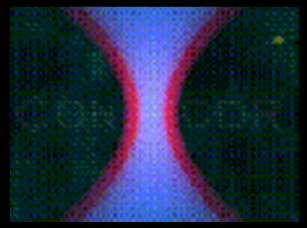


Espectroscopia de Correlação de Fluorescência (FCS)
x
Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)

PGF 5294 - Introdução à Técnica de Espalhamento de Luz Dinâmico: Teoria e Experimento

Daniela A. Nomura
Thais A. Enoki
Tiago R. Oliveira

21/05/2013

Introduction

DLS

DLS development occurred in the late 1960s and early 1970s

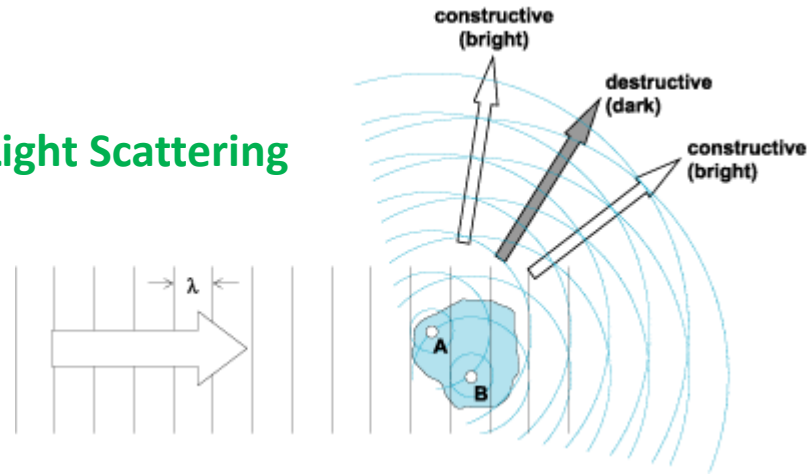
FCS

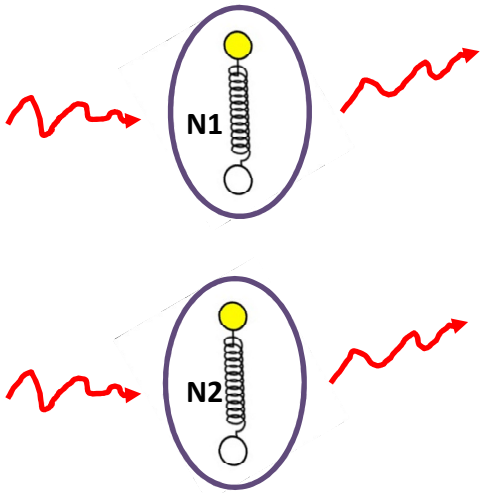
Beginning in 1972, Elson, Magde, and Webb published a series of papers describing a fluorescence-based analogue of DLS.

Fluorescence intensity fluctuations that could be analyzed in much the same way as the DLS signal.

Signal or Intensity Generation

Light Scattering





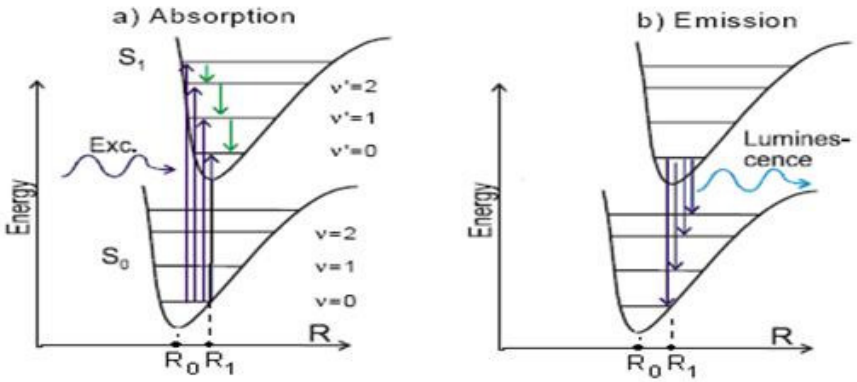
Electronic Density

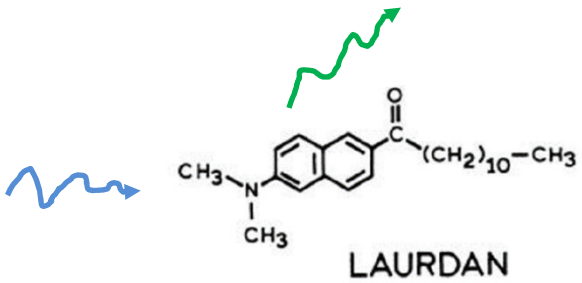
Time scale: $\Delta\tau \approx 10^{-15}$s

Elements: $D_H \geq 6$ nm

No internal structure

Fluorescence





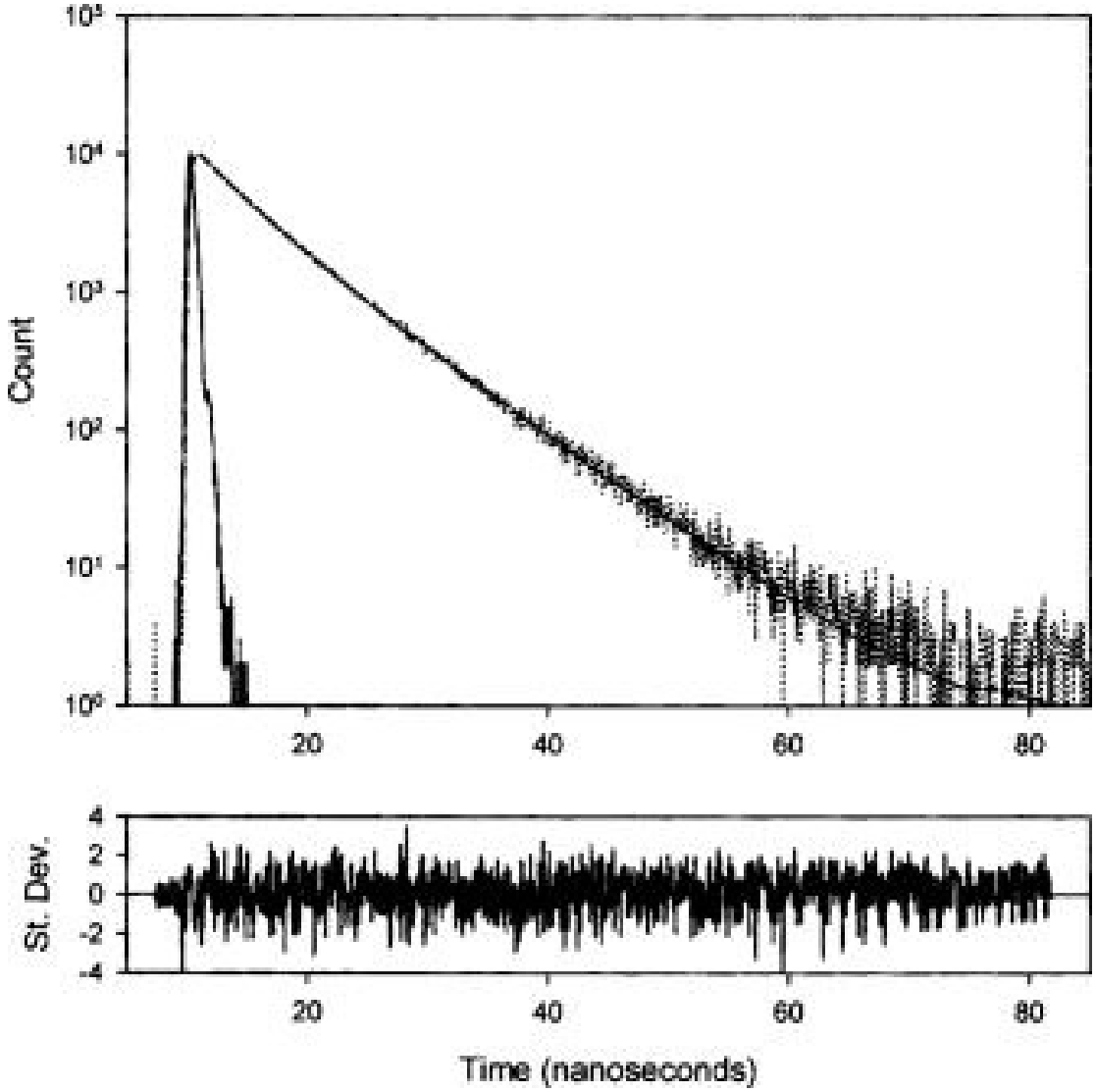
Electronic States

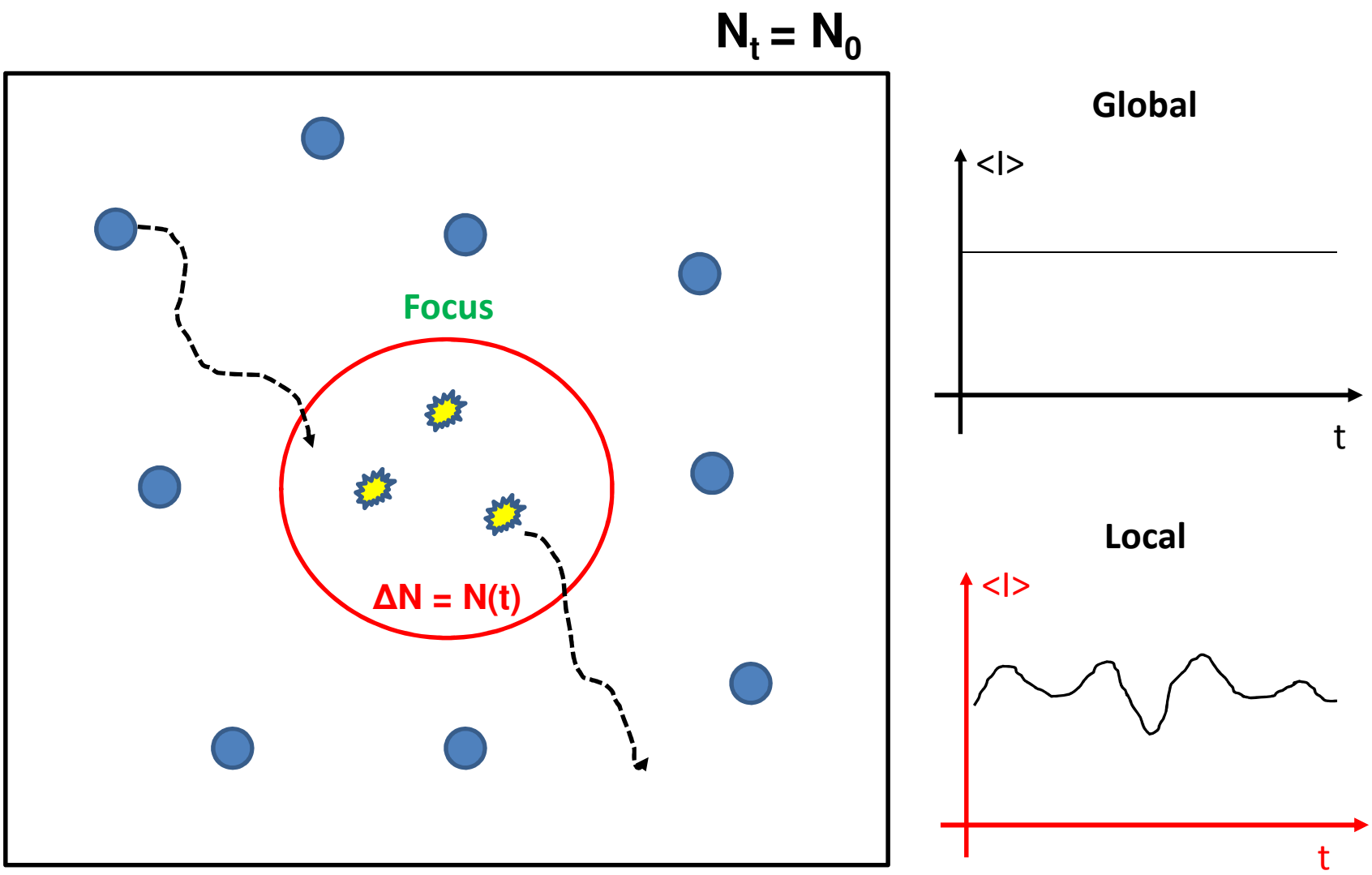
Time scale: $\Delta\tau \approx 10^{-9}$s

Elements: $D_H \geq 0.5$ nm

Depends on chemical structure

Time scale

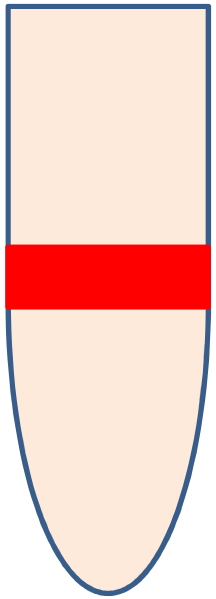




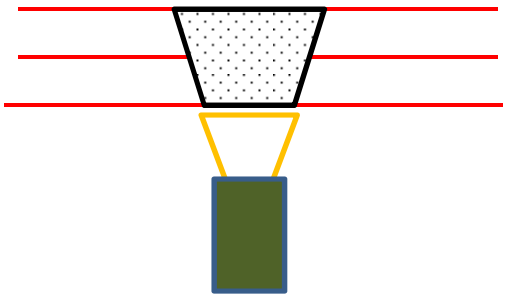
local variations in the particle concentration

Light Scattering

Sample



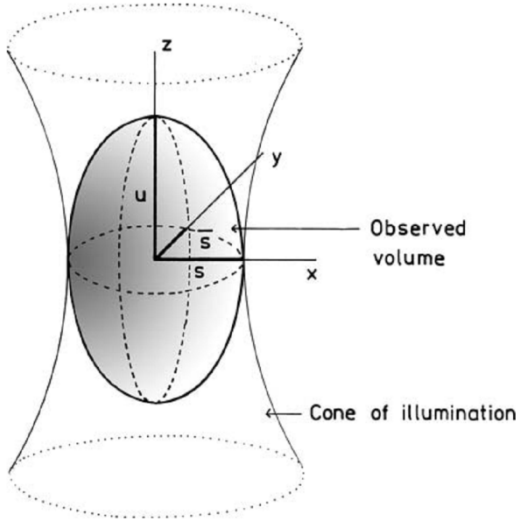
Sample volume



Beam

Detector

Fluorescence



$$\omega_0 = \frac{1.22\lambda}{2 \cdot NA}$$

Relembrando - Notas de aula da Carla

$$g_1(\tau) = \mathrm{Re}\left\{ \left\langle e^{i\vec{k}\cdot(\vec{r}(\tau+t)-\vec{r}(t))} \right\rangle_{\substack{\text{tempos}\\ \text{longos}}} e^{-i\omega_0\tau} \right\} =$$

Solução fundamental (1D) $C(x,0) = \delta(x)$ (CI)

$$\frac{\partial C}{\partial t} = +D\frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \rightarrow \left[C(x,t) = \frac{1}{\sqrt{4\pi\sigma^2}} \cdot e^{-x^2/2\sigma^2} \right]$$

variância $\left[\sigma^2 = \langle x^2 \rangle = Dt \right]$

(2) A expressão (*) da pg 1 mostra que

$F_s(k,\tau)$ coincide com a Transformada de Fourier

de $p(r,\tau \mid 0, t_0=0) = C(r,\tau)$

Ou seja: $\boxed{F_s(k,\tau) = \int_{-\infty}^{+\infty} dr\, e^{-ikr}\, C(r,\tau)}$ (**)

Assim, para calcular $F_s(k,\tau)$ utilizaremos que

$C(r,\tau)$ satisfaz à Eq. de Difusão

$$\frac{d}{d\tau} F_s(k,\tau) = -Dk^2 F_s(k,\tau)$$

Solução : $F_s(k,\tau) = F_s(k,0)\, e^{-Dk^2\tau}$

Fluorescence

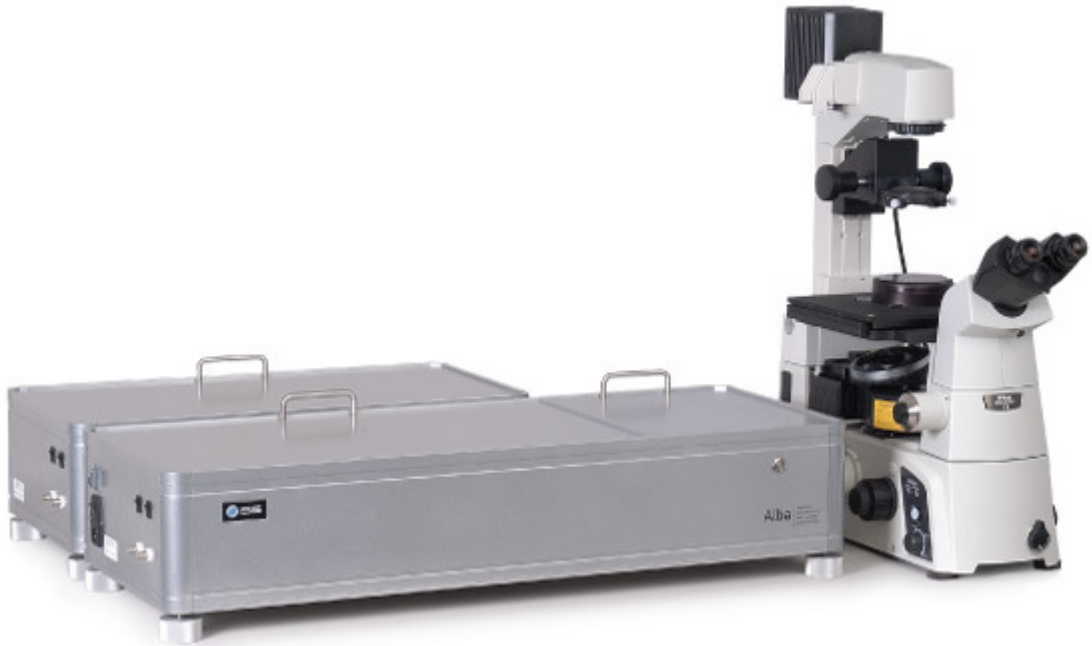
$$F(t) = B \int \mathrm{CEF}(r) I(r) C(r,t)\, dV$$

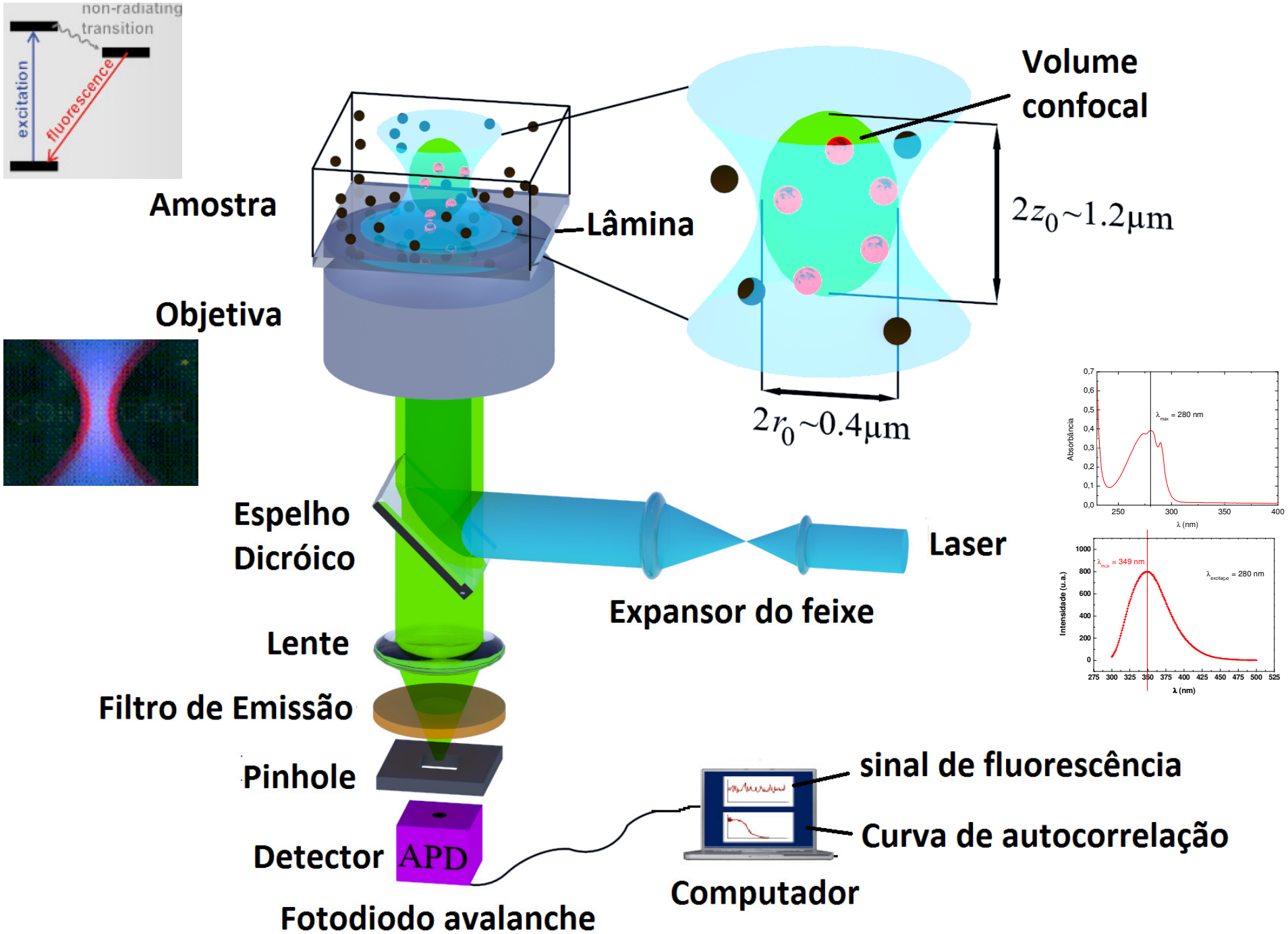
CEF(r) is the collection efficiency function of the instrument as a function of position (r)

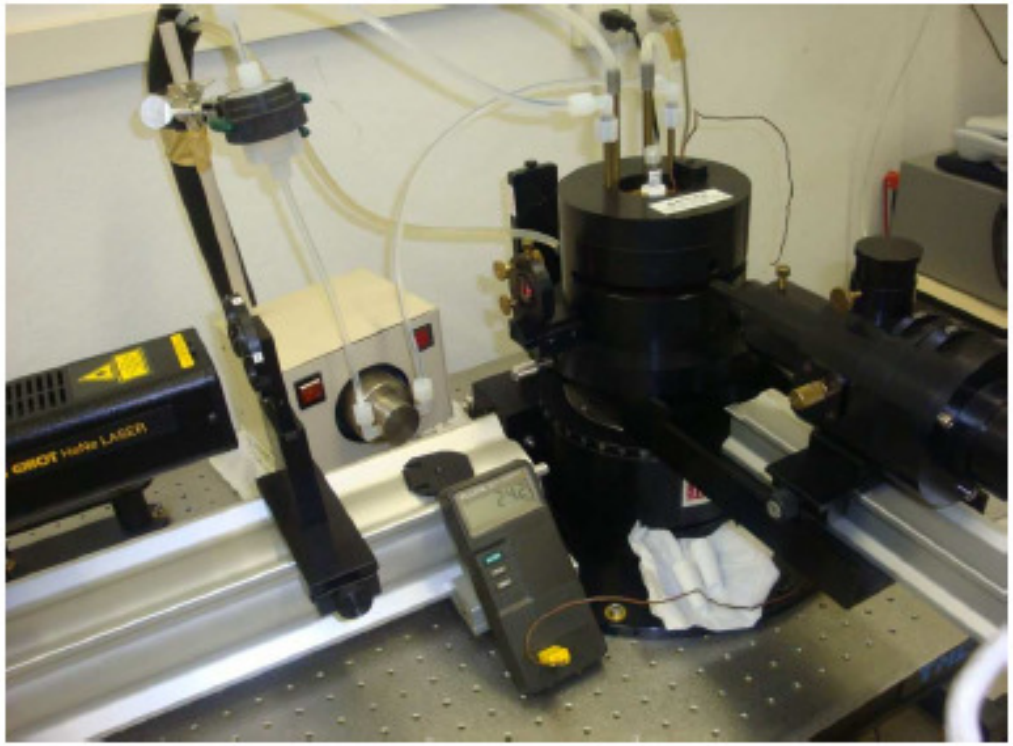
$$G'(\tau) = \frac{\langle F(t)F(t+\tau)\rangle}{\langle F\rangle\langle F\rangle}$$

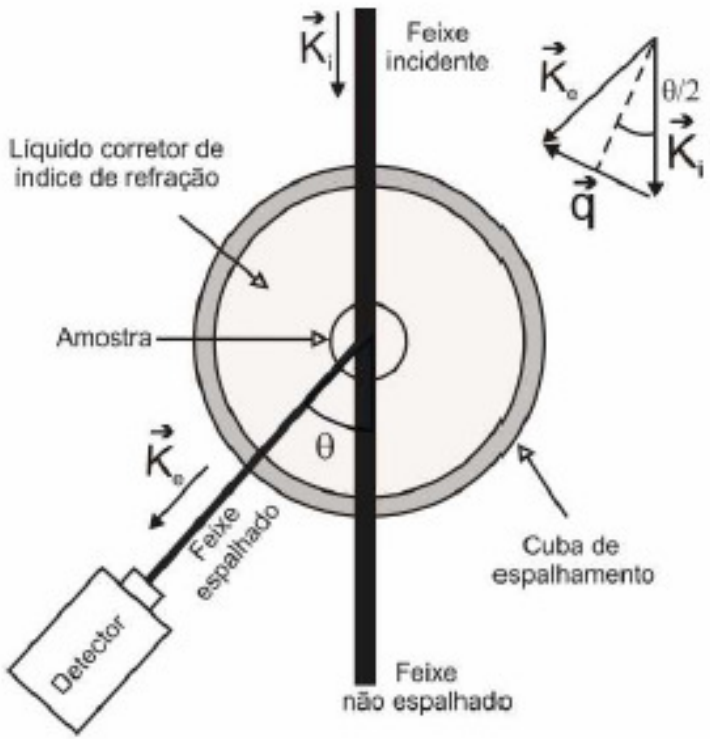
$$G(\tau) = \frac{B^2 \int\int p(r)p(r')\langle \delta C(r,0)\delta C(r',\tau)\rangle dV d'V}{\left[BC\int p(r)\,dV\right]^2}$$

2. Experimento de Espectroscopia de Correlação de Fluorescência




non-radiating transition
excitation
fluorescence
Amostra
Lâmina
Volume confocal
$2z_0 \sim 1.2\mu m$
$2r_0 \sim 0.4\mu m$
Objetiva
Espelho Dicróico
Laser
Expansor do feixe
Lente
Filtro de Emissão
Pinhole
Detector APD
Fotodiodo avalanche
Computador
sinal de fluorescência
Curva de autocorrelação
Absorbância
λ_{max} = 280 nm
λ (nm)
Intensidade (u.a.)
λ_{max} = 349 nm
$\lambda_{excitação}$ = 280 nm
λ (nm)




$\vec{K}_i$
Feixe incidente
$\vec{K}_e$
θ/2
$\vec{K}_i$
$\vec{q}$
Líquido corretor de índice de refração
Amostra
θ
$\vec{K}_e$
Feixe espalhado
Detector
Cuba de espalhamento
Feixe não espalhado

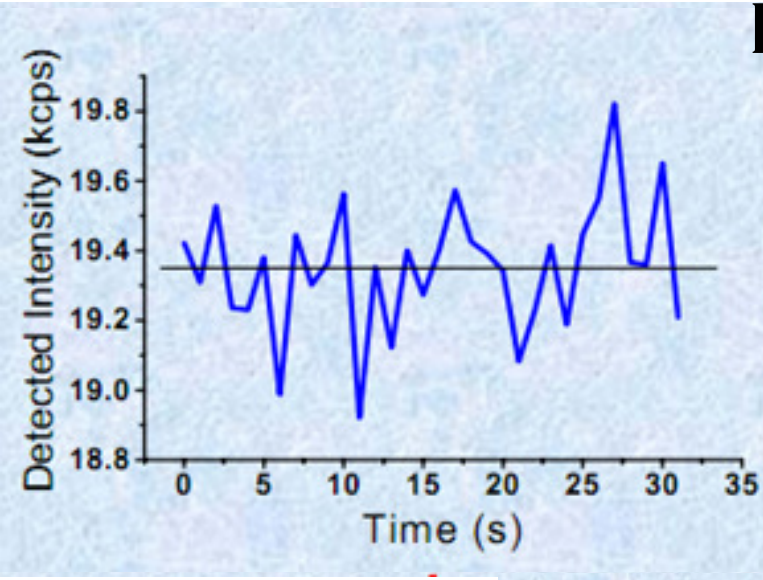
A técnica é aplicável quando poucas moléculas podem ser simultaneamente detectadas (cada molécula contribui significantemente para o sinal medido):

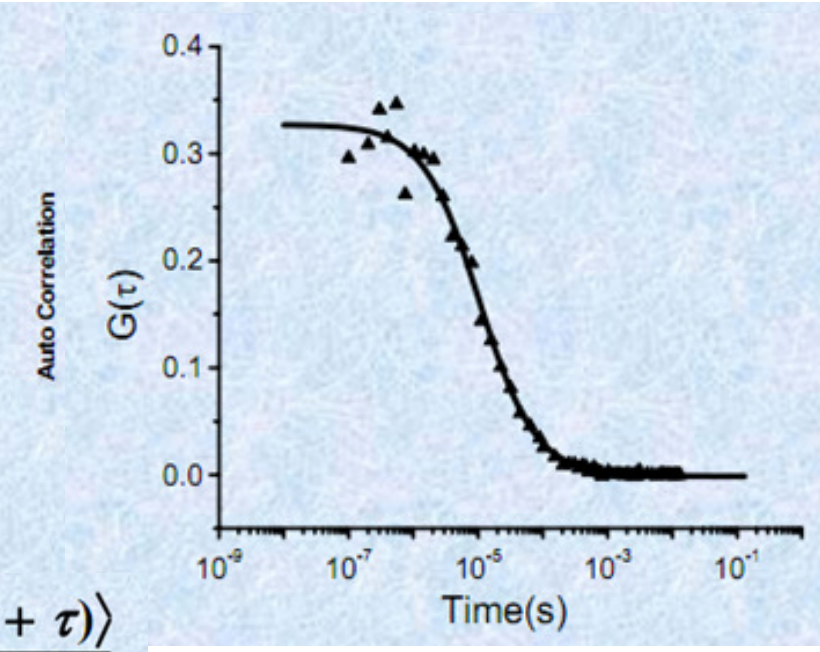
- Baixas concentrações (~nM)
- Pequeno volume de observação (~ fL)

- Interesse primário: flutuações espontâneas na intensidade de emissão fluorescente.

- A maioria das medidas de FCS é realizada com fluoróforos ou moléculas marcadas com sondas fluorescentes, difundindo livremente em solução aquosa.

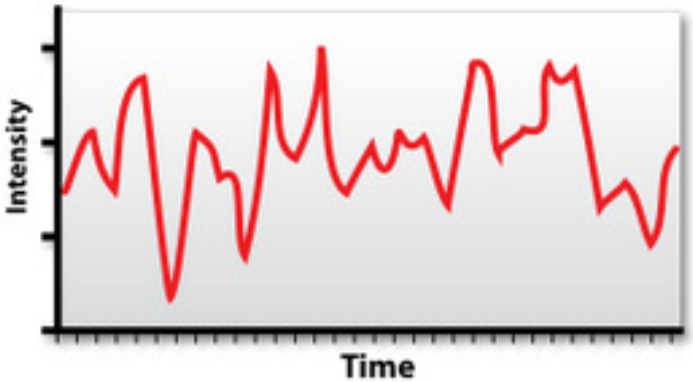
FCS

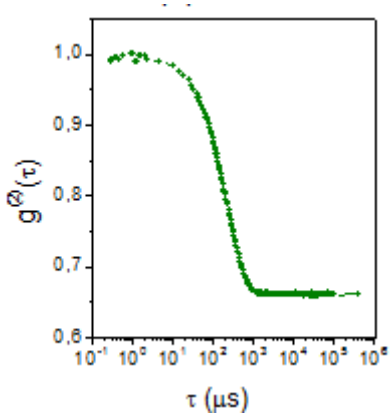




$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \delta F(t+\tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2}$$

DLS

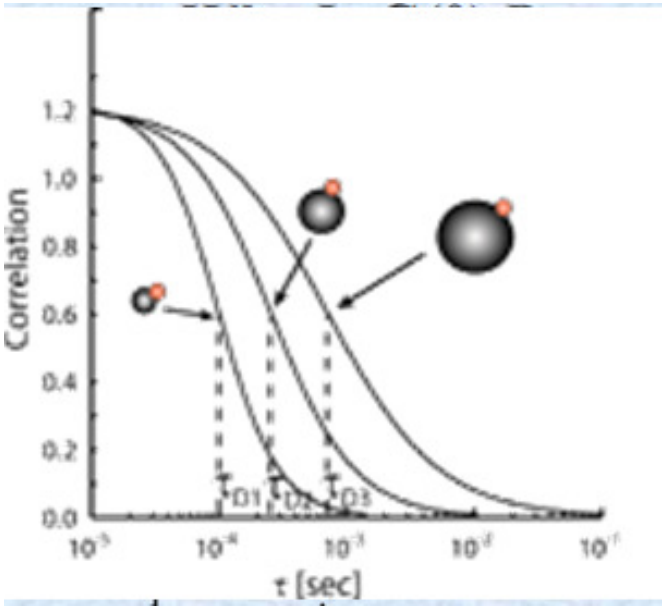




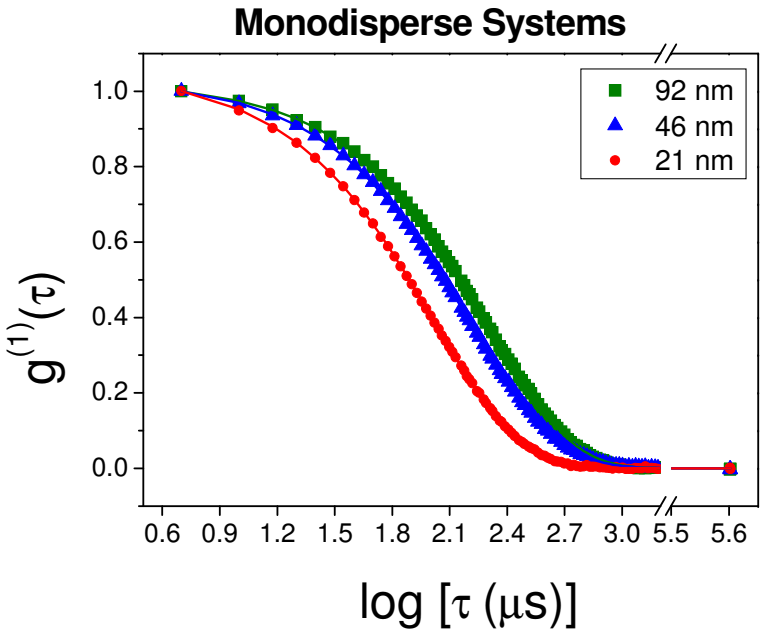
$$g^{(2)}(\tau) = \frac{\langle I(t) I(t+\tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2}$$

Efeito do tamanho das partículas na curva de Autocorrelação

FCS

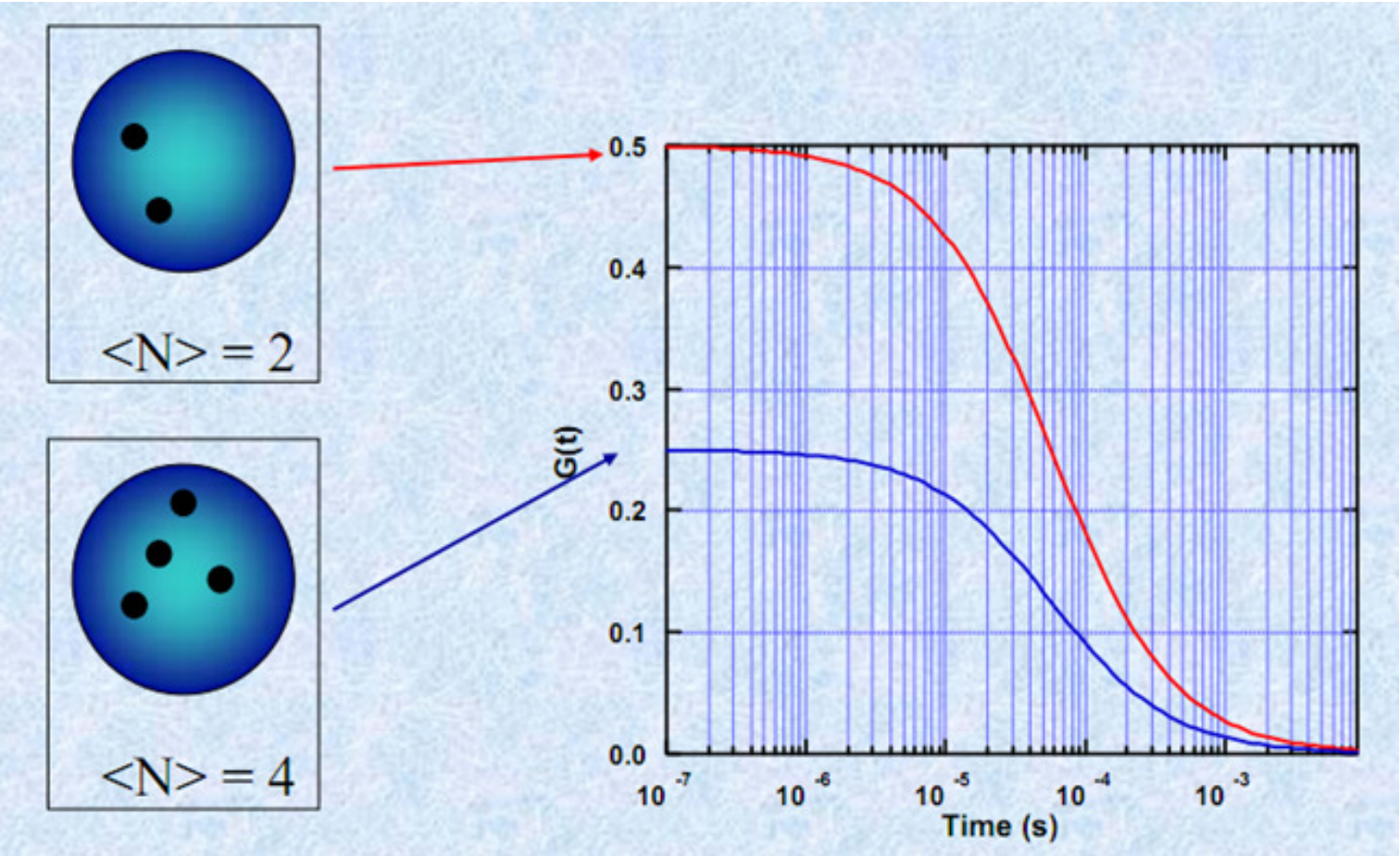


DLS



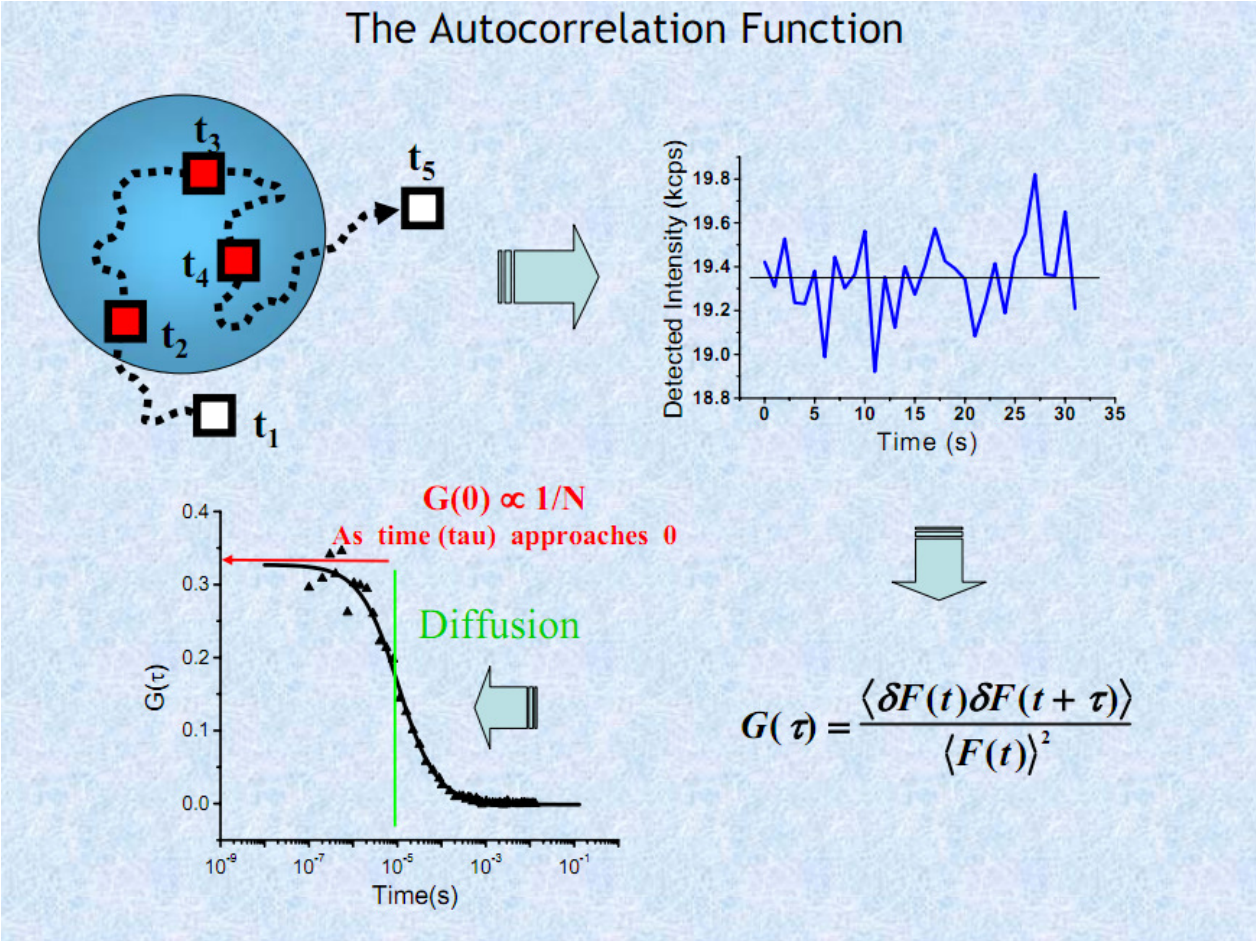
Stokes – Einstein: $$d_{ef} = \frac{k_B T}{3\pi\eta D}$$

Efeito do tamanho das partículas na curva de Autocorrelação



A amplitude da função de autocorrelação em $\tau = 0$ informa o número médio de moléculas que estão sendo observadas. $G\ (0) \propto \frac{1}{<N>}$

Espectroscopia de Correlação de Fluorescência



$$G'(\tau) = \frac{\langle F(t)F(t+\tau)\rangle}{\langle F\rangle\langle F\rangle}$$

$$= 1 + \frac{\langle \delta F(0)\delta F(\tau)\rangle}{\langle F\rangle^2}$$

$$G(\tau) =$$

Autocovariância

Fluorescence Correlation Spectroscopy

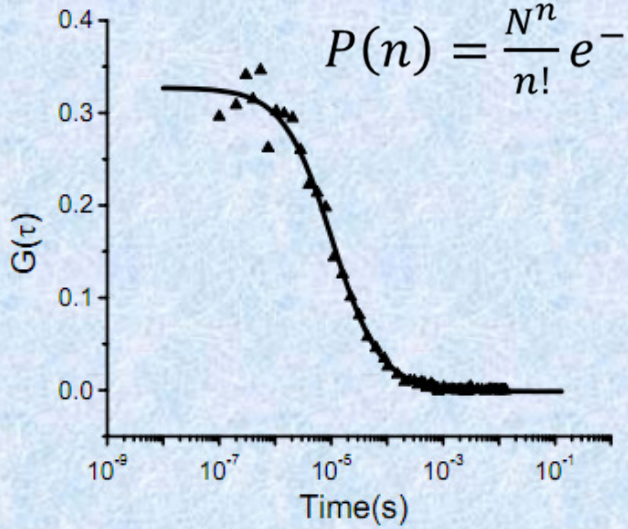
Why Is G(0) Proportional to 1/Particle Number?

A Poisson distribution describes the statistics of particle occupancy fluctuations. In a Poissonian system the variance is proportional to the average number of fluctuating species:

$$\langle Particle_Number \rangle = Variance$$

Poisson Distribution

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



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

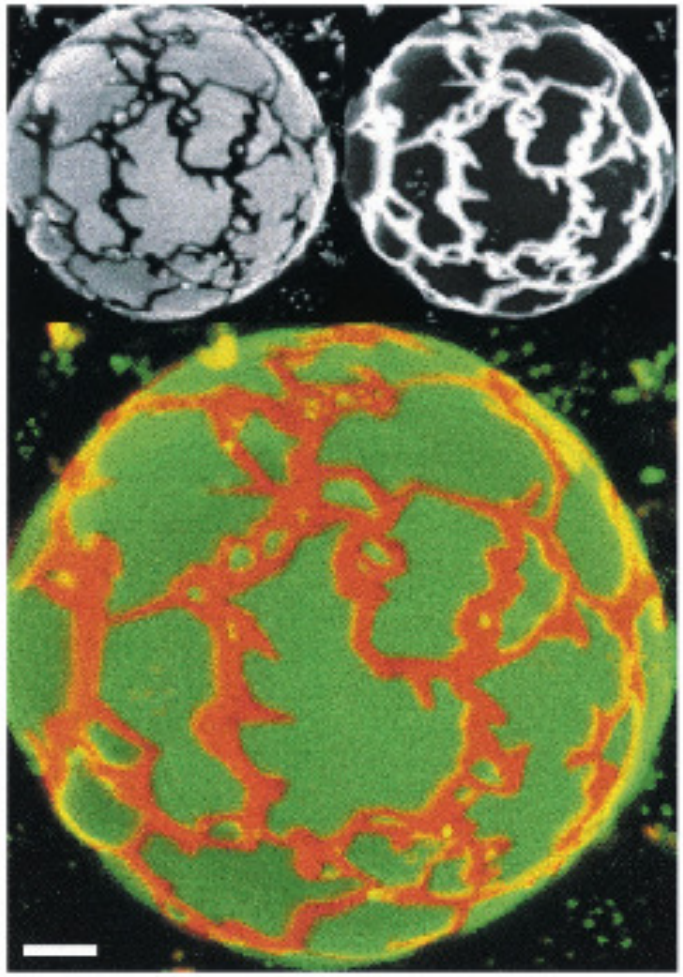
$$G(0) = \frac{\langle \delta F(t)^2 \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} = \frac{\langle (F(t) - \langle F(t) \rangle)^2 \rangle}{\langle F(t) \rangle^2}$$

$$G(0) = \frac{Variance}{\langle N \rangle^2} = \frac{1}{\langle N \rangle}$$

FCS x DLS

	FCS	DLS
Interesse	Flutuações da intensidade de emissão fluorescente	Flutuações da intensidade de luz espalhada elasticamente
Motivo das flutuações	Movimento Browniano das partículas em solução + mudanças conformacionais e reações químicas ou fotofísicas	Movimento Browniano das partículas em solução
Informações obtidas a partir das funções de autocorrelação	Coeficiente de Difusão, constantes cinéticas, concentração da dispersão, número de moléculas, polidispersão e massas moleculares	Coeficiente de difusão, raio hidrodinâmico médio, polidispersão
Concentração das amostras (regime diluído)	~ nM	~ mM

Aplicação: Detecção de difusões heterogêneas



Feigenson and Buboltz, 2001

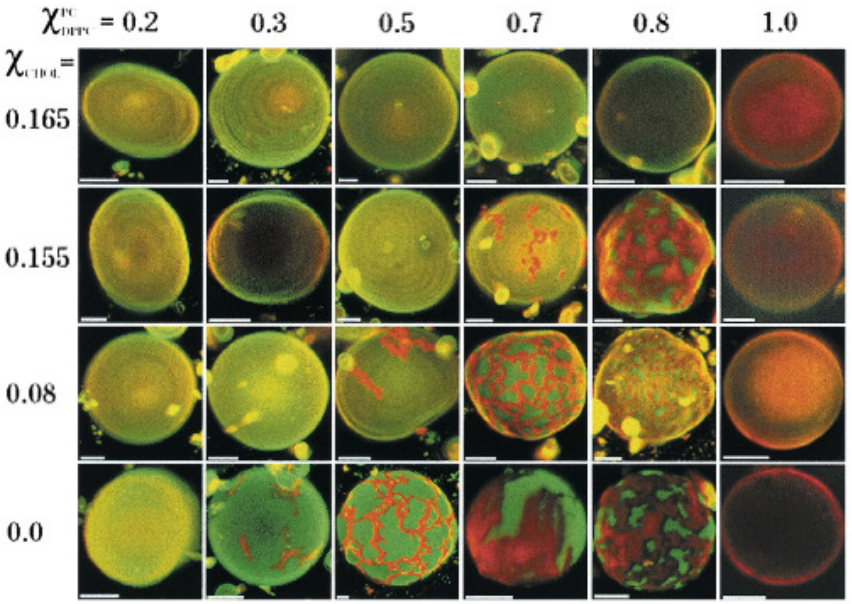
- Na década de 90 a um série de trabalhos evidenciaram heterogeneidades em membranas biológicas e membranas modelos

.

- A composição de domínios distintos em membranas reais foi observada, principalmente por microscopia de fluorescência e a *e*vidência de domínios resistentes a solubilização por detergentes.

- Esses resultados tem sido interpretados por modelos que abrangem, non-ideal mixing e transições de fase de segnda ordem e ordem superiores.

Aplicação: Detecção de difusões heterogêneas



Feigenson and Buboltz, 2001

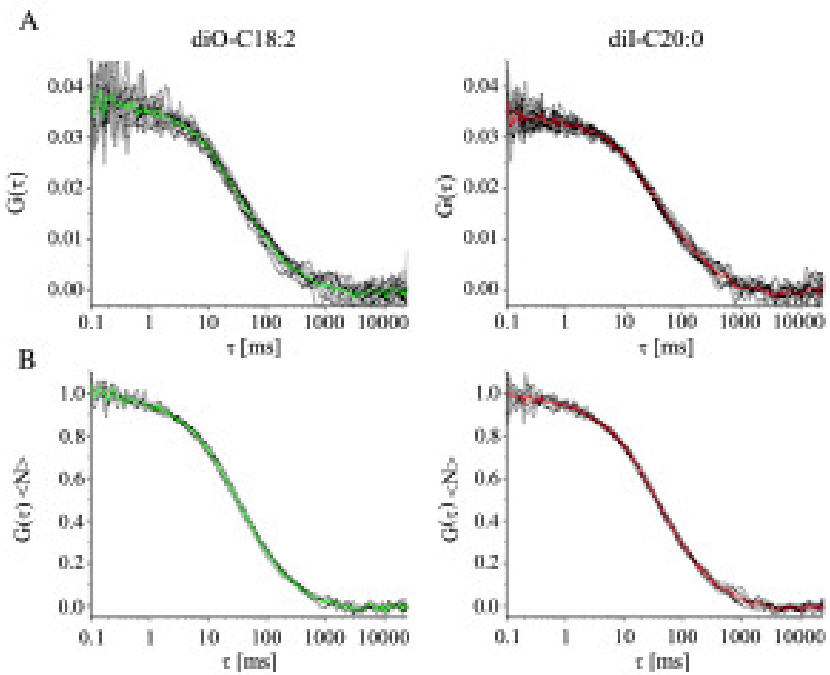
- É sabido que as membranas naturais são compostas por uma mistura de componentes PC,PE, PS, Sph, Chol

- O Chol (esterol) apresenta propriedades importantes nessas misturas.

- Composições ternárias (DLPC:DPPC:Chol) apresentam coexistencia de phases Lo e Ld.

- Pergunta: Há coexistencia de domínios, os quais são inferiores a resolução óptica do microscópio?

Aplicação: Detecção de difusões heterogêneas

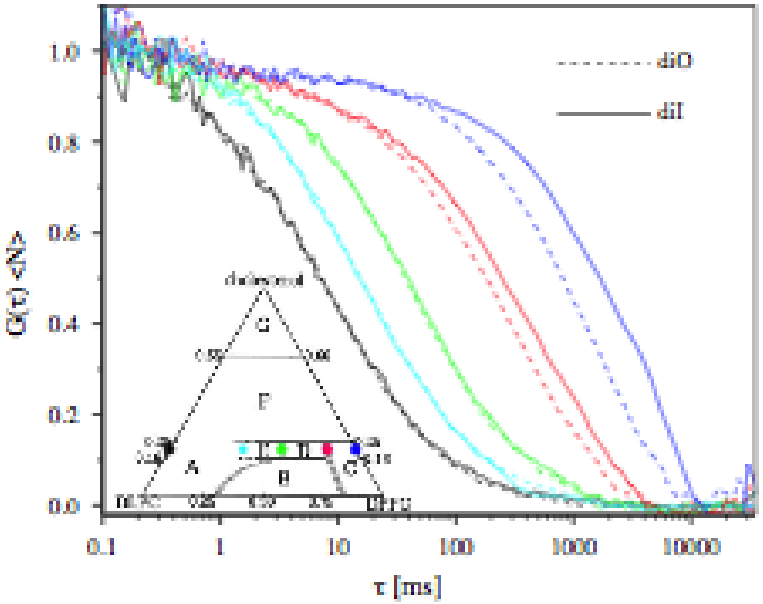


Korlach, et. al. 2005

- Estudo por FCS de duas sondas, que particionam diferentemente nas fases Lo e Ld.

- Dio-C18:2 => Ld
- DiI-C20:0 => Lo

Aplicação: Detecção de difusões heterogêneas



Korlach, et. al. 2005

- Foi identificado que para frações molares acima $\chi_{DPPC} > 0.8$ a sonda presente na fase Lo apresenta uma difusão tres vezes mais lenta que que a sonda na fase Ld.

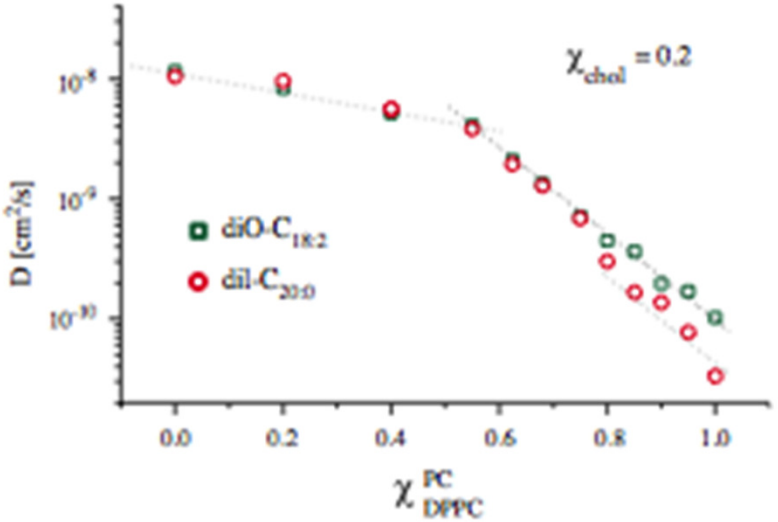
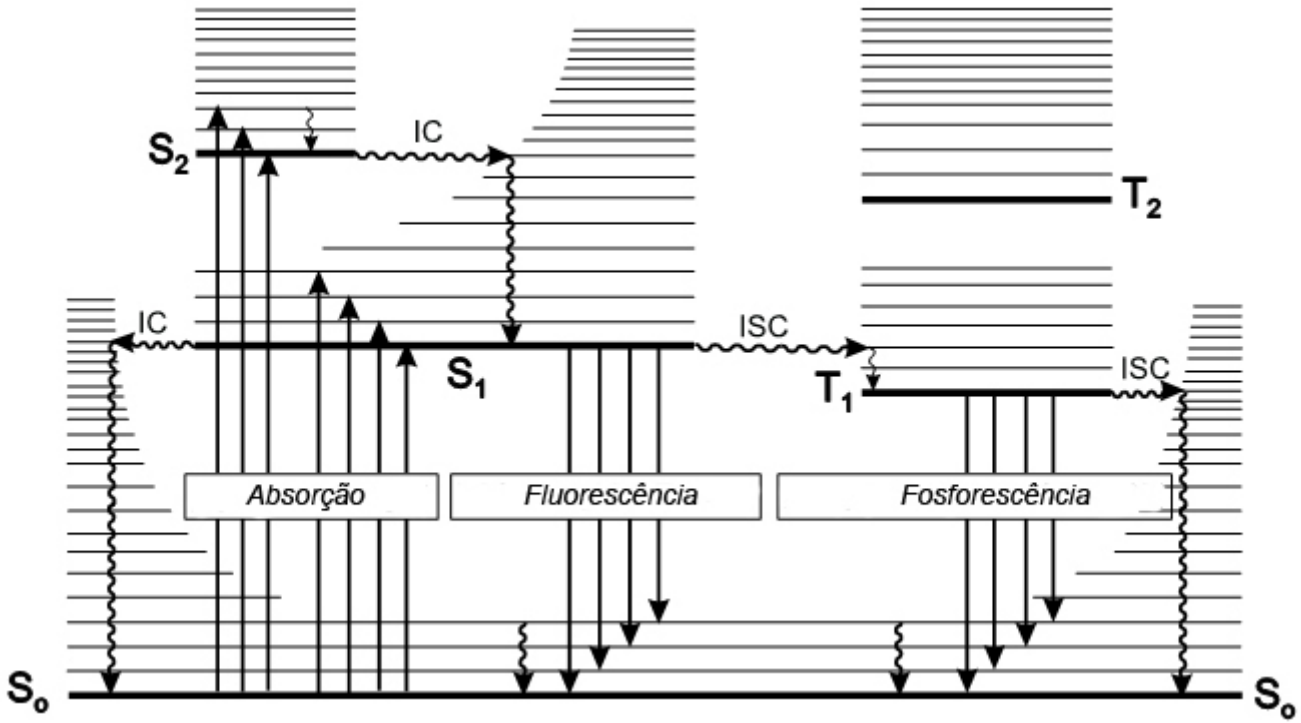


Diagrama de Jablonski



Referencias

Feingenson, G. W. and Buboltz J. T. Biophysical Journal (2001) 27775-2788.
Korlach, J., Baumgart T., Webb W. W., Feigenson, G. W. Biochimica et Biophysica Acta (2005) 158-163.
Lakowicz, J. R. , (2006). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. New York: Plenum Publishers.
Marquezin C. A. “Técnicas de fluorescência no monitoramento de membranas modelo” tese de doutorado 2008.