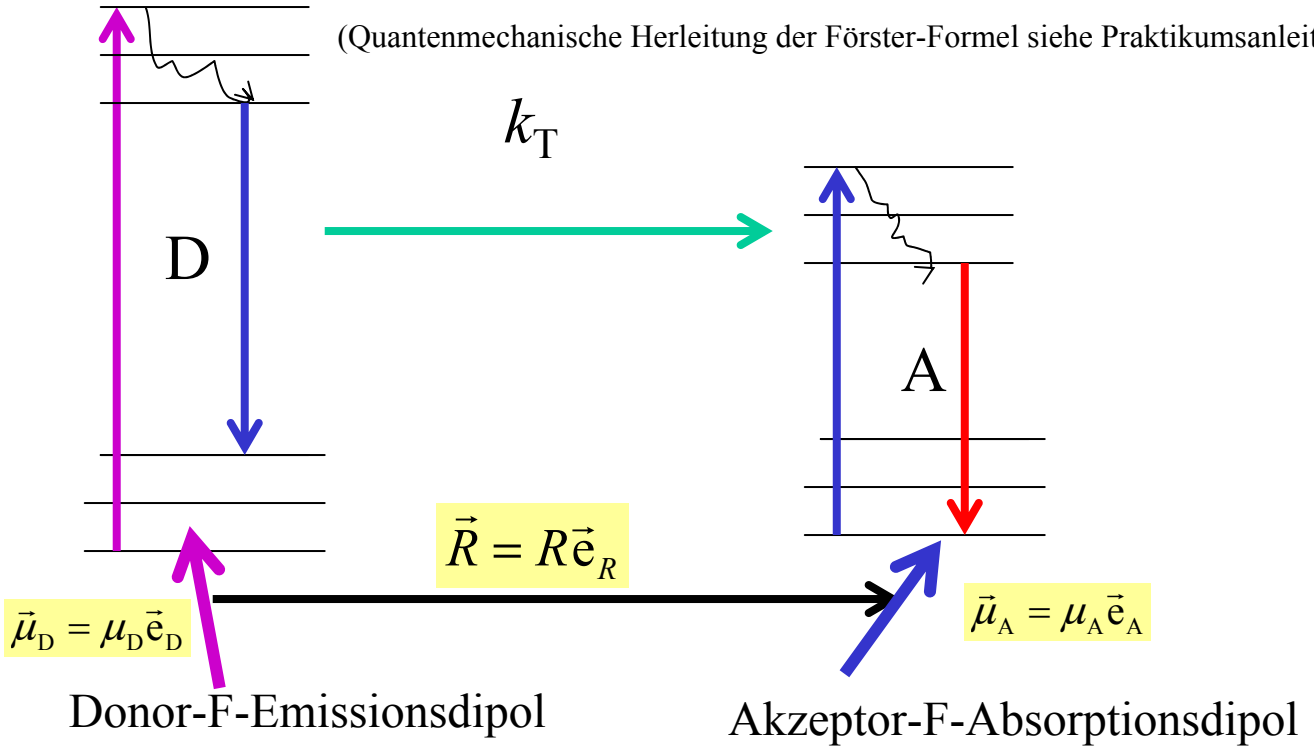


# Zur Begründung der Förster-Formel

(Quantenmechanische Herleitung der Förster-Formel siehe Praktikumsanleitung)



$$V(\vec{R}) = \frac{\kappa \mu_D \mu_A}{4\pi n^2 \epsilon_0 R^3}$$

$$\kappa \equiv \vec{e}_D \vec{e}_A - 3 \vec{e}_D \vec{e}_R \circ \vec{e}_A \vec{e}_R$$

DDWW-Energie zwischen  $\mu_D$  und  $\mu_A$

$n$  = Brechungsindex des Lösemittels

Richtungsfaktor  $-2 \leq \kappa \leq 2$  (Größte Unsicherheit)

Wir nehmen zunächst an, dass der Donor nur bei der Winkelfrequenz  $\omega$  emittiert, und zwar als Hertz'scher Dipol mit der Gesamtstrahlungsleistung  $P_D$

$c_0$  = Vakuumlichtgeschwindigkeit

$$P_D(\omega) = \frac{2\mu_D^2 (1/2)\omega^4}{3 \cdot (4\pi n^2 \epsilon_0) \cdot (c_0/n)^3}$$

Akzeptor-Absorptionsleistung bei  $\omega$

$$P_A(\omega) = \frac{1}{4} n^2 \epsilon_0 \left( \frac{\kappa \mu_D}{R^3 4\pi n^2 \epsilon_0} \right)^2 \cdot 3 \frac{c_0}{n} \epsilon_A(\omega) \frac{\ln 10}{N_A}$$

kein H-Feld

Nah-E-Feld der D-Fluoreszenz

$$\langle (\vec{e}_A \vec{e}_D)^2 \rangle = \frac{1}{3}$$

A-Absorptionsquerschnitt

Bei der Definition des Absorptionsquerschnitts ist von isotroper Orientierung des Absorptionsdipols ausgegangen worden, hier ist die Orientierungsabhängigkeit im Faktor  $\kappa$  enthalten.

Für  $R = R'_0$  wird die Hälfte der vom Donor emittierten Fluoreszenzstrahlungsleistung vom Akzeptor absorbiert:

$$P_A(\omega) = \frac{1}{2} P_D(\omega) \quad \text{d. h.}$$

$$\frac{3 n c_0 \epsilon_0 \epsilon_A(\omega) \ln 10}{4 N_A} \frac{\kappa^2 \mu_D^2}{R'_0{}^6 16 \pi^2 \epsilon_0^2 n^4} = \frac{1}{2} \frac{\mu_D^2 \omega^4 n}{3 \cdot 4 \pi \epsilon_0 c_0^3}$$

woraus mit  $\omega = 2\pi\nu$  folgt

$$R'_0{}^6 = \frac{9 \ln 10 \cdot \kappa^2 c_0^4}{128 \pi^5 N_A n^4} \cdot \frac{\epsilon_A(\nu)}{\nu^4}$$

Emittiert der Donor mit der Wahrscheinlichkeit  $f_D(\nu)d\nu$  im Frequenzintervall  $\nu \dots \nu+d\nu$ , dann ergibt sich für die sechste Potenz des modifizierten Försterradius der Ausdruck

$$R'_0{}^6 = \frac{9 \ln 10 \cdot \kappa^2 c_0^4}{128 \pi^5 N_A n^4} \cdot \int f_D(\nu) \frac{\epsilon_A(\nu)}{\nu^4} d\nu$$

$$\frac{9 \ln 10}{128 \pi^5 N_A} \approx 8,79 \cdot 10^{-28} \text{ mol}$$

Mit  $\frac{c_0}{\nu} = \lambda$  und  $\int_0^\infty f_D(\nu) d\nu = \int_0^\infty f_D(\lambda) d\lambda = 1$

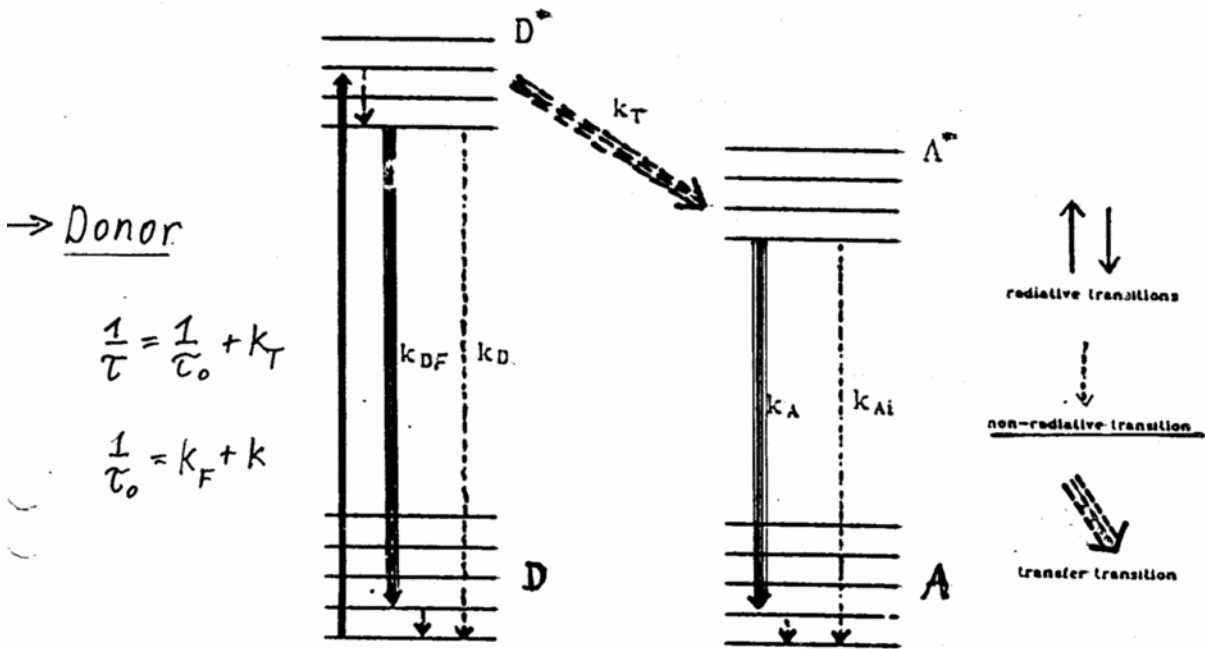
(Normierte D-Fluoreszenzfunktion bei Abwesenheit von A)

und Einbezug der D-Quantenausbeute (ohne A) in den modifizierten Förster-Radius ergibt sich für die Transferrate der gebräuchliche Ausdruck mit dem üblich als Försterradius bezeichneten Wert  $R_0$

$$k_T = k_F \left( \frac{R'_0}{R} \right)^6 = \frac{Q_D}{\tau_0} \left( \frac{R'_0}{R} \right)^6 = \frac{1}{\tau_0} \left( \frac{R_0}{R} \right)^6$$

$k_F$  ist die Emissionsrate von Fluoreszenzphotonen des Donors ohne Akzeptor

$Q_D = k_F / (k_F + k) = k_F \tau_0$  ist die Quantenausbeute des Donors ohne Akzeptor

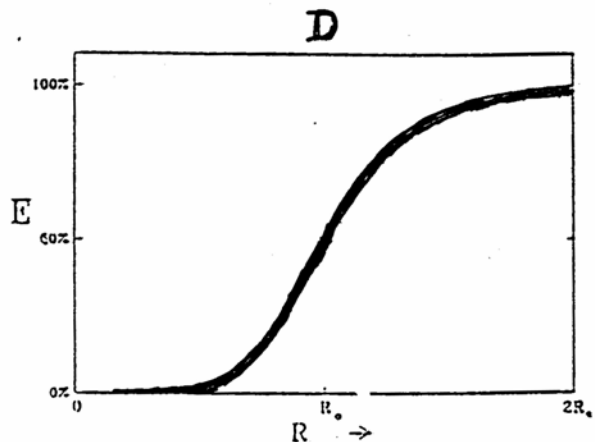
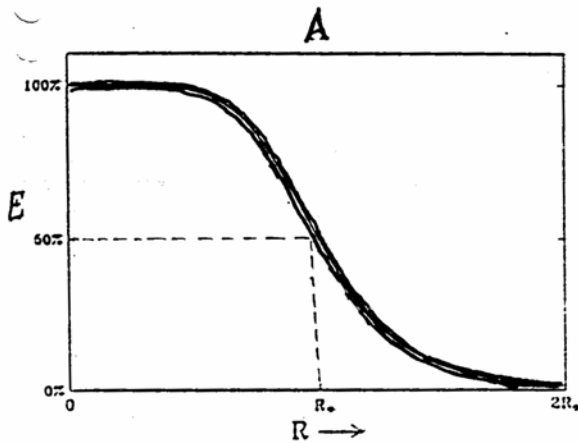


Simplified energy-level diagram of resonance energy transfer  
 D refers to the donor, and A to the acceptor; asterisks denote excited states.  $\kappa_D$ ,  $\kappa_{DF}$ ,  $\kappa_T$ ,  $\kappa_A$ , and  $\kappa_{Ai}$  are rate constants:  $\kappa_D$  and  $\kappa_{DF}$  for radiative and nonradiative deactivation of the excited donor state without transfer,  $\kappa_T$  for transfer, and  $\kappa_A$  and  $\kappa_{Ai}$  for radiative and nonradiative deactivation of the excited acceptor state without transfer.

$$E \equiv \frac{k_T}{k_T + k_F + k} = 1 - \frac{\tau}{\tau_0} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R^6}$$

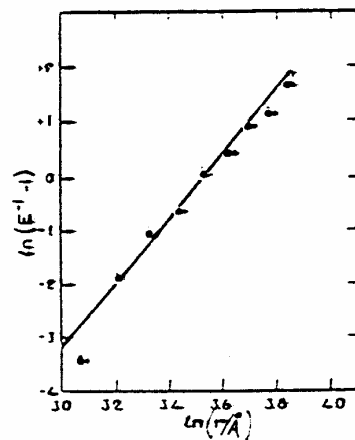
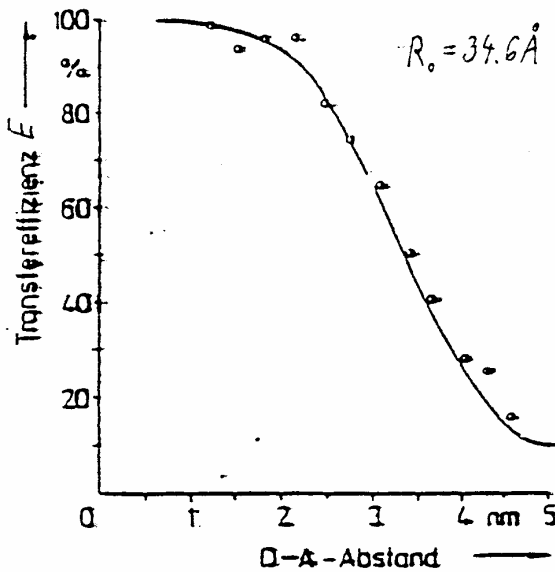
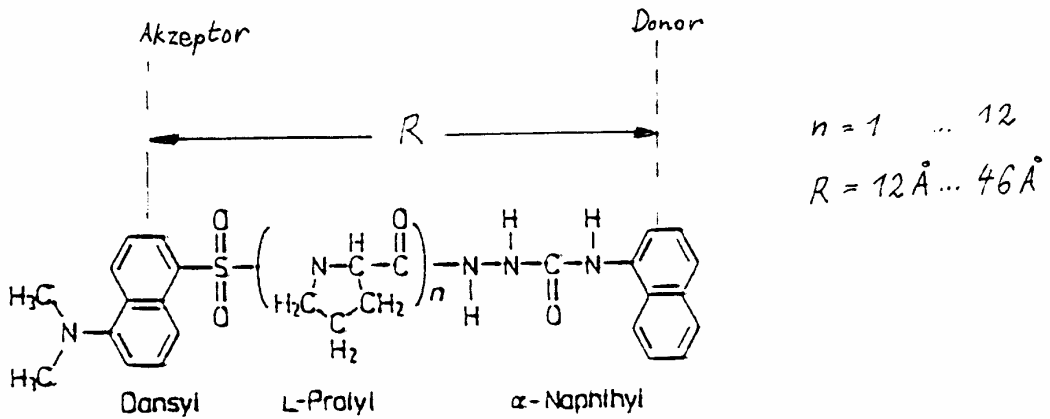
normierte A-Fluoreszenzintensität

normierte D-Fluoreszenzintensität



The transfer efficiency,  $E$ , versus the donor-acceptor distance,  $R$  (A), Förster distance,  $R_0$

Die aus der Förster-Transferrate folgende Abstandsabhängigkeit der Transfereffizienz mit der sechsten Potenz des D-A-Abstandes wurde an der unten abgebildeten Modellsubstanz demonstriert (*L. Stryer et al. 1967*)



$$\ln(E^{-1} - 1) = 6[\ln R - \ln R_0]$$

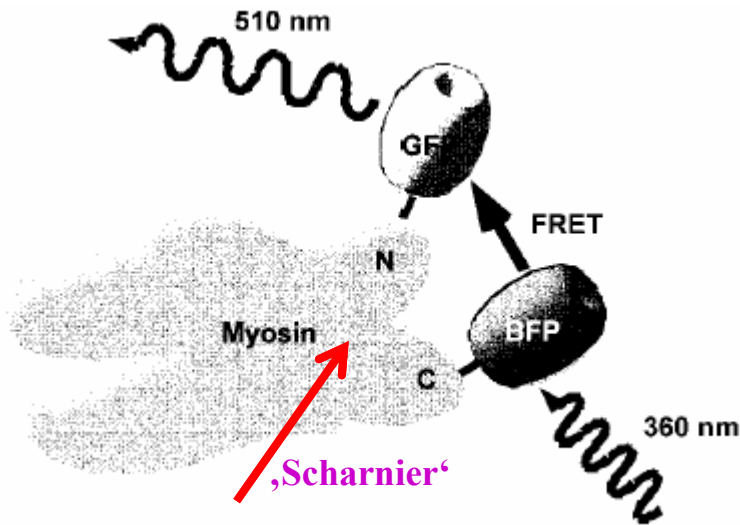
$$E = 1 - \frac{\tau}{\tau_0}$$

$$\tau_0 k_T = \left(\frac{R_0}{R}\right)^6$$

$$\frac{\tau_0}{\tau} = 1 + \left(\frac{R_0}{R}\right)^6$$

Die Überprüfung der  $R^6$ -Abhängigkeit war möglich, weil (L-prolyl)<sub>n</sub> eine konventionelle α-Helix mit bekannten Abständen ausbildet.

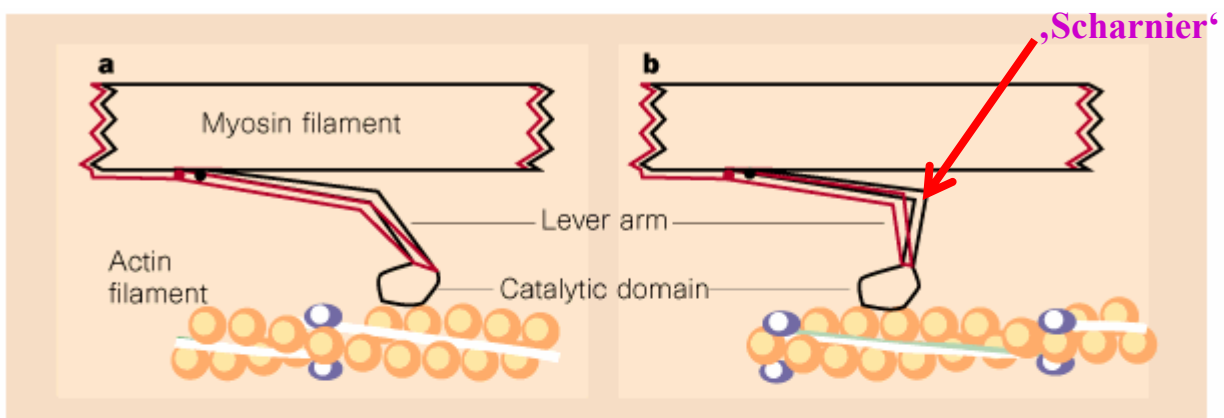
**Anwendungsbeispiel:** FRET an Myosin, markiert mit BFP am C-Terminus und mit GFP am N-Terminus *Suzuki et al. Nature* **396** 380 (1998)



**Motor-Protein Myosin:** Der Abstand zwischen BFP und GFP verändert sich mit den Konformationsänderungen des Myosins bei ATP-Bindung und Hydrolyse im Einklang mit dem Hebel-Arm-Modell der Muskelkontraktion.

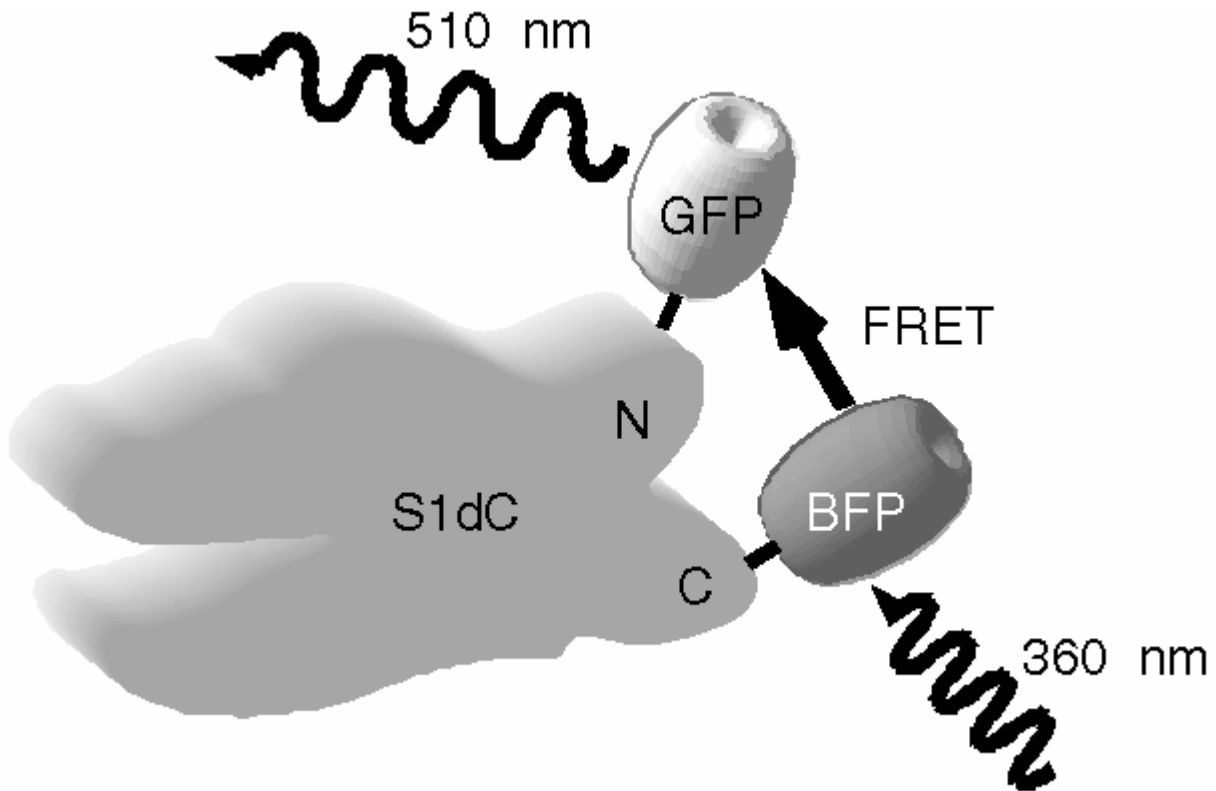
## Zur Hebel-Arm-Hypothese

*Huxley Nature* **396** 317 (1998)

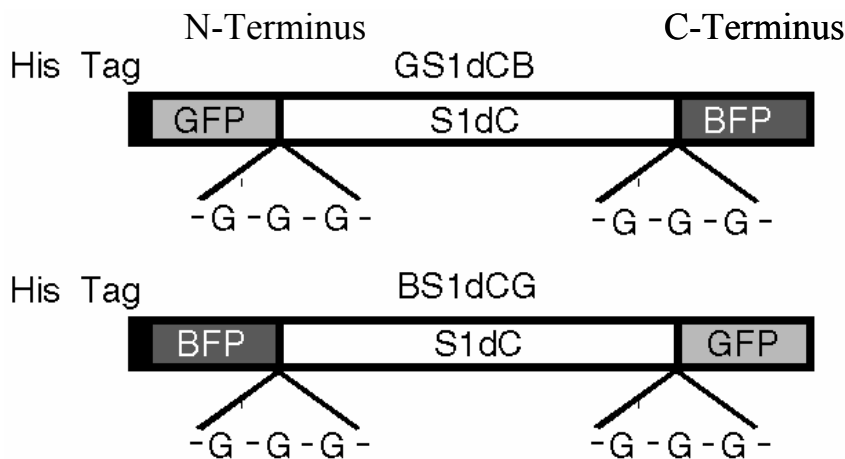


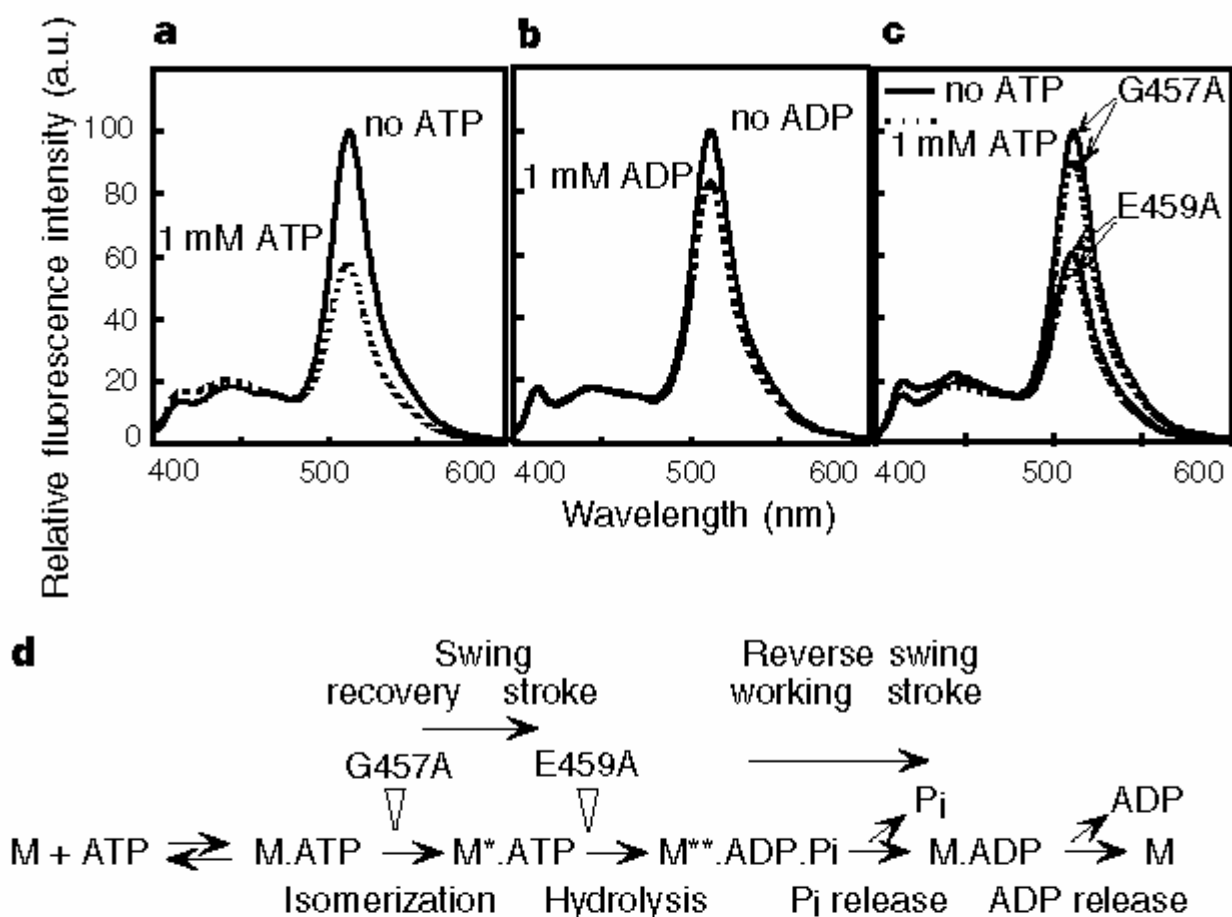
**Figure 1** Presumed shape changes in a representative cross-bridge. a, During active contraction at fixed overall length; b, during rigor. Increase of length corresponds to displacement of the myosin filament to the left. The muscle is being subjected to a length oscillation with 3-nm peak-to-peak amplitude of relative sliding of filaments; the red outlines show the situation at the maximum length and the black outlines at the minimum. In a, the centre of mass of the lever arm is to the left of that of the catalytic domain, so that the contour of total mass of the cross-bridge is more spread out in the stretched case (red) than when shortened (black), respectively decreasing and increasing the intensity of the X-ray reflection corresponding to the repeat of myosin molecules along the filament. The intensity therefore fluctuates in opposite phase to the length. In b, the situation is reversed (centre of mass of the lever arm is to the right of that of the catalytic domain) and the intensity fluctuation is in phase with length.

*Suzuki et al.* benutzten ein Myosin-Fragment, das aus der katalytischen Domäne, dem angenommenen Scharnier und dem Anfang des daran beginnenden Hebelarms bestand.



**Figure 1** Diagrams of the domain of chimaeras made from the incorporation of fluorescent proteins into S1dC. **a**, The GFP, BFP and S1dC domains were connected by flexible spacers consisting of three glycine residues to generate GS1dCB and BS1dCG. **b**, When BFP was excited by light at 360 nm, intramolecular fluorescence resonance energy transfer (FRET) took place and green light was emitted at 510 nm from GFP. The intensity of the emission from GFP depended on the distance between GFP and BFP in the chimaeras.





**Figure 2** The relationship of FRET emission spectra in chimaeric S1dC to the hydrolysis of ATP. **a**, Emission spectra of GS1dCB excited at 360 nm in the presence and absence of ATP. **b**, Emission spectra of GS1dCB in the presence and absence of ADP. **c**, Emission spectra of G457A and E459A mutants of GS1dCB in the presence and absence of ATP. The spectra of the G457A mutant were similar to that of the wild-type chimaera without ATP, whereas those of the E459A mutant were similar to that of the wild-type with ATP. **d**, Intermediate states in the ATPase cycle of myosin<sup>14,15</sup>. M, M\* and M\*\* represent myosin in different conformational states as defined by their optical properties. Steps blocked by the G457A and E459A mutations are indicated by open arrowheads. The swing and reverse swing occur at the stages indicated.

$$E = \frac{F_{\text{FRET}}^A(510 \text{ nm})}{F_{\text{DIR}}^A(510 \text{ nm})} \cdot \frac{\epsilon^A(480 \text{ nm})}{\epsilon^D(360 \text{ nm})} - \frac{\epsilon^A(360 \text{ nm})}{\epsilon^D(360 \text{ nm})}$$

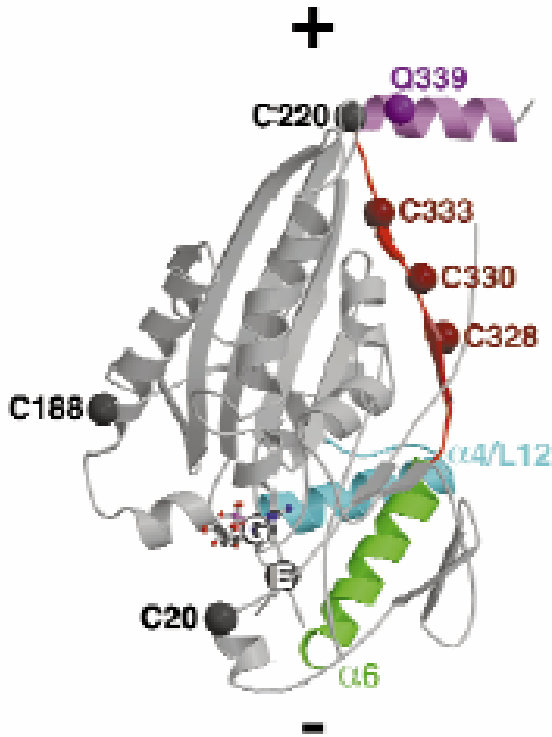
$$J = \int \lambda^4 f_D(\lambda) \epsilon^A(\lambda) d\lambda \approx 7,2 \cdot 10^{-14} \frac{\text{cm}^3}{\text{M}}$$

$$Q_D = 0,15$$

$$n = 1,4 \quad \kappa^2 = \frac{2}{3}$$

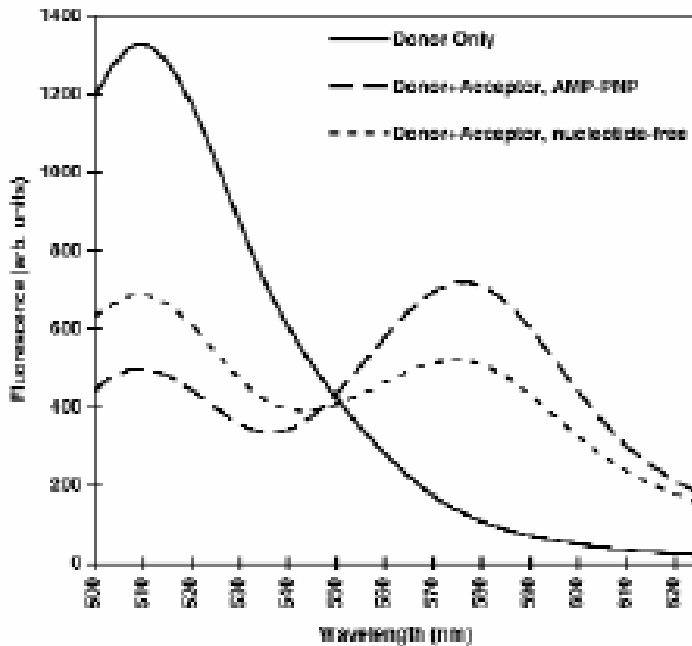
**Anwendungsbeispiel:** FRET an Kinesin, modifiziert mit GFP beginnend bei Q339 und zusätzlichen Cys-Resten zur Markierung mit extrinsischen F-Sonden *Rice et al. Nature* 402 778, (1999)

a



FRET von einem GFP-Donor bei Q339 zu einem Tetramethylrhodamin-Akzeptor bei C220. Die Donor-Fluoreszenz wird je nach Nukleotid-Anwesenheit unterschiedlich auf den Akzeptor übertragen. Die Messung des FRET in unterschiedlichen Nukleotid- und Mikrotubul-Bindungszuständen erlaubt die Ableitung eines strukturellen Modells für die Bewegung des Kinesins entlang eines Mikrotubuls.

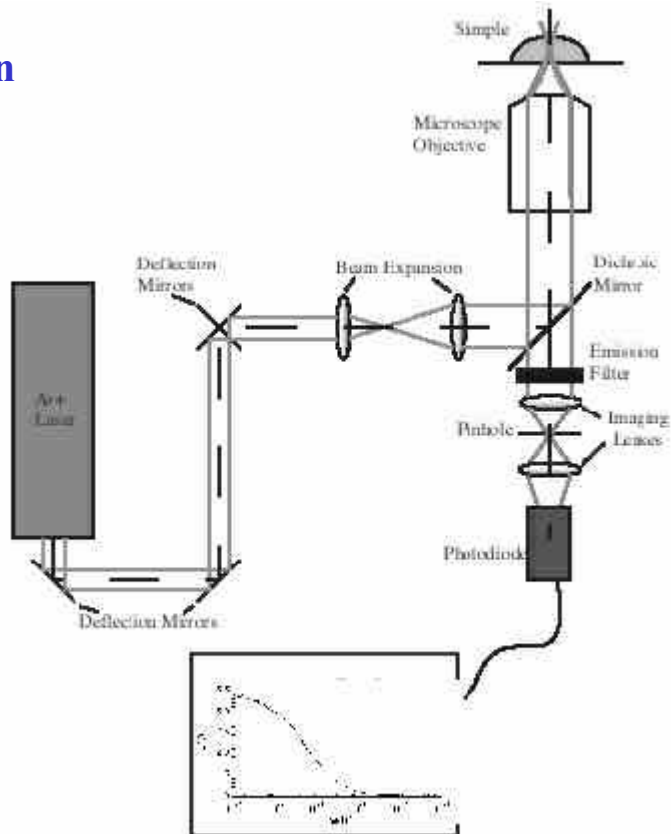
b



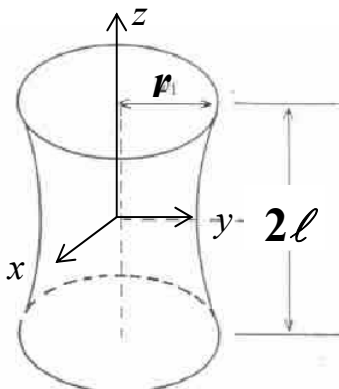


# Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS)

## Apparatur zur Detektion einzelner Moleküle und für FCS-Messungen



Die Fokussierung des Laserstrahls auf die Probe zusammen mit der konfokalen Mikroskopoptik im Detektionszweig (Pinhole  $\approx 50 \mu\text{m}$ ) führt auf ein Detektionsvolumen mit Querschnittsradius  $r \approx 200 \text{ nm}$  und  $l \approx 1000 \text{ nm}$



Das **Messvolumen** beträgt ca.

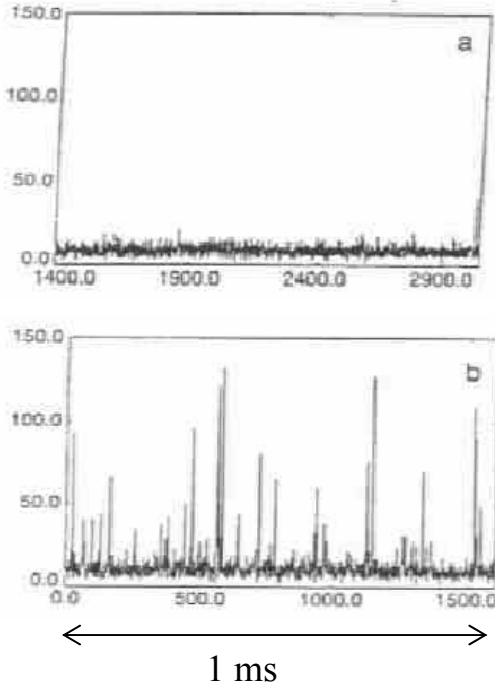
$$V \approx \pi r^2 \cdot 2l \approx 2,5 \cdot 10^{-19} \text{ m}^3 = 0,25 \text{ fl}$$

Bei einer **Konzentration** der Lösung von z. B.  $C = 10^{-9} \text{ M} \approx 6 \cdot 10^{17} \text{ m}^{-3} = \rho$  befinden sich im Mittel im Volumen  $V$

$$\rho \cdot V \approx 0,15 \text{ Moleküle, d. h. weniger als ein Molekül.}$$

Befindet sich **kein Molekül** im Messvolumen, dann registriert der Detektor nur **Rauschen**, z. T. verursacht durch Streustrahlung, die nicht vollständig weggefiltert werden konnte. Diffundiert **ein Molekül** in das Messvolumen, dann wird es durch die Laserstrahlung wiederholt zur Fluoreszenz angeregt und der Detektor registriert **„Fluoreszenz-Quanten-Ausbrüche“** ( fluorescence quantum bursts).

*Eigen und Rigler* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 5740 (1994)



### Rausch-Untergrund

**F-Quanten-Ausbrüche** von einzelnen **RG6-Molekülen**, die durch das Messvolumen diffundieren (Diffusionskoeffizient  $D$ ). Die mittlere Anzahl der RG6-Moleküle im Messvolumen betrug hier  $N \approx 0,04$ . Die Diffusionszeit ( $\approx$  mittlere Aufenthaltszeit im Messvolumen mit Radius  $R_c$ ) ist in diesem Fall

$$\tau_D \approx \frac{R_c^2}{3D} \approx 1 \text{ ms}$$

Die Rate, mit der ein diffundierendes Molekül in das Messvolumen eintritt, ist gegeben durch

$$\frac{1}{\tau_R} = 4\pi R_c D \rho \quad (\text{analog zur bimolekulare Löschungskonstante})$$

Zahlenbeispiel:

$$R_c \approx 10^{-6} \text{ m}$$

$$D \approx 10^{-10} \frac{\text{m}^2}{\text{s}}$$

$$\rho \approx 6 \cdot 10^{14} \text{ m}^{-3} \approx 10^{-12} \text{ M}$$

$$\tau_R \approx \frac{1}{4\pi(10^{-6} \text{ m}) \cdot (10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}) \cdot (6 \cdot 10^{14} \text{ m}^{-3})}$$

$$\tau_R \approx 1 \text{ s}$$

Bei Messzeiten von 15 min kann man dann bis zu  $C \approx 10^{-15} \text{ M}$  beobachten.

# Signalanalyse durch Autokorrelation

Das vom Detektor registrierte Signal  $I(t)$  ist verursacht durch die Fluoreszenzquanten, die das im Messvolumen befindliche Molekül aussendet.  $I(t)$  ist ein stationärer Zufallsprozess. Man zerlegt das Signal in Mittelwert und Abweichung vom Mittelwert :

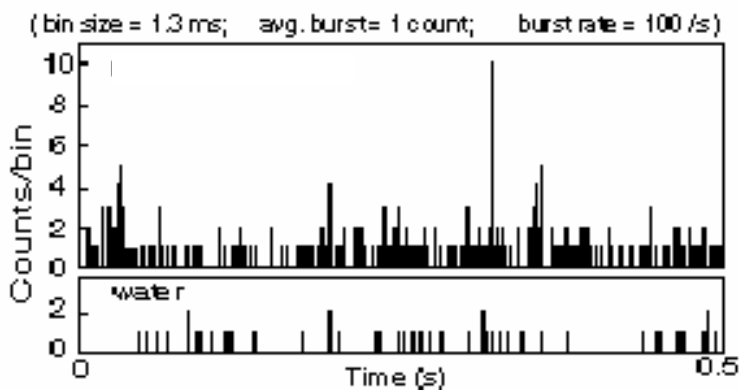
$$I(t) = \langle I(t) \rangle + \delta I(t)$$

$$\langle \delta I(t) \rangle = 0$$

Die AKF dieses stationären Prozesses ist definiert als (s. Vorlesung LS2)

$$G(\tau) \equiv \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{2T} \int_{-T}^T I(t)I(t+\tau)dt = \langle I(0)I(\tau) \rangle = \langle I(t) \rangle^2 + \langle \delta I(0)\delta I(\tau) \rangle$$

**Beispiel:** 60 pM Rhodamin B in Wasser



$I(t)$

Bei

$$C = 60 \text{ pM,}$$

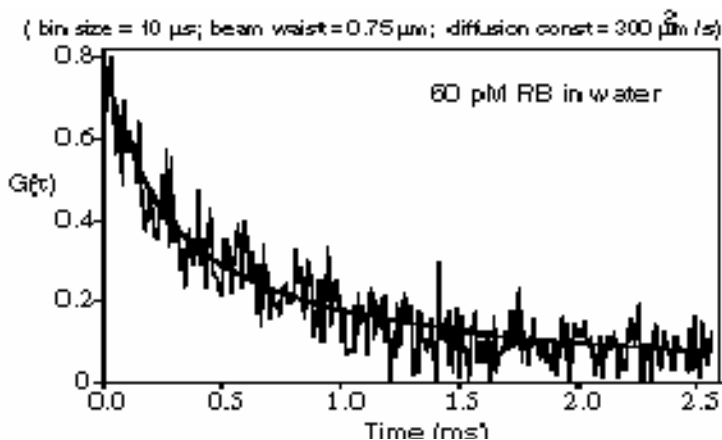
$$D = 3 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$$

$$R_c = 0,75 \text{ } \mu\text{m}$$

ergibt sich für die F-Quanten-Ausbruchsrate

$$\frac{1}{\tau_R} \approx 4\pi R_c D \rho \approx 4\pi (0,75 \cdot 10^{-6} \text{ m}) \left( 3 \cdot 10^{-10} \frac{\text{m}^2}{\text{s}} \right) \left( \frac{60 \cdot 10^{-12} \cdot 6 \cdot 10^{26}}{\text{m}^3} \right) \approx \frac{100}{\text{s}}$$

$$N = \rho V \approx 0,06$$



$$G(\tau) = \langle I(t)I(t+\tau) \rangle$$

Untersuchung einzelner Bursts durch Bildung der AKF

Zur theoretischen Behandlung führen wir die normierte AKF  $g(\tau)$  ein

$$g(\tau) \equiv \frac{G(\tau)}{\langle I(t) \rangle^2} = 1 + \frac{\langle \delta I(0) \delta I(\tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} = 1 + \frac{\langle \delta I(0)^2 \rangle}{\langle I(0) \rangle^2} \cdot \frac{\langle \delta I(0) \delta I(\tau) \rangle}{\langle \delta I(0)^2 \rangle}$$

Der PMT-Strom  $I(t)$  ist proportional zur Anzahl der z. Zt.  $t$  vom SEV registrierten Photonen und diese Anzahl ist wiederum proportional zur Anzahl der im Messvolumen vorhandenen F-Sonden. Zu jedem gegebenen Zeitpunkt (z. B.  $t = 0$ ) ist die Zahl  $n$  der sich im Messvolumen befindlichen F-Sonden klein (Mittelwert  $N$ ) und man kann annehmen, dass die Zufallszahl  $n$  einer **Poisson-Verteilung** genügt:

$$p(n) = \frac{N^n}{n!} e^{-N}$$

Wahrscheinlichkeit dafür, dass sich im Messvolumen  $n$  Teilchen befinden

$$\langle n \rangle = \sum_{n=0}^{\infty} n \cdot p(n) = N$$

Mittlere Anzahl der Teilchen im Messvolumen

$$\langle n^2 \rangle = \sum_{n=0}^{\infty} n^2 \cdot p(n) = N^2 + N$$

Mittleres Quadrat der Anzahl der Teilchen im Messvolumen

Wir können damit den Wert der normierten AKF für  $\tau = 0$  berechnen:

$$g(0) = 1 + \frac{\langle \delta I(0)^2 \rangle}{\langle I(0) \rangle^2} = 1 + \frac{\langle \delta n^2 \rangle}{\langle n \rangle^2} = 1 + \frac{\langle n^2 \rangle - \langle n \rangle^2}{\langle n \rangle^2} = 1 + \frac{1}{N}$$

Die normierte AKF des PMT-Stroms wird damit zu

$$g(\tau) = 1 + \frac{1}{N} g_1(\tau)$$

$$g_1(\tau) \equiv \frac{\langle \delta I(0) \delta I(\tau) \rangle}{\langle \delta I(0)^2 \rangle}$$

Normierte AKF der Intensitätsfluktuationen des Fluoreszenzlichts eines Teilchens im Messvolumen

# Berechnung der normierten AKF $g_1(\tau)$ eines im Messvolumen $V$ diffundierenden Teilchens

Die Intensität des vom Teilchen am Ort  $(x,y,z)$  im Messvolumen emittierten Fluoreszenzlichts ist proportional zur Intensität des fokussierten Laserlichts an dieser Stelle. Wenn man ein Gauß-Profil der Intensität des Laserlichts im Messvolumen (Abklingradius  $r/2$ , Abklinglänge  $\ell/2$ ) annimmt,

$$I(x, y, z) = I_0 e^{-\frac{2(x^2+y^2)}{r^2} - \frac{2z^2}{\ell^2}}$$

und das Teilchen mit der Diffusionskonstante  $D$  isotrop diffundiert, dann gilt

$$g_1(\tau) = g_{1x}(\tau) g_{1y}(\tau) g_{1z}(\tau)$$

mit

$$g_{1x}(\tau) = \frac{2}{\sqrt{\pi r^2}} \int_{-\infty}^{+\infty} dx \int_{-\infty}^{+\infty} dx' e^{-\frac{2x^2}{r^2}} e^{-\frac{2x'^2}{r^2}} \frac{e^{-\frac{(x'-x)^2}{4D\tau}}}{\sqrt{4\pi D\tau}} = \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{4D\tau}{r^2}}},$$

denn ein zur Zeit  $t = 0$  bei  $x$  sich befindendes Teilchen ist in der Zeit  $\tau$  zum Ort  $x'$  diffundiert mit der bedingten Wahrscheinlichkeit

$$p(x, 0 | x' \tau) = \frac{e^{-\frac{(x'-x)^2}{4D\tau}}}{\sqrt{4\pi D\tau}}$$

Die Korrelationsfunktionen  $g_{1y}$  und  $g_{1z}$  berechnen sich analog, so dass man für die normierte AKF des beobachteten Fluoreszenzlichts erhält:

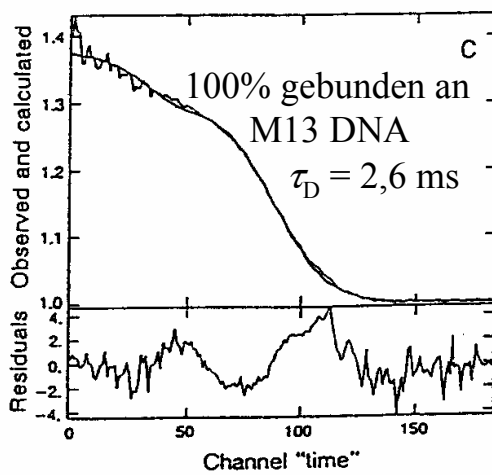
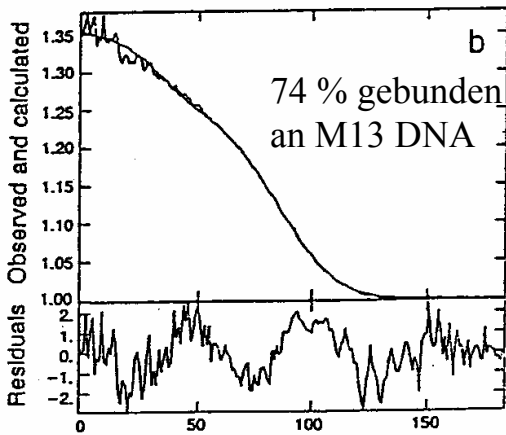
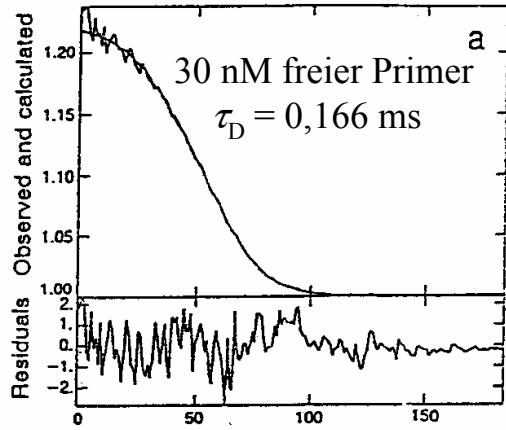
$$g(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \cdot \frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_{\text{Diff}}}} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + \left(\frac{r}{\ell}\right)^2 \frac{\tau}{\tau_{\text{Diff}}}}}$$

mit

$$\tau_{\text{Diff}} \equiv \frac{r^2}{4D}$$

**Anwendungsbeispiel:** AKF von M13 mp 18 (t) DNA primer, fluoreszenzmarkiert mit Bodipy

*Eigen und Rigler*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 5740 (1994)

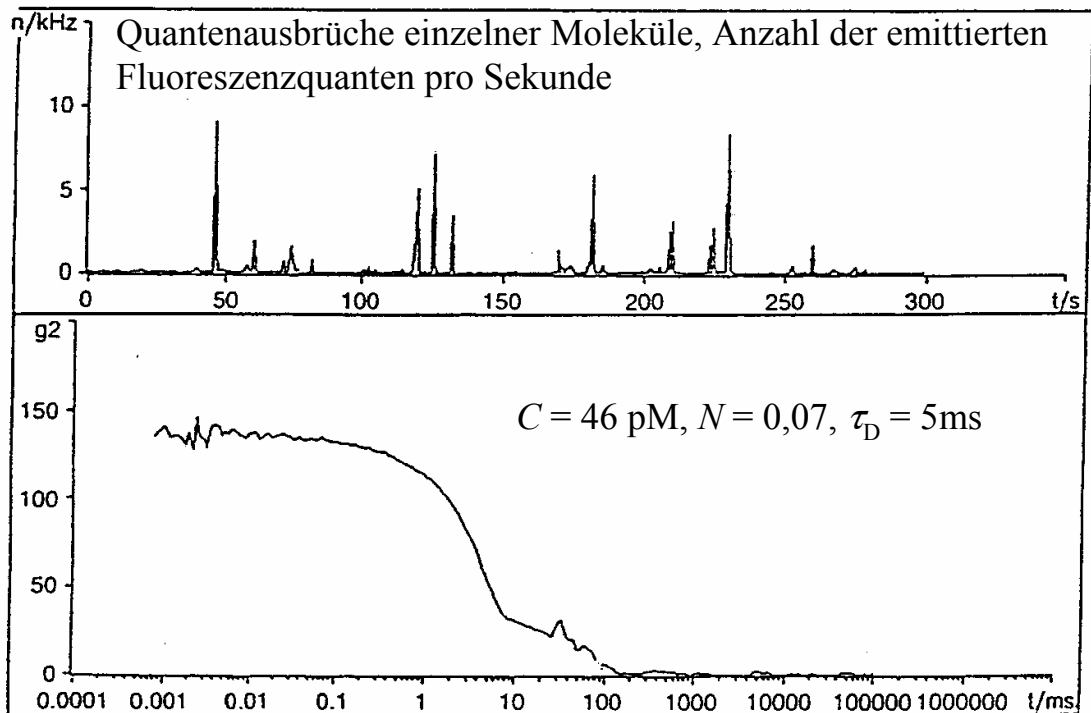


Typische AKF eines 18 Basenpaare umfassenden und mit dem kommerziellen Fluoreszenzstoff Bodipy markierten Primers zur Identifikation der DNA des Phagen M13. Die Diffusionszeit des reinen Primers ist etwa 0,16 ms. Nach Hybridisierung mit der M13-DNA vergrößert sich diese Zeit auf 2,6 ms.

## Anwendung der **FCS zum Nachweis einzelner Viren**

Subnanomolare Konzentrationen von DNA-Molekülen können durch fluoreszierende Primer nachgewiesen werden.

**Beispiel:** Identifikation einzelner Virus-Partikel durch spezifische Fluoreszenzmarkierung *Eigen, Rigler* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 5740 (1994)



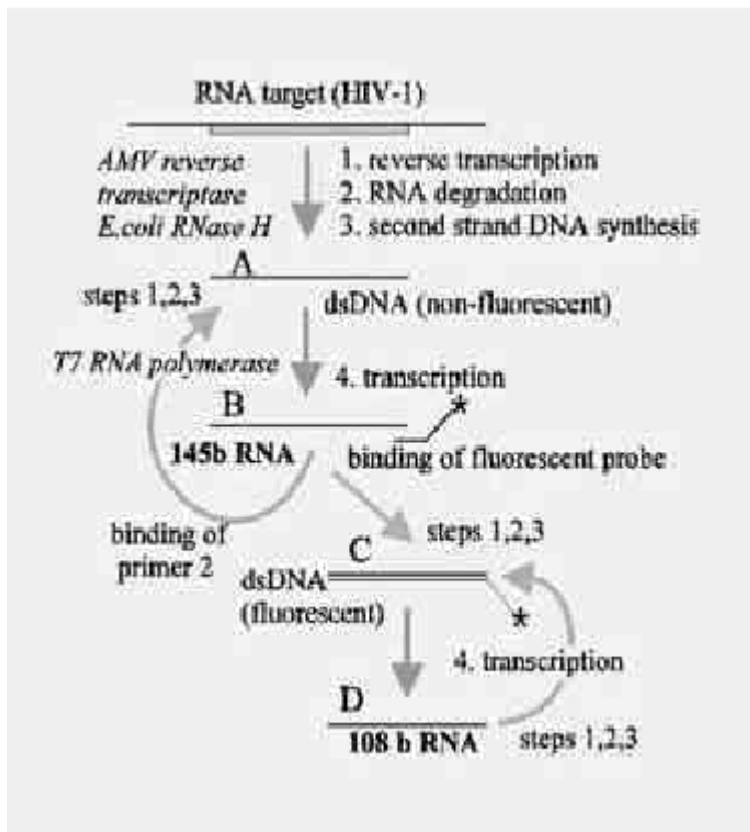
Autokorrelationsfunktion von Rhodamin-markierten M13-DNA-Molekülen.

# Nachweis von HIV-1 RNA durch NASBA kombiniert mit FCS

## Nucleic Acid Sequence-Based Amplification = NASBA

Alternative Methode zur PCR (Polymerase Chain Reaction) ohne Thermozyklen, gestattet den Nachweis von HIV-1 RNA im Plasma bis hinab zu 100 ursprünglich vorhandenen Molekülen pro ml Plasma durch Verstärkung der RNA-Target Moleküle. Die Prozessführung erfolgt bei ca. 42 °C.

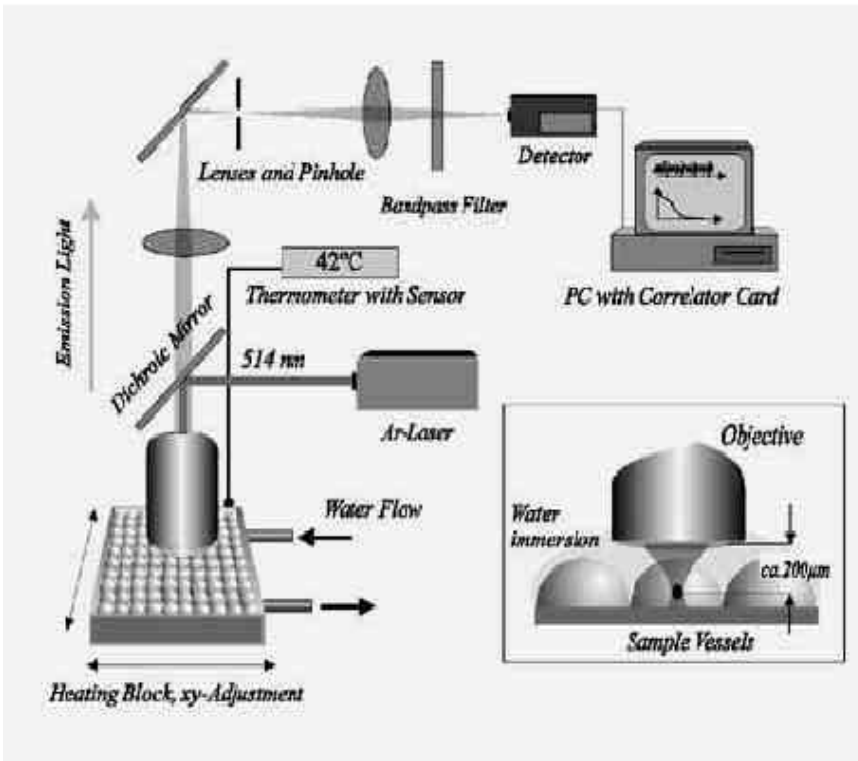
NASBA Prozessführung:



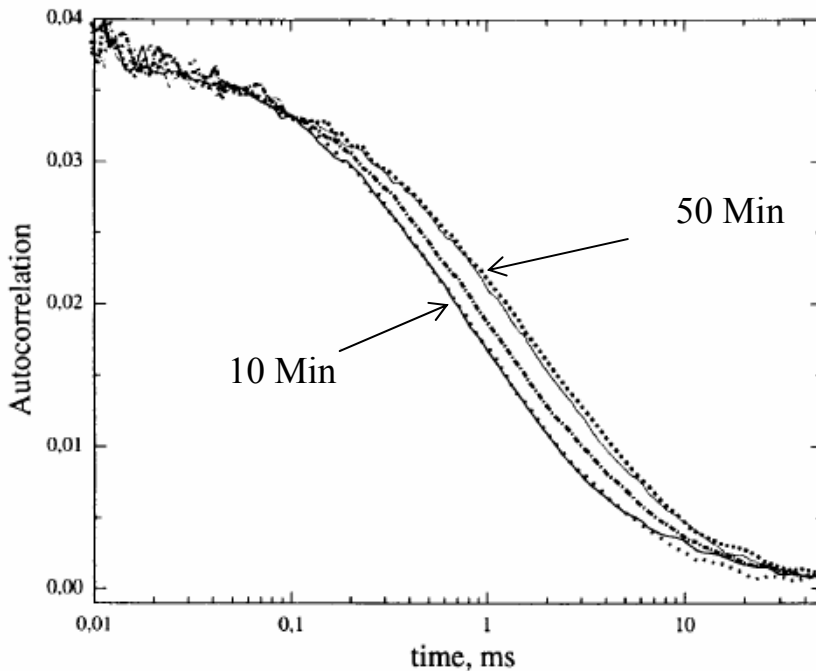
Die RNA-Target-Moleküle (9,2 kbp) werden revers transkribiert durch eine entsprechende Transkriptase, gefolgt von der Synthese des zweiten DNA-Strangs und anschließender Transkription der erzeugten doppelsträngigen DNA durch T7 RNA-Polymerase. Dabei entstehen RNA-Moleküle, die gegensinnig zu den Target-RNA-Molekülen sind und die in der zyklischen Phase von NASBA vervielfältigt werden. Durch Einbindung eines fluoreszierenden Primers in diese zyklische Phase wird die Nachweisempfindlichkeit deutlich erhöht **Oehlenschläger** et al. Proc. Natl. Acad. Sci USA 93 (1996)

Der fluoreszierende Primer bindet an eine spezifische Sequenz der verstärkten RNA-Moleküle. Die zunehmende Hybridisierung des Primers im Laufe der Verstärkung wird online mit FCS durch Registrierung des Anwachsens der Diffusionszeit nachgewiesen.





Proben können abgerastert werden



Verschiebung der FCS-AKF-Kurven im Verlauf von NASBA

*Schwille et al.*

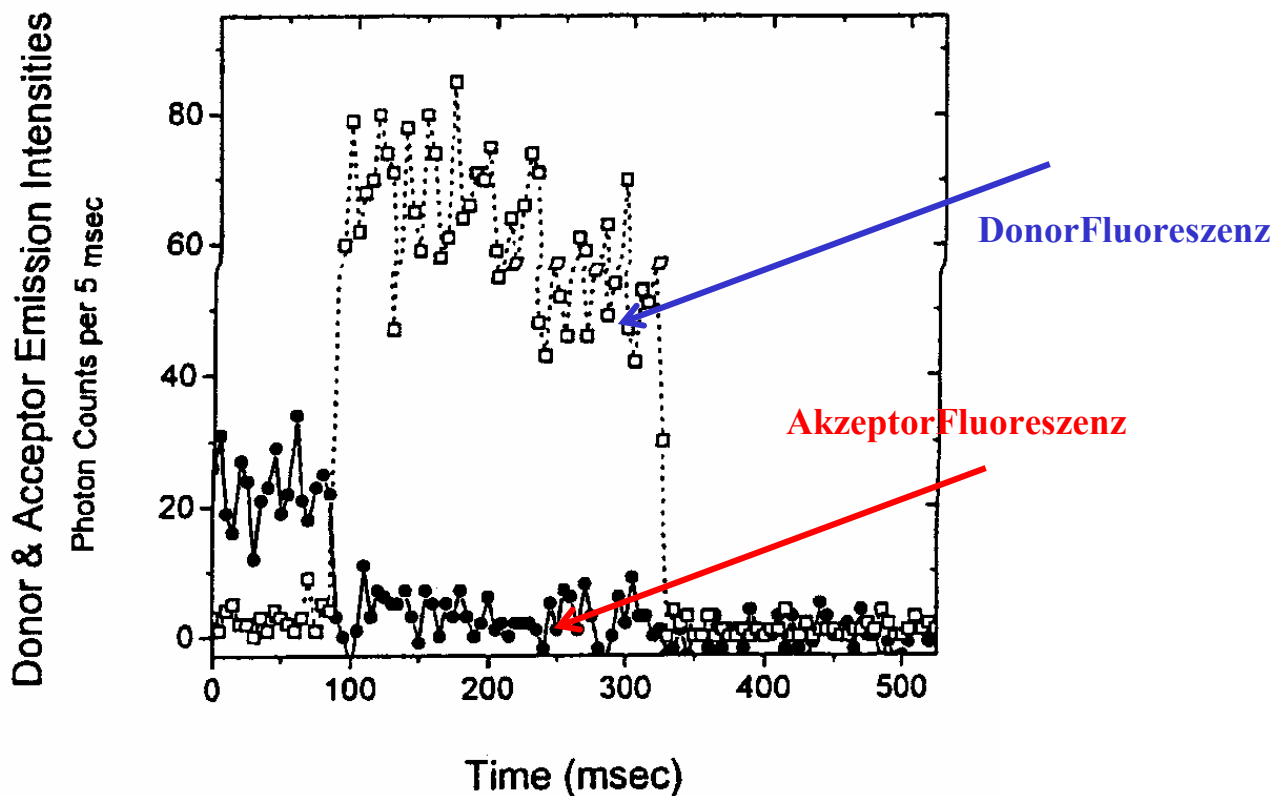
Cytometry 36 176 (1999)

Anfängliche HIV-1 RNA-Anzahl:  
5000 Moleküle pro ml Plasma. ( $\approx 10^{-17}$  M)

# FRET in Einzelmolekülen

FRET-Messungen zwischen einem Donor und einem Akzeptor in einem Biomolekül (sp-FRET) kann Informationen über die Dynamik der Entfernungsfuktuationen zwischen der D- und der A-Region des Biomoleküls liefern.

Im Gegensatz zum Ensemble-FRET, bei dem nur Mittelwerte von Abständen ermittelt werden, kann man bei Einzelmolekül-FRET relativ direkt die Verteilung der Abstände und ihrer Dynamik bestimmen.

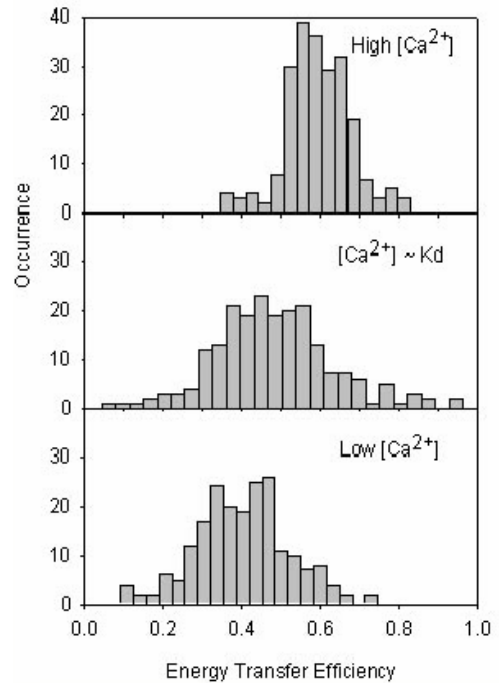
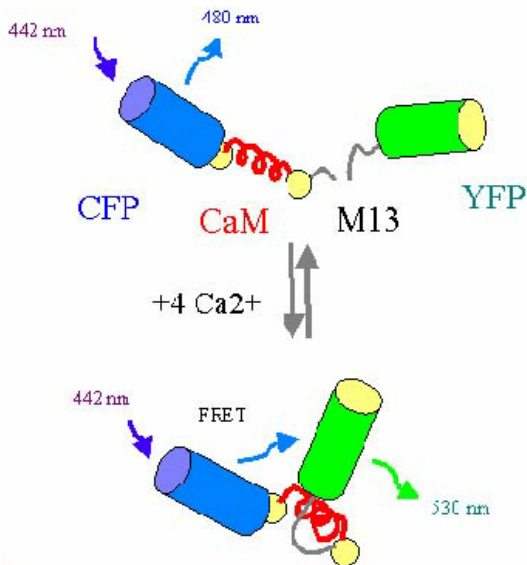


Die doppelt markierten Moleküle werden im Laserfokus positioniert (Einschränkung Fortbewegung z. B. durch Einbettung in Gel bzw. Oberflächenverankerung).

$$E(t) = \frac{1}{1 + \gamma \frac{F_D(t)}{F_A(t)}}$$

Kalibrierungsfaktor  $\gamma$

**Anwendung von Mutanten des GFP** (hier CFP und YFP) als  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensor in Zellen (*Brasselet et al.* J. Phys. Chem. B104 3676 (2000)).



Das dunkelblau (cyan) fluoreszierende Protein CFP ist von dem gelb fluoreszierenden Protein YFP durch das Calmodulin / $\text{Ca}^{2+}$  -Bindungsprotein CAM und ein Calmodulin-bindendes Peptid M13 getrennt. Bei der Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen an den Komplex erfolgt eine Bindung des Calmodulins an M13 und diese Konformationsänderung bewirkt, dass der FRET CFP→YFP effektiver wird.

Dieser Komplex kann daher als Ca-Ionen Sensor in einer Zelle verwendet werden.

Die Einzelmolekül-FRET-Effektivität zeigt eine Verteilungsbreite, die bei der Gleichgewichtskonzentration am breitesten ist. Dies ist konsistent mit der Kinetik der Ligandenbindung, die in der Nähe des Gleichgewichts die größten Fluktuationen vorhersagt.

Die Integrationszeit bei den Messungen betrug 20 ms.

Die Reorientierung der F-Emissions- und F-Absorptionsdipole erfolgt schnell gegenüber der Integrationszeit, aber langsam im Vergleich zur Fluoreszenzlebensdauer.

Der resonante Fluoreszenztransfer CFP→YFP erfolgt in der 20 ms ...100 ms-Zeitskala.