

Časově rozlišená fluorescence

Pokročilé biofyzikální metody v experimentální biologii

Ctirad Hofr



Ustálená a časově rozlišená fluorescence

- **Ustálená fluorescence** (Steady State) se měří při buzení kontinuálním zářením a dostáváme potom časovou střední hodnotu intenzity či polarizace fluorescence.
- **Časově rozlišená fluorescence** se měří pomocí pulzní excitace (délka pulzu je obvykle kratší než doba dohasínání fluorescence vzorku) nebo fázově modulovaného budícího záření a umožňuje analyzovat časové závislosti měřených parametrů.

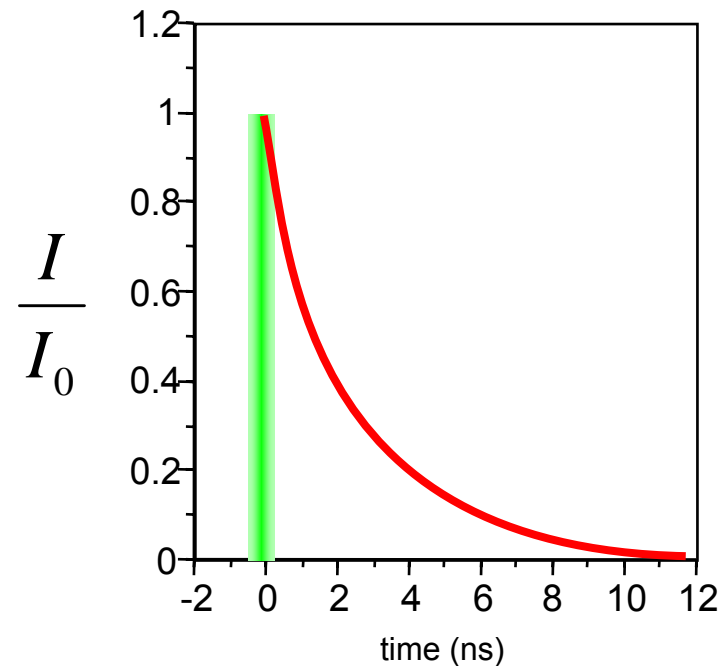
Proč měřit časově rozlišenou fluorescenci?

- Udává nám informaci o poklesu intenzity fluorescence v čase
- Měření je relativní, často nezáleží na skutečné hodnotě intenzity
- Je závislá na vlastnostech okolí
- Dává informace o dynamice – rotaci molekul

Časový průběh fluorescence

- Nejjednodušší je exponenciální pokles pro sférické částice

$$I_{(t)} = I_0 e^{-t/\tau}$$



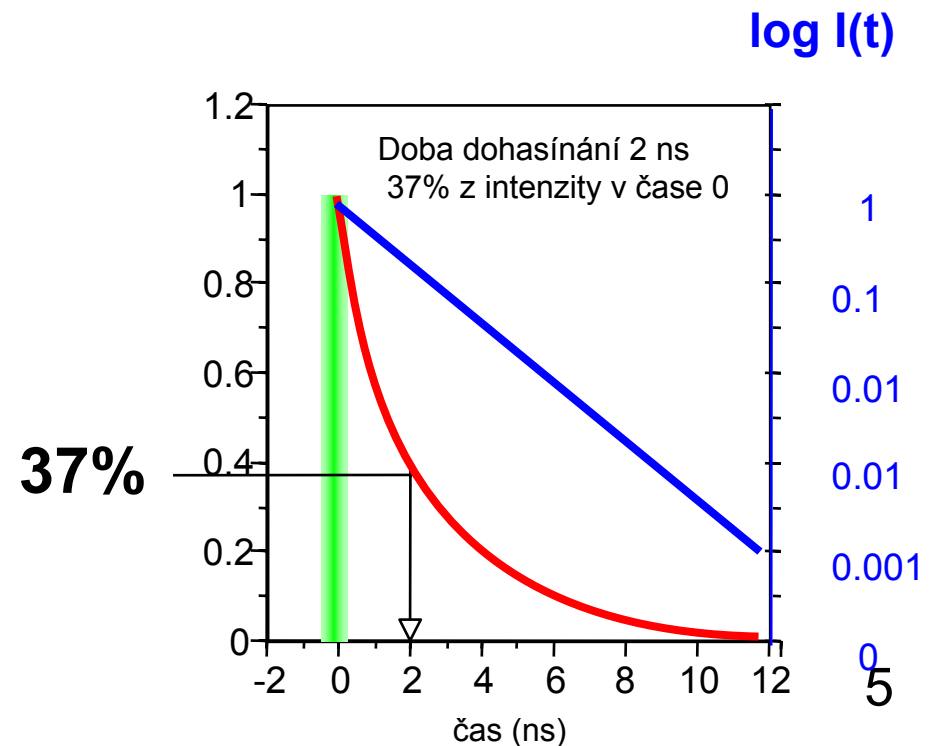
Čas dohasínání fluorescence τ

- τ je střední doba mezi excitací molekuly (tj. absorpcí fotonu) a emisí světla při návratu molekuly do základního stavu

Jaká je intenzita fluorescence v čase τ po absorpci fotonu?

$$I_{(t)} = I_0 e^{-t/\tau}$$

Doba dohasínání $\tau = 2$ ns, potom v tomto čase $t = \tau$ má fluorescence 37% z intenzity než jakou měla čase 0

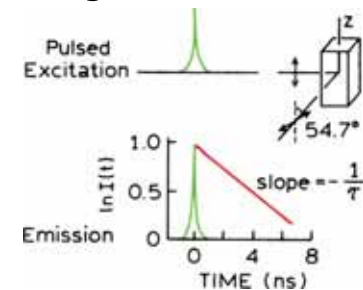


Proč měřit dobu dohasínání fluorescence τ ?

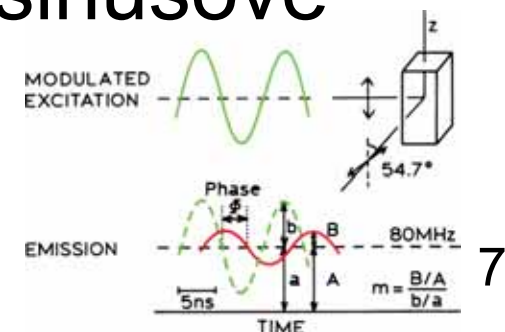
- Absolutní měření – doba dohasínání nezávisí na koncentraci vzorku
- Doba dohasínání je závislá na okolním prostředí a může být použita k určení jeho polarity, pH, teploty, koncentrace iontů, přítomnosti zhašedla
- Přidává další rozměr při fluorescenčním mapování – zvyšuje jeho selektivitu
- Umožňuje měřit rotační korelační čas molekul – rotační pohyblivost

Hlavní způsoby měření časové závislosti fluorescence

- **Pulzní metoda (time-domain)** zdrojem excitačního záření je krátký pulz

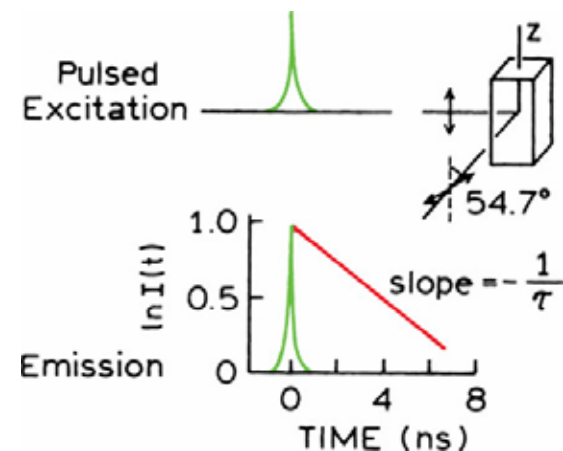


- **Metoda fázově modulovaného budícího záření (frequency domain)** zdrojem excitačního záření je sinusově modulované světlo



Pulzní metoda

- Vzorek je excitován krátkým pulzem s trváním mnohem kratším než doba dohasínání τ
- Závislost intenzity fluorescence na čase (dohasínání) je použita pro výpočet doby dohasínání τ



Počítání fotonů: Time-Correlated Single Photon Counting TSCP

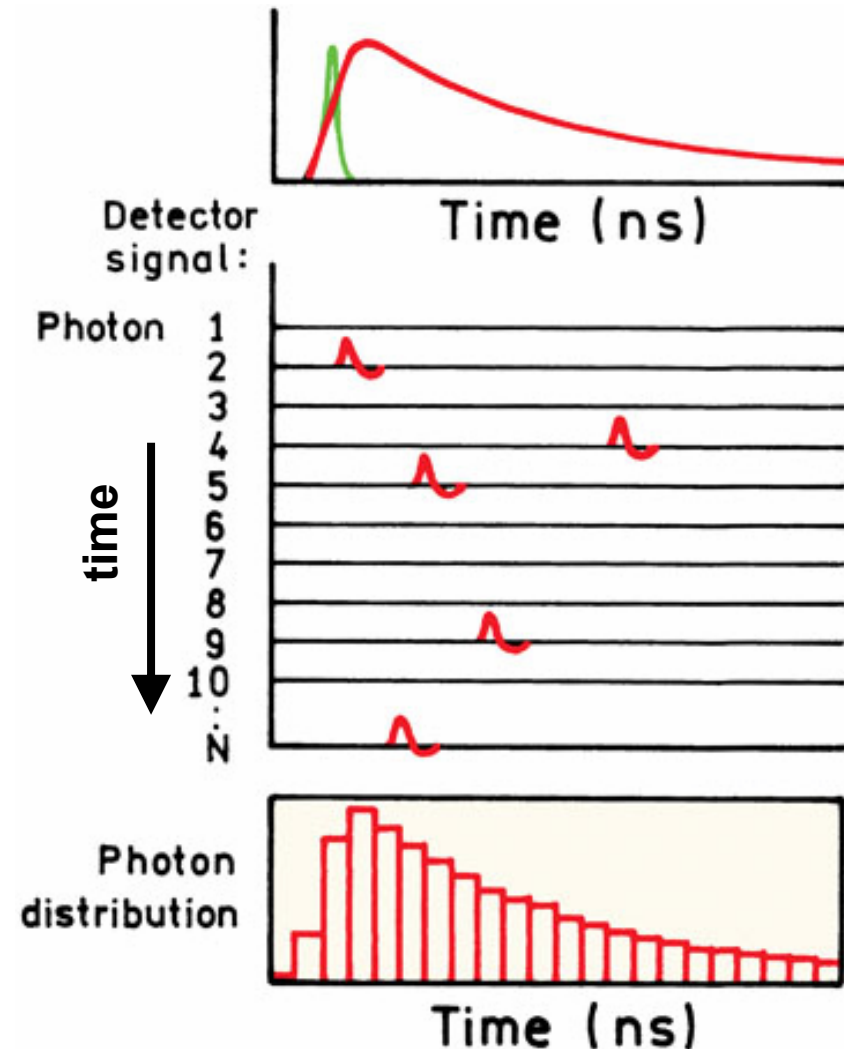
Při každém pulzu excitačního světla může být zaznamenán jeden emitovaný foton.

Typické uspořádání je, že jeden foton připadá na 100 excitačních pulzů.

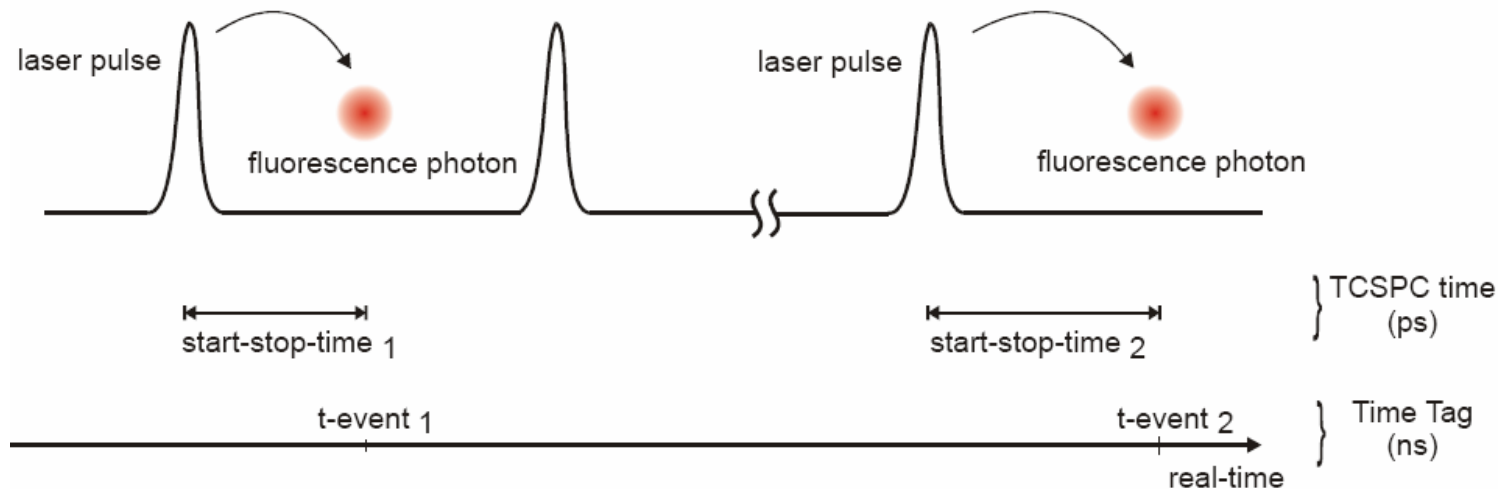
Měří se čas mezi excitačním pulzem a zaznamenaným fotonem.

Vytváří se histogram, který znázorňuje časovou distribuci fotonů

Pro vyhodnocení křivky dohasínání je potřeba mít soubor alespoň 4000 fotonů



Časové značení fotonu (Time Tagged Time-Resolved)



- Zapisuje se nejen čas vyzáření fotonu po jednotlivém pulzu (start-stop-time; ps), ale také čas od začátku experimentu (real-time; ns)

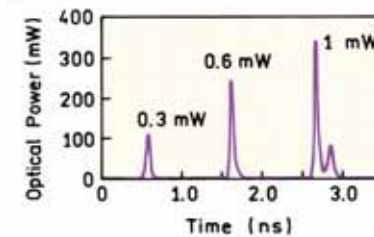
Podle firemní literatury PicoQuant http://www.picoquant.com/dl_notes/TechNote_TTTR.pdf

Zdroje pro TCSPC

Laserové diody

Šířka pulzu FWHM = 70 ps (plná šířka v polovině maxima)

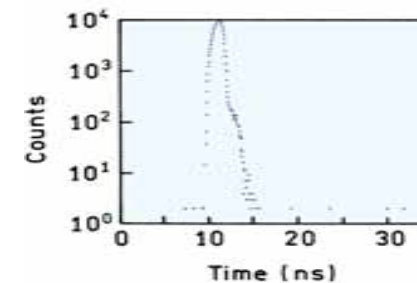
Rychlost opakování pulzu 40 MHz



LED (Light Emitting Diode)

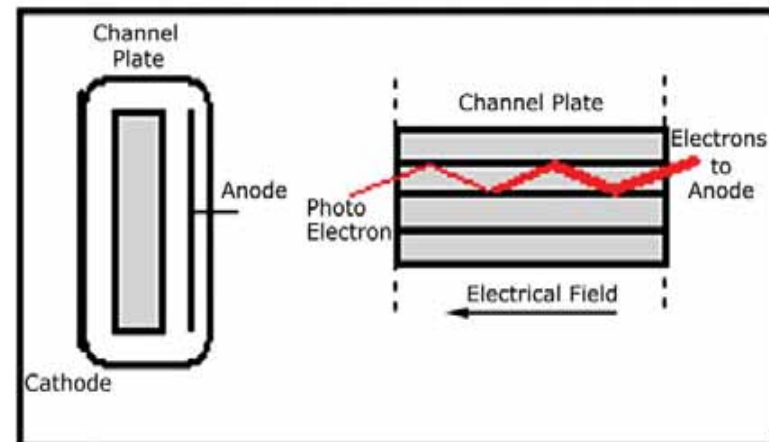
FWHM = 1,4 ns (plná šířka v polovině maxima)

Rychlost opakování pulzu 40 MHz

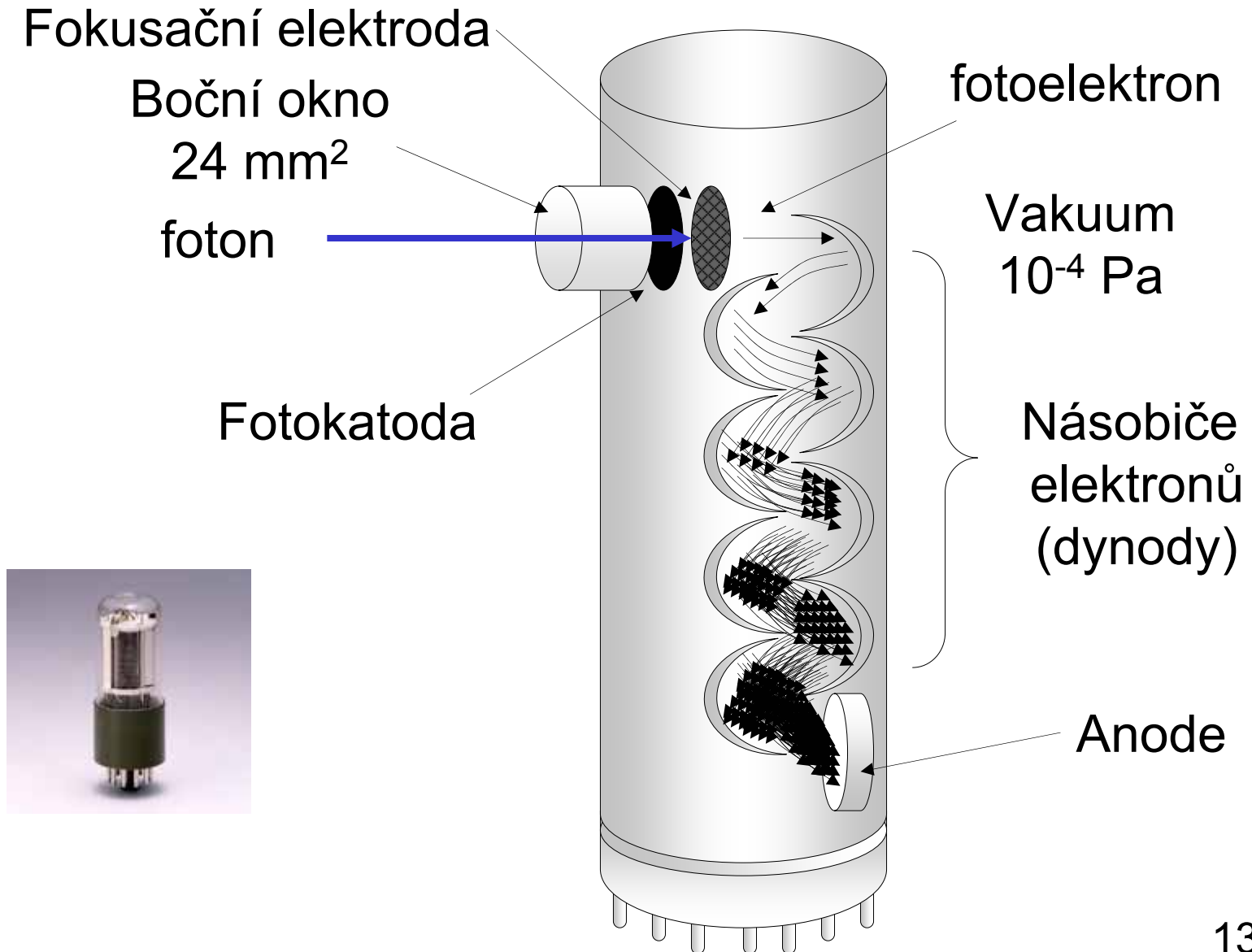


Rychlý detektor (MCP PMT)

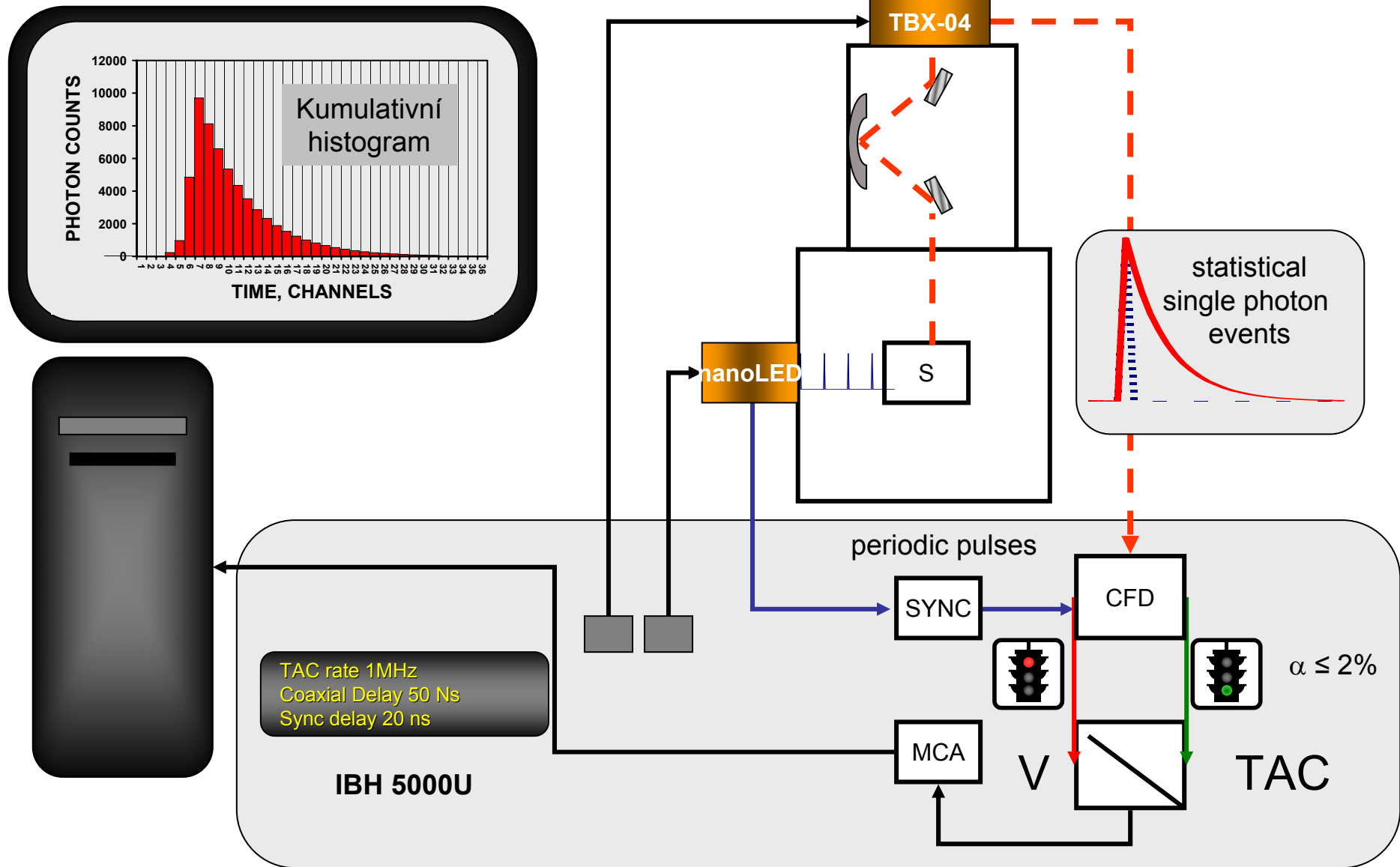
- Je nejdůležitější při sledování časové závislosti fluorescence
- V současnosti jsou nejrychlejší mikrokanálové deskové fotonásobiče (MicroChannel Plate PhotoMultiplier Tube)
- Mají rychlou odezvu, elektron putuje v detektoru méně než 1 ns. Ve srovnání s klasickým fotonásobičem je odezva 10 krát rychlejší.



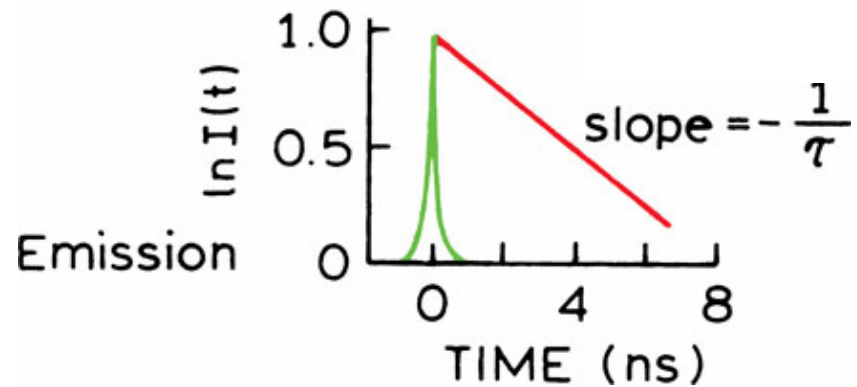
Detektor - fotonásobič



Princip přístroje s TCSPC



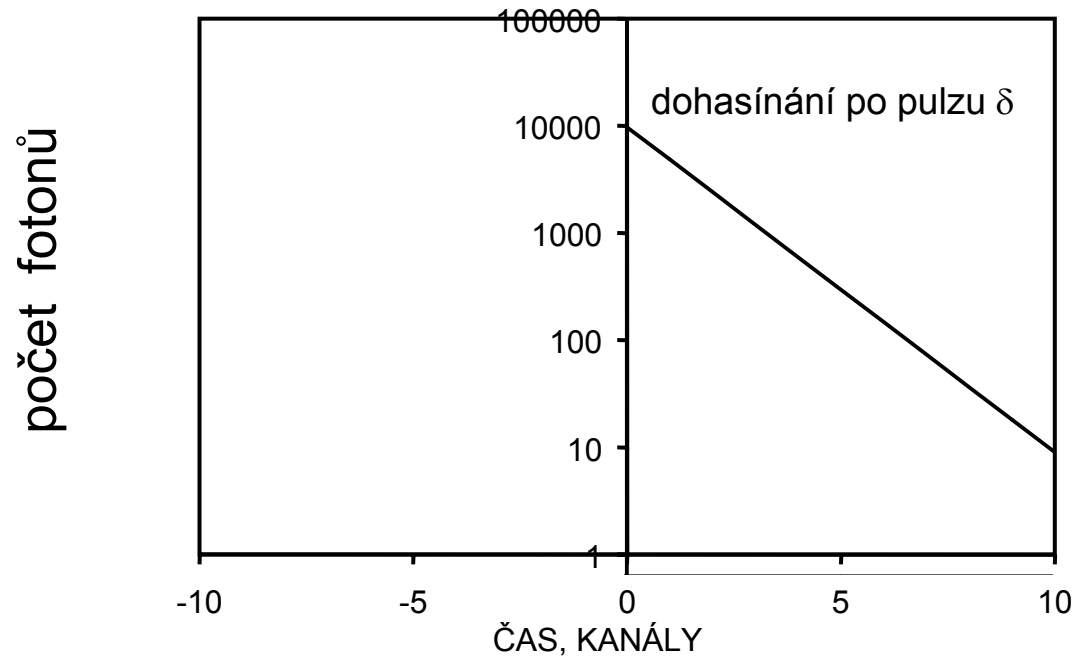
Praktické určení τ



$$I_{(t)} = I_0 e^{-t/\tau}$$

$$I_{(\tau)} = I_0 e^{-1} = I_0 \cdot 0.37$$

Princip skládání (konvoluce) signálů

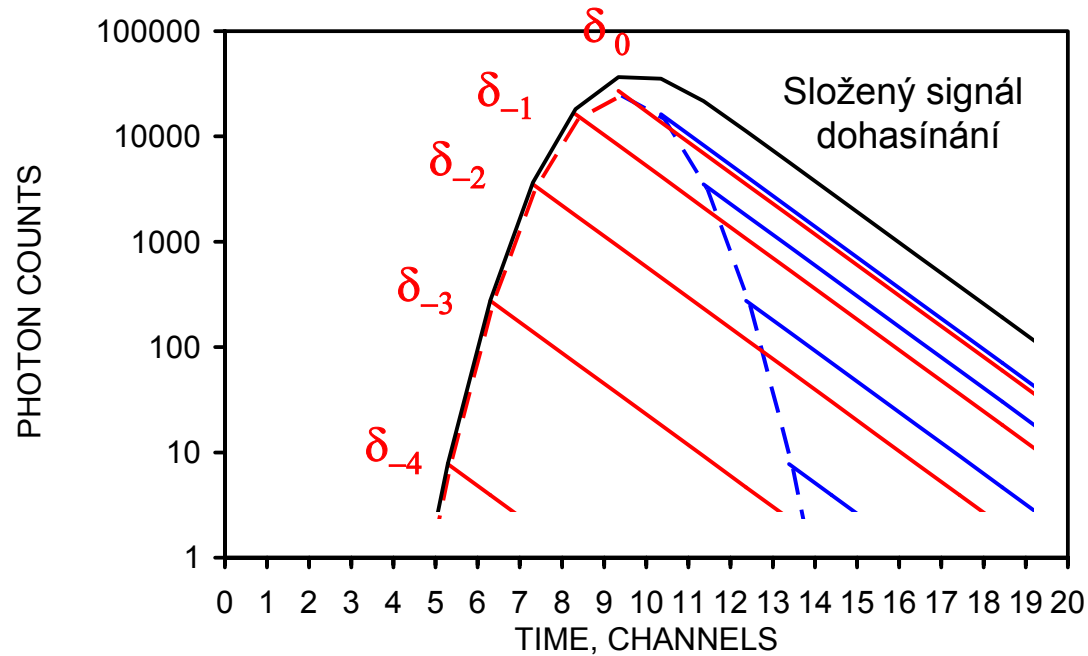


Intenzita je funkcí času:

$$I(t) = \alpha \exp(-t/\tau)$$

Intenzita zdroje světla
je také funkcí času

$$L(t)$$



Konvoluce fluorescence :

$$F(t) = I(t) \otimes L(t)$$

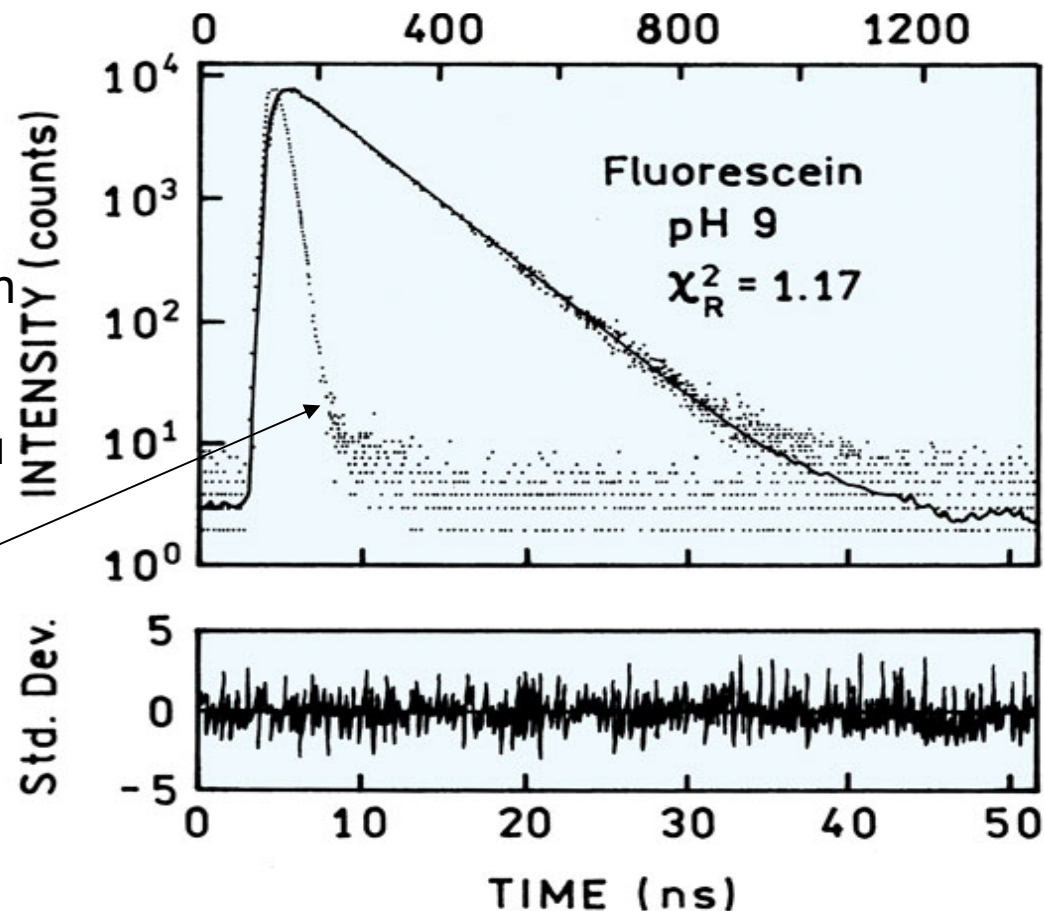
Časově rozlišená fluorescence fluoresceinu

- Fluorescein ve vodě při pH 9.0
- Excitace 450 nm
- Pulzní LED s opakovací frekvencí 20 MHz

IRF Instrument Response Function
signál zdroje a odezva přístroje

IRF je křivka odpovídající nejkratšímu možnému času dohasínání, který lze na daném přístroji měřit

IRF

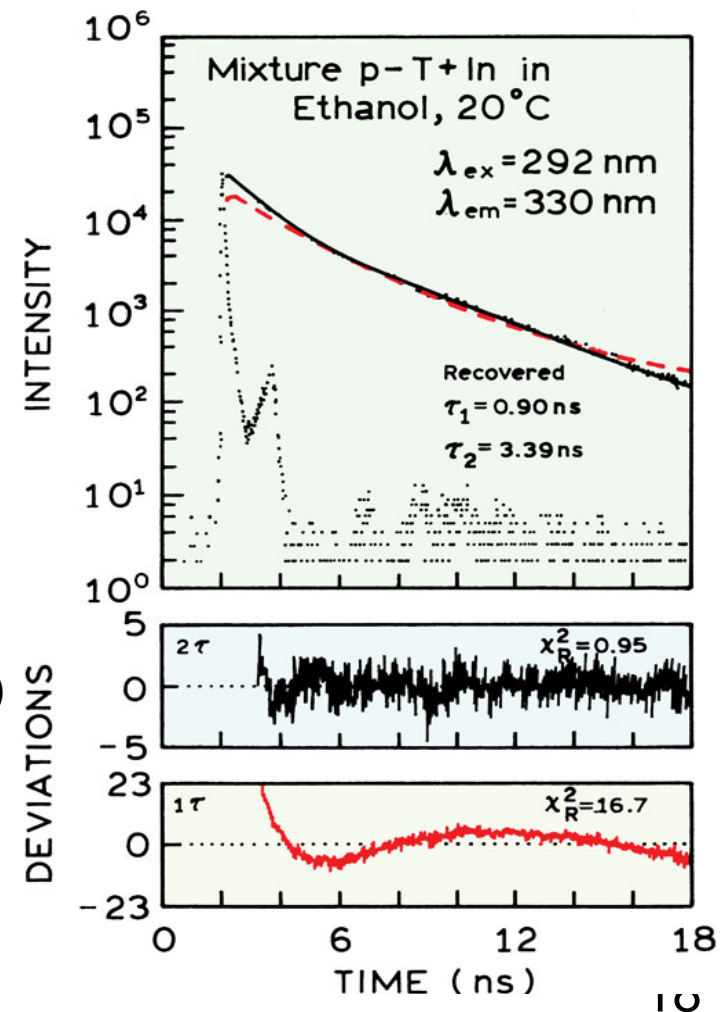


Více fluoroforů v systému: multiexponenciální dohasínání

$$I_{(t)} = \alpha_1 e^{-t/\tau_1} + \alpha_2 e^{-t/\tau_2} \dots + \alpha_N e^{-t/\tau_N}$$

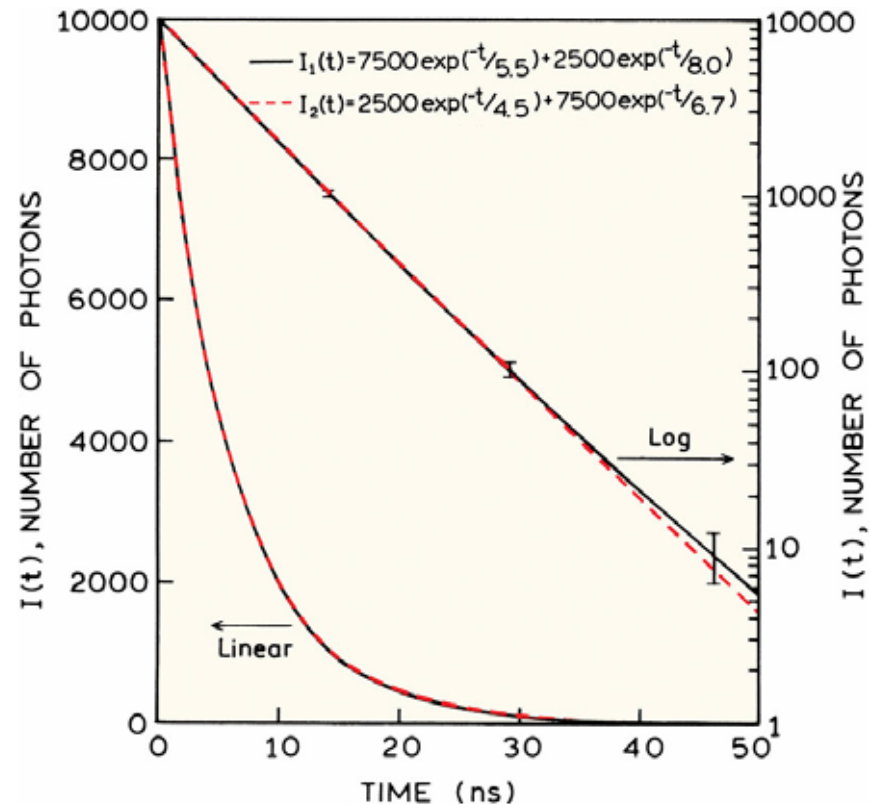
$$I_{(t)} = \alpha_i \exp(-t/\tau_i)$$

- α_i poměrné zastoupení fluoroforu
- τ_i doba dohasínání daného fluoroforu
- Celková intenzita je dána součtem (konvolucí) příspěvků od každého fluoroforu
- Při analýze je nutno použít dekonvoluce – rozklad signálu na příspěvky jednotlivých fluoroforů

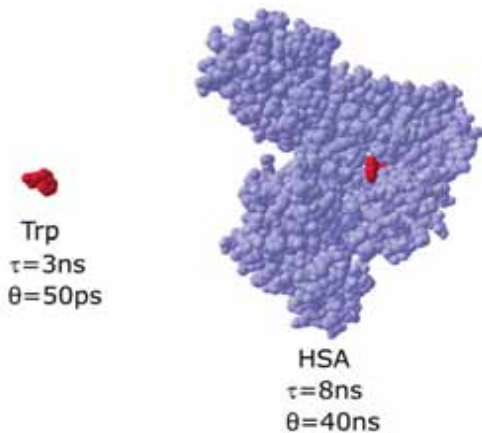


Rozlišení skládání signálů dvou fluoroforů (dekonvoluce)

- Při určování příspěvků od jednotlivých fluoroforů někdy není možno přesně určit α a τ , protože ke stejnému proložení můžeme použít jejich různé kombinace
- Různé dvojice α_i a τ_i mohou dát velmi podobný tvar křivky dohasínání



Časově rozlišená fluorescence lidského sérového albuminu HSA

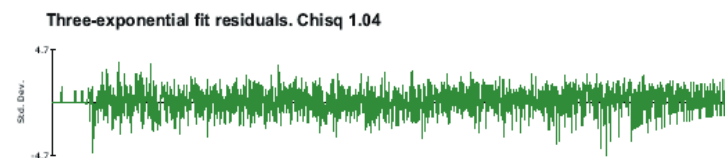
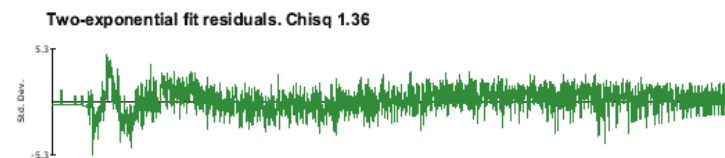
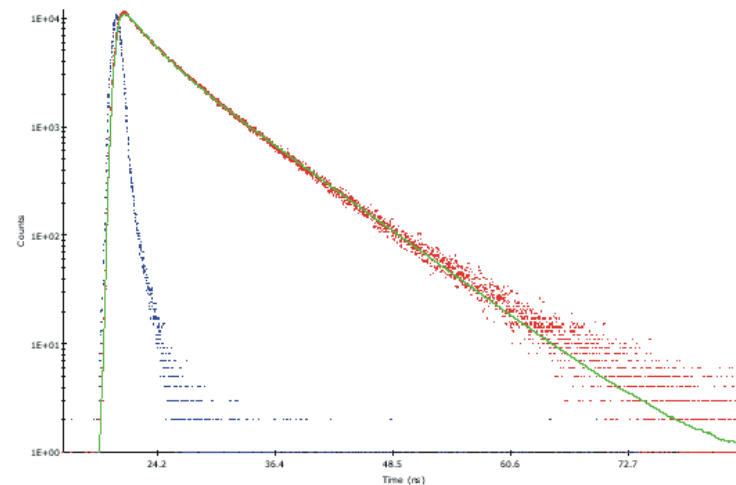


Fluoroforem je tryptofan

V proteinu je tryptofan jenom jeden, přesto je časová závislost dohasínání vícexponenciální.

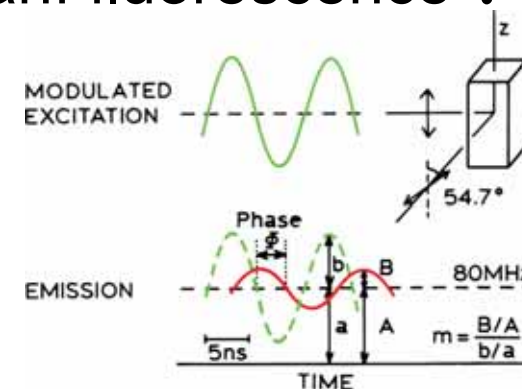
Je to dáno různými konformacemi proteinu v roztoku

Tryptofan se nachází ve více různých lokálních prostředích

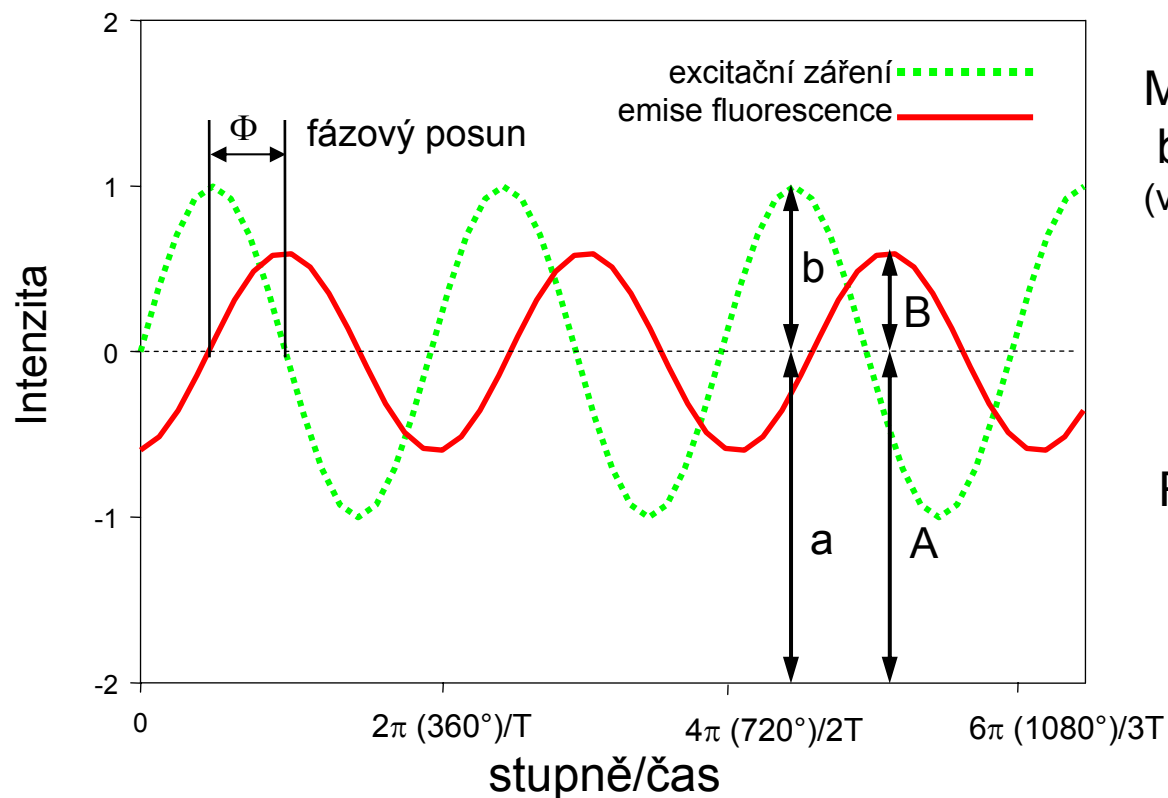


Metoda fázově modulovaného budícího záření

1. Vzorek je excitován sinusově modulovaným světlem s vysokým frekvenčním rozsahem srovnatelným s převrácenou hodnotou doby dohasínání
2. Když dojde k excitaci vzorku modulovaným zářením, emitované záření fluorescence odpovídá modulační frekvenci budícího absorbovaného záření
3. Emise je časově zpožděna ve srovnání s budícím zářením, což se projeví fázovým posunem. Fázový posun je použit k výpočtu doby dohasínání fluorescence τ



Určení doby dohasínání metodou fázové modulace



Modulace excitace

b/a

(výška peaku/střední intenzita)

Modulace emise

B/A

Relativní modulace m

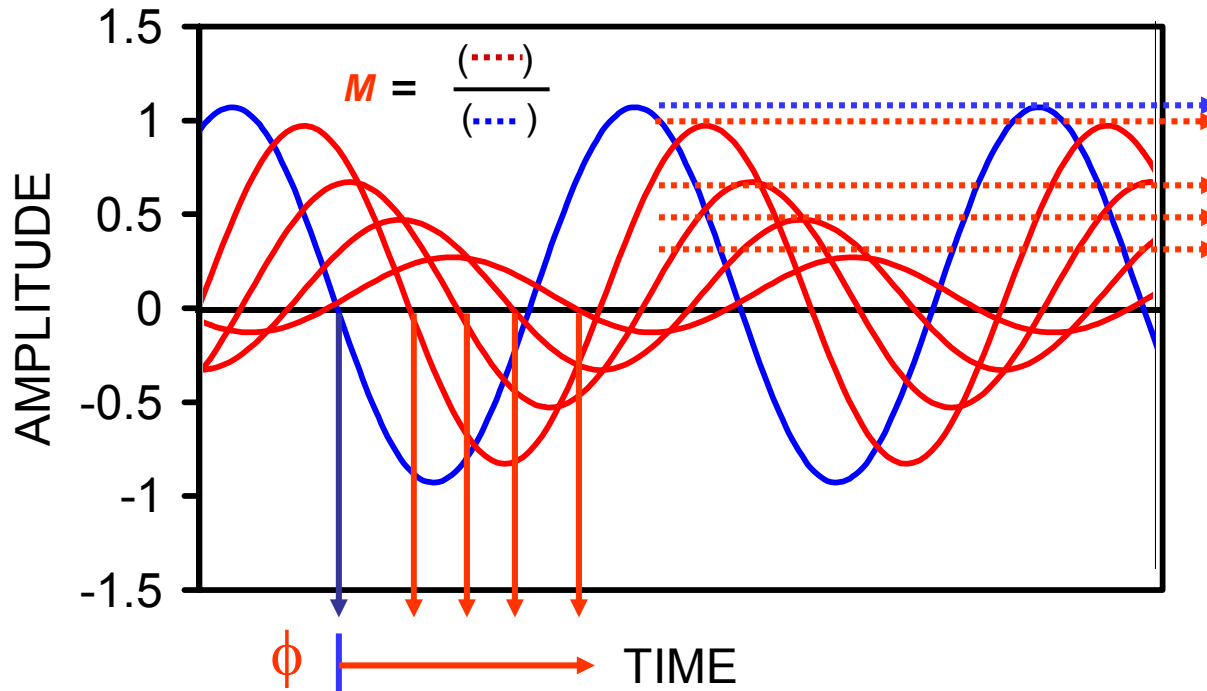
$$m = \frac{B/A}{b/a}$$

Určení času dohasínání
z fázového posunu Φ

$$\tan \Phi = \omega \tau_{\Phi}$$

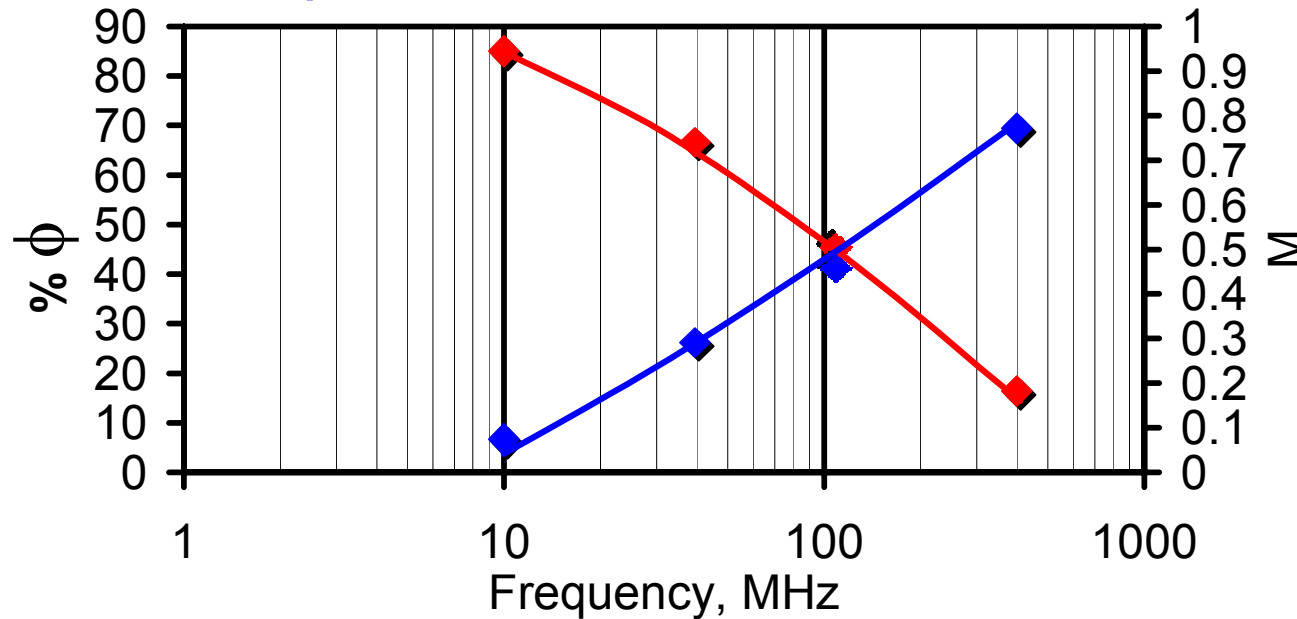
Určení času dohasínání
z modulace m

$$m = \frac{1}{\sqrt{1 + \omega^2 \tau_m^2}}$$

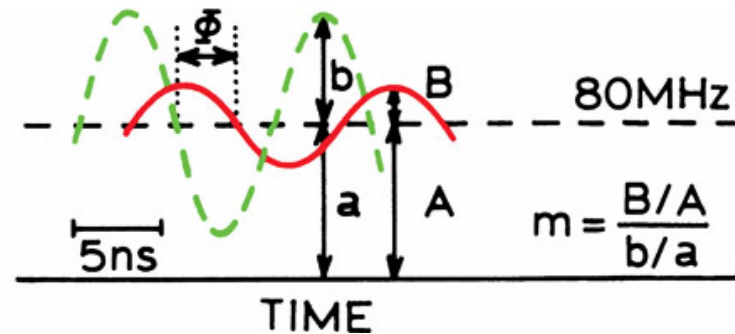


Princip měření pomocí fázové modulace

$$m = \frac{B / A}{b / a}$$



Praktický příklad výpočtu



$$\Phi = 68^\circ$$

$$m = 0.4$$

$$\tan \Phi = \omega \tau_\Phi$$

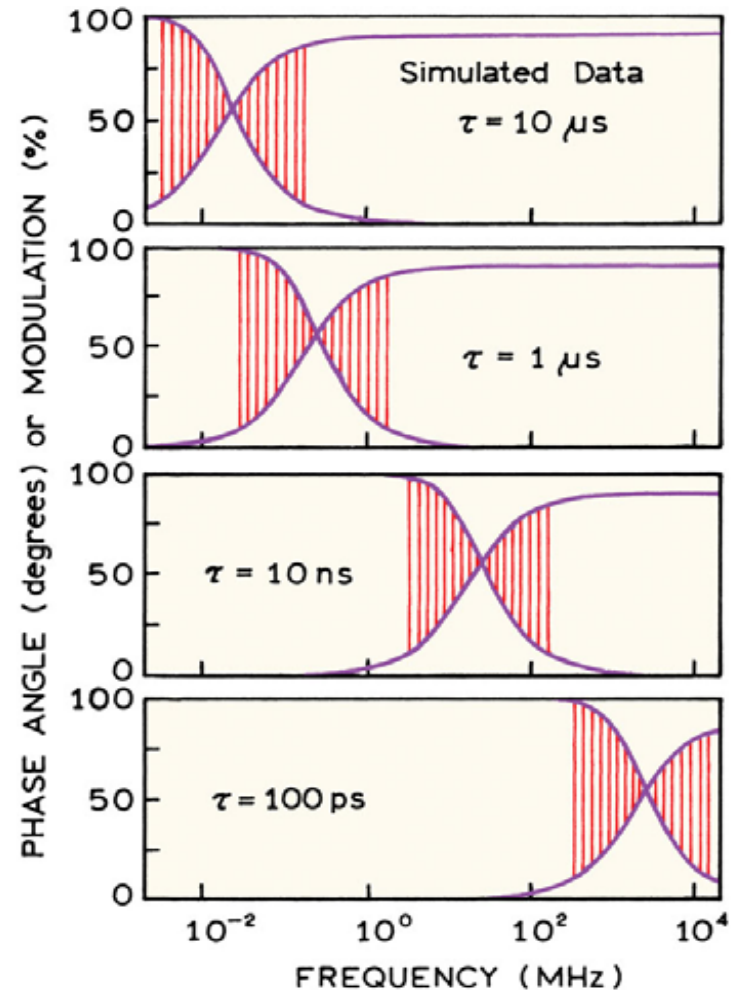
$$m = \frac{1}{\sqrt{1 + \omega^2 \tau_m^2}}$$

$$\tau_\Phi = \frac{\tan \Phi}{\omega}$$

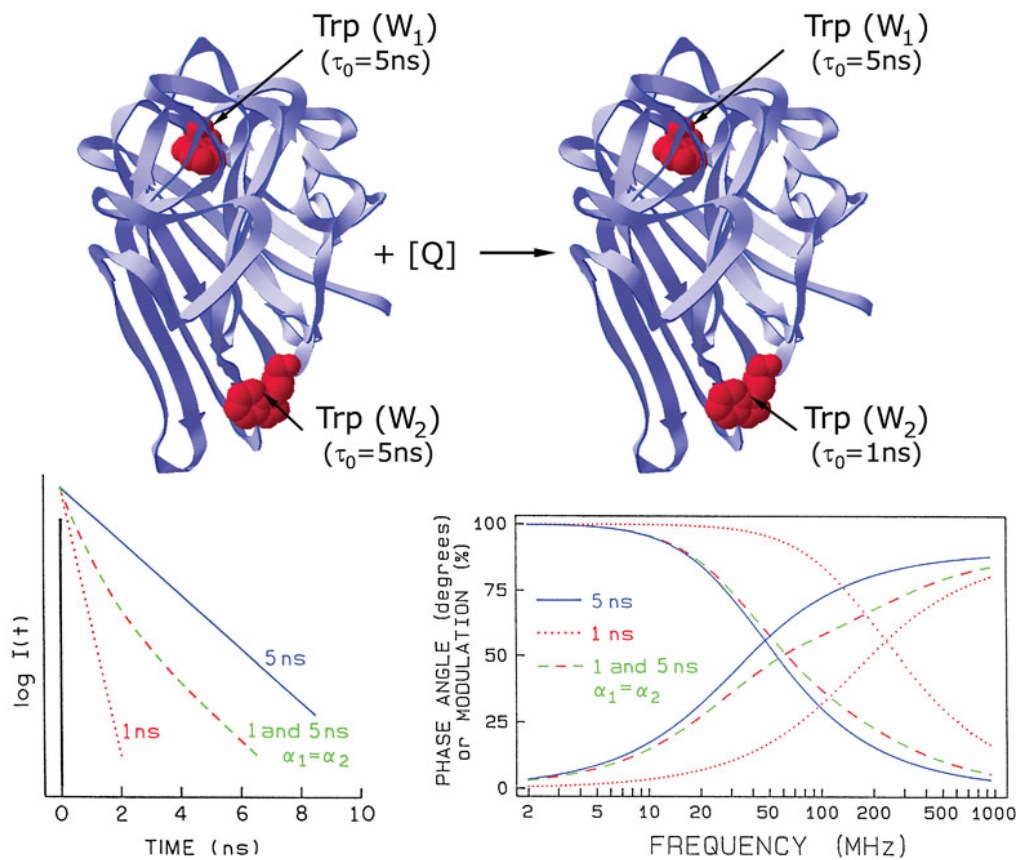
$$\tau_m = \sqrt{\frac{1}{\omega} \left[\frac{1}{m^2} - 1 \right]}$$

Závislost parametrů získaných metodou fázové modulace na τ

- Čím je kratší doba dohasínání τ , tím více se posunuje průnik křivek k vyšším frekvencím
- Pro delší dobu dohasínání $\tau = 10 \mu\text{s}$ je nutno použít modulační frekvence 10 kHz až 1 MHz
- Pro kratší dobu dohasínání $\tau = 100 \text{ ps}$ je nutno použít modulační frekvence až 2GHz tedy 10 000 krát větší



Časově rozlišená fluorescence fluoroforů v rozdílném prostředí



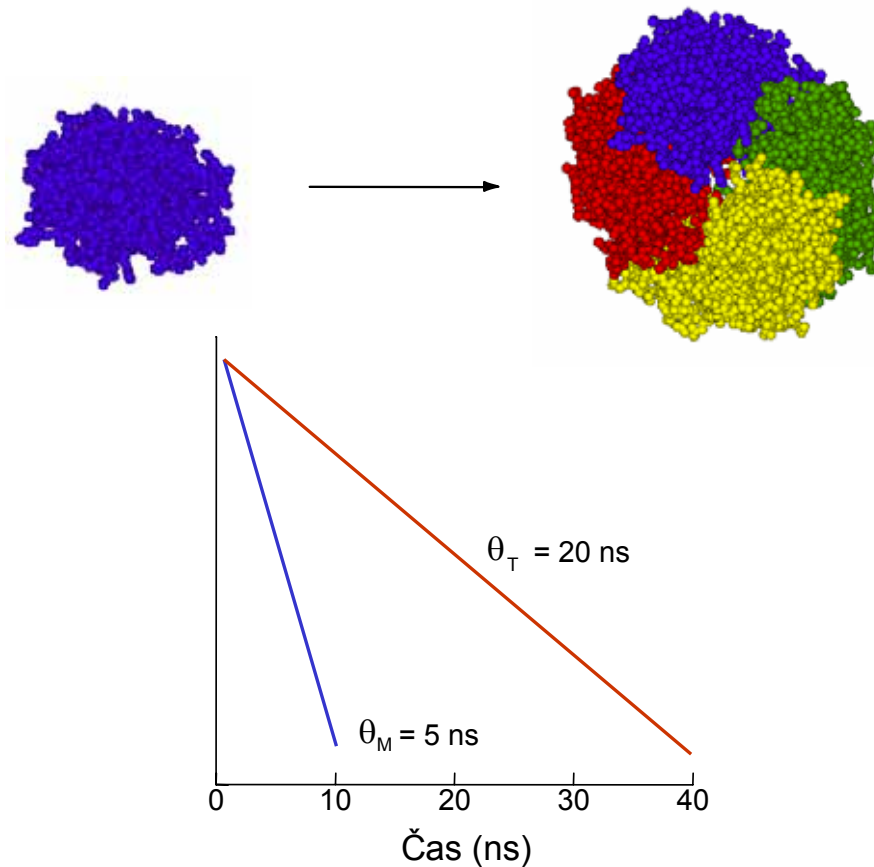
- Protein se dvěma fluorofory - tryptofany

$$I_{(t)} = \alpha_1 e^{-t/\tau_1} + \alpha_2 e^{-t/\tau_2}$$

- Fluorofory mají ve stejném prostředí stejnou hodnotu τ
- Po přidání zhašedla se sníží doba fluorescence u fluoroforu na povrchu τ_2
- Výsledkem je „prohnutá“ křivka
- Úkolem dekonvoluce je pak určit τ_1 , τ_2 a poměrné příspěvky fluoroforů α_1, α_2

Změna rotačního korelačního času při multimerizaci proteinu

- Časové závislosti polarizované fluorescence lze použít při sledování změny dynamiky systému molekul
- Sledování multimerizace fosfofruktokinázy

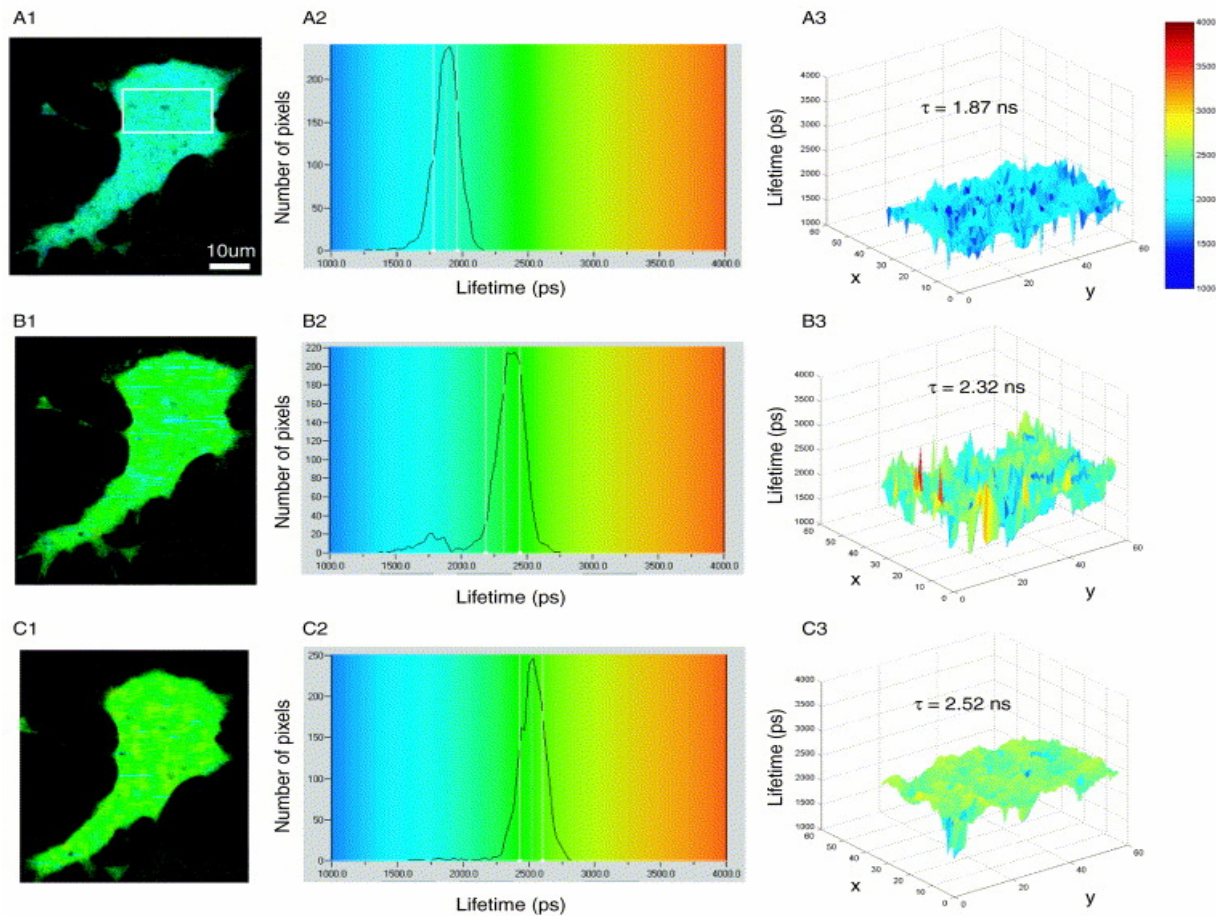


Fluorescence LifeTime Imaging Microscopy FLIM



- Sledování časové závislosti fluorescence v 2D prostoru
- Umožňuje rozlišit prostředí ve kterém se fluorofory nacházejí
- Umožňuje sledovat zhášení flouroforů, ať už vlivem prostředí, zhášedla nebo interakce s jinými molekulami

Použití FLIM při sledování interakce proteinů

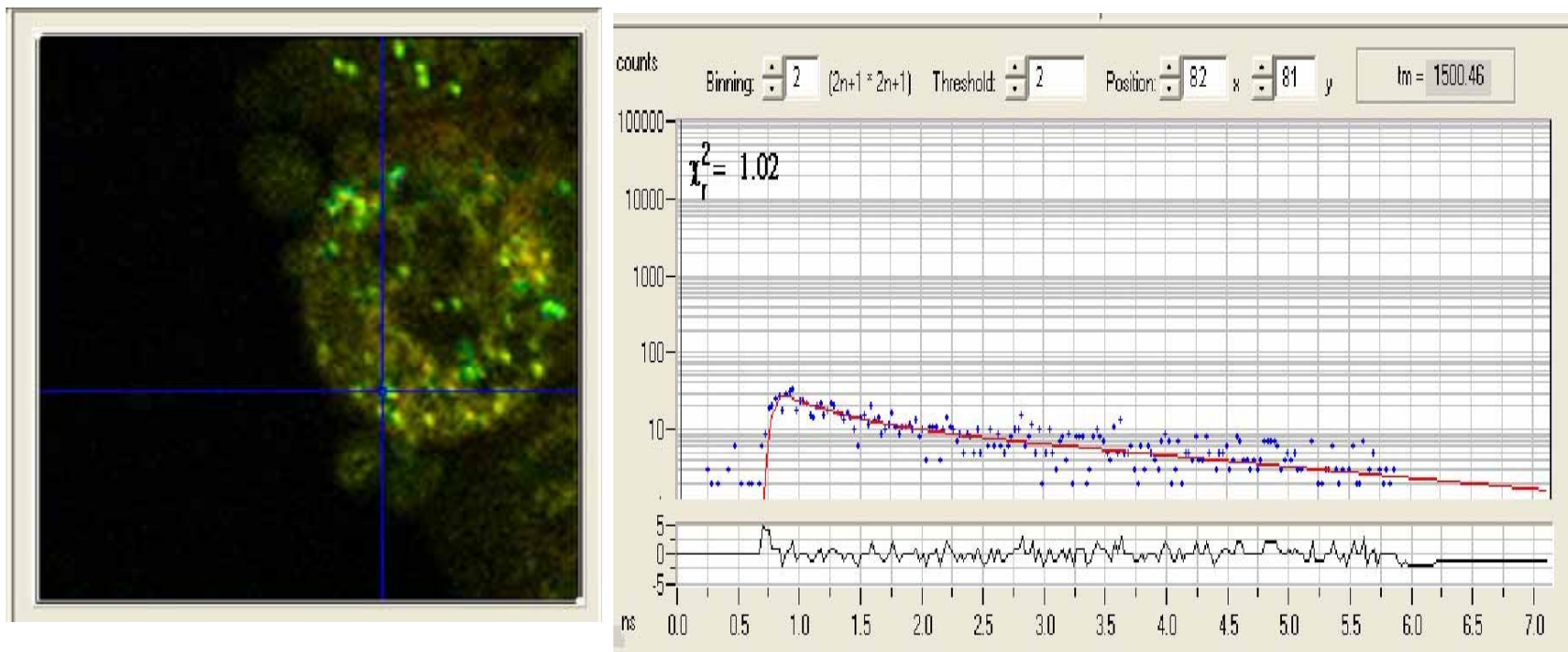


Rychlejší dohasínání v přítomnosti zhášejícího proteinu

Normální dohasínání

H. Wallrabe and A. Periasamy, Imaging protein molecules using FRET and FLIM microscopy, Current Opinion in Biotechnology, Volume 16, Issue 1, Analytical biotechnology, 2005, Pages 19-27.

Příklad detailního zobrazení FLIM



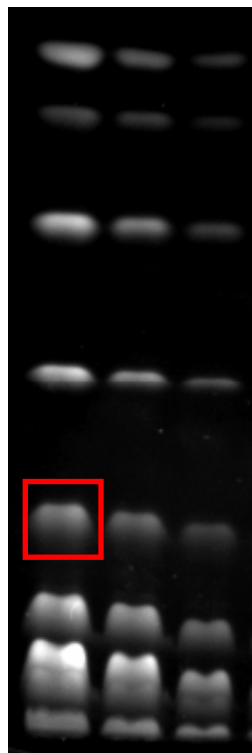
Závislost doby dohasínání fluorescence NADH je dvou-exponenciální s hodnotou 0.4 ns pro volnou a 3 ns pro navázanou molekulu NADH

Využití časově rozlišené fluorescence při proteomické analýze

Gel barvený

Sypro-Ruby

Intenzita



Časové rozlišení



Intenzita je doplněna o pseudobarevné časové rozlišení, aby mohly být oba parametry zviditelněny současně

Časové rozlišení fluorescence může pomoci při analýze proteinů v překrývajících se pásech

Literatura

- Lakowicz J.R.: Principles of Fluorescence Spectroscopy. Third Edition, Springer + Business Media, New York, 2006.
- Fišar Z.: FLUORESCENČNÍ SPEKTROSKOPIE V NEUROVĚDÁCH
<http://www1.lf1.cuni.cz/~zfiisar/fluorescence/Default.htm>

Poděkování

Grafika z knihy Principles o Fluorescence byla pro účely této přednášky laskavě poskytnuta profesorem J.R. Lakowitzem.