

Inhalt

- ◆ Phänomen und Grundlagen
- ◆ Messaufbau, Empfindlichkeit
- ◆ Quantenausbeute
- ◆ fluoreszierende Stoffe
- ◆ Anwendungsbeispiele
- ◆ Übersicht zu Anwendungen

Lernziele

- ◆ Physikalische Grundlage verstehen
- ◆ Bezug zu UV/Vis und IR-Spektroskopie herstellen können
- ◆ Praktische Umsetzung kennen
- ◆ Welche Stoffe fluoreszieren?
- ◆ Anwendungsmöglichkeiten kennen
- ◆ Vor- und Nachteile kennen
- ◆ Lumineszenz und Phosphoreszenz abgrenzen

*Des Herzens Traumwelt aus der Dichtung winkt;
Sie steigt empor im lichtverklärten Bilde.
Des Lebens raue Wirklichkeit versinkt -
Romantik, deine blaue Blume blinkt
Noch klar in dieses Dichters Wappenschilde.*

*aus „Lyrik“ von Friedrich Emil Rittershaus (1834 -1897)
Kaufmann und Dichter aus Westfalen*

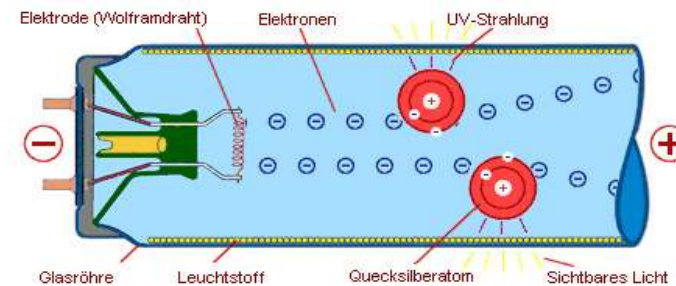
Phänomen der Fluoreszenz und Literatur

- Name: erste Beobachtungen an Flussspat (CaF_2), erstmals 1852 von George Gabriel Stokes beschrieben
- Bei Bestrahlung mit UV leuchten verschiedene Stoffe farbig (Fluor als Anteil nicht notwendig).
- Mineralien als auch Naturstoffe



purity.
Ochers are
quartz sand, c
ranging from

Quelle: www.itp.uni-hannover.de/

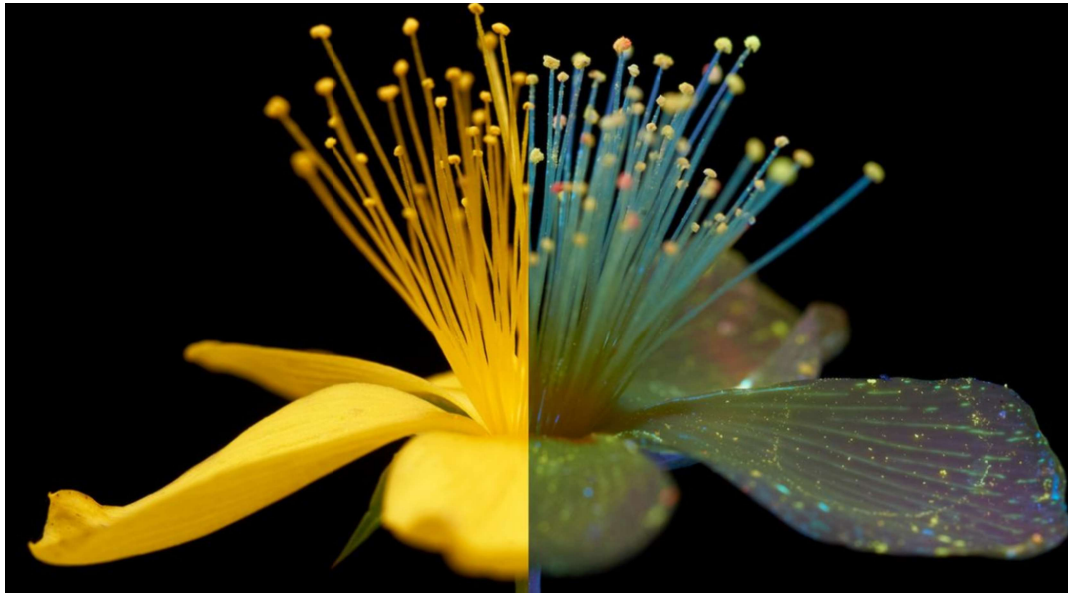


Quelle: www.osram.de/

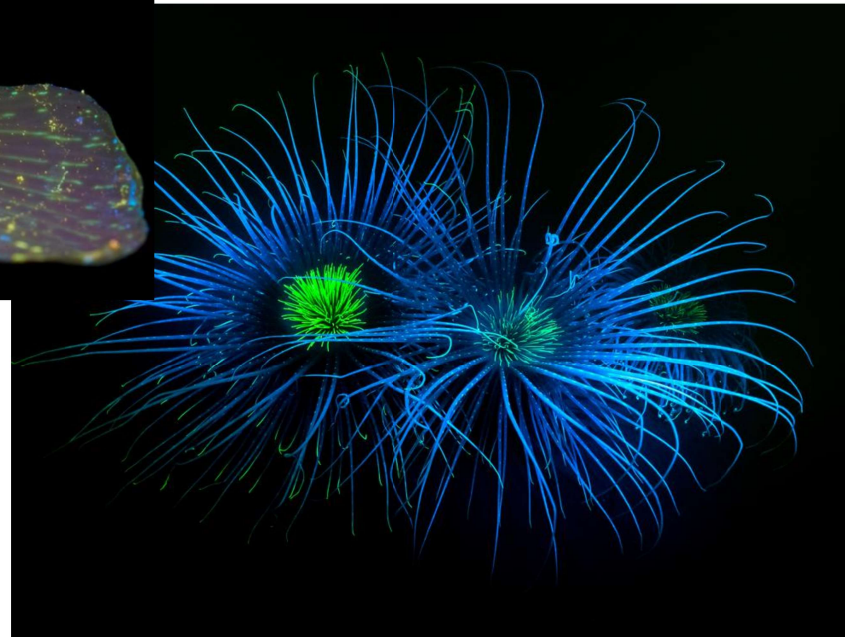
- Literatur
Grundlagen: Lehrbücher der Phys. Chemie (Wedler, Atkins)
- Anwendung in der Bioanalytik
 - Lottspeich/Zorbas, „Bioanalytik“, 2. Auflage 2006, Kap. 3.2.2 und 7.5
 - Winter/Noll, „Methoden der biophysikalischen Chemie“, Teubner 1998, Kap. 5

Introduction (5 min): <https://www.youtube.com/watch?v=blv1KxYLhc0&list=RDQMwsafIA5UZhA&index=6>

Tiere sehen z.B. anders (aus)



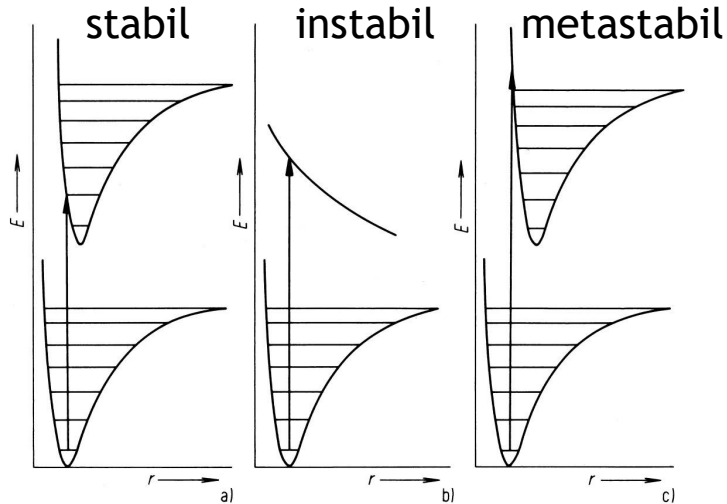
Ansichten einer Akelei, Mensch und Biene
Fluoreszenz fotografie, Craig P. Burrows,
"Die Verführung der Biene" Knesebeck Verlag 2024
Quelle: <https://www.geo.de/natur/>



Feuerwerksanemone
(*Pachycerianthus multiplicatus*), Schottland
Fluoreszenz fotografie, Dan Bolts
<https://www.tagesspiegel.de/wissen/>

Elektronische Übergänge + Schwingungen

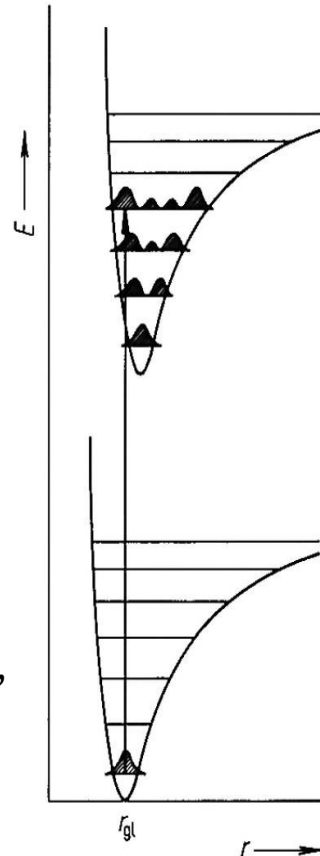
≡ Franck-Condon-Prinzip



© 2006 Wiley-VCH, Weinheim
Wedler / Lehrbuch der Physikalischen Chemie
ISBN: 3-527-31066-5 Abb-03-04-11

Erläuterung

- stabil: elektron. Zustand und Schwingungszust. wechseln
- instabil: UV-Licht setzt Elektronen frei, in Folge brechen Bindungen
- metastabil: elektron. Zustand wechselt, Schwingungszust. so hoch angeregt, dass Bindung bricht



© 2006 Wiley-VCH, Weinheim
Wedler / Lehrbuch der Physikalischen Chemie
ISBN: 3-527-31066-5 Abb-03-04-13

Quantenmech. Grundlagen (gelten so auch für UV-Vis)

Die Änderung des Elektronenzustandes erfolgt viel schneller als die Änderung der Kernabstände (bei Schwingungen).

Auch quantenmech. Schwingungszustände können durch Wellenfkt. abgebildet werden, deren Quadrat Wahrscheinlichkeiten entspricht.

Ein Übergang ist wahrscheinlicher, wenn das Elektron in einen Zustand mit hoher Aufenthaltswahrscheinlichkeit (ψ^2) wechselt.

Wer noch tiefer in die (Quanten-) Physik eintauchen möchte:
Haken/Wolf „Molekülphysik und Quantenchemie“, Springer 2006

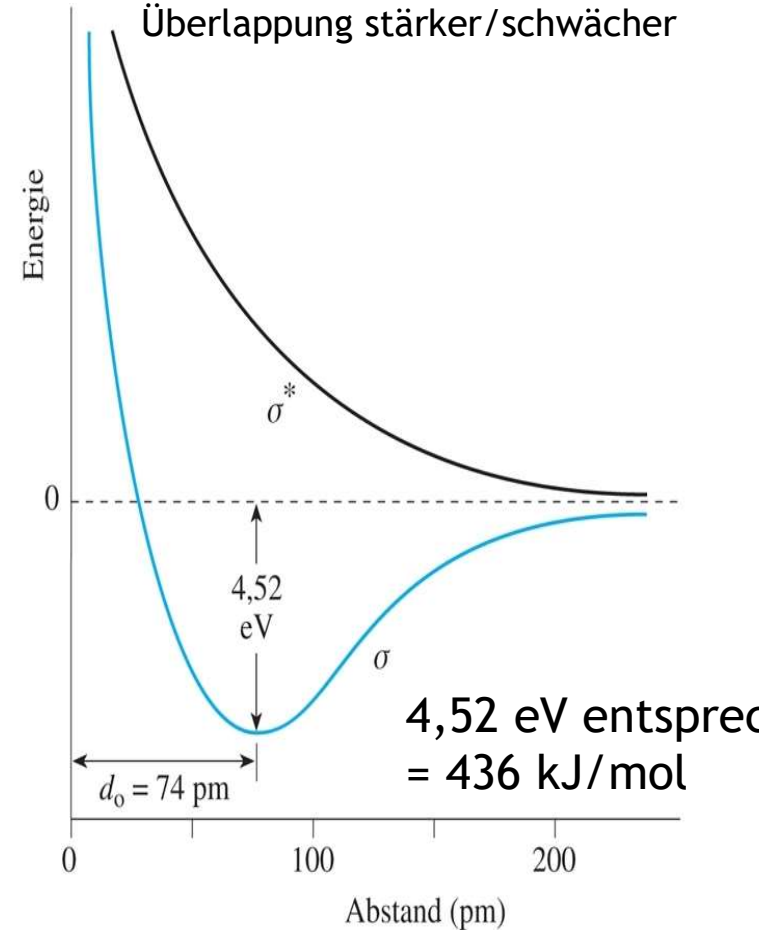
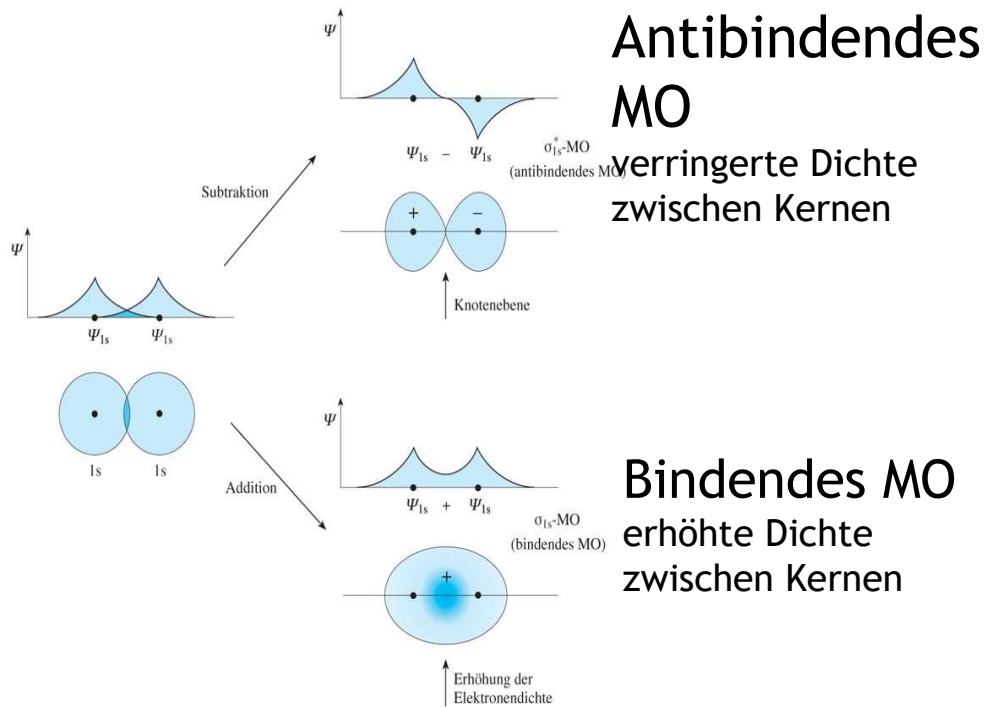
Erinnerung: Molekülorbitale (Bsp. H₂)

Kombination von Wellenfkt.; Aufenthaltswahrsch.dichten

Wellenfkt.
Lösungen der
Schrödinger-Dgl.

Orbitale
Quadrierte Wellenfkt.
(= Aufenthaltswahrsch.dichte)

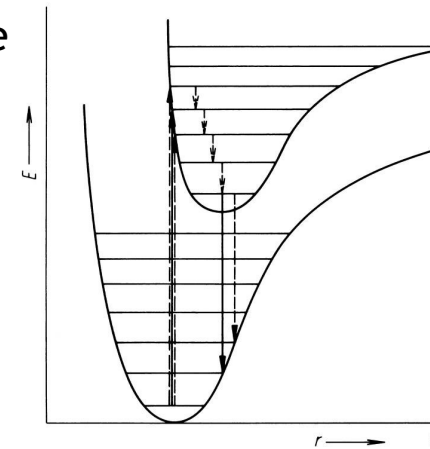
Energie(Abstand)
Je nach Abstand ist
Überlappung stärker/schwächer



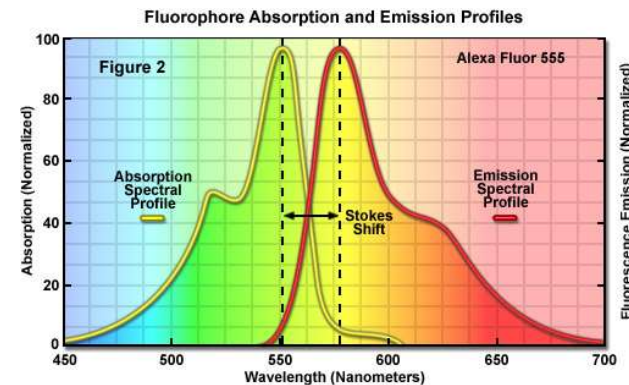
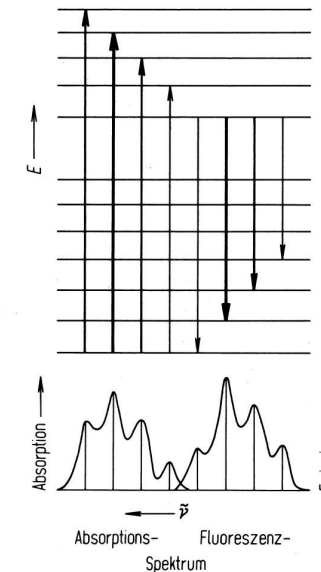
Aus "Allgemeine und Anorganische Chemie" (Binnewies, Jäckel, Willner, Rayner-Canham), erschienen bei Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg; © 2004 Elsevier GmbH München. Abbildung05-35.jpg

Grundlage der Fluoreszenz

- Elektronisch angeregte Stoffe relaxieren vorwiegend durch Wärmeabgabe, aber auch unter Abgabe eines Photons.
- Fluoreszenz ist die Emission von Strahlung (oft Licht), zu gleicher Zeit während Stoffe durch Absorption von höherenergetischer Strahlung angeregt werden (zeitlich verzögert wäre es Phosphoreszenz).
- Vor Abstrahlung ist ein Teil der Energie aus der Absorption verloren gegangen (daher höhere Wellenlänge).
- Nach strahlungslosen Übergängen aus angeregtem Zustand erfolgt die Emission mit geringerer Energie.
- Die Lebensdauer des angeregten Zustandes liegt für sichtbares Licht im Bereich von ns (10^{-9} s), strahlungslose Übergänge erfolgen sehr viel schneller (10^{-15} s).
- **Achtung: Skalierung ist irreführend:**
 - ΔE_{el} (200-800 nm) = 150-600 kJ/mol
 - ΔE_{vib} (2,5-25 μ m) = 1,3-13 kJ/mol
 - **also etwa Faktor 10-100**
($\Delta E \approx \text{kJ/mol} * 1,2 \cdot 10^{-4} \text{ m} / \lambda$)



© 2006 Wiley-VCH, Weinheim
Wedler / Lehrbuch der Physikalischen Chemie
ISBN: 3-527-31066-5 Abb-03-04-14

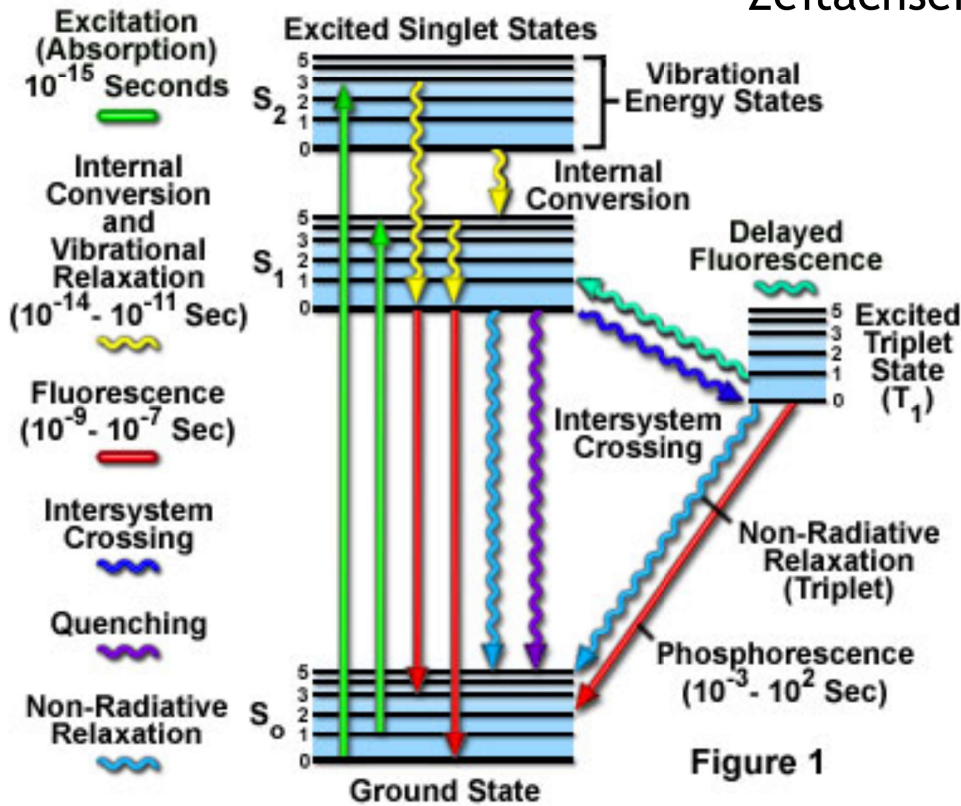


Tutorial (8 min): <https://www.youtube.com/watch?v=SGFIr1jFNBM>

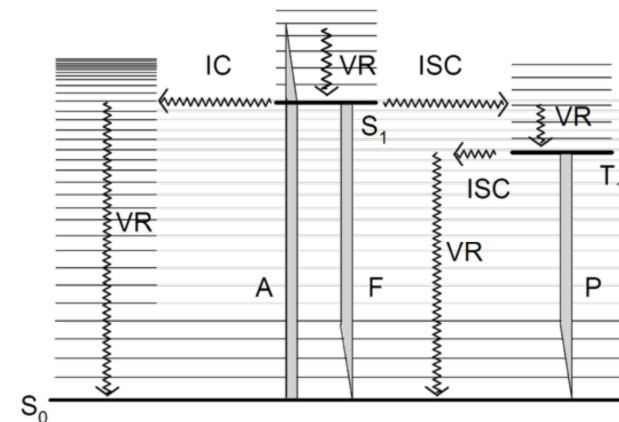
Energetische Vorgänge bei Fluoreszenz + Phosphoreszenz (sowie Laser) mit Zeitfenstern

Jablonski Energy Diagram

Zeitachsen:



Transition	Process	Rate Constant	Timescale (Seconds)
$S(0) \Rightarrow S(1)$ or $S(n)$	Absorption (Excitation)	Instantaneous	10^{-15}
$S(n) \Rightarrow S(1)$	Internal Conversion	$k(ic)$	10^{-14} to 10^{-10}
$S(1) \Rightarrow S(1)$	Vibrational Relaxation	$k(vr)$	10^{-12} to 10^{-10}
$S(1) \Rightarrow S(0)$	Fluorescence	$k(f)$ or Γ	10^{-9} to 10^{-7}
$S(1) \Rightarrow T(1)$	Intersystem Crossing	$k(pT)$	10^{-10} to 10^{-8}
$S(1) \Rightarrow S(0)$	Non-Radiative Relaxation Quenching	$k(nr), k(q)$	10^{-7} to 10^{-5}
$T(1) \Rightarrow S(0)$	Phosphorescence	$k(p)$	10^{-3} to 100
$T(1) \Rightarrow S(0)$	Non-Radiative Relaxation Quenching	$k(nr), k(qT)$	10^{-3} to 100



- A Absorption
- F Fluoreszenz
- P Phosphoreszenz
- VR vibronische Relaxation
- IC Internal Conversion
- ISC Intersystem Crossing

Quelle: <http://www.olympusfluoview.com/theory/fluoroexciteemit.html>

Lecture (23 min): <https://www.youtube.com/watch?v=5KLBrauilg>

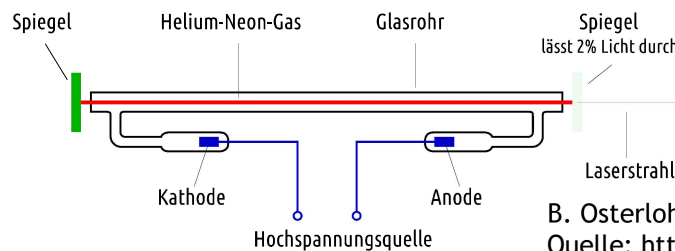
Chembrainiac - Eigenes Werk, CC BY-SA 4.0,
Quelle: <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=38271270>

Einschub: Laser

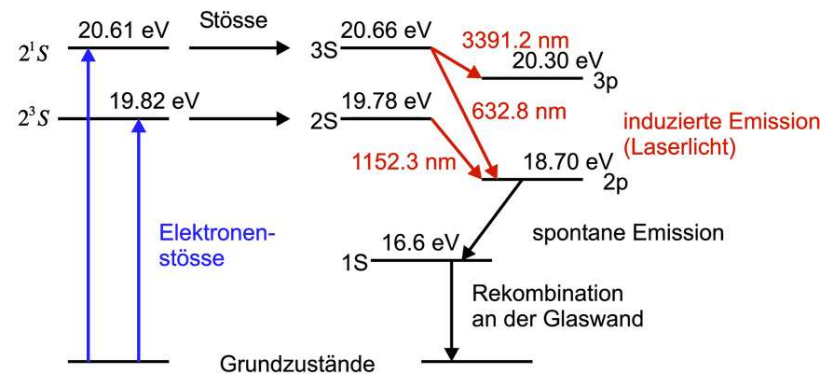
- „Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation“
- Prinzip ähnlich wie Fluoreszenz
 - Substanz wird elektronisch angeregt („gepumpt“)
 - Übergang in Triplett-Zustand und zeitverzögerte (**Phosphoreszenz**), stimulierte Emission, wenn Photon auf angeregtes Molekül trifft \Rightarrow Lichtverstärkung (Bedingung: hoher Überschuss im Triplett-Zustand)
- Laser emittieren Licht genau einer Wellenlänge (ein bestimmter Relaxationsübergang)
- Laser haben hohe Lichtintensität
- Anwendungen
 - statt Lichtquelle + Monochromator (s. FT-IR)
 - Schneiden, Verdampfen (vgl. MALDI-MS)
- Übliche Materialien:
 - Fluide: Edelgase (wie He/Ne), Farbstofflösungen
 - Kristalle: (Rubin, Nd:YAG, Halbleiter wie GaAs)



Quelle: <http://litz-rostock.de/was-ist-ein-laser/>



B. Osterloh
Quelle: <https://www.leifiphysik.de/atomphysik/laser/>



O. Marthi (Univ. Ulm)
Quelle: <http://wwwex.physik.uni-ulm.de/lehre/ap-2015/>

Begriffe zusammengefasst und Methoden dazu

Definitionen

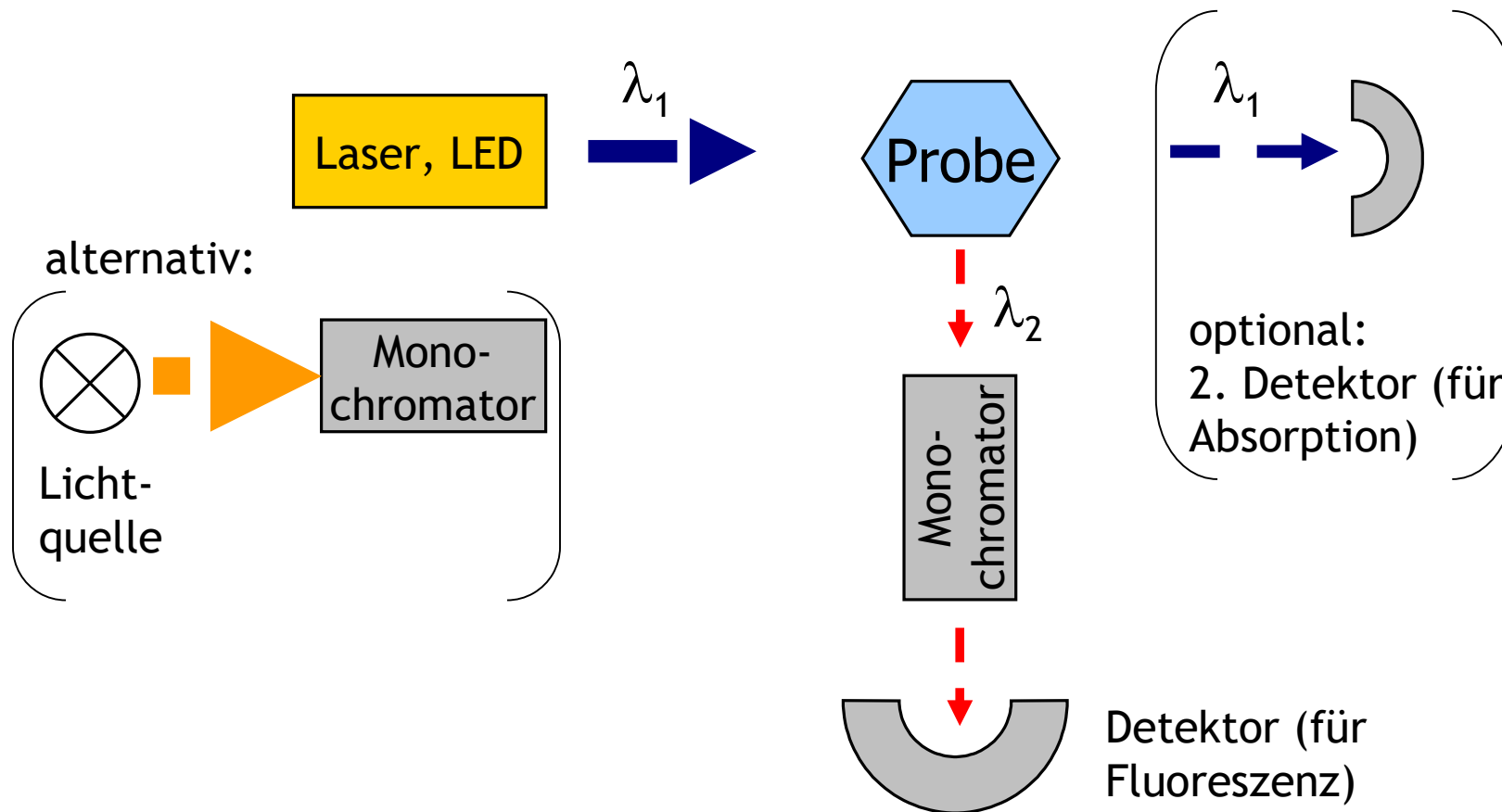
<https://goldbook.iupac.org/terms/view/L03641>

- Lumineszenz
- Photolumineszenz
im Gegensatz zu
Chemi-; Bio- (sowie einnige
andere)Lumineszenzarten
- Fluoreszenz
- Fluorophor
- Phosphoreszenz
- LASER

Praktische Methoden in der Biotechnologie

- Fluoreszenzdetektion
- (Fluoreszenzspektroskopie)
- Fluoreszenzmikroskopie
- Laser als Strahlungsquellen
- MALDI
- (Laserspektroskopie)
- (laserbasierte Mikroskopie)
- viele andere in Entwicklung

Messaufbau bei der Fluoreszenz



ELISA und Plate Reader

“Arbeitspferde“ für Immunoassays im Labor

1941—Albert H. Coons and his colleagues are the first to label antibodies with a fluorescent dye, and use it to identify antigens in tissue sections. This method is known today as **immunofluorescence**.¹

1971—Eva Engvall and Peter Perlman (independently) invent a method that revolutionized medicine called the **ELISA test**. The method uses antibodies to seek out the presence of hormones or viruses.^{3,4}

1960—**Radioimmunoassay** described in a scientific paper by Rosalyn Sussman and Solomon Berson. However, due to radioactivity posing potential health issues, researchers were in need of a safer alternative.²

1976—**Competitive ELISA method**, in which a conjugated substrate competes with a protein of interest, developed and used to detect human choriongonadotropin hormone.⁵

1977—**Sandwich ELISA method**, in which the detection antibody is coated onto the plate surface before the protein of interest is added, is developed and tested on several substrates for proof-of-concept.⁶

1978—**Indirect ELISA**, in which a secondary antibody is added for detection purposes, developed and used to detect human serum albumin.⁷

1985—The ELISA test is the first screening test commonly employed for HIV. It was approved for use on March 2, 1985.⁹

TODAY—ELISA is used to test for antibodies of **SARS-CoV-2 (COVID-19)** in response to a global pandemic causing the complete shutdown of multiple countries.

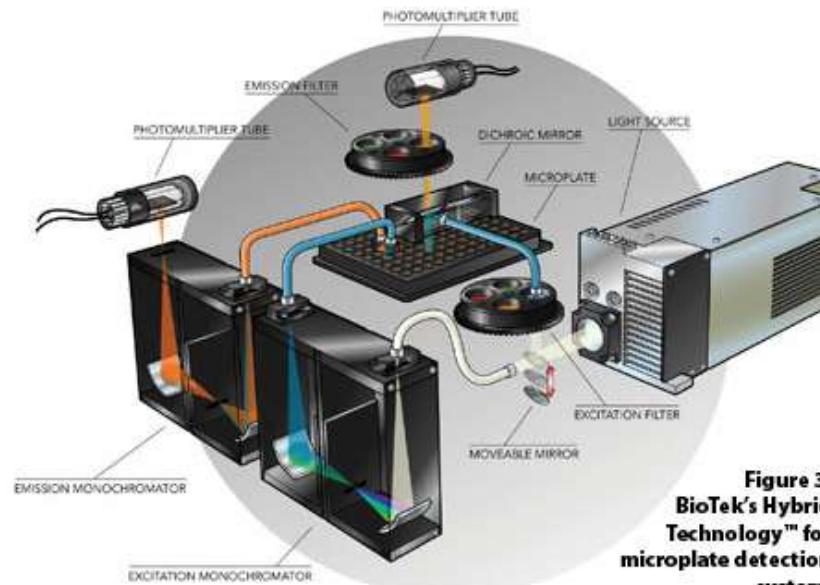
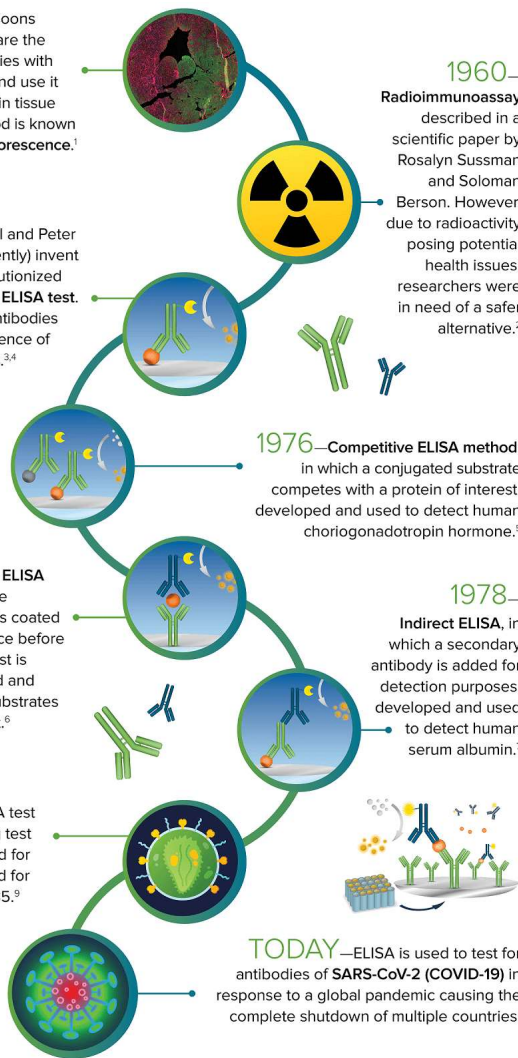


Figure 3.
BioTek's Hybrid
Technology™ for
microplate detection
systems

Aufbau einer Detektionseinheit für Microwell-Platten,
hier sowohl mit Monochromatoren als auch Filtern
Quelle: Henshall and Held (2008) [www.genengnews.com/magazine/84/
assay-hybrid-bridges-the-microplate-reader-gap/](http://www.genengnews.com/magazine/84/assay-hybrid-bridges-the-microplate-reader-gap/) (Apr-2021)

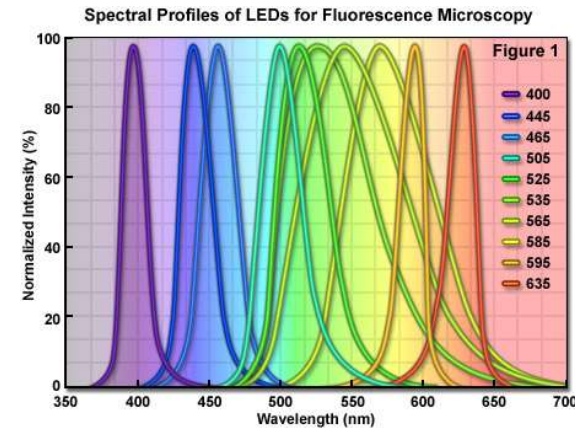


Nutzung eines typischen
Plate Readers
Quelle: www.promega.de/products
(Mai-2021)

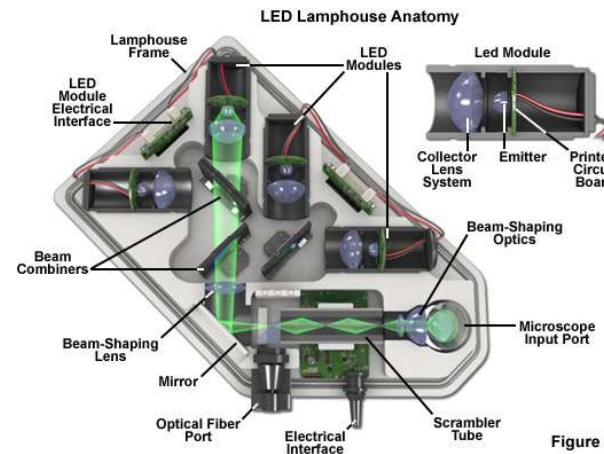
Entwicklung von Immunoassays
Quelle: C. Olsen; de.moleculardevices.com/lab-notes/ (Mai-2021)

Einschub: LED

- „Light-Emitting Diode“
- Dioden sind Bauelemente der Halbleitertechnik
 - Es gibt eine isolierende Sperrschicht
 - Isolierung kann durch Energie aufgehoben werden
 - Prinzip kann zur Detektion genutzt werden
 - Umkehrung führt zu Lichtaussendung bei Stromfluss
- LED emittieren Licht einer schmalen Bande (ein verbreiteter Dandübergang)
- LED haben hohe Lichtausbeute und Lebensdauer
- Anwendungen
 - statt Lichtquelle + Monochromator
 - einfache LED als Hinweisleuchten
- Übliche Materialien:
 - verschiedene Halbleitermaterialien sowohl positiv als auch negativ dotiert (z.B. GaN, SiC)
 - zunehmend neue Materialien

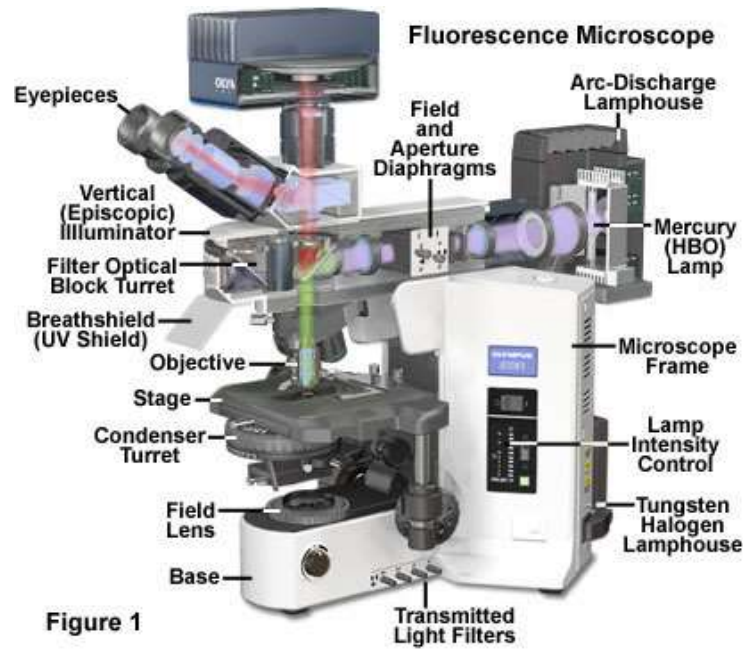


Überlagerte spektrale Profile mehrerer LED
Quelle: zeiss-campus.magnet.fsu.edu (Apr-2021)

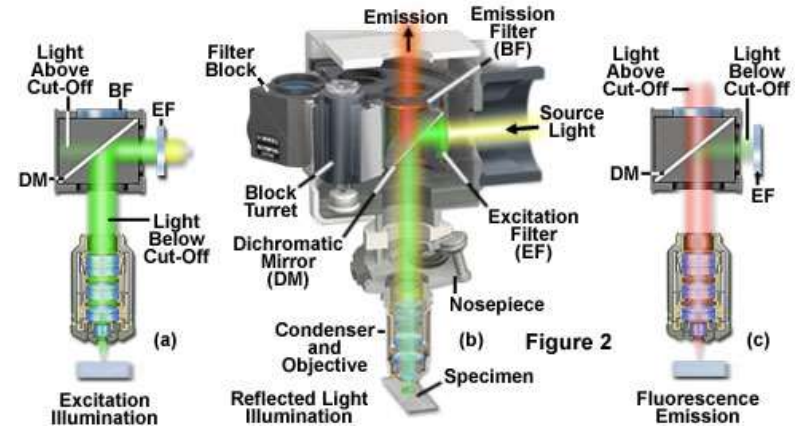


Aufbau einer Mikroskop-Beleuchtung mit LED
Quelle: zeiss-campus.magnet.fsu.edu (Apr-2021)

Fluoreszenzmikroskopie

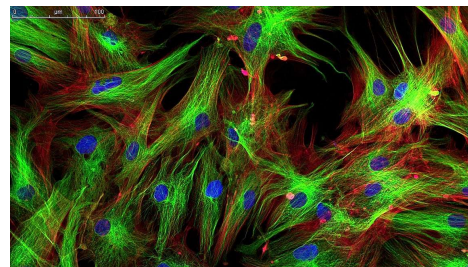


Dichromatic Mirror Function in Reflected Light Fluorescence Illumination

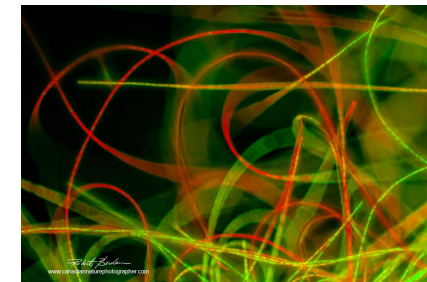


Aufbau und Funktion eines Fluoreszenzmikroskops
Quelle: www.olympus-lifescience.com (Mai-2021)

- Fluoreszenz in der Mikroskopie
 - selektiert wichtige Teile
 - erhöht den Kontrast
 - erhöht die Empfindlichkeit
- Lampe, Laser oder Dioden regen an
 - ggf. mit Monochromatoren
 - „normale“ Lichtdetektion über Auge/Kamera
 - mehrere Anregungen parallel



Hautzellen (Fibroblasten),
mehrfach gefärbt
Quelle: www.physikinstrumente.com
(Mai-2021)



Filamentöse Cyanobakterien,
Acridin orange, 200fach
Quelle: www.canadiannaturephotographer.com
(Mai-2021)

Fluoreszenzquantenausbeute und natürliche Fluorophore

Relaxationsgeschwindigkeit (Folge + Parallelreaktionen):

$$dN^*(t)/dt = N_{Ab} - (k_F + k_{sonst}) \cdot N^*(t)$$

N^* : Anzahl angeregter Moleküle; t : Zeit

N_{Ab} : Anzahl absorbierten Photonen

k_F : Geschwindigkeitskonstante der Fluoreszenzrelaxation

k_{sonst} : Konstante sonstiger, strahlungsloser Prozesse

$(k_F + k_{sonst}) \cdot N^*(t)$: Verlust durch relaxierende Moleküle



Im quasistationären Gleichgewicht (während Beleuchtung)

$$dN^*(t)/dt = 0; \quad N^* = \text{const} = N_{Ab} / (k_F + k_{sonst})$$

Fluoreszenzquantenausbeute Q_F , Anteil in Parallelreaktionen

$$Q_F = N_F / N_{Ab} = k_F \cdot N^* / N_{Ab} = k_F / (k_F + k_{sonst})$$

- Kann von null bis nahe 1 reichen, oft deutlich niedriger (je nach Substanz und Bedingungen)

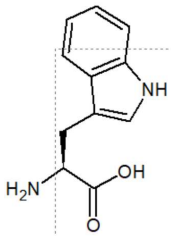
- Steigt meist mit fallender Temperatur

Natürliche Fluorophore

- Müssen UV absorbieren und passende Lebensdauern haben
- Nukleotide erst bei sehr tiefen Temperaturen (beispielsweise 80 K), keine physiologischen Messungen möglich
- Aromatische Aminosäuren; nur Tryptophan mit hohen Quantenausbeuten in Proteinen
- NADH, Nicotinamid-adenin-dinukleotid (Stoffwechsel)
- Cofaktoren einiger Proteine (Flavine, Chlorophyll)

Substanz (aq), pH7	Anregung in nm	Abs.-Koeff. $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	$\lambda_{F, \text{max}}$ in nm	Lebens d. in ns	Q_F
Adenin	260	13,4	321	< 0,02	0,00026
NADH	340	6,2	470	0,4	0,02
Tryptophan	280	5,6	348	2,6	0,2
Tryptop.-Rest	280				0,47

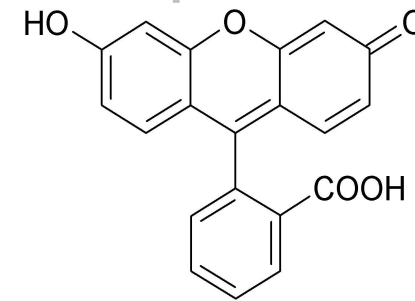
Datenquelle: Winter et al. Methoden der Biophys. Chemie Vieweg 2. Aufl. 2011



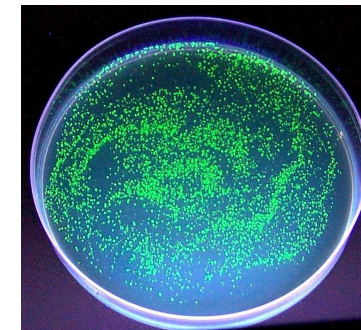
Fluoreszenz-Sonden (extrinsisch)

- Substanzen oder funktionellen Gruppen, die im UV- oder sichtbaren Bereich absorbieren und unter Abgabe von Licht fluoreszieren. Sie enthalten meist konjugierte (aromatische) π -Systeme in starren Strukturen.
- **Chemische Sonden**
kovalent oder anderweitig an die zu untersuchende Substanz gebunden (in Proteinen an S-H- und N-H-Gruppen, gute Übersicht in Winter/Noll)
- **Biochemische Sonde: GFP** (green fluorescent protein) u.ä. aus Qualle *Aequorea victoria*, 238 Aminosäuren, kann molekularbiologisch ko-exprimiert werden (s. auch Lottspeich/Zorbas) sowie farblich modifiziert (Nobelpreis 2008, s. spätere Folie)
- **Halbleiter-Sonden: Quantum dots**
Nanoskalige Halbleiter (CdSe, InGaAs u.ä.) fluoreszieren, je nach Größe mit unterschiedlichen Wellenlängen
- **Gekoppelte physikalische Sonde:**
Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) Übertrag zwischen zwei geeigneten Chromophoren, die nur ca. 1 bis 10 nm voneinander entfernt sind (z.B. für Strukturuntersuchungen).

Dies kann auch Ursache für ein Ausbleiben der Fluoreszenz sein, wenn Chromophor selbst nicht fluoresziert (Quenching)



Fluorescein-Molekül
Quelle: wikipedia



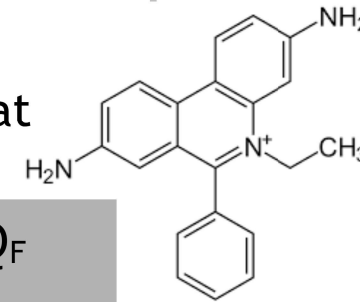
Quelle: HSWT



Quelle: <https://epicscience.net/fluorescence/>

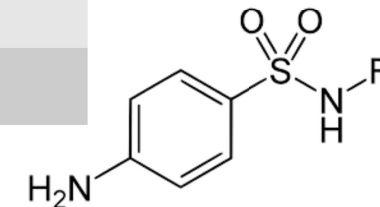
Extrinsische Fluorophore (chem. Sonden)

- ◆ Für Nucleinsäuren, DNA: z.B. Ethidiumbromid (EtBr)
- ◆ Bei Proteinen: z.B. Dansylchlorid, Fluoresceinisothiocyanat (FITC)



Substanz	Anregung in nm	Abs.-Koeff. in $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	$\lambda_{F, \text{max}}$ in nm	Lebensd. in ns	Q_F
EtBr	515	3,8	600	26,5	0,99
Dansylchlorid	330	3,4	510	13	0,1
FITC	495	42	516	0,2	0,3

Datenquelle: Winter/Noll Methoden der Biophys. Chemie Vieweg 2. Aufl. 2011



Probe	Abs. (nm)	Em. (nm)	MW	Q_F	Achtung!
Cy2	489	506	714	0.12	Viele sind giftig oder cancerogen
Cy3	(512);550	570;(615)	767	0.15	
Cy3B	558	572;(620)	658	0.67	
Cy5	(625);650	670	792	0.28	
Wild T.GFP	396; 475	508	26k	0.77	

Quelle: <http://pingu.salk.edu/flow/fluo.html>

s. auch:

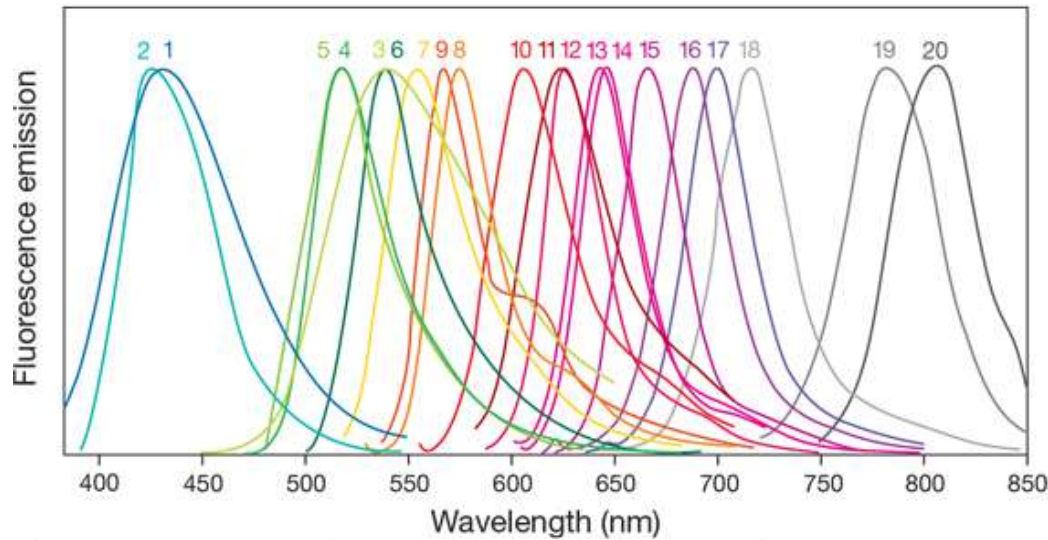
- Winter/Noll, „Methoden der Biophys. Chemie“

- Datenbank von Fluorophoren der TU Graz: <http://www.fluorophores.tugraz.at/>

- https://www.youtube.com/watch?v=CcssdJf0pKQ&list=RDQMwsafIA5UZhA&start_radio=1

Kommerzielle Fluoreszenz-Sonden

Weitere Beispiele



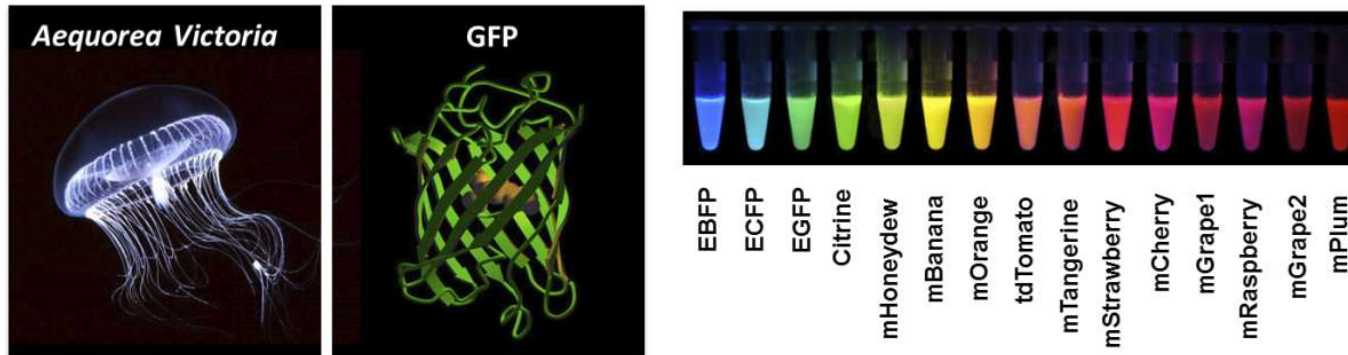
1. Alexa Fluor 350
2. Alexa Fluor 405
3. Alexa Fluor 430
4. Alexa Fluor 488
5. Alexa Fluor 500
6. Alexa Fluor 514
7. Alexa Fluor 532
8. Alexa Fluor 546
9. Alexa Fluor 555
10. Alexa Fluor 568
11. Alexa Fluor 594
12. Alexa Fluor 610
13. Alexa Fluor 633
14. Alexa Fluor 635
15. Alexa Fluor 647
16. Alexa Fluor 660
17. Alexa Fluor 680
18. Alexa Fluor 700
19. Alexa Fluor 750
20. Alexa Fluor 790

If you are using	Try this Alexa
AMCA, coumarin	Alexa Fluor 350
Cy2, FITC (fluorescein)	Alexa Fluor 488
Cy3, TRITC (rhodamine)	Alexa Fluor 555
Rhodamine red	Alexa Fluor 568
Texas Red	Alexa Fluor 594
Cy5	Alexa Fluor 647
Cy5.5, IR680	Alexa Fluor 680
Cy7	Alexa Fluor 750

Alexa Fluor dye	Absorption max. (nm)	Emission max (nm)	Emission color*	Extinction coefficient**
Alexa Fluor 350	346	442	Blue	19,000
Alexa Fluor 405	401	421	Blue	34,000
Alexa Fluor 430	433	541	Green/Yellow	16,000
Alexa Fluor 488	496	519	Green	71,000
Alexa Fluor 790	784	814	Near-IR***	270,000

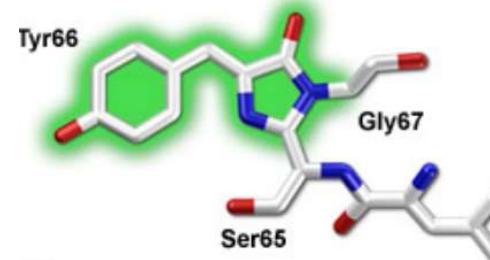
Quelle: <http://www.thermofisher.com/de/de/home/brands/molecular-probes/>
(formerly Invitrogen)

GREEN FLUORESCENT PROTEIN (GFP)



Quelle: <https://seonglab.wordpress.com/research/>
s. auch http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2008/illpres.html#lessons

- ◆ Quallen fluoreszieren, aus nicht vollständig geklärtem Grund
- ◆ Proteinsequenz seit 1970 bekannt, 238 AS-Reste, Teilsequenz 65-67 (Ser-Tyr-Gly), Ringbildung von Ser+Gly (s. Lottspeich, Engels „Bioanalytics“, p. 158; oder „Bioanalytik“)
- ◆ Universelle Einbindung über Ko-Expression
- ◆ Sehr hohe Quantenausbeuten
- ◆ Varianten (Nobelpreis 2008) in vielen Farben
- ◆ Allerdings relativ große Label

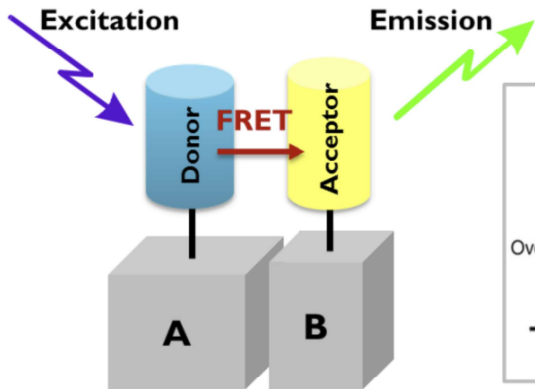


Chromophor in GFP
Quelle: <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/probes/fpinintroduction.html>

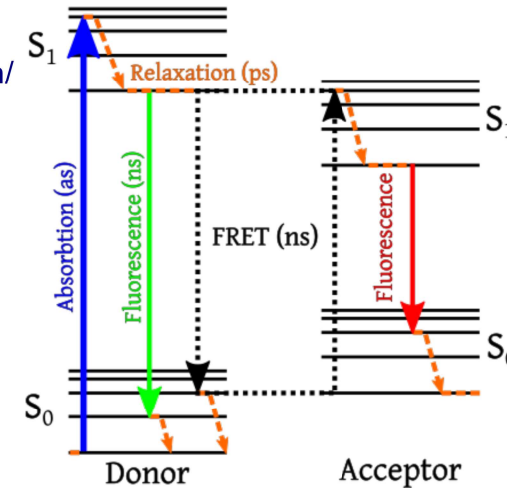
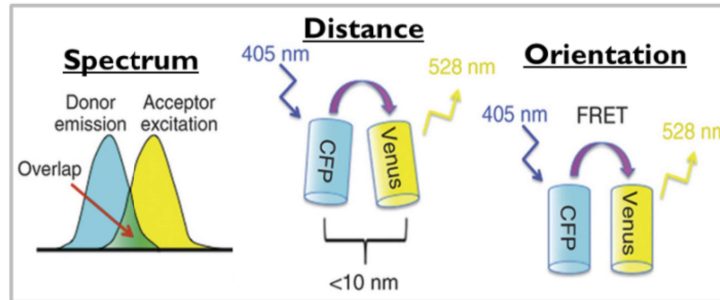
Gekoppelte Fluoreszenz-Sonden

Prinzip von FRET

FLUORESCENCE RESONANCE ENERGY TRANSFER (FRET)



Quelle: <https://seonglab.wordpress.com/research/>

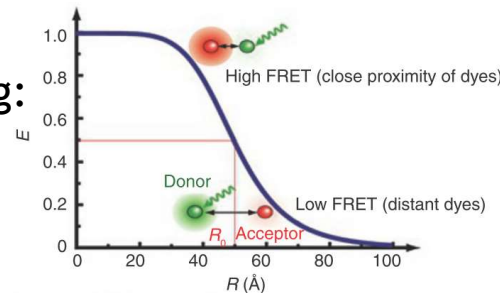


- Ein nah benachbartes Chromophor dient als zweite aktive Fluoreszenz-Sonde: "Förster-Resonanz-Energie-Transfer" (1948, engl. s. oben), wenn erste Emission mit zweiter Absorption überlappt (s. rechts)

- Effizienz ist abstandsabhängig:

$$\text{Eff} = \frac{1}{1 + (r/R_0)^6}$$

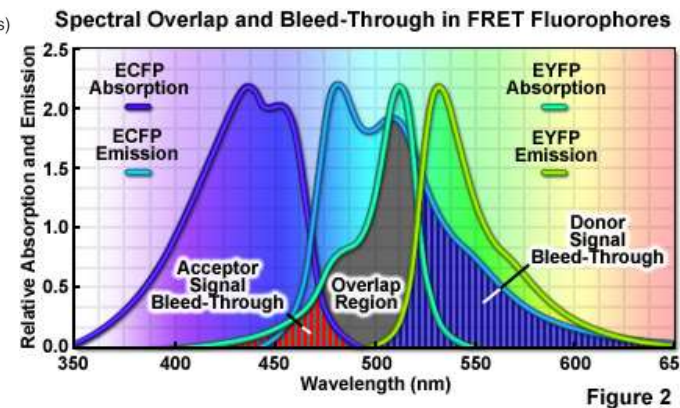
R_0 : Abstand, bei der Eff = 0,5



Quelle: Roy et al, Nature Methods (2008) DOI:10.1038/NMETH.1208

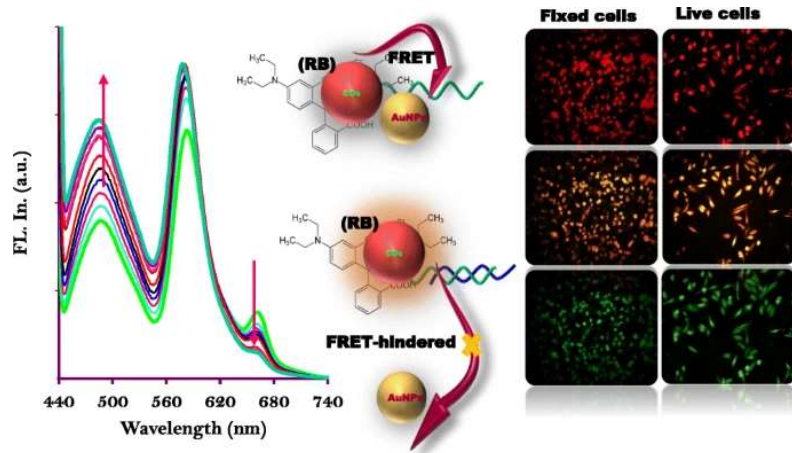
(sowie auch von der Orientierung, s. Lottspeich, Engels „Bioanalytics“, p. 160 + 402)

- Tutorial: <https://www.youtube.com/watch?v=qwMdtqgdap0> (2 min)
- Lecture: https://www.youtube.com/watch?v=JH2LIffu_7I (15 min)



Quelle: <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/print/spectralimaging/spectralfret-print.html>

Gekoppelte Fluoreszenz-Sonden, FRET über Quantum dots (QD)

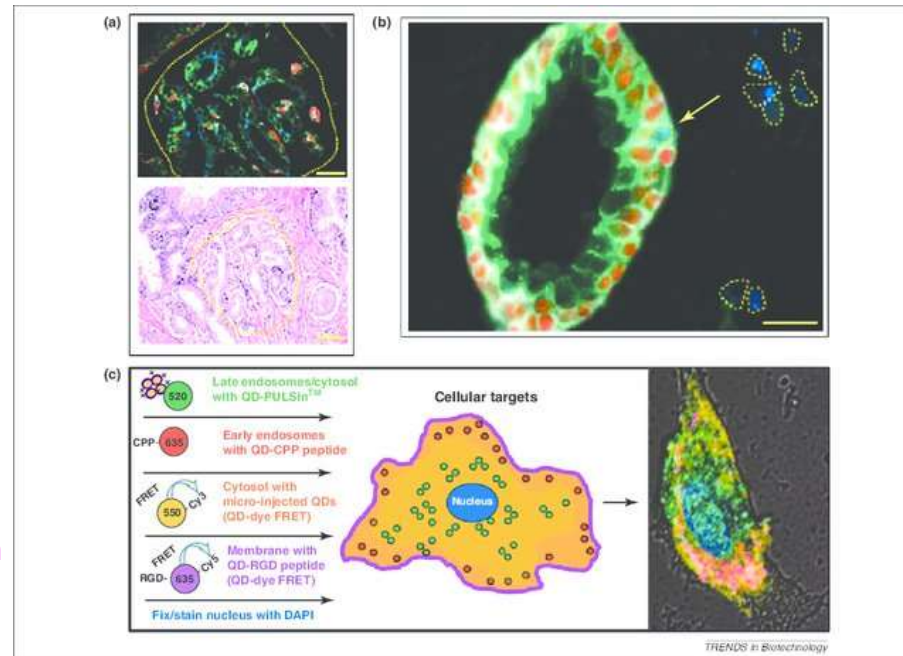


Interaktionsanalyse mit FRET und QD

- ◆ Rhodamine B ist erstes Chromophor und kann Gold-Nanopartikel als zweite aktive Fluoreszenz-Sonde durch FRET aktivieren.
- ◆ Bei der Anbindung einer microRNA wird der FRET-Effekt verhindert. Die Emission des ersten Fluorophors nimmt zu, die vom Nanogold sinkt.
- ◆ Quelle: Hamd-Ghadareh et al. (2019) *Microchimica Acta*; DOI: 10.1007/s00604-019-3446-1

Anwendungen von QD in Zellvisualisierungen

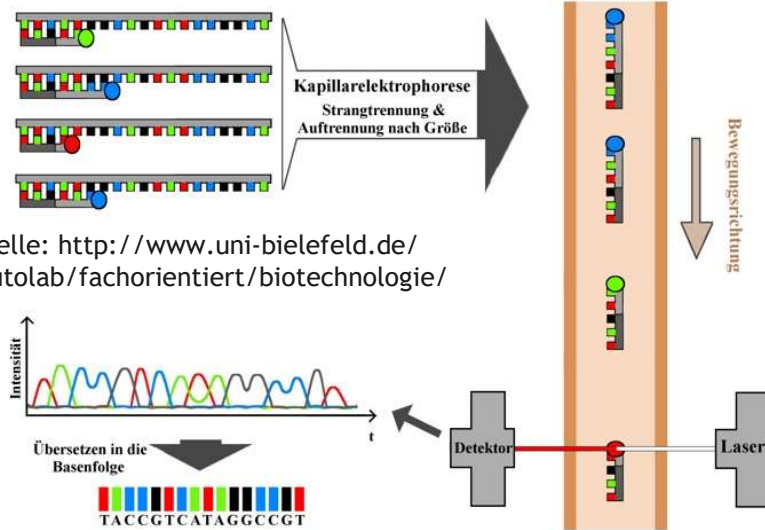
- ◆ a) Mehrfachvisualisierung mit QD gegenüber histologischer Färbung (H&E)
- ◆ b) Identifizierung einzelnen Tumorzellen in Prostata (s. Pfeil; blau angefärbt) und Umgebung
- ◆ c) Anfärbung unterschiedlicher Bereiche in einer Zelle und Mikroskopbild dazu
- ◆ Quelle: Jin and Hildebrandt (2012) *Trends in Biotechnology*, „Semiconductor Quantum Dots for in vitro Diagnostics and Cellular Imaging“



Vorzüge von Methoden mit Fluoreszenz

- ◆ **äußerst empfindlich**
Probe muss/kann stark verdünnt sein, sonst absorbieren gleichartige Moleküle, Lösungsmittel darf nicht absorbieren.
⇒ sehr **wenig Probenmaterial** benötigt
(bis hinab zu 10^{-8} mol/L mit empfindlichen Detektoren)
- ◆ **hohe Selektivität** durch Betrachtung spezifischer Gruppen, dadurch **geringer Trennaufwand**
- ◆ **praktisch störungsfreier Hintergrund**
(**hohes Signal-zu-Rausch-Verhältnis**)
- ◆ **Dynamische Messungen:** Lebensdauer der angeregten Zustände geringer als Zeiten für Diffusion, Rotation oder Konformationsänderungen von biologischen Makromolekülen.
- ◆ **Anwendungsvielfalt**
 - ELISA, Immunfluoreszenz für Immunhistochemie oder Immuncytochemie (mit markierten Antikörpern)
 - DNA- oder RNA-Markierung, z.B. Fluorezenz in situ Hybridisierung (FISH)
 - **Ständig neue biochemische Anwendungen**
(weitere auf Folgefolien)
- ◆ **Vergleichsweise einfache Instrumente** (mit moderner Lasertechnik)
- ◆ **Ideale Alternative zu radioaktiver Markierung:** („normales“ Labor)

Fluoreszenzdetektion in der DNA-Sequenzierung

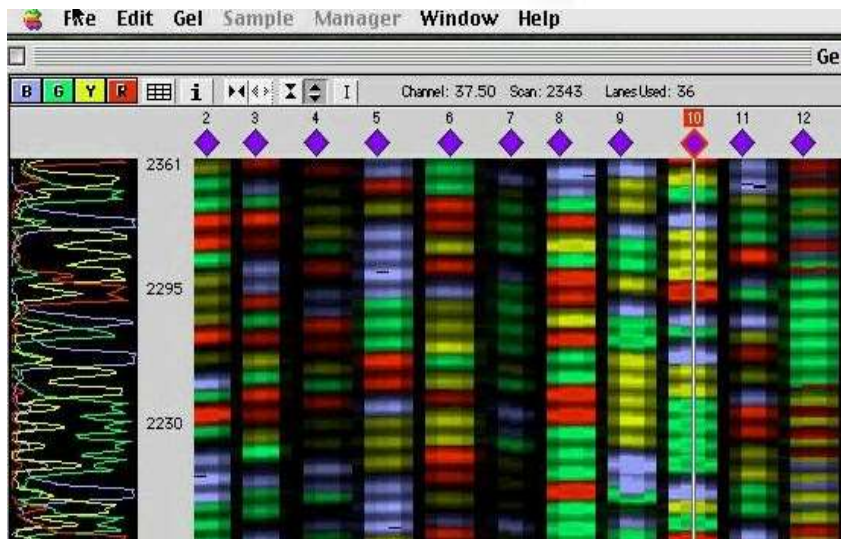


Quelle: <http://www.uni-bielefeld.de/teutolab/fachorientiert/biotechnologie/>

Fluoreszenzdetektion der chemisch markierten Nukleotide, simultan in 96 Kanälen
⇒ hoher Durchsatz
(nach Erfindung 1975 und Automatisierung 1987)

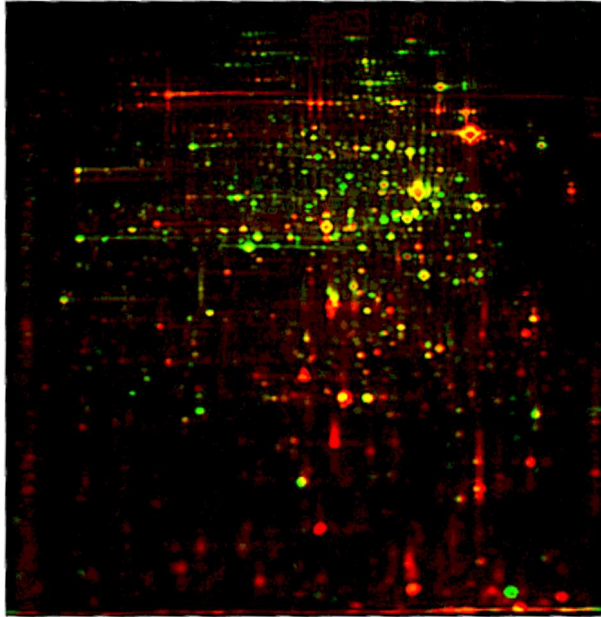
Farbstoffe sind an Abbruchnukleotide gekoppelt. Jedes Fragment hat nur ein einziges ddNTP und leuchtet nur in der Farbe der entsprechenden Base.

Diese Geräte erlaubten die schnelle Sequenzierung des humanen Genoms (Venter mit Celera und akademisches Konsortium im Jahr 2000)



Quellen: www.appliedbiosystems.com und www.research.vt.edu/resmag/resmag2001/dna_sequencing.html

Fluoreszenzmarkierung in der Proteomik u.a.



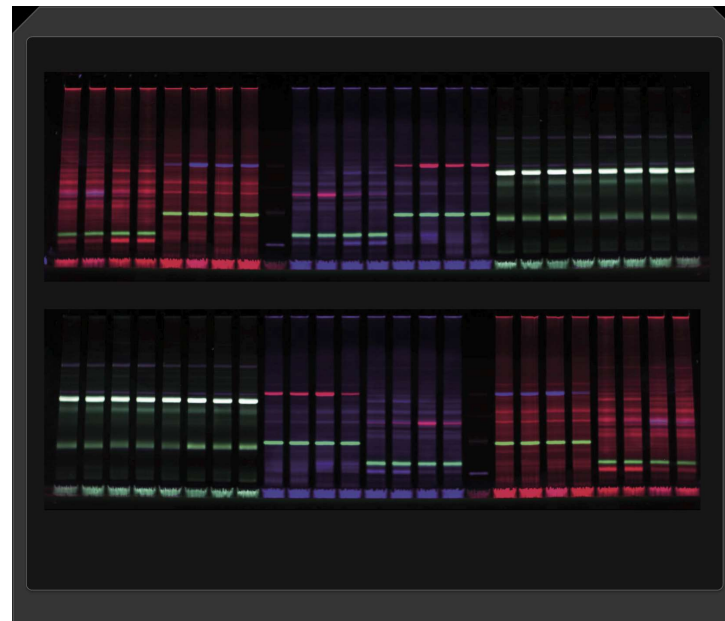
Fluoreszenzdetektion in der 2-D-Gelelektrophorese zur differentiellen Analytik.

2 Proben von *B.subtilis*, bei unterschiedlichen Bedingungen sind differentiell dargestellt (mit unterschiedlichen Fluorophoren markiert).

Quelle: Prof. Dr. Hecker, Universität Greifswald
<http://microbio1.biologie.uni-greifswald.de/project.htm>

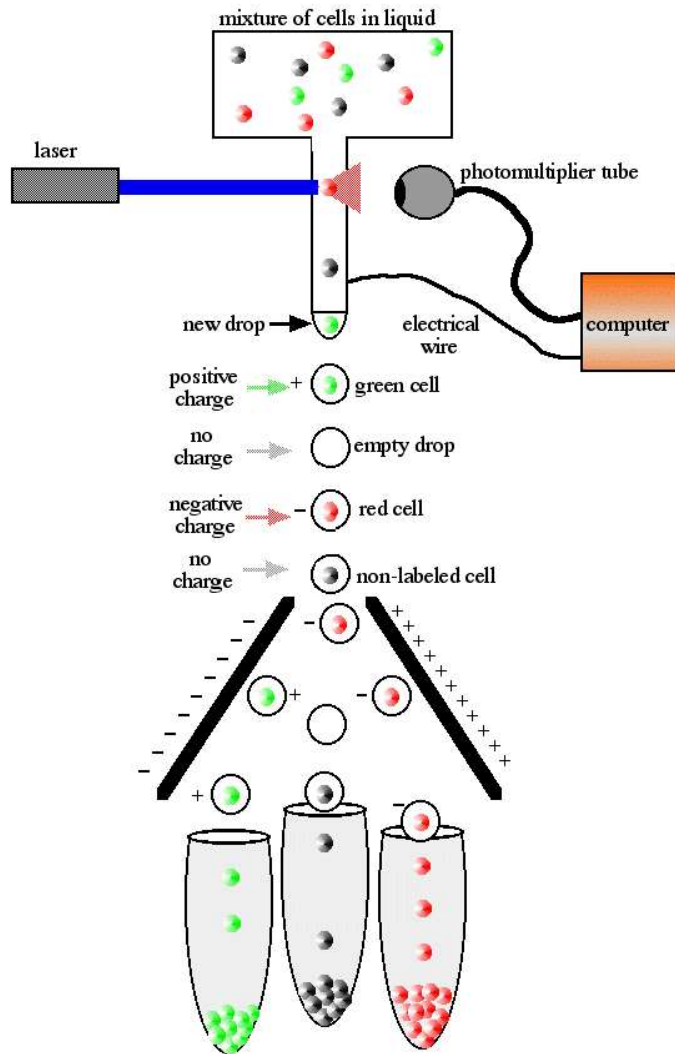
Bis zu 8 Farben parallel,
für diverse Anw. In Gelen
zusätzliche Fähigkeit, zur
Chemilumineszenz-Detektion
(s. Am Ende des Foliensatzes)

Quelle: <https://www.dyeagnostics.com>



Fluoreszenzdetektion in der Zellbiologie

FACS: Fluorescence-activated cell sorting



Sortierung von Zellen mit Fluoreszenz-Sonden; über **statische Aufladung je nach Fluoreszenz-Signal** und Auftrennung im elektrischen Feld.

Anwendung:
Aufreinigung von bestimmten Zelltypen aus Mischungen (z.B. Stammzellen), über spezifische Oberflächenbinder



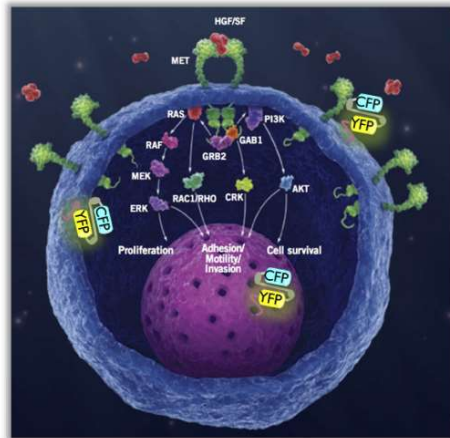
FACS in der Uni-Klinik Heidelberg

Quelle: Eigenes Foto

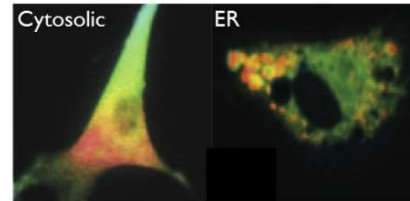
Prof. M. Schrader

Fluoreszenzdetektion in der Mikroskopie

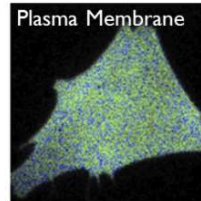
SUBCELLULAR TARGETING SIGNALS



Ca²⁺ Biosensor

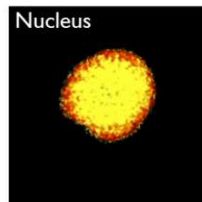


Src Biosensor

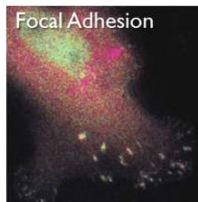


Quelle: <https://seonglab.wordpress.com/research/>

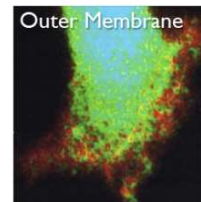
H3K9 Biosensor



FAK Biosensor



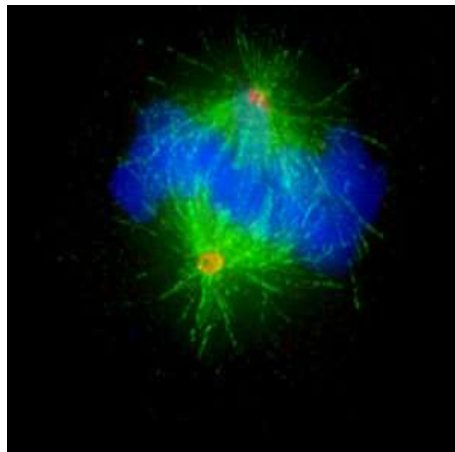
MTI-MMP Biosensor



Kim et al (2009), Seong et al (2011), Tan et al (2014), Seong et al (2013), Ouyang et al (2008)

Links auf Videos:

- Fluorescence microscopy:
<https://www.youtube.com/watch?v=AhzhOzgYoqw>
- Weitere s. Moodle



Aufnahme einer sich teilenden menschlichen Zelle.

- blau: Chromosomen
- grün: Mikrotubuli der Teilungsspindeln
- gelb/orange: beide Zentrosomen

Bild: Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried

Quelle: <http://www.mpg.de/bilderBerichteDokumente/dokumentation/pressemitteilungen/2003/pressemitteilung20031211/>

Quantifizierung mittels Fluoreszenz hier nach CE

JOURNAL ARTICLE

Quelle(2023): <https://academic.oup.com/clinchem/>

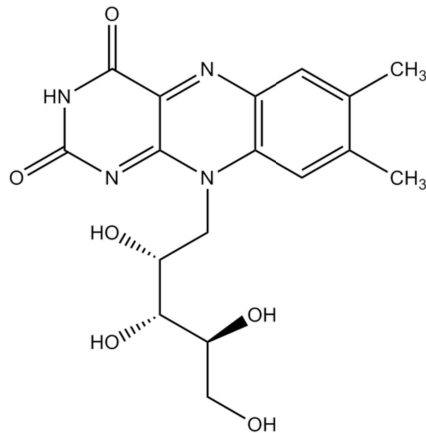
Quantification of Riboflavin, Flavin Mononucleotide, and Flavin Adenine Dinucleotide in Human Plasma by Capillary Electrophoresis and Laser-induced Fluorescence Detection FREE

Steinar Hustad , Per Magne Ueland, Jørn Schneede

Clinical Chemistry, Volume 45, Issue 6, 1 June 1999, Pages 862–868,

<https://doi.org/10.1093/clinchem/45.6.862>

Published: 01 June 1999



Erläuterung

- geringe Konz.
- hohe Relevanz
- Eigenfluoreszenz

CITATIONS

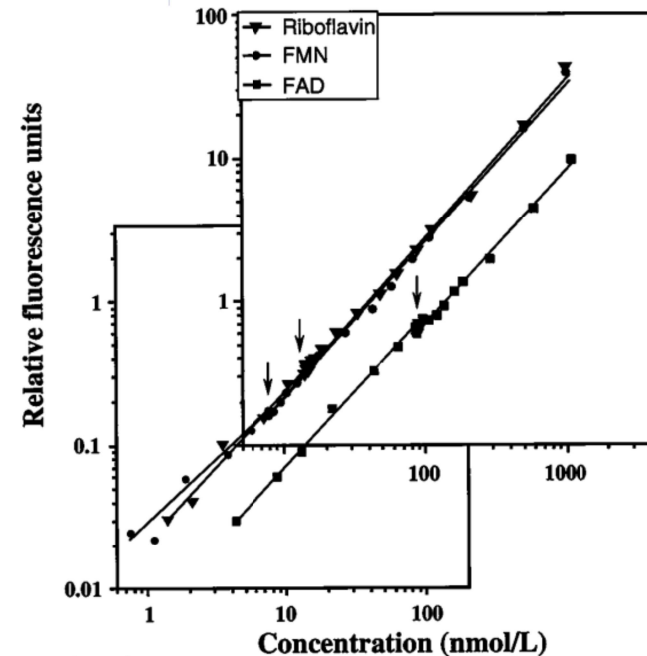
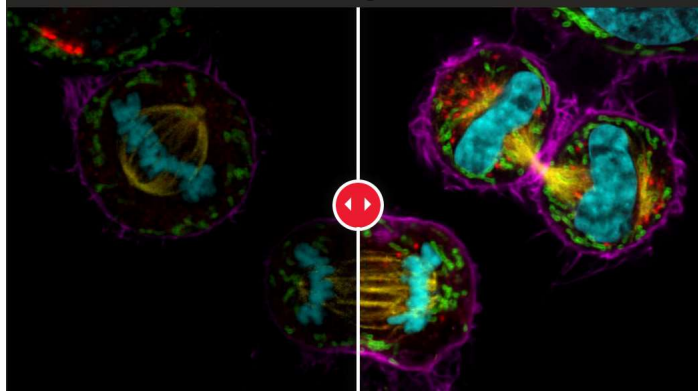


Fig. 2. Linear dynamic range of the CE assay.

The *top panel* shows the linearity in plasma with the vitamers added at concentrations up to 1000 nmol/L greater than the endogenous concentrations. Linear regression equations: $y = -0.043 + 0.025x$ ($r = 0.9987$) for riboflavin; $y = -0.078 + 0.026x$ ($r = 0.9989$) for FMN; and $y = 0.042 + 0.007x$ ($r = 0.9951$) for FAD. The equations are based on data points for endogenous concentrations (indicated by *arrows*) and for concentrations up to 200 nmol/L greater than the endogenous concentrations. The *bottom panel* shows the linearity at concentrations lower than the endogenous concentrations. Data were obtained by diluting native plasma with photo-degraded plasma. Linear regression equations: $y = -0.001 + 0.024x$ ($r = 0.9950$) for riboflavin; $y = 0.006 + 0.022x$ ($r = 0.9935$) for FMN; and $y = -0.008 + 0.008x$ ($r = 0.9980$) for FAD.

Fluoreszenz-Mikroskopie mit Weißlichtlaser

üblich gehobene Leistung

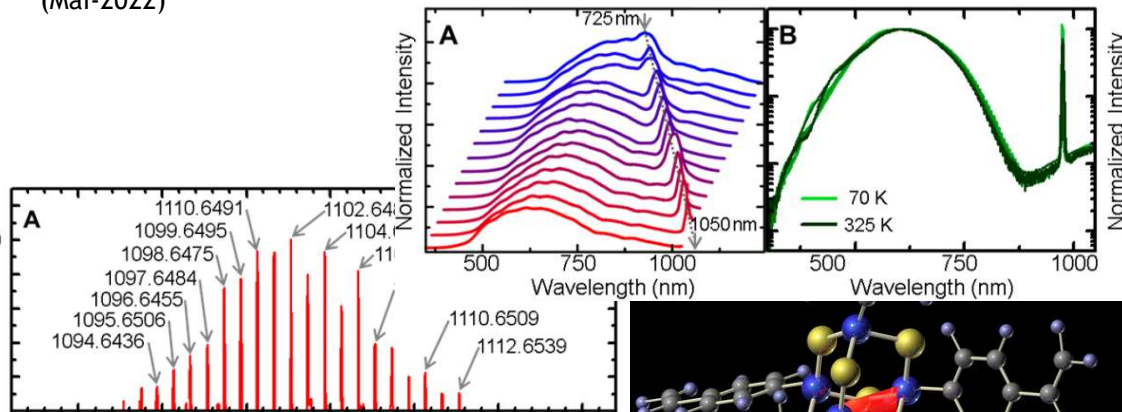


Mitotische COS7-Zellen (Fibroblasten), fünffach gefärbt:
cyan, Chromatin; gelb, Spindeln; magenta: Actin; rot, Golgi; grün Mitochondrien;
Quelle: <https://www.leica-microsystems.com/de/produkte/konfokalmikroskope>
(Mai-2022)

- gehobene Fluoreszenz in der Mikroskopie (Bsp. Leica Stellaris™)
 - bis zu 8 simultanen Laserlinien im Bereich von 410 nm bis 790 nm
 - Weißlichtlaser
 - erhöhte Kontraste
- Info zu Weißlichtlaser
 - IR-Laser bestrahlt Moleküle, dann Frequenzkonversion: viele niederenergetische Photonen, die auf das Molekül einstrahlen, resultieren in weniger, aber höherenergetischen

- amorpher Festkörper, mit $[(R^{\text{deloc}} \text{Sn})_4 \text{S}_6]$ -Organo-Zinnsulfid-Clustern

- **Literatur:** Rosemann et al. and Chatterjee (Univ. Marburg) „A highly efficient directional molecular white-light emitter driven by a continuous-wave laser diode“, Nils W. Rosemann et al.; Science, 2016



A+B oben) Emissionsspektrum (λ , T)

A unten) ESI-MS-Spektrum von $[M+Na]^+$

Bildquelle: Science 352, 1301 (2016)

suppl. pdf file

DOI: 10.1126/science.aaf6138

Bildquelle: <https://www.weltderphysik.de/gebiet/teilchen/nachrichten/2016/umwandlung-von-licht/te/konfokalmikroskope> (Mai-2022)

Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

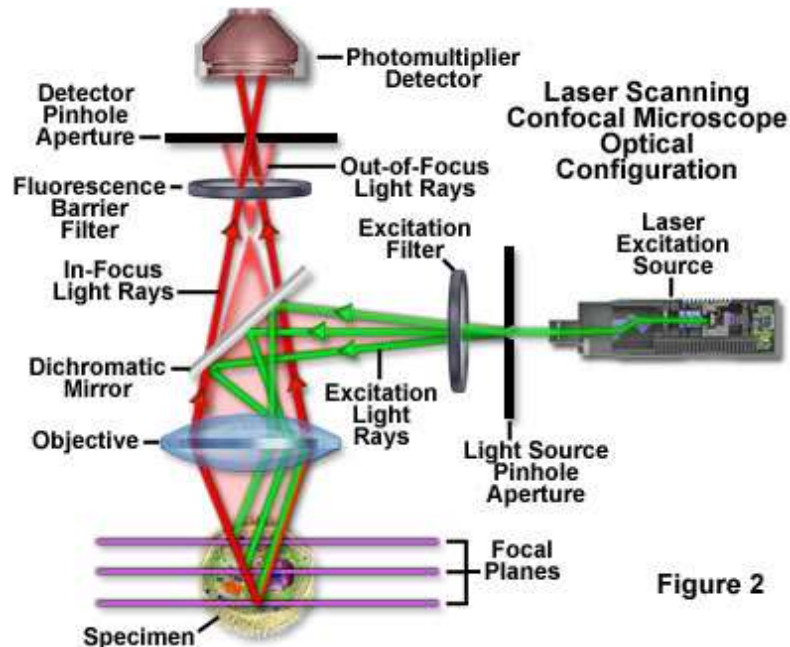
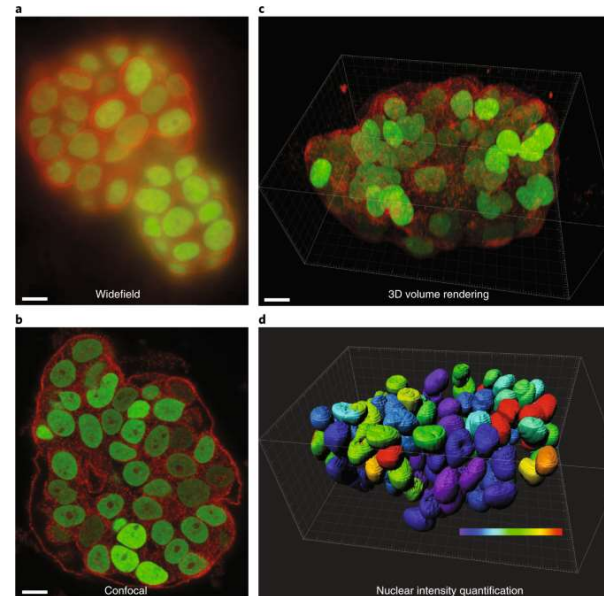


Figure 2

- Nur ein Teil des Sehfeldes ist im Fokus (also „scharf“ gestellt)
 - dieser Teil wird detektiert
 - Rest wird ausgeblendet
 - **Fokusebene wird variiert**
- Es entstehen **3D-artige Bilder**, durch Fluoreszenz:
 - **erhöhte Kontraste**
 - klarere Strukturen



a+b) Widefield/ gerendered; c+d) konfokal / quantitativ
Quelle: Jonkman (2020) Nature protocols
„Tutorial: guidance for quantitative confocal microscopy“
DOI: 10.1038/s41596-020-0313-9

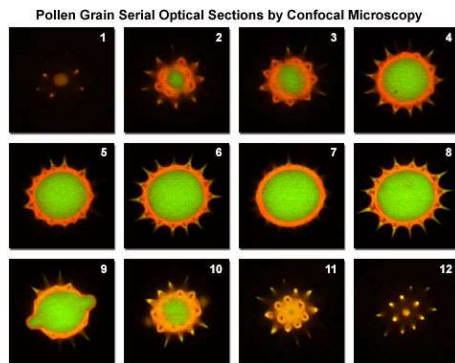
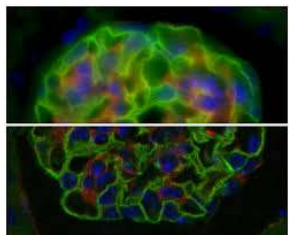


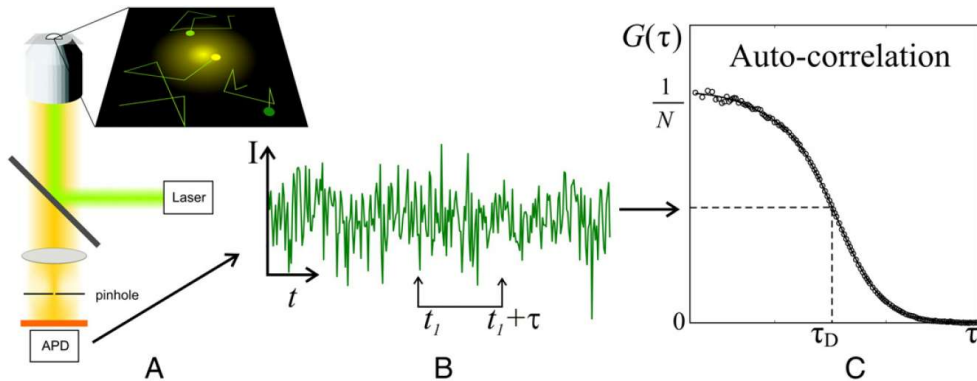
Figure 6



Schnitt durch Niere weit/konfokal
Quelle: Jonkman (2012)
microscopysolutions.ca

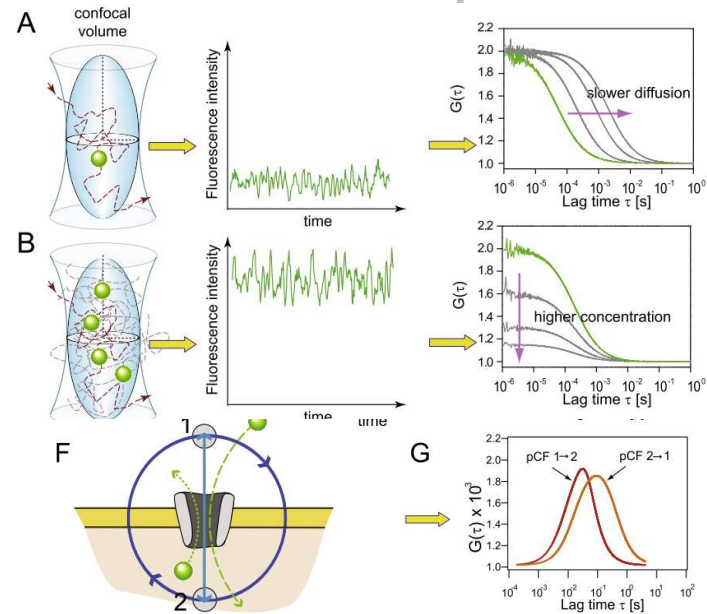
Pflanzenpollen in unterschiedlichen Fokusebenen
Quelle: www.olympus-lifescience.com (Mai-2021)

Fluorescence (Cross-)correlation Spectroscopy (FCS and FCCS)



FCS principles – diffusion time (A) or concentration (B)

Quelle: Chiantia, Ries, Schwille
Biochimica et Biophysica Acta (2008)
doi:10.1016/j.bbamem.2008.08.013

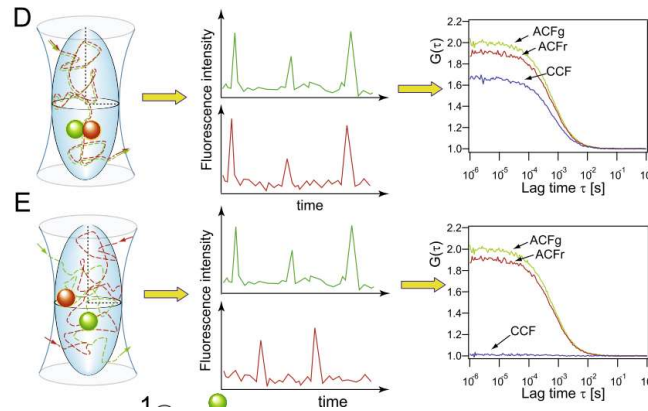


FCS influences – (A) diffusion time or (B) concentration

(F) exemplary measurement of transport time

Quelle: Chiantia, Ries, Schwille
Biochimica et Biophysica Acta (2008)
doi:10.1016/j.bbamem.2008.08.013

FCCS mode and influences –
- (D) correlated motion (high CCF)
- (E) non-correlated (low CCF)



Quelle: Chiantia, Ries, Schwille
Biochimica et Biophysica Acta (2008)
doi:10.1016/j.bbamem.2008.08.013

- FCS erlaubt Rückschlüsse auf
 - Diffusionsverhalten
 - Transportzeiten
- FCCS
 - orts aufgelöste Nachbarschaft beider Fluophore
- kombinierbar mit konfokaler Mikroskopie

Fluoreszenzmarkierung von Zellmembranen (“Diolistics”)

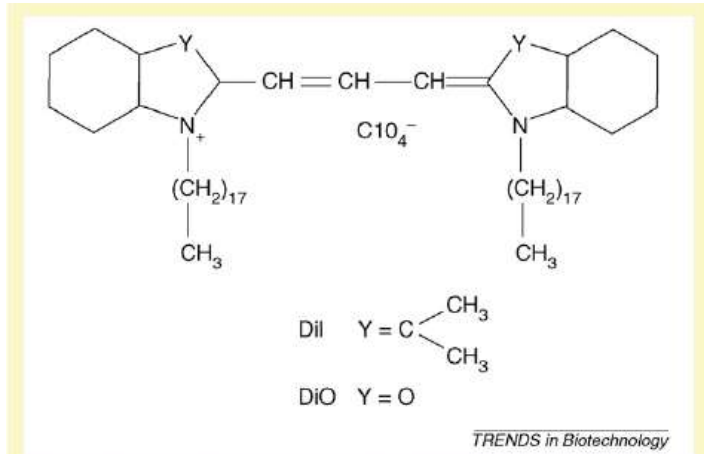


Figure 1. Structure of carbocyanine dyes. For DiI $Y = C(CH_3)_2$ and for DiO $Y = O$.



Figure 1. A gene gun. The Helios (Bio-Rad) gene gun is a small portable instrument that enables efficient transportation of dyes into cells – a technique that is becoming known as diolistics.

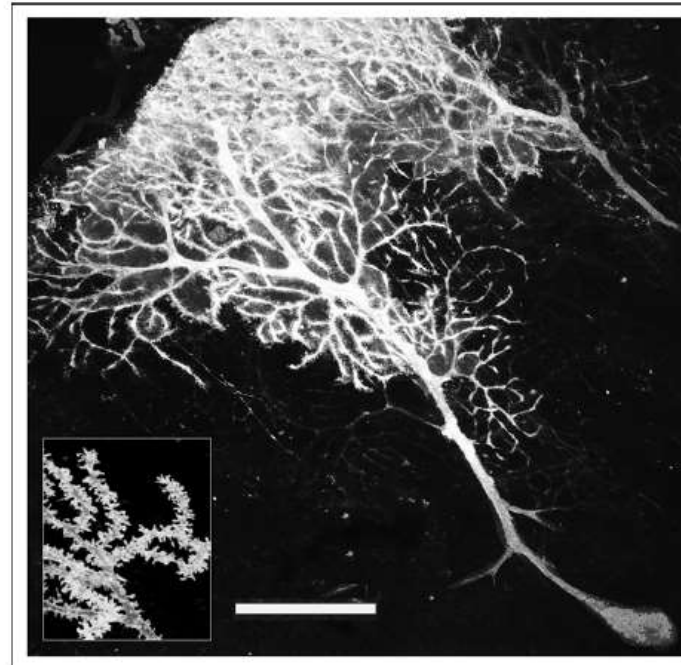


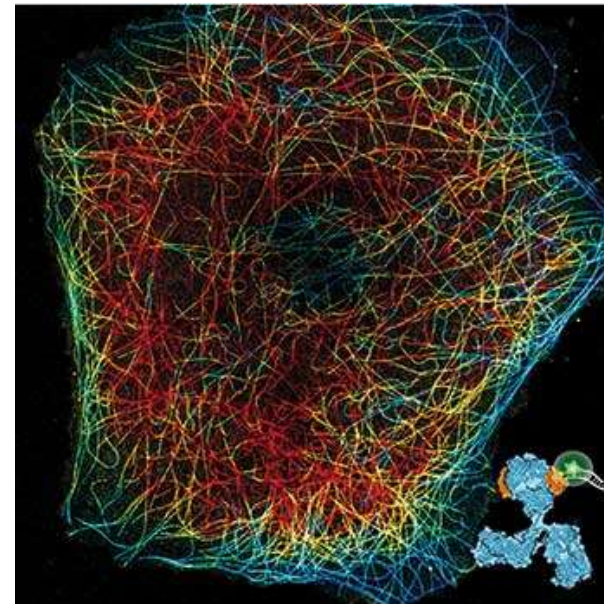
Figure 3. Diolistically labelled cells show considerable detail. A mouse Purkinje cell labelled diolistically using the lipid-soluble fluorescent dye 3,3'-dioctadecyloxycarbocyanine perchlorate (DiO) after applying the dye with the modified gene gun is shown. The insert shows a higher magnification of a part of the same image, which enables visualization of spines on dendritic shafts. Examination of these spines revealed that they were arranged in a helical fashion [14]. (Scale bar = 50 μm).

Quelle: Trends in biotechnology 25 (2007) 530-534,
<http://www.sciencedirect.com>

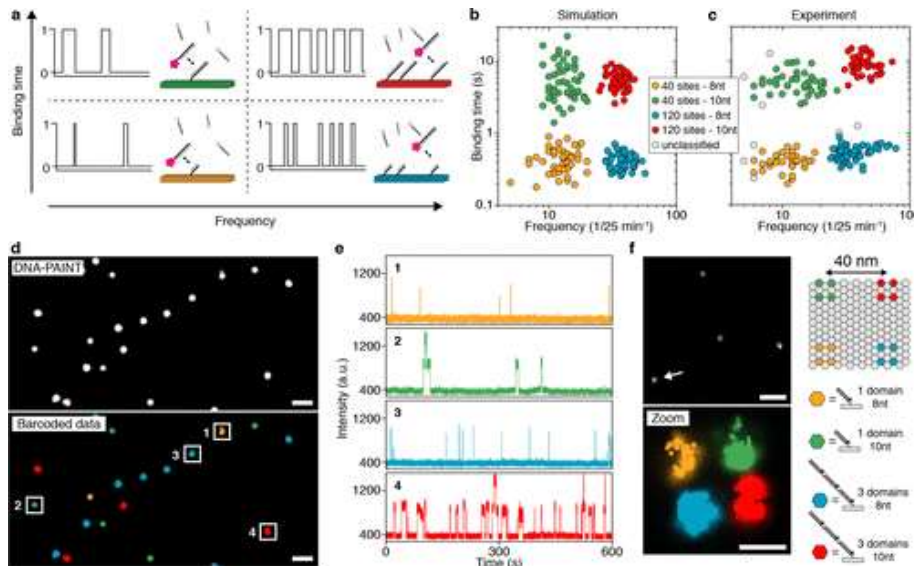
Fluoreszenz-Farbmischung durch „Blinken“

Methode DNA-PAINT

Mittels komplementärer DNA-Oligonucleotide, die zeitweilig binden, werden blinkende Signale erzeugt. Deren Überlagerung ergibt bis zu 124 optische Barcodes („Farben“), die in wenigen Minuten ausgelesen werden können



Mit markierten Antikörpern eingefärbte Mikrotubuli, Quelle:
https://laborjournal.de/rubric/special/special/2019_09_01.php



Further information:

Prof. Dr. Ralf Jungmann,

MPI Biochemistry, Martinsried

<https://www.mpg.de/20191007-Schueder-Jungmann>

Wade et al. 124-Color Super-resolution Imaging by

Engineering DNA-PAINT Blinking Kinetics

Nano Lett. 2019, 19, 4, 2641-2646

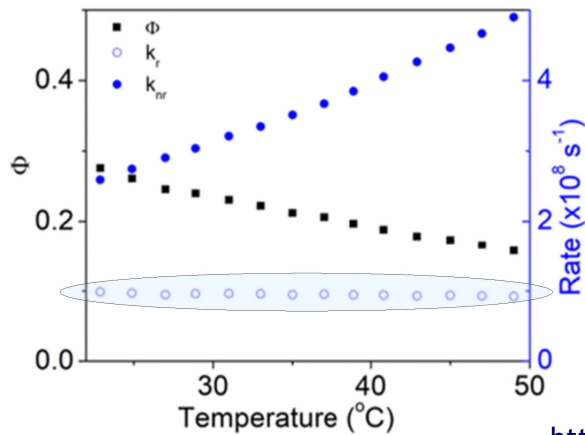
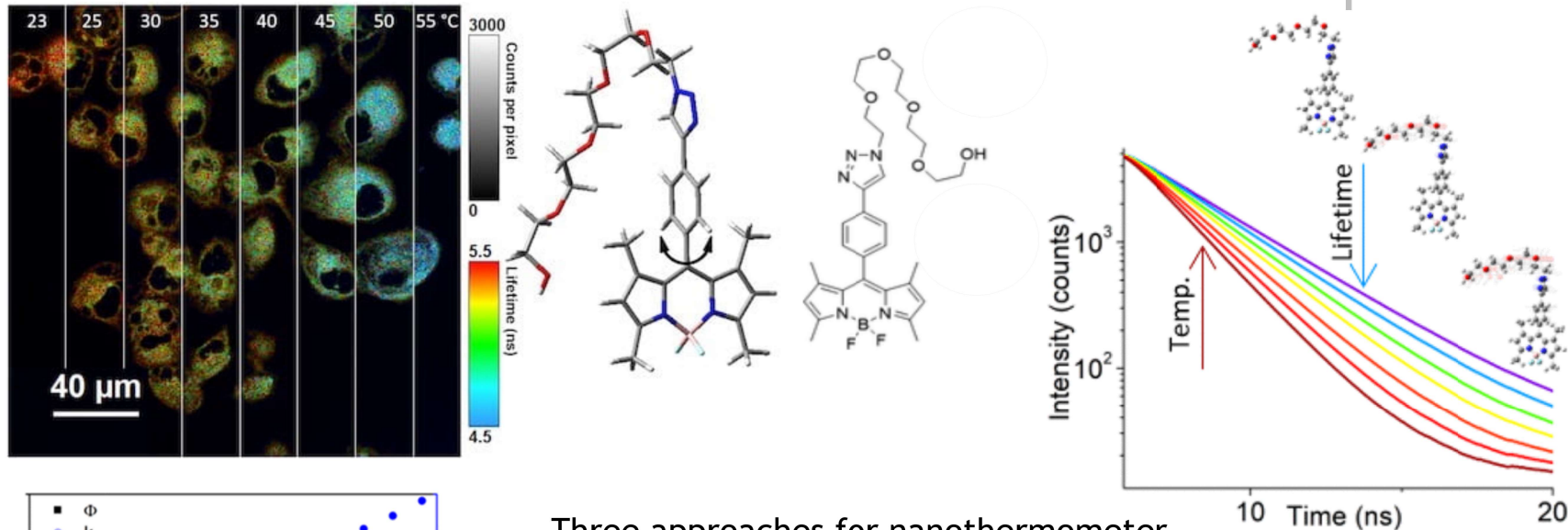
<https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.9b00508>

Schueder, F., Stein, J., Stehr, F. et al. An order of magnitude faster DNA-PAINT imaging by optimized sequence design and buffer conditions.

Nat Methods 16, 1101–1104 (2019)

[doi:10.1038/s41592-019-0584-7](https://doi.org/10.1038/s41592-019-0584-7)

Temperaturmessung für Einzelzellen



- Three approaches for nanothermometer
- changes in emission intensity
 - ratiometric fluorescence
 - **changes in lifetime**

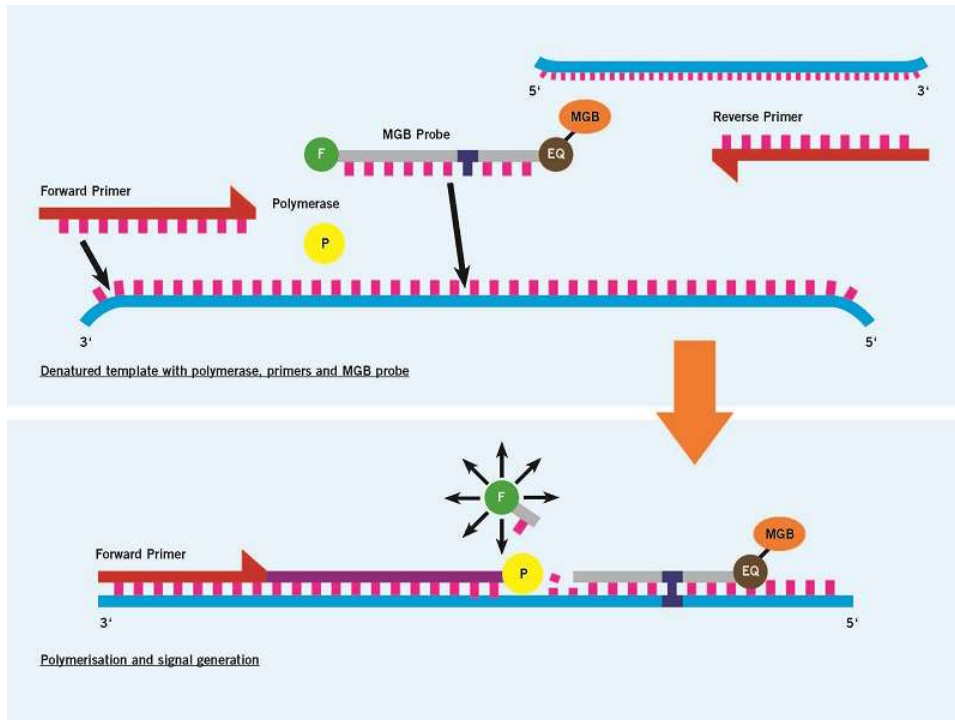
No significant cell toxicity up to 100 μM
(Pancreatic cancer Panc-1 and Human Pancreatic Nestin-expressing HPNE cell lines)

- k_r (radiative, open blue circles),
- Quantum yield (black squares), and
- k_{nr} (non-radiative, blue circles)
of PEG-BODIPY in water at different temperatures.

Quelle:
<http://news.rice.edu/2019/08/22/temperatures-inside-cells-taken-by-nano-thermometer-2/>
Ogle et al. J. Phys. Chem. B 2019, 123, 7282-7289
<https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.9b04384>

Weiterhin im Kontext interessant: Uchiyama and Gota (2016)
<https://doi.org/10.1515/revac-2016-0021>

Quenching in real-time qPCR (RT-PCR) zur DNA-Quantifizierung



Genexpressionsanalyse via
5'-Nuklease RT-PCR, mit
Fluoreszenzsonde, nahe Quencher

Als **Einzelstrang** ist der **Farbstoff der Sonde vom Quencher abgedunkelt**.
Nach Temperaturabsenkung bindet dieser an komplementären Strang.
Nach Erreichen der erste Sonde spaltet die Polymerase diese und trennt so den Farbstoff vom Quencher.

Quelle: <https://www.eurofinsgenomics.eu>

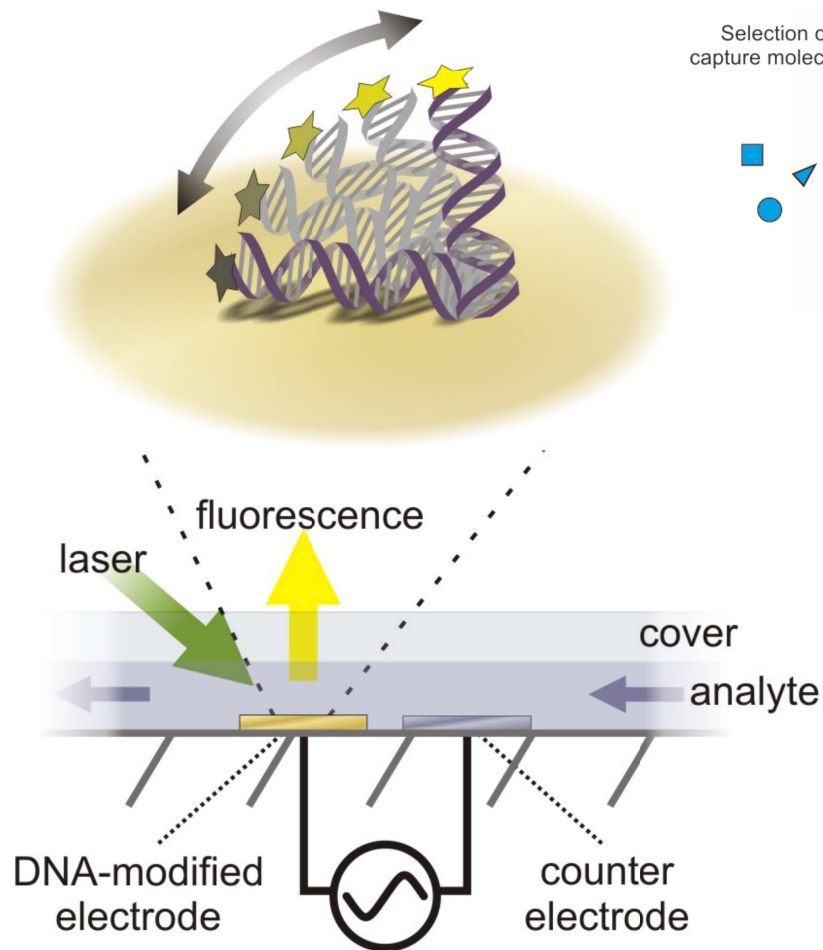
vgl. Applied Biosystems™ TaqMan® Assays,
<https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/>



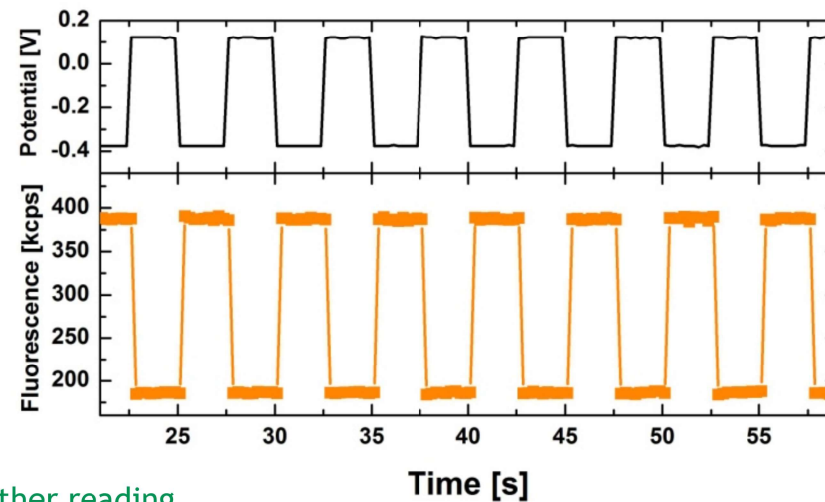
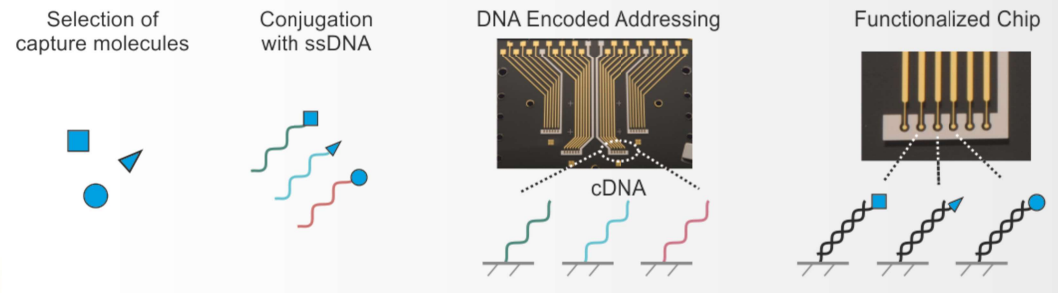
Bis zu sieben Farbstoffe und 16 Proben gleichzeitig

Quelle: <https://www.analytica-world.com/de/produkte/128119/real-time-pcr-cycler-thermocycler.html>

Biomolecular interaction analysis by *switchSENSE*TM electrically switchable DNA with fluorescence label



Quellen: <https://www.dynamic-biosensors.com/>



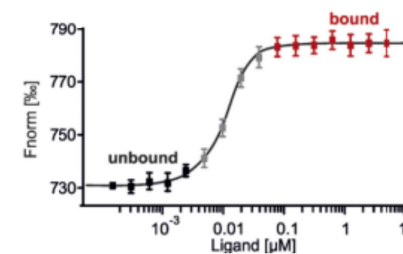
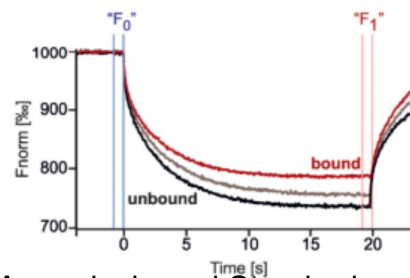
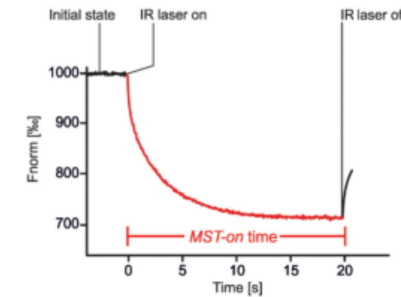
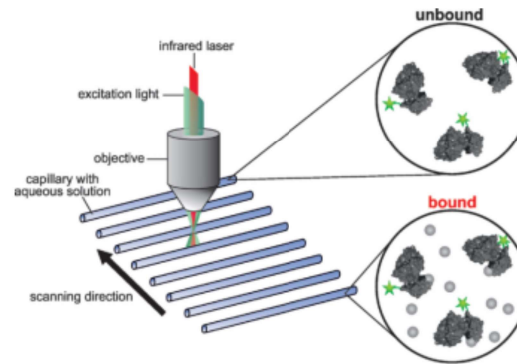
Further reading

- ◆ <https://www.dynamic-biosensors.com/switchsense/>
- ◆ Method: Kaiser + Rant J Am Chem Soc 132 (2010), pp 7935-7945, DOI:10.1021/ja908727d
- ◆ Application: Knezevic et al. J. Am. Chem. Soc., 134 (2012) pp 15225-8 DOI: 10.1021/ja3061276

Interaction analysis, type II

Microscale thermophoresis by Nanotemper™ (Munich)

Instrumentelle
Bioanalytik
Biotechnologie, 6.Sem.
HS Weihenstephan-Tr.



Messprinzip und Standardanwendung

Quelle: <http://www.isbg.fr/biophysics-characterisation/>

Gerät und Kapillarenhalter von Nanotemper

Quelle: <https://nanotempertech.com/monolith/>

- ◆ See: <https://resources.nanotempertech.com/monolith-publications>
- ◆ e.g.: Bartoschik et al. Scientific Reports (8) (2018) no. 4977;
doi: 10.1038/s41598-018-23154-3

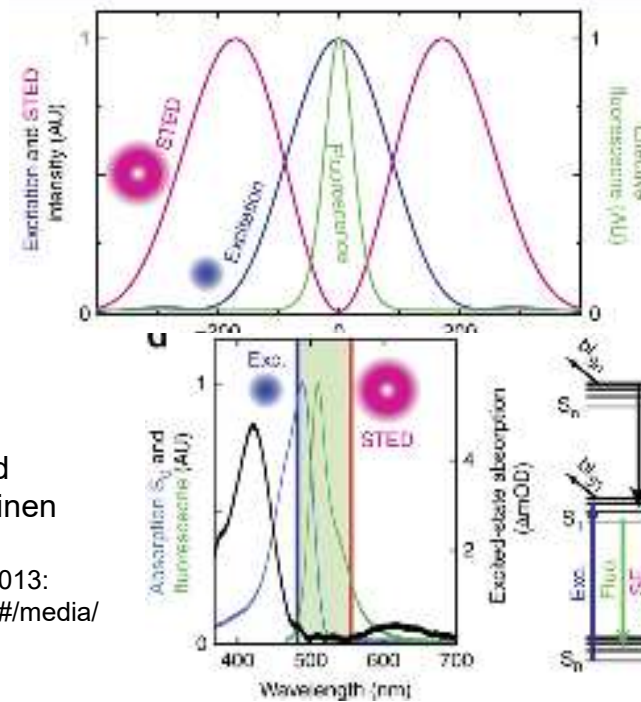
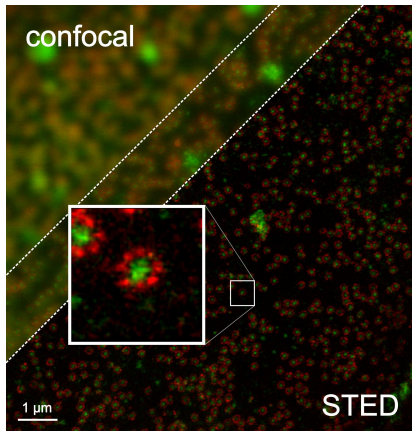


Laborräume von Nanotemper

Quelle: <https://www.top100.de/die-top-innovatoren/2018/>

„Nanoskopie“ Sub-Mikroskopie mit NanoBiophotonik Stimulated Emission Depletion (STED)

Prof. Dr. Stefan W. Hell (MPI Göttingen)
Nobelpreis Chemie 2014, Quelle (2020):
<https://www.mpibpc.mpg.de/de/nobelprize2014>



Räumliche Signallage (oben links) und Termschema (unten rechts) mit Übergängen bei STED

Quelle: Vicidomini et al., Nature Methods 15, 173–182 (2018)

Vergleich von Standard-Konfokal- und STED-Mikroskopie anhand von Proteinen des Kernporenkomplexes.

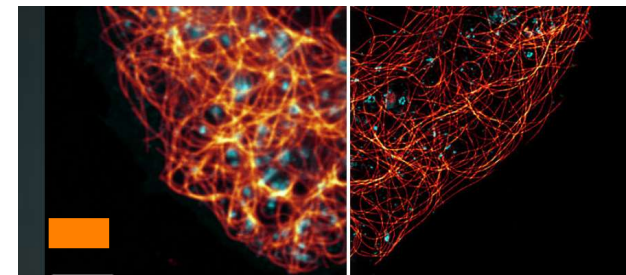
Quelle (2020), Tassekaffee - Eigenes Werk 2013:
<https://de.wikipedia.org/wiki/STED-Mikroskop#/media/>

Prinzipien

- ◆ laser-basierte Fluoreszenz, mit lichtstimulierter Emission
- ◆ stimulierte Emission muss schneller sein als spontane
- ◆ hohe Laserenergie und komplexer Aufbau haben Durchbruch verzögert (seit Publikation 1994 bis etwa 2010)

More Details

- ◆ <https://www.mpibpc.mpg.de/de/hell>
- ◆ Vicidomini, G., Bianchini, P. & Diaspro, A. STED super-resolved microscopy. Nature Methods 15, 173-182 (2018). <https://doi.org/10.1038/nmeth.4593>



Tubulinnetzwerk einer lebenden Zelle (Balken: 5 μm)

Quelle: <https://www.leica-microsystems.com> (2022)

Biolumineszenz (zur Abgrenzung)



Quelle: www.corporate.basf.com

Instrumentelle
Bioanalytik
Biotechnologie, 6.Sem.
HS Weihenstephan-Tr.

- ◆ chemische Reaktion führt zu Lichtfreisetzung (Chemilumineszenz) in lebenden Systemen, s. auch:
<http://www.chemie.uni-jena.de/institute/oc/weiss/lumineszenz.htm>
https://www.tf.uni-kiel.de/matwis/amat/admat_en/kap_5/advanced/t5_2_4.html
- ◆ Detektion mit chemischer Markierung, die farbiges Licht erzeugt
- ◆ zahlreiche indirekte Verfahren
 - zur Quantifizierung mit UV-Vis
 - oft gekoppelt mit enzymatischen Assays
 - auch als Biolumineszenz von Bakterien
- ◆ leicht automatisierbar, z.B. in multi-well-plates
- ◆ **Günstige Alternative zu Fluoreszenz** (Chemie günstiger, kein Laser, eingeschränkte Kopplung und Farben)



Quelle: https://www.tf.uni-kiel.de/matwis/amat/admat_en/kap_5/advanced/t5_2_4.html

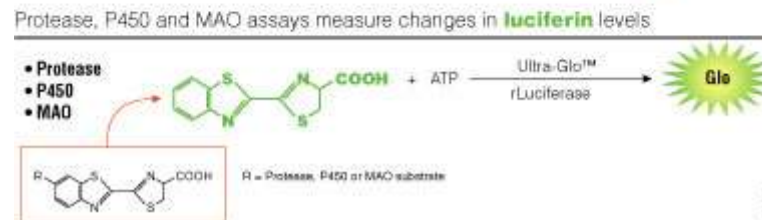
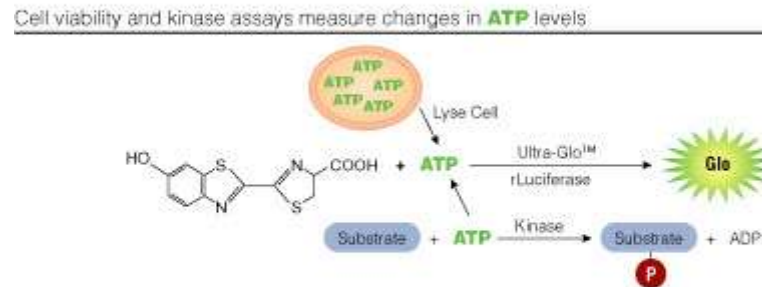
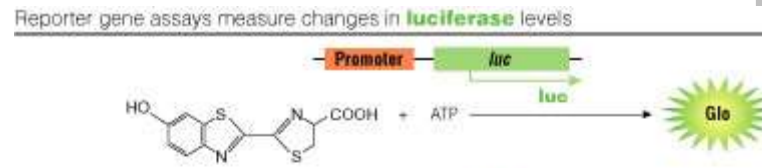


Quelle:
<http://kattumaran.com/en/bboloumence/>

Introduction (4 min):
<https://www.youtube.com/watch?v=9HXXQBz6Vv0>

Anwendungen von Chemilumineszenz

- einfache Analyte
 - Ammonium
 - Phosphat
- hoher Probendurchsatz
(in multi-well plates)
und Reader
- Klin. Chemie
 - Phosphat (wie oben)
 - Glucose-Messung
- Es besteht die Möglichkeit,
damit Fluoreszenz anzuregen,
BRET (analog zu FRET)



1. Phosphat + Ammoniummolybdat \Rightarrow Ammoniumphosphomolybdat
2. Ammoniumphosphomolybdat $\xrightarrow{\text{Ascorbinsäure}}$ Molybdänblau
3. Photometrische Messung bei 570-650 nm



Quelle: www.promega.com/ Photometrische Messung bei 365 nm

Introduction (5 min):
<https://www.youtube.com/watch?v=m0kSOrJXUKo>

Automatisierte klinische Diagnostik

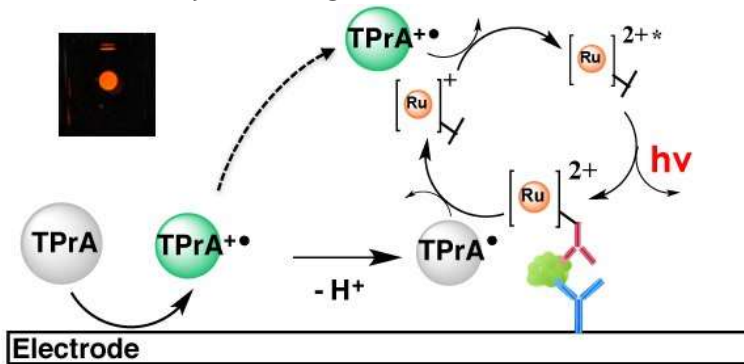
Elektrochemische Lumineszenz-Immunoassays

- Standard in klinischen Labors
- basiert auf elektrochem. Reaktionen, mit Freisetzung von Licht; z.B. mit Ru²⁺-Ionen oder anderen Luminophoren, siehe Abdussalam and Xu (2021), Anal Bioanal Chem
DOI: <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03329-0>
- vollständig automatisiert
- Beispielgerät: Cobas e 601 (Roche Diagnostics)
 - Bis zu 25 Assays,
 - 170 Tests/h
 - 100 Assays verfügbar



Cobas e 601 und 8000
Quelle: [diagnostics.roche.com](https://www.diagnostics.roche.com)
(Mai-2021)

Automatisierte klin. Diagnostik
Quelle: www.kbimed.com/
(Mai-2021)



Elektrochemische Lumineszenz (mit ursprüngl. Luminophor), bei der rotes Licht von 620 nm aus aktierten Ruthetium-Ionen, nach elektrochem. Aktivierung mit Tripropylamin, emittiert wird.
Autor: G. Valenti (2017), CC BY-SA 4.0
Quelle: en.wikipedia.org (Mai-2021)



Automatisierte Chemilumineszenz-Microarrays

Alternative klinische Diagnostik, für z.B. SARS-CoV-2

- Alternativen zu Antigen-Schnelltest oder ELISA
- sieht parallel mehrere Proteine (Spike, RBD, Nucleocapsid)
- ausweitbar auf andere Impfungen

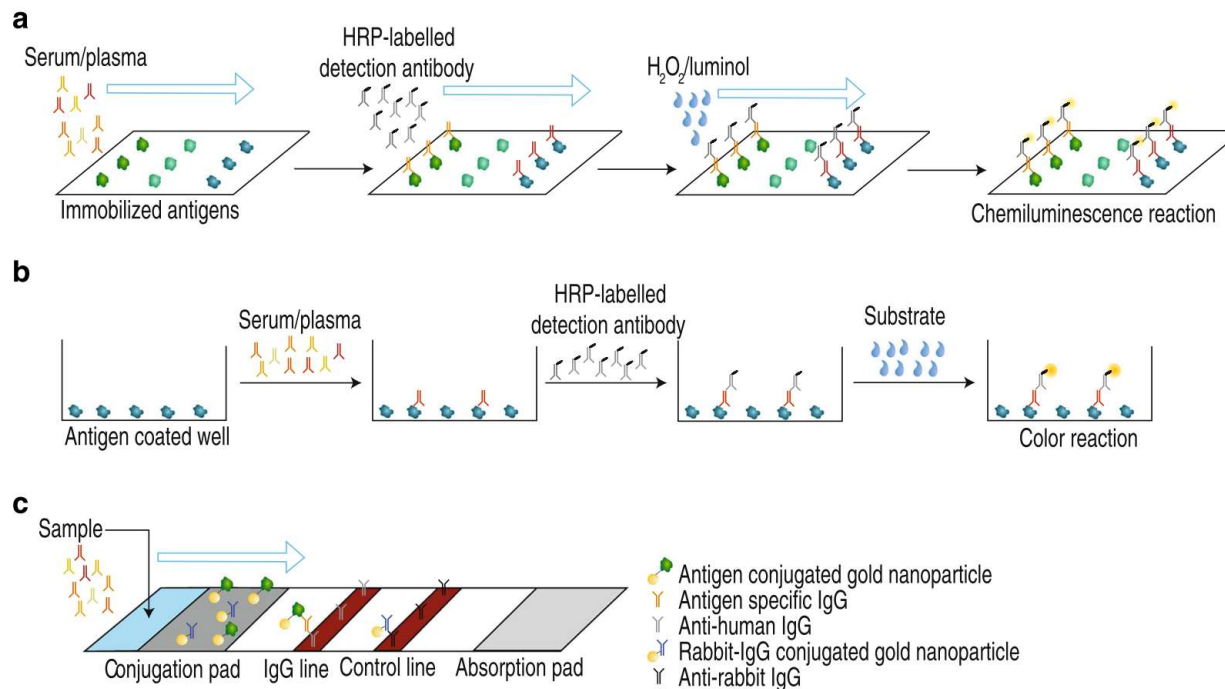


Fig. 1 Overview over different antibody test principles. **a** Flow-based CL-MIA. **b** ELISA. **c** Lateral flow immunoassay

Automated, flow-based chemiluminescence microarray immunoassay for the rapid multiplex detection of IgG antibodies to SARS-CoV-2 in human serum and plasma (CoVRapid CL-MIA)

Quelle: Klüpfel et al. Analytical and Bioanalytical Chemistry (2021) 413:5619-5632
<https://doi.org/10.1007/s00216-021-03315-6>

Aktuelle Entwicklungen zur Fluoreszenz (zur selbständigen Vertiefung, über Prüfung hinaus)

- ◆ **Superresolution Microscopy**, siehe z.B.
 - <https://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/>
 - Gruppe Hell in Science 2023, DOI: 10.1126/science.ade2650
kommentiert in <https://www.analytica-world.com>
- ◆ **Geräteentwicklung** zu Ligandenbindung und Bindungsassays,
 - Nanotemper, München: <https://nanotempertech.com/>
 - Dynamic Biosensors, München: <https://www.dynamic-biosensors.com/>
- ◆ **Nobelpreise** zur Fluoreszenz
<https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry>
 - 2014 in Chemistry; „for the development of super-resolved fluorescence microscopy“
 - 2008 in Chemistry „for the discovery and development of the green fluorescent protein, GFP“

Eigene Zusammenfassung und Anm. bezüglich der Lernziele, mögliche Prüfungsthemen



Beachten Sie die
Überschriften:
- Grundlagen und
wichtige
Anwendungen
(prüfungsrelevant)

-weiterführende
Themen
(zukunftsrelevant)