfeld-Spitze vertikal um einige μm . Der Schwingpiezo ist ein Piezoröhrchen von 1 mm Durchmesser und 9 mm Länge mit 2 Kontakten. Er wird im Gegensatz zum z-Piezo mit nur einigen hundert mV Wechselfspannung angesteuert und versetzt dadurch die Nahfeld-Spitze zu Schwingungen von einigen Zehntel nm Amplitude in y-Richtung.

Die Nahfeld-Spitze befindet sich knapp hinter dem Brennpunkt des Linsensystems L6 (in der Abbildung als Einzellinse gezeichnet). Die Nahfeld-Spitze wirft einen Schatten auf die gespaltene Photodiode, die vom Infrarotlaser Q2 beleuchtet wird. Dadurch daß die Nahfeld-Spitze sich in geringem Abstand vom Brennpunkt von L6 befindet, wird die Spitze und ihre Schwingung beim Schattenwurf stark vergrößert. Vor L6 befindet sich ein optischer Kantenfilter, der verhindert, daß an der Faser gestreutes Infrarotlicht die SPAD erreicht. Die gespaltene Photodiode gibt eine Wechselfspannung im mV-Bereich ab. Mit einem Oszilloskop wird über die Lissajous-Figur die Resonanzfrequenz der frei schwingenden Spitze aufgesucht. Die von der Photodiode abgegebene Spannung wird einem Lock-in-Verstärker zugeführt. Im Lock-in-Verstärker ist auch der Frequenzgenerator zum Ansteuern des Schwingpiezos integriert. Über einen Phasenschieber wird der Lock-in-Verstärker so eingestellt, daß er maximale Ausgangsspannung liefert. Anschließend wird die Spannung, welche den Schwingpiezo ansteuert soweit reduziert, daß das Ausgangssignal am Lock-in-Verstärker etwa 800 mV beträgt.

Die Probe wird (zusammen mit dem Objektiv L5) mit einer Mikrometerschraube vorsichtig nach oben gefahren. Der Ausgang des Lock-in-Verstärkers und der „Feedback-Control“ (s.u.) werden dabei auf dem Oszilloskop beobachtet. Sobald die Nahfeld-Spitze die Oberfläche der Probe berührt, wird die Schwingung der Spitze gedämpft und ihre Resonanzfrequenz erhöht sich durch sogenannte Scherkräfte („Shear Forces“). Das führt zu einem Rückgang der Spannung am Lock-in-Verstärker. Über den Regelkreis wird der z-Piezo so nachgeführt, daß eine bestimmte Spannung am Ausgang des Lock-in-Verstärkers und damit eine bestimmte Schwingungsamplitude der Spitze erhalten bleibt.

Der Ausgang des Lock-in-Verstärkers wird dem topographischen Informationskanal der Mikroskopelektronik zugeführt. An der Mikroskopelektronik befinden sich drei Regler.

Der erste („Level“) legt den Arbeitspunkt fest. Das heißt, diejenige Spannung am Ausgang des Lock-in-Verstärkers, die der Regelkreis aufrechtzuerhalten sucht. Der Arbeitspunkt wird auf etwa 80 % der Amplitude der freien Schwingung, also ca. 600-700 mV, eingestellt.

Der zweite („Amplification“) legt die Empfindlichkeit des Regelkreises fest, diese sollte möglichst hoch eingestellt werden.

Der dritte („ $t_{\text{Integration}}$ “) legt die Trägheit des Regelkreises fest.

Neben dem Hochspannungsausgang für den z-Piezo verfügt die Steuereinheit über einen Ausgang „Feedback-Control“, der eine Spannung zwischen -10 V und +10 V abgibt. -10 V entsprechen dabei der niedrigsten erreichbaren Position des z-Piezos, +10 V der höchsten. Durch Veränderungen an den drei oben erläuterten Reglern wird das Mikroskop nun so eingestellt, daß der z-Piezo keine Schwingungen zeigt, wobei die Empfindlichkeit möglichst groß und die Trägheit des Regelkreises möglichst klein gewählt werden.

Über eine Schnittstellenkarte ist die Steuerelektronik des Mikroskops mit einem Computer verbunden, der die gemessenen Daten in als Bilder darstellt und als .tif- Dateien speichert.

3.2.1 Komponenten

B1: Lochblende 10 μm Durchmesser (Owis)
 B2: Lochblende 100 μm Durchmesser
 B3: Lochblende mit 20 μm Durchmesser (Owis)
 Detektor: SPAD PQ131 (EG&G)
 F0: Graufilter OD1 (Spindler&Hoyer)
 F1: 630DF10 (Omega Optics)
 F2: 03Fil018 (Melles Griot)
 F3: 633NB3 (AF Analysetechnik)
 F4=F5: 675DF50 (Omega Optics)
 F6: Kantenfilter RG850
 F7: 630DF10 (Omega Optics)
 Faser: SMC-A0630B (Laser Components)
 L1: Bikonvexlinse $f = 20$ mm (Spindler&Hoyer)
 L2: Bikonvexlinse $f = 40$ mm (Spindler&Hoyer)
 L5: Ölimmersionsobjektiv 100 \times (bei 160 mm Tubuslänge) NA= 1,45 (Nikon)
 L4: Plankonvexlinse $f = 150$ mm (Spindler&Hoyer)
 L6: Objektiv ca. 20 \times (russisches Fabrikat)
 L7: Objektiv (10 \times , 0,25 NA) (Edmund)
 L8: Bikonvexlinse $f = 100$ mm (Spindler&Hoyer)
 L9: Bikonvexlinse $f = 10$ mm. (Spindler&Hoyer)
 L10: Plankonvexlinse $f = 150$ mm (Spindler&Hoyer)
 Q1: (Fernfeld-) Diodenlaser TP-APM/01-6195 $\lambda_{\text{em}} = 632$ nm (Power Tech)
 Q2: Infrarot-Diodenlaser $\lambda_{\text{em}} = 800$ nm (Hitachi)
 Q3: (Nahfeld-) Diodenlaser APM08/1749 (Power Tech)
 ST1: 645DRLP (Omega Optics)
 ST2: 645DRLPO2 (Omega Optics)
 Verstärker: Ortec 584 (EG&G)
 Frequenz-Spannungs-Wandler: Eigenbau (s. Kapitel 4.7.2)
 MCS-Karte: Konstruktion von C. Zander
 Das Mikroskopsystem, die Steuerelektronik des Mikroskops, die Schnittstellenkarte zur Übertragung der Daten auf einen PC und das Steuerprogramm für das Mikroskop sind Entwicklungen des AK Letokhov.

3.2.2 Nahfeld-Spitzen

Der AK Letokhov stellte mir freundlicherweise einige Spitzen zur Verfügung; da bei der Arbeit jedoch die Spitzen relativ häufig abbrechen, wurden jedoch auch selbst hergestellte Spitzen verwendet.

Die optischen Fasern werden mit Flußsäure zu Spitzen geätzt und anschließend verspiegelt. Zum Ätzen der Spitzen sind in der Literatur verschiedene Methoden beschrieben.

Bei der ältesten Methode [Turner 1984] wird die Glasfaser von der PMMA-Hülle (z.B. mit Dichlormethan) befreit. Die Faser taucht in 40 % Flußsäure, über der sich ein leichtes, mit der Flußsäure nicht mischbares organisches Lösungsmittel befindet. In dieser Arbeit wurde

das Verfahren unter anderem mit Toluol, Dekalin, Immersionsöl und Cyclohexanol erprobt. Die erhaltenen Spitzen weisen eine sehr rauhe Oberfläche auf und liefern (nachdem sie verspiegelt wurden) im Nahfeldmikroskop unbefriedigende Ergebnisse.

Im AK Letokhov [Lapshin 1998] werden die Fasern zunächst von der PMMA-Hülle befreit. Das Faserende wird mit einem Tropfen Kolophonium versiegelt. Die Faser wird in 40 % Flußsäure getaucht. Sobald die Faser durchgeätzt ist, was man daran erkennt, daß der Kolophoniumtropfen oben schwimmt, wird die Spitze aus der Säure gezogen und mit destilliertem Wasser abgespült. Die erhaltenen Spitzen laufen vorne konisch zu; sie ähneln einem gespitzten Bleistift.

Die dritte Methode ätzt die Fasern in ihrer PMMA-Hülle: die Faser wird mitsamt ihrer Hülle in 40 % HF bei 60°C getaucht. 35 Minuten nach dem Eintauchen werden die Fasern aus der Säure gezogen, das PMMA entfernt und die Spitzen abgespült [Lambelet 1998]. Taucht man die Fasern etwa 12 h– 24 h ein, so muß man die Flußsäure nicht erwärmen.

Die so erhaltenen Spitzen weisen eine sehr glatte Oberfläche auf, sie sind nicht kegelförmig, sondern ihre Seitenwände sind nach außen gewölbt. Der Längsschnitt durch die Spitzen ähnelt dem Bogen eines gotischen Kirchenfensters.

Alternativ können die Spitzen auch mit einem „Puller“ genannten Gerät wie Kapillaren gezogen werden. Dadurch erhält man sehr langgezogene Spitzen mit extrem glatten Oberflächen, die allerdings nur eine geringe Transmission aufweisen [Valaskovic 1995].

Die Spitzen müssen anschließend verspiegelt werden. In Arbeitskreisen, die sich auf Nahfeldmikroskopie spezialisiert haben geschieht dies dadurch, daß die Spitzen in einer Vakuumapparatur mit Aluminium bedampft werden. Dabei werden die Spitzen gedreht um überall eine gleich dicke Metallschicht aufzubringen.

Hier stand keine Bedampfungsapparatur zur Verfügung. Daher wurden die geätzten Spitzen in eine Mischung aus gesättigtem Diamminsilberhydroxid (Tollens-Reagenz) und Glucose getaucht und durch gelindes Erwärmen ein Silberspiegel auf der Spitze abgeschieden.

Das Tollens-Reagenz wird folgendermaßen hergestellt:

Zu einer Lösung von Silbernitrat wurden einige Tropfen konzentrierter Natronlauge gegeben. Der entstehende Niederschlag von Silberoxid wird zentrifugiert und mehrfach mit destilliertem Wasser gewaschen. Dem Niederschlag wird soviel konzentriertes (25 %) Ammoniakwasser zugesetzt, daß sich fast alles löst. Die Lösung wird zentrifugiert dekantiert und bis zu ihrem Einsatz bei –20°C gelagert. Da sich durch Lagerung an der Luft aus dem Tollens-Reagenz explosives, stoßempfindliches Silberfulminat bilden kann, werden nur geringe Mengen (ca. 500 µl) davon hergestellt, um eine längere Lagerung zu vermeiden.

Die Auflösung von Nahfeld-Bildern, die mit den versilberten Spitzen aufgenommen wurden, war nicht schlechter, als die mit den vom AK Lethokov zur Verfügung gestellten aluminiumbedampften Spitzen.

Wahrscheinlich sind bei der hier verwendeten Apparatur die Spitzen nicht der limitierende Faktor.

Die Apertur in der Spitze entsteht bei der Benutzung im Nahfeldmikroskop beim ersten Kontakt mit der Oberfläche von selbst.

3.3 Fluoreszenzfarbstoffe

3.3.1 Strukturen

Im dieser Arbeit wurden die Oxazinfarbstoffe MR121 und JA242, die Rhodaminfarbstoffe JF9 und JA133 sowie der Cyaninfarbstoff Cy5 eingesetzt. Cy5-dCTP ist kommerziell von der Firma Amersham Life Science erhältlich; die übrigen Farbstoffe wurden vom AK Drexhage in Siegen synthetisiert. Die freien Farbstoffe tragen eine Carboxylgruppe. Aus den Carbonsäuren werden mit Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und N-hydroxysuccinimid sogenannte NHS-Ester hergestellt. Diese lassen sich dann selektiv mit primären Aminen zu den gezeigten Amiden koppeln [Lieberwirth 1998].

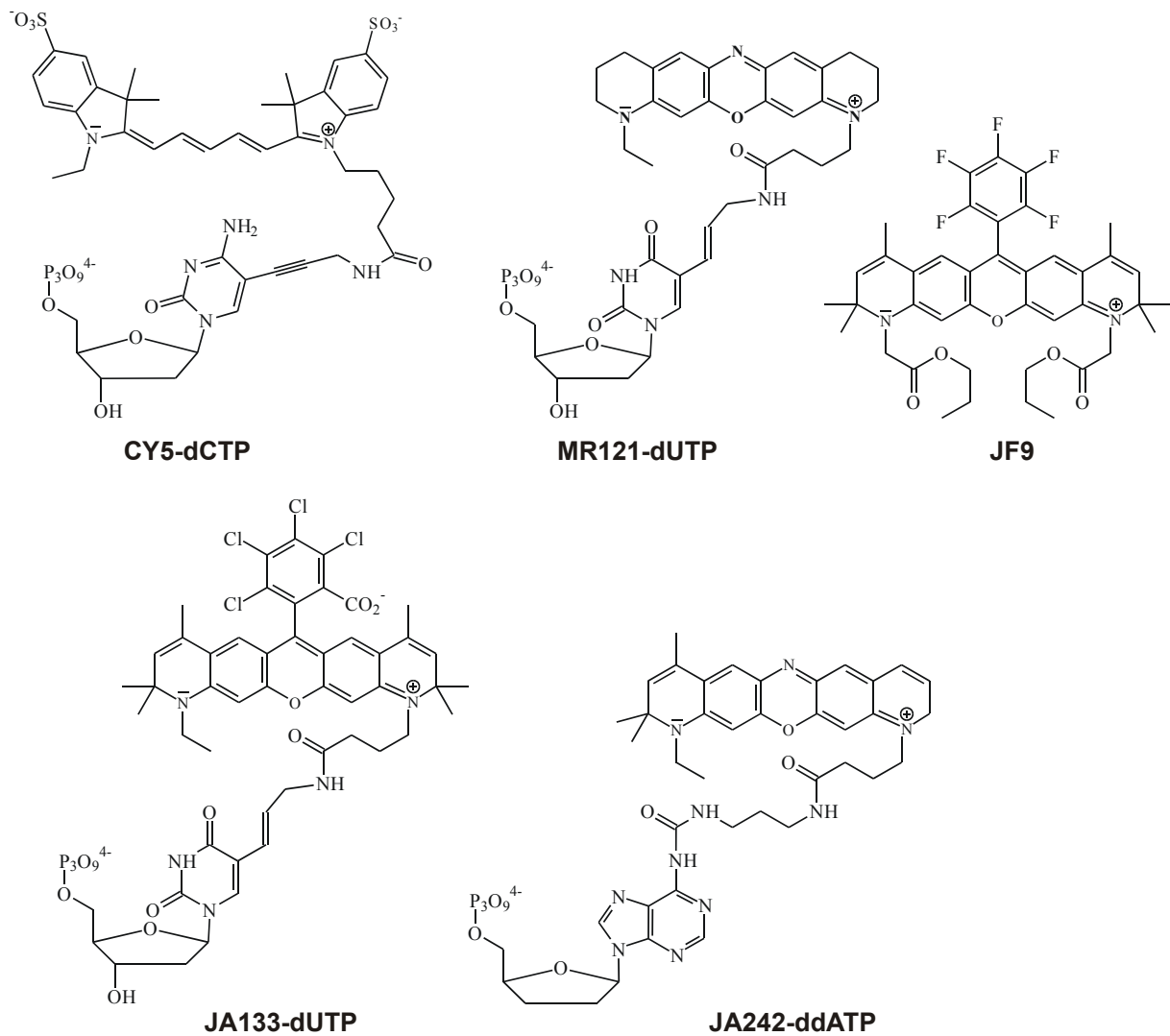


Abbildung 3.3-1 Strukturen der in dieser Arbeit eingesetzten Farbstoffkonjugate

3.3.2 Spektroskopische Eigenschaften

Die folgende Tabelle faßt die der Literatur entnommenen spektroskopischen Eigenschaften (Absorptionsmaximum, Emissionsmaximum und Fluoreszenzabklingdauer) der Farbstoffe zusammen.

Farbstoff	-Konjugat	Lösungsmittel	λ_{abs} [nm]	λ_{em} [nm]	τ [ns]	Quelle
Cy5		Wasser	650	664	1,01	Lieberwirth 1998 ^{a,b}
Cy5		Wasser	647	663	0,91	Buschmann 2003
Cy5		80 % Wasser + 20% Glycerin	649	666	1,13	Buschmann 2003
Cy5		60 % Wasser + 40% Glycerin	652	671	1,39	Buschmann 2003
Cy5		7M Harnstoff	652	670	1,21	Neumann 1999
Cy5	-dCTP	Wasser	651	670	1,04	Sauer 1998
Cy5	-dCTP	Femtopuffer	652	671	1,38	Sauer 1999
Cy5	-dCTP	Femtopuffer	652	671	1,32	Sauer 2001
Cy5	-M13-Primer	Wasser	650	670	1,13	Lieberwirth 1998 ^{a,b}
Ja133		Wasser	619	636	3,67	Lieberwirth 1998 ^b
Ja133	-M13-Primer	Wasser	623	640	4,50	Lieberwirth 1998 ^b
Ja133	-dUTP	Femtopuffer	624	664	3,96	Sauer 2001
Ja242		Wasser	664	682	1,97	Lieberwirth 1998 ^a
Ja242	-M13-Primer	7M Harnstoff	669	679	2,4*	Neumann 1999
Jf9		Wasser	631	645	3,69	Lieberwirth 1998 ^b
Jf9		7M Harnstoff	631	645	3,89	Neumann 1999
Jf9	-M13-Primer	Wasser	623	640	4,50	Lieberwirth 1998 ^b
Mr121		Wasser	662	676	1,85	Lieberwirth 1998a
Mr121		7M Harnstoff	666	680	2,29	Neumann 1999
Mr121	-dUTP	Wasser	668	682	2,10	Sauer 1998
Mr121	-dUTP	Femtopuffer	661	673	2,31	Sauer 1999, Sauer 2001

* biexponentielle Zerfallskinetik

Tabelle 3.3-1 Spektroskopische Eigenschaften der Fluoreszenzfarbstoffe

3.4 Lösungsmittel und Chemikalien

Soweit nichts anderes erwähnt ist, wurden Chemikalien von der Chemikalienausgabe der chemischen Institute oder aus dem Chemikalienlager des Theoretikums der Universität Heidelberg bezogen.

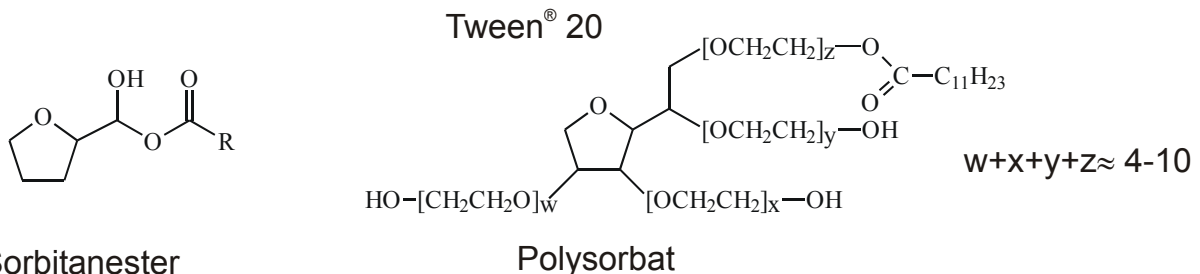
Bidestilliertes Wasser

Bidestilliertes Wasser wurde aus vollentsalztem Wasser durch zweifache Destillation in einer hierfür vorgesehenen Glasapparatur hergestellt.

Glycerin

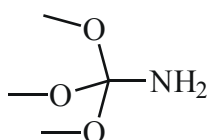
Glycerin wurde im Reinheitsgrad "für die Molekularbiologie" von der Firma Fluka (Neu-Ulm) bezogen.

Tween® 20



Tween® ist der Handelsname der ICI America Inc. für die Polyethoxyethylenderivate der Sorbitanester (= „Polysorbate“). Es handelt sich um nichtionische, gut wasserlösliche Detergenzien, die u.a. in der Lebensmittelindustrie als Emulgatoren eingesetzt werden. Tween 20 bezeichnet Polyethoxysorbitanlaurat. Es wurde dem Puffer bei Messungen im Femtotip zugesetzt, um die Adsorption der Farbstoffe an der Kapillarwand zu unterdrücken. Tween 20 wurde als 10 %-ige wäßrige Lösung in 10 ml- Ampullen von der Firma Aldrich bezogen.

Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)



Trishydroxymethylaminomethan war Bestandteil des Femtopuffers. Es diente der Stabilisierung des pH-Wertes bei 8,4.

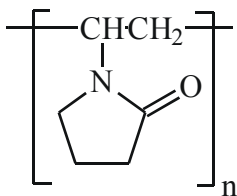
$C_4H_{11}NO_3$ M = 121,3 g/mol

Borsäure

Borsäure war Bestandteil des Femtopuffers. Sie wurde im Reinheitsgrad p.A. eingesetzt. Durch den Glycerinanteil im Femtopuffer wird die Acidität der Borsäure erhöht und der pH-Wert des Tris-Borat-Puffers von 8,4 sinkt durch die Beimischung des Glycerins ab. Durch Zusatz von etwas „Tris“ wird er wieder auf 8,4 erhöht.

$B(OH)_3$ M = 61,83 g/mol

Polyvinylpyrrolidon (PVP)



PVP ist ein wasserlösliches Polymer. Es ist Bestandteil des Femtopuffers. Durch den PVP-Zusatz wird der elektroosmotische Fluß unterdrückt und die Viskosität erhöht. Das eingesetzte PVP hatte einen K-Wert von 60.

Der K-Wert eines Polymers wird über die Finkentscher-Gleichung durch die Erhöhung der Viskosität seiner Lösungen definiert [Römpps Chemielexikon]:

$$\frac{K - Wert}{1000} = \frac{1,5 \cdot \ln \eta_r - 1 + \sqrt{1 + \left(2 + \frac{2}{c} + 1,5 \cdot \ln \eta_r\right) \cdot 1,5 \cdot \ln \eta_r}}{150 + 300 \cdot c} \quad (3.4-1)$$

Durch Umformen ergibt sich daraus:

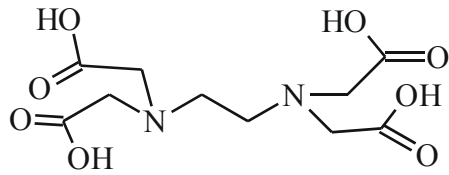
$$\ln \eta_r = \frac{Kc}{20} \cdot \frac{6Kc + 3K + 40}{3Kc + 20} \quad (3.4-2)$$

Dabei ist c die Massenkonzentration des Polymers in g/cm^3 und η_r die relative Viskosität, d.h. der Quotient der dynamischen Viskositäten der Polymerlösung und des Lösungsmittels.

$$\eta_r = \frac{\eta(\text{Polymerlösung})}{\eta(\text{reines Lösungsmittel})}$$

Die Viskosität des Puffers wird mit dieser Gleichung bei der Beschreibung des Puffers berechnet.

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)



EDTA ist Bestandteil des Sequenzierpuffers. Es inhibiert die Exonuclease durch Maskierung von Mg^{++} -Ionen. Die verwendete Stammlösung ist 0,5 M und liegt als Monohydroxy-trinatriumsalz vor. Die pKs-Werte von EDTA betragen bei 25 °C 1,99, 2,67, 6,16 und 10,26.

Beim pH-Wert des Sequenzierpuffers von 8,4 liegt es daher als dreifach negativ geladenes Ion vor.

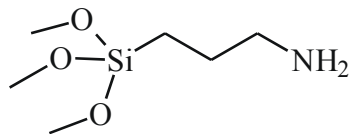
Exonuclease I

Exonuclease I ist ein Enzym, das in Anwesenheit von Mg^{++} -Ionen einzelsträngige DNS in 3' → 5' -Richtung abbaut. Exonuclease I aus *Escheria Coli* NM 554 wurde von der Firma New England Biolabs (Frankfurt) bezogen. Die Stammlösung hatte eine Aktivität von 20 u/μl. Der Puffer der Stammlösung besteht 50% Glycerin, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) 0,5 mM EDTA, 5 mM Mercaptoethanol ($HOCH_2CH_2SH$) und 100 μg/ml Rinderserumalbumin (BSA).

1 u Aktivität ist dabei definiert als die Menge Enzym, welche in 10 min. bei 37 °C 10 nmol säurelösliches Nucleotid im Standardreaktionspuffer freisetzt. Der Standardreaktionspuffer besteht aus 67 mM Glycin-KOH (pH 9,5), 6,7 mM $MgCl_2$, 10 mM Mercaptoethanol und 0,17 mg/ml einzelsträngiger DNS.

Durch zweiminütiges Erhitzen auf 80 °C verliert das Enzym seine Aktivität.

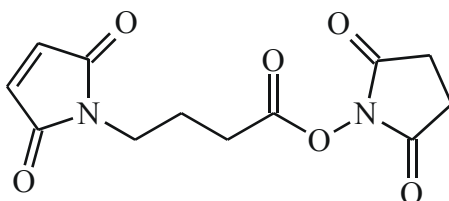
Trimethoxyaminopropylsilan (APS)



APS wurde verwendet, um Aminopropylgruppen auf Glasoberflächen zu fixieren. An die Aminogruppen können über den Linker GMBS andere Aminogruppen (z.B. in Proteinen) kovalent gebunden werden.

γ-Maleinimidobuttersäure-N-hydroxysuccinimid (GMBS)

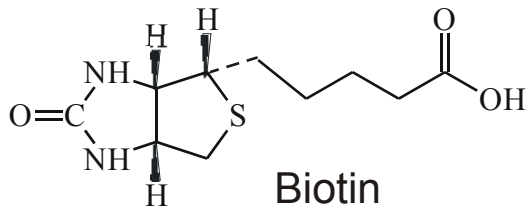
(4-N-Succinimidyl-maleinimidobutyrat)



GMBS ist ein bifunktionaler Linker, mit dem man Proteine auf APS-Beschichteten Glasoberflächen fixieren kann. GMBS wurde von der Firma Fluka (Neu-Ulm) bezogen.

Streptavidin

Streptavidin ist ein Protein mit einer Molmasse von etwa 60000 g/mol. Rekombinantes Streptavidin aus *streptomyces avidinii* wurde von der Firma Roche Molecular Biochemicals (Penzberg) bezogen. Streptavidin geht mit Biotin einen sehr stabilen Komplex ein (Dissoziationskonstante $K \approx 10^{-15}$ mol/l). Ein Molekül Streptavidin kann vier Moleküle Biotin binden. Die Carboxylgruppe des Biotins kann über eine Amidbindung mit anderen Molekülen wie z.B. Proteinen oder DNS verknüpft werden, ohne daß dies die Biotin-Streptavidin-Bindung beeinträchtigt.



3.4.1 Femtopuffer

In 100g bidestilliertem Wasser werden 242,1 mg (2 mmol) „Tris“ und 122,1 mg (2 mmol) Borsäure gelöst. Man erhält so eine Pufferlösung mit pH 8,4. Der Lösung werden 3 g PVP zugegeben und geschüttelt, bis sich alles gelöst hat. Anschließend werden 43 g Glycerin zugegeben und wiederum geschüttelt, bis eine homogene Lösung entstanden ist. Der Glycerinzusatz erhöht die Acidität der Borsäure; der pH-Wert sinkt auf etwa 7. Der Puffer wird in einem Glaskolben mit Schliff aufbewahrt, um eine Kontamination mit Farbstoffen auszuschließen.

10 ml der Pufferlösung werden 500 µl 10 % Tween[®]20 in Wasser zugesetzt.

Der hergestellte Puffer enthält (Massenanteile)

68,3 % Wasser
27,9 % Glycerin
1,9 % PVP
0,5 % Tween 20
0,16 % Tris (13 mmol/kg)
0,08 % B(OH) ₃ (13 mmol/kg)

Der Puffer enthält überwiegend Wasser und Glycerin. Die Eigenschaften binärer Glycerin-Wasser Gemische sind im [CRC Handbook of Chemistry and Physics] verzeichnet. Dort sind die in Abbildung 3.4-1 gezeigten Werte entnommen:

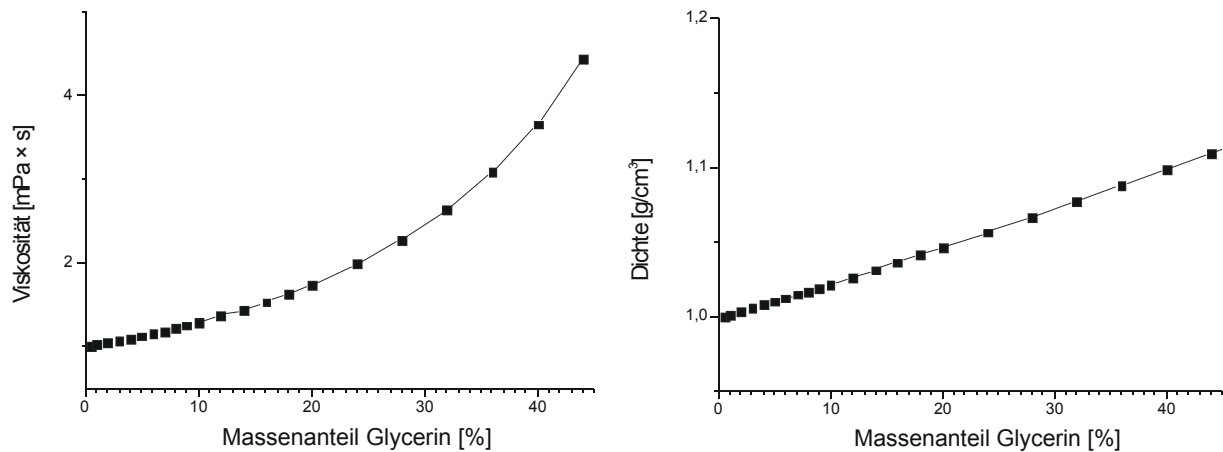


Abbildung 3.4-1 Viskosität und Dichte von Glycerin-Wasser-Gemischen bei 20°C.

Der Abbildung entnimmt man bei 27,9 Gew % Glycerin eine Viskosität von $2 \times 10^{-3} \text{ N m}^{-2}\text{s}$ und eine Dichte von $1,07 \text{ g cm}^{-3}$. Der Puffer enthält je 100 g Lösung 1,9 g PVP. Das entspricht bei der angegebenen Dichte einer Massenkonzentration von $c = 0,02089 \text{ g PVP je ml Lösung}$. Dieser Wert wird zusammen mit dem K-Wert des eingesetzten PVPs ($K = 60$) in Gleichung 3.4-2 eingesetzt. Man erhält $\ln \eta_r = 0,6$ und somit für den Puffer

$$\eta = 2 \times 10^{-3} \text{ N m}^{-2}\text{s} \times e^{0,6} = 3,2 \times 10^{-3} \text{ N m}^{-2}\text{s}.$$

3.4.2 Sequenzierpuffer

Zu 10 ml des in Abschnitt 3.4.1 beschriebenen werden 20 μl 500 mM EDTA-Na (10 μmol) gegeben und mit etwa 6 mg (50 μmol) Tris der pH auf 8,4 erhöht.

10 μl Exol der Konzentration 20 u/ μl werden mit 490 μl des EDTA-Femto-Puffers verdünnt.

Der Sequenzierpuffer hat demnach in etwa folgende Zusammensetzung:

- 68,3 % Wasser
- 27,9 % Glycerin
- 1,9 % PVP
- 0,49 % Tween 20
- 18 mM Tris
- 13 mM B(OH)₃
- 1 mM EDTA
- 0,4 u/ μl Exol

3.5 Sequenzierspitzen

Die Glasfaser wird zunächst in etwa 15 cm lange Stücke geschnitten. Anschließend wird die PMMA-Hülle mit Dichlormethan vollständig entfernt. Die Glasfaser ist ohne die Hülle sehr zerbrechlich. Um sie sicher handhaben zu können wird sie in eine Kanüle vom Typ 0,47 × 20mm eingeführt. Die Faser wird mit etwas Knetgummi am Spritzenansatz der Kanüle befestigt. Am Ende, das aus der Spitze der Kanüle ragt wird ein etwa 1,5 cm langes Stück einer 100 µl-Eppendorf-Pipettenspitze angeschmolzen. In die Pipettenspitze werden etwa 10 µl 40% Flußsäure gefüllt. Innerhalb von 24 h ist die Faser durchgeätzt und die Pipettenspitze fällt ab. Zurück bleibt eine langgezogene biegsame Spitze.

Die folgenden Beschichtungsschritte werden vor einem Mikroskop bei 30 × Vergrößerung durchgeführt. Dabei wird darauf geachtet, daß die Faserspitze nur etwa 100 µm weit in die Lösungen eintaucht, damit nur die äußerste Spitze mit Streptavidin belegt wird. Das ist wichtig, weil die Verunreinigung des Puffers durch Fluorophore mit dem Einbau der streptavidinierten Faser stark zunimmt.

Die geätzte Spitze wird zunächst mit Ethanol gewaschen und anschließend im Luftstrom getrocknet.

Im ersten Schritt werden Aminogruppen auf der Glasoberfläche fixiert. Dies geschieht durch Silanisierung mit 3-Aminopropyltrimethoxysilan (APS). Die 2 %-ige APS Lösung (20 µl APS + 1000 µl Toluol) in trockenem Toluol wirkt bei Raumtemperatur (25 °C) 30 Minuten auf die Spitze ein:

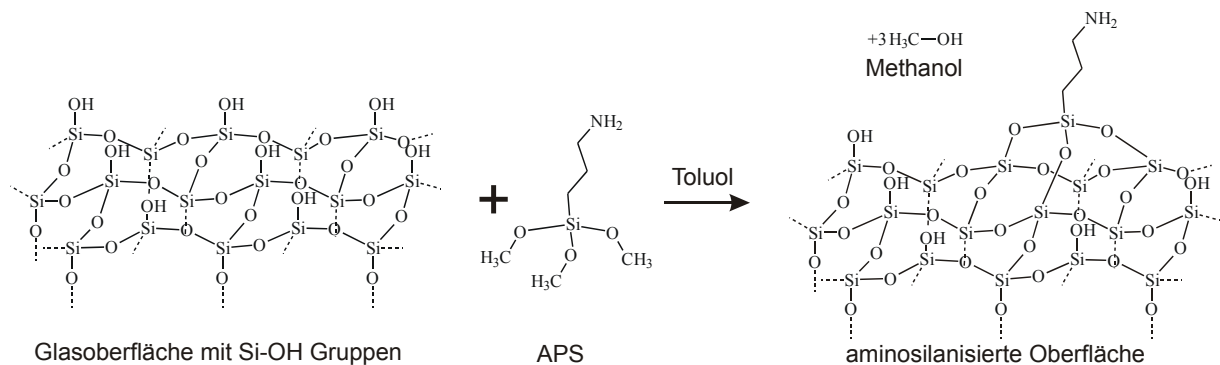


Abbildung 3.5-1 Aminosilanisierung der Oberfläche.

Der Überschuß APS wird 2× mit Toluol und 2× mit Ethanol abgespült.

Im zweiten Schritt werden die auf der Oberfläche fixierten Aminogruppen mit dem heterobifunktionellen Crosslinker γ -Maleimidobuttersäure-N-hydroxysuccinimid (GMBS) behandelt. Das eingesetzte Reagenz besteht aus 2 mM GMBS in einer 1:1 Mischung von Ethanol in Dimethylformamid (2,8 mg GMBS in 2,5 ml DMF lösen und mit 2,5 ml Ethanol mischen). Das Reagenz wirkt für 60 Minuten auf die aminosilanierte Oberfläche ein. Die Maleimidgruppe geht bei niedrigem pH-Wert Additionsreaktionen mit Mercaptogruppen, bei höherem pH Wert mit Aminogruppen ein. Durch die Behandlung mit GMBS werden NHS-Ester auf der Oberfläche fixiert.

Der Überschuß GMBS wird durch zweimaliges Abspülen der Spitzen mit Ethanol und mit sterilem Wasser entfernt.

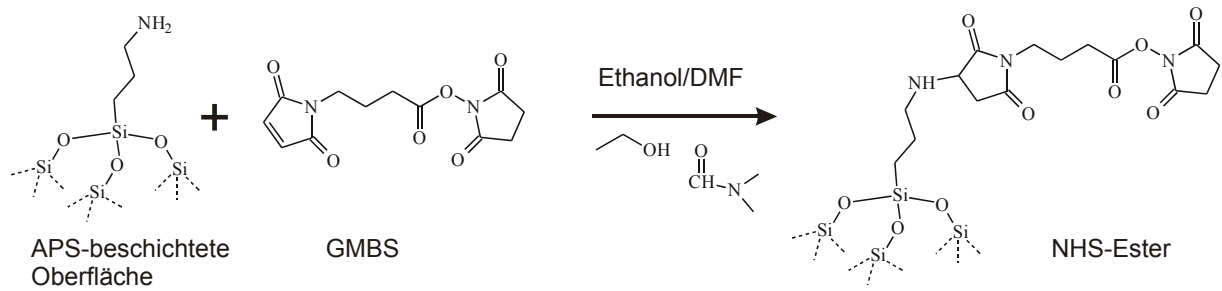


Abbildung 3.5-2 Addition des GMBS an die Aminogruppen

Die NHS-Ester reagieren in wässrigem Milieu bei pH-Werten von 7-9 mit primären Aminen zu Amiden. Bei höherem pH sinkt die Ausbeute, da der NHS-Ester dann hydrolysiert, bei niedrigerem pH Wert sind die Amine protoniert und reagieren nicht.

Zur Fixierung des Streptavidins lässt man eine 10^{-9} M Streptavidinlösung in 20 mM sterilem Carbonat-Puffer für 2 h auf die Spitzen einwirken.

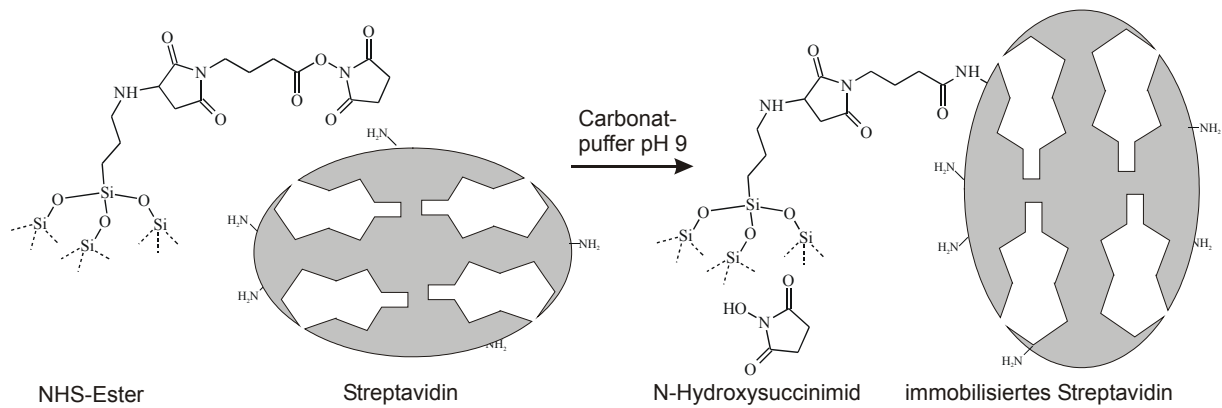


Abbildung 3.5.3 Amidbildung aus dem NHS-Ester

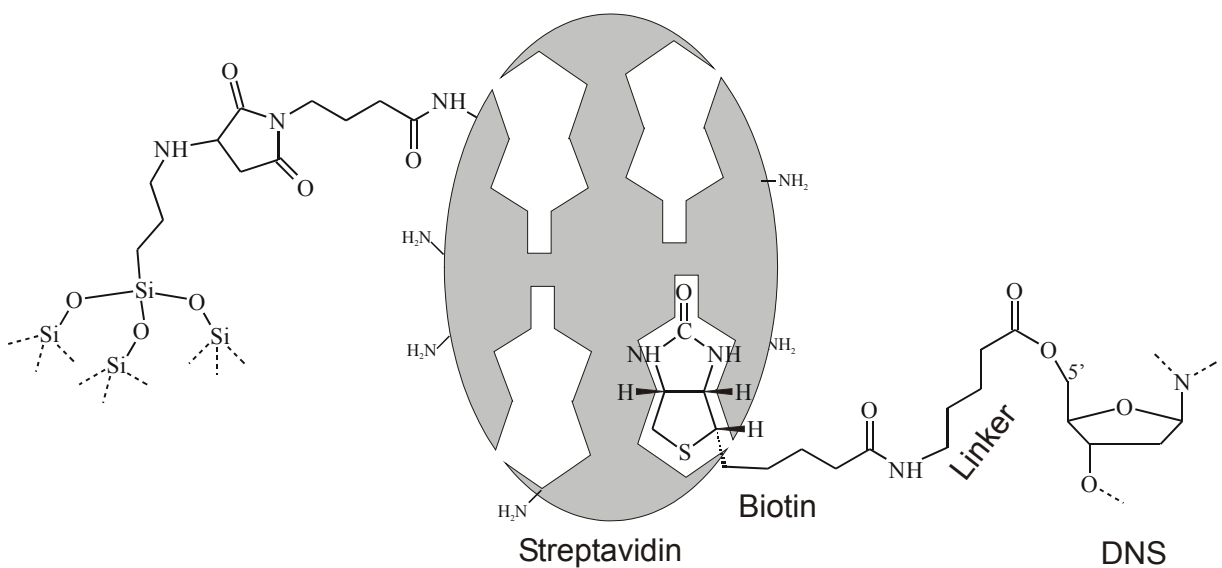


Abbildung 3.5.4 Bindung der biotinylierten DNS

3.6 Standardgeräte und Standardsoftware

Standardgeräte

Absorptionsspektren wurden mit einem Cary 500 Scan Spektrometer der Firma Varian (Darmstadt) aufgenommen. Farbstofflösungen wurden bei Konzentrationen unter 10^{-6} mol/l in Quarzküvetten „Suprasil“ der Firma Hellma (Mühlheim) vermessen.

Fluoreszenzemissionsspektren wurden mit einem LS-100 Fluoreszenzspektrometer der Firma Photon Technology International (Wedel) aufgenommen. Die Anregung erfolgte über eine Xenon-Blitzlampe.

Standardsoftware

Zur Auswertung numerischer Daten wurde Origin 6.0 der Firma Microcal Software Inc. verwendet. Innerhalb dieses Programmes wurden selbstgeschriebene Labtalk-Routinen und als .dll angebundene, in C geschriebene Funktionen verwendet.

Als weiteres Tabellenkalkulationsprogramm wurde Excel 97 der Firma Microsoft benutzt.

Als Editor für die Auswertebefehlsdateien wurde Ultraedit 7.10b der Firma IDM Computer Solutions verwendet. Mit diesem Editor ist der Austausch einzelner Textbausteine in mehreren Dateien gleichzeitig möglich. Zusammen mit dem ren-Befehl an der MS-DOS-Eingabeaufforderung wurden die Auswertebefehlsdateien mit geringem Aufwand in großer Zahl kombinatorisch erzeugt.

Als Datenkompressionsprogramm wurden Winzip 8.0 der Firma Winzip Inc, pkzip 2.04 der Firma Pkware Inc, und arj 2.41a von R.K. Jung verwendet.

C-Quellcode wurde mit Visual C++ der Firma Microsoft kompiliert.

Maple V in der Version 4.0 der Firma Waterloo Maple Inc war hilfreich bei Formelrechnungen.

Chemische Formeln wurden mit Chem Win 3.0 der Firma Soft Shell Inc. gezeichnet.

Die Bildverarbeitung wurde mit Ifan View 3.20 von Irfan Skiljan und mit Corel Draw 8.369 der Firma Corel Corp. durchgeführt.

3.7 Software des Arbeitskreises und selbst entwickelte Programme

3.7.1 Software des Arbeitskreises

Das Nahfeldmikroskop wurde mit dem Programm MXX.exe aus dem AK Lethokov gesteuert und ausgelesen.

Die .sdt- Dateien der TCSPC-Karte können mit dem Programm Fluorkit.exe von Herrn Dr. Stefan Siebert betrachtet und einzelne Zerfallskurven können in ASCII-Text umgewandelt werden.

3.7.2 Selbst entwickelte Programme

spc430h.c

Das Zentrale Programm zur Auswertung der zeitaufgelösten Einzelmolekülpuren trägt den Namen spc430x.exe, wobei x ein Buchstabe von a bis h ist, der die Versionsnummer des Programmes angibt. Das Programm kann die .sdt-Dateien der Becker-&Hickl-Karten SPC430 und SPC630 lesen.

Das Programm kann beliebig lange Spuren auswerten, da immer nur eine .sdt-Datei in den Speicher geladen wird.

Da die SPC-430-Karte bisweilen fehlerhafte Abklingkurven speichert, ist ein Filter implementiert, der diese „Bugs“ der Meßkarte eliminiert.

Das Programm ermöglicht es, die Spuren nach Fluoreszenzereignissen zu durchsuchen. Zur Rauschunterdrückung sowie zur Unterdrückung der Ereigniszersplitterung sind die Methode des Gating sowie die Glättfilter „Lee-Filter“ und „gleitender Durchschnitt“ implementiert.

Nach der Bestimmung der Fluoreszenzereignisse werden die Fluoreszenzzerfallskurven einer Mustererkennung unterworfen.

Diese ermöglicht eine Parameteroptimierung für monoexponentielle Zerfallskinetiken unter Berücksichtigung des Streu- und Untergrundlichtes sowie der Faltung mit der Instrumentenfunktion.

Die Parameter zur Auswertung werden dem Programm durch Auswertebefehlsdateien übermittelt. Der Pfad der Auswertebefehlsdatei wird dem Programm als Parameter an der Eingabeaufforderung mitgeteilt. Das Programm verlangt vom Benutzer während des Ablaufes keinen Eingriff. Durch den Einsatz von Batchdateien ist es mit relativ geringem Arbeitsaufwand möglich, die Auswerteparameter kombinatorisch zu variieren und den Effekt auf das Ergebnis zu beobachten. Während des Programmablaufs eventuell auftretende Probleme und andere Meldungen des Programmes werden in einer Datei protokolliert

Das Programm berechnet außerdem die Verteilungsfunktionen der ermittelten Ereignisparameter und erstellt Meßreihendateien, die eine schnelle Analyse großer Datenmengen ermöglichen.

Die Auswertebefehlsdateien haben die Struktur

PARAMETER1 = Wert2
PARAMETER2 = Wert2

Die Funktion, die die Auswertebefehlsdateien interpretiert, vergleicht die Zeichenkette links vom „=-Zeichen mit einer Liste von 54 zulässigen Zeichenketten und speichert den rechts stehenden Wert in einer entsprechenden Struktur. Die Angabe einiger Parameter ist optional, andere müssen belegt werden. Die 54 Zulässigen Zeichenketten lauten :

"Name_der_ersten_auszuwertenden_Datei"	"Pfad_zum_gepackten_Archiv"
"Name_der_letzten_auszuwertenden_Datei"	"Verzeichnis_innerhalb_des_Archivs"
"MCS-logate_(Kanal)"	"Muster"
"MCS-higate_(Kanal)"	"Erster_Kanal"
"MCS-Glaettparameter"	"Letzter_Kanal"
"Burst_Erkennungsschwelle_(kHz)"	"Blank[1/s]_[Datei/Konst/NBD]"
"Burst_Startschwelle_(kHz)"	"Fluoreszenz[Datei/Delta/Apr]"
"Burst_Trennscharfe_(Min<kl.Max*trennsc)"	"MLE-Blank[Konst/Datei/NBD]"
"Erstelle_MCS-ASCII(1/0)"	"Repetitionsfrequenz_des_Lasers_[MHz]"
"Erstelle_Gate-ASCII(1/0)"	"Gesamten_MLE-Scan_speichern(1/0)"
"Erstelle_Glaett-ASCII(1/0)"	"Name_der_binaeren_burst-datei"
"Erstelle_Durchschnittsratedatei(1/0)"	"Bursts_aus_Datei_laden(1/0)"
"Nicht-Burst-Decay_in_der_DrD_speichern"	"Rohdaten_als_ascii_speichern(1/0)"
"Burst-Decay_mit_speichern(1/0)"	"Name_der_Datei_fuer_die_Rohdaten"
"Name_der_Report-Datei"	"Morphe"
"Name_der_Burst-Datei"	"MLE_tau_min"
"Name_der_MCS-Datei"	"MIE_tau_max"
"Name_der_Durchschnittsdatei"	"MLE_Scanpunkte"
"Name_der_binaeren_mcs-Datei"	"Morph_Scanpunkte"
"Name_der_binaeren_Siebert-Burst-Datei"	"MLE-Pulsdatei"
"Verzeichnis_der_sdt_Dateien"	"Pulsdatei"
"Ausgabeverzeichnis"	"MLE-Pulsform[Gauss/Alles/-Untergrund]"
"Arbeitsverzeichnis"	"Pulsform[Gauss/Alles/-Untergrund]"
"MLE-erster_Kanal"	"Pfad_zur_Messreihendatei"
"MLE-letzter_Kanal"	"MCS-Lee-Parameter(Sigma0)_[kHz]"
"Sdt-Dateien_einzeln_entpacken"	"Umpolzeit"
"Pfad_zum_Entpacker"	"Name_der_Korrelationsspur"

Jede Zeile, die mit einer anderen Zeichenfolge beginnt, wird als Kommentar betrachtet, d.h. übersprungen. Die Reihenfolge der Zeilen in der Auswertebefehlsdatei ist irrelevant.

Befehlszeile	Bedeutung
Name_der_ersten_auszuwertenden_Datei = seq0000.sdt	(selbsterklärend)
Name_der_letzten_auszuwertenden_Datei = seq1999.sdt	(selbsterklärend)
Verzeichnis_der_sdt_Dateien = h:\tmp\	In dieses Verzeichnis werden die .sdt-Dateien einzeln entpackt und nach der Auswertung gelöscht. Oder: Aus diesem Verzeichnis werden die ungepackten Dateien gelesen
Sdt-Dateien_einzeln_entpacken = 1	1= Ja 0=Nein (default)
Pfad_zum_gepackten_Archiv = i:\2000-0~3\seq.zip	MS-DOS 8.3 Pfadangabe erforderlich
/*cd2:\>2000-03-21_seqhandling\seq.zip*/	Kommentar
Verzeichnis_innerhalb_des_Archivs = spc_430\	(selbsterklärend)
Ausgabeverzeichnis = H:\Dissertation\Sequenzierung\2000-03-21_hds_pcr_ex01\ seq0_ga10-59_M02L30_e10k0s1k1t0k2	Die folgenden vom Programm erzeugten, Dateien werden in das angegebene Verzeichnis geschrieben und beginnen mit der Zeichenkette seq0_ga10-59_M02L30_e10k0s1k1t0k2

Name_der_Report-Datei	= .rep	Datei für die Fehlermeldungen und sonstige Mitteilungen des Programmes
Name_der_Burst-Datei	= .dat	ASCII-Datei mit dem Ergebnis
Name_der_binaeren_burst-datei	= .bin	Binäre Datei mit der Ereignisliste (zur späteren Auswertung mit anderen Mustererkennungsparametern). Diese Datei wird geschrieben, falls der Parameter „Bursts_aus_Datei_laden(1/0)“ auf 0 gesetzt ist; sie wird gelesen falls er auf 1 gesetzt ist.
Name_der_binaeren_Siebert-Burst-Datei	= .mcs	Binäre Datei, die eine Mustererkennung mit „Fluorkit“ ermöglicht
Name_der_MCS-Datei	= .tra	(optional) ASCII-Datei mit der MCS-Spur
Name_der_Durchschnittsdatei	=	(optional) ASCII-Datei mit statistischen Informationen über jede der .sdt Dateien
Name_der_Datei_fuer_die_Rohdaten	=	(optional) ASCII-Datei mit den Rohdaten, d.h. den Abklingkurven jedes Bins
Name_der_binaeren_mcs-Datei	= .tmp	Binäre gegatete und geglättete MCS-Spur (gespeichert als unsigned long) zur Auswertung mit Hilfsprogrammen, die z.B. die Korrelationsfunktion daraus berechnen
Pfad_zur_Messreihendatei	= H:\Florian\Dissertation\ Sequenzierung\Seqmessreihe.txt	An diese Datei werden statistische Informationen dieser Auswertung angehängt.
MCS-logate_(Kanal)	= 10	unterer Kanal des MCS-Gate
MCS-higate_(Kanal)	= 59	oberer Kanal des MCS-Gate
MCS-Glaettparameter	= 02	Glättfensterbreite = $2 \times 2 + 1$ Bins 0 bedeutet keine Glättung
MCS-Lee-Parameter(Sigma0)_ [kHz]	= 30	Lee-Parameter in kHz 0 bedeutet gleitender Durchschnitt
Burst_Erkennungsschwelle_ (kHz)	= 10.0	Erkennungsschwelle
Burst_Startschwelle_ (kHz)	= 1.1	Startschwelle
Burst_Trennscharfe_ (Min<kl.Max*trennsc)	= 0.20	Trennschwelle (0..1) Je kleiner der Wert, desto weniger Ereignisse werden getrennt.
Erstelle_MCS-ASCII(1/0)	= 1	Soll in der ASCII-MCS-Spur eine Spalte mit den MCS-Rohdaten gespeichert werden?
Erstelle_Gate-ASCII(1/0)	= 1	Soll in der ASCII-MCS-Spur eine Spalte mit der gegateten Spur gespeichert werden?
Erstelle_Glaett-ASCII(1/0)	= 1	Soll in der ASCII-MCS-Spur eine Spalte mit der gegateten und geglätteten Spur gespeichert werden?
Erstelle_Durchschnittsdatei(1/0)	= 0	Soll die Durchschnittsdatei erzeugt werden?
Nicht-Burst-Decay_in_der_DrD_speichern	= 0	Soll in der Durchschnittsdatei die Abklingkurve des ereignisfreien Bereichs jeder der .sdt-Dateien gespeichert werden?
Gesamten_MLE-Scan_speichern(1/0)	= 0	Soll in der Ergebnisdatei (Ereignisliste) die Kullback-Leibler-Diskriminierungsinformation für den gesamten Mustersatz der Parameteroptimierung gespeichert werden?
Burst-Decay_mit_speichern(1/0)	= 0	Soll in der ASCII-Ereignisliste die Abklingkurve gespeichert werden?
Rohdaten_als_ascii_speichern(1/0)	= 0	(selbsterklärend)
Bursts_aus_Datei_laden(1/0)	= 0	Sollen die Ereignisse in Rohdaten gesucht werden oder soll eine bestehende binäre Ereignisliste gelesen werden?
MLE-erster_Kanal	= 1	erster Kanal für die Mustererkennung
MLE-letzter_Kanal	= 60	letzter Kanal für die Mustererkennung
MLE-Blank[Konst/Datei/NBD] Datei:H:\Florian\Dissertation\2000-03-21_bkg.nbd	=	Untergrund (in Hz/Kanal) soll aus der angegebenen Datei geladen werden.
MLE-Pulsdatei H:\Florian\puls\2000-03-21_xc7k00_w1k54_b0k66.puls	=	Der Puls (zur Faltung der Zerfallskinetik) soll aus der angegebenen Datei geladen werden
MLE-Pulsform[Gauss/Alles/-Untergrund]	= Alles	Der Puls soll so verwendet werden, wie er gelesen wurde.

MLE_tau_min	= 0.2	Bereich für die Abklingdauerbestimmung: kleinster Wert in ns
MLE_tau_max	= 20	Bereich für die Abklingdauerbestimmung: größter Wert in ns
MLE_Scanpunkte	= 128	Anzahl der zu berechnenden Muster für die Abklingdauerbestimmung
*Arbeitsverzeichnis	=	(optional) Wenn angegeben, wird die binäre MCS-Datei in dieses Verzeichnis geschrieben; wenn nicht, in das Verzeichnis mit den Ergebnissen
Pfad_zum_Entpacker	= F:\packer\pkzip\pkunzip.exe	Wird benötigt, wenn die Dateien einzeln entpackt werden sollen.
Repetitionsfrequenz_des_Lasers_[MHz]	= 64	zur Berücksichtigung der Restfluoreszenz
Muster	= Cy5-dCMP	Name des ersten Musters, dessen Kullback-Leibler-Diskriminierungsinformation ermittelt werden soll.
Erster_Kanal	= 1	erster Kanal der Abklingkurve, der berücksichtigt werden soll
Letzter_Kanal	= 60	letzter Kanal der Abklingkurve, der berücksichtigt werden soll
Blank[1/s]_[Datei/Konst/NBD]	=	Untergrund für das erste Muster
Datei:H:\Florian\Dissertation\2000-03-21_bkg.nbd		
Pulsdatei	=	Puls zur Faltung des ersten Musters
H:\Florian\puls\2000-03-21_xc7k00_w1k54_b0k66.puls		
Pulsform[Gauss/Alles/-Untergrund]	= Alles	(wie MLE-Pulsform)
Fluoreszenz[Datei/Delta/Apr]	= Apr:Tau=1.322	Das Muster soll aus dem angegebenen Puls mit $\tau=1,322$ ns berechnet werden
Muster	= Mr121-dUMP	Name des zweiten Musters, dessen Kullback-Leibler-Diskriminierungsinformation ermittelt werden soll.
Erster_Kanal	= 1	erster Kanal der Abklingkurve, der berücksichtigt werden soll
Letzter_Kanal	= 60	letzter Kanal der Abklingkurve, der berücksichtigt werden soll
Blank[1/s]_[Datei/Konst/NBD]	=	Untergrund für das zweite Muster
Datei:H:\Florian\Dissertation\2000-03-21_bkg.nbd		
Pulsdatei	=	Puls zur Faltung des zweiten Musters
H:\Florian\puls\2000-03-21_xc7k00_w1k54_b0k66.puls		
Pulsform[Gauss/Alles/-Untergrund]	= Alles	(wie MLE-Pulsform)
Fluoreszenz[Datei/Delta/Apr]	= Apr:Tau=2.069	Das Muster soll aus dem angegebenen Puls mit $\tau=2,069$ ns berechnet werden
Morphe	= Cy5-dCMP Mr121-dUMP	Die Muster mit den Namen Cy5-dCMP und Mr121-dUMP sollen gemischt und das Mischungsverhältnis optimiert werden.

Tabelle 3.7-1 Beispiel für eine Auswertebefehlsdatei

2d-hist.c

Dieses Programm berechnet aus einer Liste mit zwei Parametern und deren Fehlerangaben die zweidimensionale Verteilungsfunktion, die Verteilungsfunktionen beider Parameter, die Verteilungsparameter (Standardabweichung, Mittelwert, Schiefe, Wölbung) beider Verteilungen sowie die Kovarianz und den Korrelationskoeffizient der beiden Verteilungen. Die zweidimensionale Verteilungsfunktion wird als Graustufen-Bitmap, als Falschfarben-Bitmap sowie als ASCII-Tabelle ausgegeben.

hist.c

Dieses Programm berechnet aus der binären MCS-Spur das Histogramm der Zählrate. Das ist zwar auch (mit der als ASCII exportierten Spur) mit jedem gängigen Tabellenkalkulationsprogramm möglich, diese brauchen aber wegen der großen Datenmengen sehr lange (etwa 30 min bei typischerweise 4×10^6 Bins). Da diese Histogramme sehr oft gebraucht wurden, wurde daher ein kleines Programm geschrieben, das diese Aufgabe in weniger als 30 s erledigt.

ntelmcs.c

Dieses Programm erhöht die Binweite von MCS-Spuren und verringert so die Datenmenge

korrel.c

Dieses Programm berechnet aus den binären MCS-Spuren die Autokorrelationsfunktion.

glkor.c

Dieses Programm berechnet aus den binären MCS-Spuren die Autokorrelationsfunktion. Dabei werden eine einstellbare Anzahl an Glättparametern durchgespielt. Das Programm ermittelt unter anderem den Wendepunkt und die Amplitude der Korrelationsfunktion und stellt sie als Funktion der Glättparameter dar (Kapitel 4.3)

2d-korrel.c

Dieses Programm berechnet aus den Rohdaten die zeitaufgelöste Korrelationsfunktion.

kreuzkordehn.c

Dieses Programm berechnet aus zwei MCS-Spuren die Kreuzkorrelationsfunktion. Die Spuren werden dabei gegeneinander gedehnt und gestaucht, so daß eine zweidimensionale Datenstruktur entsteht. Das Ergebnis wird als Graustufen-Bitmap ausgegeben (s. Kapitel 4.5.1).

erropt.c

Dieses Programm sucht in den gemessenen Ereignislisten nach mit der Zielsequenz übereinstimmenden Bereichen. Es maximiert die Sequenzlänge bei einer vorgegebenen Anzahl zulässiger Fehler (Kapitel 4.6.2 und 4.6.4).

zufallssequenz.c

Dieses Programm erzeugt zufällige Ereignislisten. Diese werden benutzt um die Signifikanz von gemessenen Sequenzen zu überprüfen.

burstscripts.ogs

Dieses Labtalk-Script filtert Ereignislisten, sucht nach Stufen (Kapitel 4.6.3.6) und klassifiziert Ereignisse anhand der vom Programm spc430h.c ermittelten Abklingdauer. Die Dialoge werden dabei über spezielle Templates abgewickelt (BURSTSHE2.OTW, stpsrchP.OTP)

cft.c

Dieses Programm ist ein Filter. Er wurde eingesetzt, um die 100 Hz-Schwingung herauszurechnen, die bei einigen der gemessenen FCS-Kurven auftrat (s. Kapitel 4.2.5).

femtokor.c

Dieses Programm berechnet Korrelationsfunktionen in Mikrokapillaren (Kapitel 4.2). In der als Laufzeitbibliothek kompilierten Version (femtodll3.cpp) kann es in Origin eingebunden werden. In Origin ist eine Parameteroptimierung an gemessene Kurven möglich.

debtiff4.c

Das Programm konvertiert die vom Mxx-Programm erzeugten und nicht dem Standard entsprechenden .tif-Dateien des Nahfeldmikroskops in Tiff-Dateien, welche dem Standard 4.2 entsprechen. Bei den vom Mxx-Programm erzeugten Dateien enthalten die „Tags“ 0x00fe, 0x0129, 0x0115 und 0x0129 ungültige Werte; die Bildpunkte sind als signed short und nicht als unsigned short gespeichert.

Bei der Konvertierung wird gleichzeitig der nichtlineare optische Kanal linearisiert (Kapitel 4.7.2). Das Programm erzeugt ein Graustufen- und ein Falschfarbenbild sowie eine ASCII-Tabelle.

4. Experimente, Ergebnisse und Diskussion

4.1 Berechnung des elektrischen Feldes im Femtotip

In diesem Kapitel wird der Verlauf der elektrischen Feldstärke im Versuchsaufbau mit Hilfe des Ohmschen Gesetzes, Gleichung 4.1-1 abgeschätzt. In Kapitel 4.2 wird das Ergebnis aus diesem Kapitel für die Diskussion der durch Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) ermittelten Wanderungsgeschwindigkeit der Farbstoffionen verwendet.

$$\vec{E} = \rho \vec{j}_{el} \quad (4.1-1)$$

E ist dabei die elektrische Feldstärke, j_{el} die elektrische Stromdichte und ρ der spezifische elektrische Widerstand der Lösung. Die Stromdichte ist die durch eine infinitesimale Fläche tretende Stromstärke dividiert durch die Größe dieser Fläche, wobei der Normalenvektor der Fläche die Richtung der Stromdichte angibt.

Nachdem sich eine konstante Ladungsverteilung eingestellt hat ist die Stromdichte divergenzfrei. Das bedeutet, daß durch jeden Querschnitt durch die Kapillare die gleiche Ladungsmenge pro Zeit fließt. Mit anderen Worten muß das Integral der Stromdichte j über jeden Kapillarenquerschnitt, also die durch diesen fließende Gesamtstromstärke I konstant sein. Da sich der Querschnitt zur Spitze hin verjüngt muß die Stromdichte zur Spitze des Femtotips hin zunehmen, um außerhalb wieder rasch abzufallen. Nach dem Ohmschen Gesetz ist die Feldstärke der Stromdichte proportional, daher gilt dasselbe für die Feldstärke. Der Verlauf der Feldlinien ist im mittleren Teil der Abbildung 4.1-1 skizziert.

Die zwischen den Elektroden angelegte Spannung definiert ihre Potentialdifferenz. Zwischen der Feldstärke E und dem elektrischen Potential U besteht folgender Zusammenhang:

$$\vec{E} = -\nabla U \quad \text{bzw.} \quad U(a) - U(b) = \int_a^b \vec{E} d\vec{s}$$

s ist dabei ein beliebiger von a nach b führender Weg. Aus der rechten Gleichung folgt, daß Flächen, die von den Feldlinien senkrecht durchsetzt werden, das gleiche Potential haben müssen.

Es ist vorteilhaft, den Feldverlauf im Inneren des Femtotips getrennt vom Feldverlauf außerhalb zu behandeln. Der Potentialabfall über den Femtotip wird mit U_{Femto} , der außerhalb mit $U_{\text{außen}}$ bezeichnet. Die an den Elektroden anliegende Gesamtspannung setzt sich additiv aus diesen Teilspannungen zusammen:

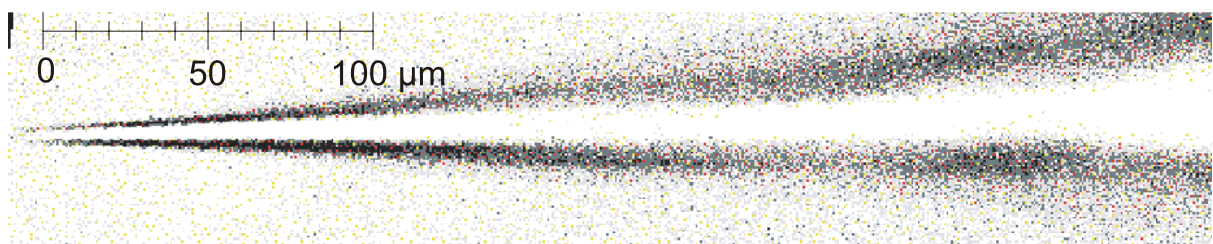
$$U_{\text{Gesamt}} = U_{\text{Femto}} + U_{\text{außen}} \quad (4.1-2)$$

Spannungsabfall im Femtotip

Im ausgezogenen, dünnen Teil des Femtotips läuft die Kapillare konisch zu, die Öffnung an der Spitze besitzt nach Herstellerangaben einen Durchmesser $2L_0 \approx 500$ nm. Die Wände des Kegelstumpfes weisen in der Bildebene einen Öffnungswinkel $2\alpha'$ von etwa $5,5^\circ$ auf (Abbildung 4.1-1 a,b). Die Achse des Femtotips ist um $\vartheta \approx 35^\circ$ gegen die Bildebene geneigt (Abbildung 4.1-1 c). Damit ergibt sich ein tatsächlicher Öffnungshalbwinkel

$$\alpha = \arctan(\cos(\vartheta)\tan(\alpha')) \approx \arctan(\cos(35^\circ)\tan(2,8^\circ)) \approx 2,3^\circ.$$

(a) Mikroskopaufnahme (10x-Objektiv)



(b) scheinbarer Winkel in der Bildebene



(c) Projektionsformel

$$\tan(\alpha) = \cos(\vartheta) \tan(\alpha')$$

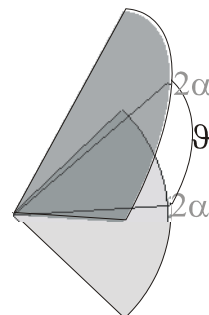


Abbildung 4.1-1 Bestimmung des Öffnungswinkels des Femtotips

(a) Mit einer CCD-Kamera aufgenommenes mikroskopisches Bild. Der Femtotip war mit Pufferlösung gefüllt und von Glycerin umgeben. Das verwendete Objektiv vergrößerte 10x bei einer numerischen Apertur von 0,25. Das Bild wurde anschließend mit einem Grafikprogramm kontrastverstärkt, um die Wände besser sichtbar zu machen.

(b) Das mit dem Grafikprogramm eingepaßte Kreissegment hat einen Öffnungswinkel von $5,6^\circ$.

(c) Da die Achse des Femtotips gegen die Bildebene um $\vartheta \approx 35^\circ$ geneigt ist, muß eine perspektivische Korrektur zur Bestimmung des tatsächlichen Öffnungshalbwinkels ($\Rightarrow \alpha \approx 2,3^\circ$) durchgeführt werden.

Es wird näherungsweise eine konstante Stromdichte auf innerhalb der Kapillare liegenden Kugelflächensegmenten angenommen (Abbildung 4.1-1, rechts).

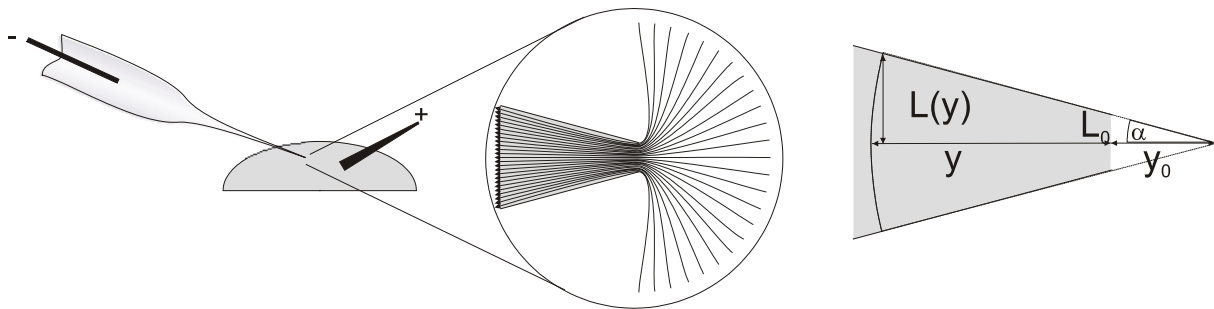


Abbildung 4.1-2 Feldlinien im Femtotip

links : Die ausgezogene, dünne Spitze hat die Form eines Kegelstumpfes.

Mitte: Vergrößerte Darstellung der Spitze mit Feldlinien.

rechts: Größen zur Berechnung des Feldes im Inneren.

Die Mittelpunkte der Kugeln liegen dabei im extrapolierten Schnittpunkt der Kapillarwände. Der Flächeninhalt der Kugelsegmente ist durch

$$A(y) = 2\pi(y + y_0)^2(1 - \cos \alpha)$$

gegeben, wobei $L_0 = y_0 \tan \alpha$ ist. Mit der Stromdichte $j_{el} = \frac{I}{A}$, wobei I die Stromstärke ist, folgt:

$$E(y) = \rho \frac{I}{2\pi(y + y_0)^2(1 - \cos \alpha)} \quad (4.1-3)$$

Die am Femtotip abfallende Spannung lässt sich durch Integration der Gleichung 4.1-3 ermitteln. Die Elektrode ist im Vergleich zur Größe der Austrittsöffnung sehr weit von dieser entfernt. Deshalb läuft das Integral von $y=0$ bis ∞ . Da das Potential überwiegend im ausgezogenen dünnen Teil des Femtotips abfällt, verursacht die Abweichung von der konischen Geometrie im hinteren Teil des Femtotips keinen großen Fehler.

Für $y=0$ liefert die Formel für den Flächeninhalt der Kugelschale, $A(0) = 2\pi y_0^2(1 - \cos \alpha)$, einen etwas größeren Wert als die tatsächliche Austrittsöffnung, $A(0) = \pi y_0^2 \tan^2 \alpha$. Aufgrund des kleinen Winkels α ist der Fehler aber zu vernachlässigen ($< 0,15\%$ für $\alpha = 2,5^\circ$). Man erhält:

$$U_{Femto} \approx \frac{\rho I}{2\pi(1 - \cos \alpha)} \int_0^\infty \frac{dy}{(y + y_0)^2} = \frac{\rho I}{2\pi(1 - \cos \alpha)} \int_{y_0}^\infty \frac{d\psi}{\psi^2} = \frac{\rho I}{2\pi(1 - \cos \alpha)} \frac{-1}{\psi} \Big|_{y_0}^\infty$$

Mit $1/y_0 = \tan(\alpha)/L_0$ ergibt sich

$$U_{Femto} \approx \frac{\tan \alpha}{2\pi(1 - \cos \alpha)} \rho I \frac{1}{L_0} \approx \frac{1}{\pi \tan \alpha} \rho I \frac{1}{L_0} \quad (4.1-4)$$

Spannungsabfall außerhalb des Femtotips

Der Potentialverlauf außerhalb des Femtotips ist nicht ohne weiteres zu berechnen, da er von der Form der Außenelektrode und von deren Abstand zur Austrittsöffnung abhängt. Die experimentelle Erfahrung zeigt jedoch, daß die Form und der Abstand der Außenelektrode keinen wesentlichen Einfluß auf das Feld im Inneren des Femtotips hat. Auch der Zusatz von Ionen im Außenraum hat nur einen geringen Einfluß (Abschnitt 4.6.3.4).

Wenn man (stark vereinfachend) annimmt, daß im Bereich der Austrittsöffnung, wo die Stromdichte hoch ist und sich das Potential stark ändert die Elektrolytzusammensetzung aus dem Kapillarinernen vorliegt (weil z.B. Puffer aus der Kapillare diffundiert), kann die unterschiedliche Leitfähigkeit von Kapillarinernen- und außenraum vernachlässigt werden.

Um den Potentialabfall im Außenraum grob abzuschätzen, wird angenommen, daß sich die Feldlinien radial in den vor dem Femtotip liegenden Halbraum ausbreiten, um auf einer im Unendlichen liegenden halbkugelförmigen Elektrode zu enden. Die Äquipotentialflächen sind dann durch Halbkugeln gegeben.

Tatsächlich ist die Außenelektrode ein mehr oder weniger kompliziert gebogener Draht von etwa 0,6 mm Durchmesser, der sich in einem schlecht definierbarem Abstand zur Öffnung des Femtotips befindet. Betrachtet man jedoch nur den Bereich einige 10 µm um die Spitze, kann man wohl davon ausgehen, daß sich die Feldlinien radial von der Spitze aus ausbreiten. Der Spannungsabfall wird aber überwiegend durch diesen Bereich hoher Stromdichte bestimmt, so daß mit dieser Näherung die Größenordnung des Spannungsabfalls außerhalb des Femtotips abgeschätzt werden kann.

Wenn r den Abstand zur Austrittsöffnung beschreibt, so erhält man damit $A=2\pi r^2$. Da die Fläche bei $r=0$ die Austrittsfläche der Kapillare, πL_0^2 ergeben muß, wird die Funktion zu $A=2\pi r^2+\pi L_0^2$ modifiziert. Damit ergibt sich ein Lorentz-förmiger Abfall der Feldstärke:

$$E(r) \approx \frac{\rho I}{2\pi r^2 + \pi L_0^2}$$

bzw. nach Integration [Bronstein 2001, S.1053]:

$$U_{\text{außen}} \approx \frac{\rho I}{2\pi} \int_0^\infty \frac{dr}{r^2 + \left(\frac{L_0}{\sqrt{2}}\right)^2} = \frac{\rho I}{2\pi} \frac{\sqrt{2}}{L_0} \arctan \frac{r\sqrt{2}}{L_0} \Bigg|_{r=0}^{r=\infty} = \frac{\rho I}{\sqrt{2}\pi L_0} \left(\frac{\pi}{2} - 0\right)$$

$$U_{\text{außen}} \approx \frac{1}{2\sqrt{2}} \rho I \frac{1}{L_0} \quad (4.1-5)$$

Feldstärke im Femtotip

Mit den Gleichungen 4.1-4 und 4.1-5 läßt sich der Anteil der Spannung, der am Femtotip abfällt berechnen. Man erhält:

$$U_{Femto} = \frac{1}{1 + \frac{U_{außen}}{U_{Femto}}} U_{Gesamt} \approx \frac{1}{1 + \frac{\pi \tan \alpha}{2\sqrt{2}}} U_{Gesamt} \quad (4.1-6)$$

Je enger der Öffnungswinkel an der Spitze, desto höher der Anteil der Spannung, der über den Femtotip abfällt. Die Größe der Austrittsöffnung hat dagegen keinen Einfluß auf die Anteile. Für $\alpha \approx 2,5^\circ$ ergibt sich, daß über 95% der Spannung am Femtotip und nicht in der Lösung, in welche dieser eintaucht, abfällt. Es ist also verständlich, daß Veränderungen im Außenraum keinen nennenswerten Einfluß auf das Feld im Inneren haben.

Gleichung 4.1-4 kann man zu

$$\rho I \approx U_{Femto} L_0 \pi \tan \alpha$$

umformen. Substituiert man das Produkt aus spezifischem Widerstand ρ und Stromstärke I in Gleichung 4.1-3, so erhält man für die Feldstärke E im Femtotip im Abstand y von der Spitze:

$$E(y) \approx \frac{\pi L_0 \tan \alpha}{2\pi(y + y_0)^2 (1 - \cos \alpha)} U_{Femto} \approx \frac{L_0 \tan \alpha}{\left(y + \frac{L_0}{\tan \alpha}\right)^2 \tan^2 \alpha} U_{Femto} = \frac{L_0 \tan \alpha}{(y \tan \alpha + L_0)^2} U_{Femto}$$

Substituiert man nach Gleichung 4.1-6 noch U_{Femto} , so erhält man:

$$E(y) \approx \frac{\sqrt{8} \tan \alpha}{\sqrt{8} + \pi \tan \alpha} \frac{1}{\left(\frac{y}{L_0} \tan \alpha + 1\right)^2} \frac{U_{Gesamt}}{L_0} \quad (4.1-7)$$

Außerhalb des Femtotips fällt die Spannung nach den vereinfachenden Annahmen des letzten Abschnitts Lorentz-förmig ab:

$$E(r) \approx \frac{\sqrt{8} \tan \alpha}{\sqrt{8} + \pi \tan \alpha} \frac{U_{Gesamt}}{L_0} \frac{1}{1 + 2 \frac{r^2}{L_0^2}} \quad (4.1-8)$$

Abbildung 4.1-3 zeigt den nach Gleichung 4.1-7 und Gleichung 4.1-8 errechneten Verlauf der Feldstärke im Femtotip und davor für $L_0 = 250 \text{ nm}$ und $\alpha = 2,3^\circ$

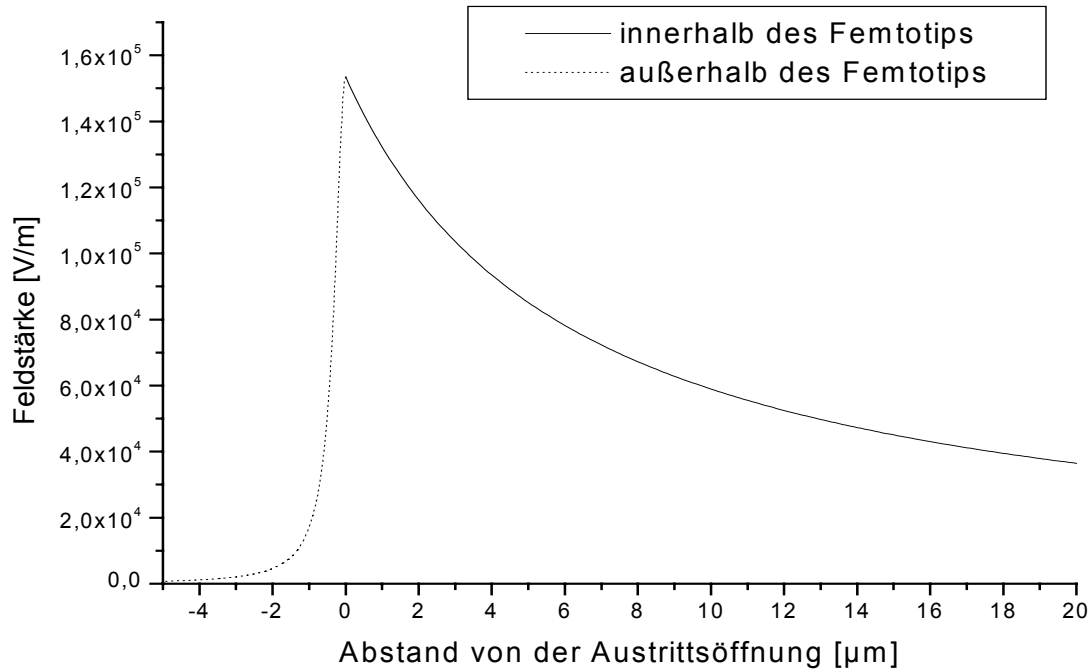


Abbildung 4.1-3 Verlauf der Feldstärke in- und außerhalb des Femtotips.
Die Feldstärke wurde für $L_0 = 250 \text{ nm}$, $\alpha = 2,3^\circ$ und $U_{\text{Gesamt}} = 1 \text{ V}$ berechnet.

An der Spitze, bei $y=0$ herrscht die größte Feldstärke:

$$E(0) \approx \frac{\sqrt{8} \tan \alpha}{\sqrt{8} + \pi \tan \alpha} \frac{U_{\text{Gesamt}}}{L_0} \quad (4.1-8)$$

Die Spitzenfeldstärke ist demnach um so größer, je stumpfer der Öffnungswinkel der Kapillare (wobei jedoch zu beachten ist, daß die hier verwendeten Näherungen nur für kleine Öffnungswinkel gelten) und je kleiner die Auslaßöffnung ist.

Für $\alpha=2,3^\circ$ ergibt der erste Term ca. 0,0384. Da $L_0 \approx 250 \text{ nm}$ jedoch sehr klein ist, ergeben sich mit $1/L_0 \approx 40000 \text{ cm}^{-1}$ bereits bei den relativ geringen Elektrodenspannungen im Bereich von 1 V bis 20 V sehr hohe Feldstärken von 1,7 kV/cm bis 33 kV/cm an der Spitze.

Im Lichte dieser Erkenntnis wird verständlich, warum bei der Arbeit mit konventionellen Kapillaren in der Gruppe von R. Keller Spannungen im kV- Bereich eingesetzt werden mußten, um bei Feldstärken von einigen 100 V/cm beobachtbare Effekte zu erzielen [Van Orden 1998], [LeCaptain 2001] und das, obwohl sehr große und stark geladene Moleküle (DNS) untersucht wurden. Andere Autoren [Fister 1998] berichten, daß bei 160 V/cm, die Ereignisfrequenz von Rhodamin6G Molekülen in Wasser nicht signifikant erhöht wird, während dies bei den höheren Feldstärken in Femtotips trotz der geringen Elektrodenspannungen offensichtlich der Fall ist (Abschnitt 4.4 und [Sauer 1999], [Becker 1999], [Zander 1998]).

4.2 FCS in Mikrokapillaren

Das Ziel dieses Kapitels ist festzustellen, ob mit Hilfe von bestimmten Mikrokapillaren („Femtotips“) der Teilchenstrom soweit eingeeignet werden kann, daß jedes austretende Fluorophor detektiert wird. Der Kapillardurchmesser wird vom Hersteller mit ca. 500 nm angegeben. Eine geometrische Abschätzung des Detektionsvolumens ergibt einen Durchmesser von ca. 1 μm , sofern nicht das Anregungsvolumen des Lasers limitierend ist. Nach dieser einfachen Abschätzung sollte es demnach möglich sein, alle austretenden Fluorophore zu beobachten.

Dabei bleibt jedoch unberücksichtigt, daß der Durchmesser des Laserstrahls in der Fokalebene begrenzt ist, und daß an den Kapillarwänden Brechung auftritt, die die Abmessungen des Detektionsvolumens verändert.

Die Beantwortung dieser Fragestellung wird mit der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) angegangen, weil diese Methode als rein statistisches Verfahren ohne Fluoreszenzereigniserkennung auskommt und damit eine Möglichkeit darstellt, die Ergebnisse aus der Einzelmolekülereignisanalyse (Kap. 4.4-4.5) zu überprüfen. Insbesondere die Ereignisbreitenverteilung, aus der, wie aus der FCS die Diffusionszeit zu gewinnen ist, reagiert empfindlich auf Doppelereignisse und Mehrfachdurchtritte sowie auf eine Variation der Schwellen zur Ereigniserkennung.

In diesem Kapitel wird die Beeinflussung des zeitlichen Abfalls der Fluoreszenzkorrelationsfunktion durch die Kapillarwand untersucht.

Im Abschnitt 4.2.1 wird ein allgemeiner Lösungsansatz zur Ermittlung der Korrelationsfunktion in zylindrischen Geometrien vorgestellt.

In Abschnitt 4.2.2 wird aus diesem Lösungsansatz unter Annahme eines Gauß-förmigen Detektionsvolumens eine Reihenentwicklung der Korrelationsfunktion abgeleitet.

Deren Abhängigkeit von den experimentellen Parametern wird in Abschnitt 4.2.3 diskutiert

In Abschnitt 4.2.4 wird für die Reihenentwicklung eine analytisch darstellbare Näherungslösung entwickelt, mit deren Hilfe die theoretisch abgeleitete Funktion an Meßwerte angepaßt werden kann.

In Abschnitt 4.2.5 werden zwei Meßreihen, eine mit Mr121-dUTP und eine mit Cy5-dCTP mit der Näherungslösung gefittet.

Die Diskussion der Ergebnisse findet in Abschnitt 4.2.6 statt.

Mehrere Autoren haben Fluoreszenzkorrelationsexperimente in Kapillaren [LeCaptain 2001], [Van Orden 1998] oder Mikrostrukturen [Brinkmeier 1997] [Brinkmeier 1999] durchgeführt. Da jedoch der Kapillardurchmesser (40 μm) gegen die Ausdehnung des effektiven Detektionsvolumens groß war, konnten die Effekte der Kapillarwände auf die Konzentrationskorrelationsfunktion $\phi(r, r', \tau)$ bei diesen Arbeiten vernachlässigt werden. Die Abweichung der gemessenen Kurven von den modellierten Funktionen wurde in der Literatur auf eine Verzerrung des Detektionsvolumens und/oder auf Inhomogenität des Geschwindigkeitsfeldes der strömenden Teilchen zurückgeführt.

Die Durchmesser der hier verwendeten Femtotips sind hingegen von ähnlicher Größe wie das Detektionsvolumen, weshalb der Einfluß der Kapillarwand beachtet werden muß.

Der Femtotip läuft nach vorne hin konisch zu (Abbildung 4.2-1, links). Für den Radius L im Abstand y von der Spitze gilt:

$$L(y) = L_0 + y \tan \alpha \quad (4.2-1)$$

Der Öffnungshalbwinkel α ist dabei der Winkel, den die Wand mit der Kegelachse einschließt. Da jedoch der Öffnungshalbwinkel α mit $2,3^\circ$ (Abschnitt 4.1) recht spitz ist, kann man im Bereich des relativ kleinen Detektionsvolumens den Femtotip als zylindrische Kapillare mit konstantem Radius annehmen, was die mathematische Behandlung in Kapitel 4.2.1 erheblich vereinfacht. Um den Fehler abzuschätzen, wird für die Ausdehnung des Detektionsvolumens in y -Richtung ein Wert von etwa $0,5 \mu\text{m}$ angenommen. Damit ändert sich in diesem Abschnitt der Radius um etwa 20 nm ($= 0,5 \mu\text{m} \times \tan(2,3^\circ)$). Der Radius an der Spitze ist mit $L_0 \approx 250 \text{ nm}$ gegeben. Der maximale relative Fehler dieser Näherung ist also kleiner als 10% .

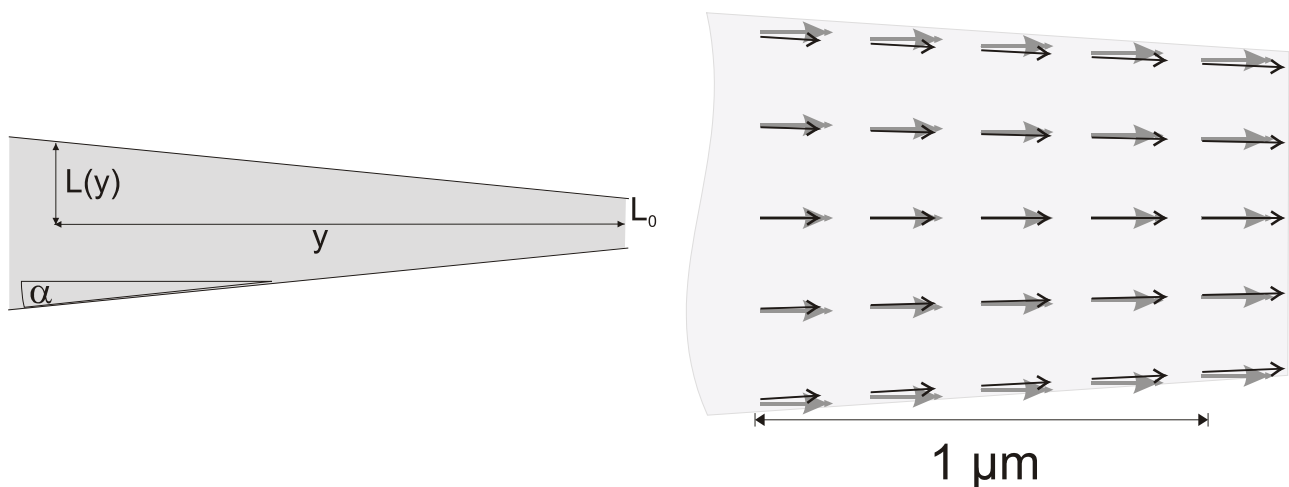


Abbildung 4.2-1 Zylindrische Näherung

Links : Der Öffnungshalbwinkel α der Kapillare ist klein. Man kann daher mit einem Fehler $< 10\%$ $L \approx \text{const.}$ im Bereich des Detektionsvolumens ($\omega_y \approx 0,5 \mu\text{m}$) annehmen. Der Winkel ist im linken Teil der Abbildung zur besseren Übersichtlichkeit vergrößert dargestellt.

Rechts: Das inhomogene Geschwindigkeitsfeld (dünne schwarze Pfeile) kann durch ein homogenes Geschwindigkeitsfeld (dicke graue Pfeile) approximiert werden. Die rechte Abbildung ist mit $\alpha = 2,3^\circ$ und $L_0 = 0,25 \mu\text{m}$ maßstabsgetreu.

Sieht man die Kapillare näherungsweise als zylindrisch an, so folgt daraus, daß sich das elektrische Feld in y - Richtung nur langsam ändert, weil die Querschnittsfläche und damit die Stromdichte konstant ist (s. Abschnitt 4.1). Da der Radius in die Querschnittsfläche quadratisch eingeht, ist der Fehler hier jedoch größer als die oben abgeschätzten 10% . Man erhält als obere Fehlergrenze etwa 17% . Aufgrund des geringen Kapillaröffnungswinkels folgt außerdem, daß die axiale Komponente des Geschwindigkeitsfeldes sehr viel größer als die radiale ist $V_p \leq V_y \tan \alpha$. Vernachlässigt man die radiale Komponente, so sind die Geschwindigkeitsvektoren parallel zur Kapillarachse. Daraus und mit der Näherung, daß die Geschwindigkeitszunahme innerhalb des Detektionsvolumens klein ist, folgt, daß das Geschwindigkeitsfeld näherungsweise homogen ist. Die Teilchen bewegen sich also in einem einheitlichen Fluß durch das Detektionsvolumen (Abbildung 4.2-1, rechts).

Zylinderkoordinaten

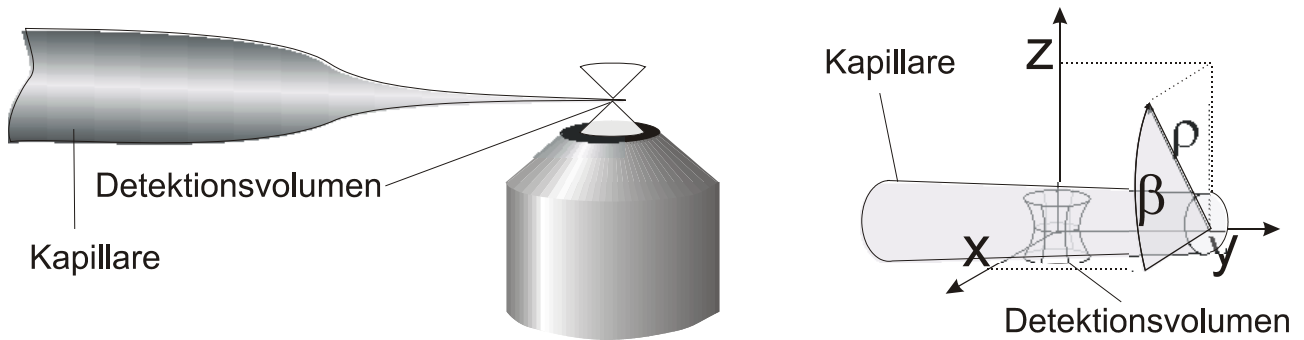


Abbildung 4.2-2 Lage des Femtotips in der Apparatur und Einführung von Zylinderkoordinaten

Da die Kapillare als Zylinder betrachtet wird, ist die Einführung von Zylinderkoordinaten (Abbildung 4.2-2) zweckmäßig, um die Randbedingungen der Diffusionsgleichung zu beschreiben. Die Transformationsgleichungen von den kartesischen Koordinaten x, y, z auf die Zylinderkoordinaten ρ, β, y lauten:

$$\rho = \sqrt{x^2 + z^2} \quad \beta = \arctan \frac{z}{x} \quad y = y \quad (4.2-2a)$$

bzw.

$$x = \rho \cos \beta \quad y = y \quad z = \rho \sin \beta \quad (4.2-2b)$$

(Üblicherweise wird die kartesische z -Koordinate als Axialkoordinate gewählt. Da aber in allen anderen Abschnitten dieser Arbeit z die Richtung der optischen Achse angibt, soll dies auch hier beibehalten werden. Der Azimut wird normalerweise mit φ bezeichnet. Da der Buchstabe φ in der Theorie der FCS aber für die Teilchenzahldichteschwankungskorrelation verwendet wird, soll der Azimut hier β heißen, um Verwechslungen zu vermeiden.)

In der Kapillare findet zusätzlich zur Diffusion ein gerichteter Teilchenstrom statt. Daher muß die modifizierte Diffusionsgleichung des Abschnitts 2.6.2 verwendet werden:

$$\frac{\partial \delta c}{\partial t} = D \nabla^2 \delta c - \vec{V} \nabla \delta c$$

Der Laplace-Operator nimmt in Zylinderkoordinaten die Form

$$\nabla^2 c = \left(\frac{\partial^2 c}{\partial \rho^2} \right)_{\beta, y} + \frac{1}{\rho} \left(\frac{\partial c}{\partial \rho} \right)_{\beta, y} + \frac{1}{\rho^2} \left(\frac{\partial^2 c}{\partial \beta^2} \right)_{\rho, y} + \left(\frac{\partial^2 c}{\partial y^2} \right)_{\rho, \beta}$$

an [Bronstein 2001 S. 676], während der Nabla-Operator durch

$$\nabla c = \left(\frac{\partial c}{\partial \rho} \right)_{\beta, y} \hat{\rho} + \frac{1}{\rho} \left(\frac{\partial c}{\partial \beta} \right)_{\rho, y} \hat{\beta} + \left(\frac{\partial c}{\partial y} \right)_{\rho, \beta} \hat{y}$$

gegeben ist [Bronstein 2001 S. 670].

Die Azimut-Komponente des Geschwindigkeitsfeldes V_β muß aus Symmetriegründen Null sein, während die Radialkomponente V_ρ vernachlässigbar ist. Es bleibt die Axialkomponente $V_y = V$:

$$\vec{V} = V_\rho \hat{\rho} + V_y \hat{y} \approx V \hat{y}$$

4.2.1 Allgemeiner Lösungsansatz

Zunächst soll ein Verfahren angegeben werden, mit dessen Hilfe die Korrelationsfunktion unabhängig von der speziellen Form des Detektionsvolumens errechnet werden kann. Im nächsten Abschnitt (4.2.2) wird eine Lösung für ein Gauß-förmiges Detektionsvolumen erarbeitet.

Diffusionsgleichung und Randbedingungen

Bei axialem Fluß ergibt sich mit den transformierten Differentialoperatoren in Zylinderkoordinaten die Diffusionsgleichung zu:

$$\left(\frac{\partial \delta c}{\partial t}\right)_{\rho, \beta, y} = D \left[\left(\frac{\partial^2 \delta c}{\partial \rho^2}\right)_{\beta, y, t} + \frac{1}{\rho} \left(\frac{\partial \delta c}{\partial \rho}\right)_{\beta, y, t} + \frac{1}{\rho^2} \left(\frac{\partial^2 \delta c}{\partial \beta^2}\right)_{\rho, y, t} + \left(\frac{\partial^2 \delta c}{\partial y^2}\right)_{\rho, \beta, t} \right] - V \left(\frac{\partial \delta c}{\partial y}\right)_{\rho, \beta, t} \quad (4.2.1-1)$$

Es sind folgende Randbedingungen zu stellen:

1) Die Schwankungen senkrecht zur Kapillarwand müssen an dieser verschwinden:

$$\frac{\partial}{\partial \rho} \delta C(\rho, \beta, y, t) = 0 \quad @ \quad \rho = L \quad (4.2.1-2a)$$

2) Die Funktion muß invariant gegen eine Azimutverschiebung um ganzzahlige Vielfache von 2π sein:

$$\delta C(\rho, \beta, y, t) = \delta C(\rho, \beta + 2\pi, y, t) \quad (4.2.1-2b)$$

Der Lösungsweg des Abschnitts 2.6 ist hier nicht zielführend, da die Terme $(1/\rho)(\partial \delta c / \partial \rho)$ und $(1/\rho^2)(\partial^2 \delta c / \partial \rho^2)$ bei der Fouriertransformation nicht aufgelöst werden.

Berechnung der Signalkorrelationsfunktion aus F

Statt der Konzentrationskorrelationsfunktion $\varphi(\mathbf{r}, \mathbf{r}', \tau) = \langle \delta C(\mathbf{r}, 0) \delta C(\mathbf{r}', \tau) \rangle$ wird das Integral

$$F(\vec{r}, t) = \frac{1}{C} \iiint_{\vec{r}'} \varphi(\vec{r}, \vec{r}', t) De(\vec{r}') d^3 \vec{r}' \quad (4.2.1-3)$$

zur Berechnung der Signalkorrelationsfunktion herangezogen [Enderlein 2002]. Da $\varphi(\mathbf{r}, \mathbf{r}', 0) = \langle C \rangle \delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}')$ (Gleichung 2.6.1-9) ist, folgt

$$F(\vec{r}, 0) = \frac{1}{C} \iiint_{\vec{r}'} \bar{C} \delta(\vec{r} - \vec{r}') De(\vec{r}') d^3 \vec{r}' = De(\vec{r}) \quad (4.2.1-4)$$

Die Signalkorrelationsfunktion ergibt sich aus F über

$$\begin{aligned} G(\tau) &= \frac{\langle \delta I(\tau) \delta I(0) \rangle}{\langle I \rangle^2} = \frac{1}{I^2} \iiint_{\vec{r}} \iiint_{\vec{r}'} De(\vec{r}) De(\vec{r}') \varphi(\mathbf{r}, \mathbf{r}', \tau) d^3 \vec{r}' d^3 \vec{r} \quad (\text{Vgl. 2.6-6}) \\ &= \frac{1}{I^2} \iiint_{\vec{r}} De(\vec{r}) \iiint_{\vec{r}'} De(\vec{r}') \varphi(\mathbf{r}, \mathbf{r}', \tau) d^3 \vec{r}' d^3 \vec{r} \end{aligned}$$

Substitution des inneren Integrals durch die Gleichung 4.2.1-3 führt zu

$$G(\tau) = \frac{1}{I^2} \iiint_{\vec{r}} De(\vec{r}) \bar{C} F(\vec{r}, \tau) d^3 \vec{r}$$

Nach der Gleichung 4.2.1-4 kann $De(\mathbf{r})$ durch $F(\mathbf{r}, 0)$ substituiert werden:

$$G(\tau) = \frac{\bar{C}}{I^2} \iiint_{\vec{r}} F(\vec{r}, 0) F(\vec{r}, \tau) d^3 \vec{r} \quad (4.2.1-5)$$

F ist selbst eine Lösung der Differentialgleichung 4.2.1-1 mit den Randbedingungen 4.2.1-2a+b und der Startbedingung 4.2.1-4:

$$\frac{\partial F}{\partial t} = D \nabla^2 F - \vec{V} \nabla F \quad (4.2.1-6)$$

$$\frac{\partial}{\partial \rho} F(\rho, \beta, y, t) = 0 \quad @ \quad \rho = L \quad (4.2.1-7a)$$

$$F(\rho, \beta, y, t) = F(\rho, \beta + 2\pi, y, t) \quad (4.2.1-7b)$$

Um Gleichung 4.2.1-6 plausibel zu machen, wird die Definitionsgleichung von F, Gleichung 4.2.1-3, in die zu beweisende Gleichung 4.2.1-6 mit $\varphi(\vec{r}, \vec{r}', t) = \langle \delta C(\vec{r}, 0) \delta C(\vec{r}', t) \rangle = \langle \delta C(\vec{r}, t) \delta C(\vec{r}', 0) \rangle$ eingesetzt:

$$0 \stackrel{?}{=} D\nabla^2 F - \bar{V}\nabla F - \frac{\partial F}{\partial t} = \hat{O}F$$

Der Index \vec{r} am Nabla-Operator soll dabei bedeuten, daß die Ableitung nach den Koordinaten \vec{r} (und nicht nach \vec{r}') erfolgt. Da Mittelwertbildung, Integration und Differentiation lineare Operationen sind, darf ihre Reihenfolge vertauscht werden: $\hat{O}\int\langle\dots\rangle = \int\langle\hat{O}\dots\rangle$

$$\bar{C}\hat{O}F = \left\langle \iiint_{\vec{r}'} D\nabla_{\vec{r}}^2 \delta C(\vec{r}, t) \delta C(\vec{r}', 0) De(\vec{r}') - \bar{V}\nabla_{\vec{r}} \delta C(\vec{r}, t) \delta C(\vec{r}', 0) De(\vec{r}') - \frac{\partial}{\partial t} \delta C(\vec{r}, t) \delta C(\vec{r}', 0) De(\vec{r}') d^3 \vec{r}' \right\rangle$$

Als nächstes werden alle Funktionen, auf die die Differentialoperatoren keine Wirkung haben, vor diese gezogen:

$$\bar{C}\hat{O}F = \left\langle \iiint_{\vec{r}'} \delta C(\vec{r}', 0) De(\vec{r}') D\nabla_{\vec{r}}^2 \delta C(\vec{r}, t) - \delta C(\vec{r}', 0) De(\vec{r}') \bar{V}\nabla_{\vec{r}} \delta C(\vec{r}, t) - \delta C(\vec{r}', 0) De(\vec{r}') \frac{\partial}{\partial t} \delta C(\vec{r}, t) d^3 \vec{r}' \right\rangle$$

Anschließend werden alle r' – unabhängigen Terme aus dem Integral gezogen:

$$\bar{C}\hat{O}F = \left\langle \left[D\nabla_{\vec{r}}^2 \delta C(\vec{r}, t) - \frac{\partial}{\partial t} \delta C(\vec{r}, t) - \bar{V}\nabla_{\vec{r}} \delta C(\vec{r}, t) \right] \iiint_{\vec{r}'} \delta C(\vec{r}', 0) De(\vec{r}') d^3 \vec{r}' \right\rangle$$

$$\bar{C}\hat{O}F = \left\langle \left[\hat{O}\delta C(\vec{r}, t) \right] \iiint_{\vec{r}'} \delta C(\vec{r}', 0) De(\vec{r}') d^3 \vec{r}' \right\rangle$$

Da $\hat{O}\delta C$ definitionsgemäß kongruent gleich Null ist, ist Gleichung 4.2.1-6 damit für alle $\bar{C} > 0$ bewiesen.

Entwicklung von F aus Eigenfunktionen des Differentialoperators $D\nabla^2 - V\nabla$

Da der Differentialoperator auf der rechten Seite von Gleichung 4.2-7 linear ist

$$[D\nabla^2 - V\nabla](\Psi_1 + \Psi_2) = [D\nabla^2 + V\nabla]\Psi_1 + [D\nabla^2 - V\nabla]\Psi_2,$$

kann eine allgemeine Lösung von F als Reihe von Eigenfunktionen des Differentialoperators $[D\nabla^2 - V\nabla]$ mit 4.2.1-7a und -7b als Randbedingungen entwickelt werden. Diese Eigenfunktionen sind durch

$$\psi_{n,\alpha,q}(\rho, \beta, y, t) = J_n\left(\frac{k_{n,\alpha}}{L}\rho\right) \exp[iq(y - Vt) + in\beta] \quad (4.2.1-8)$$

gegeben [Enderlein 2002].

Dabei bezeichnet J_n die Besselfunktion n-ter Ordnung erster Gattung. Die Indizes der Eigenfunktionen sind $\alpha \in \mathbb{N} \setminus 0$, $n \in \mathbb{Z}$ und $q \in \mathbb{R}$. α und n sind diskret, da die Randbedingungen 4.2.1-7a und 4.2.1-7b erfüllt werden müssen. α entspricht dabei der transformierten

Radialkoordinate ρ , während der transformierte Azimut β durch n und die transformierte Axialkoordinate y durch q gegeben ist.

Um die Randbedingung (4.2.1-7a) zu erfüllen, müssen die $k_{n,\alpha}$ die diskreten Lösungen der transzendenten Gleichung 4.2.1-9 sein:

$$\frac{\partial J_n\left(k_{n,\alpha} \frac{\rho}{L}\right)}{\partial \rho} = 0 \quad @ \quad \rho = L \quad (4.2.1-9)$$

Die J_n können durch

$$J_n(x) = \frac{(-i)^n}{\pi} \int_0^\pi e^{ix \cos \phi} \cos(n\phi) d\phi \quad (4.2.1-10)$$

dargestellt werden. [Bronstein 2001, Gl. 9.54f, S. 528]]

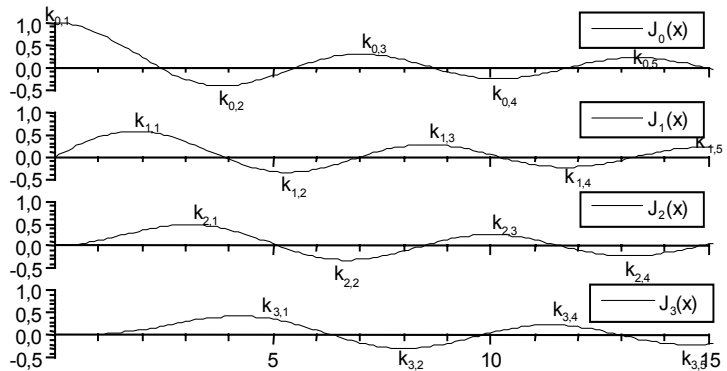


Abb. 4.2.1-3 Drei Besselfunktionen mit ihren Extrema $k_{n,\alpha}$

$k_{n,\alpha}$ ist also der Abszissenwert des α -ten Extremums der Besselfunktion n -ter Ordnung (s. Abbildung 4.2.1-3). Da $J_{-n}(x) = (-1)^n J_n(x)$, gilt $k_{-n,\alpha} = k_{n,\alpha}$.

Berechnung der Eigenwerte

Anwenden von $D\nabla^2 + V\nabla$ auf Ψ ergibt:

$$\left[D\nabla^2 + V\nabla \right] \Psi = D \left[\left(\frac{\partial^2 \Psi}{\partial \rho^2} \right)_{\beta,y,t} + \frac{1}{\rho} \left(\frac{\partial \Psi}{\partial \rho} \right)_{\beta,y,t} + \frac{1}{\rho^2} \left(\frac{\partial^2 \Psi}{\partial \beta^2} \right)_{\rho,y,t} + \left(\frac{\partial^2 \Psi}{\partial y^2} \right)_{\rho,\beta,t} \right] - V \left(\frac{\partial \Psi}{\partial y} \right)_{\rho,\beta,t}.$$

Berechnung der Ableitungen:

$$\frac{\partial^2 \Psi}{\partial \rho^2} = \exp[iq(y - Vt) + in\beta] \frac{\partial^2 J_n\left(\frac{k_{n,\alpha}}{L} \rho\right)}{\partial \rho^2}$$

Durch zweimalige Anwendung von $J_n'(ax) = -n/x J_n(ax) + a J_{n-1}(ax)$ und $J_{n-2}(ax) = 2(n-1)/(ax) J_{n-1}(ax) - J_n(ax)$ [Bronstein 2001, Gl. 9.54a, S.528] erhält man für die zweite Ableitung der Besselfunktion nach ρ :

$$\frac{\partial^2 \Psi}{\partial \rho^2} = \exp[iq(y - Vt) + in\beta] \left[\left(\frac{n(n+1)}{\rho^2} - \frac{k_{n,\alpha}^2}{L^2} \right) J_n\left(\frac{k_{n,\alpha}}{L} \rho\right) - \frac{k_{n,\alpha}}{\rho L} J_{n-1}\left(\frac{k_{n,\alpha}}{L} \rho\right) \right]$$

Die übrigen Terme errechnen sich zu:

$$\frac{1}{\rho} \frac{\partial \psi}{\partial \rho} = \exp[iq(y-Vt) + in\beta] \left[\frac{k_{n,\alpha}}{\rho L} J_{n-1} \left(\frac{k_{n,\alpha}}{L} \rho \right) - \frac{n}{\rho^2} J_n \left(\frac{k_{n,\alpha}}{L} \rho \right) \right]$$

$$\frac{1}{\rho^2} \frac{\partial^2 \psi}{\partial \beta^2} = J_n \left(\frac{k_{n,\alpha}}{L} \rho \right) \exp[iq(y-Vt) + in\beta] \left(\frac{-n^2}{\rho^2} \right) = -\frac{n^2}{\rho^2} \psi$$

$$\frac{\partial^2 \psi}{\partial y^2} = -q^2 \psi$$

$$\frac{\partial \psi}{\partial y} = iq \psi$$

Damit erhält man

$$\begin{aligned} [D\nabla^2 - V\nabla] \psi &= D \left\{ \exp[iq(y-Vt) + in\beta] \left[\left(\frac{n(n+1)}{\rho^2} - \frac{k_{n,\alpha}^2}{L^2} \right) J_n \left(\frac{k_{n,\alpha}}{L} \rho \right) - \frac{k_{n,\alpha}}{\rho L} J_{n-1} \left(\frac{k_{n,\alpha}}{L} \rho \right) \right] \right. \\ &\quad \left. + \exp[iq(y-Vt) + in\beta] \left[-\frac{n}{\rho^2} J_n \left(\frac{k_{n,\alpha}}{L} \rho \right) + \frac{k_{n,\alpha}}{\rho L} J_{n-1} \left(\frac{k_{n,\alpha}}{L} \rho \right) \right] \right. \\ &\quad \left. - \left(\frac{n}{\rho} \right)^2 \psi - q^2 \psi \right\} - iVq \psi \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} [D\nabla^2 - V\nabla] \psi &= D \left\{ \exp[iq(y-Vt) + in\beta] \left[\left(\frac{n^2}{\rho^2} - \frac{k_{n,\alpha}^2}{L^2} \right) J_n \left(\frac{k_{n,\alpha}}{L} \rho \right) \right] \right. \\ &\quad \left. - \left(\frac{n}{\rho} \right)^2 \psi - q^2 \psi \right\} - iVq \psi \end{aligned}$$

$$[D\nabla^2 - V\nabla] \psi = D \left\{ \left(\frac{n^2}{\rho^2} - \frac{k_{n,\alpha}^2}{L^2} \right) \psi - \left(\frac{n}{\rho} \right)^2 \psi - q^2 \psi \right\} - iVq \psi$$

$$[D\nabla^2 + V\nabla] \psi = \left[-D \left(\frac{k_{n,\alpha}^2}{L^2} + q^2 \right) - iVq \right] \psi = \lambda_{n,\alpha,q} \Psi_{n,\alpha,q}(\rho, \beta, y, t) \quad (4.2.1-11)$$

Wie man sieht, ist $\Psi_{n,\alpha,q}$ also tatsächlich eine Eigenfunktion zu $D\nabla^2 + V\nabla$ mit dem Eigenwert

$$\lambda_{n,\alpha,q} = - \left(D \left(\frac{k_{n,\alpha}^2}{L^2} + q^2 \right) + iVq \right) \quad (4.2.1-12)$$

Produktansatz $F(\rho, \beta, y, t) = \Psi(\rho, \beta, y, t) \theta(t)$

Setzt man F als Produkt einer ortsunabhängigen Funktion $\theta(t)$ und der ortsabhängigen Funktion $\Psi(\rho, \beta, y, t)$ an, so erhält man durch Einsetzen von

$$F = F(\rho, \beta, y, t) = \Psi(\rho, \beta, y, t) \theta(t) \quad (4.2.1-13)$$

in Gleichung 4.2.1-6:

$$\frac{\partial \Psi \theta}{\partial t} = \theta [D \nabla^2 - \vec{V} \nabla] \Psi$$

mit Gleichung 4.2.1-11 und $\partial \Psi / \partial t = -iqV\Psi$ (abgeleitet von Gleichung 4.2.1-8) erhält man:

$$\Psi \frac{\partial \theta}{\partial t} + \theta \frac{\partial \Psi}{\partial t} = \theta \lambda_{n,\alpha,q} \Psi$$

$$\Psi \frac{\partial \theta}{\partial t} - \theta iqV\Psi = \theta \lambda_{n,\alpha,q} \Psi$$

$$\frac{\partial \theta}{\partial t} = \theta (\lambda_{n,\alpha,q} + iqV)$$

Damit ergibt sich die allgemeine Lösung für die ortsunabhängige Funktion zu

$$\theta = \theta_0 \exp(\lambda_{n,\alpha,q} + iqV)t$$

Einsetzen von Gleichung 4.2.1-12 und Normierung von Ψ auf $\theta_0 = \theta(t=0) = 1$ führt zu:

$$\theta(t) = \exp\left(-Dt \left(\frac{k_{n,\alpha}^2}{L^2} + q^2\right)\right) \quad (4.2.1-14)$$

Normierung der Transformation und Orthogonalität der $\Psi_{n,\alpha,q}(\rho, \beta, y, t)$

Die Ψ bilden eine vollständige orthogonale Basis für eine Reihenentwicklung von F in den Koordinaten n und α bzw. einen deltagonalen Kern für eine Integraltransformation in q, wie die Integration von $\Psi^* \Psi$ (wobei * für komplexe Konjugation steht) über das Volumen $dV = \rho d\rho d\beta dq$ zeigt:

$$\int_{\rho=0}^L \int_{\beta=0}^{2\pi} \int_{y=-\infty}^{\infty} \Psi_{n,\alpha,q}^*(\rho, \beta, y, t) \Psi_{n',\alpha',q'}(\rho, \beta, y, t) dy d\beta d\rho$$

$$= \int_{\rho=0}^L J_n\left(\frac{k_{n,\alpha}}{L}\rho\right) J_{n'}\left(\frac{k_{n',\alpha'}}{L}\rho\right) \rho d\rho \int_{\beta=0}^{2\pi} e^{-in\beta+in'\beta} d\beta \int_{y=-\infty}^{\infty} e^{-iq(y-Vt)+iq'(y-V't)} dy$$

mit $\rho'=\rho/L$ vereinfacht sich das erste Integral, und man erhält

$$\iiint \psi^* \psi d^3\vec{r} = L^2 \int_{\rho'=0}^1 J_n(k_{n,\alpha}\rho') J_{n'}(k_{n',\alpha'}\rho') \rho' d\rho' \int_{\beta=0}^{2\pi} e^{-in\beta+in'\beta} d\beta \int_{y=-\infty}^{\infty} e^{-iq(y-Vt)+iq'(y-V't)} dy$$

Aufgrund des Kronecker-Symbols $\delta_{n,n'}$ im zweiten Term müssen nur die Integrale $J_n(\dots)J_{n'}(\dots)$ mit $n = n'$ berücksichtigt werden:

$$\iiint \psi^* \psi d^3\vec{r} = L^2 \int_{\rho'=0}^1 J_n(k_{n,\alpha}\rho') J_n(k_{n,\alpha'}\rho') \rho' d\rho' \{2\pi\delta_{n,n'}\} \{2\pi\delta(q-q')\}$$

Damit lässt sich auch für das erste Integral eine analytische Lösung angeben [Abramowitz 1972, Gl. 11.4.5 (S.485)]:

Für positive reelle Lösungen $\kappa_1, \kappa_2, \kappa_3, \dots$ von

$aJ_\nu(x) + bxJ_\nu'(x) = 0$, wobei a, b, ν reelle Konstanten sind, gilt:

$$\int_0^1 J_\nu(\kappa_n t) J_\nu(\kappa_m t) t dt = \begin{cases} 0 & \text{falls } \nu > -1 \wedge m \neq n \\ \frac{1}{2} [J_\nu'(\kappa_n)]^2 & \text{falls } \nu > -1 \wedge m = n \wedge b = 0 \\ \frac{1}{2\kappa_n^2} \left[\frac{a^2}{b^2} + \kappa_n^2 - \nu^2 \right] [J_\nu(\kappa_n)]^2 & \text{falls } \nu \geq -1 \wedge m = n \wedge b \neq 0 \end{cases}$$

Die Beschränkung des Gültigkeitsbereiches auf $\nu > -1$ stört hier nicht. Weil für ganzzahlige ν

$J_\nu(x) = (-1)^\nu J_\nu(x)$ gilt, kann das Integral $\int_{\rho'=0}^1 J_{-n}(k_{-n,\alpha}\rho) J_{-n}(k_{-n,\alpha'}\rho') \rho' d\rho'$

$= (-1)^{2n} \int_{\rho'=0}^1 J_n(k_{n,\alpha}\rho) J_n(k_{n,\alpha'}\rho') \rho' d\rho'$ durch Substitution von n durch $-n$ auch für alle $n < 0$ gelöst

werden.

Die im Kasten angegebene Bedingung ist für $a = 0$ und beliebige b erfüllt. Nach Gleichung 4.2.1-9 ist $J_n(\kappa_{n,\alpha}) = 0$. Daher ist $x = \kappa_{n,\alpha}$ für $a = 0$ Lösung von $aJ_n(x) + bxJ_n'(x) = 0$. Falls auch $b = 0$ gewählt wird, ergibt sich für die Bedingung die triviale Lösung $0 = 0$. Daher findet zur Berechnung des Integrals die unterste Formel ($b \neq 0$) Anwendung. Damit erhält man:

$$\begin{aligned} \iiint \psi^* \psi d^3\vec{r} &= L^2 \left\{ \frac{1}{2} \left(1 - \frac{n^2}{k_{n,\alpha}^2} \right) J_n^2(k_{n,\alpha}) \delta_{\alpha,\alpha'} \right\} \{ 2\pi \delta_{n,n'} \} \{ 2\pi \delta(q-q') \} \\ &= 2\pi^2 L^2 \left(1 - \frac{n^2}{k_{n,\alpha}^2} \right) J_n^2(k_{n,\alpha}) \delta_{n,n'} \delta_{\alpha,\alpha'} \delta(q-q') \end{aligned} \quad (4.2.1-15)$$

Der Term vor den Kronecker-Symbolen und der Diracschen Deltafunktion gibt den Normierungsfaktor der Transformation wieder.

Transformationsgleichungen

Die Funktion F ergibt sich somit zu

$$F(\rho, \beta, y, t) = \sum_{n=-\infty}^{\infty} \sum_{\alpha=1}^{\infty} \frac{1}{\sqrt{2\pi L} J_n(k_{n,\alpha}) \sqrt{1 - \frac{n^2}{k_{n,\alpha}^2}}} \int_{q=-\infty}^{\infty} \tilde{F}_{n,\alpha}(q) \psi_{n,\alpha,q}(\rho, \beta, y, t) \theta(t) dq \quad (4.2.1-16)$$

Ausformuliert erhält man

$$F(\rho, \beta, y, t) = \sum_{n=-\infty}^{\infty} \sum_{\alpha=1}^{\infty} \frac{1}{\sqrt{2\pi L} J_n(k_{n,\alpha}) \sqrt{1 - \frac{n^2}{k_{n,\alpha}^2}}} \int_{q=-\infty}^{\infty} \tilde{F}_{n,\alpha}(q) J_n\left(k_{n,\alpha} \frac{\rho}{L}\right) e^{iq(y-Vt)+in\beta} e^{-D\left(\frac{k_{n,\alpha}^2}{L^2}+q^2\right)t} dq \quad (4.2.1-17)$$

F ist nach Gleichung 4.2.1-3 eine reelle Funktion. Da Ψ eine komplexe Funktion ist, muß die transformierte $\tilde{F}_{n,\alpha}(q)$ bestimmte Symmetrieeigenschaften aufweisen, damit Gleichung 4.2.1-16 reell wird. Aus $\Psi_{n,\alpha,q} = \Psi_{-n,\alpha,q}^*$ folgt $\tilde{F}_{n,\alpha}(q) = \tilde{F}_{-n,\alpha}^*(q)$. Aus $\Psi_{n,\alpha,q} = \Psi_{n,\alpha,-q}^*$ folgt $\tilde{F}_{n,\alpha}(q) = \tilde{F}_{n,\alpha}^*(-q)$. Dann kürzen sich die Imaginärteile der Summenglieder über n bzw. die imaginären Flächen von $-q$ bis 0 und von 0 bis q weg.

Die Rücktransformation ist entsprechend durch

$$\tilde{F}_{n,\alpha}(q) = \frac{1}{\theta(t)} \frac{1}{\sqrt{2\pi L} J_n(k_{n,\alpha}) \sqrt{1 - \frac{n^2}{k_{n,\alpha}^2}}} \int_{\rho=0}^L \int_{\beta=0}^{2\pi} \int_{y=-\infty}^{\infty} \rho F(\rho, \beta, y, t) \psi_{n,\alpha,q}^*(\rho, \beta, y, t) dy d\beta d\rho \quad (4.2.1-18)$$

gegeben.

Berechnung der Signalkorrelationsfunktion aus der transformierten Funktion \tilde{F}

Setzt man Gleichung 4.2.1-16 in Gleichung 4.2.1-5 ($G(\tau) = \frac{\bar{C}}{\bar{I}^2} \iiint_{\vec{r}} F(\vec{r}, 0) F(\vec{r}, \tau) d^3\vec{r}$) ein, so erhält man für die Autokorrelationsfunktion der Fluoreszenzintensität

$$G(\tau) = \frac{\bar{C}}{\bar{I}^2} \iiint_{\vec{r}} \left\{ \sum_{n=-\infty}^{\infty} \sum_{\alpha=1}^{\infty} \frac{1}{\sqrt{2\pi L J_n(k_{n,\alpha})} \sqrt{1 - \frac{n^2}{k_{n,\alpha}^2}}} \int_{q=-\infty}^{\infty} \tilde{F}_{n,\alpha}(q) \psi_{n,\alpha,q}(\vec{r}, 0) dq \right\} \left\{ \sum_{n'=-\infty}^{\infty} \sum_{\alpha'=1}^{\infty} \frac{1}{\sqrt{2\pi L J_{n'}(k_{n',\alpha'})} \sqrt{1 - \frac{n'^2}{k_{n',\alpha'}^2}}} \int_{q'=-\infty}^{\infty} \tilde{F}_{n',\alpha'}(q') \psi_{n',\alpha',q'}(\vec{r}, \tau) \theta(\tau) dq' \right\} d^3\vec{r}$$

Die geschweiften Klammern werden ausmultipliziert und die Grenzen der Summe über n mit $\tilde{F}_{-n',\alpha} = \tilde{F}_{n',\alpha}^*$ und $\Psi_{n',\alpha,q} = \Psi_{-n',\alpha,q}^*$ umgekehrt.

$$G(\tau) = \frac{\bar{C}}{\bar{I}^2} \iiint_{\vec{r}} \sum_{n=-\infty}^{\infty} \sum_{\alpha=1}^{\infty} \sum_{n'=-\infty}^{\infty} \sum_{\alpha'=1}^{\infty} \frac{1}{\sqrt{2\pi L J_n(k_{n,\alpha})} \sqrt{1 - \frac{n^2}{k_{n,\alpha}^2}}} \frac{1}{\sqrt{2\pi L J_{n'}(k_{n',\alpha'})} \sqrt{1 - \frac{n'^2}{k_{n',\alpha'}^2}}} \int_{q=-\infty}^{\infty} \int_{q'=-\infty}^{\infty} \tilde{F}_{-n,\alpha}^*(q) \tilde{F}_{n',\alpha'}(q') \psi_{-n,\alpha,q}^*(\vec{r}, 0) \psi_{n',\alpha',q'}(\vec{r}, \tau) \theta(\tau) dq dq' d^3\vec{r}$$

Dadurch kann man die Orthogonalität von Ψ auszunutzen. Zunächst zieht man die Integration über $d^3\vec{r}$ in das innerste Integral, da dort die einzigen ortsabhängigen Funktionen, nämlich $\Psi_{n',\alpha',q'}(\vec{r}, \tau)$ und $\Psi_{-n,\alpha,q}^*(\vec{r}, 0)$ stehen. Dabei wird $\Psi_{n',\alpha',q'}(\vec{r}, \tau) = \Psi_{n',\alpha',q'}(\vec{r}, 0) e^{-iq'V\tau}$ (s. Gleichung 4.2.1-8) substituiert:

$$G(\tau) = \frac{\bar{C}}{\bar{I}^2} \sum_{n=-\infty}^{\infty} \sum_{\alpha=1}^{\infty} \sum_{n'=-\infty}^{\infty} \sum_{\alpha'=1}^{\infty} \frac{1}{\sqrt{2\pi L J_n(k_{n,\alpha})} \sqrt{1 - \frac{n^2}{k_{n,\alpha}^2}}} \frac{1}{\sqrt{2\pi L J_{n'}(k_{n',\alpha'})} \sqrt{1 - \frac{n'^2}{k_{n',\alpha'}^2}}} \int_{q=-\infty}^{\infty} \int_{q'=-\infty}^{\infty} \tilde{F}_{-n,\alpha}^*(q) \tilde{F}_{n',\alpha'}(q') e^{-iq'V\tau} \iiint_{\vec{r}} \psi_{n',\alpha',q'}(\vec{r}, 0) \psi_{-n,\alpha,q}^*(\vec{r}, 0) d^3\vec{r} \theta(\tau) dq dq'$$

Das Integral über das Volumen ($\iiint_{\vec{r}} \dots d^3\vec{r}$) entspricht nun der linken Seite von Gleichung 4.2.1-15.

Es wird substituiert:

$$G(\tau) = \frac{\bar{C}}{\bar{I}^2} \sum_{n=-\infty}^{\infty} \sum_{\alpha=1}^{\infty} \sum_{n'=-\infty}^{\infty} \sum_{\alpha'=1}^{\infty} \frac{1}{\sqrt{2\pi L J_n(k_{n,\alpha})} \sqrt{1 - \frac{n^2}{k_{n,\alpha}^2}}} \frac{1}{\sqrt{2\pi L J_{n'}(k_{n',\alpha'})} \sqrt{1 - \frac{n'^2}{k_{n',\alpha'}^2}}} \int_{q=-\infty}^{\infty} \int_{q'=-\infty}^{\infty} \tilde{F}_{-n,\alpha}^*(q) \tilde{F}_{n',\alpha'}(q') e^{-iq'V\tau} 2\pi^2 L^2 \left(1 - \frac{n^2}{k_{n,\alpha}^2}\right) J_n^2(k_{n,\alpha}) \delta_{n,n'} \delta_{\alpha,\alpha'} \delta(q-q') \theta(\tau) dq dq'$$

Die Kronecker-Symbole bewirken, daß alle Terme mit $n \neq -n'$ oder $\alpha \neq \alpha'$ wegfallen, und die Diracsche Deltafunktion eliminiert das Integral über q' :

$$G(\tau) = \frac{\bar{C}}{\bar{I}^2} \sum_{n=-\infty}^{\infty} \sum_{\alpha=1}^{\infty} \frac{1}{2\pi^2 L^2 J_n^2(k_{n,\alpha}) \left(1 - \frac{n^2}{k_{n,\alpha}^2}\right)} \int_{q=-\infty}^{\infty} \tilde{F}_{-n,\alpha}^*(q) \tilde{F}_{-n,\alpha}(q) e^{-iqV\tau} 2\pi^2 L^2 \left(1 - \frac{n^2}{k_{n,\alpha}^2}\right) J_n^2(k_{n,\alpha}) \theta(\tau) dq$$

Der q-unabhängige Normierungsfaktor kürzt sich weg und mit $\theta(\tau) = e^{-D\tau \left(\frac{k_{n,\alpha}^2}{L^2} + q^2\right)}$ erhält man schließlich:

$$G(\tau) = \frac{\bar{C}}{\bar{I}^2} \sum_{n=-\infty}^{\infty} \sum_{\alpha=1}^{\infty} \exp\left(-\frac{D\tau}{L^2} k_{n,\alpha}^2\right) \int_{q=-\infty}^{\infty} \tilde{F}_{n,\alpha}^*(q) \tilde{F}_{-n,\alpha}(q) \exp(-D\tau q^2 - iqV\tau) dq \quad (4.2.1-19)$$

Die transformierte Funktion \tilde{F} ist über die Startbedingung (Gleichung 4.2.1-4) durch die inverse Transformation (Gleichung 4.2.1-18) zugänglich:

$$\tilde{F}_{n,\alpha}(q) = \frac{1}{\sqrt{2\pi L} J_n(k_{n,\alpha}) \sqrt{1 - \frac{n^2}{k_{n,\alpha}^2}}} \int_{\rho=0}^L \int_{\beta=0}^{2\pi} \int_{y=-\infty}^{\infty} \rho F(\rho, \beta, y, 0) \psi_{n,\alpha,q}^*(\rho, \beta, y, 0) dy d\beta d\rho$$

$$\tilde{F}_{n,\alpha}^*(q) = \frac{1}{\sqrt{2\pi L} J_n(k_{n,\alpha}) \sqrt{1 - \frac{n^2}{k_{n,\alpha}^2}}} \int_{\rho=0}^L \int_{\beta=0}^{2\pi} \int_{y=-\infty}^{\infty} \rho De(\rho, \beta, y) J_n\left(\frac{k_{n,\alpha}}{L} \rho\right) \exp[-iqy - in\beta] dy d\beta d\rho \quad (4.2.1-20)$$

4.2.2 Ellipsoid-Gauß-förmiges Detektionsvolumen

Die Annahme, daß die Detektionseffizienz vom Zentrum des Detektionsvolumens Gauß-förmig abfällt, wird in der Literatur weitgehend verwendet. Sie liefert eine befriedigende Beschreibung des zeitlichen Abfalls der Korrelationsfunktion im offenen Volumen.

Dennoch sollte man sich vor Augen halten, daß das Gaußsche Detektionsvolumen selbst ohne zusätzliche Brechung an den Wänden einer Kapillare eine recht grobe Näherung ist. Sie soll hier dennoch verwendet werden, da dadurch wenigstens ein Teil der Mehrfachintegrale analytisch lösbar ist. Zur Berechnung eines bestimmten $\tilde{F}_{n,\alpha}(q)$ muß dann nur ein einfaches Integral numerisch integriert werden.

Der tatsächliche Verlauf der Detektionseffizienz ist sicherlich eine recht komplizierte Funktion des Ortes. Bei dem hier eingesetzten Diodenlaser mit seinem elliptischen Strahlprofil und seinen schlecht definierten Schwingungsmoden wäre die Berechnung der exakten Verlaufs der Detektionseffizienz in der konischen Kapillare sehr schwierig.

Die experimentell gemessenen Korrelationsfunktionen in Kapitel 4.2.5 lassen sich mit der in diesem Kapitel gewonnenen Funktion befriedigend beschreiben. Sie liefern damit eine empirische Bestätigung der Zulässigkeit der Gaußschen Näherung.

Unter der Annahme, die Detektionseffizienz falle von der Mitte aus Gauß-förmig ab, erhält man für die Detektionseffizienz in Zylinderkoordinaten:

$$De(\vec{r}) = De_0 \exp\left[-2\left[\frac{x^2}{\omega_x^2} + \frac{y^2}{\omega_y^2} + \frac{z^2}{\omega_z^2}\right]\right] = De_0 \exp\left[-2\left[\frac{\rho^2 \cos^2 \beta}{\omega_x^2} + \frac{y^2}{\omega_y^2} + \frac{\rho^2 \sin^2 \beta}{\omega_z^2}\right]\right]$$

$$De(\vec{r}) = De_0 e^{-2\frac{y^2}{\omega_y^2}} e^{-2\frac{\rho^2}{\omega_z^2}} \exp\left[-2\rho^2 \frac{\omega_z^2 - \omega_x^2}{\omega_x^2 \omega_z^2} \cos^2 \beta\right] \quad (4.2.2-1)$$

Einsetzen in Gleichung 4.2.1-20 ergibt:

$$\tilde{F}_{n,\alpha}(q) = \frac{1}{\sqrt{2\pi} L J_n(k_{n,\alpha})} \sqrt{1 - \frac{n^2}{k_{n,\alpha}^2}} \int_{\rho=0}^L \int_{\beta=0}^{2\pi} \int_{y=-\infty}^{\infty} \rho De_0 e^{-2\frac{y^2}{\omega_y^2}} e^{-2\frac{\rho^2}{\omega_z^2}} \exp\left[-2\rho^2 \frac{\omega_z^2 - \omega_x^2}{\omega_x^2 \omega_z^2} \cos^2 \beta\right] J_n\left(\frac{k_{n,\alpha}}{L} \rho\right) e^{-iqy} e^{-in\beta} dy d\beta d\rho$$

Das y-Integral läßt sich aus dem Dreifachintegral herausziehen. Durch Aufsuchen der quadratischen Ergänzung im Exponenten ($q^2 \omega_y^2 / 8$) wird es in ein Integral vom Gaußtyp umgewandelt, dessen Wert in den Grenzen von $-\infty$ bis $+\infty$ sich analytisch angeben läßt. Nach Substitution $\rho' = \rho/L$ im ρ -Integral erhält man mit $\rho d\rho = L^2 \rho' d\rho'$:

$$\tilde{F}_{n,\alpha}(q) = \frac{De_0}{\sqrt{2\pi} L J_n(k_{n,\alpha})} \sqrt{1 - \frac{n^2}{k_{n,\alpha}^2}} L^2 \int_{\rho'=0}^1 J_n(k_{n,\alpha} \rho') \rho' e^{-2\frac{L^2 \rho'^2}{\omega_z^2}} \int_{\beta=0}^{2\pi} \exp\left[-2L^2 \rho'^2 \frac{\omega_z^2 - \omega_x^2}{\omega_x^2 \omega_z^2} \cos^2 \beta\right] e^{-in\beta} d\beta d\rho' \cdot e^{-q^2 \omega_y^2 / 8} \omega_y \sqrt{\frac{\pi}{2}}$$

Mit $e^{-in\beta} = \cos(n\beta) - i \sin(n\beta)$ erhält man durch Verschieben der Integrationsgrenzen des β -Integrals um $-\pi$, was den Wert nicht ändert, da die Integration eine volle Periode (2π) umfaßt:

$$\begin{aligned} \tilde{F}_{n,\alpha}(q) &= \frac{De_0 L e^{-q^2 \omega_y^2 / 8} \omega_y}{2\sqrt{\pi} J_n(k_{n,\alpha})} \sqrt{1 - \frac{n^2}{k_{n,\alpha}^2}} \int_{\rho'=0}^1 J_n(k_{n,\alpha} \rho') \rho' e^{-2\frac{L^2 \rho'^2}{\omega_z^2}} \int_{\beta=-\pi}^{\pi} \exp\left[-2L^2 \rho'^2 \frac{\omega_z^2 - \omega_x^2}{\omega_x^2 \omega_z^2} \cos^2 \beta\right] [\cos(\beta) - i \sin(\beta)]^n d\beta d\rho' \\ &= \frac{De_0 L e^{-q^2 \omega_y^2 / 8} \omega_y}{2\sqrt{\pi} J_n(k_{n,\alpha})} \sqrt{1 - \frac{n^2}{k_{n,\alpha}^2}} \int_{\rho'=0}^1 J_n(k_{n,\alpha} \rho') \rho' e^{-2\frac{L^2 \rho'^2}{\omega_z^2}} \int_{\beta=-\pi}^{\pi} \exp\left[-2L^2 \rho'^2 \frac{\omega_z^2 - \omega_x^2}{\omega_x^2 \omega_z^2} \cos^2 \beta\right] [\cos(n\beta) - i \sin(n\beta)] d\beta d\rho' \end{aligned} \quad (4.2.2-2)$$

Da $\sin(n\beta)$ eine ungerade Funktion ist, während $\exp(\dots \cos^2(n\beta))$ eine gerade Funktion ist, muß der imaginäre Term des β -Integrals aus Symmetriegründen wegfallen. Da n im verbleibenden Integranden nur im Kosinus auftritt, ändert das Integral seinen Wert nicht, wenn n durch $-n$ ersetzt wird.

Berechnung des Azimutintegrals

Das β -Integral soll im folgenden mit $B_n(\rho')$ bezeichnet werden. Da $B_n(\rho') = B_{-n}(\rho')$ ist, kann $n \geq 0$ angenommen werden:

$$B_n(\rho') = \int_{\beta=-\pi}^{\pi} \exp\left[-2L^2 \rho'^2 \frac{\omega_z^2 - \omega_x^2}{\omega_x^2 \omega_z^2} \cos^2 \beta\right] \cos(n\beta) d\beta \quad (4.2.2-3)$$

Um weitere Symmetrieeigenschaften auszunutzen, wird $\cos(n\beta)$ zunächst als Potenzreihe von $\cos(\beta)$ und $\sin(\beta)$ entwickelt:

$$B_n(\rho') = \int_{\beta=-\pi}^{\pi} \exp\left[-2L^2\rho'^2 \frac{\omega_z^2 - \omega_x^2}{\omega_x^2\omega_z^2} \cos^2\beta\right] [\cos(\beta) - i\sin(\beta)]^n d\beta$$

Mit $(a+b)^n = \sum_{k=0}^n \binom{n}{k} a^{n-k} b^k$ folgt:

$$B_n(\rho') = \int_{\beta=-\pi}^{\pi} \exp\left[-2L^2\rho'^2 \frac{\omega_z^2 - \omega_x^2}{\omega_x^2\omega_z^2} \cos^2\beta\right] \sum_{k=0}^n \frac{(-i)^k n!}{(n-k)!k!} \cos^{n-k}(\beta) \sin^k(\beta) d\beta$$

Die Summenglieder mit ungeraden $k=2j+1$ ergeben ungerade Funktionen $\cos^{n-2j-1}(\beta)\sin^{2j+1}(\beta)$. Da $\exp(\dots\cos^2(\beta))$ gerade ist, fallen die Summenglieder mit $k=2j+1$; $j=0..\lfloor n/2 \rfloor$ bei der Integration aus Symmetriegründen weg:

$$B_n(\rho') = \int_{\beta=-\pi}^{\pi} \exp\left[-2L^2\rho'^2 \frac{\omega_z^2 - \omega_x^2}{\omega_x^2\omega_z^2} \cos^2\beta\right] \sum_{j=0}^{nDIV2} \frac{(i^2)^j n!}{(n-2j)!(2j)!} \cos^{n-2j}(\beta) \sin^{2j}(\beta) d\beta$$

Der verbleibende Integrand ist gerade:

$$B_n(\rho') = 2 \int_{\beta=0}^{\pi} \exp\left[-2L^2\rho'^2 \frac{\omega_z^2 - \omega_x^2}{\omega_x^2\omega_z^2} \cos^2\beta\right] \sum_{j=0}^{nDIV2} \frac{(-1)^j n!}{(n-2j)!(2j)!} \cos^{n-2j}(\beta) \sin^{2j}(\beta) d\beta$$

Die Substitution $u = \cos(\beta)$, $d\beta = -du/\sin(\beta)$ mit $\sin(\beta) = +\sqrt{1-\cos^2\beta}$ für $0 \leq \beta \leq \pi$ ergibt:

$$B_n(\rho') = -2 \int_{u=1}^{-1} \exp\left[-2L^2\rho'^2 \frac{\omega_z^2 - \omega_x^2}{\omega_x^2\omega_z^2} u^2\right] \sum_{j=0}^{nDIV2} \frac{(-1)^j n!}{(n-2j)!(2j)!} u^{n-2j} (1-u^2)^{j-1/2} du$$

Für ungerade n ist $(u^{n-2j} (1-u^2)^{j-1/2}) \forall j \in \mathbb{Z}$ ungerade, während $\exp(\dots u^2)$ gerade ist. Für ungerade n fallen daher bei der Integration sämtliche Summenglieder weg, und das Integral ergibt 0:

$$B_{2n}(\rho') = 4 \int_{u=0}^1 \exp\left[-2L^2\rho'^2 \frac{\omega_z^2 - \omega_x^2}{\omega_x^2\omega_z^2} u^2\right] \sum_{j=0}^n \frac{(-1)^j (2n)!}{(2n-2j)!(2j)!} u^{2(n-j)} (1-u^2)^{j-1/2} du$$

$$B_{2n+1}(\rho') = 0 \quad (4.2.2-4)$$

Das Integral auf der rechten Seite von $B_{2n}(\rho')$ lässt sich nicht analytisch lösen. Um es auszuwerten gehen wir auf die Formulierung für $B_{2n}(\rho)$ in der Gleichung 4.2.2-3 zurück:

$$B_{2n}(\rho') = \int_{\beta=-\pi}^{\pi} \exp\left[-2L^2\rho'^2 \frac{\omega_z^2 - \omega_x^2}{\omega_x^2\omega_z^2} \cos^2\beta\right] \cos(2n\beta) d\beta$$

Ein Vergleich mit Gleichung 4.2.1-10 lässt die Ähnlichkeit mit der Integraldarstellung der Besselfunktion für ganzzahlige n erkennen. Mit $\cos^2 \beta = \frac{1}{2} \cos(2\beta) + \frac{1}{2}$ [Bronstein 2001, Gl. 2.125, S. 83] erhält man:

$$B_{2n}(\rho') = \int_{\beta=-\pi}^{\pi} \exp\left[-L^2 \rho'^2 \frac{\omega_z^2 - \omega_x^2}{\omega_x^2 \omega_z^2} (\cos(2\beta) + 1)\right] \cos(2n\beta) d\beta$$

$\cos(2\beta)$ ist eine Funktion der Periode π . Man kann daher die Integrationsgrenzen um π verschieben und den β -unabhängigen Summanden in der Exponentialfunktion vor das Integral ziehen:

$$B_{2n}(\rho') = \exp\left[-L^2 \rho'^2 \frac{\omega_z^2 - \omega_x^2}{\omega_x^2 \omega_z^2}\right] \int_{\beta=0}^{2\pi} \exp\left[-L^2 \rho'^2 \frac{\omega_z^2 - \omega_x^2}{\omega_x^2 \omega_z^2} \cos(2\beta)\right] \cos(2n\beta) d\beta$$

Zunächst wird eine Substitution $\beta' = 2\beta$, $d\beta = \frac{1}{2} d\beta'$ durchgeführt, um den Faktor 2 im Cosinus zu eliminieren:

$$B_{2n}(\rho') = \frac{1}{2} \exp\left[-L^2 \rho'^2 \frac{\omega_z^2 - \omega_x^2}{\omega_x^2 \omega_z^2}\right] \int_{\beta'=0}^{4\pi} \exp\left[-L^2 \rho'^2 \frac{\omega_z^2 - \omega_x^2}{\omega_x^2 \omega_z^2} \cos(\beta')\right] \cos(n\beta') d\beta'$$

Das Integral umfaßt zwei volle Perioden von $\cos(\beta)$ und ein geradzahliges Vielfaches der Periode von $\cos(n\beta)$. Man kann daher mit $\int_0^{2\pi} \dots d\beta = \int_{2\pi}^{4\pi} \dots d\beta$ die obere Integrationsgrenze halbieren:

$$\begin{aligned} B_{2n}(\rho') &= \exp\left[-L^2 \rho'^2 \frac{\omega_z^2 - \omega_x^2}{\omega_x^2 \omega_z^2}\right] \int_{\beta'=0}^{2\pi} \exp\left[-L^2 \rho'^2 \frac{\omega_z^2 - \omega_x^2}{\omega_x^2 \omega_z^2} \cos(\beta')\right] \cos(n\beta') d\beta' \\ &= \exp\left[-L^2 \rho'^2 \frac{\omega_z^2 - \omega_x^2}{\omega_x^2 \omega_z^2}\right] \left\{ \int_{\beta'=0}^{\pi} \exp\left[-L^2 \rho'^2 \frac{\omega_z^2 - \omega_x^2}{\omega_x^2 \omega_z^2} \cos(\beta')\right] \cos(n\beta') d\beta' \right. \\ &\quad \left. + \int_{\beta'=\pi}^{2\pi} \exp\left[-L^2 \rho'^2 \frac{\omega_z^2 - \omega_x^2}{\omega_x^2 \omega_z^2} \cos(\beta')\right] \cos(n\beta') d\beta' \right\} \end{aligned}$$

mit

$$\cos(\beta + \pi) = -\cos(\beta) \text{ und } \cos(n\beta + n\pi) = (-1)^n \cos(n\beta)$$

lassen sich die Grenzen des zweiten Integrals um $-\pi$ verschieben:

$$B_{2n}(\rho') = 2 \exp\left[-L^2 \rho'^2 \frac{\omega_z^2 - \omega_x^2}{\omega_x^2 \omega_z^2}\right] \int_{\beta'=0}^{\pi} \exp\left[-L^2 \rho'^2 \frac{\omega_z^2 - \omega_x^2}{\omega_x^2 \omega_z^2} \cos(\beta')\right] \cos(n\beta') d\beta'$$

$$+ (-1)^n \int_{\beta'=0}^{\pi} \exp \left[+ L^2 \rho'^2 \frac{\omega_z^2 - \omega_x^2}{\omega_x^2 \omega_z^2} \cos(\beta') \right] \cos(n\beta') d\beta' \left\} \right.$$

Die beiden Integrale sehen jetzt der Besselfunktion $J_n(x) = \frac{(-i)^n}{\pi} \int_{\varphi=0}^{\pi} e^{ix \cos(\varphi)} \cos(n\varphi) d\varphi$ schon sehr ähnlich. Erweiterung der Gesamtgleichung um den Vorfaktor und Erweiterung des Exponenten um i führt auf:

$$B_{2n}(\rho') = 2 \exp \left[-L^2 \rho'^2 \frac{\omega_z^2 - \omega_x^2}{\omega_x^2 \omega_z^2} \right] \frac{\pi}{(-i)^n} \left\{ \frac{(-i)^n}{\pi} \int_{\beta'=0}^{\pi} \exp \left[i \left(-L^2 \rho'^2 \frac{\omega_z^2 - \omega_x^2}{i \omega_x^2 \omega_z^2} \right) \cos(\beta') \right] \cos(n\beta') d\beta' \right. \\ \left. + (-1)^n \frac{(-i)^n}{\pi} \int_{\beta'=0}^{\pi} \exp \left[i \left(L^2 \rho'^2 \frac{\omega_z^2 - \omega_x^2}{i \omega_x^2 \omega_z^2} \right) \cos(\beta') \right] \cos(n\beta') d\beta' \right\}$$

Mit $1/i = -i$ folgt schließlich:

$$B_{2n}(\rho') = \exp \left[-L^2 \rho'^2 \frac{\omega_z^2 - \omega_x^2}{\omega_x^2 \omega_z^2} \right] \frac{\pi}{(-i)^n} \left\{ J_n \left(i L^2 \rho'^2 \frac{\omega_z^2 - \omega_x^2}{\omega_x^2 \omega_z^2} \right) + (-1)^n J_n \left(-i L^2 \rho'^2 \frac{\omega_z^2 - \omega_x^2}{\omega_x^2 \omega_z^2} \right) \right\}$$

Da $J_n(-x) = (-1)^n J_n(x)$ vereinfacht sich die Gleichung weiter:

$$B_{2n}(\rho') = 2\pi \exp \left[-L^2 \rho'^2 \frac{\omega_z^2 - \omega_x^2}{\omega_x^2 \omega_z^2} \right] (-1)^n i^{-n} J_n \left(i L^2 \rho'^2 \frac{\omega_z^2 - \omega_x^2}{\omega_x^2 \omega_z^2} \right)$$

Die Funktionen $i^{-n} J_n(ix)$ werden modifizierte Besselfunktionen genannt und mit $I_n(x)$ bezeichnet. Es sind reelle Funktionen, die die gleichen Symmetrieeigenschaften wie die J_n aufweisen (gerade für gerade n , ungerade für ungerade n). Im Gegensatz zu den J_n oszillieren sie jedoch nicht und sie besitzen auch keinen Grenzwert für $x \rightarrow \infty$, sondern streben gegen ∞ (Die J_n streben gegen Null). Zusammenfassend erhält man für die Azimutintegrale (β -Integrale) in Gleichung 4.2.2-2:

$$B_{2n}(\rho') = 2\pi \exp \left[-L^2 \rho'^2 \frac{\omega_z^2 - \omega_x^2}{\omega_x^2 \omega_z^2} \right] (-1)^n I_n \left(L^2 \rho'^2 \frac{\omega_z^2 - \omega_x^2}{\omega_x^2 \omega_z^2} \right) \quad (4.2.2-4a)$$

Die Beta-Integrale mit ungeradzahligem n verschwinden,:

$$B_{2n+1}(\rho) = 0 \quad (4.2.2-4b)$$

Die Integrale sind gerade bezüglich einer Vertauschung von n und $-n$:

$$B_{-n}(\rho) = B_n(\rho) \quad (4.2.2-4c)$$

Die modifizierte Besselfunktion lässt sich durch eine schnell konvergierende Reihe darstellen:

$$I_\nu(x) = i^{-\nu} J_\nu(ix) = \sum_{k=0}^{\infty} \frac{\left(\frac{x}{2}\right)^{n+2k}}{k! \Gamma(\nu + k + 1)} \quad [\text{Bronstein 2001, Gl. 9.53a S. 527}]$$

Da hier nur modifizierte Besselfunktionen ganzzahliger Ordnung auftreten, kann $\Gamma(n+k+1) = (n+k)!$ [Bronstein 2001, Gl. 8.102b, S.478] substituiert werden:

$$I_n\left(L^2 \rho^2 \frac{\omega_z^2 - \omega_x^2}{\omega_x^2 \omega_z^2}\right) = \sum_{k=0}^{\infty} \frac{\left(L^2 \rho^2 \frac{\omega_z^2 - \omega_x^2}{2\omega_x^2 \omega_z^2}\right)^{n+2k}}{k!(n+k)!} \quad (4.2.2-5)$$

Wie numerische Experimente gezeigt haben, konvergiert die Reihe innerhalb von etwa 10 Gliedern auf eine relative Genauigkeit von 10^{-15} (der Präzision des Datentyps „double“), während für die numerische Integration der Gleichung 4.2.2-3 mittels einer Taylorreihe zweiter Ordnung (für höhere Ordnungen wird die Berechnung der Ableitungen rechenintensiv) mindestens 10000 Iterationen notwendig sind. Da außerdem die mathematischen Operationen der Reihe wesentlich einfacher sind, wird die Rechenzeit um weit mehr als den Faktor 1000 verkürzt. Da $B_n(\rho')$ selbst in einem Integranden steht, ist dieser Vorteil erheblich.

Damit ergibt sich nach Gleichung 4.2.2-2 für die transformierte Funktion:

$$\tilde{F}_{2n,\alpha}(q) = (-1)^n \frac{\sqrt{\pi} D e_0 L e^{-q^2 \omega_y^2 / 8} \omega_y}{J_{2n}(k_{2n,\alpha}) \sqrt{1 - \frac{4n^2}{k_{2n,\alpha}^2}}} \int_{\rho'=0}^1 \exp\left[-L^2 \rho'^2 \frac{\omega_z^2 + \omega_x^2}{\omega_x^2 \omega_z^2}\right] J_{2n}(k_{2n,\alpha} \rho') I_n\left(L^2 \rho'^2 \frac{\omega_z^2 - \omega_x^2}{\omega_x^2 \omega_z^2}\right) \rho' d\rho' \quad (4.2.2-6a)$$

$$\tilde{F}_{2n+1,\alpha}(q) = 0 \quad (4.2.2-6b)$$

Es gelang mir nicht, für das verbleibende Integral in 4.2.2-6a eine analytische Funktion zu finden, es wird daher numerisch errechnet.

Berechnung der Korrelationsfunktion

$\tilde{F}_{n,\alpha}(q)$ ist eine reelle Funktion mit den Symmetrieeigenschaften $\tilde{F}_{-n,\alpha}(q) = \tilde{F}_{n,\alpha}(q)$ und $\tilde{F}_{n,\alpha}(-q) = \tilde{F}_{n,\alpha}(q)$. Daher kann man das Betragsquadrat in Gleichung 4.2.1-19 durch das Quadrat ersetzen:

$$\tilde{F}_{2n,\alpha}^2(q) = \frac{\pi D e_0^2 L^2 \omega_y^2 \exp\left(-\frac{q^2 \omega_y^2}{4}\right)}{\left(1 - \frac{4n^2}{k_{2n,\alpha}^2}\right) J_{2n}^2(k_{2n,\alpha})} \left\{ (-1)^n \int_{\rho'=0}^1 \exp\left[-L^2 \rho'^2 \frac{\omega_z^2 + \omega_x^2}{\omega_x^2 \omega_z^2}\right] J_{2n}(k_{2n,\alpha} \rho') I_n\left(L^2 \rho'^2 \frac{\omega_z^2 - \omega_x^2}{\omega_x^2 \omega_z^2}\right) \rho' d\rho' \right\}^2$$

Einsetzen in Gleichung 4.2.1-15 ergibt für die Korrelationsfunktion

$$G(\tau) = \frac{\bar{C}}{\bar{I}^2} \sum_{n=-\infty}^{\infty} \sum_{\alpha=1}^{\infty} \exp\left(-\frac{D\tau}{L^2} k_{n,\alpha}^2\right) \int_{q=-\infty}^{\infty} \tilde{F}_{n,\alpha}^2(q) \exp(-D\tau q^2 - iqVt) dq$$

Zunächst soll das q-Integral errechnet und mit $Q_{n,\alpha}$ bezeichnet werden:

$$G(\tau) = \frac{\bar{C}}{\bar{I}^2} \sum_{n=-\infty}^{\infty} \sum_{\alpha=1}^{\infty} \exp\left(-\frac{D\tau}{L^2} k_{n,\alpha}^2\right) Q_{n,\alpha} \quad (4.2.2-7)$$

$$Q_{n,\alpha} = \int_{q=-\infty}^{\infty} \tilde{F}_{n,\alpha}^2(q) \exp(-D\tau q^2 - iqVt) dq$$

$$Q_{2n,\alpha} = \frac{\pi D e_0^2 L^2 \omega_y^2}{\left(1 - \frac{4n^2}{k_{2n,\alpha}^2}\right) J_{2n}^2(k_{2n,\alpha})} \left\{ (-1)^n \int_{\rho'=0}^1 \exp\left[-L^2 \rho'^2 \frac{\omega_z^2 + \omega_x^2}{2\omega_x^2 \omega_z^2}\right] J_{2n}(k_{2n,\alpha} \rho') I_n\left(L^2 \rho'^2 \frac{\omega_z^2 - \omega_x^2}{2\omega_x^2 \omega_z^2}\right) \rho' d\rho' \right\}^2 \int_{q=-\infty}^{\infty} \exp\left(-\frac{q^2 \omega_y^2}{4} - D\tau q^2 - iqVt\right) dq$$

Das q-Integral läßt sich durch Aufsuchen der quadratischen Ergänzung analytisch lösen. Man erhält:

$$Q_{2n,\alpha} = \frac{\pi D e_0^2 L^2 \omega_y^2}{\left(1 - \frac{4n^2}{k_{2n,\alpha}^2}\right) J_{2n}^2(k_{2n,\alpha})} \left\{ (-1)^n \int_{\rho'=0}^1 \exp\left[-L^2 \rho'^2 \frac{\omega_z^2 + \omega_x^2}{\omega_x^2 \omega_z^2}\right] J_{2n}(k_{2n,\alpha} \rho') I_n\left(L^2 \rho'^2 \frac{\omega_z^2 - \omega_x^2}{\omega_x^2 \omega_z^2}\right) \rho' d\rho' \right\}^2 \exp\left(-\frac{V^2 \tau^2}{\omega_y^2 + 4D\tau}\right) \frac{1}{\sqrt{1 + 4\frac{D\tau}{\omega_y^2}}} \frac{\sqrt{\pi}}{\omega_y}$$

$$Q_{2n,\alpha} = 4\pi D e_0^2 L^2 \frac{\sqrt{\pi} \omega_y \exp\left(-\frac{V^2 \tau^2}{\omega_y^2 + 4D\tau}\right)}{2\sqrt{1 + \frac{4D\tau}{\omega_y^2}}} \left\{ \frac{\int_{\rho'=0}^1 \exp\left[-L^2 \rho'^2 \frac{\omega_z^2 + \omega_x^2}{\omega_x^2 \omega_z^2}\right] J_{2n}(k_{2n,\alpha} \rho') I_n\left(L^2 \rho'^2 \frac{\omega_z^2 - \omega_x^2}{\omega_x^2 \omega_z^2}\right) \rho' d\rho'}{(-1)^n \sqrt{1 - \frac{4n^2}{k_{2n,\alpha}^2}} J_{2n}(k_{2n,\alpha})} \right\}^2$$

Bezeichnet man den Term in den geschweiften Klammern als $R_{2n,\alpha}$, so erhält man

$$R_{2n,\alpha} = (-1)^n \frac{\int_{\rho'=0}^1 \exp\left[-L^2 \rho'^2 \left(\frac{1}{\omega_x^2} + \frac{1}{\omega_z^2}\right)\right] J_{2n}(k_{2n,\alpha} \rho') I_n\left(L^2 \rho'^2 \left(\frac{1}{\omega_x^2} - \frac{1}{\omega_z^2}\right)\right) \rho' d\rho'}{\sqrt{1 - \frac{4n^2}{k_{2n,\alpha}^2} J_{2n}(k_{2n,\alpha})}} \quad (4.2.2-8)$$

$$Q_{2n,\alpha} = 4\pi D e_0^2 L^2 \frac{\sqrt{\pi} \omega_y \exp\left(-\frac{V^2 \tau^2}{\omega_y^2 + 4D\tau}\right)}{2\sqrt{1 + \frac{4D\tau}{\omega_y^2}}} R_{2n,\alpha}^2 \quad (4.2.2-9a)$$

$$Q_{2n+1,\alpha} = 0 \quad (4.2.2-9b)$$

Die Q_n haben die Dimension $De_0^2 L^3$, wie man auch durch Vergleich mit Gleichung 2.6.1-16 erwartet. Da die Summanden mit ungeraden n wegfallen und $Q_{-2n,\alpha} = Q_{2n,\alpha}$ kann man die Summe über n auf $\frac{1}{4}$ des Rechenaufwands reduzieren:

$$G(\tau) = \frac{\bar{C}}{\bar{I}^2} \sum_{n=-\infty}^{\infty} \sum_{\alpha=1}^{\infty} \exp\left(-\frac{D\tau}{L^2} k_{n,\alpha}^2\right) Q_{n,\alpha}$$

$$G(\tau) = \frac{\bar{C}}{\bar{I}^2} \left[\sum_{\alpha=1}^{\infty} \exp\left(-\frac{D\tau}{L^2} k_{0,\alpha}^2\right) Q_{0,\alpha} + 2 \sum_{n=1}^{\infty} \sum_{\alpha=1}^{\infty} \exp\left(-\frac{D\tau}{L^2} k_{2n,\alpha}^2\right) Q_{2n,\alpha} \right]$$

$$G(\tau) = \frac{\bar{C} D e_0^2}{\bar{I}^2} 4\pi L^2 \frac{\sqrt{\pi} \omega_y \exp\left(-\frac{V^2 \tau^2}{\omega_y^2 + 4D\tau}\right)}{2\sqrt{1 + \frac{4D\tau}{\omega_y^2}}} \left[\sum_{\alpha=1}^{\infty} \exp\left(-\frac{D\tau}{L^2} k_{0,\alpha}^2\right) R_{0,\alpha}^2 + 2 \sum_{n=1}^{\infty} \sum_{\alpha=1}^{\infty} \exp\left(-\frac{D\tau}{L^2} k_{2n,\alpha}^2\right) R_{2n,\alpha}^2 \right] \quad (4.2.2-10)$$

$G(\tau)$ lässt sich als ein Produkt von drei Termen beschreiben, von denen der erste, $G(0)$, die Amplitude, der zweite, $G_y(\tau)$, den Abfall der Funktion aufgrund der Diffusion und des Flusses in axialer (y -) Richtung und der dritte Term, $G_{\rho,\beta}(\tau)$, den Abfall der Funktion aufgrund der Diffusion quer zur Kapillarachse, also in radialer (ρ) und azimuthaler (β) Richtung wiedergibt.

$$G(\tau) = G(0) G_y(\tau) G_{\rho,\beta}(\tau) \quad (4.2.2-11)$$

4.2.3 Abhängigkeit der Teilfunktionen von den experimentellen Parametern

Amplitude $G(0)$

Nach Gleichung 4.2.1-5 ist $G(0)$ durch

$$G(0) = \frac{\bar{C}}{\bar{I}^2} \int_{\rho=0}^L \int_{\beta=0}^{2\pi} \int_{y=-\infty}^{\infty} F^2(\vec{r}, t=0) dy d\beta \rho d\rho \quad (4.2.3-1)$$

gegeben. Statt $F(\vec{r}, 0)$ kann man nach Gleichung 4.2.1-3 die Detektionseffizienz $De(\vec{r})$ einsetzen:

$$\begin{aligned} &= \frac{\bar{C}}{\bar{I}^2} \iiint_V De^2(\vec{r}) d^3\vec{r} = \frac{\bar{C} \iiint_V De^2(\vec{r}) d^3\vec{r}}{\left(\bar{C} \iiint_V De(\vec{r}) d^3\vec{r} \right)^2} = \frac{De_0^2 \iiint_V \left(\frac{De(\vec{r})}{De_0} \right)^2 d^3\vec{r}}{\bar{C} \left(De_0 \iiint_V \frac{De(\vec{r})}{De_0} d^3\vec{r} \right)^2} = \frac{\iiint_V \left(\frac{De(\vec{r})}{De_0} \right)^2 d^3\vec{r}}{\bar{C} \iiint_V \frac{De(\vec{r})}{De_0} d^3\vec{r}} \end{aligned}$$

Die Integranden in der letzten Formulierung sind dimensionslos; deshalb haben die Integrale die Dimension von Volumina. Das Produkt im Nenner hat daher die Dimension einer Teilchenzahl.

Setzt man das Detektionsvolumen als $DV = \iiint_V \frac{De(\vec{r})}{De_0} d^3\vec{r}$ an, so kommt man auf die

Formulierung des Besetzungsgrades des Detektionsvolumens, wie Thomson sie verwendet [Thomson 1991, S.341] (s. auch Abschnitt 2.6.1):

$$G(0) = \frac{\gamma}{\bar{N}^1} \quad (4.2.3-2)$$

mit dem Strukturfaktor

$$\gamma = \frac{\iiint_V \left(\frac{De(\vec{r})}{De_0} \right)^2 d^3\vec{r}}{\iiint_V \frac{De(\vec{r})}{De_0} d^3\vec{r}} \quad (4.2.3-4)$$

und der mittleren Teilchenzahl

$$\bar{N}^1 = \bar{C} \iiint_V \frac{De(\vec{r})}{De_0} d^3\vec{r} \quad (4.2.3-5)$$

Berechnung des quadratischen Integrals

$$\iiint_V \left(\frac{De(\vec{r})}{De_0} \right)^2 d^3\vec{r} = \int_{\rho=0}^L \int_{\beta=0}^{2\pi} \int_{y=-\infty}^{\infty} e^{-4\frac{y^2}{\omega_y^2}} e^{-4\frac{\rho^2}{\omega_z^2}} \exp\left[-4\rho^2 \frac{\omega_z^2 - \omega_x^2}{\omega_x^2 \omega_z^2} \cos^2 \beta\right] dy d\beta \rho d\rho$$

Das y-Integral kann herausgezogen werden. Es ist vom Gauß-Typ und kann analytisch angegeben werden. Das ρ -Integral ist durch die Substitution $u = \rho^2$; $d\rho = \frac{du}{2\rho}$ analytisch lösbar.

Man erhält

$$\iiint_V \left(\frac{De(\vec{r})}{De_0} \right)^2 d^3\vec{r} = \frac{\sqrt{\pi}}{4} \omega_x \omega_y \omega_z \int_{\beta=0}^{\pi/2} \frac{1 - \exp\left[-4 \frac{L^2}{\omega_x \omega_z} \left(\frac{\omega_x}{\omega_z} + \left(\frac{\omega_z - \omega_x}{\omega_x \omega_z} \right) \cos^2 \beta \right)\right]}{\left(\frac{\omega_x}{\omega_z} + \left(\frac{\omega_z - \omega_x}{\omega_x \omega_z} \right) \cos^2 \beta \right)} d\beta \quad (4.2.3-6)$$

Das β -Integral hat keine analytische Lösung. Falls $\omega_x = \omega_z$ ist der Integrand in Gleichung 4.2.3-6 β -unabhängig und man erhält

$$\iiint_V \left(\frac{De(\vec{r})}{De_0} \right)^2 d^3\vec{r} = \frac{\pi^{3/2}}{8} \omega_x \omega_y \omega_z \left(1 - e^{-4\frac{L^2}{\omega_z^2}} \right)$$

Berechnung des Detektionsvolumens

Die Berechnung des Detektionsvolumens geschieht durch dieselbe Substitution, wie die des quadrierten Integrals. Man erhält

$$\iiint_V \left(\frac{De(\vec{r})}{De_0} \right) d^3\vec{r} = \left(\sqrt{\frac{\pi}{2}} \right)^3 \omega_y \omega_x \omega_z \cdot \frac{2}{\pi} \int_{\beta=0}^{\pi/2} \frac{1 - \exp\left[-2 \frac{L^2}{\omega_x \omega_z} \left(\frac{\omega_x}{\omega_z} + \left(\frac{\omega_z - \omega_x}{\omega_x \omega_z} \right) \cos^2 \beta \right)\right]}{\frac{\omega_x}{\omega_z} + \left(\frac{\omega_z - \omega_x}{\omega_x \omega_z} \right) \cos^2 \beta} d\beta \quad (4.2.3-7)$$

Falls $\omega_x = \omega_z$ wird der Integrand wieder β -unabhängig, und man erhält für das Detektionsvolumen:

$$\iiint_V \left(\frac{De(\vec{r})}{De_0} \right) d^3\vec{r} = \sqrt{\frac{\pi}{2}} \omega_y \frac{\pi}{2} \omega_z^2 \left(1 - e^{-2\frac{L^2}{\omega_z^2}} \right)$$

Berechnung des Strukturfaktors

Der Strukturfaktor ist nach Gleichung 4.2.3-4 der Quotient aus dem quadrierten Integral und dem Detektionsvolumen:

$$\gamma = \frac{1}{\sqrt{2}} \cdot \frac{1}{2} \frac{\int_{\beta=0}^{\pi/2} \frac{1 - \exp\left[-4 \frac{L^2}{\omega_x \omega_z} \left(\frac{\omega_x}{\omega_z} + \left(\frac{\omega_z - \omega_x}{\omega_x \omega_z}\right) \cos^2 \beta\right)\right]}{\left(\frac{\omega_x}{\omega_z} + \left(\frac{\omega_z - \omega_x}{\omega_x \omega_z}\right) \cos^2 \beta\right)} d\beta}{\int_{\beta=0}^{\pi/2} \frac{1 - \exp\left[-2 \frac{L^2}{\omega_x \omega_z} \left(\frac{\omega_x}{\omega_z} + \left(\frac{\omega_z - \omega_x}{\omega_x \omega_z}\right) \cos^2 \beta\right)\right]}{\frac{\omega_x}{\omega_z} + \left(\frac{\omega_z - \omega_x}{\omega_x \omega_z}\right) \cos^2 \beta} d\beta}$$

Um die Formeln kompakter zu gestalten, wird der dimensionslose Kapillarparameter

$$\kappa_l^2 = \frac{L^2}{\omega_x \omega_z} \quad (4.2.3-8)$$

eingeführt. κ_l^2 entspricht dem Verhältnis der Querschnittsfläche der Kapillare zur Querschnittsfläche des $1/e^2$ Ellipsoids des Detektionsvolumens.

Zur Beschreibung der Elliptizität des Detektionsvolumens wird das Verhältnis der Halbachsenlängen herangezogen.

$$\kappa_z = \frac{\omega_z}{\omega_x} \quad (4.2.3-9)$$

Damit erhält man für den Strukturfaktor:

$$\gamma = \frac{1}{\sqrt{8}} \cdot \frac{\int_{\beta=0}^{\pi/2} \frac{1 - \exp\left[-4 \frac{\kappa_l^2}{\kappa_z} (1 + (\kappa_z^2 - 1) \cos^2 \beta)\right]}{1 + (\kappa_z^2 - 1) \cos^2 \beta} d\beta}{\int_{\beta=0}^{\pi/2} \frac{1 - \exp\left[-2 \frac{\kappa_l^2}{\kappa_z} (1 + (\kappa_z^2 - 1) \cos^2 \beta)\right]}{1 + (\kappa_z^2 - 1) \cos^2 \beta} d\beta} \quad (4.2.3-10)$$

und für das Detektionsvolumen

$$\iiint_V \left(\frac{De(\vec{r})}{De_0} \right) d^3\vec{r} = \sqrt{\frac{\pi}{2}} \omega_x \omega_y \omega_z \cdot \kappa_z \int_{\beta=0}^{\pi/2} \frac{1 - \exp\left[-2 \frac{\kappa_l^2}{\kappa_z} (1 + (\kappa_z^2 - 1) \cos^2 \beta)\right]}{1 + (\kappa_z^2 - 1) \cos^2 \beta} d\beta \quad (4.2.3-11)$$

Zusammenfassend ergibt sich für die Amplitude:

$$G(0) = \frac{1}{\bar{C} \pi \sqrt{\pi} \omega_x \omega_y \omega_z} \frac{\int_{\beta=0}^{\pi/2} \frac{1 - \exp\left[-4 \frac{\kappa_l^2}{\kappa_z} (1 + (\kappa_z^2 - 1) \cos^2 \beta)\right]}{1 + (\kappa_z^2 - 1) \cos^2 \beta} d\beta}{\left(\frac{2}{\pi} \kappa_z \int_{\beta=0}^{\pi/2} \frac{1 - \exp\left[-2 \frac{\kappa_l^2}{\kappa_z} (1 + (\kappa_z^2 - 1) \cos^2 \beta)\right]}{1 + (\kappa_z^2 - 1) \cos^2 \beta} d\beta \right)^2} \quad (4.2.3-12)$$

Für das nicht durch eine Kapillarwand eingeschränkte Gaußsche Detektionsvolumen wurde in Abschnitt 2.6.1 ein Strukturfaktor $\gamma = \frac{1}{\sqrt{2^3}}$ bei einem Detektionsvolumen von

$$\iiint \frac{De(\vec{r})}{De_0} d^3\vec{r} = \left(\sqrt{\frac{\pi}{2}} \right)^3 \omega_x \omega_y \omega_z \quad \text{und somit } G(0) = \frac{1}{\bar{C} \pi \sqrt{\pi} \omega_x \omega_y \omega_z} \text{ abgeleitet.}$$

Der hier gewonnene Strukturfaktor nimmt für $L \ll \omega_x, \omega_z$ den Wert $\gamma = 1/\sqrt{2}$ an. Für $L \gg \omega_x, \omega_z$ strebt er erwartungsgemäß gegen den Wert beim uneingeschränkten Detektionsvolumen (s. Abbildung 4.2.3-1A).

Das Detektionsvolumen strebt dagegen im ersten Fall gegen Null, um im zweiten Fall wiederum gegen den Wert beim uneingeschränkten Detektionsvolumen zu streben (s. Abbildung 4.2.3-1B). Bei vernachlässigbarem Untergrund und konstanter Farbstoffkonzentration nimmt die Amplitude der FCS in der Kapillare im Vergleich zum offenen Volumen zu. Ursache ist die Einschränkung des Detektionsvolumens durch die Kapillare zu, wie auch intuitiv zu erwarten ist (s. Abbildung 4.2.3-1C).

Die Amplitudenerhöhung ist durch

$$\frac{G(0)_{\text{Kapillare}}}{G(0)_{\text{frei}}} = \frac{\gamma_{\text{Kapillare}}}{\gamma_{\text{frei}}} \frac{\iiint_{\text{frei}} \frac{De(\vec{r})}{De_0} d^3\vec{r}}{\iiint_{\text{Kapillare}} \frac{De(\vec{r})}{De_0} d^3\vec{r}}$$

gegeben.

Abbildung 4.2.3-1 zeigt den numerisch errechneten Verlauf der amplitudenrelevanten Funktionen im Bereich $0,1\omega_x < L < 20\omega_x$ und $\omega_x < \omega_z < 10\omega_x$. Die numerische Integration erfolgte mittels einer Taylorreihe gemäß

$$\int_{x_0 - \frac{\Delta x}{2}}^{x_0 + \frac{\Delta x}{2}} f(x) dx = f(x) \Delta x + \sum_{n=1}^{\infty} \frac{d^{2n} f(x = x_0)}{dx^{2n}} \frac{1}{(2n+1)!} \frac{\Delta x^{2n+1}}{2^{2n}}$$

Die Reihe wurde nach $n=1$ abgebrochen, die Schrittweite betrug $\Delta\beta = 10^{-4}$.

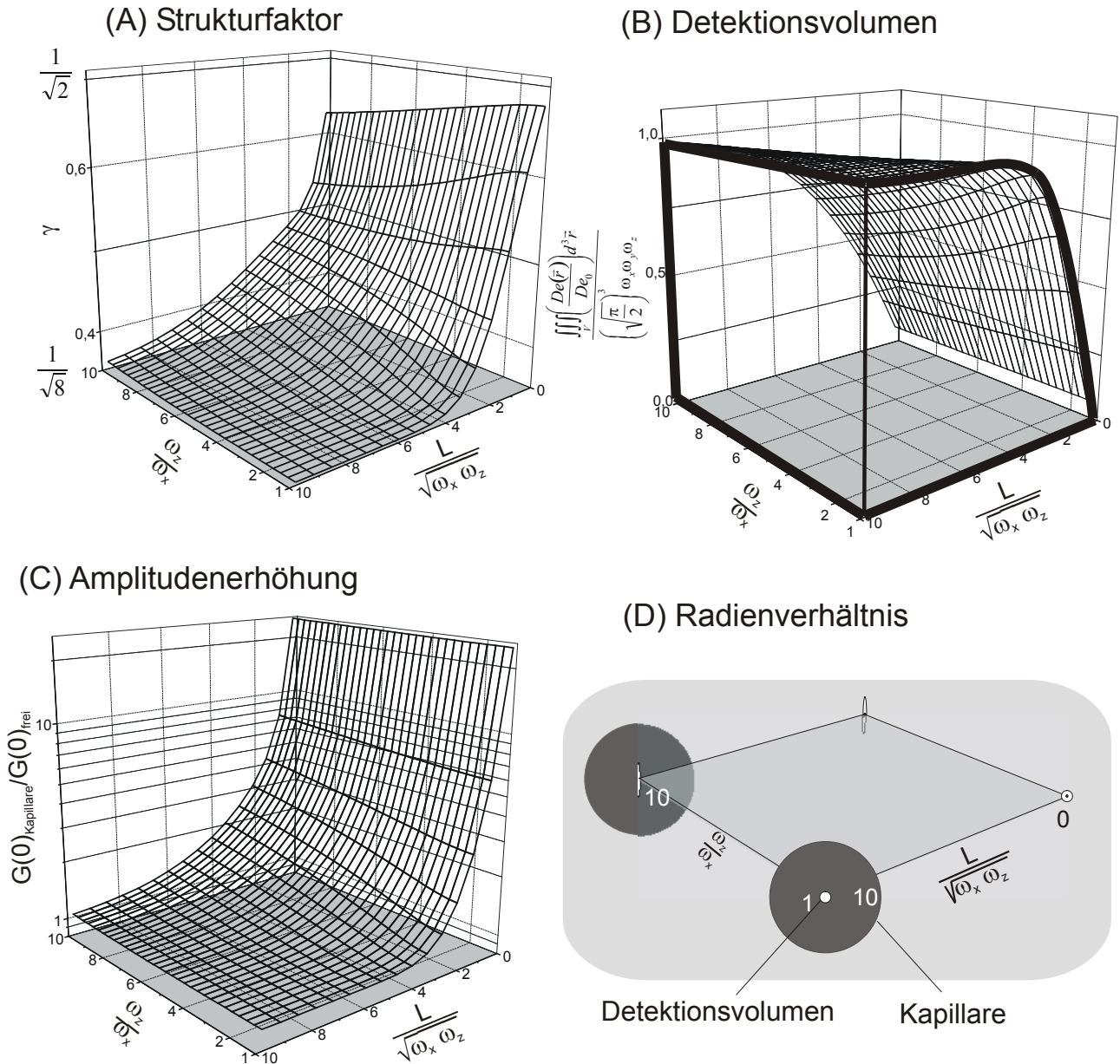


Abbildung 4.2.3-1 Einfluß von Kapillardurchmesser und Elliptizität des Detektionsvolumens auf die Amplitude der Korrelationsfunktion

(A) Der Strukturfaktor nimmt für $L \ll \omega_x, \omega_z$ den Wert $1/\sqrt{2}$ an, um für große Kapillardurchmesser auf die Hälfte abzufallen.

(B) Das Detektionsvolumen strebt für kleine Kapillarradien gegen null, um bei großen Radien den Wert $DV = DV_{frei} = \left(\sqrt{\pi/2}\right)^3 \omega_x \omega_y \omega_z$ anzunehmen.

(C) Die Amplitude (logarithmische z-Skala) nimmt daher für kleine Kapillardurchmesser stark zu, falls der Untergrund vernachlässigbar gegen die Intensität des Fluoreszenzsignals ist.

(D) Maßstabsgetreue Abbildung des Verhältnisses von Detektionsvolumen und Kapillarquerschnitt. Der dunkelgraue Kreis stellt die Kapillare dar, wobei $0,2\sqrt{\omega_x \omega_z} \leq L \leq 10\sqrt{\omega_x \omega_z}$; die weiße Ellipse den Schnitt entlang der x-z-Ebene durch das Detektionsvolumen. An der Grenze der Ellipse ist die Detektionseffizienz auf $1/e^2$ abgefallen. Die Elliptizität wurde von $\omega_x \leq \omega_z \leq 10 \omega_x$ variiert.

Axialer Abfall $G_y(\tau)$

Für den axialen Abfall erhält man aus Gleichung 4.2.2-10:

$$G_y(\tau) = \frac{\omega_y \sqrt{\pi} \exp\left(-\frac{V^2 \tau^2}{\omega_y^2 + 4D\tau}\right)}{2 \sqrt{1 + \frac{4D\tau}{\omega_y^2}}} \bigg/ \lim_{t \rightarrow 0} \frac{\omega_y \sqrt{\pi} \exp\left(-\frac{V^2 t^2}{\omega_y^2 + 4Dt}\right)}{2 \sqrt{1 + \frac{4Dt}{\omega_y^2}}}$$

Der Grenzwert im Nenner bewirkt die Normierung $\lim_{t \rightarrow 0} G_y(t) \equiv 1$. Man erhält

$$G_y(\tau) = \frac{\omega_y \sqrt{\pi} \exp\left(-\frac{V^2 \tau^2}{\omega_y^2 + 4D\tau}\right)}{2 \sqrt{1 + \frac{4D\tau}{\omega_y^2}}} \bigg/ \frac{\omega_y \sqrt{\pi}}{2}$$

Mit

$$\tau_v = \frac{\omega_y}{V} \quad (4.2.3-13)$$

und

$$\tau_y = \frac{\omega_y^2}{4D} \quad (4.2.3-14)$$

ergibt sich

$$G_y(\tau) = \frac{\exp\left(-\frac{V^2 \tau^2}{\omega_y^2 + 4D\tau}\right)}{\sqrt{1 + \frac{4D\tau}{\omega_y^2}}} = \frac{\exp\left(-\frac{\tau^2 / \tau_v^2}{1 + \tau / \tau_y}\right)}{\sqrt{1 + \frac{\tau}{\tau_y}}} \quad (4.2.3-15)$$

Das ist genau das gleiche Ergebnis, das in Abschnitt 2.6.2 bei einer gleichmäßig bewegten Probe bei ungehinderter Diffusion in y-Richtung erhalten wurde.

Abbildung 4.2.3-2 zeigt den Verlauf von G_y bei unterschiedlichen Flußgeschwindigkeiten. Die Flußgeschwindigkeit ist in Einheiten von $4D/\omega_y$ angegeben.

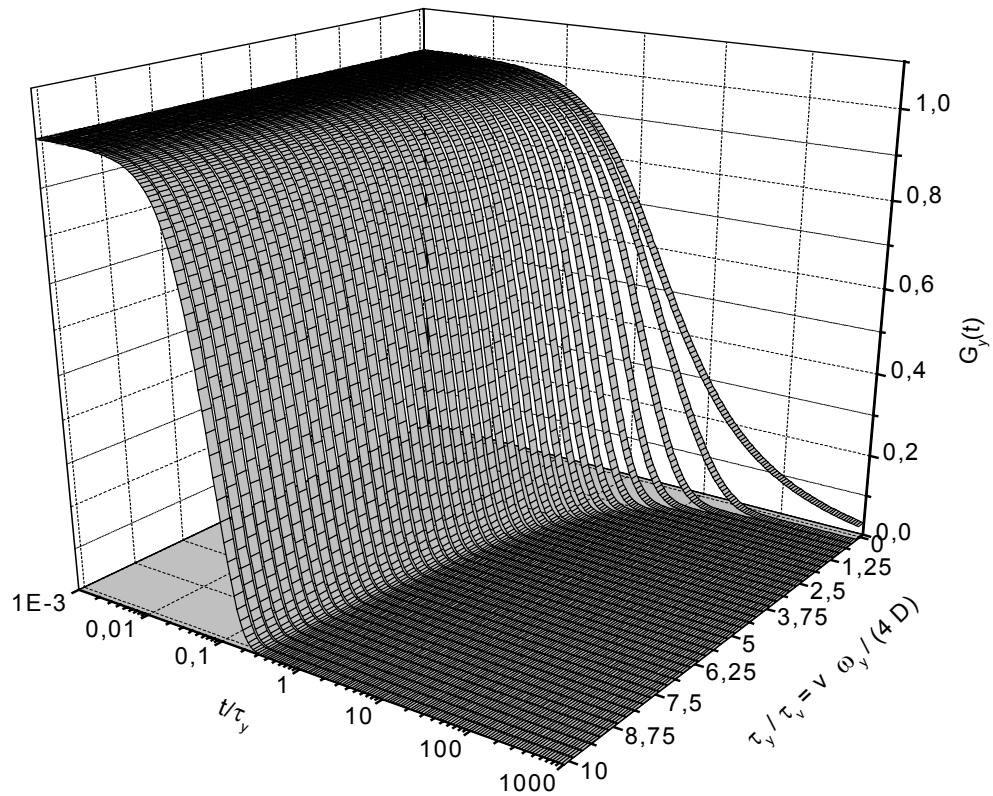


Abbildung 4.2.3-2 $G_y(t)$ bei verschiedenen Flußgeschwindigkeiten. Die Funktionswerte wurden nach Gleichung 4.2.3-9 errechnet. Mit steigender Geschwindigkeit verschiebt sich der Abfall zu kürzeren Zeiten und wird steiler.

Radialer und azimuthaler Abfall $G_{\rho,\beta}(\tau)$

$$G_{\rho,\beta}(\tau) = \frac{\sum_{\alpha=1}^{\infty} \exp\left(-\frac{D\tau}{L^2} k_{0,\alpha}^2\right) R_{0,\alpha}^2 + 2 \sum_{n=1}^{\infty} \sum_{\alpha=1}^{\infty} \exp\left(-\frac{D\tau}{L^2} k_{2n,\alpha}^2\right) R_{2n,\alpha}^2}{\sum_{\alpha=1}^{\infty} R_{0,\alpha}^2 + 2 \sum_{n=1}^{\infty} \sum_{\alpha=1}^{\infty} R_{2n,\alpha}^2} \quad (4.2.3-10)$$

mit

$$R_{2n,\alpha} = (-1)^n \frac{\int_{\rho=0}^1 \exp\left[-L^2 \rho'^2 \left(\frac{1}{\omega_x^2} + \frac{1}{\omega_z^2}\right)\right] J_{2n}(k_{2n,\alpha} \rho') I_n\left(L^2 \rho'^2 \left(\frac{1}{\omega_x^2} - \frac{1}{\omega_z^2}\right)\right) \rho' d\rho'}{\sqrt{1 - \frac{4n^2}{k_{2n,\alpha}^2}} J_{2n}(k_{2n,\alpha})} \quad (\text{vgl. 4.2.2-8})$$

Der in Gleichung 4.2.3-10 als Normierungsfaktor dienende Nenner läßt sich aus der Amplitude berechnen: Nach Gleichung 4.2.2-10 ist

$$G(0) = \frac{\bar{C} D e_0^2}{\bar{I}^2} 4\pi L^2 \frac{\sqrt{\pi} \omega_y}{2} \left[\sum_{\alpha=1}^{\infty} R_{0,\alpha}^2 + 2 \sum_{n=1}^{\infty} \sum_{\alpha=1}^{\infty} R_{2n,\alpha}^2 \right] = \frac{\bar{C}}{\bar{I}^2} \iiint D e^2(\vec{r}) d^3 \vec{r}$$

Die Koeffizientensumme ergibt sich damit zu

$$\sum_{\alpha=1}^{\infty} R_{0,\alpha}^2 + 2 \sum_{n=1}^{\infty} \sum_{\alpha=1}^{\infty} R_{2n,\alpha}^2 = \frac{1}{4\pi L^2} \frac{2}{\sqrt{\pi} \omega_y} \iiint \frac{D e^2(\vec{r})}{D e_0^2} d^3 \vec{r}$$

Das Integral wurde im Abschnitt über die Amplitude bereits berechnet. Mit Gleichung 4.2.3-6 ergibt sich:

$$\sum_{\alpha=1}^{\infty} R_{0,\alpha}^2 + 2 \sum_{n=1}^{\infty} \sum_{\alpha=1}^{\infty} R_{2n,\alpha}^2 = \frac{\omega_x \omega_z}{8\pi L^2} \int_{\beta=0}^{\pi/2} \frac{1 - \exp \left[-4 \frac{L^2}{\omega_x \omega_z} \left(\frac{\omega_x}{\omega_z} + \left(\frac{\omega_z - \omega_x}{\omega_x \omega_z} \right) \cos^2 \beta \right) \right]}{\left(\frac{\omega_x}{\omega_z} + \left(\frac{\omega_z - \omega_x}{\omega_x \omega_z} \right) \cos^2 \beta \right)} d\beta$$

mit $L^2/(\omega_x \omega_z) = \kappa_l^2$, $\omega_z/\omega_x = \kappa_z$ erhält man für die Koeffizientensumme

$$\sum_{\alpha=1}^{\infty} R_{0,\alpha}^2 + 2 \sum_{n=1}^{\infty} \sum_{\alpha=1}^{\infty} R_{2n,\alpha}^2 = \frac{\kappa_z}{8\pi \kappa_l^2} \int_{\beta=0}^{\pi/2} \frac{1 - \exp \left[-4 \frac{\kappa_l^2}{\kappa_z} \left(1 + (\kappa_z^2 - 1) \cos^2 \beta \right) \right]}{\left(1 + (\kappa_z^2 - 1) \cos^2 \beta \right)} d\beta$$

Die Größe L^2/D hat die Dimension einer Zeit. Da die charakteristische Diffusionszeit in x-Richtung beim uneingeschränkten Gaußschen Detektionsvolumen durch $\tau_x = \omega_x^2/4D$ und in z-Richtung entsprechend durch $\tau_z = \omega_z^2/4D$ gegeben ist, soll L^2/D durch diese Zeiten ausgedrückt werden. Sei

$$\tau_{xz} = \sqrt{\tau_x \tau_z} = \frac{\omega_x \omega_z}{4D}, \quad (4.2.3-17)$$

so ist

$$\frac{L^2}{D} = 4\tau_{xz} \kappa_l^2$$

Wird dieser Ausdruck in Gleichung 4.2.3-10 eingesetzt, so erhält man:

$$G_{\rho,\beta}(t) = \frac{\sum_{\alpha=1}^{\infty} \exp \left(-\frac{t}{4\tau_{xz} \kappa_l^2} k_{0,\alpha}^2 \right) R_{0,\alpha}^2 + 2 \sum_{n=1}^{\infty} \sum_{\alpha=1}^{\infty} \exp \left(-\frac{t}{4\tau_{xz} \kappa_l^2} k_{2n,\alpha}^2 \right) R_{2n,\alpha}^2}{\frac{\kappa_z}{8\pi \kappa_l^2} \int_{\beta=0}^{\pi/2} \frac{1 - \exp \left[-4 \frac{\kappa_l^2}{\kappa_z} \left(1 + (\kappa_z^2 - 1) \cos^2 \beta \right) \right]}{\left(1 + (\kappa_z^2 - 1) \cos^2 \beta \right)} d\beta} \quad (4.2.3-18)$$

Die Koeffizienten $R_{2n,\alpha}$ nehmen mit den Variablen κ_1, κ_z folgende Form an:

$$R_{2n,\alpha} = (-1)^n \frac{\int_{\rho=0}^1 \exp\left[-\frac{L^2}{\omega_x \omega_z} \rho'^2 \left(\frac{\omega_z}{\omega_x} + \frac{\omega_x}{\omega_z}\right)\right] J_{2n}(k_{2n,\alpha} \rho') I_n\left(\frac{L^2}{\omega_x \omega_z} \rho'^2 \left(\frac{\omega_z}{\omega_x} - \frac{\omega_x}{\omega_z}\right)\right) \rho' d\rho'}{\sqrt{1 - \frac{4n^2}{k_{2n,\alpha}^2}} J_{2n}(k_{2n,\alpha})}$$

$$R_{2n,\alpha} = (-1)^n \frac{\int_{\rho=0}^1 \exp\left[-\frac{\kappa_l^2}{\kappa_z} \rho'^2 (\kappa_z^2 + 1)\right] J_{2n}(k_{2n,\alpha} \rho') I_n\left(\frac{\kappa_l^2}{\kappa_z} \rho'^2 (\kappa_z^2 - 1)\right) \rho' d\rho'}{\sqrt{1 - \frac{4n^2}{k_{2n,\alpha}^2}} J_{2n}(k_{2n,\alpha})} \quad (4.2.3-19)$$

Der Normierungsfaktor wird durch Auswertung des quadratischen Amplitudenintegrals bestimmt und nicht einfach durch Summation der ohnehin zu errechnenden $R_{2n,\alpha}^2$, da dadurch eine Kontrolle, ob genügend Terme $R_{2n,\alpha}$ berücksichtigt worden sind, möglich ist: Werden nicht genügend Terme der Reihen über n und α berücksichtigt, so findet man

$$\frac{\sum_{\alpha=1}^A R_{0,\alpha}^2 + 2 \sum_{n=1}^N \sum_{\alpha=1}^A R_{2n,\alpha}^2}{\frac{\kappa_z}{8\pi\kappa_l^2} \int_{\beta=0}^{\pi/2} \frac{1 - \exp\left[-4 \frac{\kappa_l^2}{\kappa_z} (1 + (\kappa_z^2 - 1) \cos^2 \beta)\right]}{(1 + (\kappa_z^2 - 1) \cos^2 \beta)} d\beta} < 1$$

und kann entsprechend weiter rechnen. Um den Quotienten als Abbruchkriterium zu nutzen, muß das zweidimensionale Koeffizientenfeld zunächst so umstrukturiert werden, daß es eine eindimensionale Form annimmt. Die Reihe wird abgebrochen sobald der Quotient einen willkürlich zu wählenden Schwellenwert, hier 99%, übersteigt.

Die Koeffizienten $R_{n,\alpha}$ müssen für große n, α gegen Null gehen, sonst könnte die Reihe über $R_{n,\alpha}^2$ nicht endlich sein. Die Reihenfolge, in der die Koeffizienten berechnet werden, ist in der folgenden Tabelle skizziert: Man beginnt in der oberen linken Ecke mit $R_{0,1}$ und rechnet anschließend Diagonalen, die mit zunehmenden Indices n beginnen $R_{2k,1} \dots R_{0,k}$. Aus praktischen Gründen wird eine begonnene Diagonale stets fertig gerechnet, selbst wenn das Abbruchkriterium bereits vor deren Fertigstellung erfüllt ist. Wie sich anschließend herausgestellt hat, ist diese Anordnung insbesondere für kleine Elliptizitäten κ_z ca. 1 nicht ganz optimal, da die $R_{2n,\alpha}$ mit steigendem n viel schneller konvergieren als mit steigendem α (Abbildung 4.2.3b). Ein flacherer Diagonalenwinkel als die hier verwendeten 45° wäre daher besser. Das heißt, es werden mit dieser Anordnung auch Terme berechnet, die keinen wesentlichen Einfluß auf die Form der Funktion haben.

$n \setminus \alpha$	1	2	3	4	5	...	α
0	$A[0]=R_{0,1}$	$A[2]=R_{0,2}$	$A[5]=R_{0,3}$	$A[9]=R_{0,4}$	$A[14]=R_{0,5}$		$R_{0,\dots}$
2	$A[1]=R_{2,1}$	$A[4]=R_{2,2}$	$A[8]=R_{2,3}$	$A[13]=R_{2,4}$	$A[19]=R_{2,5}$		$R_{2,\dots}$
4	$A[3]=R_{4,1}$	$A[7]=R_{4,2}$	$A[12]=R_{4,3}$	$A[18]=R_{4,4}$	$A[25]=R_{4,5}$		$R_{4,\dots}$
6	$A[6]=R_{6,1}$	$A[11]=R_{6,2}$	$A[17]=R_{6,3}$	$A[24]=R_{6,4}$	$R_{6,5}$		$R_{6,\dots}$
8	$A[10]=R_{8,1}$	$A[16]=R_{8,2}$	$A[23]=R_{8,3}$	$R_{8,4}$	$R_{8,5}$		$R_{8,\dots}$
...							
$2n$...	R_{\dots}	$R_{\dots,3}$	$R_{\dots,4}$	$R_{\dots,5}$		$A[x]=R_{2n,\alpha..}$

Es gilt $A[\frac{1}{2}m(m+1)+j]=R_{2(m-j),j+1}$ wobei $0 \leq j \leq n$.

Um zu einem gegebenem $A[x]$ die zugehörigen Indices $2n, \alpha$ zu $R_{2n,\alpha}$ zu finden, werden zunächst

$$m = \text{floor}\left(\frac{\sqrt{8x+1}-1}{2}\right) \text{ und } j = x - \frac{m(m+1)}{2}$$

berechnet, wobei $y = \text{floor}(x)$ die nächste ganze Zahl $y \leq x$ zurückgibt. Die Indices n, α ergeben sich dann aus

$$2n = 2(m-j) \quad \text{und} \quad \alpha = j+1.$$

Um zu gegebenen $2n, \alpha$ das zugehörige x zu finden, wird

$$m = \frac{2n}{2} + \alpha - 1 \text{ und } j = \alpha - 1$$

berechnet. x ergibt sich aus

$$x = \frac{m(m+1)}{2} + j.$$

Bei der Berechnung der Koeffizienten nach Gleichung 4.2.3-19 tritt ein praktisches Problem auf: Die modifizierten Besselfunktionen I_n streben für $\kappa_l > 1$ rasch gegen sehr große Werte. Insbesondere der Zähler in der Reihenentwicklung der I_n (s. Gleichung 4.2.2-5) läuft aus dem zulässigen Wertebereich des größten Fließkommatyps der verwendeten C-Implementierung. Die Berechnung des Integranden nach Gleichung 4.2.3-12 ist daher numerisch instabil und liefert für nur $\kappa_l \ll 1$ richtige Ergebnisse.

Das Problem lässt sich jedoch umgehen, wenn die Exponentialfunktion $\exp(-\kappa_l^2 \dots)$ mit in die Reihenentwicklung der Besselfunktion gezogen wird: Gleichung 4.2.3-12 nimmt damit die folgende Form an:

$$R_{2n,\alpha} = (-1)^n \frac{\int_{\rho'=0}^1 \exp\left[-2 \frac{\kappa_l^2}{\kappa_z} \rho'^2\right] J_{2n}(k_{2n,\alpha} \rho') A_n\left(\frac{\kappa_l^2}{\kappa_z} \rho'^2 (\kappa_z^2 - 1)\right) \rho' d\rho'}{\sqrt{1 - \frac{4n^2}{k_{2n,\alpha}^2} J_{2n}^2(k_{2n,\alpha})}},$$

wobei

$$A_n(x) = e^{-x} I_n(x)$$

Die Funktion $A_n(x)$ lässt sich problemlos berechnen. Es gilt:

$$\lim_{x \rightarrow \infty} A_n(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi x}} = 0$$

$$\lim_{x \rightarrow 0} A_n(x) = \delta_{n,0}$$

$$\frac{dA_n(x)}{dx} = \left(\frac{n}{x} - 1\right)A_n(x) + A_{n+1}(x)$$

$$\frac{d^2 A_n(x)}{dx^2} = \frac{2x^2 - 2nx - n + n^2}{x^2} A_n(x) - \frac{2x+1}{x} A_{n+1}(x)$$

A_n wird in einer zu Gleichung 4.2.2-5 analogen Reihe entwickelt, wobei der Zähler und der Nenner der Reihenglieder zunächst logarithmiert berechnet werden. Die zahlenmäßig kleinere Differenz wird anschließend exponiert und zur Summe addiert:

$$A_n(x) = e^{-x} \sum_{k=0}^{\infty} \exp \left[(n+2k) \ln \left(\frac{x}{2} \right) - \ln((n+k)!) - \ln(k!) \right]$$

$$= \sum_{k=0}^{\infty} \exp \left[(n+2k) \ln \left(\frac{x}{2} \right) - \ln((n+k)!) - \ln(k!) - x \right]$$

Dieses Verfahren liefert stabile Werte und ist nach einigen programmieretechnischen Verbesserungen praktisch genauso schnell wie das nach Gleichung 4.2.3-12.

Mit steigendem Kapillardurchmesser κ_1 und steigender Elliptizität des Detektionsvolumens κ_z konvergieren die $R_{2n,\alpha}$ immer langsamer gegen Null, so daß zunehmend mehr Terme berücksichtigt werden müssen (Abbildung 4.2.3-3a). Der Verlauf der $R_{2n,\alpha}$ für $\kappa_z = 8$ und $\kappa_1=10$ ist im rechten Teil der Abbildung 4.2.3-3 dargestellt.

(a) Grösse des Koeffizientenfeldes

(b) normiertes Koeffizientenfeld

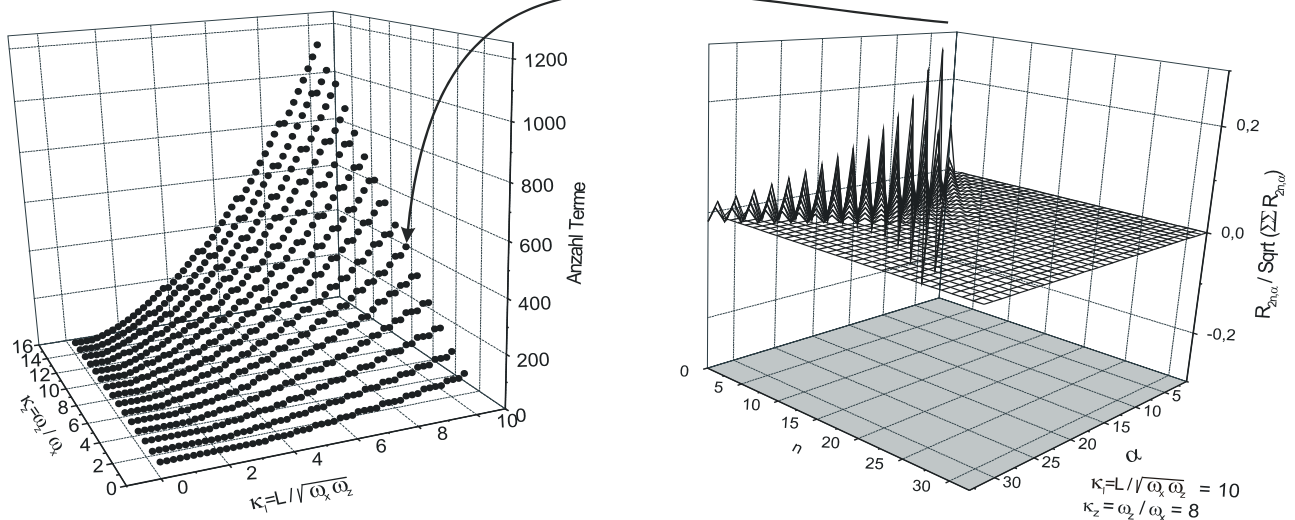


Abbildung 4.2.3-3 Grösse und Form des Koeffizientenfeldes

(a) Anzahl zu bestimmender Terme bei mindestens 99% Vollständigkeit. Es wurden mindestens 15 Terme berechnet. Ein Abbruch ist nur nach Fertigstellung einer ganzen Diagonale zulässig, d.h. die Anzahl der Terme ist durch $n(n+1)/2$ darstellbar.

(b) normiertes, d.h. durch die Wurzel der Summe dividiertes, Koeffizientenfeld für $\kappa_1 = 10$ und $\kappa_z = 8$. Die nach vorne weisende Ecke des Feldes wurde nicht berechnet, das Tabellenkalkulationsprogramm (Origin 6.0) war aber nicht davon abzuhalten, die fehlenden Werte als Null zu zeichnen. Die Lage des Feldes ist im linken Teil der Abbildung durch einen Pfeil markiert.

Für $\kappa_z = 1$ verschwinden alle Terme $R_{2n,\alpha}$ mit $n \neq 0$. Mit steigendem κ_z müssen zunehmend die Besselfunktionen höherer Ordnung berücksichtigt werden. Für $\kappa_l = 0$ ist $R_{0,1} = 1$ und alle anderen Terme sind Null. Da $k_{n=0,\alpha=1} = 0$ bedeutet das, daß für $\kappa_l \rightarrow 0$ $G_{\rho,\beta} = 1$ und damit zeitlich invariant wird. Da $G_{\rho,\beta}$ den Abfall der Korrelationsfunktion aufgrund der Diffusion quer zur Achse beschreibt, ergibt das auch anschaulich einen Sinn, da für $\kappa_l \rightarrow 0$ eine solche Diffusion nicht möglich ist. Mit steigendem κ_l gewinnen die Terme mit höherem α an Gewicht.

In Abbildung 4.2.3-4a sind einige $G_{\rho,\beta}(t)$ für $\kappa_z = 5$ bei unterschiedlichen Kapillarradien κ_l dargestellt. In Abbildung 4.2.3-4b wird der Kapillarradius $\kappa_l = 1$ konstant gehalten und statt dessen die Elliptizität κ_z variiert.

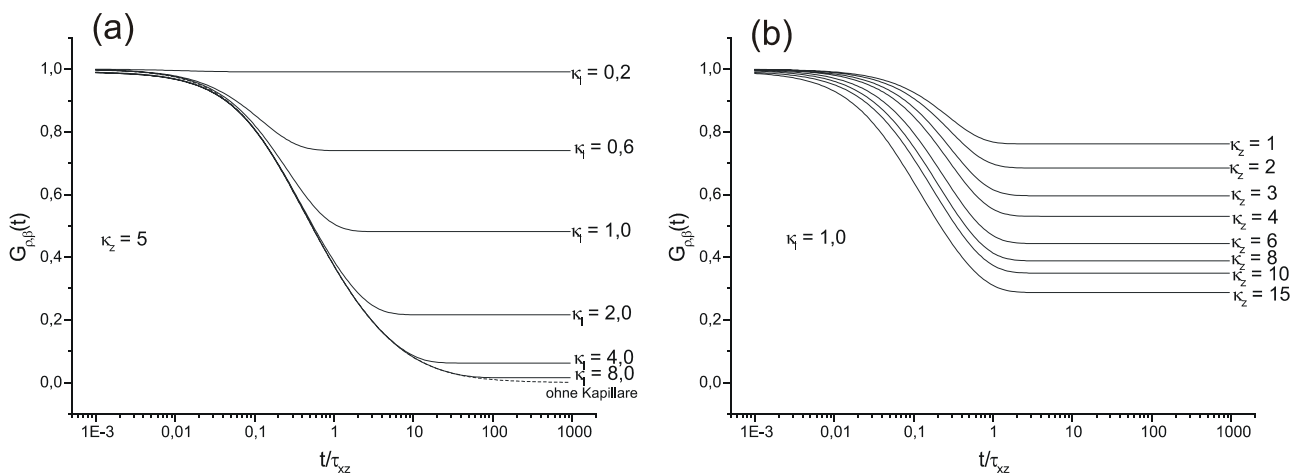


Abbildung 4.2.3-4 radialer und azimutaler Abfall $G_{\rho,\beta}(t)$ bei verschiedenen Kapillarradien und Elliptizitäten. Um die Kurven vergleichen zu können, wurde die Abszisse auf $\tau_{xz} = \omega_x \omega_z / (4 D)$, der geometrisch gemittelten Diffusionszeit in x und z Richtung ohne Kapillare, skaliert.

(a) Die Form des Detektionsvolumens wird konstant gehalten und der Kapillarradius L wird variiert. Für $\kappa_l = L / \sqrt{\omega_x \omega_z} \rightarrow 0$ strebt $G_{\rho,\beta}(t)$ gegen eins, während für $\kappa_l \rightarrow \infty$ $G_{\rho,\beta}(t)$ gegen den entsprechenden Funktionswert bei Abwesenheit der Kapillare, $1/\sqrt{(1+t/\tau_x)(1+t/\tau_z)}$ strebt.

(b) Der Kapillarradius wird konstant gehalten, das Detektionsvolumen bei konstantem Querschnittsflächeninhalt in z-Richtung gestreckt und in x-Richtung entsprechend gestaucht. Mit zunehmender Elliptizität $\kappa_z = \omega_z / \omega_x$ des Detektionsvolumens verringert sich der Einfluß der Kapillarwand.

Für lange Korrelationszeiten geht $G_{\rho,\beta}$ für kleine Kapillarradien nicht gegen Null, sondern gegen einen Grenzwert $0 < G_{\rho,\beta}(\infty) < 1$. Im Zähler verschwinden für große Zeiten alle Terme mit $k_{n,\alpha} > 0$; daraus folgt unmittelbar, daß nur $R_{0,1}$ (mit $k_{0,1} = 0$) im Zähler stehen bleibt.

$$\lim_{t \rightarrow \infty} G_{\rho,\beta}(t) = \frac{R_{0,1}^2}{\frac{\kappa_z}{8\pi\kappa_l^2} \int_0^{\pi/2} \frac{1 - \exp\left[-4 \frac{\kappa_l^2}{\kappa_z} (1 + (\kappa_z^2 - 1)\cos^2 \beta)\right]}{(1 + (\kappa_z^2 - 1)\cos^2 \beta)} d\beta} \quad (4.2.3-20)$$

Mit $J_0(0)=1$ ergibt sich:

$$R_{0,1} = \int_{\rho'=0}^1 \exp\left[-\frac{\kappa_l^2}{\kappa_z} \rho'^2 (\kappa_z^2 + 1)\right] I_0\left(\frac{\kappa_l^2}{\kappa_z} \rho'^2 (\kappa_z^2 - 1)\right) \rho' d\rho'$$

Falls $\kappa_z=1$ läßt sich $R_{0,1}$ analytisch angeben, der Integrand im Nenner wird β -unabhängig. Dann erhält man (mit $I_0(0)=1$):

$$\lim_{t \rightarrow \infty} G_{\rho,\beta}(t) = \frac{\left(\int_{\rho'=0}^1 \exp[-2\kappa_l^2 \rho'^2] \rho' d\rho'\right)^2}{\frac{1}{8\pi\kappa_l^2} \int_{\beta=0}^{\pi/2} (1 - \exp[-4\kappa_l^2]) d\beta} = \frac{\left(\frac{1 - \exp[-2\kappa_l^2]}{4\kappa_l^2}\right)^2}{\frac{1 - \exp[-4\kappa_l^2]}{16\kappa_l^2}} = \frac{1 - \exp[-2\kappa_l^2]}{\kappa_l^2 (1 + \exp[-2\kappa_l^2])} \quad @ \quad \kappa_z = 1 \quad (4.2.3-21)$$

In Abbildung 4.2.3-5 ist der Grenzwert für lange Zeiten bei unterschiedlichen Kapillarradien und Elliptizitäten aufgetragen. Es zeigt sich, daß der Grenzwert stärker von κ_l als von κ_z abhängt.

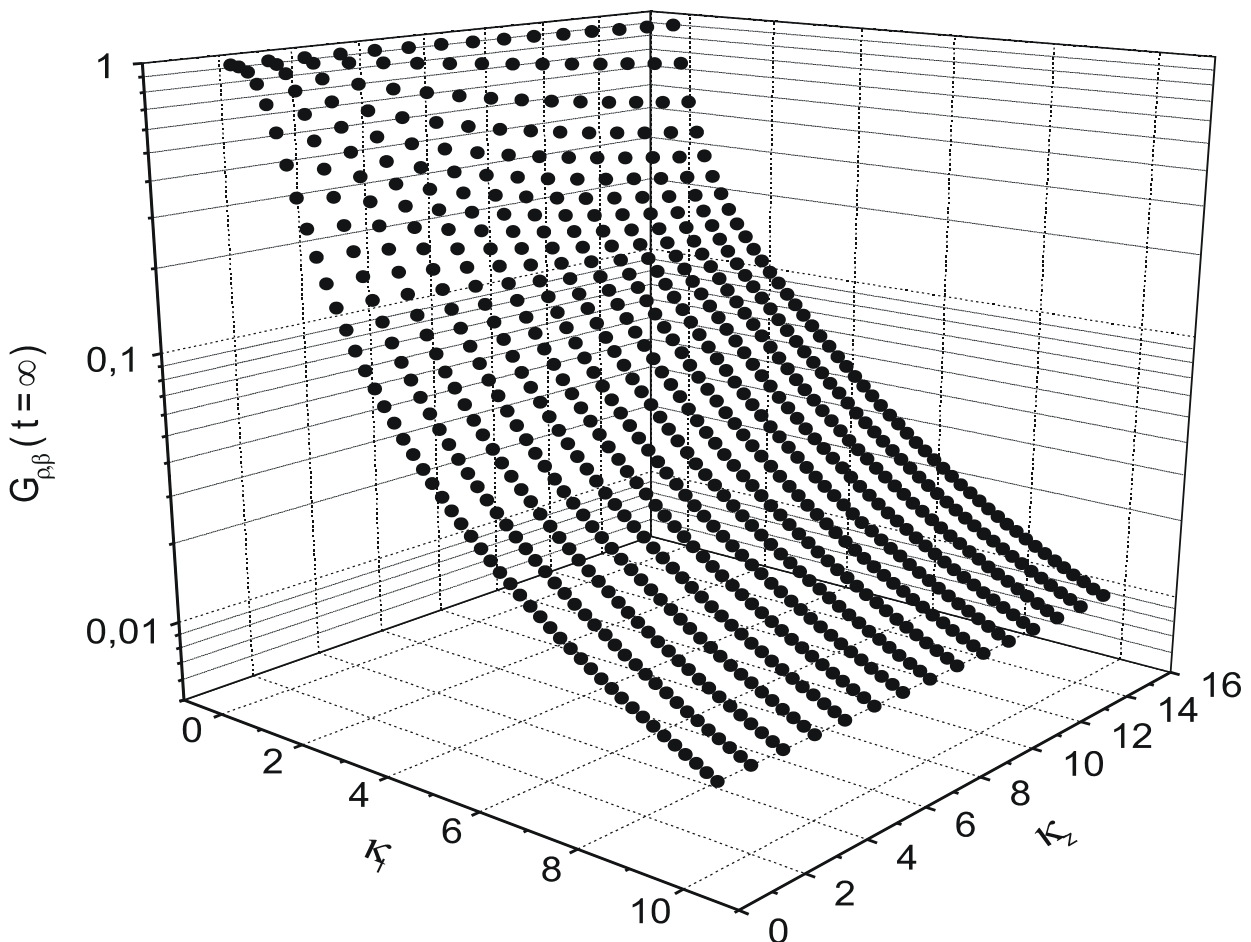


Abbildung 4.2.3-5 Restamplitude $G_{\rho,\beta}(\infty)$
Mit steigendem κ_l fällt $G_{\rho,\beta}(\infty)$ auf Null. Der Einfluß von κ_z ist dagegen nur für $\kappa_l < 6$ von Bedeutung.

Für $\kappa_l = 0$ oder $\kappa_l \gg 6$ wird $G_{\rho,\beta}(\infty)$ unabhängig von κ_z .

4.2.4 Analytische Approximation

Mit den in Kapitel 4.2.3 gewonnenen Ergebnissen ist es möglich, den Funktionswert $G(t)$ bei einer bestimmten Korrelationszeit t für einen gegebenen Satz von Parametern (Kapillarradius L , Achsenabschnitte des $1/e^2$ -Ellipsoids der Detektionseffizienz $\omega_x, \omega_y, \omega_z$, Diffusionskonstante D , Flußgeschwindigkeit v und mittlere Teilchenzahldichte \bar{C}) bzw. den aus diesen umkehrbar eindeutig abgeleiteten dimensionslosen Größen ($N_{frei} = \bar{C} \pi \sqrt{\pi} \omega_x \omega_y \omega_z$, $\kappa_l = L / \sqrt{\omega_x \omega_z}$, $\kappa_y = \omega_y / \omega_x$, $\kappa_z = \omega_z / \omega_x$, $t/\tau_{xz} = t 4D / (\omega_x \omega_z)$ sowie $f_v = v \omega_y / (4D)$) zu berechnen. Einsetzen der Gleichungen 4.2.3-12, 4.2.3-15 und 4.2.3-18 in Gl. 4.2.2-11 ergibt:

$$G(t) = \frac{1}{N_{frei}} \frac{\int_{\beta=0}^{\pi/2} \frac{1 - \exp\left[-4 \frac{\kappa_l^2}{\kappa_z} (1 + (\kappa_z^2 - 1) \cos^2 \beta)\right]}{1 + (\kappa_z^2 - 1) \cos^2 \beta} d\beta}{\frac{2}{\pi} \kappa_z \left(\int_{\beta=0}^{\pi/2} \frac{1 - \exp\left[-2 \frac{\kappa_l^2}{\kappa_z} (1 + (\kappa_z^2 - 1) \cos^2 \beta)\right]}{1 + (\kappa_z^2 - 1) \cos^2 \beta} d\beta \right)^2} \cdot \frac{\exp\left(-\frac{f_v^2 \kappa_z^2 t^2}{\kappa_y^4 \tau_{xz}^2} - \frac{\kappa_z t}{1 + \frac{\kappa_z t}{\kappa_y^2 \tau_{xz}}}\right)}{\sqrt{1 + \frac{\kappa_z t}{\kappa_y^2 \tau_{xz}}}}$$

$$\frac{\sum_{\alpha=1}^{\infty} \exp\left(-\frac{t}{4\tau_{xz} \kappa_l^2} k_{0,\alpha}^2\right) R_{0,\alpha}^2 + 2 \sum_{n=1}^{\infty} \sum_{\alpha=1}^{\infty} \exp\left(-\frac{t}{4\tau_{xz} \kappa_l^2} k_{2n,\alpha}^2\right) R_{2n,\alpha}^2}{\frac{\kappa_z}{8\pi \kappa_l^2} \int_{\beta=0}^{\pi/2} \frac{1 - \exp\left[-4 \frac{\kappa_l^2}{\kappa_z} (1 + (\kappa_z^2 - 1) \cos^2 \beta)\right]}{(1 + (\kappa_z^2 - 1) \cos^2 \beta)} d\beta}$$

(4.2.4-1)

Die Entwicklungskoeffizienten $R_{2n,\alpha}$ sind dabei durch Gleichung 4.2.3-12 definiert. $k_{2n,\alpha}$ gibt den Abszissenwert des α -ten Extremums der Besselfunktion $2n$ -ter Ordnung an (Abb. 4.2.1-3).

Um das Modell zu einer experimentell ermittelten Korrelationsfunktion in Bezug zu setzen, möchte man die Parameter so variieren, daß das Modell das Experiment möglichst gut wiedergibt. Dabei besteht ein sehr großer Nachteil darin, daß die Funktion $G_{\kappa_l, \kappa_y, \dots}(t)$ nicht analytisch vorliegt: zum einen ist die Berechnung von $G_{\rho, \beta}$ über die Entwicklungskoeffizienten überaus zeitraubend zum anderen akzeptieren kommerziell verfügbare Ausgleichsrechnungsprogramme (wie z.B. der „nonlinear Curve Fit“ des Programmes Origin) nur analytische Funktionen. Das zweite Problem läßt sich allerdings durch Compilieren des C-Codes als dynamische Laufzeitbibliothek („dynamic link library“, dll) und Anbinden der dll an Origin umgehen. Die (zeitunabhängige) Amplitudenfunktion bereitet keine Schwierigkeiten, wenn die Meßkurve auf $G(0) \equiv 1$ normiert wird. Problematisch ist daher nur $G_{\rho, \beta}(t)$. Die Idee

ist nun, eine geeignete, möglichst einfache analytische Funktion zu finden, mit der Gl. 4.2.3-11 approximiert werden kann.

Zu diesem Zweck werden für 750 Wertepaare $\kappa_l = 0,2; 0,4; \dots; 10$ und $\kappa_z = 1; 2; \dots; 15$ bei je 200 Zeitpunkten $\tau = (10^{-3} \dots 10^3) \times \tau_{xz}$ die Korrelationsfunktionen numerisch errechnet. Dabei wird die aufwendige Berechnung des Koeffizientenfeldes für jedes Paar κ_l, κ_z nur einmal ausgeführt. Dennoch dauerte die Rechnung etwa 8 Tage (mit einem optimierten C-Programm auf einem Athlon 1333). Insbesondere für große κ_l wächst das Koeffizientenfeld rasch an, so daß die Berechnung einer einzelnen Kurve bei $\kappa_l = 10$ mehrere Stunden Rechenzeit in Anspruch nimmt. Mit der im folgenden abgeleiteten Näherung ist die gesamte Schar von 750 Funktionen in weniger als 10s Rechenzeit erledigt, wobei die maximale Abweichung der Näherung vom numerischen Wert unter 5% liegt.

Für $\kappa_l \gg 10$ ergibt sich die bekannte Lösung im offenen Volumen, $1/\sqrt{(1+\kappa_z t/\tau_{xz})(1+t/(\kappa_z \tau_{xz}))}$ und für kleine Zeiten $t \ll \tau_{xz}$ gilt das auch für kleinere κ_l (Abb. 4.2.3-4a). Für große Zeiten strebt die Funktion des offenen Volumens gegen Null, während $G_{\rho,\beta}(t \rightarrow \infty)$ gegen einen von κ_l und κ_z abhängigen Grenzwert g_∞ strebt. Abb. 4.2.3-5 stellt diesen Grenzwert für 750 Wertepaare von κ_l und κ_z graphisch dar.

Um die Korrelationsfunktion zu approximieren, wird für $G_{\rho,\beta}$ die Funktion des offenen Volumens eingesetzt und der Einfluß der Kapillare dadurch berücksichtigt, daß statt der Korrelationszeit τ eine noch zu bestimmende Funktion $\theta(\kappa_l, \kappa_z, \tau/\tau_{xz})$ eingesetzt wird. Abbildung 4.2.4-1 veranschaulicht die Bedeutung dieser Funktion graphisch.

Wenn man also

$$G_{\rho,\beta}(\tau) = \frac{1}{\sqrt{(1+\kappa_z \theta(\kappa_l, \kappa_z, \tau/\tau_{xz})) \left(1 + \frac{\theta(\kappa_l, \kappa_z, \tau/\tau_{xz})}{\kappa_z}\right)}} \quad (4.2.4-2)$$

ansetzt, so wird $\lim_{t/\tau_{xz} \rightarrow 0} \theta(\kappa_l, \kappa_z, \tau/\tau_{xz}) = t/\tau_{xz}$ sein, denn für kleine Zeitverschiebungen ist es unwahrscheinlich, daß das Teilchen auf die Wand trifft. Für große Zeiten erhält man einen konstanten Grenzwert: $\lim_{t/\tau_{xz} \rightarrow \infty} \theta(\kappa_l, \kappa_z, \tau/\tau_{xz}) = \theta_\infty(\kappa_l, \kappa_z)$. Wenn man also $\theta(\kappa_l, \kappa_z, \tau/\tau_{xz})$ gegen

τ/τ_{xz} aufträgt, erhält man eine streng monoton steigende Kurve, die unabhängig von κ_l, κ_z für kleine Zeiten die Tangente $\theta = t/\tau_{xz}$ hat, um bei mittleren Zeiten abzuknicken und für große Zeiten gegen einen Grenzwert zu laufen (Abbildung 4.2.4-1b). Je größer das Verhältnis von Kapillardurchmesser zur Ausdehnung des Detektionsvolumens ist, desto später knickt die Kurve ab. Um θ_∞ zu berechnen, wird zunächst $\lim_{t \rightarrow \infty} G_{\rho,\beta}(t)$ bestimmt. θ_∞ ergibt sich dann durch Umformen von Gl. 4.2.4-2 aus $g_\infty(\kappa_z, \kappa_l) = G_{\rho,\beta}(t=\infty)$ zu:

$$\theta_\infty = \frac{\sqrt{g_\infty^2 \cdot (1 - \kappa_z^2)^2 + 4\kappa_z^2} - g_\infty \cdot (1 + \kappa_z^2)}{2g_\infty \cdot \kappa_z^2} \quad (4.2.4-3)$$

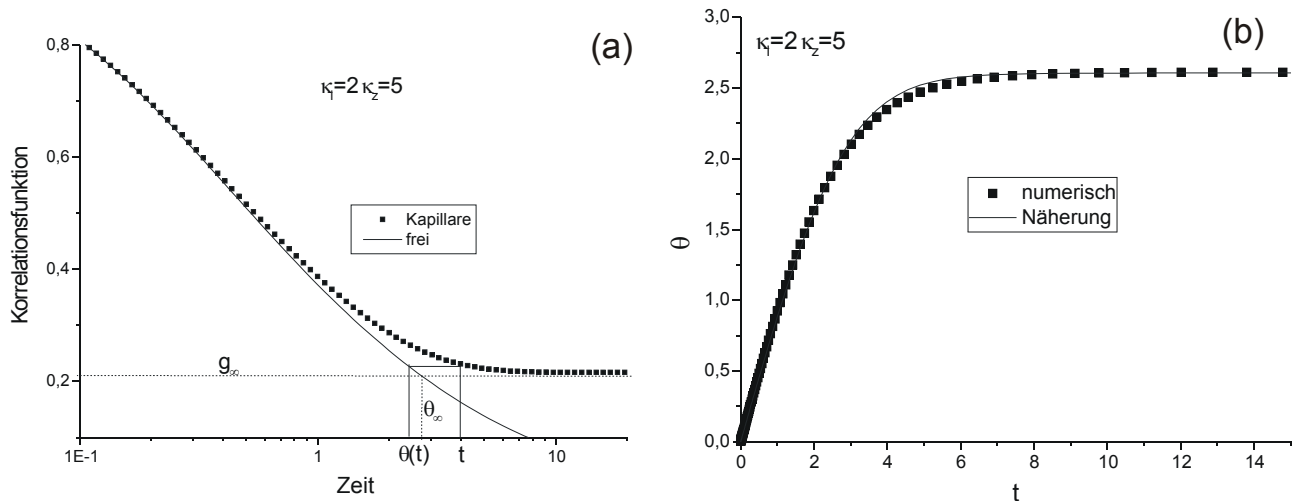


Abbildung 4.2.4-1 (a) Bestimmung und (b) Verlauf von $\theta(t)$.
 Die Näherung im rechten Teil der Abbildung ist durch Gl. 4.2.4-14 gegeben

Näherung für $G_{\rho,\beta}(t=\infty)$

Zunächst wird eine analytische Näherung für $g_\infty(\kappa_z, \kappa_l) = G_{\rho,\beta}(t=\infty)$ gebraucht. Für $\kappa_z=1$ wurde in Abschnitt 4.2.3 die analytische Lösung $g_\infty(\kappa_z=1, \kappa_l) = (1 - e^{-2\kappa_l^2}) / (\kappa_l^2 + \kappa_l^2 e^{-2\kappa_l^2})$ (Gl. 4.2.3-21) gefunden.

Ein Versuch, für $g_\infty(\kappa_z, \kappa_l)$ direkt eine Näherung zu finden, führte zu komplizierten Funktionen mit sehr unbefriedigendem Ergebnis (bis zu 15% Abweichung bei einer Näherung mit insgesamt 30 Parametern).

Aus Symmetriegründen ist $g_\infty(\kappa_z, \kappa_l) = g_\infty(1/\kappa_z, \kappa_l)$. Daher muß g_∞ eine gerade Funktion von $\ln(\kappa_z)$ sein. Betrachtet man die Höhenlinien des Graphen von g_∞ , aufgetragen gegen $\ln(\kappa_z)$ und $\ln(\kappa_l)$, so erhält man die Abbildung 4.2.4-2:

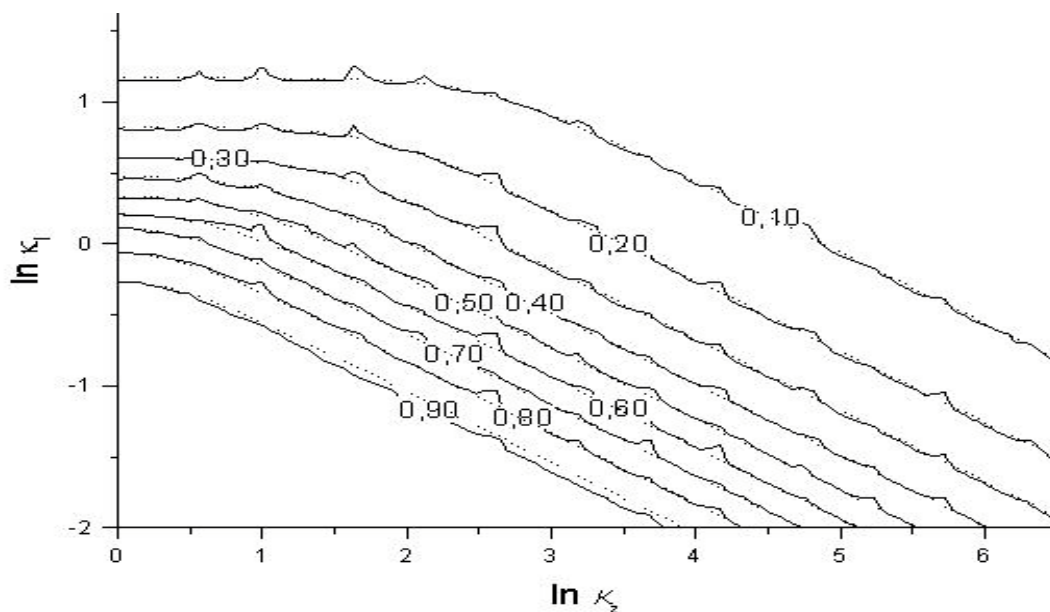


Abbildung 4.2.4-2: Höhenlinien des Graphen $g_\infty(\kappa_z, \kappa_l)$.
 Die numerisch ermittelten Höhenlinien sind durchgezogen dargestellt, die Näherungskurven gepunktet. Der dargestellte Bereich umfaßt $1 \leq \kappa_z \leq 665$ und $0.14 \leq \kappa_l \leq 7,3$.

Die Höhenlinien lassen sich mit

$$x = \ln(\kappa_z) \quad (4.2.4-4)$$

und

$$y = \ln(\kappa_l) \quad (4.2.4-5)$$

sowie

$$y_0 = y_0(x, y) |_{g_\infty(x=0, y_0)} \equiv g_\infty(x, y) \quad (4.2.4-6)$$

näherungsweise durch

$$y \approx -\frac{a}{f} \ln \left(\frac{(1 + e^{-f(x_c-x)})(1 + e^{-f(x_c+x)})}{(1 + e^{-fx_c})^2} \right) + y_0 \quad (4.2.4-7)$$

beschreiben.

Der Parameter y_0 stellt dabei den Ordinatenabschnitt der Höhenlinie dar. Gelingt es, die übrigen Parameter durch y_0 auszudrücken und die Gleichung nach y_0 aufzulösen, so ist das Problem damit gelöst, denn für $\kappa_z = 1 \Leftrightarrow x = \ln(\kappa_z) = 0$ ist die analytische Lösung der Gl. 4.2.3-21 bekannt.

Man findet für die übrigen Parameter a, f, x_c näherungsweise

$$a=0,5 \quad f=3 \quad \text{und} \quad x_c = \frac{2,2}{65} \ln(1 + e^{65y_0}).$$

Substitution in die oben angegebene Gleichung führt zu

$$y \approx -\frac{1}{6} \ln \left(\frac{\left(\left(1 + e^{-3 \left(\frac{2,2}{65} \ln(1 + e^{65y_0}) - x \right)} \right) \left(1 + e^{-3 \left(\frac{2,2}{65} \ln(1 + e^{65y_0}) + x \right)} \right) \right)}{\left(1 + e^{-3 \frac{2,2}{65} \ln(1 + e^{65y_0})} \right)^2} \right) + y_0$$

Diese Gleichung läßt sich leider nicht nach y_0 auflösen.

Daher wurde für eine Reihe von Punkten x, y der zugehörige y_0 -Wert, d.h. der Ordinatenabschnitt derjenigen Höhenlinie, der der Punkt x, y angehört numerisch ermittelt und anschließend eine Funktion $y_0(x, y)$ gesucht die diesen Ordinatenabschnitt näherungsweise wiedergibt.

Man findet schließlich, daß y_0 -y bei konstant gehaltenem x -Wert durch eine S-förmige Funktion mit 5 Parametern approximiert werden kann. Die Funktion stellt das Integral über die Differenz zweier Fermi-Funktionen dar. Sie wurde gewählt, weil die Ableitungen der numerisch ermittelten Kurven stark asymmetrische Peakfunktionen ergaben und der Ansatz über die Fermi-Funktionen eine intuitiv einfache Möglichkeit darstellt, die Flankenzentren (y_{c1}, y_{c2}) und -steigungen (f_1, f_2) des Pulses zu beeinflussen:

$$y_0 - y \approx \frac{a_y}{y_{c1} - y_{c2}} \left(\frac{\ln(1 + e^{f_1(y-y_{c1})})}{f_1} - \frac{\ln(1 + e^{f_1(y-y_{c2})})}{f_1} + y_{c1} - y_{c2} \right) \quad (4.2.4-8)$$

Abbildung 4.2.4-2 zeigt Näherungskurven zusammen mit den zugehörigen Datenpunkten für eine Reihe von x-Werten. Die dabei bestimmten optimalen Parameter a_y , y_{c1} , y_{c2} , f_1, f_2 sind in Tabelle 4.2.4-1 angegeben.

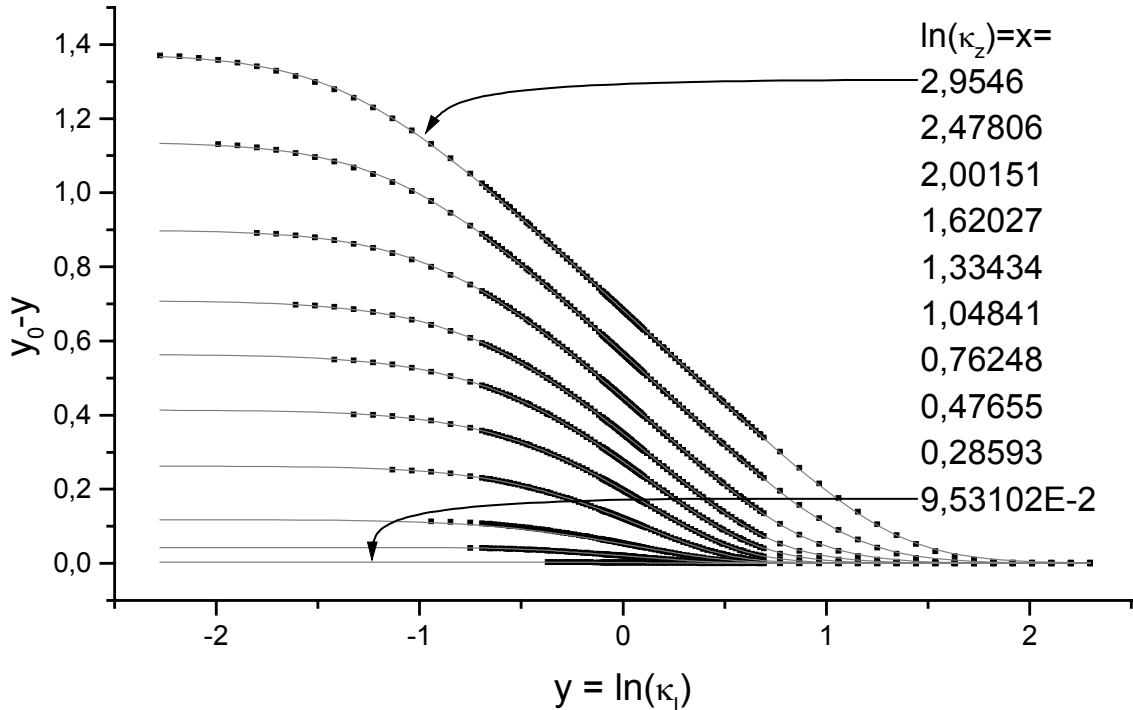


Abbildung 4.2.4-2 Näherungskurven durch y_0-y bei verschiedenen x-Werten

x	χ^2	a_y	y_{c1}	f_1	y_{c2}	f_2
2,95	3,96E-6	1,375 ± 1,3E-3	-1,352 ± 2,6E-3	3,27 ± 4,6E-2	1,345 ± 2,2E-3	4,67 ± 6,1E-2
2,48	2,90E-6	1,137 ± 1,2E-3	-1,107 ± 2,9E-3	3,21 ± 4,5E-2	1,116 ± 2,5E-3	4,84 ± 6,3E-2
2,00	1,55E-6	0,900 ± 9,3E-4	-0,865 ± 3,9E-3	3,08 ± 3,7E-2	0,897 ± 2,8E-3	5,09 ± 6,0E-2
1,62	7,38E-7	0,709 ± 7,5E-4	-0,669 ± 5,6E-3	2,94 ± 3,3E-2	0,735 ± 2,9E-3	5,37 ± 5,6E-2
1,33	2,93E-7	0,564 ± 6,3E-4	-0,521 ± 7,5E-3	2,81 ± 3,0E-2	0,629 ± 2,5E-3	5,58 ± 5,4E-2
1,05	1,18E-7	0,414 ± 4,1E-4	-0,438 ± 7,6E-3	2,90 ± 2,7E-2	0,553 ± 2,0E-3	6,04 ± 5,7E-2
0,76	4,47E-8	0,263 ± 3,2E-4	-0,446 ± 6,2E-3	3,23 ± 3,3E-2	0,500 ± 1,6E-3	6,85 ± 6,1E-2
0,48	1,58E-8	0,118 ± 2,0E-4	-0,510 ± 3,0E-3	4,37 ± 5,7E-2	0,471 ± 1,6E-3	8,11 ± 6,1E-2
0,29	2,61E-9	0,043 ± 7,0E-5	-0,480 ± 1,7E-3	6,02 ± 8,8E-2	0,460 ± 1,5E-3	8,66 ± 6,4E-2
0,095	1,7E-11	0,003 ± 5,3E-6	-0,231 ± 8,5E-4	11,9 ± 2,1E-1	0,474 ± 1,3E-3	9,36 ± 6,3E-2
0	--	0,000 ± 0,0E-∞	-- ± --	-- ± --	-- ± --	-- ± --

Tabelle 4.2.4-1 Parameter der Näherungskurven aus Abbildung 4.2.4-2.

Die Parameter a_y , y_{c1} , y_{c2} , f_1, f_2 werden nun ihrerseits als Funktionen von x aufgefaßt, für die entsprechende Näherungen gesucht werden. Aufgrund der Symmetrieeigenschaften bezüglich eines Überganges $\kappa_z \rightarrow 1/\kappa_z$ kommen dabei nur gerade Funktionen von x in Frage.

Die Funktion $a_y(x)$ hat bei $x = 0$ definitionsgemäß eine Nullstelle. Der Abbildung 4.2.4-1 ist zu entnehmen, daß die Nullstelle zugleich Minimum der Funktion sein muß, da für $|x| > 0$ $y_0 > y$. Für große x zeigt sich dagegen eine lineare Entwicklung von $a_y(x)$. Die Ableitung von a_y ist daher eine ungerade, S-förmige Kurve, wie z.B. $P1 \cdot \tanh(P2 \cdot x)$. Integration [Bronstein 2001, Gl.21.5.4.1-436, S. 1077] liefert als Ansatz für $a_y(x)$:

$$a_y = \frac{P1}{P2} \ln(\cosh(P2 \cdot x)) = \frac{P1}{P2} \ln\left(\frac{e^{P2 \cdot x} + e^{-P2 \cdot x}}{2}\right) = \frac{P1}{P2} \ln(e^{P2 \cdot x} + e^{-P2 \cdot x}) - \frac{P1}{P2} \ln 2 \quad (4.2.4-9)$$

Wie man sich anhand der letzten Formulierung leicht überzeugen kann, gilt $\lim_{x \rightarrow 0} a_y = 0$ sowie

$\lim_{|x| \rightarrow \infty} a_y = P1 \cdot |x| - \frac{P1}{P2} \ln 2$. Abbildung 4.2.4-4a zeigt die $a_y(x)$ aus Tabelle 4.2.4-1 sowie die Näherungskurve.

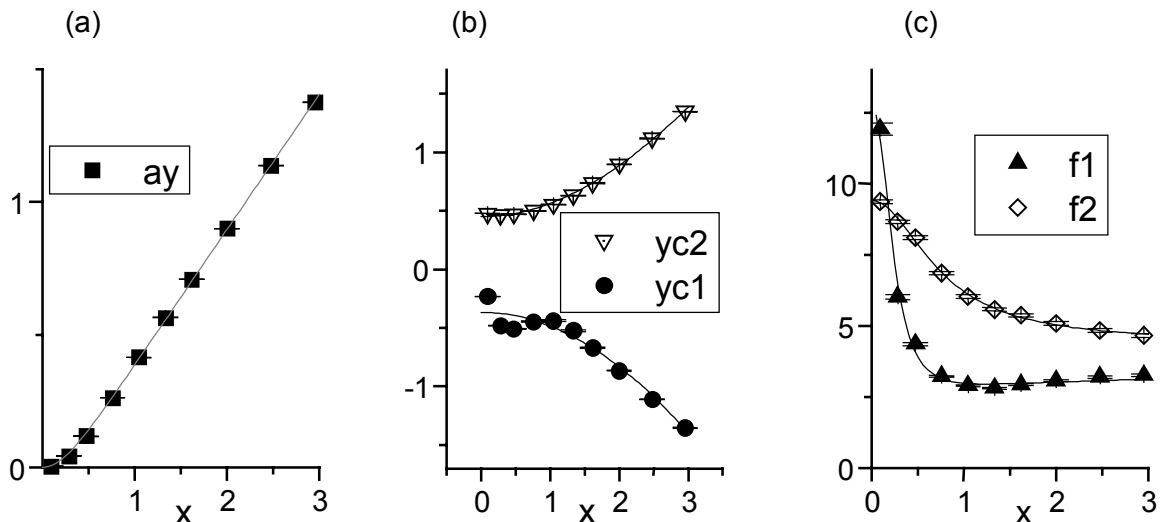


Abbildung 4.2.4-4 Darstellung der Daten aus Tabelle 4.2.4-1 und der durch sie gelegten Näherungskurven.

(a) Amplitude a_y mit Näherung Gl. 4.2.4-4

(b) Krümmungszentren $yc1, yc2$ mit Näherung Gl. 4.2.4-5 a, b. Der schlechte Fit für $yc1$ bei $x < 0,5$ macht sich im Ergebnis kaum bemerkbar, da in diesem Bereich die Amplitude $a_y(x)$ klein ist.

(c) Krümmungswerte (Flankensteigungen der Ableitung) $f1, f2$ und Näherung Gl. 4.2.4-6 a, b.

Für $yc1, yc2$ kann derselbe Ansatz verwendet werden, allerdings wird hier noch ein dritter Parameter benötigt, der den von Null verschiedenen Ordinatenabschnitt (Abbildung 4.2.4-4b) angibt:

$$y_{c1} = \frac{P3}{P4} \ln(\cosh(P4 \cdot x)) + P5 \quad y_{c2} = \frac{P6}{P7} \ln(\cosh(P7 \cdot x)) + P8 \quad (4.2.4-10^{a,b})$$

Für f_1 liefert Lorentz($1/x$) und für f_2 liefert eine normale Lorentzkurve brauchbare Näherungen (Abbildung 4.2.4-3c):

$$f_1 = P_9 \left(1 - \frac{P_{10}}{1 + \left(\frac{P_{11} - x}{P_{11} \cdot P_{12} \cdot x} \right)^2} \right) \quad f_2 = P_{13} + \frac{P_{15}}{1 + 2 \left(\frac{x}{P_{14}} \right)^2} \quad (4.2.4-11^{a,b})$$

Als vorläufiges Ergebnis erhält man aus den Fits der Abbildung 4.2.4-3 eine Liste mit 15 Parametern P1-P15, die eingesetzt in die Gleichungen 4.2.4-5, 4.2.4-6, 4.2.4-7 und schließlich 4.2.4-4 und 4.2.3-13 die Restamplitude g_∞ als Funktion von x und y und damit auch als Funktion von κ_z und κ_l beschreiben:

P1	+5,10E-1 ± 3,6E-3	P2	+2.82E+0 ± 1,3E-1
P3	-1.72E+0 ± 9.8E+0	P4	+1,36E-1 ± 8,2E-1
P5	-3,70E-1 ± 4,5E-2	P6	+8,73E-1 ± 3,1E-1
P7	+2,61E-1 ± 1,1E-1	P8	+4,47E-1 ± 8,7E-3
P9	+1,27E+1 ± 1,0E-0	P10	+7,68E-1 ± 1,9E-2
P11	+1,23E+0 ± 1,1E-1	P12	+3.59E+0 ± 3.8E-1
P13	+4.42E+0 ± 6,8E-2	P14	+1.06E+0 ± 3,9E-2
P15	+4.99E+0 ± 8,4E-2		

Mit diesen Parametern weicht die analytische Näherung im Bereich $0,2 \leq \kappa_l \leq 10$ und $1 \leq \kappa_z \leq 20$ um maximal 1,27% vom numerischen Wert ab (für $\kappa_l=2,4$ und $\kappa_z=12$ liefert dort die Näherung $g_\infty = 0,1286$ während numerisch 0,1270 gefunden wird). Diese Parameter dienen als Startwerte für eine numerische Optimierung.

Mit den Startwerten erhält man als mittlere quadratische Abweichung über alle 4928 errechneten Datenpunkte im Bereich $0,2 \leq \kappa_l \leq 10$ und $1 \leq \kappa_z \leq 20$: $\chi^2 = 0,02323$.

Die numerisch optimierten Parameter (nicht angegeben) liefern zwar mit $\chi^2 = 5,33 \times 10^{-6}$ einen besseren Wert für die mittlere quadratische Abweichung, dafür ergibt sich an manchen Stellen ein relativer Fehler von über 80%; daher werden im Folgenden die Startwerte und nicht die „optimierten“ Werte verwendet.

Approximation der Zeitkorrektur $\theta(\kappa_l, \kappa_z, t)$

Zu Beginn des Abschnitts 4.2.4 wurde festgestellt, daß

$$\lim_{t \rightarrow 0} \theta(\kappa_l, \kappa_z, t) = t \quad (4.2.4-12)$$

$$\lim_{t \rightarrow \infty} \theta(\kappa_l, \kappa_z, t) = \theta_\infty(\kappa_l, \kappa_z) \quad (4.2.4-13)$$

sowie

$$\frac{\partial}{\partial t} \theta(\kappa_l, \kappa_z, t) = \theta'(\kappa_l, \kappa_z, t) > 0 \quad \forall t \quad (4.2.4-14)$$

Dabei bezeichnet t den Quotienten τ/τ_{xz} , wobei τ die Korrelationszeit und $\tau_{xz} = \omega_x \times \omega_z / (4 \times D)$ die geometrisch gemittelte Diffusionszeit in x- und z-Richtung in Abwesenheit der Kapillare ist.

Für die partielle Ableitung der Gl. 4.2.4-9 ergibt sich daher $\theta'(\kappa_l, \kappa_z, 0) = 1$ und $\theta'(\kappa_l, \kappa_z, t \rightarrow \infty) = 0$. Als brauchbarer Ansatz für θ' erweist sich nach einigem Probieren eine Fermi-Funktion. (Um $t=0$ zentrierte Peakfunktionen lieferten unbefriedigende Ergebnisse.):

$$\theta'(\kappa_l, \kappa_z, t) \approx \frac{1}{1 + \exp[f \cdot (t - t_c)]} \quad (4.2.4-15)$$

Die Integration über θ' liefert den Ansatz für θ :

$$\theta(\kappa_l, \kappa_z, t) = \int_0^t \theta'(\kappa_l, \kappa_z, t') dt' \approx \frac{1}{f} \ln \left(\frac{1 + \exp[-f \cdot t_c]}{1 + \exp[f \cdot (t - t_c)]} \right) + t \quad (4.2.4-16)$$

Die Bildung des Grenzwertes für $t \rightarrow \infty$ ergibt θ_∞ :

$$\begin{aligned} \theta_\infty(\kappa_l, \kappa_z) &\approx \frac{\ln[1 + \exp(-f \cdot t_c)]}{f} + \lim_{t \rightarrow \infty} \left(t - \frac{1}{f} \ln[1 + e^{f \cdot (t - t_c)}] \right) = \frac{\ln[1 + \exp(-f \cdot t_c)]}{f} + \lim_{t \rightarrow \infty} \left(t - \frac{f \cdot (t - t_c)}{f} \right) \\ &= \frac{\ln[1 + \exp(-f \cdot t_c)]}{f} + t_c = \frac{\ln[\exp(f \cdot t_c) + 1]}{f} \end{aligned} \quad (4.2.4-17)$$

Da θ_∞ über Gl. 4.2.4-3 aus dem im vorangegangenen Abschnitt bestimmten g_∞ zugänglich ist, kann einer der Parameter f , t_c aus den Gln. 4.2.4-10-17 eliminiert werden, wobei man für t_c eine analytische Lösung erhält:

$$t_c = \frac{1}{f} \ln(e^{f \theta_\infty} - 1) \quad (4.2.4-18)$$

Substitution von t_c in Gl. 4.2.4-16 durch Gl. 4.2.4-18 ergibt:

$$\theta(t) \approx t + \theta_\infty - \frac{1}{f} \ln(e^{f \theta_\infty} + e^{ft} - 1) \quad (4.2.4-19)$$

Eine Kurvendiskussion von $\theta'(t)$ zeigt, daß diese Funktion einen Wendepunkt an der Stelle $t = t_c$ mit der Steigung $-1/4f$ besitzt. Die Bestimmung von f aus der Steigung der Wendetangenten der numerisch bestimmten $\theta'(t)$ erwies sich jedoch als nicht zweckmäßig, da diese Methode insbesondere für kleine κ_l schlechte Parameter f ergibt. Statt dessen wird ein least-square-Fit zur Bestimmung von f herangezogen, wobei die Steigung der Wendetangente den

Startwert liefert. Abbildung 4.2.4-5a zeigt die so ermittelten f -Werte als Funktion der Parameter κ_1 und κ_z . In Abbildung 4.2.4-5b ist $\ln(f)$ gegen $\ln(\kappa_1)$ unabhängig von κ_z aufgetragen. Wie man erkennt, ist die Streuung der Punkte, die durch die unterschiedlichen κ_z -Werte verursacht wird, relativ klein.

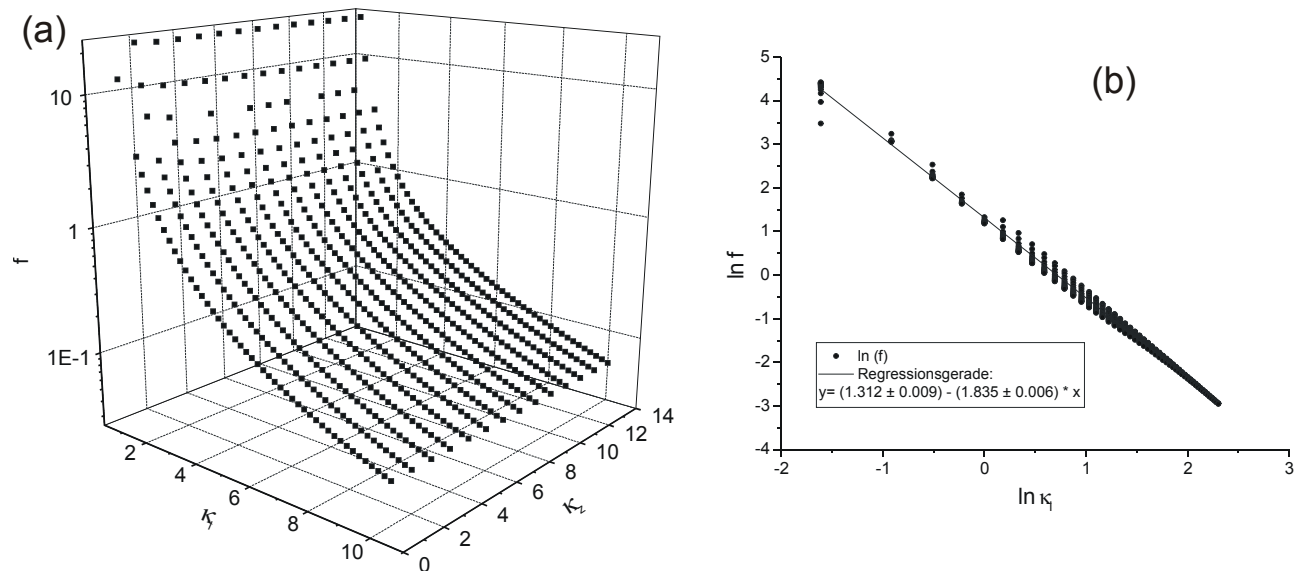


Abbildung 4.2.4-5 Parameter f aus Gl. 4.2.10-15 als Funktion von κ_1 und κ_z .

(a) Dreidimensionale semilogarithmische Darstellung: f ist näherungsweise unabhängig von κ_z

(b) Projektion auf die κ_1 - f -Ebene in logarithmischer Darstellung mit Regressionsgerade

Im logarithmischen Graphen liegen die Punkte fast perfekt auf einer Geraden, man kann also

$$\ln f = a_0 + a_1 \ln \kappa_1 \quad (4.2.4-20)$$

ansetzen, wobei man $a_0 = 1.312 \pm 9,22\text{E-}3$ und $a_1 = -1,835 \pm 5,67\text{E-}3$ bei einem Regressionskoeffizienten von $-0,9965$ erhält.

Exponieren von Gl. 4.2.4-15 ergibt $f \approx e^{a_0} \kappa_1^{a_1}$ bzw. nach Umformulieren:

$$f \approx \frac{P16}{\kappa_1^{P17}} \quad (4.2.4-21)$$

$$P16 \quad 3.714\text{E}+0 \pm 3.42\text{E-}2$$

$$P17 \quad 1.835\text{E}+0 \pm 5.67\text{E-}3$$

Durch Einsetzen der Gleichungen 4.2.4-9, 4.2.4-10, 4.2.4-11 in Gleichung 4.2.4-8 erhält man eine Näherung für y_0 . Durch Exponieren erhält man den Wert κ_1 , bei dem $g_\infty(\kappa_z, \kappa_1) \equiv g_\infty(\kappa_z=1, \kappa_1)$. Dieser Wert wird in Gleichung 4.2.3.-13 eingesetzt und ergibt g_∞ . Mit Gl. 4.2.4-3 erhält man daraus $\theta_{\infty,1}$, das zusammen mit Gl. 4.2.4-16 in Gl. 4.2.4-14 eingesetzt $\theta(t)$ ergibt. Durch Verwendung dieses Ergebnisses in Gl. 4.2.4-2 ist das Ziel, eine analytische Näherung zu für $G_{p,\beta}$ finden, erreicht.

Die maximale relative Abweichung der Näherung von den 750 numerisch errechneten Funktionen im Bereich $0,2 \leq \kappa_1 \leq 10$ und $1 \leq \kappa_z \leq 15$ betrug $+4.72\%$ bei $\kappa_1=2$, $\kappa_z=1$ $t=1.86$.

Die quadratisch gemittelte relative Abweichung aller 750×200 Datenpunkte beträgt 0.92%. Der Geschwindigkeitsgewinn der Näherung gegenüber der numerischen Rechnung ist abhängig von der Anzahl der Terme $R_{2n,\alpha}$, die bei der numerischen Rechnung berücksichtigt werden müssen. Für $\kappa_l < 1$ (ca. 15 Terme) beträgt der Zeitgewinn etwa 10^3 ; für $\kappa_l = 10$ (ca. 1200 Terme) etwa 10^6 .

Im folgenden Kasten sollen die Ergebnisse des Abschnitts 4.2.4 zusammengefaßt werden:

P1	+5,10E-1 ± 3,6E-3	P2	+2.82E+0 ± 1,3E-1
P3	-1.72E+0 ± 9.8E+0	P4	+1,36E-1 ± 8,2E-1
P5	-3,70E-1 ± 4,5E-2	P6	+8,73E-1 ± 3,1E-1
P7	+2,61E-1 ± 1,1E-1	P8	+4,47E-1 ± 8,7E-3
P9	+1,27E+1 ± 1,0E-0	P10	+7,68E-1 ± 1,9E-2
P11	+1,23E+0 ± 1,1E-1	P12	+3.59E+0 ± 3.8E-1
P13	+4.42E+0 ± 6,8E-2	P14	+1.06E+0 ± 3,9E-2
P15	+4.99E+0 ± 8,4E-2	P16	+3.71E+0 ± 3.4E-2
P17	+1.84E+0 ± 5.6E-3		

$$t = \tau/\tau_{xz} \quad lkz = |\ln(\kappa_z)| \quad lkl = \ln(\kappa_l)$$

$$a_y = \frac{P1}{P2} \ln(\cosh(P2 \cdot lkz)) \quad y_{c1} = \frac{P3}{P4} \ln(\cosh(P4 \cdot lkz)) + P5 \quad y_{c2} = \frac{P6}{P7} \ln(\cosh(P7 \cdot lkz)) + P8$$

(4.2.4-9), (4.2.4-10^{a,b})

$$f1 = P9 \left(1 - \frac{P10}{1 + \left(\frac{P11 - lkz}{P11 \cdot P12 \cdot lkz} \right)^2} \right) \quad f2 = P13 + \frac{P15}{1 + 2 \left(\frac{lkz}{P14} \right)^2}$$

(4.2.4-11^{a,b})

$$y_0 \approx lkl + \frac{a_y}{y_{c1} - y_{c2}} \left(\frac{\ln(1 + e^{f_1(lkl - y_{c1})})}{f_1} - \frac{\ln(1 + e^{f_1(lkl - y_{c1})})}{f_1} + y_{c1} - y_{c2} \right)$$

(4.2.4-8)

$$kl_0 = e^{y_0} \quad g_\infty = \frac{1 - \exp[-2kl_0^2]}{kl_0^2(1 + \exp[-2kl_0^2])} \quad \theta_\infty = \frac{\sqrt{g_\infty^2(1 - \kappa_z^2)^2 + 4\kappa_z^2 - g_\infty(1 + \kappa_z^2)}}{2g_\infty\kappa_z^2}$$

(), (4.2.3-13), (4.2.4-3)

$$f \approx \frac{P16}{\kappa_l^{P17}} \quad \theta \approx t + \theta_\infty - \frac{1}{f} \ln(e^{f\theta_\infty} + e^{ft} - 1)$$

(4.2.4-21), (4.2.4-19)

$$G_{\rho,\beta} = \frac{1}{\sqrt{(1 + \kappa_z \theta) \left(1 + \frac{\theta}{\kappa_z} \right)}}$$

(4.2.4-2)

Kasten 4.2.4-1 Näherungsformel zur Berechnung des radial-azimutalen Abfalls der Korrelationsfunktion $G_{\rho,\beta}$

Das folgende Labtalk-Script kann zwar in Origin zur Berechnung der Näherungslösung verwendet werden. Allerdings arbeitet die Implementierung als dll etwa 100x schneller:

```

Parameter: kl,kz,txz
Variablen: unabh: tau abh : Grb
t=tau/txz; x=abs(ln(kz)); y=ln(kl);
P1 = 0.51017 ; P2 = 2.82284 ; P3 = -1.72285 ; P4 = 0.13642 ; P5 = -0.37027 ; P6 = -
1.72285 ;
P7 = 0.13642 ; P8 = -0.37027 ; P9 = 12.73972 ; P10 = 0.76818 ; P11 = 3.58891 ; P12 =
1.23789 ;
P13 = 4.41873 ; P14 = 1.06111 ; P15 = 4.98901 ; P16 = 1.31234 ; P17 = -1.83517 ;

ay=P1/P2*ln(cosh(P2*x));
yc1=P3/P4*ln(cosh(P4*x))+P5; yc2=P6/P7*ln(cosh(P7*x))+P8;
f1=P9*(1-P10/(1+(P11-x)/P12/x/P11)^2)); f2=P13+P15/(1+2*(x/P14)^2);

y0=y+ay/(yc1-yc2)*(ln(1+exp(f1*(y-yc1)))/f1-ln(1+exp(f2*(y-yc2)))/f2+yc1-yc2);

k10=exp(y0); goo=(1-exp(-2*k10^2))/k10^2/(1+exp(-2*k10^2));
too=1/2/kz*(-goo-goo*kz^2+(g^2-2*kz^2*goo^2+goo^2*kz^4+4*kz^2)^(1/2))/goo;

ft=exp(P16)*k1^-P17;
if((t*ft<650)&&(too*ft<650))
    theta=too+t-ln((exp(too*ft)-1+exp(ft*t)))/ft;
if((t*ft>=650)&&(too*ft<650))
    theta=too;
if(too*ft>=650)
    theta=t;
Grb=1/sqrt((1+kz*theta)*(1+theta/kz));

```

Zum Abschluß dieses Abschnitts sollen nun noch einige der numerisch gerechneten Korrelationsfunktionen mit der Näherung gefittet werden, um zu überprüfen, ob der Fit die richtigen Parameter liefert: Es werden 12 repräsentative numerische Kurven bei $\kappa_l = 0.4, 1, 2.5$ und 6.2 und $\kappa_z = 1, 3$ und 10 ($\tau_{xz} = 1$) gewählt und mit der Näherung gefittet, wobei die Diffusionszeit einmal bei 1 fixiert und einmal variiert wurde. Wie man an Tabelle 4.2.4-2 erkennt, liefert die Näherung bei bekannter Diffusionszeit für alle Kapillarradien gute Ergebnisse. Wird dagegen auch die Diffusionszeit variiert, ergeben sich nur für $\kappa_l > 1 \wedge \kappa_z < \kappa_l^2 \wedge 1/\kappa_z < \kappa_l^2$ gute Ergebnisse. Der Kapillarradius muß also um so größer sein, je stärker die Elliptizität des Detektionsvolumens ausgeprägt ist. Anschaulich bedeutet das, daß die freie Diffusionszeit nur dann aus dem radial-azimutalen Abfall der Korrelationsfunktion in der Kapillare zugänglich ist, wenn die Kapillärwände außerhalb des $1/e^2$ -Ellipsoids des Detektionsvolumens liegen.

kl	kz	χ^2 (1)	κ_l (1)	κ_z (1)	χ^2 (2)	κ_l (2)	κ_z (2)	τ_{xz} (2)
0,4	1	1,06E-07	0,400 ± 0,005	0,998 ± 21,02	3,38E-09	0,396 ± 0,088	1,000 ± 65,694	0,812 ± 0,326
0,4	3	1,16E-07	0,387 ± 9,4E-4	3,239 ± 0,015	9,56E-08	0,600 ± 0,071	0,999 ± 37,67	0,459 ± 0,094
0,4	10	3,01E-06	0,383 ± 8,2E-4	10,71 ± 0,043	1,29E-06	0,194 ± 0,0083	(50,0) ± 6,136	3,890 ± 0,367
1,0	1	1,49E-06	0,898 ± 0,0013	1,829 ± 0,0088	9,98E-07	0,590 ± 0,342	4,806 ± 5,314	2,179 ± 2,316
1,0	3	5,80E-06	0,978 ± 0,0017	3,217 ± 0,013	6,17E-07	0,304 ± 0,0046	39,707 ± 1,705	(10,0) ± 0,351
1,0	10	0,00002	0,975 ± 0,0023	10,284 ± 0,040	6,85E-06	0,493 ± 0,0175	(50,0) ± 5,055	4,359 ± 0,380
2,4	1	7,29E-06	2,402 ± 0,0022	0,691 ± 0,0063	1,66E-06	2,400 ± 0,0010	0,999 ± 1,881	0,955 ± 0,0024
2,4	3	3,33E-06	2,387 ± 0,0016	3,256 ± 0,0072	2,04E-06	2,391 ± 0,0012	3,005 ± 0,021	0,952 ± 0,0039
2,4	10	7,16E-06	2,370 ± 0,0046	10,624 ± 0,023	4,05E-06	2,038 ± 0,043	15,919 ± 0,747	1,472 ± 0,0681

6,2	1	0,00001	6,201±0,064	0,782±0,013	0,00001	6,205±0,064	1,314±0,050	1,004±0,0058
6,2	3	5,10E-06	6,204±0,040	3,067±0,0083	5,09E-06	6,201±0,040	3,042±0,025	0,995±0,0047
6,2	10	9,44E-06	6,185±0,055	10,211±0,026	9,48E-06	6,183±0,055	10,172±0,169	0,996±0,014

Tabelle 4.2.4-2 Fitparameter der Näherung an simulierte Kurven. In Fit (1) wurde die freie Diffusionszeit vorgegeben, in Fit (2) wurde sie variiert. Falls die Näherung falsche Ergebnisse ergibt, sind die Zellen grau unterlegt. Für $\kappa_1 \leq 1$ muß τ_{xz} vorgegeben werden.

Abbildung 4.2.4-6 zeigt die numerischen Werte, die Kurven beider Fits (sind mit dem Auge praktisch ununterscheidbar) und die jeweiligen Abweichungen.

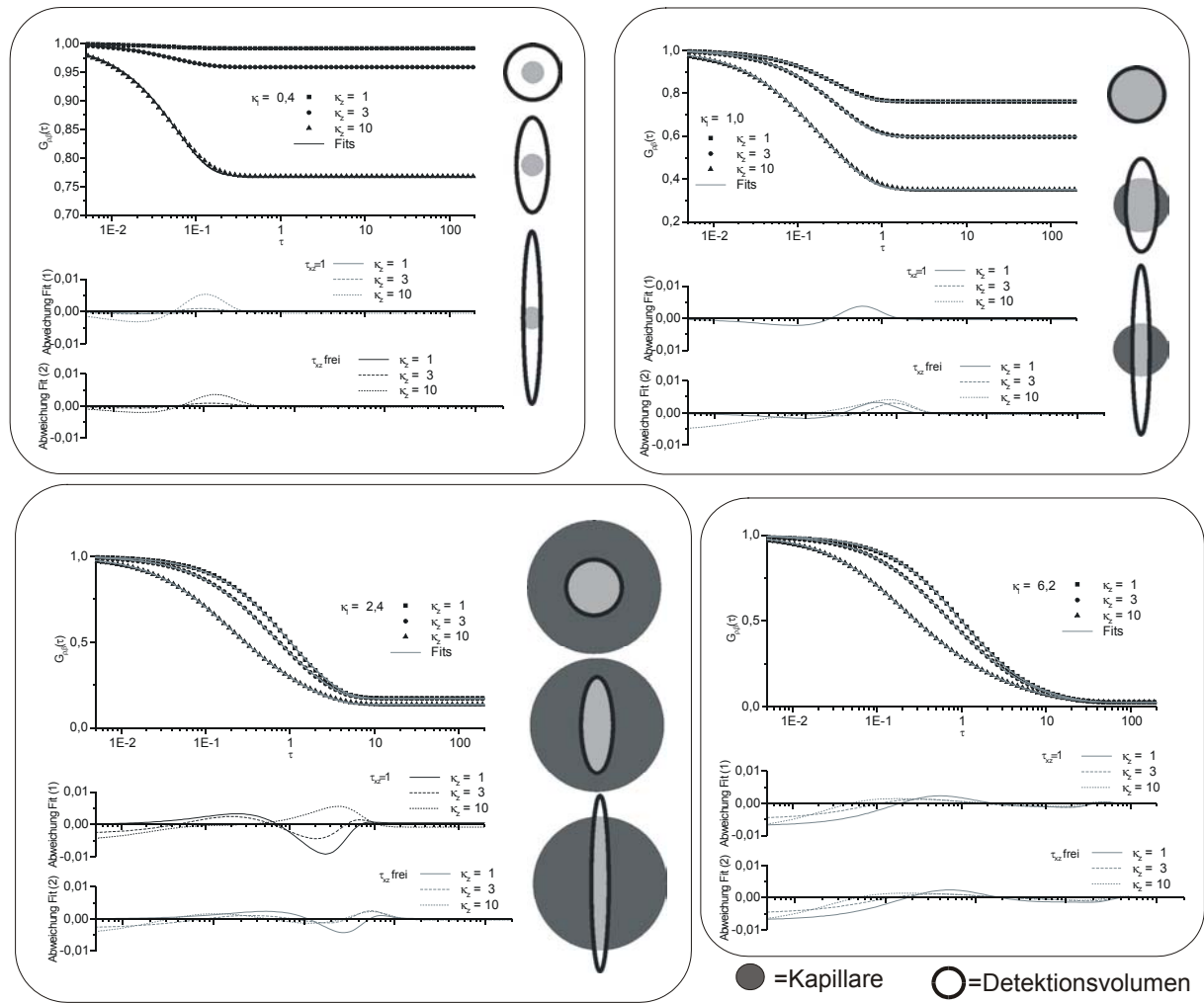


Abbildung 4.2.4-6 Fitkurven der Näherungsgleichung 4.2.4-2 an numerisch ermittelten Datenpunkten. In Fit (1) wurde $\tau_{xz}=1$ vorgegeben, in Fit (2) wurde es variiert. Für die drei kleineren Kapillarradien sind neben den Kurven maßstabsgetreue Abbildungen des $1/e^2$ -Ellipsoids des Detektionsvolumens (weiße Ellipse mit schwarzem Rand) und des Kapillarquerschnittes (dunkelgrauer Kreis) angegeben. Nur wenn das Detektionsvolumen vollständig und ausreichend weit innerhalb der Kapillare liegt, läßt sich τ_{xz} aus der Korrelationsfunktion ermitteln.

Zusammenfassend erhält man als Korrelationsfunktion in Mikrokapillaren bei Gauß-förmigem Detektionsvolumen:

$$G(t) = G(0) \cdot G_y(t) \cdot G_{\rho,\beta}(t) \cdot G_{\text{Photochem}}(t)$$

Aus der **Amplitude** $G(0)$ läßt sich bei vernachlässigbarem Untergrund der mittlere Besetzungsgrad des Detektionsvolumens ableiten:

$$G(0) = \frac{1}{N}$$

Bei dieser Definition beträgt das Detektionsvolumen $\pi^{3/2} \times \omega_x \omega_y \omega_z$.

Der **axiale Abfall** $G_y(t)$ läßt sich analytisch angeben:

$$G_y(t) = \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{t}{\tau_y}}} \cdot e^{-\frac{t^2/\tau_f^2}{1 + t/\tau_y}}$$

Dabei ist $\tau_y = \tau_x \sqrt{\kappa_y} = \frac{\omega_y^2}{4D}$ die Diffusionszeit in y-Richtung und $\tau_f = \frac{\omega_y}{v} = 2 \frac{\sqrt{D\tau_y}}{v}$
 $= 2\kappa_y \frac{\sqrt{D\tau_x}}{v}$ die Flußdurchtrittszeit bei der Fließgeschwindigkeit v .

Der **radial-azimutale Abfall** $G_{\rho\beta}(t)$ ergibt sich als Reihenentwicklung nach Gl. 4.2.3-11

$$G_{\rho,\beta}(t) = \frac{\sum_{\alpha=1}^{\infty} \exp\left(-\frac{t}{4\tau_{xz}\kappa_l^2} k_{0,\alpha}^2\right) R_{0,\alpha}^2 + 2 \sum_{n=1}^{\infty} \sum_{\alpha=1}^{\infty} \exp\left(-\frac{t}{4\tau_{xz}\kappa_l^2} k_{2n,\alpha}^2\right) R_{2n,\alpha}^2}{\frac{\kappa_z}{8\pi\kappa_l^2} \int_{\beta=0}^{\pi/2} \frac{1 - \exp\left[-4 \frac{\kappa_l^2}{\kappa_z} (1 + (\kappa_z^2 - 1) \cos^2 \beta)\right]}{(1 + (\kappa_z^2 - 1) \cos^2 \beta)} d\beta}$$

oder als Näherung nach Kasten 4.4.2-1.

Dabei ist

$$\tau_x = \frac{\omega_x^2}{4D} \quad \tau_{xz} = \frac{\omega_x \omega_z}{4D} \quad \kappa_y = \frac{\omega_y}{\omega_x} \quad \kappa_z = \frac{\omega_z}{\omega_x} \quad \kappa_l = \frac{L}{\sqrt{\omega_x \omega_z}} = \frac{L}{\omega_x \sqrt{\kappa_z}}$$

$\omega_{x,y,z}$ ist die jeweilige Länge der Halbachse des Ellipsoids, an dem die Detektionseffizienz auf $1/e^2$ des Wertes im Zentrum abgefallen ist, D die Diffusionskonstante und L der Kapillarradius.

$G_{\text{Photochem}}(t)$ ist der photochemische Anteil der Korrelationsfunktion, der durch Photozerstörung, Übergang in den Tripletzustand, oder im Fall von Cy5, cis-trans-Isomerisierung hervorgerufen wird. Diese Funktionen sind in Kapitel 2.6.3 beschrieben.

4.2.5 Experiment

Es wurden zwei unabhängige Meßreihen, eine mit dem fünffach-negativ geladenen Cy5-dCTP⁵⁻ und eine mit dem dreifach negativ geladenen MR121-dUTP³⁻ ausgeführt. Die Messungen wurden an verschiedenen Apparaturen durchgeführt, so daß eine perfekte Übereinstimmung der Abmessungen des Detektionsvolumens nicht zu erwarten ist. Die Messungen an der Anlage, mit der die Experimente mit Mr121-dUTP durchgeführt wurden zeigten teilweise ein Artefakt, so daß diese Daten gefiltert werden mußten, um sie auszuwerten.

Filterung der Rohdaten

Bei der Auswertung der Daten stellt sich heraus, das ein Teil der mit Mr121-dUTP gemessenen Kurven, vor allem derjenigen, die an der Spitze des Femtotips aufgenommen wurden, von einer Schwingung überlagert sind.

Die Messungen an der Spitze sind jedoch zur Beantwortung der Frage, ob alle Fluorophore beim Austritt erfaßt werden, von entscheidender Bedeutung. Um die Messungen verwenden zu können, muß die Schwingung vor der Auswertung mathematisch eliminiert werden.

Die Schwingung weist in etwa äquidistante Maxima bei $n \cdot 10$ ms mit $n=0,1,2...$ auf. Das entspricht einer Cosinuswelle der Frequenz 100 Hz. Die Ursache dieser Schwingung konnte nicht ermittelt werden; aufgrund der Frequenz und der Tatsache, daß die Schwingung im Femtotip sehr viel ausgeprägter als in freier Lösung ist, drängt sich jedoch der Verdacht auf, daß es sich um eine durch ein Netzgerät verursachte mechanische Schwingung entweder des Laserstrahls oder der Probe handelt. Die Schwingung tritt jedoch nicht reproduzierbar auf. Es wurden sogar zwei Messungen gefunden, bei denen einige der unmittelbar hintereinander aufgenommenen Einzelmessungen das Artefakt zeigen, andere hingegen nicht.

Zur Filterung der Daten wird wegen der geraden Symmetrie sowohl der Meßkurve (s. Abschnitt 2.6: $G(t)=G(-t)$) als auch des Artefaktes, eine Cosinus-Fouriertransformation herangezogen:

$$\tilde{y}(f) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{\infty} y(t) \cos(ft) dt = \sqrt{\frac{2}{\pi}} \int_0^{\infty} y(t) \cos(ft) dt \quad (4.2.5-1)$$

die Transformation ist zu sich selbst invers:

$$y(t) = \sqrt{\frac{2}{\pi}} \int_0^{\infty} \tilde{y}(f) \cos(ft) df \quad (4.2.5-2)$$

Da die Kurve $y(t)$ nicht analytisch sondern durch einen Satz von Meßwerten (t_i, y_i) gegeben ist wird statt der kontinuierlichen Fouriertransformation eine diskrete durchgeführt.

Bei einer diskreten Cosinus-Fouriertransformation [Numerical Recipes in C Kap.12] wird ein Datensatz mit $N+1$ auf der Zeitachse äquidistanten Punkten aus der Zeitdomäne

$$y(t_j) = y_j \quad j = 0, 1, \dots, N \quad t_j = j \cdot \Delta \quad (4.2.5-3)$$

in die Frequenzdomäne transformiert:

$$\tilde{y}(f_k) = \tilde{y}_k \quad k = 0, 1, \dots, N \quad f_k = \frac{k}{2N \cdot \Delta} \quad (4.2.5-4)$$

Das Abtastintervall Δ („sampling rate“) bestimmt dabei die maximale Frequenz f_N , bis zu der das Spektrum angegeben werden kann (Nyquistfrequenz).

$$f_N = \frac{1}{2\Delta} \quad (4.2.5-5)$$

Das Spektrum enthält die vollständige Information des Datensatzes bis zur Nyquistfrequenz („sampling theorem“). Liegen dem gemessenen Datensatz Vorgänge zu Grunde, die sich auf einer kürzeren Zeitskala als der doppelten Abtastrate ablaufen, weist also das Spektrum oberhalb der Nyquistfrequenz von Null verschiedene Amplituden auf, so werden diese Amplituden in das Spektrum hinein projiziert und verfälschen es („aliasing“).

Die diskrete Cosinus-Fouriertransformation ist durch Gleichung 4.2.5-6 definiert. Sie ist bis auf den Normierungsfaktor aus [Numerical Recipes in C] übernommen; dort findet sich auch der verwendete Quellcode für die Transformation:

$$\tilde{y}(f_k) = \tilde{y}_k = \sqrt{\frac{2}{N}} \left[\frac{y_0 + (-1)^k y_N}{2} + \sum_{j=1}^{N-1} y_j \cos\left(\frac{\pi j k}{N}\right) \right] \quad (4.2.5-6)$$

Die Transformation ist, wie die kontinuierliche Cosinus-Fouriertransformation (Gl. 4.2.5-1), zu sich selbst invers:

$$y_j = \sqrt{\frac{2}{N}} \left[\frac{\tilde{y}_0 + (-1)^j \tilde{y}_N}{2} + \sum_{k=1}^{N-1} \tilde{y}_k \cos\left(\frac{\pi j k}{N}\right) \right] \quad (4.2.5-7)$$

Wenn N durch eine ganzzahlige Potenz von 2 darstellbar ist, kann durch rekursive Anwendung des Danielson-Lanzcos-Lemmas die Transformation in einer numerisch sehr vorteilhaften Weise durchgeführt werden („Fast Fourier Transform“) [Numerical Recipes in C, Kap. 12.2].

Da die Abtastrate der gemessenen Korrelationsfunktion nicht konstant ist, müssen die Daten vor einer FFT auf 2^m Datenpunkte interpoliert werden. Außerdem muß y_0 durch Extrapolation geschätzt werden, so daß man insgesamt $2^m + 1$ äquidistante Datenpunkte erhält. Möchte man die Hochfrequenten Charakteristika wie z.B. den Triplett-Anstieg bei kleinen Zeiten erhalten, muß man sich bei der Wahl des Abtastintervalls am kürzesten Zeitabstand der Meßdaten ($2 \cdot 10^{-7}$ s) orientieren. Dadurch werden die Datensätze allerdings enorm aufgebläht (von typischerweise 10^2 Datenpunkten auf mehr als 10^7 Datenpunkte).

Ich hatte deshalb zunächst versucht, die Daten mit einer Methode, die nicht auf äquidistante Daten angewiesen ist, dem Lamb-Periodogramm, zu transformieren. Dieses Verfahren erwies sich jedoch als völlig ungeeignet, da das Artefakt im Spektrum praktisch nicht zu erkennen war: Das Lamb-Verfahren verlangt zwar keine äquidistanten Meßpunkte, aber die Datendichte muß in etwa gleichverteilt sein. Die gemessenen Korrelationsfunktionen weisen hingegen überproportional viele Datenpunkte bei kleinen Zeiten auf, so daß das Verfahren hier versagt.

Abbildung 4.2.5-1 zeigt die Korrelationsfunktion, die 1 µm vor der Austrittsöffnung bei 8V Elektrodenspannung und 45.5 µW Anregungsleistung gemessen wurde. Die erste der 5 Einzelmessungen zeigte das Artefakt. Die Abbildung (a) zeigt diese und den Mittelwert der übrigen vier Einzelmessungen. Daneben (b) sind die Spektren abgebildet, die man durch Quadrieren der Transformaten Funktion erhält (Leistungsspektrum). Man erkennt im Spektrum der artefaktbehafteten Messung ein Leistungsmaximum bei 100 Hz, das im Vergleichsspektrum fehlt.

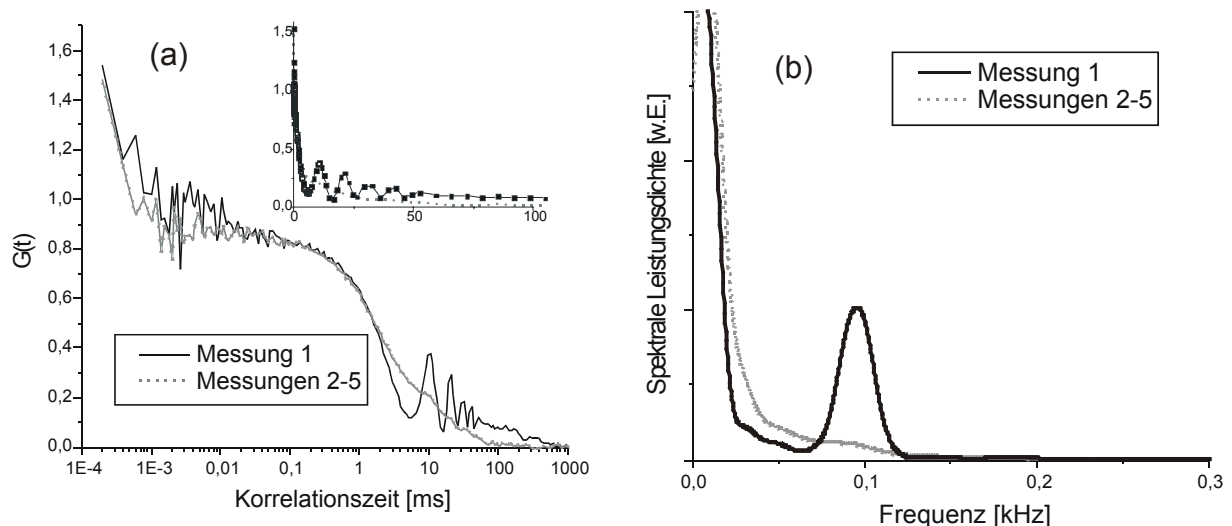


Abbildung 4.2.5-1 normierte Korrelationsfunktion von Mr121-dUTP im Femtotip mit und ohne Artefakt (a) Funktion in der Zeitdomäne. Um die Schwingung zu verdeutlichen, ist die Funktion in der kleinen Grafik gegen eine lineare Zeitachse aufgetragen.

(b) „Power Spektrum“ (Quadrat der Amplitude der Funktion in der Frequenzdomäne)

Die Schwingung verschwindet bei einer Korrelationszeit von 50 s nur scheinbar: Aufgrund der exponentiellen Zunahme des Abstandes aufeinanderfolgender Meßpunkte in der Korrelationsfunktion fällt die Nyquistfrequenz der Meßdaten von $0,5/(2 \times 10^{-4} \text{ ms}) = 2,5 \text{ MHz}$ bei kleinen Zeiten auf 2,5 Hz am Ende der Kurve. Bei 49,1 s fällt die Nyquistfrequenz von 150 Hz auf 75 Hz, d.h. die 100Hz-Schwingung wird ab diesem Zeitpunkt durch die zu geringe Abtastrate verdeckt.

Wie die Betrachtung weiterer Spektren zeigte, kommen auch Artefaktschwingungen anderer Frequenzen vor. Die beobachteten Frequenzen lassen sich durch $f = 50 \text{ Hz} \cdot 2^n$ mit $n = -1, 0, 1, 2$ und 3 beschreiben, wobei die Schwingung mit $n = 2$ d.h. $f = 100 \text{ Hz}$ mit Abstand die größte Amplitude aufweist.

Das Filtern der Daten im Frequenzraum ist im Prinzip denkbar einfach: Die betroffenen Frequenzbereiche werden herausgeschnitten und durch Exponentialfunktionen ersetzt, die zwischen den Randpunkten der entfernten Frequenzbereiche interpoliert werden.

Um dem Verfahren eine größere Stabilität zu verleihen, wird zur Ermittlung der Exponentialfunktion nicht einfach der Randpunkt verwendet, sondern der Mittelwert im Frequenzbereich $A_- = \langle A(f) \rangle \mid 0,8 \cdot f_- \leq f \leq f_-$ für den unteren Randpunkt und $A_+ = \langle A(f) \rangle \mid f_+ \leq f \leq 1,2 \cdot f_+$ für den oberen Randpunkt ermittelt. Im Bereich zwischen den Randpunkten wird das Originalspektrum dann durch $A(f) = A_- \cdot \exp[(f - 0,9 \cdot f_-) \cdot \ln(A_+/A_-) / (1,1 \cdot f_+ - 0,9 \cdot f_-)] \mid f_- < f < f_+$ ersetzt. Die folgende Tabelle gibt eine Zusammenfassung der substituierten Frequenzbereiche wieder:

Blockfrequenz [Hz]	f_- [Hz]	f_+ [Hz]
25	17,1	30,7
50	36	57
100	71	118
200	171	218

Dieses Verfahren ergibt bessere Ergebnisse als ein Bandblock-Filter, der die Amplitude in den betroffenen Bereichen einfach auf Null setzt.

Das gefilterte Spektrum wird anschließend zurücktransformiert, um die gefilterten Daten in der Zeitdomäne zu erhalten. Danach wird die Datenmenge durch Interpolation auf die ursprüngliche Zeitskala wieder reduziert.

Daß der Filter seinen Zweck erfüllt, wird in Abbildung 4.2.5-2 demonstriert. Die Zahl der interpolierten Datenpunkte zur Berechnung des Spektrums betrug $2^{23} + 1 = 8388609$ in einem Zeitfenster von 2936 s. Eine noch größere Zahl würde zwar den steilen Abfall im Bereich unter $2 \mu\text{s}$ besser erhalten, aber das rechtfertigt den hohen Rechenaufwand nicht, zumal es bei dieser Untersuchung um die Diffusion und nicht um die Triplettkinetik geht.

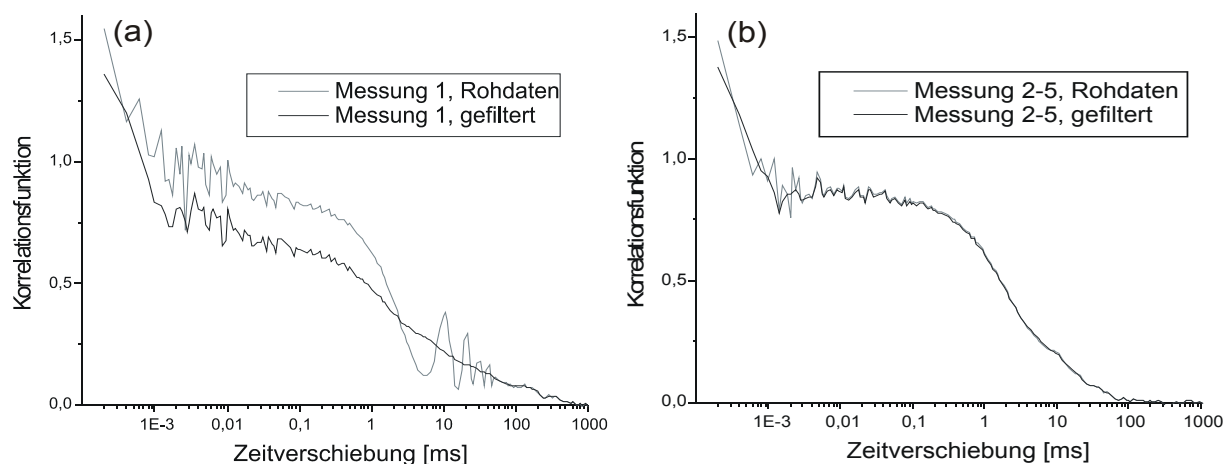


Abbildung 4.2.5-2 Effekt des Filters

(a) Die Artefaktschwingung wird praktisch eliminiert.

(b) Die Messung ohne Artefakt bleibt im Wesentlichen unverändert.

Es fällt auf, daß die artefaktbehaftete Messung bei großen Zeiten langsamer abfällt als die Referenzkurve. Der Vergleich mit anderen Messungen zeigt jedoch, daß dieser verzögerte Abfall nicht eindeutig mit der Schwingungsamplitude des Artefaktes korreliert. Der verzögerte Abfall wird daher durch den Filter nicht korrigiert.

Mr121-dUTP

Eine etwa 4×10^{-9} M Lösung von Mr121-dUTP in Sequenzierpuffer (67,9% Tris-Borat-Puffer pH = 8, 29,1% Glycerin, 2,9% Polyvinylpyrrolidon (M=60000, K=60), 0,5% Tween 20) wurde in einen Femtotip gefüllt. Der Femtotip war an einer elektronisch justierbaren Präzisionsverschiebeeinheit der Firma Newport befestigt und tauchte in einen Tropfen Glycerin. Der Glycerintropfen und das Innere des Femtotips waren mit Platinelektroden kontaktiert. Die Detektion erfolgte über ein 1,4 NA 100x Ölimmersionsobjektiv mit einer Lawinenphotodiode. Die Anregungsleistung des Lasers konnte mit einem Filterrad im Bereich 0-500 μW stufenlos variiert werden. Das Ausgangssignal der Lawinenphotodiode wurde direkt einer ALV-5000 Hardwarekorrelatorkarte zugeführt. Es wurden je 5 Korrelationsfunktionen à 15 s gemessen.

Der Abstand zur Austrittsöffnung wurde auf 0, 1, 2, 5 und 15 μm , die Spannung zwischen den Elektroden auf 0, 4, 8, 12, 16, 20 und 30 V und die Anregungsleistung, gemessen an der Eintrittspupille des Objektivs, auf 10, 50, 100 und 500 μW eingestellt. Es wurden, da eine Messung einschließlich der Nachjustierung etwa 5 min Zeit beansprucht, nicht sämtliche 120 Kombinationen aller Parameter gemessen, sondern nur etwa 90 davon.

Bei jeder Messung wurden die Koordinaten des Femtotips an der elektronischen Steuerung des Newport-Blockes abgelesen und protokolliert. Die y-Koordinate (in etwa die Achse des Femtotips) wurde eingestellt, danach die x- und z-Koordinate nachjustiert.

Zum Vergleich wurde die Korrelationsfunktion der gleichen Lösung sowie einer 10^{-7}M und einer 2×10^{-8} M Lösung im Tropfen gemessen.

Mr121-dUTP im Tropfen

Zum Vergleich mit den Messungen im Femtotip wurden auch Korrelationsfunktionen der gleichen 4×10^{-9} M (sowie einer 2×10^{-8} M und einer 1×10^{-7} M, Daten nicht gezeigt) Lösung von Mr121 in Femtopuffer im Tropfen aufgenommen:

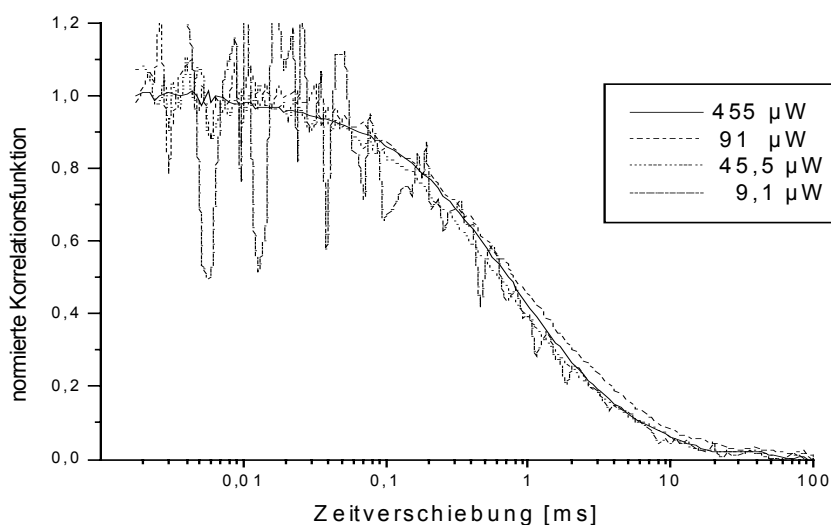


Abbildung 4.2.5-3 normierte Korrelationsfunktionen von Mr121-dUTP im Tropfen bei verschiedenen Anregungsleistungen.

Die dargestellten Kurven zeigen den Mittelwert aus je 5 Einzelmessungen. Daß die Photozerstörung im Leistungsbereich zwischen 10 und 450 μW bei den Messungen im Tropfen (im Gegensatz zum Femtotopf) keine Rolle spielt, ist daran erkennbar, daß die normierten Korrelationsfunktionen in ihrem Abfall praktisch deckungsgleich sind (Abbildung 4.2.5-3).

Unterhalb 5×10^{-7} s zeigen die Kurven einen stark leistungsabhängigen Anstieg (Daten nicht gezeigt). Da jedoch die Amplitude dieses Anstiegs mit sinkender Leistung wächst, kann dieser nicht auf den Einfluß des Triplettzustands zurückgeführt werden, denn dann sollte der umgekehrte Fall eintreten. Wahrscheinlich handelt es sich um Nachpulse des Detektors oder Reflexionen in den Kabeln, die sich mit sinkender Intensität verstärkt bemerkbar machen.

Die Einzelmessungen sowie die gemittelten Daten wurden im Bereich 5 μs -100 ms mit Gleichung 4.2.5-8 gefittet; die Ergebnisse der Fits der Einzelmessungen sind in Tabelle 4.2.5-1 zusammengefaßt; die der gemittelten Kurven im mittleren Teil der Tabelle 4.2.5-3. Die Fits der Einzelmessungen wurden anschließend statistisch ausgewertet, wobei sie zur Mittelwertbildung mit dem Kehrwert ihrer Fehler gewichtet wurden (Tabelle 4.2.5-3 oben). Diejenigen Parameter, die für die Auswertung fixiert wurden, blieben unberücksichtigt (wurden mit Null gewichtet).

Um die Übereinstimmung beider Auswerteverfahren zu überprüfen, wurde der Quotient der erhaltenen Parameter gebildet und dieser logarithmiert. Bei identischen Werten ergibt dieser Logarithmus Null (Tabelle 4.2.5-3 unten).

$$G(t) = 1 / \left[N \sqrt{1 + \frac{t}{\tau_x}} \sqrt{1 + \frac{t}{\tau_y}} \sqrt{1 + \frac{t}{\tau_z}} \right] \quad (4.2.5-8)$$

$\tau_x = \frac{\omega_x^2}{4D}$ ist die charakteristische Diffusionszeit in x-Richtung. Für die beiden anderen

Richtungen gelten analoge Formeln. Wie man der Tabelle 4.2.5-1 entnehmen kann, ist das Minimum für τ_y und τ_z nicht sonderlich scharf ausgeprägt (große Fehlerangaben), und tatsächlich lassen sich praktisch deckungsgleiche Kurven erzeugen wenn einer der beiden Parameter erhöht und der andere gleichzeitig abgesenkt wird. Bei einigen Fits mußte τ_z fixiert werden, sonst liefe es gegen unendlich.

c [mol/l]	P [μW]	#	χ^2	R ²	N	τ_x [ms]	τ_y [ms]	τ_z [ms]	
(4,00 $\pm 1,11$) E-09	10 ± 1	1	7,00E-05	0,711	21,2 \pm 1,62	0,015 \pm 0,005	680 \pm 2,9E+7	680 \pm 2,8E7	(a)
		2	7,00E-05	0,622	36,7 \pm 2,34	0,175 \pm 0,143	6,8 \pm 6,1E+4	6,8 \pm 6,1E4	(a)
		3	5,00E-05	0,752	30,5 \pm 1,55	0,189 \pm 0,169	0,9 \pm 1,6E+0	1,8E15 \pm 2,4E29	(a)
		4	9,00E-05	0,645	28,6 \pm 1,96	0,070 \pm 0,033	15 \pm 1,7E+6	15 \pm 1,7E6	(a)
		5	8,00E-05	0,644	31,4 \pm 2,03	0,086 \pm 0,036	39 \pm 1,4E+6	39 \pm 1,4E6	(a)
	50 ± 5	1	1,96E-06	0,989	30,8 \pm 0,26	0,228 \pm 0,029	6,4 \pm 2,9E+6	6,4 \pm 2,8E6	(a)
		2	4,44E-06	0,976	30,4 \pm 0,37	0,227 \pm 0,031	6,6 \pm 5,9E+7	6,5 \pm 5,9E7	(a)
		3	2,99E-06	0,982	32,3 \pm 0,34	0,324 \pm 0,083	1,7 \pm 1,2E+0	53 \pm 2,1E2	(a)
		4	2,29E-06	0,987	31,5 \pm 0,29	0,310 \pm 0,060	2,1 \pm 1,5E+0	34 \pm 9,5E1	(a)
		5	2,10E-06	0,987	32,6 \pm 0,29	0,328 \pm 0,064	1,8 \pm 9,2E-1	119 \pm 6,2E2	(a)

(4,00 ±1,11) E-09	100 ±10	1	1,22E-06	0,980	53,1 ± 0,58	0,318 ± 0,065	7,1 ± 2,7E+7	7,1 ± 2,7E7	(a)
		2	1,46E-06	0,979	50,3 ± 0,57	0,271 ± 0,042	12 ± 5,1E+7	11,5 ± 5,1E7	(a)
		3	1,43E-06	0,978	51,7 ± 0,56	0,355 ± 0,051	4,1 ± 1,7E+0	4,1E17 ± 8,6E32	(a)
			1,43E-06	0,978	51,6 ± 0,56	0,329 ± 0,036	11 ± 6,9E+0	15,0 (fix)	(a)
		4	2,87E-06	0,952	55,0 ± 0,96	0,307 ± 0,096	6,8 ± 4,7E+4	6,7 ± 4,7E4	(a)
		5	1,94E-06	0,971	51,3 ± 0,64	0,346 ± 0,047	9,6 ± 6,5E+0	15,0 (fix)	(a)
			1,93E-06	0,971	51,4 ± 0,64	0,365 ± 0,059	4,5 ± 2,3E+0	150,0 (fix)	(a)
	1,92E-06		0,971	51,4 ± 0,64	0,369 ± 0,062	4,2 ± 2,0E+0	1,5E4 (fix)	(a)	
	500 ±50	1	5,76E-08	0,999	44,1 ± 0,09	0,366 ± 0,021	4,0 ± 7,8E+1	4,1 ± 8,1E1	(a)
		2	5,03E-08	1,000	43,7 ± 0,08	0,352 ± 0,015	3,1 ± 1,0E+0	10,4 ± 5,6E0	(a)
		3	9,00E-08	0,999	43,5 ± 0,11	0,383 ± 0,024	2,1 ± 4,3E-1	27,5 ± 1,8E1	(a)
		4	4,63E-08	1,000	43,1 ± 0,07	0,394 ± 0,019	2,2 ± 3,9E-1	18,6 ± 7,9E0	(a)
		5	4,21E-08	1,000	44,4 ± 0,07	0,382 ± 0,015	3,9 ± 3,9E+6	3,9 ± 3,9E6	(a)
	(2,00 ±0,47) E-08	10 ±1	1	4,37E-06	0,562	164,3 ± 11,9	0,115 ± 0,067	19 ± 2,2E+5	18,6 ± 2,2E5
2			3,12E-06	0,625	183,4 ± 11,1	0,324 ± 0,388	6,1 ± 1,2E+6	6,1 ± 1,1E6	(a)
3			6,16E-06	0,462	184,7 ± 15,8	0,759 ± 1337	0,8 ± 1,3E+3	16,8 ± 3,1E2	(a)
4			3,38E-06	0,608	183,4 ± 11,6	0,362 ± 0,568	3,1 ± 3,7E+1	9,2 ± 1,7E2	(a)
50 ±5		1	4,30E-08	0,988	211,9 ± 2,02	0,247 ± 0,041	4,8 ± 3,6E+3	4,8 ± 3,6E3	(b)
		2	3,80E-08	0,989	221,3 ± 2,13	0,224 ± 0,037	5,1 ± 3,0E+7	5,1 ± 2,9E7	(b)
		3	5,11E-08	0,986	210,6 ± 2,13	0,235 ± 0,033	7,0 ± 2,6E+7	7,0 ± 2,5E7	(b)
		4	4,92E-08	0,985	221,4 ± 2,28	0,306 ± 0,065	1,4 ± 5,6E-1	15,0 (fix)	(b)
			4,86E-08	0,986	221,8 ± 2,28	0,358 ± 0,123	0,9 ± 4,6E-1	150,0 (fix)	(b)
			4,85E-08	0,986	221,9 ± 2,28	0,371 ± 0,143	0,9 ± 4,7E-1	1,5E5 (fix)	(b)
		5	5,97E-08	0,982	222,6 ± 2,53	0,250 ± 0,039	4,8 ± 2,3E+7	4,8 ± 2,2E7	(b)
10 ±1		1	7,70E-08	0,834	626,3 ± 25,9	0,358 ± 0,429	1,0 ± 1,7E+0	2,3E18 ± 3,8E33	(b)
			7,65E-08	0,834	623,3 ± 25,3	0,277 ± 0,158	2,1 ± 2,8E+0	15,0 (fix)	(b)
		2	2,98E-08	0,928	629,7 ± 13,9	0,473 ± 0,140	4,4 ± 3,4E+0	150,0 (fix)	(b)
	3,01E-08		0,927	629,1 ± 13,9	0,457 ± 0,124	5,4 ± 4,4E+0	50,0 (fix)	(b)	
	3,02E-08		0,927	627,3 ± 13,8	0,416 ± 0,093	9,2 ± 8,5E+0	30,0 (fix)	(b)	
	3	6,72E-08	0,861	590,1 ± 22,6	0,192 ± 0,076	2,4 ± 2,6E+0	1,1E17 ± 4,2E32	(b)	
		6,68E-08	0,862	581,7 ± 22,8	0,156 ± 0,053	11 ± 2,5E+5	11,2 ± 2,53E5	(b)	
		7,19E-08	0,871	553,6 ± 20,8	0,213 ± 0,106	5,8 ± 4,1E+4	5,7 ± 4,12E4	(b)	

Tabelle 4.2.5-1 Fitparameter der Einzelmessungen von $4 \times 10^{-9} M$ Mr121-dUTP in Femtopuffer im Tropfen

(a) = Rohdaten (b) = Daten mit 25 Hz- Blockfilter behandelt

Die Fitparameter selbst sagen zunächst nichts über die Abmessungen des Detektionsvolumens im Tropfen aus.

Die Größe des Detektionsvolumens lässt sich aus der Amplitude bzw. aus dem aus ihr abgeleiteten Parameter N abschätzen, wenn die Konzentration des Fluorophors bekannt ist. Bei vernachlässigbarem Untergrund gilt für die Amplitude:

$$\frac{1}{G(0)} = N = N_A c V_{eff} \quad (4.2.5-9)$$

,wobei N_A die Avogadro-Konstante, c die Konzentration und $V_{eff} = \sqrt{\pi^3} \omega_x \omega_y \omega_z$ das effektive Detektionsvolumen im in Abschnitt 2.6.1 beschriebenen Sinne ist.

Auflösen nach V_{eff} ergibt:

$$V_{eff} = \frac{N}{N_A c} \quad \Delta V_{eff} = V_{eff} \sqrt{\left(\frac{\Delta N}{N}\right)^2 + \left(\frac{\Delta c}{c}\right)^2} \quad (4.2.5-10)$$

bzw.

$$V_{eff} = \sqrt{\pi^3} \omega_x^3 \kappa_y \kappa_z = 8 \sqrt{\pi^3 D^3 \tau_x \tau_y \tau_z} \quad (4.2.5-11)$$

$$\Delta V_{eff} = V_{eff} \frac{1}{2} \sqrt{9 \left(\frac{\Delta D}{D} \right)^2 + \left(\frac{\Delta \tau_x}{\tau_x} \right)^2 + \left(\frac{\Delta \tau_y}{\tau_y} \right)^2 + \left(\frac{\Delta \tau_z}{\tau_z} \right)^2}$$

Der Achsenabschnitt des e⁻²-Detektionseffizienzellipsoids mit der x-Achse ist durch Gl. 4.2.5-12 gegeben.

$$\omega_x = 2 \sqrt{D \tau_x} \quad \Delta \omega_x = \frac{\omega_x}{2} \sqrt{\left(\frac{\Delta D}{D} \right)^2 + \left(\frac{\Delta \tau_x}{\tau_x} \right)^2} \quad (4.2.5-12)$$

Das Verhältnis der Achsenabschnitte zueinander läßt sich auch ohne Kenntnis des Diffusionskoeffizienten direkt aus den experimentell ermittelten Diffusionszeiten ermitteln:

$$\kappa_y = \sqrt{\frac{\tau_y}{\tau_x}} \quad \Delta \kappa_y = \frac{\kappa_y}{2} \sqrt{\left(\frac{\Delta \tau_x}{\tau_x} \right)^2 + \left(\frac{\Delta \tau_y}{\tau_y} \right)^2} \quad (4.2.5-13^a)$$

$$\kappa_z = \sqrt{\frac{\tau_z}{\tau_x}} \quad \Delta \kappa_z = \frac{\kappa_z}{2} \sqrt{\left(\frac{\Delta \tau_x}{\tau_x} \right)^2 + \left(\frac{\Delta \tau_z}{\tau_z} \right)^2} \quad (4.2.5-13^b)$$

Sind Konzentration und Diffusionskoeffizient des Fluorophors bekannt, so läßt sich aus einer einzigen Messung der Korrelationsfunktion die Größe des Detektionsvolumens sowohl über die Amplitude $G(0)$ als auch über den zeitlichen Abfall $1/\sqrt{(1+t/\tau_x)(1+t/\tau_y)(1+t/\tau_z)}$ der Funktion auf zwei unabhängigen Wegen bestimmen.

Die (photometrisch bestimmte) Konzentration der Stammlösung war mit $c = 2,5 \mu\text{M}$ angegeben.

Die 1×10^{-7} M Lösung wurde daraus durch einen, die 2×10^{-8} M Lösung durch zwei und die 4×10^{-9} M Lösung durch drei Verdünnungsschritte hergestellt. Bei der 4×10^{-9} M Lösung ist jedoch zu bedenken, daß wegen der kleinen Konzentration bereits eine geringe Adsorption an den Wänden der Pipettenspitzen oder an den Reaktionsgefäßen einen großen Fehler verursacht. Außerdem ist der Extinktionskoeffizient von Mr121-dUTP wegen der dafür notwendigen großen Substanzmenge nie gravimetrisch bestimmt worden. Man verwendet daher den aus verwandten Verbindungen abgeleiteten Schätzwert $\varepsilon = \lg(I_E/I_A)/c/l \approx 10^4 \text{ m}^2 \text{ mol}^{-1}$, wobei c die Farbstoffkonzentration, l die Küvettenlänge und I_E bzw. I_A die Intensität des in die Küvette ein- bzw. aus der Küvette austretenden monochromatischen Lichts der dem Absorptionsmaximum ($\lambda = 668 \text{ nm}$) entsprechenden Wellenlänge ist. Nimmt man für die Ausgangskonzentration einen Fehler von 10% und für jede Verdünnung einen Fehler von 15% an, so ergeben sich die in Tabelle 4.2.5-2 angegebenen Ungenauigkeiten.

Bei einem von Null verschiedenen Untergrund sinkt die Amplitude der Korrelationsfunktion und man erhält einen zu großen Wert N . Das daraus errechnete Volumen ist entsprechend

ebenfalls zu groß. Eine Adsorption der Fluorophore vermindert die tatsächliche Konzentration; setzt man die errechnete Konzentration ein, ist diese also zu groß und man erhält einen zu kleinen Wert für das Volumen. Die beiden Fehler heben sich also teilweise auf.

Um die Abmessungen des Detektionsvolumens aus den Diffusionszeiten zu bestimmen, wird der Diffusionskoeffizient benötigt.

Für Cy5²⁻ in Wasser ($\eta = 10^{-3} \text{ Nm}^{-2}\text{s}$) wird in der Literatur [Widengren 2001] ein Diffusionskoeffizient von $2,5 \times 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ angegeben. MR121-dUTP³⁻ ist ein wenig größer als Cy5²⁻ und hat auch noch eine höhere Gesamtladung. In Abschnitt 3.4.1 wurde die Viskosität des Sequenzierpuffers auf etwa $3,2 \times 10^{-3} \text{ Nm}^{-2}\text{s}$ abgeschätzt. Wenn man annimmt, daß der Molekülradius von Mr121-dUTP größer ist als der von Cy5, erhält man mit der größeren Viskosität des Puffers als Obergrenze einen Diffusionskoeffizienten von

$$D \leq 7,8 \times 10^{-11} \text{ m}^2\text{s}^{-1} = 7,8 \times 10^{-2} (\mu\text{m})^2(\text{ms})^{-1}$$

In meiner Diplomarbeit (Heidelberg 1997) hatte ich den effektiven Van-der-Waals-Radius von Mr121-dUTP auf ca. $7,2 \times 10^{-10} \text{ m}$ abgeschätzt. Nimmt man eine Hydrathülle von etwa $3 \times 10^{-10} \text{ m}$ Dicke an, so erhöht sich dieser auf etwa 10^{-9} m . $3 \times 10^{-10} \text{ m}$ ist die Kantenlänge eines Würfels mit dem gleichen Volumen, das im Mittel von einem Wassermolekül eingenommen wird.

Durch Einsetzen von $r = 1 \times 10^{-9} \text{ m}$ in die Stokes-Einstein-Gleichung (Gl.2.4.1-11)

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta r}$$

erhält man mit $kT = 4,142 \times 10^{-21} \text{ J}$ ($T = 300\text{K}$) einen Diffusionskoeffizienten von

$$D \approx 6,9 \times 10^{-11} \text{ m}^2\text{s}^{-1} = 6,9 \times 10^{-2} (\mu\text{m})^2(\text{ms})^{-1}.$$

Als Schätzwert für den Diffusionskoeffizienten von Mr121-dUTP in Femtopuffer wird daher

$$D = (7,3 \pm 1,5) \times 10^{-11} \text{ m}^2\text{s}^{-1} = (7,3 \pm 1,5) \times 10^{-2} (\mu\text{m})^2(\text{ms})^{-1}$$

eingesetzt.

Mit diesem Diffusionskoeffizienten ergeben sich aus den Diffusionszeiten der Tabelle 4.2.5-1 der in der Spalte ω_x der Tabelle 4.2.5-2 angegebene Abszissenabschnitt des e^{-2} Detektionseffizienzellipsoids und das in der Spalte V_{eff} (4.2.5-11) errechnete effektive Detektionsvolumen. Diesem ist das aus der Amplitude der FCS und der Konzentration errechnete Volumen in der Spalte V_{eff} (4.2.5-10) gegenübergestellt, um die Ergebnisse beider Auswerteverfahren zu vergleichen.

c [mol/l]	P [μW]	#	χ^2	ω_x [μm] (4.2.5-12)	κ_y (4.2.5-13 ^a)	κ_z (4.2.5-13 ^b)	V_{eff} [fl] (4.2.5-10)	V_{eff} [μm ³] (4.2.5-11)		
(4,00 ±1,11) E-09	9,1 ±0,5	1	7,00E-05	0,067 ± 0,012	211,2 ± 4,4E+06	211,7 ± 4,5E+06	8,8 ± 2,5	73,8 ± 2,2E+06		
		2	7,00E-05	0,226 ± 0,095	6,2 ± 2,8E+04	6,2 ± 2,8E+04	15,2 ± 4,3	2,5 ± 1,6E+04		
		3	5,00E-05	0,235 ± 0,108	2,2 ± 2,2E+00	9,9E7 ± 6,5E+21	12,6 ± 3,5	1,6E7 ± 1,4E+21		
		4	9,00E-05	0,143 ± 0,037	14,8 ± 8,4E+05	14,8 ± 8,4E+05	11,8 ± 3,3	3,5 ± 2,8E+05		
		5	8,00E-05	0,159 ± 0,037	21,2 ± 3,9E+05	21,3 ± 3,9E+05	13,0 ± 3,7	10,0 ± 2,5E+05		
	45,5 ±1,0	1	1,96E-06	0,258 ± 0,031	5,3 ± 1,2E+06	5,3 ± 1,2E+06	12,7 ± 3,5	2,7 ± 8,5E+05		
		2	4,44E-06	0,258 ± 0,032	5,3 ± 2,4E+07	5,3 ± 2,4E+07	12,6 ± 3,5	2,7 ± 1,7E+07		
		3	2,99E-06	0,308 ± 0,051	2,2 ± 8,5E-01	12,8 ± 2,5E+01	13,4 ± 3,7	4,7 ± 9,5E+00		
		4	2,29E-06	0,301 ± 0,042	2,6 ± 9,3E-01	10,5 ± 1,5E+01	13,0 ± 3,6	4,1 ± 6,0E+00		
		5	2,10E-06	0,309 ± 0,044	2,3 ± 6,4E-01	19,1 ± 4,9E+01	13,5 ± 3,7	7,3 ± 1,9E+01		
	91,0 ±2	1	1,22E-06	0,304 ± 0,044	4,7 ± 9,1E+06	4,7 ± 9,1E+06	22,0 ± 6,1	3,5 ± 9,5E+06		
		2	1,46E-06	0,281 ± 0,036	6,5 ± 1,4E+07	6,5 ± 1,4E+07	20,8 ± 5,8	5,2 ± 1,6E+07		
		3	1,43E-06	0,322 ± 0,040	3,3 ± 7,5E-01	1,1E9 ± 1,1E+24	21,4 ± 5,9	6,8E8 ± 7,1E+03		
			1,43E-06	0,310 ± 0,036	5,8 ± 1,8E+00	6,7 (τ _z fix)	21,4 ± 5,9	6,4 (τ _z fix)		
		4	2,87E-06	0,300 ± 0,056	4,6 ± 1,6E+04	4,6 ± 1,6E+04	22,8 ± 6,3	3,3 ± 1,6E+04		
		5	1,94E-06	0,318 ± 0,039	5,2 ± 1,8E+00	6,5 (τ _z fix)	21,3 ± 5,9	6,2 (τ _z fix)		
			1,93E-06	0,326 ± 0,043	3,5 ± 9,3E-01	20,2 (τ _z fix)	21,3 ± 5,9	13,8 (τ _z fix)		
	1,92E-06	0,328 ± 0,043	3,3 ± 8,6E-01	201,7 (τ _z fix)	21,3 ± 5,9	133,5 (τ _z fix)				
	455 ±5	1	5,76E-08	0,327 ± 0,035	3,2 ± 3,2E+01	3,3 ± 3,3E+01	18,3 ± 5,0	2,1 ± 2,9E+01		
		2	5,03E-08	0,321 ± 0,034	2,9 ± 4,9E-01	5,4 ± 1,5E+00	18,1 ± 5,0	2,9 ± 1,3E+00		
		3	9,00E-08	0,334 ± 0,036	2,3 ± 2,5E-01	8,4 ± 2,8E+00	18,0 ± 5,0	4,1 ± 1,9E+00		
		4	4,63E-08	0,339 ± 0,036	2,3 ± 2,2E-01	6,8 ± 1,5E+00	17,9 ± 4,9	3,5 ± 1,3E+00		
		5	4,21E-08	0,334 ± 0,035	3,2 ± 1,6E+06	3,2 ± 1,6E+06	18,4 ± 5,1	2,1 ± 1,5E+06		
	(2,00 ±0,47) E-08	9,1 ±0,5	1	4,37E-06	0,183 ± 0,057	12,7 ± 7,7E+04	12,7 ± 7,7E+04	13,6 ± 3,3	5,5 ± 4,7E+04	
			2	3,12E-06	0,307 ± 0,187	4,3 ± 4,2E+05	4,3 ± 4,2E+05	15,2 ± 3,6	3,0 ± 4,1E+05	
3			6,16E-06	0,471 ± 414,6	1,0 ± 1,2E+03	4,7 ± 4,1E+03	15,3 ± 3,8	2,7 ± 3,4E+03		
4			3,38E-06	0,325 ± 0,257	2,9 ± 1,8E+01	5,0 ± 4,8E+01	15,2 ± 3,7	2,8 ± 3,1E+01		
45,5 ±1,0		1	4,30E-08	0,269 ± 0,036	4,4 ± 1,7E+03	4,4 ± 1,7E+03	17,6 ± 4,1	2,1 ± 1,1E+03		
		2	3,80E-08	0,256 ± 0,034	4,7 ± 1,4E+07	4,7 ± 1,4E+07	18,3 ± 4,3	2,1 ± 8,7E+06		
		3	5,11E-08	0,262 ± 0,032	5,4 ± 1,0E+07	5,4 ± 1,0E+07	17,4 ± 4,1	2,9 ± 7,7E+06		
		4	4,92E-08	0,299 ± 0,044	2,1 ± 4,9E-01	6,9 (τ _z fix)	18,3 ± 4,3	2,2 (τ _z fix)		
			4,86E-08	0,323 ± 0,065	1,5 ± 4,9E-01	20,4 (τ _z fix)	18,4 ± 4,3	6,1 (τ _z fix)		
			4,85E-08	0,329 ± 0,072	1,5 ± 5,1E-01	636,0 (τ _z fix)	18,4 ± 4,3	191,9 (τ _z fix)		
		5	5,97E-08	0,270 ± 0,035	4,3 ± 1,0E+07	4,3 ± 1,0E+07	18,4 ± 4,3	2,1 ± 7,0E+06		
		(1,00 ±0,18) E-07	9,1 ±0,5	1	7,70E-08	0,323 ± 0,196	1,6 ± 1,8E+00	2,5E+9 ± 2,1E+24	10,4 ± 1,9	7,9E8 ± 6,5E+23
					7,65E-08	0,284 ± 0,086	2,7 ± 2,0E+00	7,3 (τ _z fix)	10,3 ± 1,9	2,5 ± 2,0E+00
2	2,98E-08			0,372 ± 0,067	3,0 ± 1,3E+00	17,8 (τ _z fix)	10,4 ± 1,9	15,5 ± 8,0E+00		
	3,01E-08			0,365 ± 0,062	3,4 ± 1,5E+00	10,4 (τ _z fix)	10,4 ± 1,8	9,7 ± 5,1E+00		
3	3,02E-08		0,349 ± 0,053	4,7 ± 2,2E+00	8,6 (τ _z fix)	10,4 ± 1,8	9,5 ± 5,4E+00			
	6,72E-08		0,237 ± 0,053	3,5 ± 2,0E+00	7,6E8 ± 1,4E+24	9,8 ± 1,8	2,0E8 ± 3,7E+23			
	6,68E-08		0,213 ± 0,043	8,5 ± 9,6E+04	8,5 (τ _z fix)	9,6 ± 1,7	3,9 ± 6,2E+04			
	7,19E-08		0,250 ± 0,067	5,2 ± 1,9E+04	5,2 ± 1,9E+04	9,1 ± 1,6	2,3 ± 1,1E+04			

Tabelle 4.2.5-2 Aus den Fitparametern der Einzelmessungen abgeschätzte Parameter des Detektionsvolumens
Autokorrelationsfunktionen des Fluoreszenzsignals von 4×10^{-9} M Mr121-dUTP in Sequenzierpuffer im offenen Volumen.

Im Abschnitt <Fits [Messung]> von Tabelle 4.2.5-3 sind die Tabellen 4.2.5-1 und 4.2.5-2 statistisch ausgewertet, wobei die Fehlerangaben (die sich aus der Schärfe des Minimums beim Fitten ergeben) in diesen Tabellen zur Wichtung der Daten herangezogen wurden. Der Fehler im Abschnitt <Fits [Messung]> von Tabelle 4.2.5-3 ergibt sich hingegen aus der Standardabweichung der Ergebnisse der Tabellen 4.2.5-1 und 4.2.5-2.

Der Abschnitt Fit[<Messungen>] gibt die Ergebnisse an, die erhalten werden, wenn man zunächst über die Einzelmessungen mittelt und anschließend fittet.

Der Abschnitt $\ln(\langle \text{Fit} \rangle / \text{Fit} \langle \dots \rangle)$ gibt die Logarithmen der Quotienten der Ergebnisse aus den beiden vorangegangenen Abschnitten an. Die Logarithmen schließen in ihrem Konfidenzintervall für alle Ergebnisse die Null ein; die beiden Verfahren liefern also keine signifikant verschiedenen Ergebnisse, wobei die Übereinstimmung für die mittlere Teilchenzahl im Detektionsvolumen N besser ist als für die Diffusionszeiten τ . Die Wichtung der Daten im ersten Abschnitt führt allerdings auf bessere Ergebnisse als die (ungewichtete) Mittelung und anschließende Auswertung im zweiten Abschnitt. Dafür hat man dann jedoch auch den fünffachen Aufwand beim Fitten.

c [mol/l]	4,E-09				2,E-08		1,E-07
Δc [mol/l]	1,1E-09				4,7E-09		1,8E-08
P [μ W]	10	50	100	500	10	50	10
ΔP [μ W]	1	5	10	50	1	5	1
<Fits [Messung]>							
$\langle \chi^2 \rangle$	7,20E-05	2,75E-06	1,78E-06	5,73E-08	4,26E-06	4,83E-08	5,62E-08
$\langle \Delta \chi^2 \rangle$	1,48E-05	1,02E-06	5,25E-07	1,92E-08	1,38E-06	6,75E-09	2,20E-08
$\langle R^2 \rangle$	0,675	0,984	0,972	0,999	0,564	0,986	0,881
$\langle \Delta R^2 \rangle$	0,054	0,005	0,009	0,000	0,073	0,002	0,041
$\langle N \rangle$	29,13	31,54	51,83	43,77	178,68	218,54	610,84
$\langle \Delta N \rangle$	5,60	0,97	1,44	0,50	9,81	5,17	28,85
$\langle \tau_x \rangle$ [ms]	0,142	0,265	0,331	0,374	0,166	0,260	0,284
$\langle \Delta \tau_x \rangle$	0,074	0,051	0,033	0,016	0,269	0,061	0,125
$\langle \tau_y \rangle$ [ms]	9,27E-01	1,84E+00	5,25E+00	2,32E+00	3,00E+00	1,03E+00	2,96E+00
$\langle \Delta \tau_y \rangle$ [ms]	2,97E+02	2,55E+00	3,06E+00	9,00E-01	7,95E+00	2,46E+00	3,58E+00
$\langle \tau_z \rangle$ [ms]	9,72E+00	4,79E+01	6,78E+00	1,55E+01	1,20E+01	4,82E+00	6,54E+00
$\langle \Delta \tau_z \rangle$ [ms]	8,38E+14	4,67E+01	1,46E+17	1,01E+01	6,01E+00	5,67E+04	8,28E+17
$\langle \omega_x \rangle$ [μ m]	0,146	0,284	0,312	0,331	0,246	0,282	0,305
$\langle \Delta \omega_x \rangle$ [μ m]	0,069	0,027	0,016	0,007	0,118	0,030	0,062
$\langle \kappa_y \rangle$	2,22	2,39	3,92	2,48	2,88	1,75	3,13
$\langle \Delta \kappa_y \rangle$	89,80	1,62	1,18	0,46	5,17	1,66	2,10
$\langle \kappa_z \rangle$	8,63	12,60	4,70	6,57	5,06	4,42	5,74
$\langle \Delta \kappa_z \rangle$	4,46E+07	5,76	3,81E+08	2,28	4,03	237,56	9,08E+08
$\langle V_{\text{eff}} [\text{fl}] (4.2.5-10) \rangle$	11,93	13,08	21,56	18,17	14,82	18,16	10,07
$\langle \Delta V_{\text{eff}} [\text{fl}] \rangle$	2,33	0,40	0,60	0,21	0,81	0,43	0,48
$\langle V_{\text{eff}} [\text{fl}] (4.2.5-11) \rangle$	3,44	4,87	10,50	3,45	2,81	4,56	6,94
$\langle \Delta V_{\text{eff}} [\text{fl}] \rangle$	7,12E+06	1,91	2,41E+08	0,87	1,35	71,46	2,78E+08
$\left\langle \ln \frac{V_{\text{eff}}(4.x.5.10)}{V_{\text{eff}}(4.x.5.11)} \right\rangle$	1,244	0,980	0,216	1,643	1,690	0,377	0,189
$\left\langle \Delta \ln \frac{V_{\text{eff}}(4.x.5.10)}{V_{\text{eff}}(4.x.5.11)} \right\rangle$	6,580	0,388	6,529	0,307	0,391	1,652	8,388
Fit[<Messungen>]							
$\chi^2 [\dots]$	2,00E-05	7,10E-07	5,60E-07	2,10E-08	6,00E-07	1,29E-08	2,56E-08
$R^2 [\dots]$	0,850	1,000	0,990	1,000	0,872	0,997	0,949
$N [\dots]$	35,15	31,41	52,32	43,55	205,63	213,65	574,55
$\Delta N [\dots]$	1,15	0,12	0,35	0,06	6,85	1,05	9,78
$\tau_x [\dots]$ [ms]	0,154	0,256	0,318	0,389	0,645	0,279	0,284
$\Delta \tau_x [\dots]$ [ms]	0,051	0,022	0,025	0,014	2156180,00 0	0,026	0,042
$\tau_y [\dots]$ [ms]	1,15E+01	5,12E+00	6,53E+00	2,39E+00	6,45E-01	5,03E+00	1,44E+01
$\Delta \tau_y [\dots]$ [ms]	8,60E+07	2,12E+01	2,20E+00	4,70E-01	2,16E+06	2,61E+04	1,32E+01

$\tau_z[<..>]$ [ms]	1,15E+01	6,86E+00	1,50E+01	8,88E+00	3,85E+01	5,03E+00	5,00E+01
$\Delta\tau_z[<..>]$ [ms]	8,60E+07	3,27E+01	0,00E+00	2,78E+00	3,97E+02	2,61E+04	0,00E+00
$\omega_x[<..>]$ [μm]	0,212	0,273	0,305	0,337	0,434	0,285	0,288
$\Delta\omega_x[<..>]$ [μm]	0,041	0,030	0,034	0,035	7,25E+05	0,032	0,036
$\kappa_y[<..>]$	8,64	4,47	4,53	2,48	1,00	4,25	7,12
$\Delta\kappa_y[<..>]$	3,23E+07	9,26	0,78	0,25	2,36E+06	1,10E+04	3,31
$\kappa_z[<..>]$	8,64	5,18	6,87	4,78	7,72	4,25	13,28
$\Delta\kappa_z[<..>]$	3,23E+07	12,34	0,00E+00	0,75	1,29E+07	1,10E+04	0,00E+00
V_{eff} [fl](4.2.5-10) [<..>]	14,59	13,04	21,72	18,08	17,07	17,74	9,54
ΔV_{eff} [fl] [<..>]	4,08	3,62	6,03	5,02	4,05	4,17	1,73
V_{eff} [fl](4.2.5-11) [<..>]	3,97	2,63	4,90	2,52	3,52	2,33	12,54
ΔV_{eff} [fl] [<..>]	2,10E+07	8,36	1,73E+00	0,91	8307446,08	8553,10	7,00E+00
$\ln \frac{V_{\text{eff}}(4.x.5.10)}{V_{\text{eff}}(4.x.5.11)}$ [<..>]	1,303	1,599	1,488	1,969	1,580	2,028	-0,274
$\Delta \ln \frac{V_{\text{eff}}(4.x.5.10)}{V_{\text{eff}}(4.x.5.11)}$ [<..>]	5,29E+06	3,184	0,449	0,454	2,36E+06	3663,238	0,586
ln(<Fit>/Fit<..>)							
$\ln(<[N]>/N[<..>])$	-1,878E-01	4,106E-03	-9,482E-03	5,146E-03	-1,405E-01	2,261E-02	6,125E-02
$\Delta \ln(<[N]>/N[<..>])$	1,951E-01	3,094E-02	2,854E-02	1,142E-02	6,421E-02	2,418E-02	5,021E-02
$\ln(<\tau_x>/\tau_x[<..>])$	-1,461E+00	3,329E-02	4,017E-02	-3,799E-02	-1,360E+00	-7,114E-02	8,839E-04
$\Delta \ln(<\tau_x>/\tau_x[<..>])$	2,085E+00	2,125E-01	1,276E-01	5,644E-02	3,341E+06	2,516E-01	4,645E-01
$\ln(<\tau_y>/\tau_y[<..>])$	-2,518E+00	-1,026E+00	-2,184E-01	-2,901E-02	1,535E+00	-1,583E+00	-1,579E+00
$\Delta \ln(<\tau_y>/\tau_y[<..>])$	7,478E+06	4,368E+00	6,740E-01	4,348E-01	3,341E+06	5,180E+03	1,518E+00
$\ln(<\tau_z>/\tau_z[<..>])$	-1,677E-01	1,944E+00	-7,934E-01	5,560E-01	-1,167E+00	-4,229E-02	-2,034E+00
$\Delta \ln(<\tau_z>/\tau_z[<..>])$	8,620E+13	4,865E+00	2,154E+16	7,263E-01	1,032E+01	1,284E+04	1,265E+17
$\ln(<\omega_x>/\omega_x[<..>])$	-3,730E-01	3,943E-02	2,258E-02	-1,809E-02	-5,688E-01	-1,319E-02	5,791E-02
$\Delta \ln(<\omega_x>/\omega_x[<..>])$	5,087E-01	1,454E-01	1,212E-01	1,066E-01	1,671E+06	1,557E-01	2,385E-01
$\ln(<\kappa_y>/\kappa_y[<..>])$	-1,361E+00	-6,254E-01	-1,446E-01	-3,660E-04	1,059E+00	-8,853E-01	-8,215E-01
$\Delta \ln(<\kappa_y>/\kappa_y[<..>])$	3,739E+06	2,178E+00	3,474E-01	2,100E-01	2,363E+06	2,590E+03	8,160E-01
$\ln(<\kappa_z>/\kappa_z[<..>])$	-9,845E-04	8,892E-01	-3,797E-01	3,193E-01	-4,234E-01	3,937E-02	-8,387E-01
$\Delta \ln(<\kappa_z>/\kappa_z[<..>])$	6,373E+06	2,427E+00	8,120E+07	3,799E-01	1,671E+06	2,591E+03	1,582E+08
$\ln(<V_{\text{eff}}[\text{fl}](4.2.5-10)>/V_{\text{eff}}[\text{fl}](4.2.5-10)$ [<..>])	-2,014E-01	3,145E-03	-7,363E-03	4,912E-03	-1,415E-01	2,317E-02	5,411E-02
$\Delta \ln(<V_{\text{eff}}[\text{fl}](4.2.5-10)>/V_{\text{eff}}[\text{fl}](4.2.5-10)$ [<..>])	3,407E-01	2,792E-01	2,790E-01	2,777E-01	2,436E-01	2,362E-01	1,870E-01
$\ln(<V_{\text{eff}}[\text{fl}](4.2.5-11)>/V_{\text{eff}}[\text{fl}](4.2.5-11)$ [<..>])	-1,433E-01	6,146E-01	7,612E-01	3,137E-01	-2,250E-01	6,684E-01	-5,922E-01
$\Delta \ln(<V_{\text{eff}}[\text{fl}](4.2.5-11)>/V_{\text{eff}}[\text{fl}](4.2.5-11)$ [<..>])	5,679E+06	3,196E+00	2,292E+07	4,398E-01	2,363E+06	3,663E+03	4,012E+07

Tabelle 4.2.5-3 Mittelung der Ergebnisse aus Tabelle 4.2.5-2 im Vergleich zu den Fits der gemittelten Kurven. Beide Verfahren liefern keine signifikant verschiedenen Ergebnisse.

Die beiden Methoden zur Bestimmung der Größe des Detektionsvolumens, Gl. 4.2.5-10 und Gl. 4.2.5-11 liefern teilweise signifikant verschiedene Ergebnisse (Zeile $\ln \frac{V_{\text{eff}}(4.2.5-10)}{V_{\text{eff}}(4.2.5-11)}$). Im

Mittel ist das über die Amplitude bestimmte Volumen um einen Faktor 3,4 größer als das über die Diffusionszeiten bestimmte. Mit zunehmender Anregungsleistung wächst das nach Gl. 4.2.5-10 ermittelte Volumen an. Dies ist auf die beginnende Fluoreszenzsättigung bei höheren Leistungen und der damit verbundenen Verschlechterung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses zurückzuführen. Zur Bestimmung des Detektionsvolumens nach Gl. 4.2.5-10 werden daher nur die Messungen mit niedriger Anregungsleistung herangezogen. Man erhält als gewichteten Mittelwert

$$V_{\text{eff}}(4.2.5-10) = 12,4 \pm 2,5 \text{ fl} \quad (\text{aus } G(0), c)$$

Nach Gl. 4.2.5-11 erhält man dagegen

$$V_{\text{eff}}(4.2.5-11) = 3,8 \pm 3,1 \text{ fl} \quad (\text{aus } \tau_x, \tau_y, \tau_z, D)$$

Mit dem Diffusionskoeffizient $D = 7,3 \text{ e-}11 \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ erhält man als Abszissenabschnitt des e^{-2} -Detektionseffizienzellipsoids

$$\omega_x(4.2.5-12) = (0,302 \pm 0,065) \mu\text{m} \quad (\text{aus } \tau_x, D)$$

Im Mittel ist das nach Gl. 4.2.5-10 aus der Amplitude ermittelte Volumen um den Faktor $3,2 \pm 2,7$ größer als das nach Gl. 4.2.5-11. Bei den verwendeten Konzentrationen ist eine starke Amplitudenerniedrigung aufgrund des Untergrunds unwahrscheinlich. Eine mögliche Erklärung für das kleinere Volumen nach Gl. 4.2.5-11 ist, daß der Diffusionskoeffizient zu klein abgeschätzt wurde. Mit einem um den Faktor 2,2 erhöhten Diffusionskoeffizienten von $1,6 \text{ e-}10 \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ (und einem um den Faktor 1,47 erhöhten Abszissenabschnitt des e^{-2} -Detektionseffizienzellipsoids von $\omega_x = 0,445 \mu\text{m}$) erhält man mit den Gln. 4.2.5-10 und 4.2.5-11 übereinstimmende Werte für das Detektionsvolumen. Anders ausgedrückt, erhält man, wenn man ω_x über die Amplitude ausrechnet (Gl. 4.2.5-14) einen größeren Wert als mit dem abgeschätzten Diffusionskoeffizienten.

$$\omega_x = \frac{\sqrt[3]{\frac{\tau_x}{\sqrt{\tau_y \tau_z}} \frac{N}{N_A c}}}{\sqrt{\pi}} \quad \Delta \omega_x = \frac{\omega_x}{3} \sqrt{\left(\frac{\Delta \tau_x}{\tau_x}\right)^2 + \left(\frac{\Delta \tau_y}{2\tau_y}\right)^2 + \left(\frac{\Delta \tau_z}{2\tau_z}\right)^2 + \left(\frac{\Delta N}{N}\right)^2 + \left(\frac{\Delta c}{c}\right)^2} \quad (4.2.5-14)$$

$$\omega_x(4.2.5-14) = (0,453 \pm 0,165) \mu\text{m} \quad (\text{aus } \tau_x, \tau_y, \tau_z, G(0), c)$$

Erklärung

Der um den Faktor 2,2 erhöhte Diffusionskoeffizient würde bedeuten, daß der Molekülradius von Mr121-dUTP weniger als halb so groß wie der von Cy5 ist.

Wahrscheinlicher ist, daß das Modell des Gaußschen Detektionseffizienzellipsoids für diese Betrachtung unzureichend ist [Enderlein 2002^b], [Böhmer 2001]. Zum aus der Amplitude

ermittelten Detektionsvolumen tragen außer dem zentralen Beugungsscheibchen auch die durch die Beugung an der Eintrittspupille entstehenden Nebenmaxima bei: Die Amplitude der Korrelationsfunktion ist durch

$$G(0) = \frac{\iiint \left(\frac{De(\vec{r})}{De(0)} \right)^2 d^3\vec{r}}{C \left(\iiint \frac{De(\vec{r})}{De(0)} d^3\vec{r} \right)^2} \quad (4.2.5-15)$$

mit der Konzentration C und der Detektionseffizienz $De(\mathbf{r})$ verknüpft.

Die Intensität des Beugungsbildes einer gleichmäßig mit parallelem Licht der Wellenlänge λ beleuchteten Kreisblende mit Radius R , welches von einer Linse mit der Brennweite f in deren Brennebene erzeugt wird ist durch

$$I(r) \propto \left(\frac{J_1 \left(2\pi \frac{R}{\lambda} \sin \varphi \right)}{2\pi \frac{R}{\lambda} \sin \varphi} \right)^2 \quad \text{mit } \tan \varphi = \frac{r}{f} \quad (4.2.5-16)$$

gegeben. r bezeichnet dabei den Abstand des Punktes, an dem die Intensität gemessen wird vom Brennpunkt, also dem geometrisch-optischen Bildpunkt der Lichtquelle [Bergmann-Schaefer III, S.394 Gl. 3.42a]. J_1 ist die Besselfunktion erster Gattung erster Ordnung.

Um den Einfluß der Nebenmaxima auf den Wert von ω_x qualitativ zu verstehen wird nun

$$\frac{\int_0^\infty 2\pi r \left(\frac{I(r)}{I(0)} \right)^2 dr}{\left(\int_0^\infty 2\pi r \frac{I(r)}{I(0)} dr \right)^2} \equiv \frac{2\pi \int_0^\infty r e^{-4\left(\frac{r}{\omega}\right)^2} dr}{\left(2\pi \int_0^\infty r e^{-2\left(\frac{r}{\omega}\right)^2} dr \right)^2} = \frac{2\pi \frac{\omega^2}{8}}{\left(2\pi \frac{\omega^2}{4} \right)^2} = \frac{1}{\pi\omega^2} \quad (4.2.5-17)$$

gesetzt. Dabei wird zur Vereinfachung nur in zwei Dimensionen gerechnet. Das Differential $dA = 2\pi r dr$ übernimmt dabei die Rolle von dV im dreidimensionalen Fall. Abbildung 4.2.5-4 zeigt die nach Gl. 4.2.5-17 errechnete Gaußkurve zusammen mit der normierten nach Gl. 4.2.5-16 errechneten Intensitätsverteilung.

Die Diffusionszeit wird durch die Frequenz der zeitlichen Schwankung des Signals bestimmt und nicht durch die Amplitude dieser Schwankung. Die Nebenmaxima, die nur halb so breit sind wie das Hauptmaximum, verkürzen die Diffusionszeit also eher, als daß sie sie erhöhen. Die Verhältnisse sind in Abbildung 4.2.5-4 schematisch dargestellt.

In Abschnitt 2.3.3 wurde $\omega_x = 0,34 \mu\text{m}$ abgeschätzt, dieser Wert liegt also zwischen dem aus der Korrelationszeit abgeschätzten Wert von $0,30 \pm 0,07 \mu\text{m}$ und dem aus der Amplitude abgeschätzten Wert von $0,45 \pm 0,17 \mu\text{m}$.

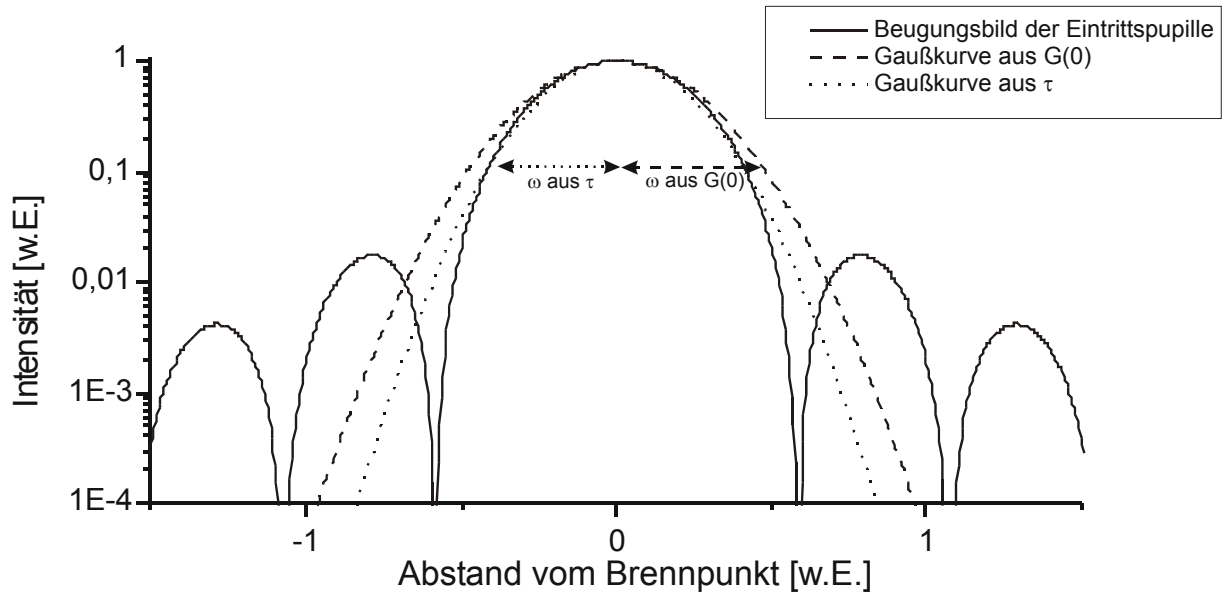


Abbildung 4.2.5-4 Erklärung der unterschiedlichen Ergebnisse aus Gln. 4.2.5-12 und 4.2.5-14 durch den Einfluß der Beugungsringe.

Zusammenfassend erhält man für das freie Volumen folgende Parameter für den Verlauf der Detektionseffizienz:

$$\tau_x \quad 0,323 \pm 0,123 \text{ms} \quad \tau_y \quad 2,996 \pm 3,645 \text{ms} \quad \tau_z \quad 11,845 \pm 13,906 \text{ms}$$

$$\begin{aligned} \omega_x &= 0,30 \pm 0,07 \text{ } \mu\text{m (aus } \tau_x) \\ \kappa_y &= 2,98 \pm 2,09 \\ \kappa_z &= 5,76 \pm 2,91 \\ V_{\text{eff}} &= 12,4 \pm 2,5 \text{ fl (aus } G(0)) \end{aligned}$$

Mr121-dUTP im Femtotip

Die 4×10^{-9} M Lösung von Mr121-dUTP in Femtopuffer wurde in einen Femtotip gefüllt, und in verschiedenen Abständen zur Spitze bei unterschiedlichen Spannungen und Anregungsleistungen die Korrelationsfunktion gemessen (Abbildung 4.2.5-5). Es wurden jeweils 5 Messungen unmittelbar hintereinander ausgeführt. Zur Auswertung wurden die Einzelmessungen mit dem zu Beginn des Abschnitts 4.2.5 beschriebenen Spektralfilter behandelt, die gefilterten Kurven gemittelt und die Standardabweichung als Fehlerbalken zur Wichtung der Datenpunkte verwendet. Die Datenpunkte unter $50 \text{ } \mu\text{s}$ Korrelationszeit, die die Nachpulse des Detektors und Reflexionen an den Kabeln widerspiegeln, wurden nicht ausgewertet.

Als Fitfunktion diente

$$G(t) = \frac{1}{N} \cdot G_y \left(t, \tau_x, \kappa_y, \frac{1}{\tau_y} \right) \cdot G_{\rho\beta} \left(t, \tau_x, \kappa_z, \kappa_l \right) \cdot \left(1 - C_{PD} \left(1 - e^{-k_{PD} t} \right) \right).$$

Dabei sind $G_y(t, \kappa_y, 1/\tau_v)$ durch Gleichung 4.2.3-15 und $G_{\beta}(t, \tau_x, \kappa_z, \kappa_l)$ durch die Näherung aus Kasten 4.2.4-1 gegeben (Gleichungen 4.2.4-2, 4.2.4-3, 4.2.4-8 - 4.2.4-13, 4.2.4-19, 4.2.4-21). Bei den Messungen mit 10, 50 und 100 μW wurde der die Photozerstörung beschreibende vierte Term weggelassen.

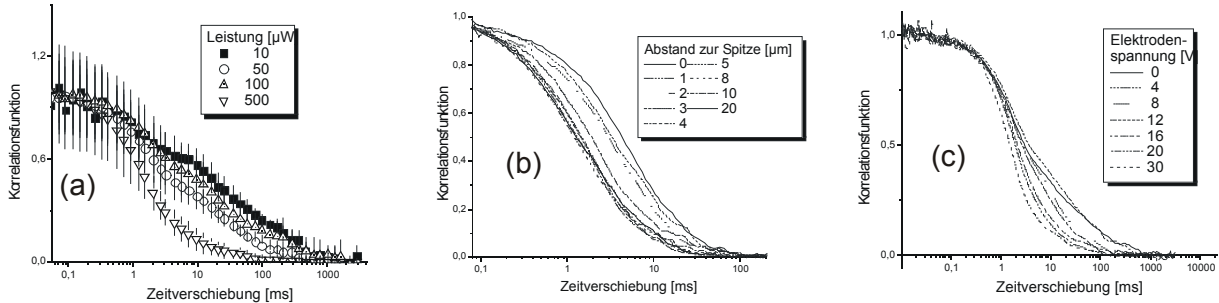


Abbildung 4.2.5-5 normierte gemessene Korrelationsfunktionen von Mr121-dUTP im Femtotip
 (a) Variation der Leistung $1\mu\text{m}$ vor Austritt aus der Kapillare bei 0V Elektroden-Spannung
 (b) Variation des Abstandes zur Austrittsöffnung bei $500\mu\text{W}$ Leistung und 0V Spannung
 (c) Variation der Elektroden-Spannung $5\mu\text{m}$ vor Austritt aus der Kapillare bei $50\mu\text{W}$ Leistung.

Im Gegensatz zu den Messungen im Tropfen zeigen die bei $500\mu\text{W}$ aufgenommenen Korrelationsfunktionen im Femtotip einen signifikant zu kürzeren Zeiten verschobenen Abfall (Abbildung 4.2.5-5a): Da die Diffusion im Femtotip durch die Kapillarwände behindert wird, macht sich bei der dadurch verlangsamten Bewegung der Moleküle im hohen Leistungsbereich die Photozerstörung bemerkbar.

Die Korrelationsfunktion fällt mit zunehmenden Kapillardurchmesser erwartungsgemäß schneller ab (Abbildung 4.2.5-5b).

Mit steigender Spannung fällt die Korrelationsfunktion schneller ab (Abbildung 4.2.5-5c).

Die Messungen an einer bestimmten Position bei einer gegebenen Leistung und variierender Elektroden-Spannung sind jeweils zu einer Meßreihe zusammengefaßt. Die zu einer Meßreihe gehörenden Kurven wurden zusammen ausgewertet. Die Diffusionszeit in x -Richtung (quer zur optischen Achse und quer zur Kapillarachse), τ_x , die Achsenabschnittsverhältnisse $\kappa_y = \omega_y/\omega_x$, $\kappa_z = \omega_z/\omega_x$ sowie der Kapillarparameter $\kappa_l = L/\omega_x/\sqrt{\kappa_z}$ werden dabei für alle Kurven einer Messreihe als gemeinsame Parameter behandelt. Die Flußgeschwindigkeit v sowie der Besetzungsgrad des Detektionsvolumens N können hingegen für jede Spannung unterschiedliche Werte annehmen.

Die Tabellen 4.2.5-4 bis 4.2.5-7 geben die Ergebnisse der Fits an den verschiedenen Positionen wieder, wobei die freien Diffusionszeiten aus den Messungen im Tropfen vorgegeben sind: $\tau_x = 0,332\text{ ms}$, $\kappa_y = 2,98$, $\kappa_z = 5,76$ oder mit $D = 7,3\text{ e-}11\text{ m}^2/\text{s}$, $\omega_x = 0,31\mu\text{m}$, $\omega_y = 0,93\mu\text{m}$, $\omega_z = 1,79\mu\text{m}$. Das heißt, es wird vorausgesetzt, daß die Detektionseffizienz durch die Brechung an den Kapillarwänden nicht wesentlich verzerrt wird und daß die Moleküle nicht durch Adsorption verlangsamt werden. Im Gegensatz zur Messung im Tropfen macht sich bei der höchsten Leistung, $500\mu\text{W}$, im Femtotip die Photozerstörung bemerkbar.

Position: am Ausgang des Femtotips

Leistung		10 μ W	50 μ W	100 μ W	500 μ W
χ^2		4,31E+00	7,19E+00	1,19E+00	2,60E-04
R^2		9,59E-01	9,81E-01	9,88E-01	9,97E-01
κ_I		3,902E-01 \pm 1,131E-02	3,150E-01 \pm 3,476E-03	4,102E-01 \pm 7,840E-03	2,813E-01 \pm 1,216E-02
C_{PD}		--	--	--	4,332E-01 \pm 5,536E-03
k_{PD} [kHz]		--	--	--	7,976E-01 \pm 3,211E-02
00V	<N>	3,325E+00 \pm 5,580E-02	2,417E+00 \pm 4,447E-03	4,467E+00 \pm 1,908E-02	1,009E+00 \pm 2,951E-03
	v/ω_y [kHz]	1,124E-03 \pm 5,154E-03	1,924E-02 \pm 8,758E-04	5,770E-03 \pm 2,965E-03	4,009E-02 \pm 2,591E-03
04V	<N>	4,336E+00 \pm 4,299E-02	3,509E+00 \pm 7,481E-03	5,984E+00 \pm 7,172E-02	1,635E+00 \pm 6,636E-03
	v/ω_y [kHz]	2,732E-03 \pm 5,551E-03	1,309E-02 \pm 2,270E-05	5,867E-03 \pm 4,226E-03	5,184E-02 \pm 4,184E-03
08V	<N>	3,817E+00 \pm 3,531E-02	4,044E+00 \pm 5,938E-02	4,874E+00 \pm 8,545E-02	1,559E+00 \pm 6,110E-03
	v/ω_y [kHz]	1,108E-08 \pm 1,241E+03	1,351E-02 \pm 2,386E-03	1,993E-09 \pm 8,089E+03	6,997E-02 \pm 4,284E-03
12V	<N>	4,861E+00 \pm 1,264E-01	3,580E+00 \pm 4,779E-02	4,237E+00 \pm 3,674E-02	1,889E+00 \pm 8,619E-03
	v/ω_y [kHz]	4,404E-02 \pm 3,756E-03	1,951E-02 \pm 3,289E-03	1,474E-02 \pm 3,200E-03	6,997E-02 \pm 5,116E-03
16V	<N>	5,489E+00 \pm 6,893E-02	2,714E+00 \pm 1,332E-02	3,605E+00 \pm 4,180E-02	2,006E+00 \pm 9,636E-03
	v/ω_y [kHz]	1,205E-05 \pm 4,467E-01	1,058E-02 \pm 1,658E-03	2,715E-02 \pm 3,412E-03	7,863E-02 \pm 5,583E-03
20V	<N>	5,238E+00 \pm 8,657E-02	1,980E+00 \pm 2,420E-02	4,167E+00 \pm 3,250E-02	1,947E+00 \pm 9,121E-03
	v/ω_y [kHz]	2,831E-03 \pm 1,812E-03	7,913E-03 \pm 4,451E-03	3,747E-03 \pm 6,411E-03	7,630E-02 \pm 5,385E-03

Tabelle 4.2.5-4 Fitparameter der Messungen an der Spitze des Femtotips, wenn die Parameter des Detektionsvolumens den im Tropfen bestimmten gleichgesetzt werden.

Position: 1 μ m vor Ausgang des Femtotips

Leistung		10 μ W	50 μ W	100 μ W	500 μ W
χ^2		4,15E+00	1,28E+00	1,80E-04	3,50E-04
R^2		9,97E-01	9,91E-01	9,95E-01	9,99E-01
κ_I		3,548E-01 \pm 1,044E-02	5,339E-01 \pm 7,078E-03	3,477E-01 \pm 3,579E-01	3,118E-01 \pm 5,685E-03
C_{PD}		--	--	--	7,233E-01 \pm 8,393E-03
k_{PD} [kHz]		--	--	--	5,666E-01 \pm 1,265E-02
00V	<N>	5,953E+00 \pm 1,914E-01	1,598E+00 \pm 3,130E-02	1,436E+00 \pm 3,241E-01	1,302E+00 \pm 4,427E-03
	v/ω_y [kHz]	0 \pm 0	2,784E-02 \pm 1,484E-03	9,702E-03 \pm 1,258E-01	5,448E-02 \pm 8,462E-03
04V	<N>	3,927E+00 \pm 1,548E-01	1,328E+00 \pm 1,824E-02	2,305E+00 \pm 7,351E-01	6,467E-01 \pm 1,208E-03
	v/ω_y [kHz]	1,848E-02 \pm 3,741E-03	5,875E-02 \pm 3,475E-03	3,311E-02 \pm 1,974E-01	9,796E-02 \pm 6,004E-03
08V	<N>	5,530E+00 \pm 3,233E-01	1,210E+00 \pm 2,309E-02	2,199E+00 \pm 6,783E-01	7,040E-01 \pm 1,410E-03
	v/ω_y [kHz]	1,608E-02 \pm 8,603E-03	1,152E-01 \pm 3,381E-03	5,852E-02 \pm 2,063E-01	1,719E-01 \pm 6,925E-03
12V	<N>	4,405E+00 \pm 3,988E-02	9,773E-01 \pm 1,249E-02	2,259E+00 \pm 7,175E-01	7,923E-01 \pm 1,747E-03
	v/ω_y [kHz]	1,029E-09 \pm 6,718E+03	1,563E-01 \pm 6,645E-03	9,725E-02 \pm 2,437E-01	1,628E-01 \pm 7,442E-03
16V	<N>	4,465E+00 \pm 3,434E-02	1,097E+00 \pm 9,331E-03	2,589E+00 \pm 9,375E-01	9,913E-01 \pm 2,650E-03
	v/ω_y [kHz]	8,251E-02 \pm 3,603E-04	2,141E-01 \pm 2,874E-03	1,652E-01 \pm 3,495E-01	1,534E-01 \pm 8,669E-03
20V	<N>	7,957E+00 \pm 1,377E-01	1,377E+00 \pm 4,953E-03	3,196E+00 \pm 1,393E+00	9,628E-01 \pm 2,536E-03
	v/ω_y [kHz]	2,615E-02 \pm 1,079E-03	9,620E-02 \pm 2,486E-03	1,414E-01 \pm 3,994E-01	2,604E-01 \pm 9,093E-03

Tabelle 4.2.5-5 Fitparameter der Messungen im Femtotip in 1 μ m Abstand von der Spitze, wenn die Parameter des Detektionsvolumens den im Tropfen bestimmten gleichgesetzt werden.

Position: 2 μm vor Ausgang des Femtotips

Leistung		10 μW	50 μW	500 μW
χ^2		9,30E-04	5,12E+00	1,36E+00
R^2		9,63E-01	9,87E-01	1,00E+00
κ_I		6,454E-01 \pm 1,010E-02	5,607E-01 \pm 1,590E-03	2,619E-01 \pm 3,313E-02
C_{PD}		--	--	6,850E-01 \pm 9,222E-03
k_{PD} [kHz]		--	--	3,421E-01 \pm 7,125E-03
00V	<N>	2,315E+00 \pm 2,338E-02	1,271E+00 \pm 1,800E-02	4,620E-01 \pm 8,546E-03
	v/ω_y [kHz]	7,837E-03 \pm 9,250E-03	1,545E-02 \pm 1,519E-03	5,439E-02 \pm 3,178E-03
04V	<N>	2,769E+00 \pm 3,309E-02	1,727E+00 \pm 2,080E-02	7,900E-01 \pm 5,692E-03
	v/ω_y [kHz]	1,043E-02 \pm 9,871E-03	2,707E-02 \pm 2,317E-03	6,396E-02 \pm 2,085E-03
08V	<N>	2,185E+00 \pm 2,110E-02	1,490E+00 \pm 1,594E-02	7,868E-01 \pm 2,283E-03
	v/ω_y [kHz]	8,058E-02 \pm 9,306E-03	6,986E-02 \pm 4,079E-03	1,164E-01 \pm 3,798E-03
12V	<N>	2,072E+00 \pm 1,918E-02	1,671E+00 \pm 1,122E-02	7,813E-01 \pm 3,239E-03
	v/ω_y [kHz]	1,447E-01 \pm 1,104E-02	1,517E-01 \pm 2,836E-03	1,473E-01 \pm 5,986E-03
16V	<N>	2,516E+00 \pm 2,761E-02	1,558E+00 \pm 1,017E-02	7,812E-01 \pm 2,291E-03
	v/ω_y [kHz]	4,173E-02 \pm 9,265E-03	1,282E-01 \pm 2,828E-03	1,737E-01 \pm 4,097E-03
20V	<N>	2,234E+00 \pm 2,181E-02	1,651E+00 \pm 2,873E-03	8,056E-01 \pm 2,034E-03
	v/ω_y [kHz]	6,985E-03 \pm 9,485E-03	1,774E-01 \pm 6,583E-04	2,245E-01 \pm 2,352E-03
30V	<N>	3,798E+00 \pm 6,157E-02	1,733E+00 \pm 3,381E-02	7,088E-01 \pm 5,576E-04
	v/ω_y [kHz]	1,186E-02 \pm 1,314E-02	8,579E-02 \pm 3,940E-03	3,114E-01 \pm 5,963E-03

Tabelle 4.2.5-5 Fitparameter der Messungen im Femtotip in 2 μm Abstand von der Spitze, wenn die Parameter des Detektionsvolumens den im Tropfen bestimmten gleichgesetzt werden.

Position: 5 μm und 15 μm vor Ausgang des Femtotips

Leistung		10 μW	50 μW	500 μW	50 μW
Abst. zur Spitze		5 μm	5 μm	5 μm	15 μm
χ^2		1,89E+00	2,57E+00	5,76E-01	2,30E+00
R^2		9,80E-01	9,92E-01	9,99E-01	9,93E-01
κ_I		1,119E+00 \pm 8,164E-03	5,687E-01 \pm 3,869E-03	2,997E-01 \pm 9,975E-02	6,551E-01 \pm 4,202E-03
C_{PD}		--	--	5,056E-01 \pm 8,462E-03	--
k_{PD} [kHz]		--	--	5,428E-01 \pm 2,125E-02	--
00V	<N>	3,042E+00 \pm 3,295E-02	1,045E+00 \pm 5,775E-03	4,594E-01 \pm 2,018E-03	2,961E+00 \pm 3,140E-02
	v/ω_y [kHz]	8,933E-03 \pm 2,755E-03	2,877E-02 \pm 2,514E-03	5,005E-02 \pm 2,272E-03	4,990E-02 \pm 2,039E-03
04V	<N>	2,434E+00 \pm 3,703E-02	8,763E-01 \pm 1,038E-02	5,669E-01 \pm 3,403E-03	1,426E+00 \pm 1,600E-02
	v/ω_y [kHz]	2,054E-02 \pm 3,185E-03	3,116E-02 \pm 2,973E-03	7,972E-02 \pm 3,029E-03	3,647E-02 \pm 2,576E-03
08V	<N>	2,766E+00 \pm 4,263E-02	9,902E-01 \pm 2,058E-03	6,205E-01 \pm 2,197E-03	1,298E+00 \pm 3,523E-02
	v/ω_y [kHz]	7,225E-02 \pm 3,113E-03	6,789E-02 \pm 2,083E-03	1,306E-01 \pm 5,270E-03	6,368E-02 \pm 2,313E-03
12V	<N>	2,535E+00 \pm 2,953E-02	9,470E-01 \pm 1,522E-02	6,824E-01 \pm 1,800E-03	1,060E+00 \pm 6,766E-03
	v/ω_y [kHz]	7,120E-02 \pm 1,872E-03	1,009E-01 \pm 4,686E-03	1,783E-01 \pm 4,168E-03	1,158E-01 \pm 3,272E-03
16V	<N>	1,027E+00 \pm 5,420E-03	7,662E-01 \pm 6,496E-03	6,709E-01 \pm 2,602E-03	1,113E+00 \pm 9,363E-03
	v/ω_y [kHz]	6,771E-02 \pm 1,101E-03	1,990E-01 \pm 4,016E-03	2,416E-01 \pm 2,937E-03	1,803E-01 \pm 3,740E-03
20V	<N>	1,496E+00 \pm 3,169E-02	7,898E-01 \pm 6,745E-03	6,319E-01 \pm 4,614E-03	9,272E-01 \pm 3,847E-03
	v/ω_y [kHz]	5,947E-02 \pm 2,598E-03	1,991E-01 \pm 2,321E-03	2,754E-01 \pm 5,394E-03	2,284E-01 \pm 2,707E-03

30V	<N>	1,012E+00 ± 1,767E-02	9,024E-01 ± 8,716E-03	6,315E-01 ± 4,144E-03	1,063E+00 ± 9,482E-03
	v/ω _y [kHz]	6,379E-02 ± 3,848E-03	1,753E-01 ± 2,417E-03	3,853E-01 ± 9,511E-03	1,816E-01 ± 1,982E-03

Tabelle 4.2.5-5 Fitparameter der Messungen im Femtotip in 5 μm und 15 μm Abstand von der Spitze, wenn die Parameter des Detektionsvolumens den im Tropfen bestimmten gleichgesetzt werden.

Mit $L = 0,25 \mu\text{m} + y \cdot \tan(2,3^\circ)$, wobei y der Abstand zur Spitze ist, und $\omega_x = 0,3 \mu\text{m}$ sowie $\kappa_z = 5,76$, erhält man für $\kappa_l = \frac{L}{\sqrt{\omega_x \omega_z}} = \frac{L}{\omega_x \sqrt{\kappa_z}}$ die in Tabelle 4.2.5-6 angegebenen

theoretischen Werte.

Die zu erwartende Flußgeschwindigkeit ergibt sich mit dem Diffusionskoeffizienten D , der Ladung q , der Boltzmann-Konstante k , der Temperatur T und der Feldstärke E nach Gl. 2.5.1-4 zu

$$v = \frac{Dq}{kT} E.$$

Die Feldstärke ist nach Gleichung 4.1-7 mit $\alpha = 2,3^\circ$ und $L_0 = 0,25 \mu\text{m}$ zu

$$E(y) \approx \frac{\sqrt{8} \tan \alpha}{\sqrt{8 + \pi \tan \alpha}} \frac{1}{\left(\frac{y}{L_0} \tan \alpha + 1\right)^2} \frac{U}{L_0} \approx \frac{1,54 \cdot 10^5 \text{ m}^{-1} U}{\left(\frac{y}{6,22 \mu\text{m}} + 1\right)^2}$$

abgeschätzt worden. Die Diffusionskonstante wurde zu $D \approx 7,3 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ abgeschätzt. Die Ladung beträgt $q = 3 \times 1,602 \times 10^{-19} \text{ C}$. Nach Gleichung 2.5.1-5 erhält man mit $T = 300 \text{ K}$ eine Ionenbeweglichkeit von $\mu \approx 9 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$. Damit ergibt sich für MR121-dUTP³⁻ die zu erwartende Geschwindigkeit als

$$v \approx \frac{1,30 \cdot 10^{-3} \text{ ms}^{-1} \text{ V}^{-1}}{\left(\frac{y}{6,22 \mu\text{m}} + 1\right)^2} U. \quad (4.2.5-18)$$

Mit $\omega_y \approx 2,98 \times 0,3 \mu\text{m} = 0,89 \mu\text{m}$ ergibt sich daher

$$\frac{v}{\omega_y} \approx \frac{1,45 \text{ kHz V}^{-1}}{\left(\frac{y}{6,22 \mu\text{m}} + 1\right)^2} U.$$

y [μm]	0	1	2	5	15
L [μm]	0,25	0,29	0,33	0,45	0,85
κ _l = L / √(ω _x ω _z)	0,35	0,40	0,46	0,62	1,18
v/ω _y /U [kHz/V]	1,45	1,08	0,83	0,45	0,12

Tabelle 4.2.5-6 Erwartete Werte für den Kapillarparameter κ_l (bei ω_x = 0,3 μm, ω_z = 1,6 μm) und die Flußgeschwindigkeit v

Die Ergebnisse für κ_l entsprechen bis auf die Werte bei 455 μW den Erwartungen. Bei der höchsten Leistung mußte die Photozerstörung im Modell berücksichtigt werden. Auch v zeigt, bis auf die Messung an der Spitze den erwarteten linearen Anstieg mit wachsender Spannung. Die Geradensteigung der Geschwindigkeiten beträgt mit etwa 0,01 kHz /V allerdings nur etwa 1% des erwarteten Wertes. Außerdem wurde innerhalb der Fehlergrenzen keine systematische Verlangsamung der Wanderungsgeschwindigkeit mit zunehmendem Abstand von der Spitze gefunden.

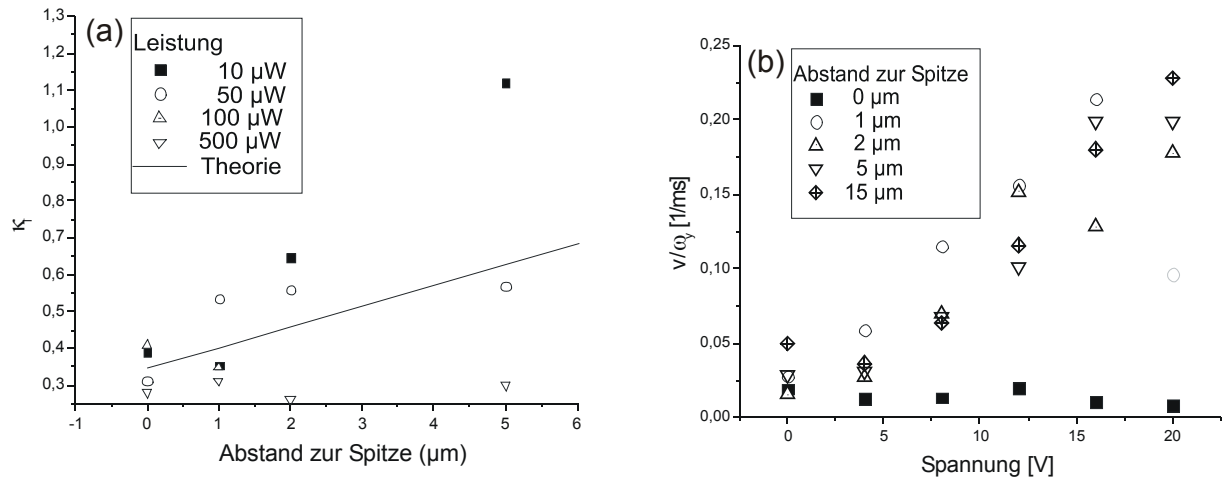


Abbildung 4.2.5-6 Graphische Darstellung der Fitparameter aus den Tabellen 4.2.5-3 bis 4.2.5-5 Mr121-dUTP im Femtotip. $\tau_x = 0,323$ ms, $\kappa_y = 2,98$ $\kappa_z = 5,76$ wurden aus den Messungen im Tropfen vorgegeben.

- (a) Der Kapillarparameter $\kappa_l = L / \sqrt{\omega_x \omega_z}$ nimmt mit zunehmendem Abstand von der Spitze erwartungsgemäß zu.
 (b) Flußgeschwindigkeit, gemessen bei 50 μW Anregungsleistung in unterschiedlichen Abständen von der Spitze, aufgetragen gegen die Elektrodenspannung.

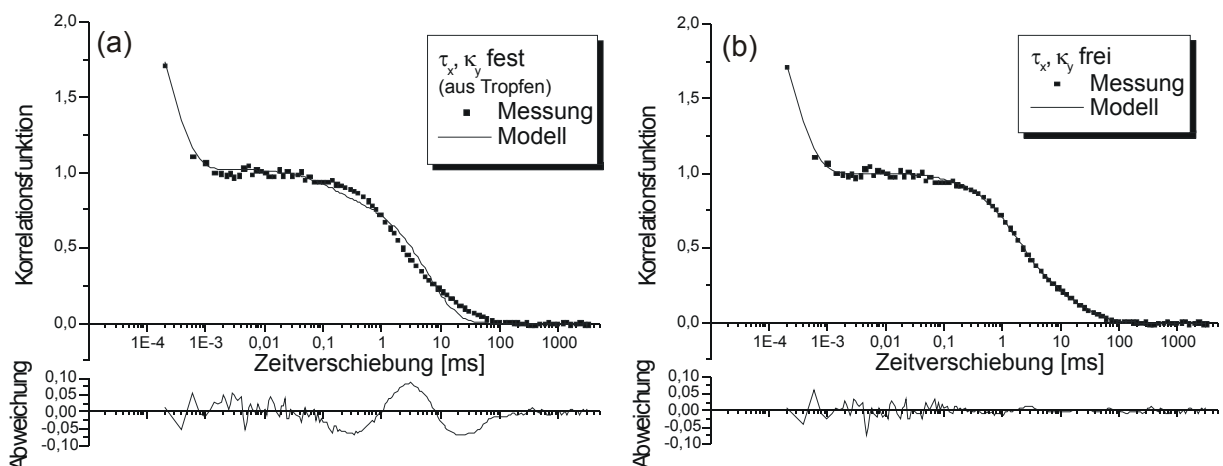


Abbildung 4.2.5-7 Übereinstimmung zwischen Messung und Modell. Die Meßdaten wurden 1 μm vor der Austrittsöffnung bei 8V Elektrodenspannung und 50 μW Anregungsleistung aufgenommen.

(a) Die Diffusionszeiten sind auf die im Tropfen bestimmten Werte festgelegt.

$$(\tau_x \equiv 0,332 \text{ ms}; \kappa_y \equiv 2,98; \kappa_z \equiv 5,76; \kappa_l = 0,464 \pm 0,013; v/\omega_y = (0,180 \pm 0,006) \text{ kHz})$$

(b) Die Diffusionszeit in xz- und y-Richtung wird variiert.

$$(\tau_x = (1,95 \pm 2,01) \text{ ms}; \kappa_y = 1,1 \pm 1,3; \kappa_z \equiv 5,76; \kappa_l = 0,78 \pm 0,48; v/\omega_y = (0,093 \pm 0,052) \text{ kHz})$$

Die experimentellen Kurven werden bei festgesetztem $\tau_x = \tau_{x,\text{frei}}$ $\kappa_y = \kappa_{y,\text{frei}}$ $\kappa_z = \kappa_{z,\text{frei}}$ NUR unbefriedigend durch das Modell beschrieben. Wie Abbildung 4.2.5-7 zeigt, wird eine wesentliche Verbesserung erreicht, wenn τ_x und κ_y freigegeben werden, die Variation von κ_z bewirkt hingegen nur eine leichte Verbesserung.

In den folgenden Tabellen wurden neben allen anderen Parametern auch τ_x , κ_y und, sofern dies eine Verbesserung bewirkte, κ_z variiert. Das heißt, daß die Verzerrung des Detektionsvolumens durch die Kapillare berücksichtigt wird. Die Angabe der Achsenabschnitte des Detektionseffizienzellipsoids ω_x , ω_y , ω_z erfolgt unter der Annahme, daß $D = 7,3 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ und daß keine Adsorption an der Kapillarwand auftritt. Die in den Tabellen angegebenen abgeleiteten Größen ergeben sich aus den Fitparametern über folgende Gleichungen:

$$\omega_x = \frac{1}{2} \sqrt{\frac{\tau_x}{D}} \quad \Delta\omega_x = \frac{\omega_x}{2} \sqrt{\left(\frac{\Delta\tau_x}{\tau_x}\right)^2 + \left(\frac{\Delta D}{D}\right)^2}$$

$$\omega_y = \frac{\kappa_y}{2} \sqrt{\frac{\tau_x}{D}} \quad \Delta\omega_y = \omega_y \sqrt{\left(\frac{\Delta\kappa_y}{\kappa_y}\right)^2 + \left(\frac{\Delta\tau_x}{2\tau_x}\right)^2 + \left(\frac{\Delta D}{2D}\right)^2}$$

$$\omega_z = \frac{\kappa_z}{2} \sqrt{\frac{\tau_x}{D}} \quad \Delta\omega_z = \omega_z \sqrt{\left(\frac{\Delta\kappa_z}{\kappa_z}\right)^2 + \left(\frac{\Delta\tau_x}{2\tau_x}\right)^2 + \left(\frac{\Delta D}{2D}\right)^2}$$

$$v = vdw \cdot \frac{\kappa_y}{2} \sqrt{\frac{\tau_x}{D}} \quad \Delta v = v \sqrt{\left(\frac{\Delta vdw}{vdw}\right)^2 + \left(\frac{\Delta\kappa_y}{\kappa_y}\right)^2 + \left(\frac{\Delta\tau_x}{2\tau_x}\right)^2 + \left(\frac{\Delta D}{2D}\right)^2} \quad (vdw = \frac{v}{\omega_y})$$

Position: am Ausgang des Femtotips

Leistung	10 μW	50 μW	100 μW	500 μW
χ^2	1,330E-2	4,060E-3	4,070E-3	1,020E-3
R^2	9,585E-1	9,782E-1	9,787E-	9,950E-1
C_{PD}	----- \pm -----	----- \pm -----	----- \pm -----	8,429E-1 (fix)
k_{PD} [kHz]	----- \pm -----	----- \pm -----	----- \pm -----	6,417E-1 (fix)
τ_x [ms]	1,021E+0 \pm 1,097E-1	5,158E-1 \pm 2,640E-2	4,349E-1 \pm 3,055E-2	6,856E-1 \pm 4,280E+0
κ_y	4,286E+0 \pm 3,923E-1	6,556E+0 \pm 3,173E-1	5,521E+0 \pm 2,188E-1	1,902E+0 \pm 5,897E+0
κ_z	5,760E+0 (fix)	5,760E+0 (fix)	5,760E+0 (fix)	5,761E+0 \pm 8,691E+02
κ_l	6,630E-1 \pm 2,905E-2	7,238E-1 \pm 1,266E-2	5,845E-1 \pm 9,256E-3	3,166E-1 \pm 2,479E+01
00V v/ω_y [kHz]	4,380E-3 \pm 2,076E-3	2,241E-2 \pm 1,626E-3	1,299E-2 \pm 1,537E-3	8,700E-3 (fix)
04V v/ω_y [kHz]	1,056E-2 \pm 2,356E-3	1,715E-2 \pm 1,419E-3	9,935E-3 \pm 1,468E-3	8,465E-9 \pm 1,934E+04
08V v/ω_y [kHz]	5,433E-3 \pm 2,110E-3	1,258E-2 \pm 1,252E-3	7,501E-3 \pm 1,424E-3	2,296E-2 \pm 1,601E-2
12V v/ω_y [kHz]	2,848E-2 \pm 3,602E-3	1,662E-2 \pm 1,399E-3	1,005E-2 \pm 1,472E-3	2,646E-2 \pm 1,439E-2
16V v/ω_y [kHz]	1,988E-2 \pm 2,956E-3	1,852E-2 \pm 1,468E-3	1,607E-2 \pm 1,613E-3	4,337E-2 \pm 1,022E-2
20V v/ω_y [kHz]	1,818E-2 \pm 2,836E-3	4,810E-3 \pm 1,053E-3	7,968E-3 \pm 1,430E-3	3,533E-2 \pm 1,168E-2
ω_x [μm]	5,459E-1 \pm 6,330E-2	3,881E-1 \pm 4,109E-2	3,564E-1 \pm 3,869E-2	4,474E-1 \pm 1,397E+0
ω_y [μm]	2,340E+0 \pm 3,456E-1	2,544E+0 \pm 2,962E-1	1,967E+0 \pm 2,274E-1	8,510E-1 \pm 3,745E+0
ω_z [μm]	3,144E+0 \pm (kz fix)	2,235E+0 \pm (kz fix)	2,053E+0 \pm (kz fix)	2,577E+0 \pm 3,890E+2
L [μm]	8,687E-1 \pm 1,077E-1	6,741E-1 \pm 7,234E-2	4,999E-1 \pm 5,485E-2	3,400E-1 \pm 3,699E+01
$\omega_x/\omega_{x,\text{frei}}$	1,820E+0 \pm 1,978E-1	1,294E+0 \pm 1,921E-1	1,188E+0 \pm 1,936E-1	1,491E+0 \pm 3,127E+0
$\omega_y/\omega_{y,\text{frei}}$	2,617E+0 \pm 1,616E+0	2,846E+0 \pm 1,738E+0	2,201E+0 \pm 1,344E+0	9,519E-1 \pm 4,228E+0

V_{00V} [$\mu\text{m}/\text{ms}$]	$1,872\text{E-}3 \pm 4,965\text{E-}1$	$8,809\text{E-}3 \pm 1,372\text{E-}1$	$6,603\text{E-}3 \pm 1,654\text{E-}1$	$1,022\text{E-}2 \pm 4,401\text{E+}0$
V_{04V} [$\mu\text{m}/\text{ms}$]	$4,514\text{E-}3 \pm 2,675\text{E-}1$	$6,739\text{E-}3 \pm 1,428\text{E-}1$	$5,050\text{E-}3 \pm 1,876\text{E-}1$	$9,947\text{E-}9 \pm 2,285\text{E+}12$
V_{08V} [$\mu\text{m}/\text{ms}$]	$2,322\text{E-}3 \pm 4,155\text{E-}1$	$4,942\text{E-}3 \pm 1,532\text{E-}1$	$3,813\text{E-}3 \pm 2,223\text{E-}1$	$2,698\text{E-}2 \pm 4,456\text{E+}0$
V_{12V} [$\mu\text{m}/\text{ms}$]	$1,217\text{E-}2 \pm 1,945\text{E-}1$	$6,532\text{E-}3 \pm 1,437\text{E-}1$	$5,107\text{E-}3 \pm 1,866\text{E-}1$	$3,109\text{E-}2 \pm 4,434\text{E+}0$
V_{16V} [$\mu\text{m}/\text{ms}$]	$8,495\text{E-}3 \pm 2,096\text{E-}1$	$7,278\text{E-}3 \pm 1,408\text{E-}1$	$8,170\text{E-}3 \pm 1,531\text{E-}1$	$5,096\text{E-}2 \pm 4,407\text{E+}0$
V_{20V} [$\mu\text{m}/\text{ms}$]	$7,770\text{E-}3 \pm 2,148\text{E-}1$	$1,890\text{E-}3 \pm 2,479\text{E-}1$	$4,050\text{E-}3 \pm 2,135\text{E-}1$	$4,151\text{E-}2 \pm 4,413\text{E+}0$

Tabelle 4.2.5-7 Fitparameter der Messungen mit Mr121-dUTP an der Spitze des Femtotips (oberer Teil der Tabelle) und daraus abgeleitete Größen (unterer Teil der Tabelle), wenn die Parameter des Detektionsvolumens freigegeben werden.

Position: 1 μm vor dem Ausgang des Femtotips

Leistung	10 μW	50 μW	100 μW	500 μW
χ^2	1,717E-2	7,500E-4	8,200E-4	8,300E-
R^2	9,461E-1	9,962E-1	9,956E-1	9,962E-1
C_{PD}	----- \pm -----	----- \pm -----	----- \pm -----	7,173E-1 (fix)
k_{PD} [kHz]	----- \pm -----	----- \pm -----	----- \pm -----	4,390E-1 (fix)
τ_x [ms]	$2,194\text{E+}0 \pm 9,214\text{E-}1$	$1,628\text{E+}0 \pm 4,315\text{E-}1$	$1,884\text{E+}0 \pm 8,310\text{E-}1$	$1,241\text{E+}0 \pm 4,462\text{E-}2$
κ_y	$1,201\text{E+}0 \pm 2,601\text{E-}1$	$1,380\text{E+}0 \pm 2,918\text{E-}1$	$1,730\text{E+}0 \pm 4,190\text{E-}1$	$2,980\text{E+}0$ (fix)
κ_z	$5,760\text{E+}0$ (fix)	$7,115\text{E+}0 \pm 6,052\text{E+}01$	$8,077\text{E+}0 \pm 1,233\text{E+}02$	$5,760\text{E+}0$ (fix)
κ_l	$3,964\text{E-}1 \pm 9,147\text{E-}2$	$5,904\text{E-}1 \pm 2,643\text{E+}0$	$4,927\text{E-}1 \pm 3,924\text{E+}0$	$7,022\text{E-}1 \pm 2,581\text{E-}2$
00V v/ω_y [kHz]	$5,337\text{E-}10 \pm 3,564\text{E+}04$	$1,726\text{E-}2 \pm 3,010\text{E-}3$	$7,741\text{E-}3 \pm 1,598\text{E-}3$	$3,848\text{E-}2 \pm 5,005\text{E-}3$
04V v/ω_y [kHz]	$9,964\text{E-}3 \pm 1,073\text{E-}2$	$4,547\text{E-}2 \pm 4,908\text{E-}3$	$2,530\text{E-}2 \pm 1,828\text{E-}3$	$6,503\text{E-}2 \pm 6,673\text{E-}3$
08V v/ω_y [kHz]	$1,814\text{E-}2 \pm 1,025\text{E-}2$	$1,252\text{E-}1 \pm 1,213\text{E-}2$	$4,207\text{E-}2 \pm 2,436\text{E-}3$	$1,159\text{E-}1 \pm 9,253\text{E-}3$
12V v/ω_y [kHz]	$4,474\text{E-}2 \pm 1,166\text{E-}2$	$1,436\text{E-}1 \pm 1,356\text{E-}2$	$6,911\text{E-}2 \pm 3,592\text{E-}3$	$1,066\text{E-}1 \pm 8,871\text{E-}3$
16V v/ω_y [kHz]	$7,500\text{E-}2 \pm 1,423\text{E-}2$	$1,694\text{E-}1 \pm 1,535\text{E-}2$	$1,194\text{E-}1 \pm 5,529\text{E-}3$	$1,029\text{E-}1 \pm 8,709\text{E-}3$
20V v/ω_y [kHz]	$2,399\text{E-}2 \pm 1,047\text{E-}2$	$8,193\text{E-}2 \pm 8,328\text{E-}3$	$9,828\text{E-}2 \pm 4,773\text{E-}3$	$1,926\text{E-}1 \pm 1,114\text{E-}2$
30V v/ω_y [kHz]	----- \pm -----	----- \pm -----	----- \pm -----	$3,110\text{E-}1 \pm 1,238\text{E-}2$
ω_x [μm]	$8,005\text{E-}1 \pm 1,871\text{E-}1$	$6,894\text{E-}1 \pm 1,156\text{E-}1$	$7,417\text{E-}1 \pm 1,805\text{E-}1$	$6,019\text{E-}1 \pm 6,277\text{E-}2$
ω_y [μm]	$9,610\text{E-}1 \pm 3,063\text{E-}1$	$9,513\text{E-}1 \pm 2,568\text{E-}1$	$1,283\text{E+}0 \pm 4,405\text{E-}1$	$1,794\text{E+}0 \pm 1,871\text{E-}1$
ω_z [μm]	$4,611\text{E+}0 \pm$ (kz fix)	$4,905\text{E+}0 \pm 41,73017585$	$5,990\text{E+}0 \pm 9,143\text{E+}1$	$3,467\text{E+}0 \pm$ (kz fix)
L [μm]	$7,616\text{E-}1 \pm 2,501\text{E-}1$	$1,086\text{E+}0 \pm 6,706\text{E+}0$	$1,038\text{E+}0 \pm 1,146\text{E+}01$	$1,014\text{E+}0 \pm 1,122\text{E-}1$
$\omega_x/\omega_{x,\text{frei}}$	$2,668\text{E+}0 \pm 2,834\text{E-}1$	$2,298\text{E+}0 \pm 2,320\text{E-}1$	$2,472\text{E+}0 \pm 2,914\text{E-}1$	$2,006\text{E+}0 \pm 1,913\text{E-}1$
$\omega_y/\omega_{y,\text{frei}}$	$1,075\text{E+}0 \pm 7,299\text{E-}1$	$1,064\text{E+}0 \pm 6,997\text{E-}1$	$1,435\text{E+}0 \pm 9,917\text{E-}1$	$2,006\text{E+}0 \pm 1,221\text{E+}0$
V_{00V} [$\mu\text{m}/\text{ms}$]	$5,553\text{E-}10 \pm 6,678\text{E+}13$	$1,814\text{E-}2 \pm 3,213\text{E-}1$	$6,032\text{E-}3 \pm 4,006\text{E-}1$	$2,146\text{E-}2 \pm 1,667\text{E-}1$
V_{04V} [$\mu\text{m}/\text{ms}$]	$1,037\text{E-}2 \pm 1,123\text{E+}0$	$4,779\text{E-}2 \pm 2,907\text{E-}1$	$1,972\text{E-}2 \pm 3,508\text{E-}1$	$3,626\text{E-}2 \pm 1,463\text{E-}1$
V_{08V} [$\mu\text{m}/\text{ms}$]	$1,887\text{E-}2 \pm 6,489\text{E-}1$	$1,316\text{E-}1 \pm 2,868\text{E-}1$	$3,278\text{E-}2 \pm 3,481\text{E-}1$	$6,460\text{E-}2 \pm 1,314\text{E-}1$
V_{12V} [$\mu\text{m}/\text{ms}$]	$4,655\text{E-}2 \pm 4,116\text{E-}1$	$1,510\text{E-}1 \pm 2,859\text{E-}1$	$5,385\text{E-}2 \pm 3,472\text{E-}1$	$5,943\text{E-}2 \pm 1,334\text{E-}1$
V_{16V} [$\mu\text{m}/\text{ms}$]	$7,804\text{E-}2 \pm 3,709\text{E-}1$	$1,780\text{E-}1 \pm 2,847\text{E-}1$	$9,303\text{E-}2 \pm 3,464\text{E-}1$	$5,740\text{E-}2 \pm 1,343\text{E-}1$
V_{20V} [$\mu\text{m}/\text{ms}$]	$2,496\text{E-}2 \pm 5,404\text{E-}1$	$8,612\text{E-}2 \pm 2,884\text{E-}1$	$7,658\text{E-}2 \pm 3,467\text{E-}1$	$1,074\text{E-}1 \pm 1,193\text{E-}1$
V_{30V} [$\mu\text{m}/\text{ms}$]	----- \pm -----	----- \pm -----	----- \pm -----	$1,734\text{E-}1 \pm 1,116\text{E-}1$

Tabelle 4.2.5-8 Fitparameter der Messungen in 1 μm Abstand von der Spitze des Femtotips (oberer Teil der Tabelle) und daraus abgeleitete Größen (unterer Teil der Tabelle), wenn die Parameter des Detektionsvolumens freigegeben werden.

Position: 2 μm vor dem Ausgang des Femtotips

Leistung	10 μW	50 μW	500 μW
χ^2	2,653E-2	9,400E-4	3,500E-4
R^2	9,351E-1	9,952E-1	9,984E-1
C_{PD}	----- \pm -----	----- \pm -----	4,448E-1 \pm 1,226E-1
k_{PD} [kHz]	----- \pm -----	----- \pm -----	1,334E-1 \pm 5,448E-2
τ_x [ms]	$5,786\text{E-}1 \pm 5,380\text{E-}2$	$1,185\text{E+}0 \pm 3,490\text{E-}2$	$1,885\text{E+}0 \pm 4,781\text{E-}1$
κ_y	$3,544\text{E+}0 \pm 8,481\text{E-}1$	$2,645\text{E+}0 \pm 2,305\text{E-}1$	$1,066\text{E+}0 \pm 2,501\text{E-}1$
κ_z	$5,760\text{E+}0$ (fix)	$5,760\text{E+}0$ (fix)	$5,760\text{E+}0$ (fix)
κ_l	$9,395\text{E-}1 \pm 1,243\text{E-}1$	$8,216\text{E-}1 \pm 4,160\text{E-}2$	$7,652\text{E-}1 \pm 1,988\text{E-}1$
00V v/ω_y [kHz]	$7,393\text{E-}3 \pm 9,668\text{E-}3$	$6,968\text{E-}3 \pm 1,508\text{E-}3$	$4,104\text{E-}2 \pm 9,596\text{E-}3$
04V v/ω_y [kHz]	$8,593\text{E-}3 \pm 9,515\text{E-}3$	$1,865\text{E-}2 \pm 1,747\text{E-}3$	$6,843\text{E-}2 \pm 1,136\text{E-}2$
08V v/ω_y [kHz]	$5,038\text{E-}2 \pm 1,509\text{E-}2$	$5,341\text{E-}2 \pm 3,593\text{E-}3$	$1,441\text{E-}1 \pm 1,621\text{E-}2$

12V v/ω_y [kHz]	8,514E-2 ± 2,137E-2	8,879E-2 ± 5,378E-3	1,732E-1 ± 1,805E-2
16V v/ω_y [kHz]	2,876E-2 ± 1,153E-2	1,007E-1 ± 5,883E-3	2,190E-1 ± 2,073E-2
20V v/ω_y [kHz]	5,989E-3 ± 1,021E-2	1,451E-1 ± 7,376E-3	2,416E-1 ± 2,196E-2
30V v/ω_y [kHz]	8,768E-3 ± 9,507E-3	9,569E-2 ± 5,677E-3	3,429E-1 ± 2,662E-2
ω_x [μm]	4,110E-1 ± 4,635E-2	5,883E-1 ± 6,106E-2	7,418E-1 ± 1,211E-1
ω_y [μm]	1,457E+0 ± 3,854E-1	1,556E+0 ± 2,109E-1	7,911E-1 ± 2,261E-1
ω_z [μm]	2,368E+0 ± (kz fix)	3,389E+0 ± (kz fix)	4,273E+0 ± (kz fix)
L [μm]	9,268E-1 ± 1,611E-1	1,160E+0 ± 1,340E-1	1,362E+0 ± 4,179E-1
$\omega_x/\omega_{x,\text{frei}}$	1,370E+0 ± 1,960E-1	1,961E+0 ± 1,910E-1	2,473E+0 ± 2,288E-1
$\omega_y/\omega_{y,\text{frei}}$	1,630E+0 ± 1,068E+0	1,740E+0 ± 1,070E+0	8,849E-1 ± 5,877E-1
V_{00V} [$\mu\text{m}/\text{ms}$]	5,075E-3 ± 1,334E+0	4,478E-3 ± 2,553E-1	5,188E-2 ± 3,692E-1
V_{04V} [$\mu\text{m}/\text{ms}$]	5,898E-3 ± 1,138E+0	1,198E-2 ± 1,648E-1	8,650E-2 ± 3,305E-1
V_{08V} [$\mu\text{m}/\text{ms}$]	3,459E-2 ± 3,996E-1	3,433E-2 ± 1,513E-1	1,821E-1 ± 3,071E-1
V_{12V} [$\mu\text{m}/\text{ms}$]	5,844E-2 ± 3,646E-1	5,706E-2 ± 1,484E-1	2,189E-1 ± 3,042E-1
V_{16V} [$\mu\text{m}/\text{ms}$]	1,974E-2 ± 4,804E-1	6,469E-2 ± 1,476E-1	2,769E-1 ± 3,010E-1
V_{20V} [$\mu\text{m}/\text{ms}$]	4,111E-3 ± 1,726E+0	9,324E-2 ± 1,447E-1	3,054E-1 ± 2,999E-1
V_{30V} [$\mu\text{m}/\text{ms}$]	6,018E-3 ± 1,116E+0	6,150E-2 ± 1,479E-1	4,334E-1 ± 2,961E-1

Tabelle 4.2.5-9 Fitparameter der Messungen in 2 μm Abstand von der Spitze des Femtotips (oberer Teil der Tabelle) und daraus abgeleitete Größen (unterer Teil der Tabelle), wenn die Parameter des Detektionsvolumens freigegeben werden.

Position: 5 bzw. 15 μm vor dem Ausgang des Femtotips

Leistung	10 μW	50 μW	500 μW	50 μW
Abstand zur Spitze	5 μm	5 μm	5 μm	15 μm
χ^2	5,521E-2 ± -----	8,500E-4 ± -----	1,600E-4 ± -----	9,300E-4 ± -----
R^2	8,923E-1 ± -----	9,958E-1 ± -----	9,993E-1 ± -----	9,954E-1 ± -----
C_{PD}	----- ± -----	----- ± -----	6,913E-1 ± 8,208E-2	----- ± -----
k_{PD} [kHz]	----- ± -----	----- ± -----	2,716E-2 ± 5,309E-3	----- ± -----
τ_x [ms]	5,189E-1 ± 1,852E+01	3,311E+0 ± 9,812E-1	2,490E+0 ± 8,500E-1	2,694E+0 ± 7,910E-1
κ_y	1,122E+0 ± 1,983E+01	6,953E-1 ± 1,549E-1	7,871E-1 ± 1,733E-1	6,969E-1 ± 1,605E-1
κ_z	4,590E+0 ± 3,448E+03	5,760E+0 (fix)	6,182E+0 ± 4,474E+01	5,760E+0 (fix)
κ_l	3,459E-1 ± 1,348E+02	4,347E-1 ± 5,899E-2	6,059E-1 ± 2,295E+0	5,635E-1 ± 5,717E-2
00V v/ω_y [kHz]	1,439E-8 ± 7,033E+04	2,171E-2 ± 4,555E-3	2,543E-2 ± 1,398E-2	4,026E-2 ± 7,177E-3
04V v/ω_y [kHz]	2,342E-2 ± 7,859E-2	2,471E-2 ± 4,601E-3	5,192E-2 ± 1,026E-2	3,122E-2 ± 6,899E-3
08V v/ω_y [kHz]	4,070E-1 ± 1,136E-1	8,831E-2 ± 7,429E-3	1,567E-1 ± 8,881E-3	6,895E-2 ± 8,441E-3
12V v/ω_y [kHz]	2,738E-1 ± 9,437E-2	1,245E-1 ± 9,673E-3	2,176E-1 ± 1,080E-2	1,156E-1 ± 1,128E-2
16V v/ω_y [kHz]	2,179E-1 ± 8,784E-2	2,237E-1 ± 1,562E-2	3,165E-1 ± 1,380E-2	1,479E-1 ± 1,345E-2
20V v/ω_y [kHz]	1,744E-1 ± 8,360E-2	2,789E-1 ± 1,845E-2	3,774E-1 ± 1,539E-2	2,117E-1 ± 1,769E-2
30V v/ω_y [kHz]	3,383E-1 ± 1,031E-1	4,112E-1 ± 2,380E-2	4,800E-1 ± 1,764E-2	2,677E-1 ± 2,108E-2
ω_x [μm]	3,892E-1 ± 6,948E+0	9,833E-1 ± 1,773E-1	8,526E-1 ± 1,699E-1	8,870E-1 ± 1,589E-1
ω_y [μm]	4,368E-1 ± 1,097E+01	6,837E-1 ± 1,960E-1	6,711E-1 ± 1,993E-1	6,182E-1 ± 1,803E-1
ω_z [μm]	1,787E+0 ± 1342,681684	5,664E+0 ± (kz fix)	5,271E+0 ± 3,816E+01	5,109E+0 ± (kz fix)
L [μm]	2,885E-1 ± 1,562E+02	1,026E+0 ± 2,315E-1	1,285E+0 ± 6,734E+0	1,199E+0 ± 2,470E-1
$\omega_x/\omega_{x,\text{frei}}$	1,297E+0 ± 1,785E+01	3,278E+0 ± 2,413E-1	2,842E+0 ± 2,557E-1	2,957E+0 ± 2,404E-1
$\omega_y/\omega_{y,\text{frei}}$	4,886E-1 ± 1,228E+01	7,648E-1 ± 5,082E-1	7,506E-1 ± 5,022E-1	6,915E-1 ± 4,611E-1
V_{00V} [$\mu\text{m}/\text{ms}$]	3,294E-8 ± 4,889E+12	3,176E-2 ± 3,552E-1	3,790E-2 ± 6,246E-1	6,513E-2 ± 3,419E-1
V_{04V} [$\mu\text{m}/\text{ms}$]	5,362E-2 ± 2,534E+01	3,614E-2 ± 3,418E-1	7,736E-2 ± 3,566E-1	5,051E-2 ± 3,660E-1
V_{08V} [$\mu\text{m}/\text{ms}$]	9,318E-1 ± 2,512E+01	1,292E-1 ± 2,987E-1	2,335E-1 ± 3,023E-1	1,115E-1 ± 3,164E-1
V_{12V} [$\mu\text{m}/\text{ms}$]	6,268E-1 ± 2,512E+01	1,821E-1 ± 2,969E-1	3,242E-1 ± 3,010E-1	1,870E-1 ± 3,076E-1
V_{16V} [$\mu\text{m}/\text{ms}$]	4,988E-1 ± 2,512E+01	3,272E-1 ± 2,950E-1	4,716E-1 ± 3,001E-1	2,392E-1 ± 3,056E-1
V_{20V} [$\mu\text{m}/\text{ms}$]	3,994E-1 ± 2,512E+01	4,080E-1 ± 2,941E-1	5,624E-1 ± 2,997E-1	3,424E-1 ± 3,035E-1
V_{30V} [$\mu\text{m}/\text{ms}$]	7,746E-1 ± 2,512E+01	6,013E-1 ± 2,924E-1	7,153E-1 ± 2,992E-1	4,331E-1 ± 3,022E-1

Tabelle 4.2.5-10 Fitparameter der Messungen in 5 μm und 15 μm Abstand von der Spitze des Femtotips (oberer Teil der Tabelle) und daraus abgeleitete Größen (unterer Teil der Tabelle), wenn die Parameter des Detektionsvolumens freigegeben werden.

Das Detektionsvolumen wird, wie Abbildung 4.2.5-8 zeigt, vor allem in der x-z-Ebene durch die Kapillare aufgeweitet, wobei die Aufweitung mit zunehmendem Abstand von der Spitze zunimmt.

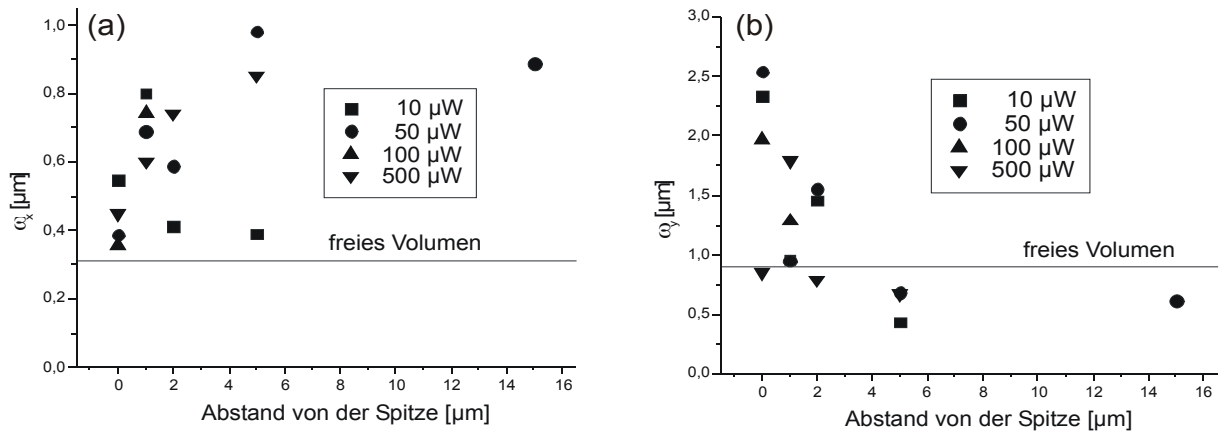


Abbildung 4.2.5-8 Aufweitung des Detektionsvolumens durch die Kapillare
(a) in x-z-Richtung (b) in y-Richtung

In y-Richtung (Richtung der Kapillarachse) scheint das Detektionsvolumen hingegen nur an der Spitze aufgeweitet zu werden, während es weiter hinten in der Kapillare eher gestaucht wird. Die Fehlerbalken in der Grafik wurden zur besseren Übersichtlichkeit weggelassen; den Tabellen 4.2.5-7 bis 10 ist zu entnehmen, daß die Unsicherheit bei diesen Daten (wegen der hohen Kovarianz mit anderen Parametern) sehr groß ist.

Wie Abbildung 4.2.5-9 zeigt, liegen der Kapillarparameter κ_l und der aus diesem mit $\tau_x D$ und κ_z errechnete Kapillarradius in der erwarteten Größenordnung. Die Übereinstimmung mit der Theorie ist allerdings wesentlich besser wenn ω_x und κ_z vorgegeben werden. Der Grund hierfür dürfte in der großen Kovarianz zwischen diesen drei Parametern liegen. Eine weitere Erklärung für den zu groß ermittelten Kapillarradius wird im Diskussionsteil (Abschnitt 4.2.6) gegeben.

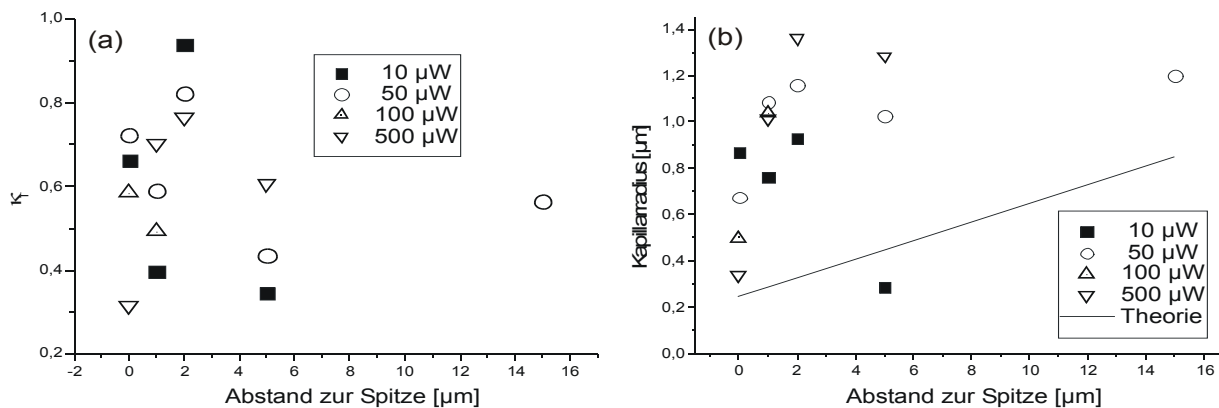


Abbildung 4.2.5-9 Kapillarparameter und Kapillarradius

(a) Fitparameter $\kappa_l = L / (\omega_x \sqrt{\kappa_z})$ bei freigegebenem $\tau_x = \omega_x^2 / (4D)$.

(b) Aus κ_l , κ_z , τ_x und D errechneter Kapillarradius L , sowie der theoretische Wert ($L = 0,25 \mu\text{m} + y \cdot \tan(2,3^\circ)$). Eine Erklärung für die beobachtete Abweichung wird in Abschnitt 4.2.6 gegeben.

Abbildung 4.2.5-10 zeigt die Flußgeschwindigkeiten an den unterschiedlichen Positionen in Abhängigkeit von der Elektroden Spannung. Messungen mit der gleichen Anregungsleistung sind dabei in jeweils einer Graphik dargestellt. Neben den Meßpunkten sind auch die Regressionsgeraden eingezeichnet.

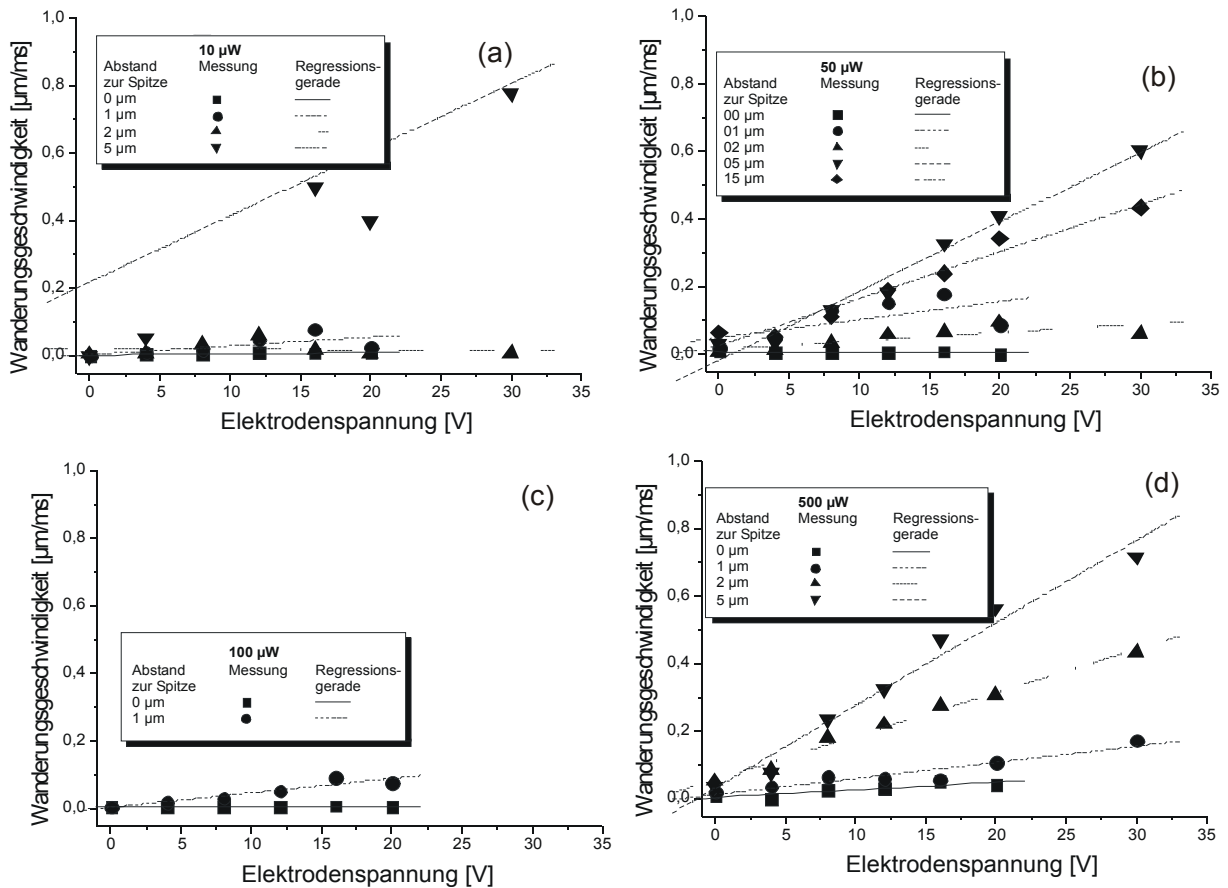


Abbildung 4.2.5-10 Flußgeschwindigkeiten in Abhängigkeit von der Spannung
Die Messungen an den verschiedenen Positionen sind jeweils zu einer Meßreihe zusammengefaßt.
(a) bei 10 μW Anregungsleistung (b) bei 50 μW Anregungsleistung
(c) bei 100 μW Anregungsleistung (d) bei 500 μW Anregungsleistung

Die Parameter der Regressionsgeraden sind in Tabelle 4.2.5-11 wiedergegeben:

Abstand zur Spitze [μm]	0	1	2	5	15
Leistung	Regressionskoeffizient				
10 μW	0,68533	0,67046	-0,11179	0,57005	--
50 μW	-0,70449	0,64559	0,80169	0,98829	0,98036
100 μW	-0,06831	0,94282	--	--	--
500 μW	0,88017	0,94433	0,99311	0,98754	--

Leistung	Ordinatenabschnitt [$\mu\text{m}/\text{ms}$]				
10 μW	$2,53\text{E-}3 \pm 2,36\text{E-}3$	$4,41\text{E-}3 \pm 1,70\text{E-}2$	$2,20\text{E-}2 \pm 1,44\text{E-}2$	$2,18\text{E-}1 \pm 2,01\text{E-}1$	----- \pm -----
50 μW	$8,27\text{E-}3 \pm 1,37\text{E-}3$	$4,85\text{E-}2 \pm 3,83\text{E-}2$	$1,49\text{E-}2 \pm 1,32\text{E-}2$	$-1,79\text{E-}2 \pm 2,25\text{E-}2$	$2,59\text{E-}2 \pm 1,999\text{E-}2$
100 μW	$5,62\text{E-}3 \pm 1,33\text{E-}3$	$4,59\text{E-}3 \pm 9,08\text{E-}3$	----- \pm -----	----- \pm -----	----- \pm -----
500 μW	$4,40\text{E-}3 \pm 7,31\text{E-}3$	$1,32\text{E-}2 \pm 1,18\text{E-}2$	$5,75\text{E-}2 \pm 1,08\text{E-}2$	$3,28\text{E-}2 \pm 2,77\text{E-}2$	----- \pm -----
Leistung	Geradensteigung [$\mu\text{m}/(\text{ms} \times \text{V})$]				
Theorie	$1,30\text{E+}00$	$9,65\text{E-}1$	$7,44\text{E-}1$	$4,00\text{E-}1$	$1,12\text{E-}1$
10 μW	$3,66\text{E-}4 \pm 1,95\text{E-}4$	$2,54\text{E-}3 \pm 1,40\text{E-}3$	$-2,26\text{E-}4 \pm 9,00\text{E-}4$	$1,95\text{E-}2 \pm 1,26\text{E-}2$	----- \pm -----
50 μW	$-2,24\text{E-}4 \pm 1,13\text{E-}4$	$5,36\text{E-}3 \pm 3,17\text{E-}3$	$2,48\text{E-}3 \pm 8,27\text{E-}4$	$2,05\text{E-}2 \pm 1,41\text{E-}3$	$1,39\text{E-}2 \pm 1,25\text{E-}3$
100 μW	$-1,51\text{E-}5 \pm 1,10\text{E-}4$	$4,24\text{E-}3 \pm 7,50\text{E-}4$	----- \pm -----	----- \pm -----	----- \pm -----
500 μW	$2,24\text{E-}3 \pm 6,04\text{E-}4$	$4,75\text{E-}3 \pm 7,40\text{E-}4$	$1,28\text{E-}2 \pm 6,76\text{E-}4$	$2,44\text{E-}2 \pm 1,74\text{E-}3$	----- \pm -----

Tabelle 4.2.5-11 Parameter der Regressionsgeraden aus Abbildung 4.2.5-10

Entgegen der Erwartung (Gleichung 4.2.5-18) wurde die maximale Geschwindigkeit (Geradensteigung) 5 μm vor der Austrittsöffnung des Femtotips und nicht an der Spitze gemessen, wie Abbildung 4.2.5-11 illustriert. Für eine Diskussion dieses Ergebnisses sei auf Abschnitt 4.2.6 verwiesen.

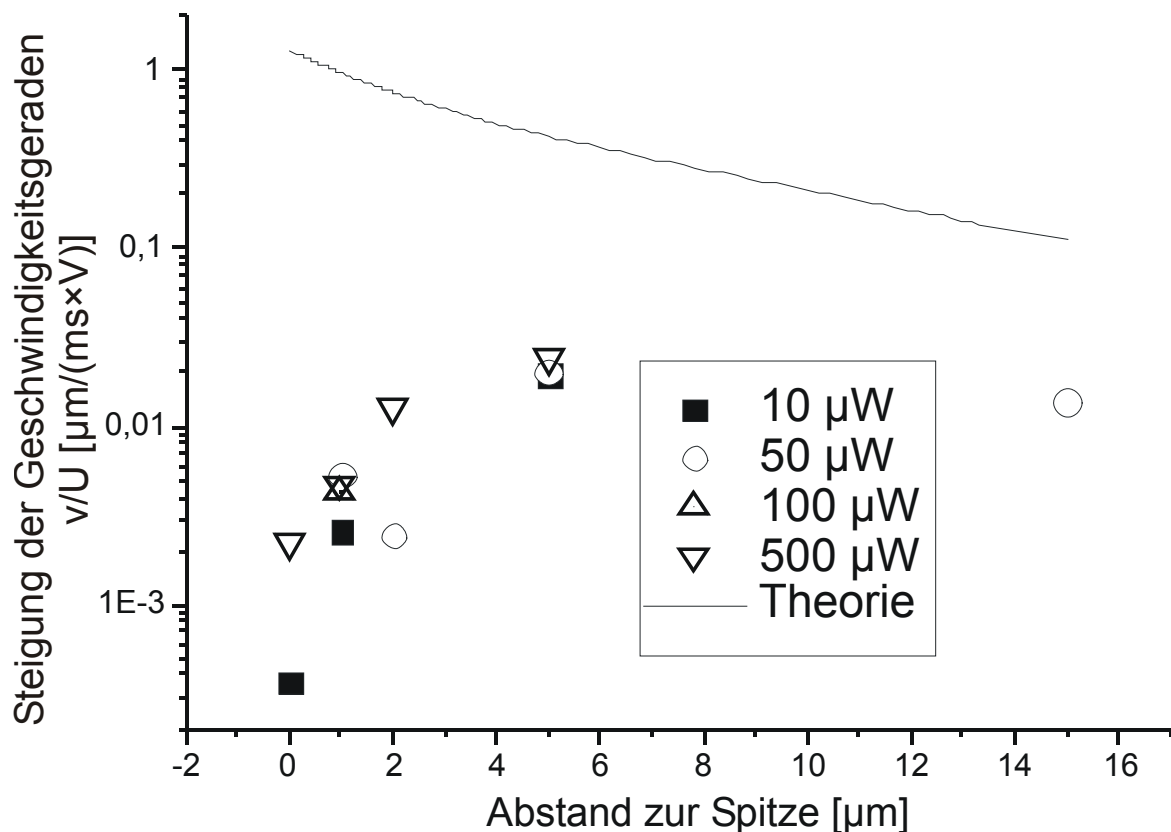


Abbildung 4.2.5-11 Geradensteigungen der Regressionsgeraden aus Abbildung 4.2.5-10 Mr121-dUTP im Femtotip. Die Ordinate ist zur besseren Übersicht logarithmisch aufgetragen.

Die theoretische Kurve ergibt sich aus der abgeschätzten Ionenbeweglichkeit und dem in Abschnitt 4.1 errechneten Feldstärkeverlauf (Gleichung 4.1-7) nach Gleichung 4.2.5-19.

Wenn die Geschwindigkeit bei sich verjüngender Kapillare zur Spitze hin abnimmt, so ist dies bei konstantem Teilchenstrom durch den Kapillarquerschnitt nur möglich, wenn die Konzentration der Teilchen zur Spitze hin zunimmt:

Die Teilchenstromdichte j_{MR121} ist mit dem Teilchenstrom Φ_{MR121} durch die Querschnittsfläche A durch

$$j_{MR121}(y) = \frac{\Phi_{MR121}}{A(y)} = \frac{\Phi_{MR121}}{\pi L^2(y)}$$

verknüpft. Zwischen der Teilchenstromdichte, der Wanderungsgeschwindigkeit v und der Teilchenzahldichte 1c besteht folgender Zusammenhang:

$$j_{MR121}(y) = v(y) \cdot {}^1c(y)$$

Setzt man die rechten Seiten der letzten beiden Gleichungen einander gleich, so erhält man mit $L(y) = L_0 + y \times \tan(\alpha)$, wobei α der Öffnungshalbwinkel der Kapillare ist:

$${}^1c(y) = \frac{\Phi_{MR121}}{\pi v(y)(L_0 + y \tan \alpha)} \quad (4.2.5-20)$$

Aus dieser Gleichung wird offensichtlich, daß $c(y)$ mit sinkendem y zunehmen muß, wenn $v(y)$ abnimmt.

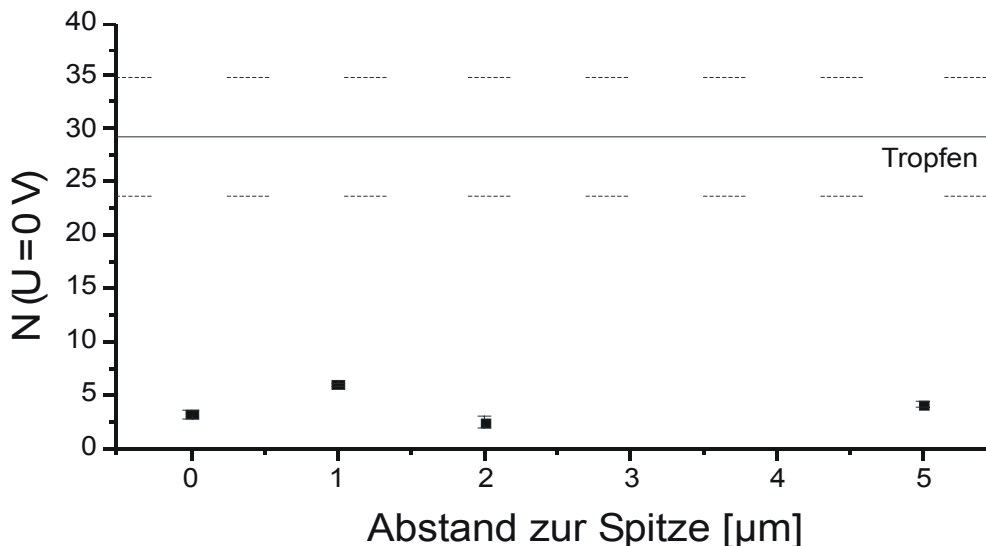


Abbildung 4.2.5-12 Aus der FCS-Amplitude ermittelte Teilchenzahlen von Mr121-dUTP bei abgeschalteter Elektrodenspannung und $10 \mu\text{W}$ Anregungsleistung.

Prinzipiell lassen sich Teilchenzahldichten bei bekannten Abmessungen des Detektionsvolumens aus der Amplitude der Korrelationsfunktion bestimmen.

Ein direkter Vergleich der FCS- Amplituden an unterschiedlichen Positionen innerhalb der Kapillare ergibt jedoch keinen Sinn, da sich das Detektionsvolumen an den einzelnen Positionen unterscheidet (Abbildung 4.2.5-12).

Dieses Problem kann jedoch dadurch umgangen werden, daß die ermittelten Teilchenzahlen, $N(U)$ auf die Teilchenzahl bei abgeschalteter Spannung, $N(0 \text{ V})$, normiert werden. In diesem Fall kann man $c(y) \approx \text{konstant}$ annehmen, wenn keine Photozerstörung auftritt und man sich soweit innerhalb der Kapillare aufhält, daß die Verarmung der Spitze an Farbstoff durch den diffusiven Austritt desselben aus der Öffnung zu vernachlässigen ist. Bei der geringsten Anregungsleistung, $10 \mu\text{W}$, spielt die Photozerstörung keine Rolle. Stellvertretend ist hier das Ergebnis für 8 V (Abbildung 4.2.5-13a) und für 20 V (Abbildung 4.2.5-13b) abgebildet:

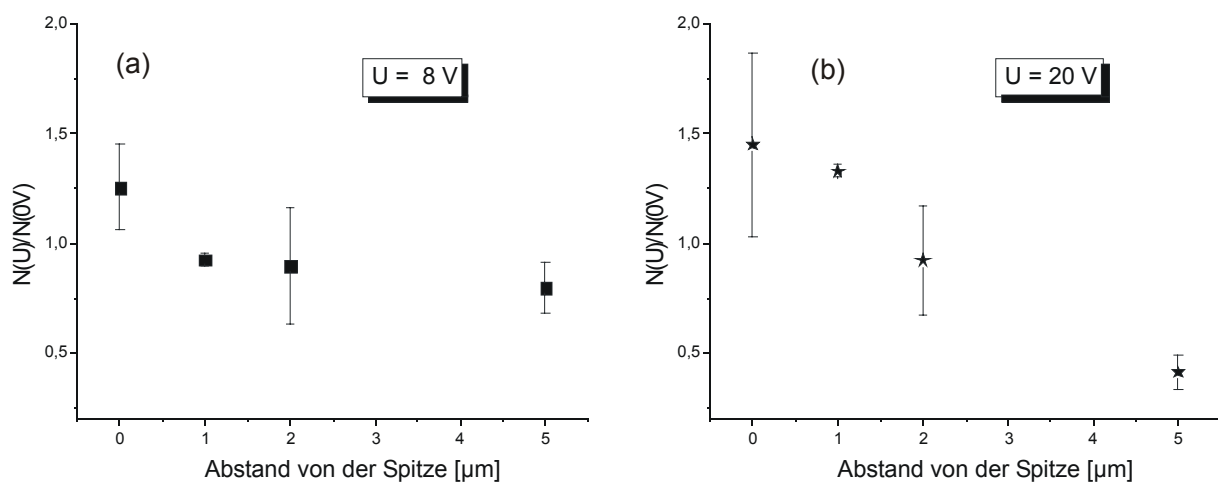


Abbildung 4.2.5-13 Auf $N(U=0)$ normierte Teilchenzahlen N

(a) für $U = 8 \text{ V}$ Elektroden Spannung

(b) für $U = 20 \text{ V}$ Elektroden Spannung

An der Spitze wird durch das Anlegen der Spannung die mittlere Teilchenzahl im Detektionsvolumen erhöht. Im Abstand von 1 und 2 μm ist die Erhöhung weniger stark ausgeprägt. Im Abstand von 5 μm zur Spitze wird die Teilchenzahl durch die Spannung sogar reduziert. Dies überrascht etwas, da 5 μm immer noch recht weit vorne liegen, wenn man die gesamte Länge des konischen Abschnitts des Femtotips von etwa 500 μm zugrunde legt. Man sollte bei diesen Daten jedoch beachten, daß die Amplitude der Korrelationsfunktion starken systematischen Fehlern unterworfen ist: Sinkt das Signal-zu-Rausch-Verhältnis, so ergibt das eine scheinbare Erhöhung der Teilchenzahl. Dieser Effekt reduziert die gemessenen Verhältnisse daher systematisch, da eine niedrigere Teilchenzahl einen geringeren Fluoreszenzanteil am gemessenen Signal und daher einen höheren Untergrundanteil bewirkt. Außerdem hat bereits eine leichte Dejustierung der Anlage drastische Effekte auf die Amplitude.

Cy5-dCTP

Die offensichtliche Abweichung vom erwarteten Ergebnis gab Anlaß zur Auswertung einer weiteren Versuchsserie. Bei diesen Versuchen wurde das besser wasserlösliche Cy5-dCTP⁵⁻ eingesetzt. Da Cy5 die in Abschnitt 2.6 beschriebene Photoisomerisierung zeigt, ist man hier auf den hohen Leistungsbereich beschränkt, wenn man eine Überlagerung des isomerisierungsbedingten Abfalls der Korrelationsfunktion mit dem diffusiven Abfall vermeiden will. Das hat den Nachteil, daß im Femtotip die Photozerstörung der Moleküle zu berücksichtigen ist.

Eine etwa 10^{-9} M Lösung von Cy5-dCTP in Sequenzierpuffer (67,9% Tris-Borat-Puffer pH8, 29,1% Glycerin, 2,9% Polyvinylpyrrolidon (M = 60000 K = 60) 0,5% Tween^(R)20) wurde in einen Femtotip gefüllt, und in Abständen von 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10 und 20 μm von der Austrittsöffnung bei 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 24 V Spannung je 5x30s die Korrelationsfunktion gemessen. Von den Funktionen wurde diejenige mit der höchsten und diejenige mit der niedrigsten Amplitude verworfen und die übrigen drei gemittelt. Zum Vergleich wurde die Korrelationsfunktion der gleichen Lösung im Tropfen gemessen. Bei jeder Messung wurden die Koordinaten des Femtotips an der elektronischen Steuerung des Newport-Blockes abgelesen und protokolliert. Die y-Koordinate (in etwa die Achse des Femtotips) wurde eingestellt, danach die x- und z-Koordinate nachjustiert. Die Anregungsleistung an der Eintrittspupille des Objektivs (100x 1,4 NA Ölimmersion) betrug 500 μW . Sie wurde durch Verdrehen eines Polfilters gegen die Hauptpolarisationsrichtung des Lasers eingestellt. Der Femtotip tauchte in einen Tropfen Glycerin, der mit der Außenelektrode (Pt-Draht) kontaktiert war.

Cy5-dCTP im offenen Volumen

Abbildung 4.2.5-14 zeigt die gemessene Korrelationskurve eines Tropfens der Farbstofflösung sowie die mit einem 3d-Gaussmodell des Detektionsvolumens angepaßte Modellkurve. Der χ^2 – Wert von $4 \cdot 10^{-7}$ sowie die Tatsache, daß die Abweichung rein statistisch streut, zeigt, daß die Meßpunkte mit dem Modell sehr gut beschrieben werden können. Da der verwendete Farbstoff Cy5 der in Abschnitt 2.6.3 beschriebenen Isomerisierung unterliegt, muß die diffusive Modellkurve noch mit der von Widengren und Schwille publizierten Funktion $G_{\text{fast}}(t) = 1 + A_1 \exp(-I_1 t) + A_2 \exp(-I_2 t)$ multipliziert werden [Widengren 2001]. Die Photozerstörung ist im Tropfen praktisch bedeutungslos: der Parameter k_{PD} kann ebenso gut Null gesetzt werden, ohne daß sich χ^2 erhöht.

$$G(t) = \left\{ 1 + A_1 e^{-I_1 t} + A_2 e^{-I_2 t} \right\} \cdot \frac{1}{N} \cdot \frac{1}{\sqrt{\left(1 + \frac{t}{\tau_x}\right) \left(1 + \frac{t}{\kappa_y^2 \tau_x}\right) \left(1 + \frac{t}{\kappa_z^2 \tau_x}\right)}} \cdot e^{-k_{\text{PD}} t}$$

Der erste Term beschreibt die Triplettkinetik und die Isomerisierungsreaktion (Gleichung 2.6.3-3 mit $A_1=B_2/B_1$ und $A_2=B_3/B_1$ $I_1=\lambda_2$ $I_2=\lambda_3$), der zweite die Amplitude, der dritte den diffusiven Abfall und der vierte die Photozerstörung.

Die angepaßten Parameter A_1 , A_2 , I_1 und I_2 sind recht komplizierte Funktionen der photochemisch relevanten Isomerisierungskonstanten, der Triplettkinetik sowie der Anteile an Molekülen in den verschiedenen Zuständen (s. Abschnitt 2.6.3 und [Widengren 2000]). Sie sind für die Diskussion hier ohne Belang. Der Farbstoff Cy5 wurde allein deshalb für diese Messungen verwendet, weil er am besten wasserlöslich ist und daher die geringste Adsorptionstendenz der hier verfügbaren Farbstoffe aufweist.

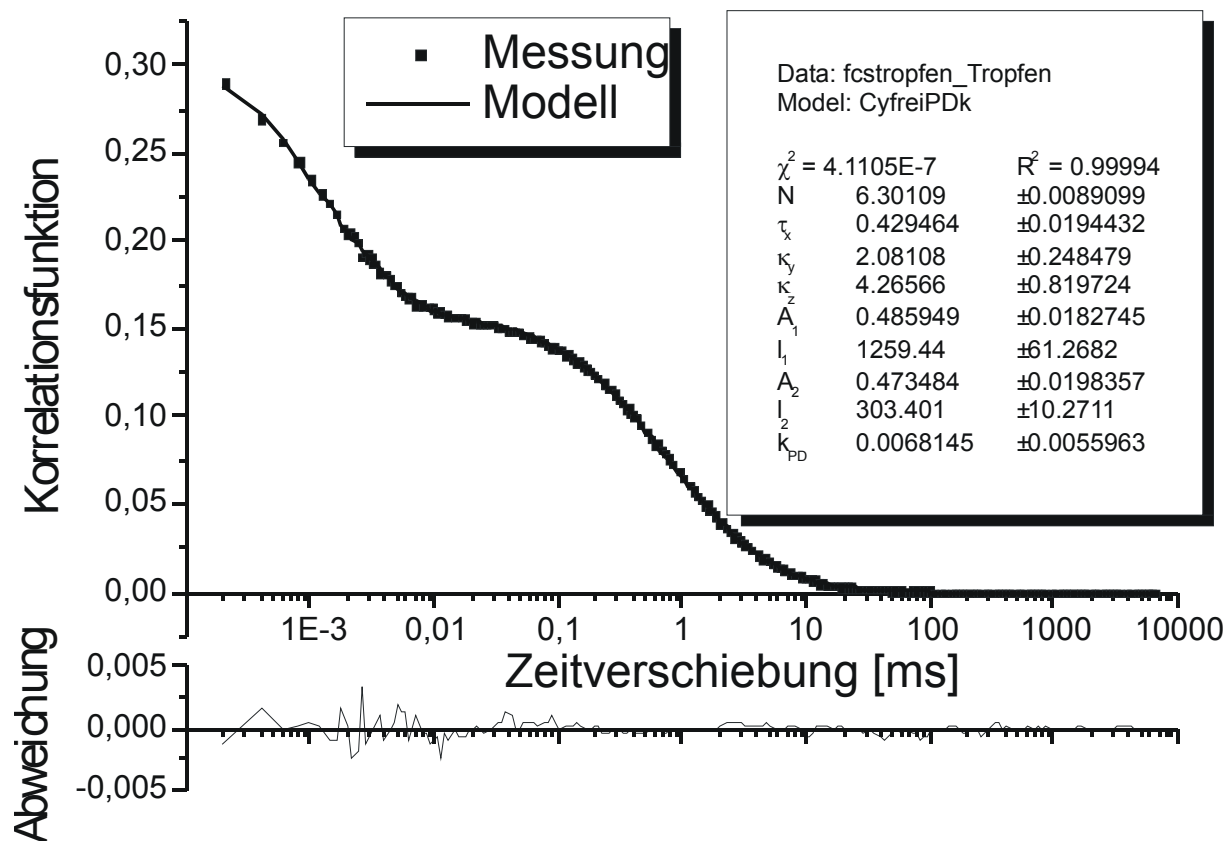


Abbildung 4.2.5-14 gemessene und modellierte Korrelationsfunktion im offenen Volumen

Die Farbstoffkonzentration betrug etwa 10^{-9} mol/l Cy5-dCTP in Sequenzierpuffer, die Anregungsleistung an der Eintrittspupille des Objektivs beträgt $500 \mu W$, das entspricht bei einem Brennfleck von etwa $0,17 \mu m^2$ Größe einer Intensität von $3,1 \cdot 10^9 W m^{-2} = 310 kW/cm^2$ die Durchschnittsrate des Detektors betrug 130 kHz.

Als diffusive Parameter erhält man $\tau_x = (0,429 \pm 0,019)$ ms, $\kappa_y = 2,08 \pm 0,25$, $\kappa_z = 4,27 \pm 0,82$.

Im Abschnitt 2.3.3 war $\omega_x = 340$ nm, $\omega_y = 540$ nm und $\omega_z = 300$ nm geschätzt worden. Während das abgeschätzte $\kappa_y = 1,6$ noch einigermaßen nahe am experimentell ermittelten Wert liegt, ergibt sich für ein abgeschätztes κ_z von 0,9 ein Wert, der deutlich vom Experiment abweicht.

Unter der Annahme daß $\omega_x = 340$ nm ist, erhält man aus $\tau_x = 0,43$ ms als Diffusionskonstante D von Cy5-dCTP⁵⁻ in Sequenzierpuffer: $D = \omega_x^2 / (4\tau_x) = 6,72 \times 10^{-11} m^2 s^{-1}$. Mit der

abgeschätzten Viskosität des Puffers von $3,19 \times 10^{-3} \text{ N m}^2\text{s}^{-1}$ errechnet sich daraus ein Diffusionskoeffizient in Wasser von $2,14 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$. In der Literatur [Widengren 2001] wird für den ungekoppelten Farbstoff Cy5 ($\text{C}_{33}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_8\text{S}_2^{2-}$, $M = 754,79 \text{ g/mol}$) in Wasser $2,5 \times 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ angegeben. Cy5-dCTP ($\text{C}_{45}\text{H}_{52}\text{N}_6\text{O}_{20}\text{P}_3\text{S}_2^{5-}$, $M = 1153,97 \text{ g/mol}$) ist nicht nur größer, sondern auch höher geladen. Der gefundene, etwas kleinere Diffusionskoeffizient scheint daher realistisch.

Cy5-dCTP im Femtotip

Die 10^{-9} M Lösung von Cy5-dCTP in Femtopuffer aus dem vergangenen Abschnitt wurde in einen Femtotip gefüllt und die Korrelationsfunktion bei verschiedenen Abständen zur Spitze und unterschiedlichen Elektrodenspannungen gemessen. Die Korrelationsfunktionen werden auf den Mittelwert zwischen $25,6 \mu\text{s}$ und $41,6 \mu\text{s}$ normiert, der Parameter N wird damit für alle Kurven gleich. Die an einer Position bei verschiedenen Spannungen gemessenen Kurven werden zu einer Meßreihe zusammengefaßt und gemeinsam ausgewertet. Die Parameter τ_x , κ_y , κ_z , κ_l und k_{PD} sind allen Kurven einer Reihe gemeinsam, während v/ω_y frei variiert wird.

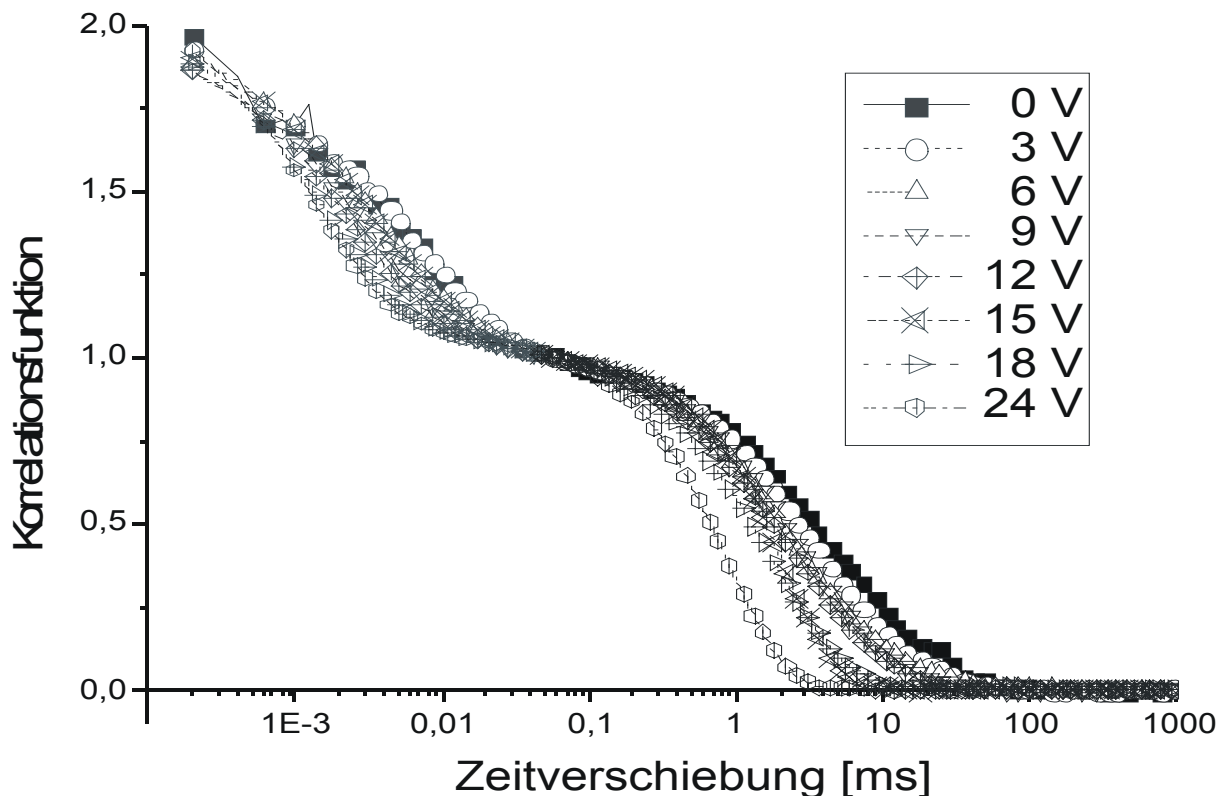


Abbildung 4.2.5-15 gemessene normierte Korrelationsfunktionen von Cy5-dCTP im Femtotip. Der Abstand zur Austrittsöffnung beträgt $2 \mu\text{m}$. Wie am Verlauf der Korrelationsfunktionen unterhalb $0,1 \text{ ms}$ deutlich wird, hat die Elektrodenspannung offensichtlich einen Einfluß auf die Isomerisierungs- und / oder die Übergangsrate zum Triplettzustand.

Als Fitfunktion dient

$$G(t) = \left\{ 1 + A_1 e^{-t/\tau_1} + A_2 e^{-t/\tau_2} \right\} \cdot \frac{1}{N} \cdot \left\{ G_y \left(t, \tau_x, \kappa_y, \frac{1}{\tau_v} \right) \cdot G_{\rho\beta} \left(t, \tau_x, \kappa_z, \kappa_l \right) \right\} \cdot e^{-k_{PD} t}.$$

Die Funktion unterscheidet sich von der im Tropfen verwendeten nur im diffusiven Teil.

$G_y(t, \tau_x, \kappa_y, 1/\tau_v)$ ist durch Gleichung 4.2.3-15 und $G_{\rho\beta}(t, \tau_x, \kappa_z, \kappa_l)$ durch die Näherung aus Kasten 4.2.4-1 gegeben (Gleichungen 4.2.4-2, 4.2.4-3, 4.2.4-8 - 4.2.4-13, 4.2.4-19, 4.2.4-21).

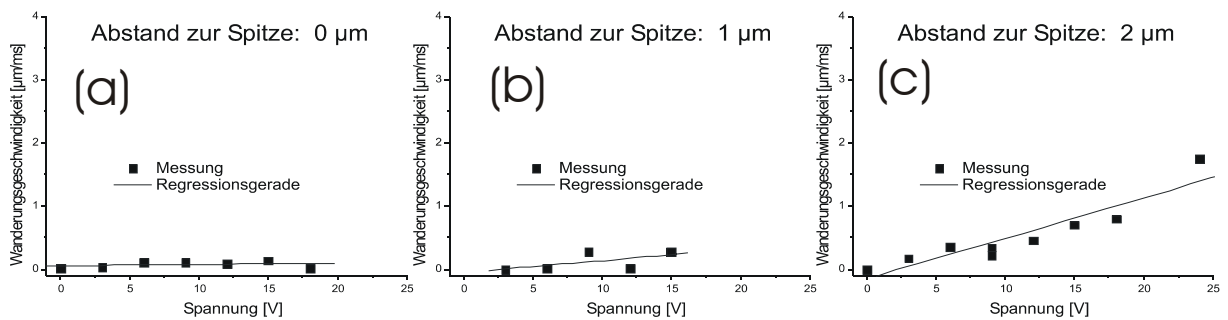
Die Datenpunkte mit einer Korrelationszeit von weniger als 50 μs werden maskiert, da sie durch die Isomerisierungsreaktion und die Triplettbildung bestimmt werden, die hier nicht untersucht werden. Die zugehörigen Parameter A_1, l_1, A_2, l_2 , die, wie eine Betrachtung der Abbildung 4.2.5-15 zeigt, überraschenderweise spannungsabhängig sind, müssen deshalb nicht variiert werden, was die Zahl der zu optimierenden Größen von 46 auf 14 je Meßreihe reduziert. Tabelle 4.2.5-12 gibt die Fitergebnisse wieder.

Abstand zur Spitze [μm]:	0	1	2	3	4
χ^2	0,00063	0,00081	0,00025	0,00044	0,00086
R^2	0,99523	0,99461	0,99834	0,99675	0,99344
k_{PD}	0 (fix)	$0,095 \pm 0,005$	$0,050 \pm 0,002$	$0,027 \pm 0,002$	$0,101 \pm 0,007$
τ_x [ms]	$1,95 \pm 0,30$	$1,05 \pm 8,11$	$1,49 \pm 0,18$	$0,33 \pm 2,17$	$0,43 \pm 0,23$
κ_y	$2,11 \pm 0,14$	$1,71 \pm 6,90$	$1,08 \pm 0,07$	$1,73 \pm 5,61$	$1,36 \pm 0,35$
κ_z	4,3 (fix)	4,3 (fix)	4,3 (fix)	$5,6 \pm 10^3$	4,3 (fix)
κ_l	$4,43\text{E-}1 \pm 1,29\text{E-}2$	$1,99\text{E-}1 \pm 3,08\text{E-}1$	$3,23\text{E-}1 \pm 2,08\text{E-}2$	$3,22\text{E-}1 \pm 2,97\text{E+}1$	$3,04\text{E-}1 \pm 2,23\text{E-}2$
00V v/ω_y [kHz]	$2,91\text{E-}2 \pm 9,57\text{E-}4$	--	$2,1\text{E-}9 \pm 1,0\text{E+}11$	$3,6\text{E-}10 \pm 5,0\text{E+}4$	$1,94\text{E-}6 \pm 2,74\text{E+}3$
03V v/ω_y [kHz]	$5,36\text{E-}2 \pm 1,46\text{E-}3$	$1,7\text{E-}9 \pm 3,76\text{E+}10$	$1,11\text{E-}1 \pm 7,79\text{E-}3$	$1,67\text{E-}1 \pm 1,01\text{E-}2$	$1,47\text{E-}7 \pm 3,10\text{E+}4$
06V v/ω_y [kHz]	$1,57\text{E-}1 \pm 3,45\text{E-}3$	$1,29\text{E-}2 \pm 8,22\text{E-}2$	$2,27\text{E-}1 \pm 7,37\text{E-}3$	$2,11\text{E-}1 \pm 9,235\text{E-}3$	$8,43\text{E-}9 \pm 1,80\text{E+}8$
09V ^a v/ω_y [kHz]	$1,62\text{E-}1 \pm 3,52\text{E-}3$	$2,35\text{E-}1 \pm 9,49\text{E-}3$	$1,47\text{E-}1 \pm 7,05\text{E-}3$	$3,47\text{E-}1 \pm 9,11\text{E-}3$	$1,63\text{E-}1 \pm 3,59\text{E-}2$
09V ^b v/ω_y [kHz]	--	--	$2,20\text{E-}1 \pm 7,29\text{E-}3$	--	$3,47\text{E-}1 \pm 2,29\text{E-}2$
12V v/ω_y [kHz]	$1,37\text{E-}1 \pm 3,12\text{E-}3$	$1,15\text{E-}2 \pm 9,13\text{E-}2$	$2,95\text{E-}1 \pm 8,31\text{E-}3$	$4,81\text{E-}1 \pm 1,04\text{E-}2$	$2,33\text{E-}1 \pm 2,76\text{E-}2$
15V v/ω_y [kHz]	$2,02\text{E-}1 \pm 4,10\text{E-}3$	$2,36\text{E-}1 \pm 9,50\text{E-}3$	$4,55\text{E-}1 \pm 1,07\text{E-}2$	$5,29\text{E-}1 \pm 1,10\text{E-}2$	$4,45\text{E-}1 \pm 2,22\text{E-}2$
18V v/ω_y [kHz]	$2,80\text{E-}2 \pm 9,40\text{E-}4$	--	$5,14\text{E-}1 \pm 1,16\text{E-}2$	$8,44\text{E-}1 \pm 1,54\text{E-}2$	$1,15\text{E+}0 \pm 3,26\text{E-}2$
24V v/ω_y [kHz]	--	--	$1,12\text{E+}0 \pm 1,73\text{E-}2$	$9,57\text{E-}1 \pm 1,70\text{E-}2$	$1,32\text{E+}0 \pm 3,54\text{E-}2$
ω_x [μm]	$6,84\text{E-}1 \pm 1,25\text{E-}1$	$5,00\text{E-}1 \pm 1,98\text{E+}0$	$5,98\text{E-}1 \pm 1,06\text{E-}1$	$2,82\text{E-}1 \pm 9,22\text{E-}1$	$3,21\text{E-}1 \pm 1,02\text{E-}1$
ω_y [μm]	$1,45\text{E+}0 \pm 2,835\text{E-}$	$8,37\text{E-}1 \pm 4,79\text{E+}0$	$6,44\text{E-}1 \pm 1,21\text{E-}1$	$4,86\text{E-}1 \pm 2,24\text{E+}0$	$4,37\text{E-}1 \pm 1,78\text{E-}1$
L [μm]	$7,62\text{E-}1 \pm 1,41\text{E-}1$	$2,45\text{E-}1 \pm 1,06\text{E+}0$	$4,84\text{E-}1 \pm 9,14\text{E-}2$	$2,16\text{E-}1 \pm 2,76\text{E+}1$	$2,45\text{E-}1 \pm 8,04\text{E-}2$
L_{Theorie} [μm]	0,250	0,290	0,330	0,370	0,411
$\omega_x/\omega_{x,\text{frei}}$	$2,12\text{E+}0 \pm 1,64\text{E-}1$	$1,51\text{E+}0 \pm 6,16\text{E+}0$	$1,85\text{E+}0 \pm 1,15\text{E-}1$	$8,74\text{E-}1 \pm 2,85\text{E+}0$	$9,96\text{E-}1 \pm 2,72\text{E-}1$
$\omega_y/\omega_{y,\text{frei}}$	$3,34\text{E+}0 \pm 3,20\text{E+}0$	$1,93\text{E+}0 \pm 1,12\text{E+}1$	$1,48\text{E+}0 \pm 1,42\text{E+}0$	$1,12\text{E+}0 \pm 5,28\text{E+}0$	$1,00\text{E+}0 \pm 1,03\text{E+}0$
v_{00V} [$\mu\text{m}/\text{ms}$]	$2,00\text{E-}2 \pm 3,97\text{E-}3$	--	$3,2\text{E-}9 \pm 1,56\text{E+}11$	$7,5\text{E-}10 \pm 1,03\text{E+}5$	$4,44\text{E-}6 \pm 6,28\text{E+}3$
v_{03V} [$\mu\text{m}/\text{ms}$]	$3,70\text{E-}2 \pm 7,30\text{E-}3$	$2,09\text{E-}9 \pm 4,49\text{E}10$	$1,73\text{E-}1 \pm 3,48\text{E-}2$	$3,43\text{E-}1 \pm 1,58\text{E+}0$	$3,37\text{E-}7 \pm 7,10\text{E+}4$
v_{06V} [$\mu\text{m}/\text{ms}$]	$1,08\text{E-}1 \pm 2,14\text{E-}2$	$1,54\text{E-}2 \pm 1,32\text{E-}1$	$3,52\text{E-}1 \pm 6,73\text{E-}2$	$4,34\text{E-}1 \pm 2,00\text{E+}0$	$1,92\text{E-}8 \pm 4,12\text{E+}8$
$v_{09V(a)}$ [$\mu\text{m}/\text{ms}$]	$1,11\text{E-}1 \pm 2,20\text{E-}2$	$2,81\text{E-}1 \pm 1,61\text{E+}0$	$2,28\text{E-}1 \pm 4,44\text{E-}2$	$7,13\text{E-}1 \pm 3,28\text{E+}0$	$3,74\text{E-}1 \pm 1,73\text{E-}1$
$v_{09V(b)}$ [$\mu\text{m}/\text{ms}$]	--	--	$3,42\text{E-}1 \pm 6,53\text{E-}2$	--	$7,95\text{E-}1 \pm 3,29\text{E-}1$
v_{12V} [$\mu\text{m}/\text{ms}$]	$9,45\text{E-}2 \pm 1,86\text{E-}2$	$1,38\text{E-}2 \pm 1,34\text{E-}1$	$4,58\text{E-}1 \pm 8,71\text{E-}2$	$9,88\text{E-}1 \pm 4,55\text{E+}0$	$5,34\text{E-}1 \pm 2,27\text{E-}1$
v_{15V} [$\mu\text{m}/\text{ms}$]	$1,39\text{E-}1 \pm 2,74\text{E-}2$	$2,82\text{E-}1 \pm 1,61\text{E+}0$	$7,06\text{E-}1 \pm 1,34\text{E-}1$	$1,08\text{E+}0 \pm 5,01\text{E+}0$	$1,01\text{E+}0 \pm 4,19\text{E-}1$
v_{18V} [$\mu\text{m}/\text{ms}$]	$1,935\text{E-}2 \pm 3,84\text{E-}3$	--	$7,99\text{E-}1 \pm 1,51\text{E-}1$	$1,73\text{E+}0 \pm 7,99\text{E+}0$	$2,63\text{E+}0 \pm 1,07\text{E+}0$
v_{24V} [$\mu\text{m}/\text{ms}$]	--	--	$1,74\text{E+}0 \pm 3,29\text{E-}1$	$1,96\text{E+}0 \pm 9,06\text{E+}0$	$3,02\text{E+}0 \pm 1,23\text{E+}0$

Abstand zur Spitze [μm]:	5	6	8	10	20
χ^2	0,00042	0,00046	0,00049	0,00026	0,00038
R^2	0,99699	0,99677	0,99638	0,99814	0,99724
k_{PD}	$0,098 \pm 0,005$	$0,188 \pm 0,011$	0,1 (fix)	$0,1 \pm 0,004$	0,1 (fix)
τ_x [ms]	$0,430 \pm 10,91$	$0,837 \pm 0,352$	$0,731 \pm 2,411$	$0,715 \pm 5,430$	$1,138 \pm 0,295$
k_y	$1,214 \pm 15,35$	$1,664 \pm 0,460$	$0,925 \pm 1,466$	$0,955 \pm 3,591$	$0,760 \pm 0,162$
k_z	$2,00 \pm 294$	$6,69 \pm 96,5$	$3,45 \pm 144$	$2,02 \pm 64,1$	4,3 (fix)
k_l	$4,19E-1 \pm 2,80E+1$	$5,63E-1 \pm 4,29E+0$	$5,32E-1 \pm 1,13E+1$	$5,63E-1 \pm 7,52E+0$	$5,23E-1 \pm 5,04E-2$
00V v/ω_y [kHz]	$6,64E-3 \pm 7,57E-1$	$9,72E-8 \pm 2,39E+4$	$1,48E-2 \pm 3,47E-1$	$4,26E-2 \pm 9,57E-2$	$3E-9 \pm 3,0E+18$
03V v/ω_y [kHz]	1,72E-7 (fix)	$2,57E-9 \pm 8,11E+7$	4,34E-10 (fix)	$1,02E-8 \pm 4,89E+8$	$1,16E-1 \pm 4,45E-2$
06V v/ω_y [kHz]	$1,84E-1 \pm 2,97E-2$	$8,30E-3 \pm 3,31E-1$	$1,53E-1 \pm 3,42E-2$	$1,98E-1 \pm 2,31E-2$	$1,57E-1 \pm 3,46E-2$
09V v/ω_y [kHz]	$4,83E-1 \pm 1,75E-2$	$2,67E-1 \pm 2,73E-2$	$3,54E-1 \pm 2,89E-2$	$3,72E-1 \pm 1,89E-2$	$2,02E-1 \pm 2,95E-2$
12V v/ω_y [kHz]	$3,90E-2 \pm 1,28E-1$	$1,56E-1 \pm 2,48E-2$	$3,90E-1 \pm 3,07E-2$	$5,01E-1 \pm 2,10E-2$	$3,64E-1 \pm 3,02E-2$
15V v/ω_y [kHz]	$6,03E-1 \pm 1,70E-2$	$5,38E-2 \pm 5,23E-2$	$5,18E-1 \pm 3,81E-2$	$5,39E-1 \pm 2,19E-2$	$3,83E-1 \pm 3,09E-2$
18V v/ω_y [kHz]	$8,97E-1 \pm 1,86E-2$	$2,14E-1 \pm 2,53E-2$	$5,21E-1 \pm 3,83E-2$	$6,86E-1 \pm 2,580E-2$	$5,79E-1 \pm 4,05E-2$
24V v/ω_y [kHz]	$1,33E+0 \pm 2,48E-2$	$5,86E-1 \pm 4,01E-2$	$1,07E+0 \pm 6,65E-2$	$9,84E-1 \pm 3,38E-2$	$8,45E-1 \pm 5,24E-2$
ω_x [μm]	$3,21E-1 \pm 4,07E+0$	$4,48E-1 \pm 1,20E-1$	$4,18E-1 \pm 6,94E-1$	$4,14E-1 \pm 1,57E+0$	$5,22E-1 \pm 1,10E-1$
ω_y [μm]	$3,90E-1 \pm 6,98E+0$	$7,46E-1 \pm 2,87E-1$	$3,87E-1 \pm 8,88E-1$	$3,95E-1 \pm 2,11E+0$	$3,97E-1 \pm 1,19E-1$
L [μm]	$1,91E-1 \pm 1,91E+1$	$6,54E-1 \pm 6,86E+0$	$4,14E-1 \pm 1,24E+1$	$3,32E-1 \pm 7,00E+0$	$6,86E-1 \pm 1,59E-1$
L_{Theorie} [μm]	0,451	0,491	0,571	0,652	1,053
$\omega_x/\omega_{x,\text{frei}}$	$9,96E-1 \pm 1,26E+1$	$1,39E+0 \pm 2,93E-1$	$1,29E+0 \pm 2,14E+0$	$1,28E+0 \pm 4,87E+0$	$1,62E+0 \pm 2,11E-1$
$\omega_y/\omega_{y,\text{frei}}$	$9,01E-1 \pm 1,61E+1$	$1,72E+0 \pm 1,74E+0$	$8,93E-1 \pm 2,21E+0$	$9,12E-1 \pm 4,95E+0$	$9,16E-1 \pm 9,02E-1$
v_{00V} [$\mu\text{m}/\text{ms}$]	$1,70E-2 \pm 1,96E+0$	$1,30E-7 \pm 3,21E+4$	$3,83E-2 \pm 9,02E-1$	$1,07E-1 \pm 6,24E-1$	$7E-9 \pm 7,6E+18$
v_{03V} [$\mu\text{m}/\text{ms}$]	$4,40E-7 \pm 7,88E-6$	$3,45E-9 \pm 1,08E+8$	$1,12E-9 \pm 2,57E-9$	$2,58E-8 \pm 1,23E+9$	$2,94E-1 \pm 1,42E-1$
v_{06V} [$\mu\text{m}/\text{ms}$]	$4,71E-1 \pm 8,43E+0$	$1,11E-2 \pm 4,43E-1$	$3,97E-1 \pm 9,14E-1$	$5,02E-1 \pm 2,68E+0$	$3,97E-1 \pm 1,47E-1$
v_{09V} [$\mu\text{m}/\text{ms}$]	$1,23E+0 \pm 2,21E+1$	$3,58E-1 \pm 1,42E-1$	$9,14E-1 \pm 2,09E+0$	$9,40E-1 \pm 5,02E+0$	$5,10E-1 \pm 1,70E-1$
v_{12V} [$\mu\text{m}/\text{ms}$]	$9,99E-2 \pm 1,81E+0$	$2,10E-1 \pm 8,76E-2$	$1,00E+0 \pm 2,31E+0$	$1,26E+0 \pm 6,77E+0$	$9,17E-1 \pm 2,86E-1$
v_{15V} [$\mu\text{m}/\text{ms}$]	$1,54E+0 \pm 2,76E+1$	$7,22E-2 \pm 7,55E-2$	$1,33E+0 \pm 3,06E+0$	$1,36E+0 \pm 7,28E+0$	$9,64E-1 \pm 3,00E-1$
v_{18V} [$\mu\text{m}/\text{ms}$]	$2,29E+0 \pm 4,11E+1$	$2,88E-1 \pm 1,16E-1$	$1,34E+0 \pm 3,08E+0$	$1,73E+0 \pm 9,27E+0$	$1,45E+0 \pm 4,49E-1$
v_{24V} [$\mu\text{m}/\text{ms}$]	$3,42E+0 \pm 6,13E+1$	$7,85E-1 \pm 3,07E-1$	$2,76E+0 \pm 6,34E+0$	$2,48E+0 \pm 1,33E+1$	$2,12E+0 \pm 6,52E-1$

Tabelle 4.2.5-12 Fitparameter der Messungen von Cy5-dCTP im Femtotip (oberer Teil der Tabellen) und daraus abgeleitete Größen (unterer Teil der Tabellen).

Wie im Fall von MR121 werden die ermittelten Wanderungsgeschwindigkeiten der Farbstoffionen gegen die Elektroden Spannung aufgetragen und Regressionsgeraden durch die Meßpunkte gelegt:



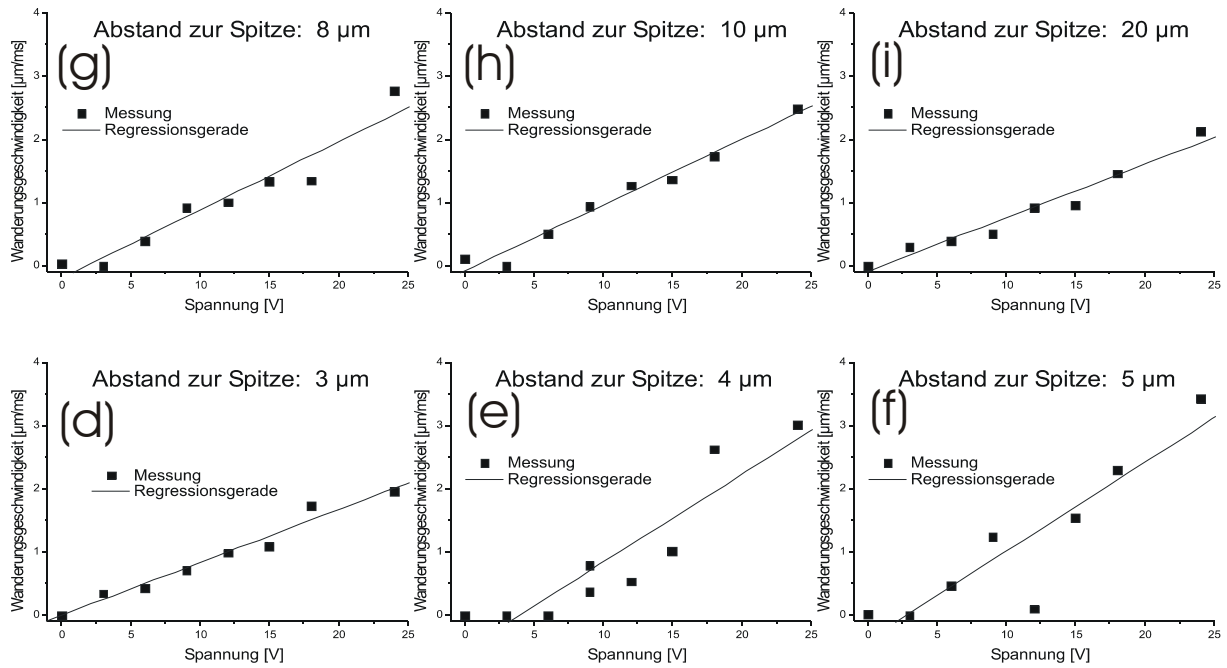


Abbildung 4.2.5-16 Wanderungsgeschwindigkeit von $Cy5-dCTP^{5-}$ gegen die Elektrodenspannung aufgetragen.

(a) an der Spitze (b) 1 μm vor der Spitze (c) 2 μm vor der Spitze
 (d) 3 μm vor der Spitze (e) 4 μm vor der Spitze (f) 5 μm vor der Spitze
 (g) 8 μm vor der Spitze (h) 10 μm vor der Spitze (i) 20 μm vor der Spitze

Die Parameter der Regressionsgeraden sind in Tabelle 4.2.5-13 zusammengefaßt, der theoretische Wert der Geradensteigung ergibt sich aus der berechneten Feldstärke (Gl. 4.2.5-18) und der aus $D \approx 6,72 \times 10^{-11} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ und $q = 5 \times 1,602 \times 10^{-19} \text{ C}$ abgeschätzten Ionenbeweglichkeit von ca. $1,3 \times 10^{-8} \text{ m}^2\text{s}^{-1}\text{V}^{-1}$:

$$v \approx \frac{2,03 \cdot 10^{-3} \text{ ms}^{-1}\text{V}^{-1}}{\left(\frac{y}{6,22 \mu\text{m}} + 1\right)^2} U \quad (4.2.5-20)$$

Abstand zur Spitze [μm]	Regressionskoeffizient	Ordinatenabschnitt [$\mu\text{m}/\text{ms}$]	Geradensteigung [$\mu\text{m}/\text{ms}/\text{V}$]	
			Experiment	Theorie
0	0,29584	$0,056 \pm 0,035$	$0,0023 \pm 0,0033$	2,0300
1	0,59730	$-0,050 \pm 0,145$	$0,0188 \pm 0,0146$	1,5066
2	0,92590	$-0,148 \pm 0,126$	$0,0639 \pm 0,0099$	1,1623
3	0,98488	$-0,002 \pm 0,079$	$0,0837 \pm 0,0060$	0,9239
4	0,91728	$-0,550 \pm 0,292$	$0,1388 \pm 0,0228$	0,7519
5	0,90384	$-0,390 \pm 0,358$	$0,1405 \pm 0,0271$	0,6239
6	0,80776	$-0,079 \pm 0,107$	$0,0271 \pm 0,0081$	0,5259
8	0,96312	$-0,198 \pm 0,163$	$0,1079 \pm 0,0123$	0,3884
10	0,98684	$-0,080 \pm 0,092$	$0,1039 \pm 0,0070$	0,2985
20	0,98012	$-0,089 \pm 0,093$	$0,0849 \pm 0,0070$	0,1142

Tabelle 4.2.5-13 Parameter der Regressionsgeraden aus Abbildung 4.2.5-12

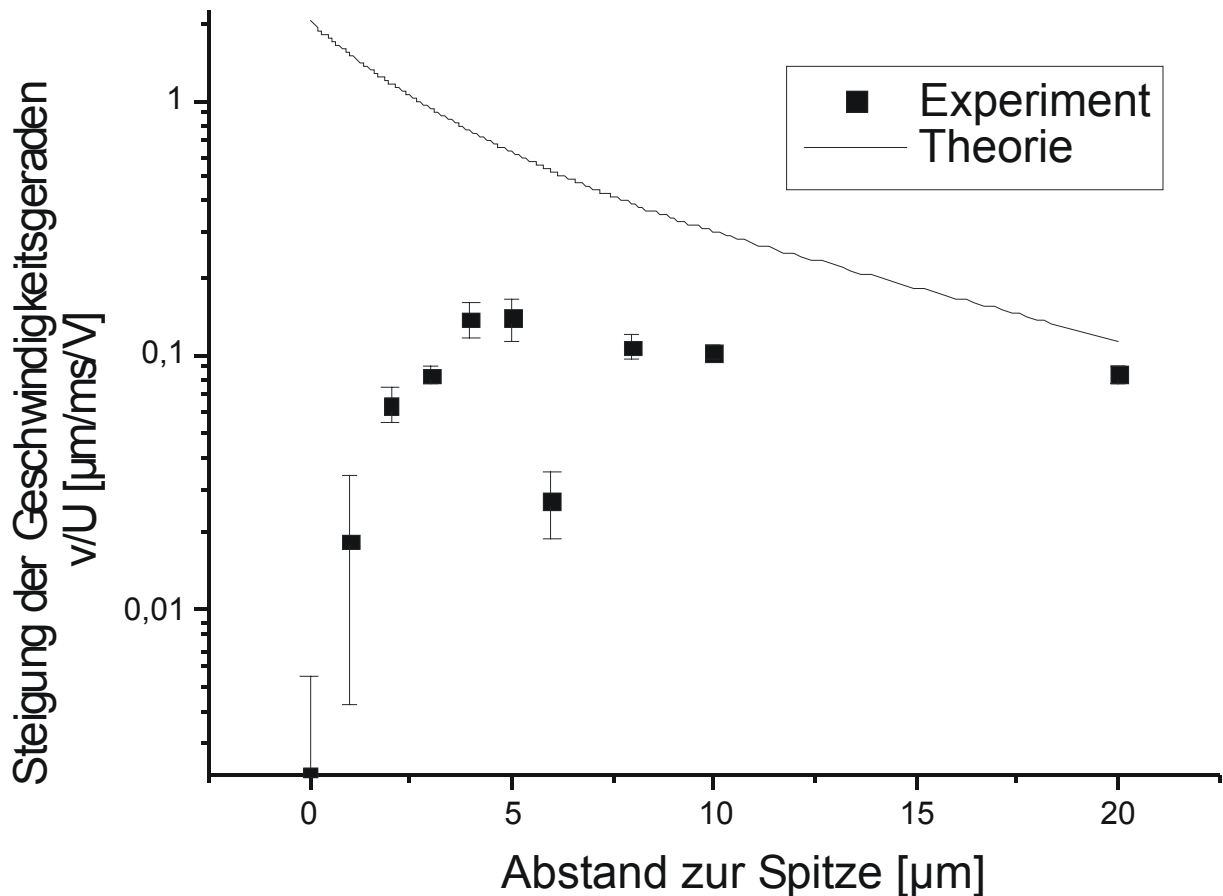


Abbildung 4.2.5-17 Geradensteigungen der Regressionsgeraden aus Abbildung 4.2.5-16 Cy5-dCTP im Femtotip. Die Ordinate ist zur besseren Übersicht logarithmisch aufgetragen.

Der Geschwindigkeitsverlauf in Abbildung 4.2.5-17 zeigt analog zu Mr121-dUTP (Abbildung 4.2.5-13) deutliche Abweichungen von der Theorie, nach der die Geschwindigkeit an der Spitze am höchsten sein sollte. Man findet statt dessen, wie im vorgenannten Fall ein Geschwindigkeitsmaximum etwa 5 µm vor der Austrittsöffnung.

4.2.6 Diskussion

Die in Abschnitt 4.2.2 entwickelte Funktion bzw. ihre in Abschnitt 4.2.4 gewonnene analytische Näherung beschreibt die gemessenen Korrelationsfunktionen befriedigend. Die Parameter weisen jedoch in dem Bereich, der im Versuch vorkommt, große Kovarianzen auf, so daß nicht alle Parameter gleichzeitig variiert werden können.

Das Detektionsvolumen wird im hinteren Bereich der Kapillare, durch deren Einfluß in x-z-Richtung aufgeweitet, während, außer an der Spitze die Diffusionszeit in y-Richtung (das ist die Richtung der Kapillarachse) nicht stark beeinflusst wird. Die ermittelten Kapillarradien entsprechen in etwa den Erwartungen.

Es wurden an der Spitze Kapillarparameter κ_1 im Bereich 0,3-0,7 bei den Experimenten mit Mr121-dUTP und 0,2-0,4 bei den Experimenten mit Cy5-dCTP gefunden. Bei Elliptizitäten

von $\kappa_z \approx 5,7$ (MR121) bzw. 4,3 (Cy5) ergibt sich daher an der Spitze die in Abbildung 4.2.6-1 gezeigte Relation zwischen dem $1/e^2$ -Detektionsellipsoid und dem Kapillarquerschnitt:

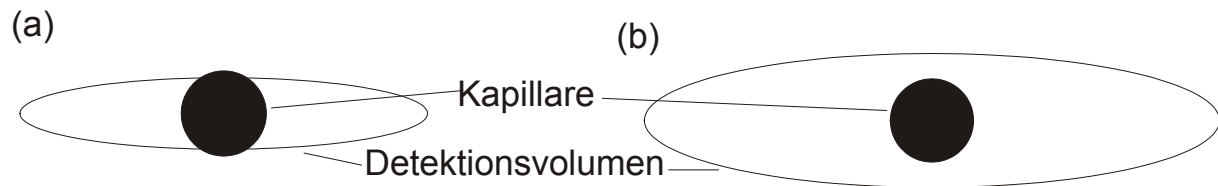


Abbildung 4.2.6-1 Größenverhältnis von Kapillardurchmesser und Detektionsvolumen

Der schwarz gefüllte Kreis stellt den Kapillarquerschnitt dar, die Ellipse das $1/e^2$ Detektionseffizienzellipsoid; d.h. an der Linie ist die Detektionseffizienz auf etwa 13,5% des Maximalwertes im Zentrum gefallen. In der Abbildung zeigt die z-Achse nach rechts, die x-Achse nach oben und die y-Achse (Kapillarachse) nach vorne.

(a) Ergebnis des Experiments mit Mr121-dUTP

(b) Ergebnis des Experiments mit Cy5-dCTP

Da die Experimente an verschiedenen Versuchsanordnungen durchgeführt wurden, ist die Abweichung zwischen der Abbildung 4.2.6-1 a und b erklärbar. Die Messung mit Cy5-dCTP wurde an der selben Apparatur durchgeführt, wie die Versuche in den anderen Kapiteln dieser Arbeit; die Messung mit MR121 an der Doppeldetektionsapparatur ([Park 2003]).

Es sollte demnach möglich sein, am Ausgang eines Femtotips alle Fluorophore, die diesen verlassen, zu detektieren.

Die Wanderungsgeschwindigkeit der Teilchen nimmt mit zunehmender Spannung erwartungsgemäß zu.

In der Literatur [Becker 1999] wurde die Geschwindigkeit von Cy5-dCTP in Abhängigkeit von der Spannung an der Spitze eines Femtotips bereits untersucht. Der dort angegebenen Grafik ist eine Steigung der Geschwindigkeitsgeraden von $2,28 \times 10^{-5} \text{ ms}^{-1}\text{V}^{-1}$ zu entnehmen, während hier experimentell $2,3 \times 10^{-6} \text{ ms}^{-1}\text{V}^{-1}$ und theoretisch $2,0 \times 10^{-3} \text{ ms}^{-1}\text{V}^{-1}$ gefunden wurde. Für Mr121-dUTP ergab sich an der Spitze ein Wert von $6 \times 10^{-7} \text{ ms}^{-1}\text{V}^{-1}$. Die in der Literaturstelle verwendete Methode beruht auf der Ereignisbreitenverteilung eines Einzelmolekülexperimentes, unterscheidet sich also von dem hier verwendeten Korrelationsverfahren. Die in der Literatur gefundene Geschwindigkeit liegt näher am experimentellen als am theoretischen Wert. Das Geschwindigkeitsprofil entlang der Kapillarachse zeigt, vor allem an der Spitze deutliche Abweichungen von der in Abschnitt 4.1 errechneten Feldstärkeverteilung. Weiter hinten nähern sich die vorhergesagten und die gefundenen Werte jedoch deutlich an.

Erklärungsversuche

1. Einfluß der Kapillarwand

Die Flüssigkeitsschicht an der Kapillarwand ruht, oder strömt den Farbstoffmolekülen sogar entgegen, falls der elektroosmotische Fluß nicht vollständig unterdrückt ist. Das Stokessche Gesetz, welches den Reibungskoeffizient umströmter Kugeln angibt, geht jedoch davon aus,

daß die Strömung räumlich nicht begrenzt ist. Bewegt sich die Kugel nahe an einer Wand entlang, erfährt sie einen größeren Widerstand als eine Kugel die sich in großer Entfernung von der Wand bewegt, da die viskose Schubspannung der Geschwindigkeitsgradienten proportional ist und dieser im ersten Fall größer als im zweiten ist. Diesen Effekt kann man zum Beispiel in einem Kugelfallviskosimeter anschaulich beobachten: Kugeln die am Rand des Meßzylinders eingeworfen werden bleiben hinter jenen die in der Mitte absinken zurück. Angesichts von effektiven Molekülradien von etwa 10^{-9} m erscheint der Kapillarradius von $2,5 \times 10^{-7}$ m an der Spitze jedoch immer noch sehr groß, so daß dieser Effekt allein die beobachteten Abweichungen wahrscheinlich nicht erklären kann.

2. Adsorption der Moleküle an der Kapillarwand

An der Kapillarwand adsorbierte Fluorophore verändern ihre Position viel langsamer als solche in Lösung und sind in ihrer Bewegung auf die Oberfläche beschränkt. Um die Adsorption zu unterdrücken, sind dem Puffer 0,5 % des Detergenz „Tween 20“ zugesetzt. Falls die Adsorption nicht vollständig unterdrückt ist, wird sich jedoch ein dynamisches Gleichgewicht zwischen adsorbierten und freien Molekülen einstellen. Der Fluoreszenzbeitrag der adsorbierten Moleküle wird zu einer im Mittel verlängerten Diffusionszeit führen.

3. Erhöhung der Viskosität

Die Viskosität von Glycerin-Wasser-Gemischen steigt mit zunehmendem Glyceringehalt stark an [CRC Handbook of Chemistry and Physics 1977 Tab.23 S. D231]. Der Puffer enthält 30% Glycerin ($\eta = 2,4$ cP; wird durch den PVP-Gehalt auf 3,2 cP erhöht), der Kapillaraußenraum hingegen über 90% ($\eta > 150$ cP). Durch den elektroosmotischen Fluß und / oder die Kapillarkraft kann Glycerin aus dem Außenraum in die Spitze der Kapillare eindringen und dadurch die Viskosität lokal erhöhen. Für diese Erklärung spricht die beobachtete starke Zunahme der Diffusionszeit in y-Richtung bei weniger als 3 μ m Abstand von der Spitze. Ein zusätzliches Indiz für diese Erklärung ist der zu große Wert des Kapillarradius an der Spitze, wenn man in $L = 2\kappa_l \sqrt{D\tau_x \kappa_z}$ den Wert für die Diffusionskonstante D in Sequenzierpuffer einsetzt. Ist der Glycerinanteil in der Spitze des Femtotips erhöht, so ergibt sich mit der dadurch erhöhten Viskosität eine reziprok verringerte Diffusionskonstante.

Die postulierte Ortsabhängigkeit der Diffusionskonstante wirft allerdings ein Problem in der verwendeten Theorie auf:

Bei der Ableitung der Theorie wurde die Konstanz von D implizit vorausgesetzt. Nimmt man D als ortsabhängige Funktion an, so verändert sich die Diffusionsgleichung wie folgt:

$$\begin{aligned} \left(\frac{\partial c}{\partial t} \right)_{\vec{r}} &= \text{div}(\vec{j}) = \text{div}(D(\vec{r}) \cdot \nabla c - \vec{v}c) \\ &= \nabla D(\vec{r}) \cdot \nabla c + D(\vec{r}) \cdot \nabla^2 c - c \nabla \vec{v} - \vec{v} \nabla c \end{aligned}$$

Demnach wurde in Kapitel 4.2.1 nicht nur der Term $c \operatorname{div}(\mathbf{v})$ sondern auch der Term $\operatorname{grad}(D) \operatorname{grad}(c)$ vernachlässigt. Die beiden vernachlässigten Terme $\nabla D(\vec{r}) \cdot \nabla c (< 0)$ und $-c \nabla \vec{v} (> 0)$ haben unterschiedliche Vorzeichen: Wenn die y-Achse zum Ausgang der Kapillare weist, ist bei zur Spitze hin zunehmender Viskosität η des Puffers wegen $D \propto \frac{1}{\eta}$ $\nabla D < 0$. Die Farbstoffkonzentration c nimmt zur Spitze hin zu, daher ist $\nabla c > 0$. Die gefundene Teilchengeschwindigkeit \vec{v} sinkt und damit ist $\nabla \vec{v} < 0$. Die Fehler gleichen sich daher teilweise aus.

4. Ortsabhängigkeit der Leitfähigkeit

Die Berechnung der Feldstärke über die Stromdichte in Kapitel 4.1 erfolgte unter der Annahme die Leitfähigkeit der Lösung sei überall gleich. Es ist jedoch seit langem bekannt, daß die molare Leitfähigkeit von Elektrolytlösungen bei hohen Feldstärken zunimmt, weil sich dann die gegensinnig geladene Ionenatmosphäre um die Ladungsträger nicht mehr vollständig aufbaut („erster Wienscher Effekt“, [z.B. Atkins 1990]). Dieser Effekt wirkt also der Entstehung von Feldstärkespitzen entgegen. Zusätzlich nimmt der Dissoziationsgrad schwacher Elektrolyte, wie z.B. Borsäure oder Tris(hydroxymethyl)aminomethan ($(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$) bei hohen Feldstärken zu („zweiter Wienscher Effekt“), die zusätzlich erzeugten Ionen bewirken eine weitere Steigerung der Leitfähigkeit.

Wenn die Geschwindigkeit der Farbstoffionen bei konstantem Fluß und sich verjüngender Kapillare abnimmt, so muß zwangsläufig ihre Konzentration steigen. Eine höhere Ionenkonzentration bedeutet aber gleichzeitig eine höhere Leitfähigkeit des Elektrolyten und damit einen geringeren Widerstand, der nach dem Ohmschen Gesetz wiederum bei gegebener Stromdichte eine geringere Feldstärke bedeutet.

5. Elektrisches Gegenfeld

Im Kapillarienraum befindet sich eine 10mM Tris-Borat-Pufferlösung, der Glycerin, PVP, Detergenzien und Farbstoffionen zugesetzt sind.

Im Kapillaraußenraum befindet sich Glycerin, das mehr oder weniger mit Wasser verunreinigt ist.

Die Ionenkonzentration innerhalb der Kapillare übersteigt die außerhalb um ein vielfaches. In der Spitze der Kapillare liegt daher ein Konzentrationsgradient vor. Nach hinten nimmt die Ionenkonzentration zu. Unter dem Einfluß des angelegten elektrischen Feldes bewegen sich die Kationen in die Kapillare hinein und die Anionen aus ihr heraus. Die Konzentrationsgradienten von Anionen und Kationen verschieben sich gegeneinander, so daß sich ein dem angelegten Feld entgegengesetzt gerichtetes Feld aufbaut und die effektive Feldstärke vermindert. Anschaulich bedeutet das, daß die Anionen in die Spitze der Kapillare gedrückt werden und den Zustrom weiterer Anionen durch ihre Ladung behindern.

4.3 Fluoreszenzereigniserkennung

In diesem Kapitel werden Verfahren zur Wahl der Parameter der Fluoreszenzereigniserkennung erarbeitet. Die korrekte Ereigniserkennung ist die Voraussetzung dafür, daß Moleküle gezählt oder Sequenzen angegeben werden können.

Die Fluoreszenzereigniserkennung geschieht in vier Schritten:

1) Aus den zeitaufgelösten Daten wird eine MCS-Spur errechnet.

Da das Signal-zu-Rausch-Verhältnis für die einzelnen Kanäle sehr unterschiedlich ist, werden dabei nur die Kanäle aufsummiert, die ein hohes Signal-zu-Rausch-Verhältnis aufweisen. Kanäle die außerhalb dieses Zeitfensters („Gate“) auf der mikroskopischen Zeitachse liegen, werden nicht berücksichtigt.

2) Die MCS-Spur wird mit einem Glättfilter behandelt.

Aufgrund der Poisson-Statistik des Detektionsprozesses sind die Zählraten der Bins der MCS-Spur von Schrotrauschen überlagert. Außerdem können Inhomogenitäten im Detektionsvolumen, Mehrfachdurchtritte einzelner Moleküle und photochemische Prozesse („Blinking“) zu einer Schwankung der Zählrate innerhalb eines Fluoreszenzereignisses führen. Wenn die Spur nicht geglättet würde, zerfielen ein großer Anteil der Fluoreszenzereignisse in einzelne Teilereignisse und das Ergebnis hätte nur eine sehr eingeschränkte Aussagekraft.

3) An die geglättete MCS-Spur werden zur Fluoreszenzereigniserkennung Schwellen gelegt.

Die Erkennungsschwelle muß überschritten werden, damit ein Ereignis erkannt wird.

Die Startschwelle grenzt das Ereignis gegen den Untergrund ab und bestimmt damit dessen Beginn und Ende.

Wenn ein Fluoreszenzereignis mehrere Maxima oberhalb der Erkennungsschwelle hat, bewirkt die Trennschwelle, daß das Ereignis gespalten wird, wenn das Minimum zwischen den Maxima kleiner ist als das Produkt aus der Trennschwelle und dem kleineren der beiden Maxima.

4) Zur Charakterisierung des Fluoreszenzereignisses werden die Verteilungsfunktionen der Photonen a) auf der makroskopischen und b) auf der mikroskopischen Zeitskala untersucht.

a) Die Verfahren der beschreibenden Statistik ergeben, angewandt auf die Verteilungsfunktion der Ankunftszeiten der Photonen auf der makroskopischen Zeitskala, Auskunft über Durchtrittszeiten (->Diffusionskoeffizient, elektrophoretische Mobilität), Ereignisasymmetrien (->Photozerstörung), Ereigniswölbungen (->Sättigungsverhalten) und Modalwerte (= Zeitpunkte der Ereignismaxima). Aus den Ereignismaxima lassen sich Rückschlüsse auf die Detektionseffizienz bzw. die Fluoreszenzquantenausbeute des Fluorophors gewinnen.

b) Die Verteilungsfunktion auf der mikroskopischen Zeitskala wird durch Mustererkennung einem Referenzmuster zugeordnet bzw. durch Minimierung der

Kullback-Leibler-Diskriminierungsinformation wird ein Schätzwert für die Abklingdauer monoexponentieller Fluoreszenzzerfallskurven erhalten.

4.3.1 Gating

Zur Auswahl der Kanäle, die zur Ermittlung der MCS-Spur herangezogen werden, wird für jeden Einzelkanal die Korrelationsfunktion ermittelt. Da die Amplitude der Korrelationsfunktion sehr empfindlich auf das Signal-zu-Rausch-Verhältnis (SN) reagiert (Gl. 2.6.4) hat man mit dieser einen guten Parameter zur Auswahl der Kanäle zur Hand:

$$G \propto \frac{SN^2}{1 + SN^2}$$

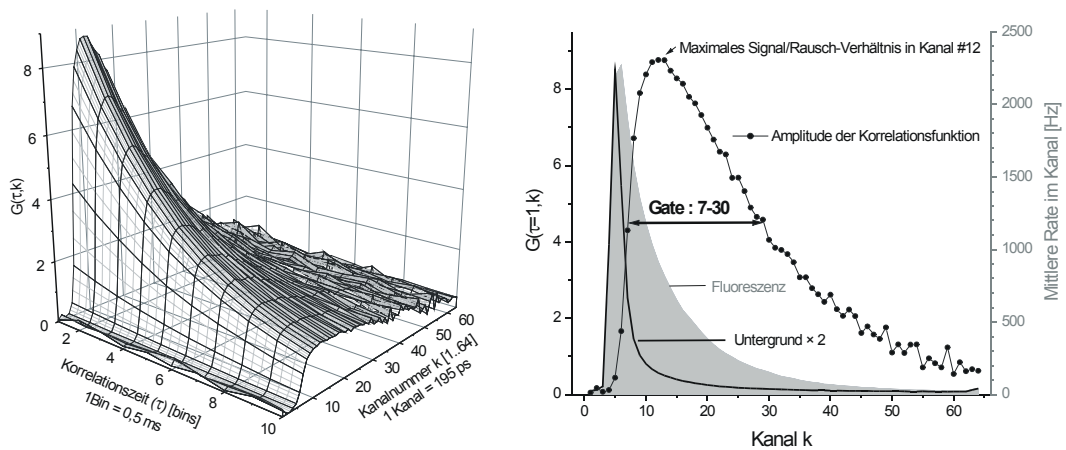


Abbildung 4.3.1-1 Wahl des optimalen Zeitfensters („Gate“) zur Fluoreszenzereigniserkennung

Die Wahl des Zeitfensters hängt von der Lage des Laserpulses und von der Fluoreszenzabklingdauer des Fluorophors ab. Im Fall des Beispiels aus Abb. 4.3.1-1 handelt es sich um Cy5 ($\tau = 1,32$ ns). Das gewählte Zeitfenster umfaßt die Kanäle 7-30. Vor Kanal 7 wird der Untergrund in erster Linie von der Raman-Streuung des Laserpulses am Lösungsmittel dominiert. Nach Kanal 30 ist die Fluoreszenz soweit abgeklungen, daß sich die Dunkelzählrate des Detektors und das Restlicht im Laboratorium störend bemerkbar macht.

Durch das Gating der MCS-Spur wurde in diesem Beispiel das durchschnittliche Signal-zu-Rausch-Verhältnis innerhalb der Fluoreszenzereignisse von 5,1 auf 9,9 erhöht.

Hat man ein geeignetes Zeitfenster gewählt, werden die darin liegenden Kanäle eines jeden Bins zur MCS-Spur aufsummiert:

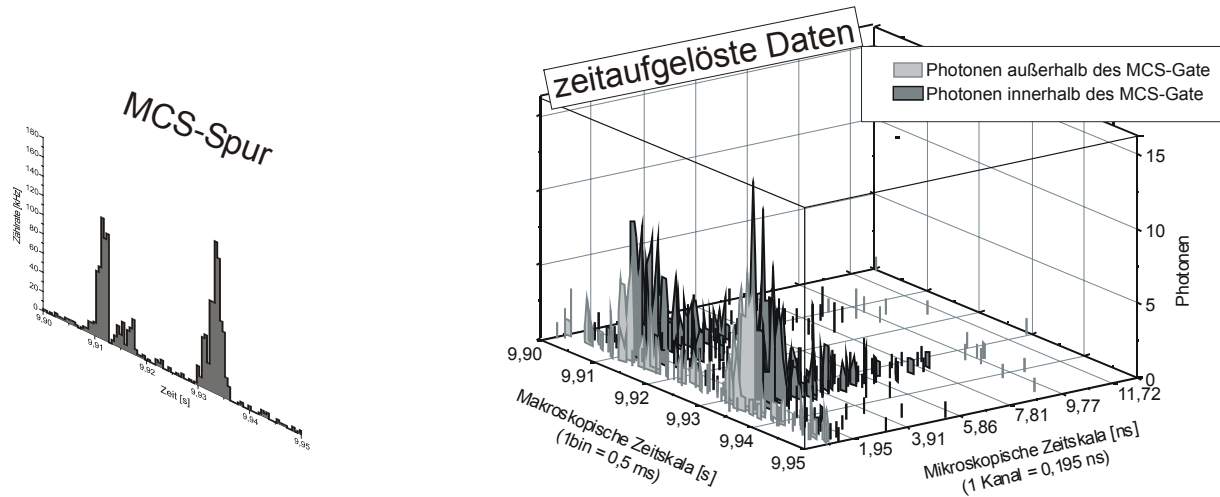


Abbildung 4.3.1-2 Berechnung der MCS-Spur aus den zeitaufgelösten Daten

4.3.2 Glätten

Das Glätten der MCS-Spuren ist in erster Linie wegen der Poisson-Statistik des Detektionsprozesses notwendig [Quian1990], [Enderlein 1998]: Beträgt zum Beispiel der Erwartungswert für die Zählrate in einem bestimmten Bin 5,0 Photonen (das entspricht bei 500 μ s Binweite bereits 10 kHz), so beträgt die Wahrscheinlichkeit dafür, tatsächlich 5 Photonen zu finden nur $e^{-5} \cdot 5^5 / 5! = 17,5\%$; die Wahrscheinlichkeit dafür weniger als 3 Photonen in dem Bin zu finden aber bereits 12,5%. Wendet man auf eine ungeglättete Spur Schwellen zur Fluoreszenzereigniserkennung an, zerfallen daher sehr viele Ereignisse in Teilereignisse. Während die Verteilungsfunktion einiger Fluoreszenzparameter wie z.B. die der Fluoreszenzabklingdauer dadurch nur verbreitert wird, ergeben andere Statistiken wie z.B. die Ereignisbreite oder der Ereignisabstand dann völlig unsinnige Ergebnisse.

Neben diesem statistischen „Schrotrauschen“ können auch photochemische Prozesse („Blinking“), Inhomogenitäten und Nebenmaxima in der Detektionseffizienz (Beugungserscheinungen) sowie diffusive Prozesse im Randbereich des Detektionsvolumens zu Schwankungen in der Zählrate während eines Fluoreszenzereignisses führen.

In dieser Arbeit wurde der gleitende Durchschnitt und der Lee-Filter [Enderlein 1997²] eingesetzt (s. Kapitel 2.9), dabei kann der gleitende Durchschnitt als ein Spezialfall des Lee-Filters mit $s_0 = \infty$ angesehen werden.

Wenn die ungefilterten Daten durch $f(t)$ gegeben sind, werden ein gleitender Durchschnitt und eine gleitende Varianz folgendermaßen definiert:

$$\mu(t) = \frac{1}{w} \int_{t-\frac{w}{2}}^{t+\frac{w}{2}} f(\theta) d\theta \quad (\text{gleitender Durchschnitt})$$

$$\sigma^2(t) = \frac{1}{w} \int_{t-\frac{w}{2}}^{t+\frac{w}{2}} (f(\theta) - \mu(t))^2 d\theta \quad (\text{gleitende Varianz})$$

Aus diesen und den ungefilterten Daten $f(t)$ werden dann die gefilterten Daten $\tilde{f}(t)$ berechnet:

$$\tilde{f}(t) = \mu(t) + (f(t) - \mu(t)) \cdot \frac{\sigma^2(t)}{\sigma^2(t) + s_0^2} \quad (4.3.2-1)$$

(Lee-Filter)

Je größer die Fensterbreite w und der Varianzparameter s_0 , desto stärker wird die Spur geglättet. Beträgt die Fensterbreite $w = 0$, so ist $\mu(t) \equiv f(t)$ und die Daten bleiben ungeglättet. Beträgt der Varianzparameter $s_0 = 0$, ergibt der Bruch in Gleichung 4.3.2-1 Eins und die Daten bleiben ebenfalls ungeglättet. Wird $s_0 \gg \sigma(t)$ gewählt, strebt der Bruch gegen Null und der Lee-Filter geht in den gleitenden Durchschnitt über.

Zum Filtern müssen demnach zwei Parameter festgelegt werden: die Fensterbreite w und der Varianzparameter s_0 .

Fensterbreite w

Zur Wahl der Fensterbreite orientiert man sich sinnvollerweise an der Breite der Fluoreszenzereignisse. Zur Bestimmung der Ereignisbreite geht man von der Autokorrelationsfunktion des Detektorsignals aus. Wenn man vereinfachend annimmt, daß das Detektionsvolumen annähernd als langgestreckter Zylinder angesehen werden kann, von dessen Achse aus die Detektionseffizienz Gauß-förmig gemäß

$$De(x, y, z) \approx De_0 e^{-2 \frac{x^2 + y^2}{\omega_{xy}^2}}$$

abfällt, so ergibt sich die Diffusionszeit $\tau_{xy} = \omega_{xy}^2 / (4D)$ als Wendepunkt des Graphen von $G(\tau)$ gegen $\ln(\tau)$ (s. Abschnitt 2.6), wobei D die Diffusionskonstante ist. Die mittlere Zeit für einen diffusiven Zentralschritt eines Moleküls durch das Detektionsvolumen ergibt sich zu $\tau_{\text{Zentral}} = \omega_{xy}^2 / (2D) = 2 \tau_{xy}$ [Ko 1997] (s. Kapitel 2.4). Da die meisten Moleküle das Detektionsvolumen nur am Rand streifen und daher kürzere Durchtrittszeiten aufweisen wird als Fensterbreite die Diffusionszeit aus der FCS gewählt:

$$w \approx \tau_{\text{Wendepkt, FCS}} \quad (4.3.2-2)$$

Da die Daten mit einer bestimmten Binweite aufgenommen werden, kann die Fensterbreite w nicht beliebig gewählt werden, sondern nur ganzzahlige Vielfache der Binweite (meist 500 μs) annehmen. Um die Programmierung zu vereinfachen, wurden als Fensterbreite nur ungerade ganze Vielfache der Binweite zugelassen:

$$w = (2 \times M + 1) \times \text{Binweite} ; M = 0, 1, 2, 3, \dots \quad (4.3.2-3)$$

Der Glättparameter M gibt also an, wie viele Bins links und rechts vom gerade betrachteten Bin zum Filtern verwendet werden. Ein Glättparameter von $M = 0$ hat dementsprechend keine Filterwirkung.

Um die Wirkung des Glättparameters zu untersuchen, wurde eine gemessene Spur (Cy5-dCMP + Mr121-dUMP, im Femtotip bei 10V Elektroden Spannung) mit unterschiedlichen Fensterbreiten geglättet und die Veränderung der Korrelationsfunktion untersucht (Abbildung 4.3.2-1):

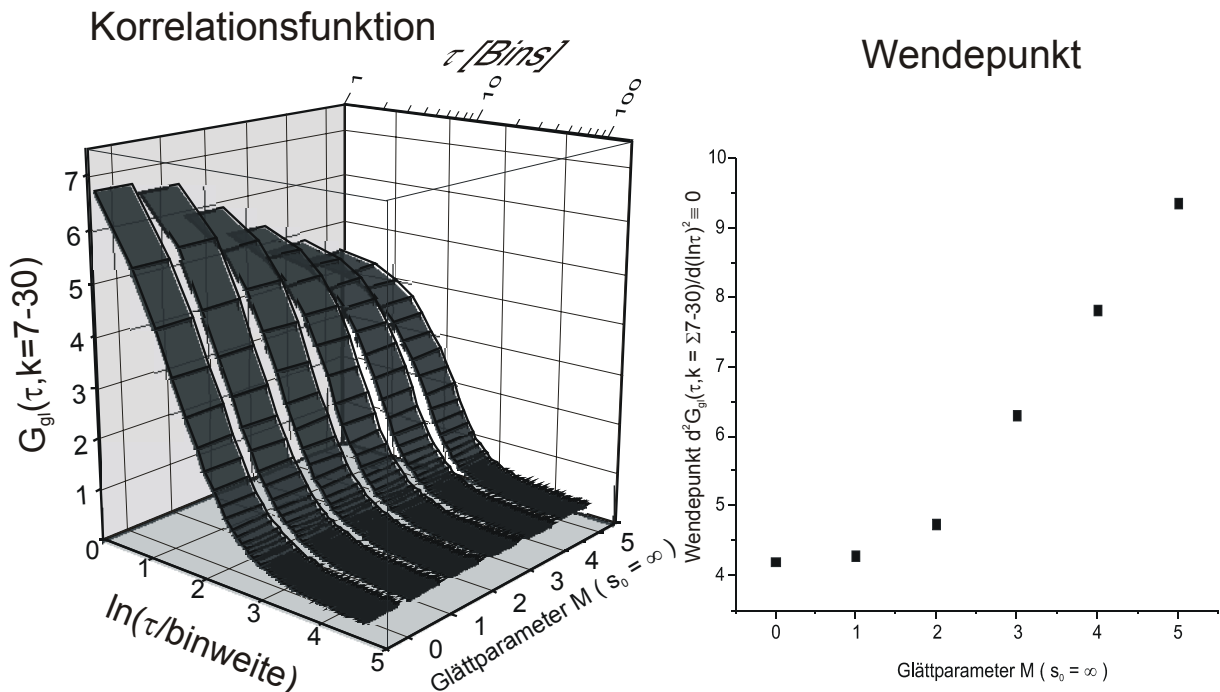


Abbildung 4.3.2-1 Einfluß des Glättparameters auf die Korrelationsfunktion.

Die Korrelationsfunktion der ungeglätteten Daten hat ihren Wendepunkt bei $\ln(\tau/\text{Bins}) = 1,41$. Das entspricht einer Korrelationszeit von $\tau_{WP} = 500 \mu\text{s} \times \exp(1,41) \approx 2,05 \text{ ms} = 4,1 \text{ Bins}$. Nach Gleichung 4.3.2-2 ergibt sich damit eine Fensterbreite von 2 ms. Mögliche Fensterbreiten sind $w = 0,5, 1,5, 2,5, 3,5, 4,5, \dots \text{ms}$. Der gewählte Glättparameter beträgt $M=2$, entsprechend einer Fensterbreite von 2,5 ms. Wie die rechte Hälfte der Abbildung 4.3.2-1 zeigt, verschiebt sich ab diesem Glättparameter der Wendepunkt der Korrelationsfunktion zu längeren Zeiten.

Varianzparameter s_0

Ein endlicher Varianzparameter mindert den Effekt des Filters, ein Varianzparameter von $s_0 = 0$ hebt ihn völlig auf. Der gleitende Durchschnitt verbreitert die Fluoreszenzereignisse und reduziert ihre Maximalfrequenz. Ein geeignetes s_0 kann diesen manchmal störenden

Effekten entgegenwirken. Der gleitende Durchschnitt verfälscht die Parameter „Maximalhöhe“ H , „Basisbreite“ W_b und (in geringerem Maße) „Halbwertsbreite“ W_{FWHM} , da diese Parameter auf der gegateten und geglätteten MCS-Spur beruhen. Die aus den Momenten der Photonenankunftszeit gewonnenen Parameter „Standardbreite“ W , „Schiefe“ S und „Wölbung“ K , sowie die „Maximalfrequenz“ f_{max} (s. Abschnitt 4.3.4) sind hingegen auf die unbehandelte MCS-Spur bezogen und bleiben von der Glättung relativ unbeeinflusst. Enderlein [Enderlein 1997²] empfiehlt als Varianzparameter die durchschnittliche Ereignishöhe. Das Problem dabei ist nur, daß man die Spur erst glätten muß, um die Ereignisse zu ermitteln.

In dieser Arbeit wurde der Varianzparameter meist entweder auf ∞ gesetzt, das heißt der gleitende Durchschnitt verwendet, oder auf das 25-fache der nach Abschnitt 4.3.3 ermittelten Erkennungsschwelle, das entspricht in etwa $De_0/2$, wobei De_0 die Zählrate eines Moleküls im Zentrum des Detektionsvolumens ist. Wurde der Glättparameter M richtig gewählt, kann durch Variation von s_0 meiner Erfahrung nach das Ergebnis gegenüber dem gleitenden Durchschnitt nur unwesentlich verbessert werden. Abbildung 4.3.2-2 demonstriert den Einfluß des Glättfilters auf die Form eines gemessenen Fluoreszenzereignisses.

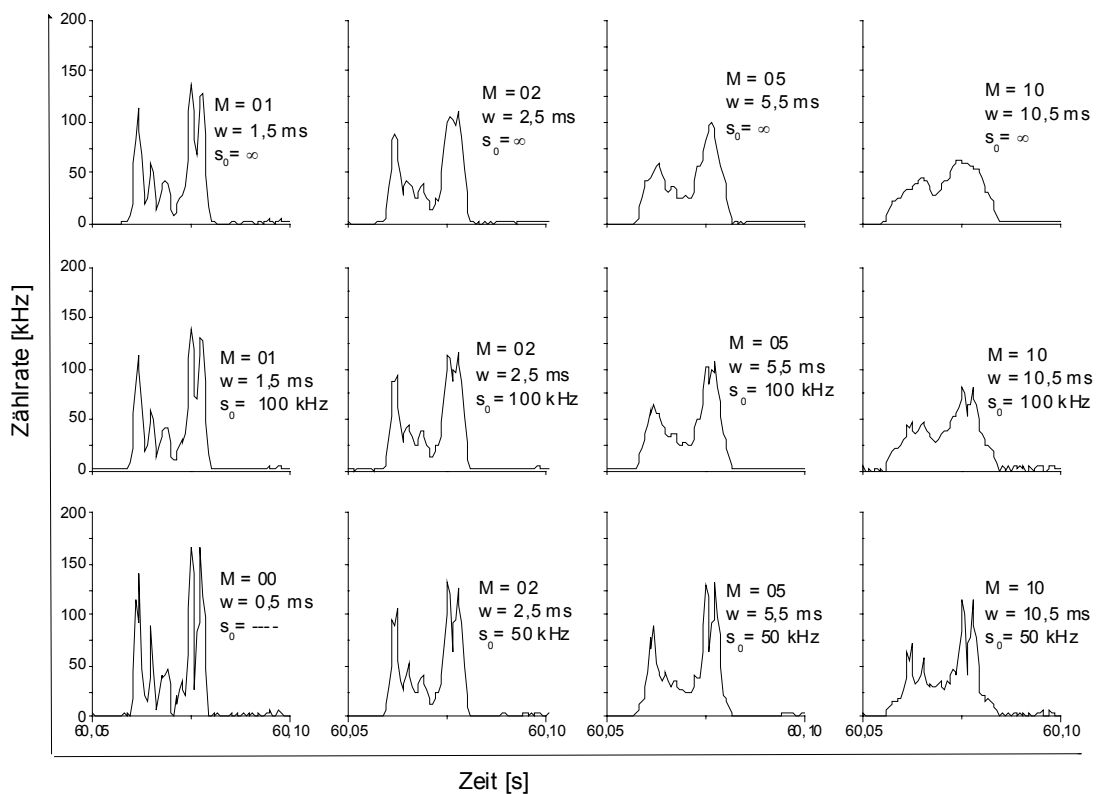


Abbildung 4.3.2-2 Wirkung des Lee-Filters.
Die Rohdaten sind unten links ($M = 00$) gezeigt

4.3.3 Schwellen

Startschwelle

Die Startschwelle dient der Abgrenzung des Fluoreszenzereignisses gegen den Untergrund. Sie sollte also etwas oberhalb der „typischen“ Zählrate des Untergrunds liegen. Wollte man die Durchschnittsrate des Untergrundes verwenden, so wäre man in einem Zirkelschluß gefangen, denn dazu müßte man zuerst die Fluoreszenzereignisse bestimmen.

Da Fluoreszenzereignisse bei Einzelmolekülexperimenten selten sind, kann man davon ausgehen, daß mehr als die Hälfte der Bins der Spur Untergrund enthalten. Als Startschwelle wird daher einfach der Median der Zählrate verwendet. Dieser liegt sicher etwas über dem Median des Untergrundes und erfüllt daher die oben aufgestellten Forderungen.

Erkennungsschwelle

Die Erkennungsschwelle liegt oberhalb der Startschwelle. Sie ist aus zwei Gründen notwendig:

- 1) Aufgrund des Schrotrauschens beim Detektionsprozeß liegt ein erheblicher Teil der Zählraten des Untergrundes über der Startschwelle (bei reinem Lösungsmittel exakt 50%!).
- 2) Vor allem bei Messungen im Tropfen streifen die meisten Moleküle das Detektionsvolumen nur am Rande. Ohne die Erkennungsschwelle, die eine Mindesteindringtiefe in das Detektionsvolumen darstellt, wären die Fluoreszenzereignisse praktisch nicht vom Untergrund zu unterscheiden und man hätte einen fließenden Übergang.

Die Erkennungsschwelle sollte die Detektionseffizienz für ein einzelnes Molekül an der Grenze eines möglichst scharf abgegrenzten Bereich des Detektionsvolumens darstellen.

Fällt die Detektionseffizienz vom Zentrum des Detektionsvolumens aus Gauß-förmig (Gl.2.3.3-2) ab, so sind die Flächen gleicher Detektionseffizienz durch Ellipsoide gegeben.

$$De(x, y, z) = De_0 e^{-2 \left[\left(\frac{x}{\omega_x} \right)^2 + \left(\frac{y}{\omega_y} \right)^2 + \left(\frac{z}{\omega_z} \right)^2 \right]}$$

Auf der durch

$$\alpha^2 = \left(\frac{x}{\omega_x} \right)^2 + \left(\frac{y}{\omega_y} \right)^2 + \left(\frac{z}{\omega_z} \right)^2 \quad (4.3.3-1)$$

gegebenen Ellipsoidoberfläche (mit den Halbachsenlängen $\alpha\omega_x$, $\alpha\omega_y$, $\alpha\omega_z$) ist die Detektionseffizienz demnach auf

$$De(\alpha) = De_0 e^{-2\alpha^2} \quad (4.3.3-2)$$

abgefallen.

Die größte Änderung der Detektionseffizienz ist an den Wendepunkten bei $\alpha = \pm 1/2$ gegeben. Die Erkennungsschwelle sollte demnach auf De_0/e gesetzt werden, um ein möglichst scharf begrenztes Detektionsvolumen zu erhalten.

Die maximale Detektionseffizienz De_0 gibt die Zählrate eines einzelnen Moleküls im Zentrum des Detektionsvolumens an. Die folgende, sehr stark vereinfachte Rechnung soll es ermöglichen, aus der Verteilungsfunktion der Zählraten in den einzelnen Bins, eine geeignete Erkennungsschwelle zu ermitteln. Dabei wird davon ausgegangen daß das Detektionsvolumen Gauß-förmig und die Konzentration des Farbstoffes so gering ist, daß zu keinem Zeitpunkt mehrere Moleküle gleichzeitig einen signifikanten Beitrag zum Detektorsignal leisten.

Chen hat 1999 ein „Photon Counting Histogramm“ (PCH) genanntes Verfahren veröffentlicht, das auf die zweite Einschränkung verzichtet und die Untersuchung von unterschiedlich hell leuchtenden Farbstoffen in einer Mischung zuläßt [Chen 1999], [Müller 2000]. Ein weiteres Verfahren, das auch auf nicht-Gauß-förmige Detektionsvolumina anwendbar ist, stellt die Fluoreszenzintensitätsverteilungsanalyse (Fluorescence Intensity Distribution Analysis, FIDA) [Kask 1999], [Kask 2000], [Palo 2000] dar.

Diese Verfahren sind mathematisch relativ anspruchsvoll. Zur Bestimmung der Erkennungsschwelle genügt hingegen eine ungefähre Abschätzung von De_0 , so daß hier ein stark vereinfachtes Verfahren auf das Zählratenhistogramm angewendet werden kann:

Um von einem Molekül eine Zählrate $\geq f = De_0 \exp(-2\alpha^2)$ zu erhalten, muß sich dieses in einem Bereich um den Fokus befinden, in dem

$$\alpha \leq \sqrt{\frac{1}{2} \ln \frac{De_0}{f}} \quad (4.3.3-3)$$

ist. Das von diesem Ellipsoid eingeschlossene Volumen ist durch

$$V(\alpha) = \frac{4}{3} \pi \alpha^3 \omega_x \omega_y \omega_z \quad (4.3.3-4)$$

gegeben. Die Wahrscheinlichkeit ein Molekül in diesem Volumen zu finden ist, wenn die Wahrscheinlichkeit für Mehrfachereignisse vernachlässigbar ist, gleich dem Produkt dieses Volumens mit der Teilchenzahldichte $N_A c$:

$$W(\text{rate} \geq f) \propto \frac{\pi N_A c \omega_x \omega_y \omega_z}{3\sqrt{2}} \left(\ln \frac{De_0}{f} \right)^{\frac{3}{2}}; \quad N_A c \omega_x \omega_y \omega_z \ll 1 \quad \wedge \quad 0 \ll f \leq De_0 \quad (4.3.3-5)$$

Für $f=0$ muß die Wahrscheinlichkeit natürlich 1 ergeben, Gleichung 4.3.3–5 strebt hingegen gegen unendlich. Durch den Untergrund kommt noch eine Verschiebung der Kurve nach

rechts hinzu. Eine genauere Analyse würde zudem noch eine Faltung mit der Poisson-Statistik des Detektors erfordern. Für hohe Zählraten liefert Gl. 4.3.3-5 jedoch brauchbare Ergebnisse. Für $f = De_0$ strebt sie gegen Null. Trägt man daher $\ln(W(\text{rate} \geq f))$ gegen f auf, so fällt die Kurve bei De_0 steil ab. Abbildung 4.3.3-1 zeigt die nach Gl. 4.3.3-5 errechnete Kurve zusammen mit einigen experimentell bei unterschiedlichen Anregungsleistungen ermittelten Verteilungsfunktionen (als Farbstoff diente Cy5-dCTP) :

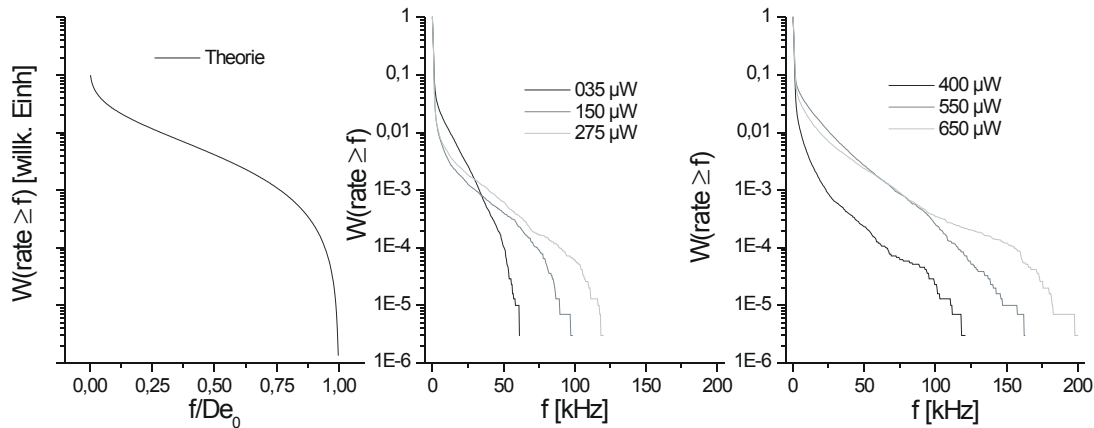


Abbildung 4.3.3-1 Von Gleichung 4.3.3-5 vorhergesagte und mit Cy5-dCTP gefundene Verteilungsfunktionen der Zählrate in den Bins einer MCS-Spur.

Man erkennt, daß die Gleichung 4.3.3-5 trotz der sehr groben Näherungen, die bei ihrer Ableitung gemacht wurden, die Form der experimentell gefundenen Verteilungsfunktionen qualitativ wiedergibt. De_0 steigt im untersuchten Bereich mit zunehmender Leistung erwartungsgemäß an.

Leistung [μW]	De_0 [kHz]
35	61 ± 4
150	95 ± 6
275	118 ± 2
400	118 ± 10
550	162 ± 10
650	198 ± 20

Tabelle 4.3.3-1 Aus Grafik 4.3.3-1 ermittelte Detektionseffizienzen von Cy5-dCTP

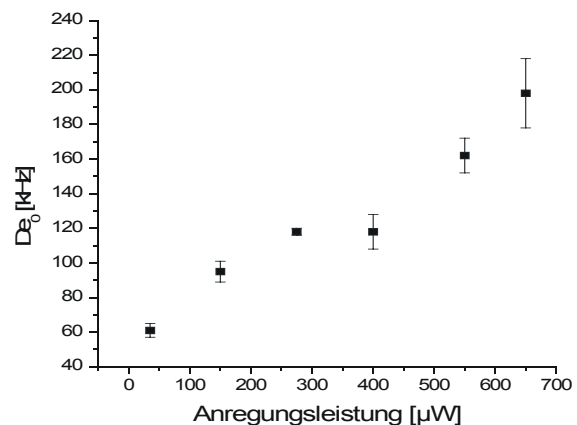


Abbildung 4.3.3-2 Detektionseffizienz von Cy5-dCTP in Abhängigkeit von der Anregungsleistung

Die Ermittlung der Detektionseffizienz mit dem gerade angewandten Verfahren ist mit einem sehr großen Fehler behaftet: Wird eine Spur der Länge N Bins ausgewertet und beträgt die Wahrscheinlichkeit dafür eine bestimmte Zählrate f zu finden $W(f)$, so ist die tatsächlich gefundene Anzahl von Bins mit dieser Zählrate Poisson-verteilt mit dem Erwartungswert $\lambda = N \times W(f)$. Die Schwankungsbreite der Poisson-Statistik beträgt $\sqrt{\lambda}$, der relative Fehler daher $1/\sqrt{\lambda}$. Da De_0 aus dem Abfall am Ende der Statistik ermittelt wird, ist dort $\lambda=1$, der

relative Fehler in der Histogrammstatistik mithin 100%. Außerdem würde ein einziger „Ausreißer“ wie z.B. ein Doppelereignis das Ergebnis völlig verfälschen.

Die Histogramme nach Art der Abbildung 4.3.3-1 erweisen sich für die Ermittlung der Erkennungsschwelle dennoch als recht nützlich: Legt man durch die beiden ersten Wendepunkte der Funktion $\ln(W(\text{rate} \geq f))$ Tangenten (Abbildung 4.3.3-3), so schneiden sich diese in einem Punkt. Es hat sich gezeigt, daß dessen Abszissenwert als Erkennungsschwelle geeignet ist. Die so ermittelte Erkennungsschwelle liegt bei etwa $D_{e0}/50$, das entspricht $\alpha \approx 1,4$. Mit ihr werden daher nicht nur Zentraldurchtritte, sondern auch Randereignisse berücksichtigt. Der Erwartungswert der Zählrate für den Untergrund liegt unter 0,6 kHz oder 1,5 Photonen/(2,5 ms). Die Obergrenze für die Wahrscheinlichkeit, ein Untergrundbin irrtümlich als Fluoreszenzereignis zu werten, ergibt sich mit 3,6 kHz als Erkennungsschwelle (= 9 Photonen/ (2,5ms)) damit aus der Poisson-Statistik des Untergrundes in diesem Beispiel zu $W_{\text{err}} \leq 2,7 \times 10^{-5}$, das ergibt eine falsch-postiven-Rate von 1/100s. (Der sauberste Puffer, der hier hergestellt werden konnte, hatte eine Verunreinigungsrate von etwa 1/10s, das entspricht einer Verunreinigung von ca. 10^{-13} M.)

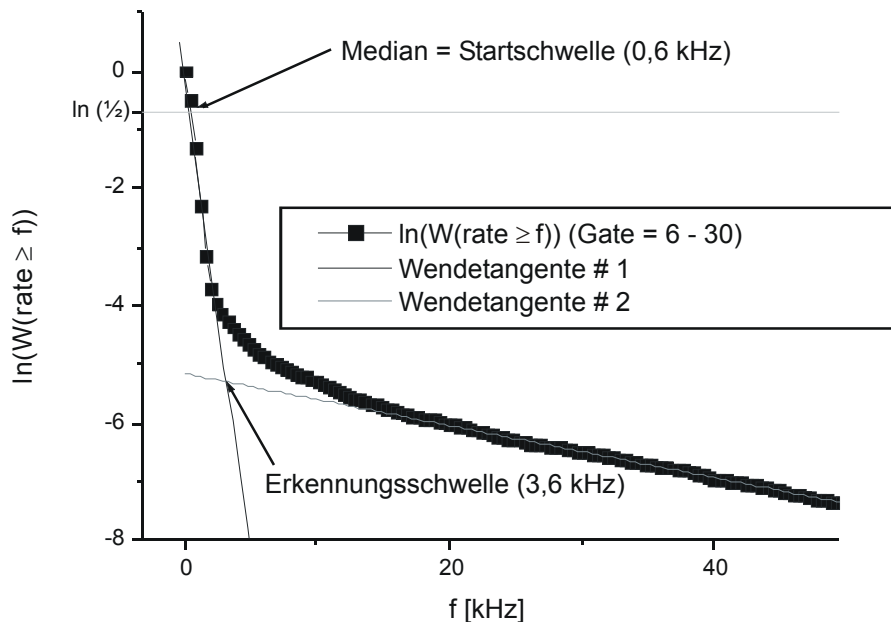


Abbildung 4.3.3-3 Ermittlung von Erkennungs- und Startschwelle aus der Verteilungsfunktion der Zählraten in der gegateten MCS-Spur

Letztendlich ist die Wahl der Erkennungsschwelle mit einer gewissen Willkür behaftet, da das Detektionsvolumen keine scharfe Grenze aufweist. Man muß die getroffene Wahl in jedem Fall an der MCS-Spur überprüfen. Die Schwelle muß je nach der Zielsetzung, ob alle Ereignisse, also auch solche, die das Detektionsvolumen nur am Rand streifen, erfaßt werden sollen oder nur Zentraldurchtritte, entsprechend korrigiert werden.

Trennschwelle

Die Trennschwelle bewirkt, daß ein Ereignis mit mehreren lokalen Maxima, die über der Erkennungsschwelle liegen an dem zwischen ihnen liegenden Minimum gespalten werden, wenn das Minimum kleiner als das Produkt aus der Trennschwelle und dem kleineren der beiden Maxima ist. Je höher die Trennschwelle ($0 \leq t_{re} \leq 1$), desto öfter werden Fluoreszenzereignisse gespalten.

Die Trennschwelle soll in höher konzentrierten Lösungen (d.h. bei der hier verwendeten Apparatur ca. $10^{-10}M$) vermeiden, daß sich teilweise überlagernde Fluoreszenzereignisse vermischt werden. Bei hochverdünnten Lösungen (d.h. $10^{-12} M$) ist das Problem irrelevant, und man muß eher vermeiden, daß Fluoreszenzereignisse zerfallen (s. Abschnitt 4.3.2). Zur Ermittlung der Trennschwelle sollte man sich am durchschnittlichen Besetzungsgrad des Detektionsvolumens orientieren. Je größer dieser ist, desto größer muß auch die Trennschwelle gewählt werden, wobei allerdings 0,5 nicht überschritten werden sollte, da sonst zu viele Ereignisse gespalten werden.

Der Besetzungsgrad des Detektionsvolumens ist aus der Amplitude der Korrelationsfunktion als $N=1/G(0)$ zugänglich. Dabei muß jedoch unbedingt berücksichtigt werden, daß die Amplitude der Korrelationsfunktion bei hochverdünnten Lösungen durch den Untergrund sehr stark reduziert werden kann. (Für $c \rightarrow 0$ geht wegen des Untergrundes $G(0) \rightarrow 0$ und nicht $\rightarrow \infty$!). In den meisten Fällen ist eine Trennschwelle zwischen etwa 10% und 50% angemessen.

4.3.4 Charakterisierung der Fluoreszenzereignisse

Zur Charakterisierung der Fluoreszenzereignisse dienen zum einen die Fluoreszenz-abklingkurven (auf der mikroskopischen Zeitskala) und zum anderen die Lage und Form des Ereignisses auf der MCS-Spur (der makroskopischen Zeitskala).

Parameter aus der MCS-Spur

Die MCS-Spur stellt ein Histogramm der Ankunftszeiten der Photonen auf der makroskopischen Zeitskala dar. Dieses Histogramm kann mit Hilfe der beschreibenden Statistik parametrisiert werden. Je kleiner die Binweite der Spur, desto besser ist die statistische Beschreibung.

Aus der geglätteten Spur werden ermittelt (s. auch Abbildung 4.3.4-1, links):

1.) Zeit des Ereignismaximums (\leftrightarrow Modalwert der Ankunftszeitverteilung)

t_{\max}

2.) Höhe des Ereignismaximums

$$H$$

3.) Basisbreite des Ereignisses (<-> Variationsbreite der Verteilung)

$$W_b$$

4.) Halbwertsbreite des Ereignisses

$$W_{fwhm}$$

5.) Abstand des Ereignismaximums zum Ereignismaximum des vorangegangenen Ereignisses

$$d_{max}$$

Aus den Rohdaten werden ermittelt (s. auch Abbildung 4.3.4-1, rechts):

6.) Die Zahl der Photonen im Ereignis (<->Stichprobenumfang)

$$\Phi$$

(6a) Die Momente der Verteilung (n = 1,2,3,4(,6,8))

$$m_n = \frac{1}{\Phi} \sum_{i=1}^{\Phi} \text{Zeit}(\text{Photon}\#i)^n \approx \frac{1}{\Phi} \text{binweite}^n \sum_{b=\text{erstes bin}}^{\text{letztes bin}} b^n \cdot \varphi[b] \quad 4.3.4-1$$

$$\Delta m_n = \sqrt{\frac{m_{2n} - m_n^2}{\Phi}} \quad 4.3.4-2$$

Aus den Momenten werden berechnet:

7) Der Schwerpunkt des Ereignisses (<->Mittelwert der Verteilung)

$$\mu = m_1 \quad 4.3.4-3$$

8) Die Standardbreite des Ereignisses

$$W = \sigma = \sqrt{m_2 - m_1^2} \quad 4.3.4-4$$

9) Die Schiefe des Ereignisses (= Skewness)

$$S = \frac{m_3 - 3m_2m_1 + 2m_1^3}{\sigma^3} \quad 4.3.4-5$$

Ein Ereignis das dadurch endet, daß das Molekül vor dem Verlassen des Detektionsvolumens photozerstört wird, sollte eine Ankunftszeitverteilungsfunktion mit Ausläufern zur linken Seite (linksschiefe Verteilungsfunktion) haben, d.h. $S < 0$. Ein symmetrisches Ereignis hat eine Schiefe von $S = 0$. Hier wird die Definition der Schiefe aus [Numerical Recipes in C] verwendet. In der Literatur (z.B. [Schulze 1990], [Sachs 1992], [Bortz 1993]) findet sich zuweilen auch folgende Definition:

$$S' = \frac{\text{Mittelwert} - \text{Modalwert}}{\sigma}$$

Bedauerlicherweise ist das Vorzeichen von S' dem von S normalerweise entgegengesetzt. Die oben erwähnte linksschiefe Verteilungsfunktion wird auch als „rechtssteil“ bezeichnet und hat einen Wert $S' > 0$.

10) Die Wölbung des Ereignisses (= Exzeß = Kurtoise)

$$K = \frac{m_4 - 4m_3m_1 + 6m_2^2m_1^2 - 3m_1^4}{\sigma^4} - 3 \quad 4.3.4-6$$

Die Kurtoise ist ein Maß dafür, wie breit das Maximum einer Verteilungsfunktion ist. Eine Gaußglocke hat eine Kurtoise von 0. Verteilungen die ein breiteres Maximum besitzen nennt man breitgipflig oder platikurtisch ($K < 0$), solche die ein schmaleres Maximum besitzen schmalgipflig oder leptokurtisch ($K > 0$).

Ein Molekül, das ein Gauß-förmiges Detektionsvolumen durchwandert und im Zentrum einen Bereich passiert, in dem die Fluoreszenz gesättigt wird, sollte eine breitgipflige Ankunftszeitverteilungsfunktion aufweisen. (Bei den gemessenen Ereignissen streut die Kurtoise allerdings derart, daß mit diesem Parameter nichts anzufangen ist.)

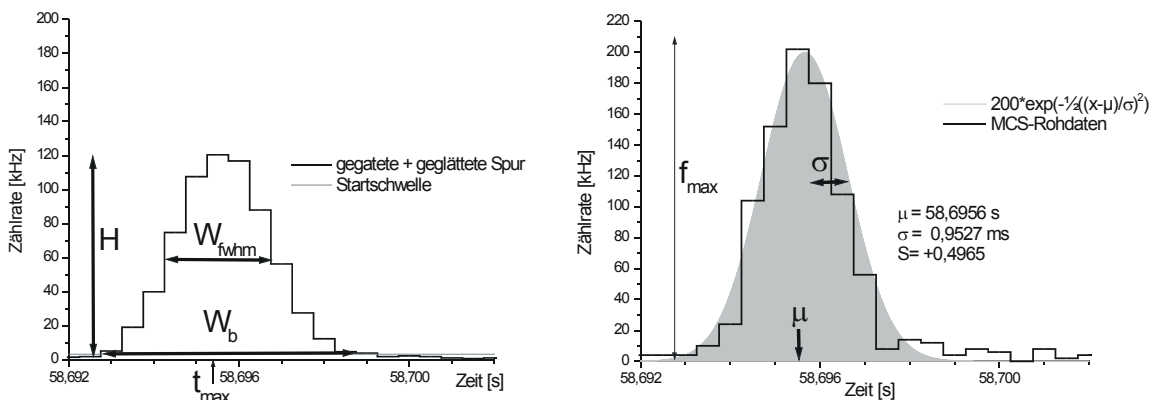


Abbildung 4.3.4-1 Zur Erläuterung der Parameter aus der MCS-Spur

Parameter aus der Fluoreszenzabklingkurve

Die Theorie des Referenzmustervergleichs und der Parameteroptimierung bei Poisson-verteilten Meßwerten ist in Abschnitt 2.10 ausführlich erklärt. Hier soll das Verfahren daher nur an einem Beispielergebnis verdeutlicht werden.

Zunächst werden die Abklingkurven aller Bins, die Bestandteil des Ereignisses sind, zu einer Ereignisabklingkurve aufsummiert. Die Abklingkurven sämtlicher Bins, die nicht zu

Fluoreszenzereignissen gehören, werden ebenfalls aufsummiert und ergeben den Untergrund.

Wurde eine Streulichtkurve aufgenommen, so wird der Puls aus dieser bestimmt, andernfalls aus dem Untergrund.

Der Puls wird mit einer Schar von monoexponentiellen Abklingkurven (Abbildung 4.3.4-2 oben links) gefaltet und ergibt den reinen Referenzmustersatz (Abbildung 4.3.4-2 oben rechts). Die Abklingkurven sind dabei Funktionen des zu ermittelnden Parameters, hier also $\ln(\tau/\text{ns})$.

Aus der Basisbreite, der Gesamtphotonenzahl des Ereignisses, und der mittleren Untergrundrate wird der Untergrundanteil für das individuelle Fluoreszenzereignis ermittelt (Abbildung 4.3.4-2 unten links). Aus der Abklingkurve des Untergrundes und dem reinen Referenzmustersatz wird für jedes Ereignis entsprechend seinem Untergrundanteil ein individueller Referenzmustersatz gemischt (Abbildung 4.3.4-2 unten rechts).

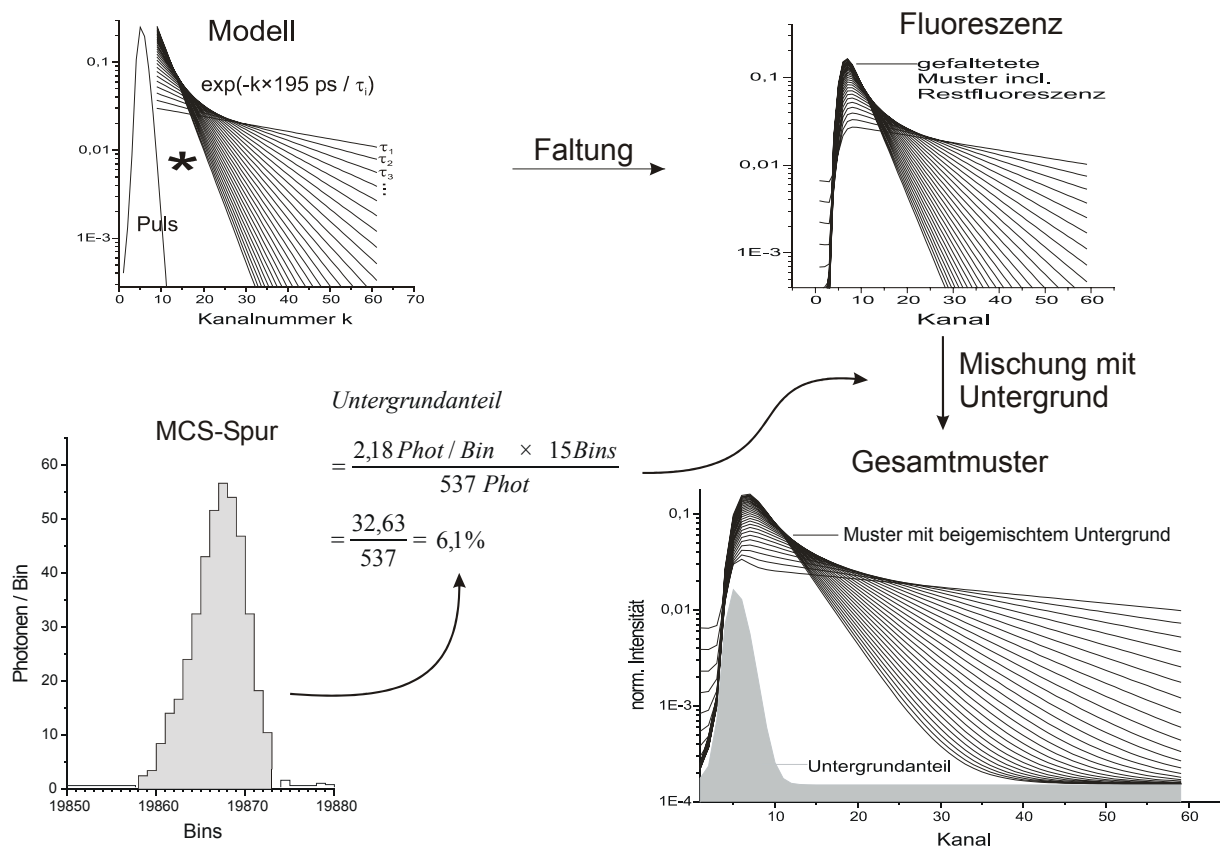


Abbildung 4.3.4-2 Erzeugung des Referenzmustersatzes

Oben: Faltung des monoexponentiellen Modells mit dem Anregungspuls

Unten: Ermittlung des Untergrundanteils aus der Ereignisbreite, dem durchschnittlichen Untergrund und der Photonenzahl des Ereignisses. Das Gesamtmuster wird anschließend aus der Fluoreszenz und dem Untergrund gemischt.

Die Muster des individualisierten Referenzmustersatzes werden mit der gemessenen Abklingkurve verglichen. Man erhält für das Ereignis einen Datensatz, in dem die Kullback-Leibler-Diskriminierungsinformation als Funktion von $\ln(\tau/\text{ns})$ gegeben ist (Abbildung 4.3.4-3 links). Die Kullback-Leibler-Diskriminierungsinformation wird nach $\ln \tau$ differenziert, die Nullstelle der Ableitung gibt $\ln \tau_{\text{MLE}}$ und die Tangentensteigung an der Nullstelle $1/\Delta \ln \tau_{\text{MLE}}$ an (Abbildung 4.3.4-3 rechts).

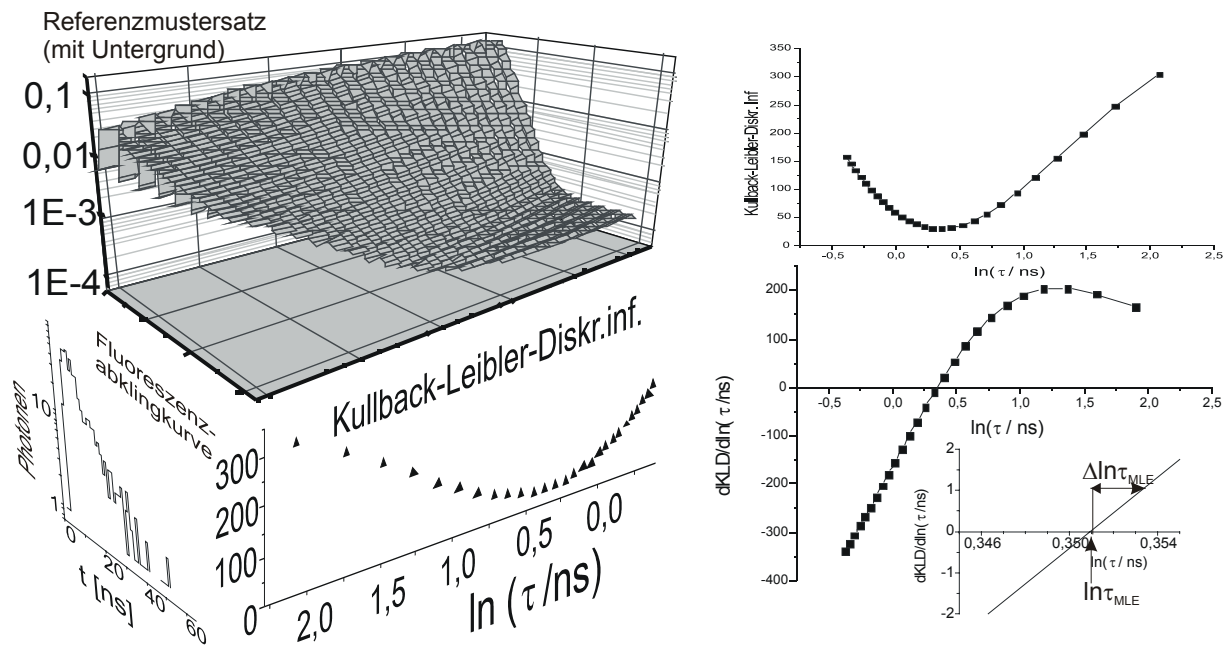


Abbildung 4.3.4-3 Abschätzung der Fluoreszenzabklingdauer durch Mustervergleich zwischen der gemessenen Abklingkurve mit einer Schar von Vergleichsmustern

Alternativ können auch zwei Abklingdauern τ_1 und τ_2 vorgegeben werden. Dann werden die Muster zu einem biexponentiellen Muster gemischt und das Mischungsverhältnis optimiert. Eine freie biexponentielle Parameteroptimierung stellt ein dreidimensionales (und nicht ein eindimensionales) Problem dar. Obwohl man das erläuterte Verfahren prinzipiell auch hier anwenden könnte (man erhielte einen 3d-Datensatz $KLD(\tau_1, \tau_2, a_1)$), wurde dieser Versuch wegen der großen Anzahl notwendiger Referenzmuster hier nicht unternommen. Das Aufsuchen des Minimums einer mehrdimensionalen Funktion ist zudem mit einem größeren mathematischen (und damit auch programmiertechnischen) Aufwand verbunden, als bei einer eindimensionalen.

4.3.5 Erfassungswahrscheinlichkeit

In Kapitel 4.2 wurden Fluoreszenzkorrelationsexperimente in „Femtotips“ ausgewertet. Die Analyse der an der Sequenzierapparatur gemessenen Funktion mit der entwickelten Theorie ergab, mit einem Kapillarparameter $\kappa_1 \approx 0,4$ und einer Elliptizität $\kappa_z \approx 4,3$ als $1/e^2$ -Achsenabschnitte quer zur Kapillarachse ($\omega_x/L = 1/(\kappa_L \sqrt{\kappa_z})$, $\omega_z/L = \sqrt{\kappa_z}/\kappa_L$) das 1,2-fache und das 5,2-fache des Kapillarradius, also $0,3 \mu\text{m}$ und $1,3 \mu\text{m}$. Am seitlichen Kapillarrand ist die Detektionseffizienz demnach auf etwa $\exp(-2/1,2) = 19\%$ des Maximalwertes abgefallen, am oberen Kapillarrand auf 68% . Die Zählrate der geglätteten MCS-Spur während eines Zentraltransits steigt bis auf 109 kHz für Cy5 bzw. bis auf 52 kHz für Mr121 an (Kapitel 4.4.4). Bei einem Durchtritt am seitlichen Kapillarrand sind demnach für Cy5-dCMP etwa $20,7 \text{ kHz}$, für Mr121-dUMP etwa $9,9 \text{ kHz}$ Signal zu erwarten. Der

Untergrund der gegateten Spur liegt bei ca. 1,5 kHz (Rohdaten: 4,4 kHz). Die Zählraten in den 0,5 ms breiten Bins sind Poisson-verteilt mit einem Untergrunderwartungswert von 0,75 Photonen. Durch den Glättfilter wird das Schrotrauschen stark reduziert. Bei einem gleitenden Durchschnitt über typischerweise 2,5 ms ergibt sich ein Untergrunderwartungswert von 2,3 Photonen. Als Zentraltransit-Signalerwartungswert erhält man $109 \text{ kHz} \times 2,5 \text{ ms} = 272$ Photonen (Cy5) bzw. 130 Photonen (Mr121)

Legt man die Erkennungsschwelle auf 12 kHz oder 30 Photonen/5 Bins, so werden $3,9 \times 10^{-20}$ % der Untergrundbins diesen Wert überschreiten, was eine falsch-positiven-Rate von etwa $7,8 \times 10^{-19}$ Hz ergibt, während $3,7 \times 10^{-77}$ % der Cy5- und $1,1 \times 10^{-24}$ % der Mr121-Zentraldurchtritte nicht erfaßt werden. Unter falsch-positiven „Ereignissen“ sind dabei Bereiche der MCS-Spur zu verstehen, in dem die Ereigniserkennung ein Fluoreszenzereignis ergibt, obwohl kein Fluorophor im Detektionsvolumen ist. Diese dürfen nicht mit den „Untergroundereignissen“, die auf eine Kontamination des Puffers zurückzuführen sind, verwechselt werden. Für die Randdurchtritte ergibt sich auf der geglätteten Spur ein Signalerwartungswert von 51,8 (Cy5) bzw. 24,8 Photonen. Von den Durchtritten am seitlichen Kapillarrand werden demnach 0,04 % (Cy5) bzw. 82,9 % (Mr121) nicht erfaßt. Da die Detektionseffizienz in z-Richtung relativ wenig abfällt, wird sie im folgenden als in z-Richtung konstant betrachtet. Der Abfall wird durch Einführung eines Faktors von

$$\frac{5,2}{2} \int_{-1/5,2}^{1/5,2} \exp(-2z^2) dz = 0,98$$

berücksichtigt.

Es wird angenommen, daß die Teilchenstromdichte über den Kapillarquerschnitt konstant ist.

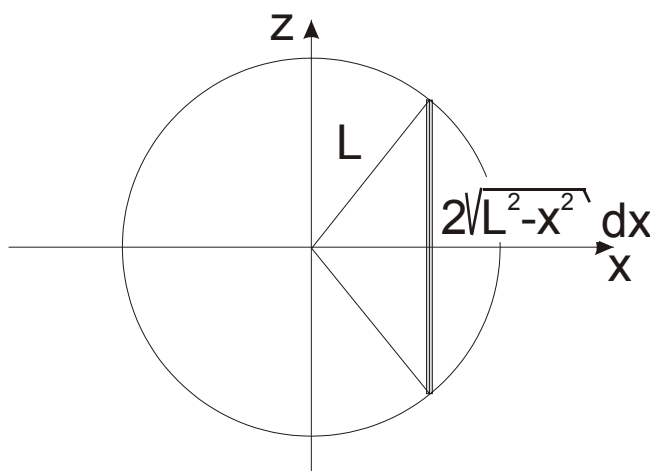


Abbildung 4.3.5-1 zur Randaustrittswahrscheinlichkeit

Damit ergibt sich die Wahrscheinlichkeitsdichte für einen Austritt beim Abszissenwert x (Abbildung 4.3.5-1) zu:

$$W(x)dx = \frac{2\sqrt{L^2 - x^2}}{\pi \cdot L^2} dx$$

Der Erwartungswert für die maximale Zählrate eines solchen Ereignisses auf der geglätteten Spur ist dann gegeben durch

$$\lambda(x) = \lambda_{\text{zentral}} \cdot 0,98 \cdot \exp\left(-2\left(\frac{x}{\omega_x}\right)^2\right)$$

λ_{zentral} beträgt für Cy5-dCMP 272 Photonen und für Mr121-dUMP 130 Photonen.

Die Wahrscheinlichkeit $W(x)$, daß die Erkennungsschwelle von 30 Photonen nicht erreicht wird, läßt sich aus der Poissonverteilung ableiten:

$$W_-(x) = e^{-\lambda(x)} \sum_{c=0}^{29} \frac{(\lambda(x))^c}{c!}$$

Die Wahrscheinlichkeit W_- , ein austretendes Molekül nicht zu erfassen, ergibt sich durch Faltung der beiden Wahrscheinlichkeiten $W(x)$ und $W_-(x)$ durch Integration über den Kapillardurchmesser:

$$W_- = \int_{x=-L}^{x=L} W_-(x)W(x)dx$$

$$W_- = \sum_{c=0}^{29} \frac{2}{c! \cdot \pi \cdot L^2} \int_{x=-L}^{x=L} \sqrt{L^2 - x^2} \left(0,98 \cdot \lambda_{\text{zentral}} \cdot \exp\left(-2\left(\frac{x}{\omega_x}\right)^2\right) \right)^c e^{-0,98 \cdot \lambda_{\text{zentral}} \cdot \exp\left(-2\left(\frac{x}{\omega_x}\right)^2\right)} dx$$

Substitution $\chi = x / \omega_x$ ergibt:

$$W_- = \sum_{c=0}^{29} \frac{2 \cdot (0,98 \cdot \lambda_{\text{zentral}})^c}{c! \cdot \pi \cdot \left(\frac{L}{\omega_x}\right)^2} \int_{\chi=-L/\omega_x}^{\chi=L/\omega_x} \sqrt{\left(\frac{L}{\omega_x}\right)^2 - \chi^2} \exp(-2c\chi^2 - 0,98\lambda_{\text{zentral}}e^{-2\chi^2}) d\chi$$

Das Integral kann mit $L/\omega_x = 0,83$ für jeden Wert $c = 0,1,\dots,29$ numerisch berechnet werden. Die Summe ergibt sich zu

Cy5-dCMP	$W_- = 1,5 \times 10^{-8} \%$
Mr121-dUMP	$W_- = 0,46 \%$

Damit ergibt sich eine Erkennungsrate von über 99 % bei einer zu vernachlässigenden falsch-positiven-Rate. Diese Überlegung gilt jedoch nur bei optimaler Justage des Femtotips. Der Fehlerabschätzung in Kapitel 4.6 wurde deshalb 95 % Erkennungsrate zugrunde gelegt. Als weiterer Unsicherheitsfaktor für die Ereigniserkennung muß das von Experimenten auf Oberflächen bekannte „Blinking“ betrachtet werden: Sollten die Moleküle auch in Lösung nicht fluoreszierende, langlebige Zustände besitzen, so besteht die Möglichkeit, daß sie bei der Passage des Detektionsvolumens „aus“ sind und nicht detektiert werden.

4.4 Verteilungsfunktionen der Fluoreszenzparameter

In diesem Abschnitt werden die empirisch gefundenen Verteilungsfunktionen verschiedener Fluoreszenzparameter kurz diskutiert. Mit der Verteilungsfunktion der Abstände aufeinanderfolgender Ereignisse steht ein Mittel zur Überprüfung der Fluoreszenzereigniserkennung zur Verfügung.

4.4.1 Ereignisabstand

Wenn die Fluoreszenzereigniserkennung perfekt funktioniert, so daß jedem Einzelmoleküldurchtritt genau ein erkanntes Ereignis entspricht, läßt sich die Verteilungsfunktion der Abstände aufeinanderfolgender Ereignisse vorhersagen. Voraussetzung ist, daß die Konzentration der Fluorophore während der Messung konstant ist, also z.B. nicht durch eine Reaktion ansteigt. Die Experimente in diesem Abschnitt wurden an einer ca. 10^{-11} M Lösung von Cy5-dCMP und Mr121-dUMP durchgeführt, die Voraussetzung ist damit erfüllt.

Bei $t = 0$ ereigne sich ein Einzelmoleküldurchtritt.

Die Wahrscheinlichkeit, daß im Zeitintervall $]0, \Delta t]$ ein weiteres Ereignis erfolgt, sei durch

$$p$$

gegeben.

Die Wahrscheinlichkeit dafür, daß im besagten Zeitintervall kein weiteres Ereignis eintritt, ist entsprechend durch

$$1-p$$

gegeben. Entspricht nun jedem Ereignis der Durchtritt eines anderen Moleküls, so müssen diese Ereignisse unabhängig voneinander sein, da in den hochverdünnten Lösungen keine Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Fluorophoren auftreten. Die Eintrittswahrscheinlichkeit eines Ereignisses muß dann unabhängig davon sein, wann das letzte Ereignis eingetreten ist. Die Wahrscheinlichkeit dafür, daß $n-1$ Intervalle vergehen, ohne daß ein weiteres Ereignis erfolgt und im n -ten Intervall ein Ereignis erfolgt, ist durch

$$W(n) = (1-p)^{n-1} \cdot p$$

gegeben.

Für infinitesimale Zeitintervalle $\Delta t = dt \rightarrow 0$ gilt:

$$p = \omega dt$$

Mit $n = \frac{t}{\Delta t} \rightarrow \infty$ erhält man für die Dichtefunktion des Ereignisabstands

$$W(t \leq \text{Abst.} \leq t + dt) = w(t)dt = (1 - \omega dt)^{\frac{t-dt}{dt}} \omega dt = \left(1 - \frac{\omega t}{n}\right)^{n-1} \omega dt$$

Da $e^x = \lim_{\chi \rightarrow \infty} \left(1 + \frac{x}{\chi}\right)^\chi$, lässt sich das zu

$$w(t)dt = \frac{e^{-\omega t}}{\left(1 - \frac{\omega t}{n}\right)} \omega dt$$

umformen.

Der Term im Nenner ergibt für $n \rightarrow \infty$ 1 und kann daher weggelassen werden

$$w(t)dt = \omega e^{-\omega t} dt \quad (4.4.1-1)$$

Die Ereignisabstände sollten demnach eine Exponentialverteilung aufweisen [Kung 1998], [Chiu 1996].

Deren Erwartungswert ist durch

$$\langle t \rangle = \frac{1}{\omega},$$

die Varianz durch

$$\left\langle \left(t - \frac{1}{\omega}\right)^2 \right\rangle = \frac{1}{\omega^2}$$

gegeben.

Das folgende Beispiel zeigt die Abstandsverteilung einer 1:1-Mischung von Cy5-dCMP und Mr121-dUMP im Femtotip bei 10V Elektroden spannung. Um den Effekt des Glättfilters zu demonstrieren wurde die Fensterbreite des gleitenden Durchschnitts zwischen 0,5 ms (Rohdaten) und 3,5 ms variiert. Der Wendepunkt der Korrelationsfunktion (der Rohdaten) dieser Messung lag bei 2,05 ms.

Für große Abstände lassen sich die Verteilungsfunktionen recht gut durch Gl. 4.4.1-1 beschreiben.

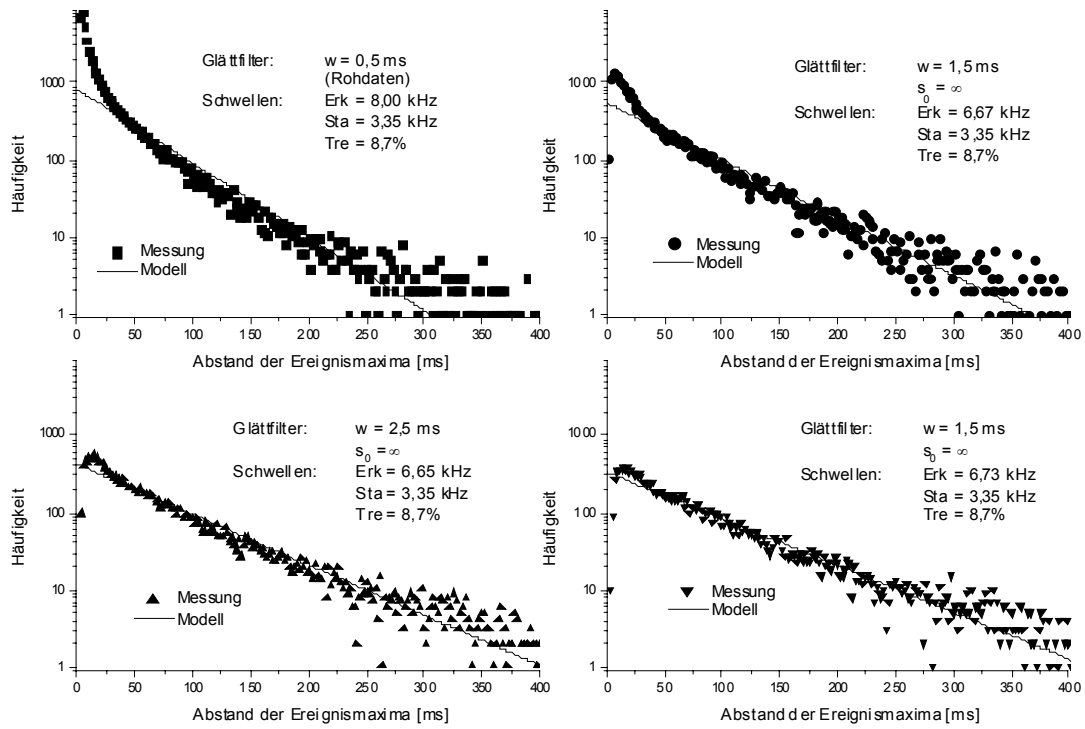


Abbildung 4.4.1-1 Abstandsverteilungen der Fluoreszenzereignisse bei unterschiedlichen Glättparametern

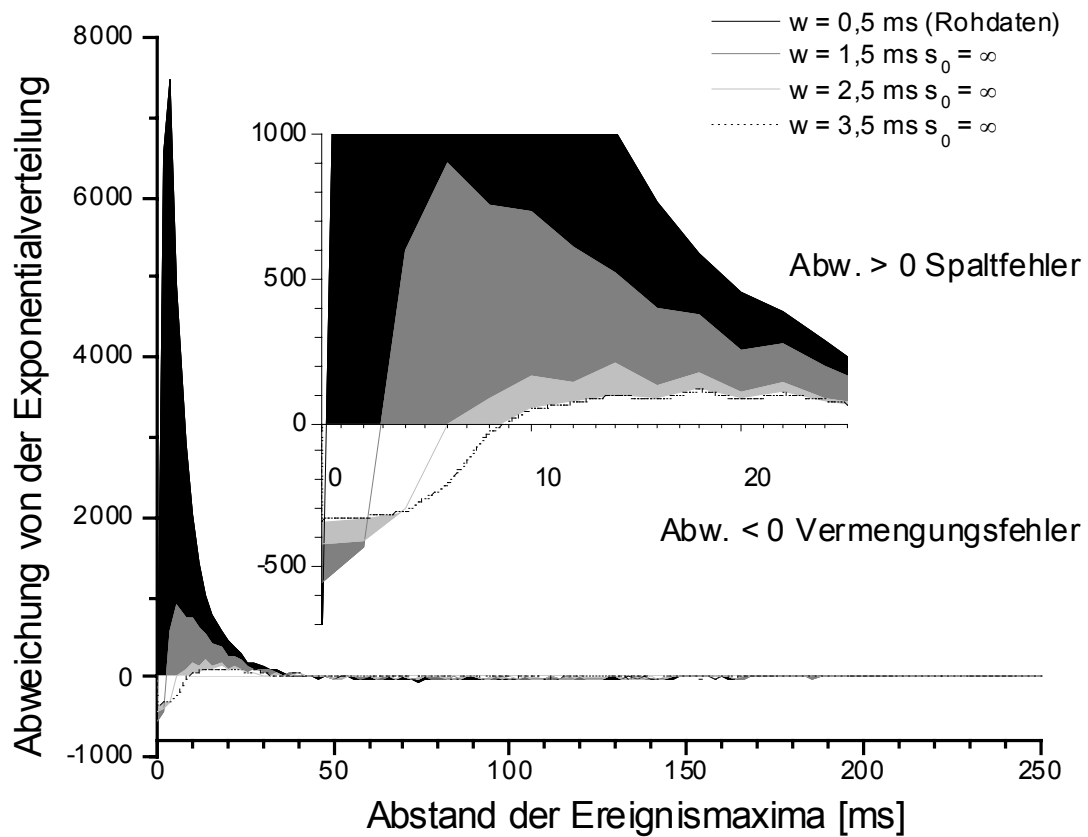


Abbildung 4.4.1-2 Abweichung der Abstandsverteilung von der Exponentialverteilung

Wie Abbildung 4.4.1-2 zeigt, ist die Abweichung der Abstandsverteilungsfunktion von der Exponentialverteilung stark von der Wahl des Glättparameters abhängig. Für Abstände unterhalb der Fensterbreite findet man eine negative Abweichung. Das entspricht der Vorstellung, daß Ereignisse mit einem kürzeren Abstand verschmolzen werden. Für Abstände oberhalb der Fensterbreite liegt eine positive Abweichung vor, das entspricht Ereignissen, die aufgrund einer Intensitätsfluktuation irrtümlich gespalten werden (oder Mehrfachdurchtritten, die bei der angelegten Spannung in der Kapillare allerdings eher selten sein sollten (Vgl. allerdings [Fister 1998])). Bei einer Glättfensterbreite $< 2,5$ ms überwiegt der Spaltfehler, während bei einer Fensterbreite $> 2,5$ ms der Vermengungsfehler dominiert. Der Vermengungsfehler ist natürlich von der Konzentration des Farbstoffes bzw. der Ereignisfrequenz abhängig: Je verdünnter die Lösung ist, desto größer kann die Breite des Glättfensters gewählt werden, ohne das verschiedene Ereignisse verschmelzen. Die Ereignisbreite und damit der Wendepunkt der Korrelationsfunktion wird allerdings dennoch ansteigen.

Tabelle 4.4.1-1 faßt die in Abbildung 4.4.1-2 gezeigten Ergebnisse zusammen:

M	w [ms]	Vermengungsfehler	Spaltfehler	Ereignisse/s	ω [Hz]
0	0,5	820 (0- 2ms)	29594 (4-46 ms)	45,535	22,03
1	1,5	986 (0- 4ms)	6141 (6-46 ms)	20,206	17,18
2	2,5	1139 (0- 6ms)	1511 (8-46 ms)	13,834	15,01
3	3,5	1224 (0-10ms)	1049 (11-46 ms)	11,776	13,97

Tabelle 4.4.1-1 Ergebnis der Ereignisabstandsanalyse bei 10V Elektrodenspannung

M: Glättparameter w: Glättfensterbreite w: Ereignisfrequenz aus der Abstandsanalyse Ereignisse/s : Anzahl der detektierten Ereignisse / Meßzeit (1024 s)

Wie man der Tabelle entnehmen kann, reagiert die Ereignisabstandsanalyse wesentlich weniger empfindlich auf Fehler in der Fluoreszenzereigniserkennung als die Zahl detektierter Ereignisse: bei $M = 0$ ist die Ereignisanzahl etwa 3-fach überhöht (Fehler = +200%), der Fitparameter ω aus der Ereignisabstandsanalyse hingegen nur 1,5-fach (Fehler = +50%).

Abbildung 4.4.1-3 zeigt die Analyse der übrigen Experimente mit dieser Kapillare bei 2, 5, (10), 15, 20, 25, 30 V Elektrodenspannung (alle Experimente mit $M = 2$), Tabelle 4.4.1-2 gibt die Steigungen der eingezeichneten Regressionsgeraden wieder.

Spannung [V]	ω [Hz]	Ereignisse / Meßzeit [Hz]	MCS-Zählrate [kHz]
2	$3,136 \pm 1,574$	0,532	$0,61 \pm 0,55$
5	$7,280 \pm 1,982$	3,192	$1,36 \pm 0,76$
10	$18,086 \pm 1,963$	13,854	$3,36 \pm 1,60$
15	$20,964 \pm 2,198$	14,898	$6,01 \pm 7,17$
20	$28,121 \pm 3,638$	11,828	$2,44 \pm 1,70$
25	$35,663 \pm 2,925$	23,577	$8,01 \pm 4,44$
30	$48,876 \pm 2,867$	36,065	$4,44 \pm 2,35$
Tropfen	$38,050 \pm 3,156$	31,664	$4,38 \pm 1,08$

Tabelle 4.4.1-2 Ergebnisse aus Abbildung 4.4.1-3

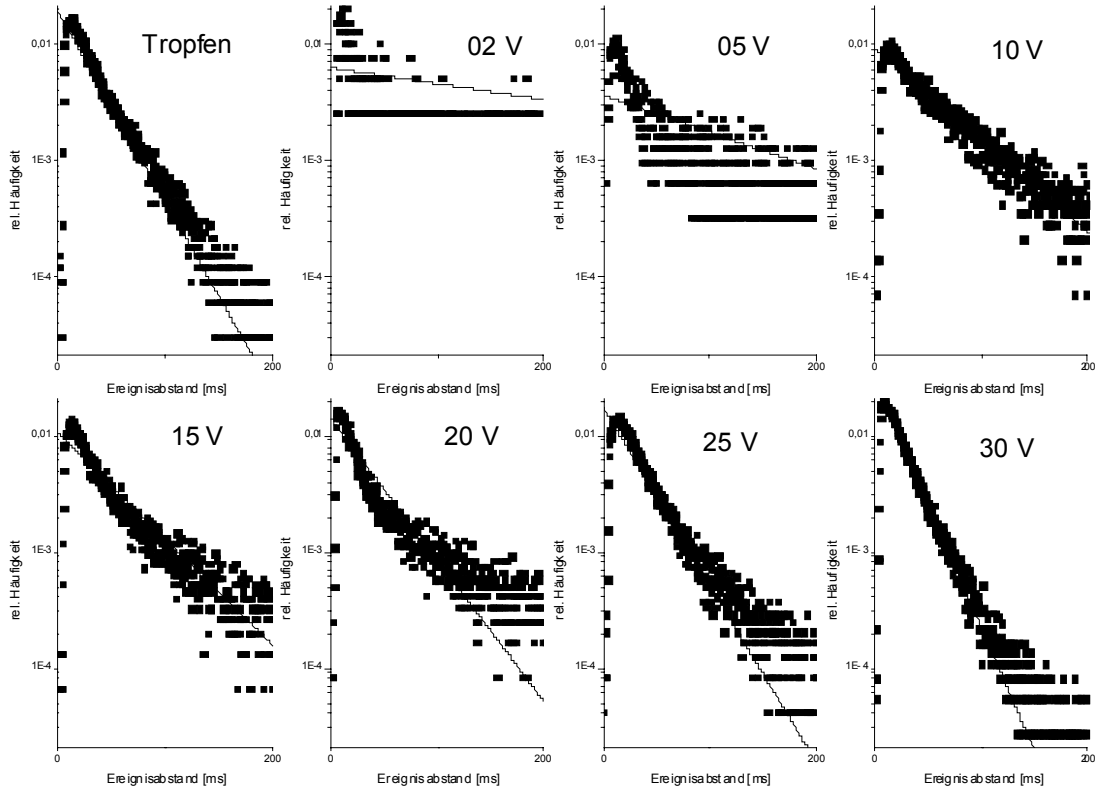


Abbildung 4.4.1-3 Ereignisabstandsanalyse bei verschiedenen Elektroden Spannungen

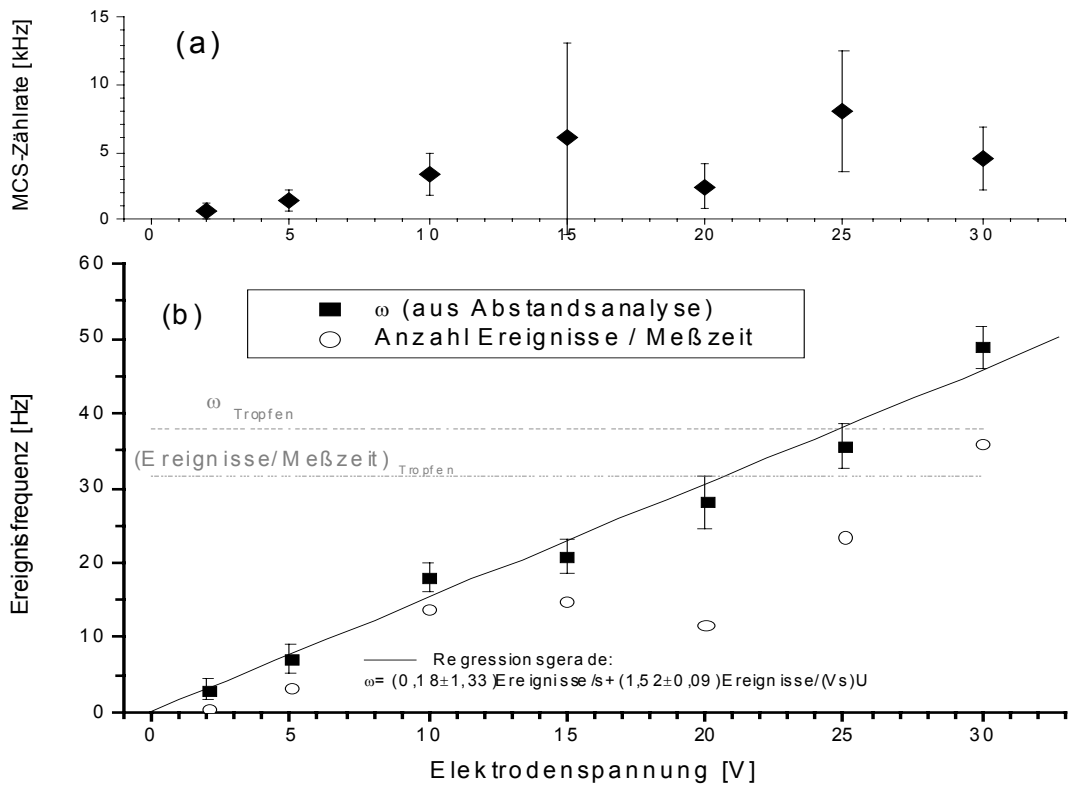


Abbildung 4.4.1-4 Spannungsabhängigkeit
 (a) der Durchschnittsrate am Detektor ($ch = 7-30$)
 (b) der Ereignisfrequenz

Der Fitparameter ω zeigt den erwarteten linearen Verlauf mit steigender Spannung (Abbildung 4.4.1-4). Auch der Quotient aus der Gesamtzahl der Ereignisse und der Meßzeit steigt mit der Spannung an, die Punkte zeigen aber eine viel größere Abweichung von der Ausgleichsgerade:

Bemerkenswert an der Ausgleichsgerade ist, daß der Ordinatenabschnitt bei $U = 0$ V innerhalb der Fehlergrenzen 0 ist, und nicht etwa der Wert im Tropfen. Die Ursache hierfür ist, daß der Kapillardurchmesser die Abmessung des Detektionsvolumens unterschreitet und daher die Diffusion der Moleküle durch das Detektionsvolumen behindert. In Abschnitt 4.2 wurde zudem gezeigt, daß die Viskosität der Lösung in der Spitze der Kapillare stark erhöht ist.

Für die Ereignisfrequenz ω erhält man, falls alle die Kapillare verlassenden Moleküle erfaßt werden:

$$\langle \omega \rangle = \langle v_y \rangle \cdot A \cdot N_A c \quad (4.4.1-1)$$

Dabei ist $\langle v_y \rangle$ die mittlere Geschwindigkeit der Teilchen entlang der Kapillarachse, A die Querschnittsfläche der Kapillare, N_A die Avogadro-Konstante und c die Farbstoffkonzentration. Mit $A = 2,0 \times 10^{-13} \text{ m}^2$ und $c = 10^{-10} \text{ mol/l}$ ergibt sich der mittlere Abstand der y -Koordinaten der Teilchen zu $\Delta y = 1/(A \times N_A \times c) = 83 \text{ }\mu\text{m}$.

Die Geradensteigung ergibt sich somit zu

$$\frac{d\omega}{dU} = AN_A \cdot \left(c \frac{dv_y}{dU} + v_y \frac{dc}{dU} \right)$$

bzw. mit der elektrophoretischen Mobilität μ_{el} und der Spitzenfeldstärke E zu

$$\frac{d\omega}{dU} = AN_A \cdot \mu_{el} \left(c \frac{dE}{dU} + E \frac{dc}{dU} \right) \quad (4.4.1-2)$$

In Abschnitt 4.2.5 (Abbildung 4.2.5-1) wurde demonstriert, daß $dc/dU > 0$, Abbildung 4.4.1-4a bestätigt dies auch für dieses Experiment: Die Durchschnittsrate der MCS-Spur steigt mit der Spannung, was bei einer gegebenen Detektionseffizienz nur auf eine Erhöhung der Farbstoffkonzentration zurückzuführen sein kann. Wenn also $dc/dU \neq 0$, so folgt aus Gl. 4.4.1 daß die Feldstärke E nichtlinear mit der Spannung zusammenhängen muß, sonst dürfte man in Abbildung 4.4.1-4b nicht $d\omega/dU = \text{const.}$ finden. Für eine Diskussion möglicher Ursachen dieser Nichtlinearität sei auf Abschnitt 4.2.6 verwiesen. Wenn man annimmt, daß $c \times dE/dU \gg E \times dc/dU$, so erhält man mit $\Delta y = 83 \text{ }\mu\text{m}$ für die Teilchengeschwindigkeit

$$v_y \approx \Delta y \times d\omega/dU \times U \approx 1,3 \times 10^{-4} \text{ m/s/V} \times U$$

In der Literatur [Becker 1999] findet man für Cy5-dCTP unter vergleichbaren Bedingungen $2,28 \times 10^{-5} \text{ ms}^{-1}\text{V}^{-1}$ (ermittelt aus der Ereignisbreitenverteilung). In Abschnitt 4.2 wurde für Cy5-dCTP aus Korrelationsmessungen $2,3 \times 10^{-6} \text{ ms}^{-1}\text{V}^{-1}$ ermittelt, für Mr121-dUTP $6 \times 10^{-7} \text{ ms}^{-1}\text{V}^{-1}$. Das Ergebnis aus der Abstandsanalyse ist offenbar viel zu groß. Im Umkehrschluß

bedeutet das, daß sich durch die angelegte Spannung die Teilchenkonzentration um den Faktor 5-10 erhöhen muß, damit man mit $Dy \approx 8 \mu\text{m}$ zu Abschnitt 4.2 konsistente Ergebnisse erhält. In Abbildung 4.5.8-3 wurde ein Konzentrationsanstieg mit einem defokussierten Laser und einer CCD-Kamera experimentell bestätigt.

Nach Gleichung 4.4.1-2 ist die Geradensteigung der elektrophoretischen Mobilität μ_{el} proportional. Aus der Spannungsabhängigkeit der Ereignisabstände in der 1:1-Mischung kann man das Verhältnis der elektrophoretischen Mobilität abschätzen:

Wenn

$$\frac{dc_{Cy}}{dU} \approx \frac{dc_{Mr}}{dU} \text{ und } c_{Cy} \approx c_{Mr}$$

gilt

$$\frac{d\omega_{Cy}}{dU} : \frac{d\omega_{Mr}}{dU} \approx \frac{\mu_{Cy}}{\mu_{Mr}}$$

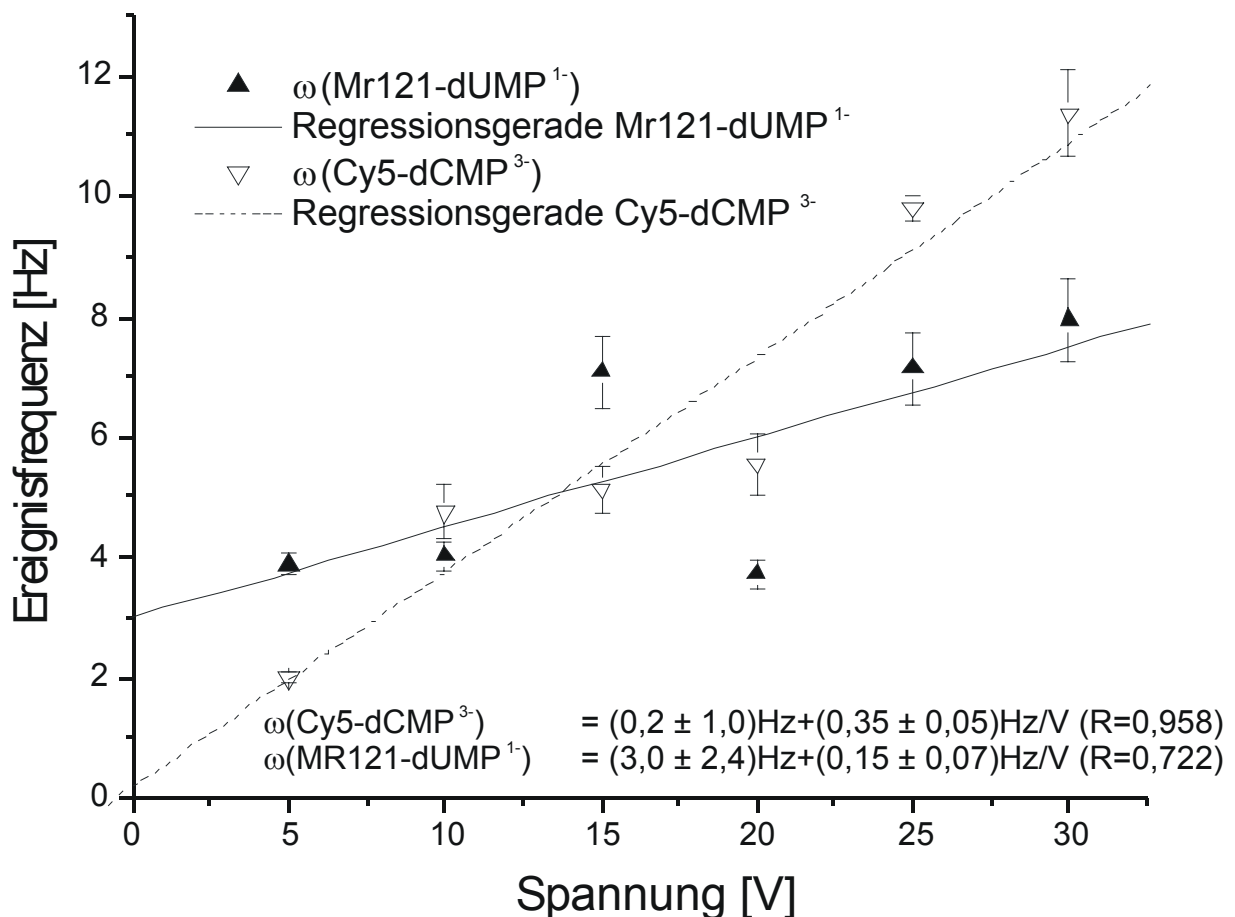


Abbildung 4.4.1-5 Die Geradensteigungen der Ereignisfrequenzen von Cy5-dCMP und Mr121-dUMP unterscheiden sich

Mit $d\omega_{Cy}/dU = (0,35 \pm 0,05) \text{ Hz/V}$ und $d\omega_{Mr}/dU = (0,15 \pm 0,07) \text{ Hz/V}$ (Abbildung 4.4.1-5) erhält man unter der Voraussetzung, daß die Konzentrationen beider Farbstoffe bei allen Spannungen gleich sind

$$\mu_{el}(\text{Cy5-dCMP}^{3-}) : \mu_{el}(\text{Mr121-dUMP}^-) = 2,3 \pm 1,1$$

Da Cy5-dCMP die Gesamtladung -3 trägt, Mr121-dUMP hingegen nur -1 und die Diffusionskoeffizienten beider Teilchen vergleichbar sind, entspricht das Ergebnis den Erwartungen. In der Literatur [Sauer 1999] wird beschrieben, daß die elektrophoretischen Mobilitäten von Cy5-dCTP⁵⁻ und von MR121-dUTP³⁻ ungefähr gleich sind. Das Ladungsverhältnis der Triphosphate beträgt allerdings auch nur 1,67 statt 3,0 wie im Fall der Monophosphate.

In Kapillaren mit homogenem Feldverlauf scheinen sich diese Effekte nicht so gut beobachten zu lassen: In der Literatur [Fister 1998] wird berichtet, daß bei 160 V/cm, die Ereignisfrequenz von Rhodamin6G Molekülen in Wasser nicht erhöht wird, weil der Stofftransport unter den dort beschriebenen Bedingungen überwiegend diffusionskontrolliert ist. Für Cy5-dCTP im Femtotip stimmen die in der Literatur [Becker 1999], [Zander 1998] beschriebenen Beobachtungen mit den hier gemachten überein.

4.4.2 Ereignisbreite

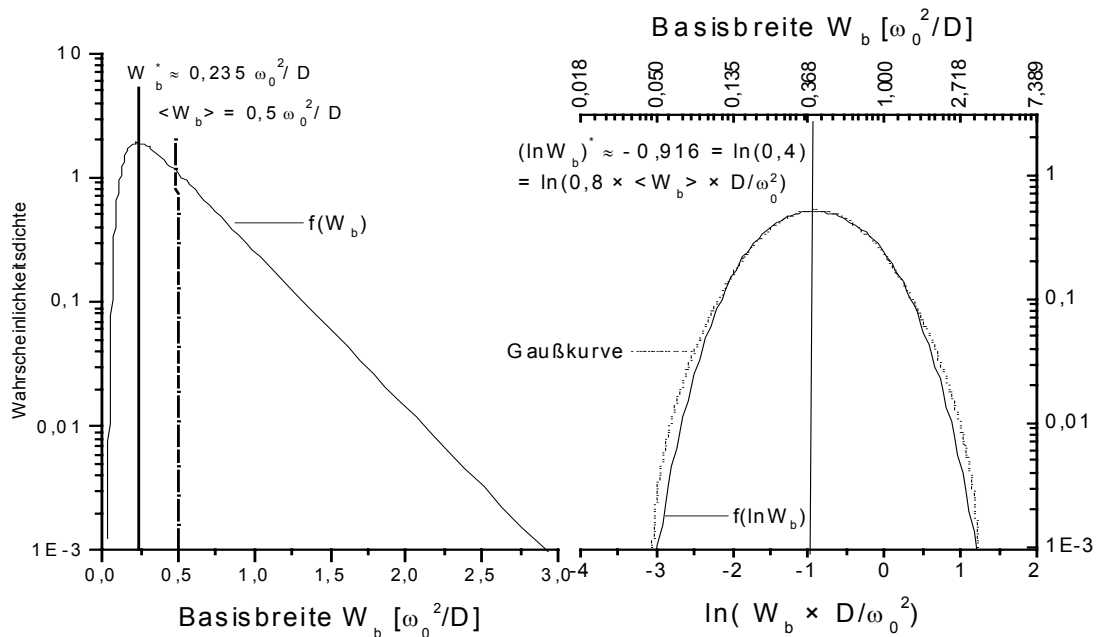


Abbildung 4.4.2-1 Verteilungsfunktion der Ereignisbreite für diffusive Zentraldurchtritte durch ein langgestrecktes zylindrisches Detektionsvolumen mit Radius ω_0 (nach [Ko 1997]). links: bei linearer Abszisse erhält man eine asymmetrische Verteilungsfunktion, die für $W > 0,5 \omega_0^2 / D$ angenähert monoexponentiell abfällt. rechts: Für den Logarithmus der Ereignisbreite erhält man eine angenähert Gauß-förmige Verteilungsfunktion.

Die Verteilungsfunktion der Basisbreite des Ereignisses bei diffusivem Stofftransport durch ein langgestrecktes zylindrisches Volumen wurde in der Literatur bereits eingehend untersucht (s. Abschnitt 2.4 [Ko 1997]).

Die Verteilungsfunktion für diffusive Zentralschritte durch einen langgestreckten Zylinder mit Radius ω_0 ist durch Gl. 2.4.3.1-8 (Abbildung 2.4.3.1-1) gegeben. Wählt man $\ln(W_b)$ statt W_b , so ergibt sich mit

$$f_{\ln}(W_b)d\ln W_b = f_{lin}(W_b)dW_b = W_b f_{lin}(W_b)d\ln W_b$$

$$f_{\ln}(W_b)d\ln W_b = W_b \sum_{n=1}^{\infty} \left[\frac{\alpha_n D}{\omega_0^2 J_1(\alpha_n)} \exp\left(-\frac{\alpha_n^2 D}{2\omega_0^2} W_b\right) \right] d\ln W_b$$

eine beinahe Gauß-förmige Verteilungsfunktion mit einem Maximum bei $\ln(0,8 \langle W_b \rangle)$. Dabei ist D die Diffusionskonstante, α_n die n-te Nullstelle von J_0 und J_m die Besselfunktion m-ter Ordnung erster Gattung. Durch die Logarithmierung der Abszisse ist die Verteilungsfunktion einfacher zu Interpretieren, da sie in sehr guter Näherung durch eine Gaußglocke mit $\mu = \ln(0,4) = \ln(0,8 \times \langle W_b \rangle)$ und $\sigma = \ln(4)$ beschreibbar ist (Abbildung 4.4.2-1).

In dieser Arbeit wird statt der stark von der Startschwelle abhängigen Basisbreite eine auf dem zweiten Moment der makroskopischen Photonenankunftszeit beruhende Breitenfunktion verwendet (Gl. 4.3.4-4). Deren Fehler ist besser einzuschätzen und wird weniger von den Auswerteparametern beeinflusst. Die Basisbreite W_b , die Halbwertsbreite W_{fwhm} und die Breitenfunktion $W = \sqrt{m_2 - m_1^2}$ sind erwartungsgemäß miteinander korreliert (Tabelle 4.4.2-1).

Bei der Halbwertsbreite fällt auf, daß sie für breite Ereignisse zwei Maxima aufweist. Die Korrelation zwischen W und W_b ist hingegen sehr gut, wie Abbildung 4.4.2-2 zeigt :

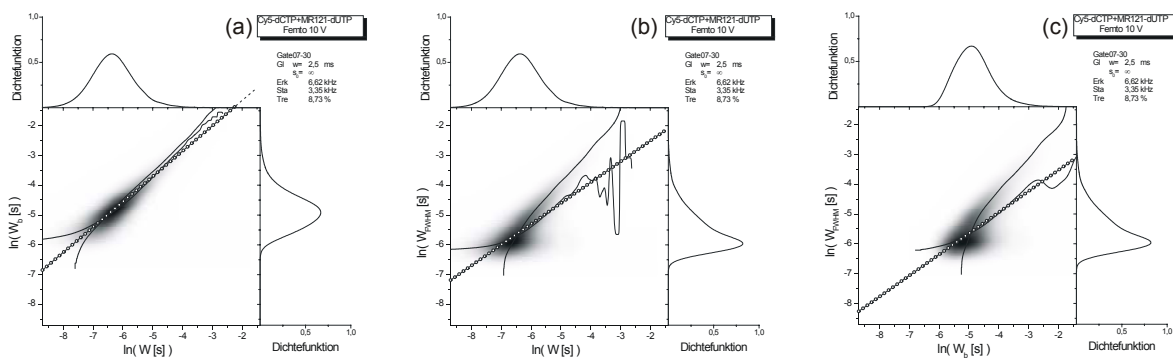


Abbildung 4.4.2-2 Zweidimensionale Verteilungsfunktionen der verschiedenen zur Ereignisbreitencharakterisierung verwendeten Parameter
 links: $\ln(W_b/s)$ gegen $\ln(W/s)$ W = Standardabweichung der Photonenankunftszeit
 Mitte: $\ln(fwhm/s)$ gegen $\ln(W/s)$ W_b = Basisbreite des Ereignisses
 rechts: $\ln(fwhm/s)$ gegen $\ln(W_b/s)$ W_{fwhm} = Halbwertsbreite des Ereignisses
 Über die Dichtekarten (schwarz = maximale Wkt-dichte) sind die Regressionsgeraden (Linie mit weißen Kreisen) und die Schwerpunkte der Histogrammschnitte eingetragen.

Die Parameter der Regressionsgeraden $y = y_0 + a \cdot x$ sind in Tabelle 4.4.2-1 wiedergegeben:

x	y	y ₀	a	R
ln(W/s)	ln(W _b /s)	0,546 ± 0,012	0,850 ± 0,002	0,967
ln(W/s)	ln(W _{fwhm} /s)	-1,114 ± 0,033	0,698 ± 0,005	0,748
ln(W _b /s)	ln(W _{fwhm} /s)	-2,110 ± 0,032	0,708 ± 0,007	0,667

Tabelle 4.4.2-1 Regressionsgeraden aus Abbildung 4.4.2-2

Mit steigender Elektrodenspannung wurde in der Literatur [Becker 1999] mit Cy5-dCTP eine reziproke Verkürzung der Durchtrittszeiten beschrieben, was einem linearen Geschwindigkeitsanstieg entspricht.

In Abbildung 4.4.2-3a ist die Verteilungsfunktion von ln(W/s) bei verschiedenen Elektrodenspannungen wiedergegeben. Der Mittelwert im Tropfen liegt bei $\langle \ln(W/s) \rangle = -6,394 \pm 0,105$. Das entspricht nach Tab 4.4.2-1 $\langle \ln(W_b/s) \rangle = 0,546 + 0,85 \times (-6,394) = -4,889 \pm 0,080$ (experimentell $-4,94367 \pm 0,0314$). Die mittlere Basisbreite beträgt $W_b/s \approx \exp(-4,9 \pm 0,08)/0,8 \approx (9,3 \pm 0,8) \times 10^{-3}$ oder $W_b \approx 9,3$ ms. Das ergibt mit $\omega_0 \approx 1 \mu\text{m}$ eine Diffusionskonstante der Monophosphate von $1,1 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$. In Kapitel 4.2 wurde für das größere Cy5-dCTP $6,7 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ abgeschätzt. (Bei diesem Vergleich beachte man, daß ω_0 hier der durch die Startschwelle festgelegte Radius ist, während in Kapitel 4.2 ω_0 durch $De(\omega_0) = 1/e^2 De_0$ definiert ist.) Die Größe $1/W \propto 1/\exp(\ln W) = \exp(-\ln W)$ ist der Teilchengeschwindigkeit proportional. Der in der oben zitierten Literaturstelle gefundene lineare Verlauf dieser Größe konnte hier wegen des zu großen Fehlers (trotz einiger Versuche die Messung mit unterschiedlichen Parametern auszuwerten) leider nicht nachgewiesen werden (Abbildung 4.4.2-3b):

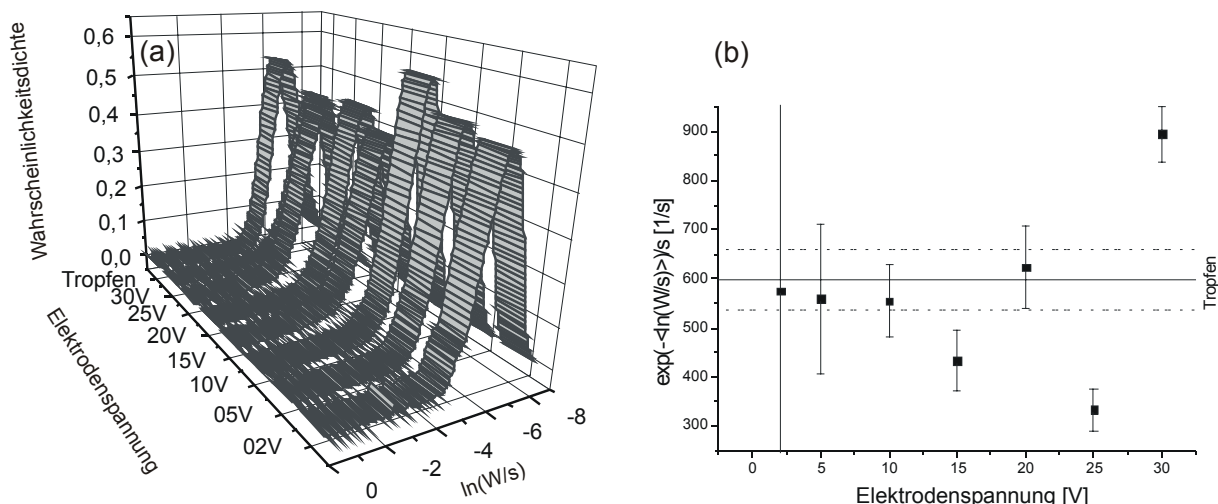


Abbildung 4.4.2-3 (a) Verteilungsfunktion der logarithmierten Ereignisbreite und (b) reziproke Ereignisbreite in Abhängigkeit von der Elektrodenspannung
Die Werte unter 15V und der Wert bei 25 V entsprechen nicht den Erwartungen.

Ein Unterschied in den Durchtrittszeiten für Cy5-dCMP und Mr121-dUMP konnte nicht nachgewiesen werden (Vgl. Abbildung 4.4.1-5).

4.4.3 Gesamtphotonenzahl

Die erwartete Gesamtphotonenzahl λ_Φ eines Einzelmolekülereignisses hängt von der Trajektorie $\vec{s} = (\vec{r}(t_1), \vec{r}(t_2), \vec{r}(t_3), \dots)$ des Moleküls durch das Detektionsvolumen ab:

$$\lambda_\Phi(\vec{s}) = \int_{t_{\text{Eintritt}}}^{t_{\text{Ausritt}}} De(\vec{r}) \vec{r}(t) dt$$

Die beobachtbare Photonenzahlverteilung $W(\Phi)$ ergibt sich aus einer Faltung der λ_Φ -Verteilung mit der Poisson-Statistik des Detektors

$$W(\Phi = F) = \int_0^\infty \frac{e^{-\lambda_\Phi} \lambda_\Phi^F}{F!} \cdot W(\lambda_\Phi) d\lambda_\Phi$$

Um genau zu sein, müßte man auch noch die Möglichkeit von Mehrfachereignissen und Photozerstörung berücksichtigen [Enderlein 1998].

Das Problem besteht darin, einen analytischen Ausdruck für die Wahrscheinlichkeit $W(s)$ einer bestimmten Trajektorie aufzustellen, um gemäß

$$W(|\lambda_\Phi - l_F| \leq \frac{dl_F}{2}) = dl_F \int_{\text{über alle Trajektorien}} \lambda_\Phi(\vec{s}) W(\vec{s}) \delta(\lambda_\Phi - l_F) d\vec{s}$$

einen Ausdruck für die Wahrscheinlichkeitsdichte von λ_Φ zu finden. In der oben erwähnten Literaturstelle werden die Trajektorien mit Hilfe von Irrfahrtsprozessen simuliert und mit einem Modell welches die Detektionseffizienz beschreibt die Verteilungsfunktion von Φ numerisch ermittelt.

Andere Autoren [Rigler 1992, Fries 1998], entwickeln bzw. verwenden ein Modell, daß das (Gauß-förmig angenommene) Detektionsvolumen in Ellipsoidschalen gleicher Detektionseffizienz einteilt und erhalten so einen Ausdruck, der die Wahrscheinlichkeitsdichte von Φ mit der Ereignisbreite W_b korreliert:

$$W(\Phi)_{W_b} \approx \text{konst} \cdot \frac{\sqrt{\ln \frac{De_0 W_b}{\Phi}}}{\Phi} \quad (4.4.3-1)$$

Durch Faltung mit Gl. 2.4.3.1-8 kann man dann eine Verteilungsfunktion der Photonenzahl für diffusive Einzelmolekül-Zentraldurchtritte bei vernachlässigbarer Photozerstörung angeben. Diese Funktionen sind streng monoton fallend, im offenen Volumen findet man entsprechend kein lokales Maximum in der Photonenzahlverteilungsfunktion. In Kapillaren findet man hingegen solche Maxima. Es ist sogar möglich, in der Statistik mehrere Maxima aufzufinden und so zwischen Ein- und Oligomolekülereignissen zu unterscheiden [Enderlein 1997²].

Durch Logarithmierung der Photonenzahl erhält man aus Gl. 4.4.3-1:

$$W(\ln\Phi)_{\ln W_b} \approx konst \sqrt{\ln(De_0 W_b) - \ln\Phi}$$

Normierung

$$1 \equiv \int_{\ln(sta \cdot W_b)}^{n(De_0 \cdot W_b)} W(\ln\Phi) d \ln\Phi$$

ergibt

$$konst = \frac{2}{3} (\ln(De_0 W_b) - \ln(sta \cdot W_b))^{3/2} = \frac{2}{3} \left(\ln\left(\frac{De_0}{sta}\right) \right)^{3/2}$$

Das Integral läuft von der minimalen Photonenzahl $\Phi = sta \times W_b$ (sta = Startschwelle) bis zur maximalen Photonenzahl $De_0 \times W_b$. Damit ergibt sich für den Schwerpunkt des $\ln\Phi$ -Histogramms bei einer bestimmten Ereignisbreite:

$$\langle \ln\Phi \rangle_{W_b} = \frac{\int_{\ln(sta \cdot W_b)}^{n(De_0 \cdot W_b)} W k t_{W_b} (\ln\Phi) \cdot \ln\Phi d \ln\Phi}{\int_{\ln(sta \cdot W_b)}^{n(De_0 \cdot W_b)} W k t_{W_b} (\ln\Phi) d \ln\Phi} = \frac{2 \ln(De_0 W_b) + 3 \ln(sta \cdot W_b)}{5} = \frac{1}{5} \ln(De_0^2 sta^3 W_b^5)$$

Um den Logarithmus aufspalten zu können, wird mit der fünften Potenz einer Einheitszeit $t^\circ = 1s$ erweitert:

$$\langle \ln\Phi \rangle_{W_b} = \frac{1}{5} \ln(De_0^2 sta^3 / Hz^5) + \ln(W_b / s) \quad (4.4.3-2)$$

In einer doppelt logarithmischen Wahrscheinlichkeitsdichtekarte von $\ln\Phi$ gegen $\ln W$ (Abbildung 4.4.3-1) sollte sich also der Schwerpunkt von $\ln\Phi$ linear darstellen, wobei für die Geradensteigung 1 zu erwarten ist.

Während die Vorhersage der Linearität zufriedenstellend wiedergegeben wird ($R > 0,9$), sind die gefundenen Geradensteigungen dy/dx erheblich kleiner als 1 (Tabelle 4.4.3-1):

	y_0	dy/dx	R
Cy5-dCTP	$4,7930 \pm 0,0050$	$0,2274 \pm 0,0008$	0,9945
Mr121-dUTP	$4,6002 \pm 0,0157$	$0,1881 \pm 0,0023$	0,9308

Tabelle 4.4.3-1 Parameter der Regressionsgeraden an $\langle \ln\Phi \rangle (\ln(W/s))$.

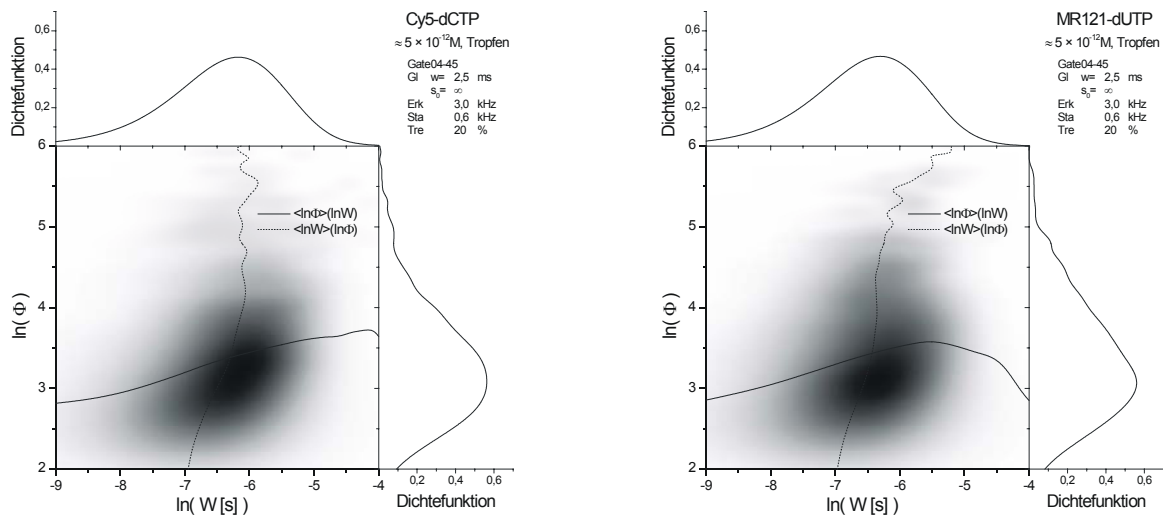


Abbildung 4.4.3-1 Zweidimensionale Verteilungsfunktion von Ereignisbreite und Gesamtphotonenzahl in doppelt logarithmischer Auftragung. Als Farbstofflösung diente $5 \times 10^{-12} \text{ M}$ Cy5-dCTP (links) bzw. $5 \times 10^{-12} \text{ M}$ Mr121-dUTP (rechts). Die Messungen erfolgten im Tropfen.

Die breiten Ereignisse enthalten demnach weniger Photonen, als erwartet. Eine Mögliche Ursache könnte sein, daß die Trennschwelle zu niedrig und der Glättparameter zu groß gewählt wurde, so daß die Statistik durch verschmolzene Ereignisse verfälscht wird. Die Struktur des tatsächlichen Detektionsvolumens ist zudem erheblich komplizierter als das einfache Gaußsche Modell vorgibt, so fällt es nicht von der Mitte aus monoton ab, sondern enthält Minima (sog. „Airy-Scheibchen“) und Nebenmaxima.

4.4.4 Maximalfrequenz

Die Maximalfrequenz eines Fluoreszenzereignisses hängt davon ab, wie nahe das Molekül dem Zentrum kommt und wie effizient es dort detektiert wird. Der erste Faktor ist eine statistische Größe, der zweite die apparate-, leistungs- und stoffspezifische Konstante D_{e0} . Die Maximalfrequenz selbst bleibt bei der hier verwendeten histogrammierten Datenerfassung unbeobachtbar, da ein Bin immer ein Integral über einen endlichen Zeitraum darstellt. Das beobachtbare Ereignismaximum stellt also keine Momentaufnahme der maximalen Eindringtiefe dar, sondern die Mittelung über den dem Zentrum am nächsten kommenden Abschnitt der Molekültrajektorie. Wenn die Binweite erheblich kleiner als die Ereignisbreite ist, lassen sich aus der Maximalfrequenz dennoch brauchbare Aussagen ableiten.

In der Literatur [Eggeling 2001] wurde für die Maximalfrequenz im Tropfen eine sogenannte log-normal Verteilung beschrieben. (Bei einer log-normal Verteilung ist der Logarithmus der untersuchten Größe normalverteilt.)

Man sollte erwarten, daß breitere Ereignisse im Mittel auch höher sind: Für ein Molekül, daß sich dem Zentrum des zylinderförmigen Detektionsvolumens (durch die Startschwelle

definierter Radius ω_0) bis auf den Abstand r nähert, erhält man als mittlere Ereignisbreite [Ko 1997] (Gl. 2.4.3.1-9)

$$\langle W_b \rangle(r) = \frac{\omega_0^2 - r^2}{2D}$$

Bei Annahme eines langgestreckten quasizylindrischen Gauß-förmigen Detektionsvolumens erhält man für die Maximalfrequenz in Abhängigkeit vom Minimalabstand r

$$\langle f_{\max} \rangle(r) = De_0 (De_0 / sta) \frac{r^2}{\omega_0^2}$$

Beide Funktionen sind mit steigendem Minimalabstand r streng monoton fallend; daher ist eine positive Korrelation zwischen f_{\max} und W_b zu erwarten. Abbildung 4.4.4-1 bestätigt dies zwar prinzipiell, das Abfallen von $\langle f_{\max} \rangle(W_b)$ im Intervall $2,5 \text{ ms} \leq W_b \leq 5 \text{ ms}$ bei der Messung im Tropfen ist jedoch überraschend und nicht ohne weiteres erklärbar.

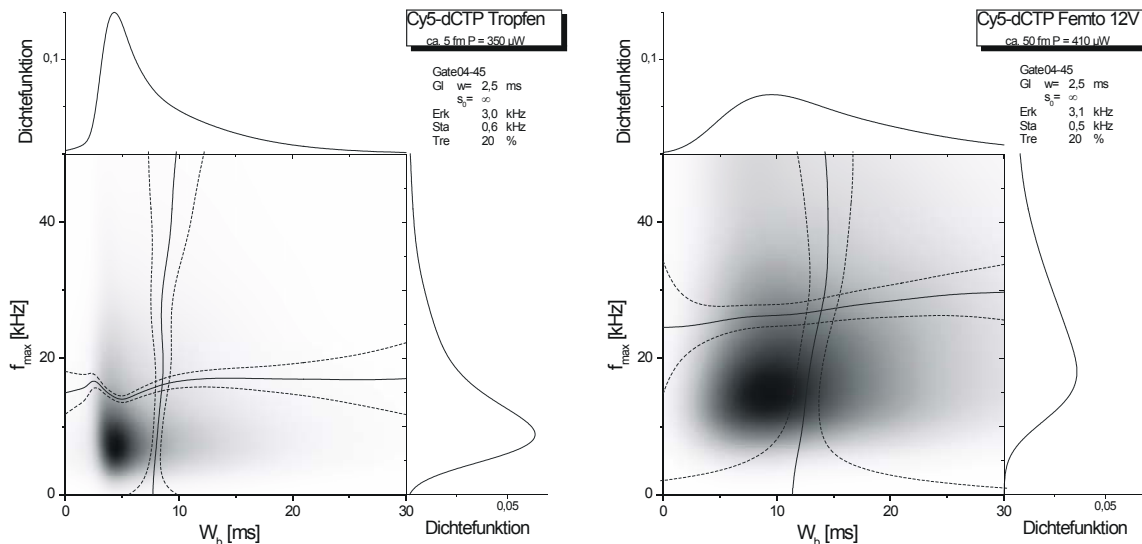


Abbildung 4.4.4-1 Ereignismaximum in Abhängigkeit von der Ereignisbreite.

Für die Statistik im Tropfen wurden 2809, für die in der Kapillare 970 Ereignisse ausgewertet. Die durchgezogenen Linien über der 2D-Graustufenkarte zeigen den Schwerpunkt eines Parameters als Funktion des anderen, die gestrichelten Linien geben den Fehler des Schwerpunkts wieder.

Der Korrelationskoeffizient zwischen W_b und f_{\max} beträgt im Tropfen $R = 0,0736$ ($\neq 0$ auf einem 99,9 % - Signifikanzniveau). In der Kapillare erhält man $R = 0,0987$ ($\neq 0$ auf einem 97,5 % - Signifikanzniveau).

Die Fluoreszenzereignisse in der Kapillare sind im Mittel breiter und höher als solche im Tropfen, da die Moleküle durch die Kapillarwand daran gehindert werden, das Detektionsvolumen seitlich zu verlassen.

Die folgende 2D-Dichtekarte zeigt die Ereignishäufigkeit in Abhängigkeit von der Fluoreszenzabklingdauer und der Maximalfrequenz der Ereignisse (auf der geglätteten Spur) bei einer 1:1-Mischung von Cy5-dCMP und Mr121-dUMP. Die höhere Detektionseffizienz für Cy5 ($\ln(\tau / \text{ns}) = 0,28$) im Vergleich zu MR121 ($\ln(\tau / \text{ns}) = 0,78$) ist deutlich sichtbar.

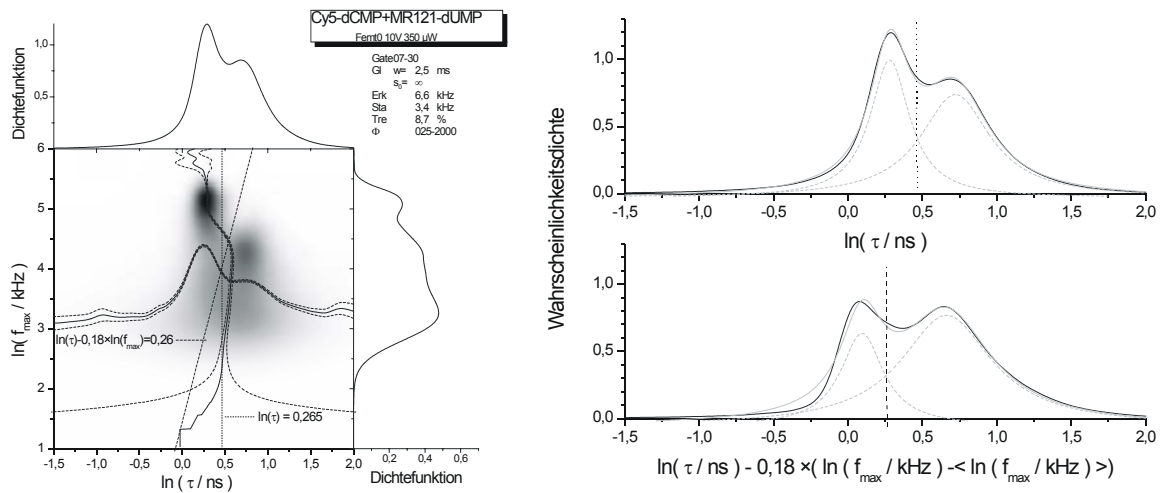


Abbildung 4.4.4-2 Verteilungsfunktion von $\ln(\tau)$ und $\ln(f_{max})$ bei einer 1:1-Mischung aus Cy5-dCMP und Mr121-dUMP

links: Zweidimensionale Verteilungsfunktion

rechts: durch Berücksichtigung von $\ln(f_{max})$ als zusätzlichem Fluoreszenzparameter zu $\ln(\tau)$ wird das Parameterhistogramm der Mischung geringfügig besser getrennt.

Für Cy5 ergibt sich aus der linken Hälfte von Abbildung 4.4.4-2 $\langle \ln(f_{max}/kHz) \rangle = 4,39 \pm 0,02$, für Mr121 $\langle \ln(f_{max}/kHz) \rangle = 3,80 \pm 0,02$. Wegen des großen Anteils von Randdurchtritten läßt sich durch Berücksichtigung von $\ln(f_{max})$ als zusätzlichem Parameter das Histogramm der Mischung nur unwesentlich besser trennen (Abbildung 4.4.4-2, rechts unten). Das 95 %-Quantil des Ereignismaximums ist ein Maß für die bei einem Zentraldurchtritt erreichbare Zählrate. Für Cy5-dCMP beträgt dieses Quantil 109,2 kHz (gefilterte MCS-Spur) bzw. 192 kHz (Rohdaten); für Mr121-dUMP 51,6 kHz (gefiltert) bzw. 102 kHz (Rohdaten).

4.4.5 Schiefe

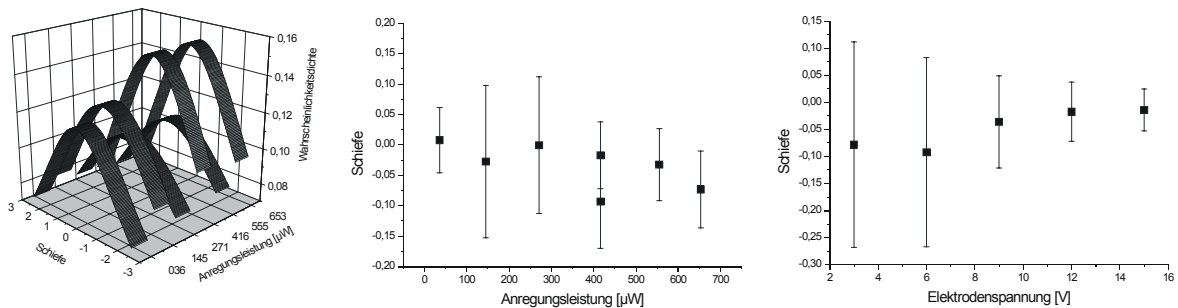


Abbildung 4.4.5-1 Ereignisschiefe von 50 fM Cy5-dCTP im Femtotip

links: Verteilungsfunktion der Schiefe bei verschiedenen Anregungsleistungen und 12 V Spannung

Mitte: Mittelwert der Schiefe bei 12V Elektrodenspannung als Funktion der Anregungsleistung

rechts: Mittelwert der Schiefe bei 416 μW Anregungsleistung als Funktion der Elektrodenspannung

Die Schiefe der makroskopischen Photonenankunftszeitverteilung ist ein Maß für die Ereignisasymmetrie. Mit steigender Anregungsleistung wird die Verteilung erwartungsgemäß zunehmend linksschief, da die Photozerstörung an Gewicht gewinnt. Die zunehmende Abweichung ins Negative bei niedrigen Elektrodenspannungen ist wohl der steigenden Ereignisbreite zuzurechnen.

4.4.6 Fluoreszenzabklingdauer und Fluoreszenzabklingkurven

In der Literatur [Sauer 1998], [Eggeling 2001] wird die Fluoreszenzabklingdauer meist als normalverteilt beschrieben. Eine allgemeine Ableitung für die Verteilungsfunktionen von Parametern, die mit Hilfe eines Wahrscheinlichkeitsschätzers ermittelt werden, findet sich in [Enderlein 2001].

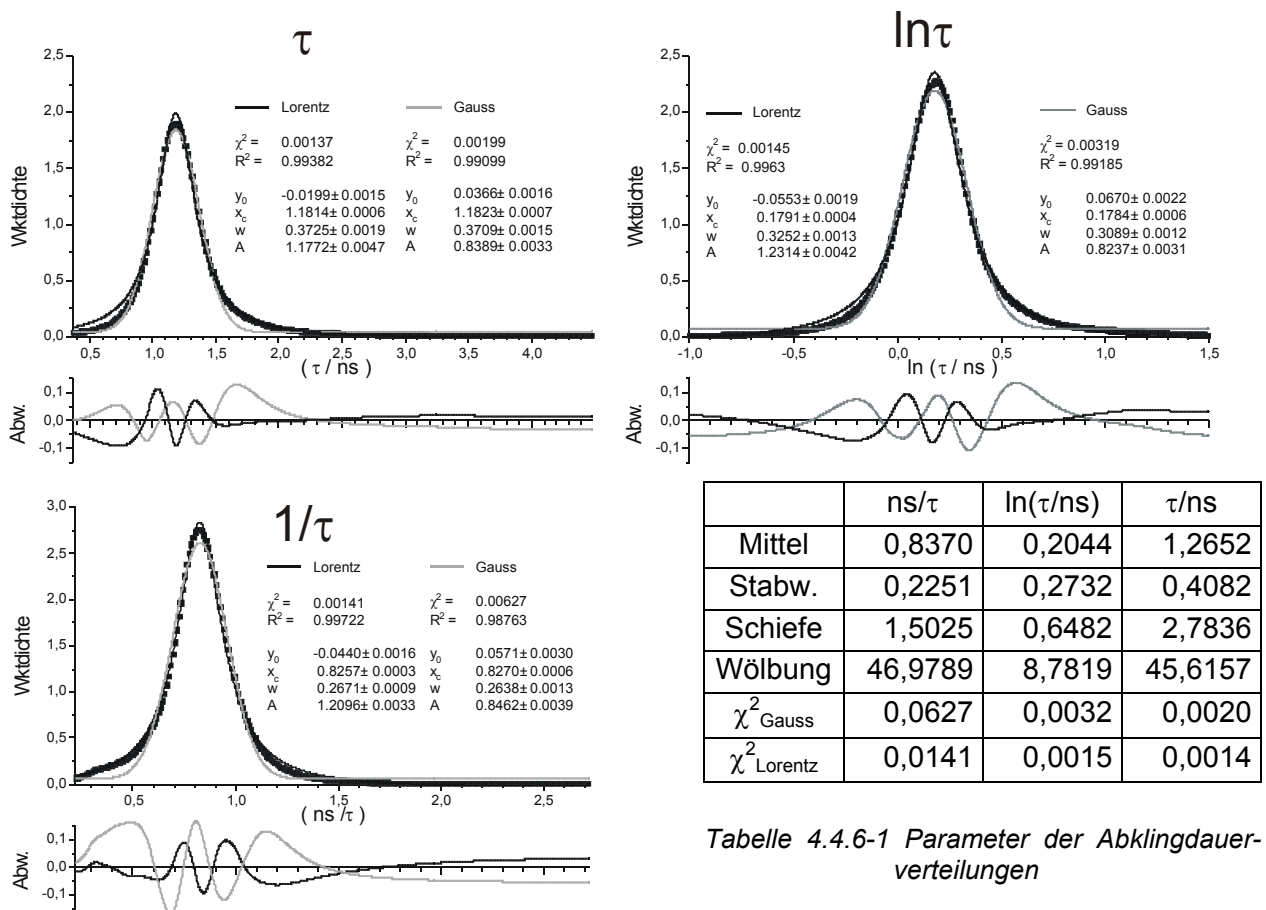


Abbildung 4.4.6-1 Lebensdauerverteilungsfunktionen von Cy5-dCTP. Die durchgezogenen Linien geben die gefitteten Gauß- bzw. Lorentzkurven wieder; unter den Verteilungsfunktionen sind die Abweichungen vom Modell auf einer vierfach überhöhten Ordinate aufgetragen.

In dieser Arbeit habe ich die Erfahrung gemacht, daß die Fluoreszenzabklingdauer eine rechtsschiefe Verteilungsfunktion aufweist mit $\lim_{\tau \rightarrow 0} W(\tau) = 0$.

Logarithmiert man die Abszisse so erhält man mit $W(\ln(\tau/\text{ns}))$ eine symmetrischere (weniger rechtsschiefe) Verteilung als es $W(\tau)$ oder $W(1/\tau)$ sind (s. Tabelle 4.4.6-1, Zeile „Schiefe“).

Von den Fitkurven beschreiben die Lorentzkurven an $W(\ln\tau)$ und $W(\tau)$ die empirischen Verteilungen im Beispiel von Abbildung 4.4.6-1 am besten.

<p>Gauß</p> $g(x) = \frac{A}{\frac{w}{2}\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{1}{2}\left(\frac{x-x_c}{w/2}\right)^2} + y_0$	<p>Lorentz</p> $l(x) = \frac{A}{\pi w/2} \frac{1}{\left(\frac{x-x_c}{w/2}\right)^2 + 1} + y_0$
--	--

Als Lösung diente Cy5-dCTP im Femtotip bei 9V Elektrodenspannung und 416 μW Anregungsleistung. Es wurden bei einem Gate von Kanal 12-30, Glättparametern von $w = 2,5$ ms und $s_0 = \infty$, einer Erkennungsschwelle von 3,1 kHz, einer Startschwelle von 0,5 kHz und einer Trennschwelle von 20% innerhalb von 300 s 829 Ereignisse registriert. Im Fall einer Mischung aus Cy5-dCMP und Mr121-dUMP (Daten sind im Abschnitt 4.4.4 gezeigt) ist der Fit mit $\ln\tau$ als Abszisse dem mit τ deutlich überlegen.

Betrachtet man die Fluoreszenzabklingdauer aller Ereignisse mit einer bestimmten Gesamtphotonenzahl Φ_0 so kann $\ln(\tau/\text{ns})$ in guter Näherung durch eine Normalverteilung beschrieben werden.

Die Breite der Verteilungsfunktion $\sigma_{\ln\tau}(\Phi_0)$ nimmt erwartungsgemäß mit steigender Photonenzahl Φ_0 ab (Abbildung 4.4.6-2, rechts).

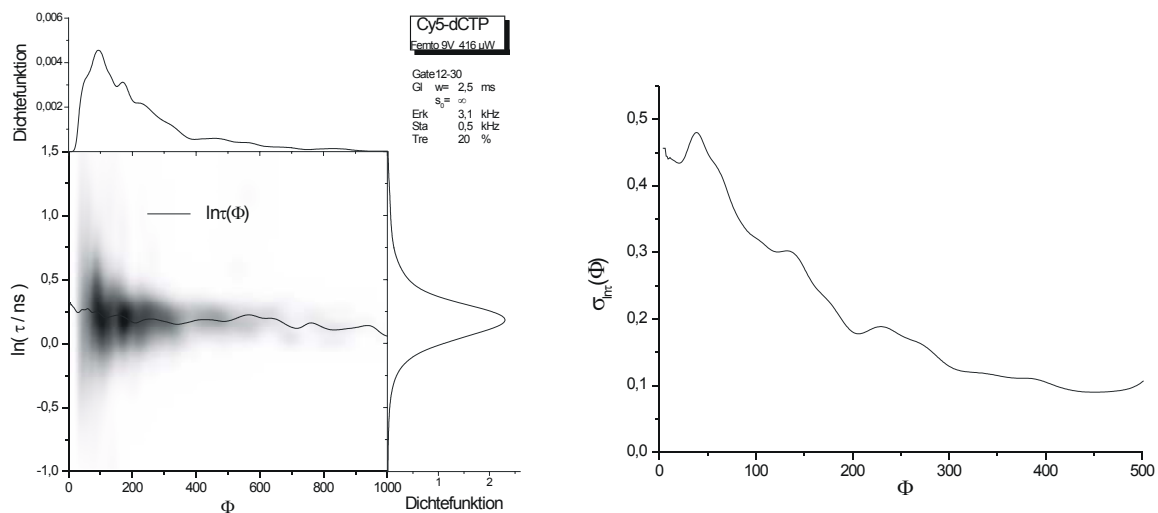


Abbildung 4.4.6-2 Verteilungsfunktion der Photonenzahl ϕ und der logarithmierten Abklingdauer τ
links: 2D-Dichtekarte
rechts: Die Breite der Verteilung der logarithmierten Abklingdauer nimmt mit steigender Photonenzahl ab.

Man erhält demnach für $\ln\tau$ eine Verteilungsfunktion, die durch Überlagerung unterschiedlich breiter Gaußkurven entsteht. Die breiteren Kurven haben dabei ein höheres Gewicht, da Ereignisse mit geringer Photonenzahl häufiger als solche mit hoher Photonenzahl sind (Abbildung 4.4.6-2, links). Das Ergebnis ist eine leptokurtische und annähernd symmetrische

Verteilungsfunktion. In der Praxis erweisen sich Lorentzkurven als eine geeignete Näherung für die Verteilungsfunktion von $\ln\tau$.

Abklingkurven

Die Abklingkurve des ereignisfreien Bereiches ist zwar kein Fluoreszenzereignisparameter, sie eignet sich jedoch gut zur Kontrolle der Ereigniserkennung, insbesondere der Start- und Erkennungsschwelle: Sind die Schwellen zu niedrig gewählt, zeigt sich in der Abklingkurve des ereignisfreien Untergrundes im Bereich des Gates ein Einbruch. Liegen die Schwellen zu hoch, wird die idealerweise wie die Streulichtkurve aussehende Untergrund-Abklingkurve durch Fluoreszenz verunreinigt.

Im Femtotip ist die Fluoreszenzereigniserkennung sehr viel eindeutiger als im Tropfen möglich. Daher ist der Untergrund der Messung im Tropfen auch mit wesentlich mehr Fluoreszenz vermischt (Abbildung 4.4.6-3, links). Umgekehrt sind die Fluoreszenzereignisse im Femtotip im Mittel höher, da der Anteil der Randdurchtritte durch die Kapillarwand gesenkt wird (Abbildung 4.4.6-3, rechts).

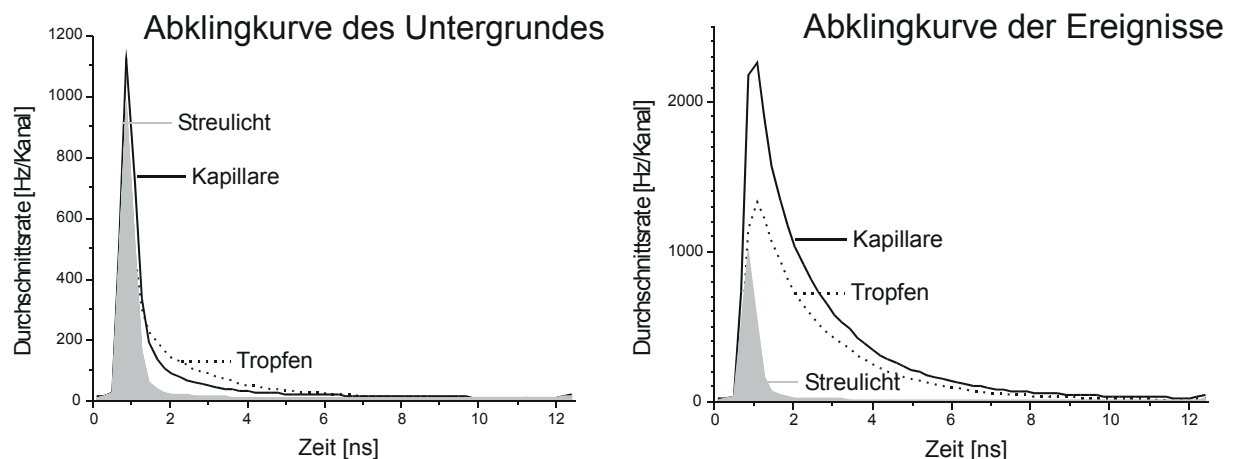


Abbildung 4.4.6-3 Abklingkurven des Untergrundes und der Ereignisse in Kapillare und Tropfen. Als Lösung diente eine 1:1-Mischung von Cy5-dCMP und Mr121-dUMP (beide etwa 5 fM).

4.5 Elektrophoretische Handhabung von Einzelmolekülen

In diesem Kapitel werden Versuche zur Handhabung von einzelnen Molekülen bzw. kleinen Gruppen von Molekülen beschrieben.

Ausgangspunkt dafür war die Beobachtung, daß (unter einem ultraviolett-Fluoreszenzmikroskop mit dem Auge sichtbar) mit „Cybr-grün“ interkalierte λ -Phagen-DNS in einen mit einer Anode versehenen Femtotip hereingezogen werden kann. Die DNS besteht aus einem 41kb langen, kreisförmig geschlossenen Doppelstrang. Der Farbstoff „Cybr-grün“ kann mit einer Quecksilber-Hochdrucklampe im ultravioletten Spektralbereich angeregt werden. Der interkalierte Farbstoff fluoresziert grün. Da das menschliche Auge in diesem Spektralbereich besonders empfindlich ist, gelingt es (unter einem konventionellen Fluoreszenzmikroskop) einem an Dunkelheit adaptierten Beobachter einzelne DNS - Moleküle als etwa $3\mu\text{m}$ lange, fadenförmige Gebilde zu erkennen. Taucht man einen mit einer Anode versehenen und mit Puffer gefüllten Femtotip in einen Tropfen Puffer, der interkalierte DNS enthält, so kann man bei etwa 20V Spannung zwischen der Anode und der in den Tropfen tauchenden Kathode beobachten, daß DNS-Moleküle in die Kapillare gesaugt werden, wenn ihr Abstand von der Öffnung weniger als etwa $5\mu\text{m}$ beträgt.

Das Ziel dieser Versuche ist, eine definierte Anzahl von Molekülen in ein Vorratsgefäß, den Femtotip, zu füllen. Im Rahmen dieser Arbeit wird eine solche Technik benötigt, um einen einzelnen markierten DNS-Strang für einen anschließenden Sequenzversuch zu selektieren. Man könnte die farbstoffmarkierten Ionen aber auch an anderer Stelle, wie z.B. im Inneren einer Zelle freisetzen. Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 4.5-1 dargestellt:

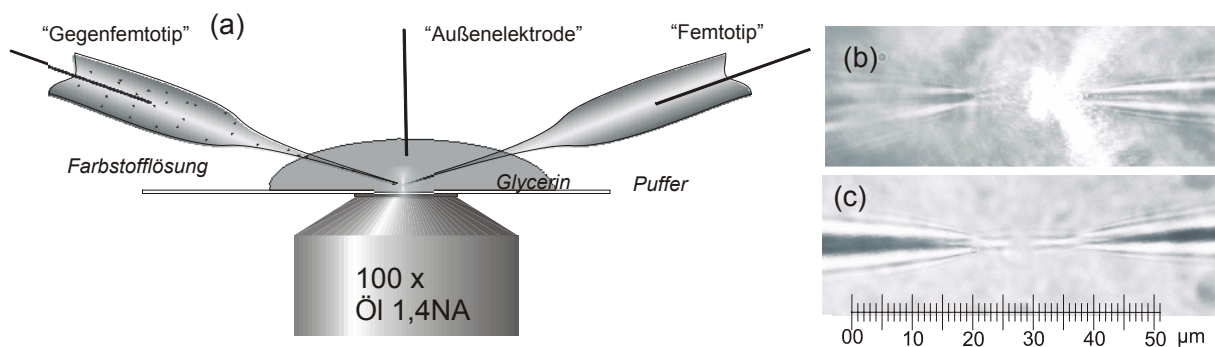


Abbildung 4.5-1 (a) Versuchsaufbau (b) Mikroskopaufnahme mit eingekoppeltem Laser (c) Mikroskopaufnahme ohne Laser (Abbildung mit 100x Objektiv auf CCD-Kamera)

(a) Dem mit reiner Pufferlösung gefüllten Femtotip ist ein mit Farbstofflösung gefüllter Gegenfemtotip gegenüber gestellt. Die Femtotips tauchen in einen Tropfen Glycerin, der sich auf einem Deckglas über einem Ölimmersionsobjektiv befindet. Beide Femtotips sowie der Glycerintropfen sind mit Platinelektroden versehen.

(b) Das Detektionsvolumen befindet sich an der Spitze des mit reiner Pufferlösung gefüllten Femtotips.

(c) Der Abstand zwischen den Spitzen beträgt ca. $2-3\mu\text{m}$.

Zu Beginn des Versuches befindet sich im Femtotip reiner Puffer, im Gegenfemtotip verdünnte, ca. $10^{-10}-10^{-12}\text{M}$, Farbstofflösung. Die Spitze des „leeren“ Femtotips befindet sich im Detektionsvolumen.

Um die negativ geladenen Farbstoffmoleküle aus dem „Gegenfemtutip“ in den „Femtutip“ zu ziehen, wird die Elektrode des Gegenfemtutips mit dem negativen, die des Femtutips mit dem positiven Pol einer Gleichspannungsquelle verbunden und die Fluoreszenz zeitaufgelöst detektiert. (Abbildung 4.5-2 a)

Anschließend werden die Elektroden von der Spannungsquelle getrennt. Der Strahlweg zum Detektor wird kurz unterbrochen, um den Umpolzeitpunkt später nachvollziehen zu können. Der Gegenfemtutip wird mit der Außenelektrode kurzgeschlossen und einige 10 μm vom Femtutip entfernt, um zu vermeiden, daß ausdiffundierender Farbstoff die Messung stört.

Um den Farbstoff wieder aus dem Femtutip zu entfernen, werden die Außenelektrode und der Gegenfemtutip mit dem positiven Pol der Spannungsquelle verbunden, der Femtutip mit dem negativen. Die Fluoreszenz der austretenden Farbstoffe wird zeitaufgelöst detektiert. (Abbildung 4.5.2b)

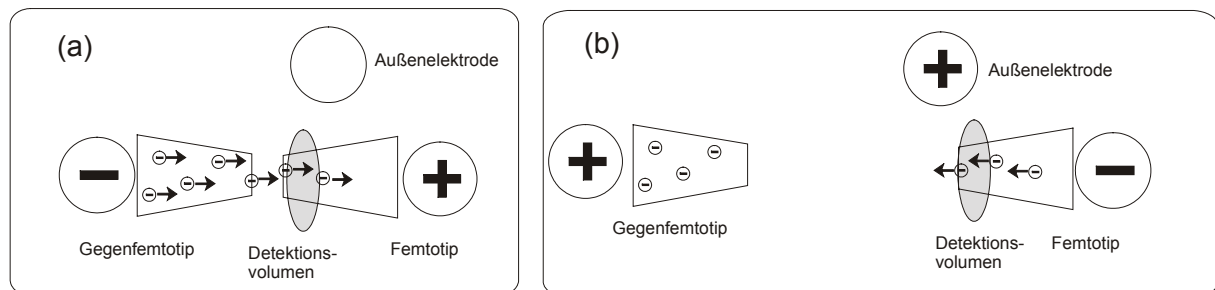


Abbildung 4.5-2 Versuchsprinzip

(a) „Reinziehen“ der Farbstoffe in den mit reinem Puffer gefüllten Femtutip

(b) „Rausziehen“ der in (a) reingezogenen Farbstoffmoleküle

Als Farbstofflösungen wurden eingesetzt:

- | | | |
|----|--|---|
| 1) | Cy5-dCTP ⁵⁻ | 5×10^{-10} M |
| 2) | Mr121-dUTP ³⁻ | 5×10^{-10} M |
| 3) | Ja133-dUTP ⁴⁻ | 5×10^{-11} M |
| 4) | Ja242-ddATP ³⁻ | 5×10^{-10} M |
| 5) | Mr121-dUTP ³⁻ +Cy5-dCTP ⁵⁻ | je $2,5 \times 10^{-10}$ M |
| 6) | PCR-Mischung | ca. 5×10^{-12} M an PCR-Produkt und 5×10^{-11} M an Cy5-dCMP ³⁻ und Mr121-dUMP ¹⁻ |

Als Lösungsmittel diente in allen Fällen der bereits beschriebene Femtopuffer (Kapitel 3.4.1). Im Raum zwischen den Kapillaren befindet sich Glycerin. Als Objektiv diente ein auf 160 mm Tubuslänge korrigiertes 1,4 NA Ölimmersionsobjektiv der Firma Olympus mit einer Vergrößerung von 100 \times .

4.5.1 Symmetrieparametrisierung durch Kreuzkorrelation

Eine interessante Frage bei diesen Experimenten ist, ob die Spur der „rausgezogenen“ Moleküle symmetrisch zur Spur der „reingezogenen“ Moleküle ist. Um einen ersten Eindruck zu gewinnen, kann die Anzahl der detektierten Photonschauer gegen die Meßzeit aufgetragen werden. Sind die Spuren symmetrisch, sollte der Umpolzeitpunkt ein Wendepunkt dieser Kurve sein, der Zentrum einer Inversionssymmetrie ist. Um mit der selben Graphik einen optischen Eindruck des Verhältnisses der herein- und herausgezogenen Fluorophore zu vermitteln, werden die Fluoreszenzereignisse während des Rausziehens besser negativ gezählt; die Inversionssymmetrie geht dann in eine Spiegelsymmetrie über und der y-Wert gibt im Idealfall die Zahl der Moleküle an, die sich gerade im „Femtotip“ befinden (s. Abbildungen 4.5.2-1 bis 4.5.2 - 2, 4.5.3-1 bis 4.5.3-2, 4.5.4-4 bis 4.5.4-6, 4.5.5-2 bis 4.5.5-5, 4.5.6-2, 4.5.7-4 und 4.5.8-1).

Um einen quantitativen Parameter für die Symmetrie zu erhalten, wird die Kreuzkorrelation zwischen der Spur, die während des Hereinziehens und der Spur die während des Herausziehens gemessen wurde, errechnet. Dazu wird zunächst die Spur am Umpolzeitpunkt t_0 gespalten, und die reingezogene Spur an der Ordinate gespiegelt:

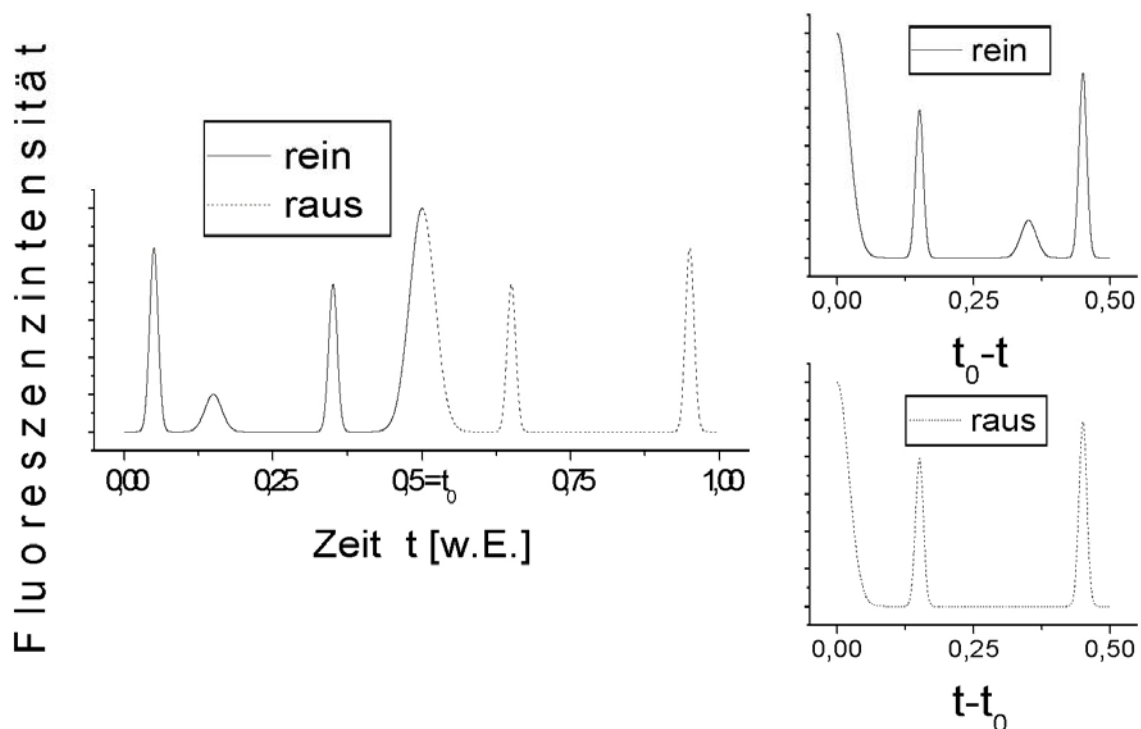


Abbildung 4.5.1-1 Spaltung der Spur zur Ermittlung der Symmetrie über die Kreuzkorrelation.

$$\text{Rein}(t) \equiv \text{Spur}(t_0-t)$$

$$\text{Raus}(t) \equiv \text{Spur}(t_0+t)$$

Die Korrelationsfunktion $[f \otimes g](\theta)$ zweier Funktionen $f(t)$, $g(t)$ sei dabei definiert als:

$$[f \otimes g](\theta) \equiv \frac{\langle f(t) \cdot g(t+\theta) \rangle}{\langle f(t) \rangle \langle g(t) \rangle} \quad (4.5.1-1)$$

In der Literatur [z.B. Numerical Recipes in C] wird bisweilen eine andere Vorzeichenkonvention bezüglich θ verwendet und die Normierung durch $\langle f \rangle \langle g \rangle$ weggelassen.

Eine negative Verschiebung θ ist Äquivalent zu einer Vertauschung der Funktionen:

$$[f \otimes g](\theta) = [g \otimes f](-\theta) \quad (4.5.1-2)$$

Die Korrelationsfunktion einer Funktion mit sich selbst ist die in dieser Arbeit bereits mehrfach verwendete Autokorrelationsfunktion (Abschnitte 2.6 und 4.2).

Falls eine Symmetrie in der Abfolge der Fluoreszenzereignisse enthalten ist, hängt die Wahrscheinlichkeit dafür, ein Ereignis zum Zeitpunkt $t+t_0$ zu detektieren von der Wahrscheinlichkeit ab, daß zum Zeitpunkt t_0-t ebenfalls eines detektiert wurde.

In diesem Fall ist also $\lim_{\theta \rightarrow 0} [rein(t) \otimes raus(t)](\theta) > 0$ zu erwarten. Liegt die Symmetrieachse nicht bei $t=t_0$, sondern bei einem anderen Zeitpunkt t_{Symm} , so liegt das Maximum in der Kreuzkorrelationsfunktion nicht bei $\theta = 0$, sondern bei $\theta = t_{Symm} - t_0$. Wenn die Symmetrie perfekt ist, gilt $rein(t) = raus(t)$. Die Kreuzkorrelationsfunktion ist dann identisch mit den Autokorrelationsfunktionen der beiden Spuren. Wird die Kreuzkorrelationsfunktion durch die Amplitude der Autokorrelationsfunktion geteilt, so gibt die Höhe des Korrelationsmaximums einen quantitativen Parameter für das Ausmaß der Symmetrie. Werden statt der Funktionen f, g ihre Abweichungen $\delta f, \delta g$ von den Mittelwerten \bar{f}, \bar{g} korreliert,

$$[\delta f \otimes \delta g]_{Normiert}(\theta) = \frac{[\delta f \otimes \delta g](\theta)}{\sqrt{[\delta f \otimes \delta f](\tau \rightarrow 0) \cdot [\delta g \otimes \delta g](\tau \rightarrow 0)}} \quad (4.5.1-3)$$

so läßt sich die Korrelationsfunktion folgendermaßen interpretieren: Ein Maximum der Höhe 1 bedeutet perfekte Symmetrie, ist die Kreuzkorrelationsfunktion überall Null, so ist keine Symmetrie vorhanden. Ein Funktionswert < 0 würde eine ungerade Symmetrie bedeuten:

Perfekte gerade Symmetrie: $\delta f(t) = \delta g(t + \theta_{Symm})$

$$[\delta f \otimes \delta g]_{Normiert}(\theta_{Symm}) = \frac{\langle \delta f^2 \rangle}{\sqrt{\langle \delta f^2 \rangle \langle \delta f^2 \rangle}} = 1 \quad (4.5.1-4^a)$$

Perfekte ungerade Symmetrie: $\delta f(t) = -\delta g(t + \theta_{Symm})$

$$[\delta f \otimes \delta g]_{Normiert}(\theta_{Symm}) = \frac{\langle \delta f \cdot (-\delta f) \rangle}{\sqrt{\langle \delta f^2 \rangle \langle \delta f^2 \rangle}} = -1 \quad (4.5.1-4^b)$$

Keine Korrelation: $\langle \delta f(t) \delta g(t+\theta) \rangle = \langle \delta f(t) \rangle \langle \delta g(t+\theta) \rangle = \langle \delta f(t) \rangle \langle \delta g(t) \rangle$

$$[\delta f \otimes \delta g]_{\text{Normiert}}(\theta) = \frac{\langle \delta f \rangle \langle \delta g \rangle}{\sqrt{\langle \delta f^2 \rangle \langle \delta g^2 \rangle}} = \frac{0 \cdot 0}{\sqrt{\langle \delta f^2 \rangle \langle \delta g^2 \rangle}} = 0 \quad (4.5.1-4^c)$$

Liegen die Funktionen analytisch vor, so kann man, wie in den Gleichungen 4.5.1-4^{a-c},

geschehen $[\delta f \otimes \delta f](\tau \rightarrow 0) = \frac{\langle \delta f^2 \rangle}{\langle f \rangle^2}$ setzen. Bei Meßdaten ist dies aufgrund der

stochastischen Natur des Detektionsvorganges nicht zulässig („Schrotrauschen“), so daß dort der Grenzwert gebildet werden muß. Für die hier gemachten theoretischen Überlegungen ist das jedoch irrelevant. Damit erhält man

$$[\delta f \otimes \delta g]_{\text{Normiert}}(\theta) = \frac{\langle \delta f(t) \delta g(t+\theta) \rangle}{\langle f \rangle \langle g \rangle} \cdot \frac{\sqrt{\langle f \rangle^2 \langle g \rangle^2}}{\sqrt{\langle \delta f^2 \rangle \langle \delta g^2 \rangle}} = \frac{\langle \delta f(t) \delta g(t+\theta) \rangle}{\sqrt{\langle \delta f^2 \rangle \langle \delta g^2 \rangle}}$$

$$\begin{aligned} [\delta f \otimes \delta g]_{\text{Normiert}}(\theta) &= \frac{\langle (f(t) - \bar{f})(g(t+\theta) - \bar{g}) \rangle}{\sqrt{\langle (f - \bar{f})^2 \rangle \langle (g - \bar{g})^2 \rangle}} = \frac{\langle f(t)g(t+\theta) - \bar{f}g(t+\theta) - f(t)\bar{g} + \bar{f}\bar{g} \rangle}{\sqrt{\langle f^2 - 2\bar{f}f + \bar{f}^2 \rangle \langle g^2 - 2\bar{g}g + \bar{g}^2 \rangle}} \\ &= \frac{\langle f(t)g(t+\theta) \rangle - \bar{f}\bar{g}}{\sqrt{(\langle f^2 \rangle - \bar{f}^2) \langle g^2 \rangle - \bar{g}^2}} \end{aligned}$$

Probleme mit dieser Methode treten auf, wenn die Moleküle mit unterschiedlicher Geschwindigkeit herein- und herausgezogen werden: Die Spuren sind dann nicht mit einem fixen Zeitintervall θ_{Peak} gegeneinander verschoben, sondern mit einer Funktion $\theta_{\text{Peak}}(t)$. Das Maximum in der Kreuzkorrelationsfunktion ist in diesem Fall verbreitert und möglicherweise nicht mehr erkennbar. Das läßt sich dadurch berücksichtigen, daß man eine der beiden Spuren mit unterschiedlichen Faktoren s staucht oder streckt und die Kreuzkorrelationsfunktion beobachtet.

$$\begin{aligned} [\delta f \otimes \delta g](\theta, s) &\equiv \frac{\left\langle \delta f(t) \delta g\left(\frac{t+\theta}{s}\right) \right\rangle}{\lim_{\tau \rightarrow 0} \sqrt{\langle \delta f(t) \delta f(t+\tau) \rangle \langle \delta g(t) \delta g(t+\tau) \rangle}} \quad (4.5.1-5) \\ &= \frac{\left\langle f(t) g\left(\frac{t+\theta}{s}\right) \right\rangle - \langle f(t) \rangle \left\langle g\left(\frac{t}{s}\right) \right\rangle}{\lim_{\tau \rightarrow 0} \sqrt{\langle f(t) f(t+\tau) \rangle - \langle f(t) \rangle^2} \sqrt{\left\langle g\left(\frac{t}{s}\right) g\left(\frac{t+\tau}{s}\right) \right\rangle - \left\langle g\left(\frac{t}{s}\right) \right\rangle^2}} \end{aligned}$$

Wenn man das Schrotrauschen nicht beachten muß, vereinfacht sich die Gleichung zu:

$$[\delta f \otimes \delta g](\theta, s) \equiv \frac{\left\langle f(t)g\left(\frac{t+\theta}{s}\right) \right\rangle - \langle f(t) \rangle \left\langle g\left(\frac{t}{s}\right) \right\rangle}{\sqrt{\left\langle f^2(t) \right\rangle - \langle f(t) \rangle^2} \sqrt{\left\langle g^2\left(\frac{t}{s}\right) \right\rangle - \left\langle g\left(\frac{t}{s}\right) \right\rangle^2}} \quad (4.5.1-6)$$

Die Abszisse, d.h. die j-Achse des Datensatzes g_j wird um den Faktor s gestaucht. $g(s)_j$ gibt dann den gestreckten Datensatz wieder:

$$j' = (\text{int})(j/s) \quad nks = (\text{int}(100 \cdot j/s) \% 100) / ((\text{double})100)$$

$$g(s)_j = g_{j'} + (g_{j'+1} - g_{j'}) \cdot nks$$

Für $s < 1$ erhält man z.T. Indices j' , die außerhalb des Meßbereiches liegen. In diesem Fall werden die fehlenden Werte 0 gesetzt.

Die Kreuzkorrelationsfunktionen lassen sich aus den Datensätzen gemäß

$$C(s)_j = [\delta f \otimes \delta g(s)]_j = \frac{\frac{1}{N-j} \sum_{i=1}^{N-j} \delta f_i \delta g_{i+j}(s)}{\left(\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N f_i\right) \left(\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N g_i\right)} ; C(s)_{-j} = [\delta g(s) \otimes \delta f]_j \quad ; j = 0, \dots, N-1 \quad (4.5.1-7)$$

errechnen. Zur Normierung werden sie durch das geometrische Mittel der Amplituden der Autokorrelationsfunktionen, $\sqrt{\left(\lim_{\theta \rightarrow 0} [\delta g \otimes \delta g](\theta)\right) \left(\lim_{\theta \rightarrow 0} [\delta f \otimes \delta f](\theta)\right)}$ geteilt. Damit erhält man mit dem Maximum $0 \leq C_{j,\max} \leq 1$ eine Maßzahl für die Symmetrie.

Die Berechnung einer einzelnen Korrelationsfunktion in der Zeitdomäne erfordert bei typischerweise 10^5 Bins je Spur etwa 90 Minuten. Da zur Auswertung einer einzelnen Messung mehrere hundert dieser Funktionen bei verschiedenen Streckfaktoren benötigt werden, ist diese Rechenzeit unpraktikabel. Die Rechenzeit läßt sich jedoch auf einige Sekunden verkürzen, wenn die Korrelationsfunktion statt in der Zeitdomäne in der Frequenzdomäne errechnet wird: Die Summenbildung in Gleichung 4.5.1-7 erübrigt sich dann und wird durch ein einfaches Produkt ersetzt (Korrelationstheorem). Der Übergang aus der Zeit- in die Frequenzdomäne und umgekehrt erfolgt dabei durch eine Fast-Fourier-Transformation (FFT) [Numerical Recipes in C Kap. 12.2 und 13.2]:

$$\left. \begin{array}{l} f_j \xrightarrow{-\bar{f}} \delta f_j \xrightarrow{FFT} \tilde{\delta f}_j \\ g_{j'} \xrightarrow{-\bar{g}} \delta g_{j'} \xrightarrow{j=j'/s} \delta g_j(s) \xrightarrow{FFT} \tilde{\delta g}_j(s) \end{array} \right\} \tilde{c}'_j(s) = \tilde{\delta f}_j^* \cdot \tilde{\delta g}_j(s) \xrightarrow{FFT^{-1}} c'_j \xrightarrow{\frac{1}{\langle g \rangle \langle h \rangle}} c_j \quad (4.5.1-8)$$

Die Streckung könnte im Prinzip auch im Fourierraum stattfinden, so daß die FFT in den Frequenzraum nur einmal durchgeführt werden müßte. Das scheitert jedoch praktisch daran, daß die Werte der fouriertransformierten Funktion nicht durch Interpolation aufzufinden sind, weil das Spektrum zu schnell schwankt.

Um die Ergebnisse des Verfahrens zu überprüfen, wird es auf zwei Paare von Funktionen angewandt. Im ersten Fall entspricht die zweite Funktion der ersten, wobei die Abszisse zunächst um -100 ms verschoben und anschließend um den Faktor 1/0,9 gestreckt wird. Im zweiten Fall entstammen die Funktionen unterschiedlichen Messungen, so daß sie sicher nicht korreliert sind. Abbildung 4.5.1-2 zeigt die vier Spuren:

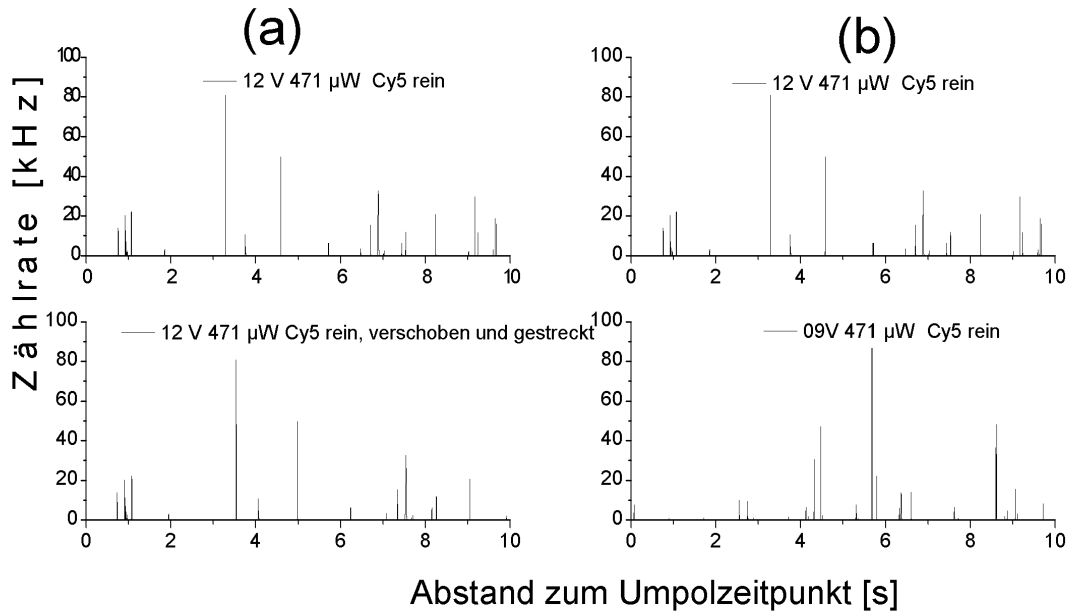


Abbildung 4.5.1-2 Testdaten (aus Abschnitt 4.5.6) zur Evaluation des Korrelationsverfahrens zur Symmetriestimmung

(a) korrelierte Testdaten

(b) unkorrelierte Testdaten.

Die Korrelationsfunktionen der beiden Spurenpaare (Abbildung 4.5.1-3) weisen in beiden Fällen unerwartet viele Maxima auf:

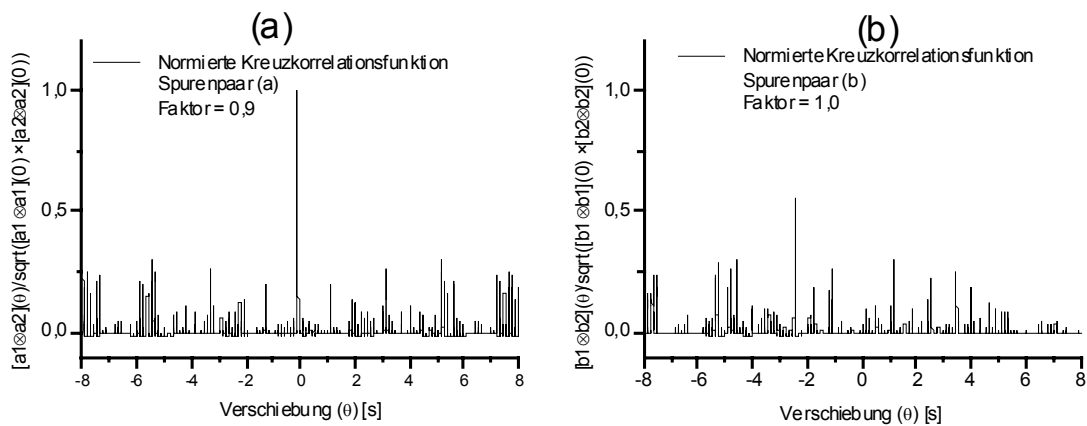


Abbildung 4.5.1-3 Korrelationsfunktionen

(a) der korrelierten Testdaten

(b) der unkorrelierten Testdaten

Dies rührt daher, daß nur eine geringe Anzahl von Fluoreszenzereignissen in den Spuren enthalten ist, so daß auch an sich unkorrelierte Ereignisse zu einem Maximum in der Korrelationsfunktion führen. Bei einer ausreichend großen Anzahl von Fluoreszenzereignissen würden sich diese Maxima gegen die (negative) Basislinie wegmitteln.

Um die Korrelationsfunktionen bei unterschiedlichen Streckfaktoren übersichtlich wiederzugeben, wird eine Graustufenkarte verwendet. Ein Maximum entspricht einem dunklen Pixel auf der Karte:

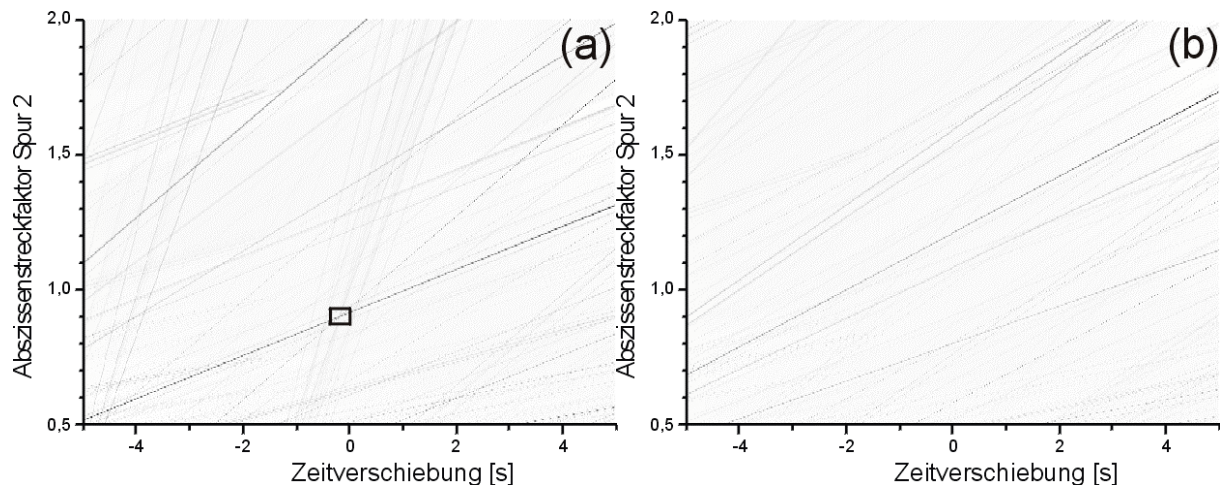


Abbildung 4.5.1-4 Graustufenkarte der Korrelationsfunktionen bei verschiedenen Streckfaktoren. Dunkle Pixel entsprechen Maxima der Korrelationsfunktionen.

(a) korrelierte Testdaten

(b) unkorrelierte Testdaten

Man erhält sowohl bei den korrelierten als auch bei den unkorrelierten Testdaten eine sehr große Anzahl von Maxima in der zweidimensionalen Korrelationskarte: Definiert man ein Maximum als einen zusammenhängenden Bereich der Korrelationsfunktion in dem der Funktionswert 8 % des geometrischen Mittels der Amplituden der Autokorrelationsfunktionen übersteigt, so erhält man in den 501 Zeilen (Streckfaktoren) der Abbildung 4.5.1-4 in beiden Fällen mehrere tausend Maxima. Man erkennt, daß die Maxima mit wachsendem Streckfaktor einer systematischen Verschiebung ihres Korrelationszeitmaximums unterworfen sind, so daß sie sich in der Graustufenkarte zu Linien anordnen. Das „richtige“ Korrelationsmaximum in Abbildung 4.5.1-4a bei $\theta = -0,1$ s und einem Streckfaktor von 0,9 zeichnet sich dadurch aus, daß sich dort mindestens vier solcher Linien in einem einzigen Punkt schneiden.

Das markierte Rechteck in Abbildung 4.5.1-4 a entspricht dem in Abbildung 4.5.1-5 vergrößert dargestellten Korrelationsmaximum.

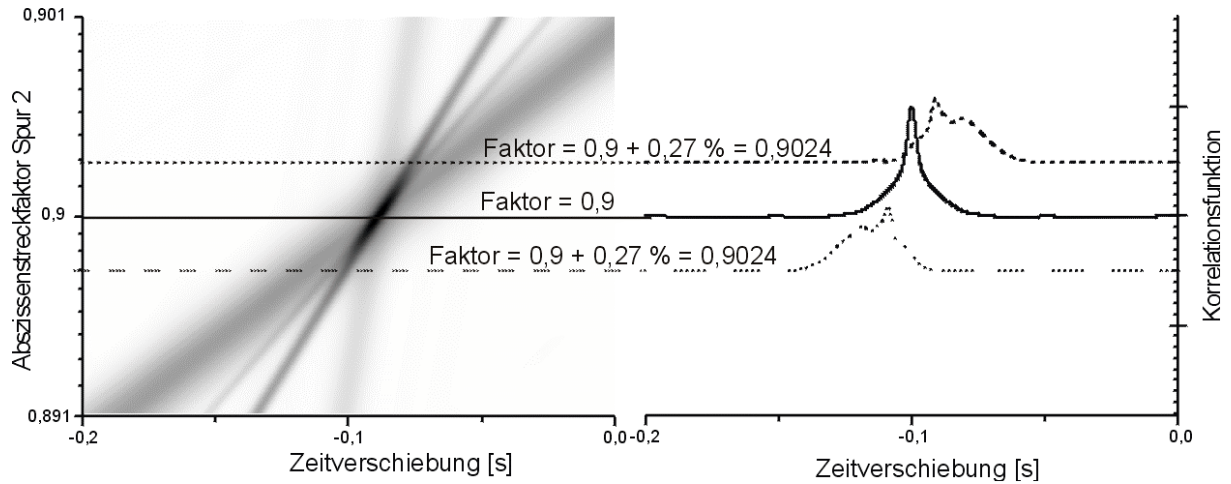


Abbildung 4.5.1-5 Vergrößerte Darstellung des Maximums der korrelierten Testdaten

links: Graustufenskala

rechts: Schnittlinien.

Bereits eine Verstimmung um wenige Promille verändert Form, Höhe und Lage des Korrelationsmaximums erheblich.

Für die folgenden theoretischen Überlegungen sei angenommen, daß die Fluoreszenzintensitäten $f(t)$ und $g(t)$ auf beiden Spuren exakt bekannt, also nicht durch eine Meßstatistik und eine endliche Binweite verrauscht sind. Die Mittelung in Gl. 4.5.1-6 geschieht dann durch Integration über die Meßzeit T :

$$[\delta f \otimes \delta g](\theta, s) = \frac{\frac{1}{\ddot{U}(T, \theta, s)} \int_{\ddot{U}_-(T, \theta, s)}^{\ddot{U}_+(T, \theta, s)} f(t) g\left(\frac{t+\theta}{s}\right) dt - \frac{1}{T} \int_0^T f(t) dt \cdot \frac{1}{sT} \int_0^{sT} g\left(\frac{t}{s}\right) dt}{\sqrt{\left(\frac{1}{T} \int_0^t f^2(t) dt - \left(\frac{1}{T} \int_0^T f(t) dt\right)^2\right) \left(\frac{1}{sT} \int_0^{sT} g^2\left(\frac{t}{s}\right) dt - \left(\frac{1}{sT} \int_0^{sT} g\left(\frac{t}{s}\right) dt\right)^2\right)}}$$

$t' = t/s$:

$$\frac{\frac{1}{\ddot{U}(T, \theta, s)} \int_{\ddot{U}_-(T, \theta, s)}^{\ddot{U}_+(T, \theta, s)} f(t) g\left(\frac{t+\theta}{s}\right) dt - \frac{1}{T} \int_0^T f(t) dt \cdot \frac{1}{T} \int_0^T g(t') dt'}{\sqrt{\left(\frac{1}{T} \int_0^t f^2(t) dt - \left(\frac{1}{T} \int_0^T f(t) dt\right)^2\right) \left(\frac{1}{T} \int_0^T g^2(t') dt' - \left(\frac{1}{T} \int_0^T g(t') dt'\right)^2\right)}} \quad (4.5.1-9)$$

$\ddot{U}(T, \theta, s) = \ddot{U}_+(T, \theta, s) - \ddot{U}_-(T, \theta, s)$ gibt die Länge des Bereichs an, in dem sowohl $f(t)$ als auch $g((t+\theta)/s)$ durch die Messung bestimmt sind. Außerhalb des Intervalls $[\ddot{U}_-(T, \theta, s), \ddot{U}_+(T, \theta, s)]$ ist mindestens eine der Funktionen nicht gemessen und wird Null gesetzt.

Für jede beliebige Zeit t innerhalb des Überlappzeitraums $[\ddot{U}_-, \ddot{U}_+]$ gilt:

$$0 \leq t \leq T \quad \wedge \quad 0 \leq \frac{t+\theta}{s} \leq T \quad \forall \quad \ddot{U}_-(T, \theta, s) \leq t \leq \ddot{U}_+(T, \theta, s)$$

Daraus folgt:

$$\left. \begin{array}{l}
 \ddot{U}_- = 0 \quad \ddot{U}_+ = s(T + \theta) \quad \ddot{U} = s(T + \theta) \quad \text{falls} \quad -T \leq \theta < 0 \\
 \ddot{U}_- = s\theta \quad \ddot{U}_+ = s(T + \theta) \quad \ddot{U} = sT \quad \text{falls} \quad 0 \leq \theta < \frac{1-s}{s}T \\
 \ddot{U}_- = s\theta \quad \ddot{U}_+ = T \quad \ddot{U} = T - s\theta \quad \text{falls} \quad \frac{1-s}{s}T \leq \theta \leq \frac{T}{s}
 \end{array} \right\} s \leq 1 \\
 \left. \begin{array}{l}
 \ddot{U}_- = 0 \quad \ddot{U}_+ = s(T + \theta) \quad \ddot{U} = s(T + \theta) \quad \text{falls} \quad -T \leq \theta < \frac{1-s}{s}T \\
 \ddot{U}_- = 0 \quad \ddot{U}_+ = T \quad \ddot{U} = T \quad \text{falls} \quad \frac{1-s}{s}T \leq \theta < 0 \\
 \ddot{U}_- = s\theta \quad \ddot{U}_+ = T \quad \ddot{U} = T - s\theta \quad \text{falls} \quad 0 \leq \theta \leq \frac{T}{s}
 \end{array} \right\} s > 1 \quad (4.5.1-10)$$

$$\ddot{U} = 0 \quad \text{falls} \quad \theta < -T \vee \frac{T}{s} < \theta$$

Um die bisher gewonnenen Erkenntnisse zu vertiefen, sei im folgenden angenommen, daß sich beide Spuren als eine Summe von Fluoreszenzereignissen darstellen lassen:

$$f(t) = \sum_{i=1}^{\text{Anzahl Ereignisse}} f_i(t)$$

Die Fläche unter f_i entspricht der Zahl der Photonen im Ereignis i .

Um mit den Integralen arbeiten zu können müssen, die Spuren parametrisiert werden. Hier werden Gaußkurven verwendet, da sie eine analytische Behandlung der Integrale zulassen:

Die Spur $f(t)$ wird beschrieben als Summe von Gaußkurven $f_i(t)$,

$$f(t) = \sum_{i=1}^{\text{Anzahl Ereignisse}} f_i = \sum_{i=1}^{\text{Anzahl Ereignisse}} \frac{\Phi_i}{\sigma_i \sqrt{2\pi}} e^{-\frac{1}{2} \left(\frac{t - \mu_i}{\sigma_i} \right)^2} \quad (4.5.1-11)$$

wobei

$$\Phi_i = \sum_{j=\text{erster Bin des Ereignisses}}^{\text{letzter Bin des Ereignisses}} \text{MCS}[j] \quad (4.5.1-12^a)$$

die Zahl der Photonen des Ereignisses i angibt,

$$\mu_i = \frac{1}{\Phi_i} \sum_{j=\text{erster Bin des Ereignisses}}^{\text{letzter Bin des Ereignisses}} t[j] \cdot \text{MCS}[j] \quad (4.5.1-12^b)$$

seinen Schwerpunkt und

$$\sigma_i = \sqrt{\frac{1}{\Phi_i - 1} \sum_{j=\text{erster Bin des Ereignisses}}^{\text{letzter Bin des Ereignisses}} (t[j] - \mu_i)^2 \cdot \text{MCS}[j]} \quad (4.5.1-12^c)$$

seine Breite.

Um die Integrale analytisch zu berechnen, muß man die Integrationsgrenzen, in Gleichung 4.5.1-9 so erweitern, daß die Integrale von $-\infty$ bis ∞ laufen. Der dabei gemachte Fehler ist

bedeutungslos, solange $\left(\frac{\mu_i}{\sigma_i} \right)^2 \gg 1 \quad \wedge \quad \left(\frac{\mu_i - T}{\sigma_i} \right)^2 \gg 1 \quad \cdot \quad \wedge \quad \left(\frac{\mu_i - \ddot{U}_-}{\sigma_i} \right)^2 \gg 1$

$\wedge \left(\frac{\mu_i - \ddot{U}_+}{\sigma_i} \right)^2 \gg 1 \quad \forall \quad 1 \leq i \leq N$. In Worten bedeutet das, daß kein Ereignis so nahe an einer der Grenzen 0, T, \ddot{U}_- , \ddot{U}_+ liegen darf, daß er zu einem erheblichen Teil aus dem Meßbereich herausragt. Da die Breite σ der Ereignisse nur einige Millisekunden beträgt, während die Meßzeit T typischerweise einige 10s und der Ereignisabstand im Mittel etwa 0,1 s beträgt, ist diese Forderung bei den vorliegenden Experimenten im allgemeinen erfüllt:

$$[\delta f \otimes \delta g](\theta, s) = \frac{\frac{1}{\ddot{U}(T, \theta, s)} \int_{-\infty}^{\infty} f(t) g\left(\frac{t+\theta}{s}\right) dt - \frac{1}{T} \int_{-\infty}^{\infty} f(t) dt \cdot \frac{1}{T} \int_{-\infty}^{\infty} g(t) dt}{\sqrt{\left(\frac{1}{T} \int_{-\infty}^{\infty} f^2(t) dt - \left(\frac{1}{T} \int_{-\infty}^{\infty} f(t) dt \right)^2 \right) \left(\frac{1}{T} \int_{-\infty}^{\infty} g^2(t) dt - \left(\frac{1}{T} \int_{-\infty}^{\infty} g(t) dt \right)^2 \right)}}$$

Das uneigentliche Integral über ein Produkt zweier Gaußkurven läßt sich analytisch angeben:

$$\int_{-\infty}^{\infty} \frac{\Phi_1}{\sigma_1 \sqrt{2\pi}} e^{-\frac{1}{2} \left(\frac{t-\mu_1}{\sigma_1} \right)^2} \frac{\Phi_2}{\sigma_2 \sqrt{2\pi}} e^{-\frac{1}{2} \left(\frac{t-\mu_2}{\sigma_2} \right)^2} dt = \frac{\Phi_1 \Phi_2}{\sqrt{2\pi} \sqrt{\sigma_1^2 + \sigma_2^2}} e^{-\frac{1}{2} \frac{(\mu_1 - \mu_2)^2}{\sigma_1^2 + \sigma_2^2}}$$

Die Spuren werden nun durch die Summen ihrer Fluoreszenzereignisse substituiert: Mit

$$f(t) = \sum_{i=1}^{N_f} f_i(t) \quad \text{und} \quad g\left(\frac{t}{s}\right) = \sum_{j=1}^{N_g} g_j\left(\frac{t}{s}\right) \quad \text{erhält man}$$

$$[\delta f \otimes \delta g](\theta, s) = \frac{\frac{1}{\ddot{U}(T, \theta, s)} \int_{-\infty}^{\infty} \sum_{i=1}^{N_f} f_i(t) \sum_{j=1}^{N_g} g_j\left(\frac{t+\theta}{s}\right) dt - \frac{1}{T} \int_{-\infty}^{\infty} \sum_{i=1}^{N_f} f_i(t) dt \cdot \frac{1}{T} \int_{-\infty}^{\infty} \sum_{j=1}^{N_g} g_j(t) dt}{\sqrt{\left(\frac{1}{T} \int_{-\infty}^{\infty} \left(\sum_{i=1}^{N_f} f_i(t) \right)^2 dt - \left(\frac{1}{T} \int_{-\infty}^{\infty} \sum_{i=1}^{N_f} f_i(t) dt \right)^2 \right) \left(\frac{1}{T} \int_{-\infty}^{\infty} \left(\sum_{j=1}^{N_g} g_j(t) \right)^2 dt - \left(\frac{1}{T} \int_{-\infty}^{\infty} \sum_{j=1}^{N_g} g_j(t) dt \right)^2 \right)}}$$

Die Integrale kann man in die Summen ziehen und erhält damit für die einzelnen Terme:

$$\begin{aligned} \left\langle f(t) g\left(\frac{t+\theta}{s}\right) \right\rangle &= \frac{1}{\ddot{U}(T, \theta, s)} \sum_{i=1}^{N_f} \sum_{j=1}^{N_g} \int_{-\infty}^{\infty} f_i(t) g_j\left(\frac{t+\theta}{s}\right) dt \\ &= \frac{1}{\ddot{U}} \sum_{i=1}^{N_f} \sum_{j=1}^{N_g} \int_{-\infty}^{\infty} \frac{\Phi_i}{\sigma_i \sqrt{2\pi}} e^{-\frac{1}{2} \left(\frac{t-\mu_i}{\sigma_i} \right)^2} \frac{\Phi_j}{\sigma_j \sqrt{2\pi}} e^{-\frac{1}{2} \left(\frac{t+\theta}{s} - \mu_j \right)^2} dt \\ &= \frac{1}{\ddot{U}} \sum_{i=1}^{N_f} \sum_{j=1}^{N_g} \int_{-\infty}^{\infty} \frac{\Phi_i}{\sigma_i \sqrt{2\pi}} e^{-\frac{1}{2} \left(\frac{t-\mu_i}{\sigma_i} \right)^2} \frac{s \Phi_j}{s \sigma_j \sqrt{2\pi}} e^{-\frac{1}{2} \left(\frac{t+\theta-s\mu_j}{s\sigma_j} \right)^2} dt \end{aligned}$$

$$= \frac{s}{\ddot{U}} \sum_{i=1}^{N_f} \sum_{j=1}^{N_g} \frac{\Phi_i \Phi_j}{\sqrt{2\pi} \sqrt{\sigma_i^2 + s^2 \sigma_j^2}} e^{-\frac{1}{2} \frac{(\theta - (s\mu_j - \mu_i))^2}{\sigma_i^2 + s^2 \sigma_j^2}}$$

$$\bar{f} = \langle f(t) \rangle = \frac{1}{T} \sum_{i=1}^{N_f} \int_{-\infty}^{\infty} f_i(t) dt = \frac{\sum_{i=1}^{N_f} \Phi_i}{T} \quad \bar{g} = \langle g(t) \rangle = \frac{\sum_{j=1}^{N_g} \Phi_j}{T}$$

$$\langle f^2(t) \rangle = \frac{1}{T} \sum_{i=1}^{N_f} \sum_{i_2=1}^{N_f} \int_{-\infty}^{\infty} f_{i_1}(t) f_{i_2}(t) dt = \frac{1}{T} \sum_{i=1}^{N_f} \left[\frac{\Phi_{i_1}^2}{2\sigma_{i_1} \sqrt{\pi}} + 2 \sum_{i_2=1}^{i_1-1} \frac{\Phi_{i_1} \Phi_{i_2}}{\sqrt{2\pi} \sqrt{\sigma_{i_1}^2 + \sigma_{i_2}^2}} e^{-\frac{1}{2} \frac{(\mu_{i_1} - \mu_{i_2})^2}{\sigma_{i_1}^2 + \sigma_{i_2}^2}} \right]$$

$$\langle \delta f^2 \rangle = \langle f^2 \rangle - \langle f \rangle^2 = \frac{1}{T^2} \left\{ T \sum_{i=1}^{N_f} \left[\frac{\Phi_{i_1}^2}{2\sigma_{i_1} \sqrt{\pi}} + 2 \sum_{i_2=1}^{i_1-1} \frac{\Phi_{i_1} \Phi_{i_2}}{\sqrt{2\pi} \sqrt{\sigma_{i_1}^2 + \sigma_{i_2}^2}} e^{-\frac{1}{2} \frac{(\mu_{i_1} - \mu_{i_2})^2}{\sigma_{i_1}^2 + \sigma_{i_2}^2}} \right] - \left(\sum_{i=1}^{N_f} \Phi_i \right)^2 \right\}$$

$$= \frac{1}{T^2} \sum_{i=1}^{N_f} \left[\Phi_{i_1}^2 \left(\frac{T}{2\sigma_{i_1} \sqrt{\pi}} - 1 \right) + 2 \Phi_{i_1} \sum_{i_2=1}^{i_1-1} \Phi_{i_2} \left(\frac{T e^{-\frac{1}{2} \frac{(\mu_{i_1} - \mu_{i_2})^2}{\sigma_{i_1}^2 + \sigma_{i_2}^2}}}{\sqrt{2\pi} \sqrt{\sigma_{i_1}^2 + \sigma_{i_2}^2}} - 1 \right) \right]$$

Für g erhält man entsprechend:

$$\langle \delta g^2 \rangle = \frac{1}{T^2} \sum_{j=1}^{N_g} \Phi_{j_1}^2 \left(\frac{T}{2\sigma_{j_1} \sqrt{\pi}} - 1 \right) + 2 \Phi_{j_1} \sum_{j_2=1}^{j_1-1} \Phi_{j_2} \left(\frac{T e^{-\frac{1}{2} \frac{(\mu_{j_1} - \mu_{j_2})^2}{\sigma_{j_1}^2 + \sigma_{j_2}^2}}}{\sqrt{2\pi} \sqrt{\sigma_{j_1}^2 + \sigma_{j_2}^2}} - 1 \right)$$

$$[\delta f \otimes \delta g](\theta, s) = \frac{\frac{s}{\ddot{U}} \sum_{i=1}^{N_f} \sum_{j=1}^{N_g} \frac{\Phi_i \Phi_j}{\sqrt{2\pi} \sqrt{\sigma_i^2 + s^2 \sigma_j^2}} e^{-\frac{1}{2} \frac{(\theta - (s\mu_j - \mu_i))^2}{\sigma_i^2 + s^2 \sigma_j^2}} - \frac{1}{T} \sum_{i=1}^{N_f} \Phi_i \cdot \frac{1}{T} \sum_{j=1}^{N_g} \Phi_j}{\text{Nenner}}$$

$$[\delta f \otimes \delta g](\theta, s) = \frac{\sum_{i=1}^{N_f} \sum_{j=1}^{N_g} \Phi_i \Phi_j \left(\frac{s}{\ddot{U}} \frac{e^{-\frac{1}{2} \frac{(\theta - (s\mu_j - \mu_i))^2}{\sigma_i^2 + s^2 \sigma_j^2}}}{\sqrt{2\pi} \sqrt{\sigma_i^2 + s^2 \sigma_j^2}} - \frac{1}{T^2} \right)}{\text{Nenner}}$$

$$\text{Nenner} = \frac{1}{T^2} \sqrt{\sum_{i=1}^{N_f} \Phi_{i_1}^2 \left(\frac{T}{2\sigma_{i_1} \sqrt{\pi}} - 1 \right) + 2 \Phi_{i_1} \sum_{i_2=1}^{i_1-1} \Phi_{i_2} \left(\frac{T e^{-\frac{1}{2} \frac{(\mu_{i_1} - \mu_{i_2})^2}{\sigma_{i_1}^2 + \sigma_{i_2}^2}}}{\sqrt{2\pi} \sqrt{\sigma_{i_1}^2 + \sigma_{i_2}^2}} - 1 \right)} \sqrt{\sum_{j=1}^{N_g} \Phi_{j_1}^2 \left(\frac{T}{2\sigma_{j_1} \sqrt{\pi}} - 1 \right) + 2 \Phi_{j_1} \sum_{j_2=1}^{j_1-1} \Phi_{j_2} \left(\frac{T e^{-\frac{1}{2} \frac{(\mu_{j_1} - \mu_{j_2})^2}{\sigma_{j_1}^2 + \sigma_{j_2}^2}}}{\sqrt{2\pi} \sqrt{\sigma_{j_1}^2 + \sigma_{j_2}^2}} - 1 \right)}$$

(4.5.1-13)

Der etwas unhandliche Term im Nenner ist θ - und s -unabhängig. Betrachtet man den Zähler von Gleichung 4.5.1-13 als Funktion von θ , so erkennt man, daß er eine Summe über $N_f \times N_g$ Gaußkurven darstellt, wobei N_f und N_g die Zahl der Ereignisse in f bzw. g ist. Damit ist die beobachtete große Anzahl von Maxima in Abbildung 4.5.1-3 erklärt.

Gibt es unter den Ereignissen der Spuren f und g Gruppen, die den gleichen Abstand θ_0 haben, für die also $\mu_i - \mu_j = \text{const} = \theta_0$ gilt, so addieren sich die Amplituden ihrer Korrelationsmaxima an der Stelle θ_0 in der Korrelationsfunktion und ergeben ein Maximum, das über die nichtkorrelierten Nebenmaxima hinauswächst.

Das Maximum, welches durch Korrelation des Ereignisses i auf der ungestreckten Spur f mit dem Ereignis j auf der mit s gestreckten Spur $g(s)$ entsteht, $\theta_{i,j}(s)$ liegt bei $s \times \mu_j - \mu_i$, unterliegt also einer linearen Verschiebung mit s ; die Ortslinien der Maxima sind daher Geraden:

$$\theta_{i,j}^{\max}(s) = -\mu_i + s \cdot \mu_j \quad (4.5.1-14)$$

Ihre Steigung hängt von der Lage des Ereignisses auf der gestreckten Spur ab. Da das „richtige“ Korrelationsmaximum eine Überlagerung mehrerer Maxima der Korrelationsfunktion ist, müssen sich dort mehrere dieser Geraden schneiden.

Die Anzahl der Geraden beträgt $N_f \times N_g$. Die Gerade von μ_{i1} nach μ_{j1} schneidet diejenige von μ_{i2} nach μ_{j2} mit $\mu_{i2} < \mu_{i1}$ immer dann bei einem positiven Faktor s , wenn $\mu_{j2} < \mu_{j1}$. Damit ergibt sich die Zahl der Schnittpunkte mit $s > 0$ zu $\frac{N_f(N_f-1)}{2} \cdot \frac{N_g(N_g-1)}{2}$, sie wächst also mit der

vierten Potenz der Ereigniszahlen. Die Dichte der Schnittpunkte ist in Abbildung 4.5.1-6 sowohl für die korrelierten wie auch für die unkorrelierten Testdaten wiedergegeben:

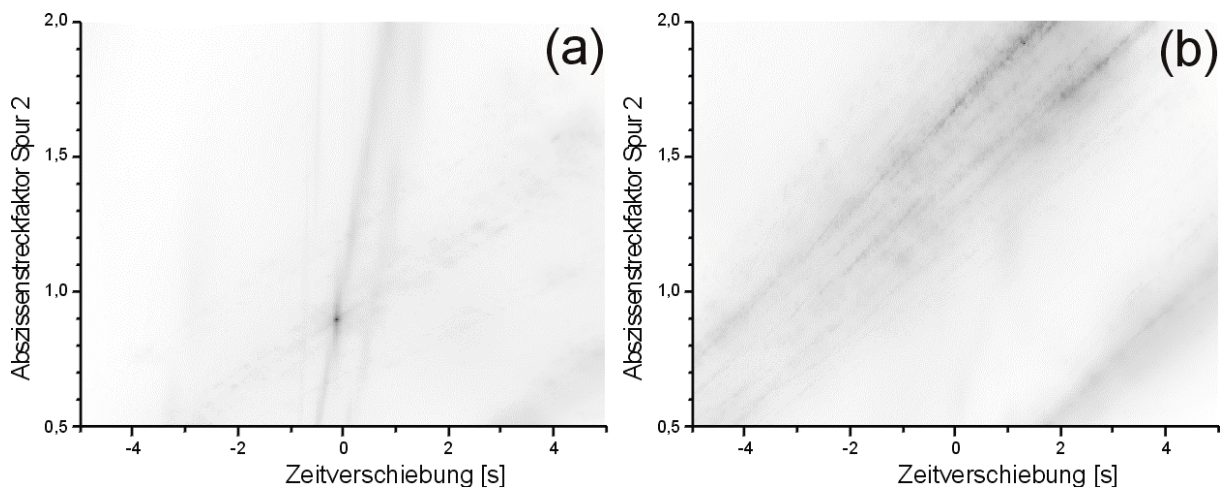


Abbildung 4.5.1-6 Dichtekarte der Schnittpunkte der Maximallinien

(a) für die korrelierten Testdaten

(b) für die unkorrelierten Testdaten

Ein dunkler Bereich in Abbildung 4.5.1-6 bedeutet, daß sich dort viele der Maximallinien schneiden. Mit Hilfe dieser Karte kann man die Korrelationskarte der Abbildung 4.5.1-4 gewichten, so daß sie übersichtlicher wird und das richtige Korrelationsmaximum einfacher aufzufinden ist:

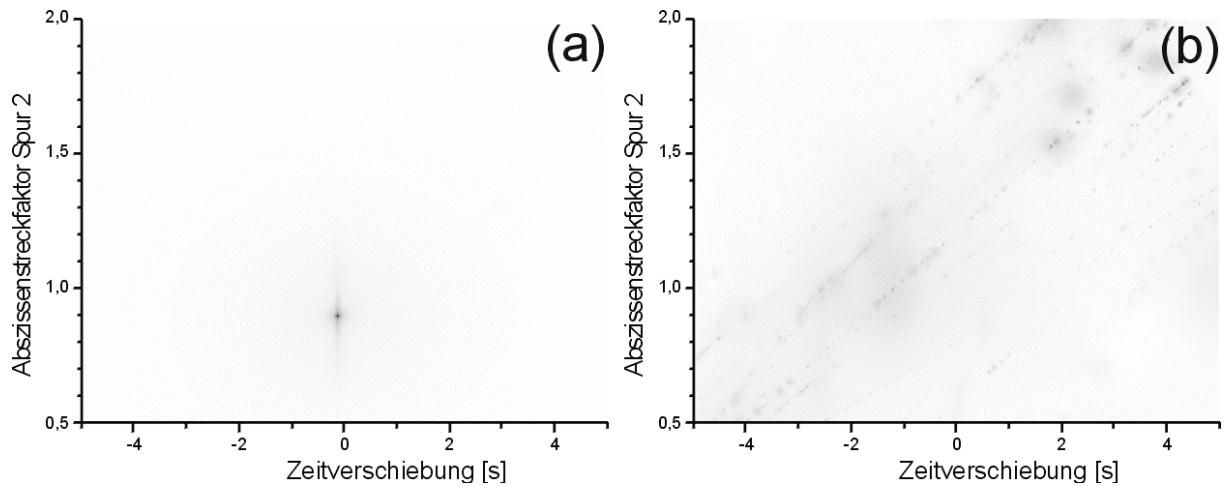


Abbildung 4.5.1-7 mit der Schnittpunktdichte gewichtete Graustufenkarte der Korrelationsfunktionen.
 (a) Das richtige Maximum der korrelierten Testdaten ist problemlos aufzufinden.
 (b) Die Karte der unkorrelierten Testdaten weist kein ausgeprägtes Maximum auf.

Am Maximum der korrelierten Testdaten beträgt die Korrelationsfunktion $[f \otimes g](\theta = -0.1, s = 0.9) = 1.0$. Am Maximum der unkorrelierten Testdaten beträgt die Korrelationsfunktion $[f \otimes g](\theta = +1.3, s = 1.9) = 0.04$.

Nachdem das Optimum θ_{\max} , s_{\max} gefunden ist, wird die Abszisse der Raus-Spur mit s_{\max} multipliziert und anschließend um $-\theta_{\max}$ verschoben. Ereignisse auf der Rein- und der Raus-Spur, für die

$$|\mu_{\text{rein}} - (s_{\max} \mu_{\text{raus}} - \theta_{\max})| \leq 2\sqrt{\sigma_{\text{rein}}^2 + s_{\max}^2 \sigma_{\text{raus}}^2} \quad (4.5.1-15)$$

gilt, werden zu Ereignispaaren zusammengefasst. Die Zahl dieser Paare ist ein weiterer Parameter, wie weit die beiden Spuren korreliert sind:

Die Wahrscheinlichkeit dafür, auf der Raus-Spur (mit N_2 Ereignissen innerhalb der Überlappzeit \ddot{U}) in einem bestimmten Intervall $[t_0 - \Delta t, t_0 + \Delta t]$ um ein zufällig gewähltes t_0 einen Ereignisschwerpunkt zu finden, ist durch

$$W_{\text{raus}}(\Delta t) = \frac{N_2}{\ddot{U}} \cdot 2\Delta t$$

gegeben.

Sind die Ereignisschwerpunkte der beiden Spuren unkorreliert und gleichverteilt, so ergibt sich als Erwartungswert λ_P der Zufallsvariablen N_{Paar} , welche die Gesamtzahl von in einer Serie von N_1 solcher Zeitpunkte auftretenden Ereignisse angibt zu

$$\lambda_P = N_1 \cdot W_{\text{raus}} = \frac{N_1 N_2}{\ddot{U}} \cdot 2\Delta t$$

Nach Gleichung 4.5.1-15 beträgt $\Delta t = 2\sqrt{\sigma_{\text{rein}}^2 + s_{\max}^2 \sigma_{\text{raus}}^2}$. Als Mittelwert für Δt wird daher die Wurzel der quadratisch gemittelten Ereignisbreite eingesetzt. Damit erhält man:

$$\lambda = \langle N_{\text{Paar}} \rangle \approx \frac{N_1 N_2}{\dot{U}(\theta_{\text{max}}, s_{\text{max}})} 4 \sqrt{\frac{1}{N_1 + N_2} \sum_{i=1}^{N_1} \sigma_i^2 + s^2 \sum_{j=1}^{N_2} \sigma_j^2} . \quad (4.5.1-16)$$

Ist $W_{\text{raus}} \ll 1$, so kann man die N_{Paar} näherungsweise als Poisson-verteilt annehmen. Damit ergibt sich die Wahrscheinlichkeit dafür, mindestens N_{Paar} tatsächlich beobachtete Ereignispaare rein zufällig zu finden als:

$$W_{\text{Zuf}}(N_{\text{Paar}}) \approx 1 - \sum_{N=0}^{N_{\text{Paar}}-2} e^{-\lambda_P} \frac{(\lambda_P)^N}{N!} \quad (4.5.1-17)$$

Der Summand -2 in der Obergrenze der Summe folgt aus den zwei bei der Auswertung eingeführten Freiheitsgraden der Verschiebung θ und der Streckung s .

Je geringer die Wahrscheinlichkeit W_{Zuf} ist, desto besser ist die statistische Absicherung der Korrelation.

Um die Gleichungen 4.5.1-16 und 4.5.1-17 zu überprüfen, wurden Montecarlosimulationen mit unterschiedlichen Ereigniszahlen $N = N_1 + N_2$, unterschiedlichen Anteilen auf beiden Spuren $A = N_1/N$ und verschiedenen Ereignisbreitenverteilungen durchgeführt.

Die Auswertung einzelner Messungen hat gezeigt, daß die Ereignisbreiten in sehr guter Näherung durch eine log-normal – Verteilung

$$f(\ln W) d \ln W = \frac{1}{\sqrt{2\pi} \sigma_{\ln W}} e^{-\frac{1}{2} \left(\frac{\ln W - \mu_{\ln W}}{\sigma_{\ln W}} \right)^2} d \ln W$$

beschreibbar sind. Dabei ergab sich empirisch $\mu_{\ln W/s} = -5,75$ und $\sigma_{\ln W/s} = 0,65$. Das entspricht einem Mittelwert der Breite von $\mu_W = \langle W \rangle = 3,93$ ms bei einer Standardabweichung $\sigma_W = \text{Sqrt}(\langle W^2 \rangle - \langle W \rangle^2) = 2,85$ ms.

Es wurden zu jedem Parametersatz N, A, μ_W, σ_W 5000 Spurenpaare simuliert und Verteilungsfunktion von N_{Paar} ermittelt. Die Spurlänge betrug jeweils 50 s. Um maximalen Überlapp zu gewährleisten, wurde $s_{\text{max}}=1$ und $\theta_{\text{max}}=0$ gesetzt. Dabei nahm $N=N_1+N_2$ die Werte 10, 100, 1000, 5000 und 10000; $A= N_1/N$ die Werte 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40% und 50% an. Die Verteilungsfunktion bei einem Parameter $A' = 1-A$ muß, bei sonst gleichen Parametern, aus Symmetriegründen identisch mit der bei A sein. Dies wurde auch exemplarisch simuliert und bestätigt. Es wurden folgende Ereignisbreitenverteilungen untersucht: (1) $\sigma_W[\text{ms}] = 0,85; 1,35; 1,85; 2,35; 2,85; 3,35; 3,85; 4,35$ und $4,85$ bei $\mu_W = 3,93$ ms sowie (2) $\mu_W[\text{ms}] = 1,93$ und $5,93$ bei $\sigma_W = 2,85$ ms. Die Parameter Mittelwert und Standardabweichung der aus den Simulationen erhaltenen Paarverteilungsfunktionen sind in Tabelle 4.5.1-1 angegeben. Zum Vergleich ist die Schätzfunktion λ nach Gleichung 4.5.1-16 für den Mittelwert und die bei Vorliegen einer Poissonverteilung zu erwartende Standardabweichung wiedergegeben:

μ_w [ms]	σ_w [ms]	N = N ₁ +N ₂	A = N ₁ /N [%]	λ (4.5.1-16)	Mittelwert Paare (Montecarlo)	Stabw. Paare (Montecarlo)	Stabw. Poisson = $\sqrt{\text{Paare}}$	$\lambda / \langle \text{Paare} \rangle - 1$ [%]	$\frac{\sqrt{\langle \text{Paare} \rangle}}{\text{StabwPaare}} - 1$ [%]		
3,93	0,85	10	10	2,88E-3	5,20E-3	7,19E-2	7,21E-2	-44,6	0,3		
			20	5,14E-3	7,20E-3	8,46E-2	8,49E-2	-28,6	0,4		
			30	6,75E-3	9,20E-3	9,55E-2	9,59E-2	-26,6	0,5		
			40	7,70E-3	1,06E-2	1,02E-1	1,03E-1	-27,4	0,5		
			50	8,02E-3	1,44E-2	1,19E-1	1,20E-1	-44,3	0,7		
		100	1	3,18E-2	4,48E-2	2,07E-1	2,12E-1	-28,9	2,3		
			5	1,53E-1	2,14E-1	4,53E-1	4,62E-1	-28,6	2,2		
			10	2,89E-1	3,87E-1	6,13E-1	6,22E-1	-25,5	1,6		
			20	5,13E-1	7,07E-1	8,17E-1	8,41E-1	-27,4	2,9		
			30	6,72E-1	9,08E-1	9,23E-1	9,53E-1	-25,9	3,2		
			40	7,68E-1	1,08E+0	1,01E+0	1,04E+0	-28,7	3,2		
			50	7,99E-1	1,11E+0	1,03E+0	1,05E+0	-28,0	2,6		
		1000	1	3,18E+0	3,59E+0	1,51E+0	1,89E+0	-11,4	25,1		
			5	1,51E+1	1,73E+1	3,37E+0	4,15E+0	-12,2	23,2		
			10	2,85E+1	3,28E+1	4,61E+0	5,72E+0	-13,1	24,1		
			20	4,99E+1	5,83E+1	6,29E+0	7,64E+0	-14,4	21,4		
			30	6,48E+1	7,67E+1	7,23E+0	8,76E+0	-15,5	21,2		
			40	7,36E+1	8,81E+1	7,83E+0	9,39E+0	-16,5	19,9		
			50	7,65E+1	9,15E+1	7,93E+0	9,57E+0	-16,4	20,6		
		5000	1	7,93E+1	4,44E+1	2,24E+0	6,66E+0	78,6	197,6		
			5	3,73E+2	2,18E+2	5,41E+0	1,48E+1	71,4	172,8		
			10	6,91E+2	4,24E+2	8,22E+0	2,06E+1	63,1	150,4		
			20	1,18E+3	7,90E+2	1,30E+1	2,81E+1	48,9	115,8		
			30	1,49E+3	1,07E+3	1,70E+1	3,28E+1	38,4	93,0		
			40	1,66E+3	1,26E+3	1,99E+1	3,54E+1	32,2	78,1		
			50	1,72E+3	1,32E+3	2,09E+1	3,63E+1	30,1	73,5		
		10000	1	3,17E+2	9,87E+1	1,15E+0	9,93E+0	221,0	765,4		
			5	1,49E+3	4,91E+2	3,08E+0	2,22E+1	202,8	620,1		
			10	2,74E+3	9,74E+2	5,40E+0	3,12E+1	181,2	478,0		
			20	4,60E+3	1,89E+3	1,14E+1	4,35E+1	142,9	282,8		
			30	5,72E+3	2,69E+3	1,92E+1	5,19E+1	112,9	169,8		
			40	6,29E+3	3,25E+3	2,63E+1	5,70E+1	93,7	116,6		
			50	6,47E+3	3,45E+3	2,94E+1	5,88E+1	87,3	100,0		
		3,93	1,35	10	10	2,98E-3	3,40E-3	5,82E-2	5,83E-2	-12,4	0,2
					20	5,29E-3	8,80E-3	9,34E-2	9,38E-2	-39,9	0,4
30	6,91E-3				9,80E-3	9,85E-2	9,90E-2	-29,5	0,5		
40	7,93E-3				9,40E-3	9,65E-2	9,70E-2	-15,6	0,5		
50	8,27E-3				1,08E-2	1,03E-1	1,04E-1	-23,4	0,5		
100	1			3,29E-2	4,46E-2	2,06E-1	2,11E-1	-26,3	2,3		
	5			1,58E-1	2,03E-1	4,43E-1	4,50E-1	-22,3	1,6		
	10			2,98E-1	3,94E-1	6,08E-1	6,28E-1	-24,3	3,3		
	20			5,30E-1	7,14E-1	8,39E-1	8,45E-1	-25,9	0,7		
	30			6,94E-1	9,46E-1	9,57E-1	9,72E-1	-26,7	1,6		
	40			7,92E-1	1,05E+0	9,98E-1	1,02E+0	-24,4	2,6		
	50			8,25E-1	1,10E+0	1,04E+0	1,05E+0	-25,1	1,0		
1000	1			3,28E+0	3,63E+0	1,52E+0	1,90E+0	-9,4	24,9		
	5			1,56E+1	1,73E+1	3,29E+0	4,16E+0	-9,7	26,5		
	10			2,94E+1	3,29E+1	4,55E+0	5,74E+0	-10,8	26,1		
	20			5,14E+1	5,89E+1	6,23E+0	7,67E+0	-12,7	23,2		
	30			6,67E+1	7,74E+1	7,25E+0	8,80E+0	-13,8	21,4		
	40			7,57E+1	8,88E+1	7,82E+0	9,42E+0	-14,7	20,5		
	50			7,87E+1	9,24E+1	8,14E+0	9,61E+0	-14,8	18,1		
5000	1			8,19E+1	4,43E+1	2,21E+0	6,66E+0	84,8	201,4		
	5			3,85E+2	2,18E+2	5,27E+0	1,48E+1	76,7	180,2		
	10			7,11E+2	4,24E+2	8,12E+0	2,06E+1	67,8	153,4		
	20			1,21E+3	7,90E+2	1,31E+1	2,81E+1	52,6	115,0		
	30			1,52E+3	1,08E+3	1,72E+1	3,28E+1	41,6	90,9		
	40			1,70E+3	1,26E+3	2,02E+1	3,55E+1	35,0	75,3		
	50			1,76E+3	1,32E+3	2,10E+1	3,64E+1	32,9	73,4		
10000	1			3,27E+2	9,86E+1	1,17E+0	9,93E+0	231,7	751,6		
	5			1,53E+3	4,91E+2	3,20E+0	2,21E+1	211,9	591,6		
	10			2,81E+3	9,73E+2	5,43E+0	3,12E+1	188,7	474,4		
	20			4,69E+3	1,89E+3	1,14E+1	4,35E+1	148,0	283,2		
	30			5,83E+3	2,69E+3	1,87E+1	5,18E+1	116,9	177,6		
	40			6,41E+3	3,25E+3	2,59E+1	5,70E+1	97,5	119,6		
	50			6,62E+3	3,45E+3	2,93E+1	5,88E+1	91,7	100,4		

3,93	1,85	10	10	3,10E-3	4,80E-3	6,91E-2	6,93E-2	-35,4	0,2		
			20	5,48E-3	7,60E-3	8,69E-2	8,72E-2	-27,9	0,4		
			30	7,22E-3	1,18E-2	1,08E-1	1,09E-1	-38,8	0,6		
			40	8,25E-3	1,14E-2	1,06E-1	1,07E-1	-27,6	0,6		
			50	8,56E-3	8,00E-3	8,91E-2	8,94E-2	7,0	0,4		
		100	1	3,44E-2	3,92E-2	1,94E-1	1,98E-1	-12,2	2,0		
			5	1,65E-1	2,13E-1	4,52E-1	4,62E-1	-22,8	2,1		
			10	3,11E-1	3,86E-1	6,09E-1	6,21E-1	-19,3	2,0		
			20	5,52E-1	7,09E-1	8,25E-1	8,42E-1	-22,1	2,1		
			30	7,25E-1	9,48E-1	9,37E-1	9,73E-1	-23,5	3,9		
			40	8,28E-1	1,07E+0	1,01E+0	1,04E+0	-23,0	2,7		
		1000	50	8,61E-1	1,14E+0	1,04E+0	1,07E+0	-24,5	2,5		
			1	3,43E+0	3,65E+0	1,52E+0	1,91E+0	-5,9	25,4		
			5	1,63E+1	1,75E+1	3,35E+0	4,19E+0	-6,9	24,9		
			10	3,06E+1	3,32E+1	4,69E+0	5,77E+0	-7,9	22,9		
			20	5,35E+1	5,94E+1	6,28E+0	7,71E+0	-10,0	22,8		
			30	6,93E+1	7,81E+1	7,27E+0	8,84E+0	-11,3	21,6		
		5000	40	7,87E+1	8,94E+1	7,85E+0	9,45E+0	-12,0	20,5		
			50	8,18E+1	9,34E+1	7,96E+0	9,67E+0	-12,5	21,5		
			1	8,55E+1	4,43E+1	2,25E+0	6,65E+0	93,1	196,1		
			5	4,00E+2	2,17E+2	5,31E+0	1,47E+1	84,2	177,4		
			10	7,37E+2	4,23E+2	8,15E+0	2,06E+1	74,2	152,3		
			20	1,24E+3	7,89E+2	1,31E+1	2,81E+1	57,6	114,2		
		10000	30	1,57E+3	1,08E+3	1,73E+1	3,28E+1	45,7	90,0		
			40	1,75E+3	1,26E+3	2,05E+1	3,55E+1	38,9	73,3		
			50	1,81E+3	1,32E+3	2,14E+1	3,64E+1	37,2	69,8		
			1	3,41E+2	9,85E+1	1,23E+0	9,92E+0	246,7	709,1		
			5	1,59E+3	4,90E+2	3,21E+0	2,21E+1	224,4	588,9		
			10	2,90E+3	9,72E+2	5,56E+0	3,12E+1	198,6	460,9		
		3,93	2,35	10	20	4,81E+3	1,89E+3	1,14E+1	4,35E+1	154,7	281,6
					30	5,97E+3	2,68E+3	1,86E+1	5,18E+1	122,2	179,1
					40	6,58E+3	3,25E+3	2,60E+1	5,70E+1	102,7	119,0
					50	6,83E+3	3,45E+3	2,92E+1	5,87E+1	98,0	101,0
					10	3,22E-3	3,20E-3	5,65E-2	5,66E-2	0,6	0,2
				100	20	5,70E-3	6,20E-3	7,85E-2	7,87E-2	-8,1	0,3
		30	7,46E-3		1,24E-2	1,11E-1	1,11E-1	-39,8	0,6		
		40	8,53E-3		1,18E-2	1,08E-1	1,09E-1	-27,7	0,6		
		50	8,95E-3		1,54E-2	1,25E-1	1,24E-1	-41,9	-0,5		
		1	3,62E-2		4,26E-2	2,02E-1	2,06E-1	-15,0	2,2		
		5	1,73E-1		2,20E-1	4,71E-1	4,69E-1	-21,3	-0,4		
		1000	10	3,28E-1	4,16E-1	6,18E-1	6,45E-1	-21,1	4,2		
			20	5,81E-1	7,27E-1	8,29E-1	8,53E-1	-20,0	2,8		
			30	7,63E-1	9,60E-1	9,61E-1	9,80E-1	-20,5	2,0		
			40	8,70E-1	1,11E+0	1,02E+0	1,05E+0	-21,8	3,0		
			50	9,05E-1	1,13E+0	1,04E+0	1,06E+0	-20,1	2,1		
1	3,62E+0		3,68E+0	1,53E+0	1,92E+0	-1,7	25,7				
5000	5	1,72E+1	1,77E+1	3,37E+0	4,21E+0	-3,0	25,0				
	10	3,21E+1	3,35E+1	4,66E+0	5,78E+0	-4,0	24,1				
	20	5,60E+1	6,00E+1	6,31E+0	7,75E+0	-6,6	22,7				
	30	7,25E+1	7,88E+1	7,31E+0	8,88E+0	-7,9	21,4				
	40	8,22E+1	9,02E+1	7,92E+0	9,50E+0	-8,9	20,0				
	50	8,54E+1	9,42E+1	8,01E+0	9,70E+0	-9,3	21,2				
10000	1	9,00E+1	4,42E+1	2,26E+0	6,65E+0	103,8	194,2				
	5	4,20E+2	2,17E+2	5,37E+0	1,47E+1	93,4	174,3				
	10	7,69E+2	4,22E+2	8,31E+0	2,05E+1	82,1	147,2				
	20	1,29E+3	7,88E+2	1,32E+1	2,81E+1	63,5	113,3				
	30	1,62E+3	1,07E+3	1,70E+1	3,28E+1	50,7	92,2				
	40	1,81E+3	1,26E+3	1,98E+1	3,55E+1	43,7	79,3				
3,93	2,85	10	50	1,88E+3	1,32E+3	2,08E+1	3,63E+1	42,5	74,6		
			1	3,59E+2	9,84E+1	1,25E+0	9,92E+0	265,0	694,5		
			5	1,66E+3	4,90E+2	3,29E+0	2,21E+1	239,0	572,8		
			10	3,01E+3	9,71E+2	5,66E+0	3,12E+1	209,8	450,2		
			20	4,94E+3	1,89E+3	1,15E+1	4,34E+1	162,0	278,3		
		30	6,12E+3	2,68E+3	1,88E+1	5,18E+1	128,3	175,3			
10	40	6,79E+3	3,24E+3	2,62E+1	5,69E+1	109,6	117,6				
	50	7,10E+3	3,44E+3	2,94E+1	5,87E+1	106,2	99,4				
	10	3,39E-3	6,20E-3	7,85E-2	7,87E-2	-45,3	0,3				
	20	5,97E-3	5,40E-3	7,33E-2	7,35E-2	10,6	0,3				
	30	7,77E-3	1,32E-2	1,14E-1	1,15E-1	-41,1	0,7				
3,93	2,85	10	40	9,02E-3	1,10E-2	1,04E-1	1,05E-1	-18,0	0,6		
			50	9,28E-3	1,30E-2	1,13E-1	1,14E-1	-28,6	0,7		

3,93	2,85	100	1	3,83E-2	4,78E-2	2,13E-1	2,19E-1	-19,9	2,5		
			5	1,83E-1	2,35E-1	4,74E-1	4,85E-1	-22,1	2,2		
			10	3,46E-1	4,10E-1	6,36E-1	6,40E-1	-15,5	0,6		
			20	6,14E-1	7,47E-1	8,32E-1	8,65E-1	-17,8	3,9		
			30	8,03E-1	9,76E-1	9,59E-1	9,88E-1	-17,7	3,0		
			40	9,18E-1	1,14E+0	1,06E+0	1,07E+0	-19,6	1,2		
		50	9,58E-1	1,18E+0	1,08E+0	1,09E+0	-19,0	1,0			
		1000	1	3,83E+0	3,69E+0	1,52E+0	1,92E+0	3,9	26,5		
			5	1,81E+1	1,77E+1	3,35E+0	4,21E+0	2,3	25,9		
			10	3,39E+1	3,38E+1	4,70E+0	5,81E+0	0,3	23,7		
			20	5,89E+1	6,01E+1	6,26E+0	7,75E+0	-2,1	23,8		
			30	7,60E+1	7,94E+1	7,38E+0	8,91E+0	-4,3	20,8		
			40	8,62E+1	9,10E+1	7,78E+0	9,54E+0	-5,3	22,6		
		50	8,95E+1	9,47E+1	8,09E+0	9,73E+0	-5,5	20,3			
		5000	1	9,53E+1	4,40E+1	2,30E+0	6,64E+0	116,3	188,3		
			5	4,41E+2	2,17E+2	5,39E+0	1,47E+1	103,7	173,2		
			10	8,03E+2	4,22E+2	8,10E+0	2,05E+1	90,6	153,5		
			20	1,33E+3	7,86E+2	1,31E+1	2,80E+1	69,8	114,5		
			30	1,67E+3	1,07E+3	1,74E+1	3,27E+1	56,3	87,8		
			40	1,87E+3	1,25E+3	2,01E+1	3,54E+1	49,5	76,5		
		50	1,96E+3	1,32E+3	2,12E+1	3,63E+1	49,1	71,2			
		10000	1	3,80E+2	9,83E+1	1,29E+0	9,91E+0	286,2	667,6		
			5	1,74E+3	4,89E+2	3,39E+0	2,21E+1	255,0	553,0		
			10	3,12E+3	9,69E+2	5,84E+0	3,11E+1	221,6	433,3		
			20	5,08E+3	1,88E+3	1,17E+1	4,34E+1	169,6	270,3		
			30	6,29E+3	2,67E+3	1,91E+1	5,17E+1	135,5	171,0		
			40	7,03E+3	3,23E+3	2,62E+1	5,68E+1	117,7	116,5		
		50	7,43E+3	3,43E+3	2,95E+1	5,86E+1	116,4	98,3			
		3,93	3,35	10	10	3,48E-3	5,60E-3	7,46E-2	7,48E-2	-37,9	0,3
					20	6,28E-3	7,60E-3	8,69E-2	8,72E-2	-17,4	0,4
					30	8,16E-3	9,80E-3	9,85E-2	9,90E-2	-16,7	0,5
					40	9,33E-3	1,24E-2	1,11E-1	1,11E-1	-24,8	0,6
					50	9,77E-3	1,38E-2	1,17E-1	1,17E-1	-29,2	0,7
				100	1	4,05E-2	4,14E-2	1,99E-1	2,03E-1	-2,2	2,1
					5	1,94E-1	2,28E-1	4,70E-1	4,78E-1	-15,0	1,7
10	3,68E-1				4,32E-1	6,53E-1	6,57E-1	-15,0	0,7		
20	6,52E-1				7,66E-1	8,69E-1	8,75E-1	-14,9	0,7		
30	8,51E-1				1,00E+0	9,69E-1	1,00E+0	-15,3	3,4		
40	9,72E-1				1,14E+0	1,04E+0	1,07E+0	-15,0	2,6		
50	1,01E+0			1,18E+0	1,06E+0	1,09E+0	-14,4	2,8			
1000	1			4,07E+0	3,73E+0	1,51E+0	1,93E+0	9,3	27,9		
	5			1,92E+1	1,79E+1	3,38E+0	4,23E+0	7,8	24,9		
	10			3,58E+1	3,39E+1	4,56E+0	5,82E+0	5,5	27,7		
	20			6,19E+1	6,05E+1	6,37E+0	7,78E+0	2,3	22,2		
	30			7,97E+1	7,98E+1	7,24E+0	8,94E+0	-0,1	23,4		
	40			9,02E+1	9,14E+1	7,83E+0	9,56E+0	-1,3	22,1		
50	9,40E+1			9,51E+1	7,86E+0	9,75E+0	-1,1	24,0			
5000	1			1,01E+2	4,41E+1	2,30E+0	6,64E+0	129,3	189,0		
	5			4,64E+2	2,16E+2	5,48E+0	1,47E+1	114,9	168,3		
	10			8,38E+2	4,20E+2	8,37E+0	2,05E+1	99,4	144,9		
	20			1,38E+3	7,83E+2	1,33E+1	2,80E+1	76,4	110,7		
	30			1,73E+3	1,07E+3	1,74E+1	3,27E+1	62,3	87,7		
	40			1,95E+3	1,25E+3	2,04E+1	3,53E+1	56,1	73,5		
50	2,05E+3			1,31E+3	2,11E+1	3,62E+1	56,8	71,5			
10000	1			4,02E+2	9,82E+1	1,32E+0	9,91E+0	309,6	653,4		
	5			1,82E+3	4,88E+2	3,47E+0	2,21E+1	271,8	537,7		
	10			3,22E+3	9,68E+2	5,81E+0	3,11E+1	233,0	435,6		
	20			5,20E+3	1,88E+3	1,19E+1	4,33E+1	177,2	265,6		
	30			6,48E+3	2,66E+3	1,95E+1	5,16E+1	143,2	164,3		
	40			7,31E+3	3,22E+3	2,65E+1	5,67E+1	127,3	114,1		
50	7,81E+3			3,42E+3	2,96E+1	5,85E+1	128,5	97,7			
3,93	3,85			10	10	3,63E-3	4,80E-3	6,91E-2	6,93E-2	-24,4	0,2
					20	6,46E-3	6,20E-3	7,85E-2	7,87E-2	4,2	0,3
		30	8,46E-3		1,14E-2	1,06E-1	1,07E-1	-25,8	0,6		
		40	9,70E-3		1,06E-2	1,02E-1	1,03E-1	-8,5	0,5		
		50	1,01E-2		1,22E-2	1,10E-1	1,10E-1	-17,1	0,6		
		100	1	4,31E-2	4,34E-2	2,04E-1	2,08E-1	-0,6	2,2		
			5	2,05E-1	2,21E-1	4,57E-1	4,70E-1	-7,0	2,9		
			10	3,88E-1	4,37E-1	6,50E-1	6,61E-1	-11,2	1,6		
			20	6,88E-1	7,46E-1	8,58E-1	8,64E-1	-7,8	0,7		
			30	8,46E-1	9,14E-1	1,06E-1	1,07E-1	-17,1	0,6		

3,93	3,85	100	30	9,00E-1	1,03E+0	9,92E-1	1,01E+0	-12,3	2,1		
			40	1,03E+0	1,15E+0	1,05E+0	1,07E+0	-10,4	2,1		
			50	1,07E+0	1,21E+0	1,07E+0	1,10E+0	-11,7	2,6		
		1000	1	4,33E+0	3,74E+0	1,54E+0	1,93E+0	15,8	25,1		
			5	2,03E+1	1,80E+1	3,39E+0	4,24E+0	13,2	24,9		
			10	3,79E+1	3,41E+1	4,62E+0	5,84E+0	11,0	26,3		
			20	6,49E+1	6,06E+1	6,34E+0	7,78E+0	7,1	22,7		
			30	8,37E+1	8,00E+1	7,38E+0	8,95E+0	4,6	21,2		
			40	9,45E+1	9,16E+1	7,94E+0	9,57E+0	3,2	20,6		
			50	9,86E+1	9,54E+1	8,16E+0	9,77E+0	3,4	19,6		
		5000	1	1,07E+2	4,39E+1	2,30E+0	6,62E+0	144,5	188,3		
			5	4,88E+2	2,15E+2	5,49E+0	1,47E+1	126,5	167,4		
			10	8,73E+2	4,19E+2	8,46E+0	2,05E+1	108,3	142,0		
			20	1,43E+3	7,80E+2	1,33E+1	2,79E+1	82,9	110,0		
			30	1,79E+3	1,06E+3	1,76E+1	3,26E+1	68,8	84,8		
			40	2,03E+3	1,24E+3	2,05E+1	3,52E+1	63,5	71,5		
			50	2,15E+3	1,30E+3	2,11E+1	3,61E+1	65,5	70,9		
		10000	1	4,26E+2	9,81E+1	1,37E+0	9,91E+0	334,2	622,3		
			5	1,89E+3	4,88E+2	3,55E+0	2,21E+1	288,1	522,7		
			10	3,32E+3	9,66E+2	6,15E+0	3,11E+1	244,1	405,2		
			20	5,33E+3	1,87E+3	1,19E+1	4,33E+1	184,7	263,4		
			30	6,67E+3	2,65E+3	1,96E+1	5,15E+1	151,7	162,3		
			40	7,62E+3	3,20E+3	2,69E+1	5,65E+1	138,4	110,2		
			50	8,22E+3	3,40E+3	2,95E+1	5,83E+1	142,0	97,7		
		3,93	4,35	10	10	3,81E-3	4,00E-3	6,31E-2	6,32E-2	-4,8	0,2
					20	6,72E-3	6,20E-3	7,85E-2	7,87E-2	8,4	0,3
					30	8,98E-3	9,20E-3	9,55E-2	9,59E-2	-2,4	0,5
					40	1,01E-2	1,20E-2	1,09E-1	1,10E-1	-15,6	0,6
50	1,05E-2				1,32E-2	1,14E-1	1,15E-1	-20,2	0,7		
100	1			4,55E-2	4,44E-2	2,06E-1	2,11E-1	2,4	2,3		
	5			2,19E-1	2,33E-1	4,68E-1	4,83E-1	-6,2	3,2		
	10			4,10E-1	4,28E-1	6,35E-1	6,54E-1	-4,3	3,0		
	20			7,27E-1	7,87E-1	8,85E-1	8,87E-1	-7,6	0,2		
	30			9,52E-1	1,01E+0	9,84E-1	1,01E+0	-6,2	2,4		
	40			1,08E+0	1,18E+0	1,05E+0	1,09E+0	-8,6	3,2		
	50			1,13E+0	1,21E+0	1,08E+0	1,10E+0	-6,9	2,1		
1000	1			4,60E+0	3,72E+0	1,55E+0	1,93E+0	23,5	24,6		
	5			2,16E+1	1,78E+1	3,40E+0	4,22E+0	21,1	24,1		
	10			3,98E+1	3,42E+1	4,67E+0	5,85E+0	16,3	25,3		
	20			6,81E+1	6,08E+1	6,37E+0	7,80E+0	12,0	22,4		
	30			8,72E+1	8,01E+1	7,37E+0	8,95E+0	8,9	21,4		
	40			9,89E+1	9,15E+1	7,81E+0	9,57E+0	8,1	22,6		
	50			1,03E+2	9,53E+1	8,09E+0	9,76E+0	8,2	20,6		
5000	1			1,14E+2	4,39E+1	2,30E+0	6,62E+0	159,8	187,3		
	5			5,11E+2	2,15E+2	5,69E+0	1,47E+1	137,7	157,7		
	10			9,05E+2	4,17E+2	8,49E+0	2,04E+1	116,9	140,6		
	20			1,47E+3	7,76E+2	1,36E+1	2,78E+1	89,3	104,7		
	30			1,85E+3	1,05E+3	1,77E+1	3,25E+1	75,5	83,8		
	40			2,11E+3	1,23E+3	2,08E+1	3,51E+1	71,6	68,7		
	50			2,26E+3	1,29E+3	2,15E+1	3,59E+1	75,2	67,1		
10000	1			4,51E+2	9,81E+1	1,39E+0	9,90E+0	359,6	614,7		
	5			1,97E+3	4,87E+2	3,64E+0	2,21E+1	303,8	506,9		
	10	3,41E+3	9,65E+2	6,23E+0	3,11E+1	254,0	398,8				
	20	5,45E+3	1,87E+3	1,25E+1	4,32E+1	192,2	245,6				
	30	6,89E+3	2,64E+3	1,98E+1	5,14E+1	161,1	160,1				
	40	7,97E+3	3,18E+3	2,69E+1	5,64E+1	150,6	109,6				
	50	8,68E+3	3,37E+3	2,95E+1	5,81E+1	157,3	96,7				
3,93	4,85	10	10	3,93E-3	5,60E-3	7,46E-2	7,48E-2	-29,8	0,3		
			20	6,96E-3	9,20E-3	9,55E-2	9,59E-2	-24,3	0,5		
			30	9,16E-3	1,18E-2	1,08E-1	1,09E-1	-22,4	0,6		
			40	1,06E-2	1,30E-2	1,13E-1	1,14E-1	-18,8	0,7		
			50	1,09E-2	1,14E-2	1,06E-1	1,07E-1	-4,4	0,6		
		100	1	4,80E-2	4,52E-2	2,08E-1	2,13E-1	6,3	2,3		
			5	2,29E-1	2,33E-1	4,70E-1	4,83E-1	-1,9	2,7		
			10	4,32E-1	4,56E-1	6,51E-1	6,75E-1	-5,2	3,8		
			20	7,72E-1	7,80E-1	8,69E-1	8,83E-1	-1,0	1,7		
			30	1,00E+0	1,01E+0	9,92E-1	1,01E+0	-0,9	1,4		
			40	1,15E+0	1,19E+0	1,06E+0	1,09E+0	-3,7	2,5		
			50	1,19E+0	1,24E+0	1,07E+0	1,12E+0	-4,5	4,3		

3,93	4,85	1000	1	4,88E+0	3,76E+0	1,53E+0	1,94E+0	29,8	26,5	
			5	2,28E+1	1,79E+1	3,38E+0	4,23E+0	27,4	25,4	
			10	4,18E+1	3,41E+1	4,72E+0	5,84E+0	22,6	23,7	
			20	7,13E+1	6,06E+1	6,31E+0	7,79E+0	17,6	23,4	
			30	9,10E+1	8,00E+1	7,28E+0	8,94E+0	13,8	22,8	
			40	1,03E+2	9,13E+1	7,87E+0	9,56E+0	13,0	21,5	
		50	1,08E+2	9,51E+1	8,01E+0	9,75E+0	13,6	21,8		
		5000	1	1,21E+2	4,38E+1	2,39E+0	6,61E+0	175,5	176,4	
			5	5,33E+2	2,14E+2	5,69E+0	1,46E+1	149,0	156,9	
			10	9,35E+2	4,15E+2	8,65E+0	2,04E+1	125,0	135,7	
			20	1,51E+3	7,71E+2	1,37E+1	2,78E+1	95,7	103,3	
			30	1,91E+3	1,05E+3	1,78E+1	3,23E+1	82,6	81,4	
			40	2,21E+3	1,22E+3	2,04E+1	3,49E+1	80,7	71,0	
		10000	50	2,38E+3	1,28E+3	2,17E+1	3,58E+1	85,7	65,3	
			1	4,76E+2	9,80E+1	1,42E+0	9,90E+0	385,6	596,8	
			5	2,04E+3	4,87E+2	3,72E+0	2,21E+1	318,4	492,5	
			10	3,50E+3	9,63E+2	6,42E+0	3,10E+1	263,4	383,0	
			20	5,59E+3	1,86E+3	1,24E+1	4,31E+1	200,4	247,6	
	30		7,13E+3	2,63E+3	1,99E+1	5,12E+1	171,5	157,0		
	1,93	2,85	10	40	8,34E+3	3,16E+3	2,67E+1	5,62E+1	164,2	110,6
				50	9,16E+3	3,35E+3	2,97E+1	5,79E+1	173,6	95,2
				10	2,04E-3	2,00E-3	4,47E-2	4,47E-2	2,0	0,1
				20	3,74E-3	3,20E-3	5,65E-2	5,66E-2	16,9	0,2
				30	4,82E-3	5,60E-3	7,46E-2	7,48E-2	-13,9	0,3
40				5,52E-3	7,80E-3	8,80E-2	8,83E-2	-29,2	0,4	
100			50	5,65E-3	3,20E-3	5,65E-2	5,66E-2	76,6	0,2	
			1	2,61E-2	2,64E-2	1,60E-1	1,62E-1	-1,3	1,3	
			5	1,25E-1	1,18E-1	3,35E-1	3,43E-1	6,3	2,6	
			10	2,34E-1	2,30E-1	4,80E-1	4,79E-1	1,8	-0,2	
			20	4,17E-1	3,97E-1	6,25E-1	6,30E-1	4,9	0,9	
			30	5,44E-1	4,99E-1	7,05E-1	7,07E-1	8,9	0,3	
1000			40	6,18E-1	5,92E-1	7,61E-1	7,69E-1	4,5	1,1	
			50	6,50E-1	6,31E-1	7,92E-1	7,95E-1	2,9	0,3	
			1	2,68E+0	2,14E+0	1,31E+0	1,46E+0	25,4	12,0	
			5	1,26E+1	1,02E+1	2,83E+0	3,19E+0	23,4	12,8	
			10	2,32E+1	1,92E+1	3,95E+0	4,38E+0	21,1	10,8	
			20	3,99E+1	3,44E+1	5,19E+0	5,86E+0	16,1	13,0	
5000		30	5,13E+1	4,48E+1	5,95E+0	6,69E+0	14,6	12,5		
		40	5,83E+1	5,15E+1	6,53E+0	7,18E+0	13,1	10,0		
		50	6,09E+1	5,35E+1	6,66E+0	7,32E+0	13,7	9,9		
		1	6,62E+1	3,29E+1	3,39E+0	5,73E+0	101,4	69,1		
		5	2,95E+2	1,59E+2	7,70E+0	1,26E+1	85,8	63,5		
		10	5,20E+2	3,03E+2	1,09E+1	1,74E+1	71,9	59,5		
10000	20	8,50E+2	5,45E+2	1,59E+1	2,34E+1	55,8	47,2			
	30	1,09E+3	7,22E+2	1,85E+1	2,69E+1	50,3	45,4			
	40	1,25E+3	8,31E+2	2,04E+1	2,88E+1	51,0	41,3			
	50	1,35E+3	8,67E+2	2,11E+1	2,94E+1	55,4	39,5			
	1	2,63E+2	8,66E+1	3,34E+0	9,31E+0	203,2	179,1			
	5	1,13E+3	4,23E+2	8,16E+0	2,06E+1	165,9	152,2			
5,93	2,85	10	10	1,94E+3	8,19E+2	1,25E+1	2,86E+1	136,8	129,0	
			20	3,12E+3	1,51E+3	1,97E+1	3,89E+1	106,0	97,5	
			30	4,02E+3	2,05E+3	2,60E+1	4,52E+1	96,4	74,1	
			40	4,70E+3	2,38E+3	2,97E+1	4,88E+1	97,7	64,0	
			50	5,16E+3	2,49E+3	3,07E+1	4,99E+1	106,8	62,9	
			10	4,67E-3	5,80E-3	7,59E-2	7,62E-2	-19,5	0,3	
		100	20	8,30E-3	1,36E-2	1,16E-1	1,17E-1	-39,0	0,7	
			30	1,09E-2	1,30E-2	1,13E-1	1,14E-1	-16,5	0,7	
			40	1,24E-2	1,78E-2	1,32E-1	1,33E-1	-30,3	0,9	
			50	1,29E-2	2,02E-2	1,41E-1	1,42E-1	-35,9	1,0	
			1	5,20E-2	7,42E-2	2,62E-1	2,72E-1	-29,9	3,9	
			5	2,49E-1	3,18E-1	5,39E-1	5,64E-1	-21,5	4,6	
		1000	10	4,71E-1	6,21E-1	7,56E-1	7,88E-1	-24,2	4,2	
			20	8,35E-1	1,08E+0	9,91E-1	1,04E+0	-22,7	4,9	
			30	1,09E+0	1,40E+0	1,15E+0	1,18E+0	-22,1	2,8	
			40	1,25E+0	1,66E+0	1,26E+0	1,29E+0	-24,8	2,4	
			50	1,30E+0	1,67E+0	1,24E+0	1,29E+0	-22,1	3,7	
			1	5,19E+0	4,93E+0	1,56E+0	2,22E+0	5,5	42,6	
	1000	5	2,46E+1	2,38E+1	3,56E+0	4,88E+0	3,4	37,2		
		10	4,60E+1	4,52E+1	4,96E+0	6,72E+0	1,8	35,4		
		20	7,97E+1	8,10E+1	6,83E+0	9,00E+0	-1,6	31,8		

5,93	2,85	1000	30	1,03E+2	1,07E+2	7,74E+0	1,03E+1	-3,9	33,6
			40	1,16E+2	1,23E+2	8,56E+0	1,11E+1	-5,3	29,5
			50	1,21E+2	1,28E+2	8,80E+0	1,13E+1	-5,8	28,7
		5000	1	1,29E+2	4,80E+1	1,40E+0	6,93E+0	169,5	394,1
			5	6,03E+2	2,38E+2	3,52E+0	1,54E+1	154,0	337,7
			10	1,10E+3	4,68E+2	5,77E+0	2,16E+1	136,0	274,8
			20	1,84E+3	8,95E+2	1,03E+1	2,99E+1	106,0	190,3
			30	2,30E+3	1,25E+3	1,53E+1	3,53E+1	84,4	130,6
			40	2,55E+3	1,48E+3	1,94E+1	3,85E+1	71,7	98,9
			50	2,65E+3	1,57E+3	2,12E+1	3,96E+1	68,6	86,9
		10000	1	5,16E+2	9,98E+1	4,52E-1	9,99E+0	417,5	2108,3
			5	2,39E+3	4,98E+2	1,30E+0	2,23E+1	379,9	1623,0
			10	4,34E+3	9,95E+2	2,43E+0	3,15E+1	336,6	1198,3
			20	7,14E+3	1,97E+3	6,51E+0	4,44E+1	262,5	581,9
			30	8,78E+3	2,87E+3	1,40E+1	5,36E+1	205,6	283,8
			40	9,64E+3	3,57E+3	2,33E+1	5,98E+1	169,6	156,3
			50	1,00E+4	3,85E+3	2,88E+1	6,20E+1	160,5	115,7

Tabelle 4.5.1-1 Ergebnisse der Monte-Carlo-Simulationen

Wie der letzten Spalte der Tabelle zu entnehmen ist, kann für $N \leq 100$ die Wahrscheinlichkeitsfunktion sehr gut durch eine Poissonverteilung wiedergegeben werden. Für größere N ist die empirische Wahrscheinlichkeitsfunktion schmäler als die Poissonverteilung um denselben Mittelwert, für $N=1000$ beträgt die Abweichung etwa 30%. Die Schätzfunktion für den Erwartungswert, Gleichung 4.5.1-16 liefert bei den meisten Ereignisbreitenverteilungen nur für mittlere Ereignishäufigkeiten ($N = 1000 \Leftrightarrow$ ca. 10 Ereignisse/s) einigermaßen brauchbare Werte (Abweichung bis ca. 15%). Für $N=10$ und $N=100$ sind die Werte etwa 10-40% zu klein, für $N=5000$ und $N=10000$ sind die Schätzwerte aus Gleichung 4.5.1-16 bis zu vierfach überhöht. Bei Ereignisbreitenverteilungen mit einem hohen Anteil schmaler Ereignisse funktioniert die Schätzfunktion für $N=100$ am besten.

Abbildung 4.5.1-8 zeigt einige der Wahrscheinlichkeitsfunktionen aus Tabelle 4.5.1-1. Links ist die Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion der Ereignisbreite, in der Mitte die Simulation für insgesamt 100 Ereignisse und rechts die Simulation für insgesamt 1000 Ereignisse auf dem 50 s langen Spurenpaar dargestellt. Bei $N_1/N = 50\%$ entspricht das im Mittel 1 Ereignis/s bzw. 10 Ereignisse/s.

Für $N = 100$ gibt die Poisson-Näherung um den empirischen Mittelwert die simulierte Verteilungsfunktion gut wieder. Für $N=1000$ sind die Poisson-Näherungen zu breit und das Wahrscheinlichkeitsmaximum entsprechend zu niedrig.

Als **Ergebnis der Montecarlosimulationen** ist festzuhalten, daß die Näherung der Gleichung 4.5.1-16 eher grob und auch nur in einem relativ engen Ereignisfrequenzbereich gültig ist. Man könnte zwar versuchen, eine bessere Schätzformel zu entwickeln oder Korrekturfunktionen für Gleichung 4.5.1-16 zu finden. Da die Montecarlosimulationen jedoch in einer vertretbaren Rechenzeit durchführbar sind (< 5 min für 5000 Simulationen mit je 1000 Ereignispaaren), kommt man schneller ans Ziel, wenn diese durchgeführt werden. Um festzustellen wie wahrscheinlich eine bestimmte Anzahl von Ereignispaaren ist, wenn die Ereignisschwerpunkte zufällig verteilt sind werden jeweils 5000 Spurenpaare simuliert und die Ereignispaare ausgezählt. Die n Ereignisschwerpunkte sind dabei durch gleichverteilte Zufallszahlen mit $W(t) dt = dt/\text{Meßzeit}$ gegeben. Die Ereignisbreiten werden nicht extra simuliert, sondern die gemessene Liste mit den Ereignisbreiten wird einfach für jede Simulation zufällig permutiert (d.h. jede der $n!$ Permutationen ist gleich wahrscheinlich).

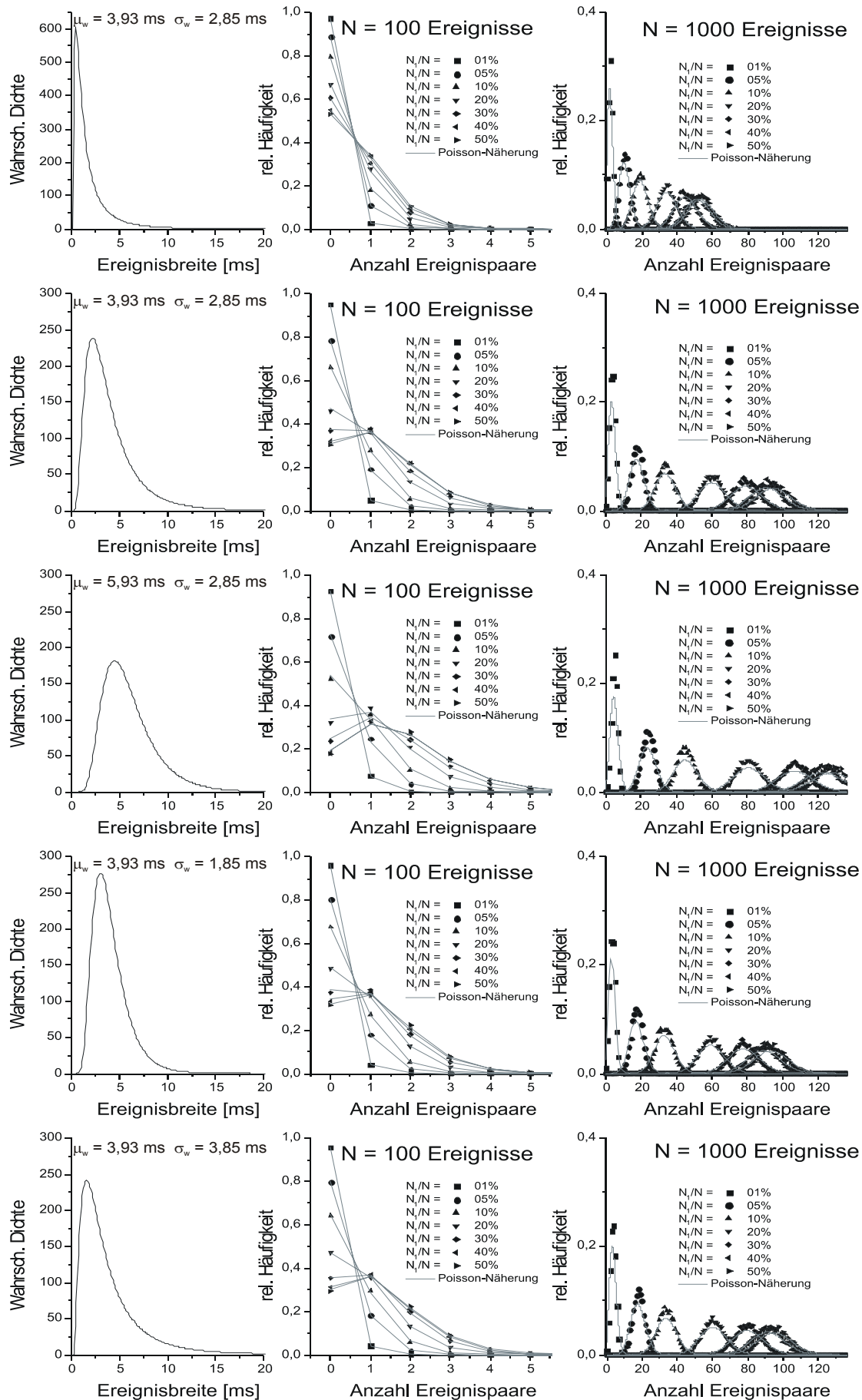


Abbildung 4.5.1-8 Simulierte Paarverteilungsfunktionen für verschiedene Ereignisbreitenverteilungen

4.5.2 Cy5-dCTP

Als Farbstofflösung in diesem Unterkapitel dient ca. 5×10^{-10} M Cy5-dCTP in Femtopuffer. Zusätzlich zur Elektrodenspannung wurde in diesem Experiment die Anregungsleistung variiert. Es wurden insgesamt 6 Meßreihen bei 36, 145, 271, 416 und 653 μ W Anregungsleistung, gemessen an der Eintrittspupille des Objektivs, mit je 5 Einzelmessungen bei 3, 6, 9, 12 und 15 V Elektrodenspannung durchgeführt. Eine Einzelmessung dauerte 153,6 s, wobei die Umpolung nach etwa 60s erfolgte. D.h. die Farbstoffionen wurden etwa $2,5 \times$ länger aus dem Femtotip herausgezogen, als sie vorher hereingezogen wurden.

Die Fluoreszenzereignisbestimmung erfolgte nach dem in Abschnitt 4.3 beschriebenen Verfahren.

Das über die Amplitude der zeitaufgelösten Korrelationsfunktion ermittelte optimale Zeitfenster ergab als untere Grenze Kanal 12 und als obere Grenze Kanal 30. Die so gegatete Spur wurde mit dem gleitenden Durchschnitt (s. Kapitel 2.9.3) geglättet. Erst ab einem Glättparameter von 3, d.h. einer Fensterbreite von 7 Bins à 0,5 ms, verschiebt sich der Wendepunkt der Korrelationsfunktion wesentlich. Als Glättparameter wird daher 2, d.h. eine Fensterbreite von 2,5 ms gewählt.

Die Schwellen zur Fluoreszenzereigniserkennung wurden für jede Meßreihe einzeln bestimmt. Dazu wurde das Histogramm der Zählraten der gegateten und geglätteten Spur bei 9 V Elektrodenspannung herangezogen.

Als Startschwelle dient der Median der Zählrate, als Erkennungsschwelle der Schnittpunkt der Wendetangenten des Graphen von $\ln(W(\text{rate} \geq f))$ gegen f (s. Abschnitt 4.3.3). Die Trennschwelle wurde auf 20% des kleineren Minimums festgesetzt.

Tabelle 4.5.2-1 faßt die Parameter zur Fluoreszenzereigniserkennung zusammen:

Gate	Kanal 12-30 von 64 Kanälen	
Filter	gleitender Durchschnitt	gl = 2
Trennschwelle	20%	
Leistung [μ W]	Startschwelle [kHz]	Erkennungsschwelle [kHz]
36	0,49	1,95
145	0,49	2,71
271	0,50	2,49
416	0,57	3,14
555	0,67	2,34
653	0,68	2,65

Tabelle 4.5-1 Parameter zur Fluoreszenzereigniserkennung

Werden andere Parameter gewählt, so ändern sich zwar die absoluten Ereigniszahlen, das Ergebnis, bleibt jedoch qualitativ gleich.

Die untere Hälfte von Abbildung 4.5.2-1 zeigt die aus den zeitaufgelösten Daten ermittelte MCS-Spur sowie die gegatete Spur der Messung bei 271 μ W Anregungsleistung und 15 V Elektrodenspannung. Bei der gegateten Spur ist das Signal- zu Rausch- Verhältnis deutlich

verbessert (von 4,66 auf 19,70). Nach etwa 50s werden die Elektroden von der Spannungsquelle getrennt, nach 60,2 s wird umgepolt. In der oberen Hälfte von Abbildung 4.5.2-1 ist die Anzahl der Fluoreszenzereignisse gegen die Zeit aufgetragen. Ein Ereignis, das während des „Reinziehens“ detektiert wurde inkrementiert den Zähler, während Ereignisse, die nach dem Umpolen detektiert werden den Zähler dekrementieren. Der Zähler gibt also im Idealfall an, wie viele Moleküle sich gerade im Femtotip befinden.

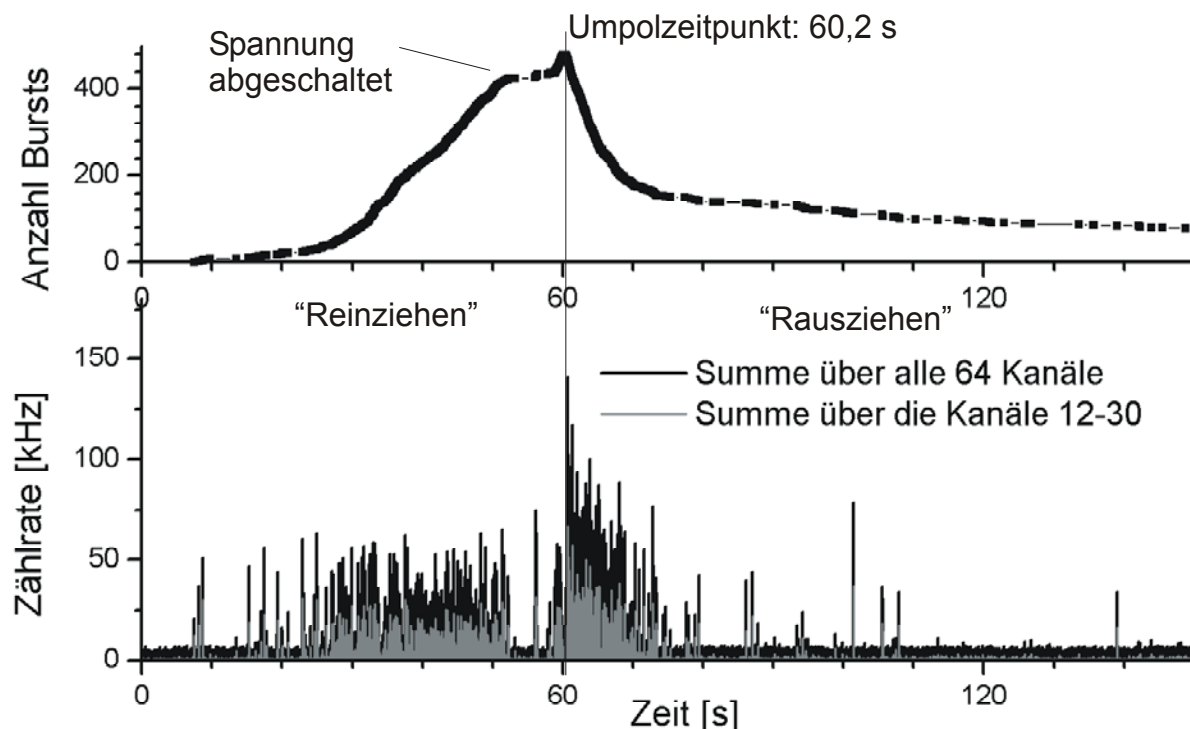


Abbildung 4.5.2-1 Erkante Fluoreszenzereignisse und MCS-Spur bei 271 μW Anregungsleistung und 15 V Elektrodenspannung.

Die obere Hälfte der Abbildung zeigt die Zahl der im Femtotip befindlichen Moleküle.

Die untere Hälfte der Abbildung zeigt die ungegatete Spur (schwarz) und die gegatete Spur (grau).

Die Binweite in dieser Abbildung beträgt 2 ms.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.5.2-2 zusammengefaßt. Die Gesamtzahl detektierter Ereignisse hängt stark von der Wahl der Schwellen ab, während die Abhängigkeit beim Quotienten aus der Anzahl der Moleküle beim Heraus- und Hereinziehen weniger stark ausgeprägt ist. Ein negativer Logarithmus dieses Quotienten (letzte Spalte in Tabelle 4.5.2-2) bedeutet, daß während des Hereinziehens mehr Moleküle als während des Herausziehens detektiert werden. Außer von der angelegten Elektrodenspannung hängt die Gesamtzahl der Moleküle auch von der Nummer des Versuchs in der Meßreihenfolge ab: Bei den später durchgeführten Experimenten wurden mehr Ereignisse detektiert als bei den ersten Experimenten. Die laufende Nummer des Versuchs mit dem verwendeten Femtotip ist in der zweiten Spalte der Tabelle vermerkt.

Leistung [μ W]	Versuch #	Spannung [V]	Umpolzeit [s]	Moleküle gesamt	Moleküle rein	Moleküle raus	In (raus/rein)
36	11	3	60,0	312	239	73	-1,19
	12	6	57,0	1568	1109	459	-0,88
	13	9	55,5	917	551	366	-0,41
	14	12	59,0	2160	1635	525	-1,14
	15	15	62,7	2839	2413	426	-1,73
145	1	3	57,7	160	1145	24	-3,87
	2	6	59,0	343	289	54	-1,68
	3	9	55,5	229	141	88	-0,47
	4	12	59,3	387	188	199	0,06
	5	15	58,2	894	670	224	-1,10
271	6	3	56,0	222	195	27	-1,98
	7	6	58,3	198	133	65	-0,72
	8	9	56,5	364	249	115	-0,77
	9	12	57,3	492	296	196	-0,41
	10	15	60,2	881	478	403	-0,17
416	16	3	56,5	125	92	33	-1,03
	17	6	57,6	390	363	27	-2,60
	18	9	61,8	341	299	42	-1,96
	19	12	58,2	970	906	64	-2,65
	20	15	61,0	497	388	109	-1,27
	31	3	55,1	162	146	16	-2,21
	32	6	57,0	189	151	38	-1,38
	33	9	56,2	830	514	316	-0,49
	34	12	57,4	2035	1242	793	-0,45
35	15	56,0	4104	2748	1356	-0,71	
555	21	3	69,1	382	336	46	-1,99
	22	6	58,0	459	398	61	-1,88
	23	9	55,0	1529	984	545	-0,59
	24	9	59,5	1726	1174	552	-0,75
	25	15	59,0	4392	2179	2213	0,02
653	26	3	65,3	245	211	34	-1,83
	27	6	56,0	583	560	23	-3,19
	28	9	57,6	1017	954	63	-2,72
	29	12	59,0	1461	1379	82	-2,82
	30	15	57,6	2306	2207	99	-3,10

Tabelle 4.5.2-2 Ergebnisse der Handhabungsversuche mit Cy5-dCTP

In Abbildung 4.5.4-2 ist die Anzahl der detektierten Ereignisse gegen die Versuchszeit aufgetragen. Die während des Reinziehens erkannten Ereignisse werden dabei positiv, die während des Rausziehens erkannten hingegen negativ gewertet. Beim Reinziehen zeigt die Kurve bei den meisten Messungen einen mehr oder weniger linearen Verlauf, während die Kurve beim Rausziehen nach einiger Zeit abflacht. Die MCS-Spuren wurden in der Abbildung aus Gründen der Übersichtlichkeit weggelassen. Die einzelnen Graphen sind in der Abbildung tabellarisch angeordnet: Die Zeilen entsprechen konstanter Anregungsleistung, die Spalten konstanter Elektrodenspannung.

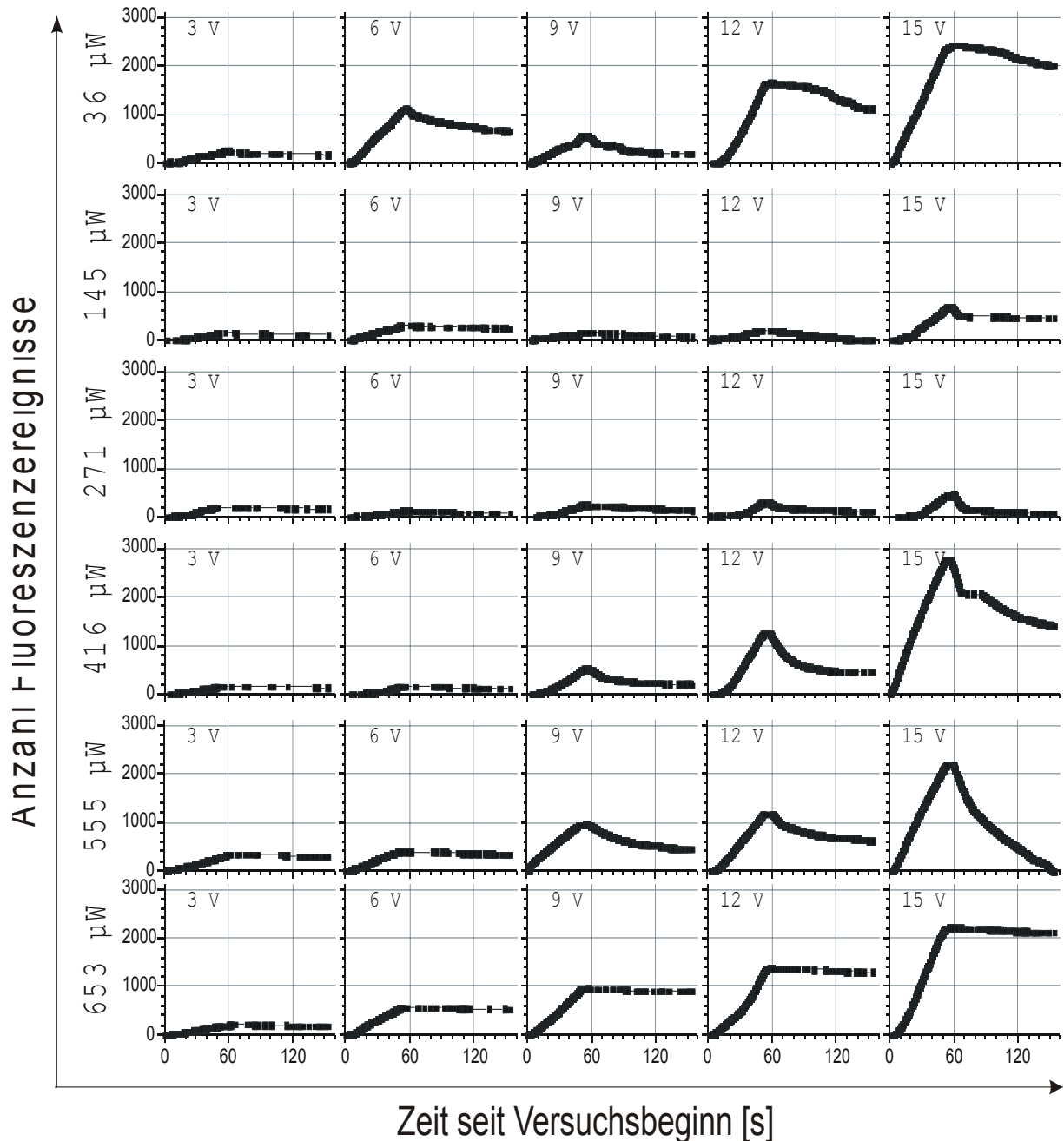


Abbildung 4.5.2-2 Detektierte Fluoreszenzereignisse während des Rein- und Rausziehens. Die Graphen entsprechen der oberen Hälfte von Abbildung 4.5.2-1. Die Anregungsleistung ist jeweils am linken Rand der Reihen vermerkt, die Elektrodenspannung links oben in den einzelnen Graphen.

Der Logarithmus des Quotienten der Anzahl herein- und herausgezogener Moleküle ist in Abbildung 4.5.2-3 gegen die Anregungsleistung aufgetragen. Der Quotient nimmt erwartungsgemäß mit steigender Anregungsleistung ab. Mit steigender Anregungsleistung nimmt die Wahrscheinlichkeit dafür, daß ein Molekül bereits beim ersten Durchtritt durch das Detektionsvolumen zerstört wird, zu. Die Elektrodenspannung scheint hingegen keinen systematischen Einfluß zu haben.

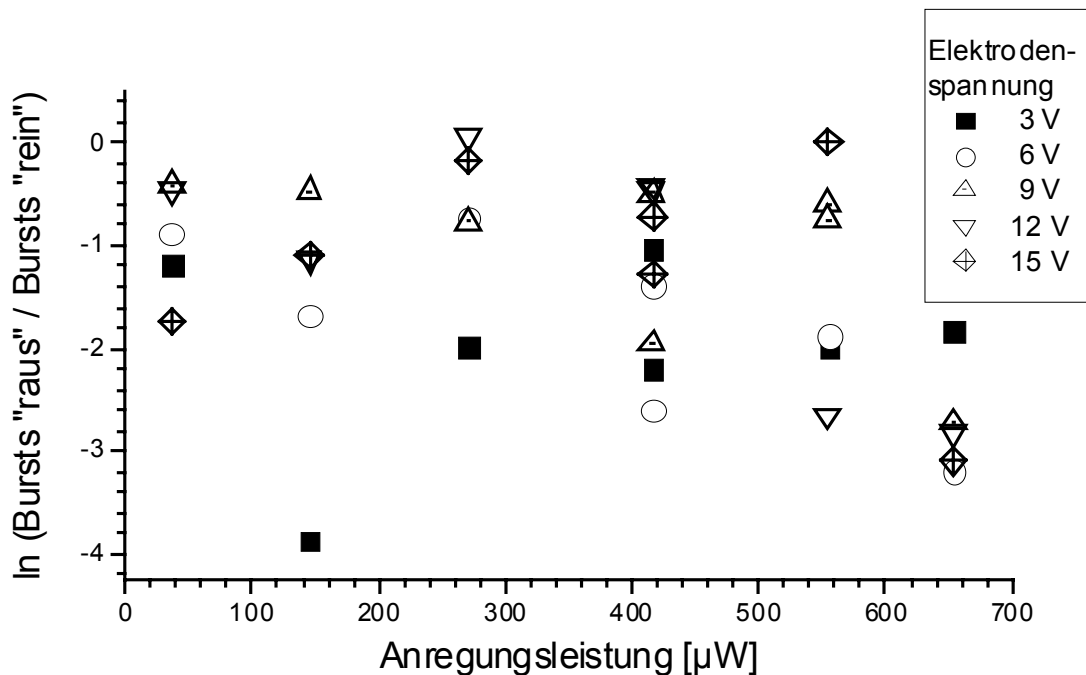


Abbildung 4.5.2-3 Logarithmus des Quotienten der Anzahl herausgezogener und hereingezogener Moleküle gegen die Anregungsleistung aufgetragen.

Aufsuchen etwaiger Symmetrien in den „Rein“- und in den „Raus“- Spuren

Zunächst werden die Fluoreszenzereignislisten der „Rein“- und der „Raus“-Spur auf den Bereich von ± 50 s um den Umpolzeitpunkt beschränkt. Anschließend werden die Listen von Streulichtereignissen bereinigt, indem die ermittelte Photonenzahl innerhalb des Gates, d.h. innerhalb der Kanäle 12-30, was einem Zeitfenster von 2,3 ns – 4,5 ns nach dem Maximum des Laserpulses entspricht, mit $\exp(-\frac{1}{2}((\ln\tau - \ln(1,2))/\Delta\ln\tau)^2)$ gewichtet und alle Ereignisse mit weniger als 10 Photonen verworfen werden. Die so behandelten Ereignislisten werden nun im Bereich $-20 \text{ s} \leq \theta \leq +5 \text{ s}$ und $0,5 \leq \text{Streckfaktor der Rausspur} \leq 1,5$ miteinander korreliert. Anschließend wird das Maximum des Produktes aus der Maximallinienschnittpunktdichtekarte (Vgl. Abschnitt 4.5.1) und der Korrelationsfunktion der Ereignislisten ermittelt.

Jetzt werden die gegateten Rohdaten (Rein = Umpolzeit...0 , Raus = Umpolzeit..2 \times Umpolzeit) um das gefundene vorläufige Maximum korreliert. Dabei beträgt das Intervall für die Verschiebung $\theta \pm 0,25$ s, das für den Streckfaktor $s \pm 0,06$.

In der linken Spalte von Abbildung 4.5.2-4 sind die Korrelationsfunktionen in diesem Bereich in Abhängigkeit von der Verschiebung θ und vom Streckfaktor s in einer linearen Graustufenskala wiedergegeben . Schwarz entspricht dem maximalen Funktionswert, weiß dem minimalen. Die schwarze horizontale Linie über der Karte entspricht dem in der mittleren Spalte von Abbildung 4.5.2-4 gezeigten Schnitt durch das Maximum der Korrelationsfunktion in diesem Bereich. Rechts ist der (gegateten) MCS-Spur beim

Reinziehen die entsprechend dem Korrelationsmaximum θ_{\max} verschobene und um s_{\max} gestreckte MCS-Spur beim Rausziehen gegenübergestellt.

Die Verschiebung θ_{\max} und der Streckfaktor s_{\max} , bei der der Symmetrieparameter, d.h. die normierte Kreuzkorrelationsfunktion der „Rein“- und der „Raus“-Spur maximal wird, ist in Tabelle 4.5.2-3 wiedergegeben. Ein Parameter von $G_{\text{Norm}}(\theta_{\max}, s_{\max}) = 1$ (Vgl. Gleichung 4.5.1-5) bedeutet dabei perfekte Symmetrie, ein Parameter von Null hingegen keine Symmetrie. Sind auf einer der beiden Spuren nicht genügend Fluoreszenzereignisse ($N_1, N_2 < 8$), so ist der Funktionswert eingeklammert, da dann keine ausreichende Statistik vorliegt. Die Überlappzeit beschreibt dasjenige Zeitintervall auf der „Rein“-Spur, auf dem gleichzeitig die um θ_{\max} verschobene und um s_{\max} gestreckte „Raus“-Spur definiert ist. Die Überlappzeit kann demnach maximal so groß wie die Umpolzeit sein. N_1 gibt die Anzahl der Fluoreszenzereignisse innerhalb der Überlappzeit auf der „Rein“-Spur an, N_2 diejenige auf der Rausspur. Ereignispaare sind nach Gleichung 4.5.1-15 solche Photonenschauer, deren Schwerpunkte auf der „Rein“-Spur und auf der verschobenen und gestreckten „Raus“-Spur zu gleichen Zeiten, d.h. innerhalb eines Zeitintervalls von $2\sqrt{\sigma_{\text{rein}}^2 + \sigma_{\text{raus}}^2}$, liegen. λ gibt den mittels 5000 Montecarlosimulationen der beiden Spuren statistisch ermittelten Erwartungswert der Ereignispaare wieder. W_{Zuf} gibt die Wahrscheinlichkeit dafür an, daß mindestens die tatsächlich beobachtete Anzahl von Ereignispaaren auf eigentlich unkorrelierten Spuren zufällig gefunden wird.

Eine negative Verschiebung θ_{\max} bedeutet, daß das Zentrum der Symmetrie vor der Umpolzeit liegt. Das ist im allgemeinen zu erwarten, da vor der Umpolung die Spannung einige Sekunden lang abgeschaltet wird. Ein Streckfaktor $s_{\max} < 1$ bedeutet, daß die „Raus“-Spur gestaucht wird, während ein Faktor > 1 bedeutet, daß sie gestreckt wird.

Die normierte Kreuzkorrelationsfunktion der beiden Spuren ist dabei nach Gleichung 4.5.1-5 definiert als:

$$G_{\text{norm}}(\theta, s) = \frac{\left\langle \delta_{\text{rein}}(t) \delta_{\text{raus}}\left(\frac{t+\theta}{s}\right) \right\rangle}{\lim_{\tau \rightarrow 0} \sqrt{\left\langle \delta_{\text{rein}}(t) \delta_{\text{rein}}(t+\tau) \right\rangle \left\langle \delta_{\text{raus}}(t) \delta_{\text{raus}}(t+\tau) \right\rangle}}$$

mit

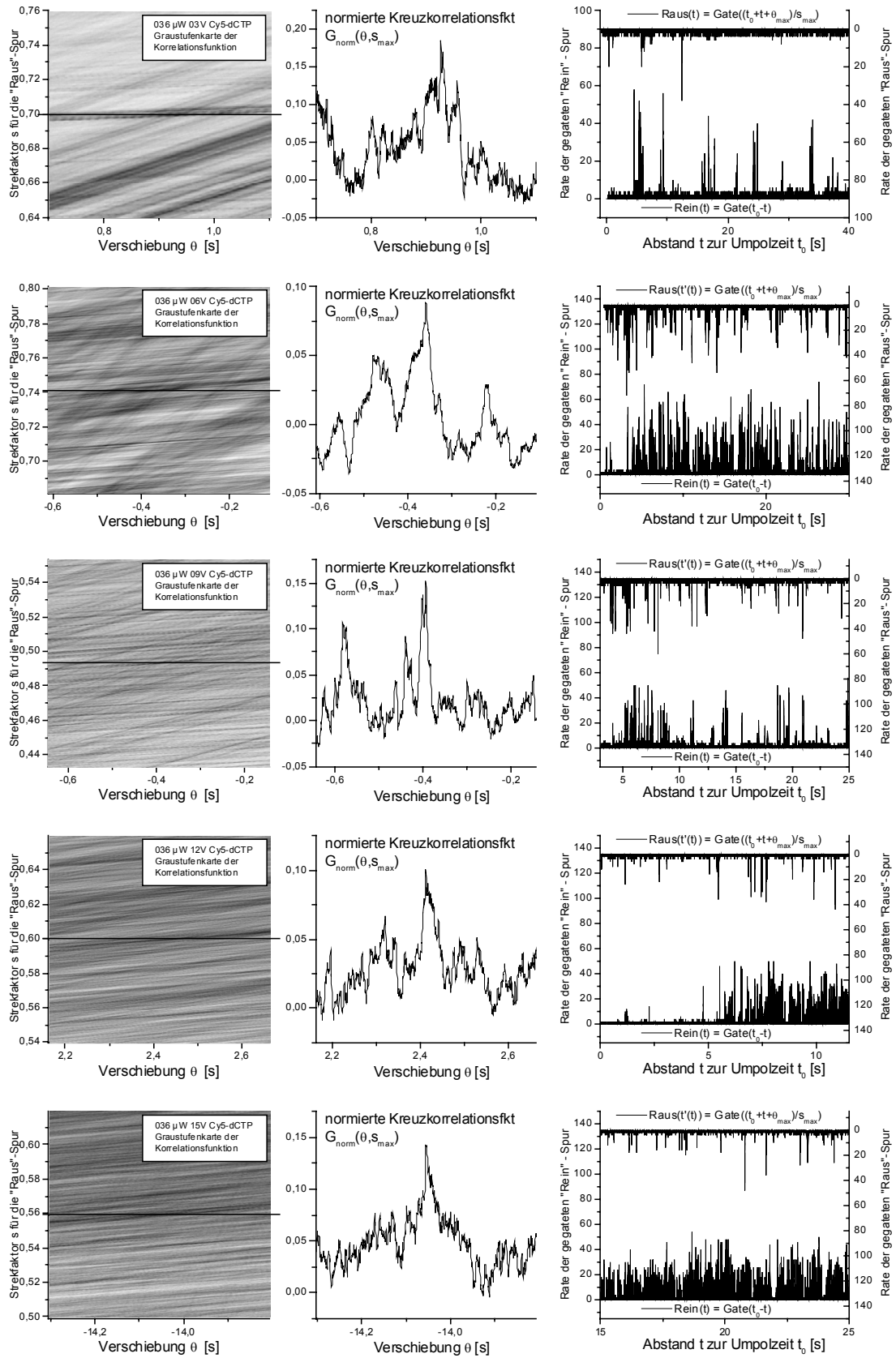
$$\delta_{\text{rein}}(t) = \text{Gate}(t_0 - t) - \frac{1}{t_0} \int_0^{t_0} \text{Gate}(t') dt' \quad 0 \leq t \leq t_0$$

und

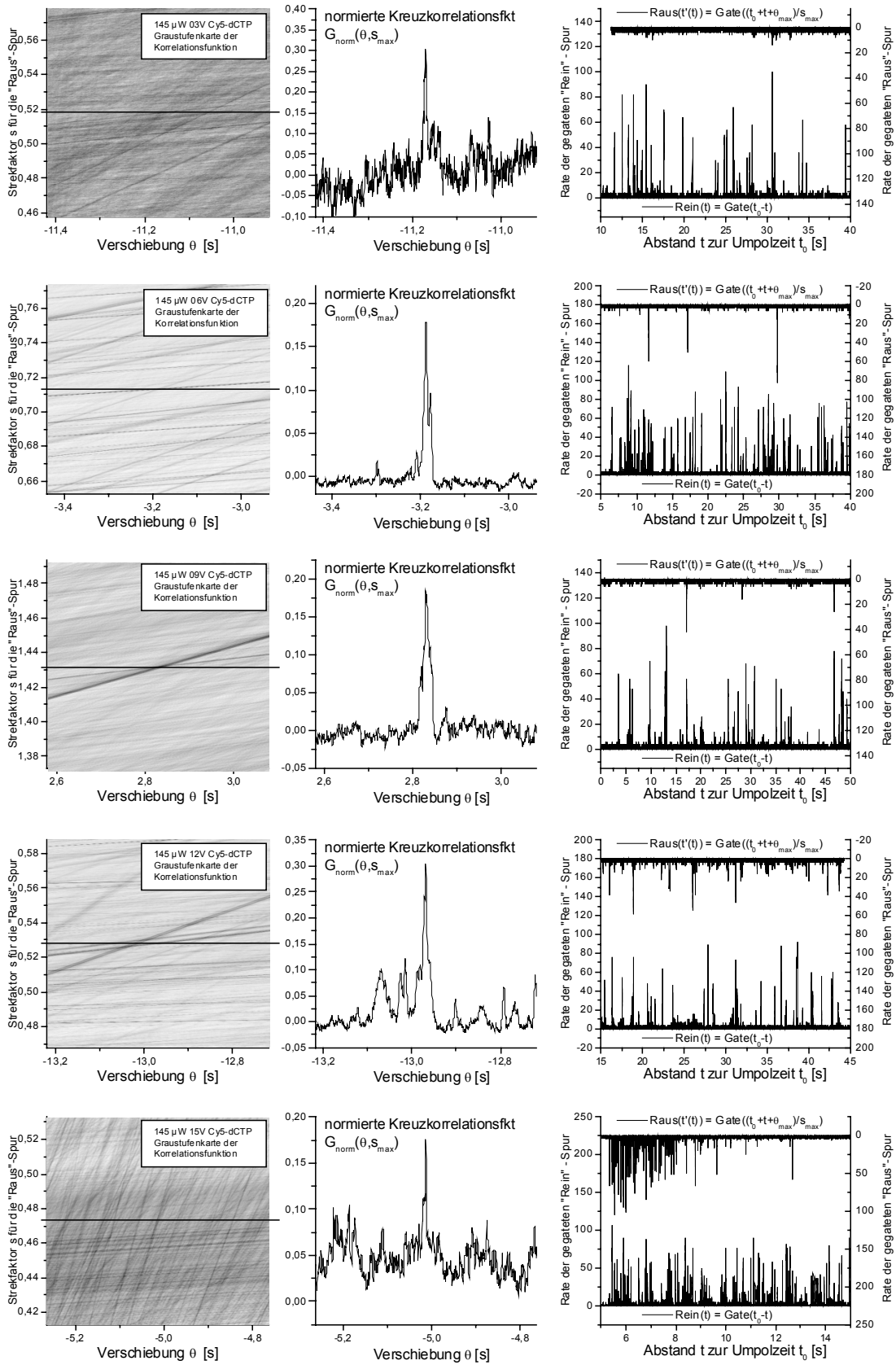
$$\delta_{\text{raus}}(t) = \text{Gate}(t_0 + t) - \frac{1}{t_0} \int_{t_0}^{2t_0} \text{Gate}(t') dt' \quad 0 \leq t \leq t_0 .$$

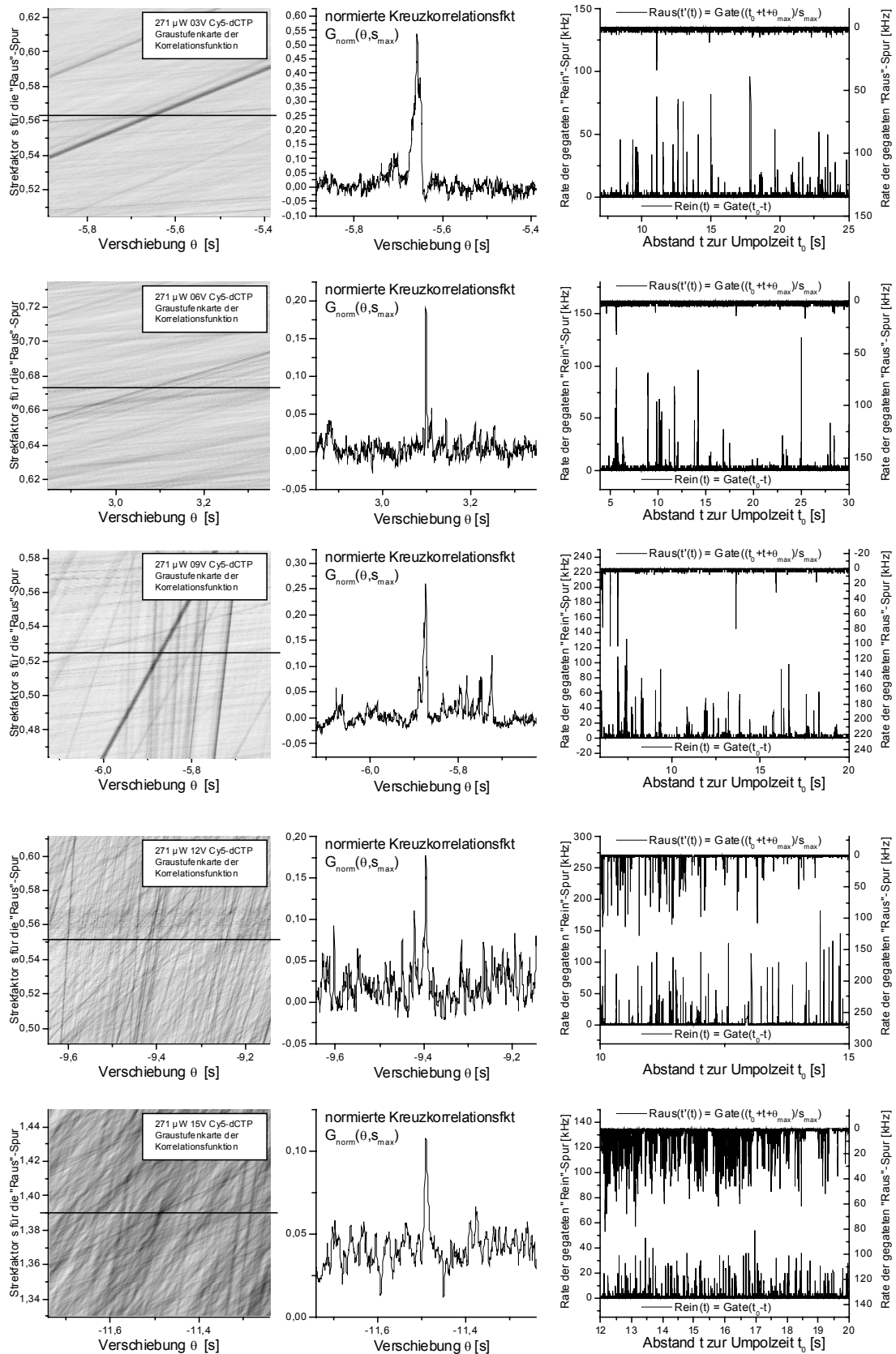
Leistung [μW]	Spannung [V]	N_1	N_2	Ereignispaare			Überlappzeit [s]	Umpolzeit t_0 [s]	Korrelationszeit θ_{\max} [s]	Streckfaktor der „Raus“-Spur S_{\max}	$G_{\text{Norm}}(\theta_{\max}, S_{\max})$	
				Beob.	(Montecarlo)							
					λ	W_{zuf} [%]						
36	3	62	21	1	$0,78 \pm 0,86$	100,0	33,4	60,0	0,928	0,700	0,185	
	6	438	144	33	$30,77 \pm 4,75$	51,5	37,1	57,0	-0,360	0,741	0,088	
	9	126	76	5	$5,74 \pm 2,27$	93,6	24,7	55,5	-0,394	0,493	0,153	
	12	794	81	41	$26,79 \pm 4,26$	0,4	28,2	59,0	2,413	0,600	0,100	
	15	1079	130	79	$53,87 \pm 5,58$	0,0	28,0	62,7	-14,055	0,559	0,143	
145	3	59	6	1	$0,21 \pm 0,45$	100,0	25,9	57,7	-11,170	0,518	(0,305)	
	6	150	13	1	$0,93 \pm 0,93$	100,0	35,6	59,0	-3,188	0,713	0,178	
	9	95	8	3	$0,42 \pm 0,63$	34,7	50,0	55,5	2,829	1,433	0,185	
	12	97	44	5	$1,93 \pm 1,35$	30,0	26,4	59,3	-12,969	0,528	0,305	
	15	310	134	25	$15,83 \pm 3,67$	3,9	23,6	58,2	-5,013	0,473	0,176	
271	3	77	4	0	$0,16 \pm 0,39$	100,0	27,6	56,0	-5,658	0,563	(0,538)	
	6	54	9	1	$0,28 \pm 0,52$	100,0	30,6	58,3	3,099	0,674	(0,191)	
	9	106	22	4	$1,01 \pm 0,98$	27,0	26,2	56,5	-5,874	0,524	(0,260)	
	12	191	87	12	$3,94 \pm 1,92$	0,7	27,0	57,3	-9,395	0,551	0,178	
	15	257	273	64	$20,17 \pm 4,24$	$6\text{E-}12$	36,5	60,2	-11,490	1,390	0,108	
416	1. Versuch	3	34	3	0	$0,06 \pm 0,24$	100,0	26,9	56,5	3,728	0,626	(0,268)
		6	219	4	1	$0,60 \pm 0,71$	100,0	36,2	57,6	-11,779	1,008	(0,201)
		9	125	3	0	$0,18 \pm 0,42$	100,0	28,8	61,8	-10,720	0,599	(0,342)
		12	652	13	5	$3,79 \pm 1,60$	79,2	49,4	58,2	0,928	1,007	0,112
		15	155	22	2	$2,04 \pm 1,37$	100,0	50	61,0	2,569	1,147	0,176
	2. Versuch	3	79	6	2	$0,18 \pm 0,41$	100,0	30,1	55,1	-15,586	0,602	(0,496)
		6	72	10	1	$0,27 \pm 0,51$	100,0	16,8	57,0	-3,509	0,374	(0,364)
		9	267	222	24	$15,45 \pm 3,73$	6,1	26	56,2	-11,930	0,531	0,119
		12	749	479	110	$64,61 \pm 7,19$	$5,2\text{E-}5$	28,2	57,4	-9,127	0,552	0,091
		15	722	426	170	$49,09 \pm 6,38$	0,0	18,2	56,0	-11,831	1,506	0,033
555	3	100	4	0	$0,16 \pm 0,39$	100,0	31,5	69,1	-18,539	0,634	(0,243)	
	6	144	6	2	$0,29 \pm 0,52$	100,0	26,0	58,0	-18,651	0,520	(0,312)	
	9	640	271	48	$37,32 \pm 5,47$	6,7	47,3	55,0	-2,667	1,042	0,062	
	9	804	259	51	$35,49 \pm 5,40$	1,0	40,0	59,5	-10,008	1,017	0,075	
	15	995	770	306	$184,4 \pm 10,9$	$4\text{E-}14$	34,3	59,0	-5,706	1,330	0,043	
653	3	36	1	0	$0,03 \pm 0,16$	100,0	23,2	65,3	-2,694	0,465	(0,383)	
	6	219	6	0	$0,53 \pm 0,69$	100,0	28,4	56,0	-5,735	0,568	(0,354)	
	9	654	16	4	$3,01 \pm 1,53$	83,8	43,9	57,6	-6,127	1,027	0,144	
	12	837	20	6	$4,01 \pm 1,76$	59,5	35,8	59,0	-3,251	0,716	0,099	
	15	906	19	10	$5,78 \pm 1,99$	19,9	23,6	57,6	-5,794	0,738	0,089	

Tabelle 4.5.2-3 Ergebnisse der Symmetrieparametrisierung der „Rein“- und der „Raus“-Spur bei den Handhabungsversuchen mit Cy5-dCTP.

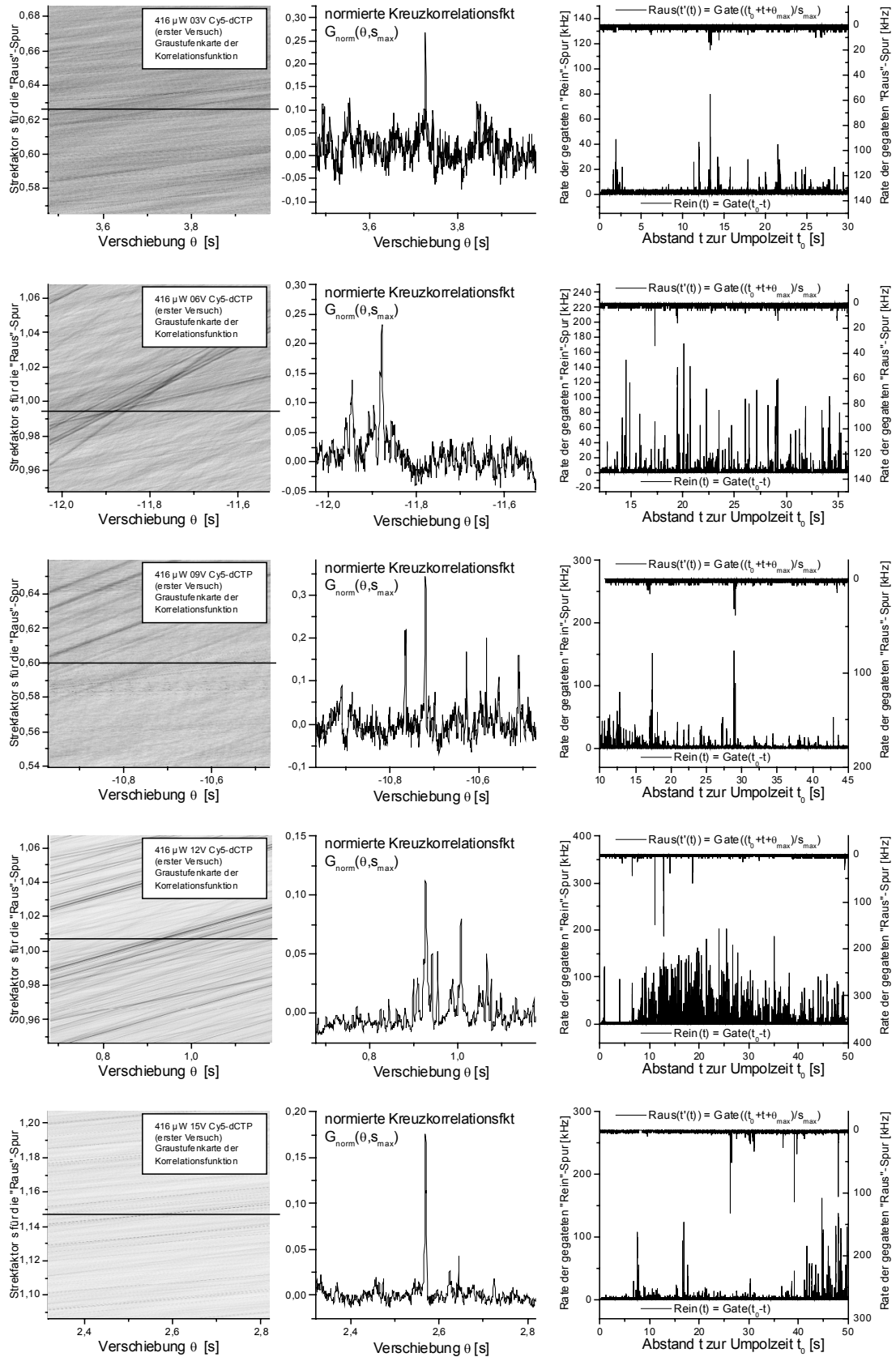
036 μW 

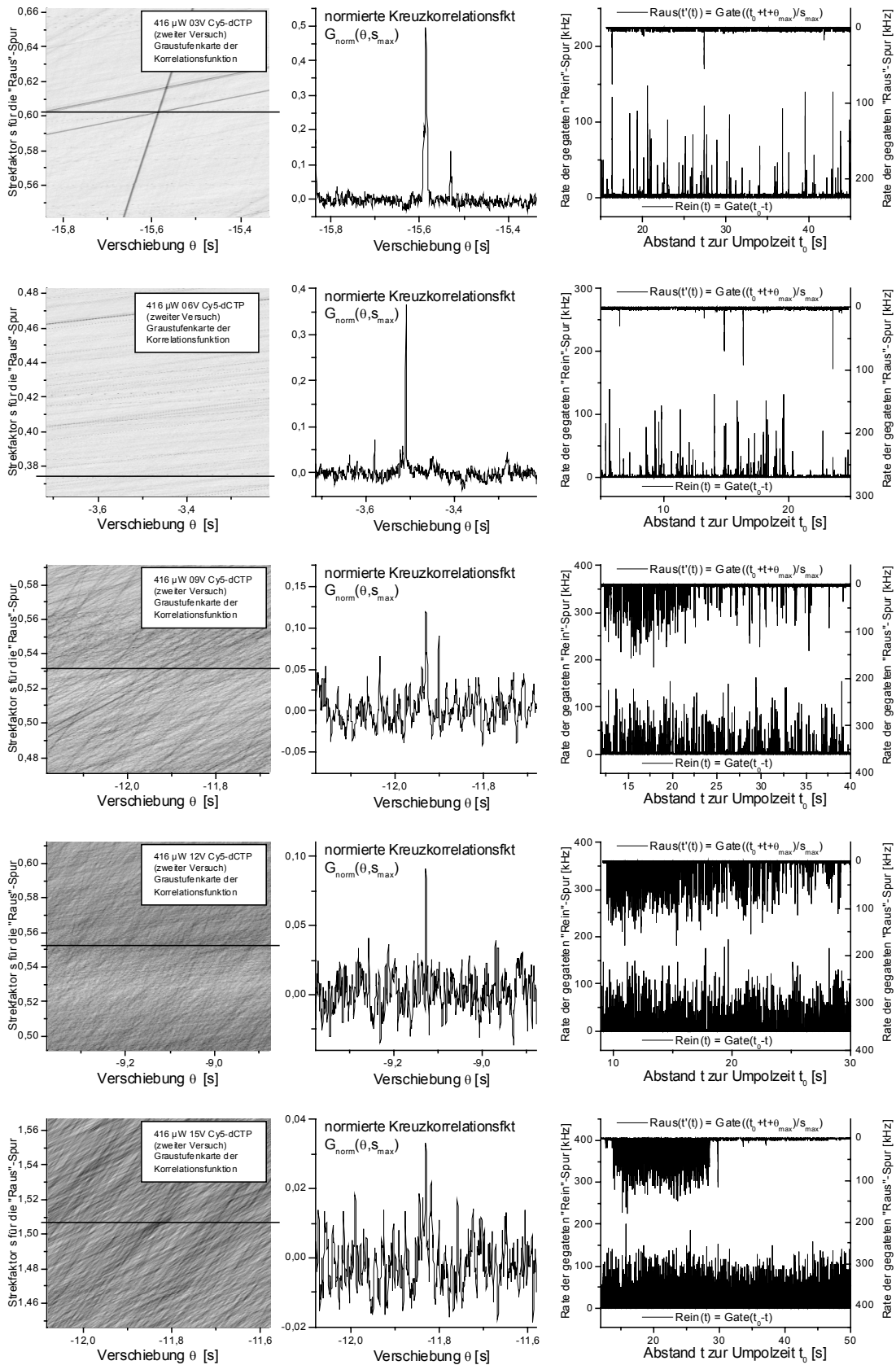
145 μW



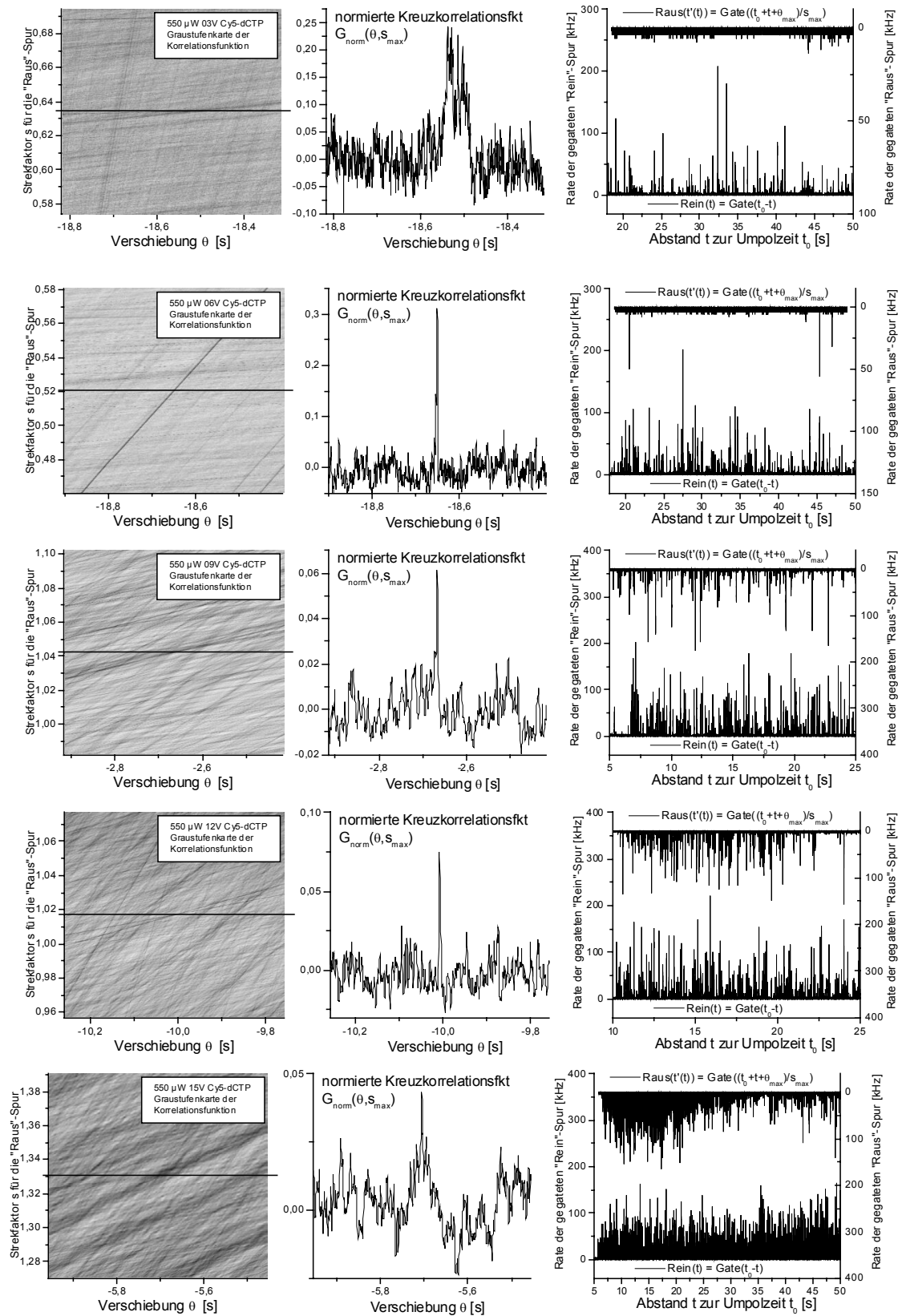
271 μW 

416 μW (erster Versuch)



416 μW (zweiter Versuch)

560 μW



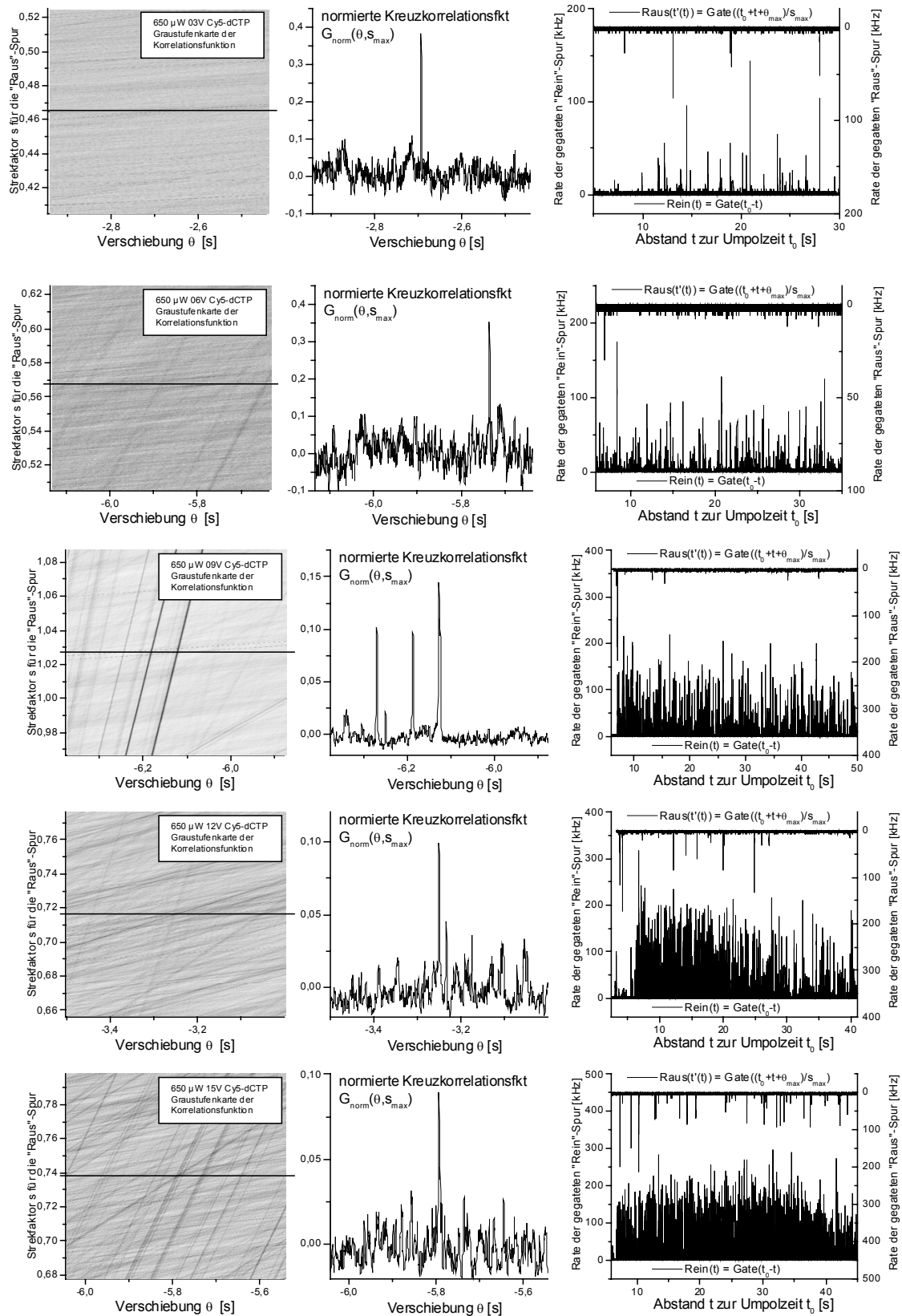
650 μW 

Abbildung 4.5.2-4 Kreuzkorrelationsfunktionen der gegateten Rohdaten.

4.5.3 Mr121-dUTP

Als Farbstofflösung in diesem Unterkapitel dient ca. $2,5 \times 10^{-9}$ M Mr121-dUTP in Sequenzierpuffer. Vor Beginn des eigentlichen Versuches wurde eine Blindprobe bei den beiden verwendeten Anregungsleistungen gemessen: Es wurde für je 102,4 s Spannung an die Elektrode gelegt, wobei die „Femtotip-“ Elektrode Kathode und die Außenelektrode Anode war. Es wurden zwei Meßreihen bei 145 und 271 μ W Anregungsleistung, gemessen an der Eintrittspupille des Objektivs, mit je 5 Einzelmessungen bei 3, 6, 9, 12 und 15 V Elektrodenspannung durchgeführt. Eine Einzelmessung dauerte 153,6 s, wobei die Umpolung nach etwa 60s erfolgte; d.h. die Farbstoffionen wurden etwa $2,5 \times$ länger aus dem Femtotip herausgezogen als sie vorher hereingezogen wurden.

Die Fluoreszenzereignisbestimmung erfolgte nach dem in Abschnitt 4.3 beschriebenen Verfahren.

Das über die Amplitude der zeitaufgelösten Korrelationsfunktion ermittelte optimale Zeitfenster ergab als untere Grenze Kanal 10 und als obere Grenze Kanal 51, das Fenster ist also, entsprechend der längeren Fluoreszenzabklingdauer des Farbstoffs MR121, etwas breiter als im Fall von Cy5. Die gegatete Spur wurde mit dem gleitenden Durchschnitt (s. Kapitel 2.9.3) geglättet. Als Glättparameter wird, 2, d.h. eine Fensterbreite von 2,5 ms gewählt.

Die Schwellen zur Fluoreszenzereigniserkennung wurden für beide Meßreihen einzeln bestimmt. Dazu wurde das Histogramm der Zählraten der gegateten und geglätteten Spur bei 9 V Elektrodenspannung herangezogen.

Als Startschwelle dient der Median der Zählrate, als Erkennungsschwelle der Schnittpunkt der Wendetangenten des Graphen von $\ln(W(\text{rate} \geq f))$ gegen f (s. Abschnitt 4.3.3). Die Trennschwelle wurde auf 20% des kleineren Minimums festgesetzt. Die Blindprobe wurde mit den gleichen Schwellen wie das Experiment ausgewertet.

Tabelle 4.5.3-1 faßt die Parameter zur Fluoreszenzereigniserkennung zusammen:

Gate	Kanal 10-51 von 64 Kanälen	
Filter	gleitender Durchschnitt	gl = 2
Trennschwelle	20%	
Leistung [μ W]	Startschwelle [kHz]	Erkennungsschwelle [kHz]
145	1,20	5,40
271	1,26	4,27

Tabelle 4.5.3-1 Parameter zur Fluoreszenzereigniserkennung

Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.5.3-2 zusammengefaßt. Die Gesamtzahl der detektierten Ereignisse hängt stark von der Wahl der Schwellen ab, während die Abhängigkeit beim Quotienten aus der Anzahl der Moleküle beim Heraus- und Hereinziehen weniger stark ausgeprägt ist. Ein negativer Logarithmus dieses Quotienten (letzte Spalte in Tabelle 4.5.1-2) bedeutet, daß während des Hereinziehens mehr Ereignisse als während des Herausziehens detektiert werden. Außer von der angelegten Elektrodenspannung hängt die Gesamtzahl der Fluoreszenzereignisse auch von der Nummer des Versuchs in der

Meßreihenfolge ab: Bei den später durchgeführten Experimenten wurden mehr Ereignisse detektiert als bei den ersten Experimenten, weil das Glycerin während der Experimente mit Farbstoff verunreinigt wird. Die laufende Nummer des Versuchs mit dem verwendeten Femtotip ist in der zweiten Spalte der Tabelle vermerkt.

Leistung [μ W]	Versuch #	Spannung [V]	Umpolzeit [s]	Moleküle gesamt	Moleküle rein	Moleküle raus	In (raus/rein)
Blindprobe (102,4 s raus)							
145	6	3				3	
	7	6				15	
	8	9				6	
	9	12				19	
	10	15				34	
271	1	3				0	
	2	6				16	
	3	9				5	
	4	12				47	
	5	15				18	
Experiment : $2,5 \times 10^{-9}$ M Mr121-dUTP							
145	11	3	64,5	580	430	150	-1,05
	12	6	58,5	1130	668	462	-0,37
	13	9	56,4	1705	923	782	-0,17
	14	12	57,5	2129	1197	932	-0,25
	15	15	53,0	2907	1331	1576	0,17
271	16	3	54,7	984	706	278	-0,93
	17	6 ^a	59,7	205	100	105	0,05
	18	6 ^b	56,9	1166	570	596	0,04
	19	9	56,7	1449	529	920	0,55
	20	12	59,1	1797	854	943	0,10
	21	15	60,0	1486	1072	414	-0,95

Tabelle 4.5.3-2 Ergebnisse der Handhabungsversuche mit Mr121-dUTP

In den Abbildungen 4.5.3-1 und 4.5.3-2 ist die Anzahl der detektierten Fluoreszenzereignisse gegen die Versuchszeit aufgetragen. Ein Ereignis, das während des „Reinziehens“ detektiert wurde inkrementiert den Zähler, während Ereignisse, die nach dem Umpolen detektiert wurden, den Zähler dekrementieren. Der Zähler gibt also im Idealfall an, wie viele Moleküle sich gerade im Femtotip befinden.

Zum Vergleich sind die Fluoreszenzereignisse der Blindprobe als graue Kreise über die Kurve beim Rausziehen gezeichnet. Beim Reinziehen zeigt die Kurve bei den meisten Messungen einen mehr oder weniger linearen Verlauf, während die Kurve beim Rausziehen nach einiger Zeit abflacht. Wie im Fall von Cy5-dCTP übersteigt die Zahl der reingezogenen Farbstoffionen die der rausgezogenen in den meisten Versuchen.

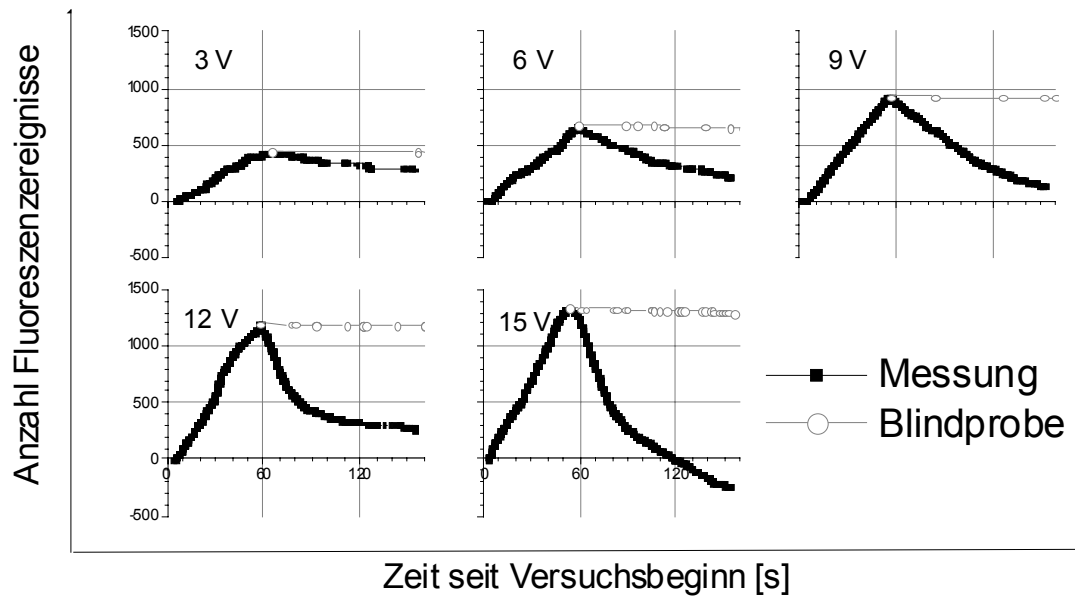


Abbildung 4.5.3-1 Detektierte Ereignisse während des Rein- und Rausziehens bei $145 \mu\text{W}$ Anregungsleistung.

Während des Reinziehens detektierte Ereignisse sind positiv, während des Rausziehens detektierte negativ gezählt. Die schwarzen Quadrate geben das Experiment wieder, die grauen Kreise die Blindprobe.

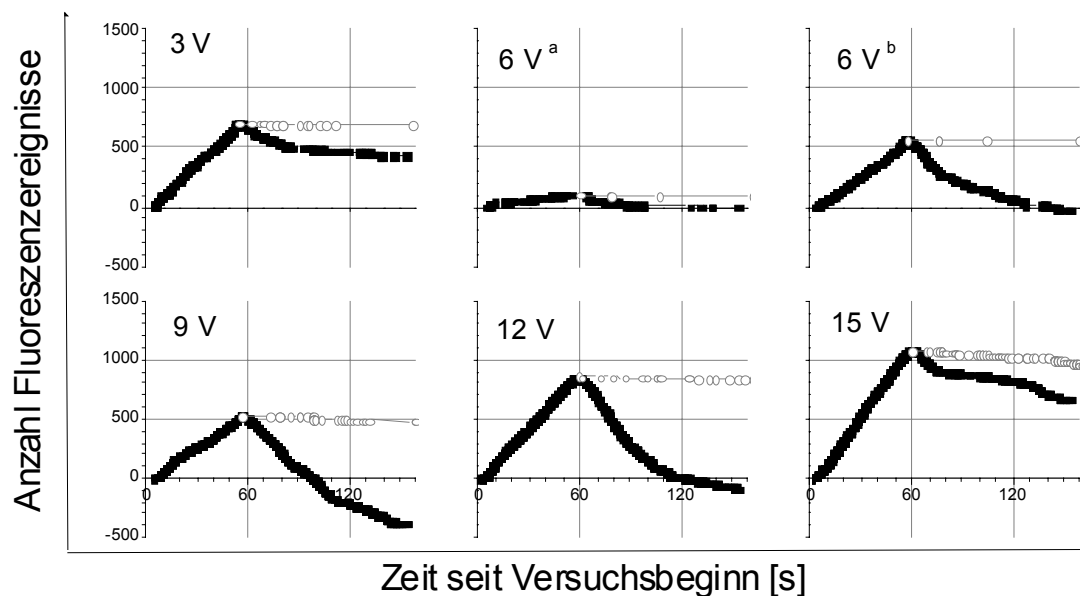


Abbildung 4.5.3-2 Detektierte Ereignisse während des Rein- und Rausziehens bei $271 \mu\text{W}$ Anregungsleistung.

Während des Reinziehens detektierte Ereignisse sind positiv, während des Rausziehens detektierte negativ gezählt. Die schwarzen Quadrate geben das Experiment wieder, die grauen Kreise die Blindprobe.

Aufsuchen etwaiger Symmetrien in den „Rein“- und in den „Raus“- Spuren

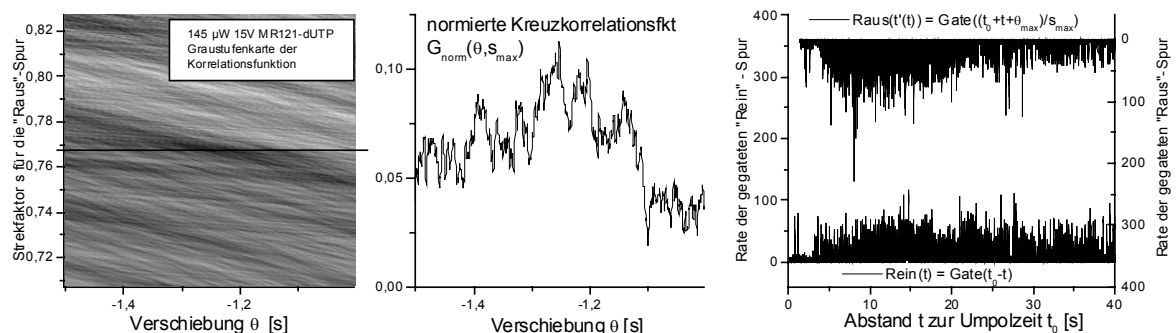
Das Verfahren entspricht exakt dem in Abschnitt 4.5.2 verwendeten, so daß die dort gemachten Erläuterungen hier nicht wiederholt werden. Da MR121 (2,31 ns) eine längere Fluoreszenzabklingdauer als Cy5 (1,32 ns) hat, wird jedoch ein breiteres Gate, nämlich Kanal 10-51 verwendet. Der Wichtungsterm zur Bereinigung der Fluoreszenzereignislisten von falsch positiven Elementen beträgt $\exp(-\frac{1}{2}((\ln\tau-1.18)/\Delta\ln\tau)^2)$, wobei τ die vom MLE-Schätzer ermittelte Fluoreszenzabklingdauer ist.

Lei- stung [μ W]	Span- nung [V]	N_1	N_2	Ereignis- Paare		Über- lapp- zeit [s]	Um- pol- zeit t_0 [s]	Korre- lations- zeit θ_{max} [s]	Streck- faktor der „Raus“ - Spur s_{max}	G_{Norm} (θ_{max} , s_{max})	
				Be- ob.	(Montecarlo)						
					λ						W_{zuf} [%]
145	3	296	53	16	6,55 \pm 2,40	0,6	38,2	64,5	-10,85	1,54	0,08
	6	350	208	43	39,71 \pm 5,57	42,7	37,7	58,5	-12,27	0,91	0,11
	9	411	498	172	153,9 \pm 9,74	5,5	24,5	56,4	-18,29	0,49	0,20
	12	769	626	306	234,1 \pm 10,9	8,4E-9*	33,7	57,5	-16,27	0,72	0,06
	15	818	982	427	348,1 \pm 12,8	1,1E-7*	36,8	53,0	-1,25	0,77	0,11
271	3	333	177	35	27,98 \pm 4,79	17,1	29,7	54,7	2,16	0,64	0,11
	6 ^a	42	45	3	1,21 \pm 1,07	71,6	26,9	59,7	-11,07	1,26	0,09
	6 ^b	295	340	66	52,86 \pm 6,28	4,8	36,2	56,9	-14,80	0,85	0,16
	9	416	417	90	103,1 \pm 7,88	98,0	41,4	56,7	-8,58	0,85	0,08
	12	375	587	221	188,6 \pm 10,2	0,2	27,2	59,1	-7,72	0,54	0,14
	15	364	159	58	57,60 \pm 5,96	63,7	25,9	60,0	-13,54	0,52	0,18

Tabelle 4.5.3-3 Ergebnisse der Symmetrieparametrisierung der „Rein“- und der „Raus“-Spur bei den Handhabungsversuchen mit Mr121-dUTP.

(^{*} Gaußsche Abschätzung)

Abbildung 4.5.3-3 Messung bei 145 μ W Anregungsleistung und 15 V Elektrodenspannung



Links: Graustufenkarte der Korrelationsfunktion in Abhängigkeit von Verschiebung und Streckfaktor

Mitte: Querschnitt durch das Maximum bei einem konstanten Streckfaktor von $s = 0,77$.

Rechts: Der Rein-Spur ist die um θ_{max} verschobene und mit s_{max} gestreckte Raus-Spur gegenübergestellt.

4.5.4 Ja133-dUTP

Als Farbstofflösung in diesem Unterkapitel dient ca. 5×10^{-10} M Ja133-dUTP in Sequenzierpuffer. Neben der Elektrodenspannung wurde die Anregungsleistung variiert. Es wurden insgesamt 3 Meßreihen bei 340, 540 und 720 μ W Anregungsleistung, gemessen an der Eintrittspupille des Objektivs, mit je 6 Einzelmessungen bei 3, 6, 9, 12, 15 und 18 V Elektrodenspannung durchgeführt. Die Meßreihe bei 340 μ W Anregungsleistung wurde dreifach, die beiden anderen doppelt durchgeführt. Eine Einzelmessung dauerte 202,4 s, wobei die Umpolung nach etwa 50 s erfolgte; d.h. die Farbstoffionen wurden etwa $3 \times$ länger aus dem Femtotip herausgezogen, als sie vorher hereingezogen wurden. Bei 340 μ W Anregungsleistung wurden zusätzlich Blindproben, sowie die am Gegenfemtotip austretenden Farbstoffionen gemessen.

Die Fluoreszenzereignisbestimmung erfolgte nach dem in Abschnitt 4.3 beschriebenen Verfahren.

Das über die Amplitude der zeitaufgelösten Korrelationsfunktion ermittelte optimale Zeitfenster ergab als untere Grenze Kanal 10 und als obere Grenze Kanal 57. Die so gegatete Spur wurde mit dem gleitenden Durchschnitt (s. Kapitel 2.9.3) geglättet. Der verwendete Glättparameter beträgt 2. Das entspricht einer Fensterbreite von 5 Bins oder 2,5 ms. Die Schwellen zur Fluoreszenzereigniserkennung wurden für jede Meßreihe einzeln bestimmt. Dazu wurde das Histogramm der Zählraten der gegateten und geglätteten Spur bei 12 V Elektrodenspannung herangezogen.

Als Startschwelle dient der Median der Zählrate, als Erkennungsschwelle der Schnittpunkt der Wendetangenten des Graphen von $\ln(W(\text{rate} \geq f))$ gegen f (s. Abschnitt 4.3.3). Die Trennschwelle wurde auf 20 % des kleineren Minimums festgesetzt.

Tabelle 4.5.4-1 faßt die Parameter zur Fluoreszenzereigniserkennung zusammen:

Gate	Kanal 10-57 von 64 Kanälen	
Filter	gleitender Durchschnitt	gl = 2
Trennschwelle	20 %	
Leistung [μ W]	Startschwelle [kHz]	Erkennungsschwelle [kHz]
340	0,43	3,20
540	0,47	2,08
720	0,58	2,76

Tabelle 4.5.4-1 Parameter zur Fluoreszenzereigniserkennung

Bei der Auswertung der Versuche stellte sich heraus, daß es Probleme mit falsch positiven Ereignissen gab. Diese werden wahrscheinlich durch an Luftblasen gestreutes Laserlicht verursacht. Mit Hilfe der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Mustererkennungs-Software können diese falsch positiven Ereignisse jedoch anhand ihres Fluoreszenzabklingverhaltens eindeutig identifiziert werden. Es werden daher nur solche Fluoreszenzereignisse gewertet, die eine geschätzte Abklingdauer von mehr als 1,2 ns, entsprechend $\ln(\tau/\text{ns}) > 0,2$ aufweisen. Die Artefakt-Ereignisse haben eine wahrscheinlichste Fluoreszenzabklingdauer von 0,33 ns ($\ln(t/\text{ns}) = -1,1$) und sind daher leicht von JA133 ($\tau = 3,96$ ns [Sauer 2001]) zu unterscheiden. Abbildung 4.5.4-1 zeigt die Verteilungsfunktion der ermittelten Fluoreszenz-

abklingdauern der einzelnen Ereignisse bei 340 μW Anregungsleistung im Femtotip, im Gegenfemtotip, im Tropfen und in der Blindprobe. Die Messungen in den Kapillaren sind dabei über alle Spannungen gemittelt.

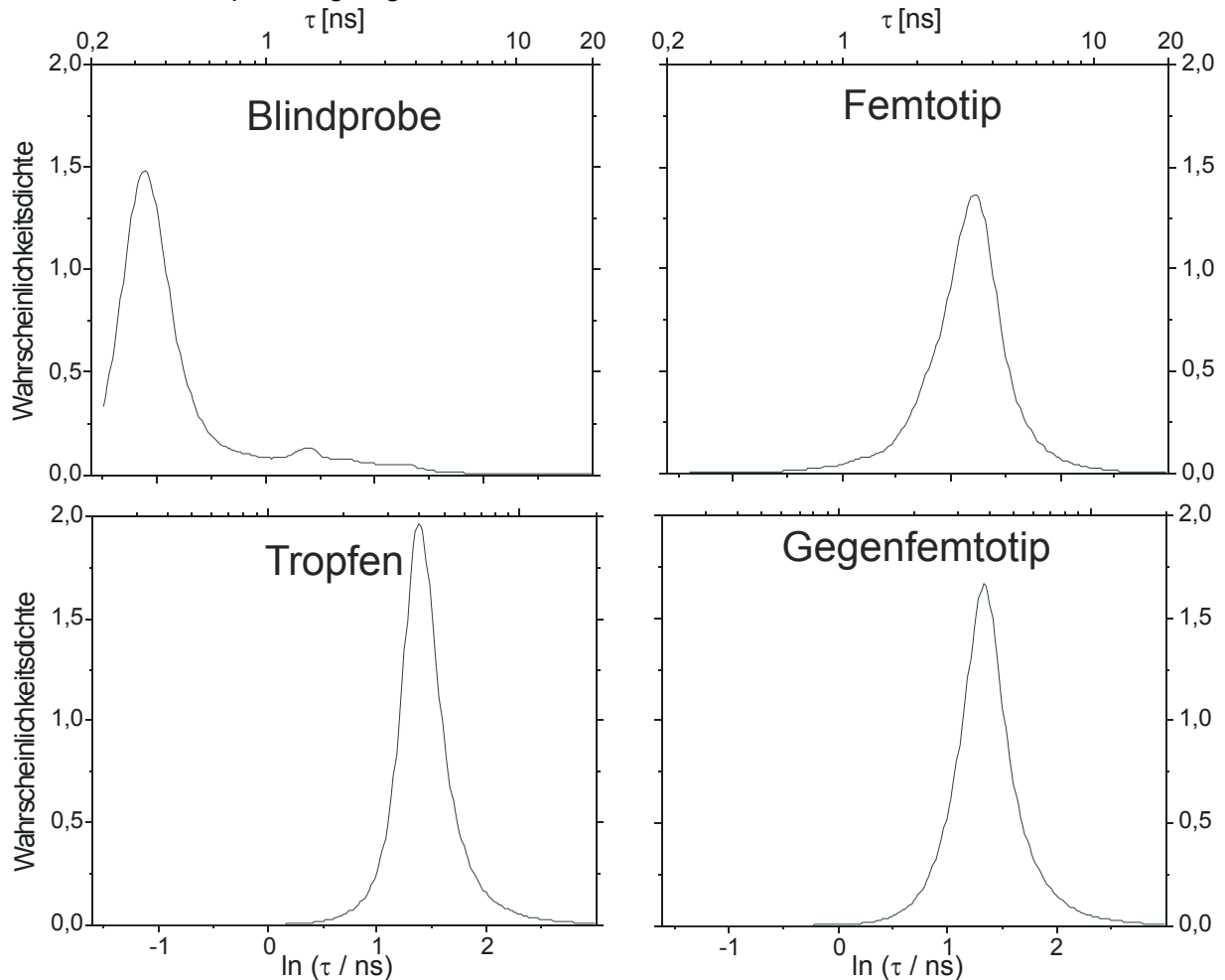


Abbildung 4.5.4-1 gemessene Verteilungsfunktionen von $\ln(\tau/\text{ns})$ bei 340 μW Anregungsleistung.

Die Übereinstimmung des Histogrammaximums ($\ln\tau=1,33 \Leftrightarrow \tau = 3,8 \text{ ns}$) im Tropfen und im Gegenfemtotip mit dem publizierten [Sauer 2001] Ensemblemaximum von Ja133-dUTP (3,96 ns) ist gut. Das Histogrammaximum im Femtotip liegt hingegen bei $\ln\tau = 1,19 \Leftrightarrow \tau = 3,28 \text{ ns}$.

Die linke Hälfte von Abbildung 4.5.4-2 zeigt die aus den zeitaufgelösten Daten ermittelte gegatete MCS-Spur und die aus dem Gegenfemtotip austretenden Moleküle der Messung bei 340 μW Anregungsleistung und 18 V Elektrodenspannung während des „Reinziehens“ in den Femtotip. Auf der rechten Seite sind die in den Femtotip eintretenden Moleküle und die zugehörige gegatete Spur dargestellt. Offensichtlich treten aus dem Gegenfemtotip mehr Moleküle aus, als in den Femtotip eintreten. Bei den anderen Spannungen ist die Diskrepanz noch größer, wie aus Tabelle 4.5.4-2 zu entnehmen ist. Da mit der verwendeten Apparatur nur in einem Detektionsvolumen zur selben Zeit gemessen werden kann, mußten die Messungen in Femtotip und Gegenfemtotip nacheinander durchgeführt werden. Die im Femtotip detektierten Moleküle sind daher nicht dieselben wie die im Gegenfemtotip.

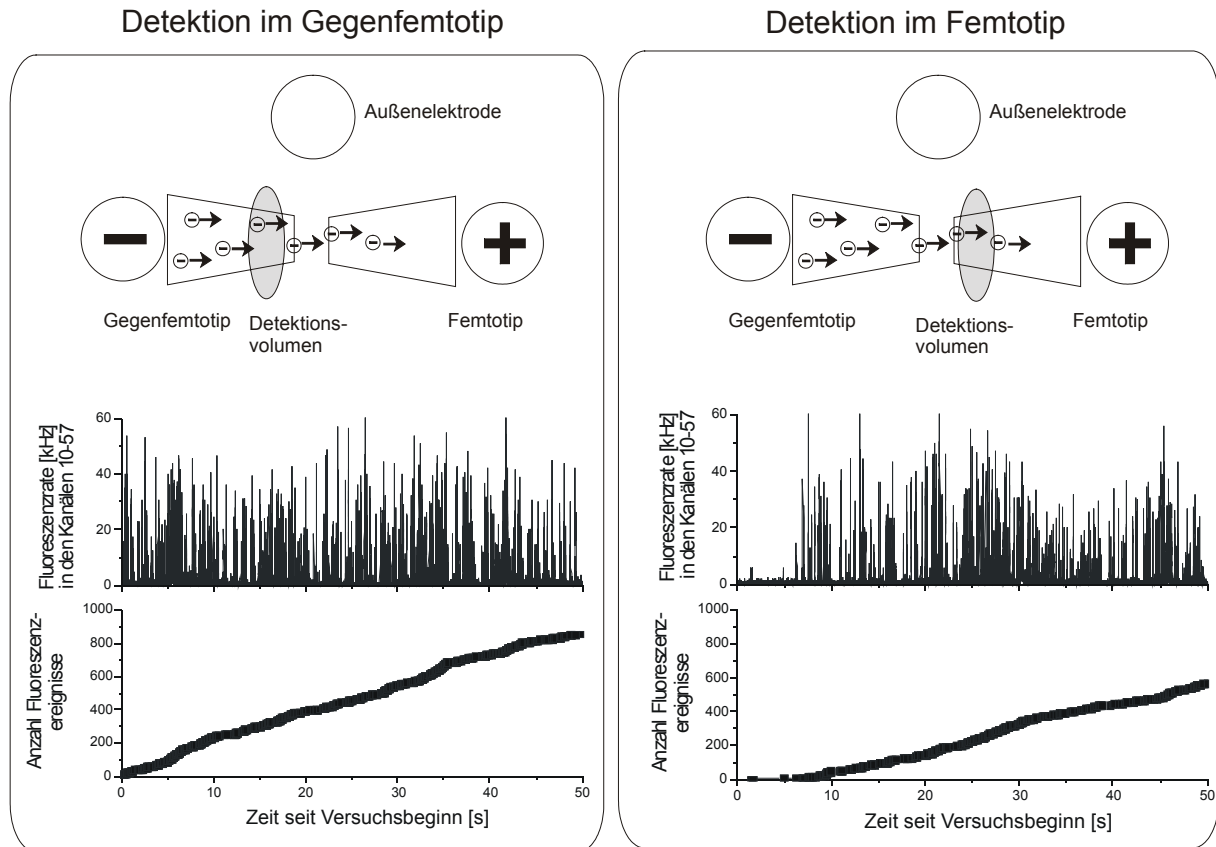


Abbildung 4.5.4-2 Reinziehen der Moleküle in den Femtotip.

Die dargestellte Binweite der gegateten MCS-Spuren (Mitte) beträgt 2ms.

Detektierte Fluoreszenzereignisse gegen die Versuchszeit aufgetragen (unten). Jedes Ereignis inkrementiert den Zähler: Es treten pro Zeiteinheit fast doppelt so viele Moleküle aus dem Gegenfemtotip aus wie in den Femtotip eintreten.

Die linke Hälfte von Abbildung 4.5.4-3 zeigt das Rausziehen der in Abbildung 4.5.4-2 in den Femtotip hereingezogenen Moleküle, die rechte Hälfte zeigt die zugehörige, vor den Versuchen aufgenommene Blindprobe. Die Ereignisse beim Rausziehen sind, wie stets in diesem Kapitel, gegen eine negative Ordinate aufgetragen.

Die Ergebnisse der Messungen bei 340 μW Anregungsleistung sind in Tabelle 4.5.4-2 zusammengefaßt. Die einzelnen Versuchsserien wurden an aufeinander folgenden Tagen mit jeweils einem anderen Femtotip durchgeführt. Im Gegenfemtotip wurde auch eine Messung bei abgeschalteter Spannung durchgeführt. In diesem Fall wurden keine Photonenschauer registriert.

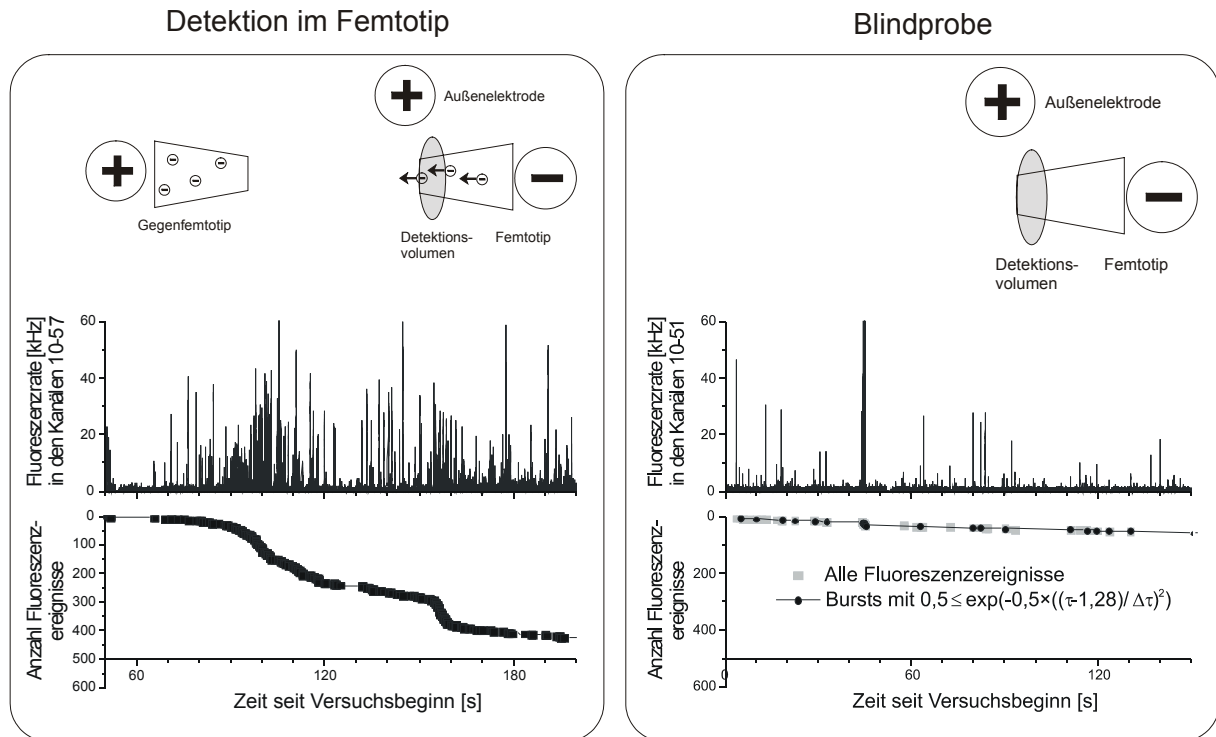


Abbildung 4.5.4-3 Rausziehen der Moleküle aus dem Femtotip und Blindprobe.

Die Abszisse schneidet die Ordinate bei 502 Ereignissen, der Anzahl der in Abbildung 4.5.4-2 hereingezogenen Moleküle.

Spannung [V]	3	6	9	12	15	18
Moleküle aus Gegenfemto/102,4s	90	269	1274	1750	1737	1692
Blindprobe Ereignisse/204,8s	9	2	3	23	13	32
Serie 1						
Umpolzeit [s]	54,3	51,0	53,0	54,1	69,0	54,2
Moleküle Femtotip rein	120	5	54	45	20	502
Moleküle Femtotip raus	0	0	163	70	97	429
$\ln \left(\frac{\text{Moleküle Femtotip raus}}{\text{Moleküle Femtotip rein}} \right)$	----	----	1,10	0,44	1,58	-0,16
$\ln \left(\frac{\text{Moleküle Femtotip rein}}{\text{Gegenfemtotip raus}} \right)$	0,93	-3,29	-2,50	-3,02	-4,07	-0,58
Serie 2						
Umpolzeit [s]	52,1	52,9	52,3	52,0	53,0	52,3
Moleküle Femtotip rein	73	42	360	175	263	478
Moleküle Femtotip raus	110	147	373	1330	1214	516
$\ln \left(\frac{\text{Moleküle Femtotip raus}}{\text{Moleküle Femtotip rein}} \right)$	0,41	1,25	0,04	2,03	1,53	0,08
$\ln \left(\frac{\text{Moleküle Femtotip rein}}{\text{Gegenfemtotip raus}} \right)$	0,43	-1,16	-0,61	-1,66	-1,49	-0,62
Serie 3						
Umpolzeit [s]	52,0	53,4	55,2	52,1	54,1	57,5
Moleküle Femtotip rein	38	381	75	72	422	341
Moleküle Femtotip raus	68	396	367	34	1036	991
$\ln \left(\frac{\text{Moleküle Femtotip raus}}{\text{Moleküle Femtotip rein}} \right)$	0,58	0,04	1,59	-0,75	0,90	1,07
$\ln \left(\frac{\text{Moleküle Femtotip rein}}{\text{Gegenfemtotip raus}} \right)$	-0,22	1,05	-2,17	-2,55	-1,02	-0,96

Tabelle 4.5.4-2 Ergebnisse der Experimente mit 340 μW Anregungsleistung

Die Ergebnisse der Messungen bei 540 und 720 μW Anregungsleistung sind in den Tabellen 4.5.4-3 und 4.5.4-4 zusammengefaßt. Die einzelnen Versuchsserien wurden an aufeinander folgenden Tagen mit jeweils einem anderen Femtotip durchgeführt. Zunächst wurde jeweils die Serie mit 340 μW , dann die mit 540 μW und schließlich die Serie mit 720 μW gemessen. Die Meßreihenfolge innerhalb der einzelnen Serien war 3, 6, 9, 12, 15 und 18 V.

Spannung [V]	3	6	9	12	15	18
Serie 1						
Umpolzeit [s]	53,9	59,0	57,7	60,0	54,1	55,1
Moleküle Femtotip rein	870	123	459	623	494	367
Moleküle Femtotip raus	449	0	421	203	566	605
$\ln \left(\frac{\text{Moleküle Femtotip raus}}{\text{Moleküle Femtotip rein}} \right)$	-0,66	----	-0,09	-1,12	0,14	0,50
Serie 2						
Umpolzeit [s]	53,9	53,7	56,3	58,4	61,5	52,2
Moleküle Femtotip rein	150	551	901	489	1673	1578
Moleküle Femtotip raus	160	603	871	731	1542	2133
$\ln \left(\frac{\text{Moleküle Femtotip raus}}{\text{Moleküle Femtotip rein}} \right)$	0,06	0,09	-0,03	0,40	-0,08	0,30

Tabelle 4.5.4-3 Ergebnisse der Experimente mit 540 μW Anregungsleistung

Spannung [V]	3	6	9	12	15	18
Serie 1						
Umpolzeit [s]	55,2	54,4	56,1	58,3	54,5	50,1
Moleküle Femtotip rein	108	451	126	141	255	245
Moleküle Femtotip raus	114	491	110	428	784	880
$\ln \left(\frac{\text{Moleküle Femtotip raus}}{\text{Moleküle Femtotip rein}} \right)$	0,05	0,08	-0,14	1,11	1,12	1,28
Serie 2						
Umpolzeit [s]	57,0	56,0	54,4	52,1	58,2	68,8
Moleküle Femtotip rein	22	423	484	556	205	1135
Moleküle Femtotip raus	131	249	296	385	425	865
$\ln \left(\frac{\text{Moleküle Femtotip raus}}{\text{Moleküle Femtotip rein}} \right)$	1,78	-0,53	-0,49	-0,37	0,73	-0,27

Tabelle 4.5.4-4 Ergebnisse der Experimente mit 720 μW Anregungsleistung

In den Abbildungen 4.5.4-4 bis 4.5.4-7 ist die Anzahl der detektierten Fluoreszenzereignisse gegen die Versuchszeit aufgetragen. Die während des Reinziehens erkannten Ereignisse werden dabei positiv, die während des Rausziehens erkannten hingegen negativ gewertet. Beim Reinziehen zeigt die Kurve bei den meisten Messungen einen mehr oder weniger linearen Verlauf, während die Kurve beim Rausziehen nach einiger Zeit abflacht.

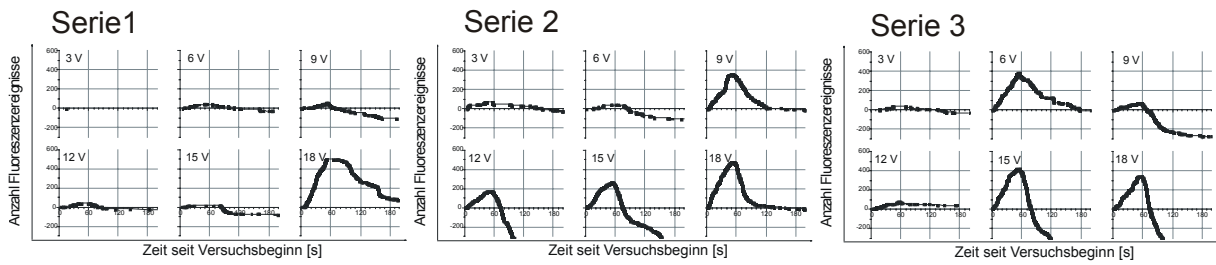


Abbildung 4.5.4-4 Im Femtotip detektierte Ereignisse bei 340 μW Anregungsleistung.
Die reingezogenen Moleküle werden positiv, die rausgezogenen negativ gezählt

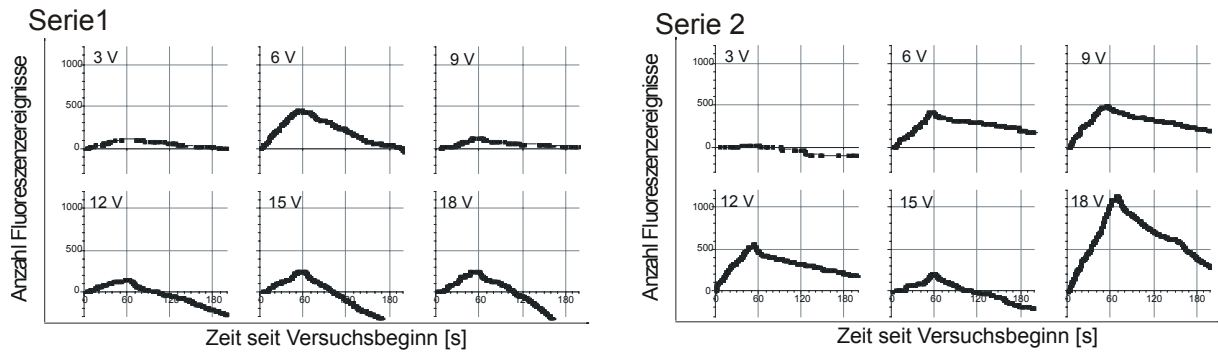


Abbildung 4.5.4-5 Im Femtotip detektierte Ereignisse bei 540 μW Anregungsleistung.
Die reingezogenen Moleküle werden positiv, die rausgezogenen negativ gezählt

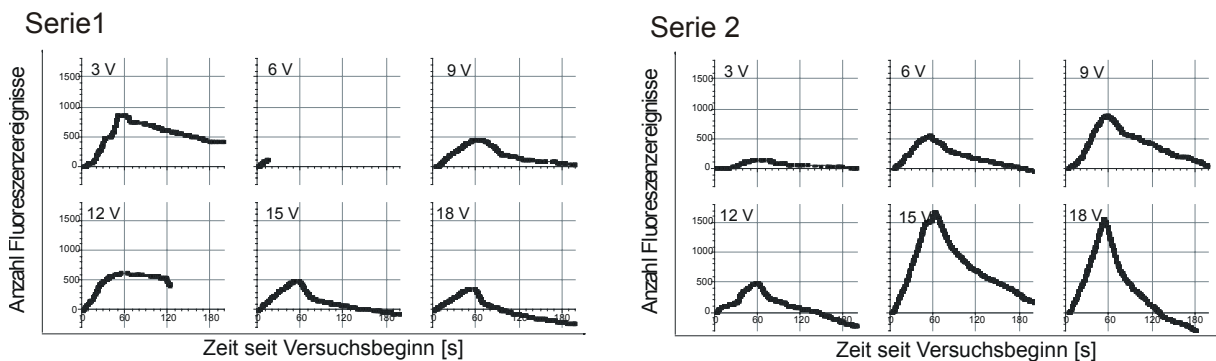


Abbildung 4.5.4-6 Im Femtotip detektierte Ereignisse bei 720 μW Anregungsleistung.
Die reingezogenen Moleküle werden positiv, die rausgezogenen negativ gezählt

Aufsuchen etwaiger Symmetrien in den „Rein“- und in den „Raus“- Spuren

Das Verfahren entspricht exakt dem in Abschnitt 4.5.2 verwendeten, so daß die dort gemachten Erläuterungen hier nicht wiederholt werden. Das optimale Gate für Ja133-dUTP beträgt Kanal 10-57. Das entspricht 0,9 – 10,1 ns nach dem Anregungspulsmaximum. Der Wichtungsterm zur Bereinigung der Fluoreszenzereignislisten von falsch positiven Elementen beträgt $\exp(-\frac{1}{2}((\ln\tau - 1.2)/\Delta\ln\tau)^2)$, wobei τ die vom MLE-Schätzer ermittelte Fluoreszenzabklingdauer ist.

Leistung [μ W]	Spannung [V]	N ₁	N ₂	Ereignispaare			Überlappzeit [s]	Umpolzeit t ₀ [s]	Korrelationszeit θ_{\max} [s]	Streckfaktor S _{max}	G _{Norm} (θ_{\max} , S _{max})	
				Beob.	(Montecarlo)							
					λ	W _{Zuf} [%]						
340	Serie 1	3	0	0	0	---	100,0	27,0	54,0	-19,156	0,500	0,167
		6	32	30	6	0,37±0,59	5,7E-2	42,3	51,0	-1,218	0,864	0,304
		9	63	51	2	1,72±1,26	100,0	32,6	53,0	-13,433	0,875	0,158
		12	43	39	5	1,09±1,00	9,1	24,7	54,0	-17,275	0,680	0,309
		15	75	6	1	0,23±0,47	100,0	37,6	69,0	-4,450	1,324	0,079
		18	238	143	29	19,90±4,03	5,4	26,7	54,0	0,728	0,559	0,193
	Serie 2	3	54	34	6	1,14±1,04	2,4	45,5	52,0	-2,490	1,024	0,346
		6	26	19	3	0,28±0,52	24,7	37,5	53,0	-1,899	0,749	0,172
		9	175	226	37	24,54±4,49	1,6	26,7	52,0	-2,892	0,534	0,288
		12	389	132	38	20,47±4,08	0,1*	35,0	52,0	-14,952	0,727	0,225
		15	283	200	56	32,67±4,89	3,9E-2*	31,7	53,0	-15,257	1,172	0,251
		18	293	301	45	27,75±4,82	0,4*	34,4	52,3	-15,558	1,071	0,118
	Serie 3	3	28	20	1	0,38±0,60	100,0	32,8	52,0	-2,426	0,684	0,228
		6	224	193	43	27,11±4,56	0,3	38,6	53,4	-11,409	0,820	0,377
		9	186	51	14	5,53±2,16	0,5	31,2	55,2	-18,794	0,645	0,258
		12	5	3	0	0,07±0,26	100,0	12,4	52,1	3,288	0,350	0,300
		15	436	293	80	51,75±6,33	2,3E-3*	32,5	54,1	-14,052	0,650	0,183
		18	323	245	69	34,11±5,39	4,2E-5*	23,2	57,5	-11,663	0,464	0,314
540	Serie 1	3	456	121	57	29,43±4,53	1,6E-3*	50,1	53,9	3,707	1,054	0,215
		6	188	180	16	19,60±3,98	94,0	32,0	59,0	-5,777	0,640	0,139
		9	240	135	26	13,54±3,35	0,2	50,0	57,7	2,157	1,299	0,110
		12	84	30	2	3,52±1,78	100,0	20,3	60,0	-13,732	0,406	0,415
		15	135	198	11	13,31±3,49	92,5	22,3	54,1	-18,192	0,445	0,221
		18	129	185	8	6,60±2,50	65,3	22,8	55,1	-15,390	0,465	0,182
	Serie 2	3	71	25	2	1,18±1,06	100,0	28,4	53,9	0,620	0,581	0,251
		6	139	168	11	16,23±3,77	98,6	24,7	53,7	-7,143	0,494	0,270
		9	297	245	40	40,75±5,68	71,9	25,4	56,3	-2,782	0,507	0,213
		12	202	184	32	15,99±3,72	0,1*	38,0	58,4	-12,010	1,244	0,145
		15	384	449	154	114,0±8,42	4,1E-4*	19,6	61,5	-10,623	0,632	0,202
		18	500	434	244	196,6±8,82	1,8E-5*	19,0	52,2	0,420	1,177	0,085
720	Serie 1	3	69	20	9	0,70±0,83	9,2E-4*	49,0	55,2	2,448	1,171	0,294
		6	259	125	30	17,08±3,76	0,4	34,9	54,4	-11,642	0,698	0,208
		9	76	40	3	1,36±1,14	75,2	28,9	56,1	-1,689	0,577	0,175
		12	44	69	2	1,44±1,17	100,0	28,2	58,3	-14,885	0,563	0,648
		15	163	123	15	8,61±2,69	7,9	46,4	54,5	0,259	0,952	0,061
		18	119	82	8	4,35±2,00	26,8	26,6	50,1	-10,369	0,532	0,350
	Serie 2	3	24	7	0	0,25±0,49	100,0	20,6	57,0	-15,443	0,608	0,559
		6	281	72	25	11,04±3,01	0,1*	45,0	56,0	-5,035	0,941	0,193
		9	305	58	17	7,88±2,55	0,9	40,0	54,4	-9,952	1,315	0,182
		12	136	137	21	18,15±3,87	45,3	22,8	52,1	-9,242	0,455	0,390
		15	138	85	15	6,85±2,45	1,5	49,1	58,2	-0,877	1,403	0,124
		18	312	251	71	57,56±6,31	4,3	21,8	68,8	-16,485	0,559	0,196

Tabelle 4.5.4-5 Ergebnisse der Symmetrieparametrisierung
(*Wahrscheinlichkeit aus Verteilungsfunktion abgeschätzt)

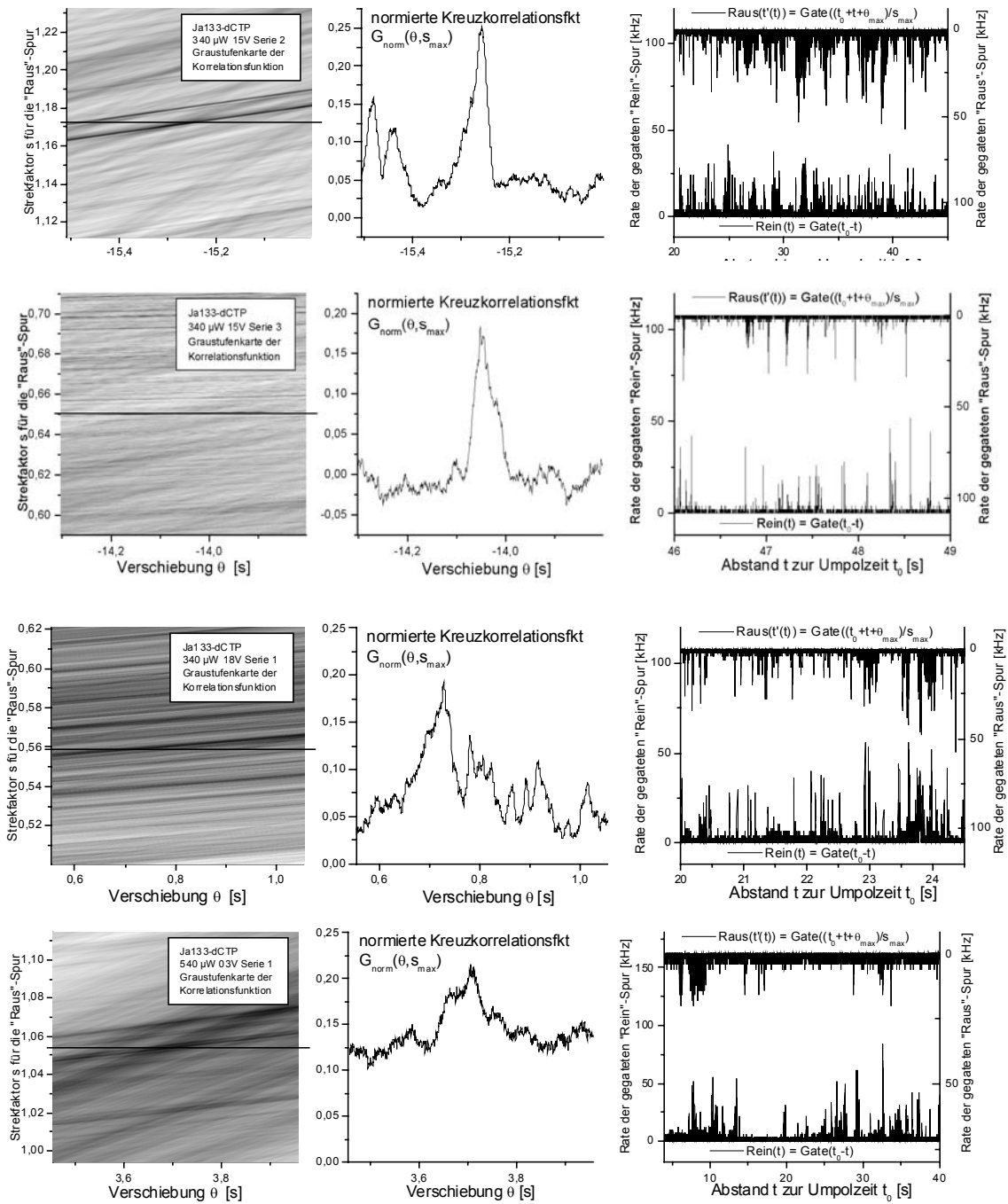


Abbildung 4.5.4-7 Graphische Darstellung ausgewählter Ergebnisse aus Tabelle 4.5.4-5

4.5.5 JA242-ddATP

Als Farbstofflösung in diesem Unterkapitel dient ca. 5×10^{-10} M JA242-ddATP in Sequenzierpuffer. Zusätzlich zur Elektrodenspannung wurde in diesem Experiment die Anregungsleistung variiert. Es wurden insgesamt 5 Meßreihen bei 420, 613, 851 und 1029 μ W Anregungsleistung, gemessen an der Eintrittspupille des Objektivs, mit je 6 Einzelmessungen bei 3, 6, 9, 12, 15 und 18 V Elektrodenspannung durchgeführt. Eine Einzelmessung dauerte 204,8 s, wobei die Umpolung nach etwa 50s erfolgte; d.h. die Farbstoffionen wurden etwa $3 \times$ länger aus dem Femtotip herausgezogen, als sie vorher hereingezogen wurden.

Die Fluoreszenzereignisbestimmung erfolgte nach dem in Abschnitt 4.3 beschriebenen Verfahren.

Das über die Amplitude der zeitaufgelösten Korrelationsfunktion ermittelte optimale Zeitfenster für die Ereignisbestimmung ergab als untere Grenze Kanal 9 und als obere Grenze Kanal 40; das Signal- zu Rausch- Verhältnis ist in Kanal 16 maximal. Die so gegatete Spur wurde mit dem gleitenden Durchschnitt (s. Kapitel 2.9.3) geglättet. Als Glättparameter wird 2, d.h. eine Fensterbreite von 5 Bins oder 2,5 ms, gewählt.

Die Schwellen zur Fluoreszenzereigniserkennung wurden für jede Meßreihe einzeln bestimmt. Dazu wurde das Histogramm der Zählraten der gegateten und geglätteten Spur bei 12 V Elektrodenspannung herangezogen.

Als Startschwelle dient der Median der Zählrate, als Erkennungsschwelle der Schnittpunkt der Wendetangenten des Graphen von $\ln(W(\text{rate} \geq f))$ gegen f (s. Abschnitt 4.3.3). Die Trennschwelle wurde auf 20% des kleineren Minimums festgesetzt.

Tabelle 4.5.1-1 faßt die Parameter zusammen:

Gate	Kanal 09-40 von 64 Kanälen	
Filter	gleitender Durchschnitt	gl = 2
Trennschwelle	20%	
Leistung [μ W]	Startschwelle [kHz]	Erkennungsschwelle [kHz]
420	0,83	2,86
613	0,91	3,75
851	0,84	3,42
1029	1,22	3,86

Tabelle 4.5.5-1 Parameter zur Fluoreszenzereigniserkennung

Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.5.5-2 zusammengefaßt. Die Gesamtzahl der Ereignisse hängt stark von der Wahl der Schwellen ab, während die Abhängigkeit beim Quotienten aus der Anzahl der Bursts beim Heraus- und Hereinziehen weniger stark ausgeprägt ist. Ein negativer Logarithmus dieses Quotienten (letzte Spalte in Tabelle 4.5.5-2) bedeutet, daß während des Hereinziehens mehr Ereignisse als während des Herausziehens detektiert werden. Die Versuche wurden alle am gleichen Tag mit demselben Femtotip durchgeführt. Der Gegenfemtotip wurde nach Versuch #4 gewechselt, da er verstopfte. Die laufende Nummer des Versuchs ist in der zweiten Spalte der Tabelle vermerkt.

Leistung	Versuch#	Spannung	Umpolzeit	Gesamt	Rein	Raus	$\ln \frac{I_{\text{raus}}}{I_{\text{rein}}}$
420 μW	1	3	51,5	248	84	164	0,67
	2	3	53,5	412	229	183	-0,22
	3	6	50,9	556	273	283	0,04
	4	9	50,1	913	363	550	0,42
	5	12	50,6	3206	1687	1519	-0,10
	6	15	52,4	3668	1426	2242	0,45
	7	18	50,1	2891	1203	1688	0,34
613 μW	8	3	49,0	125	50	75	0,41
	9	6	49,6	121	46	75	0,49
	10	9	51,8	2423	957	1466	0,43
	11	12	45,3	2636	1281	1355	0,06
	12	15	47,5	3970	1736	2234	0,25
	13	18	49,7	4803	1944	2859	0,39
851 μW	14	3	46,4	185	106	79	-0,29
	15	6	46,9	683	337	346	0,03
	16	9	48,8	1944	914	1030	0,12
	17	12	47,9	3124	1483	1641	0,10
	18	15	49,7	3251	1611	1640	0,02
	19	18	48,2	3960	1858	2102	0,12
	27	3	49,3	101	26	75	1,06
	28	6	44,9	124	37	87	0,85
	29	9	50,0	1399	824	575	-0,36
	30	12	51,1	1160	630	530	-0,17
1029 μW	20	3	53,5	194	128	66	-0,66
	21	6	47,4	948	454	494	0,08
	22	9	48,5	1561	770	791	0,03
	23	12	61,4	3086	1537	1549	0,01
	24	15	48,8	2502	1281	1221	-0,05
	25	15	49,4	2581	1424	1157	-0,21
	26	18	85,3	3206	1757	1449	-0,19

Tabelle 4.5.5-2 Ergebnisse der Handhabungsversuche mit Ja242-ddATP

In den Abbildungen 4.5.5-2 bis 4.5.5-5 ist die Anzahl der detektierten Fluoreszenzereignisse gegen die Versuchszeit aufgetragen. Die während des Reinziehens erkannten Fluoreszenzereignisse werden dabei positiv, die während des Rausziehens erkannten hingegen negativ gewertet. Beim Reinziehen zeigt die Kurve bei den meisten Messungen einen mehr oder weniger linearen Verlauf, während die Kurve beim Rausziehen nach einiger Zeit abflacht.

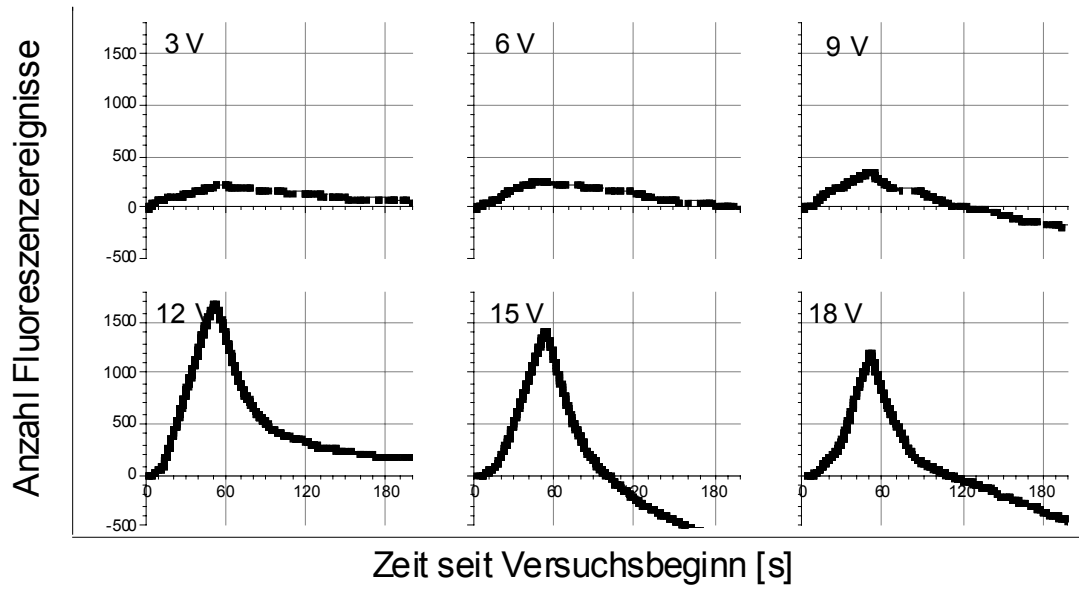


Abbildung 4.5.5-2 Detektierte Fluoreszenzereignisse während des Rein- und Rausziehens bei $420 \mu\text{W}$ Anregungsleistung.

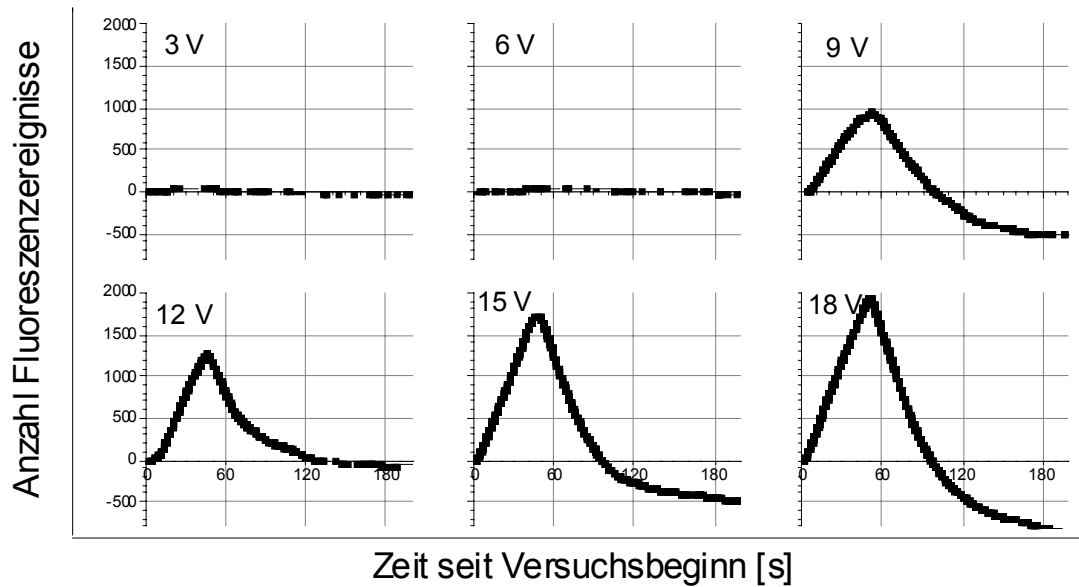


Abbildung 4.5.5-3 Detektierte Fluoreszenzereignisse während des Rein- und Rausziehens bei $613 \mu\text{W}$ Anregungsleistung.

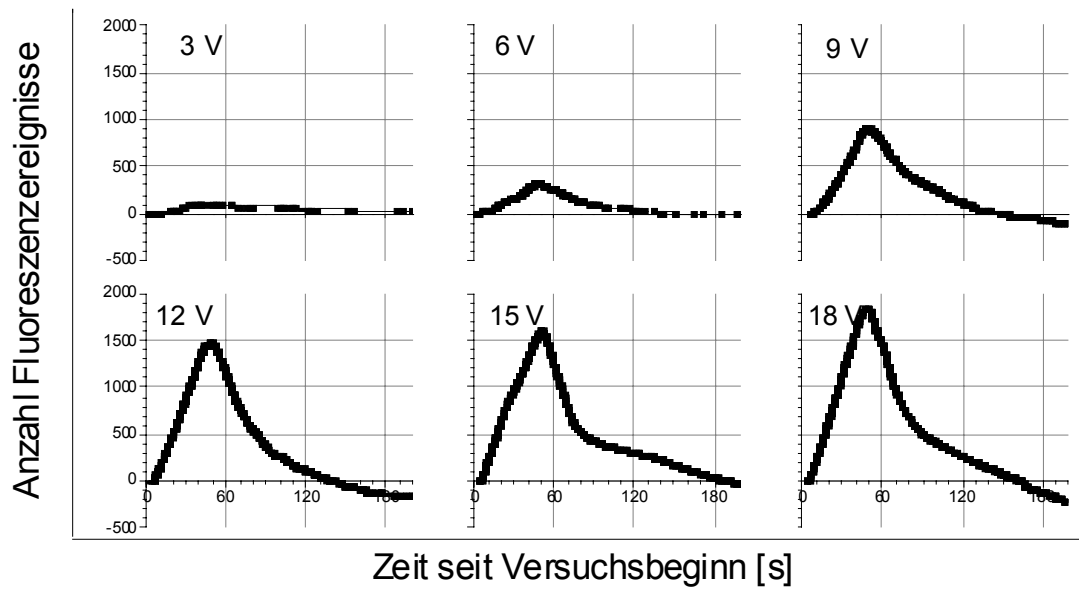


Abbildung 4.5.5-4 Detektierte Fluoreszenzereignisse während des Rein- und Rausziehens bei 861 μW Anregungsleistung.

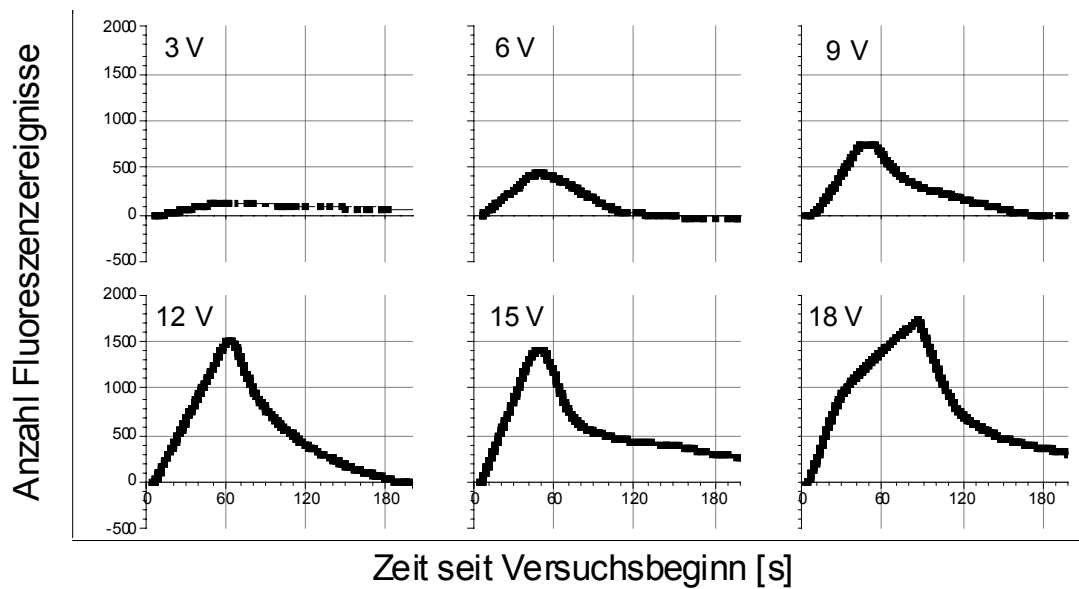


Abbildung 4.5.5-5 Detektierte Fluoreszenzereignisse während des Rein- und Rausziehens bei 1029 μW Anregungsleistung.

Der Logarithmus des Quotienten der Anzahl herein- und herausgezogener Moleküle ist in Abbildung 4.5.5-6 gegen die Anregungsleistung aufgetragen. Der Quotient nimmt erwartungsgemäß mit steigender Anregungsleistung ab. Mit steigender Anregungsleistung nimmt die Wahrscheinlichkeit dafür, daß ein Molekül bereits beim ersten Durchtritt durch das Detektionsvolumen zerstört wird, zu. Die Elektrodenspannung scheint hingegen keinen systematischen Einfluß zu haben. Im Gegensatz zum Experiment mit Cy5-dCTP (Abschnitt 4.5.1) kommen auch Quotienten > 1 , d.h. in Abbildung 4.5.5-6 positive Logarithmen vor.

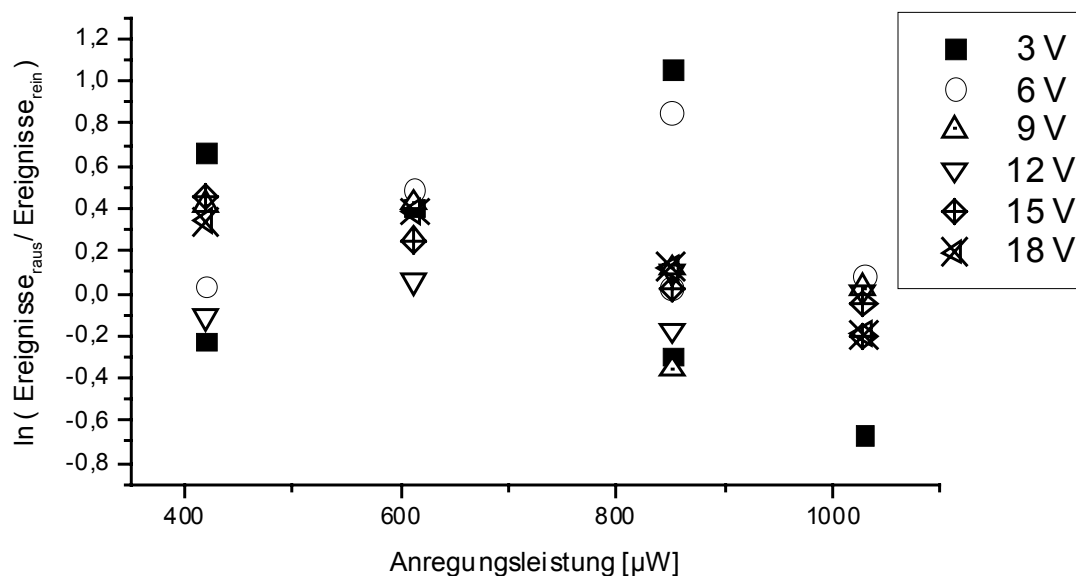


Abbildung 4.5.5-3 Logarithmus des Quotienten der Anzahl herausgezogener und hereingezogener Fluoreszenzereignisse gegen die Anregungsleistung aufgetragen.

Aufsuchen etwaiger Symmetrien in den „Rein“- und in den „Raus“- Spuren

Das Verfahren entspricht exakt dem in Abschnitt 4.5.2 verwendeten, so daß die dort gemachten Erläuterungen hier nicht wiederholt werden. Das optimale Gate für Ja242-ddATP beträgt Kanal 9-40 von 64 Kanälen. Das entspricht einem Zeitintervall von 0,6 – 6,6 ns nach dem Anregungspulsmaximum. Der Wichtungsterm zur Bereinigung der Fluoreszenzereignislisten von falsch positiven Elementen beträgt $\exp(-\frac{1}{2}((\ln\tau - 0,837)/\Delta\ln\tau)^2)$, wobei τ die vom MLE-Schätzer ermittelte Fluoreszenzabklingdauer in ns ist.

Leistung [μ W]	Spannung g [V]	N ₁	N ₂	Ereignispaare		Über- lapp- zeit [s]	Um- pol- zeit t ₀ [s]	Korrela- tionszeit θ_{\max} [s]	Streck- faktor s _{max}	G _{Norm} (θ_{\max} , s _{max})	
				Be- ob.	(Montecarlo)						
					λ						W _{Zuf} [%]
420	3 ^a	34	44	3	0,63±0,78	47,3	29,0	51,5	-6,558	0,581	0,228
	3 ^b	146	46	4	2,33±1,49	68,3	48,3	53,5	-1,747	1,095	0,083
	6	122	56	6	2,24±1,43	17,9	34,3	50,9	-10,727	0,686	0,194
	9	127	191	12	10,80±3,13	64,9	26,1	50,1	-10,138	0,523	0,140
	12	341	280	184	112,2±8,38	4,4E-14*	6,8	50,6	-8,185	0,776	0,091
	15	308	393	233	158,9±9,47	1,9E-12*	6,5	52,4	-7,496	0,556	0,128
	18	500	436	256	196,0±9,30	3,2E-08*	18,0	50,1	2,944	1,176	0,121
613	3	34	25	2	0,25±0,49	100,0	49,0	49,0	-0,387	0,685	0,372
	6	19	8	0	0,06±0,25	100,0	27,0	49,6	0,842	1,188	0,184
	9	500	383	129	111,5±8,14	3,2	30,0	51,8	0,474	1,366	0,069
	12	500	379	219	179,4±8,74	1,1E-03*	16,7	45,3	-0,294	1,382	0,087
	15	364	369	210	119,5±8,82	2,2E-14*	6,0	47,5	-7,972	0,460	0,122
	18	500	421	295	237,8±8,77	2,1E-08*	14,0	49,7	0,449	1,166	0,069
851 ^a	3	19	17	0	0,13±0,36	100,0	35,1	49,3	-14,654	1,470	0,326
	6	26	26	2	0,24±0,49	100,0	41,7	44,9	-19,774	0,774	0,456
	9	342	298	111	78,23±7,22	1,4E-03*	17,3	50,0	-9,131	0,524	0,257
	12	500	142	30	29,24±4,71	63,3	44,4	51,1	-1,567	1,163	0,076
851 ^b	3	63	21	4	0,69±0,82	15,3	32,6	46,4	-11,621	0,725	0,247
	6	152	174	18	10,72±3,15	7,3	21,6	46,9	3,361	0,532	0,131
	9	253	388	101	86,11±7,69	5,3	15,3	48,8	1,553	0,562	0,087
	12	492	432	268	196,2±8,77	1,3E-13*	15,9	47,9	-2,078	0,948	0,073
	15	466	382	287	216,2±8,55	1,7E-13*	12,8	49,7	-2,187	1,122	0,075
	18	500	433	275	233,1±9,03	6,4E-04*	15,0	48,2	1,930	1,249	0,087
1029	3	77	22	3	0,48±0,67	39,1	38,2	53,5	1,898	0,801	0,183
	6	233	250	25	20,00±4,12	26,4	29,7	47,4	1,847	0,657	0,108
	9	500	292	99	59,33±6,51	5,6E-07*	33,0	48,5	1,636	1,339	0,092
	12	500	399	213	169,4±8,61	8,8E-05*	21,0	61,4	2,406	1,377	0,086
	15	500	312	167	142,4±7,73	0,2	16,8	48,8	-0,203	1,380	0,097
	18	411	180	160	122,1±6,80	9,4E-06*	9,8	85,3	-6,193	1,299	0,123

Tabelle 4.5.5-3 Ergebnisse der Symmetrieparametrisierung
(*Wahrscheinlichkeit aus Verteilungsfunktion abgeschätzt)

4.5.6 Mischung aus Cy5-dCTP und Mr121-dUTP

Als Farbstofflösung in diesem Unterkapitel dient eine 1:1 – Mischung aus einer ca. 5×10^{-10} M Lösung von Cy5-dCTP und einer ca. 5×10^{-10} M Lösung von Mr121-dUTP in Sequenzierpuffer. Die resultierende Mischung ist also ca. $2,5 \times 10^{-10}$ M an Cy5-dCTP und $2,5 \times 10^{-10}$ M an Mr121-dUTP. Außer der Elektrodenspannung wurde in diesem Experiment die Anregungsleistung variiert. Es wurden insgesamt 6 Meßreihen bei 47, 175, 272, 471, 682 und 851 μ W Anregungsleistung, gemessen an der Eintrittspupille des Objektivs, mit je 5 Einzelmessungen bei 3, 6, 9, 12 und 15 V Elektrodenspannung durchgeführt. Eine Einzelmessung dauerte 153,6 s bzw. 204,8 s (die Zeit ist in der Tabelle vermerkt), wobei die Umpolung nach etwa 60s erfolgte; d.h. die Farbstoffionen wurden etwa $2,5\text{-}3 \times$ länger aus dem Femtotip herausgezogen, als sie vorher hereingezogen wurden.

Die Fluoreszenzereignisbestimmung erfolgte nach dem in Abschnitt 4.3 beschriebenen Verfahren.

Das über die Amplitude der zeitaufgelösten Korrelationsfunktion ermittelte optimale Zeitfenster ergab als untere Grenze Kanal 10 und als obere Grenze Kanal 54. Die so gegatete Spur wurde mit dem gleitenden Durchschnitt (s. Kapitel 2.9.3) geglättet. Als Glättparameter wird 2, d.h. eine Fensterbreite von 5 Bins oder 2,5 ms, gewählt.

Die Schwellen zur Fluoreszenzereigniserkennung wurden für jede Meßreihe einzeln bestimmt. Dazu wurde das Histogramm der Zählraten der gegateten und geglätteten Spur bei 9 V Elektrodenspannung herangezogen.

Als Startschwelle dient der Median der Zählrate, als Erkennungsschwelle der Schnittpunkt der Wendetangenten des Graphen von $\ln(W(\text{rate} \geq f))$ gegen f (s. Abschnitt 4.3.3). Die Trennschwelle wurde auf 20% des kleineren Minimums festgesetzt.

Tabelle 4.5.6-1 faßt die Parameter zur Fluoreszenzereigniserkennung zusammen

Gate	Kanal 10-54 von 64 Kanälen	
Filter	gleitender Durchschnitt	gl = 2
Trennschwelle	20%	
Leistung [μ W]	Startschwelle [kHz]	Erkennungsschwelle [kHz]
47	1,05	5,16
175	1,50	4,95
272	0,87	3,43
471	1,08	4,40
682	1,20	3,79
851	1,13	3,78

Tabelle 4.5.6-1 Parameter zur Fluoreszenzereigniserkennung

Um das Verhältnis der Anteile der Farbstoffe zueinander zu bestimmen, wurde eine Messung im Tropfen bei 471 μ W Anregungsleistung durchgeführt. Da die Konzentrationen im Tropfen (wegen des offenen Detektionsvolumens) niedriger sein müssen als im Femtotip, wurden beide Lösungen sowie die Mischung um den Faktor 1:10 mit Sequenzierpuffer verdünnt. Von allen drei Lösungen wurde die Fluoreszenz zeitaufgelöst gemessen. Die Meßdauer betrug 307,2 s.

Abbildung 4.5.6 a zeigt je 20 s lange Ausschnitte der aus den Daten errechneten MCS-Spuren. Abbildung 4.5.6 b zeigt die zugehörigen Abklingdauerhistogramme: Als Abszisse ist der natürliche Logarithmus der Fluoreszenzabklingdauer in ns aufgetragen, als Ordinate die Anzahl detektierter Ereignisse. Das Histogramm berücksichtigt die Fehler der geschätzten Fluoreszenzabklingdauern dadurch, daß es nicht nur den Balken inkrementiert, der der geschätzten Abklingdauer entspricht; es wird vielmehr jedem Balken ein Anteil zugeschlagen, der sich aus einer normierten Gaußkurve mit der geschätzten Abklingdauer als Mittelwert und dem Fehler als Standardabweichung ergibt.

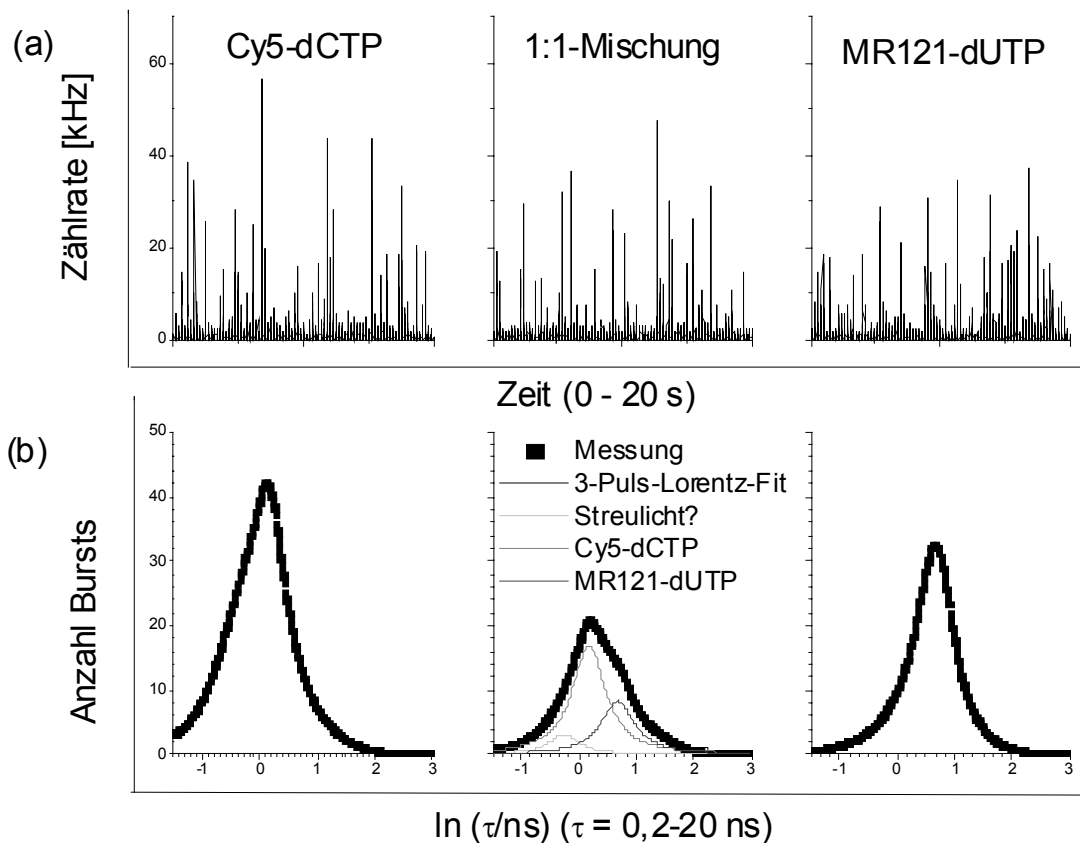


Abbildung 4.5.6-1 Messungen im Tropfen

Die Mischung (in der Mitte) entspricht der um den Faktor 10 verdünnten, im Gegenfemtotip eingesetzten Lösung.

(a) MCS-Spuren. Die dargestellte Binweite beträgt 2 ms. Zur besseren Übersicht werden nicht die gesamten Spuren gezeigt, sondern nur 20 s lange Ausschnitte.

(b) Abklingdauerhistogramme. Bei der Mischung ist zusätzlich zu den Meßdaten auch der Lorentz-Fit eingezeichnet.

Beim Abklingdauerhistogramm der Mischung (Abbildung 4.5.6-1b, Mitte) wird außer den beiden erwarteten Peaks mit Zentren bei 0,18 (= 1,2 ns → Cy5) und 0,68 (= 2,0 ns → Mr121) noch ein in der Flanke des Cy5-Peaks versteckter Puls mit einem Zentrum bei $-0,26$ (= 0,8 ns) gefunden, der wahrscheinlich auf Streulicht zurückzuführen ist. Das Flächenverhältnis der Peaks von Mr121 und von Cy5 ist $(9,31 \pm 3,05)/(18,66 \pm 4,32) = 0,50 \pm 0,12$. Die Flächen der (nicht eingezeichneten) Peaks unter den Histogrammen der unvermischten Farbstofflösungen betragen $65,3 \pm 8,0$ für Cy5-dCTP und $39,2 \pm 6,3$ für Mr121-dUTP; das entspricht einem Verhältnis von $0,6 \pm 0,12$. Die Fehler der Peakflächen ergeben sich aus der

Poisson-Statistik als $\Delta A/A = 1/\sqrt{A}$. Der ermittelte Anteil von Mr121-dUTP am Gesamtfarbstoffgehalt der Mischung beträgt demnach $(33,2 \pm 8,0)\%$, wenn man das Flächenverhältnis der Lorentzpeaks an das Abklingdauerhistogramm der Mischung zugrunde legt. Bestimmt man den Anteil aus den Ereigniszahlen der unvermischten Lösungen, so erhält man einen Anteil von $(37,5 \pm 7,5) \%$ Mr121.

Die Durchschnittszählraten der unverdünnten Lösungen bei $471 \mu\text{W}$ Anregungsleistung betragen

$(5,0 \pm 1,3) \text{ kHz}$	Cy5-dCTP (2 Messungen)
$(3,4 \pm 1,5) \text{ kHz}$	Mischung (3 Messungen)
$(2,6 \pm 1,8) \text{ kHz}$	Mr121-dUTP (2 Messungen).

Die Lorentzfits an die Abklingdauerhistogramme der unverdünnten Mischung wiesen Peakflächenverhältnisse von $0,17 \pm 0,06$ auf, das entspricht einem Anteil von $(14,5 \pm 4,4) \%$ Mr121-dUTP und $(85,5 \pm 4,4)\%$ Cy5-dCTP. Der gefundene Gehalt an Mr121-dUTP ist demnach zu klein. Als mögliche Ursache hierfür kommt die zu große Farbstoffkonzentration in Frage: Die Fluoreszenzereignisse sind zu einem nicht vernachlässigbaren Teil keine Einzelmoleküldurchtritte sondern Mehrfachereignisse. Da Cy5 an der verwendeten Apparatur Photonenschauer liefert, die im Mittel $1,7\times$ mehr Photonen enthalten als solche von Mr121, werden die Mischereignisse von Cy5 dominiert und ergeben entsprechend einen zu großen Cy5-Anteil. Das Verhältnis der Durchschnittszählraten der unvermischten Lösungen beträgt $(2,6 \pm 1,8) \text{ kHz} / (5,0 \pm 1,3) \text{ kHz} = 0,52 \pm 0,38$. Multipliziert man diese Zahl noch mit $1,7$ um die höhere Detektionseffizienz für Cy5 zu berücksichtigen, so erhält man ein Farbstoffverhältnis von $\text{Mr121/Cy5} = 0,88 \pm 0,64$, das entspricht einem Anteil von $(46,8 \pm 34,0) \%$ Mr121.

Die Mischung wird in den Gegenfemttopf gefüllt und, wie zu Beginn des Abschnitts 4.5 beschrieben, ein Handhabungsversuch durchgeführt.

Die Ergebnisse der Ereigniserkennung sind in Tabelle 4.5.4-2 zusammengefasst. Im Gegensatz zu den Ergebnissen aus den Kapiteln 4.5.1-4.5.4 wird außer der Gesamtzahl der Fluoreszenzereignisse auch die Art des Farbstoffes berücksichtigt: Je nach ermittelter Fluoreszenzabklingdauer wird das Ereignis wie folgt klassifiziert:

$\ln\tau < -0,3$	(\Leftrightarrow)	$\tau < 0,74 \text{ ns}$	verworfen (Streulicht, Luftblasen?)
$-0,3 \leq \ln\tau < 0,38$	(\Leftrightarrow)	$0,74 \text{ ns} \leq \tau < 1,46 \text{ ns}$	Cy5-dCTP ($\tau = 1,32 \text{ ns}$ [Sauer 2001])
$0,38 \leq \ln\tau < 1,10$	(\Leftrightarrow)	$1,46 \text{ ns} \leq \tau < 3,00 \text{ ns}$	Mr121-dUTP ($\tau = 2,31 \text{ ns}$ [Sauer 2001])
$1,10 \leq \ln\tau$	(\Leftrightarrow)	$3,00 \text{ ns} \leq \tau$	verworfen.

Die Grenze von $\ln\tau = 0,38$ ergab sich dabei als mittlerer Schnittpunkt der Lorentzpeaks der Fits an die gemessenen Abklingdauerverteilungen.

Leistung [μW]		47				
Spannung [V]		3	6	9	12	15
Versuchs-Nr.		31	32	33	34	35
Umpolzeit [s]		58,4	61,3	59,7	57	60,8
Gesamtzeit [s]		204,8	204,8	204,8	204,8	204,8
rein	alle	372	244	252	232	599
	Cy5-dCTP	120	92	91	108	280
	Mr121-dUTP	252	152	161	124	319
raus	alle	558	542	687	704	1287
	Cy5-dCTP	248	229	230	239	555
	Mr121-dUTP	310	313	457	465	732

Anteil Mr121- dUTP	gesamt	0,60 ± 0,03	0,59 ± 0,03	0,66 ± 0,03	0,63 ± 0,03	0,56 ± 0,02
	rein	0,68 ± 0,06	0,62 ± 0,06	0,64 ± 0,06	0,53 ± 0,06	0,53 ± 0,04
	raus	0,56 ± 0,04	0,58 ± 0,04	0,67 ± 0,04	0,66 ± 0,04	0,57 ± 0,03
In (raus/ rein)	alle	0,41	0,80	1,00	1,11	0,76
	Cy5-dCTP	0,73	0,91	0,93	0,79	0,68
	Mr121-dUTP	0,21	0,72	1,04	1,32	0,83

Leistung [μ W]		175				
Spannung [V]		3	6	9	12	15
Versuchs-Nr.		26	27	28	29	30
Umpolzeit [s]		60,2	55,5	58,5	64,4	57,6
Gesamtzeit [s]		204,8	204,8	204,8	204,8	204,8
rein	alle	246	217	286	240	294
	Cy5-dCTP	54	66	101	80	108
	Mr121-dUTP	192	151	185	160	186
raus	alle	428	676	927	815	874
	Cy5-dCTP	88	170	324	236	298
	Mr121-dUTP	340	506	603	579	576
Anteil Mr121- dUTP	gesamt	0,79 ± 0,05	0,74 ± 0,04	0,65 ± 0,03	0,70 ± 0,03	0,65 ± 0,03
	rein	0,78 ± 0,08	0,70 ± 0,07	0,65 ± 0,06	0,67 ± 0,07	0,63 ± 0,06
	raus	0,79 ± 0,06	0,75 ± 0,04	0,65 ± 0,03	0,71 ± 0,04	0,66 ± 0,04
In (raus/ rein)	alle	0,55	1,14	1,18	1,22	1,09
	Cy5-dCTP	0,49	0,95	1,17	1,08	1,01
	Mr121-dUTP	0,57	1,21	1,18	1,29	1,13

Leistung [μ W]		272 (a)				
Spannung [V]		3	6	9	12	15
Versuchs-Nr.		1	2	3	4	5
Umpolzeit [s]		59,5	60,5	59,5	60,0	65,6
Gesamtzeit [s]		153,6	153,6	153,6	153,6	153,6
rein	alle	13	46	74	255	535
	Cy5-dCTP	4	17	34	71	293
	Mr121-dUTP	9	29	40	184	242
raus	alle	67	68	445	802	1014
	Cy5-dCTP	13	17	120	281	505
	Mr121-dUTP	54	51	325	521	509
Anteil Mr121- dUTP	gesamt	0,79 ± 0,13	0,70 ± 0,10	0,70 ± 0,05	0,67 ± 0,03	0,48 ± 0,02
	rein	0,69 ± 0,30	0,63 ± 0,15	0,54 ± 0,11	0,72 ± 0,07	0,45 ± 0,04
	raus	0,81 ± 0,15	0,75 ± 0,14	0,73 ± 0,05	0,65 ± 0,04	0,50 ± 0,03
In (raus/ rein)	alle	1,64	0,39	1,79	1,15	0,64
	Cy5-dCTP	1,18	0,00	1,26	1,38	0,54
	Mr121-dUTP	1,79	0,56	2,09	1,04	0,74

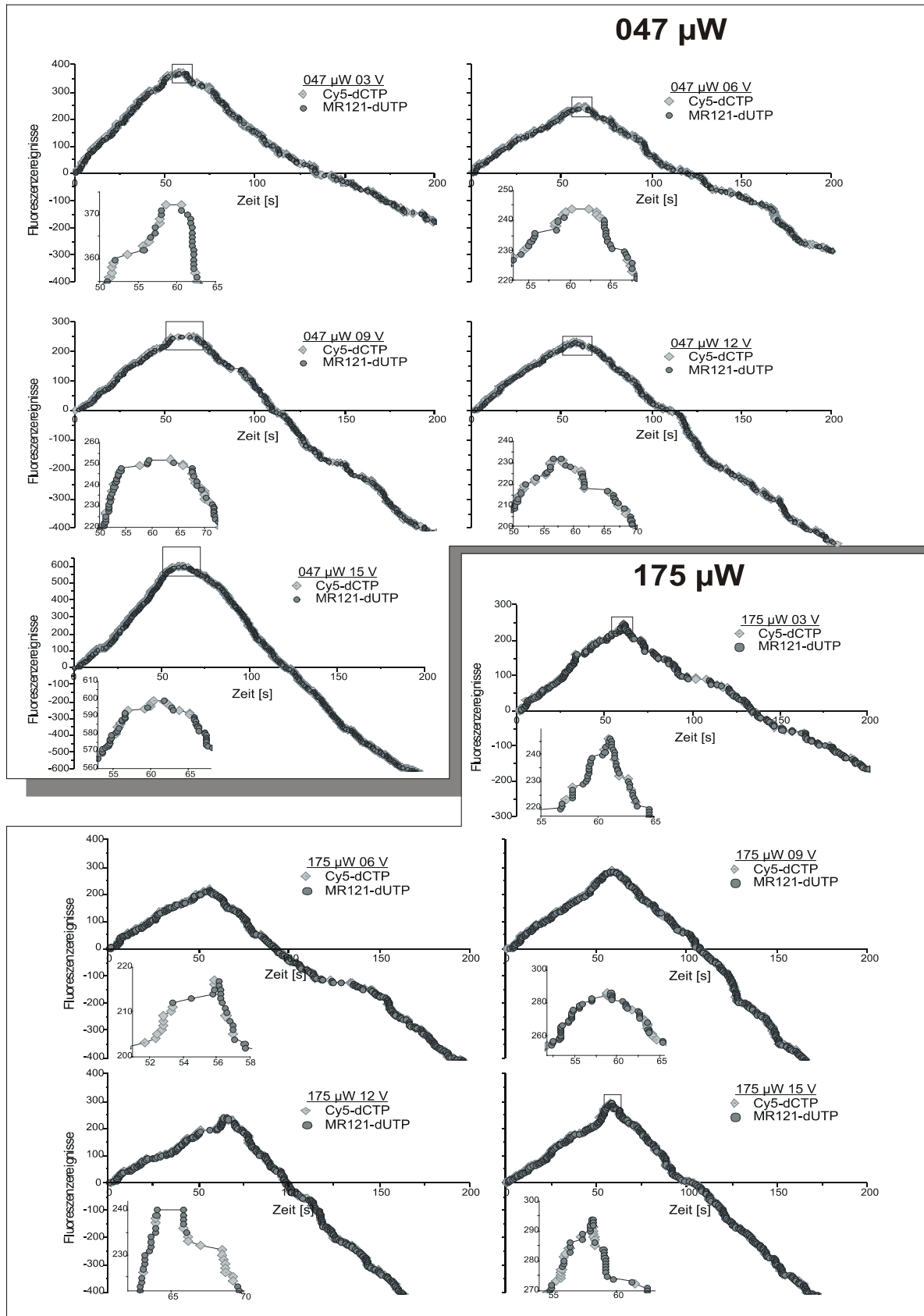
Leistung [μ W]		272 (b)				
Spannung [V]		3	6	9	12	15
Versuchs-Nr.		21	22	23	24	25
Umpolzeit [s]		58,5	58	64	58,4	61,2
Gesamtzeit [s]		204,8	204,8	204,8	204,8	204,8
rein	alle	211	369	505	1578	649
	Cy5-dCTP	64	108	176	417	308
	Mr121-dUTP	147	261	329	1161	341
raus	alle	181	364	392	384	2477
	Cy5-dCTP	45	91	113	69	955
	Mr121-dUTP	136	273	279	315	1522
Anteil Mr121- dUTP	gesamt	0,72 ± 0,06	0,73 ± 0,04	0,68 ± 0,04	0,75 ± 0,03	0,60 ± 0,02
	rein	0,70 ± 0,07	0,71 ± 0,06	0,65 ± 0,05	0,74 ± 0,03	0,53 ± 0,04
	raus	0,75 ± 0,09	0,75 ± 0,06	0,71 ± 0,06	0,82 ± 0,06	0,61 ± 0,02
In (raus/ rein)	alle	-0,15	-0,01	-0,25	-1,41	1,34
	Cy5-dCTP	-0,35	-0,17	-0,44	-1,80	1,13
	Mr121-dUTP	-0,08	0,04	-0,16	-1,30	1,50

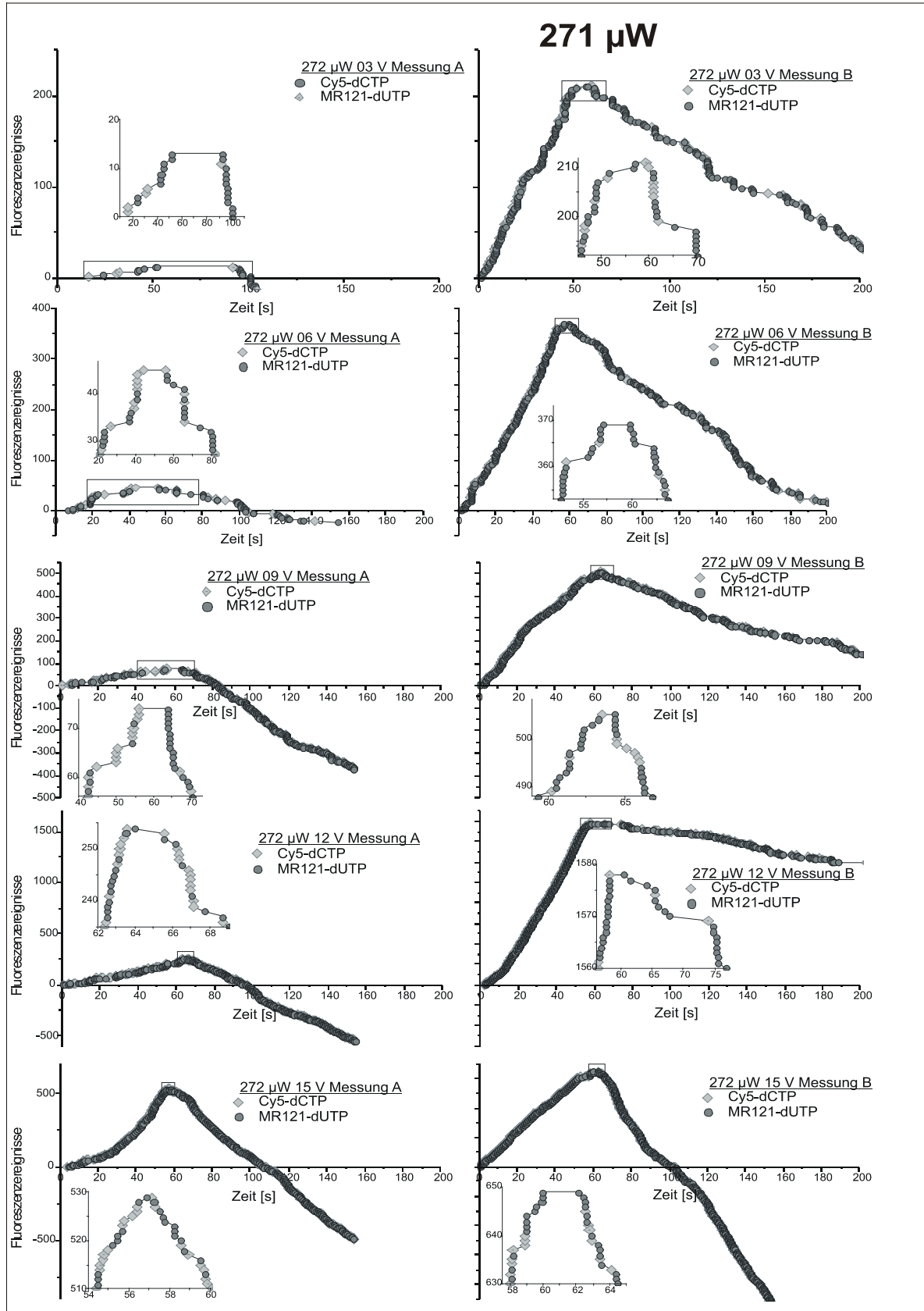
Leistung [μ W]		471				
Spannung [V]		3	6	9	12	15
Versuchs-Nr.		6	7	8	9	10

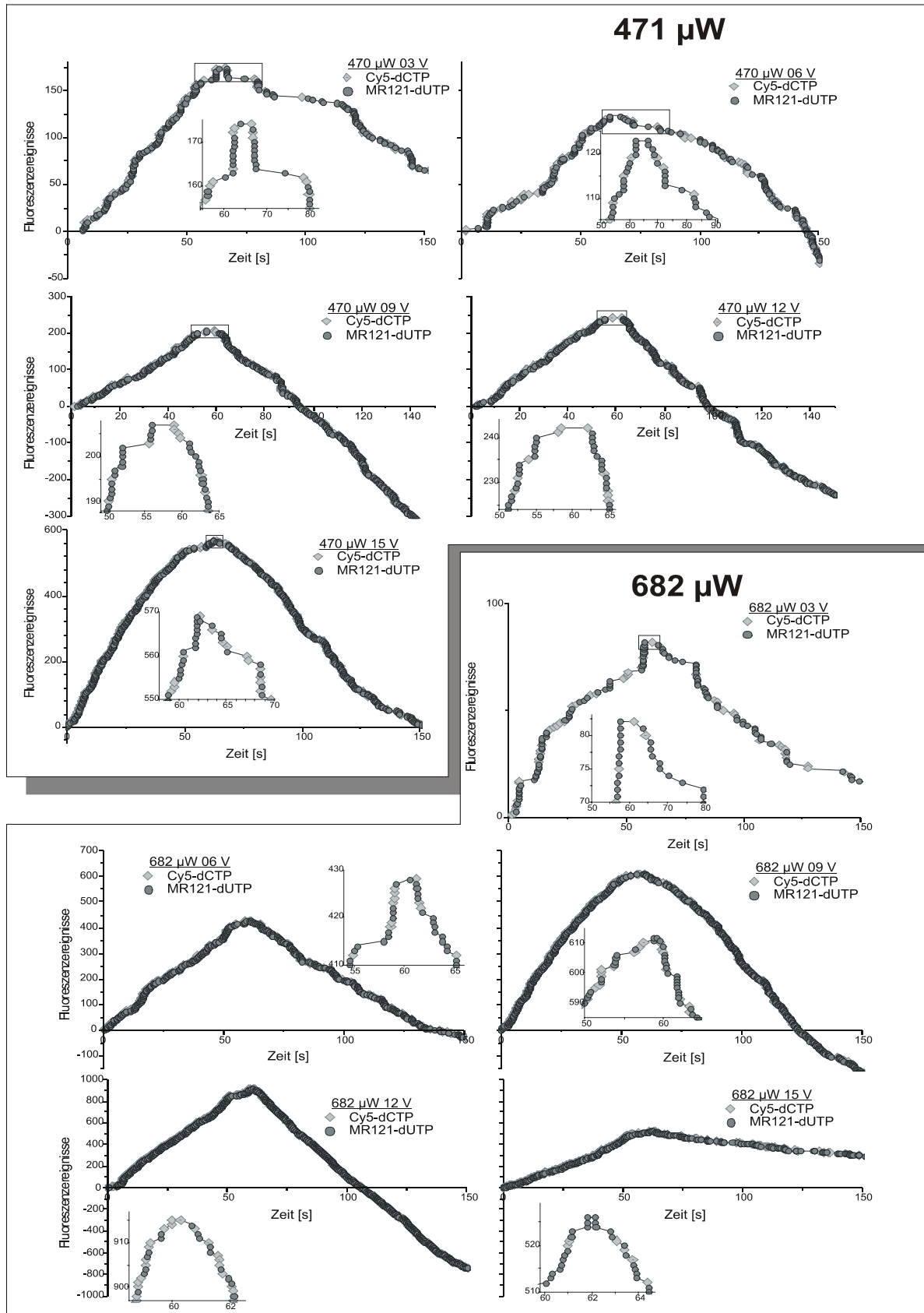
Umpolzeit [s]		64	63	58	61	62
Gesamtzeit [s]		153,6	153,6	153,6	153,6	153,6
rein	alle	174	123	207	242	569
	Cy5-dCTP	62	50	57	89	263
	Mr121-dUTP	112	73	150	153	306
raus	alle	113	175	587	501	592
	Cy5-dCTP	33	60	164	130	198
	Mr121-dUTP	80	115	423	371	394
Anteil Mr121- dUTP	gesamt	0,67 ± 0,06	0,63 ± 0,06	0,72 ± 0,04	0,71 ± 0,04	0,60 ± 0,03
	rein	0,64 ± 0,08	0,59 ± 0,09	0,72 ± 0,08	0,63 ± 0,07	0,54 ± 0,04
	raus	0,71 ± 0,10	0,66 ± 0,08	0,72 ± 0,05	0,74 ± 0,05	0,67 ± 0,04
In (raus/ rein)	alle	-0,43	0,35	1,04	0,73	0,04
	Cy5-dCTP	-0,63	0,18	1,06	0,38	-0,28
	Mr121-dUTP	-0,34	0,45	1,04	0,89	0,25
Leistung [μ W]		682				
Spannung [V]		3	6	9	12	15
Versuchs-Nr.		11	12	13	14	15
Umpolzeit [s]		57,8	60,3	58,3	59,5	61,5
Gesamtzeit [s]		153,6	153,6	153,6	153,6	153,6
rein	alle	82	428	612	915	526
	Cy5-dCTP	27	147	250	360	226
	Mr121-dUTP	55	281	362	555	300
raus	alle	67	460	824	1710	238
	Cy5-dCTP	19	94	254	610	61
	Mr121-dUTP	48	366	570	1100	177
Anteil Mr121- dUTP	gesamt	0,69 ± 0,09	0,73 ± 0,04	0,65 ± 0,03	0,63 ± 0,02	0,62 ± 0,04
	rein	0,67 ± 0,12	0,66 ± 0,05	0,59 ± 0,04	0,61 ± 0,03	0,57 ± 0,04
	raus	0,72 ± 0,14	0,80 ± 0,06	0,69 ± 0,04	0,64 ± 0,02	0,74 ± 0,07
In (raus/ rein)	alle	-0,20	0,07	0,30	0,63	-0,79
	Cy5-dCTP	-0,35	-0,45	0,02	0,53	-1,31
	Mr121-dUTP	-0,14	0,26	0,45	0,68	-0,53
Leistung [μ W]		851				
Spannung [V]		3	6	9	12	15
Versuchs-Nr.		16	17	18	19	20
Umpolzeit [s]		60	58	59,6	58,5	60,4
Gesamtzeit [s]		204,8	204,8	204,8	204,8	204,8
rein	alle	259	388	885	1182	1395
	Cy5-dCTP	66	120	263	374	380
	Mr121-dUTP	193	268	622	808	1015
raus	alle	332	253	142	240	180
	Cy5-dCTP	71	75	31	85	55
	Mr121-dUTP	261	178	111	155	125
Anteil Mr121- dUTP	gesamt	0,77 ± 0,05	0,70 ± 0,04	0,71 ± 0,03	0,68 ± 0,03	0,72 ± 0,03
	rein	0,75 ± 0,07	0,69 ± 0,05	0,70 ± 0,04	0,68 ± 0,03	0,73 ± 0,03
	raus	0,79 ± 0,07	0,70 ± 0,07	0,78 ± 0,10	0,65 ± 0,07	0,69 ± 0,08
In (raus/ rein)	alle	0,25	-0,43	-1,83	-1,59	-2,05
	Cy5-dCTP	0,07	-0,47	-2,14	-1,48	-1,93
	Mr121-dUTP	0,30	-0,41	-1,72	-1,65	-2,09

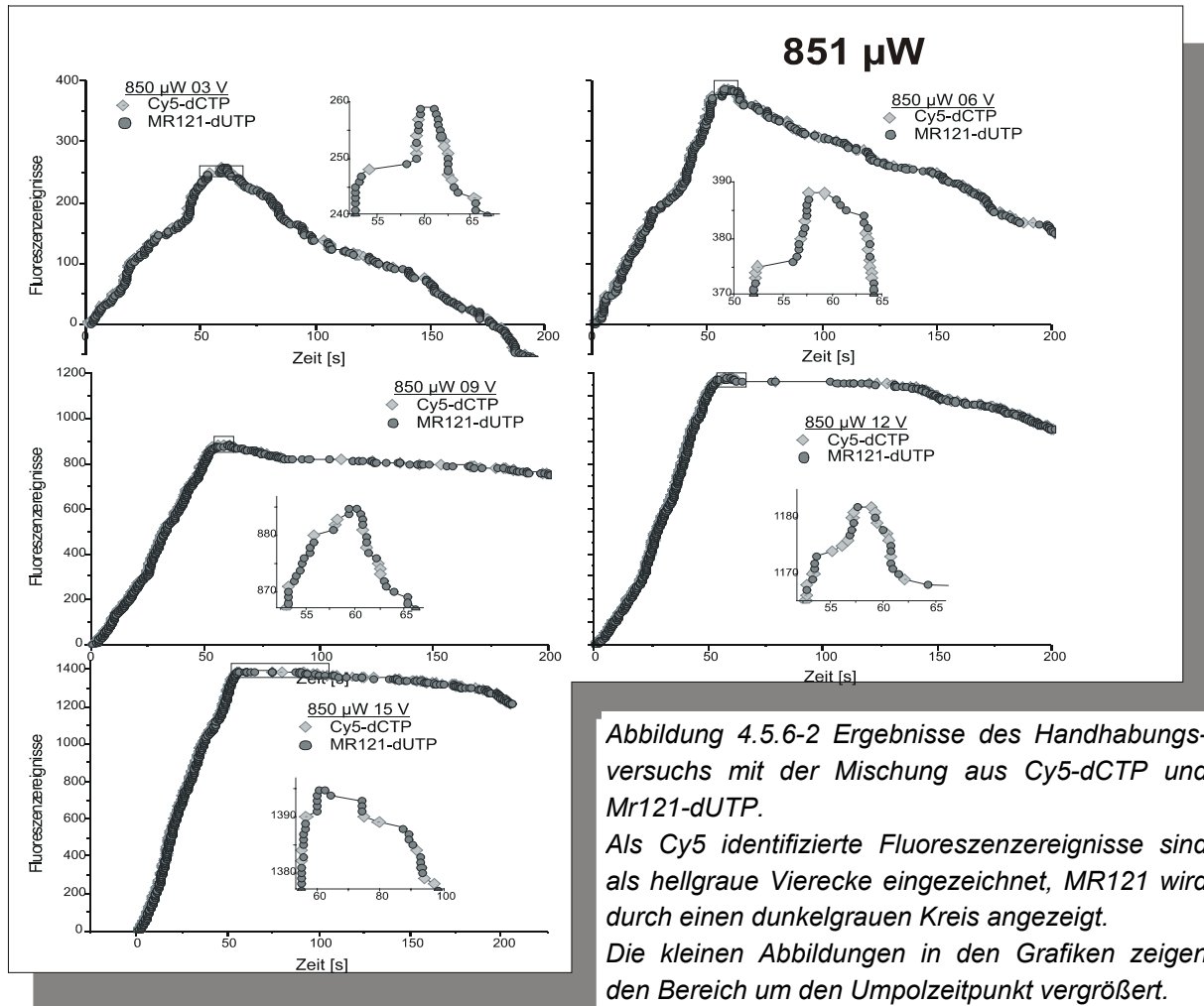
Tabelle 4.5.6-2 Ergebnisse der Handhabungsversuche mit der Mischung aus Cy5-dCTP und Mr121-dUTP

In den Abbildungen 4.5.6-2 ist die Gesamtzahl der detektierten Ereignisse gegen die Versuchszeit aufgetragen. Die während des Reinziehens erkannten Ereignisse werden dabei positiv, die während des Rausziehens erkannten hingegen negativ gewertet; wurde ein Ereignis als Cy5-dCTP klassifiziert, so wird ein hellgraues Viereck als Symbol gezeichnet, wenn die Klassifizierung Mr121-dUTP ergibt, so wird ein dunkelgrauer Kreis verwendet.









Um die Frage der Symmetrie in der Reihenfolge der Ereignisse beim Rein- und Rausziehen quantitativ beantworten zu können, kommen Korrelationsmethoden in Frage: Man numeriert die „rausgezogenen“ Ereignisse von 1 bis N_{raus} aufsteigend, die „reingezogenen“ Ereignisse von N_{raus} bis 1 absteigend. Anschließend fast man die Ereignisse mit gleichen Ordnungsnummern jeweils zu Paaren zusammen, und prüft ob bestimmte Fluoreszenzparameter wie z.B. $\ln(\tau_{\text{MLE}})_{\text{Rein}}[i]$ mit $\ln(\tau_{\text{MLE}})_{\text{Raus}}[i]$ oder $\text{Photonenzahl}_{\text{Rein}}[i]$ mit $\text{Photonenzahl}_{\text{Raus}}[i]$ korreliert ist, wobei der lineare Korrelationskoeffizient nach Pearson oder die nichtparametrischen Korrelationsverfahren nach Spearman oder nach Kendall naheliegen [von Mises 1964, Downie 1965, Hoel 1971, Dunn 1974, Lehmann 1975, Norusis 1982, Stuart 1987].

Es werden zwei Typen von Datensätzen untersucht:

- (A) Die gepaarten Ereignislisten eines einzelnen Versuches
- (B) Die n-ten Ereignisse aller Versuche.

Methode (A) wäre sinnvoll, wenn z.B. bei hohen Elektroden Spannungen die Ereignisse stark korreliert sind, während bei niedrigen Elektroden Spannungen nur eine schwache Korrelation vorliegt, die Korrelation innerhalb einer Liste aber mit zunehmender Ordnungszahl relativ konstant bleibt. Die Ereignisschwerpunkte eignen sich bei Methode A für diese Untersuchung nicht, da die Ordnungszahlen bereits nach diesem Parameter vergeben wurden, so daß diese nicht unabhängig sind und immer korreliert sein müssen.

Methode (B) würde entsprechend brauchbare Ergebnisse liefern, wenn das Ausmaß der Korrelation in erster Linie von der Ordnungsnummer und weniger von den Versuchsparametern abhängt.

Hängt das Ausmaß der Korrelation sowohl von den Experimentalparametern als auch von der Ordnungsnummer ab, so müßte man jedes Experiment bei konstanten Parametern viele Male wiederholen und anschließend die einzelnen Serien nach Methode B auswerten. Da die vorliegenden Ergebnisse jedoch nicht vielversprechend erscheinen, wurde der dafür notwendige enorm große experimentelle Aufwand nicht betrieben.

Abbildung 4.5.6-3 zeigt exemplarisch die Dichteverteilungen nach Methode A für 682 μW Anregungsleistung und 9 V Elektroden Spannung:

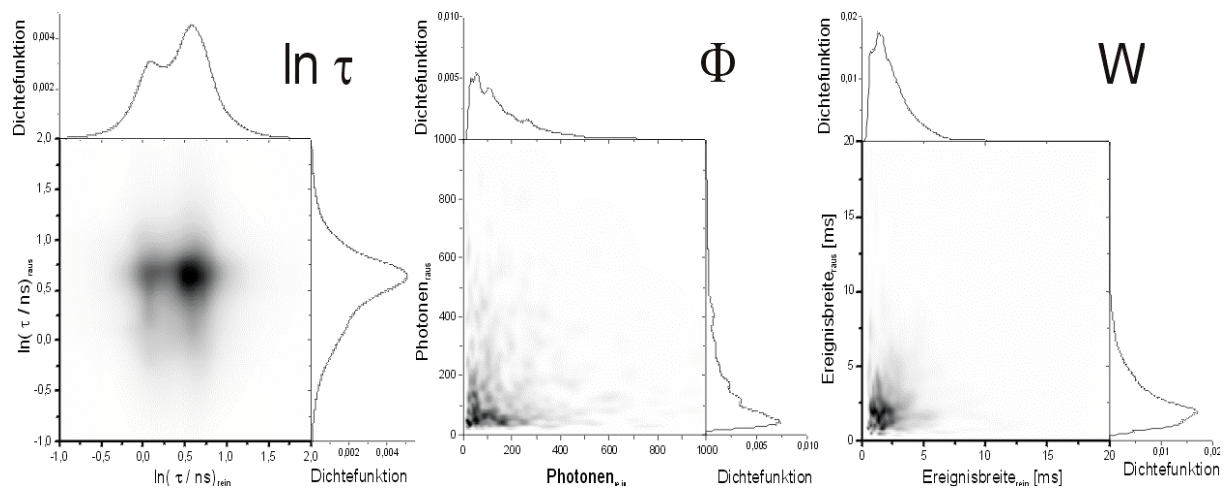


Abbildung 4.5.6-3 Zweidimensionale Dichteverteilungen der Fluoreszenzparameter $\ln(\tau)$, Photonenzahl des Ereignisses (Φ), Ereignisbreite (W). Die Anregungsleistung beträgt 682 μW , die Elektroden Spannung 9V. Die Korrelationskoeffizienten betragen $\rho_{\ln\tau}=0,02$, $\rho_{\Phi}=-0,02$ und $\rho_W=0,04$. Keiner dieser Koeffizienten ist (auf einem 90%-Niveau) signifikant von Null verschieden.

Tabelle 4.5.6-3a gibt in der Spalte ρ ($-1 \leq \rho \leq +1$) die Pearsonschen linearen Korrelationskoeffizienten für verschiedene Fluoreszenzparameter bei konstanten Versuchsparametern P , U an, während in Tabelle 4.5.6-3b die Abhängigkeit von der Ordnungsnummer (für die ersten 50 Ereignispaare) des Ereignispaars angegeben ist. Der lineare Korrelationskoeffizient ist ein Maß dafür, wie gut die Meßpunkte auf einer Geraden liegen. Ein Korrelationskoeffizient vom Betrag 1 bedeutet, daß die Punkte perfekt auf einer Geraden liegen. Das Vorzeichen des Korrelationskoeffizienten ist gleich dem Vorzeichen der Geradensteigung. Ein Korrelationskoeffizient von 0 bedeutet, daß die Meßpunkte durch alle Geradensteigungen gleich schlecht beschrieben werden.

$$\rho_{xy} = \frac{\langle (x - \bar{x})(y - \bar{y}) \rangle}{\sqrt{\langle (x - \bar{x})^2 \rangle \langle (y - \bar{y})^2 \rangle}} = \frac{\sigma_{xy}}{\sigma_x \sigma_y} \quad (4.5.6-1)$$

x steht hier für einen Parameter eines Ereignisses. auf der „rein-“ Spur und y für den entsprechenden Wert des Partners auf der „raus-“ Spur.

Außerdem ist der sogenannte t-Wert (n = Zahl der Wertepaare) angegeben.

$$t = \rho \frac{\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-\rho^2}} \quad (4.5.6-2)$$

Diese Variable zeigt bei unkorrelierten Werten, die angenähert als binormalverteilt betrachtet werden können, die Studentsche t-Verteilung. Mit Hilfe dieser Variable kann daher die Nullhypothese, welche besagt, daß die Wertepaare unkorreliert sind, einem Signifikanztest mit einer bestimmten Irrtumswahrscheinlichkeit α unterworfen werden. In der Spalte α ist die kleinste Irrtumswahrscheinlichkeit, für die bei einem zweiseitigen Test die Nullhypothese verworfen werden kann, angegeben. Das maximale Signifikanzniveau des Tests liegt dementsprechend bei $1-\alpha$. Ein kleiner Wert α besagt, daß die Korrelation sehr signifikant (also statistisch gut abgesichert) ist, während ein großer Wert von $|\rho|$ besagt, daß die Korrelation stark ist. Siehe hierzu z.B. [Numerical Recipes in C, Kap. 6.4, 14.5 und 14.6].

Es gilt:

$$\alpha = 1 - A(t | \nu) = I_{\frac{\nu}{\nu+t^2}} \left(\frac{\nu}{2}, \frac{1}{2} \right) \quad \nu = n - 2 \quad (4.5.6-3)$$

$A(t|\nu)$ ist die Studentsche t-Verteilung beim Freiheitsgrad ν . $I_x(a,b) = \frac{1}{B(a,b)} \int_0^x t^{a-1} (1-t)^{b-1} dt$

$= \frac{\Gamma(a+b)}{\Gamma(a)\Gamma(b)} \int_0^x t^{a-1} (1-t)^{b-1} dt$ ist die unvollständige Betafunktion.

Die Abbildungen 4.5.6-4 a und b geben die Ergebnisse der Tabellen 4.5.6-3 a und b graphisch wieder. Abgesehen von den Ereignisschwerpunkten läßt sich keine signifikante Korrelation der untersuchten Fluoreszenzparameter feststellen. Während der Korrelationskoeffizient von -1 bei den nach Methode A gepaarten Ereignissen à priori zu erwarten war, ist die Korrelation der Ereignisschwerpunkte nach Methode B für die Ereignispaare mit den Nummern 5-13 auf einem 95%-Niveau signifikant.

Das Problem bei diesem Verfahren ist, daß es zwar Fehler in der Bestimmung des Parameters (z.B. $\ln(\tau_{MLE})$) zuläßt, nicht jedoch bei der Zuordnung der Wertepaare. Da man jedoch à priori nicht davon ausgehen darf, daß jedes Ereignis erkannt, kein Ereignis gespalten und kein Molekül zweimal durch das Detektionsvolumen tritt, daß also kurzum die Fluoreszenzereigniserkennung perfekt ist, ist gerade diese Paarung mit einem nur schwierig abzuschätzenden Fehler behaftet.

P [μ W]	U [V]	n	Ereignis- schwerpunkt		Photonenzahl			Ereignisbreite			ln τ_{MLE}		
			ρ	α [%]	ρ	t	α	ρ	t	α	ρ	t	α
47	3	371	-0,99	7,8E-290	0,03	0,61	54,4	0,01	0,13	89,9	-0,01	-0,25	80,2
	6	244	-0,99	3,7E-188	0,01	0,10	92,4	0,01	0,18	85,4	-0,03	-0,41	68,0
	9	252	-0,99	5,2E-212	-0,08	-1,22	22,3	-0,07	-1,08	28,3	0,06	0,91	36,2
	12	232	-0,99	7,5E-224	0,00	0,04	97,2	-0,02	-0,30	76,7	-0,07	-1,11	26,8
	15	599	-0,98	<E-200	0,02	0,53	59,3	0,00	0,08	93,8	-0,01	-0,19	84,8
175	3	239	-0,97	6,2E-150	0,09	1,36	17,7	-0,07	-1,01	31,4	-0,01	-0,09	93,1
	6	213	-0,99	1,7E-168	-0,06	-0,85	39,5	-0,01	-0,13	90,0	-0,06	-0,91	36,3
	9	283	-1,00	7,8E-290	0,03	0,49	62,4	-0,03	-0,47	63,6	-0,03	-0,45	65,4
	12	240	-0,99	1,5E-228	0,00	0,02	98,3	-0,04	-0,56	57,7	0,00	0,02	98,1
	15	289	-0,99	1,9E-223	-0,06	-1,03	30,2	-0,02	-0,27	78,5	-0,02	-0,27	78,5
272 ^a	3	13	-0,90	2,5E-03	0,71	3,35	0,7	0,04	0,14	89,3	-0,12	-0,41	68,8
	6	45	-0,95	8,8E-22	0,02	0,16	87,4	-0,04	-0,28	78,0	0,06	0,39	70,1
	9	74	-0,98	9,8E-51	-0,02	-0,19	84,7	-0,15	-1,29	20,2	-0,17	-1,45	15,1
	12	255	-0,99	9,1E-197	-0,04	-0,64	52,1	-0,06	-0,91	36,5	-0,01	-0,16	87,1
	15	533	-0,98	<E-200	-0,06	-1,35	17,7	0,01	0,31	75,3	0,02	0,57	56,7
272 ^b	3	181	-0,99	3,3E-138	0,02	0,27	79,1	0,02	0,30	76,2	-0,05	-0,62	53,4
	6	364	-0,99	<E-200	-0,05	-1,01	31,1	0,02	0,39	69,6	0,03	0,52	60,2
	9	392	-0,96	1,8E-219	-0,04	-0,73	46,6	-0,02	-0,31	75,6	-0,03	-0,66	51,2
	12	384	-0,99	<E-200	0,02	0,30	76,4	-0,01	-0,21	83,1	0,04	0,70	48,6
	15	649	-0,98	<E-200	-0,01	-0,31	75,9	0,02	0,56	57,6	0,00	-0,03	97,8
471	3	113	-0,97	3,3E-65	0,12	1,30	19,6	0,20	2,20	3,0	0,04	0,43	67,1
	6	123	-0,92	2,4E-50	-0,05	-0,54	58,9	0,22	2,50	1,4	0,11	1,23	22,0
	9	207	-0,99	3,0E-161	0,02	0,31	75,5	0,02	0,33	74,3	-0,08	-1,16	24,8
	12	242	-0,99	3,4E-202	-0,09	-1,38	16,9	-0,03	-0,52	60,5	-0,07	-1,02	30,7
	15	569	-0,97	<E-200	0,01	0,15	88,2	-0,04	-0,98	33,0	-0,03	-0,62	53,3
682	3	66	-0,90	1,8E-22	0,27	2,27	2,7	0,08	0,67	50,5	0,01	0,10	91,8
	6	427	-1,00	<E-200	-0,01	-0,30	76,8	0,04	0,78	43,7	0,00	-0,05	96,3
	9	610	-1,00	<E-200	-0,02	-0,60	55,2	0,04	0,88	37,7	0,01	0,23	81,7
	12	910	-1,00	<E-200	0,05	1,55	12,2	-0,04	-1,08	27,9	0,01	0,20	84,1
	15	241	-0,96	4,0E-132	-0,07	-1,01	31,2	-0,06	-0,92	35,7	0,02	0,33	74,2
851	3	257	-0,98	3,4E-193	0,13	2,07	4,0	0,15	2,41	1,7	-0,01	-0,15	88,0
	6	253	-0,96	3,0E-137	0,01	0,22	82,9	-0,01	-0,19	85,3	0,08	1,28	20,2
	9	142	-0,84	2,4E-36	0,05	0,57	56,9	-0,07	-0,83	40,7	-0,04	-0,51	61,0
	12	240	-0,96	1,6E-133	0,10	1,54	12,5	0,10	1,52	12,9	0,00	-0,05	96,2
	15	180	-0,95	2,8E-89	-0,03	-0,36	71,6	0,04	0,57	57,0	0,05	0,62	53,3

Tabelle 4.5.6-3a Korrelationskoeffizienten ρ , t-Werte t und maximale Irrtumswahrscheinlichkeiten α (in %), bei denen die Nullhypothese $H_0: \rho = 0$ verworfen werden kann.

(A) Die Meßreihen entsprechen jeweils konstanten Experimentalparametern, Anregungsleistung vor der Eintrittspupille des Objektivs (P) und Elektrodenspannung (U).

Ereignis#	n	Ereignis- schwerpunkt			Photonenzahl			Ereignisbreite			ln τ_{MLE}		
		ρ	t	α	ρ	t	α	ρ	t	α	ρ	t	α
1	35	0,05	0,30	77,0	-0,11	-0,62	53,8	-0,06	-0,34	73,5	-0,04	-0,26	79,8
2	35	0,06	0,35	73,1	0,03	0,16	87,4	0,10	0,60	55,6	0,01	0,04	96,7
3	35	-0,08	-0,48	63,2	0,40	2,53	1,6	-0,07	-0,39	69,7	0,01	0,06	95,6
4	35	-0,17	-1,01	32,2	0,02	0,11	91,4	-0,10	-0,60	55,4	0,15	0,87	38,8
5	35	-0,31	-1,84	7,4	-0,02	-0,11	90,9	0,08	0,47	64,5	0,04	0,26	79,9
6	35	-0,34	-2,06	4,8	-0,06	-0,37	71,5	0,24	1,43	16,2	-0,04	-0,23	82,3
7	35	-0,31	-1,88	6,9	-0,17	-1,02	31,5	-0,17	-1,01	32,1	-0,02	-0,10	92,1
8	35	-0,43	-2,73	1,0	-0,25	-1,50	14,4	-0,28	-1,71	9,7	-0,07	-0,41	68,2
9	35	-0,41	-2,58	1,5	-0,10	-0,60	55,5	0,07	0,37	71,0	0,10	0,60	55,2
10	35	-0,41	-2,62	1,3	0,17	0,97	33,7	0,10	0,60	55,2	-0,08	-0,48	63,1
11	35	-0,40	-2,53	1,6	-0,04	-0,22	83,0	0,02	0,11	91,7	-0,02	-0,10	91,8
12	35	-0,42	-2,67	1,2	-0,12	-0,68	50,4	0,01	0,04	96,9	-0,07	-0,43	67,0
13	35	-0,42	-2,68	1,1	0,02	0,12	90,2	-0,18	-1,03	31,1	-0,12	-0,69	49,4
14	34	-0,14	-0,80	43,2	0,21	1,21	23,4	0,16	0,93	36,2	0,02	0,10	91,8
15	34	-0,21	-1,22	23,1	-0,16	-0,93	35,8	-0,02	-0,09	92,8	0,04	0,20	84,3
16	34	-0,22	-1,26	21,8	0,38	2,35	2,5	0,28	1,67	10,5	-0,02	-0,10	92,0
17	34	-0,19	-1,08	28,9	0,32	1,92	6,4	-0,02	-0,13	89,4	0,04	0,20	84,4
18	34	-0,21	-1,22	23,1	-0,23	-1,31	19,8	-0,32	-1,93	6,2	-0,03	-0,16	87,1
19	34	-0,20	-1,16	25,6	-0,03	-0,16	87,5	0,22	1,27	21,3	0,00	-0,02	98,1
20	34	-0,21	-1,21	23,5	0,17	0,98	33,6	0,00	-0,02	98,2	-0,04	-0,21	83,5
21	34	-0,20	-1,17	25,0	-0,21	-1,21	23,4	-0,07	-0,39	70,0	0,03	0,15	88,5
22	34	-0,24	-1,41	16,8	-0,09	-0,51	61,1	-0,01	-0,07	94,5	0,08	0,44	66,5
23	34	-0,25	-1,45	15,7	0,04	0,21	83,4	-0,06	-0,34	73,4	0,11	0,65	52,2
24	34	-0,24	-1,42	16,4	-0,15	-0,88	38,5	0,21	1,24	22,5	-0,01	-0,03	97,5
25	34	-0,23	-1,33	19,3	0,07	0,40	68,9	0,21	1,24	22,6	0,13	0,74	46,5
26	34	-0,22	-1,29	20,7	-0,06	-0,32	75,2	-0,11	-0,64	52,5	0,02	0,11	91,6
27	34	-0,26	-1,54	13,3	0,01	0,04	97,0	0,01	0,08	93,3	0,02	0,11	91,5
28	34	-0,30	-1,80	8,2	0,03	0,19	85,0	0,28	1,64	11,2	0,01	0,07	94,6
29	34	-0,30	-1,81	8,0	-0,06	-0,33	74,6	0,13	0,73	47,4	-0,07	-0,41	68,2
30	34	-0,28	-1,65	10,9	0,04	0,25	80,2	-0,03	-0,16	87,7	-0,08	-0,45	65,9
31	34	-0,28	-1,63	11,3	-0,14	-0,79	43,7	0,13	0,72	47,4	0,13	0,75	46,1
32	34	-0,26	-1,53	13,7	0,40	2,45	2,0	0,06	0,34	73,9	-0,01	-0,04	97,1
33	34	-0,28	-1,65	10,9	-0,12	-0,67	50,8	0,10	0,54	59,1	-0,01	-0,03	97,3
34	34	-0,28	-1,63	11,3	0,22	1,27	21,4	0,09	0,50	62,0	0,00	-0,01	99,5
35	34	-0,28	-1,64	11,0	0,24	1,41	16,7	-0,01	-0,08	93,5	0,07	0,42	67,4
36	34	-0,28	-1,66	10,7	0,18	1,02	31,3	0,19	1,07	29,2	0,19	1,10	27,9
37	34	-0,27	-1,60	11,8	0,19	1,12	26,9	-0,19	-1,11	27,4	0,07	0,42	67,5
38	34	-0,27	-1,58	12,4	-0,03	-0,18	86,1	0,34	2,04	5,0	0,06	0,32	74,8
39	34	-0,26	-1,50	14,3	0,08	0,48	63,7	0,27	1,57	12,7	-0,07	-0,39	70,3
40	34	-0,27	-1,59	12,2	-0,09	-0,49	62,6	-0,04	-0,25	80,3	-0,10	-0,57	57,5
41	34	-0,26	-1,51	14,1	-0,20	-1,14	26,4	0,05	0,29	77,4	0,05	0,27	79,0
42	34	-0,25	-1,45	15,7	0,15	0,88	38,3	0,02	0,09	92,9	-0,06	-0,36	72,4
43	34	-0,25	-1,45	15,7	-0,14	-0,82	41,9	0,09	0,51	61,4	-0,10	-0,57	57,2
44	34	-0,25	-1,45	15,7	-0,01	-0,03	97,6	0,02	0,12	90,7	0,03	0,20	84,5
45	34	-0,25	-1,47	15,3	-0,34	-2,02	5,2	0,02	0,13	90,1	0,06	0,34	73,5
46	33	-0,16	-0,93	36,1	0,20	1,15	25,7	0,07	0,37	71,6	-0,02	-0,11	91,3
47	33	-0,18	-1,02	31,4	-0,04	-0,24	81,2	0,28	1,62	11,6	0,22	1,23	22,7
48	33	-0,20	-1,12	27,3	0,18	0,99	32,8	0,29	1,71	9,8	0,02	0,10	91,9
49	33	-0,20	-1,15	25,9	0,06	0,33	74,4	-0,03	-0,16	87,6	0,19	1,07	29,2
50	33	-0,20	-1,15	25,7	-0,10	-0,55	58,4	0,02	0,12	90,5	0,12	0,68	50,4

Tabelle 4.5.6-3b Korrelationskoeffizienten ρ , t-Werte t und minimale Irrtumswahrscheinlichkeiten α (in %), bei denen die Nullhypothese $H_0: \rho = 0$ verworfen werden kann.

(B) Die Meßreihen entsprechen jeweils konstanten Ordnungszahlen. d.h. in der ersten Zeile stehen die Ergebnisse für die ersten Ereignispaare aus allen Experimenten.

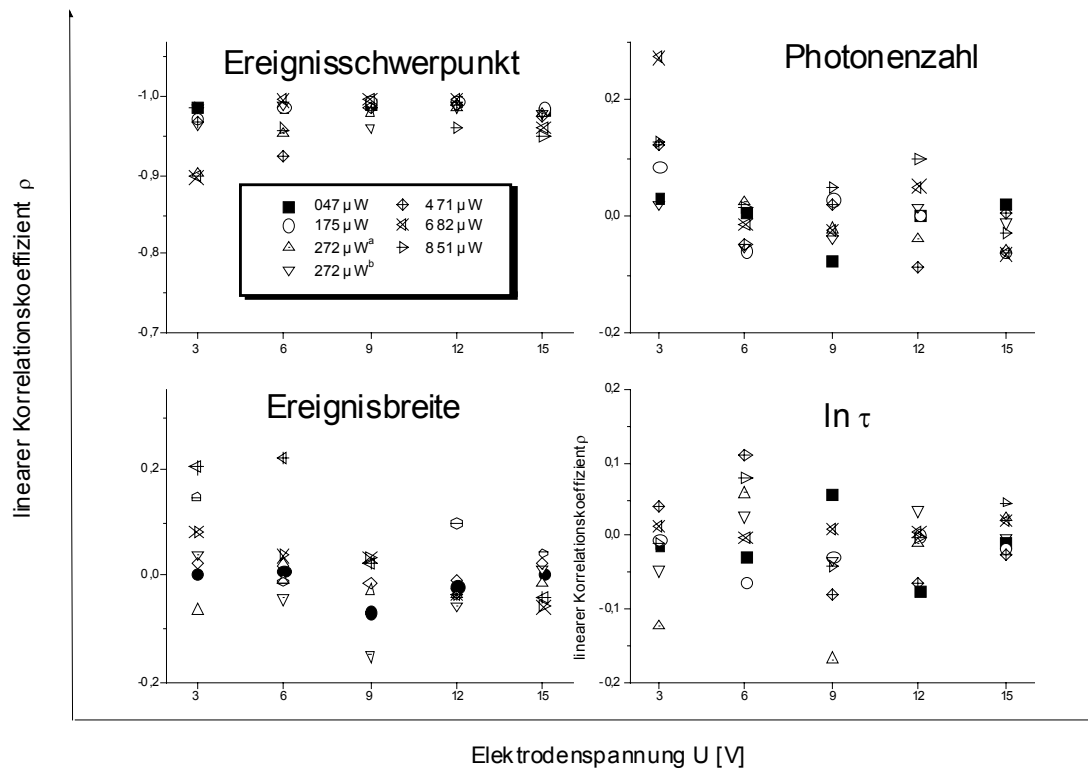


Abbildung 4.5.6-4a linearer Korrelationskoeffizient verschiedener Fluoreszenzparameter in Abhängigkeit von der Elektroden Spannung bei unterschiedlichen Anregungsleistungen.

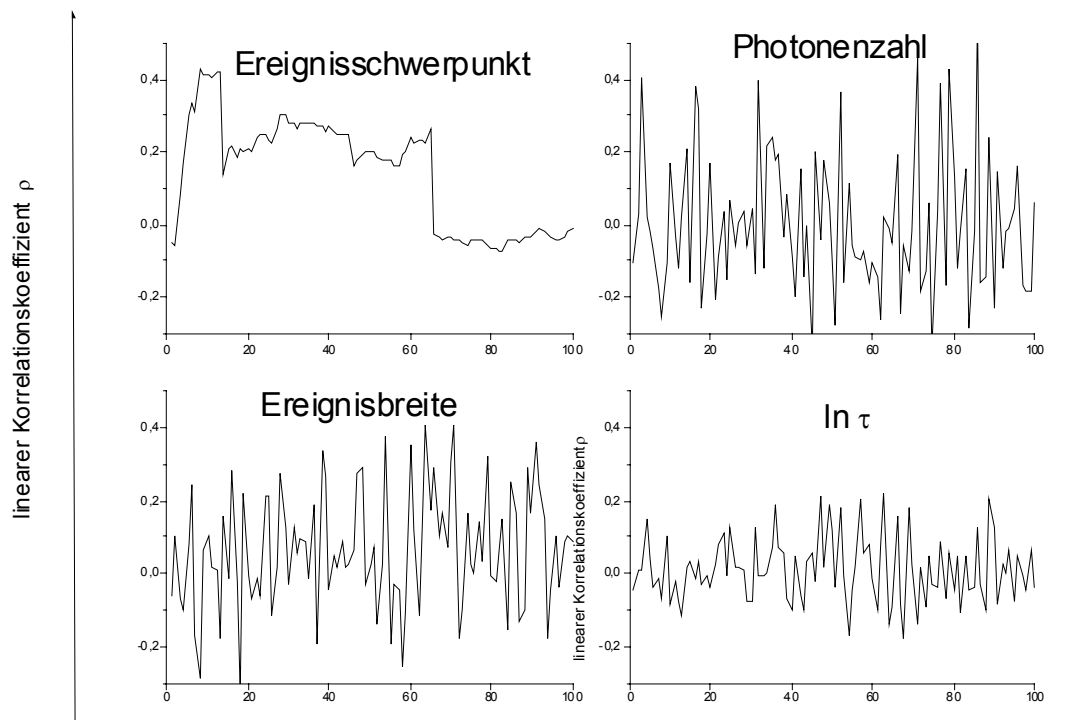


Abbildung 4.5.6-4b linearer Korrelationskoeffizient verschiedener Fluoreszenzparameter in Abhängigkeit von der Ordnungszahl des Ereignisses. (Mittel über alle Experimente).

Um das Paarungsproblem zu umgehen, ist die Idee nun, aus der Ereignisliste eine Art zweidimensionaler MCS- Spur zu errechnen. Als x-Koordinate dient die Zeit, als y-Koordinate der ln der abgeschätzten Fluoreszenzabklingdauer. Ein Ereignis wird auf dieser Spur durch eine zweidimensionale Gaußglocke dargestellt:

$$B_j(x, y) = \Phi_j \cdot \frac{1}{\sigma_{MCS,j} \sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{1}{2} \left(\frac{x - \mu_{MCS,j}}{\sigma_{MCS,j}}\right)^2\right) \cdot \frac{1}{\Delta \ln(\tau_{MLE})_j \sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{1}{2} \left(\frac{y - \ln(\tau_{MLE,j})}{\Delta \ln(\tau_{MLE})_j}\right)^2\right) \quad (4.5.6-4)$$

$\Phi_j = \sum_{b=\text{erster Bin des Ereignisses}}^{\text{letzter Bin des Ereignisses}} MCS[b]$ ist die Gesamtphotonenzahl des Fluoreszenzereignisses.

$\mu_{MCS,j} = \frac{\sum_{b=\text{erster Bin des Ereignisses}}^{\text{letzter Bin des Ereignisses}} b \cdot MCS[b]}{\Phi_j}$ ist sein Schwerpunkt auf der MCS-Spur in Bins.

$\sigma_{MCS,j} = \sqrt{\frac{\sum_{b=\text{erster Bin des Ereignisses}}^{\text{letzter Bin des Ereignisses}} MCS[b] \cdot (b - \mu_j)^2}{\Phi_j - 1}}$ ist die Standardabweichung (Gaußbreite) des Ereignisses auf der MCS-Spur in Bins.

MCS[b] ist dabei die Photonenzahl im Bin b der gemessenen Spur.

τ_{MLE} ist die Abgeschätzte Fluoreszenzabklingdauer des Wahrscheinlichkeitsschätzers (s. Abschnitt 2.10 und 4.3.4). Es gilt $KLD(\vec{d}_j, \vec{p}(\tau)) = \min @ \tau = \tau_{MLE}$.

$\frac{d}{d\tau} KLD(\vec{d}_j, \vec{p}(\tau = \tau_{MLE})) = \frac{1}{\Delta \tau_{MLE}}$. Dabei ist KLD die Kullback-Leibler-Diskriminierungsinformation zwischen der gemessenen Abklingkurve des Fluoreszenzereignisses \vec{d}_j und der Modellfunktion $\vec{p}(\tau)$.

Die zweidimensionale MCS-Spur ist gegeben durch die Summe über alle diese Gaußglocken:

$$Spur_{2d}(x, y) = \sum_{j=1}^{\text{Anzahl Ereignisse}} B_j(x, y). \quad (4.5.6-5)$$

Da die Ereignislisten nach steigenden μ_j geordnet vorliegen, kann ohne einen großen Fehler die Rechenzeit verkürzt werden, wenn nur solche Ereignisse berücksichtigt werden, für die gilt $|x - \mu_j| < 15 \times \sigma_j$.

Die linke Hälfte von Abbildung 4.5.6-5 zeigt exemplarisch Ausschnitte von 20 s um die Umpolzeitpunkte aus diesen so erzeugten zweidimensionalen Spuren bei 470 μ W

Anregungsleistung. Dies sind die Experimente 6-10 von insgesamt 35 Versuchen, die Experimente liegen also im vorderen Drittel der Versuchsreihen.

Durch die zweidimensionale Spur werden zwei Schnitte gelegt, einer bei $\ln(\tau) = 0,28$ ($\Leftrightarrow \tau = 1,32$ ns) für Cy5 und einer bei $\ln(\tau) = 0,84$ ($\Leftrightarrow \tau = 2,32$ ns) für Mr121. Damit erhält man für jeden Farbstoff eine eigene MCS-Spur (Abbildung 4.5.6-5, rechts). Die MCS-Spuren werden am Umpolzeitpunkt t_0 gespalten und für $t < t_0$ an $y = t_0$ gespiegelt. Man erhält so insgesamt vier Spuren:

$$\text{Cy5}_{\text{rein}}(t) = \text{Spur}_{2d}(x = t_0 - t, y = 0,28) \quad (4.5.6-6a)$$

$$\text{Cy5}_{\text{raus}}(t) = \text{Spur}_{2d}(x = t - t_0, y = 0,28) \quad (4.5.6-6b)$$

$$\text{Mr121}_{\text{rein}}(t) = \text{Spur}_{2d}(x = t_0 - t, y = 0,84) \quad (4.5.6-6c)$$

$$\text{Mr121}_{\text{raus}}(t) = \text{Spur}_{2d}(x = t - t_0, y = 0,84) \quad (4.5.6-6d)$$

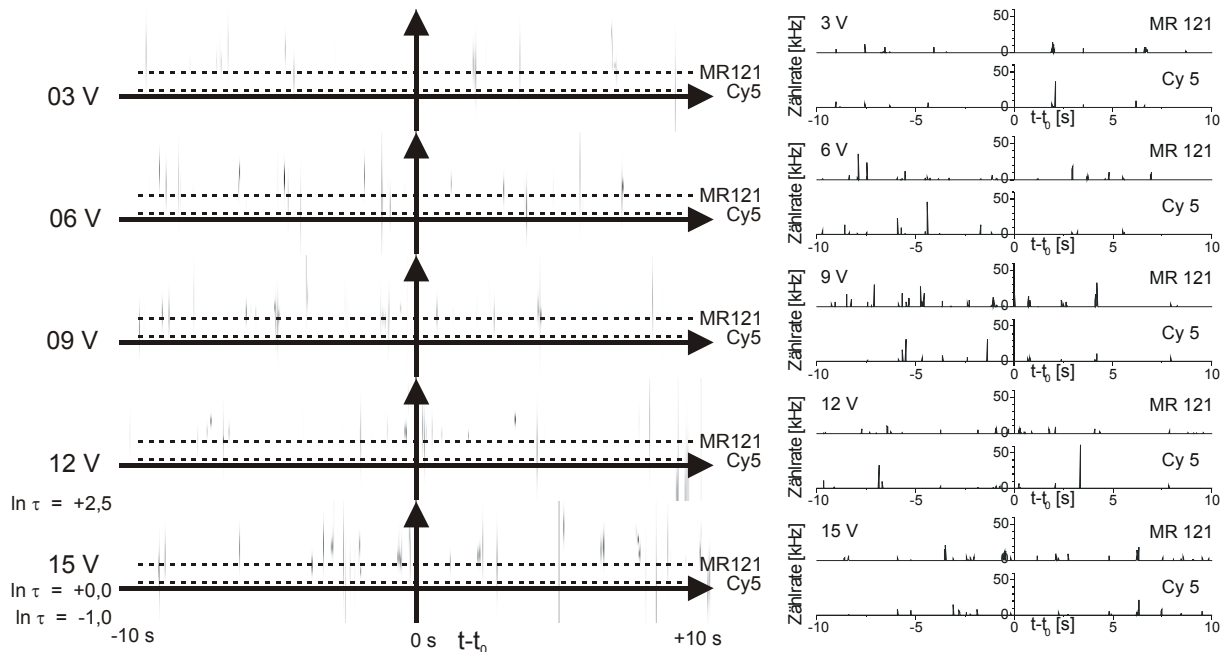


Abbildung 4.5.6-5 Aus der Ereignisliste gebildete 2d-Spur

Links: nach Gl. 4.5.6-2 errechnete 2d-Spur. Als Abszisse dient der Abstand des Ereignisses vom Umpolzeitpunkt t_0 , als Ordinate der \ln der ermittelten Fluoreszenzabklingdauer. Der Funktionswert (Zählfrequenz) ist in einer Graustufenskala dargestellt: weiß bedeutet 0 kHz, schwarz 70 kHz. Die Ereignisse sind als dunkle Flecken erkennbar.

Rechts: Schnittlinien durch die 2d-Spur ergeben getrennte Spuren für die Farbstoffe.

Für jedes der beiden so erhaltenen Spurenpaare kann nun die Auswertung aus Abschnitt 4.5.1 angewendet werden.

Das Verfahren entspricht dem in Abschnitt 4.5.2 verwendeten, so daß die dort gemachten Erläuterungen hier nicht wiederholt werden. Der Wichtungsterm zur Bereinigung der Fluoreszenzereignislisten von falsch positiven Elementen beträgt $\exp(-\frac{1}{2}((\ln\tau - 0,28)/\Delta\ln\tau)^2)$ für die Cy5-Liste und $\exp(-\frac{1}{2}((\ln\tau - 0,84)/\Delta\ln\tau)^2)$ für die Mr121-Liste wobei τ die vom MLE-Schätzer ermittelte Fluoreszenzabklingdauer in ns ist. Tabelle 4.5.6-4 gibt die Ergebnisse wieder:

P	U [V]	Farbstoff	N ₁	N ₂	Paare		Überlappzeit [s]	Umpolzeit [s]	Korrelationszeit θ_{\max} [s]	Streckfaktor S_{\max}	G _{Norm} (θ_{\max} , S_{\max})	
					beob.	Montecarlo						
						λ						W _{zuf} [%]
47 μ W	3	Cy5	102	150	22	11,05 \pm 3,08	9,7E-1*	26,6	58,4	-16,238	0,554	0,310
		Mr121	179	114	30	16,51 \pm 3,60	6,1E-1*	33,5	58,4	-7,187	0,670	0,205
	6	Cy5	134	109	13	8,38 \pm 2,63	20,9	43,3	61,3	-6,680	1,136	0,146
		Mr121	68	123	12	6,52 \pm 2,41	11,0	27,8	61,3	-11,347	0,557	0,206
	9	Cy5	121	139	9	6,55 \pm 2,40	48,3	34,5	59,7	-15,523	0,695	0,248
		Mr121	140	125	21	8,40 \pm 2,72	1,1E-1*	41,5	59,7	-8,522	0,966	0,158
	12	Cy5	117	125	16	6,00 \pm 2,33	3,6E-1*	39,9	57,0	-10,142	0,871	0,196
		Mr121	56	111	15	5,12 \pm 2,14	2,5E-1*	24,6	57,0	1,762	0,528	0,141
15	Cy5	201	261	56	31,72 \pm 4,97	2,0E-2*	27,3	60,8	-14,636	0,545	0,200	
	Mr121	160	245	47	26,94 \pm 4,66	9,0E-2*	21,2	60,8	3,566	0,506	0,257	
175 μ W	3	Cy5	70	74	4	1,78 \pm 1,28	54,0	33,5	60,2	-15,035	0,670	0,190
		Mr121	96	127	14	5,96 \pm 2,31	1,4	25,2	60,2	-14,642	0,504	0,331
	6	Cy5	104	105	8	4,17 \pm 1,96	23,7	32,9	55,5	-17,110	0,848	0,083
		Mr121	199	136	20	11,47 \pm 3,15	3,5	30,5	55,5	-19,489	1,170	0,173
	9	Cy5	91	144	14	6,27 \pm 2,36	1,8	31,1	58,5	-11,973	0,621	0,107
		Mr121	160	190	21	14,97 \pm 3,52	15,8	40,8	58,5	-4,054	0,816	0,183
	12	Cy5	126	96	14	4,61 \pm 2,10	2,9E-1*	36,1	64,4	-13,904	1,003	0,135
		Mr121	203	127	31	11,32 \pm 3,12	7,9E-4*	32,8	64,4	-17,239	1,146	0,053
15	Cy5	113	144	6	4,92 \pm 2,12	73,1	34,4	57,6	-1,128	0,675	0,103	
	Mr121	125	155	4	8,62 \pm 2,74	100,0	30,3	57,6	-19,712	0,614	0,081	
272 μ W *	3	Cy5	10	7	2	0,04 \pm 0,21	100,0	32,0	59,5	-4,292	0,696	0,346
		Mr121	24	27	3	0,48 \pm 0,69	38,3	24,4	59,5	-13,553	0,530	0,445
	6	Cy5	17	25	3	0,32 \pm 0,56	28,1	27,8	60,5	-16,397	0,580	0,481
		Mr121	26	33	4	0,65 \pm 0,79	13,1	25,6	60,5	-17,232	0,534	0,314
	9	Cy5	99	44	4	2,18 \pm 1,42	64,9	25,9	59,5	-18,934	0,517	0,163
		Mr121	198	38	10	4,92 \pm 2,05	10,9	31,8	59,5	-18,233	1,119	0,078
	12	Cy5	253	101	26	15,59 \pm 3,57	1,6	35,0	60,0	-15,035	1,480	0,074
		Mr121	346	162	49	33,14 \pm 4,89	1,3*	32,7	60,0	-17,337	1,067	0,117
15	Cy5	242	314	57	34,78 \pm 5,28	9,3E-2*	29,6	65,6	-9,182	0,605	0,209	
	Mr121	152	219	36	19,47 \pm 4,02	1,8E-1*	28,5	65,6	-7,454	0,570	0,122	
272 μ W b	3	Cy5	81	38	5	1,47 \pm 1,19	18,3	30,1	58,5	-11,846	0,603	0,257
		Mr121	70	48	3	1,88 \pm 1,34	85,8	25,9	58,5	-10,730	0,517	0,219
	6	Cy5	125	69	6	3,78 \pm 1,87	52,8	32,5	58,0	-0,702	0,650	0,163
		Mr121	184	123	22	10,57 \pm 3,01	6,2E-1*	35,3	58,0	-9,695	0,705	0,200
	9	Cy5	194	85	8	6,58 \pm 2,45	64,5	42,0	64,0	-7,980	0,907	0,266
		Mr121	146	123	17	9,13 \pm 2,86	3,8	29,7	64,0	-19,036	0,594	0,184
	12	Cy5	462	40	17	9,22 \pm 2,66	2,6	28,3	58,4	-2,917	0,567	0,138
		Mr121	524	85	29	22,96 \pm 4,05	19,0	31,1	58,4	-18,900	0,635	0,168
15	Cy5	346	320	65	48,92 \pm 5,98	1,4	36,0	61,2	-13,985	0,995	0,087	
	Mr121	347	257	73	47,19 \pm 5,82	3,0E-03*	34,2	61,2	-15,757	1,269	0,070	
471 μ W	3	Cy5	74	18	3	0,46 \pm 0,67	37,6	33,5	64,0	-5,768	0,669	0,324
		Mr121	50	23	2	0,48 \pm 0,67	100,0	30,3	64,0	-19,702	0,744	0,440
	6	Cy5	53	28	4	0,49 \pm 0,69	8,6	37,7	63,0	-1,154	0,754	0,233
		Mr121	50	44	3	0,75 \pm 0,85	53,8	43,5	63,0	-3,002	0,869	0,269
	9	Cy5	112	80	12	3,50 \pm 1,78	3,3E-1*	30,4	58,0	-18,619	0,607	0,226
		Mr121	160	130	22	11,07 \pm 3,11	9,9E-1*	31,6	58,0	-17,378	0,910	0,126
	12	Cy5	141	122	10	6,75 \pm 2,44	36,2	30,2	61,0	-19,803	0,832	0,157
		Mr121	211	107	18	9,77 \pm 2,91	3,1	30,3	61,0	-19,730	1,127	0,302
15	Cy5	135	176	20	11,05 \pm 3,11	2,1	32,8	62,0	-6,381	0,655	0,173	
	Mr121	155	155	16	9,35 \pm 2,85	7,8	32,7	62,0	-17,263	0,698	0,108	
682 μ W	3	Cy5	29	28	4	0,33 \pm 0,56	3,8	25,4	57,8	-19,804	0,508	0,334
		Mr121	34	49	7	0,62 \pm 0,78	4,7E-2*	27,2	57,8	-19,575	0,554	0,224
	6	Cy5	153	114	11	6,78 \pm 2,48	23,7	36,9	60,3	-13,064	0,816	0,146
		Mr121	214	224	22	14,60 \pm 3,57	8,8	40,4	60,3	-7,590	0,864	0,118
9	Cy5	179	231	24	16,47 \pm 3,69	8,8	33,4	58,3	-5,068	0,668	0,156	
	Mr121	274	231	35	23,75 \pm 4,45	2,6	31,6	58,3	-17,387	0,757	0,147	

Anregungsleistung [μW]	Elektrodenspannung [V]	Cy5		Mr121		$\theta_{\text{max,Cy5}}$ [s ⁻¹]	$\theta_{\text{max,Mr121}}$ [s ⁻¹]	$(\theta_{\text{max,Cy5}} - \theta_{\text{max,Mr121}})^2$ [s ⁻²]	Versuchsnummer	$\theta_{\text{max,Cy5}}$ [s ⁻¹]	$\theta_{\text{max,Mr121}}$ [s ⁻¹]	$(\theta_{\text{max,Cy5}} - \theta_{\text{max,Mr121}})^2$ [s ⁻²]	
		Wert	Standardabweichung	Wert	Standardabweichung								
682 μW	12	Cy5	477	341	113	70,74±7,09	9,9E-7*	30,7	59,5	-19,284	1,094	0,093	
		Mr121	479	357	110	73,62±7,12	9,5E-5*	33,2	59,5	-16,843	1,036	0,034	
	15	Cy5	172	98	18	6,79±2,53	1,8E-1*	27,1	61,5	-11,109	0,542	0,157	
		Mr121	181	211	33	19,17±4,06	7,9E-1*	28,1	61,5	-12,483	0,563	0,192	
	851 μW	3	Cy5	86	104	11	4,15±1,95	2,3	31,2	60,0	-18,513	0,624	0,233
			Mr121	151	166	16	10,92±3,10	19,2	38,1	60,0	-11,945	0,869	0,150
6		Cy5	142	64	9	4,49±1,99	15,7	33,3	58,0	-3,193	0,667	0,105	
		Mr121	203	90	19	7,60±2,59	2,2E-1*	37,4	58,0	-2,040	0,748	0,117	
9		Cy5	400	55	15	7,55±2,52	3,1	36,1	59,6	-9,282	0,721	0,123	
		Mr121	379	95	17	14,57±3,43	49,1	34,9	59,6	-0,350	0,697	0,137	
12		Cy5	441	18	6	2,66±1,52	26,9	34,1	58,5	-15,890	0,889	0,236	
		Mr121	549	30	11	5,63±2,06	8,4	36,1	58,5	-9,519	0,721	0,098	
15		Cy5	419	18	4	2,52±1,45	73,8	33,8	60,4	-10,268	0,675	0,179	
		Mr121	594	32	15	6,50±2,28	1,6	38,1	60,4	-11,922	0,826	0,167	

Tabelle 4.5.6-4 Ergebnisse der Symmetrieparametrisierung nach Abschnitt 4.5.1

Gegenüber einer direkten paarweisen Zuordnung der Ereignislisten hat dieses Verfahren den Vorteil, daß es nicht versagt, sobald in einer der Listen eine Verschiebung durch ein fehlendes oder ein gespaltenes Ereignis auftritt.

Aus einem einzelnen Versuch erhält man zwei optimale Verschiebungen der Spuren gegeneinander, $\theta_{\text{max,Cy5}}$ und $\theta_{\text{max,Mr121}}$. Man sollte erwarten, daß diese gleich sind. Für die Streckfaktoren gilt dies wegen der unterschiedlichen Ladung (-5 für Cy5-dCTP und -3 für Mr121-dUTP) nicht zwangsläufig. In Abbildung 4.5.6-6 ist das Quadrat der Verschiebungsabweichung auf einer logarithmischen Skala gegen die Versuchsparameter aufgetragen. Man erkennt, daß die Übereinstimmung mit sinkender Elektrodenspannung und zunehmender Anregungsleistung tendenziell besser wird. Ob dies ein physikalischer Effekt ist, sei jedoch dahingestellt: Es könnte ebenso gut sein, daß die Übereinstimmung bei den zuerst durchgeführten Versuchen besser ist als bei den zuletzt durchgeführten.

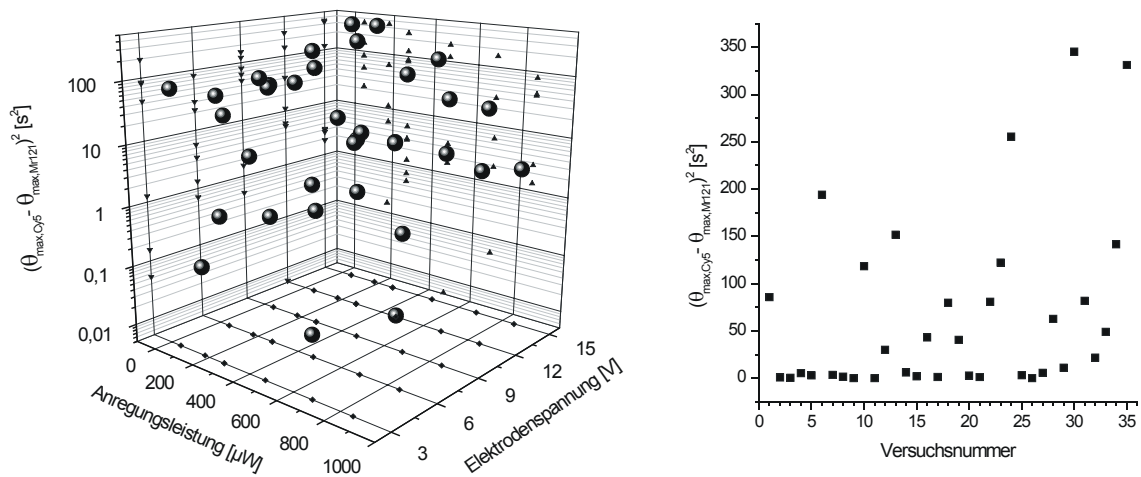


Abbildung 4.5.6-6 Quadrat der Verschiebungsabweichung gegen die Versuchsparameter und gegen die Versuchsnummer aufgetragen

Die Kreuzkorrelationen $\text{Cy5}_{\text{rein}} \otimes \text{Mr121}_{\text{rein}}$ und $\text{Cy5}_{\text{raus}} \otimes \text{Mr121}_{\text{raus}}$ sind ein Maß für die Querempfindlichkeit der Spuren.

4.5.7 PCR - Mischung

Als Farbstofflösung in diesem Unterkapitel dient das Reaktionsprodukt einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR), bei der neben unmarkiertem dCTP und dUTP auch die markierten Triphosphate Cy5-dCTP und Mr121-dUTP als Edukt vorliegen. Das entstehende doppelsträngige Polynucleotid ist 2×1688 Basen lang. Die Einzelstränge enthalten im Mittel etwa 60 Markierungen. Das Verhältnis der Marker Cy5 und Mr121 im Produkt beträgt etwa 1:1 [Sauer 1999]. Das Produkt wird mit einer Kieselgelmembran gereinigt. Die erhaltene doppelsträngige DNS wird 5 Minuten bei 95° denaturiert und anschließend mit Eis abgeschreckt. Im erhaltenen Produkt liegen neben den statistisch markierten Einzelsträngen auch noch markierte wie unmarkierte Mononucleotide vor. Die Experimente wurden bei einer Anregungsleistung, gemessen an der Eintrittspupille des Objektivs, von $361 \mu\text{W}$ durchgeführt. Die Elektroden spannung wurde zwischen 3 und 12 V in Schritten von 3V variiert. Eine Einzelmessung dauerte 204,8 s, wobei die Umpolung nach etwa 50s erfolgte. Damit wurden die Farbstoffionen etwa $3 \times$ länger aus dem Femtotip herausgezogen, als sie vorher hereingezogen wurden.

Das durch zeitaufgelöste Korrelationsspektroskopie ermittelte optimale Zeitfenster umfaßt bei dieser Meßreihe die Kanäle 7-25, das entspricht $0,76 - 4,27$ ns nach dem Maximum des Laserpulses.

Zur Ermittlung der optimalen Fensterbreite zur Glättung wird der Wendepunkt der Korrelationsfunktion gegen den Glättparameter aufgetragen (Abbildung 4.5.1-7, rechts). Dabei zeigt sich ein interessanter Effekt: Bei kleinen Fensterbreiten zeigt die Korrelationsfunktion erwartungsgemäß zwei Wendepunkte, einen, der die Diffusionszeit der Mononucleotide widerspiegelt, und einen für die PCR-Produkte. Erhöht man den Glättparameter, so bleibt der Wendepunkt der PCR-Produkte ($GI=2-3$) zunächst unverändert, während der für die Mononucleotide ansteigt. Ab einem Parameter von 7 (entsprechend $7,5$ ms Fensterbreite) verschmelzen die beiden Wendepunkte, wobei sie sich bereits ab einem Parameter von 4 aufeinander zu bewegen.

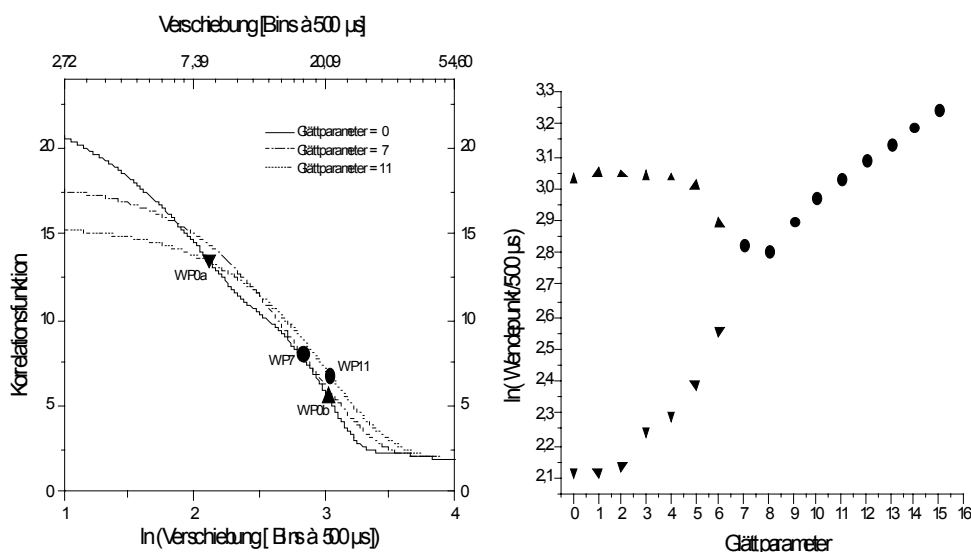


Abbildung 4.5.7-1 Korrelationsfunktion der PCR-Mischung (bei 12 V Elektroden spannung)

Abbildung 4.5.7-2 stellt die ermittelten Wendepunkte der Korrelationsfunktionen der MCS-Spuren beim Experiment mit der PCR-Mischung den Wendepunkten der Korrelationsfunktionen der MCS-Spuren eines Experimentes mit Mononucleotiden (Cy5-dCMP und Mr121-dUMP) gegenüber:

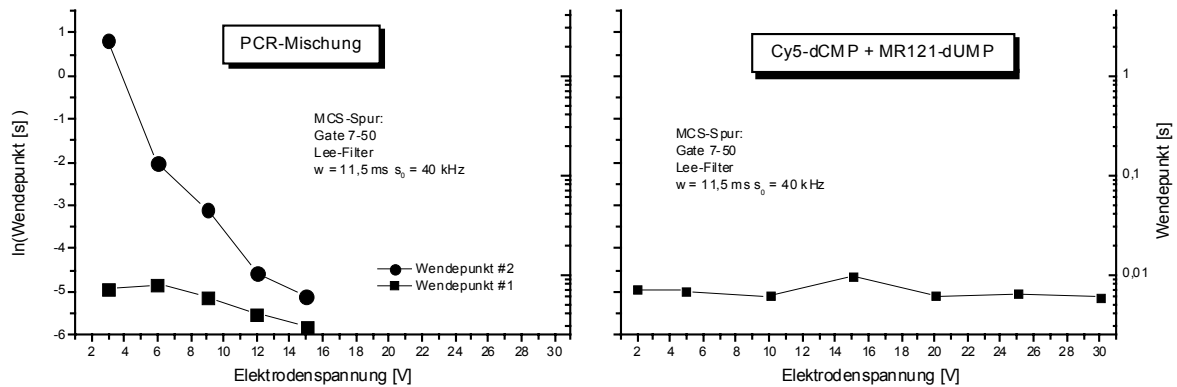


Abbildung 4.5.7-2 Logarithmus des Wendepunktes der Korrelationsfunktion der PCR-Mischung und von Monophosphaten in Abhängigkeit von der Elektrodenspannung.

Obwohl PCR-Produkt und Mononucleotid annähernd gleiche Ladungs-zu-Masse-Verhältnisse aufweisen, reagieren die PCR-Produkte in dem verwendeten Puffer sehr viel empfindlicher auf die angelegte Spannung. (In Abschnitt 4.2 wird der Verlauf der Korrelationsfunktion in Mikrokapillaren sehr viel ausführlicher behandelt.).

Das Glätten der Spur erweist sich im Fall der PCR-Mischung als erheblich schwieriger als bei reinen Mononucleotiden: Für die auf der MCS-Spur schmalen Fluoreszenzereignisse ist eine Fensterbreite von ca. 2,5 ms optimal, für die breiten Ereignisse ein Parameter von ca. 2300 ms bei 3V bis ca. 6ms bei 15 V. Nach mehreren Versuchen ergaben sich folgende Parameter zur Fluoreszenzereigniserkennung:

Gate	Kanal 10-54 von 64 Kanälen	
Erkennungsschwelle	5 kHz	
Startschwelle	1,4 kHz	
Trennschwelle	20%	
Spannung [V]	Lee-Filter	
	Fensterbreite w [ms]	Varianzparameter s_0
3	11,5	50 kHz
6	4,5	80 kHz
9	3,5	100 kHz
12	2,5	∞
15	1,5	∞

Tabelle 4.5.7-1 Parameter zur Fluoreszenzereigniserkennung

Um ein detektiertes Molekül als PCR-Produkt, als Cy5-dCMP oder als Mr121-dUMP zu klassifizieren, betrachtet man zunächst die Ereignisbreite. Liegt sie oberhalb eines

Schwellenwertes, wird das Molekül als PCR-Produkt klassifiziert, liegt sie unterhalb der Schwelle, als Monophosphat. Wurde ein Molekül als Monophosphat klassifiziert, entscheidet sich anhand der Fluoreszenzabklingdauer, ob das Ereignis als Cy5-dCMP oder Mr121-dUMP gewertet wird:

Spannung	PCR	Cy5-dCMP	Mr121-dUMP
3 V	$\ln(W/s) > -4,5$ ($W > 11\text{ms}$)	$\ln(W/s) < -4,5$ ($W < 11\text{ms}$) $\ln(\tau/\text{ns}) < 0,5$ ($\tau < 1,65\text{ns}$)	$\ln(W/s) < -4,5$ ($W < 11\text{ms}$) $\ln(\tau/\text{ns}) > 0,5$ ($\tau > 1,65\text{ns}$)
6 V	$\ln(W/s) > -4,5$ ($W > 11\text{ms}$)	$\ln(W/s) < -4,5$ ($W < 11\text{ms}$) $\ln(\tau/\text{ns}) < 0,5$ ($\tau < 1,65\text{ns}$)	$\ln(W/s) < -4,5$ ($W < 11\text{ms}$) $\ln(\tau/\text{ns}) > 0,5$ ($\tau > 1,65\text{ns}$)
9 V	$\ln(W/s) > -5,0$ ($W > 6,7\text{ms}$)	$\ln(W/s) < -5,0$ ($W < 6,7\text{ms}$) $\ln(\tau/\text{ns}) < 0,5$ ($\tau < 1,65\text{ns}$)	$\ln(W/s) < -5,0$ ($W < 6,7\text{ms}$) $\ln(\tau/\text{ns}) > 0,5$ ($\tau > 1,65\text{ns}$)
12 V	$\ln(W/s) > -5,6$ ($W > 3,7\text{ms}$)	$\ln(W/s) < -5,6$ ($W < 3,7\text{ms}$) $\ln(\tau/\text{ns}) < 0,5$ ($\tau < 1,65\text{ns}$)	$\ln(W/s) < -5,6$ ($W < 3,7\text{ms}$) $\ln(\tau/\text{ns}) > 0,5$ ($\tau > 1,65\text{ns}$)
15 V	$\ln(W/s) > -5,8$ ($W > 3,0\text{ms}$)	$\ln(W/s) < -5,8$ ($W < 3,0\text{ms}$) $\ln(\tau/\text{ns}) < 0,5$ ($\tau < 1,65\text{ns}$)	$\ln(W/s) < -5,8$ ($W < 3,0\text{ms}$) $\ln(\tau/\text{ns}) > 0,5$ ($\tau > 1,65\text{ns}$)

Tabelle 4.5.7-2 Klassifikation der Fluoreszenzereignisse anhand ihrer Standardbreiten W und ihrer Fluoreszenzabklingdauern τ .

Mit Hilfe einer zweidimensionalen Dichteverteilung soll das Verfahren verdeutlicht werden. In der linken Hälfte der Abbildung 4.5.7-3 ist die Verteilungsfunktion für die PCR-Mischung bei 12V gezeigt, in der rechten Hälfte zum Vergleich diejenige für die Monophosphate ohne PCR-Produkt (bei 10V).

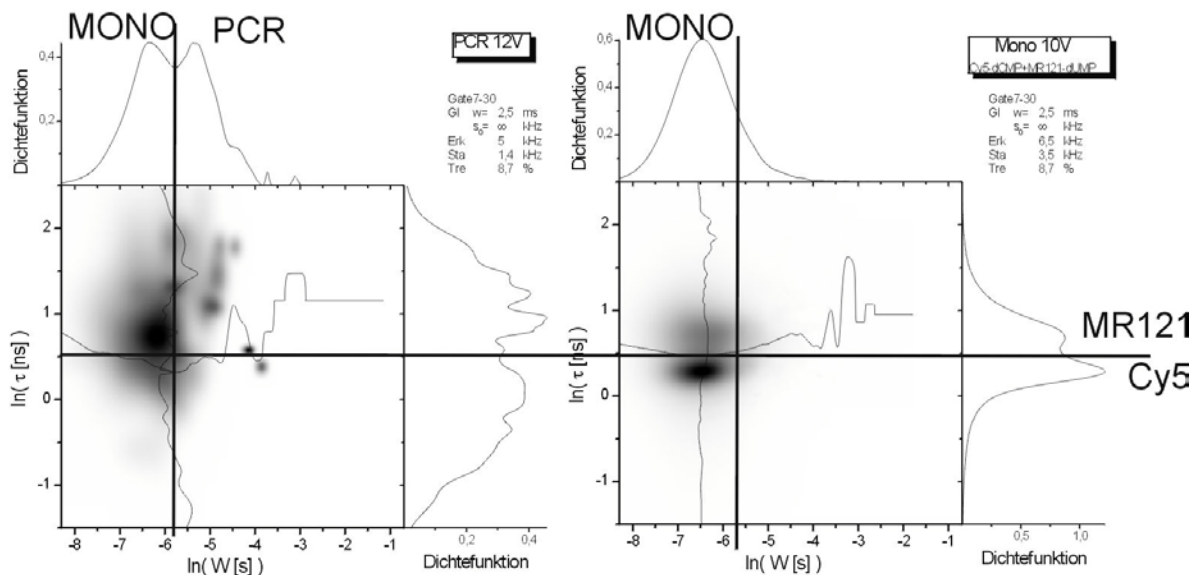


Abbildung 4.5.7-3 Dichteverteilungen der Parameter $\ln(W/s)$ und $\ln(\tau/\text{ns})$

links: PCR-Mischung

rechts: Monophosphate

Aus Abbildung 4.5.7-3 ist zusätzlich zu entnehmen, daß die Fluoreszenzabklingdauer der PCR-Produkte stark schwankt, tendenziell aber eher länger ist als die der Mononucleotide: Da die Farbstoffe in den PCR-Produkten räumlich relativ nahe beieinander sind, läßt sich

das durch Annahme eines Förster-Energietransfers oder von Emissions-Reabsorptions-Prozessen zwanglos erklären.

Die Ergebnisse des Handhabungsversuchs sind in Tabelle 4.5.7-3 zusammengefasst. Bei allen Spannungen außer bei 12 V werden während des Rausziehens viel mehr Ereignisse detektiert als während des Reinziehens.

Spannung [V]		3	6	9	12	15
Umpolzeit [s]		53,4	54,5	52,8	53,2	53,1
rein	alle	22	78	76	129	164
	Cy5-dCMP	4	9	23	45	55
	Mr121-dUMP	13	48	35	29	56
	PCR	4	20	17	54	52
raus	alle	156	660	162	153	699
	Cy5-dCMP	32	323	68	50	303
	Mr121-dUMP	56	227	43	48	153
	PCR	120	305	51	130	243

Tabelle 4.5.7-3 Ergebnis des Handhabungsversuches mit der PCR-Mischung

Die Ergebnisse für 12V sind in Abbildung 4.5.7-4 graphisch aufbereitet:

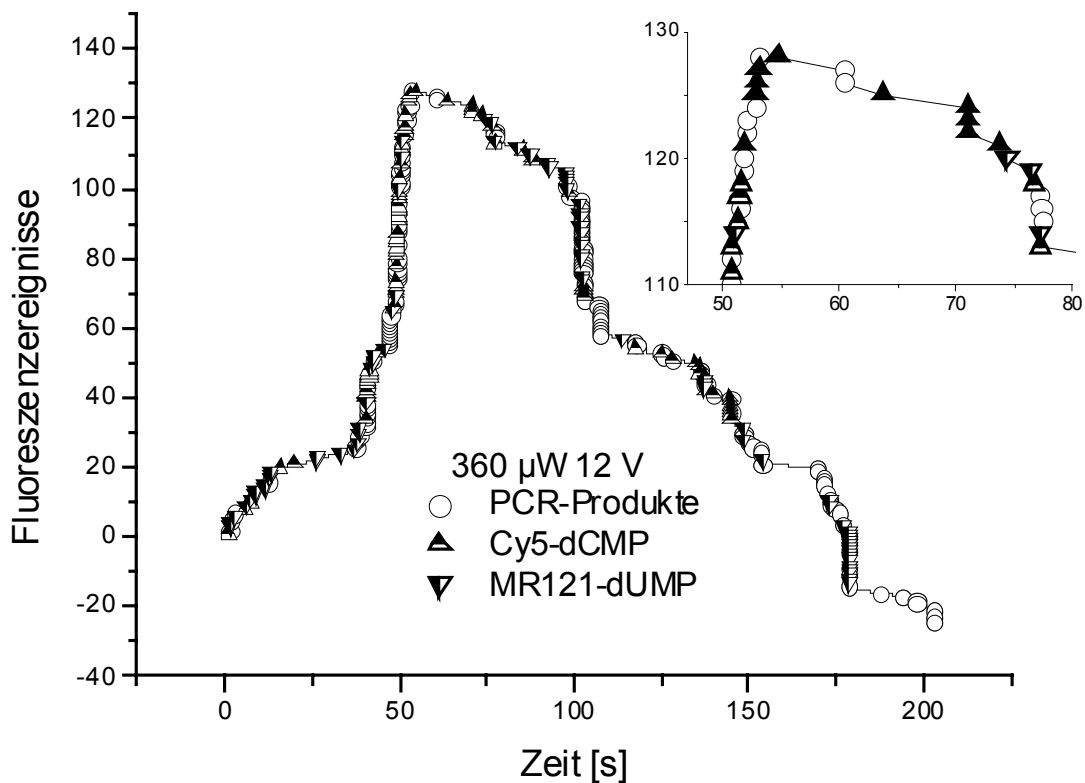


Abbildung 4.5.7-4 Ergebnis des Handhabungsversuchs der PCR-Mischung bei 12V Elektrodenspannung.

4.5.8 Diskussion

Die Handhabungsversuche zeigen einen uneinheitlichen Verlauf. Trägt man die hereingezogenen Ereignisse positiv, die herausgezogenen negativ auf, sollte man eine ansteigende Gerade bis zum Umpolzeitpunkt, dann eine abfallende Gerade bis zur Abszisse und anschließend einen Knick auf eine nur noch leicht fallende Gerade, welche den Untergrund widerspiegelt, beobachten (Abbildung 4.5.8-1 a).

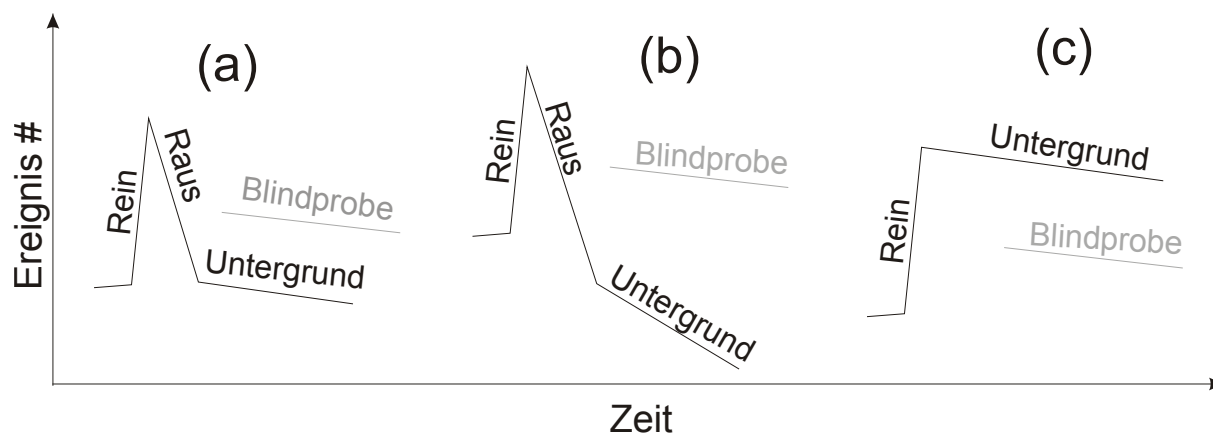


Abbildung 4.5.8-1 Typische Ereignisverläufe von Handhabungsversuchen.

- (a) Erwarteter idealisierter Verlauf: Es werden ungefähr so viele Ereignisse während des Herausziehens detektiert, wie vorher hereingezogen wurden. Die „Raus-“ Kurve zeigt einen deutlichen Knick und wird dann flach.
- (b) Empirisch häufig gefundener Kurvenverlauf: Es werden während des Herausziehens zu viele Ereignisse detektiert. Der Untergrund verläuft zu steil
- (c) Es werden zu wenige oder keine Moleküle herausgezogen.

Tatsächlich findet man diesen idealisierten Kurvenverlauf nur selten; insbesondere fällt die Untergrundgerade oft viel zu steil ab (Abbildung 4.5.8-1 b). In anderen Fällen werden zwar Moleküle in den Femtotip hineingezogen, sie kommen aber nicht wieder heraus (Abbildung 4.5.8-1 c). Diese Beobachtung kann man bei hoher Anregungsleistung damit erklären, daß die Moleküle bereits beim Reinziehen photozerstört werden, in einigen Fällen wurden aber auch bei niedriger Leistung solche Kurven beobachtet.

Der Untergrund steigt mit der Zahl der Versuche, die mit einem gegebenen Paar Femtotips durchgeführt wurden.

In Abschnitt 4.5.4 konnte gezeigt werden, daß aus dem „Gegenfemtotip“ mehr Farbstoff austritt als in den „Femtotip“ hereingezogen wird.

Diese Beobachtungen können durch die Annahme erklärt werden, daß der Ausgang eines Versuches entscheidend von der Stellung von Femtotip und Gegenfemtotip zueinander während des Reinziehens abhängt. Nur wenn beide Kapillaren exakt zueinander justiert sind, findet man den idealisierten Verlauf von Abbildung 4.5.8-1. Schon eine geringfügige, mit dem optischen Mikroskop möglicherweise nicht mehr aufgelöste Verschiebung oder ein zu großer Abstand zwischen den Mikrokapillaren führt dazu, daß ein erheblicher Teil des aus dem Gegenfemtotip austretenden Farbstoffs nicht in den Femtotip gezogen wird, sondern das

Glycerin verunreinigt. Da, wie in Abschnitt 4.2 („FCS in Femtotips“) gezeigt werden konnte, die (x-z) Ausdehnung des Detektionsvolumens die des Kapillarinndurchmessers übertrifft und die Wandstärke der Kapillare an der Spitze unbekannt ist, muß damit gerechnet werden, daß Teile des Detektionsvolumens auch das Glycerin erfassen und sich die Verunreinigung desselben mithin störend bemerkbar macht.

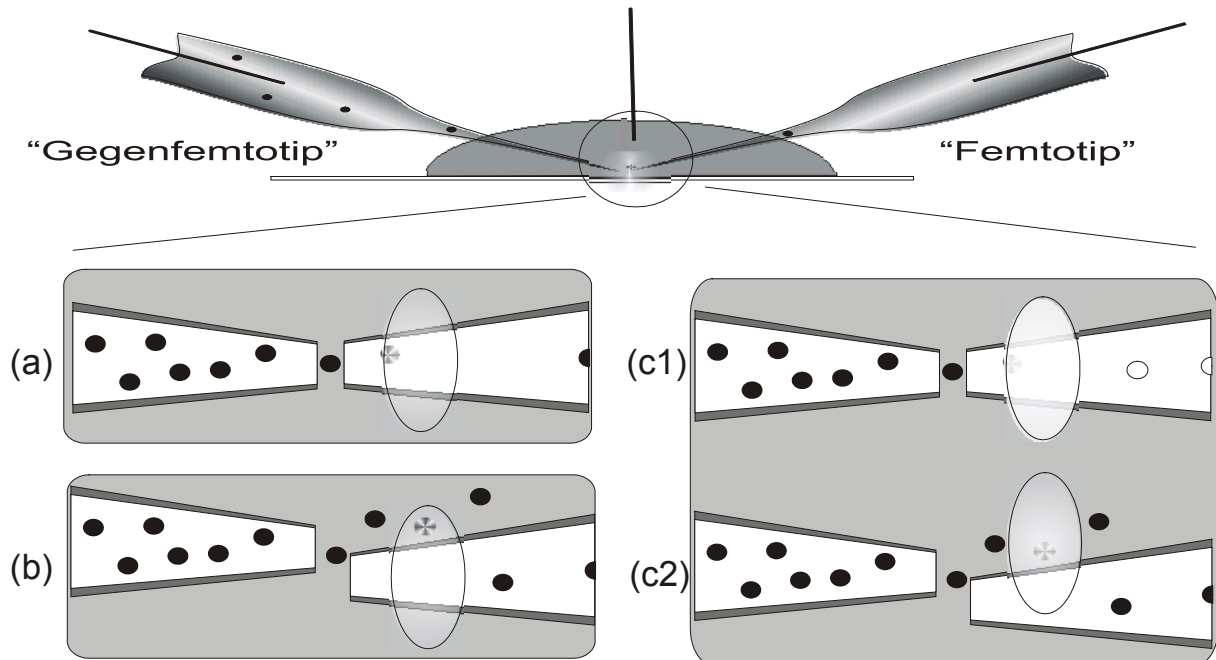


Abbildung 4.5.8-2 Erklärungsversuche

(a) Optimal justierte Kapillaren ergeben das erwartete Ergebnis

(b) Ein dejustierter „Gegenfemtotip“ verunreinigt das Glycerin; Moleküle in der Umgebung der Kapillaröffnung werden mit erfaßt.

(c1) Die Moleküle werden bei hoher Anregungsleistung bereits beim Hereinziehen Photozerstört.

(c2) Der „Femtotip“ ist gegenüber dem Detektionsvolumen dejustiert. Während des Hereinziehens tritt ein großer Überschuß an Molekülen aus dem „Gegenfemtotip“ aus. Beim Herausziehen wird der Gegenfemtotip entfernt, daher sinkt die Farbstoffkonzentration insgesamt. Die aus dem „Femtotip“ austretenden Moleküle werden wegen der Dejustierung nur unvollständig erfaßt.

Auch wenn man in jedem Fall eine starke Spannungsabhängigkeit der Ereignisfrequenz feststellt, muß das nicht gegen diese Erklärung sprechen: Bei angelegter Spannung sind am Ausgang des Femtotips Schlieren beobachtbar. Die Ursache für diese Schlierenbildung ist in einer lokalen Änderung des Brechungsindex zu sehen. Mögliche Ursachen hierfür sind (a) eine Änderung der Zusammensetzung (also austretender Puffer), (b) eine lokale Kompression des Glycerins (hierfür wären allerdings sehr hohe Drücke notwendig) oder (c) eine lokale Erwärmung des Glycerins (in der Folge dehnt sich dieses aus, die Dichte sinkt und der Brechungsindex sinkt ebenfalls). In jedem Fall ergibt sich eine Strömung an der Kapillaröffnung. Durch diese Strömung wird das zähflüssige Glycerin in Bewegung versetzt und man beobachtet allein durch die Bewegung des Lösungsmittels eine erhöhte Ereignisfrequenz.

In Abschnitt 4.2 wurden starke Indizien dafür gefunden, daß, wenn sich die Kathode im Kapillarenraum befindet, durch den elektroosmotischen Fluß oder die Kapillarkraft Glycerin aus dem Kapillaraußenraum in die Kapillare einströmt. Wenn das stimmt, fällt

Erklärung (a) aus, denn es fällt schwer, sich vorzustellen, wie durch eine $0,2 \mu\text{m}^2$ große Öffnung gleichzeitig Puffer aus der Kapillare fließt und Glycerin hineinströmt. Bleibt Erklärung (c): Das Glycerin erwärmt sich vor der Kapillaröffnung lokal. Das erwärmte Glycerin hat eine verminderte Viskosität und trägt daher in größerem Umfang zum in die Kapillare gerichteten Glycerinfluß bei. Durch die Reibung der Strömung an ihren zähen Randbereichen erwärmt sich das Glycerin innerhalb der Strömung weiter und stabilisiert so die Bildung von Domänen mit erhöhter Temperatur. Die beobachteten Schlieren entsprechen diesen Domänen und nicht etwa ausströmendem Puffer.

Diese Domänen könnten für die Handhabungsversuche sehr nützlich sein: Wenn sich während des Hereinziehens zwischen dem farbstoffgefüllten Gegenfemtotip und dem „leeren“ Femtotip eine solche Domäne erhöhter Leitfähigkeit ausbildet, könnte diese als Schlauch wirken, der die beiden Mikrokapillaren miteinander verbindet und so Farbstoffverluste an das Glycerin vermindert. Bei Raumtemperatur konnte die Ausbildung eines solchen Schlauches jedoch leider nicht beobachtet werden. Bei einem Experiment mit einem defokussierten Laser und einer ca. 10^{-6} M Lösung von Cy5-dCTP im „Gegenfemtotip“ bestätigte sich vielmehr das Bild, wonach aus dem Gegenfemtotip eine Farbstoffwolke austritt, aus der ein dünner Strahl in den Femtotip gesaugt wird (Abbildung 4.5.8-3). Möglicherweise ließe sich das bei tiefer Temperatur ändern, da die Viskosität des Glycerins dann zunimmt.

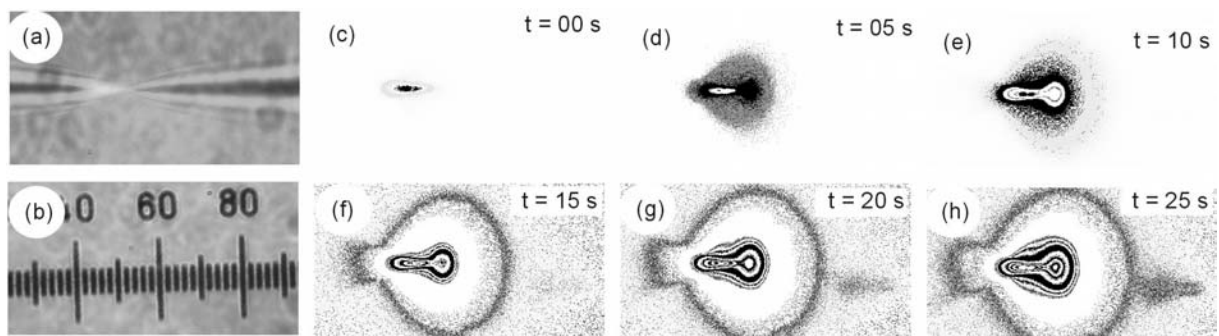


Abbildung 4.5.8-3 CCD-Aufnahmen eines Femtotip-Paares. Der „Gegenfemtotip“ (links) ist mit 10^{-6} M Cy5-dCTP, der „Femtotip“ (rechts) mit reinem Puffer gefüllt. Die Vergrößerung des Objektivs beträgt $100 \times$. Der Anregungslaser wurde für die Aufnahmen defokussiert.

(a) Aufnahme vor dem Anlegen der Spannung. Außer dem Laser wird auch Durchlicht eingestrahlt, um den ansonsten dunklen „Femtotip“ sichtbar zu machen. Die Spitze des „Gegenfemtotips“ leuchtet aufgrund der fluoreszenzierenden Farbstofflösung.

(b) Maßstabsgetreue Skala (in μm) im Durchlicht.

(c)-(h) Das Durchlicht ist abgeschaltet; man erkennt die Ausbreitung des Farbstoffes beim Reinziehen mit zunehmender Versuchsdauer bei angelegter Spannung. (Femtotip = +3V, Gegenfemtotip = Kathode, Außenelektrode ist nicht verbunden.)

Um die Frage zu beantworten, ob die Spur beim Reinziehen mit der Spur beim Rausziehen korreliert ist, wurde in Abschnitt 4.5.1 die Kreuzkorrelationsfunktion so modifiziert, daß etwaige Korrelationen auch dann aufzufinden sind, wenn sich die Zeitskalen der beiden Spuren unterscheiden. Die gefundenen Korrelationsmaxima sind allerdings nicht sehr ausgeprägt. Montecarlo-Simulationen konnten jedoch zeigen, daß vor allem bei höheren

Spannungen auf den gemessenen Spuren eine gegenüber unkorrelierten Spuren signifikant erhöhte Wahrscheinlichkeit besteht, gleichzeitig Ereignisse zu finden.

In Abschnitt 4.5.7 wurde eine Mischung aus Cy5-dCTP und Mr121-dUTP untersucht. Es konnte jedoch keine signifikante Korrelation zwischen den Fluoreszenzabklingdauern in den Ereignislisten aufgefunden werden.

Eine Ursache dafür ist sicher in der Unsicherheit der Ereignispaarzuordnung zu sehen.

Selbst wenn die Ereignislisten exakt gepaart wären, kann aufgrund der unvollständigen Trennung der Fluoreszenzabklingdauern im Abklingdauerhistogramm keine perfekte Korrelation erwartet werden:

Ist das Abklingdauerhistogramm der Mischung durch eine Summe von zwei Gaußkurven beschreibbar,

$$h(\ln \tau) = A \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma_{Cy}} e^{-\frac{1}{2}\left(\frac{\ln \tau - \mu_{Cy}}{\sigma_{Cy}}\right)^2} + (1-A)A \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma_{C_{Mr}}} e^{-\frac{1}{2}\left(\frac{\ln \tau - \mu_{Mr}}{\sigma_{Mr}}\right)^2} \quad (4.5.8-1)$$

so erhält man bei perfekter Korrelation der Ereignislisten, also dann, wenn jedem Cy5 ein Cy5 und jedem Mr121 ein Mr121 zugeordnet wird, als Korrelationskoeffizient

$$\rho_{MAX} = \frac{1}{1 + \frac{A\sigma_{Cy}^2 + (1-A)\sigma_{Mr}^2}{A(1-A)(\mu_{Cy} - \mu_{Mr})^2}} \quad (4.5.8-2)$$

Setzt man $A=0,4$ $\mu_{Cy} = 0,28$ $\sigma_{Cy} = 0,3$ $\mu_{Mr} = 0,84$ $\sigma_{Mr} = 0,4$, so erhält man

$$\rho_{MAX} \approx 0,36.$$

Selbst bei perfekter Korrelation der Ereignislisten, ist aufgrund der Tatsache, daß die Abklingdauerverteilungen von Cy5 und MR121 nicht vollständig getrennt sind, nicht ein Korrelationskoeffizient von 1, sondern einer von nur etwa 0,36 zu erwarten.

In Abschnitt 4.5.7 wurde schließlich gezeigt, daß sich solche Handhabungsversuche auch mit PCR-Produkten durchführen lassen.

4.6 Versuche zur Einzelmolekül-DNS-Sequenzierung

Die Einzelmolekül-DNS-Sequenzierung [Keller 1989], [Jett1989], [Harding 1992], [Ambrose 1993], [Jett 1995], [Sauer 2001], [Werner 2003] stellt eine der zuerst vorgeschlagenen und zugleich anspruchsvollsten Anwendungen der Einzelmolekülspektroskopie dar. Die Schwierigkeit besteht zum einen darin, einen vollständig markierten DNS-Strang zu synthetisieren, zum anderen in der gezielten Selektion eines Einzelstranges und dem 100%-igen Nachweis jedes abgespaltenen Mononucleotids und dessen fehlerfreier Identifizierung. Obwohl für jedes der Teilprobleme inzwischen Lösungen beschrieben sind ([Reha-Krantz 1999 a,b], [Sauer 2001], [Brakmann 2001 a,b], [Brakmann 2002], [Werner 2003], [Dapprich 1999], [Machara 1998], [Demas 1998], [Sauer 1999]) ist es trotz der langen und intensiven Forschungsarbeit bislang keiner der beteiligten Arbeitsgruppen gelungen, eine unbekannte Sequenz mit Hilfe der Einzelmolekülsequenzierung aufzuklären.

4.6.1 Verfahren

Die am 5'-Ende biotinylierte fluoreszenzmarkierte einzelsträngige DNS wird mit Hilfe einer mit Streptavidin beschichteten optischen Faser fixiert.

Das Ziel ist dabei, möglichst nur einen einzelnen Strang zu selektieren. Dazu wurden drei Verfahren erprobt:

1) Die Faser wird in eine hochverdünnte Lösung der markierten DNS eingetaucht. Es sollte mitunter statistisch gelingen, einen einzelnen Strang zu fixieren. Die Faser mit der DNS wird in eine Mikrokapillare überführt. In der Mikrokapillare findet der exonucleolytische Abbau statt, die freigesetzten fluoreszenzmarkierten Mononucleotide werden am Ausgang der Kapillare, wo sich das Detektionsvolumen befindet, nachgewiesen.

2.) Um beim Selektionsprozeß weniger auf den Zufall angewiesen zu sein, war die Idee, die beim Fixieren der DNS stattfindende Massen- und Volumenänderung zu beobachten und nach dem Binden eines Stranges die Faser aus der DNS-Lösung zu entfernen. Die Faser wird anschließend in die Mikrokapillare überführt und der Sequenziersuch durchgeföhrt. Die Faser ist in ein optisches Nahfeldmikroskop eingebaut und wird über eine Piezokeramik zu resonanten Schwingungen angeregt (Vgl. Scherkraftrückkoppelung beim NSOM, Kap. 4.7.1).

Ändert sich die Masse der Spitze, resultiert eine niedrigere Resonanzfrequenz. Dadurch und durch die erhöhte Reibung sollte die beobachtete Schwingungsamplitude beim Binden der DNS sinken (ähnlich wie bei dem von Dapprich beschriebenen Experiment mit einer Mikrokugel in einer optischen Pinzette [Dapprich 1992]). Die Schwingung wird an der hier verwendeten Apparatur durch eine gespaltene Photodiode gemessen, auf die der Schatten der Faser projiziert wird. Die Amplitude kann als Ausgangsspannung an einem Lock-in-Verstärker beobachtet werden (Abbildung 4.6.1-1).

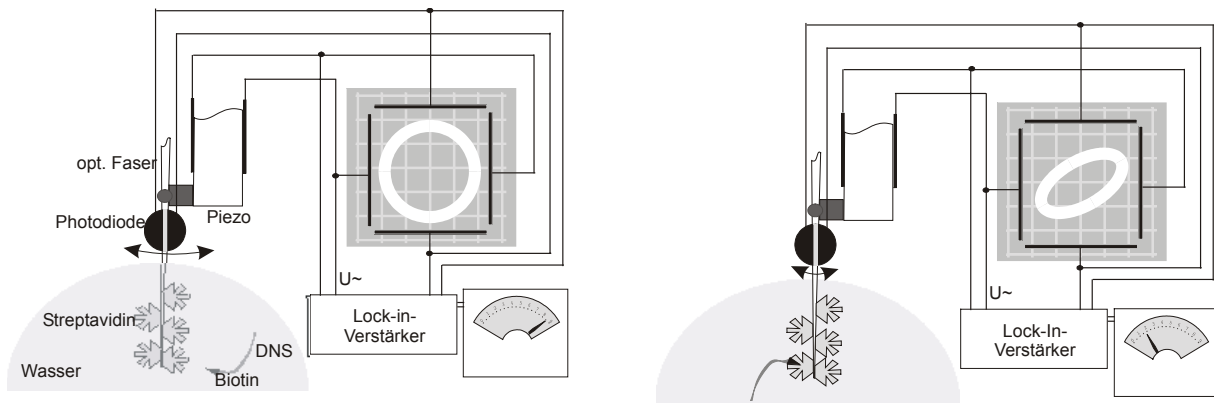


Abbildung 4.6.1-1 Versuch, DNS am Nahfeldmikroskop zu „angeln“.

Durch das Binden der DNS sollte sich die Resonanzfrequenz und die Schwingungsamplitude der vibrierenden Spitze ändern.

3.) Die unbeladene, streptavidinierte Faser wird in die Kapillare eingeführt. Die biotinylierte, fluoreszenzmarkierte DNS wird, wie in Kapitel 4.5, elektrophoretisch in die Kapillare gezogen. Die Anzahl der hereingezogenen Moleküle wird beobachtet. Dabei muß der Anregungslaser soweit abgeschwächt sein, daß die Markierungen nicht photozerstört werden. Die nicht gebundene DNS wird durch Umpolen der Elektroden anschließend wieder entfernt. Die Anzahl gebundener DNS-Stränge ergibt sich aus der Differenz der Anzahl herein- und herausgezogener Stränge. Anschließend wird der Sequenzierversuch durchgeführt (Abbildung 4.6.1-2).

Um die eigentliche Sequenzierung zu starten, wurden zwei Methoden erprobt:

(A) Zur fixierten DNS wird Exonuclease I zusammen mit dem notwendigen Cofaktor Mg^{++} gegeben.

(B) Die Exonuclease befindet sich von vornherein im Puffer. Die Reaktion ist durch EDTA gehemmt [Lee 1999]. Die Sequenzierung wird durch Zugabe eines Mg^{++} -Überschusses gestartet.

Abbildung 4.6.1-2 zeigt die Selektion nach Methode (3) und den Start der Sequenzierreaktion nach Methode (B):

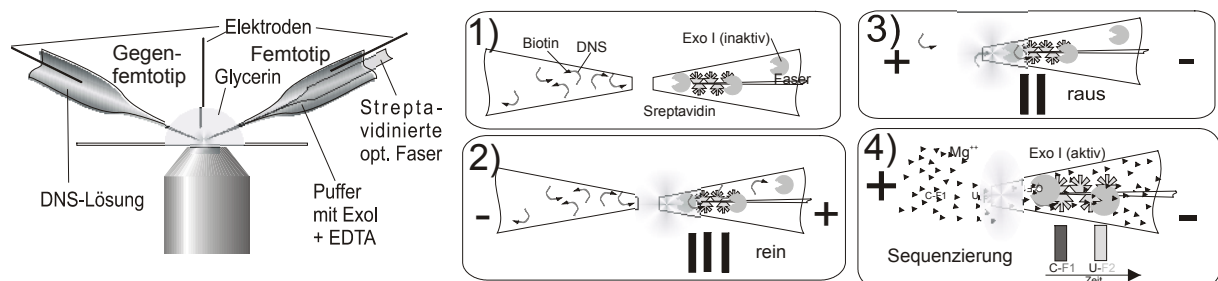


Abbildung 4.6.1-2 Sequenzierversuch mit elektrophoretischer Selektion
links: Versuchsaufbau rechts: Versuchsaufbau (s. Text)

1) Im Gegenfemtropfen befindet sich eine Lösung der fluoreszenzmarkierten, biotinylierten DNS. Im Femtrotip befindet sich Pufferlösung mit (inaktiver) Exonuclease I und EDTA als

Inhibitor. In den Femtotip ist eine streptavidinierte Faser eingeführt, an die DNS über den Biotinrest fixiert wird.

2) Durch Anlegen einer Spannung zwischen Femtotip(+) und Gegenfemtotip(-) wird die negativ geladene DNS aus dem Gegenfemtotip in den Femtotip gezogen. Die Anzahl der hereingezogenen Moleküle wird über eine MCS-Karte in Echtzeit verfolgt. Die Anregungsleistung muß dabei soweit zurückgenommen werden, daß keine Photozerstörung auftritt.

Anschließend wird der Gegenfemtotip entfernt, damit das Glycerin nicht unnötig mit DNS kontaminiert wird.

3) Nicht gebundene DNS und adsorbierte fluoreszenzmarkierte Mononucleotide werden durch Anlegen einer negativen Spannung an den Femtotip gegen die positive Außenelektrode entfernt. Durch Beobachtung der Anzahl herausgezogener DNS-Stränge kann auf die Zahl der gebundenen Stränge zurückgeschlossen werden.

4) Dem Glycerin vor der Kapillaröffnung wird ein großer Überschuß Magnesiumacetat zugegeben. Die Mg^{++} - Ionen werden durch das elektrische Feld in den Femtotip gezogen. Die Magnesiumionen erfüllen innerhalb weniger Sekunden nach Zugabe die ersten 5 mm der Spitze des Femtotips, wie durch einen Vorversuch mit dem Indikator Eriochromschwarz-T gezeigt wurde. Um den Farbumschlag (von blau nach rosa) in der dünnen Spitze beobachten zu können mußten hierzu allerdings viel höhere Konzentrationen (ca. 1M) als im Sequenzversuch eingesetzt werden.

Sobald das EDTA durch das Mg gebunden ist, aktiviert der Überschuß die Exonuclease und die Sequenzierung beginnt. Die freigesetzten fluoreszenzmarkierten Mononucleotide werden am Ausgang der Kapillare nachgewiesen und identifiziert.

4.6.2 Versuche mit einem Modell-Oligonucleotid

```

|<-----Primer----->|
5' -caattctaagcggagatcgccAGGAAGAAGAAAGGAUAGAAGAAAGGAGGAGCAGAGAAAG
   |Biotin(218)           | (197)           |MR121 (181)           |Cy5 (165)
GAAGGAGCAGGAAGAAGAGGAGGUGAGAGAGGAAGAAGAUAGGAAAGGAAAGAGAGCAGAGAAGG
   |Cy5 (149)           |MR121 (133)           |MR121 (117)           |Cy5 (101)
AAAAGGGCGGAGGAAGAGAGGAAUAAAGAAGAAAGAAGAUGGAAAGAGGAAGAGGACAAAGAAAGA
   |Cy5 (85)           |MR121 (69)           |MR121 (53)           |Cy5 (37)
GAGAGCAGAAAGAGAGAGAGGUGAAGA-3'
   |Cy5 (21)           |MR121 (5)

```

Abbildung 4.6.2-1 Modellsequenz

Die oberen Zeilen geben die Sequenz an. Der am 5'-Ende biotinylierte Primer ist durch Kleinbuchstaben gekennzeichnet, die aufgebaute Sequenz durch Großbuchstaben.

Jeder Uracilrest trägt ein Mr121-Molekül, jeder Cytosinrest ein Cy5-Molekül als Marker (untere Zeilen). Die Unterscheidung der Markierungen ist durch ihre unterschiedlichen Fluoreszenzabklingdauern möglich. Die in Klammern angegebenen Zahlen geben die Nummer des Nucleotids an, wenn der Adenosinrest am 3'-Ende die Nummer 1 trägt.

Als Substrat in diesem Abschnitt wurde ein speziell für diese Experimente synthetisiertes 218-mer verwendet. Dadurch wurde sichergestellt, daß die Markierungen weit auseinanderliegen und somit die zur Synthese verwendete Polymerase durch die Marker nicht so sehr gestört wird, daß sie nicht mehr funktioniert.

Die Sequenz ist in Abbildung 4.6.2-1 wiedergegeben. Beim exonucleolytischen Abbau eines Einzelstranges in 3'→5'-Richtung sind demnach 12 Signale in der Sequenz UCCUCCUCCU zu erwarten. Zwischen den markierten Basen liegen jeweils 15 unmarkierte. Sollte Exonuclease I an markierter DNS prozessiv arbeiten (wie an nativer DNS [Brody 1986]) ist zudem zu erwarten, daß die Signale in etwa äquidistant detektiert werden.

Eine optische Faser (SMCA0630B, Laser Comp.) wird mit Dichlormethan von ihrer PMMA-Hülle befreit. Der Mantel (aus einer Glassorte mit niederem Brechungsindex) hat einen Außendurchmesser von etwa 8 µm. Die Faser wird, wie in Abschnitt 3.5 beschrieben, mit Streptavidin beschichtet.

Die Spitze der streptavidinierten Faser wird für kurze Zeit (ca. 30 s) in eine hochverdünnte (ca. 10^{-10} M) DNS-Lösung getaucht. Durch Variation der DNS-Konzentration und der Inkubationszeit kann die Menge der gebundenen DNS beeinflusst werden.

Die mit DNS beladene Faser wird in einen Femtotip überführt. Der Femtotip wird mit einer Elektrode versehen, und adsorbierte DNS sowie anhaftende Mononucleotide werden durch Anlegen einer Spannung entfernt.

Das Faserende befindet sich bei diesen Versuchen relativ weit (ca. 155 µm) vom Ausgang des Femtotips entfernt, damit es mit dem Microloader noch erreichbar ist:

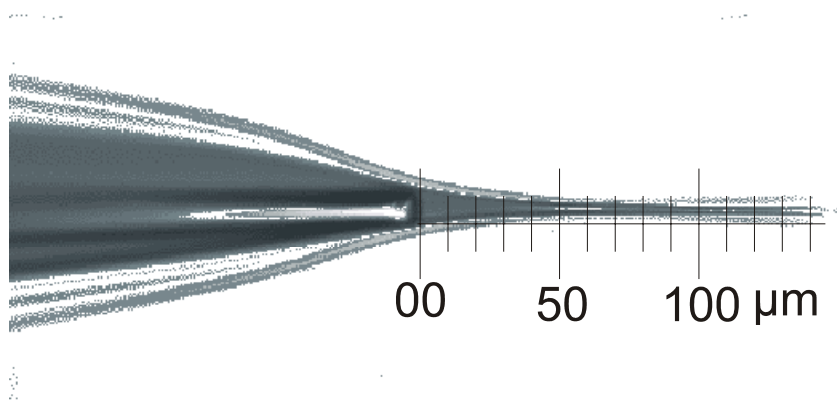


Abbildung 4.6.2-2 CCD-Aufnahme der Faser im Femtotip (10× Objektiv)

Sobald am Ausgang des Femtotips die Ereignisfrequenz auf den zuvor bestimmten Untergrund zurückgegangen ist, wird Exonuclease I in einem Puffer, der 5 mmol/l Mg^{++} -Ionen enthält, über einen „Microloader“ (das ist eine zu einer Kapillare von etwa 10 µm Innendurchmesser ausgezogene Pipettenspitze) zugespritzt. Durch die dabei entstehende Verwirbelung gelangt das Enzym an die an der Faser gebundene DNS.

Die abgespaltenen Mononucleotide werden am Ausgang der Mikrokapillare detektiert.

Die Fluoreszenzereigniserkennung erfolgt mit den in Tabelle 4.6.2-1 angegebenen Parametern.

Die Ereignisfrequenz steigt nach dem Einbau der DNS-beladenen Faser und dem Anlegen von 15 V Spannung an die Elektroden auf ca. 3 Ereignisse pro Sekunde an. Zwei Stunden später ist die Ereignisfrequenz auf im Mittel 0,7 Ereignisse pro Sekunde abgefallen. Nach dem Zuspritzen von 5 µl der mit 5 mM $MgCl_2$ aktivierten Exonuclease (entspr. einer Aktivität

von 10 U) steigt die Ereignisfrequenz auf etwa 2 Ereignisse pro Sekunde an (Abbildung 4.6.2-4 links). In den nächsten 1024 s werden 2103 Ereignisse detektiert.

Gate	Kanal 8-60 von 64 Kanälen		
Filter	Filterbreite	W	4,5 ms
	Lee-Frequenz	S_0	80 kHz
Schwellen	Erkennungsschwelle		14 kHz
	Startschwelle		5 kHz
	Trennschwelle		30 %

Tabelle 4.6.2-1 Parameter zur Fluoreszenzereigniserkennung.

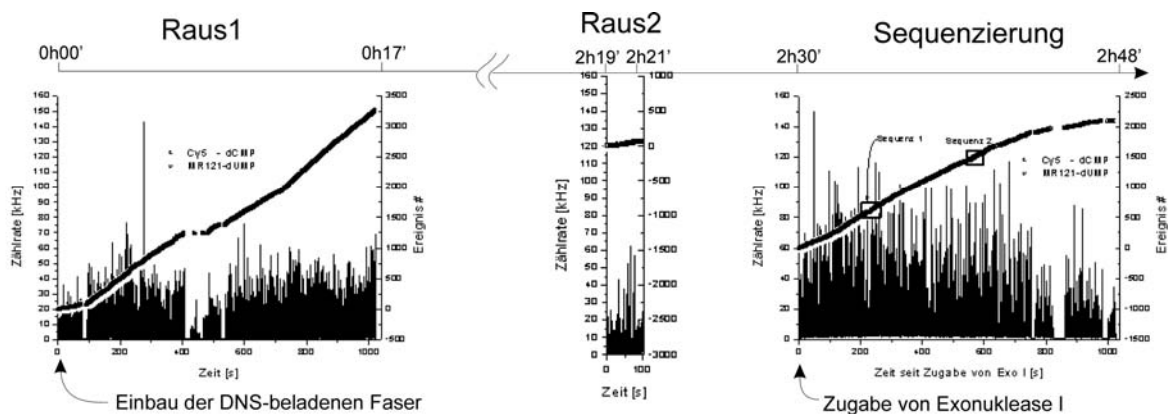


Abbildung 4.6.2-3 geglättete MGS-Spuren und erkannte Ereignisse.

Während der „Sequenzierung“ wurde die erwartete Reihenfolge $UCCUCCUCCU$ zweimal gefunden („Sequenz 1“ und „Sequenz 2“). Die beiden Abschnitte sind in Abbildung 4.6.2-5 vergrößert dargestellt.

Ereignisse mit einer Fluoreszenzabklingdauer von weniger als 1,477 ns ($\Leftrightarrow \ln\tau < 0,39$, dem Schnittpunkt der Lorentzkurven für Cy5 und MR121) werden als Cy5-dCMP klassifiziert, solche mit einer längeren Abklingdauer als Mr121-dUTP. Der dritte Puls in der rechten Hälfte von Abbildung 4.6.2-4 ist wahrscheinlich auf eine in Spuren vorhandene Verunreinigung des Puffers mit einem Fluoreszenzfarbstoff, dessen Abklingdauer etwa 3,5 ns beträgt (möglicherweise Ja133) zurückzuführen. Man erhält durch Auswertung der Integrale über die Lorentzkurven die Fehlklassifizierungswahrscheinlichkeiten. Die Wahrscheinlichkeit, ein Cy5-dCMP irrtümlich als Mr121-dUMP zu klassifizieren, liegt bei 21,6 %; die Wahrscheinlichkeit, ein Mr121-dUMP irrtümlich als Cy5-dCMP zu klassifizieren, liegt bei 23,7 %.

Etwa 800 s nach Zugabe der Exonuclease fällt die Ereignisfrequenz langsam ab: Die Ereigniskurve im rechten Teil von Abbildung 4.6.2-3 wird flacher. In den darauf folgenden 700 s beträgt sie etwa 1 Ereignis pro Sekunde.

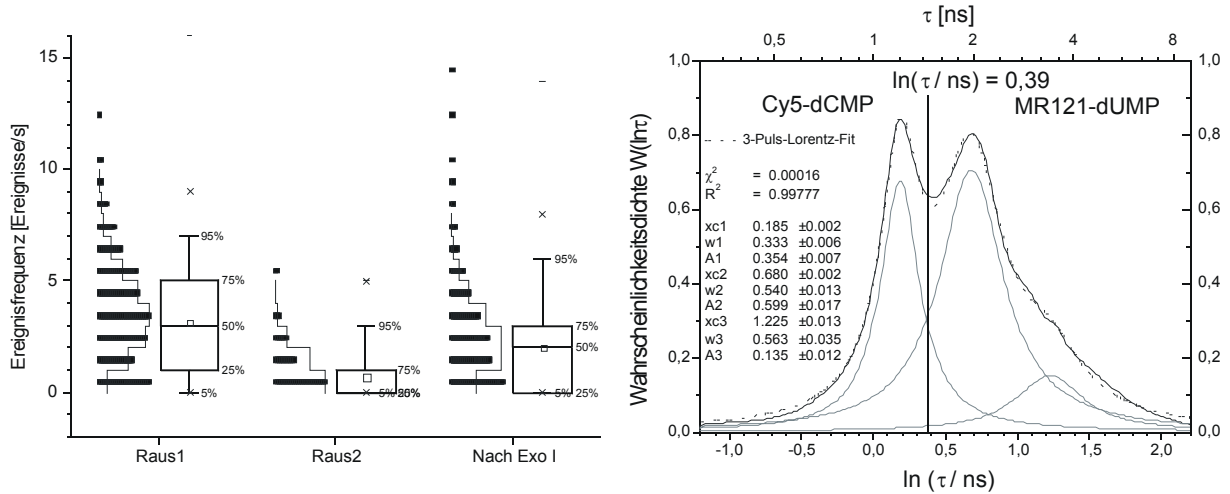


Abbildung 4.6.2-4 Boxdiagramm über die Ereignisfrequenzen (links) und Fluoreszenzabklingdauer-Verteilung während der „Sequenzierung“ (rechts).

Die bisher gezeigten Daten demonstrieren, daß das Verfahren prinzipiell funktioniert: Man kann die biotinylierte DNS mit einer streptavidinierten Faser fixieren, in das Reaktionsgefäß überführen, dort elektrophoretisch von Verunreinigungen befreien und die Sequenzierung durch Zugabe der Exonuclease starten.

Während des Sequenzierlaufs tritt die erwartete Sequenz UCCUCCUCCU zweimal auf: von Ereignis # 575 bis #588 (229,2 s - 230,6 s nach Zugabe der Exonuclease) und von Ereignis #1487 bis 1499 (567,0 s - 571,8 s nach Zugabe der Exonuclease).

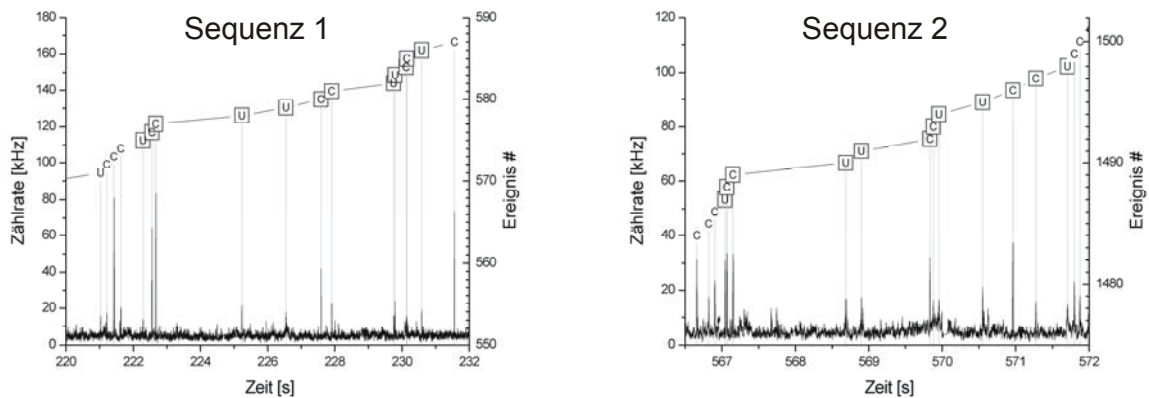


Abbildung 4.6.2-5 Vergrößerte Darstellung der beiden Bereiche, in denen die Sequenz aufgetreten ist.

Verteilungsfunktion der Längen der übereinstimmenden Abschnitte

Eine in der Biologie verwendete Methode, die Ähnlichkeit zweier Sequenzen (A,B) zu untersuchen besteht darin, eine Matrix der folgenden Form zu errechnen: Auf der X-Achse wird Sequenz A aufgetragen auf der Y-Achse Sequenz B. Das Matrixelement $M[x,y]$ erhält den Wert +1, falls $A[x]=B[y]$, sonst erhält es den Wert 0:

$$M[x, y] = \begin{cases} +1 & \text{falls } A[x] = B[y] \\ 0 & \text{falls } A[x] \neq B[y] \end{cases}$$

Stimmen Abschnitte der Sequenzen überein, so ergeben sich 1-er Diagonalen:

SeqA→ SeqB↓	T	T	C	C	T	G	A	C	T	A	G
A	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
A	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
C	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0
C	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0
T	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0
G	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
A	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
C	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0
C	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0
G	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
T	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0
C	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0
G	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1

Abbildung 4.6.2-6 Beispiel zur Erläuterung des Auswerteverfahrens

Geht man den Diagonalen der Matrix entlang, so findet man auf diesen die übereinstimmenden Abschnitte als Bereiche, in denen die 1er aufeinander folgen. Zählt man die Längen aus und histogrammiert diese, so erhält man die Verteilungsfunktion der Länge der übereinstimmenden Abschnitte. Im Beispiel von Abbildung 4.6.2-6 erhält man:

Länge des Abschnitts										
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
21	4	0	0	0	1	0	0	0	0	0

Tabelle 4.6.2-2 Verteilungsfunktion der Längen der übereinstimmenden Abschnitte aus dem Beispiel

Bei den hier vorliegenden Daten wird statt zwischen A,C,G und T jedoch nur zwischen C und U unterschieden, so daß die Matrix nicht 25% 1en und 75% 0en enthält sondern jeweils 50%. Die Diagonalen sind in diesem Fall schwieriger zu finden und es finden sich mehr zufällig übereinstimmende Abschnitte.

Zufall

Die Wahrscheinlichkeit in der Messung mit M Ereignissen „C“ zu finden betrage m_C , die Häufigkeit von „C“ in der Zielsequenz der Länge Z, z_C .

Die Wahrscheinlichkeit, von einem bestimmten Startpunkt der Messung aus zufällig die Sequenz (mit $Z \times z_C$ Cs und $Z \times (1 - z_C)$ Us) zu finden, beträgt dann

$$W_Z = m_C^{Z \cdot z_C} \cdot (1 - m_C)^{Z \cdot (1 - z_C)} = \left[m_C^{z_C} \cdot (1 - m_C)^{(1 - z_C)} \right]^Z$$

oder

$$\ln W_Z = Z \cdot \ln \left[m_C^{z_C} (1 - m_C)^{1 - z_C} \right] \quad (4.6.2-1)$$

Die Verteilungsfunktion der Länge der zufällig übereinstimmenden Abschnitte ist monoexponentiell abfallend.

Der logarithmische Term in Gleichung 4.6.2-1 beschreibt eine Sattelfläche um den Punkt $m_C = z_C = 0,5$. Die Kurve $m_C = z_C$ beschreibt die Ortlinie des Maximums, $m_C + z_C = 1$ die des Minimums.

Eine Messung mit M Ereignissen enthält $M \cdot Z$ mögliche Startpunkte, was näherungsweise gleich M ist, falls $M \gg Z$. Mit $W_Z \ll 1$ ist die Anzahl der Zufallstreffer Poisson-verteilt mit dem Erwartungswert

$$\lambda = M \cdot W_Z.$$

Damit ergibt sich als Wahrscheinlichkeit dafür, in einer Messung von M Ereignissen die Zielsequenz mit Z Ereignissen n – Mal zu finden:

$$W_n = e^{-\lambda} \frac{\lambda^n}{n!}$$

Die Wahrscheinlichkeit, mindestens n „Treffer“ zu erzielen, ergibt sich dann zu

$$W_n^+ = 1 - e^{-\lambda} \sum_{i=0}^{n-1} \frac{\lambda^i}{i!} \quad (4.6.2-2)$$

Die „Sequenzierung“ aus Abb. 4.6.2-3 enthält $M = 2104$ Ereignisse, davon 827 Cs und 1277 Us ($m_C = 0,393$). Die Zielsequenz enthält 12 Ereignisse 6 Cs und 6 Us. Damit ergibt sich $W_Z = 1/5424,6$ und $\lambda = 0,387$ und somit $W_2^+ = W(n \geq 2) = 5,82 \%$.

Da die Wahl der Parameter zur Fluoreszenzereigniserkennung einer gewissen Willkür unterliegt, wurde die Messung auch mit anderen Schwellen ausgewertet. Dabei wurde $w = 2,5; 3,5; 4,5$ und $5,5$ ms mit $s_0 = 20, 30, 50, 80$ kHz sowie $s_0 = \infty$ als Glättparameter kombiniert. Als Erkennungsschwelle (erk) wurde 10, 12, 14 und 16 kHz, als Startschwelle (sta) 5 kHz und 6 kHz sowie als Trennschwelle (tre) 30 bzw. 50% des kleineren Maximums eingesetzt. Tabelle 4.6.2-3 gibt die Ergebnisse der insgesamt 320 Kombinationen wieder.

Die Gesamtzahl der erkannten Ereignisse zeigt das erwartete Verhalten: Sie sinkt mit steigenden Glättparametern w und s_0 , sie sinkt mit zunehmender Erkennungsschwelle und steigt mit zunehmender Start- und Trennschwelle.

Das Verhältnis von C zu U variiert weniger stark als die Gesamtzahl der Ereignisse. Es sinkt mit steigenden Parametern s_0 , erk, sta, tre und steigt mit wachsendem w . Dieses Ergebnis ist

insofern unerwartet, als Cy5 erfahrungsgemäß höhere Fluoreszenzereignisse verursacht, und daher die Anzahl detektierter Cs durch eine steigende Erkennungsschwelle nicht so stark sinken sollte wie die der Us. Da Mr121-dUMP nur ein Drittel der Ladung von Cy5-dCMP aufweist, verursacht es breitere Ereignisse, entsprechend steigt erwartungsgemäß der U-Anteil mit sinkendem w und steigender Trennschwelle, weil dadurch mehr der breiten Ereignisse gespalten werden.

Glätt	Schwellen			Ereignisse	C	U	μ_{int}	Länge des übereinstimmenden Bereiches												W_n^+	R	
	w	S_0	Erk					Sta	Tre	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			11
20	10	5	30	10208	4734	5396	0,46	17355	10474	3562	1378	680	259	105	37	23	4	2	2	69,4	0,94	
			50	11546	5229	6224	0,48	19617	12334	3948	1434	724	308	108	40	26	4	2	1	93,1	0,94	
		6	30	11146	5056	5985	0,47	19053	11498	3872	1474	749	273	98	42	24	4	1	1	92,4	0,94	
			50	11898	5324	6463	0,48	20351	12539	4072	1533	760	297	100	48	25	3	1	1	93,4	0,94	
		12	5	30	5476	2190	3276	0,55	10017	5505	1892	690	354	115	66	23	20	0	2	2	28,2	0,96
				50	6510	2552	3936	0,57	11824	6909	2143	791	396	143	78	22	11	1	1	1	69,8	0,95
	6		30	5758	2257	3490	0,56	10581	5867	1950	725	356	142	57	21	17	2	4	0	100	0,95	
	14	5	30	3813	1451	2359	0,59	7061	3885	1293	490	252	95	28	9	9	1	0	0	100	0,95	
			50	4501	1696	2799	0,60	8330	4774	1451	577	286	88	31	17	11	2	0	0	100	0,95	
			6	30	3907	1465	2438	0,60	7333	3926	1299	497	256	106	41	10	6	1	0	0	100	0,96
		6	30	4501	1680	2815	0,61	8378	4727	1469	556	282	93	42	19	8	2	0	0	100	0,95	
			5	30	3007	1157	1851	0,59	5532	3117	1017	397	199	65	20	9	5	0	0	0	100	0,95
			50	3487	1331	2156	0,60	6406	3756	1121	463	210	62	30	15	4	0	0	0	100	0,95	
	16	5	30	3030	1157	1873	0,59	5628	3080	1045	401	195	72	22	8	3	0	0	0	100	0,95	
			50	3487	1322	2164	0,61	6444	3695	1163	462	200	66	32	12	2	1	0	0	100	0,95	
			6	30	9965	4593	5301	0,46	16967	10275	3472	1316	664	254	105	29	27	9	2	0	100	0,94
		6	50	11241	5056	6101	0,49	19173	11989	3852	1388	730	280	104	35	29	5	3	0	100	0,94	
			30	10899	4913	5884	0,47	18684	11246	3787	1426	745	241	101	42	27	5	3	0	100	0,94	
			50	11601	5157	6337	0,49	19960	12192	3927	1496	764	259	107	46	31	4	4	0	100	0,94	
	30	12	5	30	5271	2091	3171	0,55	9645	5320	1812	663	347	119	56	22	13	3	2	1	62,9	0,96
				50	6249	2428	3801	0,58	11400	6659	1971	767	412	143	61	20	14	2	1	1	67,6	0,95
			6	30	5547	2164	3372	0,56	10173	5699	1854	718	353	131	44	24	14	0	3	0	100	0,95
		14	5	30	6249	2408	3825	0,58	11463	6676	1934	754	423	150	53	21	14	4	4	0	100	0,95
				50	3577	1336	2239	0,60	6621	3675	1235	440	226	88	20	13	11	0	0	1	44,4	0,95
6			30	4225	1560	2661	0,61	7787	4573	1363	504	277	81	30	12	10	2	0	0	100	0,95	
16	5	30	3665	1351	2310	0,60	6869	3704	1245	461	230	102	24	10	11	0	0	0	100	0,96		
		50	4225	1549	2671	0,62	7847	4508	1369	513	266	89	29	14	12	1	0	0	100	0,95		
		6	30	2799	1052	1748	0,59	5226	2807	989	368	172	59	26	11	4	0	0	0	100	0,96	
	6	50	3244	1212	2033	0,61	6014	3446	1065	435	186	62	30	11	2	1	0	0	100	0,95		
		30	2825	1056	1769	0,60	5286	2816	1031	363	166	66	23	9	3	0	0	0	100	0,96		
		50	3244	1205	2039	0,62	6018	3435	1101	431	177	63	24	10	3	1	0	0	100	0,95		
50	10	5	30	9890	4554	5266	0,46	16919	10104	3428	1307	669	273	105	31	27	6	1	0	100	0,95	
			50	11136	5000	6055	0,49	19055	11798	3808	1396	725	298	100	33	28	3	1	0	100	0,94	
		6	30	10816	4875	5839	0,47	18602	11060	3755	1429	730	254	107	38	30	5	3	0	100	0,95	
	12	5	30	11487	5103	6277	0,49	19796	11981	3925	1484	741	270	117	39	30	4	4	0	100	0,94	
			50	5157	2040	3108	0,56	9431	5180	1804	642	344	117	53	18	15	1	2	1	61,9	0,96	
		6	30	6100	2356	3726	0,58	11088	6528	1987	725	391	131	59	20	12	3	2	1	66,3	0,95	
14	5	30	5429	2113	3304	0,56	9987	5502	1856	694	345	131	47	18	14	0	4	1	62,6	0,95		
		50	6100	2341	3742	0,58	11173	6494	1950	727	385	152	55	18	15	1	5	1	65,7	0,95		
		6	30	3487	1296	2189	0,60	6503	3520	1221	428	211	88	25	14	11	1	0	1	43,2	0,96	
	6	50	4098	1496	2598	0,62	7566	4418	1359	486	247	78	27	15	12	2	0	0	100	0,95		
		30	3575	1312	2260	0,60	6753	3550	1235	442	221	95	30	14	12	0	0	0	100	0,96		
		50	4098	1489	2605	0,62	7644	4333	1363	486	247	86	26	20	13	1	0	0	100	0,95		
80	10	5	30	2701	1018	1684	0,59	5076	2649	955	363	187	54	23	8	4	0	0	0	100	0,96	
			50	3113	1153	1961	0,62	5784	3272	1055	411	181	53	31	11	2	0	0	0	100	0,95	
		6	30	2730	1025	1706	0,60	5132	2699	969	351	181	63	23	8	4	0	0	0	100	0,96	
	12	5	30	3113	1152	1962	0,62	5774	3297	1065	403	171	53	30	11	3	1	0	0	100	0,95	
			50	9874	4548	5256	0,46	16893	10072	3430	1310	667	273	103	31	27	6	1	0	100	0,95	
		6	30	11108	4990	6037	0,49	19013	11755	3792	1395	728	299	100	33	27	3	1	0	100	0,94	
14	5	30	10800	4867	5831	0,47	18586	11026	3755	1428	725	254	108	37	32	5	3	0	100	0,95		
		50	11459	5092	6260	0,49	19764	11928	3915	1482	736	274	118	39	29	4	5	0	100	0,94		
		6	30	5139	2031	3099	0,55	9397	5157	1804	644	333	119	54	18	15	1	2	1	61,7	0,96	
	6	50	6069	2342	3709	0,58	11046	6487	1959	644	389	137	59	20	12	3	2	1	66,0	0,95		
		30	5410	2105	3293	0,56	9951	5470	1862	696	338	131	49	17	14	0	3	1	62,4	0,95		
		50	6069	2330	3722	0,58	11121	6441	1946	732	378	155	55	17	15	1	4	1	65,6	0,95		
16	5	30	3472	1293	2177	0,60	6467	3515	1205	425	216	89	24	13	11	1	0	1	43,2	0,96		
		50	4069	1489	2577	0,62	7501	4407	1337	476	252	78	27	15	12	2	0	0	100	0,94		
		6	30	3560	1307	2250	0,60	6729	3535	1219	442	219	99	31	14	11	0	0	0	100	0,96	
	6	50	4069	1481	2585	0,62	7585	4311	1351	478	242	91	27	20	12	1	0	0	100	0,95		
		5	30	2679	1012	1668	0,59	5062	2592	947	360	188	54	22	10	6	0	0	0	100	0,96	
		50	3076	1141	1936	0,61	5742	3200	1035	403	192	53	25	13	5	0	0	0	100	0,95		
16	6	30	2705	1018	1688	0,60	5106	2644	961	351	181	61	20	10	7	0	0	0	100	0,96		
		50	3076	1140	1937	0,62	5736	3214	1053	394	183	52	25	12	6	1	0	0	100	0,95		

2.5	10	5	30	9865	4543	5252	0,46	16875	100 71	3424	1309	660	274	103	32	28	6	1	0	100	0,95		
			50	11102	4986	6035	0,49	18987	11764	3800	1389	725	298	99	33	27	3	1	0	100	0,94		
		6	30	10791	4862	5827	0,47	18574	11021	3741	1427	725	256	108	35	34	5	3	0	100	0,95		
			50	11453	5088	6258	0,49	19744	11928	3925	1477	732	273	118	39	29	4	5	0	100	0,94		
		12	5	30	5129	2025	3095	0,56	9383	5151	1788	645	329	124	54	18	15	1	2	1	61,6	0,96	
				50	6062	2337	3707	0,58	11038	6478	1953	723	390	140	59	19	11	3	2	1	65,9	0,95	
			6	30	5400	2100	3288	0,56	9949	5448	1848	693	344	130	49	19	14	0	3	1	62,3	0,96	
		50	6062	2326	3719	0,58	11125	6413	1944	732	381	158	55	16	14	1	4	1	65,5	0,95			
		14	5	30	3456	1285	2169	0,60	6435	3501	1203	423	214	87	24	13	11	1	0	1	43,0	0,96	
				50	4056	1482	2571	0,62	7471	4399	1339	476	247	77	26	15	12	2	0	0	100	0,94	
			6	30	3544	1300	2241	0,60	6699	3519	1213	438	219	99	31	14	11	0	0	0	100	0,96	
		50	4056	1475	2578	0,62	7565	4290	1349	480	241	90	26	20	12	1	0	0	100	0,95			
	16	5	30	2663	1001	1663	0,60	5038	2583	941	346	188	55	24	10	6	0	0	0	100	0,96		
			50	3060	1131	1930	0,62	5720	3184	1033	389	191	56	26	13	5	0	0	0	100	0,95		
		6	30	2689	1008	1682	0,60	5080	2628	961	339	179	62	22	10	7	0	0	0	100	0,96		
	50	3060	1131	1930	0,62	5720	3185	1053	381	184	55	26	12	6	1	0	0	100	0,95				
	20	10	5	30	6570	2859	3688	0,50	11614	6500	2401	895	393	170	76	27	11	4	0	1	76,6	0,95	
				50	7514	3222	4264	0,52	13234	7754	2653	988	463	170	85	23	8	3	2	2	48,3	0,95	
			6	30	7172	3076	4070	0,51	12710	7222	2529	934	474	183	75	35	5	8	0	0	100	0,95	
				50	7733	3292	4413	0,52	13684	7945	2735	1001	472	190	71	39	6	6	1	1	80,9	0,95	
			12	5	30	4010	1588	2415	0,56	7347	4021	1377	509	262	100	41	17	12	2	0	0	100	0,96
					50	4766	1885	2871	0,58	8703	4951	1583	571	328	113	49	18	9	0	1	0	100	0,95
		6		30	4200	1638	2557	0,57	7825	4155	1427	500	301	104	42	24	13	1	1	0	100	0,96	
		50	4761	1854	2900	0,58	8865	4847	1549	556	345	127	49	19	11	0	0	1	57,8	0,96			
14		5	30	2970	1153	1816	0,58	5486	2962	1043	411	188	64	22	10	8	0	0	0	100	0,96		
			50	3540	1382	2158	0,60	6456	3738	1209	468	218	67	26	10	6	0	0	0	100	0,95		
		6	30	3040	1162	1877	0,59	5638	3070	1043	406	191	64	29	11	8	0	0	0	100	0,96		
50		3537	1360	2176	0,60	6530	3709	1171	468	210	82	28	11	4	2	0	0	0	100	0,95			
16		5	30	2415	983	1432	0,56	4454	2359	825	378	146	53	23	8	3	3	0	0	100	0,96		
			50	2847	1155	1693	0,58	5212	2964	937	384	175	61	22	12	11	1	0	0	100	0,95		
		6	30	2435	982	1453	0,57	4508	2376	859	347	152	62	23	8	3	0	0	0	100	0,96		
50		2844	1141	1704	0,58	5224	2961	953	379	167	73	19	11	6	0	0	0	100	0,95				
30		10	5	30	6314	2714	3580	0,51	11264	6231	2259	839	374	163	87	29	17	5	0	1	74,6	0,96	
				50	7120	3006	4089	0,53	12716	7274	2467	880	449	171	90	25	21	6	2	1	77,8	0,95	
			6	30	6896	2938	3932	0,52	12258	6927	2423	895	434	186	77	33	11	7	0	0	100	0,95	
				50	7343	3090	4225	0,53	13110	7462	2557	945	457	194	71	30	14	7	2	0	100	0,95	
		12	5	30	3748	1449	2294	0,57	6891	3760	1289	486	248	75	40	14	10	4	1	1	48,7	0,96	
				50	4370	1673	2689	0,59	7997	4562	1469	544	285	101	35	12	6	3	1	0	100	0,95	
			6	30	3923	1500	2419	0,58	7257	3927	1375	488	265	71	35	22	11	2	2	1	49,4	0,96	
		50	4370	1652	2712	0,60	8109	4494	1461	527	296	99	29	21	12	2	2	0	100	0,95			
	14	5	30	2728	1050	1679	0,59	5088	2675	951	375	182	60	21	15	5	0	0	0	100	0,96		
			50	3171	1210	1962	0,61	5868	3257	1083	442	202	67	16	9	4	0	0	0	100	0,95		
		6	30	2789	1057	1732	0,60	5250	2729	945	376	192	64	29	14	3	0	0	0	100	0,96		
	50	3171	1191	1980	0,61	5944	3228	1055	433	199	75	21	10	4	2	0	0	0	100	0,96			
16	5	30	2200	892	1309	0,57	4073	2116	768	319	150	42	32	7	2	2	0	0	100	0,96			
		50	2524	1007	1518	0,59	4655	2538	882	347	149	59	25	8	4	1	0	0	100	0,96			
	6	30	2217	886	1331	0,58	4131	2141	776	305	142	54	29	7	3	2	0	0	100	0,96			
50	2524	991	1533	0,60	4691	2552	866	334	148	69	20	8	4	2	0	0	100	0,96					
50	10	5	30	6224	2679	3525	0,51	11146	6078	2223	826	358	175	91	25	22	5	1	1	74,2	0,96		
			50	6966	2936	4007	0,53	12460	7065	2451	856	421	170	98	25	24	4	1	1	76,9	0,95		
		6	30	6817	2903	3891	0,52	12164	6813	2381	887	430	183	84	31	14	5	2	0	100	0,95		
			50	7194	3022	4148	0,53	12872	7287	2513	910	446	192	84	30	16	4	0	0	100	0,95		
	12	5	30	3627	1394	2229	0,57	6695	3621	1259	441	243	85	40	14	11	2	1	1	47,1	0,96		
			50	4181	1583	2592	0,60	7671	4351	1429	510	270	93	33	13	7	2	1	1	50,9	0,95		
		6	30	3804	1446	2356	0,58	7075	3792	1323	459	260	80	34	21	13	1	2	1	47,9	0,96		
	50	4181	1565	2613	0,60	7781	4298	1409	498	268	96	31	21	14	1	2	1	49,9	0,95				
	14	5	30	2613	1000	1614	0,59	4926	2499	905	355	194	58	25	13	3	0	0	0	100	0,96		
			50	2993	1127	1867	0,61	5612	2983	1031	419	204	52	18	13	6	0	0	0	100	0,96		
		6	30	2678	1008	1670	0,60	5100	2559	897	359	190	69	32	11	4	1	0	0	100	0,97		
	50	2993	1109	1884	0,62	5680	2975	989	407	201	65	23	9	7	3	1	0	100	0,96				
16	5	30	2080	842	1239	0,57	3837	1998	750	278	152	44	26	8	0	2	0	0	100	0,96			
		50	2339	923	1417	0,59	4317	2326	846	318	140	56	19	9	1	1	0	0	100	0,96			
	6	30	2102	840	1262	0,58	3937	1979	756	285	144	50	29	7	1	2	0	0	100	0,97			
50	2339	912	1427	0,60	4385	2297	818	320	138	61	23	7	3	2	0	0	100	0,96					
80	10	5	30	6202	2668	3514	0,51	11140	6039	2195	830	353	174	91	26	22	6	4	1	74,0	0,96		
			50	6927	2916	3988	0,53	12422	7001	2427	858	407	177	98	25	23	4	4	1	76,7	0,95		
		6	30	6797	2894	3880	0,52	12164	6775	2351	882	435	185	87	32	14	5	2	0	100	0,95		
			50	7156	3003	4129	0,53	12836	7225	2491	901	441	198	87	30	15	4	1	0	100	0,95		
	12	5	30	3602	1388	2211	0,57	6667	3568	1259	434	243	91	39	13	12	2	1	0	100	0,96		
			50	4137	1567	2565	0,59	7597	4295	1415	504	267	103	31	11	6	2	1	0	100	0,95		
		6	30	3778	1442	2335	0,58	7039	3736	1317	464	263	81	37	19	11	1	2	0	100	0,96		
	50	4137	1551	2584	0,60	7683	4255	1411	484	266	101	30	19	13	1	2	0	100	0,95				
	14	5	30	2576	984	1593	0,59	4860	2457	897	338	193	62	25	12	4	0	0	0	100	0,96		
			50	2937	1102	1836	0,61	5510	2930	1003	408	198	56	20	12	6	0	0	0	100	0,96		
		6	30	2641	993	1648	0,60	5044	2506	883	346	198	68	32	11	4	1	0	0	100	0,97		
	50	2937	1084	1853	0,62	5592	2908	959	392	203	67	25	9	7	3	1	0	100	0,96				

3.5	20	10	5	30	6193	2660	3513	0,51	11126	6034	2185	836	348	174	91	26	21	7	4	1	73,9	0,96			
				50	6921	2913	3985	0,53	12402	7007	2427	855	405	176	98	25	23	4	4	1			76,6	0,95	
			6	30	6788	2887	3878	0,52	12152	6766	2343	883	434	184	88	32	14	5	2	0			100	0,96	
				50	7150	3000	4126	0,53	12816	7227	2495	897	439	197	87	30	15	4	1	0			100	0,95	
			5	30	3591	1379	2209	0,57	6653	3561	1247	437	237	91	38	12	13	3	1	1			46,7	0,96	
				50	4129	1563	2561	0,59	7573	4302	1411	498	269	101	31	11	6	2	1	0			100	0,95	
		6	30	3767	1436	2330	0,58	7019	3730	1309	467	255	81	37	19	13	1	2	0			100	0,96		
			50	4129	1549	2578	0,60	7659	4256	1409	479	266	101	30	19	13	1	2	0			100	0,95		
		5	30	2559	976	1584	0,59	4850	2428	865	343	197	64	25	11	6	0	0	0			100	0,97		
			50	2925	1101	1825	0,61	5490	2912	993	409	200	56	20	12	6	0	0	0			100	0,96		
		6	30	2625	988	1637	0,60	5030	2480	853	352	200	70	34	11	4	1	0	0			100	0,97		
			50	2925	1084	1841	0,62	5568	2885	959	391	202	67	26	9	7	3	1	0			100	0,96		
	5	30	2006	810	1197	0,57	3699	1950	690	268	157	44	24	7	3	0	0	0			100	0,96			
		50	2248	885	1364	0,60	4131	2290	768	299	150	57	20	4	2	0	0	0			100	0,95			
	6	30	2027	809	1218	0,58	3793	1939	706	261	143	54	29	6	2	2	0	0			100	0,96			
		50	2248	874	1374	0,60	4203	2241	762	301	141	60	24	4	3	2	0	0			100	0,96			
	4.5	20	10	5	30	5060	2114	2934	0,52	9256	4895	1743	647	313	156	74	19	18	8	1	0	100	0,96		
					50	5803	2411	3379	0,53	10543	5862	1958	734	351	161	67	30	18	7	0	0			100	0,96
				6	30	5478	2261	3203	0,53	9947	5495	1842	706	348	152	71	21	13	5	0	1			67,1	0,96
					50	5938	2452	3472	0,54	10747	6100	1988	733	385	151	73	21	12	7	0	1			70,1	0,95
				5	30	3311	1295	2014	0,57	6173	3187	1175	424	235	87	27	8	10	1	1	2			12,3	0,96
					50	3931	1548	2380	0,58	7245	4007	1341	497	258	93	35	8	12	2	0	1			51,7	0,95
			6	30	3463	1340	2121	0,58	6471	3401	1179	454	238	78	33	17	9	1	1	1			46,1	0,96	
				50	3923	1531	2390	0,59	7293	3991	1311	495	255	87	41	18	11	1	0	0			100	0,96	
5			30	2556	1016	1540	0,57	4764	2467	891	357	175	60	26	7	7	0	0	0			100	0,96		
			50	3043	1220	1823	0,58	5590	3128	1013	430	202	70	13	7	6	1	1	0			100	0,95		
6			30	2618	1032	1586	0,58	4900	2526	921	362	170	62	24	12	4	0	2	0			100	0,96		
			50	3038	1210	1828	0,59	5598	3115	1049	401	191	72	14	11	6	1	1	0			100	0,95		
5		30	2111	882	1229	0,55	3829	2069	766	308	134	39	26	8	2	0	0	0			100	0,96			
		50	2505	1056	1449	0,55	4481	2606	870	361	145	51	21	6	4	2	0	0			100	0,95			
6		30	2135	889	1247	0,56	3933	2044	770	313	132	49	23	10	3	1	0	0			100	0,96			
		50	2500	1048	1453	0,56	4547	2558	860	339	144	64	26	8	4	2	0	0			100	0,95			
30		10	5	30	4751	1966	2773	0,52	8682	4554	1667	624	315	136	61	13	16	8	0	0			100	0,96	
				50	5344	2194	3136	0,54	9779	5291	1820	672	344	145	74	18	13	9	1	0			100	0,96	
			6	30	5143	2108	3025	0,53	9377	5067	1754	689	334	146	61	18	11	4	0	1			64,4	0,96	
				50	5483	2246	3227	0,54	9969	5538	1872	693	348	143	73	19	9	5	0	1			66,7	0,95	
			5	30	3043	1162	1879	0,57	5713	2903	1071	369	229	85	30	10	8	2	0	0			100	0,96	
				50	3522	1345	2173	0,59	6529	3541	1229	446	232	84	33	7	6	2	0	0			100	0,96	
		6	30	3181	1208	1971	0,59	5963	3099	1079	434	220	76	32	13	5	1	0	0			100	0,96		
			50	3521	1346	2173	0,60	6527	3562	1211	480	225	70	33	11	5	0	0	0			100	0,96		
	5	30	2280	902	1377	0,57	4275	2135	814	308	159	59	29	8	3	0	1	0			100	0,97			
		50	2636	1045	1589	0,58	4861	2636	922	368	162	60	25	5	4	0	1	0			100	0,96			
	6	30	2336	918	1418	0,58	4373	2234	824	313	165	58	25	9	1	1	1	0			100	0,96			
		50	2635	1042	1593	0,59	4865	2660	918	358	166	62	18	9	3	0	1	0			100	0,96			
5	30	1882	777	1105	0,55	3435	1823	686	252	132	40	23	8	1	1	0	0			100	0,96				
	50	2148	887	1261	0,57	3849	2223	780	302	117	43	14	6	5	1	0	0			100	0,95				
6	30	1899	785	1115	0,56	3501	1812	686	266	126	49	23	6	1	1	0	0			100	0,96				
	50	2147	889	1259	0,57	3907	2176	758	303	120	54	20	5	2	2	0	0			100	0,95				
50	10	5	30	4642	1902	2728	0,53	8546	4402	1617	614	310	138	58	19	14	6	0	0			100	0,96		
			50	5120	2059	3047	0,54	9439	5029	1726	651	329	151	65	19	13	7	1	0			100	0,96		
		6	30	5030	2035	2985	0,54	9259	4909	1714	648	328	155	65	20	7	6	0	0			100	0,96		
			50	5261	2108	3143	0,55	9649	5277	1784	655	332	158	64	20	6	6	0	0			100	0,96		
		5	30	2926	1107	1818	0,58	5533	2775	1007	353	230	81	33	10	6	1	2	0			100	0,97		
			50	3296	1226	2067	0,60	6173	3295	1111	407	239	78	33	8	6	1	1	0			100	0,96		
	6	30	3065	1150	1914	0,59	5797	2950	1029	414	220	75	30	12	5	2	2	0			100	0,96			
		50	3296	1223	2072	0,60	6189	3311	1093	432	223	71	35	11	4	3	1	0			100	0,96			
	5	30	2173	854	1318	0,57	4075	2032	788	287	153	53	25	9	3	0	1	1			33,0	0,97			
		50	2420	928	1490	0,59	4511	2406	842	307	163	51	28	9	2	0	1	1			34,5	0,96			
	6	30	2227	870	1357	0,59	4199	2095	794	290	158	60	23	10	2	1	1	0			100	0,97			
		50	2420	928	1492	0,60	4535	2408	828	305	166	57	25	11	2	0	1	0			100	0,96			
5	30	1724	711	1013	0,56	3167	1644	640	216	124	45	22	5	1	0	1	0			100	0,96				
	50	1880	757	1123	0,57	3427	1915	662	233	126	43	21	5	2	0	1	0			100	0,95				
6	30	1738	722	1017	0,57	3213	1625	650	236	114	52	19	4	2	0	1	0			100	0,96				
	50	1880	764	1117	0,58	3465	1864	662	253	110	49	24	4	3	0	1	1			31,0	0,96				
80	10	5	30	4610	1888	2709	0,53	8482	4372	1607	618	304	129	60	20	13	6	1	0			100	0,96		
			50	5087	2045	3027	0,54	9383	4988	1720	639	330	148	67	20	12	7	1	0			100	0,96		
		6	30	5005	2025	2969	0,54	9189	4907	1718	638	323	148	63	22	7	6	1	0			100	0,96		
			50	5227	2094	3122	0,55	9577	5244	1782	642	336	155	63	20	5	6	0	0			100	0,96		
		5	30	2884	1090	1793	0,58	5447	2737	987	357	223	78	31	13	8	0	1	0			100	0,96		
			50	3251	1209	2039	0,60	6103	3223	1103	395	241	76	36	10	5	0	1	0			100	0,96		
	6	30	3029	1136	1892	0,59	5719	2914	1027	414	211	73	28	16	5	1	1	0			100	0,96			
		50	3251	1205	2045	0,60	6119	3227	1097	429	219	72	32	15	3	1	1	0			100	0,96			
	5	30	2104	827	1277	0,58	3939	2007	742	255	152	53	28	9	6	0	0	2			5,8	0,96			
		50	2346	901	1444	0,59	4375	2353	806	27															

4.5	8	10	5	30	4602	1884	2705	0,53	8468	4363	1609	615	302	129	60	20	13	6	1	0	100	0,96	
				50	5076	2040	3021	0,54	9367	4970	1714	645	326	148	67	20	12	7	1	0	100	0,96	
			6	30	4998	2022	2965	0,54	9177	4896	1720	637	321	148	63	22	7	6	1	0	100	0,96	
				50	5215	2089	3115	0,55	9559	5224	1778	644	334	155	63	20	5	6	0	0	100	0,96	
		12	5	30	2873	1086	1786	0,58	5427	2725	981	359	224	78	31	12	7	0	1	0	100	0,97	
				50	3236	1204	2029	0,60	6079	3202	1087	404	242	76	36	9	4	0	1	0	100	0,96	
			6	30	3019	1133	1885	0,59	5701	2904	1015	418	214	73	28	15	4	1	1	0	100	0,96	
				50	3236	1200	2035	0,61	6095	3208	1079	436	222	72	32	14	2	1	1	0	100	0,96	
		14	5	30	2082	820	1263	0,58	3905	1986	734	242	157	56	27	9	5	0	1	1	32,0	0,96	
				50	2318	891	1427	0,60	4337	2320	782	272	168	58	28	10	1	0	1	1	33,4	0,96	
			6	30	2138	840	1299	0,59	4027	2036	736	262	166	61	22	10	4	0	0	1	32,5	0,97	
				50	2318	893	1426	0,60	4357	2303	772	282	172	59	26	10	2	0	0	1	33,6	0,96	
	16	5	30	1658	680	979	0,56	3039	1608	602	200	120	46	20	7	1	0	1	0	100	0,96		
			50	1809	726	1084	0,58	3315	1841	622	211	125	47	23	8	1	0	1	0	100	0,95		
		6	30	1677	691	987	0,57	3095	1596	604	220	115	52	20	4	2	0	1	0	100	0,96		
			50	1809	729	1081	0,59	3335	1809	622	226	115	53	25	6	1	0	1	0	100	0,96		
	20	10	5	30	4229	1745	2476	0,53	7690	4077	1543	538	286	118	41	19	9	2	2	0	100	0,96	
				50	4915	2023	2883	0,54	8931	4903	1728	661	301	122	49	26	8	1	0	0	100	0,96	
				6	30	4580	1827	2744	0,55	8353	4538	1640	589	284	119	52	15	8	3	0	0	100	0,96
					50	5031	2018	3004	0,55	9141	5146	1746	643	301	118	58	22	8	1	1	0	100	0,95
			12	5	30	2901	1143	1757	0,56	5409	2779	1047	359	203	89	19	9	2	0	0	0	100	0,96
					50	3480	1378	2100	0,57	6389	3563	1183	457	233	85	18	7	12	1	0	0	100	0,95
				6	30	3018	1161	1853	0,58	5577	2990	1075	390	188	81	24	7	9	1	0	0	100	0,96
					50	3469	1352	2113	0,58	6371	3586	1165	465	214	84	19	6	14	1	0	0	100	0,95
14			5	30	2294	935	1360	0,56	4304	2179	795	277	164	56	39	15	5	2	0	0	100	0,97	
				50	2763	1136	1627	0,56	5089	2826	874	355	206	72	28	8	8	0	0	0	100	0,96	
			6	30	2341	939	1401	0,57	4357	2247	836	309	166	46	33	10	3	0	0	0	100	0,96	
				50	2755	1116	1638	0,57	5067	2833	906	355	191	67	23	4	9	1	1	0	100	0,95	
16		5	30	1933	812	1122	0,55	3515	1884	718	265	119	38	20	11	5	1	0	0	100	0,96		
			50	2338	987	1352	0,55	4203	2422	820	323	136	52	18	10	4	0	0	0	100	0,95		
		6	30	1950	809	1141	0,56	3565	1872	742	268	124	39	16	10	4	1	0	0	100	0,96		
			50	2333	973	1360	0,56	4199	2417	846	310	122	54	19	8	5	1	0	0	100	0,95		
30		10	5	30	3913	1576	2331	0,54	7214	3742	1367	500	288	117	39	14	7	3	2	0	100	0,96	
				50	4408	1752	2648	0,55	8123	4384	1494	552	304	121	41	18	11	2	2	0	100	0,96	
			6	30	4240	1656	2575	0,56	7821	4156	1494	530	291	114	36	16	10	3	1	0	100	0,96	
				50	4536	1769	2757	0,56	8349	4552	1582	558	298	114	43	18	8	3	1	1	56,1	0,96	
		12	5	30	2624	1021	1603	0,57	4939	2490	897	324	210	78	26	9	6	0	1	0	100	0,97	
				50	3029	1166	1861	0,58	5631	3061	1005	382	213	83	26	8	5	0	1	0	100	0,96	
			6	30	2732	1042	1685	0,58	5089	2643	981	345	186	71	22	11	6	0	1	0	100	0,96	
				50	3028	1155	1867	0,59	5587	3069	1065	384	188	83	19	6	5	0	1	0	100	0,95	
	14	5	30	2023	824	1200	0,56	3805	1850	720	278	143	52	27	14	3	0	1	0	100	0,97		
			50	2340	948	1392	0,57	4363	2278	794	314	153	68	27	9	3	1	1	0	100	0,96		
		6	30	2070	821	1248	0,57	3875	1941	754	280	136	51	26	11	2	0	0	0	100	0,97		
			50	2340	928	1411	0,58	4365	2311	806	312	140	68	23	9	2	1	1	0	100	0,96		
16	5	30	1686	704	983	0,55	3131	1545	638	212	124	43	21	6	5	2	0	0	100	0,97			
		50	1934	804	1131	0,56	3557	1885	710	237	131	44	26	7	3	2	0	0	100	0,96			
	6	30	1700	701	998	0,56	3171	1562	620	223	129	44	19	7	3	1	1	0	100	0,97			
		50	1934	795	1138	0,56	3577	1879	692	260	119	47	22	7	3	1	2	0	100	0,96			
50	10	5	30	3796	1525	2266	0,54	7012	3610	1351	464	278	105	45	18	8	3	1	1	51,9	0,96		
			50	4179	1639	2533	0,56	7717	4140	1410	525	302	107	38	18	10	3	2	0	100	0,96		
		6	30	4120	1605	2505	0,56	7591	4036	1476	498	285	103	42	17	9	1	0	1	52,6	0,96		
			50	4306	1655	2640	0,57	7945	4299	1506	520	298	106	40	16	7	2	1	0	100	0,96		
	12	5	30	2494	964	1529	0,58	4713	2342	873	293	188	74	34	8	8	0	1	0	100	0,97		
			50	2787	1046	1738	0,59	5241	2754	945	335	192	78	32	8	7	0	0	0	100	0,96		
		6	30	2601	978	1618	0,59	4865	2525	947	294	176	68	26	10	8	1	1	0	100	0,96		
			50	2787	1028	1753	0,60	5211	2807	973	310	177	78	29	9	7	1	0	0	100	0,96		
	14	5	30	1860	753	1107	0,57	3501	1717	636	241	146	44	32	13	1	1	1	0	100	0,97		
			50	2062	810	1251	0,59	3883	1990	680	259	154	55	29	9	1	2	2	0	100	0,96		
		6	30	1903	752	1149	0,58	3543	1803	674	261	142	42	22	7	2	0	0	0	100	0,96		
			50	2062	793	1267	0,59	3859	2031	698	272	137	50	23	9	2	2	0	0	100	0,96		
16	5	30	1512	641	871	0,55	2787	1405	536	200	114	41	19	10	3	1	0	0	100	0,97			
		50	1657	681	976	0,57	3067	1583	586	205	130	42	17	9	3	1	0	0	100	0,96			
	6	30	1530	635	894	0,56	2843	1396	556	211	109	45	18	6	3	1	0	0	100	0,97			
		50	1657	667	989	0,57	3091	1569	588	216	120	48	15	6	3	1	0	0	100	0,96			
80	10	5	30	3754	1502	2247	0,55	6944	3580	1321	445	279	104	50	19	8	3	1	1	51,3	0,96		
			50	4119	1608	2504	0,56	7625	4075	1382	496	307	112	39	18	10	3	2	0	100	0,96		
		6	30	4080	1584	2486	0,57	7531	3998	1448	485	287	103	44	18	9	1	0	1	52,0	0,96		
			50	4246	1627	2608	0,57	7869	4222	1464	496	299	108	47	17	9	2	1	0	100	0,96		
	12	5	30	2439	943	1495	0,58	4589	2283	877	289	178	68	33	8	8	2	0	0	100	0,97		
			50	2716	1019	1694	0,60	5095	2656	963	319	185	71	31	8	7	1	0	0	100	0,96		
		6	30	2550	963	1582	0,59	4763	2456	939	294	169	65	25	10	9	3	0	0	100	0,96		
			50	2716	1006	1704	0,60	5095	2681	965	308	172	70	32	11	7	2	0	0	100	0,96		
	14	5	30	1806	729	1078	0,57	3431	1645	614	226	143	44	31	16	3	0	1	1	29,6	0,97		
			50	1992	780	1212	0,59	3775	1896	664	250	151	49	28	12	2	0	3	0	100	0,97		
		6	30	1852	728	1123	0,59	3473	1728	666	257	135	37	22	9	3	0	0	0	100	0,97		
			50	1992	762	1229	0,60	3747	1927	702	262	133	44	23	9	2	1	0	0	100	0,96		
16	5	30	1442	608	835	0,55	2651	1324	532	204	107	37	1										

50,5	∞	10	5	30	3740	1497	2239	0,55	6916	3574	1309	448	280	102	49	19	8	3	1	1	51,2	0,96	
				50	4102	1599	2497	0,56	7603	4050	1374	502	310	109	36	18	10	3	2	0	0	100	0,96
			6	30	4067	1579	2479	0,57	7503	3996	1440	483	284	103	45	18	9	1	0	1	51,9	0,96	
				50	4230	1619	2601	0,57	7845	4202	1460	497	298	107	46	17	9	2	1	0	100	0,96	
			12	5	30	2424	936	1487	0,58	4571	2271	865	277	180	70	35	8	8	2	0	0	100	0,97
					50	2699	1009	1687	0,60	5099	2610	951	315	185	75	33	8	7	1	0	0	100	0,96
		6		30	2536	956	1575	0,60	4743	2443	933	288	166	66	26	12	9	2	0	0	100	0,96	
				50	2699	996	1697	0,61	5089	2641	959	305	168	76	32	12	7	1	0	0	100	0,96	
		14		5	30	1787	721	1067	0,57	3391	1618	616	231	142	41	29	16	2	0	1	1	29,3	0,97
					50	1968	769	1199	0,59	3727	1864	668	249	147	50	27	11	2	0	2	0	100	0,97
			6	30	1830	720	1109	0,59	3433	1709	652	245	140	40	21	9	3	0	0	0	100	0,97	
				50	1968	751	1216	0,60	3709	1896	696	253	133	48	21	9	2	1	0	0	100	0,96	
			16	5	30	1409	594	816	0,56	2577	1303	528	197	100	35	18	5	2	1	0	0	100	0,96
					50	1523	619	904	0,57	2793	1460	574	201	103	35	15	5	2	1	0	0	100	0,96
		6		30	1422	590	832	0,57	2627	1308	522	198	101	38	16	6	3	1	0	0	100	0,97	
				50	1523	610	913	0,58	2815	1449	578	206	92	38	12	6	4	1	0	0	100	0,96	

Tabelle 4.6.2-3 Ergebnis der Parametervariation beim Sequenzierlauf

w : Breite des Glättfilters in ms

s_0 : Lee-Parameter in kHz. $s_0 = \infty$ bedeutet gleitender Durchschnitt.

erk : Erkennungsschwelle in kHz

sta : Startschwelle in kHz

tre : Trennschwelle in %.

C : Anzahl der Ereignisse mit $\ln(\tau/ns) < 0,39 \Leftrightarrow \tau < 1,48 ns$

$\mu_{ln\tau}$: Arithmetisches Mittel der logarithmierten Fluoreszenzabklingdauer in ns.

Abschnittslängenverteilungsfunktion analog zu Tabelle 4.6.2-3.

W_n^+ Wahrscheinlichkeit, mindestens die gefundene Anzahl „Zwölfer“ zufällig zu erhalten.

R Korrelationskoeffizient der theoretischen Verteilungsfunktion nach Gl. 4.6.2-2 mit der gefundenen Verteilungsfunktion.

Der Korrelationskoeffizient der vorhergesagten Verteilungsfunktion für zufällige Treffer mit der gefundenen Verteilungsfunktion liegt für alle Parametersätze sehr nahe bei 1. $R = 1$ bedeutet perfekte Übereinstimmung.

Es ist daher wahrscheinlich, daß die gefundene Reihenfolge der Cs und Us in der Messung zufällig ist.

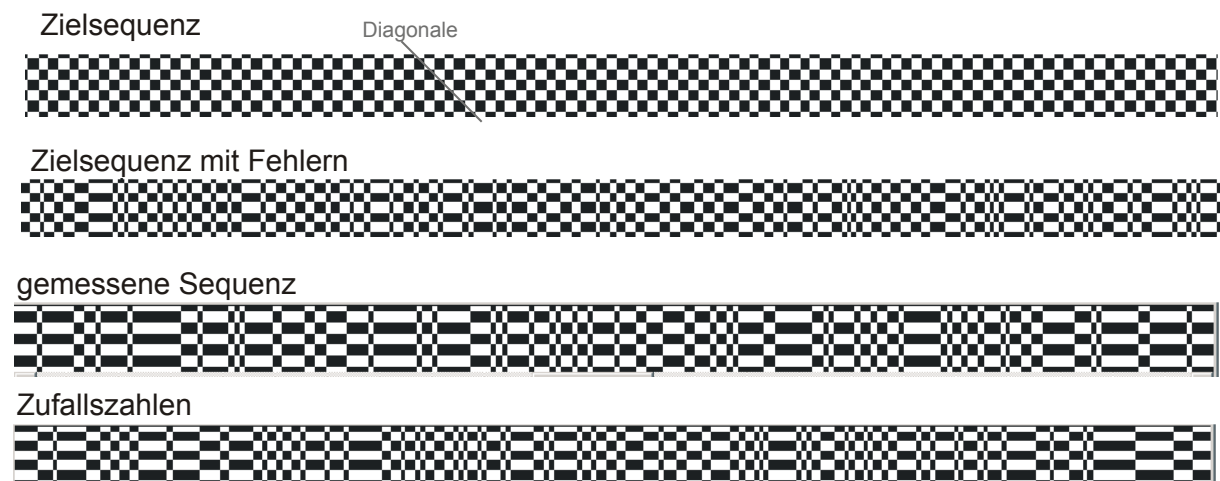


Abbildung 4.6.2-7 graphische Darstellung von Ausschnitten der Auswertematrizen

Auf der Y-Achse ist die Sequenz UCCUCCUCCU aufgetragen, auf der X-Achse die Zielsequenz, die Zielsequenz mit zufällig eingebauten Fehlern, die gemessene Sequenz aus Abbildung 4.6.2-3 und eine Zufallssequenz. Schwarze Pixel bedeuten Übereinstimmung.

Um diese Aussage zu verifizieren, wurden zu Abbildung 4.6.2-6 analoge Matrizen errechnet und graphisch dargestellt (Abbildung 4.6.2-7). Dabei wurde 1) die Wiederholung der Zielsequenz 2) die wiederholte Zielsequenz mit zufällig eingebauten Fehlern (20% Wkt., daß

U und C verwechselt wird, 10% falsch positive Ereignisse, 5% nicht detektierte Ereignisse) 3) die gemessene Sequenz und 4) eine Zufallssequenz (mit 50% C-Anteil) als X-Sequenz verwendet.

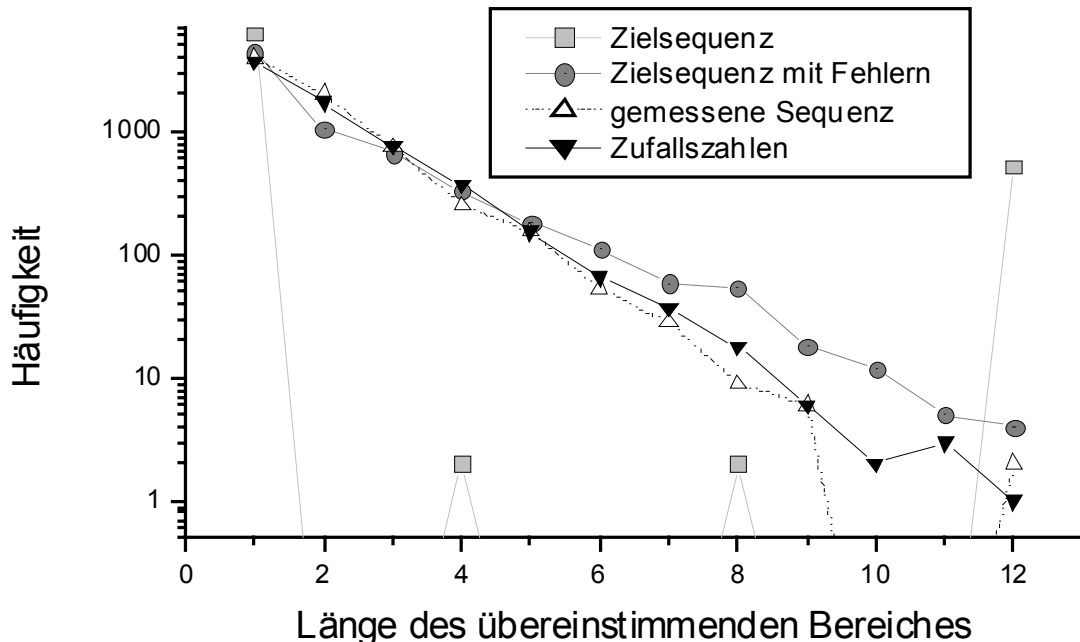


Abbildung 4.6.2-8 Verteilungsfunktionen der Längen der übereinstimmenden Abschnitte

Die Verteilungsfunktion der Längen der übereinstimmenden Abschnitte (Abbildung 4.6.2-8) zeigt für die Zufallszahlen den erwarteten exponentiellen Verlauf. Die Zielsequenz ($184 \times \text{UCCUCCUCCU}$) zeigt hingegen deutliche Abweichungen: man erhält 522 „Zwölfer“. (Da die Sequenz intern eine Periodenlänge von vier statt von 12 hat, erhält man das Dreifache von 184). Die Zielsequenz mit Fehlern (20 % Verwechslungen, 10 % falsch positive, 5 % fehlende) zeigt zwar bei den langen Abschnitten eine deutlich sichtbare Abweichung vom monoexponentiellen Abfall, diese ist jedoch wegen der kleinen Zahlen nicht sehr signifikant. Die Verteilungsfunktion der Messung ist der der Zufallszahlen ähnlich.

Zu Beginn dieses Unterkapitels (4.6.2) wurde gezeigt, daß das Verfahren prinzipiell funktioniert. Wenn die anschließende Sequenzanalyse nahe legt, daß die gefundene Sequenz zufällig ist, bedeutet dies, daß sich entweder die Moleküle auf dem Weg von der Reaktionszone zum Detektionsvolumen überholen, was mit den Ergebnissen aus Kapitel 4.4.1 in Einklang steht, oder daß mehrere DNS-Stränge gleichzeitig abgebaut werden. Durch Zugabe der Exonuclease steigt die Ereignisfrequenz um 1,3 Hz an. Ein DNS-Strang enthält 12 Markierungen, das ergibt eine Abbaurate von 0,11 DNS-Strängen/s. Multipliziert man dies mit 218 Nucleotiden/Strang, ergibt sich eine Gesamtschneiderate an allen Strängen von 23,6 Basen/s. Das ist in etwa das siebenfache der 3,3 Hz, die bei einem solchen Experiment in der Literatur [Sauer 2001] für einen Einzelstrang beschrieben sind.

Die gefundene „Sequenz 1“ (Abbildung 4.6.2-5) umfaßt einen Zeitraum von 1,4 s, die „Sequenz 2“ 4,8 s. Zwischen den Markierungen an den Enden der Sequenz liegen 176 Basen. Damit ergibt sich eine Schneiderate von 125 Hz bzw. 37 Hz.

Das Experiment wurde mit einer geringeren Menge DNS wiederholt (Abbildung 4.6.2-9). Werden die Ereignisse mit den in Tabelle 4.6.2-4 angegebenen Parametern bestimmt, so findet man im Zeitraum von 4520 s bis 4680 s nach Zugabe der Exonuclease die gesuchte Sequenz. Das entspräche einer Schneiderate des Enzyms am Einzelstrang von ca. 1,3 Basen/s. Mit den Parametern der Tabelle 4.6.2-4 ergeben sich insgesamt $M = 230$ Ereignisse bei einem C-Anteil von $m_c = 0,348$. Nach Gl. 4.6.2-1 ergibt sich die Wahrscheinlichkeit von einem bestimmten Startpunkt aus die Zielsequenz ($Z=12$, $z_c=0,5$) zufällig zu finden zu $W_z = 1/7328,9$. Die Wahrscheinlichkeit, mindestens einen Treffer zufällig zu erzielen, ergibt sich dann nach Gl. 4.6.2-2 zu etwa 3,1 %. Diese Wahrscheinlichkeit ist zwar klein, man sollte dabei jedoch beachten, daß nur bei 9 von 320 getesteten Parametersätzen die Sequenz auftrat.

Gate	Kanal 7-59 von 64 Kanälen		
Filter	Filterbreite	w	4,5 ms
	Lee-Frequenz	s_0	20 kHz
Schwellen	Erkennungsschwelle		16 kHz
	Startschwelle		5 kHz
	Trennschwelle		30 %

Tabelle 4.6.2-3 Parameter zur Fluoreszenzereigniserkennung.

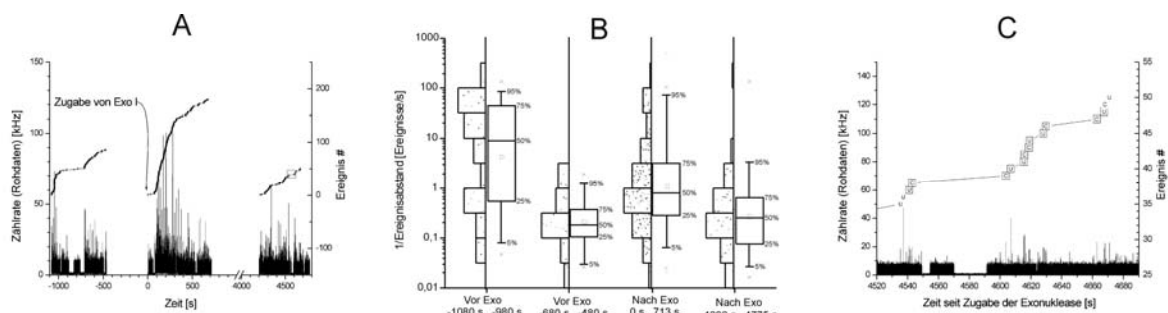


Abbildung 4.6.2-9 Versuch mit weniger DNS

A MCS-Spur

B Ereignisfrequenzen

C Vergrößerter Ausschnitt mit der Sequenz

Nach dem Einbau der DNS-beladenen Faser liegt die Ereignisfrequenz bei etwa 7 Hz. Innerhalb der nächsten 1000 s fällt sie auf 0,2 Hz. Durch Zugabe der Exonuclease steigt sie auf 1,5 Ereignisse/s, um in den nächsten 90 Minuten auf 0,25 Hz abzufallen. Der durch die Exonuclease verursachte Anstieg beträgt in diesem Experiment also, wie in dem zuvor beschriebenen, 1,3 Hz entsprechend einer Gesamtschneiderate des Enzyms an allen Strängen von ca. 24 Basen/s. Die gefundene Sequenz umfaßt hier den Zeitraum von 4535 s – 4670 s, entsprechend einer Schneiderate von 1,3 Hz.

4.6.3 Versuche mit statistisch markierten PCR-Produkten

Als Substrat in diesem Abschnitt wurde ein PCR-Produkt (PCR = Polymerase-Kettenreaktion) verwendet, bei dem einige der Cytidinreste durch Cy5-dCMP und einige der Thymidinreste durch Mr121-dUMP ausgetauscht wurden.

Als Template diente die DNS des Bakteriophagen M13MP18, dessen Sequenz in [Yanisch-Perron 1985] veröffentlicht wurde. Die Synthese des teilmarkierten PCR-Produkts ist in [Sauer 1999] beschrieben. Primer B, 5'-TTAATAACGTTCTGGGCAAAGGATTTAATACGAGT-3' ist mit den Basen 4824-4858 der M13MP18-Sequenz identisch. Der biotinylierte Primer A, 3'-TGACCGGCAGCAAATGTTGCAGC-Biotin-5' ist komplementär zu den Basen 6516-6540 der M13MP18-Sequenz. Durch die PCR wird das Fragment zwischen diesen beiden Primern amplifiziert:

```

3' -AATTATTGCA AGCCCGTTTC CTAAATTATG CTCAACAGCT TAACAAACAT TTCAGATTATG
AAGATTTAGG AGTTTACATA ATAGATAACT GCCGAGATTA GATAATCAAC AATCACGTGGA
TTTCTATAAA ATCTATTGGA AGGAGTTAAG GAAAGATGAC AACTAAACGG TTGACTGGTCT
ATAACTAACT CCCAAACTAT AAACCTCCAAG TCGTTCCACT ACGAAATCTA AAAAGTAAACG
ACGACCGAGA GTCGCACCGT GACAACGTCC GCCACAATTA TGACTGGCGG AGTGGAGACAA
AATAGAAGAC GACCACCAAG CAAGCCATAA AAATTACCGC TACAAAATCC CGATAGTCAAG
CGCGTAATTT CTGATTATCG GTAAGTTTTT ATAACAGACA CGGTGCATAA GAATGCGAAAG
TCCAGTCTTC CCAAGATAGA GACAACCGGT CTTACAGGGA AAATAATGAC CAGCACACTGA
CCACTTAGAC GGTTACATTT ATTAGGTAAA GTCTGCTAAC TCGCAGTTTT ACATCCATAAA
GGTACTCGCA AAAAGGACAA CGTTACCGAC CGCCATTATA ACAAGACCTA TAATGGTCGTT
CCGGCTATCA AACTCAAGAA GATGAGTCCG TTCACTACAA TAATGATTAG TTTCTTCATAA
CGATGTTGCC AATTAAACGC ACTACCTGTC TGAGAAAATG AGCCACCGGA GTGACTAATAT
TTTTGTGAAG AGTTC TAAGA CCGCATGGCA AGGACAGATT TTAGGGAAAT TAGCCGGAGGA
CAAAATCGAGG GCGGAGACTAA GGTTGCTCCT TTCGTGCAAT ATGCACGAGC AGTTTCGTTGG
TATCATGCGC GGGACATCGC CGCGTAATTC GCGCCGCCA CACCACCAAT GCGCGTCGCAC
TGGCGATGTG AACGGTCGCG GGATCGCGGG CGAGGAAAGC GAAAGAAGGG AAGGAAAGAGC
GGTGCAAGCG GCCGAAAGGG GCAGTTCGAG ATTTAGCCCC CGAGGGAAAT CCAAGGCTAA
ATCACGAAAT GCCGTGGAGC TGGGGTTTTT TGAACTAAAC CCACTACCAA GTGCATCACCC
GGTAGCGGGA CTATCTGCCA AAAAGCGGGA AACTGCAACC TCAGGTGCAA GAAATTATCAC
CTGAGAACAA GGTTTGACCT TGTTGTGAGT TGGGATAGAG CCCGATAAGA AACTAAATAT
TCCCTAAAAC GGCTAAAGCC TTGGTGGTAG TTTGTCTTAA AAGCGGACGA CCCC GTTTGGT
CGCACCTGGC GAACGACGTT GAGAGAGTCC CGGTCCGCCA CTTCCCGTTA GTCGACAACGG
GCAGAGCGAC CACTTTTCTT TTTGGTGGGA CCGCGGGTTA TGCGTTTGGC GGAGAGGGGCG
CGCAACCGGC TAAGTAATTA CGTCGACCGT GCTGTCCAAA GGGCTGACCT TTCGCCCGTCA
CTCGCGTTGC GTTAATTACA CTCAATCGAG TGAGTAATCC GTGGGGTCCG AAATGTGAAAT
ACGAAGGCCG AGCATAACAAC ACACCTTAAC ACTCGCCTAT TGTTAAAGTG TGTCCTTTGTC
GATACTGGTA CTAATGCTTA AGCTCGAGCC ATGGGCCCT AGGAGATCTC AGCTGGACGTC
CGTACGTTTCG AACCGtgacc ggcagcaaaa tgttgacgc-5'O-CO-(CH2)5-NH-Biotin
|<-----„Primer B“----->|

```

Abbildung 4.6.3-1 Sequenz des biotinylierten PCR-Produkts

Von den in der 1662 Basen langen, durch die PCR aufgebauten Sequenz enthaltenen 375 Ts und 384 Cs werden je etwa 30 durch die farbstoffmarkierten Cy5-dCMP und Mr121-dUMP ersetzt. Da der Austausch statistisch erfolgt, sind aus den Abbauprodukten keine

Sequenzinformationen zu erwarten. Eine höhere Markierungsdichte scheitert an der verwendeten *Taq*-Polymerase.

Trotz dieses Nachteils wurden die PCR-Produkte für die Experimente in diesem Abschnitt verwendet, da sie in ausreichender Menge zur Verfügung standen.

Um den abgespaltenen Basen weniger Zeit zu geben, sich gegenseitig zu überholen, muß der Abstand zwischen Reaktionszone und Detektionsvolumen verringert werden. Das Detektionsvolumen kann nicht von der Spitze des Femtotips nach hinten verschoben werden, weil es sonst nicht den vollen Kapillardurchmesser ausfüllt. Alternativ muß also die Reaktionszone nach vorne verschoben werden. Die optischen Fasern werden dazu mit einem im Rahmen dieser Arbeit entwickelten und in Abbildung 4.6.3-2 illustrierten Verfahren zu langgestreckten Spitzen geätzt. Da die Faser nach dem Entfernen der Polymethylmethacrylathülle sehr bruchempfindlich ist, wird sie in eine Injektionsnadel (Typ 0,47 × 20 mm) eingeführt und mit etwas Knetgummi am Ansatz für die Spritze befestigt. Man kann die Faser dann an der Kanüle sicher handhaben. Es ist auf diese Weise gelungen, Spitzen herzustellen, die man sogar vorne aus der 500 nm weiten Öffnung des Femtotips herauschieben kann (Abbildung 4.6.3-3).

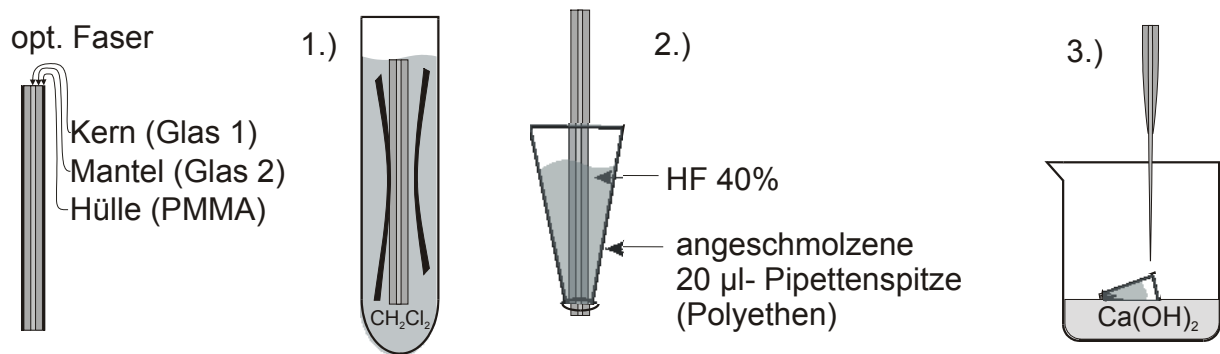


Abbildung 4.6.3-2 Ätzen der Spitzen

- 1) Die Polymethylmethacrylathülle wird durch Methylenechlorid abgelöst.
- 2) Der verbleibende Glasmantel wird in eine 20 µl PE-Pipettenspitze gesteckt und das Ende mit einer Flamme verschmolzen. In den so entstandenen Trichter werden mit Hilfe einer, zu einer Spitze ausgezogenen Plastikspritze einige µl 40 %-ige Flußsäure eingefüllt.
- 3) Innerhalb von 12-48 h fällt der Trichter mit der Flußsäure ab. Es verbleibt eine sehr langgezogene Spitze

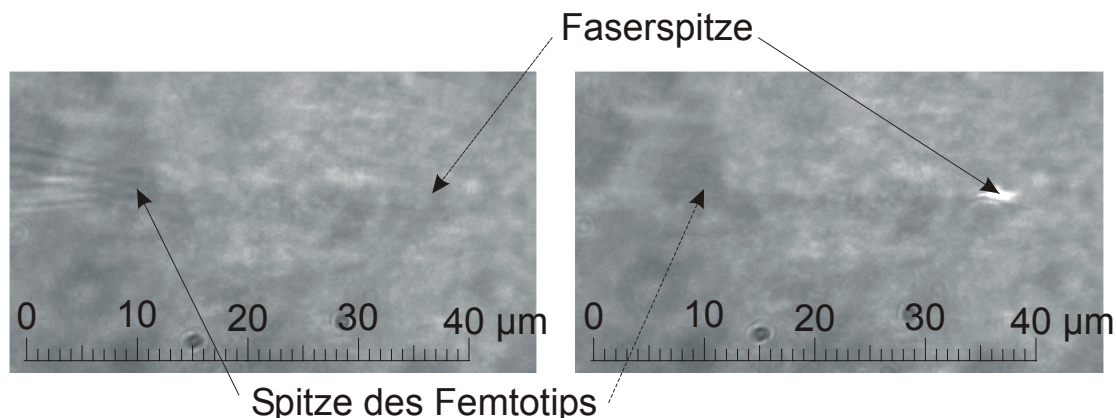


Abbildung 4.6.3-3 CCD-Aufnahme einer Faserspitze, die aus dem Ende des Femtotips ragt (Aufgenommen mit einem 100 × 1,4 NA- Ölimmersionsobjektiv.) Im Objektraum befindet sich Glycerin, im Femtotip Puffer.

links: der Femtotip ist scharfgestellt

rechts: Laserreflex an der (unsichtbaren) Spitze

Da der Femtotip unter einem Winkel von 30° gegen die Bildebene in die Apparatur eingebaut ist, können die Spitze des Femtotips und die Faserspitze mit dem Objektiv (1,4 NA Ölimmersion 100 ×) nicht gleichzeitig scharf abgebildet werden. Die Faserspitze selbst ist auf dem statischen CCD-Bild nur zu erahnen, weil sie zum einen sehr dünn ist und zum anderen einen ähnlichen Brechungsindex wie das Glycerin aufweist. Wird die Faser bewegt und das Bild durch das Okular betrachtet, so ist sie deutlicher zu sehen. Gut sichtbar ist jedoch der Reflex des Lasers an der Faserspitze (Abbildung 4.6.3-3, rechts).

Die geätzten Spitzen werden anschließend, wie in [Sauer 1999] beschrieben, mit Streptavidin überzogen, um die biotinylierte DNS fixieren zu können.

Da es unter diesen Umständen nicht gelingt, die Exonuclease durch Einspritzen an die Reaktionszone zu befördern, ist diese bereits im Puffer enthalten. Zur Inhibition des Enzyms ist dem Puffer 1 mmol/l EDTA zugesetzt.

Die Reaktion wird durch Zugabe eines großen Überschusses von Magnesiumacetat in den Kapillaraußenraum gestartet.

Das elektrophoretische Entfernen der adsorbierten Nucleotide von der DNS kann mehrere Stunden Zeit in Anspruch nehmen. Da die Exonuclease während dieser Zeit bereits mit der DNS in Kontakt steht, muß sie wirksam inhibiert werden. [Lehmann 1960] berichtet, daß die Aktivität des Enzyms in Anwesenheit von 20 mM EDTA unterbunden ist, während bei Anwesenheit freier Magnesiumionen in Konzentrationen zwischen 1,5 mM und 30 mM die volle Aktivität gegeben ist. In 4 mM EDTA beträgt die Aktivität menschlicher ExoI weniger als 0,01% des Wertes unter Standardreaktionsbedingungen [Lee 1999]. Da EDTA als statischer Fluoreszenzlöcher wirkt (Daten nicht gezeigt), kann dessen Konzentration nicht beliebig erhöht werden. Daher muß im Vorfeld peinlich darauf geachtet werden, daß der Puffer nicht mit zweiwertigen Metallionen (etwa aus Leitungswasser) verunreinigt wird.

4.6.3.1 Inhibition und Aktivierung der Exonuclease

Es wurde ein Vorversuch unternommen, der belegen soll, daß die Exonuclease vor Zugabe der Magnesiumionen inaktiv ist. Dazu wurde ein Tropfen der DNS-Lösung mit Sequenzierpuffer (1mM an EDTA, 0,4 U/µl ExoI) versetzt und die Korrelationsfunktion gemessen. Nach Zugabe der Exonuclease nimmt die Korrelationszeit sogar noch etwas zu. Möglicherweise liegt das daran, daß die Exonuclease zwar an die DNS bindet, diese jedoch nicht abbaut. Mit Zugabe des Magnesiumacetats fällt die Korrelationszeit schlagartig ab (Abbildung 4.6.3.1-1, unten rechts), die Ereignisfrequenz steigt an.

Die Gesamtmasse der DNS beträgt einschließlich Farbstoffen und Primer etwa 537000 g/mol. Die Masse des Enzyms beträgt 55000 g/mol (Stokes-Radius = 3,12 nm) [Prasher 1982], die der abgespaltenen markierten Mononucleotide Cy5-dCMP^{3'} 998 g/mol und Mr121-dUMP^{3'} 740 g/mol. Nimmt man $D \propto M^{-2/3}$ und $\tau_{\text{FCS}} \propto 1/D$ an, sollten sich die Korrelationszeiten $\tau_A : \tau_B : \tau_C$ wie 74:79:1 verhalten; experimentell (Tabelle 4.6.3.1-2) findet man 43:65:1.

Auch die Amplitude der Korrelationsfunktion zeigt qualitativ das erwartete Verhalten: Sie steigt von A nach B wegen der Verdünnung an, um nach Magnesiumzugabe wegen der zunehmenden Teilchenzahl abzufallen. Eine quantitative Auswertung der FCS-Amplitude verbietet sich wegen des hohen Untergrundanteils in den hochverdünnten Lösungen.

Die relativen Teilchenzahlen müssen statt dessen aus der Ereignisstatistik ermittelt werden. Dabei tritt das Problem auf, daß die DNS-Ereignisse nicht mit den gleichen Parametern wie die Mononucleotide erkannt werden können. Tabelle 4.6.3.1-1 gibt die verwendeten Parameter wieder:

	Gate	Kanal 8-39 von 64 Kanälen		
Monos	Filter	Filterbreite	W	2,5 ms
		Lee-Frequenz	S_0	30 kHz
	Schwellen	Erkennungsschwelle		15 kHz
		Startschwelle		6,5 kHz
		Trennschwelle		50 %
Kompro-miss	Filter	Filterbreite	W	10,5 ms
		Lee-Frequenz	S_0	30 kHz
	Schwellen	Erkennungsschwelle		15 kHz
		Startschwelle		6,5 kHz
		Trennschwelle		50 %
DNS	Filter	Filterbreite	W	50,5 ms
		Lee-Frequenz	S_0	100 kHz
	Schwellen	Erkennungsschwelle		150 kHz
		Startschwelle		10,5 kHz
		Trennschwelle		50 %

Tabelle 4.6.3.1-1 Parameter zur Fluoreszenzereigniserkennung.

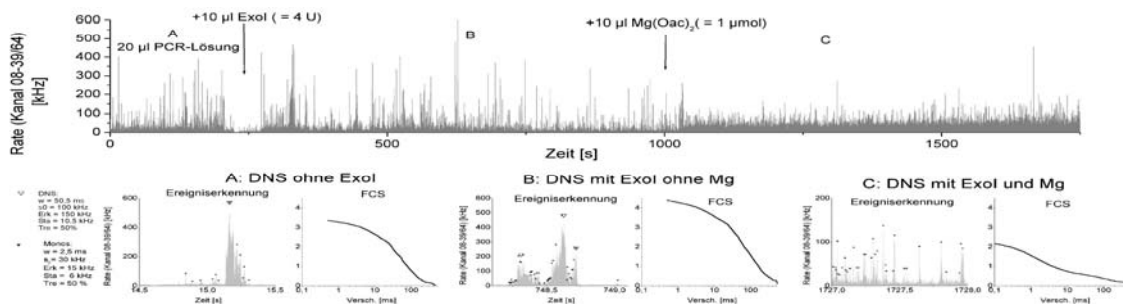


Abbildung 4.6.3.1-1 Versuch zur Inhibition und Aktivierung von Exonuclease I
 obere Zeile: MCS-Spur (2ms/Bin)
 untere Zeile: (links) Ereigniserkennung (rechts) Korrelationsfunktion

Tabelle 4.6.3.1-2 gibt einen Überblick über die Zusammensetzung der Lösung und die Einzelmolekülstatistik während der drei Phasen des Experimentes:

	A	B	C
Glycerin		30%	
PVP		2,1 %	
Tween 20		0,5 %	
Tris		16,7 mM	
B(OH) ₃		16,7 mM	
NaCl	--	0,67 mM	0,5 mM

HCl	--	33 μ M	25 μ M	
HOCH ₂ CH ₂ SH	--	33 μ M	25 μ M	
BSA	--	0,67 μ g/ml	0,5 μ g/ml	
EDTA	--	0,33 mM (frei)	0,25 mM (an Mg)	
Exol	--	0,13 U/ μ l (ca. 7e-9M)	0,1 U/ μ l (ca. 5e-9M)	
Mg(Oac) ₂	--	--	25 mM (24,7 mM frei)	
DNS	ca. 1e-11M	ca. 7e-12M	(ca. 5e-12M) (Abbauprodukte: 3e-10M)	
Wendepunkt der FCS [ms]	65	97	1,5	
Verdünnung : Probenvol. [μ l]	20	30	40	
Durchschnittsrate in Kanal 8-39 [kHz]	8,8	7,0	7,8	
w = 10,5 ms s ₀ = 30 kHz erk = 15kHz sta = 6,5 kHz tre = 50%	Ereignisbreite [ms]	11,7	11,4	5,5
	Ereignisfrequenz [Hz]	7,62	7,80	16,46
w = 2,5 ms s ₀ = 30 kHz erk = 15kHz sta = 6,5 kHz tre = 50%	Ereignisbreite [ms]	--	--	1,94
	Ereignisfrequenz [Hz]	--	--	40,63
	Ereignisanteil Besetzungsgrad	--	--	W _{n>0} = 23,1% λ = 0,263
w = 50,5 ms s ₀ = 100 kHz erk = 150 kHz sta = 10,5 kHz tre = 50%	Ereignisbreite [ms]	47,42	49,91	--
	Ereignisfrequenz [Hz]	0,027	0,224	--
	Ereignisanteil Besetzungsgrad	W _{n>0} = 1,31% λ = 0,0132	W _{n>0} = 1,42% λ = 0,0143	--

Tabelle 4.6.3.1-2 Zusammensetzung der Lösung und Einzelmolekülstatistik

A: Vor Zugabe der Exonuclease B: Nach Zugabe der inhibierten Exol C: Nach Aktivierung der Exol

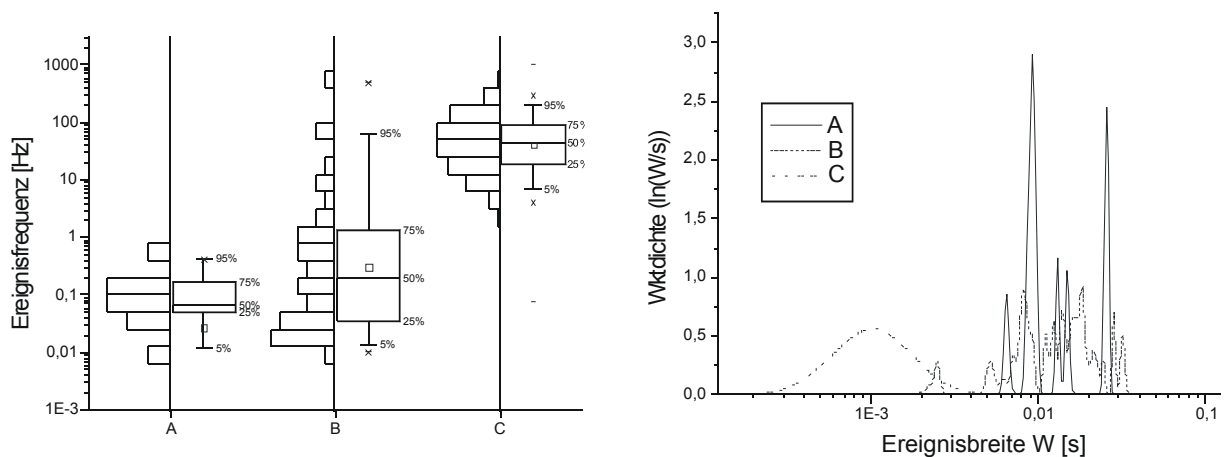


Abbildung 4.6.3.1-2 Ereignisfrequenz und Ereignisbreite

A: 20 μ l DNS-LösungB: 20 μ l DNS-Lösung + 10 μ l Exonuclease (entspricht einer Aktivität von 4U)+EDTAC: 20 μ l DNS-Lösung +10 μ l Exonuclease +10 μ l Magnesiumacetat

Die Durchschnittszählrate steigt nach Zugabe des Magnesiumacetats von 7,0 auf 7,8 kHz. Berücksichtigt man die Verdünnung der Probe von 30 μl auf 40 μl sowie den Untergrund von ca. 4 kHz, so ist das ein Anstieg der Fluoreszenzintensität um ca. 70%, der darauf hindeutet, daß der Farbstoff am Mononucleotid effektiver detektiert wird als in der DNS.

Die Ereignisfrequenz (Abbildung 4.6.3.1-2, links) steigt von 0,224 Hz auf 40,63 Hz, das ist unter Berücksichtigung der Verdünnung ein Anstieg auf das 240-fache. Gleichzeitig nimmt die Ereignisbreite von 49,9 ms auf 1,9 ms ab (Abbildung 4.6.3.1-2, rechts). Der Besetzungsgrad des Detektionsvolumens steigt von 1,4% auf 26,3%. Daraus erhält man einen Anstieg der Teilchendichte auf das 25-fache. Das ist weniger als die Hälfte des erwarteten Wertes von 60 freigesetzten Markern je abgebautem DNS-Strang. Dieser Wert ergibt sich absorptionsspektrometrisch [Sauer 1999]. Der Grund hierfür dürfte vor allem darin zu sehen sein, daß die Lösung nach der Reaktion zu konzentriert für die Auswertung der Einzelmolekülstatistik ist, und diese durch Mehrfachereignisse verfälscht wird.

4.6.3.2 Fixierung der DNS

Um zu überprüfen, daß die biotinylierte DNS tatsächlich am mit Streptavidin belegten Glas fixiert wird, wurde DNS-Lösung auf Deckgläschen pipettiert, die nach derselben Vorschrift wie die Faserspitzen streptavidiniert wurden. Dabei wurde die DNS-Konzentration sowie die Inkubationszeit variiert (ca. 10^{-9} M, 2h; ca. 10^{-10} M, 2h; sowie ca. 10^{-11} M, 1h).

Es wurden jeweils 5 μl der DNS-Lösung (in Femtopuffer) auf die Gläschen pipettiert und nach der angegebenen Inkubationszeit mit je 10 ml bidestilliertem Wasser abgespült. Zum Vergleich wurden die Versuche parallel dazu jeweils mit einem unbehandelten Glas durchgeführt. Auf die abgespülten Gläschen wurden 7 μl inhibierter Exonuclease-Puffer gegeben (0,4 U/ μl Exol, 1 mM EDTA) und die Fluoreszenz gemessen.

Nach 1024 s wurden 5 μl 100 mM Magnesiumacetat (in Femtopuffer) zugesetzt und noch einmal so lange gemessen:

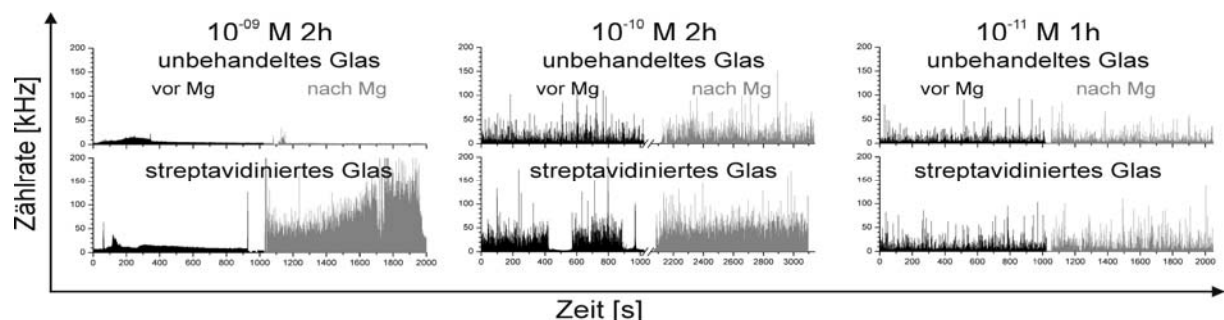


Abbildung 4.6.3.2-1 MCS-Spuren
oben: Vergleichsprobe auf unbehandeltem Glas
unten: Experiment mit beschichtetem Glas

Abbildung 4.6.3.2-1 bestätigt die Erwartungen: Auf dem unbehandelten Glas hat die Magnesiumzugabe fast keinen Effekt, auf dem streptavidinierten Glas steigt die Zählrate hingegen deutlich an. Das Ausmaß der Veränderung ist von der eingesetzten DNS-

Konzentration abhängig. Eine konzentriertere DNS-Lösung führt zu einer stärkeren Beladung des Deckglases.

C_{DNS}, t		$10^{-9} M, 2h$		$10^{-10} M, 2h$		$10^{-11} M, 1h$	
		vor Mg	nach Mg	vor Mg	nach Mg	vor Mg	nach Mg
Zählrate [kHz]	Glas	3,151	1,112	1,381	1,829	1,072	1,063
	Strept	6,650	23,981	3,068	4,467	1,081	1,451
Ereignis- erkennung	Gate	5-55		8-60		8-60	
	w [ms]	3,5		3,5		3,5	
	s0 [kHz]	80		30		30	
	Erk [kHz]	15		9,5		5,3	
	Sta [kHz]	3		3		1,1	
	Tre [%]	50		50		50	
Ereignis- frequenz	Glas	2,3	6,2	4,3	6,3	5,7	6,7
	Strept	7,1	35,7	14,1	24,1	7,1	13,1

Tabelle 4.6.3.2-1 Effekt der Magnesiumzugabe

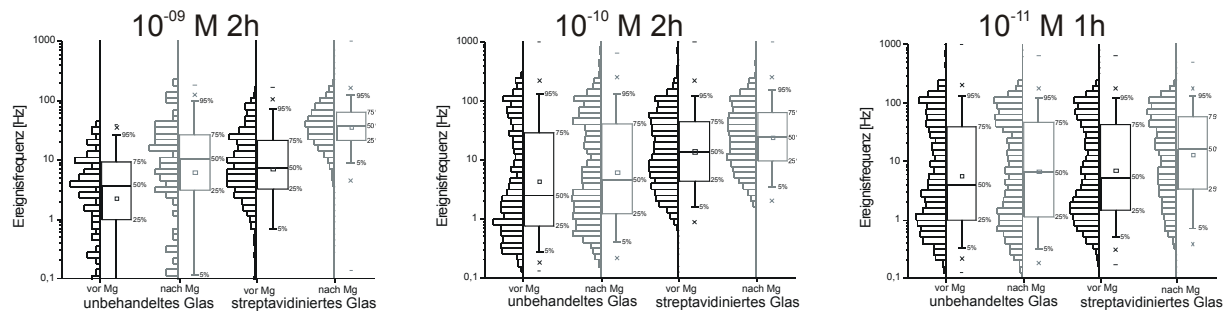


Abbildung 4.6.3.2-2 Ereignisfrequenz

Abbildung 4.6.3.2-3 zeigt eine optische Nahfeldaufnahme von an streptavidiniertem Glas gebundener DNS. Das optische Signal von etwa 8 kHz Intensität korrespondiert mit einer ca. 5 μm langen 1,5 μm breiten und 150 nm hohen Erhebung auf dem simultan gewonnenen topographischen Bild. Die Erhebungen am Rand bei $x = 0$ und $y = 0$ sind auf dem Fluoreszenzbild hingegen unauffällig. Der Untergrund der Fluoreszenzzählrate liegt bei etwa 2 kHz.

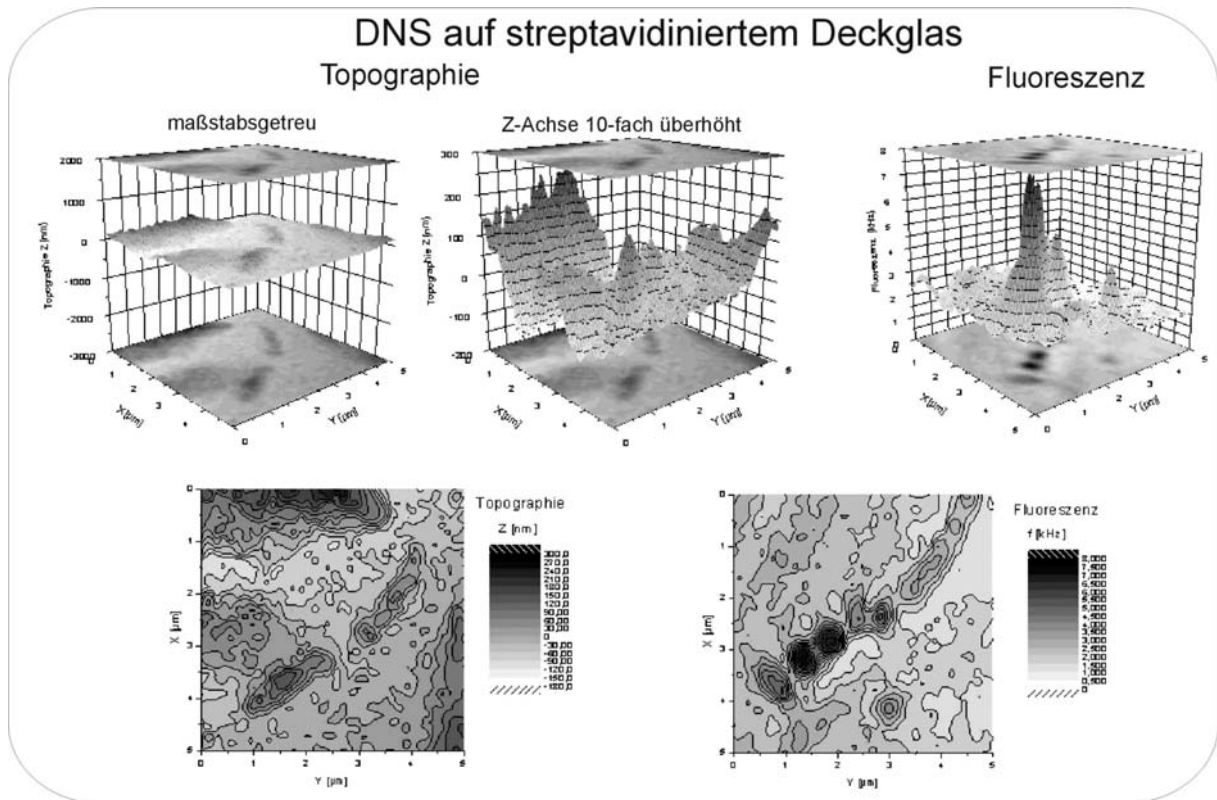


Abbildung 4.6.3.2-3 Nahfeldaufnahme von markierter DNS auf streptavidiniertem Glas ($5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$)

Zum Vergleich ist in Abbildung 4.6.3.2-4 die Nahfeldaufnahme eines unbehandelten Deckglases gezeigt. Die streifenförmige Struktur ist ein Artefakt, das durch den Meßvorgang zustande kommt. Die gemessenen Abweichungen von der Ebene betragen maximal $\pm 50\ \text{nm}$ (Stabw. $10\ \text{nm}$). Die Fluoreszenzzählrate liegt bei 2-3 kHz.

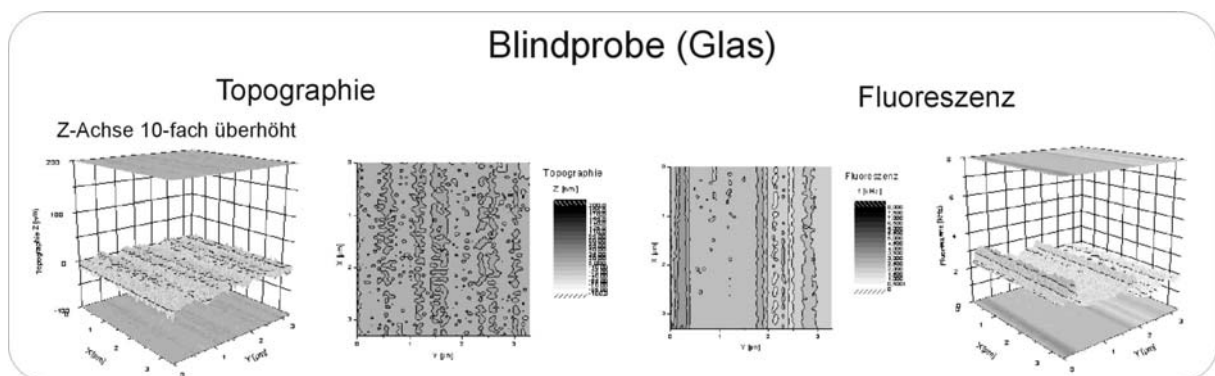


Abbildung 4.6.3.2-4 Nahfeldaufnahme eines unbehandelten Glases ($3,3\ \mu\text{m} \times 3,3\ \mu\text{m}$)

In der Literatur [z.B. Yokota 1999] wird die Höhe von DNS auf Glimmer mit ca. $5\ \text{nm}$ angegeben. Ob diese Empfindlichkeit mit der hier verwendeten Apparatur erreicht werden kann, ist fraglich. Die fluoreszierende Struktur in Abbildung 4.6.3.2-3 ist wahrscheinlich kein einzelner DNS-Strang. Durch Vergleich mit Abbildung 4.6.3.2-4 wird jedoch offensichtlich, daß die Struktur der Oberfläche durch die Beschichtung verändert wird.

4.6.3.3 Abbau in der Mikrokapillare

Die streptavidinierte Faserspitze wurde für (A) 30 s, (B) 15 s und (C) 10 s in eine ca. 10^{-10} M sowie für (D) 1s in eine ca. 10^{-11} M Lösung des PCR- Produktes getaucht. In Abschnitt 4.6.3.1 wurde ermittelt daß die Diffusionskonstante der DNS etwa 1/43 der Diffusionskonstante der Monophosphate beträgt. Geht man von einer Diffusionskonstante der Monophosphate von 6×10^{-11} m²/s (vgl. Kap. 4.2.5) aus, ergibt sich eine mittlere quadrierte Diffusionswegstrecke der DNS von $1,3 \times 10^{-12}$ m²/s. Taucht die Faser etwa 100 µm in die Lösung ein, ergibt sich ein diffusives Zylindervolumen von $\pi \times 1,3 \times 10^{-12}$ m²/s $\times 10^{-4}$ m = 4×10^{-16} m³/s. In der 10^{-10} M Lösung sollten nach dieser groben Abschätzung etwa 24 Moleküle pro Sekunde diffusiv an die Faser gelangen. Damit ergeben sich als Erwartungswert der (Poisson-verteilten) Anzahl von gebundenen DNS-Strängen bei Versuch (A) 720, bei Versuch (B) 360, bei Versuch (C) 240 und bei Versuch (D) 2,4 Stränge. Das beim Eintauchen der Faser verdrängte Flüssigkeitsvolumen sowie ein evtl. an ihr hochkriechender Flüssigkeitsfilm wurden dabei nicht berücksichtigt.

Die DNS-beladene Faser wurde anschließend mit destilliertem Wasser abgespült und in eine Mikrokapillare überführt. Die Kapillare war mit ca. 40 µl inhibierter Exonuclease-Pufferlösung (68 % bidest. Wasser, 29,5 % Glycerin, 2 % Polyvinylpyrrolidon (K90), 0,5 % Tween 20, 1,7 mM Tris, 1,7 mM Borsäure, 1mM EDTA, Exol 0,4 U/µl) gefüllt. Nach dem Anlegen der Spannung stieg die Ereignisfrequenz zunächst an, da Fluorophore freigesetzt wurden, die an der Faser oder an der DNS adsorbiert waren. Nach etwa 4-24 h ist die Zählrate wieder auf den Untergrundwert von < 1 Hz Ereignisfrequenz bzw. etwa 3 kHz Zählrate am Detektor zurückgegangen. Anschließend wurde die Spannung kurzzeitig abgeschaltet und dem Glycerin, in das die Kapillare taucht (Tropfen von ca. 0,5 - 1 ml Volumen) 200 µl 1M Magnesiumacetat in Wasser/Glycerin/PVP-Mischung zugesetzt. Diese Zugabe definiert den Nullpunkt der Zeitachse in den Experimenten. Die Spannung wurde anschließend wieder an die Elektroden gelegt und die Fluoreszenz gemessen.

Da die Positioniereinheit, mit der der Kapillarausgang im Detektionsvolumen fixiert wird, an manchen Tagen eine Drift aufweist, muß die Lage der Mikrokapillare gelegentlich überprüft werden. Dazu wird der Strahlengang in ein Okular umgelenkt, so daß der Laserreflex beobachtet werden kann. Auf der MCS-Spur ist dann ein scharfer Einbruch der Detektorfrequenz auf die Dunkelzählrate von etwa 100 Hz sichtbar, der nichts mit der in der Kapillare ablaufenden Reaktion zu tun hat. Ist die Kapillare richtig justiert und treten keine Fluorophore aus, so liegt die Zählrate bei 400 µW Anregungsleistung bei etwa 2-3 kHz, die simultan zum Laserpuls auftreten. Sinkt die Streulichtrate, also die mittlere Zählfrequenz in den dem Laserpuls entsprechenden Kanälen langsam ab, so weist dies darauf hin, daß sich die Kapillare dejustiert.

Die Parameter zur Fluoreszenzereigniserkennung der Versuche 4.6.3.3 A-D sind in Tabelle 4.6.3.3-1 zusammengefaßt:

Versuch	A	B	C	D
Gate	07-60	08-60	8-55	07-55
Glättfenster w [ms]	3,5	3,5	3,5	3,5
Varianzparameter s_0 [kHz]	60	60	60	60
Erkennungsschwelle [kHz]	13,5	8	10	9
Startschwelle [kHz]	5	2,5	4	2,5

Trennschwelle [%]		50	30	50	50
Cy5-dCMP	$\ln(\tau/\text{ns})$	-0,3..0,5	-0,5..0,55	-0,4..0,6	-0,5..0,89
Mr121-dUMP	$\ln(\tau/\text{ns})$	0,5..2,0	0,55..1,6	0,6..1,8	0,89..2,5

Tabelle 4633-1 Parameter zur Fluoreszenzereigniserkennung

Versuch A

Die Spitze der streptavidinierten Faser wurde für 30 s in etwa 10^{-10} M biotinylierte fluoreszenzmarkierte DNS-Lösung getaucht.

Abbildung 4.6.3.3-1 zeigt die MCS-Spuren, die bei Versuch (A) gemessen wurden:

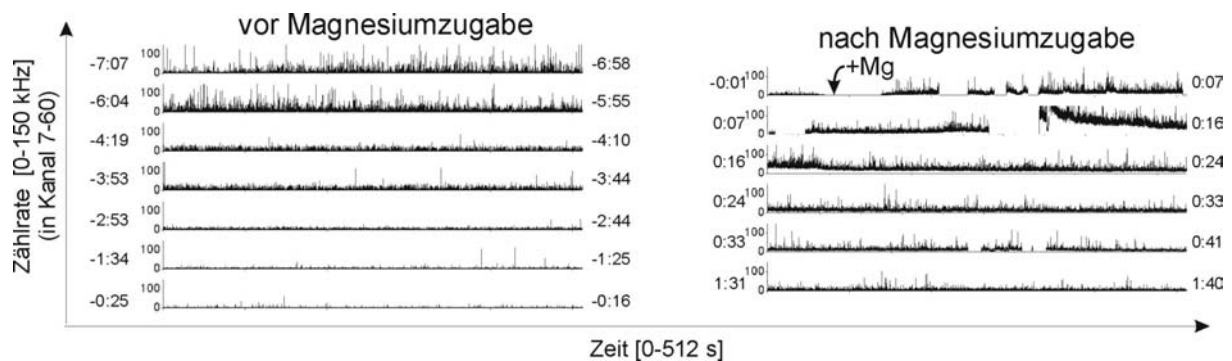


Abbildung 4.6.3.3-1 MCS-Spuren des Experimentes A, bei dem die Faser 30s in 10^{-10} M DNS- Lösung getaucht wurde. Eine Spur entspricht einem Zeitabschnitt von 512 s, die dargestellte Binweite beträgt 3,5 ms (gemessen wurde mit 0,5 ms). Links und rechts neben der Spur ist die Anfangs- und Endzeit der Spur, gerechnet ab Zugabe des Magnesiums in Stunden und Minuten angegeben.

Nach dem Einbau der Faser lag die Ereignisfrequenz bei ca. 6,6 Hz, eine Stunde später war sie auf ca. 40 Hz angestiegen, danach fiel sie wieder. Nach 3h wurden noch 0,2 Hz und nach 7h, das heißt unmittelbar vor Zugabe des Magnesiumacetats noch 0,1 Hz beobachtet. Mit der Zugabe von 200 μ l 1M Magnesiumacetat (in „Femtopuffer“) begann die Ereignisfrequenz anzusteigen. Nach 90 s betrug sie 4 Hz, nach 260 s war ein vorläufiges Plateau von ca. 15 Hz erreicht. 610 s nach der Magnesiumzugabe begann die durchschnittliche Zählrate von 18 kHz auf über 250 kHz (nach 760s) anzusteigen, so daß die Einzelmolekülerkennung zusammenbrach. Nach 1700 s war die Durchschnittsrate wieder unter 20 kHz gesunken und man beobachtete eine Ereignisfrequenz von etwa 18 Hz. 1½ h nach Magnesiumzugabe wurde eine Ereignisfrequenz von 2,4 Hz bei einer Durchschnittsrate von 6 kHz am Detektor gemessen.

Versuch B

Die Spitze der streptavidinierten Faser wurde für 15 s in etwa 10^{-10} M biotinylierte fluoreszenzmarkierte DNS-Lösung getaucht.

Bei Versuch B vergingen zwischen dem Einbau der Faser und dem Auftreten der maximalen Ereignisfrequenz von 20 Hz 4 Stunden. 15½ h nach dem Einbau der Faser betrug die Ereignisfrequenz 0,97 Hz, nach 16 h wurde das Magnesium zugesetzt. Im Gegensatz zu Versuch A war bei Versuch B zunächst kein auffälliger Anstieg der Ereignisfrequenz zu

beobachten. Während des als Seq1a bezeichneten Abschnitts von 0-2300 s nach Magnesiumzugabe lag die Ereignisfrequenz bei etwa 0,3 Hz. Nach dieser Zeit stieg sie sprunghaft auf ca. 5 Hz an und blieb bis zum Ende der Messung nach 2800 s auf diesem Wert (Seq1b). 1¼ h nach Magnesiumzugabe war die Ereignisfrequenz auf 1,9 Hz zurückgegangen (Seq2).

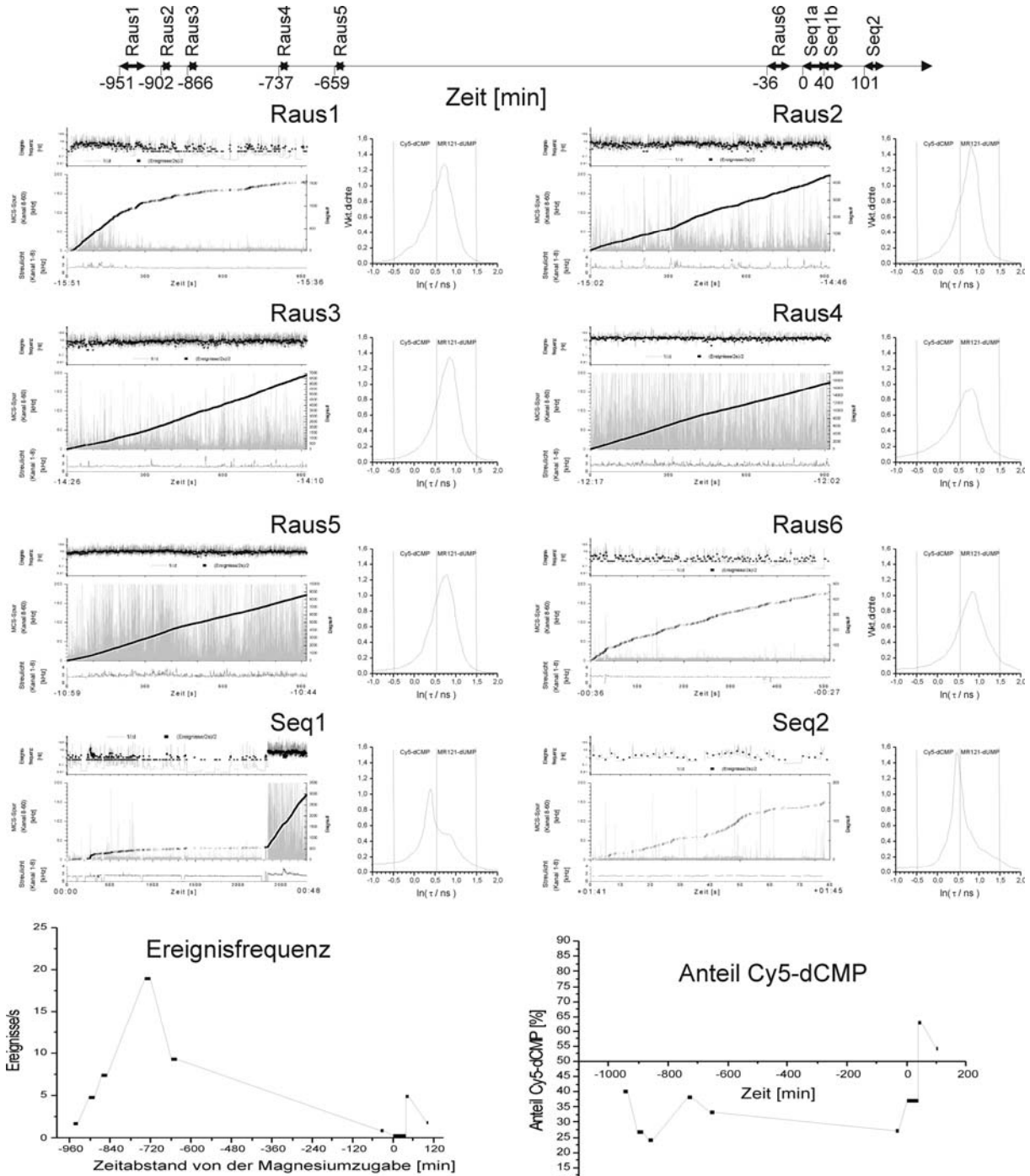


Abbildung 4.6.3.3-2 Versuch B: Faserspitze wurde für 15 s in ca. 10^{-10} M DNS-Lösung getaucht.
 oben: Maßstabsgetreue Übersicht über die Einzelmessungen.
 Mitte: Ereignisfrequenz, MCS-Spuren mit Ereigniskurven und Streulichtkurve der Messungen.
 unten: Mittlere Ereignisfrequenz und C-Anteil der austretenden Nucleotide.

Abbildung 4.6.3.3-2 zeigt den Verlauf von Versuch B: In die Graphen der MCS-Spuren, die jeweils 900 s darstellen (Raus1-Raus6) bzw. 2800 s (Seq1) und 80 s (Seq2), sind die erkannten Ereignisse eingezeichnet. Ein Ereignis wird dabei als C klassifiziert, wenn die geschätzte Fluoreszenzabklingdauer zwischen 0,61 ns und 1,73 ns ist. Ist sie zwischen 1,73 ns und 4,48 ns wird das Ereignis als U klassifiziert. Ereignisse mit Fluoreszenzabklingdauern außerhalb dieser Bereiche werden verworfen. In den Graphen über den MCS-Spuren ist die Ereignisfrequenz als reziproker Ereignisabstand und als Zahl der Ereignisse pro Sekunde mit einer logarithmischen Ordinate aufgetragen. In den Graphen unter den MCS-Spuren ist die Intensität des Streulichtes aufgetragen. An diesen Graphen läßt sich erkennen, daß der Femtotip richtig justiert ist und wann der Strahlengang auf das Okular umgelenkt wird. Unterhalb der Streulichtkurve ist die Zeit, gerechnet ab Zugabe des Magnesiumacetats in Stunden und Minuten angegeben. Zwischen dem Einbau der Faser und dem Ende des Experimentes vergingen in diesem Versuch 17h und 36 min. Rechts neben den MCS-Spuren ist die Dichteverteilung des natürlichen Logarithmus der ermittelten Abklingdauern in ns aufgetragen. Dabei fällt auf, daß sich das Histogramm nach Magnesiumzugabe deutlich nach links verschiebt und sich der breite Peak im Histogramm in zwei Einzelpeaks aufspaltet. Unter den Einzelgraphen ist die Ereignisfrequenz und der Anteil Cy5-dCMP/(Cy5-dCMP+MR121-dUMP) aufgetragen. Während der Raus- Messungen liegt dieser bei 45-25%, unmittelbar nach Magnesiumzugabe steigt er von 27% (Raus6) auf 37% (Seq1a), um mit den austretenden Reaktionsprodukten auf 62 % (Seq1b) anzusteigen. Danach fällt er auf 54 % (Seq2) ab. Aus der absorptionsspektrometrisch ermittelten Zusammensetzung des Eduktes ist ein Anteil von 50 % Cy5-dCMP zu erwarten.

Versuch C

Die Spitze der streptavidinierten Faser wurde für 10 s in etwa 10^{-10} M biotinylierte fluoreszenzmarkierte DNS-Lösung getaucht.

Abbildung 4.6.3.3-3 zeigt die MCS-Spur von Versuch C. Die Faserspitze wurde vor dem Versuch für 10 s in eine ca. 10^{-10} M DNS-Lösung getaucht. Das linke Drittel gibt die MCS-Spuren vor Zugabe des Magnesiumacetats, das mittlere Drittel die MCS-Spur nach Zugabe des Magnesiumacetats wieder. Rechts ist die Ereignisfrequenz aller Messungen logarithmisch gegen die Zeit aufgetragen: Vor Zugabe des Magnesiumacetats fiel die Ereignisfrequenz in etwa exponentiell ab. Nach Magnesiumzugabe stieg sie von 0,2 Hz auf 3 Hz an. 6½ Minuten später betrug sie ca. 1 Hz, wobei Spitzen mit bis zu 18 Hz auftraten. Nach 33 Minuten betrug die Ereignisfrequenz ca. 0,8 Hz, anschließend fiel sie innerhalb von 3 min auf den konstanten Wert von 0,1 Hz ab.

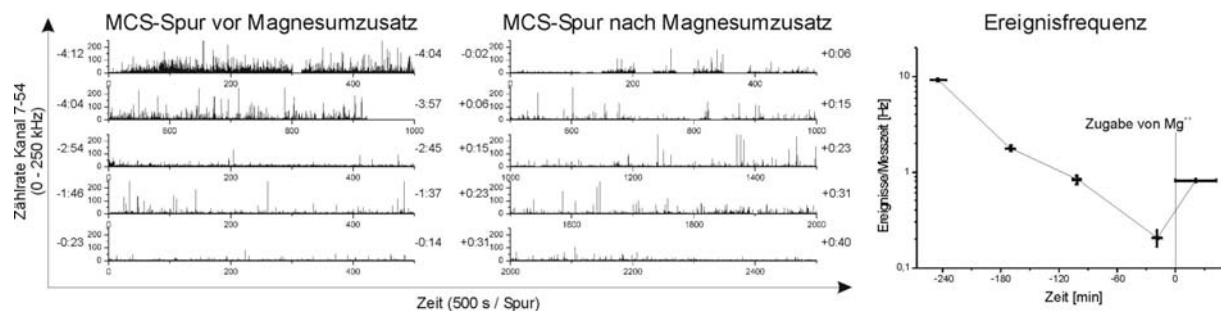


Abbildung 4.6.3.3-3 Versuch C: Faserspitze für 10 s in 10^{-10} M DNS getaucht.

Versuch D

Die Spitze der streptavidinierten Faser wurde für 1 s in etwa 10^{-11} M biotinylierte fluoreszenzmarkierte DNS-Lösung getaucht.

Abbildung 4.6.3.3-4 zeigt die MCS-Spuren, die erkannten Ereignisse, die Streulichrate und die Ereignisfrequenz von Versuch D. Als Ereignisfrequenz ist zum einen der reziproke Ereignisabstand (graue Linie) und zum anderen die Zahl der Ereignisse, die in einer Sekunde erfaßt wurden (schwarze Quadrate), logarithmisch aufgetragen.

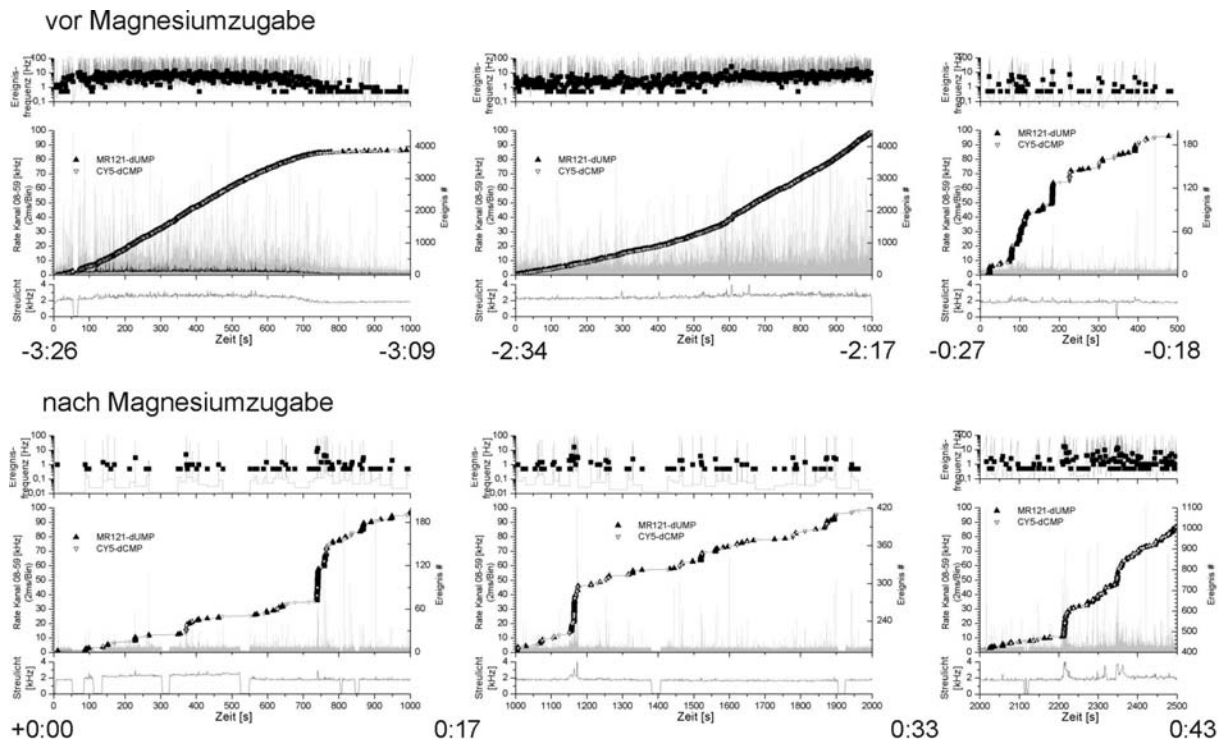


Abbildung 4.6.3.3-4 Ereignisfrequenz, MCS-Spuren + Ereignisse und Streulichrate bei Versuch D. Vor Beginn des Versuches wurde die Faserspitze für 1 s in ca. 10^{-11} M DNS-Lösung getaucht.

In den Ereigniskurven des letzten Versuches treten vier recht auffällige Stufen, das heißt zeitliche Abschnitte mit erhöhter Ereignisfrequenz auf (Abbildung 4.6.3.3-5). Sollten sich diese Stufen als signifikant erweisen, so wäre dies zum einen ein starkes Indiz dafür, daß bei diesem Versuch der Abbau einzelner DNS-Stränge beobachtet werden konnte. Zum anderen würde dies nahelegen, daß Exonuclease I auch an teilmarkierter DNS (wie an nativer DNS, [Brody 1986]) prozessiv arbeitet.

Die ersten beiden Stufen bestehen fast nur aus Ereignissen mit langer Fluoreszenzabklingdauer. Die dritte Stufe hat ein angenähert ausgeglichenes Verhältnis zwischen Cy5-dCMP und Mr121-dUMP, bei der vierten Stufe überwiegen die Ereignisse mit kurzer Abklingdauer. Die Abklingdauerverteilungen der Ereignisse der ersten beiden Stufen legen nahe, daß es sich nicht um Abbauprodukte der Sequenzierreaktion, sondern um ein aufgespaltenes, sehr breites Ereignis (möglicherweise ein Oligonucleotid) handelt.

Nimmt man an, daß Stufe 3 und 4 durch den Abbau einzelner 1688 Basen langer Stränge entsteht, so ergibt sich eine prozessive Schneiderate des Enzyms am Einzelstrang von 226,7 Hz bzw. 249,2 Hz. Dieser Wert liegt in der Nähe der 275 Hz, die an unmarkierter DNS für dieses Enzym beschrieben worden sind [Brody 1986]. Die Stufen 3 und 4 umfassen 110 bzw. 75 Ereignisse in 7,4 bzw. 6,7 s. Zieht man den Untergrund von ca. 1 Hz Ereignisfrequenz ab, ergeben sich 103 bzw. 66 Markierungen pro DNS-Strang. Der Wert von Stufe 3 scheint unrealistisch hoch, der von Stufe 4 liegt nahe den erwarteten 60 Markierungen.

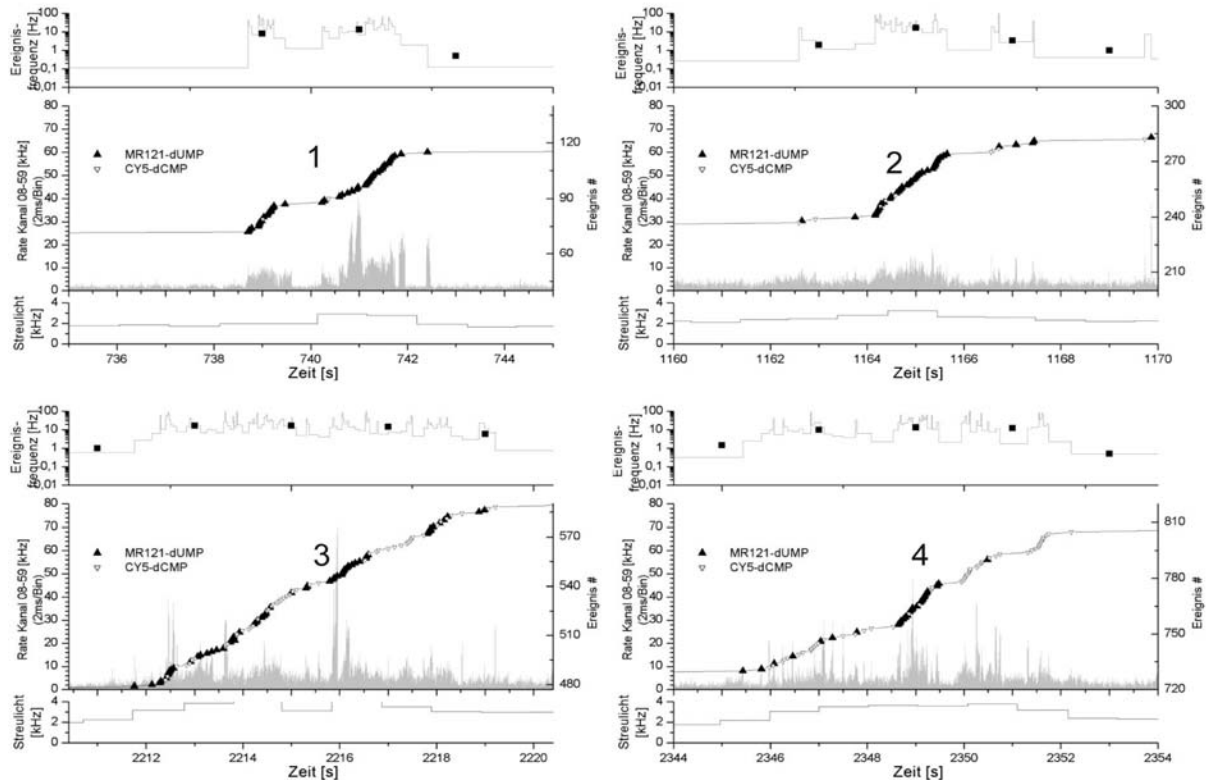


Abbildung 4.6.3.3-5 Nach der Zugabe des Magnesiumacetats treten in der Ereigniskurve von Versuch D vier Stufen auf.

Die Signifikanz von Abweichungen in der Ereignisfrequenz wird zusammen mit den in Abschnitt 4.6.3.5 beobachteten Stufen in Abschnitt 4.6.3.6 diskutiert.

Mit den in Abschnitt 4.3.3.3 dargestellten Versuchen konnte gezeigt werden, daß die Ereignisfrequenz nach der Zugabe des Magnesiumacetats ansteigt. Erwartungsgemäß ist der Anstieg um so deutlicher, je länger die Faser zuvor in die DNS-Lösung getaucht wurde. Diese Beobachtung kann man dadurch erklären, daß die Aktivität der Exonuclease durch das EDTA soweit herabgesetzt ist, daß die DNS mehrere Stunden mit ihr in Kontakt stehen kann, ohne daß sie abgebaut wird. Nach dem Zusatz des Magnesiumacetats zum Glycerin vor der Kapillaröffnung wandern die Mg^{++} -Ionen unter dem Einfluß der Kathode im Innern der Kapillare in diese hinein, wie ein Vorversuch mit Eriochromschwarz-T gezeigt hat. In der Kapillare aktiviert der Magnesiumüberschuß die Exonuclease, welche die farbstoffmarkierten Mononucleotide freisetzt. Da die Mononucleotide negativ geladen sind, werden sie zur Anode und damit aus der Kapillaröffnung gezogen. Am Kapillarausgang befindet sich das Detektionsvolumen, wo die austretenden Farbstoffe nachgewiesen und identifiziert werden.

4.6.3.4 Einfluß des Magnesiumacetats auf die Ionenwanderung in der Mikrokapillare

Der Zusatz des Magnesiumacetats zum Glycerin wird zweifellos dessen Leitfähigkeit erhöhen. Um auszuschließen, daß der in den Kapiteln 4.6.3.3 und 4.6.3.5 beobachtete Ereignisfrequenzanstieg dadurch bedingt wird, wurde eine weitere Serie von Experimenten durchgeführt. In der Kapillare befindet sich eine Lösung, die je ca. 5×10^{-11} M an Cy5-dCMP

und Mr121-dUMP ist. Die MCS-Spuren werden bei -15 V , 0 V , 5 V , 10 V , 15 V , 20 V , 25 V und 30 V Spannung der Außenelektrode gegen die Elektrode in der Kapillare je 200 s lang gemessen. Anschließend werden dem Glycerin $200\ \mu\text{l}$ 100 mM Magnesiumacetat in Femtopuffer zugesetzt und die Meßreihe wiederholt. Abbildung 4.6.3.4-1 zeigt die gegateten Spuren bei einer dargestellten Binweite von $3,5\text{ ms}$:

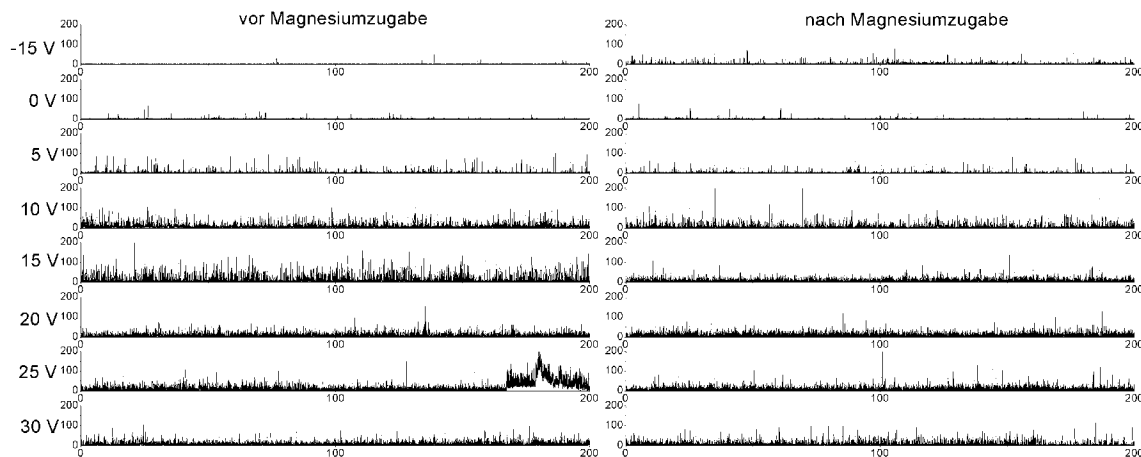


Abbildung 4.6.3.4-1 MCS-Spuren (Kanal 7-60) von Mononucleotiden in der Mikrokapillare bei verschiedenen Spannungen vor und nach Zugabe von Magnesiumacetat in das Glycerin.

Die Spuren werden mit den in Tabelle 4.6.3.4-1 angegebenen Parametern nach Fluoreszenzereignissen durchsucht:

Gate		Kanal 7-60/64
Glättfilter	Fensterbreite w	$3,5\text{ ms}$
	Varianzparameter s_0	60 kHz
Schwellen	Erkennungsschwelle	12 kHz
	Startschwelle	$3,1\text{ kHz}$
	Trennschwelle	50%

Tabelle 4.6.3.4-1 Parameter zur Fluoreszenzereigniserkennung

τ_x [ms]	$2,511 \pm 1,227$		
κ_y	$0,997 \pm 0,406$		
κ_z	$5,760 \pm 14,57$		
κ_l	$1,080 \pm 1,183$		
$f_v = v/\omega_y$ [kHz]	Spannung [V]	vor Mg	nach Mg
	0	$3,678\text{E-}08 \pm 9,904\text{E+}03$	$4,094\text{E-}02 \pm 1,477\text{E-}02$
	5	$4,613\text{E-}02 \pm 1,473\text{E-}02$	$8,899\text{E-}02 \pm 1,831\text{E-}02$
	10	$3,073\text{E-}01 \pm 3,559\text{E-}02$	$3,027\text{E-}02 \pm 1,611\text{E-}02$
	15	$2,662\text{E-}01 \pm 3,295\text{E-}02$	$6,351\text{E-}02 \pm 1,583\text{E-}02$
	20	$4,331\text{E-}01 \pm 4,226\text{E-}02$	$2,365\text{E-}01 \pm 3,088\text{E-}02$
30	$1,712\text{E-}01 \pm 2,580\text{E-}02$	$5,753\text{E-}02 \pm 1,532\text{E-}02$	

Tabelle 4.6.3.4-1 Parameter des globalen Fits der Korrelationsfunktionen

Aus den gegateten Spuren werden die Autokorrelationsfunktionen (Abbildung 4.6.3.4-2, unten rechts) errechnet, normiert und mit

$$G_{norm}(t) = \frac{1}{\sqrt{1 + \kappa_y^2 \frac{t}{\tau_x}}} \cdot e^{\frac{f_v^2 t^2}{1 + f_v t}} \cdot G_{\rho\beta}(\tau_x, \kappa_z, \kappa_l)(t)$$

gefittet. Für $G_{\rho\beta}$ wird dabei die Näherung aus Kapitel 4.2.4 verwendet. Die Kurven werden global gefittet; τ_x , κ_y und κ_z sind allen Kurven gemeinsam, die f_v variieren. Tabelle 4.6.3.3-4 gibt die Ergebnisse wieder.

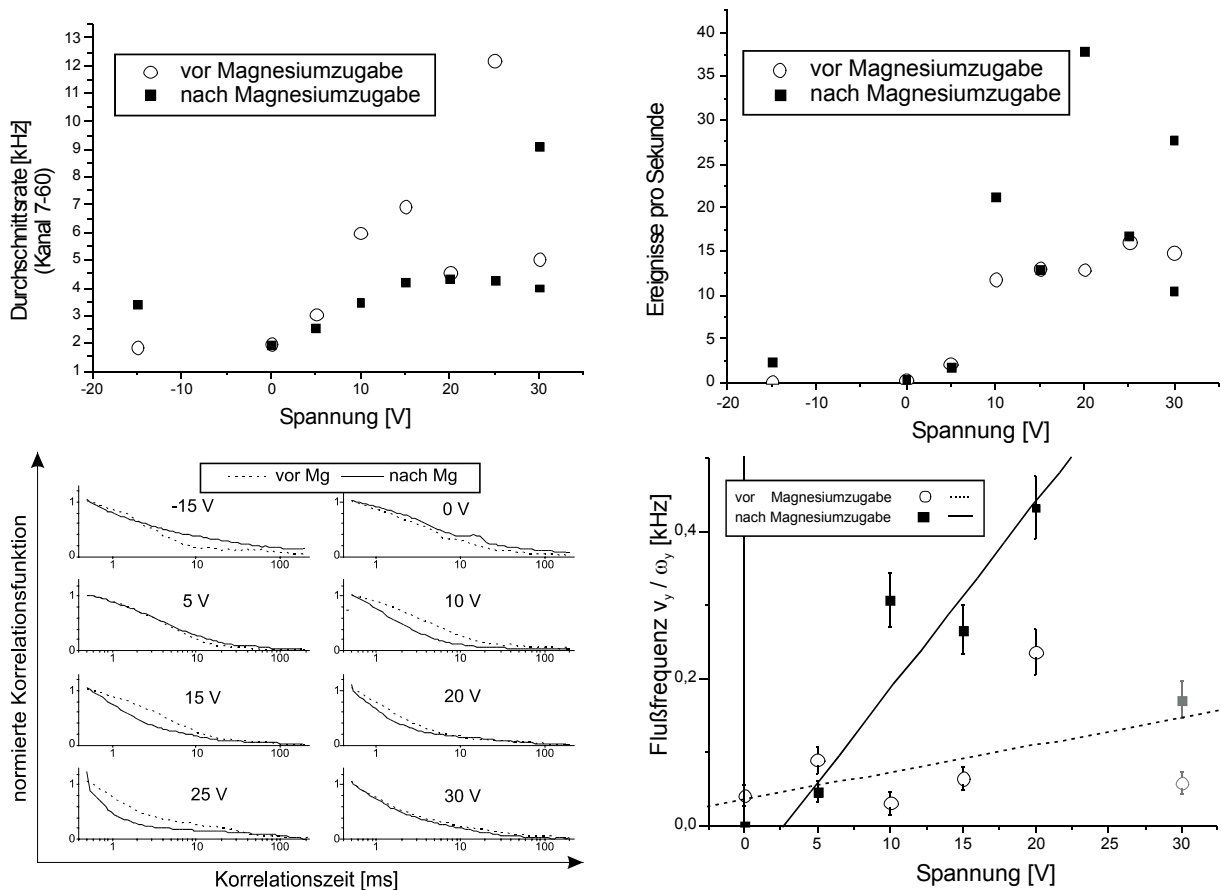


Abbildung 4.6.3.4-2 Effekt der Magnesiumzugabe auf die Durchschnittszählrate, die Ereignisfrequenz, die Korrelationsfunktion und die Austrittsgeschwindigkeit der Mononucleotide.

Die Steigungen der Regressionsgeraden durch die $f_v(U)$ der beiden Meßreihen unterscheiden sich deutlich (Abbildung 4.6.3.3-8, unten links): vor Magnesiumzugabe ergibt sich als Steigung $d(v/\omega_y)/dU$ ($3,69 \pm 3,87$) Hz/V, während nach der Magnesiumzugabe der Wert bei $(25,53 \pm 5,31)$ Hz liegt. Die höhere Austrittsgeschwindigkeit nach Magnesiumzugabe wird jedoch durch einen geringeren Konzentrationseffekt im Vergleich zur Messung ohne Magnesium teilweise kompensiert: die Durchschnittszählrate am Detektor steigt bei der Messung ohne Magnesium stärker an (Abbildung 4.6.3.3-8, oben links).

Die Ereignisfrequenz ist nach Magnesiumzugabe bei den meisten Messungen höher als vor der Magnesiumzugabe (Abbildung 4.6.3.3-8, oben rechts). Dieser Effekt beträgt, wenn man die beiden Extrempunkte wegläßt im Mittel 41 %. Die Ereignisfrequenzsteigerung bei den Sequenzierversuchen beträgt, je nach Menge der gebundenen DNS bis zu mehreren 1000 %, ist also allein durch den leitfähigkeitssteigernden Effekt des Magnesiumacetats im Kapillaraußenraum nicht zu erklären.

4.6.3.5 Versuche zur gezielten Selektion

In Abschnitt 4.6.3.3 konnte gezeigt werden, daß die Sequenzierreaktion durch Zugabe von Magnesiumacetat in den Kapillaraußenraum gestartet werden kann, und daß sich die Zahl der gebundenen DNS-Moleküle durch die Konzentration der DNS-Lösung, in welche die Faser getaucht wird, sowie durch die Eintauchdauer beeinflusst werden kann. An eine dünne streptavidinierte Faserspitze, die 100 μm tief in eine 10^{-12} M DNS-Lösung taucht, sollte etwa alle 4 s ein DNS-Strang binden. Nach dieser Zeit ist die Zahl der gebundenen Moleküle Poisson-verteilt mit $\lambda = 1$. Daraus ergibt sich die Wahrscheinlichkeit, daß tatsächlich ein einzelner Strang gebunden wird, zu $W_1 \approx 36,7\%$. Die Wahrscheinlichkeit, daß kein Strang gebunden wird, $W_0 \approx 36,7\%$, ist jedoch genauso groß, und die Wahrscheinlichkeit, daß zwei oder mehr Stränge gebunden werden, $W_{2+} \approx 26,4\%$ ist auch nicht zu vernachlässigen.

Ein einzelner Sequenziersversuch aus Kapitel 4.6.3.3 belegt die Apparatur für etwa 24 h und benötigt einschließlich der Herstellung der beschichteten Spitzen und der sterilen, entgasten Pufferlösungen etwa 5 Arbeitstage. Hinzu kommt das Problem, daß etwa jeder dritte Versuch abgebrochen werden muß, weil sich während des „Rausziehens“ eine Gasblase in der Spitze des Femtotips bildet, die sich auch durch Anlegen von hohen Spannungen (bis 400 V) nicht mehr entfernen läßt. Da noch weitere technische Risiken wie Dejustierung des Detektors, Abbrechen der empfindlichen Fasern oder der Mikrokapillare hinzukommen, scheitern etwa 50% der unternommenen Versuche an derartigen Problemen. Angesichts dieses Aufwandes scheint es kaum vertretbar, sich bereits bei der Selektion des DNS-Stranges auf ein „Glücksspiel“ mit maximal 36,7 % „Gewinnchance“ einzulassen.

Die erste Idee war, inspiriert durch ein in der Literatur beschriebenes Experiment mit streptavidinierten Mikrokugeln in einer optischen Pinzette [Dapprich 1992], das Binden der DNS an die Faserspitze über die Änderung ihrer mechanischen Eigenschaften zu beobachten. Die Faser wird hierzu in ein Nahfeldmikroskop eingebaut und mit der Piezokeramik, die normalerweise dazu dient, den Abstand der Spitze zur Oberfläche zu messen (Scherkrafrückkoppelung), zu Schwingungen von einigen Nanometern Amplitude angeregt. Der Rückkopplungskreis des Nahfeldmikroskops ist unterbrochen, um zu verhindern, daß die Spitze nachgeführt wird, und so die Eintauchtiefe variiert. Über eine optische Projektion wird die Schwingung stark vergrößert auf eine gespaltene Photodiode abgebildet. Die Differenz der Leitfähigkeit der beiden Hälften der Photodiode wird gemessen und liefert ein stark verrauschtes Signal im sub-millivolt Bereich. Das Signal wird in einem Lock-in-Verstärker mit der Wechselfrequenz verstärkt, die die Piezokeramik anregt. Bei geeigneter Wahl der Phasenverschiebung der beiden Spannungen erhält man auf diese Weise ein relativ stabiles Gleichspannungssignal, welches der Schwingungsamplitude proportional ist. Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 4.6.1-1 skizziert. Die verwendete DNS-Lösung war in dem Versuch etwa 10^{-12} M, so daß etwa alle 4 s ein Strang binden sollte. Das Gerät, mit dem das Ausgangssignal des Lock-in-Verstärkers gemessen wurde, wurde jede Sekunde von einem Computerprogramm über die RS232-Schnittstelle ausgelesen und die Werte registriert. Leider konnte kein Unterschied zur Blindprobe festgestellt werden: Innerhalb von 240 Minuten konnte nur das Verdunsten des Lösungsmittels beobachtet werden, welches zu einer langsam steigenden Schwingungsamplitude führt, weil die Faser nicht mehr so weit eintaucht.

Als Alternative wurde ein elektrophoretisches Verfahren erprobt. In einem Vorversuch konnte beobachtet werden, wie mit „Cybr-grün“ interkalierte λ -Phagen-DNS in einen mit einer Anode versehenen Femtotip hereingezogen werden kann. Die DNS besteht aus einem 41kb (das entspricht 13,5 μm B-Helix) langen, kreisförmig geschlossenen Doppelstrang. Der Farbstoff „Cybr-grün“ kann mit einer Quecksilber-Hochdrucklampe im ultravioletten Spektralbereich angeregt werden. Der interkalierte Farbstoff fluoresziert grün. Da das menschliche Auge in diesem Spektralbereich besonders empfindlich ist, gelingt es (unter einem konventionellen Fluoreszenzmikroskop) einem an Dunkelheit adaptierten Beobachter einzelne DNS - Moleküle als etwa 5 μm lange, fadenförmige Gebilde zu erkennen. Taucht man einen mit einer Anode versehenen und mit Puffer gefüllten Femtotip in einen Tropfen Puffer, der interkalierte DNS enthält, so kann man bei etwa 20 V Spannung zwischen der Anode und der in den Tropfen tauchenden Kathode beobachten, daß DNS-Moleküle in die Kapillare gesaugt werden, wenn ihr Abstand von der Öffnung weniger als etwa 10 μm beträgt. Da bei dem Vorversuch der Kapillaraußenraum aus fluoreszierender DNS-Lösung besteht, gelingt es wegen des sehr hohen Untergrundes nicht, die Zahl der hereingezogenen Moleküle an der Einzelmolekülanlage zu bestimmen. Daher wurde die DNS-Lösung in einen zweiten Femtotip, den „Gegenfemtotip“ gefüllt und dieser mit einer zweiten Mikropositioniereinheit („Newport-Block“) so positioniert, daß seine Öffnung in unmittelbarer Nähe der Öffnung des Femtotips, in dem die Sequenzierreaktion stattfindet, ist. Die beiden Femtotips tauchen in Glycerin, welches aufgrund seiner hohen Viskosität störende Schwingungen der Kapillarspitzen dämpft. Der Versuchsablauf ist in Abbildung 4.6.1-2 illustriert. Der Aufbau unterscheidet sich von dem in Kapitel 4.5 verwendeten nur durch die streptavidinierte Faser zum Fixieren der „reingezogenen“ biotinylierten DNS.

Während des „Reinziehens“ wurde der Anregungslaser auf ca. 100 μW , das ist etwa $\frac{1}{4}$ der normalerweise verwendeten Leistung abgeschwächt, um zu vermeiden, daß der Fluoreszenzfarbstoff bereits in diesem Versuchsabschnitt photozerstört wird.

Anschließend wird der Gegenfemtotip aus dem Glycerin entfernt, und ungebundene DNS sowie adsorbierte Monophosphate elektrophoretisch entfernt. Die Sequenzierreaktion wird, wie in Abschnitt 4.6.3.3, durch Zugabe von Magnesiumacetat in den Kapillaraußenraum gestartet. Diese Zugabe definiert den Nullpunkt der Zeitachse.

Insgesamt wurden 14 Sequenzierversuche mit vorangehender elektrophoretischer Handhabung durchgeführt. Von diesen scheiterten vier an Luftblasen, die den Sequenzierfemtotip irreversibel verstopften, einer an einer abgebrochenen Kapillare und zwei an nicht offensichtlichen Ursachen. Die Ergebnisse der 7 „erfolgreichen“ Versuche werden in der Reihenfolge fallender Sequenzierereignisanzahlen wiedergegeben.

Die Ereigniserkennung erfolgte bei allen Versuchen mit denselben Parametern (abgesehen vom Gate, das von der Lage des Laserpulses im Zeitfenster abhängt), um eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Ursprünglich wurde jeder Versuch mit ein wenig anderen Schwellen ausgewertet. Diese wurden nach den in Kapitel 4.3 angegebenen Methoden ermittelt. Die absoluten Ereigniszahlen weichen bei dieser individuellen Auswertung jedes Einzelversuchs von den hier angegebenen etwas ab, die Ergebnisse bleiben aber qualitativ gleich.

Tabelle 4.6.3.5-1 gibt die Parameter zur Ereigniserkennung an:

	Datum der Ausführung	unterer Kanal des Gate	oberer Kanal des Gate
Versuch 1	2000-08-31	5	60
Versuch 2	2000-09-02	6	60
Versuch 3	2000-09-14	7	60
Versuch 4	2000-03-21	8	60
Versuch 5	2000-05-10	8	60
Versuch 6	2000-08-29	8	60
Versuch 7	2000-04-11	7	60
DNS bei hoher Anregungsleistung ($P \geq 250 \mu\text{W}$)			
Glättfilter	Fensterbreite w		40,5 ms
	Lee-Parameter S_0		100 kHz
Erkennungsschwelle			60 kHz
Startschwelle			7 kHz
Trennschwelle			50 %
DNS bei niedriger Anregungsleistung ($P \leq 150 \mu\text{W}$)			
Glättfilter	Fensterbreite w		40,5 ms
	Lee-Parameter S_0		60 kHz
Erkennungsschwelle			20 kHz
Startschwelle			3 kHz
Trennschwelle			50 %
Mononucleotide bei hoher Anregungsleistung ($P \geq 250 \mu\text{W}$)			
Glättfilter	Fensterbreite w		3,5 ms
	Lee-Parameter S_0		60 kHz
Erkennungsschwelle			12 kHz
Startschwelle			3 kHz
Trennschwelle			50 %

Tabelle 4.6.3.5-1 Parameter zur Fluoreszenzereigniserkennung

1. Versuch (2000-08-31)

Der Femtotip enthielt Pufferlösung (67,4 % bidest. Wasser, 30 % Glycerin, 2,1 % PVP, 0,5 % Tween 20, 30 mM Tris, 20 mM Borsäure, pH = 8,5) mit einer Exonucleaseaktivität von 0,4 U/ μl (entsprechend etwa 2×10^{-8} M ExoI) und 1 mM EDTA-Na als Inhibitor. Im „Gegenfemtotip“ befand sich ca. 10^{-8} M DNS-Lösung im gleichen Puffer (ohne Exo I).

Vor dem eigentlichen Versuch wurde eine Blindprobe durchgeführt: An die Elektrode im Femtotip wurde für 308 s eine Spannung von -15 V gegen die Außenelektrode gelegt, und die Fluoreszenz bei $315 \mu\text{W}$ Anregungsleistung gemessen. Als Durchschnittsrate ergab sich 4,75 kHz bei einer Ereignisfrequenz (bestimmt mit Gate = 05-60, Glättfilter $w = 3,5$ ms, $s_0 = 60$ kHz, Schwellen $\text{erk} = 12$ kHz, $\text{sta} = 3$ kHz, $\text{tre} = 50$ %) von 11 Hz. Dieser hohe Untergrund (normal wäre max. 1 Hz Ereignisfrequenz bei 3 kHz Durchschnittszählrate) war auf an der Faser adsorbierte Verunreinigungen zurückzuführen und nicht auf eine Kontamination des Puffers, wie der deutliche Rückgang der Ereignisfrequenz im Laufe der Messung zeigte (Abbildung 4.6.3.5-1):

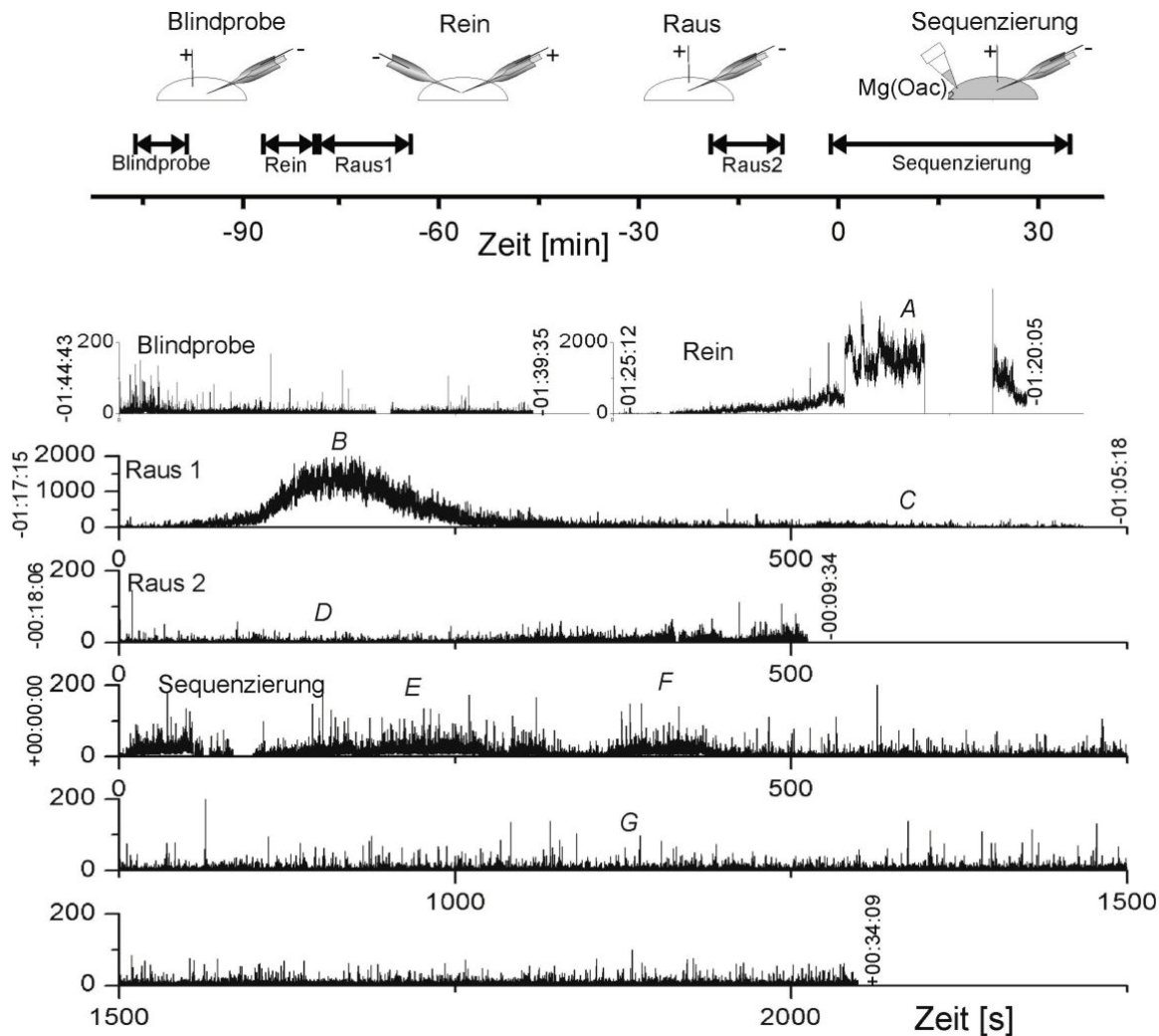


Abbildung 4.6.3.5-1 MCS-Spuren des ersten Versuchs.

Der Beginn und das Ende jeder Messung ist, bezogen auf die Zugabe des Magnesiumacetats, neben den Spuren in Stunden:Minuten:Sekunden vermerkt. Die kursiv gedruckten Großbuchstaben geben die Zeitpunkte an, an denen die in Abbildung 4.6.3.5-2 gezeigten Autokorrelationsfunktionen des Detektorsignals errechnet wurden.

Bei diesem ersten Versuch mit viel DNS wurde das „Reinziehen“ bei 315 μ W Anregungsleistung beobachtet. Die „Rein-“ Messung dauerte 308 s. 10s nach Beginn der Messung wurde an die Elektrode im Femtotip eine Spannung von +15V gegen die Elektrode im „Gegenfemtotip“ gelegt, 10 s vor ihrem Ende wurde die Spannung abgeschaltet und beide Elektroden mit der Außenelektrode kurzgeschlossen. Da die Zählrate während des „Reinziehens“ über 2 MHz anstieg, wurde der Laserstrahl zwischen 232 s und 282 s abgeblockt, um eine Überhitzung und damit eine Beschädigung des Detektors zu vermeiden. Danach wurde der Gegenfemtotip entfernt und an die Femtotipelektrode -15 V Spannung gegen die Außenelektrode gelegt. Die Zählrate erreichte 160 s nach Anlegen der Spannung ihr Maximum von etwa 1,8 MHz, anschließend fiel sie wieder rasch ab. Nach 700 s betrug sie noch 11,2 kHz. Nach insgesamt 1h:17' war sie auf 7 kHz abgefallen. Den ca. 500 μ l Glycerin im Kapillaraußenraum wurden 100 μ l 0,1 M Magnesiumacetat in Pufferlösung (ohne Exo I und ohne EDTA) gegeben. Die Zählrate begann sofort anzusteigen und erreichte 6 s nach der Zugabe 25 kHz. Nach 49 s erreichte sie das Maximum von 52 kHz. Nach 500s war

sie auf 6-7 kHz zurückgegangen und blieb bis zum Ende der Messung nach 2050 s in diesem Bereich.

Eine Auswertung mit Hilfe des Fluoreszenzereigniserkennungsprogrammes ist wegen der zu hohen Farbstoffkonzentration bei der „Rein“ Messung, der „Raus1“ Messung und der „Sequenzierung“ bei Zeiten < 550 s nicht möglich. Bei der Raus2-Messung beträgt die Ereignisfrequenz etwa 16 Hz, am Ende der Sequenzierung ergeben sich etwa 5 Hz Ereignisfrequenz.

Interpoliert man den Bereich während der „Rein“ Messung, in dem der Laser zum Schutz des Detektors abgeblockt war, mit einer Zählrate von etwa 2 MHz, so ergeben sich während des „Reinziehens“ mindestens $2,1 \times 10^8$ Fluoreszenzphotonen. Während des „Rausziehens“ erhält man abzüglich des Untergrundes etwa $1,58 \times 10^8$ Fluoreszenzphotonen. Die „Sequenzierung“ weist gegenüber dem Untergrund einen Überschuß von $1,1 \times 10^7$ Photonen auf. Wenn der Durchtritt eines PCR-Produkts zu einem Ereignis mit im Mittel 5000 Photonen führt, so ergibt das etwa 40000 hereingezogene und 32000 herausgezogene DNS-Stränge. Der Durchtritt eines markierten Mononucleotids führt zu einem Ereignis mit im Mittel ungefähr 160 Photonen. Das ergibt für die Sequenzierung etwa 70500 Mononucleotide, entsprechend etwa 1200 abgebauten DNS-Strängen mit je 60 Markierungen. Die Differenz der Anzahlen herein- und herausgezogener Stränge beträgt mit ca. 8000 demnach in etwa das Siebenfache dieses Wertes.

Die Ereignisbreite ist wegen der zu hohen Fluorophorkonzentration nicht aus der Einzelmolekülstatistik zugänglich. Deshalb wird hierzu die normierte Autokorrelationsfunktion der MCS-Spur herangezogen. Dabei müssen die Abschnitte, in denen die Korrelation errechnet wird, so gewählt sein, daß die Durchschnittsrate in etwa konstant ist. Errechnet man die Korrelationsfunktionen aus der gesamten Spur, so geht die diffusive Schwankung der Intensität in der Konzentrationsschwankung unter. Bei den in Abbildung 4.6.3.5-2 gezeigten Korrelationsfunktionen ist dies berücksichtigt. Die bei einigen der gezeigten Korrelationsfunktionen beobachtete Restamplitude ist auf diesen Effekt zurückzuführen.

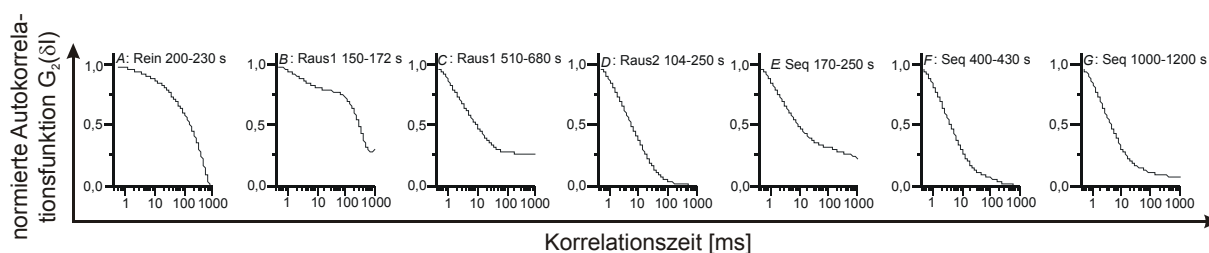


Abbildung 4.6.3.5-2 Korrelationsfunktionen zu verschiedenen Zeitpunkten des Versuches.

Es ist deutlich erkennbar, daß zum Zeitpunkt A das Signal überwiegend aus breiten Ereignissen ($\tau_{\text{kor}} > 100$ ms) besteht. Zum Zeitpunkt B ergibt sich eine Mischung breiter und schmalere ($\tau_{\text{kor}} \approx 2$ ms – 10 ms) Ereignisse. Im weiteren Verlauf des Versuches (C-G) treten keine breiten Ereignisse mehr auf. Assoziiert man die breiten Ereignisse mit nicht abgebauter DNS und die schmalen Ereignisse mit Mononucleotiden, so entspricht dies den Erwartungen.

2. Versuch (2000-09-02)

Da bei der Blindprobe vor Versuchsbeginn auf der MCS-Spur sehr viele Ereignisse zu sehen waren, wurde nach der ersten Blindprobe die Spannung (-15 V an der Femtotip-Elektrode gegen die Außenelektrode) für weitere 25 Minuten angelegt und anschließend eine zweite Blindprobe gemessen (Abbildung 4.6.3.5-3).

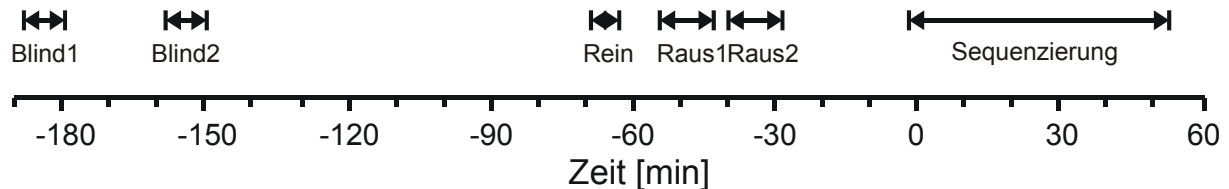


Abbildung 4.6.3.5-3 Zeitlicher Ablauf des zweiten Versuches
Abgesehen von der „Rein“ Messung und dem Zeitpunkt der Zugabe des Magnesiumacetats zu Beginn der „Sequenzierung“ lagen ständig -15 V an der „Femtotip-“ elektrode gegen die Außenelektrode

Bei der anschließenden Auswertung erwiesen sich die meisten Ereignisse der Blindprobe als Streulicht (z.B. unter dem Mikroskop nicht sichtbare Luftblasen) (s. Abbildung 4.6.3.5-4).

Beim ersten Versuch des Kapitels 4.6.3.5 wurde zu viel DNS hereingezogen. Deshalb wird bei diesem Versuch die Lösung im „Gegenfemtotip“ um den Faktor 10 verdünnt; sie ist demnach ca. 10^{-9} M an markierter DNS. Der Puffer im Femtotip ist der gleiche, wie beim vorangegangenen Versuch. Während des „Reinziehens“ wurde die Anregungsleistung, gemessen vor der Eintrittspupille des Objektivs, auf 118 μ W reduziert. 10 s nach Beginn der „Rein-“ Messung wird an die Elektrode im Femtotip eine Spannung von +15 V gegen die Elektrode im „Gegenfemtotip“ angelegt. 100 s nach Beginn der Messung wird der „Gegenfemtotip“ mit der Außenelektrode kurzgeschlossen; 150 s nach Beginn der Messung werden die Elektroden von der Spannungsquelle getrennt und miteinander kurzgeschlossen. Zum „Rausziehen“ wird der „Gegenfemtotip“ entfernt, an den Femtotip wird eine Spannung von -15 V gegen die Außenelektrode angelegt. Die Anregungsleistung beträgt dabei 280 μ W.

Die „Sequenzierung“ wird durch Zugabe von 100 μ l 1 M Magnesiumacetat in Pufferlösung (ohne EDTA und ohne Exo I) zum Glycerin gestartet. Die freigesetzten Mononucleotide werden bei 280 μ W Anregungsleistung detektiert.

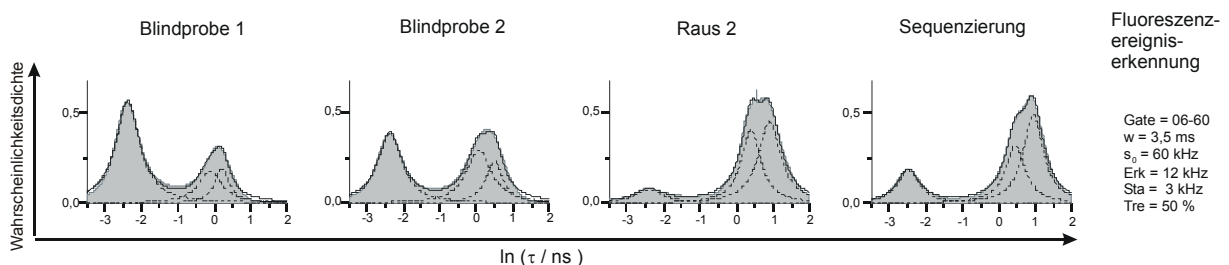


Abbildung 4.6.3.5-4 Abklingdauerverteilungen der Ereignisse beim zweiten Versuch
Die Verteilungsfunktionen sind als hellgraue Flächen dargestellt. Die schwarzen Linien zeigen die 3-Puls-Lorentzfits an die Verteilungen. Man erkennt, daß in allen Phasen des Versuches ein erheblicher Anteil der Ereignisse aus Streulicht besteht ($\ln \tau < -1 \Leftrightarrow \tau < 0,37$ ns). Bei den Blindproben ist dieser Anteil am höchsten.

Messung	Dauer [s]	Ereignisse	3-Puls-Lorentz-Fit										
			χ^2	R^2	Streulicht			Cy5-dCMP			Mr121-dUMP		
					X_{C1}	W_1	A_1	X_{C2}	W_2	A_2	X_{C3}	W_3	A_3
Blind1	307	4814	1,7E-4	0,992	-2,38	0,71	0,80	-0,11	0,23	0,80	0,21	0,15	0,49
Blind2	307	2213	1,6E-4	0,991	-2,38	0,49	0,81	0,07	0,39	0,83	0,50	0,21	0,56
Raus2	512	513	1,1E-4	0,996	-2,40	0,12	1,03	0,39	0,41	0,64	0,90	0,53	0,74
„Sequenzierung“	3072	1797	8,0E-5	0,997	-2,49	0,21	0,72	0,45	0,34	0,66	0,95	0,52	0,66

Tabelle 4.6.3.5-2 Lorentzpulse aus Abbildung 4.6.3.5-4.

Die Abklingdauern von $\ln(\tau/ns)=0,42$ (entsprechend 1,5 ns) für Cy5-dCMP und $\ln(\tau/ns)=0,92$ (entsprechend 2,5 ns) für Mr121-dUMP (Tabelle 4.6.3.5-2) sind verglichen mit Ensemble-Messungen etwas zu hoch: Für Cy5 erwartet man 1,3 ns und für Mr121 2,0 ns. Das Peakflächenverhältnis von Cy5 und Mr121 beträgt sowohl bei der „Raus2“ als auch bei der „Sequenzierung“ –Messung etwa 1:1.

Aufgrund seiner Fluoreszenzabklingdauer wird jedes Ereignis folgendermaßen klassifiziert:

Streulicht	$\ln(\tau/ns) < -1,0$	($\tau < 0,37$ ns)
Cy5-dCMP	$-1,0 \leq \ln(\tau/ns) < 0,6$	($0,37$ ns $\leq \tau < 1,8$ ns)
Mr121-dUMP	$0,6 \leq \ln(\tau/ns)$	($1,8$ ns $\leq \tau$)

Abbildung 4.6.3.5-6 zeigt den Verlauf des zweiten Versuches. Während der ersten Blindprobe funktioniert die Ereigniserkennung nicht, da über 90 % der Bins mehr Photonen als die Startschwelle (3 kHz) enthalten. Während der „Rein“-Messung war die Anregungsleistung auf 118 μ W abgeschwächt, während der anderen Messungen betrug sie 280 μ W.

Die verwendete Ereigniserkennung identifizierte beim „Reinziehen“ 203 Ereignisse mit insgesamt $2,7 \times 10^6$ Fluoreszenzphotonen. Offenbar versagte die Ereigniserkennung hier, weil soviel DNS hereingezogen wurde, daß die DNS-Stränge das Detektionsvolumen nicht einzeln und nacheinander passierten.

Beim „Rausziehen“ wurden 349 Ereignisse mit $0,83 \times 10^6$ Fluoreszenzphotonen (entsprechend 2370 Photonen/Strang) detektiert.

Berücksichtigt man die um den Faktor 2,37 verringerte Anregungsleistung beim Hereinziehen, so ergeben sich aus der Photonenzahl etwa $2,7 \times 10^6 \times 2,37 / 2370 = 2700$ „herein-gezogene“ DNS-Stränge. Die Differenz der Anzahlen herein- und herausgezogener Stränge beträgt nach dieser Rechnung etwa 2500 Stränge. Bei der anschließenden Sequenzierung sind daher im Idealfall $2500 \times 60 = 1,5 \times 10^5$ abgebaute markierte Mononucleotide zu erwarten.

Bis zum Ende der Messung (3000 s nach Zugabe des Magnesiums, dann war die Festplatte des Meßrechners voll: 3000×264 kb = 773 Mb), wurden 1797 Ereignisse detektiert, wovon 432 als Streulicht verworfen wurden. Von den verbleibenden 1365 wurden aufgrund ihrer Fluoreszenzabklingdauer 475 als Cy5-dCMP und 890 als Mr121-dUMP klassifiziert.

Am Ende der Messung beträgt die Ereignisfrequenz $1/AA_{30}(\Delta t)$ mit 0,62 Hz immer noch deutlich mehr als direkt nach der Magnesiumzugabe (0,07 Hz), aber weniger als zu Beginn des Anstiegs (1,0 Hz; Spitzen bis 6 Hz).

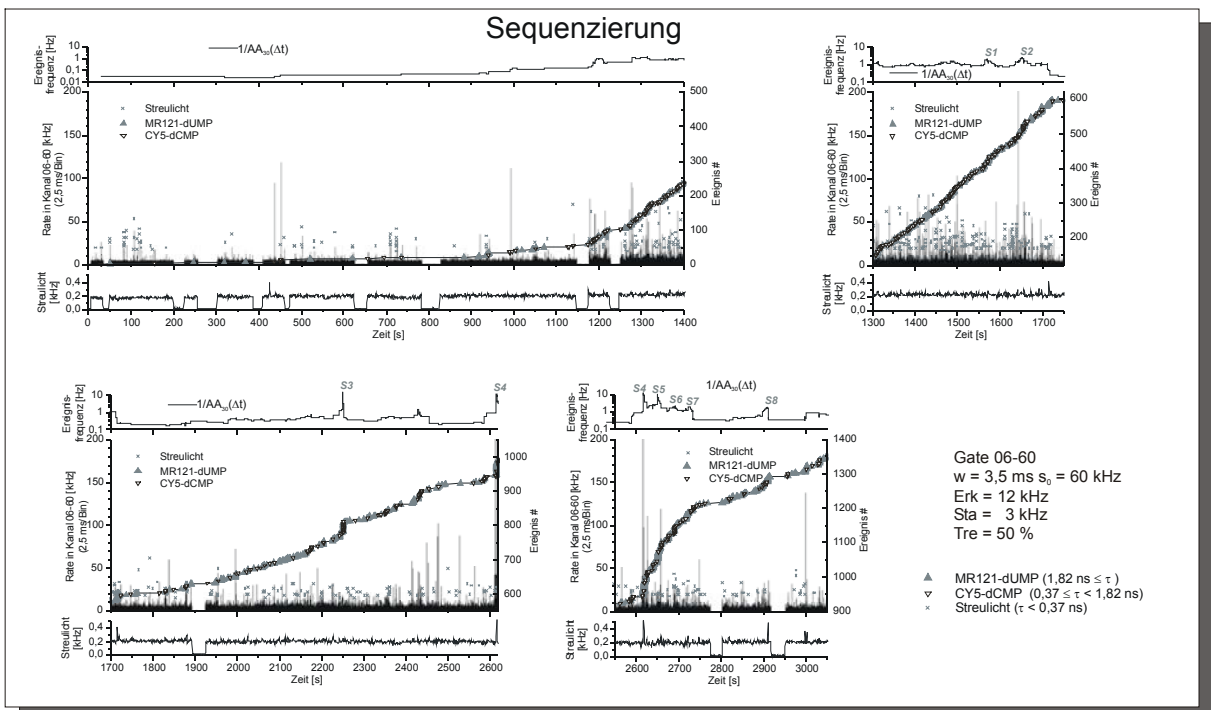
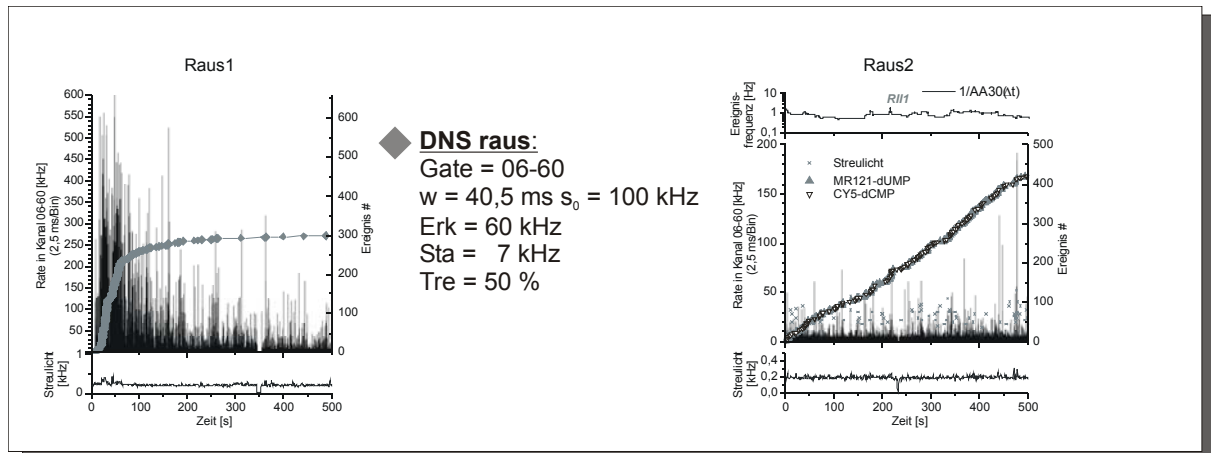
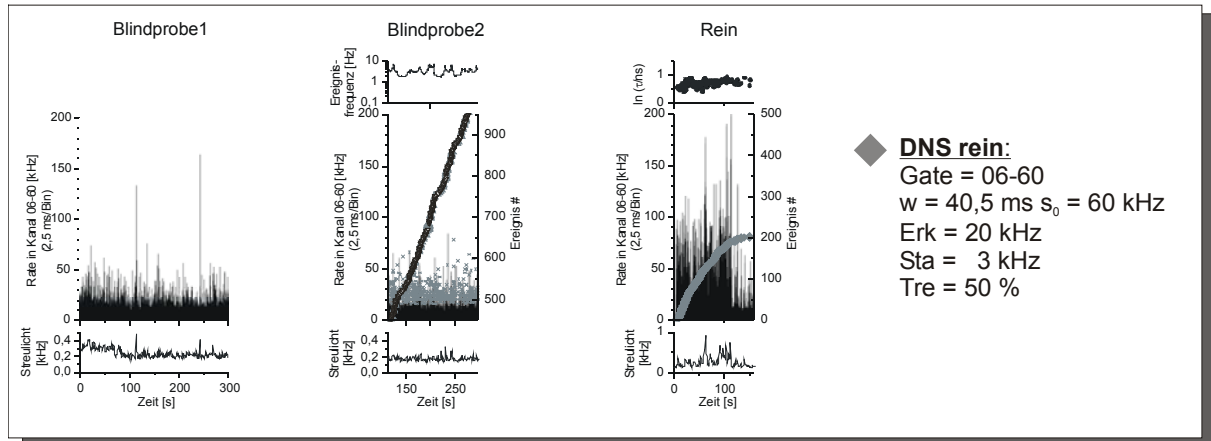


Abbildung 4.6.3.5-5 Verlauf des zweiten Versuches:

1200 s nach Zugabe des Magnesiumacetats kommt es zu einem deutlichen Anstieg der Ereignisfrequenz von unter 0,1 Hz auf über 1 Hz. Die über 60 Ereignisse gemittelte Frequenz übertrifft die mittlere Ereignisfrequenz an mehreren Stellen um mehr als das zehnfache.

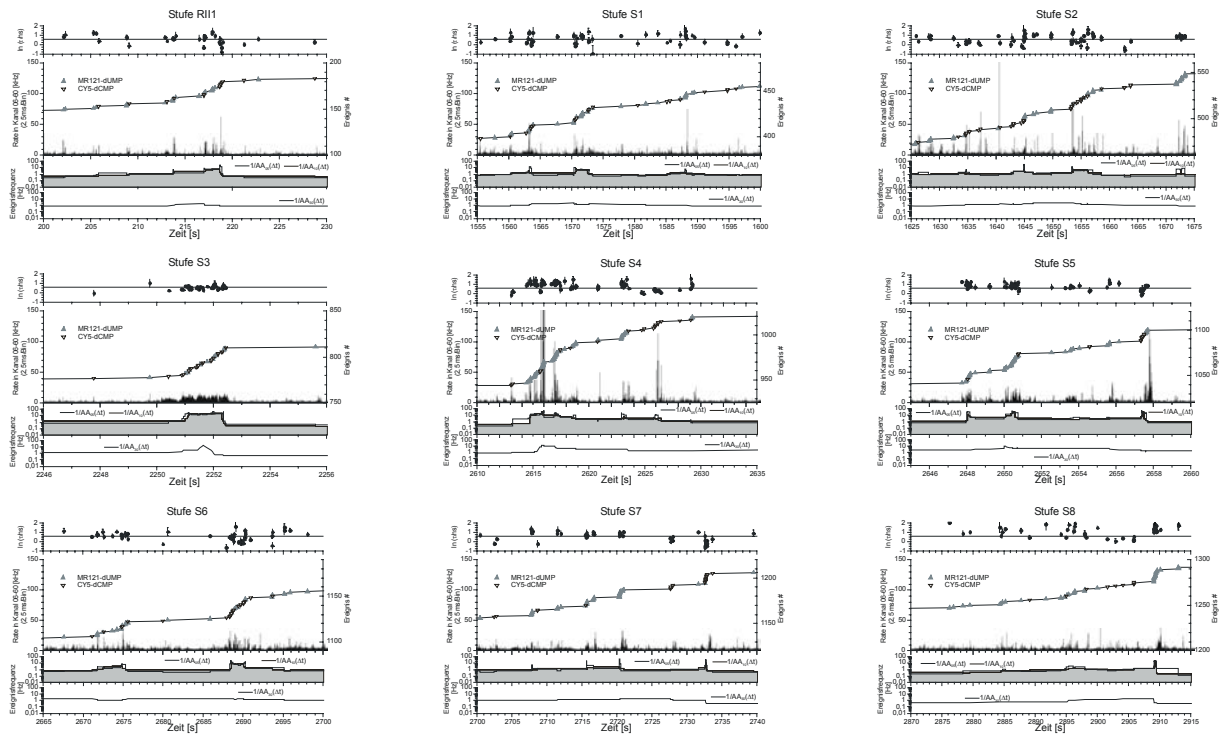


Abbildung 4.6.3.5-6 Stufen in den Ereigniskurven des zweiten Versuchs

3. Versuch (2000-09-14)

Bei diesem Versuch befindet sich wiederum ca. 10^{-9} M DNS-Lösung im Gegenfemtotip. Den ca. 500 μ l Glycerin im Kapillaraußenraum ist 1 μ l 0,5 M EDTA in Wasser zugesetzt. Im Femtotip befinden sich ca. 20 μ l der Puffermischung mit einer durch 1mM EDTA inhibierten Exonucleaseaktivität von 0,4 U/ μ l.

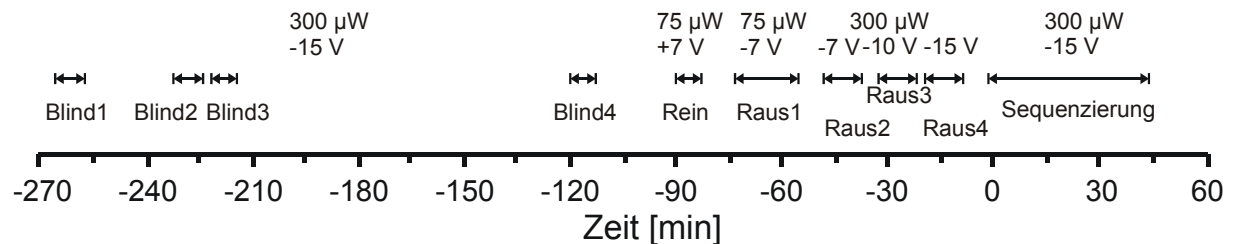


Abbildung 4.6.3.5-7 Zeitlicher Ablauf des dritten Versuches

Um die beim letzten Versuch (4.6.3.5-2) aufgetretenen Probleme mit Luftblasen zu vermeiden, wurde vor dem Beginn des Versuches bei eingebauter Faser 3¼ Stunden lang eine Spannung von -15 V an die Femtotip-Elektrode gegen die Außenelektrode gelegt und insgesamt 4 Blindproben bei 300μ W Anregungsleistung gemessen. Zum „Reinziehen“ der DNS wurden $+7$ V Spannung an die Femtotip-Elektrode gegen den „Gegenfemtotip“ angelegt, die Anregungsleistung wurde auf 75μ W reduziert. Danach wurde die Spannung 12 min lang abgeschaltet, um der biotinylierten DNS Zeit zum Binden zu geben. Anschließend wurde -7 V Spannung an die Femtotip-Elektrode gegen die Außenelektrode gelegt und bei gleicher Anregungsleistung die austretende DNS beobachtet. Danach wurde die Anregungsleistung auf 300μ W erhöht und die adsorbierten Fluorophore bei -7 V, -10 V und -15 V gegen die Außenelektrode entfernt.

Anschließend (ca. 4½ h nach dem Beginn der ersten Blindprobe, bzw. 1¼ h nach Beginn der ersten Raus-Messung) wurde die Spannung kurz abgeschaltet, und dem Glycerin im Kapillaraußenraum ca. 200 µl 1M Magnesiumacetat in Glycerin zugesetzt. Nachdem die Lösung im Kapillaraußenraum durchmischt war, wurde die Messung „Sequenzierung“ gestartet und die Spannung wieder angelegt.

Die Abklingdauerverteilungen sind für verschiedene Ereigniserkennungsparameter in Abbildung 4.6.3.5-8 gezeigt:

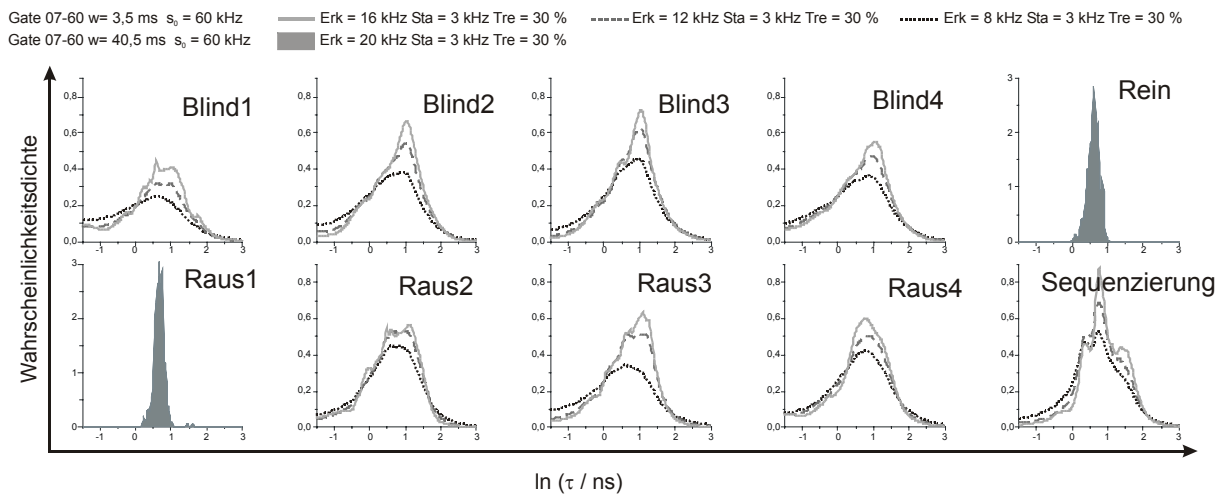


Abbildung 4.6.3.5-8 Abklingdauerverteilungen beim dritten Versuch

Sowohl die Blindproben als auch die eigentlichen Experimente enthielten bei diesem dritten Versuch im Gegensatz zum zweiten kaum Streulichtereignisse.

Bei der Sequenzierung trat jedoch im Abklingdauerhistogramm ein dritter Peak bei langen Abklingdauern auf.

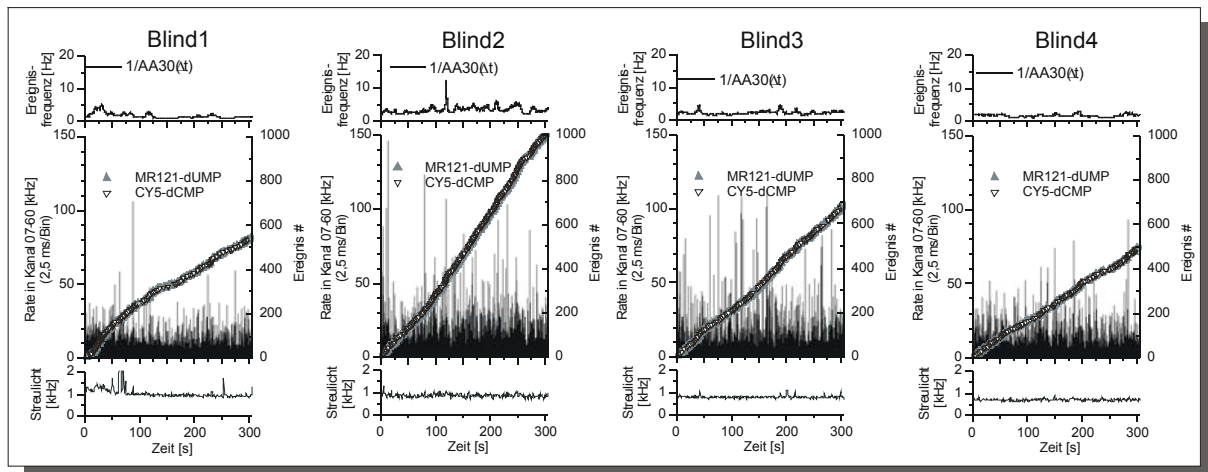
Als Klassifizierungsschwellen ergeben sich:

$$-1 \leq \ln(\tau/\text{ns}) < 0,58$$

$$0,58 \leq \ln(\tau/\text{ns}) \leq 1,6$$

$$\text{Cy5-dCMP} \quad (0,37 \text{ ns} \leq \tau < 1,79 \text{ ns})$$

$$\text{Mr121-dUMP} \quad (1,79 \text{ ns} \leq \tau < 4,95 \text{ ns})$$



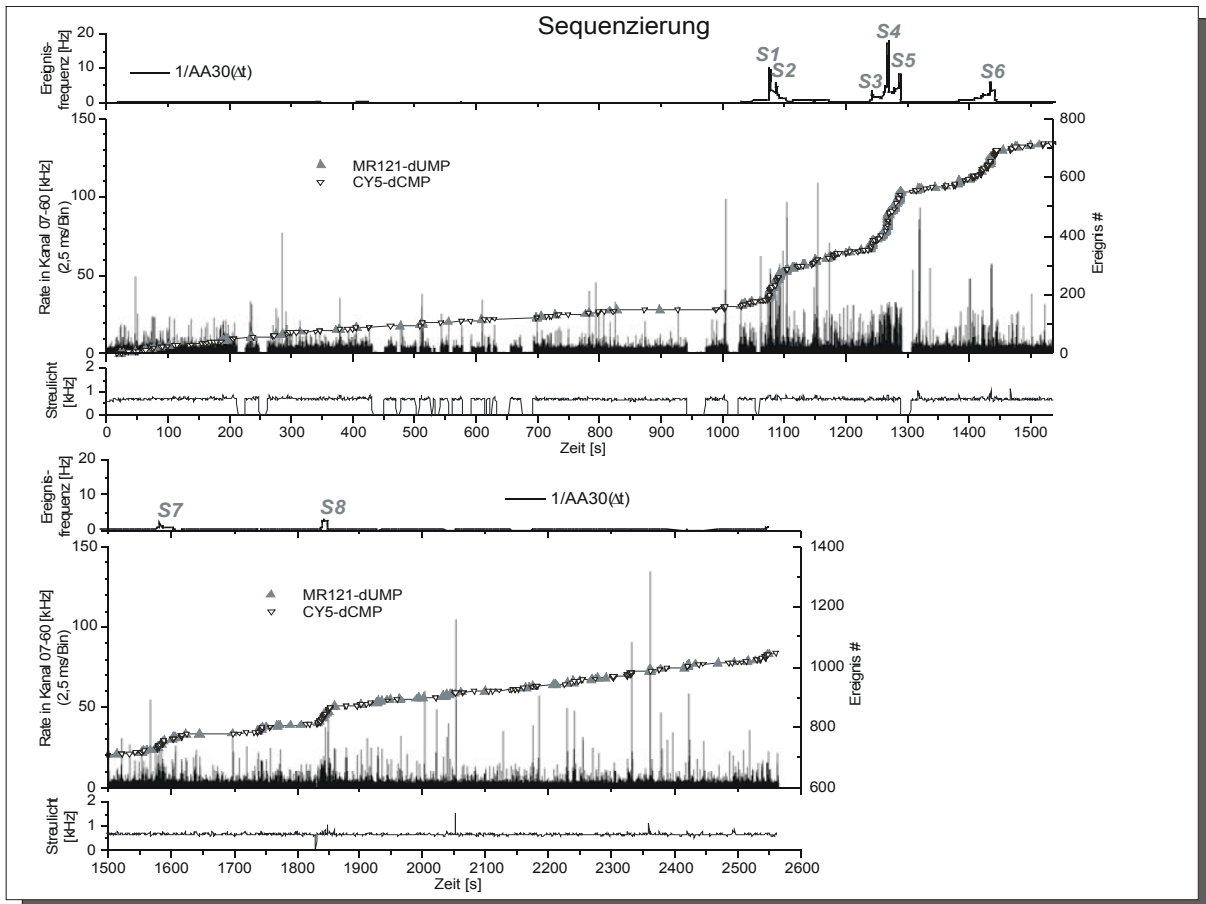
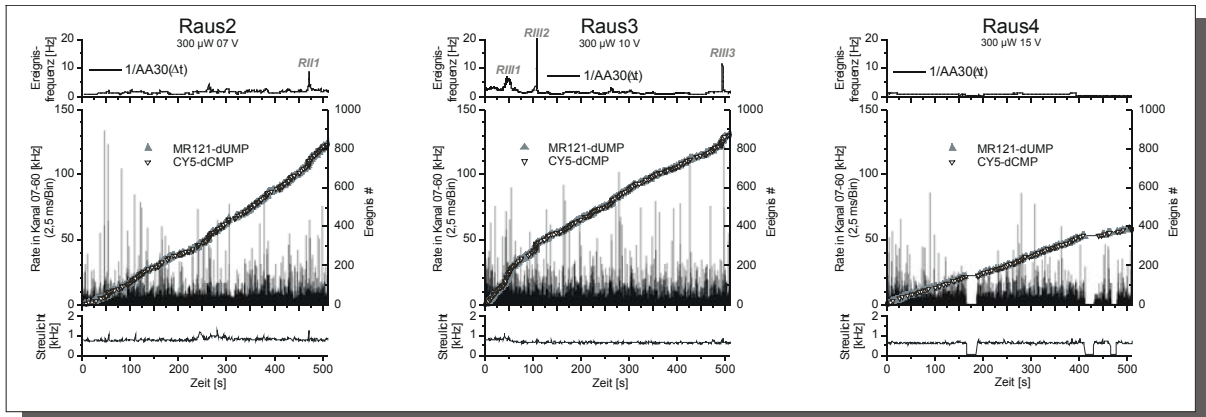
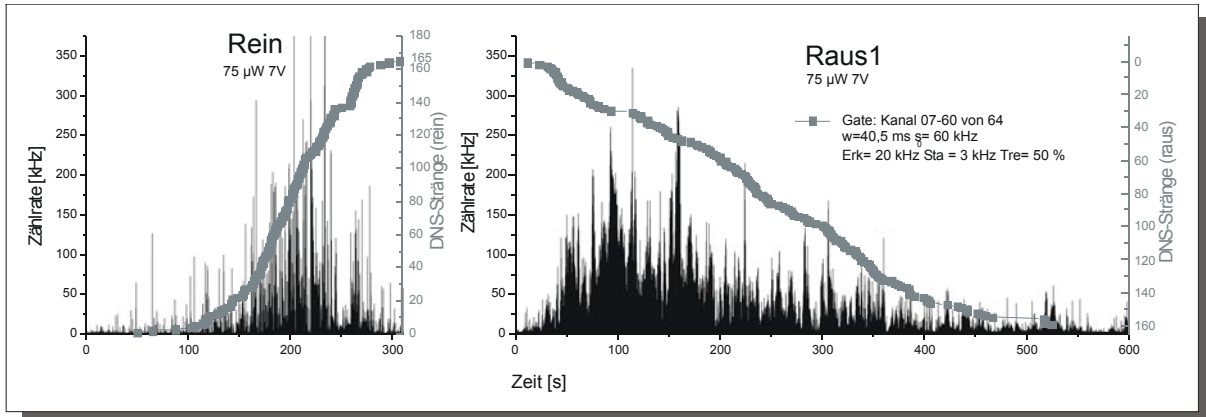


Abbildung 4.6.3.5-9 Ereignisfrequenzen, MCS-Spuren, Ereigniskurven und mittlere Streulichtintensität während des dritten Versuches

Die Ereignisfrequenz der Blindprobe (ohne DNS, bei eingebauter Faser) steigt von der ersten zur zweiten Messung im Mittel zunächst an, fällt dann aber bei der dritten und vierten Messung wieder ab. Am Ende der Blindproben beträgt sie $500 \text{ Ereignisse} / 307 \text{ s} = 1,6 \text{ Hz}$ (Abbildung 4.6.3.5-9, oben).

Es fällt auf, daß die Ereigniskurve der „hereingezogenen“ DNS-Stränge eine Symmetrie zu der der „herausgezogenen“ aufweist (Abbildung 4.6.3.5-9, zweite Zeile). Als Differenz ergeben sich nach dieser Auswertung $165 - 159 = 6$ DNS-Stränge. Nach den Ergebnissen des Kapitels 4.5 sollte man aber nicht erwarten, daß tatsächlich genau 6 Stränge an der Faser gebunden haben, sondern das Resultat eher als Abschätzung auffassen.

Während der drei folgenden „Raus-“ Messungen (Abbildung 4.6.3.5-9, dritte Zeile von oben) sinkt die Ereignisfrequenz von zunächst etwa $1,6 \text{ Hz}$ bis $1,8 \text{ Hz}$ auf ca. $0,8 \text{ Hz}$. Während in der „Raus 2“ und „Raus 3“ –Messung insgesamt vier Ereignisfrequenzspitzen (RII1,RIII1-3) auftreten, findet man bei der „Raus 4“ - Messung (im Gegensatz zur Sequenzierung) keine.

Nach Zugabe des Magnesiumacetats liegt die Ereignisfrequenz zunächst 1000 s lang relativ konstant bei $0,2 \text{ Hz}$. Anschließend steigt die Ereigniskurve sprunghaft und in etwa 8 Stufen von ca. 200 auf ca. 870 an (Abbildung 4.6.3.5-9, unten). Die Stufen sind in der Auftragung von $1/AA_{30}(\Delta t)$ gegen die Zeit besonders gut erkennbar. Die mittlere Flankensteigung der Stufen liegt zwischen $1,3$ und $11,3 \text{ Hz}$, der Mittelwert über die 8 Stufen beträgt $5,2 \text{ Hz}$. Die maximalen Steigungen über 61 Ereignisse liegen zwischen $2,2$ und $17,9 \text{ Hz}$.

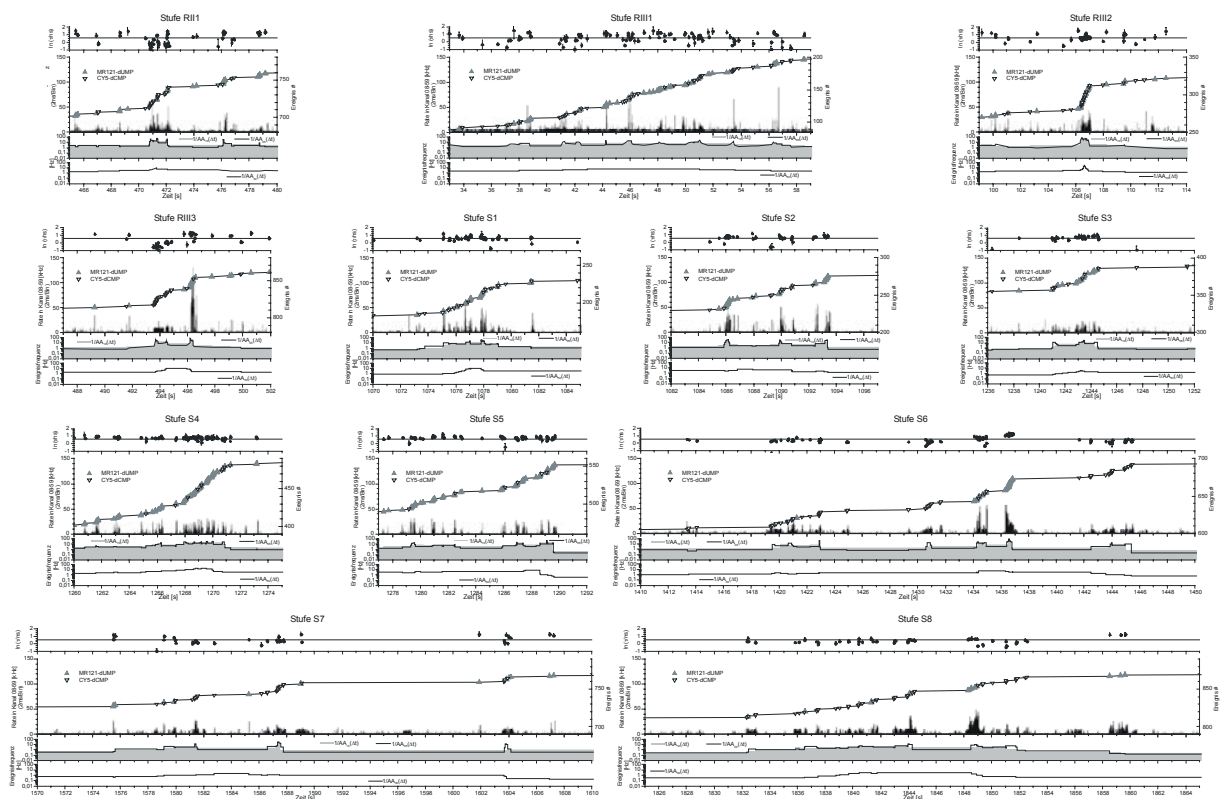


Abbildung 4.6.3.5-10 Stufen im Sequenzierlauf des dritten Versuches.

Unten ist jeweils die mittlere Frequenz über 61 Ereignisse ($1/AA_{30}(\Delta t)$) aufgetragen. Um Schwankungen in der Flankensteigung der Stufen (Etappen) hervorzuheben sind darüber die mittlere Frequenz über 21 und 11 Ereignisse ($1/AA_{10}(\Delta t)$ und $1/AA_{05}(\Delta t)$) dargestellt. Die oberen beiden Zeilen der Teilgraphiken zeigen jeweils den Logarithmus der abgeschätzten Fluoreszenzabklingdauer, die MCS-Spur und die Ereigniskurve.

Nach 1900 s treten (in der Meßzeit) keine weiteren Stufen mehr auf. Die Ereignisfrequenz liegt am Ende mit 0,25 Hz in der Größenordnung der Ereignisfrequenz, die direkt nach Magnesiumzugabe beobachtet wurde.

Abbildung 4.6.3.5-10 zeigt die im dritten Versuch auftretenden Stufen vergrößert. Die meisten Stufen weisen keine konstante Steigung auf, sondern zerfallen ihrerseits in kleinere Etappen: Die Stufen RIII2, S4 und S8 verlaufen relativ gleichmäßig, die Stufen RIII3, S2, S3, S6 und S7 hingegen sprunghaft

Da die Faserspitze bei diesem Versuch relativ lang und dünn war, gelang es nach dem Ende des Experimentes, diese mit einer Mikrometerschraube bis ins Detektionsvolumen vorzuschieben und die Fluoreszenzabklingkurven an verschiedenen Positionen der Faser zu messen (Abbildung 4.6.3.5-11).

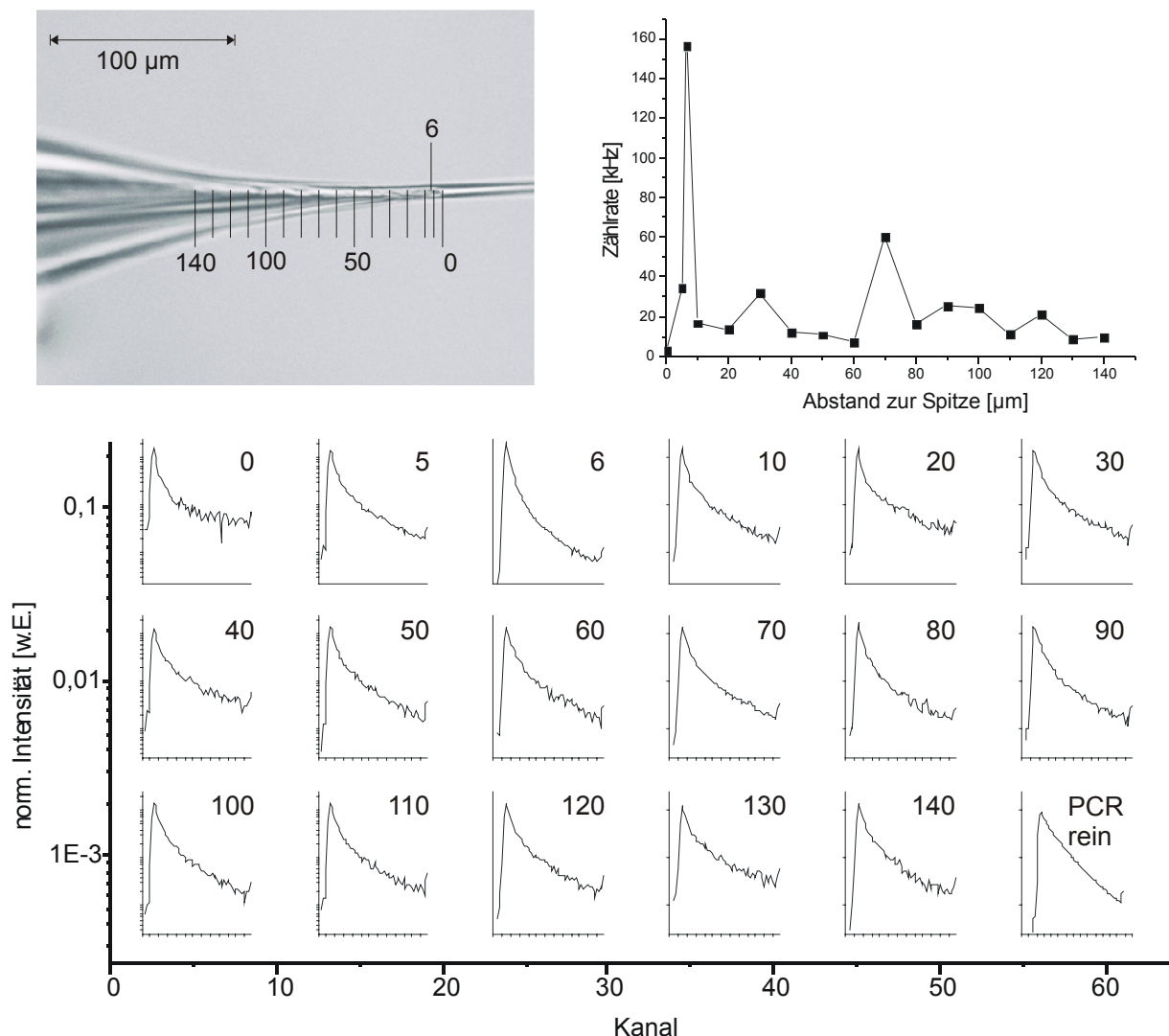


Abbildung 4.6.3.5-11 Zählraten und Abklingkurven, die nach Abschluß des Versuchs an verschiedenen Positionen der Faser gemessen wurden. Zum Vergleich ist die gemittelte Abklingkurve der PCR-Ereignisse in Lösung gezeigt.

Die Signalintensität an (oder unmittelbar vor) der Spitze beträgt 3,03 kHz, das entspricht dem Untergrundwert im Femtotip bei etwa 300 µW. Schiebt man die Faser weiter vor, so durchläuft die Zählrate etwa 6 µm hinter der Spitze ein scharfes Maximum von 170 kHz,

weiter hinten beträgt die Zählrate ca. 20 kHz. Die Fluoreszenzabklingkurven, die an der Faser gemessen wurden, können durch eine monoexponentielle Funktion nicht befriedigend beschrieben werden.

Das Maximum an der Faserspitze ist ein Indiz dafür, daß nicht jeder an der Faser gebundene Strang bei der „Sequenzierung“ auch abgebaut wird.

4. Versuch (2000-03-21)

Vor dem Versuch wurden zwei Blindproben durchgeführt: eine ohne eingebaute streptavidinierte Faser und eine mit der Faser. Dazu wurden -15 V Spannung an die Femtotip-Elektrode gegen die Außenelektrode angelegt und die austretenden Fluorophore je 100 s lang bei $400\text{ }\mu\text{W}$ Anregungsleistung gemessen.

Die DNS-Lösung im Gegenfemtotip wurde für diesen Versuch nochmals um den Faktor 10 verdünnt, sie ist also ca. 10^{-10} M an PCR-Produkten. Zusätzlich enthält der Puffer im Gegenfemtotip 5 mM EDTA. Im Femtotip befinden sich ca. $20\text{ }\mu\text{l}$ der Puffermischung mit einer durch 5 mM EDTA inhibierten Exonucleaseaktivität von $0,4\text{ U}/\mu\text{l}$.

Zum „Reinziehen“ der DNS wurden $+3\text{ V}$ Spannung an die Femtotip-Elektrode gegen den „Gegenfemtotip“ angelegt, die Anregungsleistung wurde auf $130\text{ }\mu\text{W}$ reduziert. Danach wurde die Spannung 5 min lang abgeschaltet, um der biotinylierten DNS Zeit zum Binden zu geben. Anschließend wurden -6 V Spannung an die Femtotip-Elektrode gegen die Außenelektrode angelegt und bei gleicher Anregungsleistung die austretende DNS beobachtet. Danach wurde die Anregungsleistung auf $400\text{ }\mu\text{W}$ und die Spannung auf -15 V erhöht, um die eventuell noch anhaftenden Fluorophore zu entfernen. Um die „Sequenzierung“ zu starten, werden dem Glycerin im Kapillaraußenraum $200\text{ }\mu\text{l}$ 100 mM Magnesiumacetat in Femtopuffer zugesetzt.

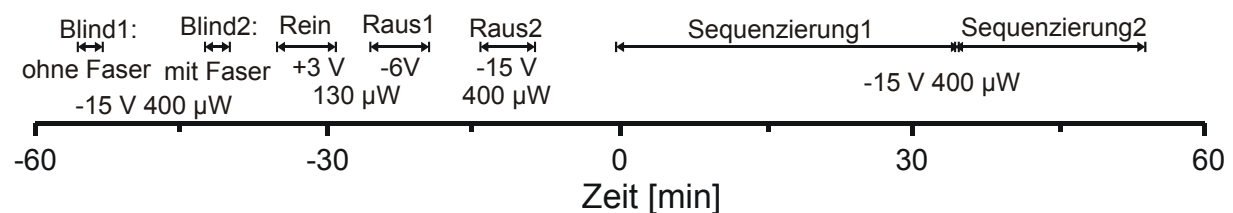


Abbildung 4.6.3.5-12 Übersicht über den vierten Versuch

Bei der Blindprobe ohne die streptavidinierte Faser wurde eine Ereignisfrequenz von nur $0,05\text{ Hz}$ beobachtet, nach dem Einbau der Faser stieg sie auf fast das Zehnfache und lag im Mittel bei $0,45\text{ Hz}$ (Abbildung 4.6.3.5.-13 oben links). Während des „Reinziehens“ wurden von der Fluoreszenzereigniserkennung 5 DNS-Stränge detektiert, während des „Rausziehens“ keiner (Abbildung 4.6.3.5.-13 oben Mitte).

Bei der „Raus2“-Messung lag die mittlere Ereignisfrequenz (für Mononucleotide) bei $0,17\text{ Hz}$; in der Ereigniskurve treten keine Stufen auf (Abbildung 4.6.3.5.-13 oben rechts).

Nach der Magnesiumzugabe ändert sich an diesem Bild zunächst nichts; während der ersten 1200 s der „Sequenzierung“ liegt die Ereignisfrequenz bei $0,089\text{ Hz}$. Nach 1200 s zeigt sich ein Anstieg auf etwa $0,5\text{ Hz}$. Bei 1350 s ist eine erste steile Stufe mit einer Flankensteigung von über 19 Hz zu beobachten. Die Stufe erstreckt sich von $1349,4825\text{ s}$ bis $1352,1150\text{ s}$

und umfaßt 44 Ereignisse, die sämtlich als Mr121-dUMP klassifiziert wurden. Diese Stufe ist daher wahrscheinlich nicht auf den Abbau eines DNS-Stranges zurückzuführen. Während der ersten 2000 s der „Sequenzierung“ finden sich noch zwei weitere Stufen, eine von 1413,447 s bis 1446,527 s mit 100 Ereignissen (davon 44 Us und 56 Cs) und eine von 1868,267 s bis 1975,3285 s mit 53 Ereignissen (davon 32 Us und 21 Cs). Etwa 2800 s nach Magnesiumzugabe während der zweiten „Sequenzierungs-“ Messung, steigt die Ereignisfrequenz erneut an und beträgt am Ende der Meßzeit etwa 2 Hz (Abbildung 4.6.3.5.-13 unten). Bei diesem Versuch ergab sich als Klassifizierungsschwelle zwischen Cy5-dCMP und Mr121-dUMP $\ln(\tau/ns) = 0,67$. Es wurden keine Ereignisse aufgrund ihrer Abklingdauer verworfen, da das Abklingdauerhistogramm weder einen Streulichtpeak noch ein Maximum mit längerer Abklingdauer als Mr121 aufwies.

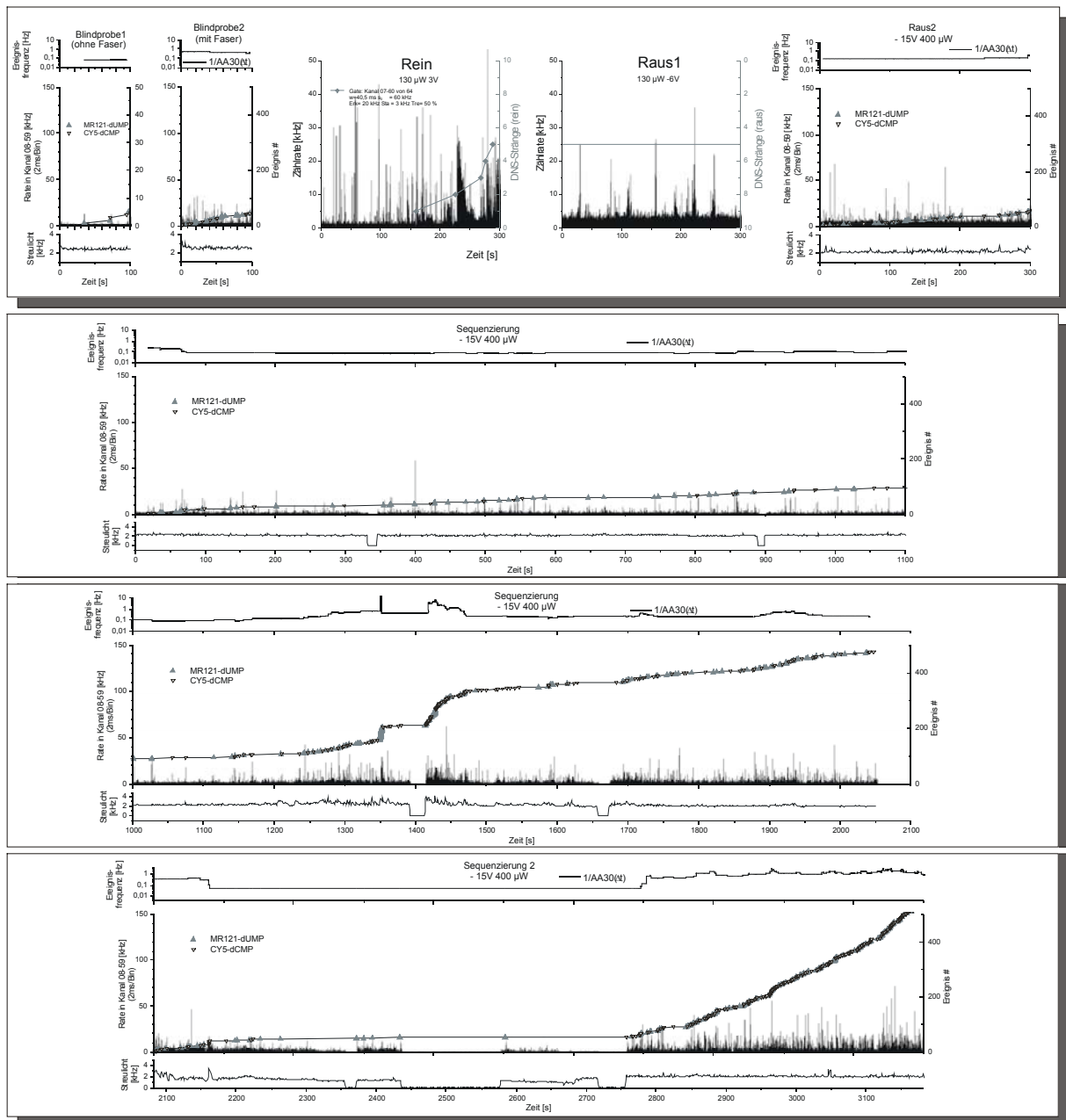


Abbildung 4.6.3.5-13 Ereignisfrequenz $1/AA_{30}(\Delta t)$, Ereigniskurven, MCS-Spuren und Streulicht beim vierten Versuch

5. Versuch (2000-05-10)

Die DNS-Lösung im Gegenfemtotip war bei diesem Versuch wiederum ca. 10^{-10} M. Während des „Reinziehens“ wurde die Anregungsleistung auf $90 \mu\text{W}$ (gemessen an der Eintrittspupille des Objektivs) reduziert, die Spannung zwischen Femtotip und Gegenfemtotip betrug $+5 \text{ V}$. Bei den übrigen Messungen lagen -10 V zwischen der Elektrode im Femtotip und der Außenelektrode, die Anregungsleistung betrug $400 \mu\text{W}$. Die Faserspitze konnte bei diesem Versuch sehr weit vorgeschoben werden: Der Abstand zwischen der Faserspitze und der Öffnung des Femtotips betrug nur etwa $10 \mu\text{m}$.

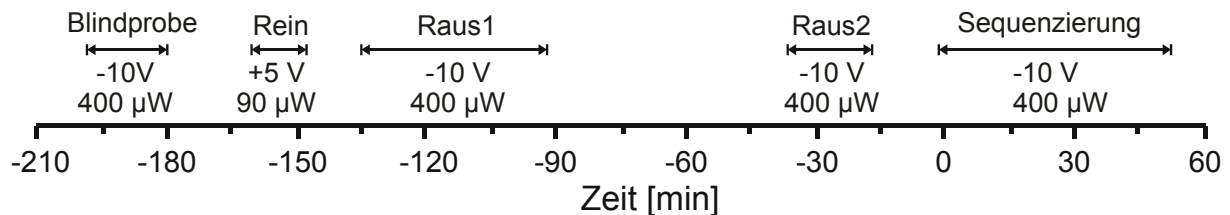


Abbildung 4.6.3.5-14 Ablauf des fünften Versuches.

Im Zeitraum zwischen der „Raus1“ und der „Raus2“ Messung blieb die Spannung eingeschaltet.

Als Klassifizierungsschwelle zwischen Cy5-dCTP und Mr121-dUMP ergab sich $\ln(\tau/ns) = 0,65$.

Die Ereignisfrequenz der Blindprobe lag im Mittel bei $0,1 \text{ Hz}$; die Ereignisse der Blindprobe waren jedoch nicht statistisch verteilt: In der Ereigniskurve trat eine Stufe mit 37 Ereignissen (alle als Mr121 klassifiziert) in $11,2 \text{ s}$ auf (Abbildung 4.6.3.5-15, oben links).

Während des „Reinziehens“ wurden 12 Ereignisse als DNS-Stränge erkannt. (Abbildung 4.6.3.5-15, oben Mitte)

Bei der „Raus1“-Messung wurden trotz der hohen Durchschnittszählrate von (am Anfang) $10 - 20 \text{ kHz}$ keine DNS-Stränge erkannt, die mittlere Ereignisfrequenz für Mononucleotide lag zunächst bei 7 Hz , wobei in der $1/AA_{30}(\Delta t)$ - Kurve Spitzenwerte bis 35 Hz auftraten. Im Verlauf der Messung sank die Ereignisrate ab, in den letzten 400 s der „Raus1“-Messung betrug sie im Mittel $0,7 \text{ Hz}$ (Abbildung 4.6.3.5-15, erste Zeile rechts und zweite Zeile). Im Verlauf der nächsten Stunde nahm die Ereignisfrequenz weiter ab. Bei der „Raus2“-Messung betrug sie im Mittel $0,3 \text{ Hz}$. Die Ereigniskurve der „Raus2“- Messung wies in 1000 s 4 Stufen auf: 61 Ereignisse ($53\text{C} + 8\text{U}$) in $31,98 \text{ s}$; 37 Ereignisse ($20\text{C} + 17\text{U}$) in $67,493 \text{ s}$; 55 Ereignisse (alle C) in $2,7505 \text{ s}$ und 27 Ereignisse ($10\text{C} + 17\text{U}$) in $2,2125 \text{ s}$ (Abbildung 4.6.3.5-15, dritte Zeile links).

In den ersten 500 s nach Magnesiumzugabe betrug die mittlere Ereignisfrequenz $0,15 \text{ Hz}$. Dann folgten insgesamt 7 Stufen mit $1,84$; $9,32$; $0,38$; $42,73$; $0,83$; $0,51$ und $1,15 \text{ Hz}$ mittlerer Ereignisfrequenz. Außerhalb der Stufen betrug die Ereignisfrequenz im Mittel $0,2 \text{ Hz}$. In den letzten 500 s der 3074 s langen „Sequenzierung“ betrug die Ereignisfrequenz $0,34 \text{ Hz}$ (Abbildung 4.6.3.5-15, dritte Zeile rechts und untere Zeile).

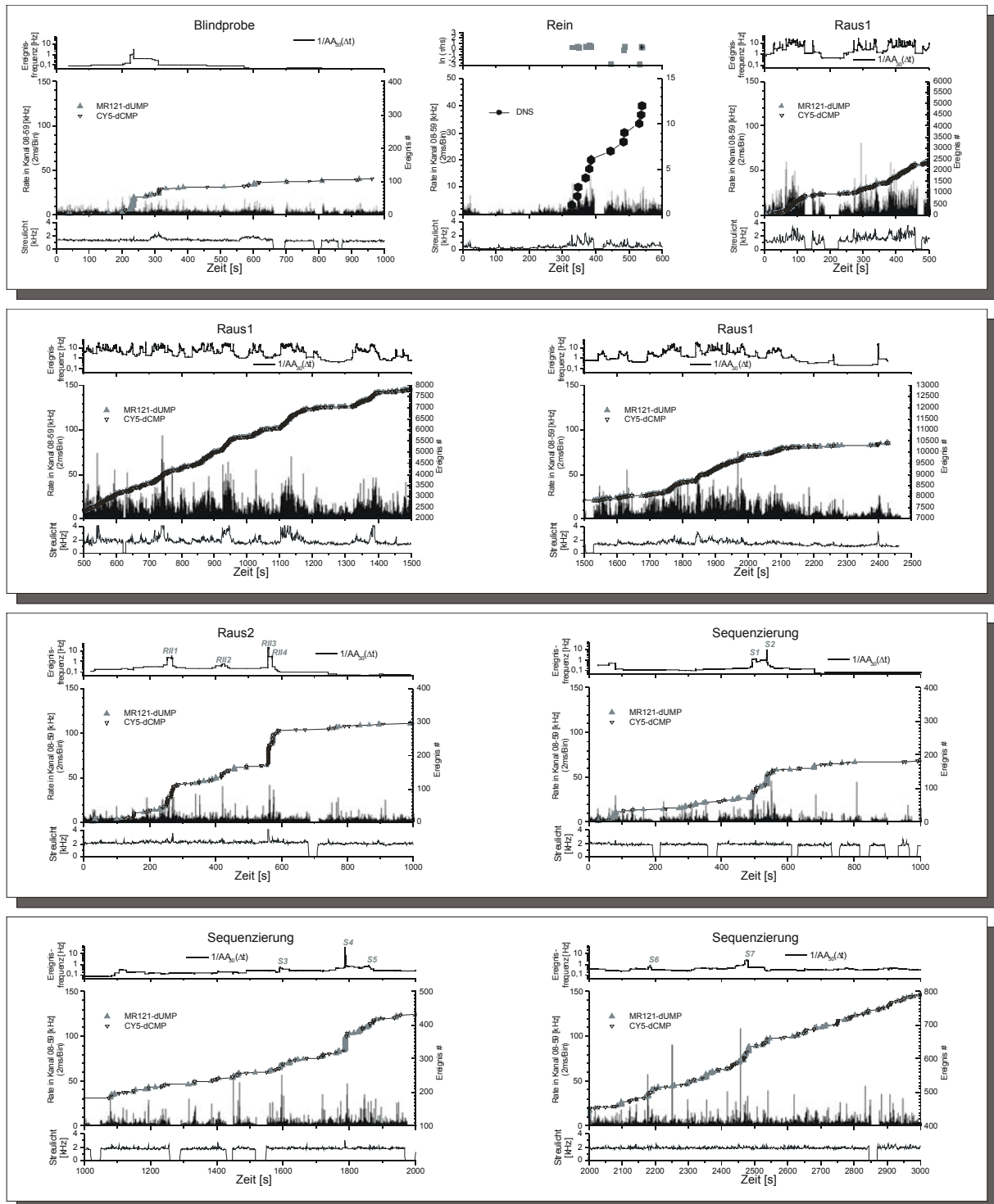


Abbildung 4.6.3.5-15 Ereignisfrequenz $1/AA_{30}(\Delta t)$, Ereigniskurven, MCS-Spuren und Streulicht rate beim fünften Versuch

Die während des fünften Versuches aufgetretenen Stufen sind in Abbildung 4.6.3.5-16 vergrößert dargestellt:

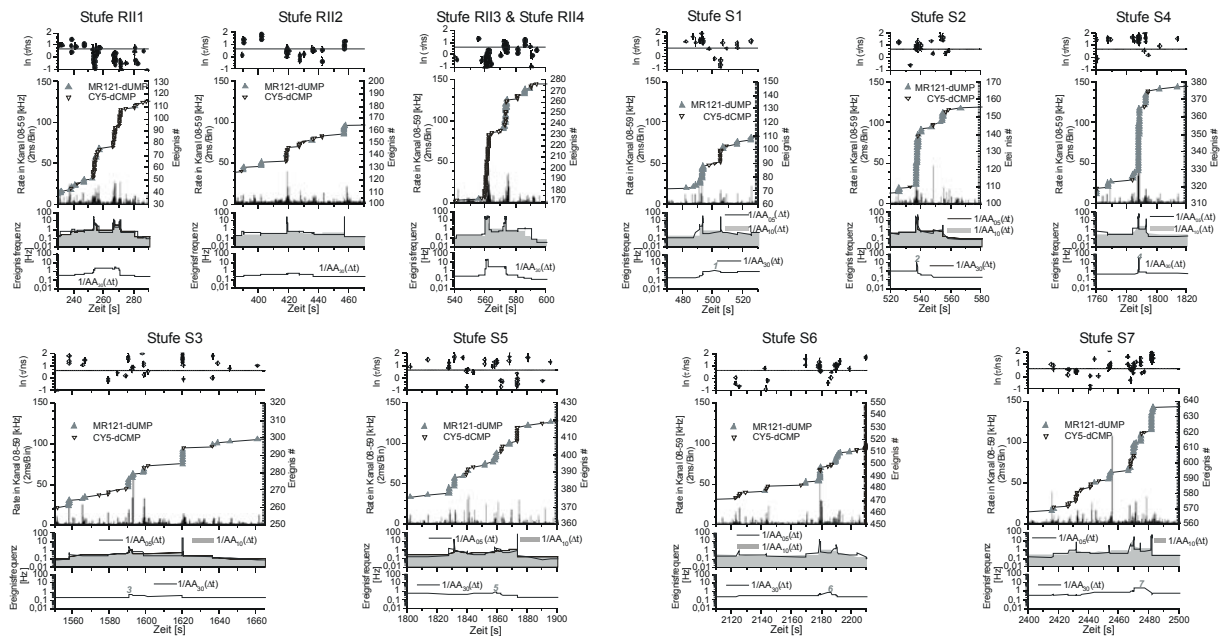


Abbildung 4.6.3.5-16 Stufen in der Ereigniskurve des fünften Versuchs

In den Graphen sind jeweils dargestellt: Der Logarithmus der vom MLE-Schätzer ermittelten Abklingdauer in ns (oben), die MCS-Spuren und die Ereigniskurven (zweite Zeile), die Ereignisfrequenz $1/AA_{10}(\Delta t)$ $1/AA_{05}(\Delta t)$ (dritte Zeile), sowie $1/AA_{30}(\Delta t)$ (unten).

Wie man an den Ereigniskurven qualitativ und an den $1/AA_{05}(\Delta t)$ -Graphen quantitativ erkennt, zerfallen viele der Stufen (= Peaks im $1/AA_{30}(\Delta t)$ -Graphen) in einzelne Etappen.

6. Versuch (2000-08-29)

Die DNS-Lösung im Gegenfemtotyp war bei diesem Versuch ca. 5×10^{-10} M. Während des „Reinziehens“ wurde die Anregungsleistung auf 100 μ W (gemessen an der Eintrittspupille des Objektivs) reduziert, die Spannung zwischen Femtotip und Gegenfemtotyp betrug +7 V. Bei den übrigen Messungen lagen –7 V zwischen der Elektrode im Femtotip und der Außenelektrode, die Anregungsleistung betrug 250 μ W. Die Messung der Blindprobe fand im Zeitraum zwischen –10h:02:04“ und –09h:45:00“ vor der Magnesiumzugabe statt, weil an diesem Tag mehrere Versuche durchgeführt wurden. Dieser Zeitraum liegt außerhalb der Zeitachse von Abbildung 4.6.3.5-17. Nach dem Ende der „Sequenzierung“-Messung wurde die Faser entfernt und mit einem „Microloader“ etwa 10 μ l einer Mischung aus Cy5-dCMP und Mr121 (je etwa 10^{-9} M) in den Femtotip injiziert. Anschließend wurde die Elektrode wieder eingeführt und bei –7V Spannung gegen die Außenelektrode und 250 μ W Anregungsleistung die austretenden Monophosphate beobachtet.



Abbildung 4.6.3.5-17 zeitliche Abfolge der Messungen des 6. Versuches

Bei den Abklingdauerverteilungen der Ereignisse der einzelnen Messungen (Abbildung 4.6.3.5-18) trat ein unerwarteter Effekt auf. Im Verlauf der Messung verschob sich das Zentrum des zu Cy5-dCMP gehörenden Peaks stark, das zu Mr121-dUMP gehörenden schwächer zu langen Abklingdauern (Tabelle 4.6.3.5-3). Nach dem Einspritzen der Monophosphate ergaben sich für Cy5 verkürzte Abklingdauern von 1,14 ns ($\ln\tau=0,129$) (statt 1,32 ns) und für Mr121 der „normale“ Wert 2,00 ns ($\ln\tau=0,694$) (Literatur: 1,96 ns).

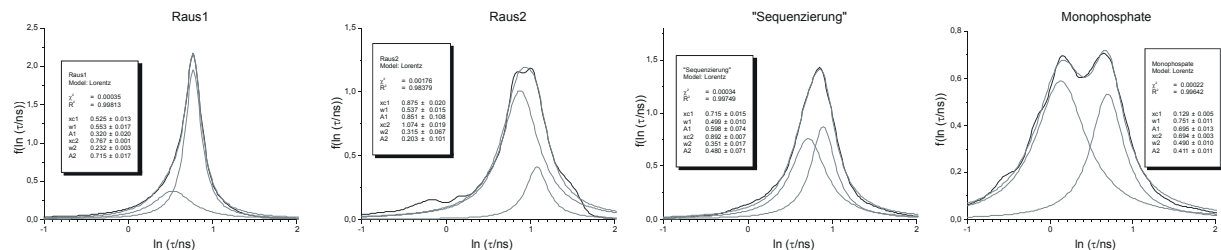


Abbildung 4.6.3.5-18 Abklingdauerverteilungen der Messungen des 6. Versuches

Messung	$\ln\tau_{\text{Cy5-dCMP}}$	$\ln\tau_{\text{Mr121-dUMP}}$	Anteil Cy5-dCMP	$\ln\tau_{\text{Lorentzschnittpkt}}$
Raus 1	$0,525 \pm 0,013$	$0,767 \pm 0,001$	30,9%	0,526
(Raus2)	--	$0,875 \pm 0,020$	ca. 0	--
„Sequenzierung“	$0,715 \pm 0,015$	$0,892 \pm 0,007$	50,9%	0,799
Monophosphate	$0,129 \pm 0,005$	$0,694 \pm 0,003$	62,8%	0,485

Tabelle 4.6.3.5-3 Lorentzfits an die Abklingdauerverteilungen.

Da während der „Raus1-“ Messung neben Mononucleotiden auch ungebundene PCR-Produkte aus dem Femtotip austreten, ist hier die Fluoreszenzereigniserkennung mit großen Schwierigkeiten verbunden: Die PCR-Produkte (mit Abklingdauern von $\ln(\tau/\text{ns}) \approx 0,8$) wurden bei der Fluoreszenzereigniserkennung mit den Parametern, die für Mononucleotide geeignet sind, zu einer Serie von als Mr121 klassifizierten Einzelereignissen aufgespalten. Aus diesem Grund war der Cy5-Anteil bei dieser Messung zu gering und daher der Schnittpunkt der Lorentzkurven zu nahe am Zentrum des Cy5-Peaks.

Als Schwelle für die Unterscheidung zwischen Cy5-dCMP und Mr121-dUMP wurde für die Messungen „Blindprobe“, „Raus1“, „Raus2“ und „Sequenzierung“ $\ln(\tau/\text{ns}) = 0,70$ ($\tau = 2,0$ ns) gewählt, für die Messung „Monophosphate“ hingegen $\ln(\tau/\text{ns}) = 0,49$ ($\tau = 1,6$ ns). Eine mögliche Ursache für die Verlängerung der Fluoreszenzabklingdauer während der Sequenzierungsversuche könnte in der Erhöhung des Glycerinanteils im Femtotip durch den elektroosmotischen Fluß (vergl. Kapitel 4.2) sein.

Während der Blindprobe (Abbildung 4.6.3.5-19, erste Zeile links) lag die mittlere Ereignisfrequenz bei 0,175 Hz wobei ein allmählicher Abfall von 0,423 Hz (für $t < 200$ s) auf 0,036 Hz (für $t > 550$ s) zu beobachten war.

Die Ereigniserkennung für DNS-Stränge ergab während der „Rein-“ Messung 98 Signale (Abbildung 4.6.3.5-19, erste Zeile Mitte). Eine Betrachtung der MCS-Spur zeigte jedoch, daß die Farbstoffkonzentration im Bereich 100 s bis 200 s zu hoch für eine Einzelmolekülerkennung war. Aus der Anzahl detektierter Fluoreszenzphotonen ($6,369 \times 10^7$ bei 100 μW Anregungsleistung) ergab sich durch Vergleich mit anderen Messungen (an der selben Apparatur mit gleicher Anregungsleistung) ein Wert von etwa ($6,369 \times 10^7$ Photonen) / (8100 Photonen / DNS) = 8000 DNS-Strängen. Beim Rausziehen (Abbildung 4.6.3.5-19,

erste Zeile rechts) wurden innerhalb der ersten 600 s 35 DNS- Stränge erkannt, danach nur noch 2. Die Anzahl der detektierten Fluoreszenzphotonen betrug $2,801 \times 10^7$ bei 250 μW Anregungsleistung, damit ergibt sich ein Schätzwert von $2,801 \times 10^7 / 8100 / 2,5 = 1400$ herausgezogenen DNS-Strängen.

Die Ereignisfrequenz der Mononucleotide während der „Raus1-“ Messung (Abbildung 4.6.3.5-19, zweite und dritte Zeile) betrug bei 600 s etwa 18 Hz, bei 1200 s etwa 5 Hz und danach etwa 1,2 Hz. Am Ende der Messung fielen im $1/AA_{30}(\Delta t)$ -Graph 8 Spitzen mit insgesamt 441 Ereignissen in 32,1 s (= 13,7 Hz) auf. Die mittlere Ereignisfrequenz außerhalb der Stufen betrug 0,74 Hz.

Bei der „Raus2-“ Messung (Abbildung 4.6.3.5-19, dritte Zeile rechts) betrug die mittlere Ereignisfrequenz 0,38 Hz, wobei eine „Stufe“ mit einer Frequenz von 0,94 Hz (72 Ereignisse in 77 s) auftrat.

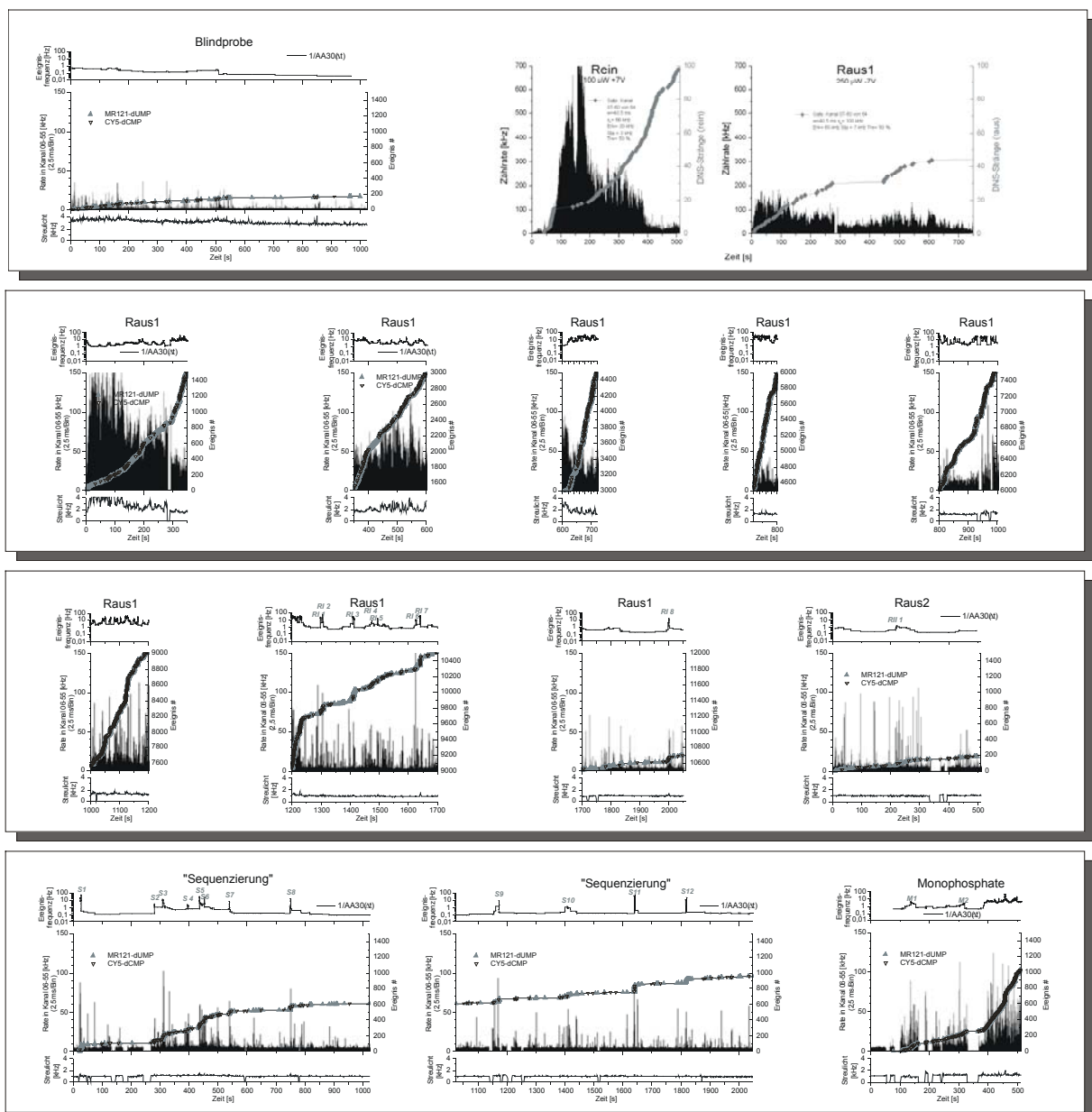


Abbildung 4.6.3.5-19 Verlauf des 6. Versuchs

Nach Zugabe des Magnesiumacetats (Abbildung 4.6.3.5-19, vierte Zeile links und Mitte) lag die Ereignisfrequenz bei zunächst 0,40 Hz. 270 s später stieg sie auf etwa 0,90 Hz, wobei der $1/AA_{30}(\Delta t)$ -Graph 12 Spitzen aufwies. Am Ende der Messung betrug die Ereignisfrequenz 0,17 Hz. Die 12 Stufen enthielten insgesamt 544 Ereignisse in 97,3 s (5,6 Hz). Die mittleren Ereignisfrequenzen der einzelnen Stufen lagen zwischen 0,91 Hz und 66,9 Hz bei einem Mittelwert von 20,1 Hz und einer Standardabweichung von 18,1 Hz. Außerhalb der Stufen betrug die Ereignisfrequenz im Mittel bei 0,20 Hz.

Etwa 100 s, nachdem die Monophosphate in den Femtotip gegeben wurden (Abbildung 4.6.3.5-19, vierte Zeile rechts), stieg die Ereignisfrequenz schlagartig auf etwa 1 Hz, nach 370 s erfolgte ein weiterer Anstieg auf 5,5 Hz.

In den Ereigniskurven der einzelnen Messungen traten insgesamt 21 Stufen auf, 8 während der „Raus1-“, 1 während der „Raus2-“ und 12 während der „Sequenzierung-“ Messung. Die entsprechenden Maxima im $1/AA_{30}(\Delta t)$ -Graph sind in Abbildung 4.6.3.5-19 mit R11-R18, R11 und S1-S12 gekennzeichnet.

Abbildung 4.6.3.5-20 zeigt neben den vergrößerten Ausschnitten mit den Stufen deren jeweilige Verteilungen der Fluoreszenzabklingdauern. Dabei sind auch die Stufen dargestellt, die vor Zugabe des Magnesiums beobachtet wurden.

Tabelle 4.6.3.5-4 gibt die Parameter der in Abbildung 4.6.3.5-20 gezeigten Lorentzfits an die $\ln(\tau/ns)$ -Verteilungen der einzelnen Stufen an:

Stufe	χ^2	R^2	X_c (Cy5)	W (Cy5)	X_c (Mr121)	W (Mr121)	Schnittpkt d. Lorentz- peaks	Mittel der Peak- zentren	Anteil Cy5 [%]
Ra I 1	2,13	0,992	0,57	0,38	0,78	0,39	0,66	0,68	46,42
Ra I 2	0,76	0,998	0,49	0,29	0,71	0,36	--	0,60	22,03
Ra I 3	1,54	0,997	0,74	0,31	1,01	0,39	0,78	0,88	25,51
Ra I 4	1,97	0,993	0,68	0,48	0,89	0,31	0,85	0,78	69,08
Ra I 5	1,70	0,991	0,73	0,48	1,02	0,27	0,96	0,87	73,73
Ra I 6	2,89	0,990	0,87	0,54	1,14	0,41	1,04	1,01	58,92
Ra I 7	7,88	0,997	0,51	0,38	0,75	0,26	0,57	0,63	36,42
Ra I 8	5,27	0,977	0,52	0,53	0,89	0,30	0,65	0,70	38,48
Ra I 1	5,46	0,994	0,82	0,35	1,09	0,27	0,97	0,95	57,14
S 1	3,03	0,988	0,72	0,27	0,99	0,33	0,76	0,86	23,15
S 2	2,27	0,991	0,34	0,22	0,86	0,19	0,78	0,60	91,68
S 3	8,58	0,985	0,68	0,36	0,96	0,30	0,82	0,82	50,41
S 4	1,26	0,994	0,80	0,25	0,94	0,09	0,93	0,87	84,51
S 5	1,65	0,998	0,67	0,15	0,78	0,16	0,74	0,72	61,73
S 6	5,67	0,990	0,59	0,26	0,86	0,34	0,67	0,73	29,87
S 7	2,39	0,993	0,69	0,19	0,82	0,26	0,76	0,76	47,10
S 8	2,03	0,986	0,54	0,11	0,67	0,13	0,59	0,60	39,19
S 9	3,91	0,989	--	--	0,82	0,27	--	--	0,00
S 10	4,41	0,994	0,78	0,34	0,92	0,25	0,90	0,85	66,95
S 11	11,76	0,994	0,66	0,23	0,86	0,25	0,70	0,76	28,79
S 12	5,87	0,991	0,85	0,26	1,02	0,18	0,94	0,93	54,47

Tabelle 4.6.3.5-4 Parameter der Lorentzfits an die Verteilungsfunktionen von $\ln(\tau/ns)$ der einzelnen Stufen

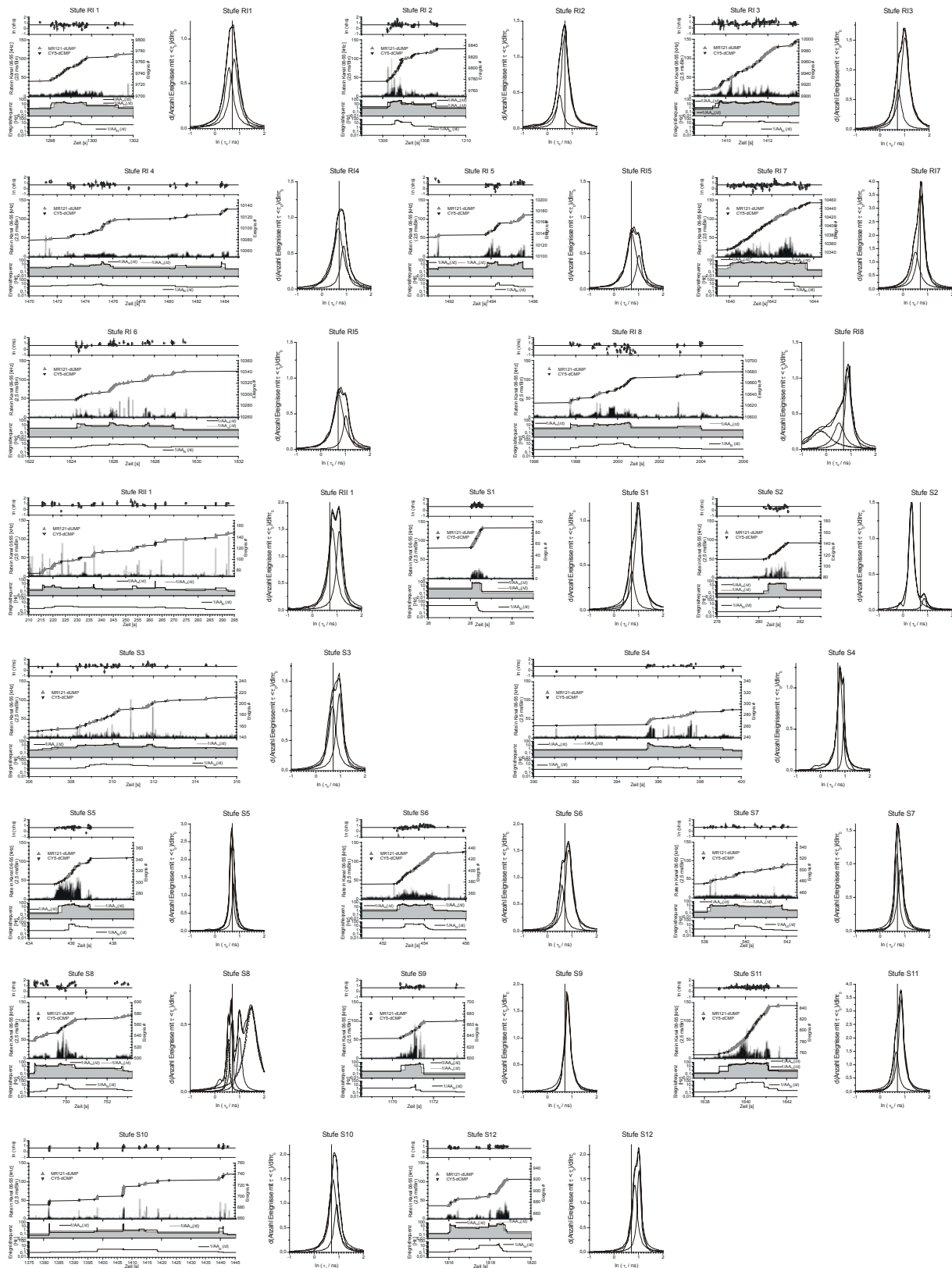


Abbildung 4.6.3.5-20 Stufen während der „Raus-“ und der „Sequenzierung-“ Messung des 6. Versuches. Neben den Graphen mit den Stufen, die jeweils $\ln(\sigma/ns)$, die MCS-Spur, die Ereigniskurve und die Ereignisfrequenz ($1/AA_{05}(\Delta t)$, $1/AA_{10}(\Delta t)$, $1/AA_{30}(\Delta t)$) zeigen, sind die Abklingdauerverteilungsfunktionen der einzelnen Stufen gezeigt.

7. Versuch (2000-04-11)

Die DNS-Lösung im Gegenfemtotip war bei diesem Versuch ca. 5×10^{-10} M. Während des „Reinziehens“ wurde die Anregungsleistung auf $140 \mu\text{W}$ (gemessen an der Eintrittspupille des Objektivs) reduziert, die Spannung zwischen Femtotip und Gegenfemtotip betrug $+10$ V. Bei den übrigen Messungen lagen -20 V zwischen der Elektrode im Femtotip und der Außenelektrode, die Anregungsleistung betrug $400 \mu\text{W}$. Vor dem „Reinziehen“ wurde eine Blindprobe bei eingebauter Faser durchgeführt. Die Faserspitze befand sich etwa $300 \mu\text{m}$ vom Ausgang des Femtotips entfernt, also relativ weit hinten. Die „Sequenzierung“ wurde durch Zugabe von $100 \mu\text{l}$ $0,1$ M Magnesiumacetat (in Sequenzierpuffer) zum Glycerin im Kapillaraußenraum gestartet. Nach dem Ende der „Sequenzierung“ wurde die Faser entfernt und mit einem „Microloader“ etwa $10 \mu\text{l}$ einer Mischung aus Cy5-dCMP und Mr121 (je etwa 10^{-9} M) in den Femtotip injiziert. Anschließend wurde die Elektrode wieder eingeführt und bei -20 V Spannung gegen die Außenelektrode und $400 \mu\text{W}$ Anregungsleistung die austretenden Monophosphate beobachtet.

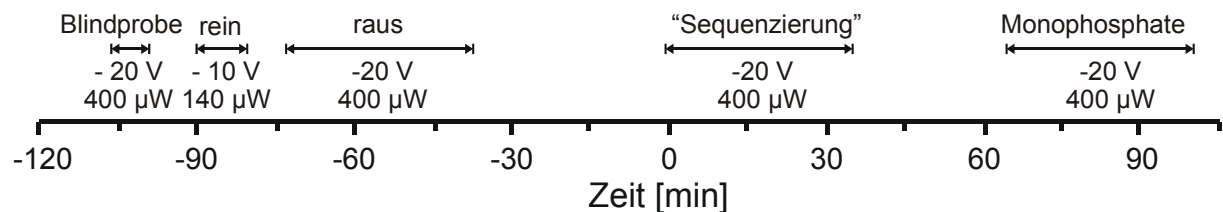


Abbildung 4.6.3.5-21 Ablauf des siebten Versuches

Als Klassifizierungsschwelle zwischen Cy5-dCTP und Mr121-dUMP ergab sich $\ln(\tau/ns) = 0,55$.

Die Ereignisfrequenz der Blindprobe lag mit im Mittel $1,6$ Hz sehr hoch, wobei das Maximum (3 Hz, Spitzen bis 10 Hz) etwa 100 s nach dem Anlegen der Spannung auftrat (Abbildung 4.6.3.5-22, oben links außen).

Während des „Reinziehens“ wurden etwa 3000 Ereignisse als DNS-Stränge erkannt. (Abbildung 4.6.3.5-22, oben Mitte links)

Beim „Rausziehen“ wurden nur 63 DNS-Stränge erkannt, der letzte $176,5$ s nach dem Anlegen der Spannung (Abbildung 4.6.3.5-22, oben Mitte). Die mittlere Ereignisfrequenz für Mononucleotide lag zunächst bei 14 Hz. Nach 461 s fiel sie schlagartig auf $0,56$ Hz ab, 1300 s nach dem Anlegen der Spannung erfolgte ein weiterer Abfall auf $0,05$ Hz (Abbildung 4.6.3.5-22, oben rechts).

In den ersten 100 s nach Magnesiumzugabe betrug die mittlere Ereignisfrequenz $0,05$ Hz. Danach betrug sie $0,32$ Hz. Im Zeitraum zwischen $880,03$ s und $907,88$ s folgte eine Stufe (76 Ereignisse: 11 Cs und 65 Us) mit $2,05$ Hz (Abbildung 4.6.3.5-22, Mitte rechts). Anschließend lag die Ereignisfrequenz bis zum Ende der Messung nach 2048 s bei $0,07$ Hz (Abbildung 4.6.3.5-22, Mitte links).

59 s nach Zugabe der Monophosphate stieg die Ereignisfrequenz von $0,11$ Hz auf $1,4$ Hz, im weiteren Verlauf auf 35 Hz. Dieser Wert wurde etwa 800 s nach der Zugabe erreicht. (Abbildung 4.6.3.5-22, unten).

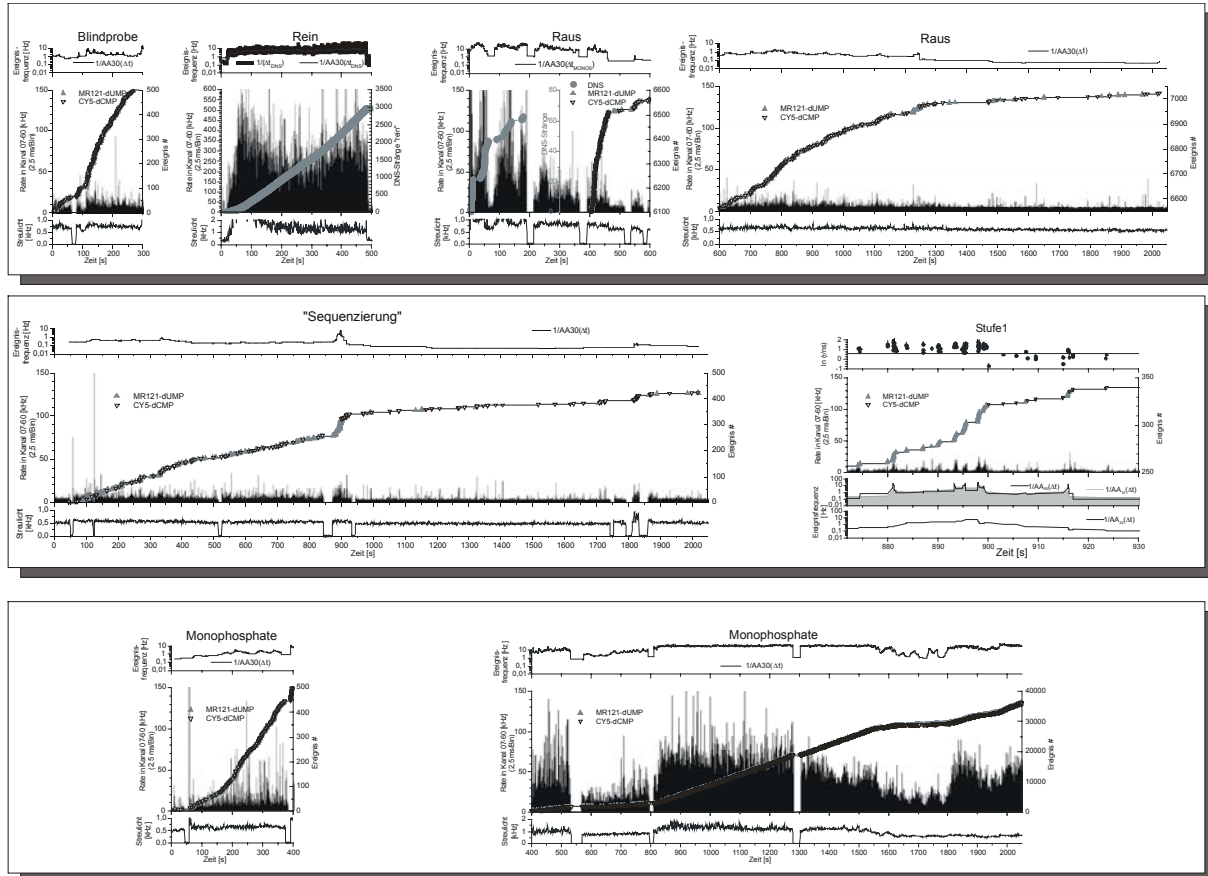


Abbildung 4.6.3.5-22 Ereignisfrequenz $1/AA_{30}(\Delta t)$, Ereigniskurven, MCS-Spuren und Streulichtrate beim siebten Versuch

Zusammenfassung der Sequenzierversuche mit vorausgegangener elektrophoretischer Einzelmolekülhandhabung

Die sieben Versuche dieses Unterkapitels sind nach fallender Anzahl der während der „Sequenzierung“ austretenden Mononucleotide sortiert. Abgesehen von den letzten beiden Versuchen stellt man dabei erwartungsgemäß fest, daß diese Anzahl mit der DNS-Konzentration im Gegenfemtotip fällt.

Versuch	Faserabstand	C _{DNS}	Phase	Leistung μ W	Beginn d. Messung hh:mm:ss	Dauer [s]	Spannung V	DNS	Monophosphate			Bemerkungen
									Cy5-dCMP	Mr121-dUMP	Stufen ²⁾	
Versuch 1 2000-08-31	150 μ m	1E-08 mol/l	Blind	315	-01:44:43	308	-15	--	140	223	--	50% der Ereignisse in den ersten 16% der Meßzeit
			Rein	315	-01:25:12	307	15	ca. 40000 ¹⁾	--	--	--	FCS: $\tau_{\text{Durchtritt}}$ ca. 500ms
			Raus1	315	-01:17:15	717	-15	ca. 32000 ¹⁾	--	--	--	FCS: $\tau_{\text{Durchtritt}}(1)$ ca. 500ms $\tau_{\text{Durchtritt}}(2)$ ca. 8ms
			Raus2	315	-00:18:06	512	-15	--	164	188	--	FCS: $\tau_{\text{Durchtritt}}$ ca. 8ms
			„Seq“	315	+00:00:00	2049	-15	--	ca. 70500	--	--	Anstieg sofort nach Mg-Zugabe, nach 500 s wird die Kurve flacher FCS: $\tau_{\text{Durchtritt}}$ ca. 8ms

Versuch 2 2000-09-02	130 µm	1E-09 mol/l	Blind1	280	-03:06:34	308	-15	--	(3301)	(1478)	0	viele Luftblasen	
			Blind2	280	-02:36:19	307	-15	--	1106	1071	0		
			Rein	118	-01:06:51	168	15	ca. 1100 ¹⁾	--	--	--	--	Konzentration zu hoch für SMD
			Raus1	280	-00:52:44	512	-15	347	--	--	--	--	
			Raus2	280	-00:38:21	512	-15	--	--	180	246	1	
			„Seq“	280	+00:00:00	3074	-15	--	475	890	8	Anstieg nach 1200 s. Am Ende der Messung läuft die Reaktion noch.	
Versuch 3 2000-09-14	125 µm	1E-09 mol/l	Blind1	300	-04:24:20	308	-15	--	269	277	0		
			Blind2	300	-03:50:48	308	-30	--	440	582	1		
			Blind3	300	-03:40:20	307	-15	--	256	432	0		
			Blind4	300	-01:58:42	307	-15	--	234	262	0		
			Rein	75	-01:28:55	307	7	165	--	--	--	--	Symmetrie Rein-Raus1
			Raus1	75	-01:12:00	922	-7	159	--	--	--	--	
			Raus2	300	-00:46:53	512	-7			361	468	1	
			Raus3	300	-00:31:53	512	-10			361	514	2	
			Raus4	300	-00:18:45	512	-15			167	221	0	
			„Seq“	300	+00:00:00	2561	-15		524	521	8	Anstieg nach 1100s. Nach 1900s wird die Kurve flacher	
Versuch 4 2000-03-21	130 µm	1E-10 mol/l	Blof	350	-00:55:15	102	-15	--	2	3	--	Blindprobe ohne Faser	
			Blmf	350	-00:42:06	103	-15	--	14	31	--	Blindprobe mit Faser	
			Rein	130	-00:34:47	307	3	5	--	--	--	--	
			Raus1	130	-00:24:57	308	-6	1	--	--	--	--	
			Raus2	350	-00:14:01	307	-15	--	--	23	34	--	
			„Seq0“	350	+00:00:00	2049	-15	--	--	205	270	--	Anstieg nach 1200 s
			„Seq1“	350	+00:34:42	1130	-15	--	304	249	--	Starker Anstieg 2800s nach Mg-Zugabe. Reaktion läuft am Ende noch	
Versuch 5 2000-05-10	20 µm	1E-10 mol/l	Blind	400	-03:17:53	1025	-10	--	28	80	1		
			rein	90	-02:39:22	615	5	12	--	--	--		
			raus1	400	-02:13:50	2459	-10	0	8130	2077	--		
			raus2	400	-00:35:10	1025	-10	--	--	205	92	4	
			„Seq“	400	+00:00:00	3074	-10	--	--	300	526	7	Erste Stufe nach 500 s, letzte nach 2000 s
Versuch 6 2000-08-29b	130 µm	1E-09 mol/l	Blind	250	-03:34:00	1025	-7	--	56	119	0		
			Rein	100	-01:38:32	512	7	98			--		
			Raus1	250	-01:16:32	2049	-7	46	(2548)	(8151)	--	Verwechslungsgefahr PCR vs. n × Mr121	
			Raus1+	250	-00:55:32	789	-7	0	333	830	8		
			Raus2	250	-00:19:39	512	-7	0	42	148	1		
			„Seq“	250	+00:00:00	2459	-7	--	--	192	829	12	Erste Stufe nach 300s; letzte Stufe nach 1800s
			Monos	250	+01:15:30	512	-7	--	596	437	--	Anstieg nach 400 s	
Versuch 7 2000-04-11	250 µm	1E-09 mol/l	Blind	400	-01:45:31	307	-20	--	371	258	--		
			Rein	140	-01:29:39	513	10	2974	--	--	--		
			Raus	400	-01:12:34	2049	-20	73	2804	4219	0		
			„Seq“	400	+00:00:00	2049	-20	--	--	168	258	1	Stufe nach 900s
			Monos	400	+01:05:37	2049	-20	--	--	3041 2	5708	--	Anstieg nach 400 s

¹⁾ Ereigniszahlen aus der Anzahl detektierter Fluoreszenzphotonen abgeschätzt

²⁾ Stufen im Sinne des Abschnitts 4.6.3.6

Tabelle 4.6.3.5-6 Zusammenfassung der Versuche mit vorangehender elektrophoretischer Handhabung der DNS

Tabelle 4.6.3.5 faßt die Anzahl der detektierten Ereignisse während der unterschiedlichen Versuchsabschnitte zusammen. In der Spalte „Stufen“ steht die Anzahl der in der Ereigniskurve aufgetretenen Stufen mit einer charakteristischen Stufenhöhe von 60 Ereignissen. Näheres hierzu ist in Abschnitt 4.6.3.6 beschrieben.

Die linke Hälfte von Abbildung 4.6.3.5-22 zeigt die Anzahl der beim „Rausziehen“ detektierten DNS-Stränge gegen die Anzahl der hereingezogenen Stränge in doppelt logarithmischer Skalierung. Die Regressionsgerade

$$\ln(y) = (-1,21 \pm 1,46) + (0,99 \pm 0,22) \times \ln(x)$$

durch die logarithmierte Anzahl zeigt, daß ein linearer Zusammenhang (Geradensteigung =1) zwischen der Anzahl herein- und herausgezogener Stränge besteht. Als Pearsonscher Regressionskoeffizient ergibt sich $R = 0,917$. Dem y-Achsenabschnitt bei $x = 1$ entnimmt man, daß etwa 30 % der hereingezogenen Stränge gebunden werden, wobei dieser Anteil sehr stark schwankt.

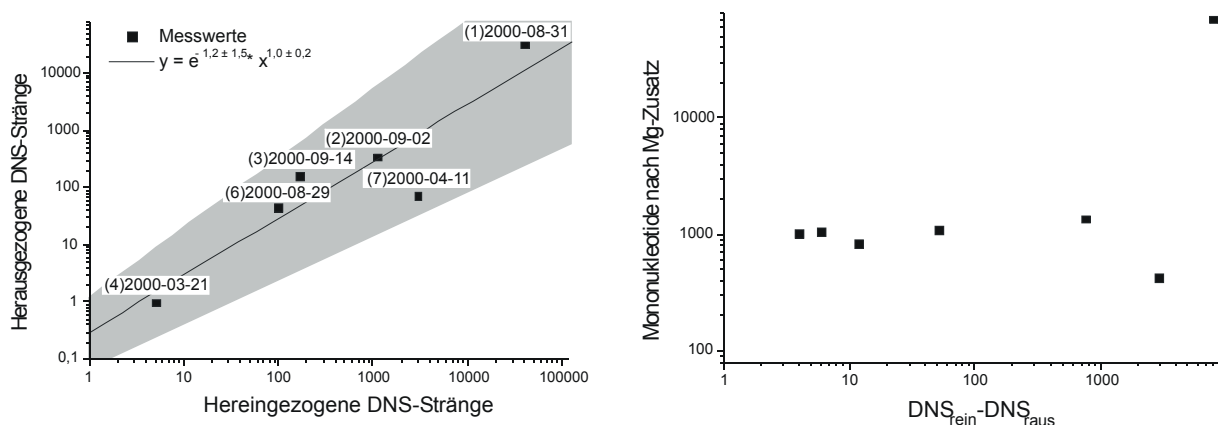


Abbildung 4.6.3.5-23

links: Die Anzahl herausgezogener DNS-Stränge ist proportional zur Anzahl hereingezogener DNS-Stränge

rechts: Zwischen der Anzahl der detektierten Mononucleotide und der Anzahl gebundener DNS-Stränge läßt sich keine Proportionalität nachweisen.

Die rechte Hälfte von Abbildung 4.6.3.5-22 zeigt die Anzahl der während der „Sequenzierung“ detektierten Mononucleotide gegen die Differenz aus der Anzahl der hereingezogenen Stränge und der Anzahl der herausgezogenen Stränge. Entgegen der Erwartung läßt sich hier keine Proportionalität nachweisen. Als Regressionsgerade durch die logarithmierte Anzahl (nicht eingezeichnet) erhält man

$$\ln(y) = (6,11 \pm 1,16) + (0,28 \pm 0,21) \times \ln(x) \text{ bei } R = 0,51$$

Auch der Ordinatenabschnitt ist mit $e^{6,11} \approx 450$ Markierungen pro Strang viel höher als der spektroskopisch ermittelte Markierungsgrad von 60 Ereignissen

Wird die Regression mit den nicht logarithmierten Ereigniszahlen durchgeführt ergibt sich

$$y = (-2879 \pm 4592) + (8,22 \pm 1,42) \times x \text{ bei } R = 0,93$$

Der Ordinatenabschnitt entspricht bei dieser Auftragung der Anzahl der Untergrundeignisse. Hierfür wird bei etwa 3000 s Meßzeit ein Wert von etwa +2000 erwartet. Auch die Geradensteigung entspricht nicht dem erwarteten Wert von 60 Markierungen pro DNS-Strang. Diese Abweichung ließe sich allerdings dadurch erklären, daß nur etwa jeder siebte an die Faser gebundene Strang auch abgebaut wird (vgl. Versuch (3)-2000-09-14).

4.6.3.6 Stufen

Die Ereigniskurve des „Sequenzierlaufs“ von Versuch D aus Abschnitt 4.6.3.3 weist vier auffällige Stufen auf. Solche Stufen wären zu erwarten, wenn einerseits nur jeweils ein DNS-Strang abgebaut wird, und andererseits die Exonuclease prozessiv arbeitet. Da das Auftreten der Stufen nicht davon abhängt, wie die DNS an die Faser gelangt ist, werden die Stufen aus den Kapiteln 4.6.3.3 und 4.6.3.5 in diesem Kapitel gemeinsam beschrieben.

Mit Hilfe der Absorptionsspektroskopie wurde eine mittlere Markierungsdichte der DNS von etwa 60 Fluorophoren pro Strang ermittelt.

Die Analyse der Stufenhöhe ermöglicht es, auch die Verteilungsfunktion des Markierungsgrades zu ermitteln.

Die mittlere Flankensteigung der Stufen läßt Aussagen über die prozessive Schneiderate der Exonuclease an teilmarkierter DNS zu.

Bei genauer Kenntnis der Beladungsdichte der Oberfläche mit DNS und der Exonucleasekonzentration ließen sich aus dem Stufenabstand auch Aussagen über die Bindungskinetik des Enzyms an oberflächenfixierte DNS treffen. Mit den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten ist dies jedoch nicht möglich, da weder die genaue Konzentration der Exonuclease noch die Beladungsdichte der Faser bekannt sind.

Eine Stufe ist ein Bereich, in dem die Ereignisfrequenz erhöht ist. Die Ereignisfrequenz ist gleich dem reziproken Ereignisabstand, der in Kapitel 4.4.1 bereits behandelt wurde. Treten die Moleküle bei konstantem mittleren Teilchenfluß ω zufällig aus der Kapillare aus, ist die Verteilungsfunktion der Ereignisabstände Δt monoexponentiell (Gl. 4.4.1-1):

$$w(\Delta t)d\Delta t = \omega e^{-\omega\Delta t} d\Delta t$$

mit

$$\omega = \frac{1}{\langle \Delta t \rangle} = v_y \cdot A \cdot N_A \cdot c$$

Dabei ist A die Querschnittsfläche der Kapillare, N_A die Avogadro-Konstante, v_y die Austrittsgeschwindigkeit und c die Konzentration der Fluorophore.

Für die Ereignisfrequenz

$$f = \frac{1}{\Delta t} \quad (4.6.3.6-1)$$

ergibt sich demnach die Verteilungsfunktion

$$w(f)df = \frac{\omega}{f^2} e^{-\omega/f} df \quad (4.6.3.6-2)$$

Diese Verteilungsfunktion besitzt keinen Erwartungswert ($\langle f \rangle = \infty$), ihr Modalwert (=Maximum) liegt bei $\omega/2$, ihr Median bei $\omega/\ln(2)$.

Die lokale Ereignisfrequenz ist wegen der ausgeprägten Rechtsschiefe ihrer Verteilungsfunktion zur Definition der Stufen ungeeignet. Vielmehr muß man eine

charakteristische Stufenhöhe h einführen. Ist die Ereignisfrequenz über h Ereignisse im Mittel erhöht, so liegt eine Stufe vor.

Da ein DNS-Strang im Mittel 60 Markierungen trägt, wird $h = 60$ gewählt. Wenn die Ereignisfrequenz über 60 Ereignisse erhöht sein soll, so ist dies gleichbedeutend mit der Aussage, daß der gleitende Durchschnitt der Ereignisabstände über 60 Ereignisse erniedrigt ist. Um festzustellen, ob in den Ereigniskurven Stufen auftreten, wurde in den Kapiteln 4.6.3.3 und 4.6.3.5 über den Ereigniskurven der Kehrwert des gleitenden Durchschnitts des Ereignisabstands mit beidseitig 30 Nachbarpunkten, $1/AA_{30}(\Delta t)$, aufgetragen:

$$\frac{1}{AA_{30}(\Delta t)} = \frac{1}{\frac{1}{2 \cdot 30 + 1} \sum_{i=n-30}^{n+30} (t_{i+1} - t_i)} = \frac{61}{t_{n+31} - t_{n-30}} \quad (4.6.3.6-3)$$

Im Nenner von Gl. 4.6.3.6-3 steht, wieviel Zeit verstreicht bis 61 Ereignisse detektiert werden. Eine Stufe in der Ereigniskurve stellt sich in diesem Graph als Maximum dar. Da auch der $AA_{30}(\Delta t)$ mehrere Größenordnungen überstreicht, werden die Kurven mit logarithmischer Ordinate dargestellt. Für den logarithmierten Ereignisabstand bzw. die logarithmierte Ereignisfrequenz erhält man als Verteilungsfunktion:

$$w(\ln \Delta t) d\Delta t = \omega \exp(\ln \Delta t - \omega e^{\ln \Delta t}) d \ln \Delta t \quad \text{bzw.} \quad w(\ln f) d \ln f = \omega \exp(-\ln f - \omega e^{-\ln f}) d \ln f$$

Da Δt nicht normalverteilt ist, können die Verteilungsfunktionen der $1/AA_n(\Delta t)$ nicht mit der Studentschen t-Verteilung berechnet werden. Um geeignete Schwellen zum Auffinden der Peaks im $1/AA_{30}(\Delta t)$ -Graph zu ermitteln, wurde daher eine Montecarlo-Simulation mit 10^6 exponentiell verteilten Zufallszahlen durchgeführt (Abbildung 4.6.3.6-1):

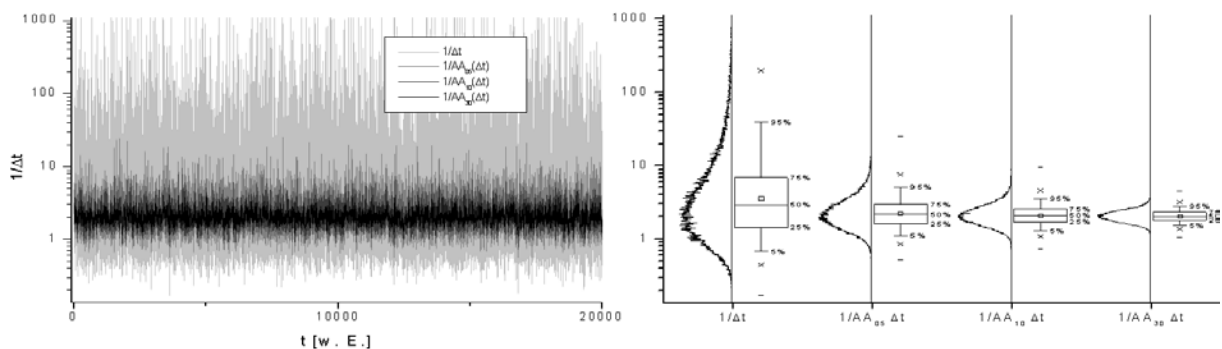


Abbildung 4.6.3.6-1 Montecarlo-Simulation geglätteter, exponentiell verteilter Zufallszahlen
Das Boxdiagramm auf der rechten Seite zeigt zur besseren Übersicht die Verteilung von $\ln(1/\Delta t)$. Der abgelesene Mittelwert (kleines Quadrat) entspricht daher dem geometrischen Mittel von $1/\Delta t$, nicht dem arithmetischen. (Die Quantile werden hingegen nicht verändert). Als Glättfilter wurde der gleitende Durchschnitt mit ± 5 , ± 10 und ± 30 Datenpunkten Fensterbreite gewählt.

Liegt die mittlere Ereignisfrequenz bei 2 Hz, so ergibt sich aus der in Abbildung 4.6.3.6-1 gezeigten Montecarlo-Simulation mit 10^6 Datenpunkten, daß 99,9 % aller Werte des Kehrwertes des gleitenden Durchschnitts über 61 Ereignisse, $1/AA_{30}(\Delta t)$, zwischen 1,16 Hz und 3,83 Hz liegen. Als 90% - Intervall erhält man [1,51 Hz; 2,76 Hz]. Der Median liegt bei 2,00 Hz. Von den 10^6 simulierten Datenpunkten lagen 10 des $1/AA_{30}(\Delta t)$ -Graphen über 4,88 Hz das entspricht 0,001 %. Die Wahrscheinlichkeit dafür daß ein Peak im $1/AA_{30}(\Delta t)$ -Graph

während eines Sequenzierlaufs mit typischerweise weniger als 10^4 Einzelmolekülereignissen das 2,5-fache der mittleren Ereignisfrequenz zufällig überschreitet, sollte demnach unter 0,1 % liegen.

In der Praxis ist die Situation durch die nicht verschwindende Ereignisbreite komplizierter: Zwei Ereignisse, deren Abstand geringer ist als etwa die Ereignisbreite, können nicht aufgelöst werden. Hinzu kommen technische Beschränkungen wie die nicht verschwindende Binweite der MCS-Spuren. Zur Auswertung müssen die Spuren geglättet werden, um zu verhindern daß die Ereignisse durch das Schrotrauschen des Detektionsprozesses und die Photophysik der Moleküle („Blinking“) von der Ereigniserkennung gespalten werden. Als maximal meßbare Ereignisfrequenz ergibt sich der Kehrwert der Glättfensterbreite w . Das entspricht typischerweise etwa 300 Hz.

In Abbildung 4.6.3.6-2 sind die Verteilungsfunktionen des Ereignisabstandes von Versuch D aus Kapitel 4.6.3.6-3 gezeigt. Die Verteilungsfunktionen von $1/\Delta t$ weichen in allen Phasen des Versuchs von der zufälligen Verteilung ab. In den Phasen „Raus1“ und „Raus2“ zeigt sich aber noch eine gewisse Ähnlichkeit mit der zufälligen Verteilung, wenn man von den Abweichungen bei hohen Frequenzen absieht. Unter der Annahme, daß die hohen Frequenzen zurückgefaltet werden, wie dies bei der Fouriertransformation mit Frequenzen oberhalb der Nyquistfrequenz geschieht („aliasing“), kann man diese Abweichung erklären. Zudem sollte man beachten, daß der mittlere Abstand der Zufallszahlen zeitlich invariant ist, die Ereignisfrequenz der Messungen jedoch einer Drift unterliegt (Abbildung 4.6.3.6-2, links).

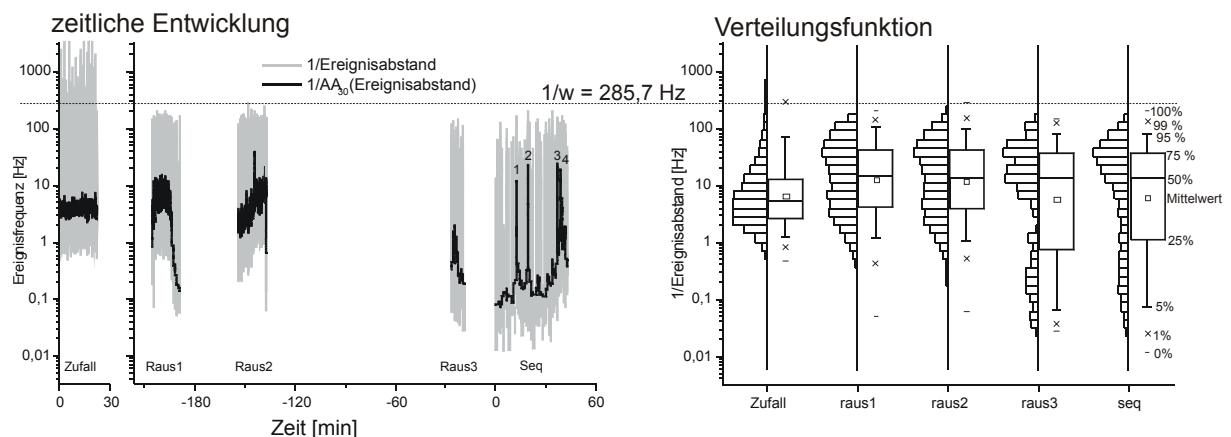


Abbildung 4.6.3.6-2 Kehrwert des Ereignisabstands in Versuch 4.6.3.3-D Während der „Sequenzierung“ treten vier Stufen auf.

Aussagekräftiger als die Verteilungsfunktion von $1/\Delta t$ ist der zeitliche Verlauf der gleitend gemittelten Ereignisfrequenz $1/AA_{30}(\Delta t)$ (Abbildung 4.6.3.6-2, links): Hier treten nur während der „Sequenzierung“ deutlich erkennbare Spitzen auf. Diese entsprechen den Stufen in Abbildung 4.6.3.3-5.

Tabelle 4.6.3.6-1 fasst die Stufen aller Experimente, die mit der statistisch markierten, 1662 Basen langen M13MP18 – Teilsequenz durchgeführt wurden, zusammen.

In der ersten Spalte ist der Versuch und die Stufenbezeichnung angegeben. Ein „S“ in der Bezeichnung zeigt an, daß sich die Stufe während der „Sequenzierung“, also nach der Magnesiumzugabe ereignete. Ein „R“ zeigt an, daß die Stufe in der Phase des „Rausziehens“ ungebundener DNS, also vor der Magnesiumzugabe lag.

In der zweiten und dritten Spalte ist die Anzahl der als Cy5-dCMP und Mr121-dUMP erkannten Ereignisse aufgeführt.

Der Parameter

$$S = \frac{\ln(Cs!) + \ln(Us!) - \sum_{i=1}^{\text{Anzahl Blocks}} \ln(n_i!)}{\ln(Cs!) + \ln(Us!)}$$

ist ein Maß für die „Zufälligkeit“ der Sequenz: Besteht die Sequenz aus 5Cs und 5Us, so hat die geordnete Sequenz „UUUUUCCCCC“ den Wert $S = (\ln(5!) + \ln(5!) - \ln(5!) - \ln(5!)) / (\ln(5!) + \ln(5!)) = 0$, die gemischte Sequenz „UCCCCUUCUC“ hingegen den Wert $S = \ln((5! 5!) / (2! 3! 2! 1! 1! 1!)) / \ln(5! 5!) = \ln(120^2 / 24) / \ln(120^2) = 0,67 \leq 1$.

Die Dauer gibt die Zeit vom Ereignismaximum des ersten bis zum Maximum des letzten Ereignisses der Stufe an.

Die Flankenschwankung

$$\sigma_F = \frac{\text{MAX}\left(\frac{1}{AA_{05}(\Delta t)}\right) - \text{MIN}\left(\frac{1}{AA_{05}(\Delta t)}\right)}{(Cs + Us) / \text{Dauer}}$$

gibt an, wie „gleichmäßig“ die Stufe ansteigt: Eine Stufe mit äquidistanten Ereignissen hat den Wert $\sigma_F = 1$, eine Stufe die in Etappen zerfällt, einen Wert $\sigma_F \gg 1$.

Die Rate gibt die als

$$\text{Rate} = \frac{Cs + Us}{Cs + Us + 1} \cdot \frac{1622 \text{ Basen}}{\text{Dauer}}$$

ermittelte mittlere prozessive Schneiderate des Enzyms an. Der Vorfaktor berücksichtigt, daß das erste detektierte Mononucleotid nicht unbedingt an Position 1622 eingebaut wurde, das letzte nicht an Position 1.

Die Spalte Bewertung zeigt an, ob ich nach Betrachtung der MCS-Spuren, der Ereigniskurven und der Abklingdauern der Ereignisse zu dem Schluß gekommen bin, daß die betreffende Stufe wahrscheinlich eine andere Ursache (aufgespaltenes breites Ereignis (dns) oder Luftblasen) als den Abbau eines DNS-Stranges hat. Die Ereignisfrequenzkurven, MCS-Spuren, Ereigniskurven, und Abklingdauern der Stufen sind beim jeweiligen Versuch gezeigt.

Stufe	Cs	Us	Zuf. S	Dauer [s]	σ_F	Rate [Hz]	Bewertung
4.6.3.3-Versuch D 2000-09-22 S 1	2	41	0,31	3,686	3,9	429,9	dns
4.6.3.3-Versuch D 2000-09-22 S 2	6	36	0,40	3,702	4,1	427,7	dns
4.6.3.3-Versuch D 2000-09-22 S 3	50	58	0,72	7,083	4,0	226,9	
4.6.3.3-Versuch D 2000-09-22 S 4	52	33	0,62	11,589	7,2	138,3	
4.6.3.5-Versuch 2 2000-09-02 RII 1	13	17	0,68	15,674	11,4	100,0	
4.6.3.5-Versuch 2 2000-09-02 S 1	19	33	0,68	34,579	8,3	46,0	
4.6.3.5-Versuch 2 2000-09-02 S 2	32	40	0,61	45,081	20,4	35,5	
4.6.3.5-Versuch 2 2000-09-02 S 3	18	13	0,74	1,558	2,1	1007,5	
4.6.3.5-Versuch 2 2000-09-02 S 4	16	52	0,41	12,038	8,9	132,8	
4.6.3.5-Versuch 2 2000-09-02 S 5	13	44	0,39	9,702	8,8	164,3	
4.6.3.5-Versuch 2 2000-09-02 S 6	22	26	0,70	24,130	10,9	65,8	

4.6.3.5-Versuch 2	2000-09-02	S	7	18	27	0,39	25,086	25,2	63,2	
4.6.3.5-Versuch 2	2000-09-02	S	8	9	36	0,44	36,216	20,0	43,8	
4.6.3.5-Versuch 3	2000-09-14	RII	1	26	22	0,55	10,128	10,3	156,9	
4.6.3.5-Versuch 3	2000-09-14	RIII1		43	55	0,75	19,843	4,9	80,9	
4.6.3.5-Versuch 3	2000-09-14	RIII2		12	19	0,78	0,824	1,8	1906,1	
4.6.3.5-Versuch 3	2000-09-14	RIII3		22	16	0,19	4,168	9,4	378,9	
4.6.3.5-Versuch 3	2000-09-14	S	1	12	25	0,63	4,016	4,3	393,0	
4.6.3.5-Versuch 3	2000-09-14	S	2	10	34	0,50	7,549	6,9	210,0	
4.6.3.5-Versuch 3	2000-09-14	S	3	10	22	0,58	10,447	13,0	150,4	
4.6.3.5-Versuch 3	2000-09-14	S	4	10	54	0,54	5,658	3,3	282,2	
4.6.3.5-Versuch 3	2000-09-14	S	5	6	54	0,48	10,523	11,7	151,6	
4.6.3.5-Versuch 3	2000-09-14	S	6	58	28	0,40	32,089	30,2	50,0	
4.6.3.5-Versuch 3	2000-09-14	S	7	28	13	0,63	31,736	23,6	49,9	
4.6.3.5-Versuch 3	2000-09-14	S	8	40	17	0,54	27,216	6,7	58,6	
4.6.3.5-Versuch 5	2000-05-10	RII	1	53	8	0,33	31,980	15,9	49,9	
4.6.3.5-Versuch 5	2000-05-10	RII	2	20	17	0,42	67,493	54,4	23,4	
4.6.3.5-Versuch 5	2000-05-10	RII	3	55	0	0,00	2,751	1,6	579,0	Luftblasen
4.6.3.5-Versuch 5	2000-05-10	RII	4	10	17	0,63	2,213	2,7	706,0	
4.6.3.5-Versuch 5	2000-05-10	S	1	12	16	0,09	15,224	20,4	102,7	
4.6.3.5-Versuch 5	2000-05-10	S	2	1	31	0,13	3,435	5,1	457,5	dns
4.6.3.5-Versuch 5	2000-05-10	S	3	9	30	0,47	102,900	74,6	15,4	
4.6.3.5-Versuch 5	2000-05-10	S	4	1	35	0,12	0,843	1,7	1871,7	dns
4.6.3.5-Versuch 5	2000-05-10	S	5	17	21	0,45	45,756	91,6	34,5	
4.6.3.5-Versuch 5	2000-05-10	S	6	18	23	0,46	80,927	37,3	19,6	
4.6.3.5-Versuch 5	2000-05-10	S	7	15	39	0,44	47,964	52,3	33,2	
4.6.3.5-Versuch 6	2000-08-29	RI	1	22	20	0,85	1,753	2,1	903,2	
4.6.3.5-Versuch 6	2000-08-29	RI	2	29	19	0,70	1,327	2,3	1197,3	
4.6.3.5-Versuch 6	2000-08-29	RI	3	24	95	0,59	5,976	3,1	269,2	
4.6.3.5-Versuch 6	2000-08-29	RI	4	18	25	0,73	9,873	13,9	160,5	
4.6.3.5-Versuch 6	2000-08-29	RI	5	14	22	0,36	1,819	3,2	866,9	
4.6.3.5-Versuch 6	2000-08-29	RI	6	9	41	0,06	5,208	4,8	305,2	
4.6.3.5-Versuch 6	2000-08-29	RI	7	60	48	0,68	3,902	2,5	411,9	
4.6.3.5-Versuch 6	2000-08-29	RI	8	30	24	0,71	6,312	5,9	252,2	
4.6.3.5-Versuch 6	2000-08-29	RII	1	13	58	0,49	77,016	58,6	20,8	
4.6.3.5-Versuch 6	2000-08-29	S	01	5	30	0,38	0,523	1,5	3012,7	dns
4.6.3.5-Versuch 6	2000-08-29	S	02	25	3	0,17	1,034	1,8	1512,6	
4.6.3.5-Versuch 6	2000-08-29	S	03	18	38	0,76	7,170	4,3	222,2	
4.6.3.5-Versuch 6	2000-08-29	S	04	8	20	0,41	8,043	14,5	194,5	
4.6.3.5-Versuch 6	2000-08-29	S	05	19	26	0,70	1,627	3,0	974,8	
4.6.3.5-Versuch 6	2000-08-29	S	06	21	33	0,48	1,789	2,5	890,1	
4.6.3.5-Versuch 6	2000-08-29	S	07	11	23	0,71	3,848	2,6	409,1	
4.6.3.5-Versuch 6	2000-08-29	S	08	10	32	0,49	4,241	5,0	373,4	
4.6.3.5-Versuch 6	2000-08-29	S	09	5	27	0,52	2,725	5,7	576,7	
4.6.3.5-Versuch 6	2000-08-29	S	10	14	41	0,62	60,643	62,2	26,3	
4.6.3.5-Versuch 6	2000-08-29	S	11	22	65	0,60	2,887	3,2	555,5	
4.6.3.5-Versuch 6	2000-08-29	S	12	3	44	0,35	2,823	4,6	562,3	
4.6.3.5-Versuch 7	2000-04-11	S	1	11	66	0,13	36,938	14,3	43,3	

Tabelle 4.6.3.6-3 Parameter der in den Kapiteln 4.6.3.3 und 4.3.6.5 aufgetretenen Stufen.

Stufen, die vor Magnesiumzugabe auftraten, führen in ihrer Bezeichnung ein „R“; solche, die nach dem Mg-Zusatz auftraten, ein „S“.

Zur Definition der Zufälligkeit S und der Flankenschwankung σ_F siehe Text auf vorhergehender Seite.

Die „Rate“ entspricht der mittleren prozessiven Schneiderate des Enzyms, falls die Stufe tatsächlich durch den Abbau eines einzelnen DNS-Stranges hervorgerufen wird.

Insgesamt wurden 58 Stufen ermittelt, von diesen traten 18 vor der Magnesiumzugabe und 40 danach auf.

Im Folgenden werden nur solche Stufen berücksichtigt, die nicht durch Artefakte wie Luftblasen oder austretende, nicht abgebaute DNS verursacht wurden. Man erhält dann insgesamt 52 Stufen, davon 17 vor und 35 nach Magnesiumzugabe.

Die Verteilungsfunktion der Stufenhöhen (Abbildung 4.6.3.6-3, links) sollte die des Markierungsgrades wiedergeben. Als Mittelwert ergibt sich 53,2 bei einer Standardabweichung von 22,5. Die Höhen der „Raus“-Stufen (Mittel 55,6; Stabw. 28,1) unterscheiden sich dabei nicht von denen der „Sequenzierung“-Stufen (Mittel 52,0; Stabw. 19,5). Der spektroskopisch ermittelte Markierungsgrad ist 60; diese Ergebnisse entsprechen damit den Erwartungen.

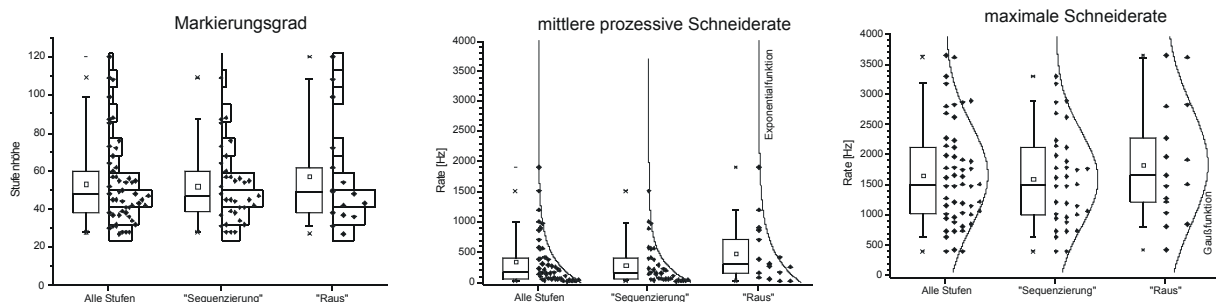


Abbildung 4.6.3.6-3 Verteilungsfunktion der Stufenhöhe, der prozessiven Schneiderate (aus der Stufendauer) sowie der aus der maximalen Schneiderate (aus der max. Flankensteigung).

Aus der Stufendauer, also der Zeit zwischen den Maxima des ersten und des letzten Ereignisses der Stufen, erhält man die mittlere prozessive Schneiderate der Exonuclease in der jeweiligen Stufe (bei 25°C Temperatur). Diese ist annähernd exponentialverteilt (Abbildung 4.6.3.6-3, Mitte). Als Mittelwert über alle Stufen ergibt sich 339 ± 57 Hz, für die Stufen vor Magnesiumzugabe erhält man 481 ± 130 Hz, für die nach Magnesiumzugabe 280 ± 59 Hz. Diese Mittelwerte stimmen mit dem prozessiven Ensemblemittelwert an unmarkierter DNS gut überein. (275 Hz bei 37°C [Brody 1986]). An markierter DNS sind bislang jedoch deutlich niedrigere Werte (3,3 Hz bei 25 °C [Sauer 2001] bzw. 44 Hz bei 25 °C [Werner 2003]) beobachtet worden.

Auffällig an den hier ermittelten mittleren Schneideraten ist ihre große Schwankung von Stufe zu Stufe. Um deren Ursache festzustellen, wurden verschiedene Parameter der Stufen gegen die Schneiderate aufgetragen:

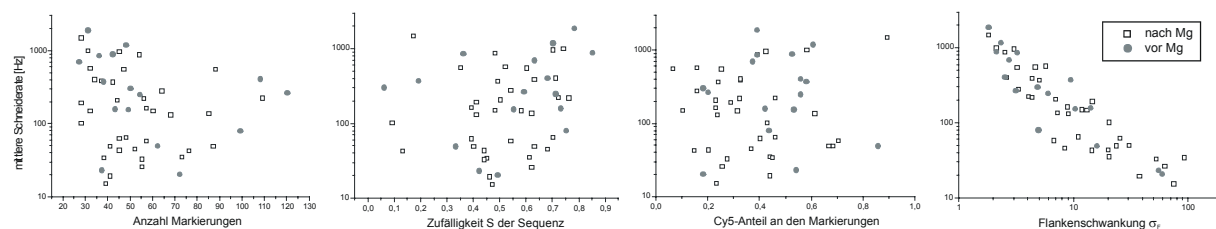


Abbildung 4.6.3.6-4 Abhängigkeit der mittleren Schneiderate von den übrigen Parametern der Stufen.

Wenn die Exonuclease durch die Farbstoffe behindert wird, sollte die mittlere Schneiderate mit zunehmendem Markierungsgrad fallen. Diese Erwartung konnte durch das Experiment nicht bestätigt werden (Abbildung 4.6.3.6-4, links). Auch der Anteil von Cy5 und Mr121 (Abbildung 4.6.3.6-4, Mitte rechts) oder die Zufälligkeit der Sequenz (Abbildung 4.6.3.6-4, Mitte links) scheint keinen Einfluß zu haben.

Die Ungleichmäßigkeit σ_F der Stufe zeigt dagegen eine sehr deutliche reziproke Korrelation mit der mittleren Schneiderate. Stufen mit konstanter Ereignisfrequenz zeigen also größere mittlere Schneideraten als solche, die in Etappen zerfallen.

Die maximale Schneiderate

$$\text{Maxrate} = \frac{1622 \text{ Basen}}{N + 1} \cdot \max\left(\frac{1}{AA_{05}(\Delta t)}\right)$$

(Abbildung 4.6.3.6-3, rechts) beträgt über alle Stufen gemittelt 1659 Hz (Stabw. 843 Hz), nach Magnesiumzugabe 1593 Hz (Stabw. 789 Hz), vor Magnesiumzugabe 1832 Hz (Stabw. 974 Hz).

4.6.4 Versuch mit vollständig markierter DNS

Als Substrat wird in diesem Abschnitt das Produkt einer Startsequenz-Erweiterungs-Reaktion (primer extension reaction) verwendet. Als Gegenstrang (template) diente die Sequenz des Bakteriophagen ϕ -x-174. Als Triphosphate standen der Polymerase neben dATP und dGTP Mr121-dUTP und Cy5-dCTP zur Verfügung, jedoch kein unmarkiertes UTP und kein unmarkiertes CTP. Das Reaktionsprodukt ist also an diesen beiden Basen vollständig markiert. Eine solche DNS erfüllt die Minimalanforderungen, die zum Erhalt von Sequenzinformation durch Einzelmolekül-DNS-Sequenzierung notwendig ist [Jett 1995].

Das zur Synthese verwendete Enzym ist eine speziell entwickelte Mutante der Polymerase des Bakteriophagen T4. Diese weist gegenüber Markierungen an den Basen eine erhöhte Toleranz auf [Reha-Krantz 1999 a,b].

Der verwendete Primer, 5'-Biotin-CCC.TGA.AAC.AAA.TGC.TTA.GGG-3' ist komplementär zu den Basen 1360-1380 der (kreisförmigen) ϕ -x-174-Sequenz (1291×A, 1157×C, 1254×G, 1684×T) [EMBL 1996]. Die Reaktionsbedingungen entsprechen mit Ausnahme der Fluoreszenzmarker den in [Werner 2003] beschriebenen.

Sollte die Polymerase nicht vorzeitig abfallen, so ist beim Abbau in 3'→5' Richtung die in Abbildung 4.6.4-1 gezeigte Sequenz zu erwarten. Diese Sequenz enthält 1249 × Cy5-dCMP und 1287 × Mr121-dUMP. Die maximal zu erwartende Sequenzlänge beträgt also 2536 Signale.

```

0          10          20          30          40          50          60          70          80          90
1300                                     . (1381) 3'-aaUaaaCUU.aUagaUaUUg
1400 UUGaUaaaaU.UUCgCggCaC.CUaCggaCUg.gCaUggCUCC.gaUUgggaUU.aCUCgaaUua.gUUCUaCUaC.gagCaaUaCC.aaaggCaaCg.aCggUagagU
1500 UUUUgUaaaC.CUgaCgaggC.gaaggaggCa.UUCUgCaUCg.aagagCggUU.UaCUgCUgaa.gUggUgUag.aUaaCUgUaa.UaCCcagaCg.UUCGaCgaaU
1600 aCgaUUaaaC.gUaUgaCUgg.UUCUgCaCU.aaUgaagUaC.gUCgCaaUgg.UaCUaCaaUa.aaagaagUaaa.CCUCcaUUUU.ggagaaUaCU.gCgaCUgUUg
1700 gCaggaaaUg.aaCagUaCgC.gagaUUagag.aCCcUvagaC.CgaUaCUaCa.aCUaCCUUga.CUggUUUgCa.gCaaUCCggU.CaaaagaCCa.gCaCaagUUg
1800 UCUGgaUaUU.UgUaagaCaC.ggCgCaaaga.aaCaaggaCU.CgUaCCgUga.UaCaaaUgag.aaCgCgaaCa.agCaaaaggC.ggaUgaCgCU.gaUUUCUaU
1900 agUCaUggaa.UUgCgaUUUC.CaCgaaaCUg.aaUaUggCUa.UaaCgaCCgC.UgggaCaaaa.CaUaCCUgUg.aaCggCggCg.CaCUaUUUU.CUaaCUaCa
2000 CaaaaggCaa.gCaCUaUag.CagaUUUCUUC.aaaUUUCUaaC.gaCUCCcagU.CaCCaUagCa.aUaCgCggaa.gCaUaCaaag.aggCaCaaUa.UggaagaaC
2100 UUCcgaaggg.UaagUaagUC.CUUggCggaa.gCaCaCUaaa.CgUUUCUgCg.CaUgaaUaag.CggUggUaCU.aaUaCUggUC.aCaaaggUCA.ggCaagUCAa
2200 CaaCgUCaCC.UUaUCagUCC.aaUUUaaaUU.aCaCUggCaa.aUagCgUUag.aCggCUggUg.agCgCUaagU.UagUaCUgaa.gCaCUaUUUU.CUaaCUaCa
2300 CUCCaaUUaU.gCggUUUCgC.CaUUUUUaaa.aUUaaaaaCg.gCaCUCCCC.aaCUggUUUCg.CUUcgcgCCa.UCCaaaagaC.gaaUCCUaa.aUUagUaCaa
2400 agUCUgaaaa.UaaagagCgg.UaUUaaUUUU.gaaaaaaaga.CUaUUcgaCC.aagagUgaag.aCaaUgaggU.CgaagaagCC.gUggaCaaaa.UgUCUgUgga
2500 UUUcgaUgUa.gCagUUGCa.UaUaaaaCUa.UCaaaCUgCC.aaUUaCgaCC.aUUaCCaCCa.aaagaagUaa.CgUaagUCUa.CCUaUgUaga.CagUUgCggC
2600 gaUUagUCCa.aCaaagaCaa.CCaCgaCUU.aaCgaaaaCU.aCggCUggga.UUUaaaaaaC.ggaCaaCCa.agCgaaCUC.agaagaagCC.aaggCUgaUg
2700 ggagggCUga.CggaUaCUaC.aaaUaggaaa.CUUaCCagCg.gUaCUaCCaC.CaaUaaUaUg.gCagUUCCUg.aCaCaCUgaU.aaCUgCagga.aggggCaUgC
2800 ggCCCGUaU.UgCaaaUaCa.aCCaaagUaC.CaaaCCagaU.UgaaaUggCg.aUgaUUUaCg.gCgCCUaaCC.aaagCgaCUU.agUCCaaUaa.UUUCUaUaa
2900 aaaCagaggU.CggUgaaUU.CUCCaCUaa.aUaCaaCCa.CgaUaaCgaC.CgCCaUaaCg.aagaCgagaa.CgaCCaCCgC.ggUaCagaUU.UaaCaaCCU

```

```

3000 CCgCCagUUU.UUCggCggag.gCCaCCgUaa.gUUCcACUaC.aCgaaCgaUg.gCUaUUGUUa.UgaCaUCCgU.aCCCACUaCg.aCCaUaaUUU.agaCggUaa
3100 UUCcCagaUU.aCaaagUUg.ggaCUaCUCC.ggCggggaUC.aaaaCaaaga.CCaCgaUaCC.gauUUCgacc.aUUUCUgaa.gaaCUUCCaU.gCaaCgUCCg
3200 aCCgUgaaga.CggCaaagaC.UaUUcAaCga.aCUaaaCCaa.CCUgaaCCaC.CgUUCagaCg.gCgaCUaUUU.CCUUUCCUaU.gagCaCUaaU.agaaCgaCga
3300 CgUaaaaggaC.UCgaaUUaCg.aaCCUCgCa.CgaCCaCgaC.UaCgaaggag.aCgaCCaUaC.CaaCUGcggC.CUaaaCCUUU.agUUUUUUCU.gaaUgaUUUU
3400 aCgUUGaCCU.gUUGUgUUUU.UCUUaaCggC.UCUaCgUUUU.aCUUGagUUU.UUUUCUgUaaC.gACCgUaagU.CagCCgCUga.agUgCggUUC.UaUgCUUUUC
3500 ggUCCaUaUa.CgUgUUUUaC.UCUaCgaaCg.aaUagUUgUC.UUCUUCagaU.gACgagCgCa.aCgCagaUaa.UaCCUUUUgU.ggUUgaaag.gUUCgUUgUC
3600 gUCCaaaggC.UCUaUaCgC.ggUUUaCgaa.UgagUUCgag.UUUGCCgacc.agUcaUaaaa.UggUUaCUGg.UUUagUUUCU.UUaCUgagCg.UUCCaaUcAc
3700 gaCUCCaaCU.gaaUCaaGua.gUCgUUUgCg.UCUUagUcGc.CaUaCCgaga.agagUaUaaC.CgCgaUgaCg.UUUCCUaUaa.agauUaCagC.agUgaCUaCg
3800 aCgaaagCCa.CaCCaaCUaU.aaaaagUaac.aUaaCUaUUU.CgaCaaCggC.UaUgaaCCUU.gUUaaagaCC.UUUCUgCCaU.UUCgaCUaCC.aUaaCCgaga
3900 UUaaaCagaU.CCUUUaUUgC.CagUCCUaaC.UgUgggaggg.UUaaCaUaCa.aaagUaCgga.ggUUUagaaC.CUCCgaaaaa.aUaCCaaGCa.agaaUaaUgg
4000 gaagaCUUaC.agUgCgaCUa.aUaaaaCUga.aaCUcGCaUa.gUCCGgaaU.UUUGgaCgaU.aaCUCCgaaC.aCCgUaaaGa.Ugagaaagag.UUaggggUUa
4100 CgaaCCgaag.gUaUUCgUUU.aCCUaUUgUgC.gUagUUCgag.aaCCUUGaCU.aagaCagaaa.agCaUaCgUC.CCgCaaCCU.UgCUaUUaCC.aCUaUaCUa
4200 CaaCUgCCgC.UaUUCcCgaCg.aaagaCUgCaa.gCaCUaCUaC.aaCaUaGaaC.aUgaCUUUCU.aaUaCUUaC.UUaaCCgUgU.UaCgaUgUaU.CaCgaggggg
4300 UUGaaCUaU.aUUaUUgUga.UaUCUggUgg.CggggCUUCC.CCUgCUUUUU.aCaaaaaUC.UCUUgCUUUU.CUGCCaaUgC.gUaaaaCgg.CgUUcgaCCg
4400 aCgaCUUgCg.ggagaaUUCC.UaUaaGcGCU.aCUaCUaUUa.aUggggUUUU.UCUUUCCaUa.aUCCUaCUc.aCaaGUUUaC.aCgaCCUCCg.gaggUgaUaC
4500 UUUagCgCaU.CUCCgaaaCg.aUaaGUCgCa.aaCUaCUUaC.gUaUcGtUgU.CCgagUaCga.CUaCCaaCCa.aaUagCaaaa.aCUgUgagag.UgCaaCCgac
4600 UgCUggCUaa.UCUCcCaaa.aUaCUaUUag.ggUUaCgaaa.CgCaCUgUaU.aaagCaCUaU.aCCagCaUa.CCaagaaCga.CggUCCcag.CgUUCcgaUU
4700 aCUaaGtUgU.CggUaGaaUg.UagUCaUaaa.aaCaCaCgga.CUaCUaCCaU.gCgaUUaCC.ggCagaagUa.aaggUaCgC.aCgUUgaaaU.CgCCUgUgaa
4800 ggaUgUCCaU.CgCaaCUggg.aUUaaaaCCa.CgagCCaUg.CgUagCggC.ggUcaUUUa.UCgaaCgUUU.UaUgCaCCg.aaUaCCaaUg.UCaUaCggU
4900 agCgUcAagC.gauUgUgUgC.CUGcgaaaaa.gUgCaagaCC.aaCCaaCaCC.ggaCaaCUaC.gauUUCcAcU.CggCGaaUUU.CgaUggUcAa.UaUaCCgCa
5000 aCaaagUUgU.CaCCgaUUUa.UgCaaUUgUU.UUUcagUUUa.UaCCUgaaC.gCgaUUUCC.agaUCCUgU.UUUUUUaCaa.UgUUgagUga.UUUUUgUgU
5100 gaCagCgaUg.aagggUUUUU.CgaCaagUUU.UagUUUUaCU.CggCUUUgaa.gCCCUaCUUU.UaCgagUgUU.aCUUUUaGaa.CaggUgCCUC.aCgaaUUag
5200 UUGaaUggUU.CgaCCcAaUg.CUGcGcUgCg.gCaaGtUgUg.CUaUaaCUUC.gUcUUgCgUU.UUUUCUcUa.CUCUaaCUCC.gacCCUUUUU.aaUgaCaUc
5300 gCUgCaaaaC.CgCCgCgUg.gCaCUgCg.UUUaGaaCgag.UUUaaUaCg.CgCgaagCUa.UUUUUaCUaa.CCgCaUagUg.UggaCgU(5386)
0000 CUcaaaaUa.gCgaagUaC.UgCgUUUaC.aUUgUgaaag.CCUaUaaaga.CUaCUcagCU.UUUUaaUaga.aCUaUUUCgU.CCUUaaUgaU.gacGaaCaaa
0100 UgCUUaaUUU.agCUUCaCCU.gACgaCCgCC.UUUUaCUUUU.UUaaGCUgga.UaggaaCgCg.UcGagCUUUU.CgagaaUgaa.aCgUggaaaa.gCgUagUUg
0200 aUUGCUaaga.CagUUUUUgU.CUGcGcaaaC.UaCUCCUUU.CaCCgaaUUa.UaCgaaCCgU.gCaagCagUU.CCUaCCaaa.UCUaUaCUaC.UgUuaaaaCa
0300 agUaCCaUCU.CUaaagaaC.aaCUgUaaaa.UUUUCUcGCa.CCUaaUgaUa.gacUCaggCU.aCgaCaagUU.ggUgaUUaUC.CaUUUUUag.UaCUcagUUC
0400 aaUgaCUUgU.UaggCaUgCa.aaggUcUgUg.aaaaCCggag.aUaaUUcGag.UaagUCCgaa.gACgCaaaa.CCUaaaUUgU.CUUUUaCUaa.agCUaaaaga
0500 CUgCUaUUG.UUUcaaaaCCU.aaCgaUgaCU.ggCgagagCa.CgagCagCga.CgCaaCUCCg.aaCgCaaUa.CCaUgCgaCC.UgaaaCaCC.UaUgggagCg
0600 aaaggaCgag.gacaaCUca.aUaaCgaCgg.CagUaaCgaa.UaaUaCaagU.aaggCagUUg.UaagUUUgCC.ggaCagagUa.gUaCCUUCCg.CgaCUUaaaU
0700 gCCUUUUgUa.aUaaUUaCCg.CagCUcGcag.gCCaaUUUcG.CgCaCUUaaC.aagCgCaaaU.ggaaCgCaCa.UgCgCgUCCU.UUgUgaCUgC.aagaaUgaCU
0800 gCgUcUUGU.UUgCaCgCag.UUUUUaaUgC.aCgCCUUUCU.CaCUaCaUua.CagaUUUUca.UUUUUUgCaa.gacCCgagC.gggagCgagC.ggCgUcGgCa
0900 aCgCUCCaUg.aUUUCcGUU.gCaUUUCCgC.gagCagaaaC.CaUaCaUCCa.CCagUUgUua.aaaUaaCgU.CCCCGaaCC.ggggaaUgaa.CUCCUaUUUa
1000 aUaCagaUUa.UaagUUUgac.CgCggCUcGc.aUaCggCgUa.CUGgaaaggg.UagaaCCgaa.ggaaCgaCCa.gUCUaaCCag.CagaaUaaUg.gUaaagUUga
1100 UagggCCaaU.agCgaCCgCU.gaggaagUUC.UaCCUgCggC.aaCCgCgaga.ggCagaaaga.ggUaaCgCag.CaCCggaaCg.aUaaCgUgaga.UgaCaCUUgU
1200 aaaaaUgaaa.aaUaCagggg.gUagCagUgC.aaUaCCaCU.UgUaCCUaa.UUCaaGuaCU.UCCUaCCaCa.aUUaCggUga.ggagaggGCU.gacaaUUgUg
1300 aUgaCCaaUa.UaaCUgUaC.ggCgaaaaaga.aCCgUgCUaa.UUgggaCUaU.ggUUaUUUUa.gggauucua.aacaaagucc.c-5'-Biotin
|<- Primer ->|
    
```

Abbildung 4.6.4-1 Sequenz des Gegenstrangs zu ϕ -x-174 (in 3'->5'-Richtung) C steht für Cy5-dCMP, U für Mr121-dUMP. Die Ziffern geben die Nummer des komplementären Nucleotids auf der ϕ -x-174-Sequenz nach [EMBL 1996] in 5'->3'-Richtung an.

Die tatsächlich aufgebaute Sequenz ist aber wahrscheinlich viel kürzer. Schätzungen aus FCS-Messungen und Elektrophoreseexperimenten in Agarose-Gelen lassen eine Sequenzlänge von einigen hundert Basen erwarten. Davon trägt etwa die Hälfte Markierungen.

Der Ablauf des Versuches entspricht dem aus Abschnitt 4.6.3.5 (Abbildung 4.6.4-2):

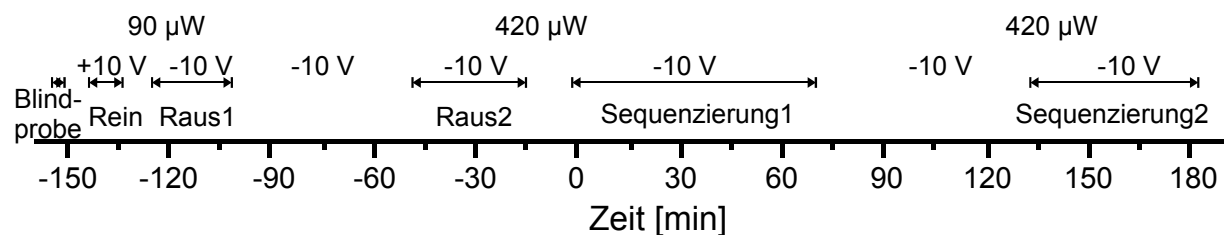


Abbildung 4.6.4-2 Zeitlicher Ablauf des Experimentes.

Der Femtotip enthält Pufferlösung (67,4 % bidest. Wasser, 30 % Glycerin, 2,1 % PVP, 0,5 % Tween 20, 30 mM Tris, 20 mM Borsäure, pH = 8,5) mit einer Exonucleaseaktivität von 0,4 U/ μ l (entsprechend etwa 2×10^{-8} M Exol) und 1 mM EDTA-Na als Inhibitor. Im „Gegenfemtotip“ befindet sich ca. 5×10^{-10} M DNS-Lösung im gleichen Puffer (ohne Exo I). Vor dem eigentlichen Versuch wurde wiederum eine Blindprobe durchgeführt (Daten nicht gezeigt): In 60 s wurden 29 Ereignisse (mit den in Tabelle 4.6.4-1 angegebenen Parametern), entsprechend einer Ereignisfrequenz von 0,5 Hz, erfasst.

Gate ($\Sigma = 64$ Kanäle = 12,5 ns, Pulsmaximum in Kanal #7)		9-60
Glättfilter	Fensterbreite w	3,5 ms
	Lee-Parameter S_0	60 kHz
Erkennungsschwelle		2,3 kHz
Startschwelle		0,3 kHz
Trennschwelle		20 %

Tabelle 4.6.4-1 Parameter zur Erkennung der Monophosphate während der Blindprobe (bei 10 V Spannung und 90 μ W Anregungsleistung)

Zum Nachweis der DNS –Stränge während der „Rein“- und der „Raus1“-Messung wurden die in Tabelle 4.6.4-2 angegebenen Parameter verwendet:

Gate ($\Sigma = 64$ Kanäle = 12,5 ns, Pulsmaximum in Kanal #7)		9-60
Glättfilter	Fensterbreite w	40,5 ms
	Lee-Parameter S_0	50 kHz
Erkennungsschwelle		6 kHz
Startschwelle		1 kHz
Trennschwelle		50 %

Tabelle 4.6.4-2 Parameter zur Erkennung der DNS-Stränge (bei 10 V und 90 μ W)

Die Erkennungsschwelle mußte im Vergleich zu Abschnitt 4.6.3.5 reduziert werden. Offenbar macht sich in der hochmarkierten DNS (mit etwa 300 Fluorophoren auf 600 Nucleotide) die intramolekulare Fluoreszenzlöschung stärker bemerkbar als in den statistisch markierten PCR-Produkten (mit etwa 60 Fluorophoren auf 1600 Nucleotide).

Zum „Reinziehen“ wurden +10 V Spannung an die Elektrode im Femtotip gegen die Elektrode im „Gegenfemtotip“ gelegt und die Anregungsleistung auf 90 μ W eingestellt. Es wurden (mit den in Tabelle 4.6.4-2 angegebenen Parametern) 71 DNS-Stränge in 410 s detektiert.

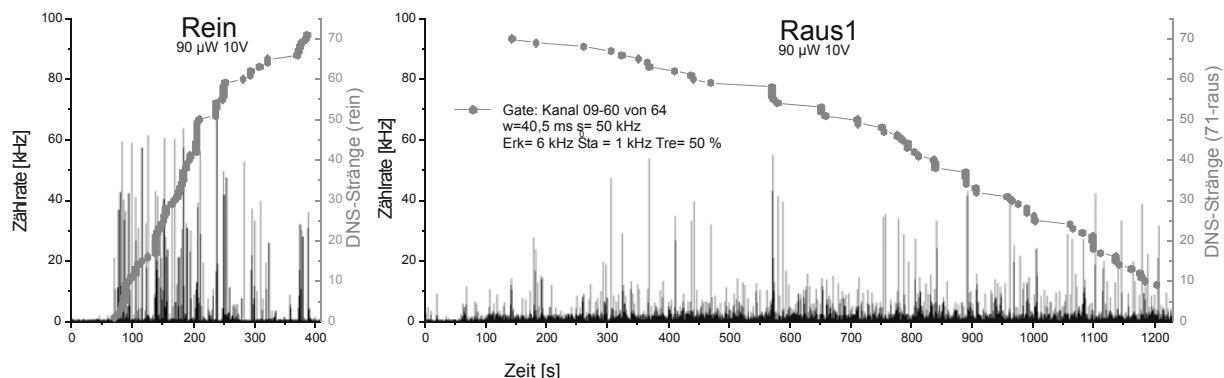


Abbildung 4.6.4-3 „Rein“- und „Raus“- ziehen der DNS: Etwa 9 Stränge werden gebunden.

Der „Gegenfemtotip“ wurde entfernt. Im weiteren Verlauf des Versuches lagen permanent – 10 V Spannung an der Elektrode im Femtotip gegen die Außenelektrode.

Während der „Raus1“ – Messung betrug die Anregungsleistung wiederum 90 μ W. Es wurden (mit den in Tabelle 4.6.4-1 angegebenen Parametern) 62 DNS-Stränge in 1240 s detektiert.

Als Differenz erhält man somit ungefähr 9 an die Faser gebundene Stränge. (Abbildung 4.6.4-3).

Um adsorbierte Monophosphate zu entfernen, lag die Spannung vor Magnesiumzugabe nach der „Raus1“-Messung weitere 1½ h an (Abbildung 4.6.4-2).

Etwa 1 h nach dem Ende der „Raus1“-Messung wurde bei 420 µW Anregungsleistung die „Raus2“-Messung durchgeführt.

Die Magnesiumzugabe definiert den Nullpunkt der Zeitachse in Abbildung 4.6.4-2. Anschließend wurden zwei „Sequenzierung“-Messungen von 4096 s und 2791 s Dauer bei 420 µW Anregungsleistung durchgeführt.

Das in Kapitel 4.3 beschriebene Verfahren zur Ereigniserkennung ergibt für die „Sequenzierung1“-Messung als Erkennungsschwelle 7,5 kHz und als Startschwelle 0,9 kHz.

Die Parameter zur Ereigniserkennung wurden variiert, um festzustellen, bei welchen Parametern eine möglichst gute Übereinstimmung zwischen der gefundenen Folge von Cs und Us und der erwarteten Sequenz (Abbildung 4.6.4-1) erreicht wird:

Es wurden folgende Parameterkombinationen getestet:

(S/N-Optimierung:	Gate = 09-60; Gate = 10-40) ×
(Glättfensterbreite:	w = 1,5 ms; w = 2,5 ms; w = 3,5 ms) ×
(Lee-Parameter:	s ₀ = 20 kHz; s ₀ = 60 kHz; s ₀ = ∞) ×
(Erkennungsschwelle	Erk = 4,5 kHz; Erk = 7,5 kHz; Erk = 12 kHz) ×
(Startschwelle	Sta = 0,9 kHz; Sta = 3,0 kHz) ×
(Trennschwelle	Tre = 20 %; Tre = 50 %)

Von den sich ergebenden 2×3×3×3×2×2 = 216 Kombinationen erhält man mit den vier Kombinationen mit Gate = 09-60; w = 2,5 ms s₀ = ∞; Erk = 12 kHz (Sta, Tre = beliebig) als maximal übereinstimmenden Bereich 31 „Treffer“ in Folge .

Mit den ursprünglich ermittelten Erkennungsparametern Gate = 09-60; w = 1,5 ms s₀ = 20 kHz ; Erk = 7,5 kHz; Sta = 0,8 kHz Tre = 50% ergeben sich hingegen nur maximal 18 Treffer in Folge.

Auf das Abklingdauerhistogramm (Abbildung 4.6.4-4) haben die Parameter Erk und w den stärksten Einfluß: Bei niedrigen Erkennungsschwellen (Erk = 4,5 kHz) und schmalen Glättfenstern (w = 1,5 ms) dominieren Ereignisse mit Fluoreszenzabklingdauern von etwa 0,4 ns (ln(τ/ns) = -0,9 ± 1,5). Dieser Streulicht-Peak verschwindet bei Erk = 7,5 kHz und Erk = 12 kHz. Das Gate, der Lee-Parameter s₀ und die Startschwelle Sta haben nur einen geringen Effekt auf die Ereignisstatistiken. Die höhere Trennschwelle Tre = 50 % führt zu einer geringeren Überlappung der Pulse für Cy5-dCMP und Mr121-dUMP.

Im folgenden werden die Auswertungen der Daten mit den beiden in Tabelle 4.6.4-3 angegebenen Parameterkombinationen dargestellt.

Auswertung A:

Gate (Σ = 64 Kanäle = 12,5 ns, Pulsmaximum in Kanal #7)		9-60
Glättfilter	Fensterbreite w	1,5 ms
	Lee-Parameter S ₀	60 kHz
Erkennungsschwelle		7,5 kHz
Startschwelle		0,8 kHz
Trennschwelle		50 %

Auswertung B:

Gate ($\Sigma = 64$ Kanäle = 12,5 ns, Pulsmaximum in Kanal #7)		9-60
Glättfilter	Fensterbreite w	2,5 ms
	Lee-Parameter S_0	∞
Erkennungsschwelle		12 kHz
Startschwelle		0,8 kHz
Trennschwelle		50 %

Tabelle 4.6.4-3 Parameter zur Erkennung der Mononucleotide (bei 10 V und 420 μ W)

Die Lorentzfits an die Abklingdauerverteilungsfunktionen (Abbildung 4.6.4-4) ergeben für Auswertung A

$$\ln(\tau/\text{ns})_{\text{Cy5}} = 0,282 \pm 0,005$$

$$W_{\text{Cy5}} = 0,653 \pm 0,018$$

$$A_{\text{Cy5}} = 0,527 \pm 0,018$$

$$\ln(\tau/\text{ns})_{\text{Mr121}} = 1,026 \pm 0,008$$

$$W_{\text{Mr121}} = 0,866 \pm 0,023$$

$$A_{\text{Mr121}} = 0,640 \pm 0,020$$

und für Auswertung B

$$\ln(\tau/\text{ns})_{\text{Cy5}} = 0,288 \pm 0,004$$

$$W_{\text{Cy5}} = 0,497 \pm 0,013$$

$$A_{\text{Cy5}} = 0,636 \pm 0,015$$

$$\ln(\tau/\text{ns})_{\text{Mr121}} = 1,087 \pm 0,009$$

$$W_{\text{Mr121}} = 0,732 \pm 0,027$$

$$A_{\text{Mr121}} = 0,536 \pm 0,018.$$

Während die Abklingdauer für Cy5 mit 1,326 ns (A) bzw. 1,333 ns (B) in sehr guter Übereinstimmung mit dem Ensemblewert (1,32 ns) ist, ist die Abklingdauer für Mr121 mit 2,790 ns (A) bzw. 2,965 ns (B) etwas zu lang; der Ensemblewert beträgt 2,31 ns.

Als Klassifizierungsschwelle wurde in beiden Auswertungen $\ln(\tau/\text{ns}) = 0,69$ (entsprechend $\tau = 1,99$ ns) gewählt. Ereignisse mit Fluoreszenzabklingdauern unterhalb dieser Schwelle werden als Cy5-dCMP, solche oberhalb als Mr121-dUMP gewertet.

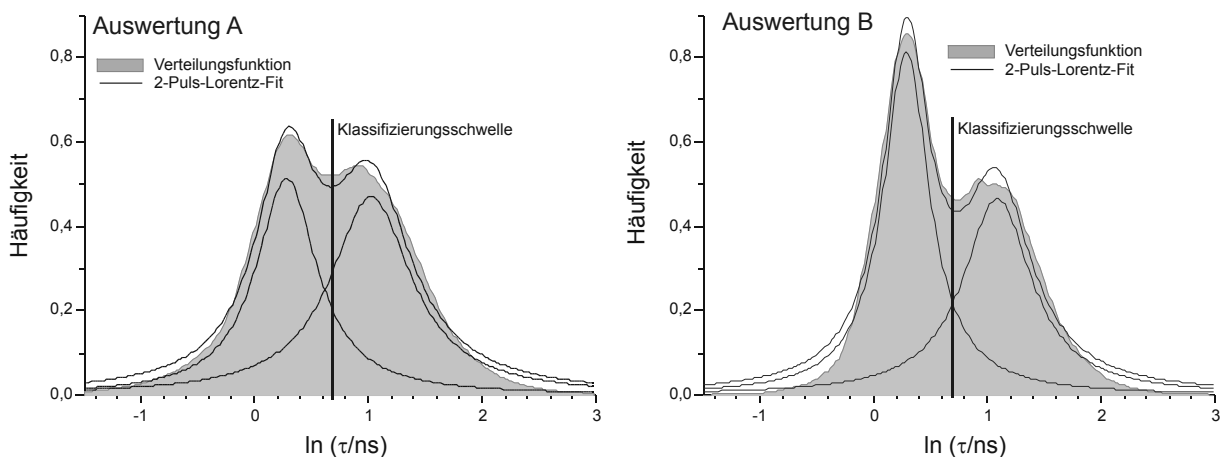


Abbildung 4.6.4-4 Abklingdauerhistogramme der Messung „Sequenzierung1“

Die Klassifizierungsschwelle wurde auf $\ln(\tau/\text{ns})=0,69$ gelegt. Die Parameter zur Ereigniserkennung sind der Tabelle 4.6.4-3 zu entnehmen.

Während der „Sequenzierung1“- Messung werden nach Auswertung A 5296 Ereignisse erkannt, davon 2707 \times Cy5-dCMP, 2576 \times Mr121-dUMP und 13 nichtklassifizierte (Abklingdauer ist nicht bestimmbar oder Abklingdauer liegt auf der Klassifizierungsschwelle).

Nach Auswertung B erhält man 2204 Ereignisse, davon 1222 \times Cy5-dCMP, 979 \times Mr121-dUMP und 3 nichtklassifizierte.

Bei beiden Auswertungen ist 1680 s nach Magnesiumzugabe ein deutlicher Anstieg der Ereignisfrequenz erkennbar. Bei Auswertung A von im Mittel 0,5 Hz auf 1,8 Hz; bei

Auswertung B von 0,2 Hz auf 0,8 Hz. Der relative Anstieg der Ereignisfrequenz liegt bei 3,3 bzw. 3,8.

Die Ereignisfrequenz ist am Ende der „Sequenzierung1“-Messung noch nicht abgesunken, die Messung mußte jedoch beendet werden, weil die Festplatte des Meßrechners voll war. Nachdem die Daten komprimiert und verschoben waren, wurde die „Sequenzierung2“-Messung gestartet. Die Ereignisfrequenz war zu diesem Zeitpunkt bereits wieder auf den Wert zu Beginn der „Sequenzierung1“-Messung zurückgegangen.

Abbildung 4.6.4-5 zeigt den Verlauf des Versuches ab der „Raus2“-Messung nach Auswertung A und B:

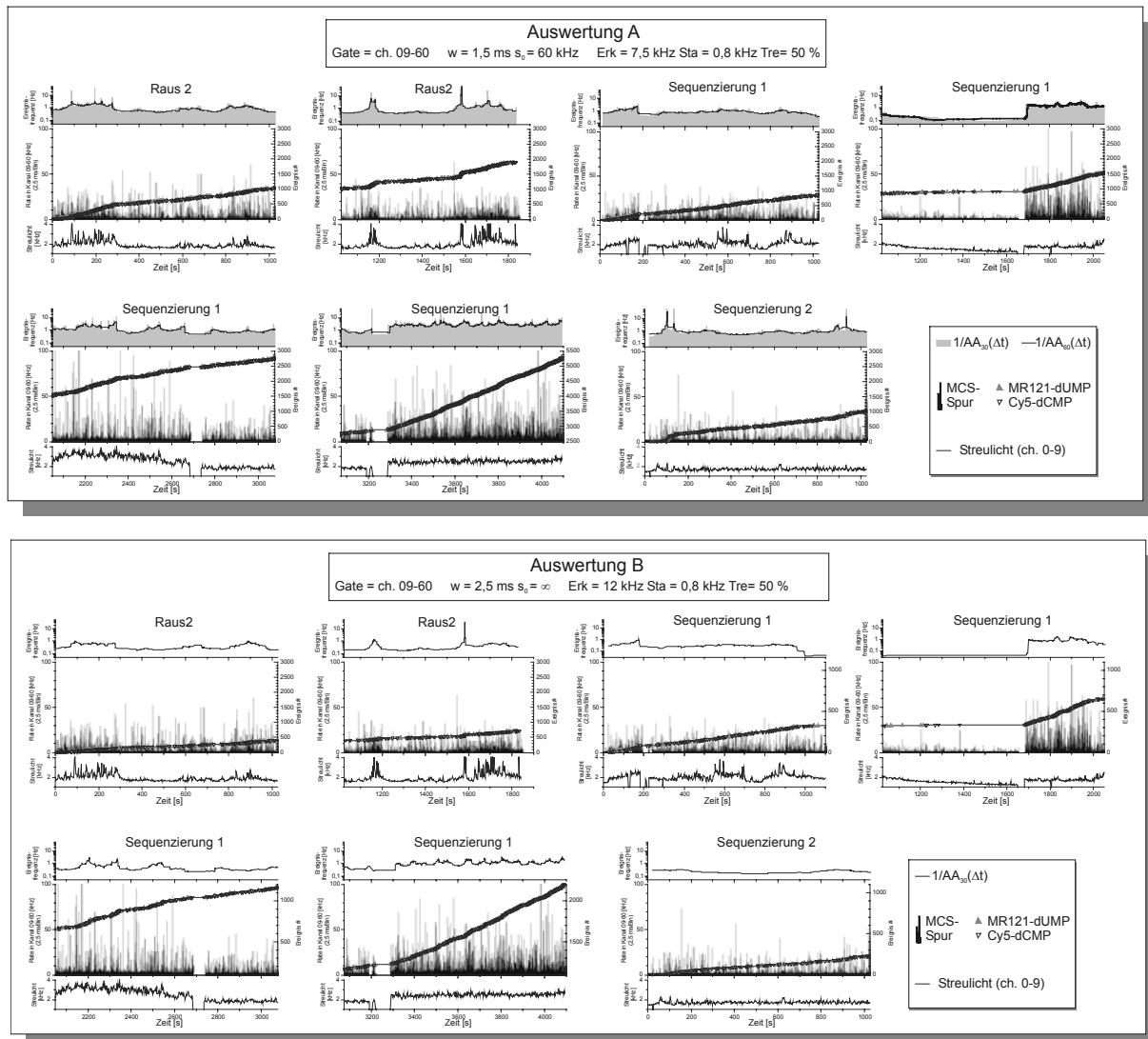


Abbildung 4.6.4-5 Versuchsverlauf ab der „Raus2“-Messung

Das Absinken der Ereignisfrequenz während der „Sequenzierung1“ im Zeitraum von 1150-1650 s ist auf eine Dejustierung des Femtotips zurückzuführen (erkennbar am Rückgang der Streulichttrate). Ein zeitbasiertes Histogramm über die Ereignisfrequenz $1/AA_{30}(\Delta t)$ (Abbildung 4.6.4-6) enthüllt, daß diese im Bereich über 1680 s in zwei Domänen zerfällt: Abschnitte mit der Untergrundrate von $(0,76 \pm 0,67)$ Hz (Auswertung A) bzw. $(0,34 \pm 0,16)$ Hz (Auswertung B), die jeweils 44% (A) bzw. 41 % (B) der Meßzeit umfassen. Die Domänen mit hoher Ereignisfrequenz weisen Zählraten von $(2,25 \pm 1,75)$ Hz (Auswertung A) bzw. $(0,99 \pm 0,73)$

Hz (Auswertung B) auf. Unterhalb 1100 s liegt die Ereignisfrequenz dagegen dauerhaft im Bereich der niedrigen Zählrate. Die Autokorrelationsfunktion von $\ln \frac{1}{\Delta t}(t)$ zeigt (für $t > 1680$ s) nach beiden Auswertungen zwei Stufen, eine bei einer Verschiebung von etwa 1,8 s und eine bei 560 s. Die Stufen finden sich entsprechend auch in den Autokorrelationsfunktionen von $\ln \frac{1}{\Delta t}(\text{Ereignis\#})$: Die Stufe bei 1,8 s entspricht nach Auswertung (A) 6 Ereignissen, nach Auswertung (B) 3 Ereignissen. Die Stufe bei 560 s entspricht 360 (A) bzw. 140 (B) Ereignissen.

Der Ereignisfrequenzunterschied zwischen den Domänen beträgt 1,5 Hz (A) bzw. 0,7 Hz (B), was bei einem Markierungsgrad von 50% einer mittleren Schneiderate des Enzyms von 3 Hz (A) bzw. 1,4 Hz (B) entspricht.

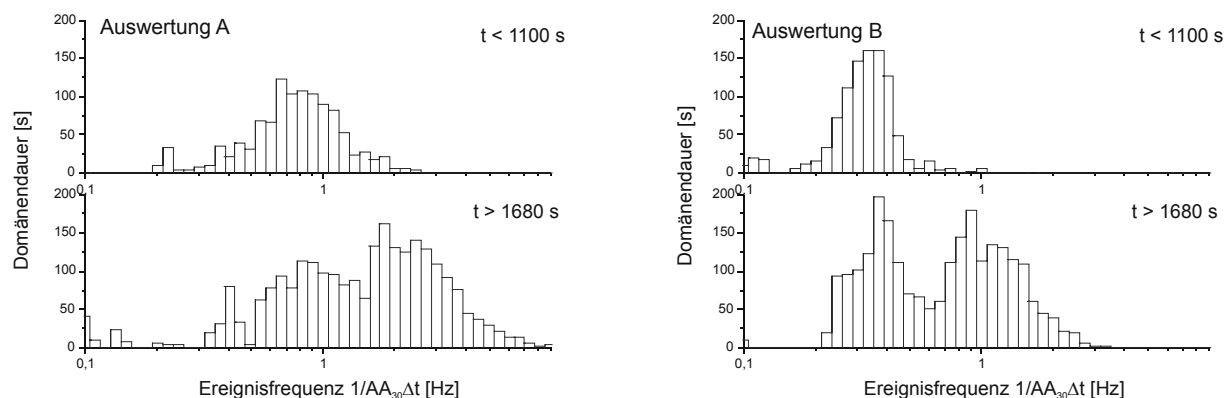


Abbildung 4.6.4-6 Histogramme über die Ereignisfrequenz

Die Histogramme über $\ln(1/AA_{30}(\Delta t))(t_i)$ können durch eine lognormal-Verteilung mit zwei Pulsen beschrieben werden:

$$A: xc_1 = -0,27 \quad w_1 = 0,89 \quad A_1 = 104,3 \quad xc_2 = 0,81 \quad w_2 = 0,78 \quad A_2 = 132,9.$$

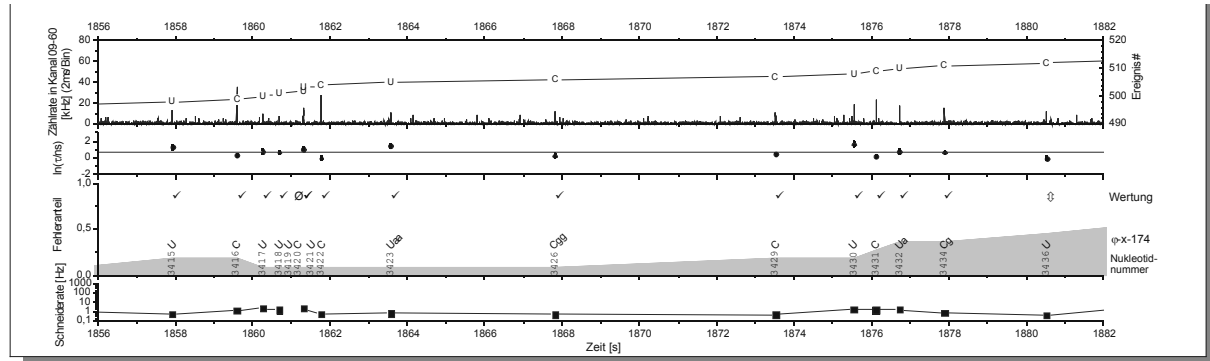
$$B: xc_1 = -1,08 \quad w_1 = 0,48 \quad A_1 = 98,4 \quad xc_2 = -0,01 \quad w_2 = 0,74 \quad A_2 = 139,3.$$

Die gemessenen Ereignislisten werden gegen die Zielsequenz verschoben und nach übereinstimmenden Bereichen gesucht. Übertrifft die Länge eines passenden Bereiches 11 „Treffer“, so wird die Sequenz von diesem „Startstück“ ausgehend unter Minimierung der Fehleranzahl und Maximierung der Fehlereintrittswahrscheinlichkeit verlängert.

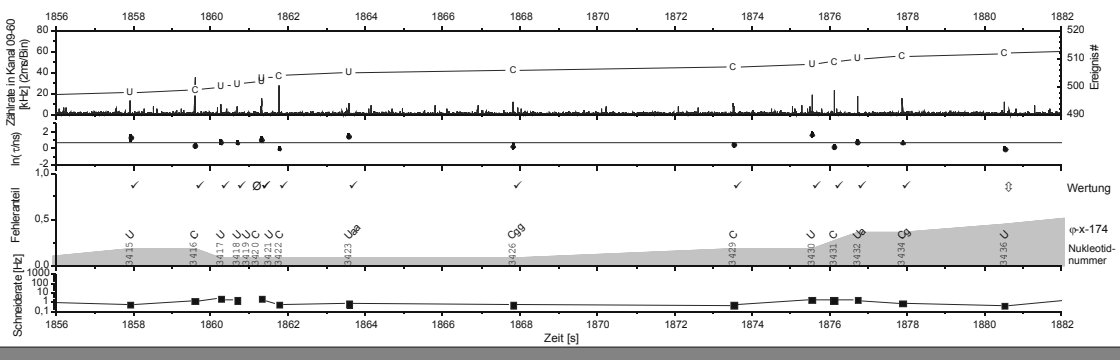
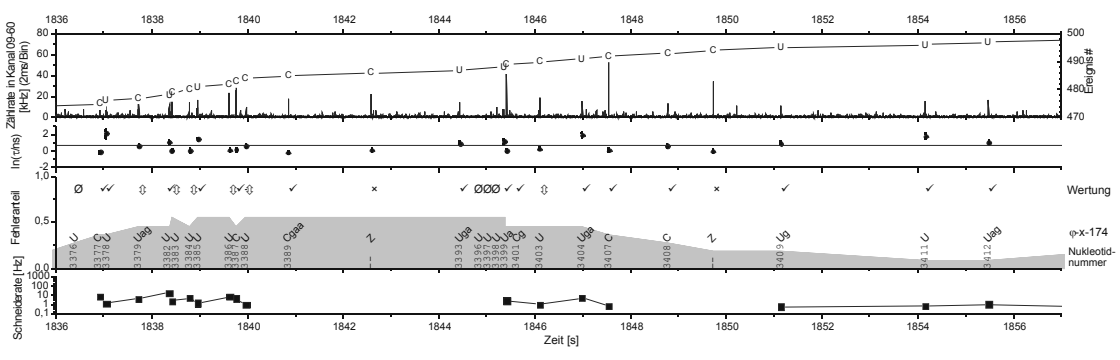
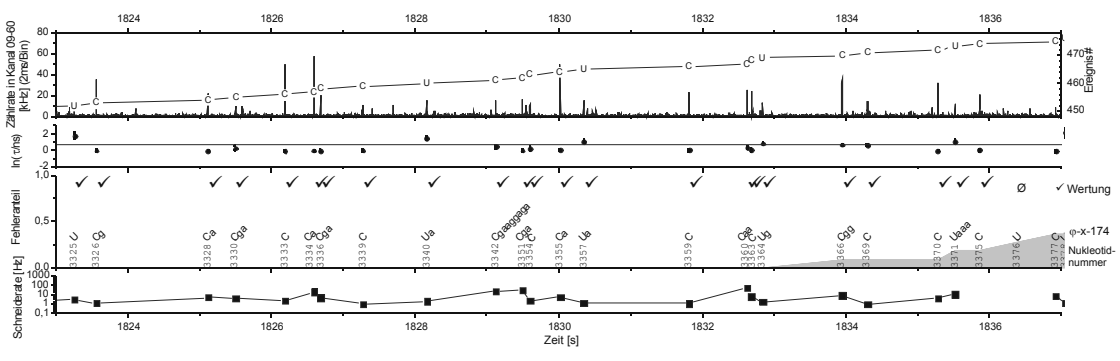
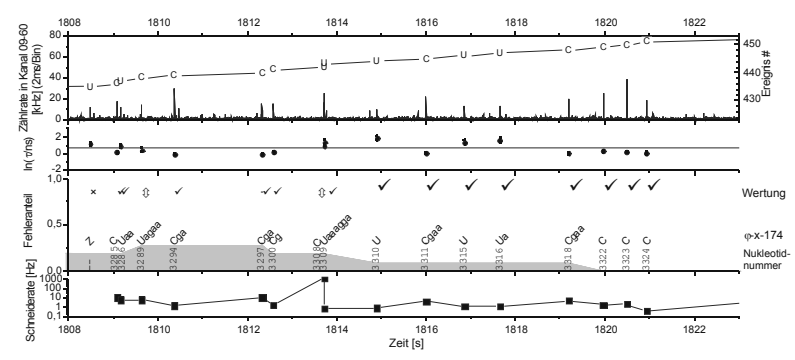
Es gibt 3 mögliche Fehlertypen: Die Sequenz kann unter der Annahme, daß

- 1) ein Element der Zielsequenz von der Ereigniserkennung nicht erfaßt wurde (\emptyset)
oder
- 2) ein Ereignis falsch klassifiziert wurde (\updownarrow)
oder
- 3) sich ein zusätzliches Ereignis (Untergrund) in die Sequenz eingeschoben hat (\times)
fortgesetzt werden. (\checkmark)

Nach Auswertung A ergeben sich 1593 „Startstücke“ mit mindestens 12 „Treffern“ in Folge, von denen sich eines mit 20 Fehlern auf mindestens 80 „Treffer“ verlängern läßt. Das „Startstück“ ist 16 Ereignisse lang. Nach Auswertung B ergeben sich 554 „Startstücke“, von denen sich 2 mit 20 Fehlern auf mindestens 80 „Treffer“ verlängern lassen. Das längere „Startstück“ (B1) ist 31, das kürzere (B2) 22 Ereignisse lang. Abbildung 4.6.4-7 zeigt die Lage der Trefferabschnitte für beide Auswertungen:



B1
Auswertung B
Startsequenz @ 1815 s



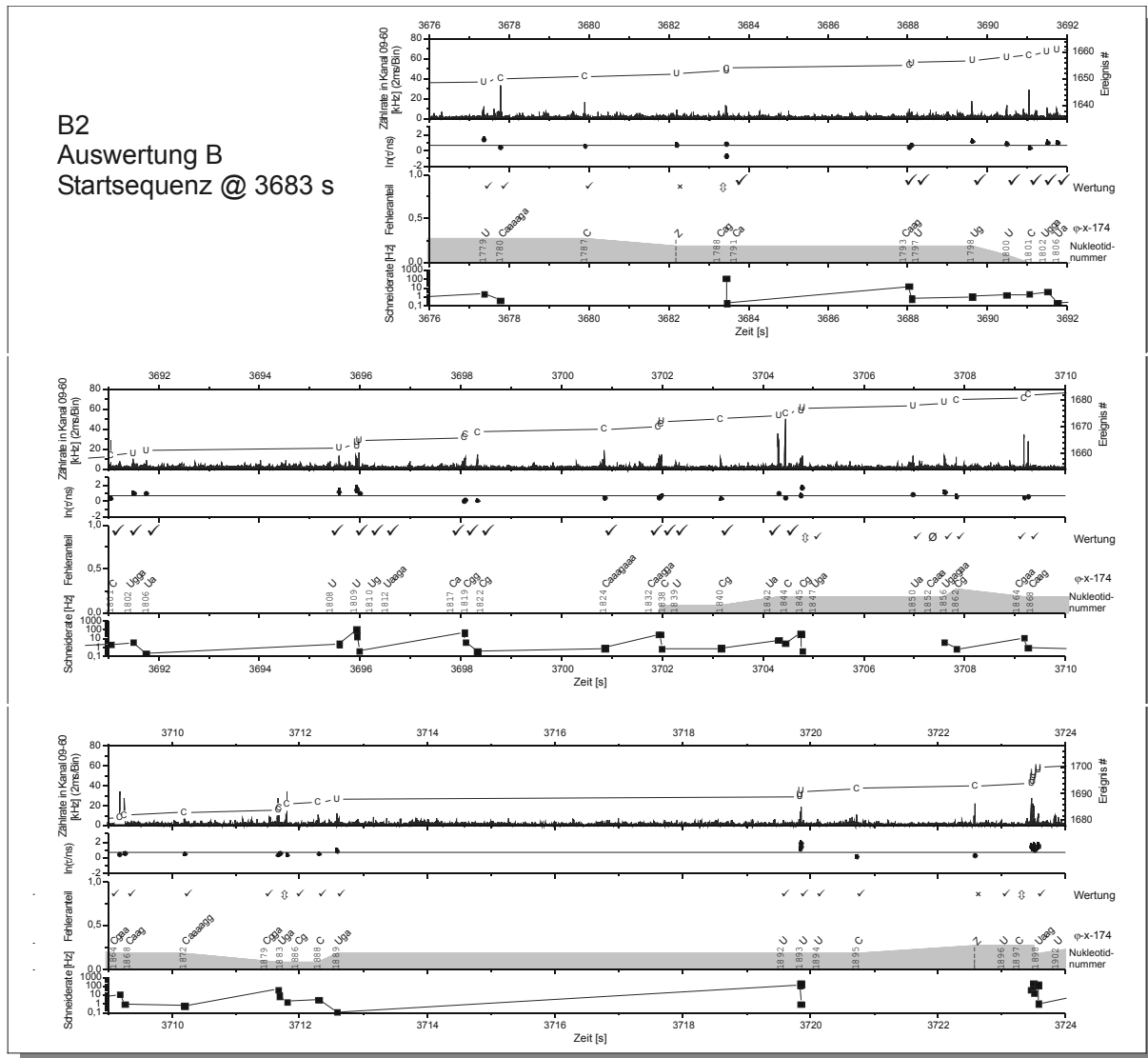


Abbildung 4.6.4-8 Zuordnung von Abschnitten der gemessenen Sequenz zum Genom von ϕ -x-174

Die einzelnen Teilgraphiken bestehen jeweils aus vier Zeilen:

1. Zeile: MCS-Spur (Kanal 09-60) mit einer dargestellten Binweite von 2,5 ms und Ereigniskurve (C = Cy5-dCMP, U= Mr121-dUMP)

2. Zeile: In der mit dem MLE-Schätzer bestimmten Abklingdauer in ns (mit Fehlerbalken). Die durchgezogene Linie zeigt die Klassifizierungsschwelle ($\ln t/ns=0,69$).

3. Zeile: Zuordnung zum ϕ -x-174 Genom:

Wertung: ✓: erwartetes Nucleotid gefunden

∅: Nucleotid der Zielsequenz nicht gefunden (fehlendes Ereignis)

⊗: Ereignis falsch klassifiziert

x: zusätzliches Ereignis (Untergrund oder Ereignis gespalten)

Zielsequenz: Gegenstrang zum ϕ -x-174-Genom in 3'→5' - Richtung

Position auf der ϕ -x-174-Sequenz (nach [EMBL 1996]) in 5'→3'-Richtung

4. Zeile: ermittelte Schneiderate in Basen pro Sekunde

Zufall

Die Wahrscheinlichkeit dafür, von einem bestimmten Startpunkt aus L mit der Zielsequenz übereinstimmende Ereignisse zufällig zu finden, beträgt bei zwei Markern 2^{-L} . Hat man E_m Ereignisse gemessen, so erhält man bei einer Zielsequenz der Länge E_z $E_m \times E_z$ mögliche Startpunkte. Ist $L \gg 1$, so wird die Anzahl N der Treffer der Länge L in der Ereignisliste Poisson-verteilt mit

$$W(N) = e^{-\lambda} \frac{\lambda^N}{N!} \quad \lambda = \langle N \rangle = E_z \times E_m \times 2^{-L} \quad (4.6.4-1)$$

Die Wahrscheinlichkeit dafür, mindestens einen Abschnitt mit 16 Treffern bei $E_m=5296$ und $E_z = 2536$ zu finden (Auswertung A), beträgt ($\lambda_{A1} = 204$) $1 - e^{-204} = 100\%$. Der „Treffer“ bei Auswertung A ist demnach schon rein zufällig sehr wahrscheinlich. Er kann daher nicht als Beleg für eine Einzelmolekülsequenzierung dienen.

Bei Auswertung B ist die Situation anders: Hier wurde bei $E_m = 2204$ eine Sequenz der Länge $L = 31$ (B1 in Abb. 4.6.4- 8) gefunden. Der Erwartungswert dafür beträgt $\lambda_{B1} = 0,02$. Die Wahrscheinlichkeit, daß dieser Treffer Zufall ist, beträgt demnach nur 0,25 %.

Der Treffer B2 hat eine Startlänge von 22. Hier ergibt sich mit $\lambda_{B2} = 1,33$ eine Wahrscheinlichkeit von 73%, diesen Treffer zufällig zu finden.

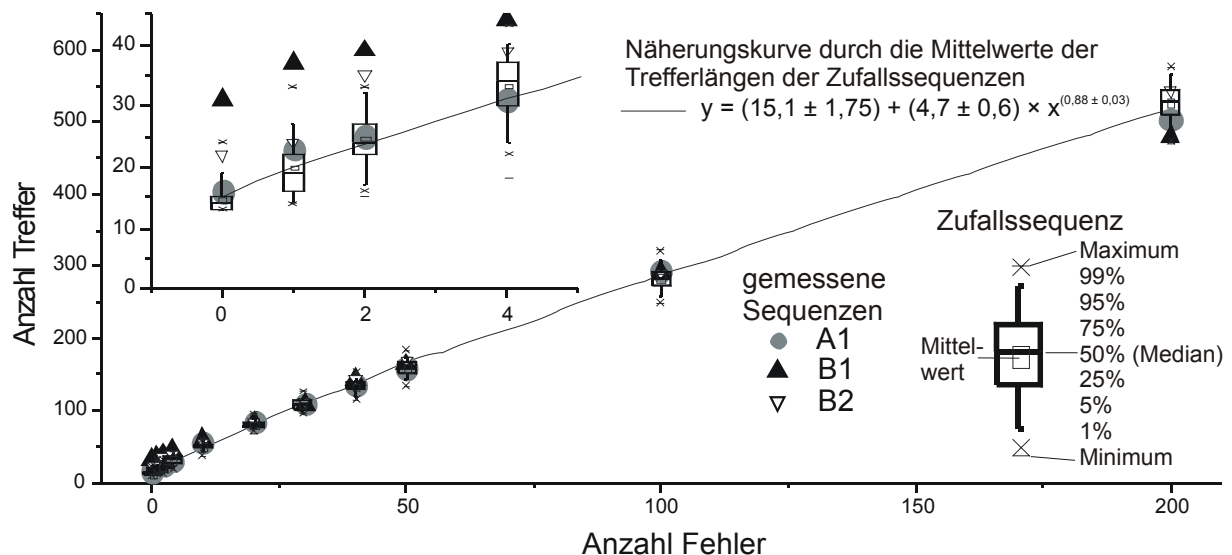


Abbildung 4.6.4-9 Vergleich der gemessenen Sequenzen mit Monte Carlo-Simulationen
 Der Treffer B1 zeigt deutliche Abweichungen von den Zufallszahlen.

Um diese Ergebnisse zu untermauern, wurden je 5 Zufallssequenzen mit 5295 und mit 2204 Zahlen erzeugt und diese genau so ausgewertet, wie die gemessene Sequenz.

Mit den längeren Sequenzen ergaben sich 33, 26, 32, 21 und 30 Abschnitte mit einer Startlänge von mindestens 12, die sich mit 20 Fehlern auf 80 „Treffer“ verlängern lassen. Die kürzeren Sequenzen ergaben 6, 12, 6, 4 und 5 solcher Abschnitte.

Die Abbildung 4.6.4-9 zeigt die erreichbare Trefferlänge in Abhängigkeit von der zugelassenen Fehleranzahl für die drei gemessenen Abschnitte A1, B1 und B2 im Vergleich zu den Zufallszahlen (als Boxdiagramme). Nur der Treffer B1 zeigt (bei 4 oder weniger Fehlern) deutliche Unterschiede zu den Zufallszahlen.

Schneiderate

Sollte der Treffer B1 echt sein, so ergibt sich eine am Einzelmolekül gemessene Schneiderate von im Mittel $(3375-3310)/(1835,86 \text{ s} - 1814,91 \text{ s}) = 3,1 \text{ Hz}$.

Für den Zufallstreffer A1 ergäbe sich entsprechend 30 Hz und für B2 2,6 Hz. Nach den Ereignisfrequenzhistogrammen (Abbildung 3.6.4-6) waren 3,0 Hz (A) bzw. 1,5 Hz (B) zu erwarten.

Fehlerrate

Der Untergrund (0 s-1000 s) beträgt 0,9 Hz (A) bzw. 0,3 Hz (B). Bei Auswertung B sollte demnach in der gemessenen Sequenz etwa alle 10 abgebaute Basen ein Untergrundeignis eingeschoben sein. Da nur jede zweite Base markiert ist, ergibt sich ein Untergrundanteil in der Sequenz von etwa $1/(5+1)$. Nach den Lorentzfits der Abbildung 4.6.4-4 beträgt die Wahrscheinlichkeit dafür, daß ein Cy5-Molekül eine Abklingdauer oberhalb der Klassifizierungsschwelle hat, 17,6 %. Die Wahrscheinlichkeit für Mr121 $\ln(\tau/ns) < 0,69$ zu finden beträgt 20,7 %. Die Lorentzkurve ist etwas breiter als die gefundene Verteilung. Legt man eine Gaußkurve zu Grunde (die etwas zu schmal ist), so ergibt sich eine Fehlerrate von 7,6 % (Cy5) bzw. 12,4 % (Mr121). Insgesamt wird die Wahrscheinlichkeit einer Fehlklassifizierung zu etwa 14% abgeschätzt. Die Erfassungswahrscheinlichkeit für aus der Kapillare austretende Moleküle wurde in Kapitel 4.2 auf etwa 95 % abgeschätzt. Die Gesamtwahrscheinlichkeit, ein richtiges Ereignis zu erkennen und korrekt zuzuordnen beträgt demnach etwa $0,83 \times 0,86 \times 0,95 = 68 \%$. Die Wahrscheinlichkeit, eine auftretende Sequenz der Länge L auch tatsächlich richtig zu erfassen, beträgt demnach $0,68^L$. Die Wahrscheinlichkeit, diese Sequenz zufällig zu finden, $0,5^L$. Die erreichte Zuordnungssicherheit von etwa 68 % ist offenbar viel zu gering, um tatsächlich verwertbare Sequenzinformation zu erhalten.

4.6.5 Diskussion

In Abschnitt 4.6.2 wurden Sequenzierungsversuche an einem Modell-Oligonucleotid gezeigt, das mit je 15 unmarkierten Basen Abstand die Sequenz UCCUCCUCCU enthält. Die Sequenz wurde dreimal gefunden, wobei sich rechnerisch Schneideraten von 125 Hz, 37 Hz und 1,3 Hz ergaben. Die Sequenzierung wurde durch Zugabe von (mit Magnesium aktivierter) Exonuclease I gestartet. Der Ereignisfrequenzanstieg nach Zugabe der Exonuclease betrug 1,3 Hz, woraus sich eine Gesamtschneiderate an allen (gleichzeitig) abgebauten Strängen von 23,6 Basen/s errechnet.

In Abschnitt 4.6.3 wurden statistisch markierte PCR-Produkte mit etwa 60 Markierungen auf 1662 Basen abgebaut. Neben der Methode, zum Start der Reaktion aktivierte Exonuclease zuzusetzen, wurde als Alternative die Aktivierung von mit EDTA inhibierter Exonuclease mit einem Überschuß an Magnesiumionen etabliert. Durch Ätzen der Faserspitzen mit Flußsäure ist es gelungen, die Reaktionszone dem Detektionsvolumen anzunähern. Dadurch wurde vermieden, daß sich die freigesetzten Nucleotide überholen.

Als Alternative zum Eintauchen der Faserspitzen in verdünnte DNS-Lösung wurde die elektrophoretische Einzelmolekülhandhabung aufgezeigt. Neben der besseren Kontrolle der Menge an gebundener DNS werden die Fasern bei diesem Verfahren in wesentlich geringerem Umfang mit Farbstoff kontaminiert. Dadurch wurde es möglich, die Versuchsdauer von typischerweise 24 h auf unter 4 h zu senken.

Der erwartete Zusammenhang zwischen der Menge an gebundener DNS und der Anzahl beim Abbau freigesetzter Mononucleotide wurde gefunden. Nach dem Ende des Sequenzierungsversuchs fluoreszierte die Faserspitze stark. Dies ist ein starkes Indiz dafür, daß nur ein Teil der oberflächengebundenen DNS während des Versuches abgebaut wurde.

Die Ereigniskurven der Sequenzierläufe mit den PCR-Produkten wiesen charakteristische Stufen auf, deren Höhe mit der erwarteten Anzahl an Markern je Strang übereinstimmte. Die aus der Stufenbreite (Zeitintervall zwischen dem ersten und dem letzten Ereignis der Stufe) ermittelte Schneiderate ist mit einem Mittelwert von (280 ± 57) Hz exponentialverteilt.

Die Stufen mit hoher Schneiderate wiesen annähernd konstante Flankensteigungen auf, während solche mit niedriger Schneiderate (breite Stufen) in einzelne Etappen zerfielen.

Die maximale Flankensteigung der Stufen war normalverteilt mit einer mittleren Ereignisrate von 59 Hz und einer Standardabweichung von 28,4 Hz. Unter der Annahme einer Markierungsdichte von 3,4 % entspricht dies 1593 Hz maximaler Schneiderate (Stabw. 789 Hz).

Falls die Stufen dem Abbau eines einzelnen PCR-Produkts entsprechen, drängen sich zwei mögliche (und sich nicht ausschließende) Erklärungen auf:

- 1) Die Markierungen sind auf dem PCR-Produkt nicht äquidistant verteilt. Hohe Flankensteigungen werden durch eng beieinander liegende Markierungen verursacht, während die Pausen langen Abschnitten unmarkierter DNS entsprechen.
- 2) Die Exonuclease weist eine maximale Schneiderate von etwa 1593 Hz auf, bleibt aber immer wieder „hängen“, z.B. weil zwei Farbstoffe eng beieinander liegen oder weil die Sequenz für das Enzym ungünstig ist.

Im Fall der Exonuclease des Bakteriophagen λ ist z.B. eine Sequenzabhängigkeit der Schneiderate bekannt [van Oijen 2003].

Bei einigen Versuchen traten bereits vor Zugabe des Magnesiumacetats Stufen in den Ereigniskurven auf. Diese waren aber seltener als die Stufen nach Magnesiumzugabe. Möglicherweise sind nicht alle Stufen auf den Abbau von PCR-Produkten zurückzuführen oder die Exonuclease kann erfolgreich mit EDTA um die Magnesiumionen konkurrieren.

Als Substrat in Abschnitt 4.6.4 diente ein nicht exakt definierter Abschnitt des Gegenstranges zum Genom des Bakteriophagen ϕ -x-174, bei dem C und T vollständig durch Cy5-C und Mr121-U ersetzt waren. Nach Aktivierung der Exonuclease stieg die Ereignisfrequenz etwa um das 3,5 – fache an. Je nach Ereigniserkennung betrug der Anstieg 0,6 Hz bis 1,3 Hz. Im Bereich der aktivierten Exonuclease bildeten sich zeitliche Domänen mit einer Korrelationszeit von 1,8 s und 560 s aus, in denen die Ereignisrate 0,34 – 0,76 bzw. 0,99 – 2,25 Hz betrug. Da der Abstand der Markierungen in der vollständig markierten DNS nicht sehr stark schwankt (die Verteilung ist exponentiell, der Mittelwert beträgt 2,1 Basen, die Standardabweichung 1,5 Basen, das Minimum 1 Base und das Maximum 11 Basen) fällt die Möglichkeit, dies mit einer Schwankung der Markierungsdichte zu erklären, weg.

Die gemessene Reihenfolge der Ereignisse wurde mit der Zielsequenz abgeglichen und ergab einen statistisch signifikanten „Treffer“ von 31 Basen Länge. In diesem Bereich ergab sich eine relativ konstante Schneiderate von 3,1 Hz. Die Wahrscheinlichkeit irgendeine Übereinstimmung von 31 Ereignissen mindestens einmal zufällig zu erhalten beträgt nur 0,25 %. Die gemessene Reihe enthielt demnach sehr wahrscheinlich Information der abgebauten Sequenz. Da nur ein solcher „Treffer“ gefunden wurde, obwohl es viele Bereiche gab, in denen man aufgrund der Ereignisrate ein aktives Enzym vermuten würde, läßt sich mit der ungenügenden Zuordnungssicherheit der Ereignisse von insgesamt nur knapp 70 % erklären. Die Unsicherheit in der Zuordnung wird in erster Linie durch den Untergrund von etwa 0,3 Hz und den Überlapp der Abklingdauerhistogramme verursacht.

Der Untergrund kommt überwiegend von an der streptavidinierten Faser adsorbierten Verunreinigungen, die sich möglicherweise durch zusätzliche Reinigungsschritte verringern lassen. Da Streptavidin ein Protein ist, muß dabei jedoch darauf geachtet werden, daß dieses nicht denaturiert und dadurch seine Fähigkeit zum Fixieren des Biotins verliert.

Der Überlapp der Abklingdauerhistogramme kann nur durch mehr Photonen, also einer Verbesserung der Apparatur, verringert werden. Der Einsatz von Farbstoffen mit besser unterscheidbaren Abklingdauern scheiterte bislang an deren Unverträglichkeit mit den Enzymen oder deren Adsorptionstendenz an den Oberflächen. Alternativ können auch weitere Fluoreszenzcharakteristika, wie z. B. die Emissionswellenlänge, hinzugezogen werden, um die Klassifizierung zu verbessern.

Auch die Markierung einer dritten Base wäre wünschenswert, da hierdurch nur noch ein Drittel (statt der Hälfte) aller zugeordneten Ereignisse schon rein statistisch paßt.

Die in dieser Arbeit ermittelten Schneideraten, ca. 3Hz bei 50% Markierung und ca. 280 Hz bei ca. 3,6 % Markierung, fügen sich in die Reihe der in der Literatur angegebenen Werte: 275 Hz an unmarkierter DNS [Brody 1986], 44 Hz an 25 % markierter DNS [Werner 2003] und 3-7 Hz bei 50 % Markierung [Sauer 2001]. Die Raten aus Kapitel 4.6.2 (1,3 Hz, 37 Hz und 125 Hz bei 50% Markierung) passen hingegen weniger gut, möglicherweise trat ein Teil der Sequenzen nur zufällig auf.

4.7 Experimente mit dem Nahfeldmikroskop

Die Vorteile eines optischen Nahfeldmikroskops gegenüber einem konventionellen (d.h. Fernfeld-) Mikroskop liegen in der höheren optischen Auflösung und dem simultan gewonnenen topographischen Kraftfeldbild.

4.7.1 Apparatur

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein optisches Nahfeldmikroskop, das unser Arbeitskreis von dem um V. S. Letokhov in Troisk (Rußland) erworben hat, für den Nachweis einzelner Moleküle auf Oberflächen umgerüstet. Abbildung 4.7.1-1 zeigt den Aufbau vor dem Umbau:

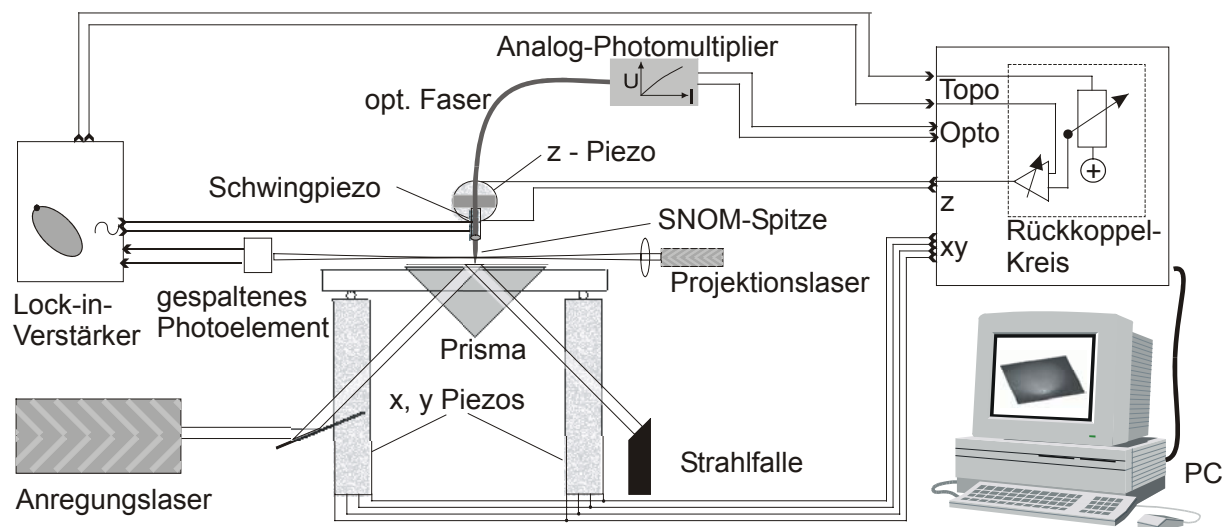


Abbildung 4.7.1-1 Ursprünglicher Aufbau des Nahfeldmikroskops (schematisch und vereinfacht). Das Objekt befindet sich auf dem Prisma. Die Anregung erfolgt durch das evaneszente Feld des totalreflektierten Laserstrahls. Die SNOM-Spitze sammelt das Fluoreszenzlicht des Objektes.

Der Anregungslaser wird von einem Prisma totalreflektiert. Die fluoreszierende Probe befindet sich auf der reflektierenden Grenzfläche und wird vom evaneszenten Feld angeregt. Der Anregungslaser ist nicht fokussiert. Die SNOM-Spitze (SNOM = Scanning Nearfield Optical Microscope, optisches Rasternahfeldmikroskop) sammelt das Fluoreszenzlicht im optischen Nahfeld der emittierenden Probe. Das Prisma wird zusammen mit dem zu untersuchenden Objekt unter der in x-y-Richtung ortsfesten Spitze seitlich bewegt.

Die Spitze wird der Oberfläche in z-Richtung nachgeführt. Die Spitze wird vom Schwingpiezo in Schwingungen von einigen hundert pm Amplitude versetzt. Diese Schwingung wird vom Projektionslaser auf ein gespaltenes Photoelement abgebildet und dabei stark vergrößert. Abhängig von der Amplitude entsteht eine Wechsellspannung, die synchron zur Spitze schwingt. Diese wird zusammen mit der Spannung, die den Schwingpiezo anregt, einem Lock-in-Verstärker zugeführt. Dieser liefert ein Gleichspannungssignal, welches von der Schwingungsamplitude der Spitze und der Phasenverschiebung zwischen Piezo-Anregung und Spitze abhängt. Nähert sich die Spitze der Oberfläche, so wirken Scherkräfte auf sie. Diese führen zu einer Dämpfung der Amplitude und einer Erhöhung der Resonanzfrequenz,

was sich wiederum auf die Phasenverschiebung und auf die Amplitude auswirkt. Die „**Shear-Force**“ - Rückkopplungsschleife führt den z-Piezo so nach, daß das Ausgangssignal des Lock-in-Verstärkers, somit die Scherkräfte und daher der Abstand zur Oberfläche konstant bleibt. Mit dieser Methode sind vertikale Auflösungen im Sub- nm- Bereich [Sekatskii 1996], [Kirsch 1997].

Die SNOM-Spitze befindet sich am Ende einer optischen Faser. Die Faser leitet das von der Spitze gesammelte Licht zu einem Photomultiplier. Dieser liefert ein von der Lichtintensität abhängiges Gleichspannungssignal, welches digitalisiert wird und das optische Bild liefert.

Diese Apparatur ist aus mindestens drei Gründen für Einzelmoleküluntersuchungen ungeeignet:

- 1.) Für den Einzelmolekülnachweis sind hohe Anregungsintensitäten (ca. 10^8 W m^{-2}) notwendig. Wird der Laser (wie beim konfokalen Aufbau) auf ca. $(1 \mu\text{m})^2$ fokussiert, so kommt man mit einigen $100 \mu\text{W}$ Laserleistung aus. In diesem Aufbau wird der Laser nicht fokussiert. Der Strahl erleuchtet eine Fläche von $(5 \text{ mm})^2$. Bei der genannten Intensität ergeben sich $2,5 \text{ kW}$ Strahlleistung (das entspricht einem Laser zum industriellen Laserschneiden).
- 2.) Die Probe wird großflächig bestrahlt. Die Moleküle sind daher die gesamte Zeit der Anregungsleistung ausgesetzt und nicht nur, wenn sie gerade detektiert werden. Im Fokus „überleben“ Farbstoffmoleküle normalerweise einige ms, bevor sie photozerstört werden.
- 3.) Zum Einzelmolekülnachweis ist eine hohe Lichtsammelleffizienz, wie sie z.B. von einem Mikroskopobjektiv mit einer numerischen Apertur von 1,2 (oder besser 1,4) bereitgestellt wird, notwendig. Die besten SNOM-Spitzen weisen hingegen typischerweise eine Transmission im Prozent - Bereich auf.

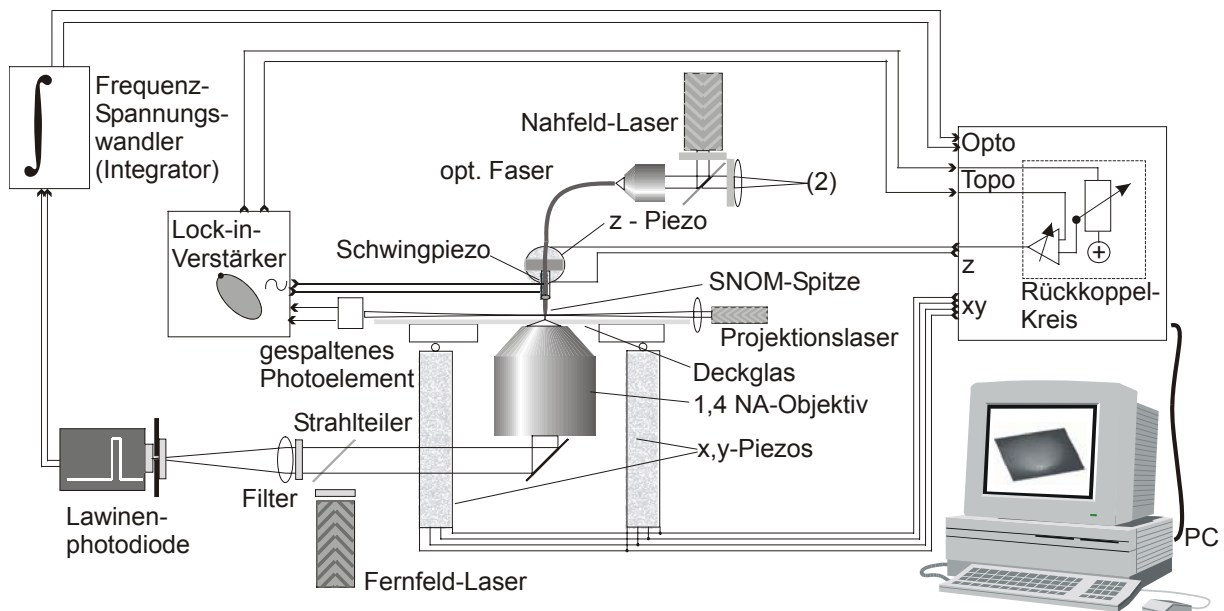


Abbildung 4.7.1-2 Umbau der Apparatur zu einem Einzelmolekül-SNOM.

Das Objekt befindet sich auf einem Deckglas in der Fokalebene des Objektivs. Die Anregung erfolgt im optischen Nahfeld der SNOM-Spitze, die sich exakt im Fokus des Objektivs befinden muß. Das Fluoreszenzlicht wird vom Objektiv gesammelt.

Der Umbau des Mikroskops (Abbildung 4.7.1-2) orientiert sich an den in der Literatur [Betzig 1993], [Kopelman 1993], [Garcia-Parajo 1998] für Einzelmolekül-SNOM beschriebenen Apparaturen.

Der Anregungslaser wird (über ein einfaches 10×-Objektiv) in eine optische Faser eingekoppelt, deren anderes Ende die SNOM-Spitze bildet. Die SNOM-Spitze wird mit großer Sorgfalt so justiert, daß die Apertur der Spitze im Fokus des Sammelobjektivs liegt. Zwischen der Spitze und dem Objektiv befindet sich ein Deckgläschen mit der fluoreszierenden Probe. Die Spitze wird durch das evaneszent aus der Apertur tretende Licht angeregt. Befindet sich die Probe im optischen Nahfeld der Spitze, so findet ein effizienter Energieübertrag auf die Probe statt, welche diese zur Fluoreszenz anregt. Das Fluoreszenzlicht wird vom Objektiv (im Fernfeld der Probe) gesammelt und auf eine Lawinenphotodiode (SPAD, single photon avalanche diode) projiziert. Die hohe Auflösung bei diesem „Beleuchtungsmodus“ („illumination mode“ [z.B. Ohtsu 2003, S.23]) kommt also durch die punktuelle Anregung und nicht durch das Auflösungsvermögen des Objektivs zustande. Dennoch muß hier ein hochwertiges Objektiv eingesetzt werden, um die notwendige Sammeleffizienz zu gewährleisten. Die SPAD liefert im Unterschied zum Photomultiplier kein Gleichspannungssignal, sondern für jedes Photon einen TTL-Puls (Rechteckimpuls). Diese müssen daher durch einen Frequenz-Spannungs-Wandler („Integrator“) (s. Abschnitt 4.7.2) in ein Gleichspannungssignal umgewandelt werden.

Dieser Aufbau läßt sich durch den in den Detektionsstrahlengang eingesetzten Strahlteiler ohne Umbau mit einem zusätzlichen Fernfeld-Anregungslaser als konfokales Rastermikroskop einsetzen.

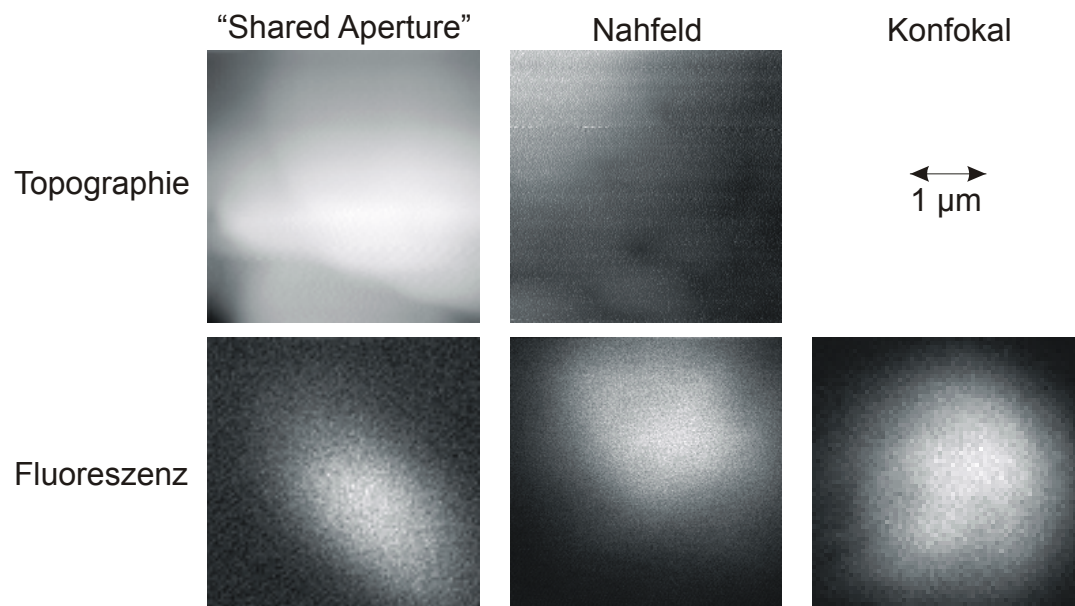


Abbildung 4.7.1-3 Aufnahmen von 1µm- Fluoreszenz-„Beads“ in Polyvinylalkohol
links: sowohl die Anregung als auch die Detektion erfolgen über die SNOM-Spitze
Mitte: Anregung über die SNOM-Spitze, Detektion im Fernfeld
rechts: sowohl die Anregung als auch die Detektion erfolgen über das Objektiv

Setzt man den Detektor an die in Abbildung 4.7.1-2 mit (2) beschriebene Position ein so sind, bei Verwendung des Nahfeld-Lasers zur Anregung, Messungen nach der „Shared Aperture“-Methode ([Courjon 1990], [Kirsch 1996], [Sandoghar 1997]) möglich.

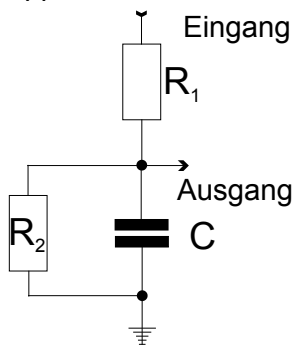
Wenn der Fernfeld-Laser zur Anregung benutzt wird, können Aufnahmen im Sammelmodus („Collection Mode“ [z.B. Ohtsu 2003, S. 21]), d.h. Anregung im Fernfeld, Detektion im Nahfeld, gemacht werden, wie dies auch beim ursprünglichen Aufbau vorgesehen war.

Die Apparatur wurde in allen vier beschriebenen Betriebsarten eingesetzt, brauchbare Aufnahmen konnten jedoch nur im konfokalen Modus oder bei Nahfeld-Anregung und Fernfeld-Detektion („illumination Mode“) erzielt werden. Die „Shared Apperture“ Methode wies (wegen des Reflexes beim Einkoppeln des Lasers in die Faser) einen sehr hohen Untergrund auf, so daß nur extrem helle Objekte (1µm-Beads) abgebildet werden konnten (Abbildung 4.7.1-3). Der „collection Mode“ (Nahfeld-Detektion bei Fernfeld-Anregung) ergab überhaupt kein Signal (möglicherweise wegen der schwierigen Justage).

4.7.2 Entwicklung des Integrators und Kalibrierung der Optik

Das Nahfeldmikroskop war ursprünglich für die Verwendung eines Photomultipliers als optischem Detektor konzipiert. Ein Photomultiplier kann so betrieben werden, daß er eine der Lichtintensität proportionale Spannung liefert. Da Photomultiplier im roten Spektralbereich eine schlechtere Empfindlichkeit aufweisen als Einzelphotonenlawinendioden (SPADs) wurde hier jedoch eine SPAD benutzt.

Eine SPAD liefert für jedes detektierte Photon einen gleichbleibenden Rechteckimpuls. Die Lichtintensität ist somit der Frequenz dieser Pulse proportional. Zur Verwendung in unserer Apparatur muß daher ein Frequenz-Spannungs-Wandler zwischengeschaltet werden.



Kaufliche Wandler sind erstens nicht billig und es ergäben sich Probleme mit den schmalen Pulsen der SPAD (ca. 200 ns breit). Die Grundidee der hier entwickelten Schaltung besteht in der Verwendung eines RC-Gliedes als Integrator. Damit die am Kondensator kumulierte Ladung wieder abfließen kann, wird ein weiterer Widerstand R_2 parallel zum Kondensator angebracht. Liegt am Eingang eine Spannung U_E an, so wird der Kondensator über R_1 geladen, während gleichzeitig mit zunehmender Spannung am Kondensator Ladung über R_2 abfließt. Der Grenzwert der

Ausgangsspannung für lange Ladezeiten liegt bei $U_{L\infty} = U_E R_2 / (R_1 + R_2)$. Die Ausgangsspannung wird durch die Ladung Q am Kondensator gemäß $U_L = Q/C$ bestimmt. Diese Ladung ergibt sich aus

$$\frac{dQ}{dt} = I_{Lade} - I_{Entlade} = \frac{U_E - U_L}{R_1} - \frac{U_L}{R_2}$$

$$\frac{dQ}{dt} = \frac{U_E}{R_1} - Q \frac{1}{C} \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right) \quad (4.7.2-1)$$

Dies ist eine inhomogene lineare Differenzialgleichung erster Ordnung. Ihre Integration (z.B. [Zachmann 1994]) ergibt

$$Q = U_E C \frac{R_2}{R_1 + R_2} \left(1 + A e^{-t/\tau_1} \right)$$

Die Integrationskonstante A ergibt sich aus der Randbedingung: Liegt am Ausgang zu Beginn des Pulses die Spannung U_0 an, so ist $U_L(t=0)=U_0$. Die Spannung während des Ladevorgangs U_L erhält man durch Division von Q durch C . Damit erhält man

$$U_L(t=0) = U_E \frac{R_2}{R_1 + R_2} (1 + A) = U_0.$$

Daraus folgt

$$A = - \left(1 - \frac{U_0}{U_E} \frac{R_1}{R_1 + R_2} \right) = - \left(1 - \frac{U_0}{U_{L\infty}} \right)$$

und somit

$$U_L = U_{L\infty} - (U_{L\infty} - U_0) e^{-t/\tau_l} \quad (4.7.2-3)$$

$$\text{mit } U_{L\infty} = \frac{R_2}{R_1 + R_2} U_E, \quad \tau_l = \frac{C R_1 R_2}{R_1 + R_2} \quad \text{und } U_0 = U(t=0)$$

Liegt am Eingang keine Spannung an, so entlädt sich der Kondensator über R_2 gemäß

$$U_D = U(t_0) e^{-t/\tau_l} \quad \text{mit } \tau_D = R_2 C, \quad (4.7.2-4)$$

wobei t_0 den Zeitpunkt angibt, ab dem der Kondensator entladen wird.

Trifft in der Zeit, in der sich der Kondensator über R_2 entlädt, ein weiterer Puls auf den Eingang des Integrators, so wird sich die am Kondensator anliegende Spannung U_0 um U_\uparrow erhöhen:

$$\begin{aligned} U_\uparrow &= U_L(t_0) - U_0 \\ U_\uparrow &= U_{L\infty} - (U_{L\infty} - U_0) e^{-t/\tau_l} - U_0 \\ U_\uparrow &= (U_{L\infty} - U_0) \left(1 - e^{-t/\tau_l} \right) \end{aligned} \quad (4.7.2-5)$$

Der Spannungsanstieg, der durch einen einzelnen Puls verursacht wird, muß klein gegen U_E gehalten werden, um zu verhindern, daß der Integrator gesättigt wird. Das wird dadurch erreicht, daß R_1 groß genug gewählt wird, daß $t_0 \ll \tau_l$. Damit vereinfacht sich die Gleichung mit $\lim_{x \rightarrow 0} e^{-x} = 1 - x$:

$$U_\uparrow = (U_{L\infty} - U_0) \frac{t_0}{\tau_l} \quad (4.7.2-6)$$

Trifft nach der Zeit t_1 (Abstand vom Ende des letzten Pulses zum Beginn des nächsten) der nächste Puls ein, so fällt die Spannung nach Gl. 4.7.2-4 ab:

$$U_\downarrow = (U_0 + U_\uparrow) - (U_0 + U_\uparrow) e^{-t/\tau_l} = (U_0 + U_\uparrow) \left(1 - e^{-t/\tau_l} \right) \quad (4.7.2-7)$$

Da die Schaltung ein Gleichspannungssignal liefern soll, wird man in der Praxis R_2 so groß wählen, daß der Integrator mehrere Pulse enthält. Damit wird $U_{\uparrow} \ll U_0$ und $\tau_D \gg t_1$. Damit läßt sich die letzte Gleichung vereinfachen:

$$U_{\downarrow} = U_0 e^{-t_1/\tau_D} \approx U_0 \frac{t_1}{\tau_D} \quad (4.7.2-8)$$

Im stationären Zustand, das heißt bei konstanter Frequenz f , gilt:

$$\begin{aligned} U_{\uparrow} &= U_{\downarrow} \\ (U_{L\infty} - U_0) \frac{t_0}{\tau_l} &= U_0 \frac{t_1}{\tau_D} \\ U_0 &= \frac{U_{L\infty}}{1 + \frac{t_1}{t_0} \frac{\tau_l}{\tau_D}} \end{aligned}$$

Die maximale Zählrate der hier verwendeten SPAD liegt bei etwa 200 kHz (entspr. 5 μ s), während die Pulsbreite nach dem Verstärker unter 20 ns liegt. Man kann also in sehr guter Näherung die Zeit t_1 vom Ende des letzten Pulses bis zum Beginn des nächsten durch die reziproke Frequenz $1/f$ ersetzen.

$$U_0 = U_E \frac{R_2}{R_1 + R_2} \frac{1}{\frac{R_1}{R_1 + R_2} \frac{1}{ft_0} + 1} \quad (4.7.2-9)$$

Die linke Hälfte der Abbildung 4.7.2-1 zeigt eine numerische Simulation der Schaltung unter der Verwendung der exakten Gleichungen 4.7.2-5 und 4.7.2-7. Für $R_1 = 100 \text{ k}\Omega$, $R_2 = 4,7 \text{ k}\Omega$, $C = 1 \mu\text{F}$ ($\hat{=} \tau_l = 0,098 \text{ ms}$, $\tau_D = 4,7 \text{ ms}$), $t_0 = 0,2 \mu\text{s}$, $t_1 = 99,8 \mu\text{s}$ ($\hat{=} f = 10 \text{ kHz}$) ergibt sich $U_0 = 0,858 U_E$ (das stimmt exakt mit der Näherung 4.7.2-9 überein) sowie $U_{\uparrow\downarrow} = 3,89 \times 10^{-5} U_E$.

Für $f \rightarrow \infty$ geht der frequenzabhängige dritte Term aus Gl. 4.7.2-9 gegen 1; die Schaltung zeigt für hohe Frequenzen also ein Sättigungsverhalten. Die Ausgangsspannung nimmt dabei den zu Beginn errechneten Sättigungswert für den Ladevorgang $U_{L\infty}$ an.

Um die Proportionalität von U_0 und f für $f \rightarrow 0$ zu erkennen, ist es sinnvoll Gl. 4.7.2-9 umzuschreiben:

$$U_0 = U_E \frac{R_2}{R_1} ft_0 \frac{1}{1 + \frac{R_2 + R_1}{R_1} ft_0} \quad (4.7.2-9a)$$

Man kann den letzten Term in Form der geometrischen Reihe $\frac{1}{1+x} = 1 - x + x^2 - x^3 + x^4 \dots$

entwickeln und für kleine Frequenzen nach dem konstanten Term abbrechen, der Frequenz-Spannungs-Wandler arbeitet dann linear.

$$U_0 \approx U_E \frac{R_2}{R_1} ft_0 \quad \text{für } f \ll \frac{R_1}{R_1 + R_2} \frac{1}{t_0} \Leftrightarrow U_0 \ll U_E \frac{R_2}{R_1 + R_2} = U_{L\infty} \quad (4.7.2-10)$$

Die rechte Hälfte der Abbildung 4.7.2-1 zeigt eine Simulation des Verhaltens der Ausgangsspannung bei wechselnden Frequenzen von 0, 10, 5, 10 und 0 kHz. Die Simulation verwendet die exakten Gleichungen ohne Näherung. Wie aus der Abbildung ersichtlich ist, reagiert die Ausgangsspannung träge auf Frequenzsprünge. Ändert sich die Frequenz zum Zeitpunkt t_s sprunghaft auf den Wert f , so reagiert der Wandler darauf mit einer Trägheit, die durch R_2C ($=\tau_D$) gegeben ist (Gl. 4.7.2-11):

$$U(f, t > t_s) = [U(t_s) - U_0(f)] \frac{t-t_s}{R_2C} + U_0(f) \quad (4.7.2-11)$$

$$U_0(f) = \overline{\lim_{t \rightarrow \infty} U(f, t)}$$

Die Spannung U_0 stellt den Grenzwert des Mittels der Ausgangsspannung für lange Zeiten bei konstanter Frequenz dar.

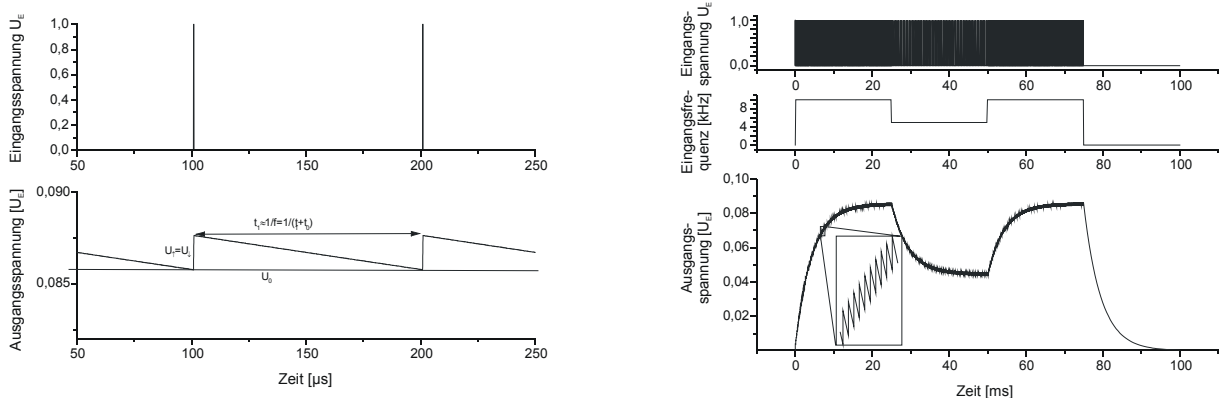


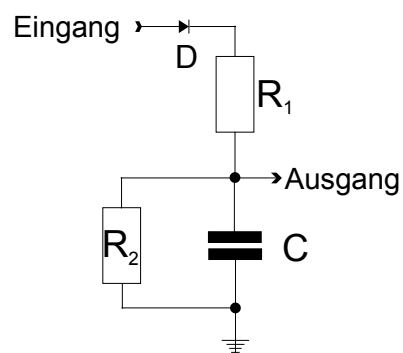
Abbildung 4.7.2-1 Simulation des Integrators

Es wurde $R_1 = 100 \text{ k}\Omega$, $R_2 = 4,7 \text{ k}\Omega$, $C = 1 \mu\text{F}$ ($\hat{=} \tau_1 = 0,098 \text{ ms}$, $\tau_D = 4,7 \text{ ms}$) sowie die Pulsbreite $t_0 = 0,2 \mu\text{s}$ gesetzt.

links: konstante Frequenz von 10 kHz ($t_1=99,8 \mu\text{s}$).

rechts: Verhalten bei Frequenzsprüngen (0 kHz, 10 kHz, 5 kHz 10 kHz und 0 kHz für je 25 ms). Das Ausgangssignal reagiert mit einer Trägheit, die durch τ_D gegeben ist. Der rechteckige vergrößerte Ausschnitt zeigt den sägezahnförmigen Verlauf der Ausgangsspannung.

In der Praxis ist es notwendig, vor den Eingang eine Diode zu schalten, um zu verhindern, daß der Kondensator sich über R_1 und den Verstärkerausgang entlädt.



Die Silizium-Halbleiterdiode D reduziert die an R_1 während des Pulses anliegende Spannung um ca. 700mV.

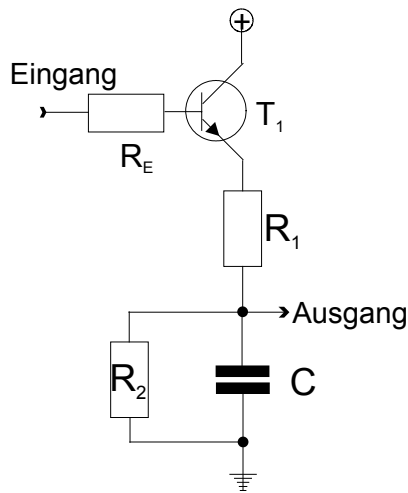
Diese Schaltung hat zwei verbesserungsfähige Nachteile: 1.) Die Sättigungsspannung ist mit 1,8 V (2,5 V Eingangsspannung – 0,7 V) zu niedrig, da der Analog-Digital-Wandler (ADC) in der Mikroskopelektronik das Gleichspannungssignal relativ verrauscht umsetzt und einen Arbeitsbereich von 0-4096 mV, entsprechend 12bit aufweist.

2.) Die SPAD am Eingang wird zu stark belastet, da der

Eingangswiderstand R_1 nur etwa 500Ω beträgt. Er muß relativ niederohmig gewählt werden, um τ_1 klein gegen τ_D zu halten, während R_2 nicht sehr groß gewählt werden sollte, um die Ausgangsspannung bei Belastung des Ausganges nicht zusammenbrechen zu lassen. Da der Ausgang mit ca. $1 \text{ M}\Omega$ belastet wird, sollte daher $R_2 < 100 \text{ k}\Omega$ bleiben. Mit $R_1 \approx 500 \Omega$ ergibt sich dann bei entladem Kondensator ein Ladestrom von ca. 4 mA.

Man kann diese Nachteile eliminieren, indem man die Eingangsspannung nicht direkt auf R_1 legt, sondern diese nutzt, um eine höhere Spannung zu schalten.

Eine solche Schaltung geschieht mit Hilfe von Transistoren, die man jenseits der Proportionalitätszone ihrer Kennlinie betreibt. Da die Eingangsspannung positiv ist, muß der



verwendete Transistor vom npn-Typ sein. Dieser Typ wird auf der Emitter-Basis-Strecke leitend, wenn an der Basis eine positive Spannung gegenüber dem Emitter anliegt. Der Kollektor wird also an die positive Spannungsquelle gelegt, der Emitter an R_1 und die Basis an den Eingangswiderstand R_E , der mit ca. $1\text{ k}\Omega$ wesentlich größer gewählt werden kann als R_1 .

Diese Schaltung hat den Nachteil, daß die sich am Ausgang aufbauende Spannung die Spannungsdifferenz zwischen Basis und Emitter verringert. Durch diese Gegenkopplung wird die Schaltung ebenso schnell gesättigt wie die einfache Schaltung mit der Diode.

Dieses Problem läßt sich unter Verwendung eines pnp-Transistors, der emitterseitig mit der Spannungsquelle verbunden ist, umgehen. Dazu muß allerdings zunächst das Eingangssignal invertiert werden. Man muß also bei anliegender Eingangsspannung eine konstante, von der Ausgangsspannung unabhängige, negative Spannung gegenüber der Anode erzeugen (Abbildung 4.7.2-3): Der npn-Transistor T_1 wird emitterseitig mit der Masse verbunden, der Kollektor wird über die Widerstände R_3 und R_{BE2} mit der Anode verbunden. Liegt an der Basis von T_1 Spannung an, so leitet der Transistor. Durch den Strom fällt am Widerstand R_{BE2} Spannung ab, die sich nutzen läßt, um die Basis des pnp-Transistors T_2 anzusteuern. Wenn keine Spannung an der Basis des npn-Transistors anliegt, so sperrt er. Der Kollektor von T_1 hat dann Anodenpotential, es liegt also auch keine Spannung an der Basis-Emitter-Diode des pnp-Transistors an und dieser sperrt ebenfalls.

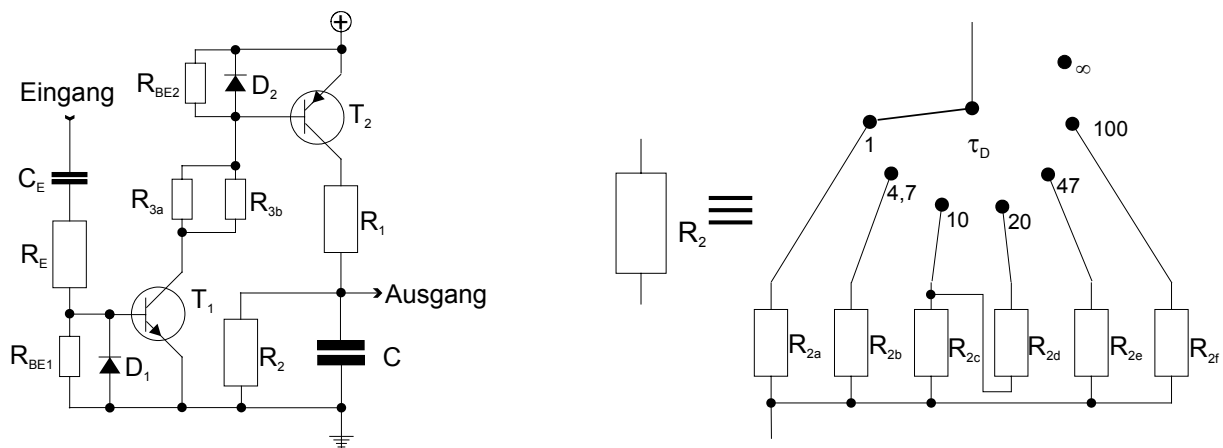


Abb.4.7.2-3 Schaltplan des in dieser Arbeit entwickelten und verwendeten Frequenz-Spannungswandlers. Der Wandler benötigt ein Netzgerät mit 15 V Ausgangsspannung. Die Werte der Bauteile sind im folgenden aufgelistet:

$$R_1 = 470\ \Omega \quad R_{2a} = 1\ \text{k}\Omega \quad R_{2b} = 4,7\ \text{k}\Omega \quad R_{2c} = R_{2d} = 10\ \text{k}\Omega \quad R_{2e} = 47\ \text{k}\Omega \quad R_{2f} = 100\ \text{k}\Omega$$

$$R_{BE1} = R_{BE2} = 1\ \text{k}\Omega \quad R_{3a} = 10\ \text{k}\Omega \quad R_{3b} = 4,7\ \text{k}\Omega \quad (\Rightarrow R_3 = 3,12\ \text{k}\Omega) \quad R_E = 1\ \text{k}\Omega$$

$$C = 1\ \mu\text{F} \quad C_E = 90\ \text{pF}$$

$$D_1 = D_2 : \text{Si-Dioden Typ „BAT41“}$$

$$T_1 : \text{Si-Transistor npn-Typ „C 1845 EA21“}$$

$$T_2 : \text{Si-Transistor pnp-Typ „2N2905A“}$$

Diese sog. Darlington-Schaltung reagiert extrem empfindlich, da beide Transistoren das Eingangssignal verstärken. Dadurch wird es möglich, den Eingang der Schaltung über eine relativ kleine Kapazität C_E galvanisch vom Verstärkerausgang zu trennen. Sollte der Verstärker also eine Untergrund-Gleichspannung abgeben, wird die Schaltung dadurch nicht gestört. Die steilen Flanken des Pulses passieren diesen Trennkondensator C_E dagegen ungehindert. Als Trigger wirkt die ansteigende Flanke des Pulses; die Schaltdauer des Integrators t_0 wird dadurch weitgehend unabhängig von der tatsächlichen Pulsdauer, was vorteilhaft ist, wenn man vor dem Eingang irgend etwas ändern will, das die Pulsform und Pulslänge beeinflussen könnte. Der Eingangswiderstand R_E begrenzt den Strom, der während des Pulsanstiegs und -abfalls fließt, auf maximal 2,5 mA und verhindert so, daß der Transistor T_1 oder die vorgeschaltete Elektronik beschädigt wird.

Da die Teildioden der Transistoren ebenso wie die Dioden $D_{1/2}$ (s.u.) Kapazitäten aufweisen, ist es vorteilhaft, die Basen über einen Widerstand R_{BE} mit den jeweiligen Emittern zu verbinden, um die Schaltzeiten kurz zu halten. Die R_{BE} müssen einerseits klein genug sein, um die Ladung der Basis-Emitter-Kapazität schnell abzuführen, dürfen aber andererseits die Spannung nicht soweit herabsetzen, daß die Transistoren nicht mehr durchschalten. Im Fall des npn-Transistors T_1 wird die C_E passierende Spannung mit $R_E = R_{BE1} = 1 \text{ k}\Omega$ halbiert, was bei $\approx 2,5 \text{ V}$ Eingangsspannung ausreicht, um die Schwelle von 700 mV zu überschreiten.

Um die Basis des pnp-Transistors vor positiven bzw. die Basis des npn-Transistors vor negativen Spannungsspitzen zu schützen, werden parallel zu den Widerständen R_{BE} schnelle Dioden $D_{1/2}$ angebracht, die entgegengesetzt zu den Teildioden der Transistoren orientiert sind.

Der Widerstand R_3 ist mit $3,12 \text{ k}\Omega$ so gewählt, daß bei leitendem T_1 der Strom auf etwa 5 mA begrenzt wird, um die empfindliche Basis des Transistors T_2 zu schützen. Mit dem Wert $R_{BE2} = 1 \text{ k}\Omega$ ergibt sich für den hypothetischen Fall, daß durch die Basis von T_2 kein Strom fließt, eine Spannungsdifferenz zwischen Emitter und Basis von etwa 5 V, was über den ca. 700 mV Schwellspannung für Si-Halbleiter liegt.

Kalibrierung des Gerätes

Zur Kalibrierung wurden mit einem Glühlämpchen als Lichtquelle durch Betrieb mit verschiedenen Spannungen unterschiedliche Zählraten am Detektor erzeugt. Die von der Schaltung abgegebene Spannung wurde in Abhängigkeit von der mit einem kommerziellen Frequenzzähler bestimmten Zählrate bei verschiedenen Werten von R_2 gemessen (Tab. 4.7.2-1).

f [kHz] \ R_2 [k Ω]	1,0	4,7	10,0	20,0	47,0	100,0
3,2	0,013	0,062	0,134	0,255	0,580	1,130
4,1	0,016	0,080	0,165	0,325	0,730	1,390
5,2	0,021	0,100	0,214	0,410	0,900	1,690
6,8	0,027	0,130	0,275	0,540	1,180	2,160
9,9	0,041	0,194	0,400	0,760	1,620	2,930
15,1	0,061	0,287	0,600	1,130	2,335	4,000
19,8	0,082	0,380	0,773	1,440	2,900	4,740
30,0	0,125	0,575	1,160	2,100	3,940	6,070
40,8	0,169	0,765	1,510	2,685	4,850	7,040
49,5	0,204	0,910	1,780	3,105	5,41	7,620

63,0	0,259	1,150	2,200	3,720	6,150	8,350
82,0	0,337	1,450	2,700	4,430	7,000	9,070
104,0	0,426	1,788	3,264	5,130	7,740	9,650
153,0	0,609	2,435	4,230	6,310	8,820	10,480
197,0	0,775	2,978	4,970	7,110	9,470	10,890
248,0	0,947	3,495	5,630	7,780	9,960	11,200

Tabelle 4.7.2-1 Ausgangsspannung U_0 in Volt bei verschiedenen Entladewiderständen R_2 und Frequenzen f der Eingangspulse. Zur Bestimmung der Frequenz wurde ein kommerzieller Frequenzzähler parallel zum Eingang geschaltet. Die Ausgangsspannung wurde mit einem digitalen Voltmeter bestimmt.

Anschließend wurde den Meßwerten eine aus Gl. 4.7.2-9 abgeleitete Kurvenschar, Gl. 4.7.2-12, angepaßt (Abbildung 4.7.2-2, links).

$$U_0 = \frac{U_E q f t_0}{1 + (1 + q) f t_0} \quad \text{mit } q = \frac{R_2}{R_{1 \text{ effektiv}}} \quad (4.7.2-12)$$

Da der Transistor T_2 mit R_1 in Reihe geschaltet und R_1 relativ klein ist, darf die endliche Leitfähigkeit des durchgeschalteten Transistors nicht vernachlässigt werden. Die q_n dürfen also nicht einfach aus den Werten der Widerstände R_1 und R_2 berechnet werden, wie Gl. 4.7.2-12 suggeriert, sondern müssen experimentell bestimmt werden: Wenn man q_n gegen $R_{2,n}$ aufträgt, läßt sich der Wert von $R_{1 \text{ effektiv}}$ aus der Geradensteigung nach $1/R_{1 \text{ effektiv}} = dq/dR_2$ bestimmen (Abb. 4.7.2-2, rechts).

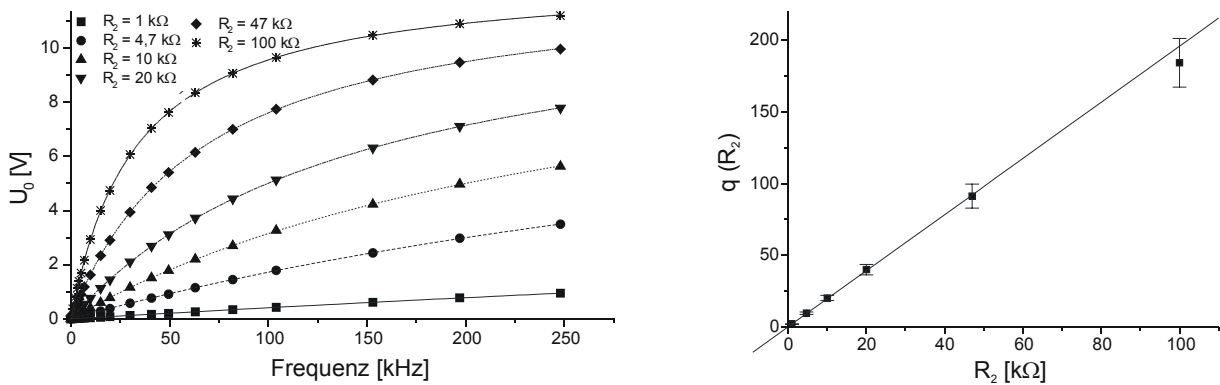


Abbildung 4.7.2-2 Kalibrierung des Integrators.

links: Die Punkte markieren die Meßwerte aus Tab. 4.7.2-1, die Linien die Näherungskurven nach Gleichung 4.7.2-12. Für $f \rightarrow 0$ gehen die Kurven in Geraden über. Sie haben die Steigung $q_n \times t_0$, wie von Gl. 4.7.2-10 vorhergesagt. Wie jedes Halbleiterelement hat auch T_2 eine Schwellspannung, diese reduziert U_E . Daher wird auch U_E den Meßwerten entnommen und nicht am Netzgerät abgelesen.

rechts: Näherungsparameter q gegen R_2 . Die q -Werte (Tabelle 4.7.2-2) liegen innerhalb der Fehlergrenzen auf einer Geraden. $q = (0,12 \pm 0,09) + (1,96 \pm 0,03) (k\Omega)^{-1} \times R_2$ (Regressionskoeffizient = 0,99919).

Aus der Steigung der Regressionsgeraden in der rechten Hälfte von Abbildung 4.7.2-2 ergibt sich ein effektiver Widerstand $R_{1 \text{ effektiv}}$ von $(511,3 \pm 1,02) \Omega$. Mit $R_1 = 470 \Omega \pm 5\%$ erhält man für den durchgeschalteten Transistor T_2 einen Restwiderstand von $(41,3 \pm 9,5) \Omega$.

χ^2		0,10944 V ²
U_E		(12,785 ± 0,012) V
t_0		(0,164 ± 0,015) µs
R_2 [kΩ]	q_n	
1,0	q_1	2,05 ± 0,18
4,7	q_2	9,67 ± 0,87
10,0	q_3	20,3 ± 1,83
20,0	q_4	40,0 ± 3,6
47,0	q_5	91 ± 8,4
100,0	q_6	184 ± 17

Tabelle 4.7.2-2 Fitparameter der Kurven nach Gl. 4.7.2-12 aus Abbildung 472-2, links

Der entwickelte Integrator liefert eine von der Eingangsfrequenz abhängige Ausgangsspannung. Die Spannung wächst dabei streng monoton mit der Frequenz. Da sich bereits für Spannungen über 300mV bei 15V Speisespannung Abweichungen von mehr als 2% ergeben, kann man die lineare Näherung der Gleichung 4.7.2-10 nicht für den gesamten benutzten Bereich bis 5V einsetzen. Bei 5V beträgt die Abweichung bereits 30%.

Da das Steuerprogramm des Mikroskops .tif-Dateien erzeugt, die nicht dem Standard entsprechen und daher von den gängigen Programmen nicht gelesen werden können müssen diese ohnehin mit Hilfe eines speziell entwickelten Computerprogrammes konvertiert werden. Dabei werden die in mV gespeicherten U_0 -Werte über Gl. 4.7.2-13 in kHz umgerechnet und somit die Nichtlinearität behoben. Der Wert von q hängt von der Integrationszeit (also von R_2) ab und kann wie U_E und t_0 Tabelle 4.7.2-2 entnommen werden

$$f = \frac{1}{t_0} \frac{1}{\left(\frac{U_E}{U_0} - 1\right)^{q-1}} \quad (4.7.2-13)$$

Vergleicht man die Eigenschaften des analogen Integrators mit denen eines digitalen, so ist der Hauptvorteil des digitalen Gerätes, daß es bereits nach einer bis maximal zwei Integrationsdauern nach einem Frequenzsprung den neuen Wert korrekt anzeigt, während das analoge Gerät erst 63,3% bzw. 86,5% des Spannungssprunges bewältigt hat. Ein Nachteil des digitalen Gerätes liegt darin, daß bei Meßbereichsüberschreitungen der Zähler auf Null zurückspringt und die Frequenz nicht mehr zu rekonstruieren ist; innerhalb des Meßbereiches arbeitet es dafür linear. Die Nichtlinearität der analogen Schaltung läßt sich mathematisch eliminieren (Gl. 4.7.2-13).

Der Hauptvorteil des verwendeten Analoggerätes liegt in seiner Simplität und Zuverlässigkeit. Die größere Trägheit des Analoggerätes wirkt sich nicht nachteilig aus, da die Bildpunkte ohnehin wesentlich näher zusammen liegen als das Auflösungsvermögen der Optik, was bedeutet, daß sich die Frequenz nicht sprunghaft ändert. Dieses sog. „oversampling“ ist notwendig, um Artefakte zu vermeiden.

Das Mikroskop nimmt, nachdem es den nächsten Bildpunkt angefahren hat, eine einstellbare Zahl an Meßwerten mit einem einstellbaren zeitlichen Abstand auf. Für die topographische Information ist dies auch vorteilhaft, da der topographische Regelkreis sehr schnell reagiert und durch die Mittelung über viele Meßpunkte das Signal weniger rauschen aufweist. Die optische Aufnahme arbeitet dagegen langsam, wenn das spärliche Fluoreszenzlicht eines einzelnen Fluorophors einen signifikanten Ausschlag geben soll.

Optimal wäre, wenn das Mikroskop ein Signal abgäbe, wenn es den nächsten Bildpunkt anfährt; mit diesem Signal könnte man einen digitalen Integrator triggern; das Mikroskop sollte dann am Ende der Integrationszeit das optische Signal aufnehmen. Hätte das Mikroskop eine digitale Schnittstelle, so könnte man sich den Digital-Analog-Wandler im digitalen Integrator und die Redigitalisierung im Mikroskop sparen.

4.7.3 Kalibrierung des Scanners

Das Steuerprogramm des Mikroskops erlaubt die Einstellung der linken oberen Ecke und der Seitenlängen des gescannten Bildes. Die Einstellung wird dabei in Bit vorgenommen. Die maximal einstellbare Seitenlänge ist 65536 Bit. Um den Positionen eine physikalische Bedeutung zuweisen zu können, muß man feststellen, wie viele μm einem Bit entsprechen. Die z-Richtung und die x-y-Richtung müssen dabei getrennt betrachtet werden.

Zur Kalibrierung des Scanners wurden Scherkräftaufnahmen mit geätzten Spitzen ohne Metallbeschichtung an einer Teststruktur gemacht, die Herr Prof. Dr. Ing. Wolfgang Ehrfeld vom Institut für Mikrotechnik Mainz (IMM) freundlicherweise zur Verfügung stellte. Die Teststruktur besteht aus Polymethylmethacrylat, ist treppenförmig und weist pro Millimeter 600 Stufen von je $0,15 \mu\text{m}$ Höhe und $1,67 \mu\text{m}$ Breite auf (Abbildung 4.7.3-1). Für die Aufnahmen wurde die

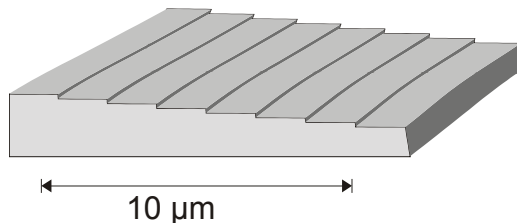


Abbildung 4.7.3-1 Teststruktur

Struktur so positioniert, daß sie in positiver x-Richtung abfällt. Die Stufen verlaufen also in y-Richtung. Der Scanner fährt die Probe zeilenweise ab. Die Zeilen verlaufen in x-Richtung bei der Aufnahme in Abbildung 4.7.3-2 also quer zu den Stufen.

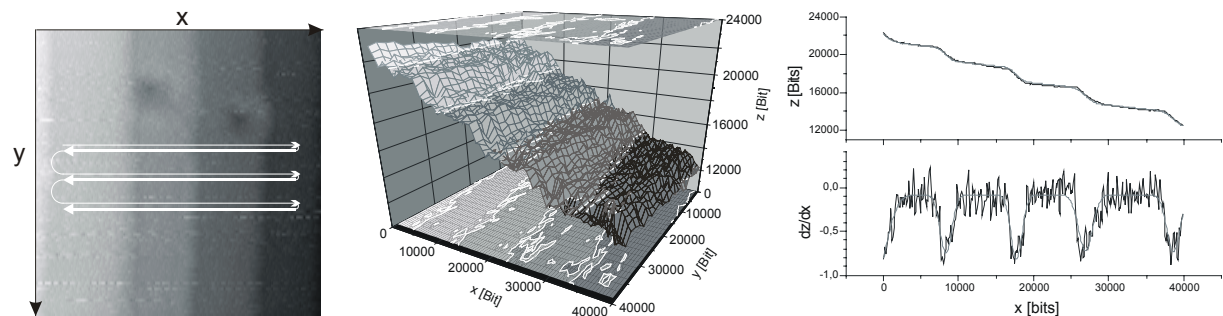


Abbildung 4.7.3-2 Scherkräftaufnahme der Teststruktur

Die Kantenlänge der quadratischen Aufnahme beträgt 400 Bit. Das Bild besteht aus 100 Zeilen mit je 400 Meßpunkten.

links: 2d-Graustufenprojektion der Oberfläche. Die weiß eingezeichneten Pfeile geben die Bewegung des Scanners schematisch an. Das gezeigte Bild besteht aus den Zeilen in negativer x-Richtung (dicke Pfeile).

Mitte: 3d-Bild

rechts oben: Mittelwerte über alle 100 Zeilen

rechts unten: Ableitung des Mittelwerts $d\langle z \rangle / dx$ mit Gaußfit.

Da die Piezokeramiken eine Hysterese aufweisen, werden je Aufnahme zwei topographische (und zwei optische) Bilder erzeugt, eines mit den Zeilen in positiver und eines mit den Zeilen

in negativer Richtung. Die Abbildung 4.7.3-2 zeigt das Bild in negativer x-Richtung (dicke Pfeile in Abbildung 4.7.3-2, links). Die positive Richtung sieht genauso aus, ist jedoch um $\Delta x = -3000$ Bit gegenüber dem gezeigten Bild verschoben.

Die Aufnahme besteht aus 100 Zeilen mit je 400 Meßpunkten und hat eine Seitenlänge von 40000×40000 Bit. Auf dem Bild sind 5 Stufen erkennbar, wobei nur die mittleren drei vollständig im sichtbar sind. Es werden 9 Zeilen (#1, #10, #40, #50, #60, #70, #80, #90 und #100) ausgewertet. Zeile #20 und #30 wird nicht verwendet weil in diesem Bereich die Teststruktur (s. auch Abbildung 4.7.3-2, links) beschädigt war. Da die einzelnen Zeilen relativ verrauscht sind, wird auch der Mittelwert über alle 100 Zeilen herangezogen. Dies ist möglich, da die Stufen quer zu den Zeilen liegen.

Die gemessenen z-Werte (in Bits) werden nach der x-Position (in Bits) abgeleitet. An die Ableitung (Abbildung 4.7.3-2, rechts unten) wird eine 5-Puls-Gaussfunktion angepaßt. Die Messungen der Einzelzeilen werden zuvor mit einem 10-Punkte-Niedrigpass-FFT-Filter behandelt, um das Rauschen zu verringern. Zur Kalibrierung werden nur die Pulse 2,3 und 4 herangezogen, da die Pulse 1 und 5 zu nah am Rand liegen und deshalb weniger präzise bestimmbar sind. Tabelle 4.7.3-1 gibt die Parameter der Anpassung an. Aus praktischen Gründen wurde die negative Ableitung gefittet, um positive Peaks zu erhalten:

y-Zeile	1	10	40	50	60	70	80	90	100	Alle	
χ^2	0,014	0,049	0,021	0,019	0,027	0,043	0,033	0,023	0,013	0,030	
R^2	0,82	0,52	0,75	0,77	0,73	0,64	0,68	0,74	0,83	0,63	
y_0	0,086±0,008	0,096±,015	0,086±0,010	0,098±0,009	0,078±0,011	0,058±0,014	0,078±0,013	0,083±0,010	0,086±0,008	0,084±0,012	
Flanke1	xc1	--- ± ---	624 ± 81	645 ± 101	140 ± 112	756 ± 77	--- ± ---	490 ± 208	--- ± 764	671 ± 45	--- ± ---
	w1	--- ± ---	747 ± 173	1370 ± 222	745 ± 194	1062 ± 171	--- ± ---	1713 ± 391	2113 ± 694	1219 ± 102	--- ± ---
	A1	--- ± ---	539 ± 107	963 ± 132	638 ± 167	754 ± 102	--- ± ---	1282 ± 279	2994 ± 2008	1248 ± 87	--- ± ---
	h1	--- ± ---	0,58 ± 0,18	0,56 ± 0,12	0,68 ± 0,25	0,57 ± 0,12	--- ± ---	0,60 ± 0,19	1,13 ± 0,84	0,82 ± 0,09	--- ± ---
Flanke2	xc2	8638 ± 50	8172 ± 65	7880 ± 47	7538 ± 32	8167 ± 40	8404 ± 81	8558 ± 96	8980 ± 53	9224 ± 34	8261 ± 78
	w2	1575 ± 102	1050 ± 133	1300 ± 97	959 ± 64	1004 ± 81	1550 ± 167	1911 ± 200	1407 ± 110	1231 ± 70	1569 ± 161
	A2	1408 ± 83	1080 ± 123	1353 ± 92	1233 ± 74	1250 ± 91	1464 ± 144	1488 ± 146	1398 ± 99	1364 ± 70	1306 ± 124
	h2	0,71 ± 0,06	0,82 ± 0,14	0,83 ± 0,08	1,03 ± 0,09	0,99 ± 0,11	0,75 ± 0,11	0,62 ± 0,09	0,79 ± 0,08	0,88 ± 0,07	0,66 ± 0,09
Flanke3	xc3	17478 ± 32	17502 ± 155	17971 ± 58	16930 ± 62	17675 ± 74	17999 ± 76	17683 ± 53	18085 ± 58	18474 ± 35	17654 ± 69
	w3	1029 ± 66	2396 ± 325	1537 ± 119	1576 ± 127	1745 ± 153	1578 ± 158	1222 ± 108	1536 ± 120	1265 ± 72	1493 ± 142
	A3	1136 ± 66	1568 ± 199	1422 ± 101	1336 ± 98	1539 ± 124	1598 ± 147	1388 ± 112	1460 ± 104	1376 ± 71	1372 ± 120
	h3	0,88 ± 0,08	0,52 ± 0,10	0,74 ± 0,08	0,68 ± 0,07	0,70 ± 0,08	0,81 ± 0,11	0,91 ± 0,11	0,76 ± 0,08	0,87 ± 0,07	0,73 ± 0,09
Flanke4	xc4	26737 ± 35	26981 ± 84	27172 ± 88	26211 ± 102	26844 ± 96	26805 ± 38	26717 ± 110	27325 ± 72	27998 ± 109	26852 ± 89
	w4	1176 ± 72	1279 ± 172	2108 ± 183	2258 ± 213	2128 ± 200	1006 ± 77	2277 ± 231	1816 ± 150	2828 ± 231	1884 ± 185
	A4	1280 ± 71	1128 ± 138	1504 ± 122	1378 ± 121	1592 ± 140	1656 ± 113	1691 ± 162	1512 ± 115	1475 ± 115	1505 ± 138
	h4	0,87 ± 0,07	0,70 ± 0,13	0,57 ± 0,07	0,49 ± 0,06	0,60 ± 0,08	1,31 ± 0,13	0,59 ± 0,08	0,66 ± 0,07	0,42 ± 0,05	0,64 ± 0,09
Flanke5	xc5	38169 ± 43	38161 ± 77	38066 ± 28	37111 ± 24	39639 ± 259	38734 ± 52	39227 ± 138	38787 ± 51	39344 ± 81	38545 ± 92
	w5	1227 ± 88	1408 ± 158	853 ± 57	799 ± 49	2561 ± 375	796 ± 105	2106 ± 268	1205 ± 109	1605 ± 163	1759 ± 206
	A5	1112 ± 72	1427 ± 146	1214 ± 73	1234 ± 67	3285 ± 578	849 ± 100	2437 ± 290	1175 ± 93	1572 ± 144	1431 ± 145
	h5	0,72 ± 0,07	0,81 ± 0,12	1,13 ± 0,10	1,23 ± 0,10	1,02 ± 0,23	0,85 ± 0,15	0,92 ± 0,16	0,78 ± 0,09	0,78 ± 0,11	0,65 ± 0,10
xc3-xc2	8840 ± 59	9330 ± 168	10090 ± 75	9393 ± 69	9507 ± 84	9595 ± 111	9125 ± 110	9105 ± 79	9250 ± 49	9393 ± 104	
xc4-xc3	9259 ± 48	9479 ± 176	9201 ± 105	9281 ± 119	9169 ± 121	8806 ± 85	9034 ± 122	9240 ± 93	9524 ± 114	9198 ± 112	

Tabelle 4.7.3-1 Gaußfits an die Ableitungen der Zeilen.

xc: Flankenzentrum in x-Bits

w: Breite der Ableitung

A: Anstieg in z-Bits (der Anstieg entspricht 150 nm in z-Richtung)

h: Flankensteigung in z-Bits/x-Bit

Als gewichteten Mittelwert des Abstands benachbarter Flanken erhält man $1,67 \mu\text{m} = 9275 \pm 90$ x-Bits. Die Peakflächen der Ableitung ergeben im Mittel $0,15 \mu\text{m} = 1351 \pm 4$ z-Bits.

Aufnahmen, bei denen die Stufen parallel zur Abtastrichtung, also in y-Richtung verlaufen, gelangen trotz zahlreicher Versuche nicht. Es ist aber gelungen, Aufnahmen anzufertigen,

bei denen die Stufen in einem Winkel von 45° gegen die Scanrichtung geneigt waren. Der Winkel auf den Aufnahmen entsprach dem des Objektes, so daß man davon ausgehen kann, daß ein Bit in y-Richtung einem Bit in x-Richtung entspricht.

In x-y-Richtung gilt:

bzw.

$$1 \text{ Bit} = 0,180 \pm 0,0017 \text{ nm}$$

$$1 \text{ } \mu\text{m} = 5565 \pm 54 \text{ Bits}$$

In z-Richtung gilt:

bzw.

$$1 \text{ Bit} = 0,1110 \pm 0,00033 \text{ nm}$$

$$1 \text{ } \mu\text{m} = 9007 \pm 27 \text{ Bits}$$

Die Abbildung 4.7.2-3 hat demnach eine Kantenlänge von $7 \text{ } \mu\text{m}$ und eine Höhe von $1,55 \text{ } \mu\text{m}$

4.7.4 Auflösungsvermögen

Aus Tabelle 4.7.3-1 entnimmt man eine mittlere gewichtete Breite der Peaks von 1350 ± 5 Bits, entsprechend einer **lateralen topographischen Auflösung** von **243 nm**. Diese Auflösung liegt weit über dem in der Literatur beschriebenen Wert von etwa 20 nm (z.B. [Kirsch 1997]).

Die mittlere quadratische Abweichung von den Ausgleichsgeraden beträgt in den Spalten 270-360 (das ist die vierte Stufe in Abbildung 4.7.3-2) 240 ± 27 Bits, entsprechend **$27 \pm 3 \text{ nm}$ vertikaler Auflösung**. Auch dieser Wert beträgt etwa das zehnfache des Literaturwertes.

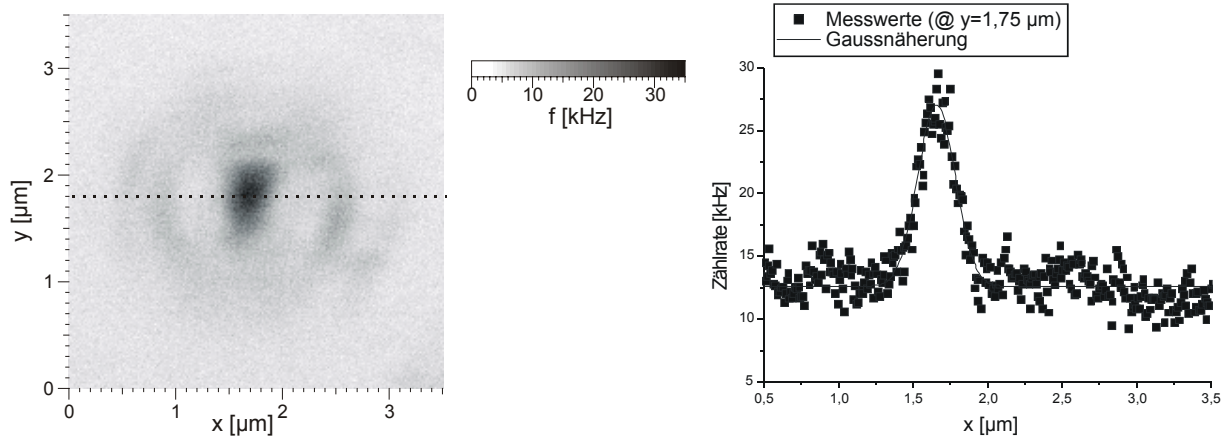
Zur Bestimmung der optischen Auflösung wurden Aufnahmen von in Polyvinylalkohol fixierten Kunststoffkügelchen von 44 nm Durchmesser angefertigt. Die Kügelchen („Beads“ oder „Microspheres“) bestehen aus Polystyrol und sind mit dem Fluoreszenzfarbstoff „Chrimson Red“ eingefärbt. Die Kügelchen haben den Vorteil, wesentlich stärker zu fluoreszieren als einzelne Farbstoffmoleküle. Außerdem sind sie photostabil und zeigen kein „Blinking“ (reversible Einbrüche in der Fluoreszenzintensität). Die Kügelchen werden mit Wasser auf eine Konzentration von ca. $2 \times 10^8/\text{ml}$ verdünnt. Der Suspension werden 2 % Polyvinylalkohol zugesetzt. 50 μl der Mischung (entsprechend $1,25 \times 10^7$ Kügelchen) werden auf einem Deckgläschen auf ca. 2 cm^2 ausgestrichen. Das entspricht einer Flächenkonzentration von $6 \times 10^{10} \text{ m}^{-2}$ oder einem Kügelchen auf $16 \text{ } \mu\text{m}^2$. Die Probe trocknet 1 Woche bei Raumtemperatur und wird anschließend vermessen.

Um einen Vergleich zu ermöglichen, ist der Nahfeldaufnahme eine konfokale Aufnahme gegenübergestellt: Die obere Hälfte von Abbildung 4.7.4-1 zeigt eine $3,5 \times 3,5 \text{ } \mu\text{m}$ große konfokale Aufnahme. Die Graustufenskala ist invertiert, d.h. Bereiche mit hoher Zählrate sind dunkel eingefärbt. Auf dem Bild ist außer dem zentralen Maximum auch der Beugungsring des ersten Nebenmaximums erkennbar. Oben rechts ist ein horizontaler Schnitt durch die Aufnahme mit einer eingepaßten Gaußkurve gezeigt.

Die untere Hälfte von Abbildung 4.7.4-1 zeigt eine Nahfeldaufnahme. Unten links befindet sich das topographische Bild. Darauf sind (neben einigen horizontalen Linien, die Artefakte darstellen) 4 Erhebungen (dunkel eingefärbt) zu erkennen. Der höchste Punkt (bei $x = 2,25 \text{ } \mu\text{m}$ $y = 0,4 \text{ } \mu\text{m}$) liegt 410 nm über der Oberfläche. An diesem Punkt zeigt auch das Fluoreszenzbild (unten Mitte) ein Intensitätsmaximum. Unten rechts ist ein vertikaler Schnitt durch das Maximum gezeigt. Da die Fluoreszenzintensität auf dem optischen Bild einen

linearen Trend aufweist, die Intensität nimmt mit zunehmender Meßdauer ab, Wurde die Abweichung von der Ausgleichsgerade zum Einpassen der Gaußkurve verwendet.

Konfokal



Nahfeld

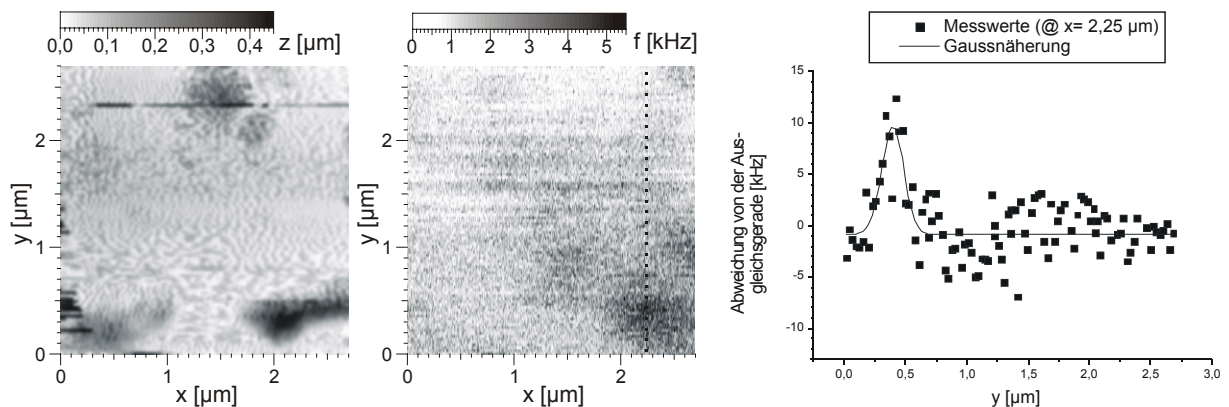


Abbildung 4.7.4-1 Aufnahmen von 44 nm – Kugelchen in Polyvinylalkohol

Die Abbildungen sind als Negative zu betrachten. Dunkle Flächen weisen hohe Intensitäten auf.

oben: konfokale Aufnahme mit horizontalem Schnitt (gepunktet eingezeichnet)

unten: Nahfeldaufnahme links: Topographie Mitte: Fluoreszenz rechts: vertikaler Schnitt durch das Fluoreszenzbild

Die eingepaßten Gaußkurven

$$y = y_0 + \frac{A}{w\sqrt{\frac{\pi}{2}}} e^{-\left(\frac{x-x_c}{w}\right)^2}$$

weisen Breiten

$w = (250 \pm 7)$ nm (konfokal)

bzw.

$w = (179 \pm 32)$ nm (Nahfeld) auf.

Das theoretisch erreichbare Helmholtzsche Auflösungsvermögen beträgt für das betrachtete System mit $NA = 1,4$ $\lambda = 632$ nm $d = 0,61 \times \lambda/NA = 275$ nm. Das Helmholtzsche Auflösungsvermögen entspricht dem Radius des ersten Minimums des Airy-Scheibchens. In Abbildung 4.7.4-1 beträgt dieser Radius etwa 360 nm. Das Mikroskop arbeitet also im konfokalen Modus fast beugungsbegrenzt.

Da auf der Nahfeldaufnahme der Beugungsring fehlt, wird hier zur Ermittlung des Auflösungsvermögens die Breite der Gaußnäherung an das Maximum herangezogen. Diese

entspricht 71,6 % des Wertes der konfokalen Aufnahme, was somit einer Auflösung von etwa 255 nm entspricht.

Die Auflösung auf der Nahfeld-Aufnahme ist also etwas besser als beugungsbegrenzt, erreicht jedoch nicht die Werte, wie sie aus der Literatur bekannt sind (<10nm).

4.7.5 Einzelmolekülaufnahmen des Farbstoffs JF9a

Der Farbstoff wird mit Ethanol auf eine Konzentration von ca. 10^{-10} mol/l verdünnt. Etwa 10 μ l der Lösung werden in die Mitte eines schnell rotierenden Deckglases getropft. Der selbstgebaute „Spincoater“ besteht aus einem 12 V- Gleichstrommotor und einem Spritzschutz. Man kann damit Drehzahlen von etwa 1000 min^{-1} erreichen.

Abbildung 4.7.5-1 zeigt eine Nahfeld (links) und eine konfokale (rechts) Aufnahme der Probe. Die Struktur auf dem topographischen Bild hat nichts mit dem abgebildeten Molekül zu tun. Wahrscheinlich handelt es sich um ein Staubkorn. Die Bilder sind wieder mit einer invertierten Graustufenskala dargestellt, dunkle Bereiche entsprechen also einer hohen Fluoreszenzintensität.

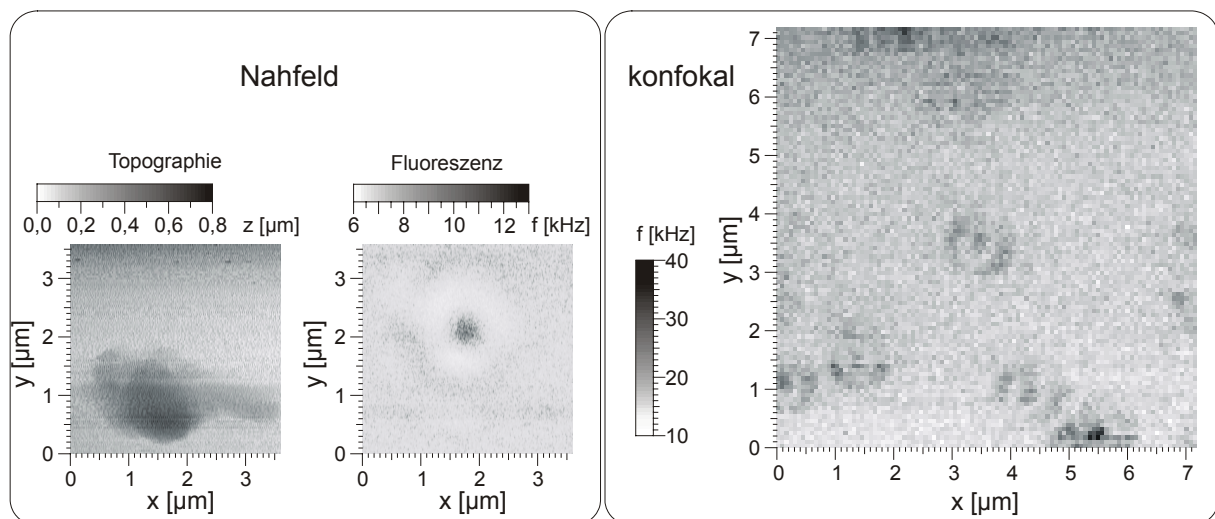


Abbildung 4.7.5-1 Aufnahmen von einzelnen JF9a-Molekülen auf einer Glasoberfläche.

links: Nahfeldaufnahme

rechts: konfokale Aufnahme

An der Nahfeldaufnahme ist der dunkle Ring um das Molekül auffällig. Möglicherweise kommt er dadurch zustande, daß die Metallbeschichtung der Spitze die Fluoreszenz löscht [Ambrose 1994]. Die Nahfeldaufnahme wurde mit einer Auflösung von 200 Zeilen \times 600 Meßpunkten angefertigt. Beim konfokalen Bild war eine höhere Auflösung als die gezeigten 100×100 Pixel nicht zu realisieren, weil die Moleküle zu schnell photozerstört werden. Die Anregungsleistung bei der konfokalen Aufnahme beträgt etwa $30 \mu\text{W}$. Dennoch wurde das Molekül bei $x = 1,3 \mu\text{m}$ und $y = 1,5 \mu\text{m}$ photozerstört, als es den Fokus passierte. Die Fluoreszenzintensität des Moleküls bei $x = 4,2 \mu\text{m}$ und $y = 0,9 \mu\text{m}$ bricht dagegen nur vorübergehend ein, es „blinkt“. Die Ringe um die zentralen Maxima sind das erste Nebenmaximum der Airy-Scheibchen.

5. Ausblick

Mit den Experimenten in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß es möglich ist, durch Einzelmolekülhydrolyse Sequenzinformation zu erhalten. Die erreichte Leselänge von nur 31 Basen kommt zum einen durch die Kontamination des Puffers, welche zu einem Untergrundanteil von etwa 17 % führt, zum anderen durch den Überlapp der Abklingdauererzeugnisse von ca. 14 % zustande.

Die Untergrundrate von 0,3 Hz ist an sich nicht sehr hoch, das Problem ist, daß das Enzym mit einer Schneiderate von etwa 3 Hz bei 50 % Markierungsdichte nur zu einem Anstieg der Zählrate von etwa 1,5 Hz führt. Durch den Einsatz mutierter Exonucleasen, welche die Farbstoffe besser akzeptieren, als das natürliche Enzym könnte es möglich sein, die Schneiderate zu erhöhen und damit den Untergrundanteil zu verringern. Die Untergrundzählrate ließe sich möglicherweise durch weitere Reinigung der streptavidinierten Faser und Bestrahlung des Puffers noch weiter reduzieren. Eine weitere Ursache für den Untergrund dürfte im Aufbau der Apparatur liegen: Die aus der Kapillare austretenden Moleküle verunreinigen das die Kapillare umgebende Glycerin allmählich. Da man davon ausgehen muß, daß das Detektionsvolumen über die Kapillare hinaus reicht, ist leicht einzusehen, daß auch Fluoreszenzfarbstoffe im Kapillaraußenraum zum Untergrund beitragen könnten. Dieses Problem ließe sich möglicherweise durch den Einsatz von Mikrostrukturen beseitigen. Allerdings bringt die Verwendung von Kunststoff als Kapillarmaterial große Probleme mit der Adsorption der Farbstoffe an der Oberfläche mit sich.

Der Überlapp der Abklingdauererzeugnisse wurde durch Nutzung der gesamten Ereignisphotonen (Faltung der Muster mit dem Laserpuls) minimiert. Eine bessere Trennung bei der gegebenen Signalintensität ist nur durch Farbstoffe, deren Abklingdauern sich stärker als die von Cy5 (1,3 ns) und Mr121 (2,1 ns) unterscheiden möglich. Alternativ könnte durch technische Verbesserungen an der Apparatur oder durch weitere Optimierung des Puffers mit dem Ziel einer Steigerung der Fluoreszenzquantenausbeute die Signalintensität erhöht werden. Es ist auch denkbar, außer der Fluoreszenzabklingdauer weitere Fluoreszenzparameter wie z.B. die Emissionswellenlänge zur Klassifizierung der Farbstoffe hinzuzuziehen [Eggeling 2001].

FCS-Messungen und Verteilungsanalysen der Maximalzählraten der Fluoreszenzereignisse haben gezeigt, daß über 99 % der die Kapillare verlassenden Moleküle erfaßt werden können. Das gilt aber nur, solange 1.) die Kapillare nicht dejustiert ist und 2.) die Moleküle auch „aktiv“ sind, wenn sie gerade das Detektionsvolumen passieren: Aus Messungen an Oberflächen ist bekannt, daß einzelne Moleküle zwischenzeitlich in Zuständen sind, in denen sie nicht fluoreszieren („Blinking“). In Lösung sind derartige Prozesse wegen der Beweglichkeit der Moleküle sehr viel schwieriger zu beobachten. Möglicherweise könnten Experimente in Mikrotröpfchen [Kung 1998], [Chiu 1999], die nur je ein Farbstoffmolekül enthalten, klären ob es auch in Lösung zu einem „Blinking“ auf langen Zeitskalen kommt.

Die Einführung eines zweiten Detektionsvolumens [Park 2003] könnte helfen, Zweideutigkeiten bei der Fluoreszenzereigniserkennung zu reduzieren.

6 Literatur

- [Abramowitz 1972] M. Abramowitz, I. Stegun; „Handbook of Mathematical Functions“, Dover Publications Inc. New York (1972)
- [Akesson 1991] E. Akesson, G.C. Walker, P.F. Barbara; „Dynamic Solvent Effects on Electron Transfer Rates in the Inverted Regime: Ultrafast studies on the Betaines“, J. Chem. Phys. **95** (1991), 4188-4194
- [Akeson 1999] M. Akeson, D. Branton, J.J. Kasianowicz, E. Brandin, D.W. Deamer; „Microsecond Time-Scale Discrimination Among Polycytidylic Acid, Polyadenylic Acid, and Polyuridylic Acid as Homopolymers or as Segments Within Single RNA Molecules“, Biophys. J. **77** (1999), 3227–3233
- [Ambrose 1993] W. P. Ambrose, P. M. Goodwin, J. H. Jett, M. E. Johnson, J. C. Martin, B. L. Marrone, J. A. Schecker, C. W. Wilkerson, R. A. Keller, A. Haces, P. J. Shih, J. D. Harding; „Application of Single Molecule Detection to DNA Sequencing and Sizing“, Ber. Bunsen Phys. Chem. (1993), 1-23
- [Ambrose 1994] W.P. Ambrose, P.M. Goodwin, J.C. Martin, R.A. Keller; „Alterations of Single Molecule Fluorescence Lifetimes in Near-Field Optical Microscopy“, Science **265** (1994), 364-367
- [Ambrose 1994] W.P. Ambrose, P.M. Goodwin, J.C. Martin, R.A. Keller, „Single Molecule Detection and photochemistry on a surface using near-field excitation“, Phys. Rev. Lett. **72** (1994), 160
- [Andersen 1999] O. S. Andersen; „Sequencing and the Single Channel“, Biophys. J. **77** (1999), 2899-2901
- [Aragon 1976] S. R. Aragón, R. Pecora; "Fluorescence Correlation Spectroscopy as a Probe of Molecular Dynamics", J. Chem. Phys. **64** (1976), 1791-1803
- [Asai 1980] H. Asai; „Proposal of a Simple Method of Fluorescence Correlation Spectroscopy for Measuring the Direction and Magnitude of a Flow of Fluorophores“, Jpn. J. Appl. Phys. **19** (1980), 2279-2282
- [Ashkin 1986] A. Ashkin, J.M. Dziedzic; „Observation of a Single-Beam Gradient Force Optical Trap for Dielectrical Particles“, Optics Lett. **11** (1986), 288-290
- [Atkins 1990] P. W. Atkins; „Physikalische Chemie“, VCH, Weinheim, 2. korr. Nachdr. der 1. Aufl. der dt. Übers. (1990)
- [Becker 1983] H.G.O. Becker „Einführung in die Photochemie“, Thieme-Verlag, Stuttgart-New York, 2. Aufl. (1983)

- [Becker 1999] W. Becker, H. Hickl, C. Zander, K.H. Drexhage, M. Sauer, S. Siebert, J. Wolfrum; „Time-resolved detection and identification of single analyte molecules in microcapillaries by time-correlated single-photon counting-TCSPC“, *Rev. Sci. Inst.* **70** (1999), 1835-1841
- [Beyer-Walter 1984] H. Beyer, W. Walter; „Lehrbuch der Organischen Chemie“, Hirzel-Verlag, Stuttgart 20.Aufl. (1984)
- [Bergmann II 1999] W. Raith „Bergmann / Schaefer Lehrbuch der Experimentalphysik Band II: Elektromagnetismus“, Walter de Gruyter, Berlin, New York 8. Auflage (1999)
- [Bergmann III 1987] H.J. Eichler, H. Gobrecht, M. Krystek, H. Niedrig, M. Richter, H. Schoenebeck, H. Weber, K. Weber; „Bergmann / Schäfer Lehrbuch der Experimentalphysik Band III, Optik“, Verlag Walter de Gruyter & Co., Berlin 8. Auflage (1987)
- [Betzig 1991] E. Betzig, J.K. Trautman, T.D. Harris, J.S. Weiner, R.L. Kostelak, „Breaking the diffraction barrier: Optical Microscopy on a nanometric scale“, *Science* **251** (1991), 1468-1470
- [Betzig 1992] E. Betzig, J.K. Trautman, „Near-field optics: microscopy, spectroscopy and surface modification beyond the diffraction limit“, *Science* **257** (1992), 189-195
- [Betzig 1993] E. Betzig, R.J. Chichester, „Single molecules observed by near-field scanning optical microscopy“, *Science* **262** (1993), 1422–1425
- [Betzig 1993] E. Betzig, J.K. Trautman, „Near Field Scanning Optical Microscope Having A Tapered Wave guide“, United States Patent 5,272,330 (1993)
- [Block 1990] S.M. Block; „Optical Tweezers: a New Tool for Biophysics“, in „Noninvasive Techniques in Cell Biology“, Wiley-Liss, New York (1990), 375-401
- [Bortz 1993] J. Bortz; „Statistik für Sozialwissenschaftler“, Springer Verlag, Berlin (1993)
- [Böhmer 2001] M. Böhmer, J. Enderlein; „Ab-initio modeling of fluorescence correlation spectroscopy experiments“; eingereicht bei *J. Phys. Chem. A* (30.11.2001)
- [Bradl 1995] J. Bradl; „Dreidimensionale axialtomographische Mikroskopie“, Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät der Ruprecht Karls - Universität Heidelberg (1995)
- [Brakmann 2001a] S. Brakmann, P. Nieckchen, „The Large Fragment of Escherichia coli DNA Polymerase I Can Synthesize DNA Exclusively from Fluorescently Labeled Nucleotides“, *CHEMBIOCHEM* **10** (2001), 773-777

- [Brakmann 2001b] S. Brakmann, S. Löbermann, „Hochgradige Markierung von DNA: Herstellung und Charakterisierung des Substrats für eine Einzelmolekülsequenzierung“, *Angew. Chem.* **113** (2001), 1473-1476
- [Brakmann 2002] S. Brakmann, S. Löbermann, „Ein weiterer Schritt in Richtung Einzelmolekülsequenzierung: Escheria-coli-Exonuclease III degradiert DNA mit Fluoreszenzmarkierungen an jedem Basenpaar“, *Angew. Chem.* **114** (2002), 3350-3352
- [Brand 1997] L. Brand, C. Eggeling, C. Zander, K.H. Drexhage, C.A.M. Seidel; „Single-Molecule Identification of Coumarin-120 by Time-Resolved Fluorescence Detection: Comparison of One- and Two-Photon Excitation in Solution“, *J. Phys. Chem. A* **101** (1997), 4313-4321
- [Breyer 2000] W.A. Breyer, B.W. Matthews; „Structure of Escherichia coli exonuclease I suggests how processivity is achieved“, *Nat. struct. biol.* **7** (2000), 1125-1128
- [Breyer 2001] W.A. Breyer, B.W. Matthews; „A structural basis for processivity“, *Protein Science* **10** (2001), 1699 –1711
- [Brinkmeier 1997] M. Brinkmeier, K. Dorre, K. Riebeseel, R. Rigler; „Confocal spectroscopy in microstructures“, *Biophys. Chem.* **66** (1997), 229-239
- [Brinkmeier 1999] M. Brinkmeier, K. Dorre, J. Stephan, M. Eigen; „Two beam cross correlation: A method to characterize transport phenomena in micrometer-sized structures“ *Anal. Chem.* **71** (1999), 609-616
- [Brody 1986] R.S. Brody, K.G. Doherty, P.D. Zimmermann; „Processivity and Kinetics of the Reaction of Exonuclease I from Escheria Coli with Polydeoxyribonucleotides“, *J. Biol. Chem.* **261** (1986), 7136-7143
- [Bronstein 2001] I. N. Bronstein, K. A. Semendjajew, G. Musiol, H. Mühlig; „Taschenbuch der Mathematik“, Verlag Harry Deutsch, Frankfurt a.M. 5. Auflage (2001)
- [Buschmann 2003] V. Buschmann, K.D. Weston, M. Sauer; „Spectroscopic Study and Evaluation of Red-Absorbing Fluorescent Dyes“, *Bioconjugate Chem.* **14** (2003), 195-204
- [Chandrashekar 1943] S. Chandrashekar; „Stochastic Problems in Physics and Astronomy“, *Rev. Mod. Phys.* **15** (1943), 1-89
- [Chen 1996] D.Y. Chen, N.J. Dovichi; „Single Molecule Detection in Capillary Electrophoresis: Molecular Shot Noise as a Fundamental Limit to Chemical Analysis“, *Anal. Chem.* **68** (1996), 690-696

- [Chen 1999] Y. Chen, J.D. Müller, P.T.C. So, E. Gratton; „The Photon Counting Histogram in Fluorescence Fluctuation Spectroscopy“, *Biophys. J.* **77** (1999), 553–567
- [Chernoff 1952] H. Chernoff; „A Measure of Asymptotic Efficiency for Tests of a Hypothesis Based on the Sum of Observations“, *Ann. Math. Stat.* **23** (1952), 493-507
- [Chiu 1996] D.T. Chiu, R. N. Zare; „Biased Diffusion, Optical Trapping, and Manipulation of Single Molecules in Solution“, *J. Am. Chem. Soc.* **118** (1996), 6512-6513
- [Cobb 1990] K.A. Cobb, V. Dolmick, M. Novotny; „Electrophoretic Separations of Proteins in Capillaries with Hydrodynamically-Stable Surface Structures“, *Anal. Chem.* **62** (1990), 2478-2483
- [Courant 1928] R. Courant, K. Friedrichs, H. Lewy; „Differenzgleichungen in der mathematischen Physik“, *Math. Ann.* Vol. **C** (1928), 32-74 Part I, §3
- [Courjon 1990] D. Courjon, J. M. Vigoureux, M. Spajer, K. Sarrayedine, S. Leblanc, *Appl. Opt.* **29** (1990), 3734
- [Crank 1975] J. Crank, „The Mathematics of Diffusion“, Oxford University Press (Clarendon), London, New York 2nd Ed. (1975)
- [Dapprich 1992] J. Dapprich; „Single-molecule DNA digestion by lambda-exonuclease“, *Cytometry* **36** (1999), 163-168
- [de Groot 1962] S.R. de Groot, P. Mazur; „Non-Equilibrium Thermodynamics“, North Holland Publishing Co., Amsterdam (1962)
- [Demas 1998] J.N. Demas, M. Wu, P.M. Goodwin, et al. „Fluorescence detection in hydrodynamically focused sample streams: Reduction of diffusional defocusing by association of analyte with high-molecular-weight species“, *Appl. Spect.* **52** (1998), 755-762
- [Dickmann 1998] K. Dickmann, J. Jersch, „Nanostrukturierung mit Laserstrahlung“, *Phys. Bl.* **52** (1996), 363-365
- [Dornboos 1997] R.M.P. Dornbos, B.G. deGroot, J. Greve, „Experimental and model investigations of bleaching and saturation of fluorescence in flow cytometry.“, *Cytometry* **29** (1997), 204.
- [Downie 1965] N.M., Downie, R.W. Heath; „Basic Statistical Methods“, Harper & Row New York 2. Auflage (1965), 206–209.
- [Dunn 1974] O.J. Dunn, V.A. Clark; „Applied Statistics: Analysis of Variance and Regression“, Wiley, New York (1974)

- [Edman 1996] L. Edman, Ü. Mets, R. Rigler; „Conformational Transitions Observed for Single Molecules in Solution“, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93** (1996), 6710-6715
- [Eggeling 1998] C. Eggeling, J. Widengren, R. Rigler, C.A.M. Seidel. „Photobleaching of fluorescent dyes under conditions used for single-molecule detection: Evidence of two-step photolysis.“, Anal. Chem. **70** (1998), 2651.
- [Eggeling 2001] C. Eggeling, S. Berger, L. Brand, J.R. Fries, J. Schaffer, A. Volkmer, C.A.M. Seidel; „Data Registration and Single-Molecule Analysis using Multi-Parameter Fluorescence Detection“; J. Biotech. **86** (2001), 163-180
- [Elson 1974¹] E.L. Elson, D. Magde; "Fluorescence Korrelation Spectroscopy: I. Conceptual Basis and Theory", Biopolymers **13** (1974), 1-27
- [Elson 1974²] E.L. Elson, D. Magde; "Fluorescence Korrelation Spectroscopy: II. An Experimental Realization", Biopolymers **13** (1974), 29-61
- [EMBL 1996] ϕ -x-174 GenBank/EMBL sequence accession numbers V01128, J02482, M10348, M10379, M10714, M10749, M10750, M10866, M10867, M24859.
- [Enderlein 1997] J. Enderlein, P.M. Goodwin, A. VanOrden, W.P. Ambrose, R. Erdmann, R.A. Keller; „A maximum likelihood estimator to distinguish single molecules by their fluorescence decays“, Chem. Phys. Lett. **270** (1997), 464-470
- [Enderlein 1997²] J. Enderlein, D.L. Robbins, W.P. Ambrose, P.M. Goodwin, R. A. Keller; „The statistics of single molecule detection: an overview“, Bioimaging **5** (1997), 88–98.
- [Enderlein 1998¹] J. Enderlein, M. Köllner; „Comparison between time-correlated single photon counting and uorescence correlation spectroscopy in single molecule identification“, Bioimaging **6** (1998), 3–13
- [Enderlein 1998²] J. Enderlein, D.L. Robbins, W.P. Ambrose, R.A. Keller; „Molecular Shot Noise, Burst Size Distribution, and Single-Molecule Detection in Fluid Flow: Effects of Multiple Occupancy“, J. Phys. Chem. A **102** (1998), 6089-6094
- [Enderlein 2001] J. Enderlein, M. Sauer; „Optimal Algorithm for Single-Molecule Identification with Time-Correlated Single-Photon Counting“, J. Phys. Chem. A **105** (2001), 48-53
- [Enderlein 2002] J. Enderlein, persönliche Mitteilung
- [Enderlein 2002^b] J. Enderlein, M. Böhmer; „Ab-initio modeling of fluorescence correlation spectroscopy experiments“, Vortrag am 26.9.2002 auf der Konferenz „8th International Workshop on Single Molecule Detection and Ultrasensitive Analysis in Life Sciences“, (Berlin, 25.9.2002-27.9.2002)

- [Feller 1957] W. Feller; „An Introduction to Probability Theory and its Applications“, John Wiley & Sons , New York (1957)
- [Fister 1998] J.C. Fister, S.C. Jacobson, L.M. Davis, J.M. Ramsey; „Counting Single Chromophore Molecules for Ultrasensitive Analysis and Separations on Microchip Devices“, *Anal. Chem.* **70** (1998), 431-437
- [Flemming 1976] G.R. Flemming, J.M. Morris, G.W. Robinson; „Direct Observation of Rotational Diffusion by Picosecond Spectroscopy“, *Chem. Phys.* **17** (1976), 91-100
- [Fries 1998] J.R. Fries, L. Brand, C. Eggeling, M. Köllner, C.A.M. Seidel; „Quantitative Identification of Different Single Molecules by Selective Time-Resolved Confocal Fluorescence Spectroscopy“, *J.Phys. Chem. A* **102** (1998), 6601-6613
- [Földes-Papp 2001^a] Z. Földes-Papp, B. Angerer, P. Thyberg, M. Hinz, S. Wennmalm, W. Ankenbauer, H. Seliger, A. Holmgren, R. Rigler; „Fluorescently labeled model DNA sequences for exonucleolytic sequencing“, *J. Biotech.* **86** (2001), 203-224
- [Földes-Papp 2001^b] Z. Földes-Papp, B. Angerer, W. Ankenbauer, R. Rigler; „Fluorescent high-density labeling of DNA: error-free substitution for a normal nucleotide“, *J. Biotech.* **86** (2001), 237-253
- [Fu 1998] D.J. Fu, K. Tang, A. Braun, D. Reuter, B. Darnhofer-Demar, D.P. Little, M.J. O'Donnell, C.R. Cantor, H. Koster; „Sequencing exons 5 to 8 of the p53 gene by MALDI-TOF massspectrometry.“, *Nat. Biotechnol.* **16** (1998), 381–384.
- [Fung 1995] E.N. Fung, E.S. Yeung; „High-Speed DNA-Sequencing by using Mixed Poly(ethyleneoxide) Solutions in uncoated capillary columns“, *Anal. Chem.* **67** (1995), 1913-1919
- [Gao 1998] Q. Gao, E.S. Yeung; „A Matrix for DNA Separation: Genotyping and Sequencing using Poly(vinylpyrrolidone) solutions in uncoated capillaries“, *Anal. Chem.* **70** (1998), 1382-1388
- [Garcia-Parajo 1998] M.F. Garcia-Parajo, J.A. Veerman, A.G.T. Ruiters, N.F. van Hulst „Near-field optical and shear-force microscopy of single fluorophores and DNA molecules“, *Ultramicroscopy* **71** (1998), 311-319
- [Garcia-Parajo 1998] M.F. Garcia-Parajo, J.A. Veerman, S.J.T. van Noort, B.G. de Grooth, J. Greve, N.F. van Hulst, „Near-field optical microscopy for DNA studies at the single molecular level“, *Bioimaging* **6** (1998), 43–53.
- [Gerthsen 1993] C. Gerthsen, H. Vogel, H. O. Kneser; "Physik", Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 17. Aufl. (1993)

- [Grabec 1997] I. Grabec, W. Sachse; „Synergetics of Measurement, Prediction and Control“, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1997), 125
- [Green 1997] P. Green; „Against a Whole-Genome Shotgun“, *Genome Res.* **7** (1997), 410-417.
- [Greiner 2002] W. Greiner; „Lehrbuch der Theoretischen Physik III : Klassische Elektrodynamik“, Verlag H. Deutsch, Frankfurt a. M. 6. Auflage (2002)
- [Haab 1995] B.B. Haab, R.A. Mathies; „Single Molecule Fluorescence Burst Detection of DNA Fragments Separated by Capillary Electrophoresis“, *Anal. Chem.* **67** (1995), 3253-3260
- [Habermehl 1992] G. Habermehl; „Naturstoffchemie“, Springer-Verlag, Berlin 1992, 469-472
- [Harding 1992] J.D. Harding, R.A. Keller; „Single Molecule Detection as an Approach to Rapid DNA Sequencing“, *Tibtech.* **10** (1992), 55-57
- [Hänninen 1997] P.E. Hänninen, J.T. Soini, E. Soini; „Photon-Burst Analysis in Two-Photon Fluorescence Excitation Flow Cytometry“, *Cytometry* **36** (1999), 183–188
- [Hjertén 1985] S. Hjertén; „High Performance Electrophoresis: Elimination of Electroendosmosis and Solute Adsorption“, *J. Chromatogr.* **347** (1985), 191-198
- [Hoel 1971] P.G. Hoel; „Introduction to Mathematical Statistics“, Wiley, New York 4. Auflage (1971), Kapitel 7
- [Hosaka 1996] S. Hosaka, T. Shintani, M. Miyamoto, A. Hirotsune, M. Terao, M. Yoshida, S. Honma, S. Kaemmer; „Scanning near-field optical microscope with a laser diode and nanometer-sized bit recording“, *Thin Solid Films*, **273** (1996), 122-127
- [Huang 1996] Z. Huang, J.T. Petty, B. O’Quinn, J.L. Longmire, N.C. Brown, J.H. Jett, R.A. Keller; „Large DNA Fragment Sizing by Flow Cytometry: Application to the Characterization of P1 Artificial Chromosome (PAC) Clones“, *Nucl. Acid Res* **24** (1996), 4202-4209
- [Hungerford 1986] J.M. Hungerford, G. D. Christian; „Statistical Sampling Errors as Intrinsic Limits on Detection in Dilute Solutions“, *Anal. Chem.* **58** (1986), 2567-2568
- [IHGSC 2001] International Human Genome Sequencing Consortium; „Initial sequencing and analysis of the human genome.“, *Nature* **409** (2001), 860-921

- [IHGSC 2004] International Human Genome Sequencing Consortium; „Finishing the euchromatic sequence of the human genome.“, *Nature* **431** (2004), 931-945
- [Jackson 2002] J.D. Jackson; „Klassische Elektrodynamik“, Walter de Gruyter, Berlin, New York 3. Auflage (2002)
- [Jarzeba 1988] W. Jarzeba, G.C. Walker, A.E. Johnson, M.A. Kahlow, P.F. Barbara; „Femtosecond Microscopic Solvation Dynamics of Aqueous Solutions“, *J. Phys. Chem.* **92** (1988), 7039-7041
- [Jersch 1998] J. Jersch, F. Demming, L.J. Hildenhausen, K. Dickmann; „Field enhancement of optical radiation in the nearfield of scanning probe microscope tips“, *Appl. Phys. A* **66** (1998), 29-34
- [Jiang 1994] Y. Jiang, P.K. McCarthy, G.J. Blanchard; „The Role of Multiple Electronic States in the Dissipative Energy Dynamics of Coumarin 153“, *Chem. Phys.* **183** (1994), 249-267
- [Jett 1989] J.H. Jett, R.A. Keller, J.C. Martin, B.L. Marrone, R.K. Moyzis, R.L. Ratliff, N.K. Seitzinger, E.B. Shera, C.C. Stewart; „High Speed DNA Sequencing: An Approach upon Fluorescence Detection of Single Molecules“, *J. of Biomolecular Structure & Dynamics* **7** (1989), 301-309
- [Jett 1992] J.H. Jett, R.A. Keller, J.C. Martin, B.L. Marrone R.K. Moyzis, R.L. Ratliff, N. K. Seitzinger, E.B. Shera, C.C. Stewart; „High-Speed-DNA-Sequencing: an Approach based upon Fluorescence of Single Molecules“, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **7** (1992), 301-309
- [Jett 1995] J. H. Jett, R. A. Keller, J.C. Martin, R. G. Posner, B. L. Marrone, L. M. Hammond, D. J. Simpson; „Method for Rapid Base Sequencing in DNA and RNA with Two Base Labeling“, United States Patent 5405747 (1995)
- [Jorgenson 1983] J.W. Jorgenson, K.D. Lukas; „Capillary Zone Electrophoresis“, *Science* **222** (1983), 266-272
- [Kahl 1995] G. Kahl; „Dictionary of Gene Technology“, VCH, Weinheim (1995)
- [Kartalov 2004] E.P. Kartalov; „Single-molecule detection and DNA sequencing-by-synthesis“, Thesis California Institute of Technology (2004)
- [Kask 1999] P. Kask, K. Palo, D. Ullmann, K. Gall; „Fluorescence-intensity distribution analysis and its application in biomolecular detection technology“, *Proc Natl. Acad. Sci.* **96** (1999), 13756–13761

- [Kask 2000] P. Kask, K. Palo, N. Fay, L. Brand, Ü. Mets, D. Ullmann, J. Jungmann, J. Pschorr, K. Gall; „Two-Dimensional Fluorescence Intensity Distribution Analysis: Theory and Applications“, *Biophys. J.* **78** (2000), 1703–1713
- [Keller 1996] R. A. Keller, W. P. Ambrose, P. M. Goodwin, J. H. Jett, J. C. Martin, M. Wu; "Single-Molecule Fluorescence Analysis in Solution", *Appl. Spectroscopy*, **50** (1996), 12 A-32A
- [Kirkwood 1950] J.G. Kirkwood, R.J. Goldberg; „Light Scattering from Composition Fluctuations in Multi-Component Solutions“, *J. Chem. Phys.* **18** (1950), 54
- [Kirsch 1996] A.K. Kirsch, C.K. Meyer, T.M. Jovin „Fluoreszenz-Nahfeldmikroskopie im ‚shared Aperture‘ Modus“, Poster auf der Diskussionstagung „Rastersondenmikroskopien und organische Materialien V“, Münster 7.-9.10.1996
- [Kirsch 1997] A.K. Kirsch, C.K. Meyer, T.M. Jovin, „Shear force imaging of DNA in a near-field scanning optical microscope (NSOM)“, *Journal of Microscopy* **185** (1997), 396-401
- [Kneubühl 1999] F. K. Kneubühl, M. W. Sigrist; „Laser“, Teubner, Stuttgart-Leipzig, 5. Auflage (1999)
- [Knippers 2001] R. Knippers; „Molekulare Genetik“, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 8. Auflage (2001)
- [Ko 1997¹] D.S. Ko, M. Sauer, S. Nord, R. Müller, J. Wolfrum; „Determination of the Diffusion Coefficient at Single Molecule Level“, *Chem. Phys. Lett.* **269** (1997), 54-58
- [Ko 1997²] D.S. Ko; „A simple computer-interfaced multichannel scaler for photon counting“. *Rev. Sci. Instrum.* **68** (1997), 3922-3923.
- [Ko 1997³] D.S. Ko, S. Nord, M. Sauer, J. Wolfrum; „Fabrication of computer-interfaced photon counter for single molecule detection in solution“. *J. Opt. Soc. Korea* **8** (1997), 42-46.
- [Kopelman 1993] R. Kopelman, W. Tan, „Near-field optics: Imaging single Molecules“, *Science* **262** (1993), 1382-1384
- [Koppel 1974] D. E. Koppel; „Statistical accuracy in Fluorescence Correlation Spectroscopy“, *Phys. Rev. A* **10** (1974), 1938-1945
- [Korlach 2002] J. Korlach, M. Levene, S.W. Turner, D.R. Larson, M. Foquet, H.G. Craighead, W.W. Webb; „A new strategy for sequencing individual molecules of DNA“, *Biophys. J.* **80** (2001), Part 2 (Annual Meeting Abstracts), 65501

- [Korn 1968] G.A. Korn, T.M. Korn; „Mathematical Handbook for Scientists and Engineers“, McGraw-Hill, New York 2. Auflage (1968), §19.7
- [Köllner 1992] M. Köllner, J. Wolfrum; „How many Photons are Necessary for Fluorescence-Lifetime Measurements“, Chem. Phys. Lett. **200** (1992), 199-204
- [Köllner 1993] M. Köllner; „How to Find the Sensivity Limit for DNA-Sequencing Based on Laser-Induced Fluorescence“, Appl. Opt. **32** (1993), 806-820
- [Köllner 1996] M. Köllner, A. Fischer, J. Arden-Jacob, K.H. Drexhage, R. Müller, S. Seeger, J. Wolfrum; „Fluorescence Pattern Recognition for Ultrasensitive Molecule Identification: Comparison of Experimental Data and Theoretical Approximations“, Chem. Phys. Lett. **250** (1996), 355-360
- [König 1926] W. König; „Über den Begriff der Polymethinfarbstoffe und eine davon abgeleitete allgemeine Farbstoffformel als Grundlage einer neuen Systematik der Farbenchemie“, J. Prakt. Chem. **112** (1926), 1-36
- [Kuhn 1948] H. Kuhn; „Free electron Model for Absorption Spectra of Organic Dyes“, J. Chem. Phys. **16** (1948), 840-841
- [Kuhn 1949] H. Kuhn; „A Quantum-Mechanical Theory of Light Absorption of Organic Dyes and Similar Compounds“, J. Chem. Phys. **17** (1949), 1198-1212
- [Kung 1998] C.-Y. Kung, M.D. Barnes, N. Lermer, W.B. Whitten, J.M. Ramsey; „Confinement and Manipulation of Individual Molecules in Attoliter Volumes“, Anal. Chem. **70** (1998), 658-661
- [Labhart 1981] H. Labhart, W. Heinzemann; in „Organic Molecular Photophysics“, ed: J. B. Birks; Wiley, London, Vol **1** (1973), 297-355
- [Lakowicz 1983] J. R. Lakowicz; „Principles of Fluorescence Spectroscopy“, Plenum Press, New York (1983)
- [Lambelet 1998] P. Lambelet, A. Sayah, M. Pfeffer, C. Philipona, F. Mrquis-Weible; „Chemically etched fiber tips for near-field optical microscopy: a process for smoother tips“, Appl. Opt. **37** (1998), 7289-7292
- [Lamola 1969] A. A. Lamola; „Energy Transfer and organic Photochemistry“, Interscience, New York (1969)
- [Lapshin 1998] D. S. Lapshin, persönliche Mitteilung
- [LeCaptain 2001] D.J. LeCaptain, M. A. Michel, A. Van Orden; „Characterization of DNA-protein complexes by capillary electrophoresis-single molecule fluorescence correlation spectroscopy“, Analyst **126** (2001), 1279-1284

- [Lee 1999] B.-I. Lee, D. M. Wilson III; „The RAD2 Domain of Human Exonuclease 1 Exhibits 5' to 3' Exonuclease and Flap Structure-specific Endonuclease Activities“; J. Biol. Chem. **274** (1999), 37763–37769
- [Lehman 1960] I.R. Lehman; „The Deoxyribonucleases of Escheria coli – I. Purification and Properties of a Phosphordieseterase –“, J. Biol. Chem. **235** (1960), 1479-1487
- [Lehman 1964] I.R. Lehman; „The Deoxyribonucleases of E. Coli – V. On the Specificity of Exonuclease I (Phosphodiesterase)“, J. Biol. Chem. **239** (1964), 2628-2636
- [Lehmann 1975] E.L. Lehmann; „Nonparametrics: Statistical Methods Based on Ranks“, Holden-Day San Francisco (1975).
- [Li 1993] L. Q. Li, L. M. Davis; „Single Photon Avalanche Diode for Single Molecule Detection“, Rev. Sci. Instrum. **64** (1993), 1524
- [Li 1995] L.-Q. Li, L. M. Davis; „Rapid and efficient detection of single chromophore molecules in aqueous solution“, Applied Optics **34** (1995), 3208-3217
- [Lieberwirth 1998a] U. Lieberwirth, J. Arden-Jacob, K.H. Drexhage, D.P. Herten, R. Müller, M. Neumann, A. Schulz, S. Siebert, G. Sagner, S. Klingel, M. Sauer, J. Wolfrum; „Multiplex Dye DNA Sequencing in Capillary Gel Electrophoresis by Diode Laser-Based Time-Resolved Fluorescence Detection“, Anal. Chem. **70** (1998), 4771-4779
- [Lieberwirth 1998b] U. Lieberwirth; „Synthese und Optimierung multiplexfarbstoffmarkierter DNS-Primer und ihre Anwendung in der DNS-Sequenzierung“, Dissertation an der Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg (1998)
- [Liphardt 1981] B. Liphardt; „Entwicklung neuer Farbstoffe zur Steigerung des Wirkungsgrades von Farbstofflasern“, Dissertation an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Georg-August-Universität Göttingen (1981)
- [Liphardt 1982] B. Liphardt, W. Lüttke; „Laserfarbstoffe mit intramolekularer Triplettlöschung“, Chem. Ber. **115** (1982), 2997-3010
- [Lippert 1957] E. Lippert; „Spektroskopische Bestimmung des Dipolmomentes aromatischer Verbindungen im ersten angeregten Singulettzustand“, Z. Elektrochem. **61** (1957), 962-975
- [Machara 1998] N.P. Machara, P.M. Goodwin, J. Enderlein, et al. „Efficient detection of single molecules eluting off an optically trapped microsphere“, Bioim. **6** (1998), 33-42

- [Madabhushi 1996] R. S. Madabhushi, S.M. Menchen, J.W. Efcavitch, P.D. Grossmann; „Polymers for separation of biomolecules“, United States Patent 5,552,028 (1996)
- [Madabhushi 1998] R. S. Madabhushi; „Separation of 4-color DNA sequencing extension products in noncovalently coated capillaries using low viscosity polymer solutions.“, *Electrophoresis* **19** (1998), 224-230
- [Magde 1978] D. Magde, W.W. Webb, E.L. Elson; „Fluorescence Correlation Spectroscopy III. Uniform Translation and Laminar Flow“, *Biopolymers* **17** (1978), 316-376
- [Maroncelli 1987] R. A. Maroncelli, G. R. Flemming; „Picosecond Solvation Dynamics of Coumarin 153: The Importance of Molecular Aspects of Solvation“, *J. Chem. Phys.* **86** (1987), 6221-6239
- [Maroncelli 1989] M. Maroncelli, J. MacInnis, G.R. Flemming; „Polar Solvent Dynamics and Electron Transfer Reactions“, *Science* **243** (1989), 1674-1681
- [Marquis-Weible 1996] F. Marquis Weible, "Microscopie optique en champ proche pour l'investigation de structures biologiques". *Bulletin de l'ASMT* **20** (1996), 56 - 59.
- [Matsumoto 1998] M. Matsumoto, T. Nishimura; „Mersenne Twister: A 623-dimensionally equidistributed uniform pseudorandom number generator“, *ACM Trans. on Modeling and Computer Simulation* **8** (1998), 3-30
- [Mc Cormick 1988] R.M. Mc Cormick; „Capillary Zone Electrophoretic Separation of Peptides and Proteins using Low pH Buffers in Modified Silica Capillaries“, *Anal. Chem.* **60** (1988), 2322-2328
- [Mc Crea 1940] W.H. Mc Crea, F.J.W. Whipple; „Random Paths in Two and Three Dimensions“, *Proc. R. Soc. Edinburgh* **60** (1940), 281-298
- [Meldrum 2000¹] D. Meldrum; „Automation for Genomics, Part One: Preparation for Sequencing“, *Genome Res.* **10** (2000), 1081–1092
- [Meldrum 2000²] D. Meldrum; „Automation for Genomics, Part Two: Sequencers, Microarrays, and Future Trends“, *Genome Res.* **10** (2000), 1288–1303
- [Meschede 1999] D. Meschede; „Optik, Licht und Laser“, Teubner Stuttgart, Leipzig (1999)
- [Mets 1994] Ü. Mets, R. Rigler; „Submillisecond Detection of Single Rhodamine Molecules in Water“, *J. Fluoresc.* **4** (1994), 259-264

- [Moore 1961] W. M. L. Moore, G. S. Hammond, R. P. Foss; „Mechanics of Photoreactions in Solutions 1. Reduction of Benzophenone by Benzhydrol“, J. Am. Chem. Soc. **83** (1961), 2789-2794
- [Müller 1996] R. Müller, C. Zander, M. Sauer, M. Deimel, D-S. Ko, S. Siebert, J. Arden-Jacob, G. Deltau, N.J. Marx, K.H. Drexhage, J. Wolfrum; „Time-Resolved Identification of Single Molecules in Solution with a Pulsed Semiconductor Diode Laser“, Chem. Phys. Lett. **262** (1996), 716-722
- [Müller 2000] J.D. Müller, Y. Chen, E. Gratton; „Resolving Heterogeneity on the Single Molecular Level with the Photon-Counting Histogram“, Biophys. J. **78** (2000), 474–486
- [Neumann 1999] M. Neumann; „DNS-Fragmentanalyse durch zeitaufgelöste Fluoreszenzdetektion in parallelen Kapillaren und polymeren Mikrochips“, Inaugural Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg (1999)
- [Nie 1994] S. Nie, D. T. Chiu, R. N. Zare; „Probing Individual Molecules with Confocal Fluorescence Microscopy“, Science **266** (1994), 1018-1021
- [Nie 1995] S. Nie, D. T. Chiu, R. N. Zare; „Real-Time Detection of Single Molecules in Solution by Confocal Fluorescence Microscopy“, Anal. Chem. **67** (1995), 2849-2857
- [Norusis 1982] M.J. Norusis, „SPSS Introductory Guide: Basic Statistics and Operations“, McGraw-Hill, New York (1982)
- [Norusis 1985] M.J. Norusis, „SPSS-X Advanced Statistics Guide“, McGraw-Hill, New York (1985)
- [Numerical Recipes in C] W.H. Press, S.A. Teukolsky, W.T. Vetterling, B.P. Flannery; „Numerical Recipes in C: The Art of Scientific Computing“, Second Edition, Cambridge University Press (1995)
- [Ohtsu 2004] M. Ohtsu, K. Kobayashi; "Optical Near Fields", Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg - New York, (2004)
- [Palo 2000] K. Palo, Ü. Mets, S. Jäger, P. Kask, K. Gall; „Fluorescence Intensity Multiple Distributions Analysis: Concurrent Determination of Diffusion Times and Molecular Brightness“, Biophys. J. **79** (2000), 2858–2866
- [Petersen 1986] N. O. Petersen; „Scanning Fluorescence Correlation Spectroscopy I. Theory and Simulation of Aggregation measurements“, Biophys. J. **49** (1986), 809-815

- [Prasher 1983] D.C. Prasher, L. Conarro, S.R. Kushner; „Amplification and Purification of Exonuclease I from Escheria Coli K12“, J. Biol. Chem. **258** (1983), 6340-6343
- [Qian 1990] H. Qian; „Inverse poisson transformation and shot noise filtering.“, Rev.Sci. Instrum. **61** (1990), 2088 –2091
- [Quian 1991] H. Quian, E. L. Elson; „Analysis of Confocal Laser Microscope Optics for 3-D fluorescence Correlation Spectroscopy“, Appl. Opt. **30** (1991), 1185-1191
- [Reichardt 1979] C. Reichardt; „Empirische Parameter der Lösungsmittelpolarität als lineare Freie Enthalpie Beziehung“, Angew. Chem. **91** (1979), 119-131
- [Reha-Krantz 1999a] L.J. Reha-Krantz, M.F. Goodman; „Variant DNA polymerases.“, United States Patent 5,928,919 (1999)
- [Reha-Krantz 1999b] L.J. Reha-Krantz, M.F. Goodman; „Synthesis of fluorophore-labeled DNA.“, United States Patent 5,945,312 (1999)
- [Rigler 1990] R. Rigler, J. Widengren; „Ultrasensitive Detection of Single Molecules by Fluorescence Correlation Spectroscopy“, Bioscience **3** (1990), 180-183
- [Rigler 1992] R. Rigler, Ü. Mets; „Diffusion of single molecules through a gaussian Laser beam“, SPIE **1921** (1992), 239-248.
- [Rigler 1993] R. Rigler, J. Widengren; „Fluorescence Correlation Spectroscopy with high Count Rate and low Background: Analysis of translational Diffusion“, Eur. Biophys. J. **22** (1993), 169-175
- [Rittinger 1991] K. Rittinger; „Synthese und zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie von Oligonukleotid-Coumarin-Verbindungen als Modellsubstanzen für eine nukleobasenspezifische Fluoreszenzlöschung“, Diplomarbeit an der Chemischen Fakultät der Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg (1991)
- [Rompae 2000] E. Van Rompaey, N. Sanders, S. C. De Smedt, J. Demeester, E. Van Craenenbroeck Y. Engelborghs; „Complex Formation between Cationic Polymethacrylates and Oligonucleotides“, Macromolecules **33** (2000), 8280-8288
- [Rosenblum 1997] B.B. Rosenblum, F. Oaks, S.M. Menchen, B. Johnson; „Improved single-strand DNA sizing accuracy in capillary electrophoresis“, Nucleic Acids Res. **25** (1997), 3925-3929
- [Ruiter 1997] A.G.T. Ruiter, J.A Veerman, M.F. Garcia-Parajo, N.F. van Hulst, „Single molecule rotational and translational diffusion observed by near-field scanning optical microscopy“, J. Phys. Chem. A **101** (1997), 7318–23

- [Sandoghar 1997] V. Sandoghar, S. Wegscheide, G. Krausch, J. Mlynek, „Reflection scanning near field optical microscopy with uncoated fiber tips: How good is the resolution really?“, J. Appl. Phys. 81 (1997), 2499-2503
- [Sanger 1977] F. Sanger, S. Nicklen, A.R. Coulson; „DNA Sequencing with chain-terminating inhibitors“, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74** (1977), 5463-5467
- [Sachs 1992] L. Sachs; „Angewandte Statistik“, Springer Verlag, Berlin 7. Aufl. (1992)
- [Sauer (Diss.) 1995] M. Sauer ; „Entwicklung effizienter Fluoreszenzfarbstoffe für den hochempfindlichen Nachweis von Biomolekülen unter Einsatz zeitaufgelöster LIF-Spektroskopie“, Inaugural Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg (1995)
- [Sauer 1995] M. Sauer, K. T. Han, R. Müller, S. Nord, A. Schulz, S. Seeger, J. Wolfrum, J. Arden-Jakob, G. Deltau, N.J. Marx, C. Zander, K. Drexhage; „New Fluorescent Dyes in the Red Region for Biodiagnostics“, J. Fluoresc. **5** (1995), 247-261
- [Sauer 1996] M. Sauer, K.H. Drexhage, C. Zander, J. Wolfrum; „Diode Laser based Detection of Single Molecules in Solution“, Chem. Phys. Lett. **254** (1996), 223-228
- [Sauer 1998] M. Sauer, J. Arden-Jacob, K.H. Drexhage, F. Göbel, U. Lieberwirth, K. Mühlegger, R. Müller, J. Wolfrum, C. Zander; „Time-Resolved Identification of Individual Mononucleotide Molecules in Aqueous Solution with Pulsed Semiconductor Lasers“, Bioimaging **6** (1998), 14–24
- [Sauer 1999] M. Sauer, B. Angerer, K-T. Han, C. Zander; "Detection and identification of single dye labeled mononucleotide molecules released from an optical Fiber in a microcapillary : First steps towards a new single molecule DNA sequencing technique", Phys. Chem. Chem. Phys. **1** (1999), 2471-2477
- [Sauer 2001] M. Sauer, B. Angerer, W. Ankenbauer, Z. Földes-Papp, F. Göbel, K.-T. Han, R. Rigler, A. Schulz, J. Wolfrum, C. Zander; „Single molecule DNA sequencing in submicrometer channels: state of the art and future prospects“, J. Biotech. **86** (2001), 181-201
- [Schmidt 1995] T. Schmidt, G.J. Schütz, W. Baumgartner, H.J. Gruber, H. Schindler, „Characterization of Photophysics and Mobility of Single Molecules in a Fluid Lipid Membrane“, J. Phys. Chem. **99** (1995), 17662-17668
- [Schulze 1990] P. Schulze; „Beschreibende Statistik“, R. Oldenbourg Verlag, München (1990)
- [Seidel 1992] C. Seidel; „Laserspektroskopische Untersuchungen molekularer Aspekte der nukleobasen-spezifischen Löschung von Fluoreszenzfarbstoffen“, Inaugural

Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg (1992)

- [Seidel 1995] C. Seidel, A. Schulz, M. Sauer; „Nucleobase Specific Quenching of Fluorescent Dyes by Photoinduced Electron Transfer. 1. Nucleobase One-Electron Redox Potentials and their Correlation with Static and Dynamic Quenching Efficiencies“, *J. Chem. Phys.* **100** (1996), 5541-5553
- [Sekatskii 1996] S.K. Sekatskii, V.S. Letokhov; „Single Fluorescence Centers on the Tips of Crystal Needles: First Observation and Prospects for Application in Scanning One Atom Fluorescence Microscopy“, *Appl. Phys. B* **63** (1996), 525-530
- [Shera 1990] E. B. Shera, N. K. Seitzinger, L. M. Davis, R. A. Keller, S. A. Soper; „Detection of Single Fluorescent Molecules“, *Chem. Phys. Lett.* **174** (1990), 553
- [She 2004] X. She, Zhaoshi Jiang, R.A. Clark, G. Liu, Z. Cheng, E. Tuzun, D.M. Church, G. Sutton, A.L. Halpern, E.E. Eichler; „Shotgun sequence assembly and recent segmental duplications within the human genome“, *Nature* **431** (2004), 927-930
- [Siegel 1986] R.A. Siegel, R. Langer; „A new Monte Carlo Approach to Diffusion in Constricted Porous Geometries“, *J. Colloid Interface Sci.* **109** (1986), 426-440
- [Siemiarczuk 1989] A. Siemiarczuk, W. R. Ware; „A Novel Method to Analysis of Pyrene Fluorescence Decays in Sodiumdodecylsulfate Micelles in the Presence of Cu^{2+} -ions based on the Maximum Entropy Method“, *Chem. Phys. Lett.* **160** (1989), 285-290
- [Siemiarczuk 1990] A. Siemiarczuk, W. R. Ware; „Comparison of the Maximum Entropy and the Exponential Series Methods for the Recovery of Distributions of Lifetimes from Fluorescence Lifetime Data“, *J. Phys. Chem.* **94** (1990), 1662-1666
- [Soper 1992] S. A. Soper, L. M. Davis, E. B. Shera; „Detection and Identification of Single Molecules in Solution“, *J. Opt. Soc. Am. B.* **9** (1992), 1761-1769
- [Soper 1993] S. A. Soper, Q. Mattingly, B. Legendre, D. Williams, J. Flanagan, R. Hammer; „Ultrasensitive NIR Fluorescence Detection and its Application to Analysis of DNA“, *Spie* **1895** (1993), 113-122
- [Soper 1993²] S. A. Soper, Q. L. Mattingly, P. Vegunta; „Photon Burst Detection of Single Near-Infrared Fluorescent Molecules“, *Anal. Chem.* **65** (1993), 740
- [Soper 1994] S. A. Soper, B. L. Legendre; „Error Analysis of Simple Algorithms for Determining Fluorescence Lifetimes in Ultradilute Dye Solutions“, *Appl. Spectroscopy* **48** (1994), 400

- [Strickler 1962] S. J. Strickler, R. A. Berg; „Relationship between Absorption Intensity and Fluorescence Lifetimes of Molecules“, J. Chem. Phys. **37** (1962), 814-822
- [Stryer 1990] L. Stryer; „Biochemie“, Spektrum der Wiss. Verlagsges., Heidelberg 1990
- [Stuart 1987] A. Stuart, J.K. Ord, „Kendall's Advanced Theory of Statistics“, Griffin and Co., London 5. Auflage (1987)
- [Surowiec 1996] K. Surowiec, B. Buszewski, Z. Suprynowicz; „The Influence of Chemical Modification of Fused Silica Capillary Tubes on the Electroosmotic Flow in Capillary Zone Electrophoresis“, Chem. Anal. Warsaw **41** (1996), 201-207
- [Suppan 1990] P. Suppan, „Solvatochromic Shifts: The Influence of the Medium on the Energy of Electronic States“, J. Photochem. Photobiol. A: Chem. **50** (1990), 293-330
- [Tellinghuisen 1994] J. Tellinghuisen, P.M. Goodwin, W.P. Ambrose, J.C. Martin, R.A. Keller; „Analysis of Fluorescence Lifetime Data for Single Rhodamine Molecules in Flowing Sample Streams“, Anal. Chem. **66** (1994), 64-72
- [Thomas 1978] K.R. Thomas, B.M. Olivera; „Processivity of DNA Exonucleases“, J. Biol. Chem. **253** (1978), 424-429
- [Thomson 1991] N. L. Thomson; „Fluorescence Correlation Spectroscopy“, in J.R. Lakowicz; „Topics in Fluorescence Spectroscopy“, Plenum Press, New York (1991), 337-378
- [Turner 1984] D. R. Turner; „Etch procedure for optical fibers“, United States Patent 4,469,554 (1984)
- [Valaskovic 1995] G.A. Valaskovic, M. Holton, G.H. Morrison; „Parameter Control, characterization and optimization in the fabrication of optical-fiber near-field probes“, Appl. Opt. **34** (1995), 1215-1228
- [van Oijen 2003] A.M. van Oijen, P.C. Blainey, D.J. Crampton, C.C. Richardson, T. Ellenberger, S. Xie; „Single-Molecule Kinetics of λ Exonuclease Reveal Base Dependence and Dynamic Disorder“, Science **301** (2003), 1235-1238
- [van Orden 1998] A. van Orden, R.A. Keller; „Fluorescence correlation spectroscopy for rapid multicomponent analysis in a capillary electrophoresis system“, Anal. Chem. **70** (1998), 4463-4471
- [Varadhan 1984] S.R.S. Varadhan; „Large Deviations and Applications“, Society for Industrial and Applied Mathematics, Philadelphia, Pa. 1984 Kap. 3 S.6

- [Venter 2001] J.C. Venter, M.D. Adams, E.W. Myers, P.W. Li, R.J. Mural, G.G. Sutton, H.O. Smith, M. Yandell, C.A. Evans, R.A. Holt, et al.; „The Sequence of the Human Genome.“, *Science* **291** (2001), 1304-1351
- [von Mises 1964] R. von Mises; „Mathematical Theory of Probability and Statistics“, Academic Press, New York (1964), Kapitel IX(A) und IX(B).
- [Watson 2004] J.D. Watson, T.A. Baker, S.P. Bell, A. Gann, M. Levine, R. Losik; „Molecular Biology of the Gene“, Pearson Education Inc., San Francisco 5. Auflage (2004)
- [Weber 1992] G. Weber, K.O. Greulich; „Manipulation of Cells, Organelles and Genomes by Laser Microbeam and Optical Trap“, *Intern. Rev. Cytol.* **133** (1992), 1-41
- [Weber 1997] J.L. Weber, E. W. Myers; „Human Whole-Genome Shotgun Sequencing“, *Genome Res.* **7** (1997), 401-409.
- [Weissman 1976] M. Weissman, H. Schindler, G. Feher, „Determination of Molecular Weights by Fluctuation Spectroscopy: Application to DNA“, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73** (1976), 2776-2780
- [Werner 2003] J.H. Werner, H. Cai, J.H. Jett, L. Reha-Krantz, R.A. Keller, P.M. Goodwin; „Progress towards single-molecule DNA sequencing: a one color demonstration“, *J. Biotech.* **102** (2003), 1-14
- [West 1967] W. West, S. Pearce, F. Grum; „Streisomerism in Cyanine Dyes—meso-substituted thia carbocyanines“, *J. Phys. Chem.* **71** (1967), 1316-1326
- [Wiener 1949] N. Wiener; „Extrapolation Interpolation and Smoothing of Stationary Time Series“, MIT Press, Cambridge (1949)
- [Widengren 1994] J. Widengren, R. Rigler, Ü. Mets; „Triplet-State Monitoring by Fluorescence Correlation Spectroscopy“, *J. Fluoresc.* **4** (1994), 255-258
- [Widengren 1995] J. Widengren, R. Rigler, Ü. Mets; „Fluorescence Correlation Spectroscopy of Triplet States in Solution: A theoretical and Experimental Study“, *J. Phys. Chem.* **99** (1995), 13368-13379
- [Widengren 1996] J. Widengren, R. Rigler; „Mechanisms of photobleaching investigated by fluorescence correlation spectroscopy.“, *Bioimaging* **4** (1996), 149-157
- [Widengren 2000] J. Widengren, P. Schülle; „Characterization of Photoinduced Isomerization and Back-Isomerization of the Cyanine Dye Cy5 by Fluorescence Correlation Spectroscopy“, *J. Phys. Chem. A* **104** (2000), 6416-6428

- [Wilkerson 1993] C.W. Wilkerson, P.M. Goodwin, W.P. Ambrose, J.C. Martin, R.A. Keller; „Detection and Lifetime Measurement of Single Molecules in Flowing Sample Streams by Laser-Induced Fluorescence“, *Appl. Phys. Lett.* **62** (1993), 2030-2032
- [Witt 1876] O. N. Witt; „Zur Kenntnis des Baues und der Bildung färbender Kohlenstoffverbindungen“, *Ber. Dt. Chem. Ges.* **9** (1876), 522-527
- [Wohland 2001] T. Wohland, R. Rigler, H. Vogel; „The Standard Deviation in Fluorescence Correlation Spectroscopy“, *Biophys. J.* **80** (2001), 2987-2999
- [Xie 1994] S. Xie, R.C. Dun, „Probing single molecule dynamics“, *Science* **265** (1994), 361–364
- [Yanisch-Perron 1985] C. Yanisch-Perron, J. Vieira, J. Messing; "Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors", *Gene* **33** (1985),103-119
- [Yokota 1999] H. Yokota, J. Sunwoo, M. Sarikaya, G. v.d. Engh, R. Aebersold; „Spin Stretching of DNA and Protein Molecules for Detection by Fluorescence and Atomic Force Microscopy“, *Anal. Chem.* **71** (1999), 4418-4422
- [Zachmann 1984] H.G. Zachmann; „Mathematik für Chemiker“, VCH, Weinheim 4. Auflage (1984)
- [Zander 1996] C. Zander, M. Sauer, K.H. Drexhage, D.S. Ko, A. Schulz, J. Wolfrum, L. Brand, C. Eggeling , C.A.M. Seidel; „Identification of Single Molecules in Aqueous Solution“, *Appl. Physics B* **63** (1996), 517-523
- [Zander 1998] C. Zander, K.H. Drexhage, K.T. Han, J. Wolfrum, M. Sauer; „Single-molecule counting and identification in a microcapillary“, *Chem. Phys. Lett.* **286** (1998), 457-465
- [Zeisel 1996] D. Zeisel, S. Nettesheim, B. Dutoit, R. Zenobi, „Pulsed laser-induced desorption and optical imaging on a nanometer scale with scanning near field microscopy using chemically etched fiber tips“, *Appl. Phys. Lett.* **68** (1996), 2491-2492

7. Liste der Veröffentlichungen und Präsentationen

F. Göbel, C. Zander, R. Müller, K.H. Drexhage, J. Wolfrum, M. Sauer; „Single Molecule Detection of Differently Labeled Mononucleotides with Pulsed Diode Lasers: How Many Labels Can be Identified due to their Characteristic Fluorescence Lifetime?“, Poster auf dem 3. International Workshop on „Single Molecule Detection: Basics and Applications in Life Sciences“ Berlin-Adlershof (24.9.1997-27.9.1997)

M. Sauer, J. Arden-Jacob, K.H. Drexhage, F. Göbel, U. Lieberwirth, K. Mühlegger, R. Müller, J. Wolfrum, C. Zander; „Time-Resolved Identification of Individual Mononucleotide Molecules in Aqueous Solution with Pulsed Semiconductor Lasers“, *Bioimaging* **6** (1998), 14–24

M. Sauer, B. Angerer, W. Ankenbauer, Z. Földes-Papp, F. Göbel, K.-T. Han, R. Rigler, A. Schulz, J. Wolfrum, C. Zander; „Single molecule DNA sequencing in submicrometer channels: state of the art and future prospects“, *J Biotech* **86** (2001), 181-201

Danksagung

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

Prof. Dr. Jürgen Wolfrum und Prof. Dr. Markus Sauer für die interessante Themenstellung, und die Begutachtung der Arbeit

Den Mitarbeitern des Arbeitskreises Wolfrum für ihre freundliche Zusammenarbeit,

Dr. Simone Reinhard, Virág Magyar, Dr. Chong-Woo Park für das Korrekturlesen der Arbeit

Prof. Dr. Jörg Langowski für stilistische, linguistische und formatierungstechnische Hinweise,

Dr. Friedrich Reinhard für Hilfe bei biologischen Fragestellungen

Dr. Michael Neumann für Hilfe bei Beschichtungsversuchen von Kapillaren

Dr. Chong-Woo Park, Dr. Christian Müller, Dr. Volker Buschmann, Dr. Thomas Hübner, Dr. Thomas Heinlein, Pia Schlüter, Oliver Priestert, Dr. Michael Neumann für hilfreiche Diskussionen

Dr. Andreas Schulz, Dr. Johann v. Saldern, Dr. Chong-Woo Park, Christian Roth für die Unterstützung bei Netzwerk- und Computerproblemen,

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

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

Herrn Hans Wolfbeisz für die Unterstützung bei glastechnischen Problemen

Dr. Ulrike Lieberwirth, Dr. Hannes Neuweiler, Dr. Mathias Brunner für die Reinigung der Farbstoffe mit der HPLC und deren Kopplung an Nucleotide

Dr. B. Angerer, Dr. W. Ankenbauer, Dr. Z. Földes-Papp für die Synthese des Modelloligonucleotids

Dr. Kyung-Tae Han für die Synthese der PCR-Produkte

Prof. Dr. Reha-Krantz und ihrem Arbeitskreis für die Synthese der vollständig markierten DNS.

Prof. Dr. Jörg Enderlein für den mathematischen Lösungsansatz der FCS in Mikrokapillaren

Dr. Lapshin und Dr. Sekatskii für Hilfe mit dem Nahfeldmikroskop.

Schließlich danke ich meiner Familie. Meinen Eltern danke ich dafür, dass sie mich während des Studiums unterstützt haben.

Meiner Frau Virág Magyar danke ich für ihren liebevollen Rückhalt