

## ZAHRADA

### FLUORESCENČNÍ KORELAČNÍ SPEKTROSKOPIE

LENKA BERANOVÁ, JANA HUMPOLÍČKOVÁ  
a MARTIN HOF

Ústav fyzikální chemie J. Heyrovského AV ČR, v. v. i.,  
Dolejškova 2155/3, 182 23 Praha 8  
lenka.beranova@jh-inst.cas.cz

Došlo 12.6.08, přijato 26.6.08.

Klíčová slova: fluorescenční korelační spektroskopie, auto-korelační funkce, konfokální mikroskop, dvoubarevná fluorescenční korelační spektroskopie, časově rozlišená fluorescenční korelační spektroskopie

#### Obsah

1. Úvod
2. Experimentální uspořádání
3. Autokorelační funkce
4. Tripletní stav fluoreskující molekuly
5. Korelace dvou různých signálů a dvoubarevná FCS
6. Časově rozlišená FCS
7. Závěr

#### 1. Úvod

Mít možnost sledovat proteiny nebo nukleové kyseliny na úrovni jednotlivých molekul je přáním všech, kdo se snaží objasnit klíčové procesy v živých buňkách. Jednou z technik, která se snaží toto přání naplnit, je fluorescenční korelační spektroskopie (FCS). Metoda vznikla v 70. letech 20. století<sup>1</sup>. Od té doby se podařilo výrazně zlepšit její experimentální uspořádání a byla využita v širokém spektru biologických aplikací včetně měření uvnitř živých buněk<sup>2,3</sup>.

Fluorescenční korelační spektroskopie využívá konfokální mikroskop. Nevytváří se při ní ale skenováním obraz vzorku jako v klasické konfokální mikroskopii. Principem této metody je sledování časových fluktuací intenzity fluorescence pocházející z malé ohniskové oblasti mikroskopu. Tyto fluktuace jsou způsobeny difuzním pohybem fluoreskujících molekul.

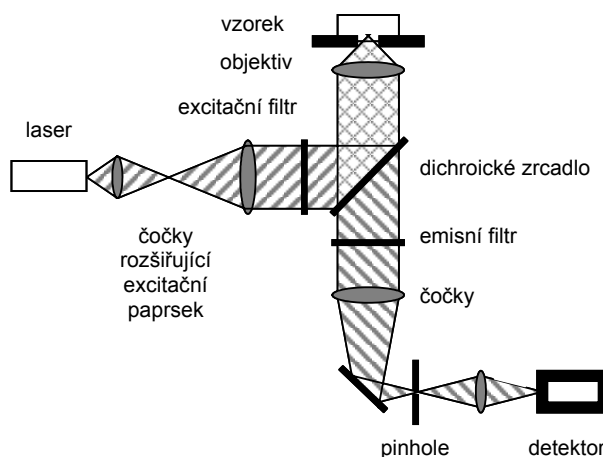
Mikroskop je zaostřen do malé oblasti – detekční objem je asi 1 femtolitr. Vzhledem k tomu, že sledujeme

vzorky s řádově nanomolární koncentrací fluorescenčně označených molekul, je v tomto objemu průměrně pouze jedna fluoreskující molekula. Na fluktuacích signálu se proto výrazně projeví, jak molekuly termálním pohybem přicházejí do detekčního objemu a jak ho opouštějí. Ze statistické analýzy časově proměnlivého fluorescenčního signálu pak lze určit průměrnou dobu, po kterou molekula zůstává v detekčním objemu, difuzní koeficient a koncentraci dané látky. Pro určení těchto parametrů je potřeba sledovat fluktuace několik minut až několik hodin.

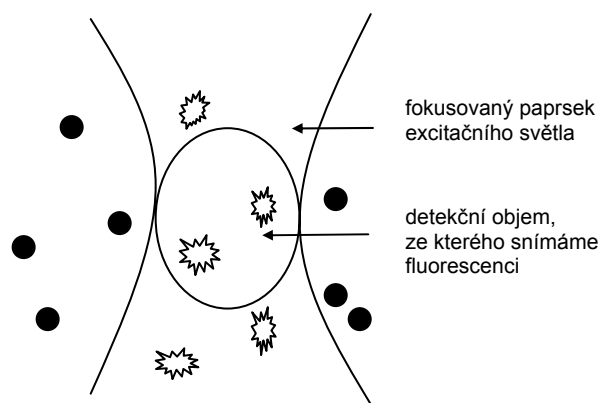
Můžeme zkoumat roztok *in vitro*, vnitřek živých buněk nebo jejich membránu. Lze získat informace o dějích, které ovlivňují difuzní koeficient určité molekuly – například o sbalení proteinu nebo nukleové kyseliny, protein-proteinových interakcích, navázání substrátu na protein, navázání molekuly na membránu.

#### 2. Experimentální uspořádání

Experimentálním zařízením pro FCS je invertovaný konfokální fluorescenční mikroskop (obr. 1). Používá se objektiv s velkou numerickou aperturou, většinou s vodní imerzí. Laserový paprsek excitačního světla je fokusován do zkoumaného vzorku. Vytváří ohnisko, jehož velikost je limitovaná difrakcí. Fluorescence excitovaných molekul je snímána objektivem a pomocí dichroického zrcadla a emisních filtrů je oddělena od excitačního záření. Do detekční části optické dráhy je umístěna konfokální štěrbinová (pinhole) o průměru 40–100  $\mu\text{m}$ , která efektivně blokuje světlo, které pochází z oblastí mimo ohniskovou rovinu. Velikost detekčního objemu (oblasti, ze které snímáme fluorescenci) je asi 0,3–1,0 femtolitrů (obr. 2).



Obr. 1. Schéma konfokálního mikroskopu



Obr. 2. Detekční objem v ohnisku mikroskopu

Jinou možností je použití dvoufotonového fluorescenčního mikroskopu. Pro excitaci dvěma fotony je zapotřebí mnohem vyšší hustota záření než pro jednofotonovou excitaci, proto se výrazně omezí oblast, ve které jsou molekuly excitovány. V tomto uspořádání už není potřeba použít pinhole. Výhodné je také, že se zmenšením excitované oblasti omezí fotodestrukce vzorku – to je zvláště důležité u intracelulárních měření.

FCS klade velké požadavky na použitá fluorescenční barviva. Stejně jako při tradiční spektroskopii je důležitý vysoký účinný průřez absorpce a kvantový výtěžek fluorescence, navíc hraje velkou roli fotostabilita barviva, které musí vydržet vysokou intenzitu světla v ohnisku mikroskopu. Mezi používaná barviva pro FCS patří např. skupina barev Alexa s různými excitačními a emisními vlnovými délkami, rhodaminy a cyaniny. Používají se také fluorescenční proteiny – různé formy GFP a DsRed.

### 3. Autokorelační funkce

Informace o pohybu jednotlivých molekul lze získat statistickou analýzou fluktuací fluorescenčního signálu,  $F$ . Vytváříme tzv. autokorelační funkci  $G(\tau)$ . Ta je definována

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \cdot \delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \quad (1)$$

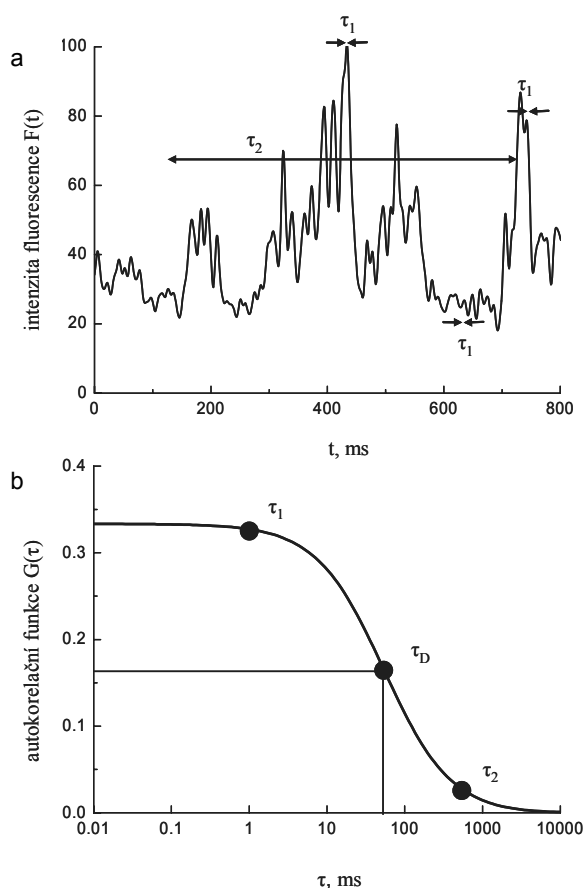
kde  $\langle \rangle$  značí průměrnou hodnotu v čase,  $F(t)$  intenzitu fluorescence a  $\delta$  okamžitou odchylku signálu od jeho průměrné hodnoty:

$$\langle F(t) \rangle = \frac{1}{T} \int F(t) dt \quad (2)$$

$$\delta F(t) = F(t) - \langle F(t) \rangle \quad (3)$$

Autokorelační funkce ukazuje, jak souvisí intenzita fluorescence s intenzitou fluorescence po určité časové prodlevě  $\tau$  (viz obr. 3). Z fluktuujícího fluorescenčního signálu (část měření je schematicky znázorněna na obr. 3a) určíme  $G(\tau)$  pro různé intervaly  $\tau$ . Typický tvar autokorelační funkce je na obr. 3b. Pro  $\tau = 0$  dává funkce podle rovnice (1) druhou mocninu průměrné relativní odchylky.

Autokorelační funkce má své maximum pro malé  $\tau$ , pro delší časy  $\tau$  funkce klesá k nule. Proč vypadá právě takhle? Zkusme to kvalitativně vysvětlit. Do detekčního objemu přicházejí difuzním pohybem jednotlivé molekuly označené fluorescenčním barvivem a zase z něj odcházejí. Ve zjednodušeném příkladu budeme předpokládat, že je v něm buď jedna fluoreskující molekula, nebo žádná. V okamžiku, kdy v detekčním objemu molekula je, je od-



Obr. 3. Vytvoření autokorelační funkce: a) naměřené fluktuace fluorescenčního signálu, b) autokorelační funkce. Pro krátké časové intervaly ( $\tau_1$ ) je hodnota autokorelační funkce velká, pro větší časové intervaly ( $\tau_2$ ) se snižuje, protože hodnoty intenzity fluorescence na začátku a na konci intervalu už spolu nesouvisí. Čas  $\tau_D$  udává dobu, po kterou se fluoreskující částice průměrně zdržuje ve fokálním objemu. Autokorelační funkce odpovídá hodnotám  $P/N = 3$ ,  $\tau_D = 54$  ms,  $z_0/r_0 = 7$

chylka od průměrné hodnoty fluorescence  $\delta F$  kladná, v okamžiku, kdy tam není, záporná. Pokud je časový interval  $\tau$  natolik malý, že je pravděpodobné, že pokud na jeho začátku byla v detekčním objemu fluoreskující molekula, tak na jeho konci tam tatáž molekula stále ještě je (na začátku i na konci intervalu je  $\delta F > 0$ ), případně, pokud tam na začátku molekula nebyla, pravděpodobně se tam nestačí za daný časový interval žádná objevit (na začátku i na konci intervalu je  $\delta F < 0$ ), pak součin odchylek na začátku a na konci intervalu bude většinou kladný a jeho vystředováním přes celé měření dostaneme kladné číslo. Pokud zvolíme dlouhý časový interval  $\tau$ , v detekčním objemu se během něj vystřídá několik různých molekul. Intenzita fluorescence na začátku intervalu nijak nesouvisí s intenzitou na konci. Součin odchylek na začátku a na konci intervalu má náhodné hodnoty, někdy kladné, někdy záporné. Při vystředování přes celé měření dostaneme nulu.

Časový interval  $\tau_D$ , pro který má autokorelační funkce poloviční hodnotu, než má ve svém maximu, pak můžeme považovat za průměrnou dobu, po kterou se jedna molekula zdržuje v detekčním objemu.

Odchylku od průměrného fluorescenčního signálu v čase  $t$  je možné vyjádřit jako

$$\delta F(t) = \int W(\mathbf{r}) \delta(\eta C(\mathbf{r}, t)) d\mathbf{r} \quad (4)$$

kde integrujeme přes detekční objem.  $C$  je lokální koncentrace částic,  $\eta$  parametr nezávislý na prostorových souřadnicích, který určuje počet fotonů detegovaný z jedné částice za jednu sekundu (závisí na celkové intenzitě excitačního světla, účinnosti detekce, účinném průřezu absorpce světla a kvantovém výtěžku fluorescence).  $W(\mathbf{r})$  udává prostorové rozložení emitovaného světla. Často se aproximuje třidimensionální Gaussovou funkcí

$$W(\mathbf{r}) = e^{-\frac{2x^2+y^2}{r_0^2}} \cdot e^{-\frac{2z^2}{z_0^2}} \quad (5)$$

kde  $z_0$  udává charakteristický rozměr detekčního objemu ve směru optické osy mikroskopu a  $r_0$  rozměr v ohniskové rovině.

Pokud budeme předpokládat, že u částic, které sledujeme, se parametr  $\eta$  nemění v čase a částice se pohybují volnou difuzí ve třech dimensích, je možné odvodit teoretický tvar autokorelační funkce:

$$G(\tau) = \frac{1}{V_{\text{eff}} \langle C \rangle} \cdot \frac{1}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + \left(\frac{r_0}{z_0}\right)^2 \cdot \frac{\tau}{\tau_D}}} \quad (6)$$

$V_{\text{eff}}$  je efektivní detekční objem,

$$V_{\text{eff}} = \pi^2 \cdot r_0^2 \cdot z_0 \quad (7)$$

$\tau_D$  je tzv. difuzní čas, parametr udávající, jak dlouho je částice v detekčním objemu, souvisí s difuzním koeficientem  $D$  fluoreskující molekuly vztahem:

$$\tau_D = \frac{r_0^2}{4D} \quad (8)$$

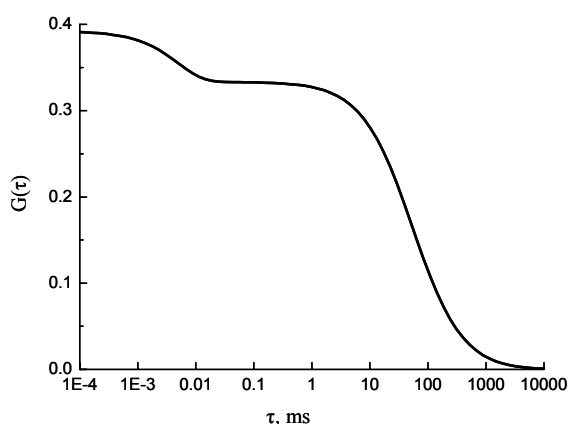
Pokud tedy naměříme fluktuující fluorescenční signál, spočítáme autokorelační funkci podle vztahu (1) a proložíme ji teoretickou závislostí (6), můžeme získat důležité informace o sledovaném systému: difuzní čas  $\tau_D$ , který charakterizuje rychlost pohybu molekul ve vzorku, průměrný počet částic („particle number“ –  $PN$ ) v detekčním objemu:

$$PN = \frac{1}{G(0)} = V_{\text{eff}} \langle C \rangle \quad (9)$$

a pokud známe rozměry detekčního objemu, můžeme určit difuzní koeficient a koncentraci dané látky.

#### 4. Tripletní stav fluoreskující molekuly

Při odvozování předchozích vztahů jsme předpokládali, že se v čase nemění fluorescenční vlastnosti fluoroforu – parametr  $\eta$ . Pro reálná fluorescenční barviva to ale neplatí. Po excitaci ze základního singletního stavu do excitovaného singletního stavu může totiž barvivo přejít do tripletního stavu. Přejed z tripletu zpět do základního singletního stavu trvá řádově delší dobu než vyzáření fluorescenčního kvanta. V této době molekula nemůže vyzářit foton. To se projeví tmavými intervaly, během kterých molekula procházející detekčním objemem nesvítí. Díky tomuto „blikání“ fluoroforu se změní tvar autokorelační funkce v oblasti krátkých časů  $\tau$  (viz obr. 4).



Obr. 4. Tvar autokorelační funkce při přechodu barviva do tripletního stavu ( $PN = 3$ ,  $\tau_D = 54$  ms,  $z_0/r_0 = 7$ ,  $T = 0,15$ ,  $\tau_r = 5$   $\mu$ s)

Pokud platí, že doba života tripletního stavu je řádově menší než  $\tau_D$ , lze tyto děje oddělit:

$$G_{celk}(\tau) = G_{pohyb}(\tau) \cdot X_{triplet}(\tau) \quad (10)$$

Dynamiku tripletního stavu můžeme vyjádřit vztahem:

$$X_{triplet}(\tau) = \frac{1 - T + T \cdot e^{-\frac{\tau}{\tau_{tr}}}}{1 - T} \quad (11)$$

kde  $\tau_{tr}$  je relaxační čas tripletního stavu a  $T$  je podíl částic, které se nacházejí v tripletním stavu. Naměřené autokorelační funkci pak můžeme proložit křivku:

$$G(\tau) = \frac{1 - T + T \cdot e^{-\frac{\tau}{\tau_{tr}}}}{1 - T} \cdot \frac{1}{PN} \cdot \frac{1}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + \left(\frac{r_0}{z_0}\right)^2 \cdot \frac{\tau}{\tau_D}}} \quad (12)$$

Analogicky jako přechod do tripletního stavu můžeme do analýzy autokorelační křivky zahrnout další rychlé jevy, které způsobují přechody mezi stavem, kdy molekula fluoreskuje, a mezi stavem, kdy nesvíčí, a zároveň neovlivňují difuzní koeficient molekuly.

## 5. Korelace dvou různých signálů a dvoubarevná FCS

Kromě autokorelační funkce lze také spočítat korelaci dvou různých signálů (kroskorelaci). V tomto případě sledujeme podobnost jednoho signálu s jiným signálem po daném časovém intervalu  $\tau$ .

Typické využití kroskorelace dvou signálů je v dvoubarevné fluorescenční korelační spektroskopii<sup>4,5</sup>. Při použití této techniky se dva druhy molekul označí dvěma fluorescenčními barvami, která mají dostatečně odlišné emisní vlnové délky. Fluorofory jsou vybudeny excitačním světlem o dvou různých vlnových délkách. Pomocí dichroického zrcadla a filtrů je rozlišena jejich fluorescence. Je detegována dvěma detektory. Můžeme pak spočítat autokorelační funkce jednotlivých komponent i jejich kroskorelaci. Tato technika se používá např. při sledování vytváření komplexů dvou molekul.

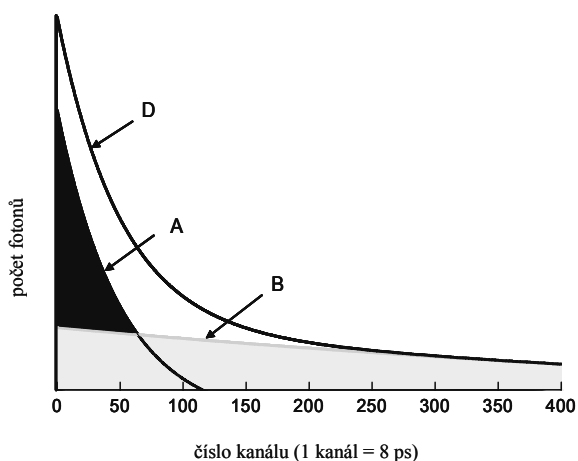
U dvoubarevné FCS je nicméně obtížné nastavit optickou aparaturu tak, aby se přesně překrývaly oba fokusované svazky o různých vlnových délkách. Tento problém lze omezit při dvoufotonové excitaci – lze najít dvojice barv s dostatečně vzdálenými maximy emisního spektra, které je možné excitovat zářením o jedné infračervené vlnové délce<sup>6</sup>.

## 6. Časově rozlišená FCS

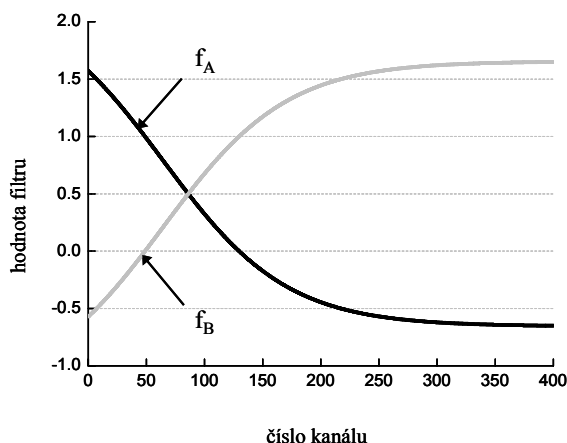
Časově rozlišená fluorescenční korelační spektroskopie (fluorescence lifetime correlation spectroscopy – FLCS)<sup>7</sup> využívá spojení dvou experimentálních přístupů – FCS a TCSPC (časově korelovaného čítání fotonů). Umožňuje rozlišit ve směsi fluorofory, které se liší dobou života. Lze tak získat autokorelační funkce jednotlivých fluoroforů i jejich kroskorelaci.

Vzorek je excitovaný krátkými laserovými pulsy opakovací frekvencí v řádu desítek MHz. Pro každý foton přicházející na detektor jsou zaznamenány dva časy: „makročas“, který zaznamenává polohu registrovaného fotonu na kontinuální časové ose od začátku experimentu, a „mikročas“, který udává, jaká doba uplynula mezi posledním laserovým pulsem a zaregistrováním daného fotonu. „Makročas“ je měřený s přesností v řádu sto nanosekund, „mikročas“ s přesností v řádu desítek pikosekund. V „makročase“ se projeví difuze molekul, přechody do tripletního stavu a podobně. Hodnota „mikročasu“ nám poskytuje informace o průběhu dohasínání fluorescence fluoroforu, ze kterého byl daný foton emitován<sup>8</sup>.

V jednoduchém případě zkoumáme vzorek složený ze dvou komponent označený dvěma barvami s odlišnými dobami života fluorescence. U obou barv musíme dopředu znát jejich průběh dohasínání (viz fluorofor A a fluorofor B na obr. 5). Z průběhu dohasínání jednotlivých barv a z dohasínání měřeného vzorku (údaj získaný z „mikročasu“ přicházejících fotonů) je možné spočítat statistické filtry  $f_A$  a  $f_B$  (viz obr. 6). Tyto filtry určují, ke kterému fluoroforu se s jakou vahou mají přiřazovat fotony přicházející v určitých „mikročasech“. Například pokud přijde foton velmi brzy po laserovém pulzu, je pravděpodobnější, že pochází od fluoroforu A. Do průběhu intenzity fluorescence fluoroforu A, ze které se pak počítá autokorelační funkce komponenty označené fluoroforem A, se



Obr. 5. Dohasínání směsi dvou fluorescenčních barv; A – fluorofor s kratší dobou života, B – fluorofor s delší dobou života, D – dohasínání fluorescence ve směsi fluoroforů A a B



Obr. 6. Statistické filtry pro dvě fluorescenční barviva; A – fluorofor s kratší dobou života, B – fluorofor s delší dobou života

tak tento foton započítá s koeficientem  $f_A = 1,5$ . Celkově se ale tento foton smí započítat pouze jednou, proto se do průběhu intenzity fluorescence komponenty označené fluoroforem B započítá s koeficientem  $f_B = -0,5$ . Pro fotony přicházející ve vyšších „mikročasech“ je pravděpodobnější, že patří fluoroforu B, proto se započítají s kladnou vahou do intenzity fluoroforu B a se zápornou vahou do intenzity fluoroforu A (obr. 6).

Použitím filtrů vzniknou ze signálu celého vzorku dva oddělené signály – od komponenty označené fluoroforem A a od komponenty označené fluoroforem B. Jejich intenzity fluktuují v čase (v našem označení se jedná o „makročas“). Z těchto signálů můžeme spočítat jak auto-korelační funkce obou komponent, tak jejich vzájemnou kroskorelaci.

Výhodné je využít FLCS při zkoumání procesů, při kterých se mění doba života fluorescenčního barviva v důsledku změny jeho nejbližšího okolí. Příkladem takového děje je kondenzace DNA. Interkalační barvivo, kterým je DNA obarvená, má jinou dobu života ve zkonzenzované a nezkonzenzované molekule DNA. Proto můžeme sledovat zvlášť signál od nezkonzenzovaných a zkonzenzovaných molekul DNA a získat tak bližší informace<sup>9</sup> o mechanismu sbalení řetězce DNA.

## 7. Závěr

Fluorescenční korelační spektroskopie (FCS) měří a analyzuje fluktuace fluorescenčního signálu způsobené difuzním pohybem fluorescenčně značených molekul. Z těchto fluktuací je možné určit difuzní koeficient dané látky a její koncentraci. V dvoubarevné FCS se navíc kroskorelují signály pocházející ze dvou skupin molekul označených barvivy s odlišným emisním spektrem. Tato metoda je vhodná pro sledování vytváření komplexů. Časově rozlišená FCS je založená na použití pulsní excitace, umožňuje rozlišit signály pocházející od fluorescenčních značek, které se liší dobou života.

## LITERATURA

1. Magde D., Elson E. L., Webb W. W.: *Biopolymers* 13, 29 (1974).
2. <http://www.biophysics.org/education/schwille.pdf>, staženo 22. dubna 2008.
3. Medina M. A, Schwille P.: *Bioessays* 24, 758 (2002).
4. Thompson N. L., Lieto A. M., Allen N. W.: *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12, 634 (2002).
5. Schwille P., Meyer-Almes F. J., Rigler R.: *Biophys. J.* 72, 1878 (1997).
6. Heinze K. G., Koltermann A., Schwille P.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 10377 (2000).
7. Böhmer M., Wahl M., Rahn H., Erdmann R., Enderlein J.: *Chem. Phys. Lett.* 353, 439 (2002).
8. Kapusta P., Wahl M., Benda A., Hof M., Enderlein J.: *J. Fluoresc.* 17, 43 (2007).
9. Humpolíčková J., Benda A., Sýkora J., Macháň R., Kral T., Gasinska B., Enderlein J., Hof M.: *Biophys. J.* 94, L17 (2008).

**L. Beranová, J. Humpolíčková, and M. Hof**  
(*J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*): **Fluorescence Correlation Spectroscopy**

Basic principles of fluorescence correlation spectroscopy (FCS) are explained. The method affords diffusion coefficients and concentrations of fluorescent-labeled species by studying temporary fluctuations of fluorescence signal caused by diffusion through the focal volume of confocal microscope. In dual-color FCS, cross-correlation of two signals from molecules labeled with two spectrally shifted dyes allows to observe interactions between the two molecules. It is also possible to distinguish between the signals of two dyes with different lifetimes. FCS uses pulsed laser excitation.