Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung 7

2 Einleitung 9

3 Theoretische Grundlagen 11

3.1 Grundlagen der Fluoreszenz 11

3.2 Fluoreszenz über Zweiphotonen-Anregung 14

3.2.1 Vorteile der Zweiphotonen-Anregung 15

3.3 Kenngrößen der Fluoreszenz 16

3.3.1 Die Fluoreszenzlebensdauer 16

3.3.2 Photobleaching und Quenching 18

3.3.3 Resonanter Energie-Transfer 19

3.4 Das Messsystem 23

3.4.1 Konfokale Einzelmolekülspektroskopie 23

3.4.2 Störsignale bei der Fluoreszenzmessung 24

3.4.3 Gepulste Titan-Saphir Lasersysteme 25

3.4.4 Lawinenphotodioden 27

3.4.5 Zeitkorreliertes Einzelphotonenzählen 27

3.5 Kurvenanpassung mit dem Levenberg-Marquardt-Algorithmus 30

3.6 Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie 31

3.6.1 Die Autokorrelationsfunktion 31

3.6.2 Die Fluoreszenz-Kreuzkorrelations-Spektroskopie 35

3.6.3 Fokalvolumeneffekte auf die FCS Analyse 37

4 Experimenteller Teil 41

4.1 Die Messapparatur 41

4.1.1 Der Titan-Saphir Laser 41

4.1.2 Der konfokale Fluoreszenzmikroskopaufbau 42

4.1.3 Die Avalanche Photodioden 44

4.1.4 Die Datenaufnahme und Speicherstruktur 45

4.2 Die verwendeten Proben 46

4.3 Einphotonen-Absorptionsspektren 48

4.4 Einphotonen-Emissionsspektren 48

4.5 Zweiphotonen-Emissionsspektren 48

5 Datenauswertung 49

5.1 Datensegmentierung und Glätten 49

5.2 Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer 50

5.3 Autokorrelations- und Kreuzkorrelationsanalyse 51

5.4 Bursterkennung und –validierung 53

5.5 Burstcharakterisierung 56

5.6 Generierung der Identifikationsfilterfunktionen 57

5.6.1 Der Lebensdauerfilter 57
5.6.2 Der Verhältnisfilter 58
5.6.3 Der Segmentfilter 58

5.7 Burstidentifikation 60

5.7.1 Identifikation mit Lebensdauer- und Verhältnisfiltern 60
5.7.2 Identifikation mit dem Segmentfilter 61

6 Ergebnisse 64

6.1 Charakterisierung der Nanosphere-Typen 64

6.1.1 Absorptions- und Emissionsspektren 64
6.1.2 Zeitspuren und prozentuale Gesamtphotonenverteilung auf die Detektoren 70
6.1.3 Gesamtfluoreszenzlebensdauern 73
6.1.4 FCS-Messungen 80
6.1.5 Auswahl der Typen für die Burstidentifiktionsanalyse 83

6.2 Charakterisierung der Filterverteilungen 84

6.2.1 Charakteristika der Lebensdauerfilter 84
6.2.2 Charakteristika der Verhältnisfilter 87
6.2.3 Charakteristika der Segmentfilter 90

6.3 Anwendungen der Filterfunktionen 96

6.3.1 Simulation von Burstüberlappungen 96

6.3.2 Identifikationsresultate bei typenreinen Proben 101

6.3.3 Identifikationsresultate bei Mischungen mehrerer Typen 103

7 Ausblick 109

A Abbildungsverzeichnis 113

B Abkürzungsverzeichnis 116

C Quellcode des Hauptprogramms 117

D Quellcode der Zeitspuren 121

E Quellcode der Ensemble-fluoreszenzlebensdauern 122

F Quellcode der FCS und FCCS Bestimmung 124

G Quellcode der Burstfindung 125

H Quellcode der Burstcharakterisierung 127

I Quellcode der Burstidentifikation 129

J Quellcode der Burstsimulation 131

K Quellcode der Bursthistogramme 132

L Quellcode des Filterschreibens und -lesens 135

M Quellcode der Grenzwertfindung 137

N Literaturverzeichnis 138

Danksagung 145

Lebenslauf 146