

# 15. Měření fluktuací intenzity

# Počet částic v pozorovaném objemu

Poissonovská statistika říká, že pravděpodobnost  $P$ , že se v daném objemovém elementu  $V$  nachází v daný okamžik  $n$  částic, je rovna

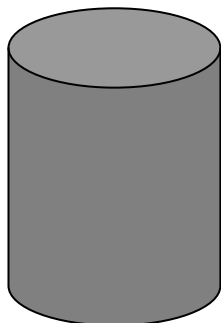
$$P(n, N) = \frac{N^n}{n!} e^{-N}$$

kde  $N$  je průměrný počet částic v objemu  $V$ . S molární koncentrací  $c$  je tedy spojen vztahem

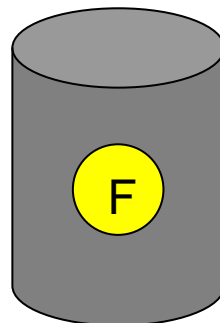
$$c = \frac{N}{N_A V}$$

Např. pro objem  $V = 1$  fl a  $c = 1$  nM (tj.  $N = 0,6$ ) dostáváme

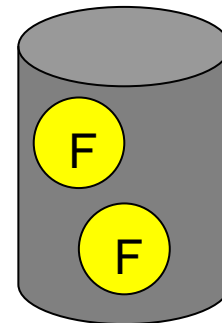
$$P(0) = 0,55$$



$$P(1) = 0,33$$

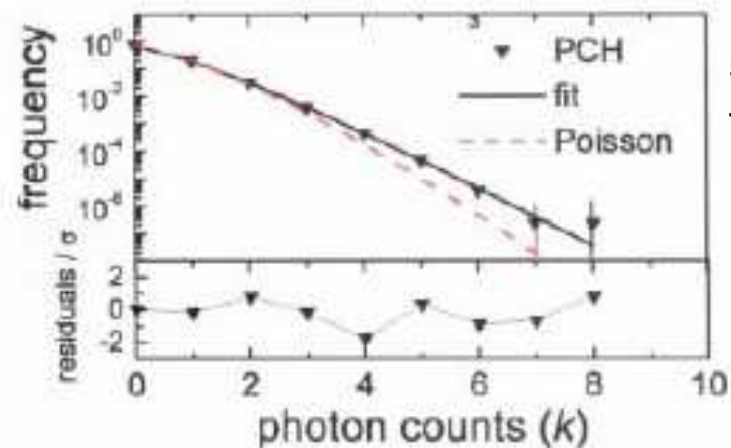
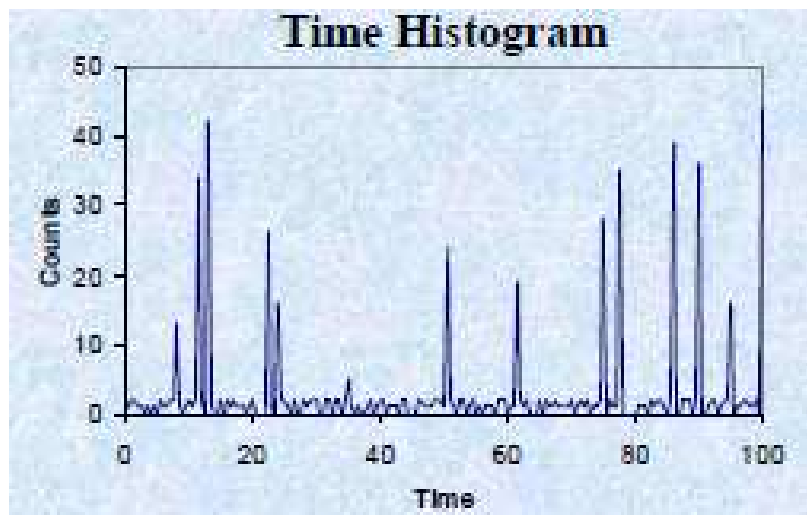


$$P(2) = 0,10$$



# FIDA (Fluorescence intensity distribution analysis)

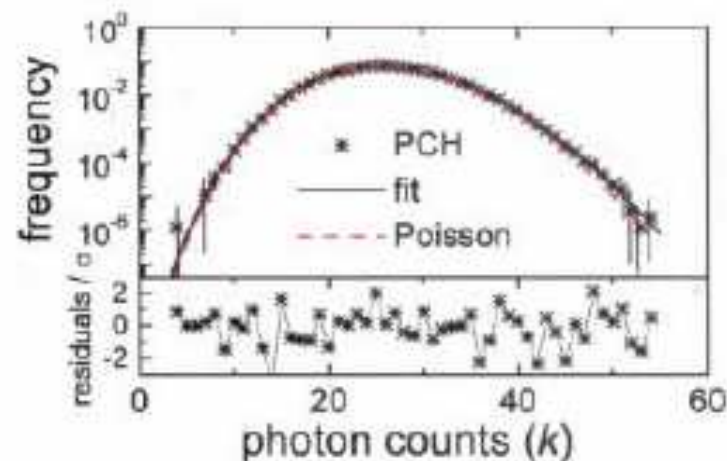
## PCH (Photon counting histogram)



5,5 nM  
fluorescein

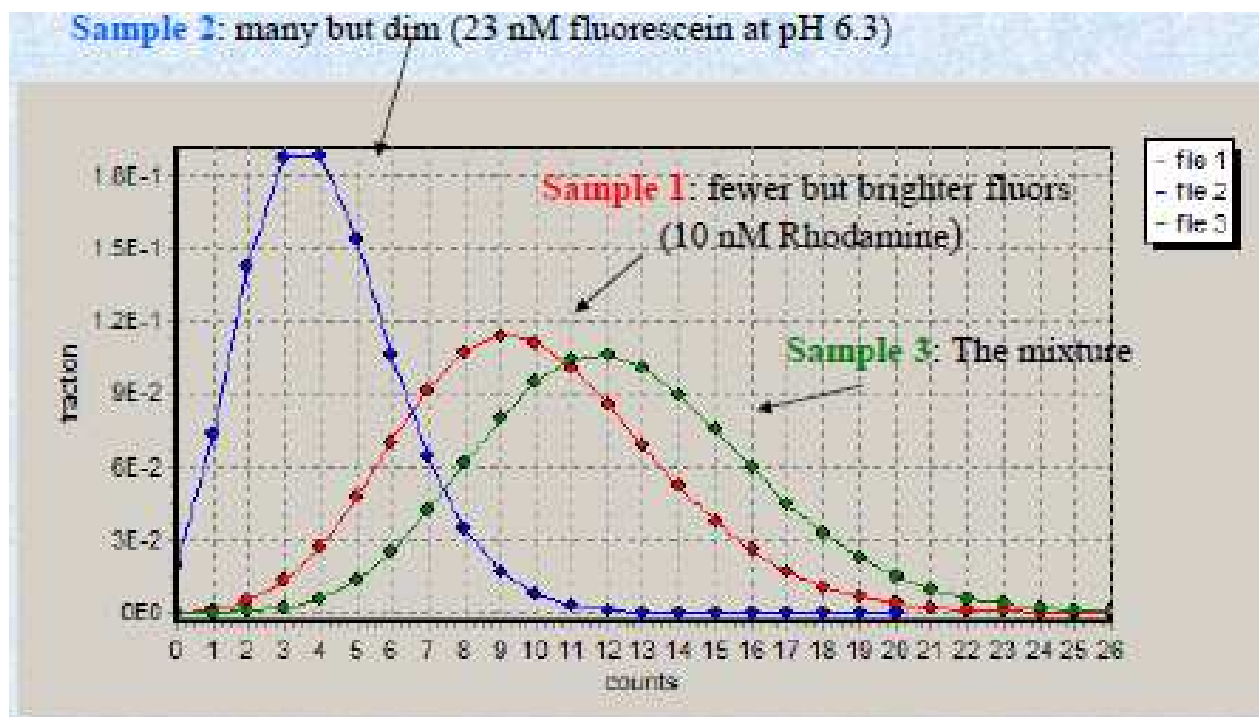
FIDA (PCH) nese informaci   
, ztrácejí  
se časové charakteristiky.

Určení koncentrace vyžaduje srovnání se  
standardem, neboť je obtížné přesně  
určit objem, ze kterého je detekovaná  
fluorescence.



550 nM  
fluorescein

# Rozlišení dvou fluoroforů s různou jasností

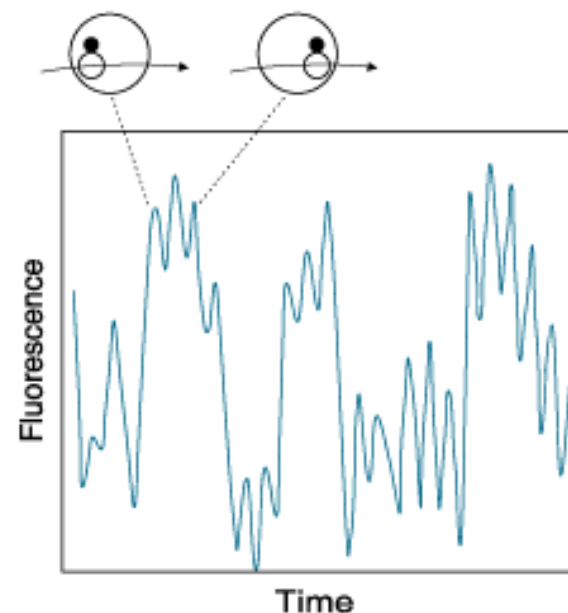
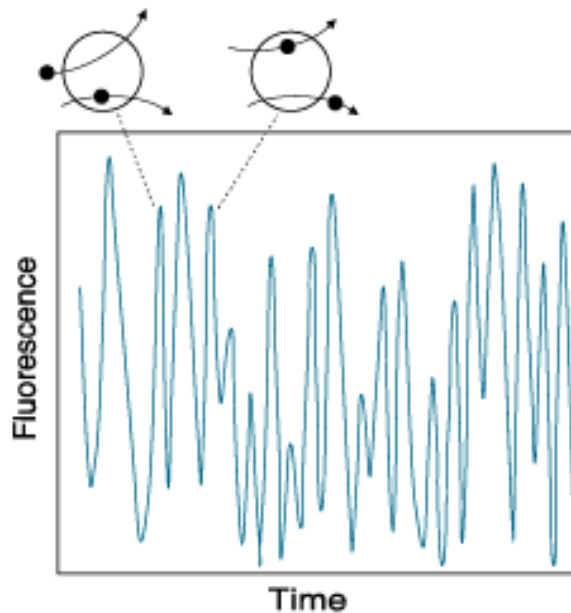
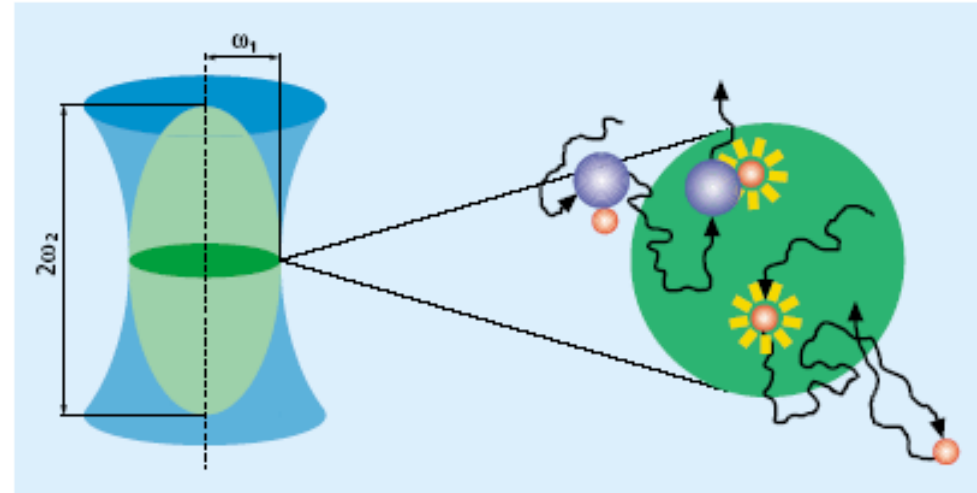


FIDA (PCH) směsi je konvolucí histogramů jednotlivých složek. Výsledný histogram je pak širší, než bychom očekávali pro vzorek obsahující pouze 1 složku.

# Původ fluktuací

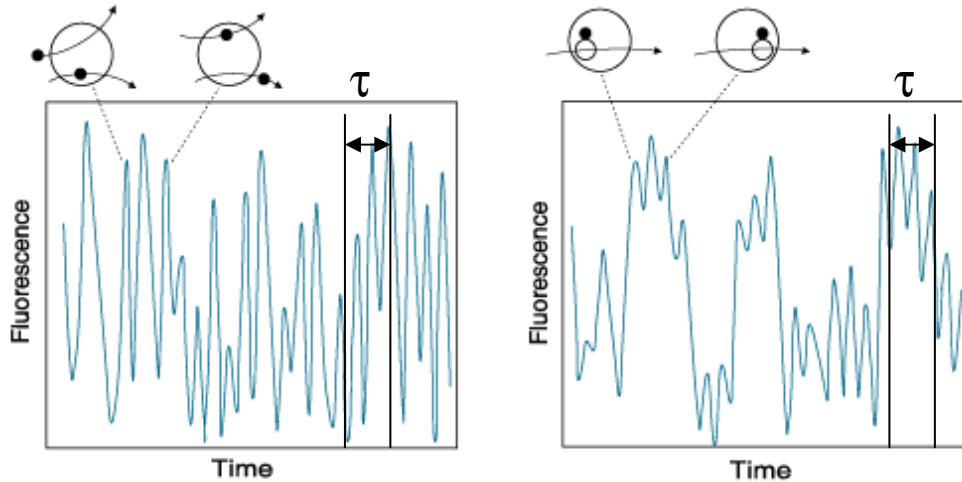
## Difúze

Enzymatická aktivita  
Fázové přechody  
Konformační dynamika  
Rotační pohyby  
Sbalování proteinů



# FCS (Fluorescence Correlation Spectroscopy)

sledování  fluktuací



autokorelační funkce

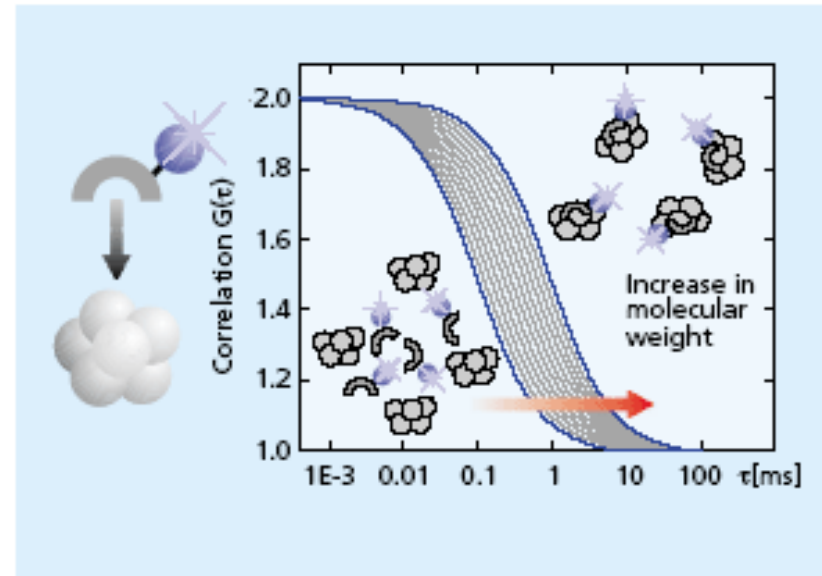
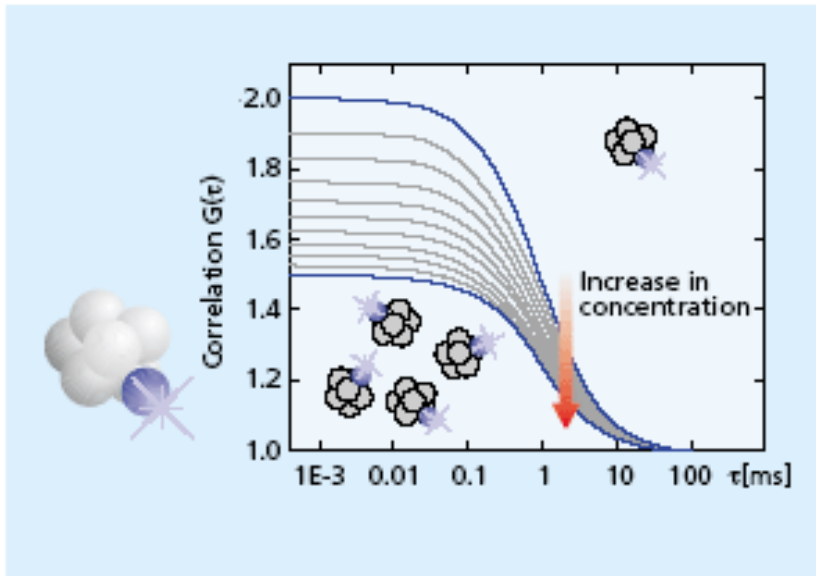
$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \cdot \delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2}$$

$\delta F$  ... odchylka od průměrné intenzity fluorescence

$\langle \rangle$  ... průměr přes všechny body

$$\lim_{\tau \rightarrow 0} G(\tau) = 1/N$$

Autokorelační funkce nese informace o počtu částic a



# Difúzní koeficient

Potřebujeme znát velikost a tvar detekčního objemu. Pro gaussovský profil platí

$$G(\tau) = G(0) \left(1 + \frac{4D\tau}{s^2}\right)^{-1} \left(1 + \frac{4D\tau}{u^2}\right)^{-1/2}$$

s a u znamenají vzdálenost od místa s maximální intenzitou, kde intenzita poklesne na  $1/e^2$ .

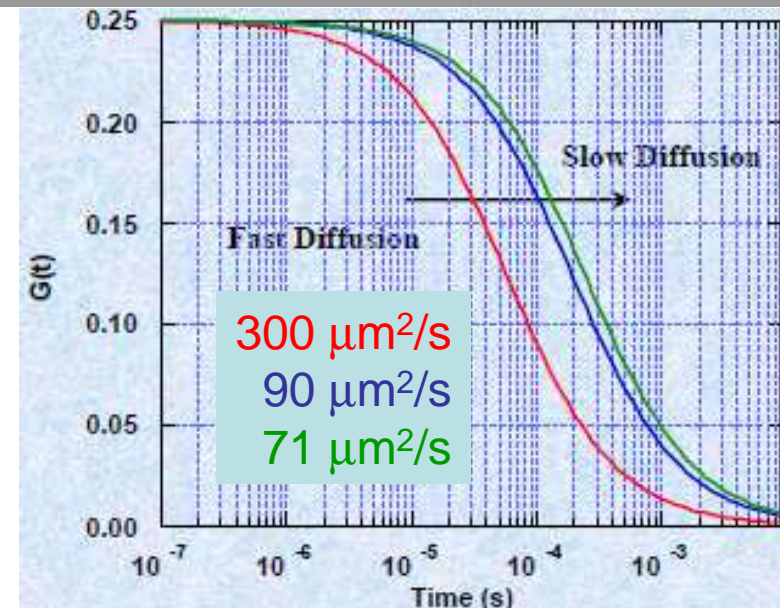
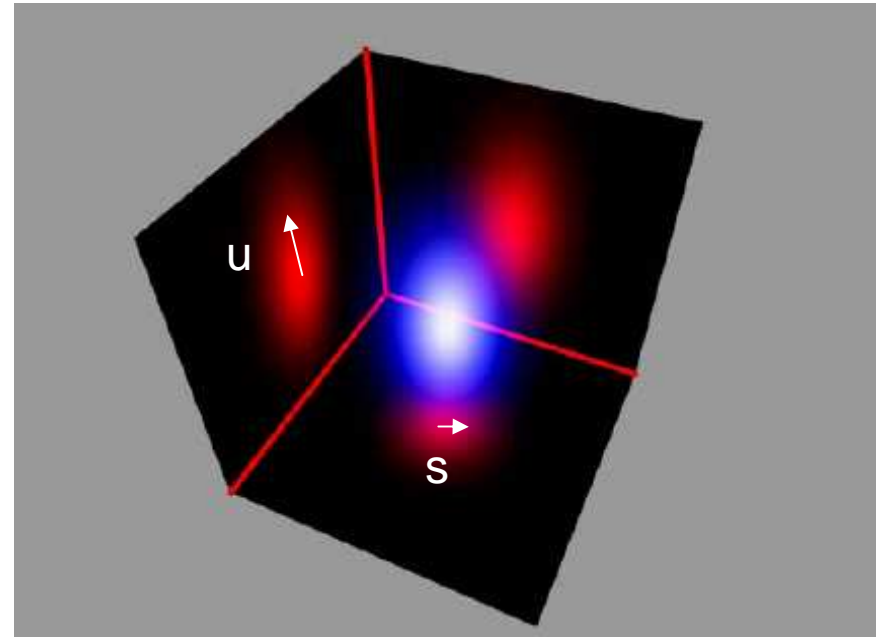
D ... translační difúzní koeficient

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta r}$$

$$MW \sim V \sim r^3$$

Monomer  $\rightarrow$  Dimer

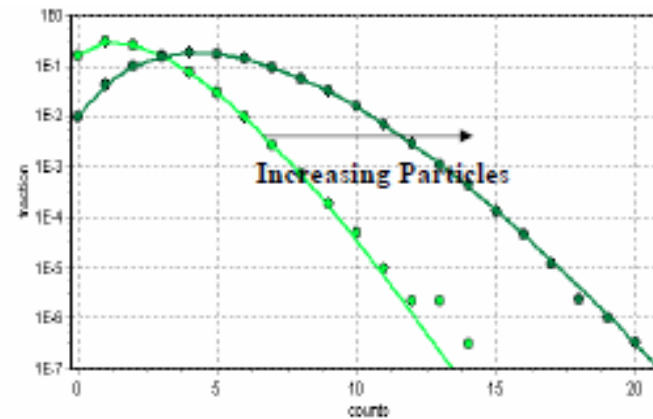
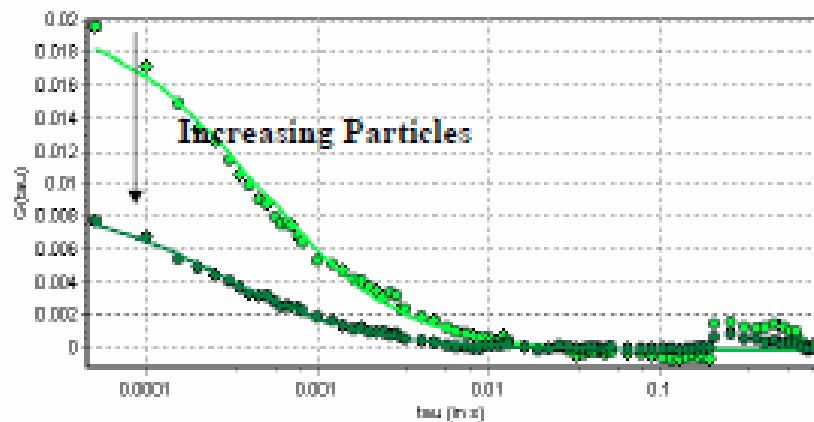
změna D jen faktorem  $2^{1/3}=1,26$



# Praktické poznámky

Stanovení difúzního koeficientu vyžaduje přesnou kalibraci rozměrů detekčního objemu ( $\sim$ fl), nejčastěji pomocí fluoroforu se známým  $D$ .  
Měření je přesné pouze při malých koncentracích ( $\sim$ nM)

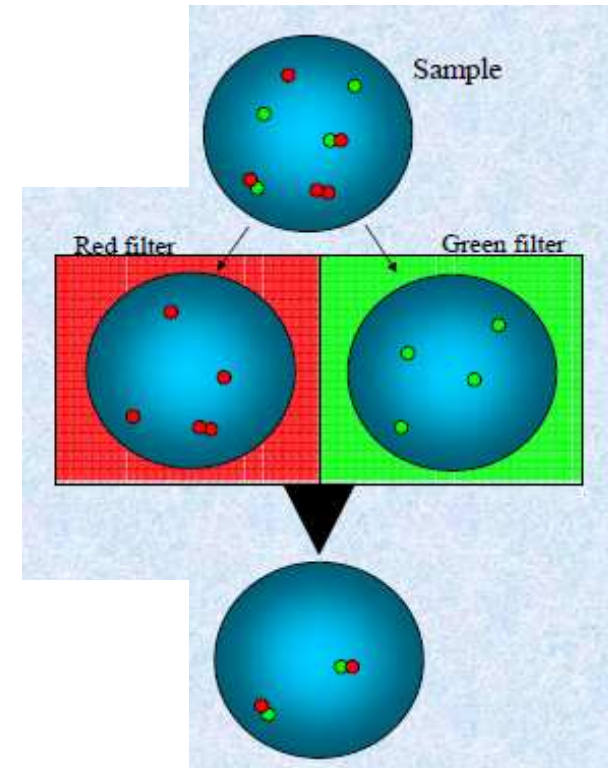
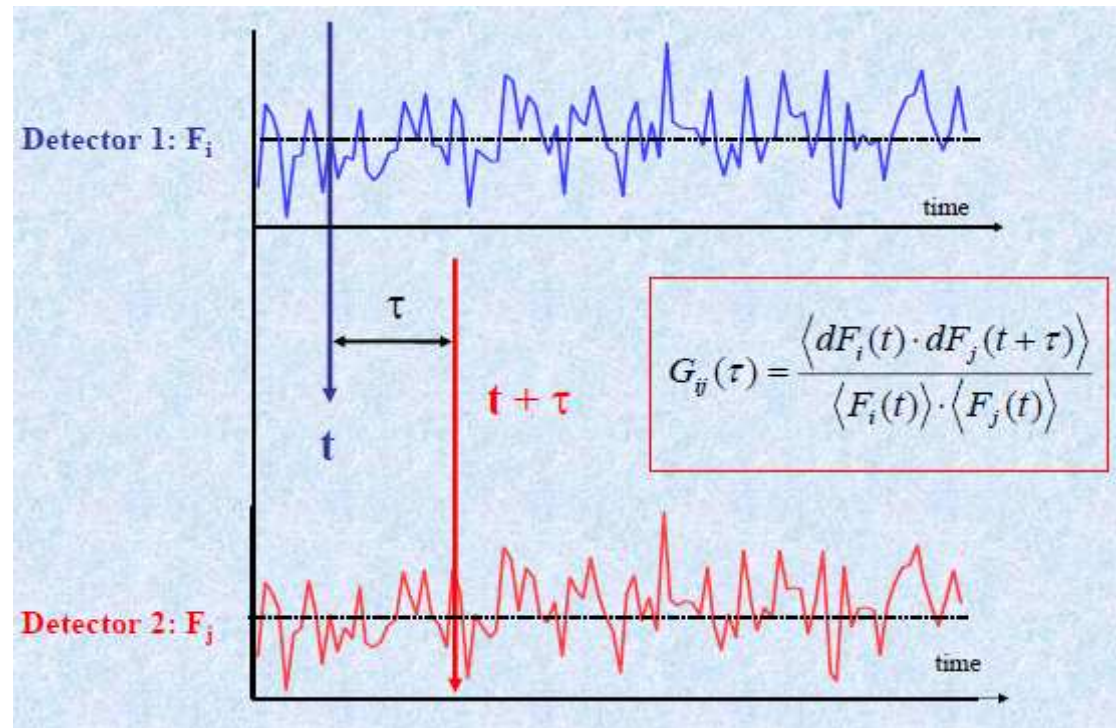
**Jeden záznam dat můžeme vyhodnocovat jako FCS i jako FIDA !**  
(FCS dokáže rozlišit molekuly s různým difúzním koeficientem, FIDA rozliší molekuly s různou relativní intenzitou fluorescence (brightness). Oba způsoby vyhodnocení nesou informaci o počtu částic.





# Pokročilejší metody

Two-color FCS (Cross-correlation FCS) Sledování kolokalizace molekul



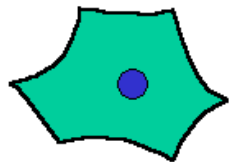
## Time-resolved FCS

Excitace pulzním světlem - současné vyhodnocování autokorelační funkce a kinetiky dohasínání fluorescence

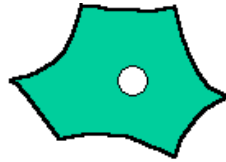
Rozlišení molekul na základě různých dob života.

# FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching)

Metoda na sledování laterální difúze v membránách

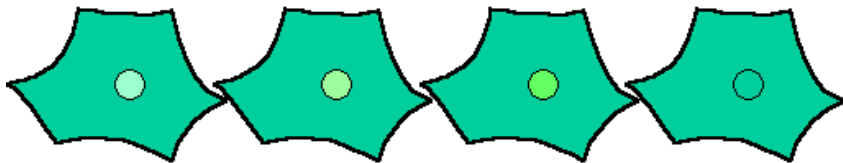


Photoblanchiment

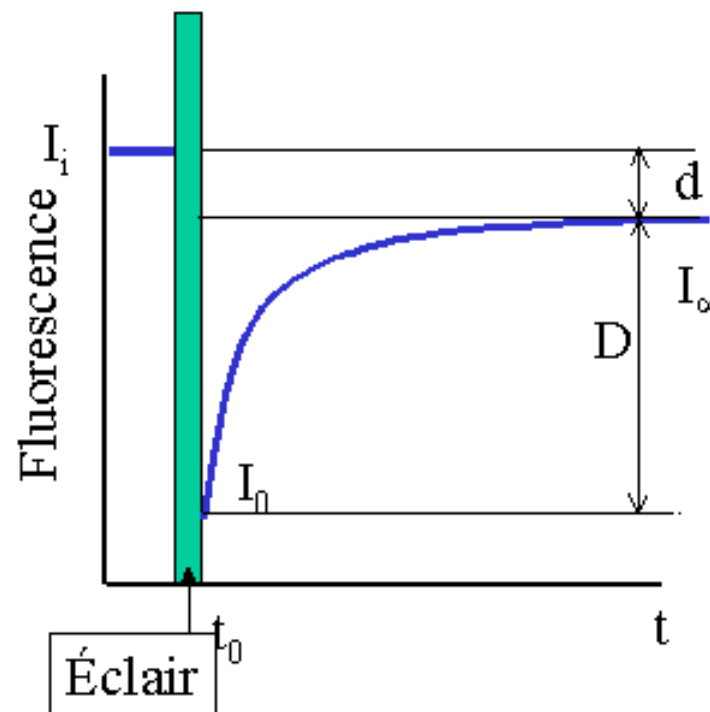
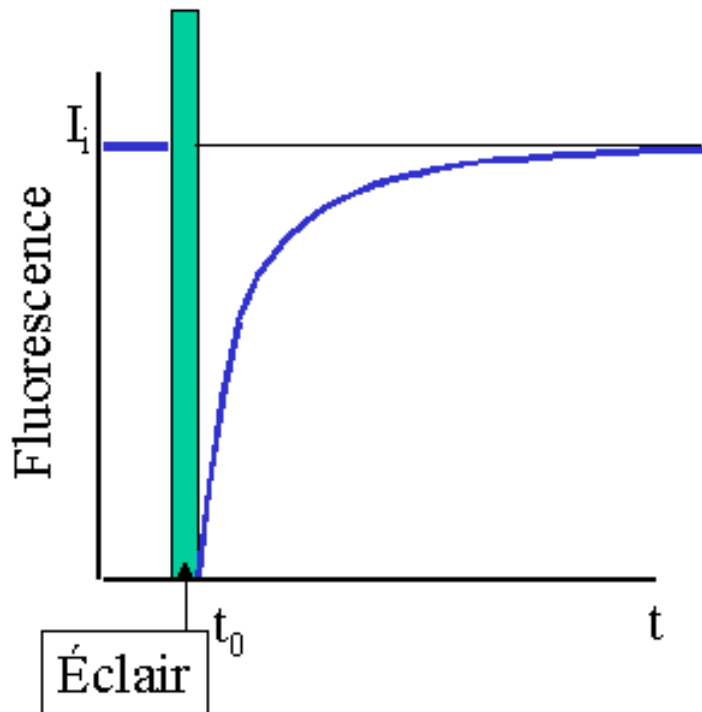


t=0

volná frakce =  $D/(d+D) = 1 - \text{imobilizovaná frakce}$



$$(I_{\infty} - I)/(I_{\infty} - I_0) = e^{-(t-t_0)/\tau} \quad (14.26)$$



# Shrnutí

Fluktuace signálu můžeme vyhodnocovat jako FCS i FIDA

FIDA (PCH) - nese informaci o počtu částic a jejich relativní intenzitě

FCS - informace o počtu částic a difúzním koeficientu

Metody pracují optimálně při sledování velmi malého objemu a velkém zředění fluoroforu

Pokročilé metody - two-color FCS, time-resolved FCS, FRAP