

ČASOVĚ ROZLIŠENÁ FLUORESCENCE

TIME-RESOLVED FLUORESCENCE

Fluorescenční metody ve vědách o životě – cesta od molekuly k buňce

C7230

Ctirad Hofr

LifeB – Laboratoř interakce a funkce esenciálních **Biomolekul**

FGP – Funkční genomika a proteomika

NCBR – Národní centrum výzkumu biomolekul

Přírodovědecká fakulta | Masarykova univerzita

M U N I  
S C I

Národní centrum  
pro výzkum  
biomolekul

# Portrait of Lotte 18 years in 5 minutes



# Portrait of Vince 20 years in 20 seconds



# Přehled

- Definice časově rozlišené (ČR) fluorescence
- Typy měření ČR fluorescence
- Praktické aplikace ČR fluorescence

# Ustálená a časově rozlišená fluorescence

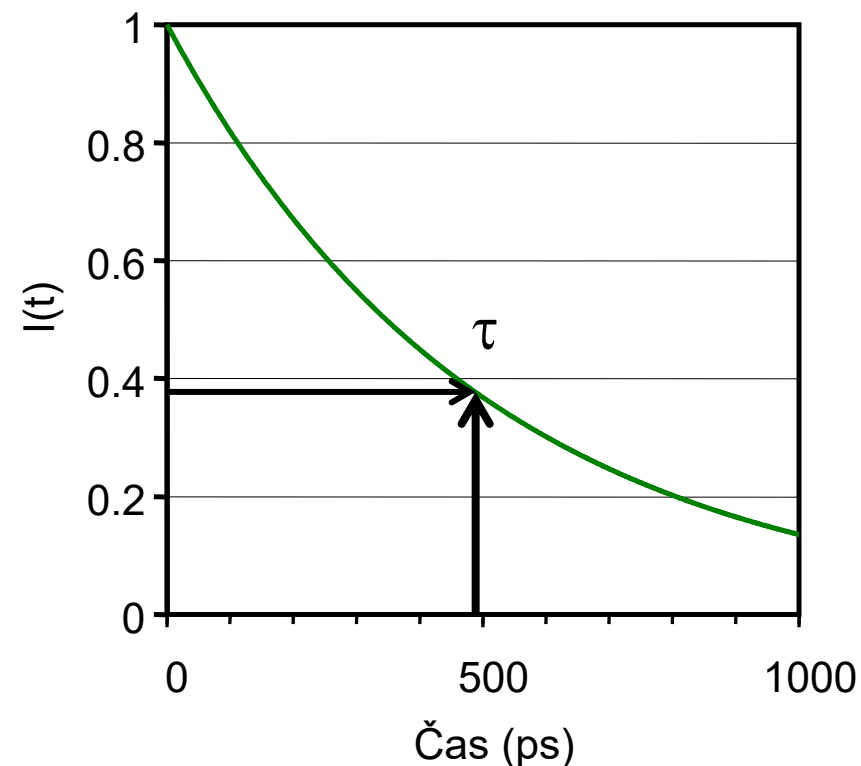
- **Časově rozlišená fluorescence** se měří pomocí pulzní excitace (délka pulzu je obvykle kratší než doba dohasínání fluorescence vzorku) nebo fázově modulovaného budícího záření a umožňuje analyzovat časové závislosti měřených parametrů.
- **Ustálená fluorescence** (Steady State) se měří při buzení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

# Proč měřit časově rozlišenou fluorescenci?

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

# Jak dlouho trvá fluorescence?

Náhodné dohasínání zpět do základního stavu:  
každá molekula emituje 1 foton

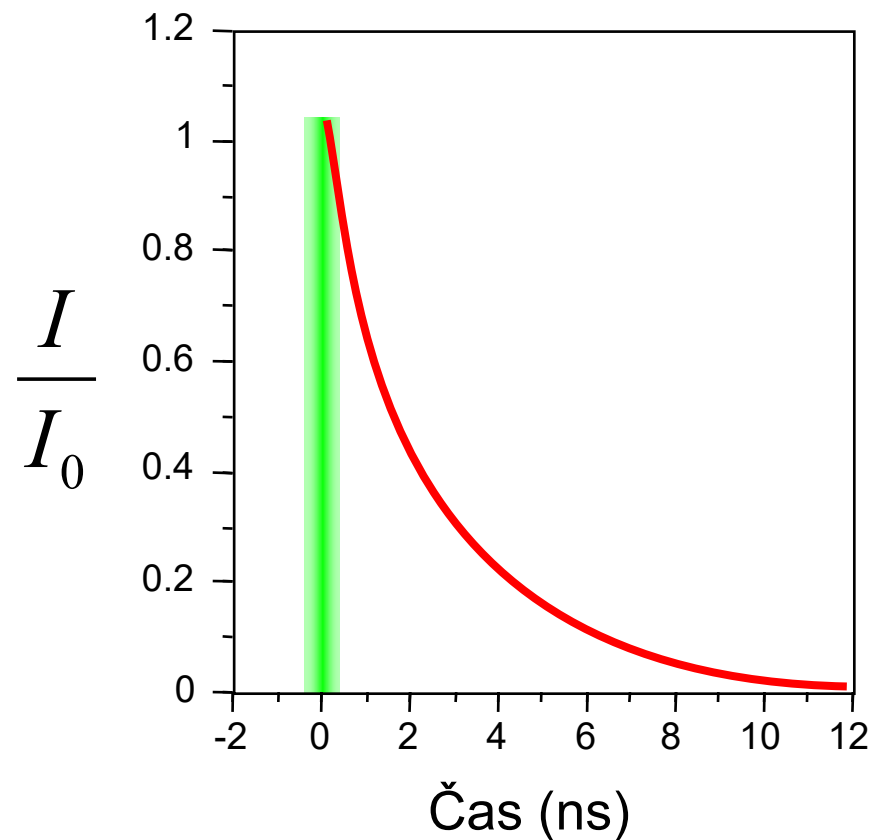


Populace molekul excitovaných  
zábleskem (pulesem)

# Časový průběh fluorescence

- Nejjednodušší je exponenciální pokles pro sférické částice

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





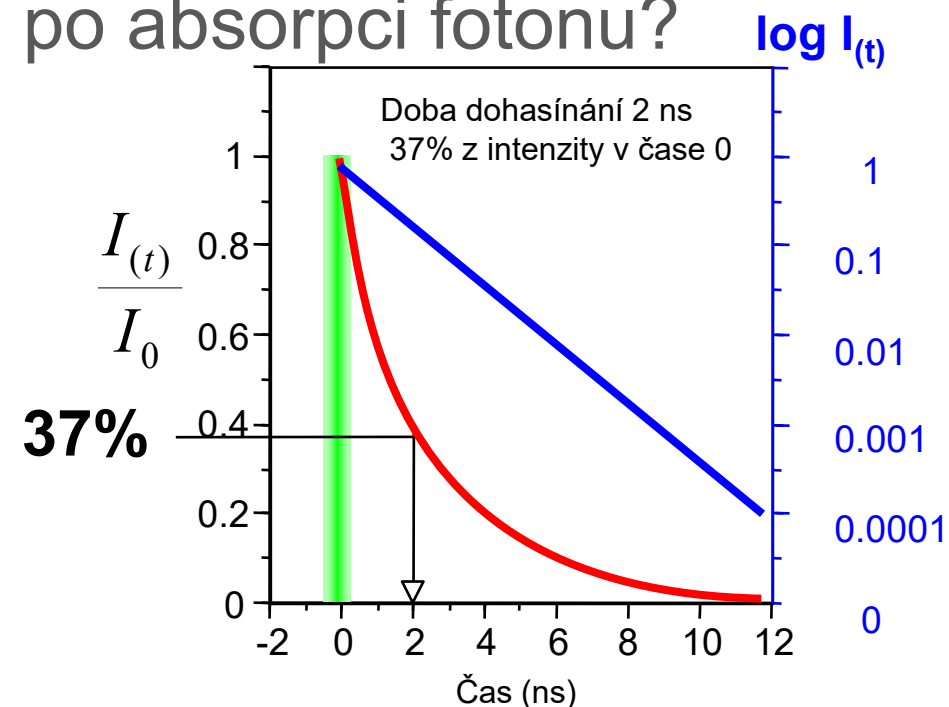
# Čas dohasínání fluorescence $\tau$

- $\tau$  je střední doba mezi excitací molekuly (absorpcí fotonu) a emisí světla při návratu molekuly do základního stavu

Jaká je intenzita fluorescence v čase  $\tau$  po absorpci fotonu?

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

- Doba dohasínání  $t = 2 \text{ ns}$ , potom v tomto čase  $t = \tau$  má fluorescence 37% z původní intenzity v čase 0

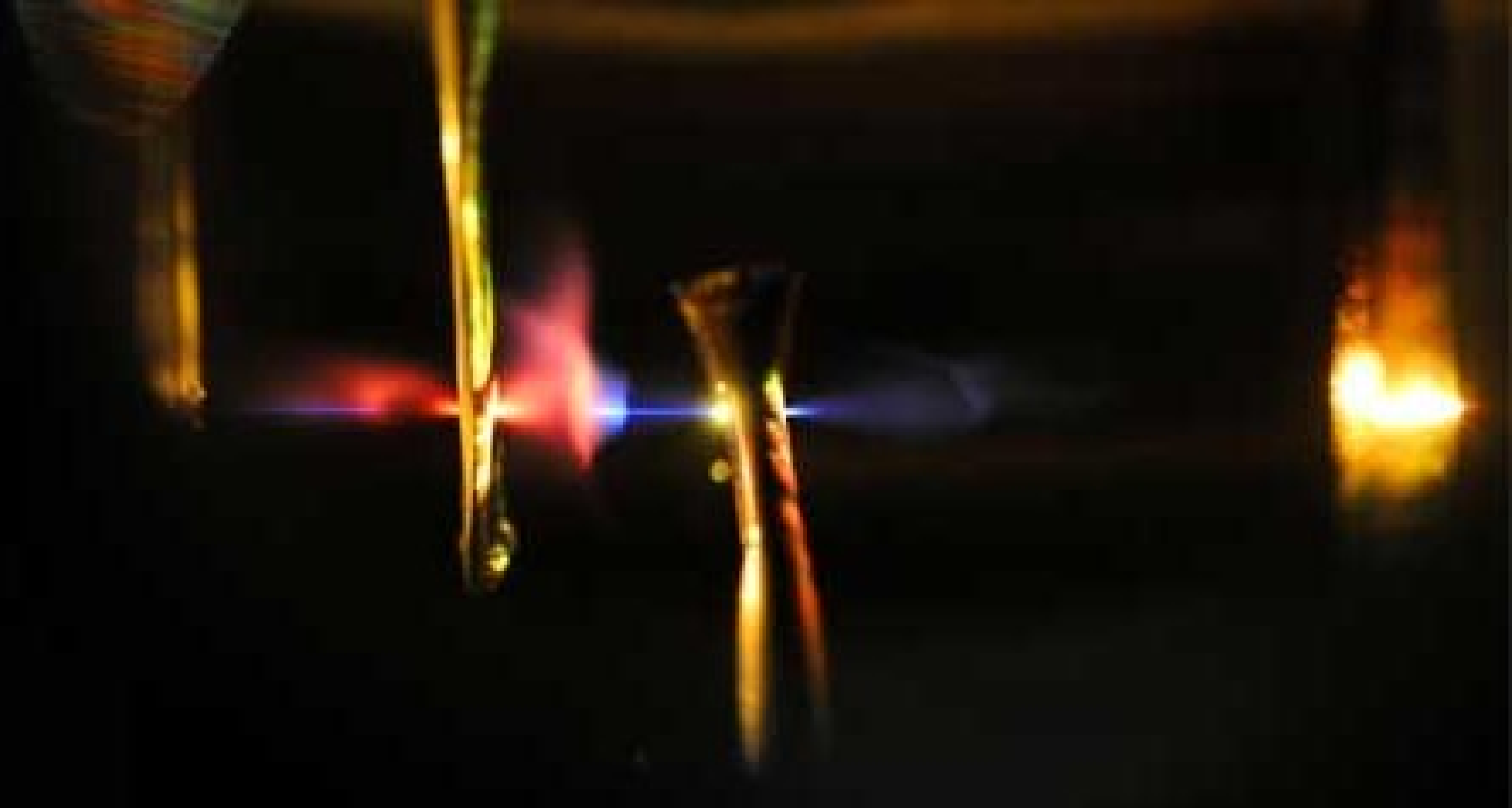


# Proč měřit dobu dohasínání fluorescence $\tau$ ?

- 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

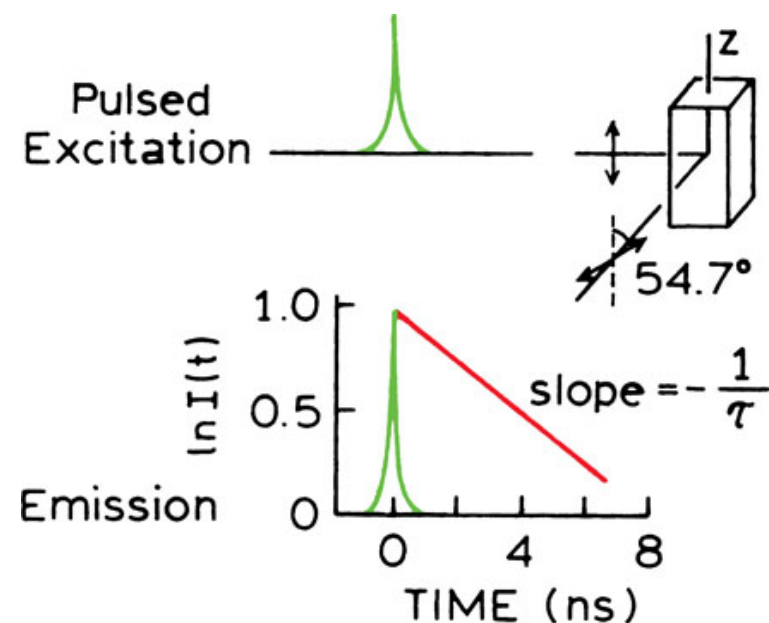
# Hlavní způsoby měření časové závislosti fluorescence

- **Pulzní metoda (time-domain)** zdrojem excitačního záření je krátký pulz
- **Metoda fázově modulovaného budícího záření (frequency domain)** zdrojem excitačního záření je sinusově modulované světlo



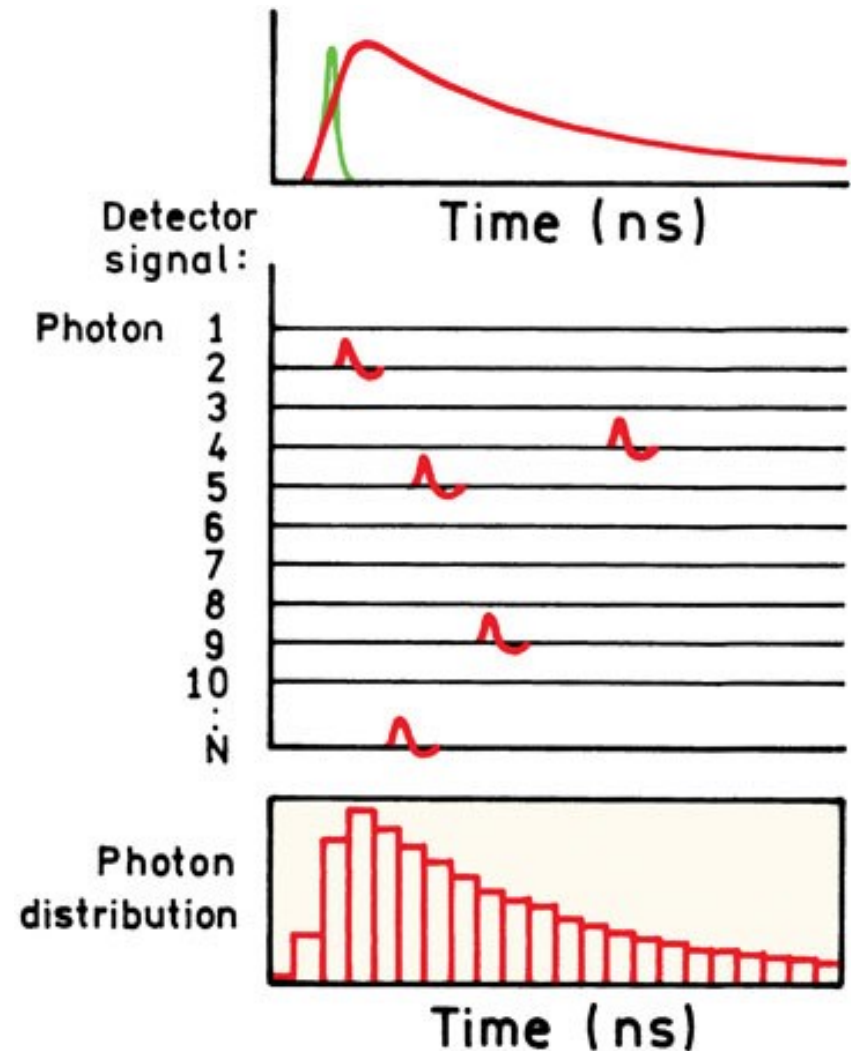
# Pulzní metoda

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



# Počítání fotonů: Time-Related Single Photon Counting TCSPC

- 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.



# Zdroje pro TCSPC

## Laserové diody

Šířka pulzu FWHM = 70 ps

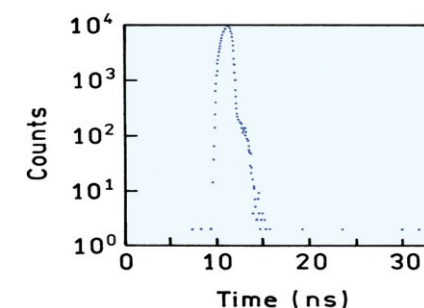
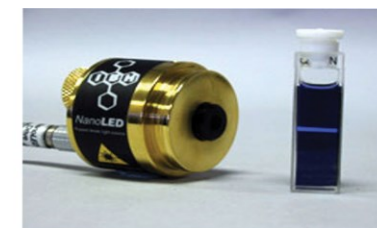
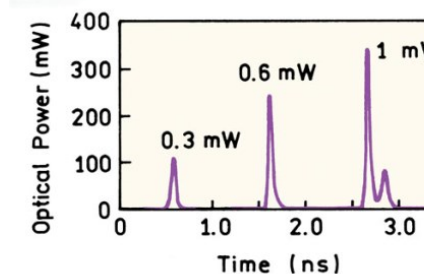
(full width at half of maximum; plná šířka v polovině maxima)

Rychlost opakování pulzu 40 MHz

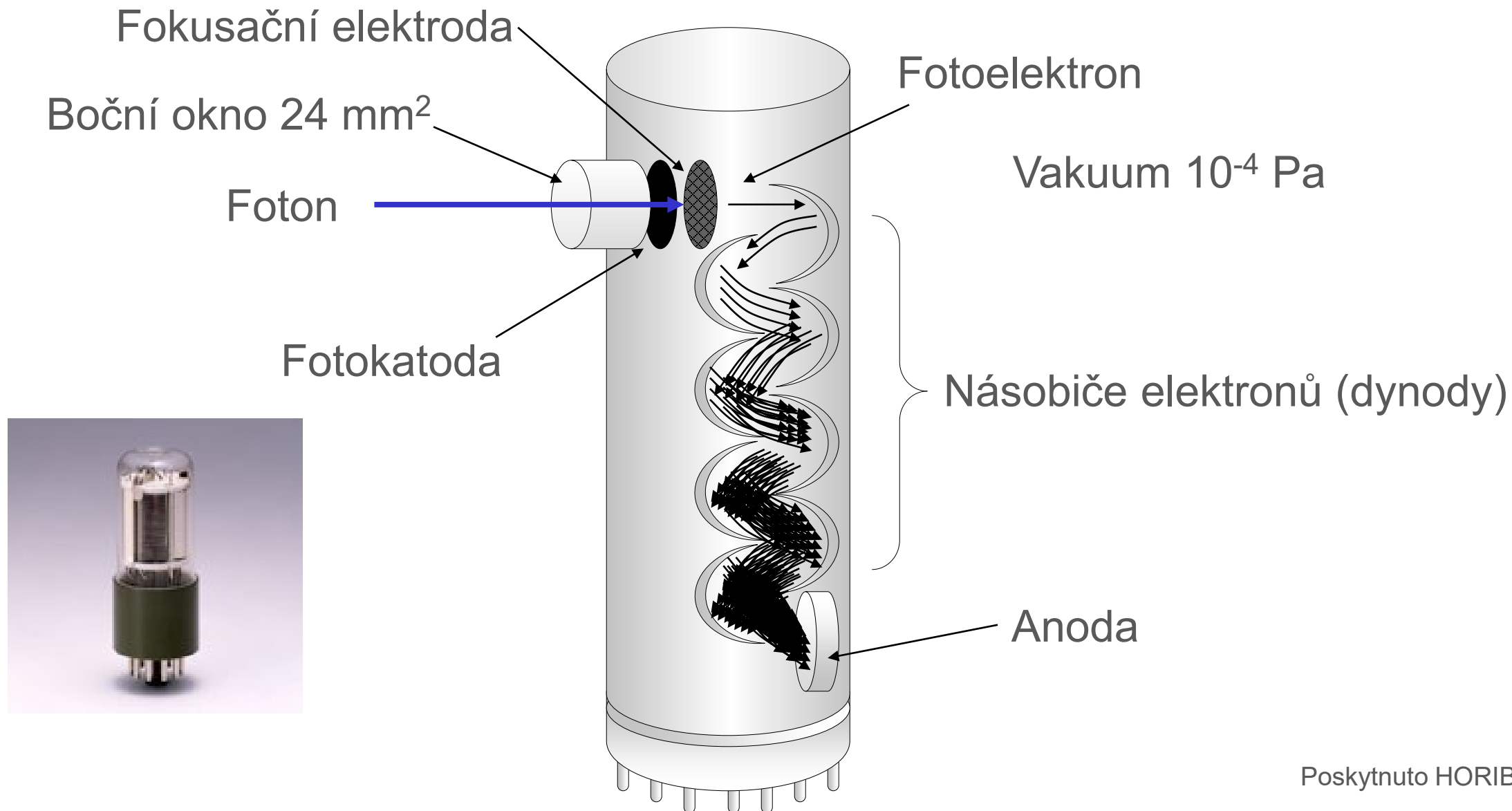
## LED (Light Emitting Diode)

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

Rychlost opakování pulzu 40 MHz



# Detektor - fotonásobič

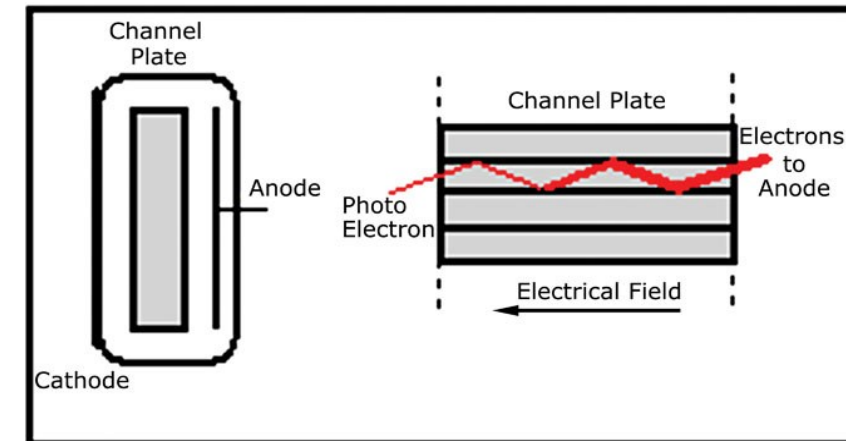


Poskytnuto HORIBA Jobin Yvon

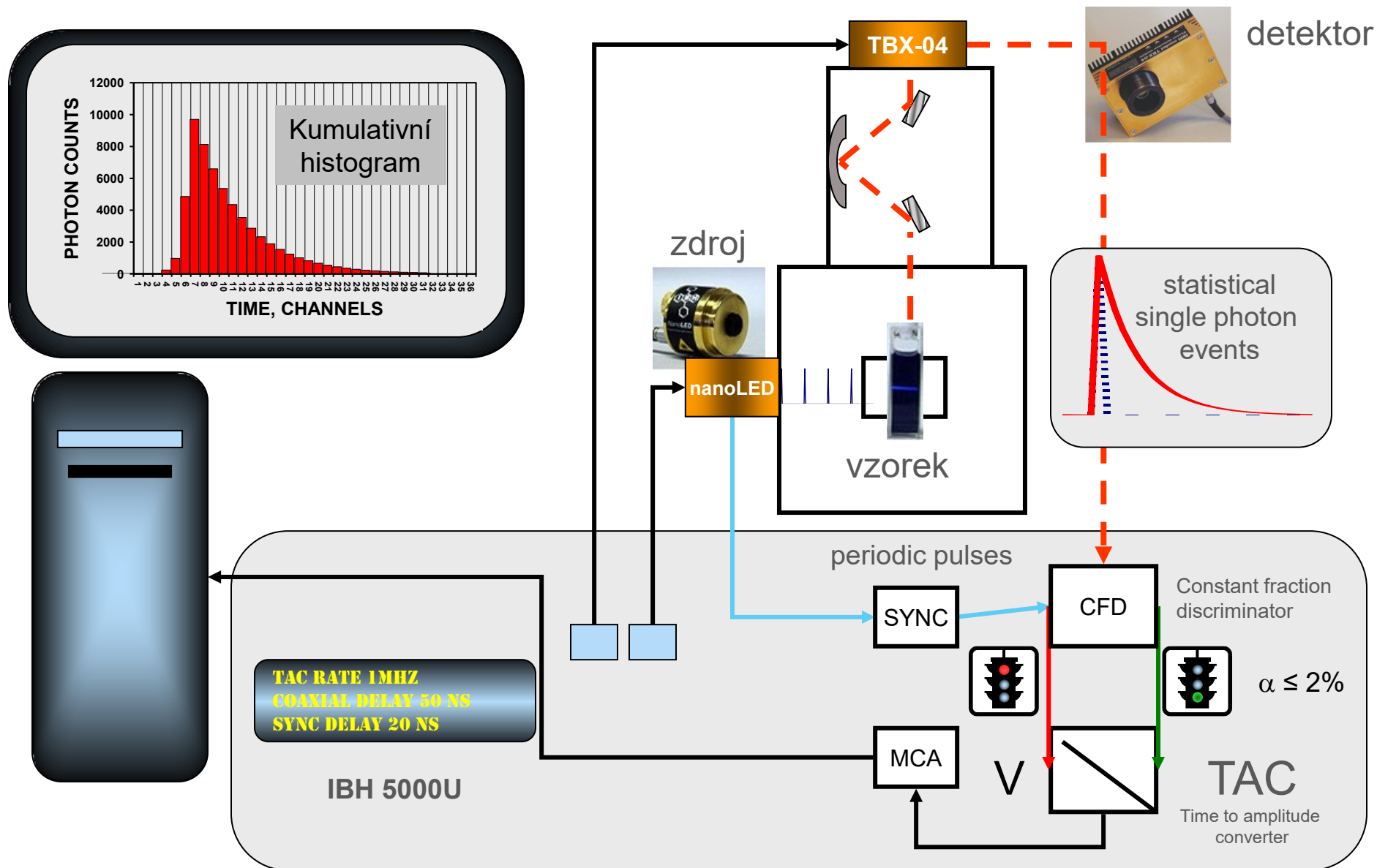


# Rychlý detektor (MCP PMT)

- Rychlost 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.

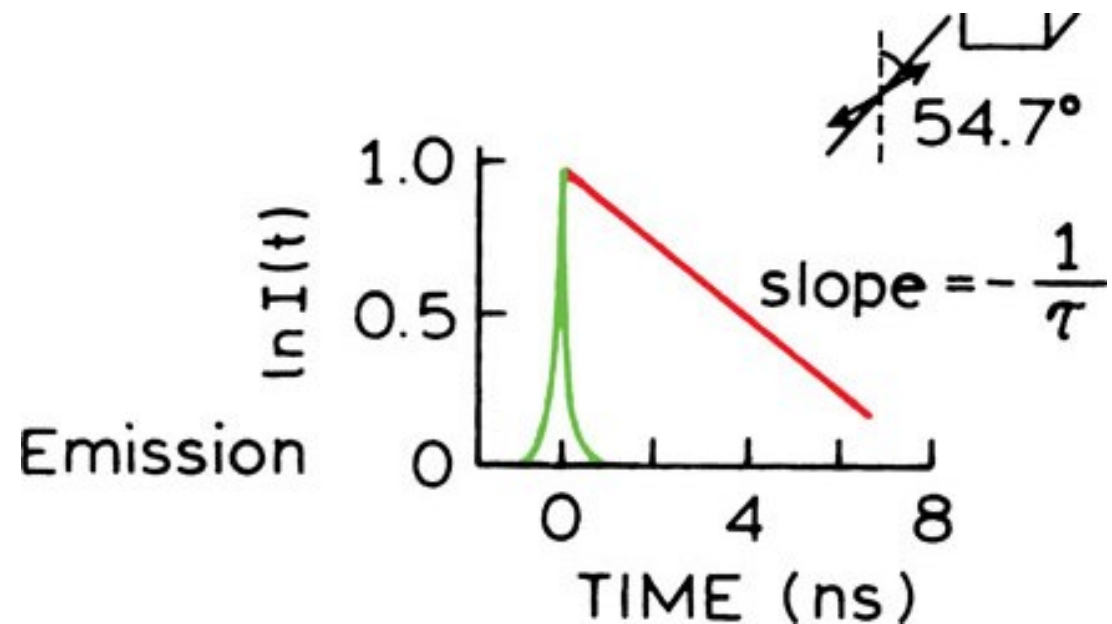


# Princip přístroje s TCSPC



Poskytnuto HORIBA Jobin Yvon

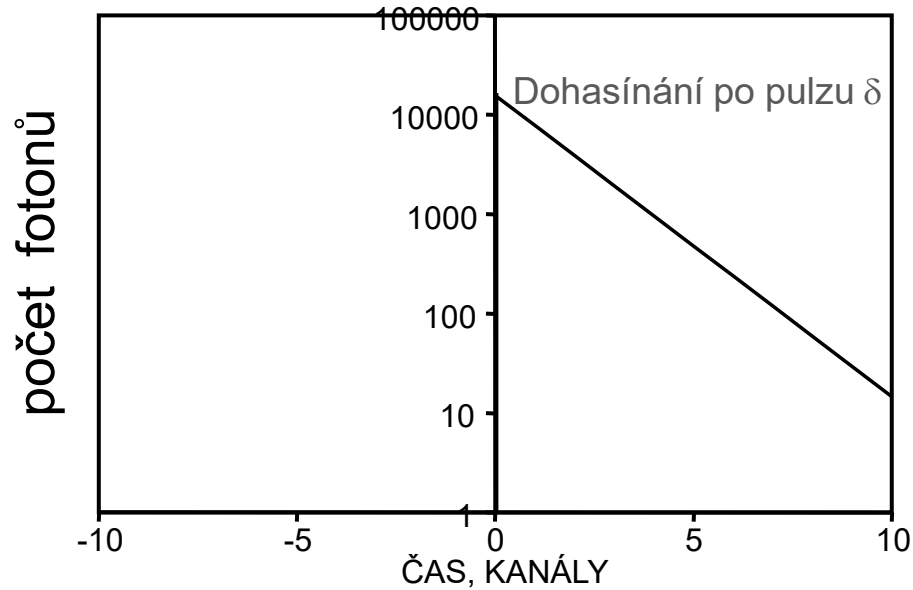
# Praktické určení $\tau$



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

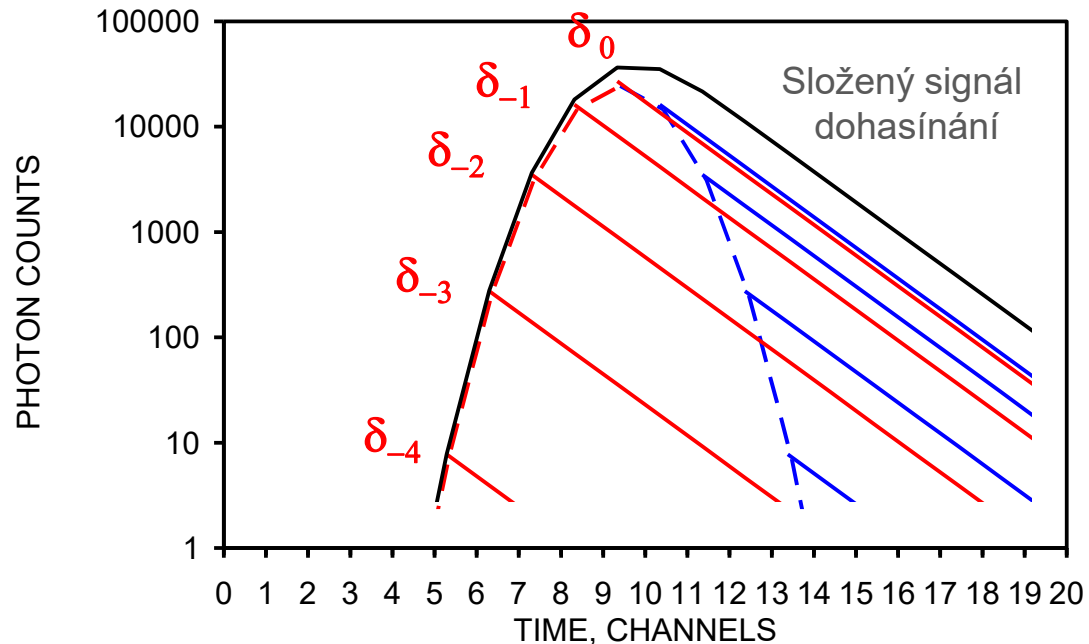
$$I(\tau) = I_0 e^{-1} = I_0 \cdot 0.37$$

# Princip skládání – konvoluce signálů



Intenzita je funkcí času:  $I(t) = \alpha \exp(-t/\tau)$

Intenzita zdroje světla je také funkcí času  $L(t)$



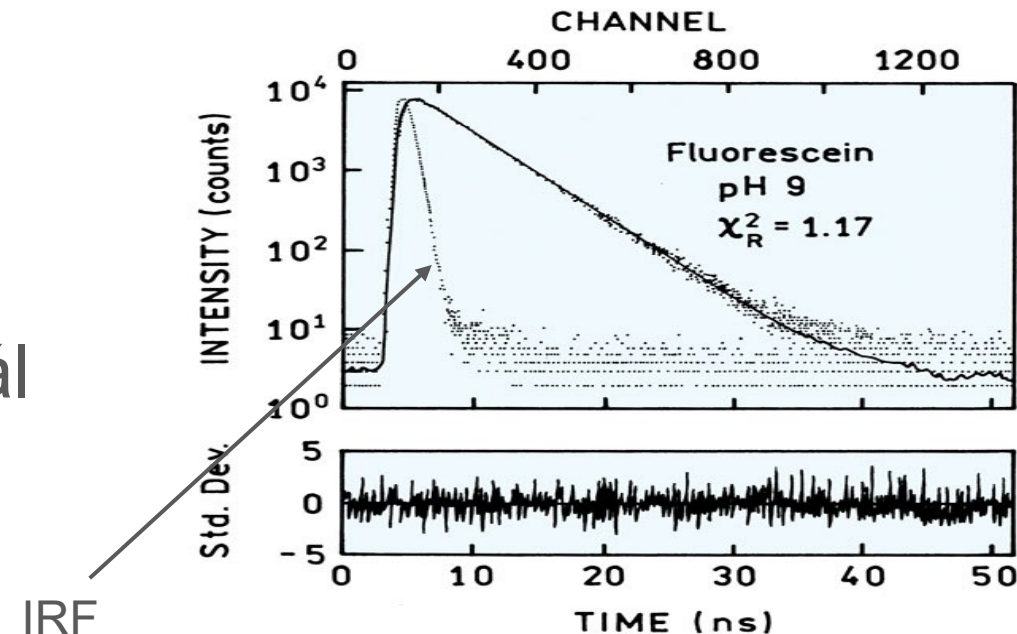
Konvoluce fluorescence:  $F(t) = I(t) \otimes L(t)$

# Časově rozlišená fluorescence fluoresceinu

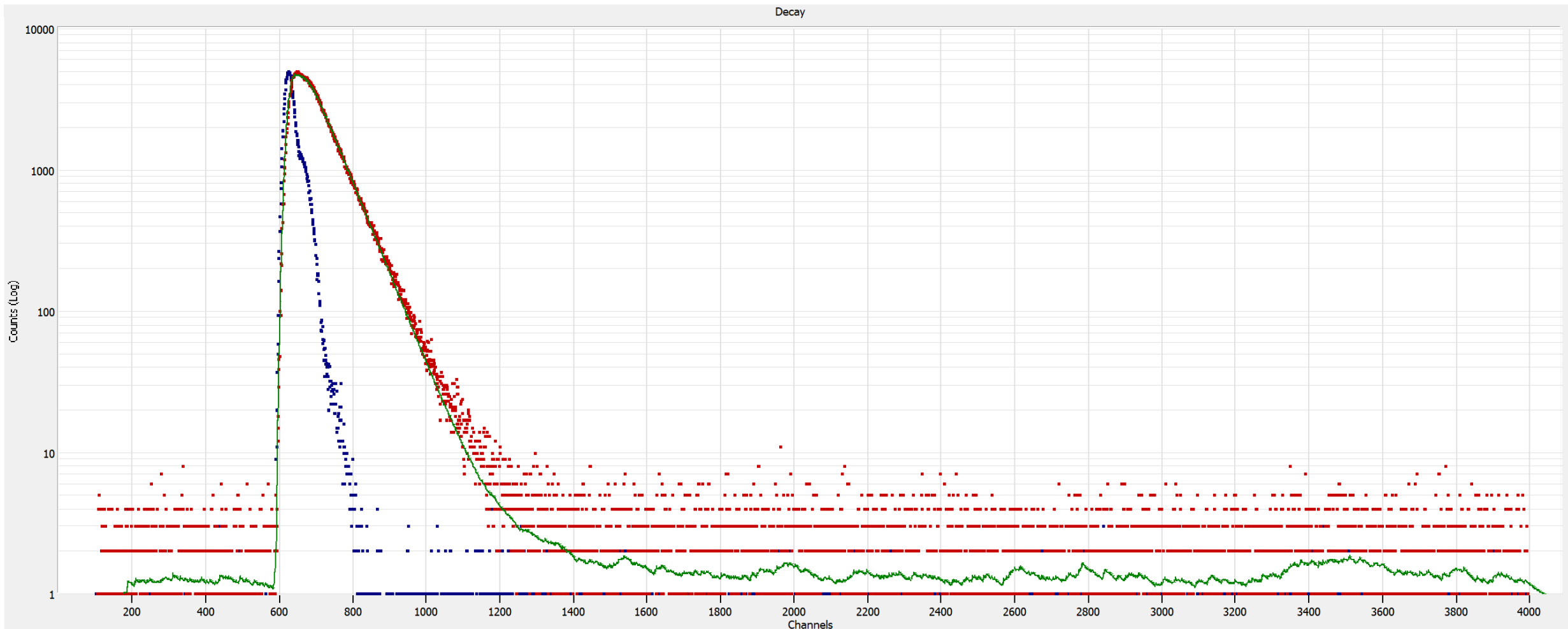
- Fluorescein v roztoku pH 9.0
- Excitace 450 nm
- Pulzní LED s opakovací frekvencí 20 MHz

**IRF** Instrument Response Function signál zdroje a odezva přístroje

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



# Záznam skutečného měření



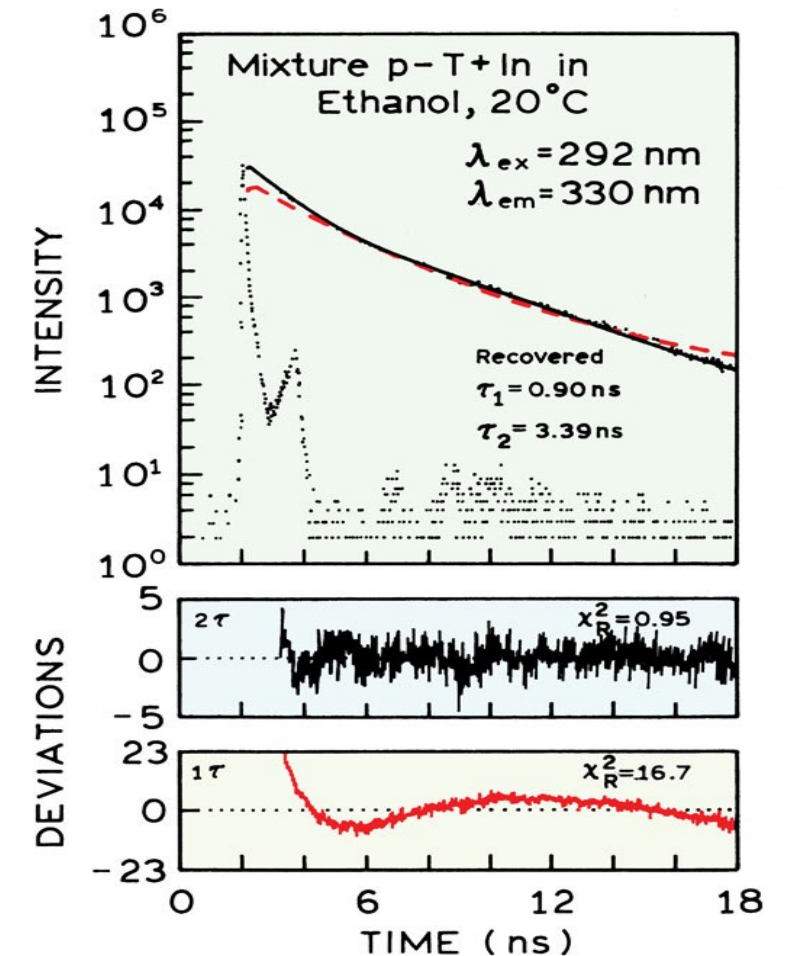
Modrá křivka je IRF, červená naměřená data a zelená fit jednokomponentním modelem.

# Více fluoroforů v systému: multiexponenciální dohasínání

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

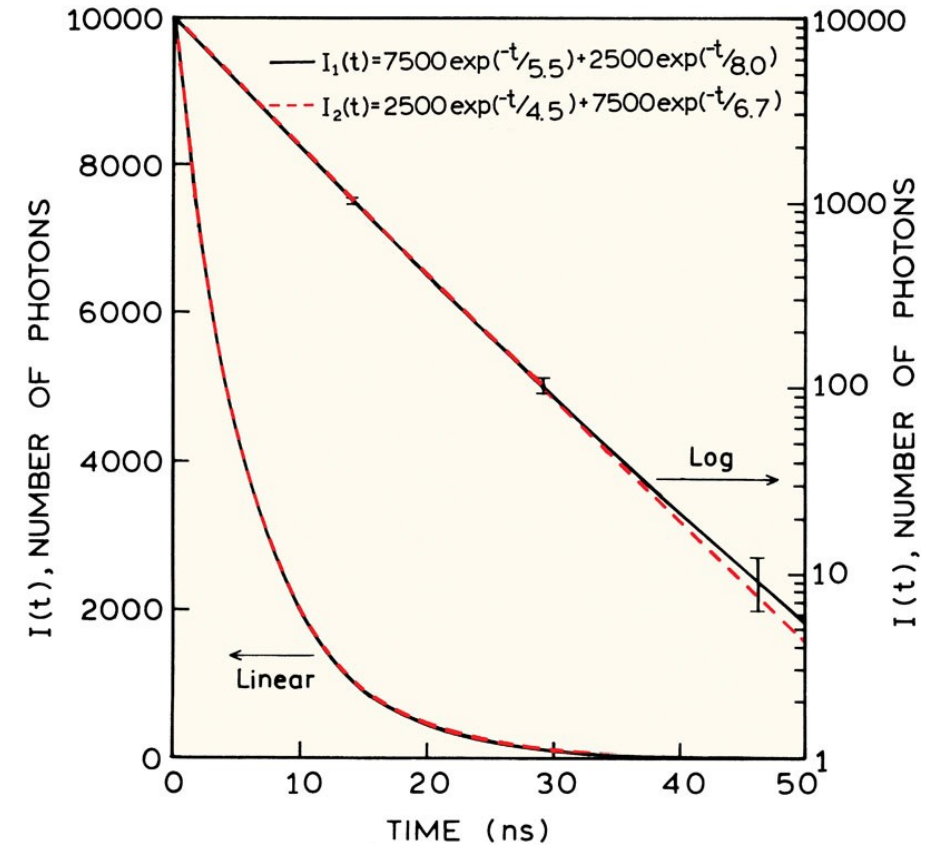
$$I(t) = \alpha_i \exp(-t/\tau_i)$$

- $\alpha_i$  poměrné zastoupení fluoroforu
- $\tau_i$  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



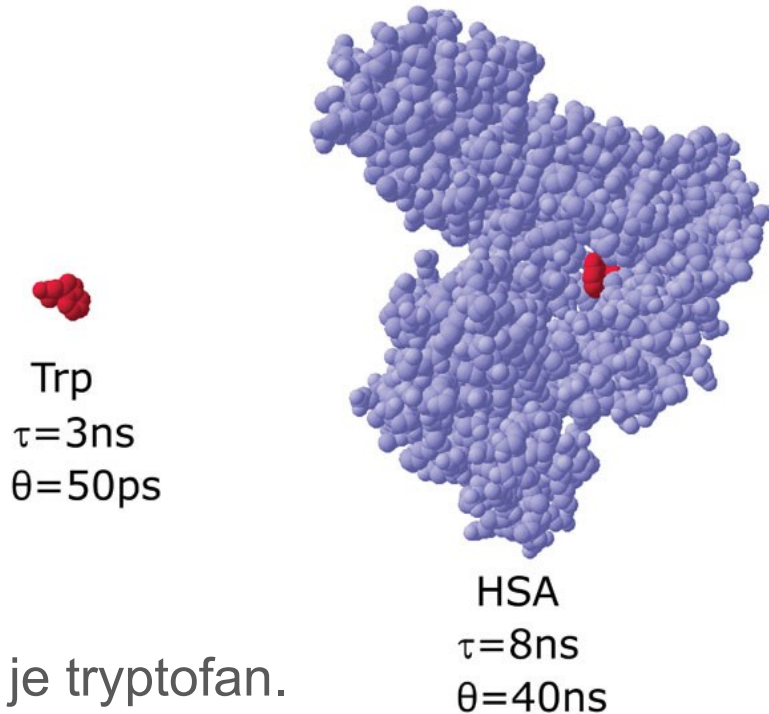
# Rozlišení skládání signálů dvou fluoroforů (dekonvoluce)

- Při určování příspěvků od jednotlivých fluoroforů někdy není možno přesně určit  $\alpha$  a  $\tau$ , protože ke stejnému proložení můžeme použít jejich různé kombinace
- Různé dvojice  $\alpha_i$  a  $\tau_i$  mohou dát velmi podobný tvar křivky dohasínání





# Rozlišení skládání signálů dvou fluoroforů (dekonvoluce)

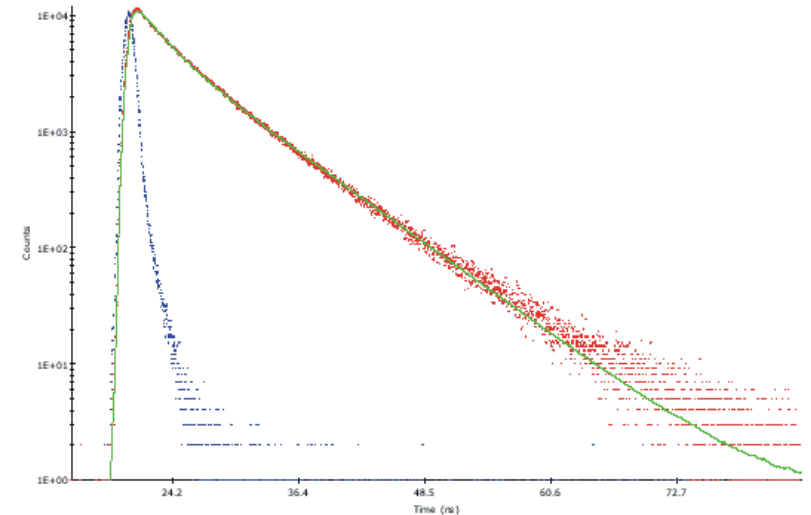


Fluoroforem je tryptofan.

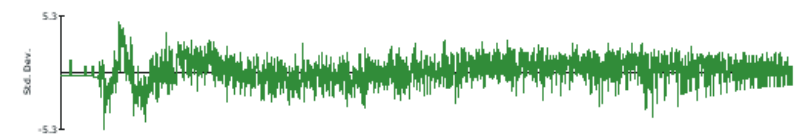
V proteinu je tryptofan jenom jeden, přesto je časová závislost dohasínání vícexponenciální.

Je to dáno různými konformacemi proteinu v roztoku.

Tryptofan se nachází ve více různých lokálních prostředích.



Two-exponential fit residuals. Chisq 1.36



Three-exponential fit residuals. Chisq 1.04



Poskytnuto HORIBA Jobin Yvon

# Co dělat, když jsou tam fluorofory dva každý v jiném prostředí?



# Dynamické zhášení

Snížení intenzity fluorescence dynamickým zhášením je popsáno **Sternovou-Volmerovou rovnicí**:

$$F_0/F = \tau_0/\tau = 1 + k_q \tau_0 C_q$$

kde je  $F_0$  – intenzita fluorescence nebo kvantový výtěžek fluorescence za nepřítomnosti zhášedla,

$F$  - totéž za přítomnosti zhášedla o koncentraci  $C_q$ ,  $\tau_0$  – doba dohasínání fluorescence bez zhášedla,  $\tau$  - doba dohasínání za přítomnosti zhášedla,  $k_q$  – bimolekulární zhášecí konstanta (= bimolekulární rychlostní konstanta určená difúzí vynásobená účinností zhášení).

Hodnota  $k_q$  udává koncentraci zhášedla, při které se sníží intenzita fluorescence na polovinu.

Nejčastějším zhášedlem fluorescence i fosforescence je molekulární **kyslík** ( $O_2$ ). Dále fluorescenci zhášejí (v důsledku mezisystémové konverze) atomy halogenů jako je **bróm** a **jód**. Často používaným zhášedlem je také akrylamid.

# Statické zhášení

Vytváří se **komplex fluoroforu a zhášedla**, který už nefluoreskuje  
Platí pro něj také Sternova-Volmerova rovnice:

$$F_0/F = 1 + K_a \tau_0 C_q$$

Kde  $K_a$  je asociační konstanta fluoroforu a zhášedla

Typickými statickými zhášedly jsou:

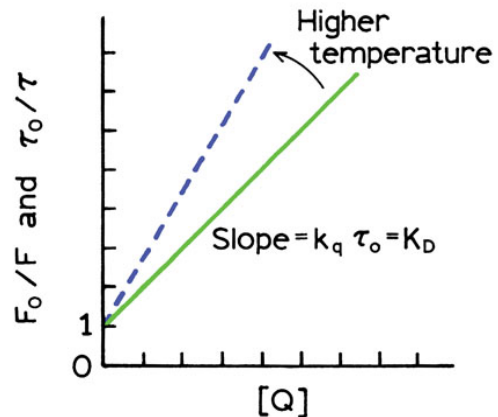
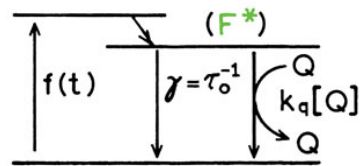
Báze nukleových kyselin  
Guanin  
Nikotinamid  
Těžké kovy

# Rozdílná teplotní závislost dynamického a statického zhášení

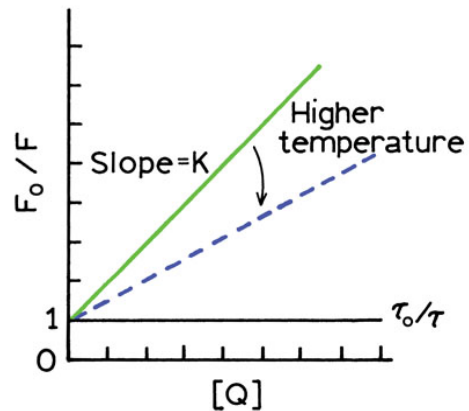
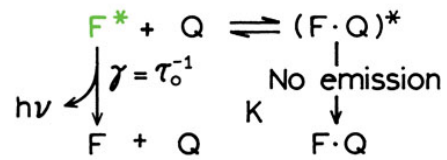
## Dynamické zhášení

## Statické zhášení

Collisional Quenching



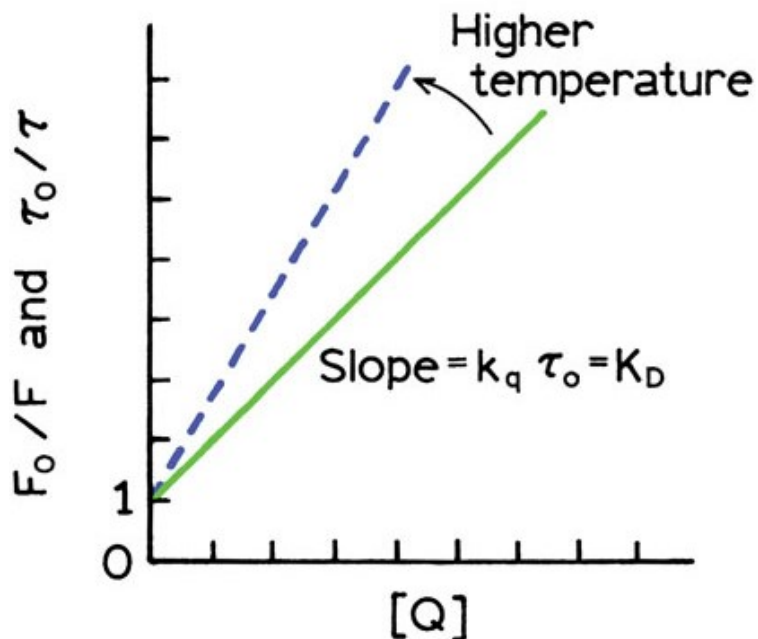
Static Quenching



- Oba druhy zhášení ukazují stejnou závislost na koncentraci zhášedla.
- Při statickém zhášení se pouze „zneviditelní“ část fluoroforů, které vytvoří komplexy.
- **Nemění se** doba dohasínání fluorescence  $\tau$ .
- Při dynamickém zhášení se doba dohasínání **mění**  $\tau_0 > \tau$ .

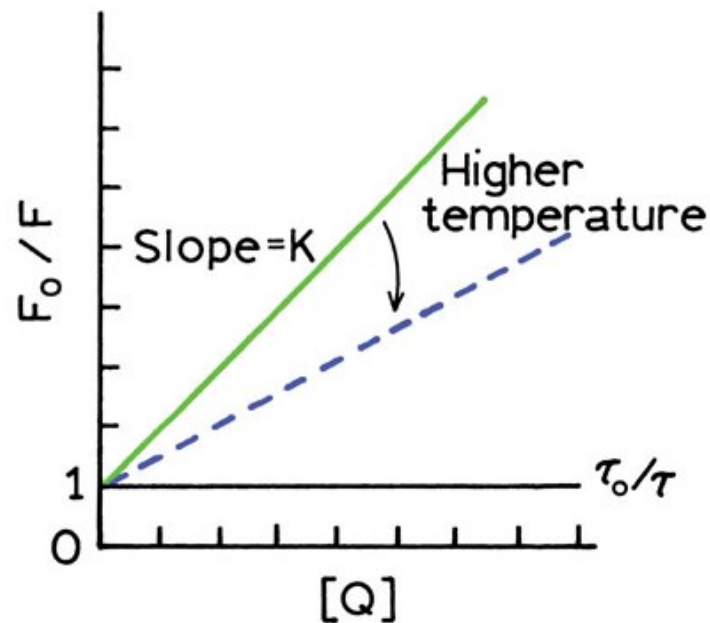
# Závislost obou druhů zhášení na teplotě

Dynamické zhášení



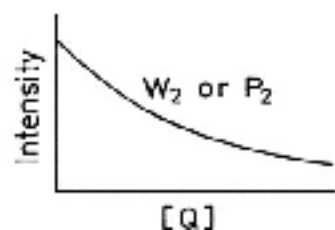
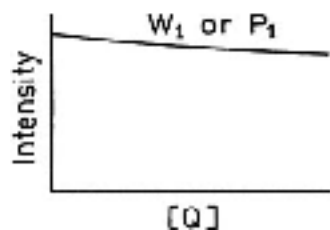
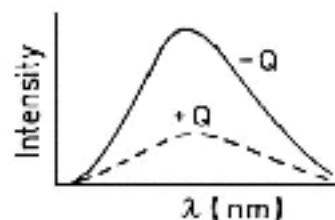
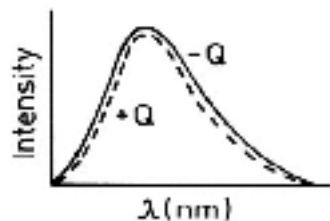
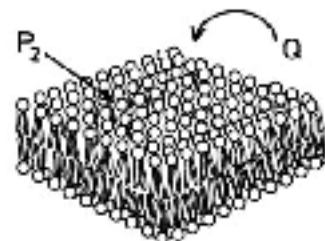
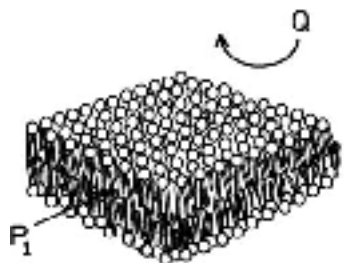
Dynamické zhášení se s rostoucí teplotou **zvyšuje**.  
Zvyšuje se pohyblivost molekul zhášedla, které takto za stejný čas „uhasí“ více molekul fluoroforu.

Statické zhášení



Statické zhášení se s rostoucí teplotou **snižuje**,  
protože dochází snadněji k disociaci slabě vázaných komplexů fluoroforu a zhášedla.

# Využití zhášení při lokalizaci fluoroforu



## V membráně

Jestliže je fluorofor P1 zanořen v membráně, je pro zhášedlo Q nedostupný a ke zhášení téměř nedochází.

S rostoucí koncentrací zhášedla se intenzita fluorescence téměř nemění.

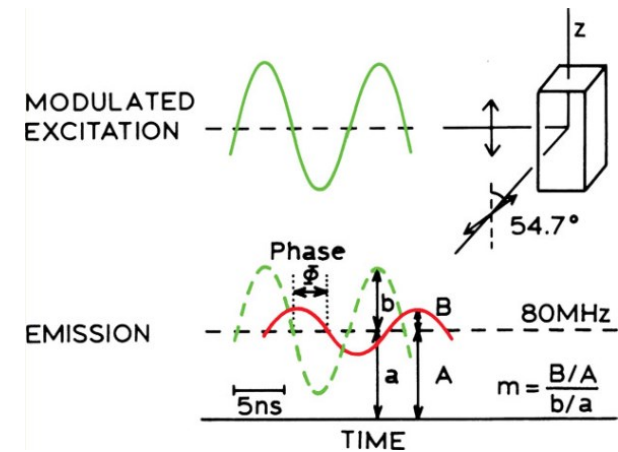
## Na povrchu

Jestliže je fluorofor P2 na povrchu, dochází k účinnému zhášení.

S rostoucí koncentrací zhášedla intenzita fluorescence velmi výrazně klesá.

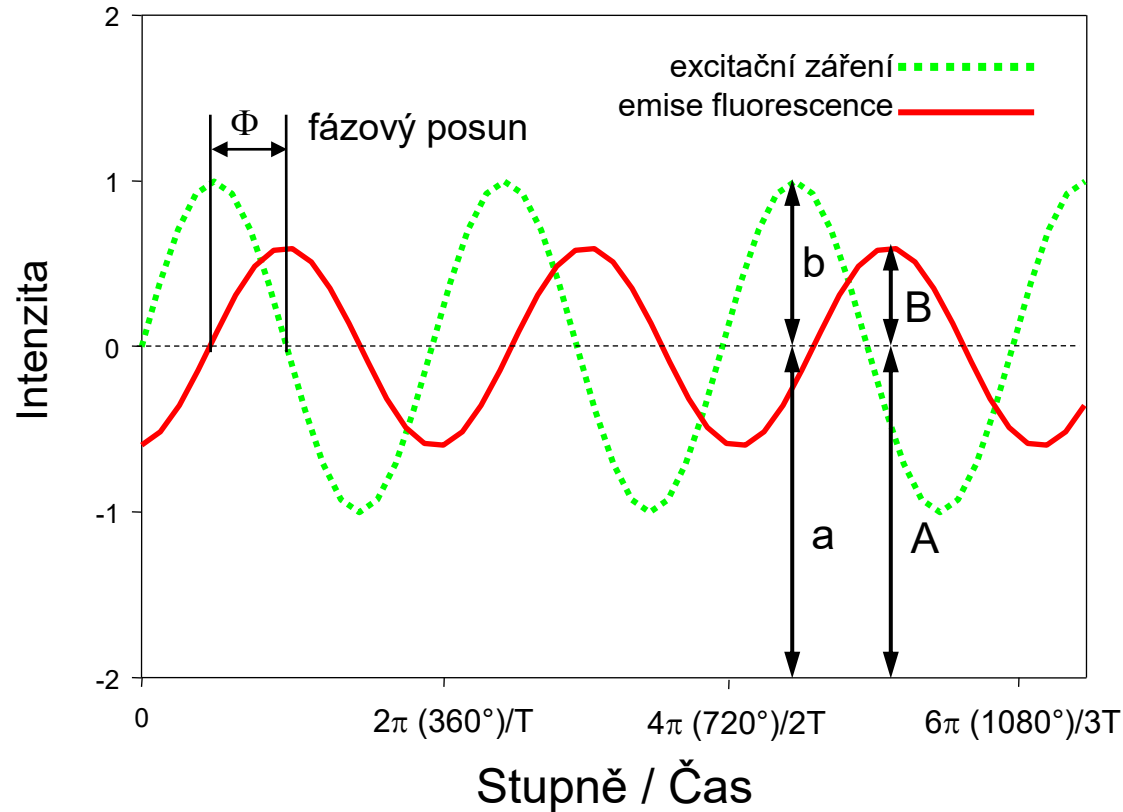
# Metoda fázově modulovaného budícího záření

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  $\tau$





# Určení doby dohasínání metodou fázové modulace



Určení času dohasínání z fázového posunu  $\Phi$

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

Modulace excitace  $b/a$  (výška peaku/střední intenzita)

Modulace emise  $B/A$

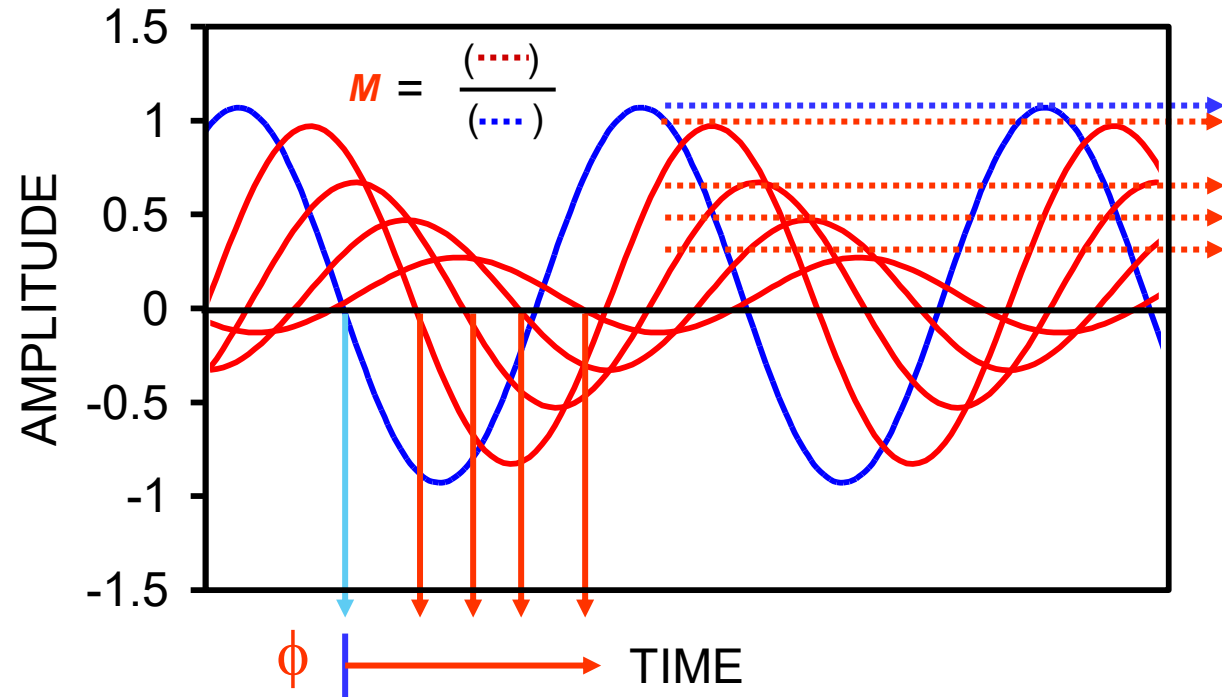
Relativní modulace  $m$

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

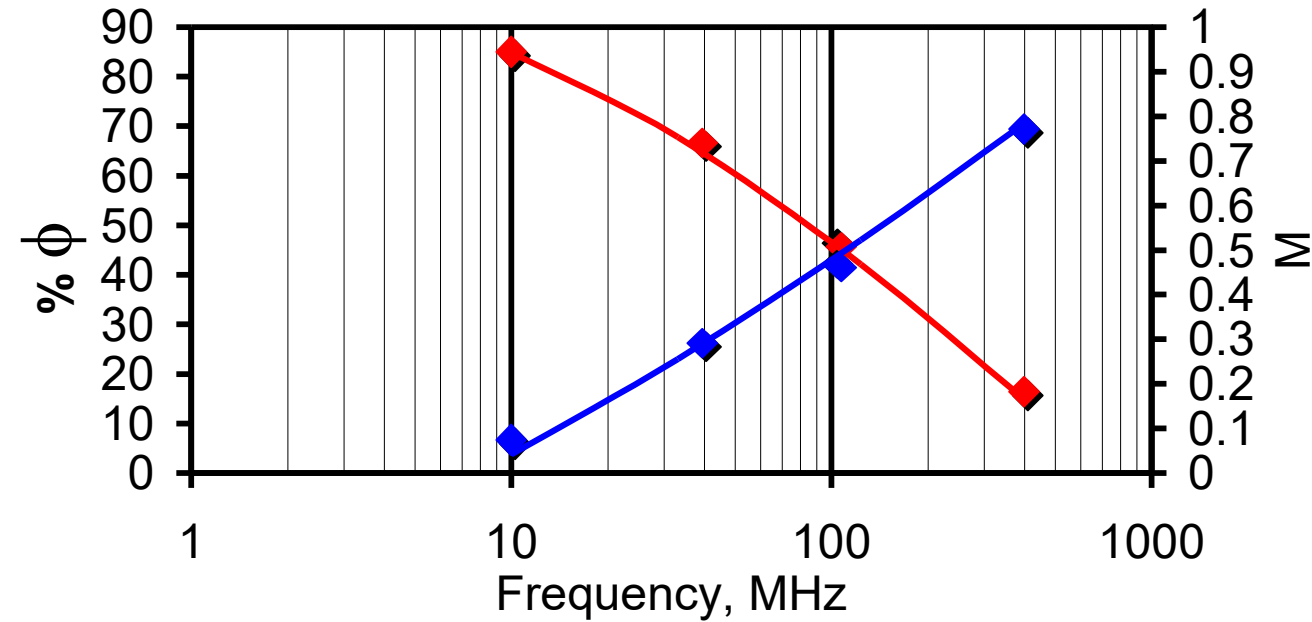
Určení času dohasínání z modulace  $m$

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

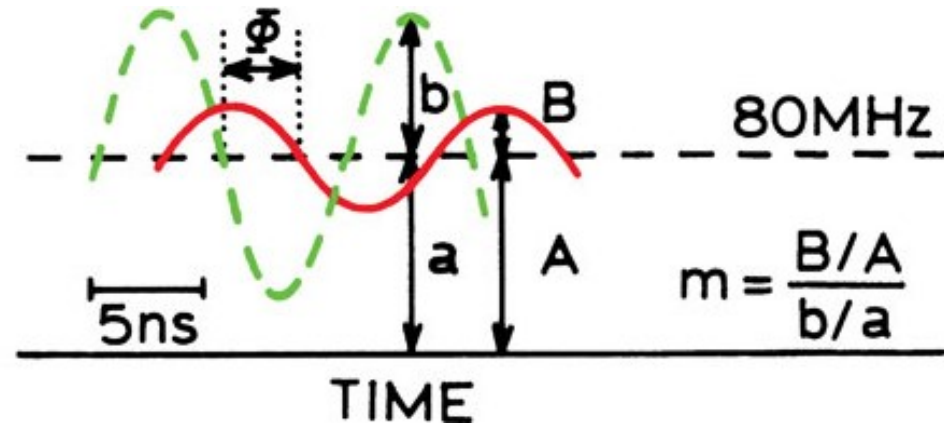
# Princip měření pomocí fázové modulace



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



# Praktický příklad výpočtu



$$\Phi = 68^\circ$$

$$m = 0.4$$

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

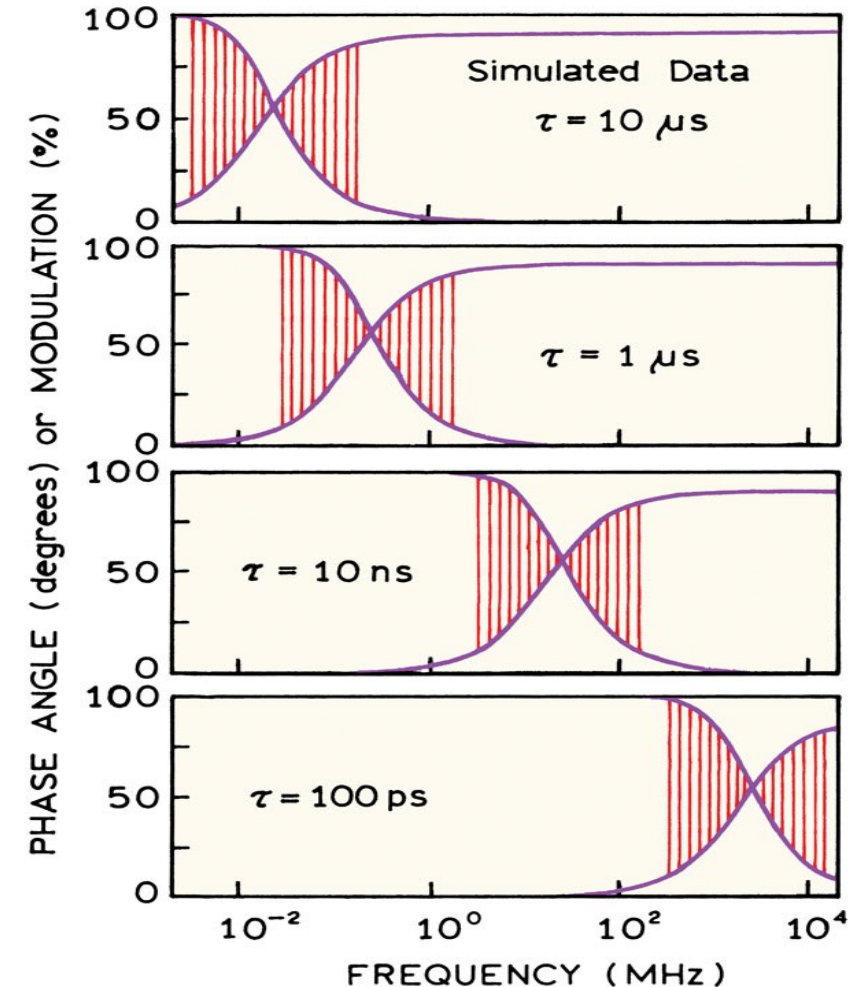
$$m = \frac{1}{\sqrt{1 + \omega^2 \tau_m^2}}; \quad \omega = 2\pi \cdot f$$

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

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

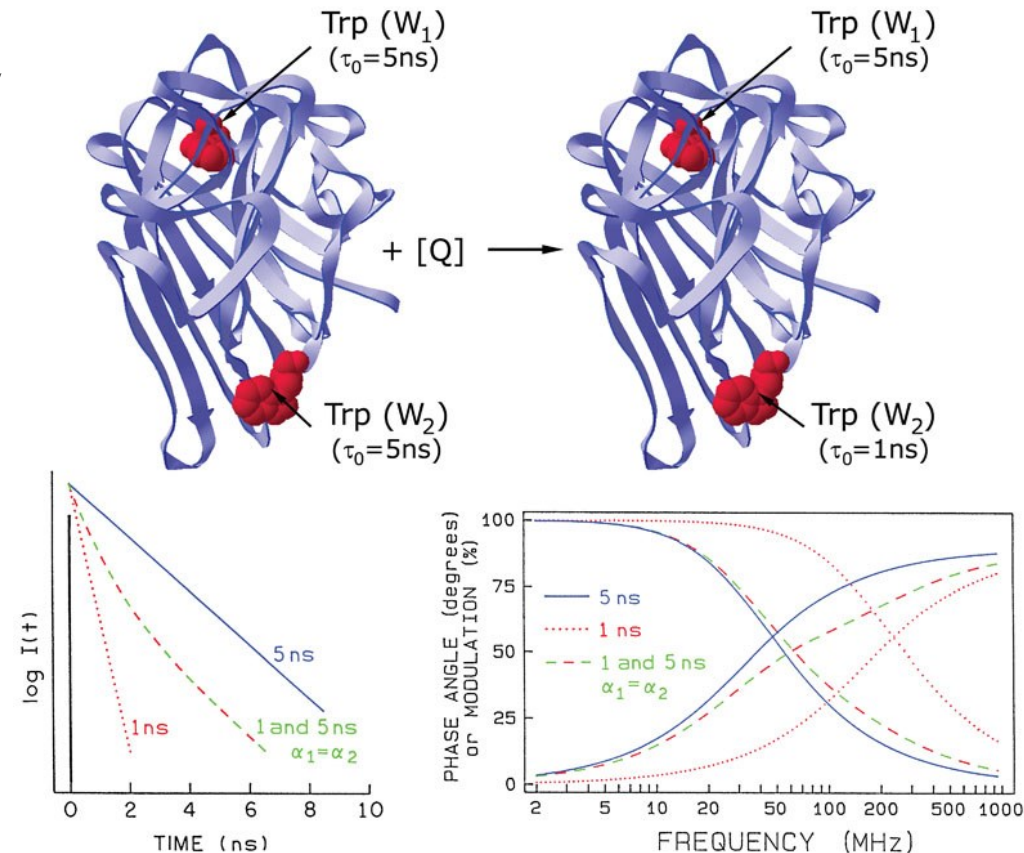
# Závislost parametrů získaných metodou fázové modulace na $\tau$

- Čím je kratší doba dohasínání  $\tau$ , 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

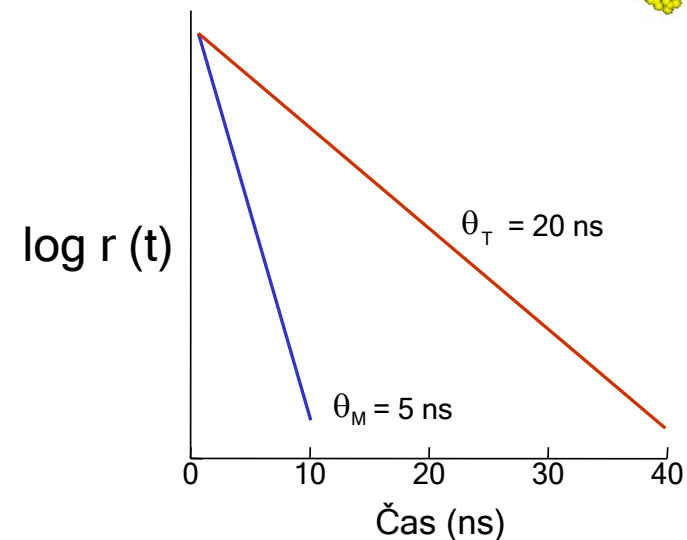
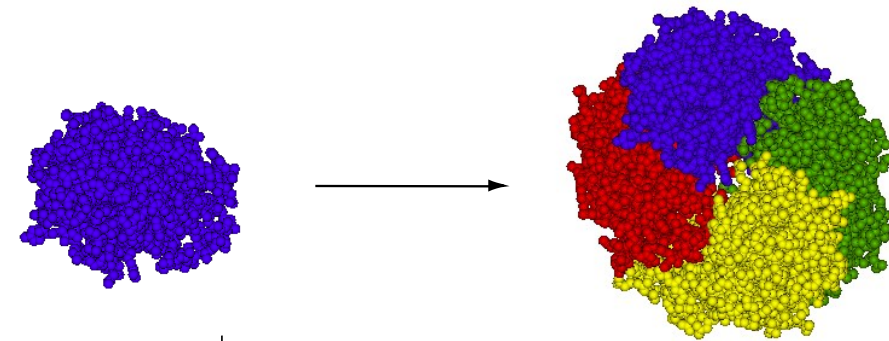
- Protein se dvěma fluorofory – tryptofany
- Fluorofory mají ve stejném prostředí stejnou hodnotu  $\tau$
- Po přidání zhašedla se sníží doba fluorescence fluoroforu na povrchu  $\tau_2$
- Výsledkem je „prohnutá“ křivka
- Úkolem dekonvoluce je pak určit  $\tau_1$ ,  $\tau_2$  a poměrné příspěvky fluoroforů  $\alpha_1, \alpha_2$



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

# Změna rotačního korelačního času při multimerizaci proteinu

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

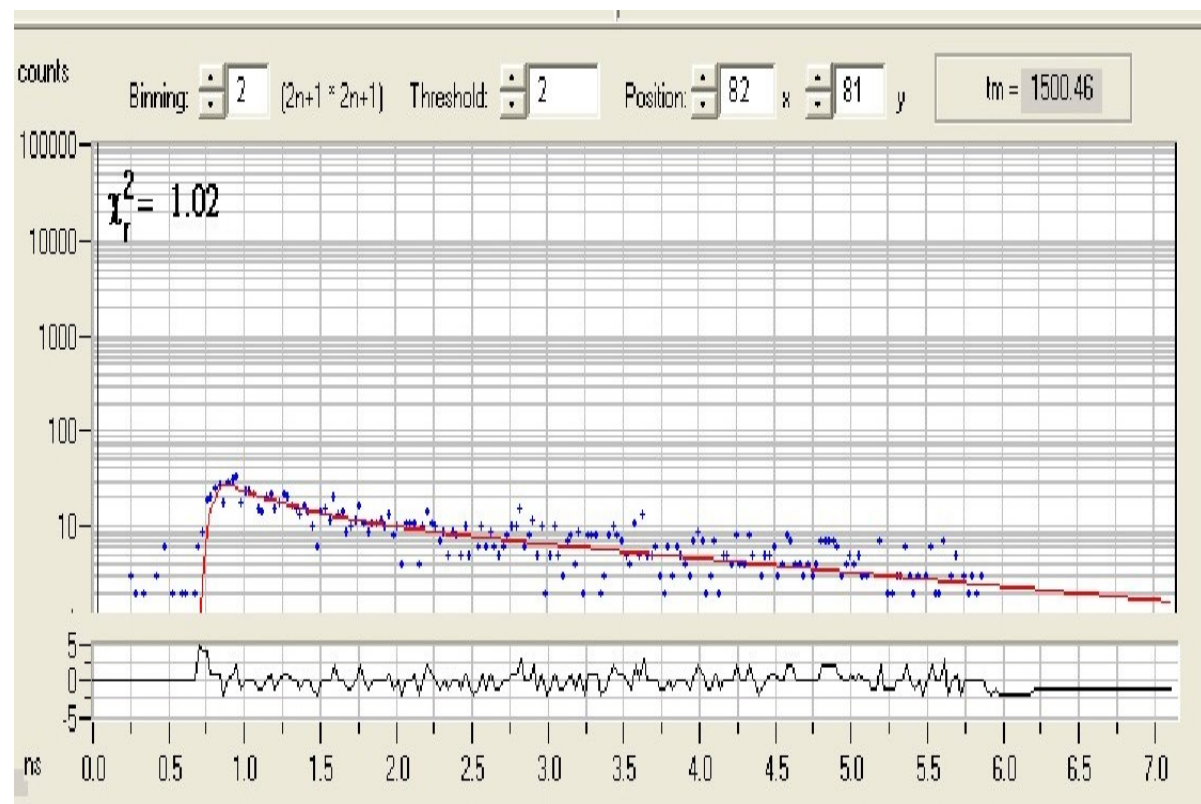
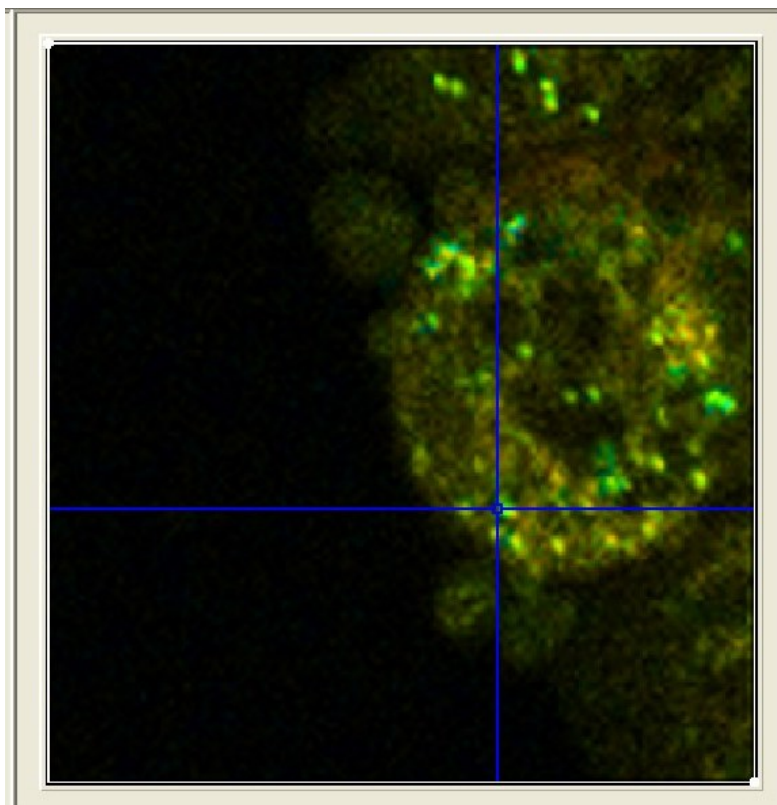


# Fluorescence LifeTime Imaging Microscopy – FLIM



- 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.

# Příklad detailního zobrazení FLIM

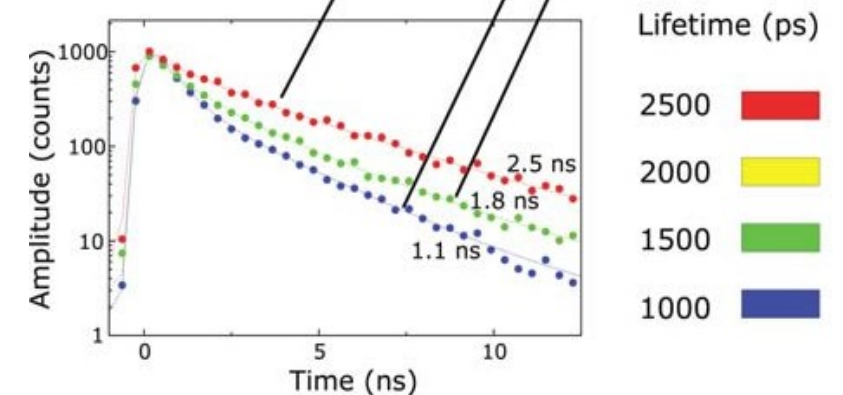
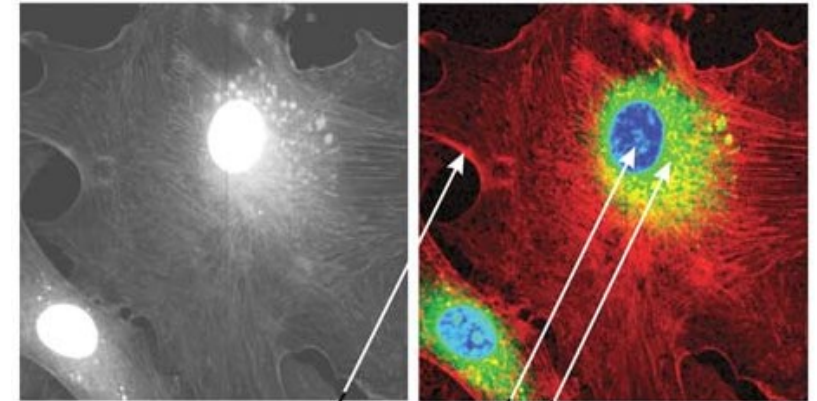


Závislost doby dohasínání fluorescence NADH je dvou-exponenciální s hodnotou 0.4 ns pro volnou a 3 ns pro navázanou molekulu NADH.



# FLIM zlepšuje rozlišení obrazu

- Buňky (artery endothelial cells) obarveny třemi různými fluorofory
- Nukleové kyseliny byly obarveny DAPI
- F-aktin byl obarven Bodipy FL-phalloidin
- Mitochondrie byly obarveny Mito-Tracker Red CMX Ros

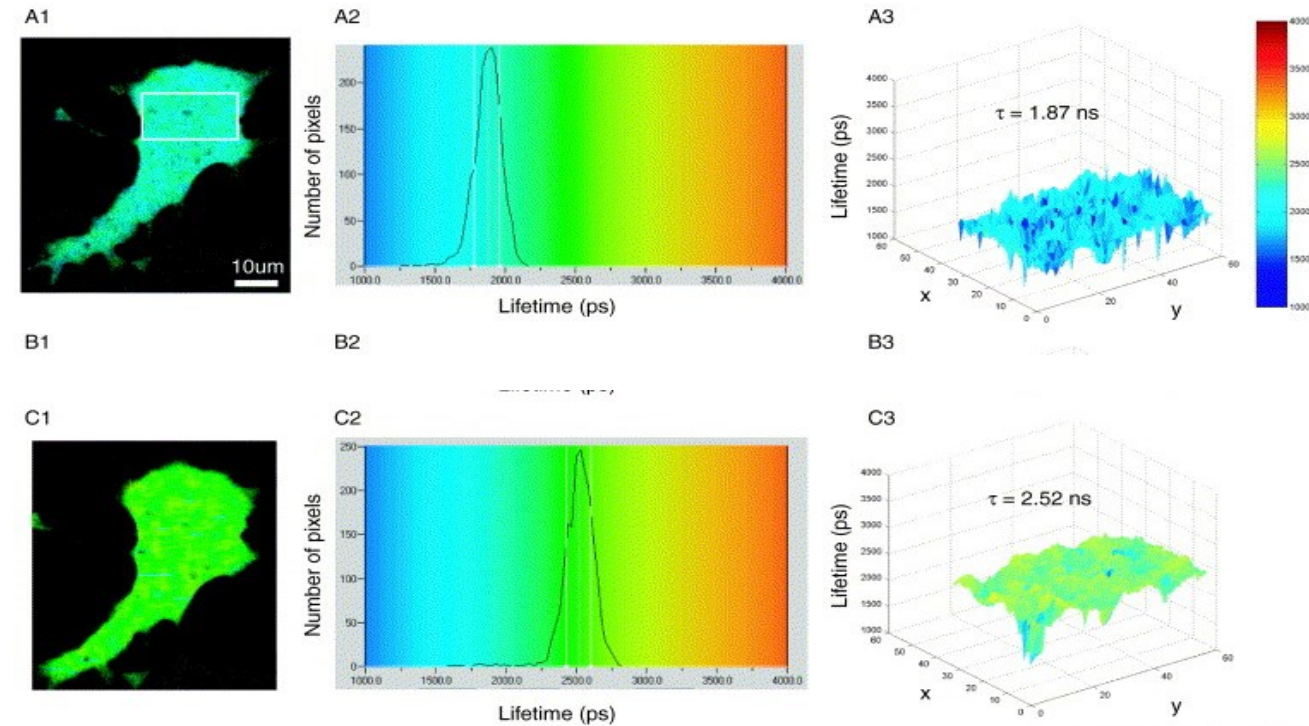


- Obraz intenzity fluorescence neumožňuje rozlišit tři použité fluorofory
- **Obraz časově rozlišené fluorescence umožňuje určit rozmístění všech tří fluoroforů na základě času dohasínání fluorescence.**

# Použití FLIM při sledování interakce proteinů

Rychlejší dohasínání v přítomnosti zhášejícího proteinu

Normální - pomalé 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.

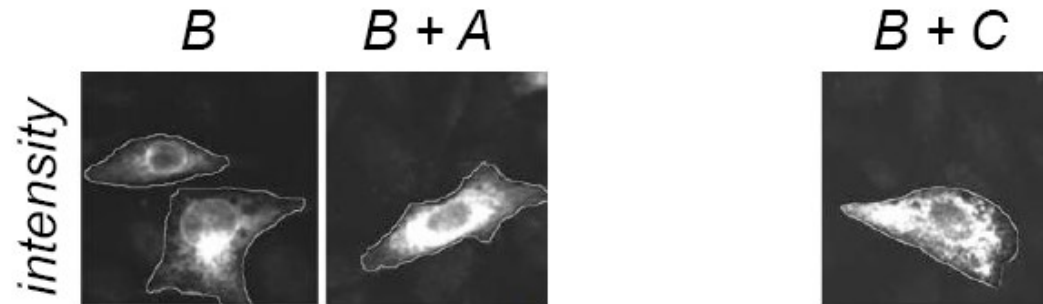
FRET-FLIM mikroskopie byla využívána při charakterizaci vytváření dimeru transkripčního faktoru C/EBP $\alpha$  uvnitř jádra živých buněk GHFT1-5

# Interakce nebo kolokalizace?

Example FRET-FLIM

Colocalisation or Interaction?

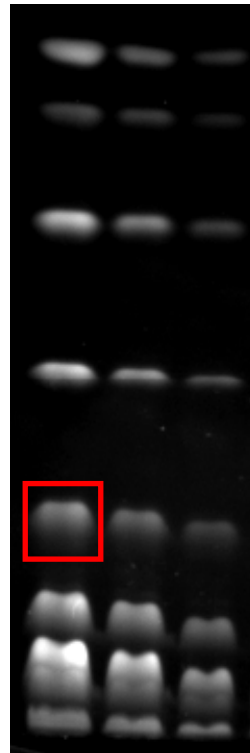
B = donor (FITC)  
A = acceptor (Cy3)  
C = acceptor (Cy3)



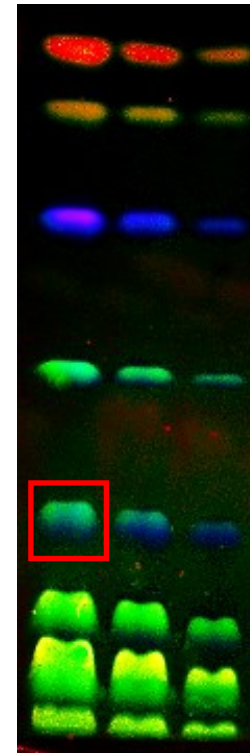
# Využití časově rozlišené fluorescence při proteomické analýze

Gel barvený  
Sypro-Ruby

Intenzita



Časové rozlišení



Upraveno podle materiálů Materialů Photonic Research Systems Ltd. [www.prsbio.com](http://www.prsbio.com)

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.

- 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/~zfishar/fluorescence/Default.htm>
- Poděkování:  
Grafika z knihy Principles o Fluorescence byla pro účely této přednášky laskavě poskytnuta profesorem J.R. Lakowitzem.



# Spectraviewer – tips & tricks

Click & drag to zoom into graph

Reset Settings View full screen

Relative intensity (%)

Wavelength (nm)

356nm ● CFSE (fluorescein...  
10% Ex, 0% Em

Light source Excitation filter Emission filter

! Note: no light sources are added to SpectraViewer.  
Please select a light source.

+ Add lasers + Add a lamp

1 Fluorophore

Show	Ex	Em
<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>

Fluorophore

<input checked="" type="checkbox"/>	● CFSE (fluorescein, ×)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	×
-------------------------------------	-------------------------	-------------------------------------	-------------------------------------	---

- [Fluorescence SpectraViewer](#)

## 2. domácí úkol

- Spectraviewer

<http://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html>