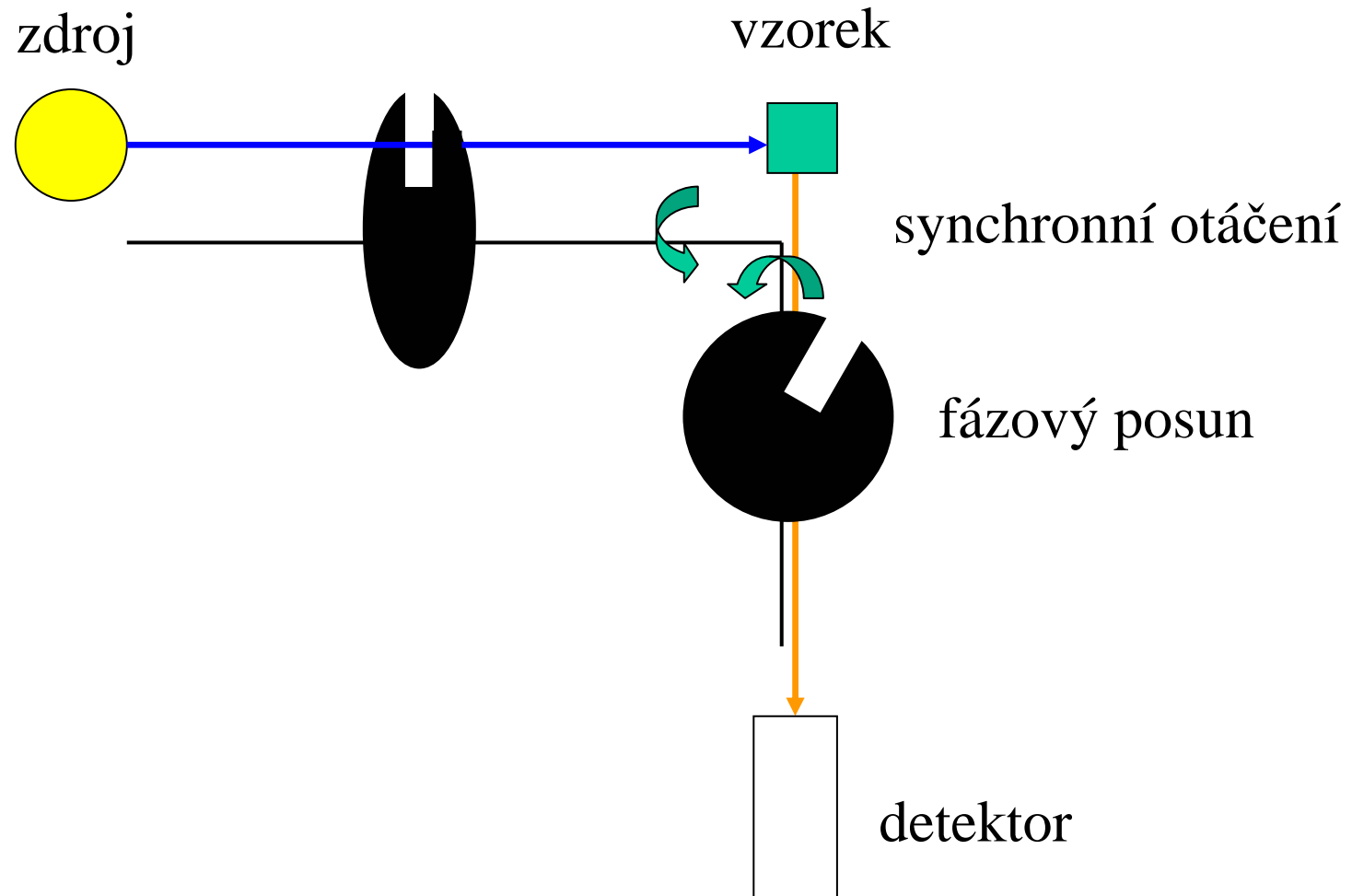


# 9. Měření kinetiky dohasínání fluorescence ve frekvenční doméně

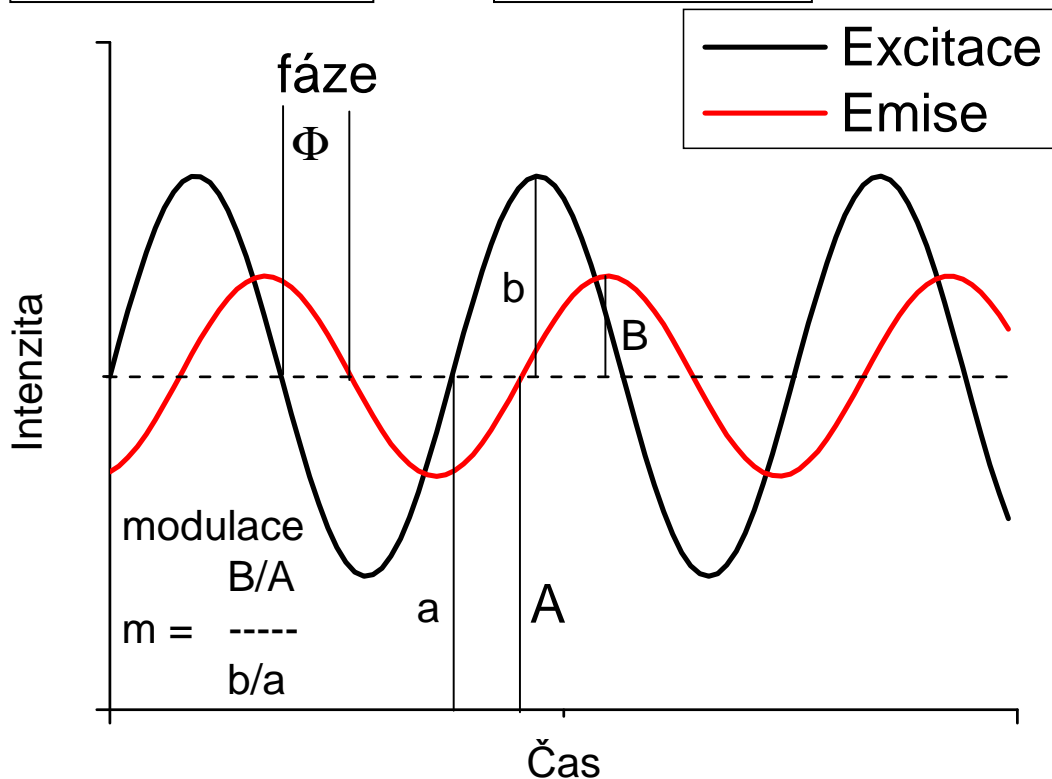
# Gaviolův experiment (1924)



# Měření dob života luminiscence

Frekvenční doména - excitace   světlem

   $\Phi$  a   emise m



Pro jedno-exponenciální dohasínání

$$\operatorname{tg} \Phi = \omega \tau_p = 2\pi f \tau_p$$

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

$$\tau_p = \tau_m$$

Tato rovnost indikuje, že se kinetika dohasínání daného fluoroforu je jednoexponenciální

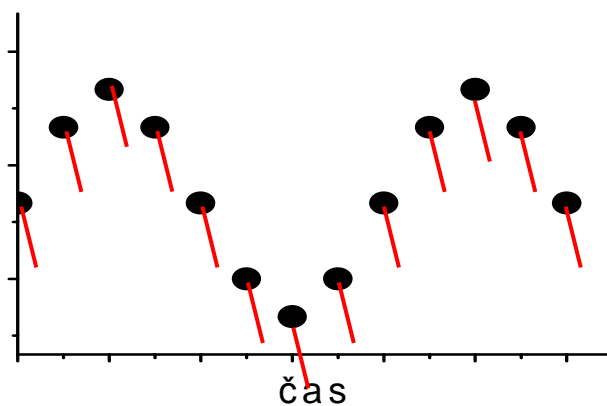
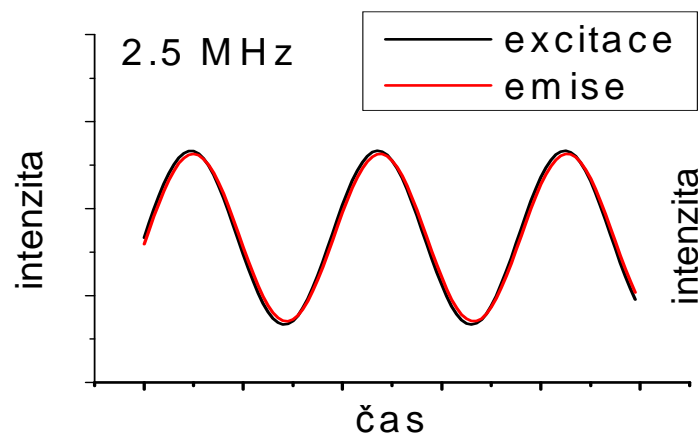
f... frekvence, [Hz]

$\omega$ ... úhlová frekvence, [rad.s<sup>-1</sup>]

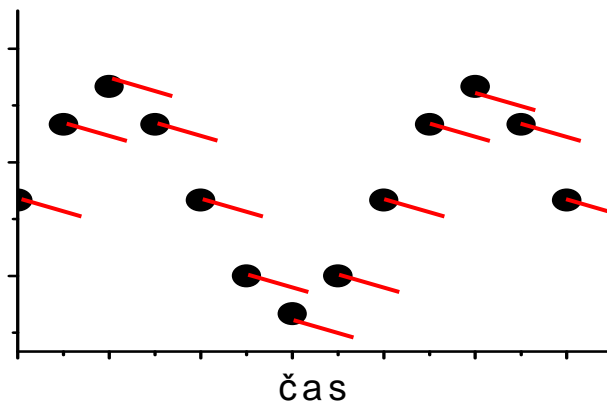
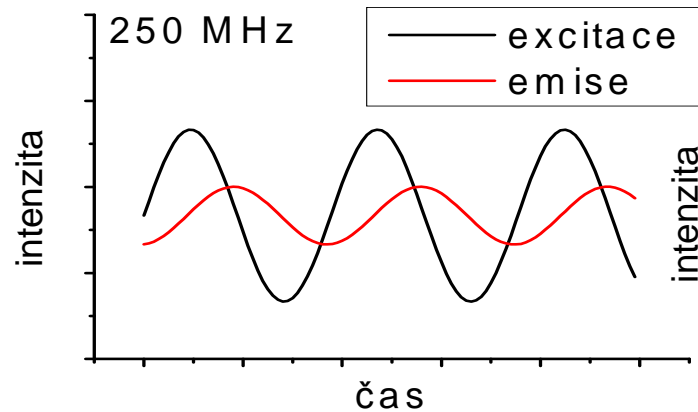
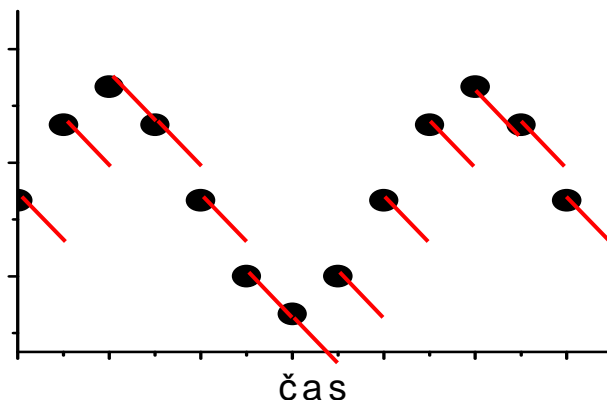
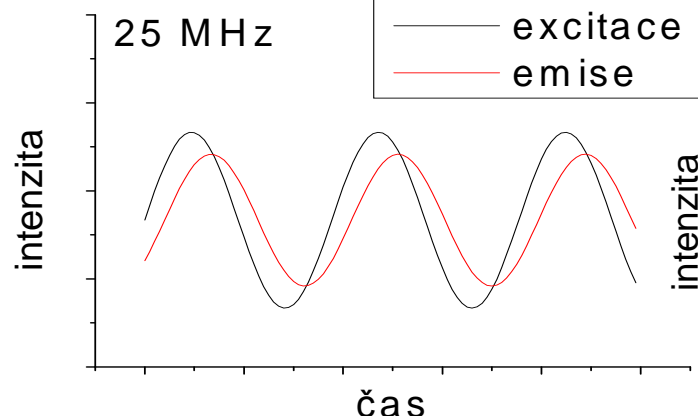
Příklad 9.1: Při frekvenci harmonické modulace světla  $f = 30$  MHz bylo zjištěno, že emise má fázový posun  $\Phi = 45^\circ$ . Jaká je doba života excitovaného stavu měřeného fluoroforu? Jaká je demodulace emise, pokud je kinetika dohasínání jedno-exponenciální?

# Původ demodulace

$\tau = 5 \text{ ns}$



modulace pomalejší  
než kinetika  
dohasínání



modulace rychlejší  
než kinetika  
dohasínání

# Odvození vztahů pro posun fáze a demodulaci při 1-exponenciálním dohasínání

Excitujeme sinusově modulovaným světlem

$$L(t) = a + b \sin(\omega t)$$

takže  $m_L = b/a$  je modulace dopadajícího světla. Předpokládáme, že populace excitovaného stavu se bude měnit se stejnou frekvencí, ale fáze a modulace budou jiné

$$F(t) = A + B \sin(\omega t - \Phi)$$

Nyní musíme nalézt vztah mezi dobou života fluorescence  $\tau$  a posunem fáze a demodulací. Předpokládejme, že kinetika dohasínání fluorescence po excitaci  $\delta$ -pulem je 1-exponenciální

$$I(t) = I_0 \exp(-t/\tau)$$

zderivováním pak dostaneme

$$dI(t)/dt = -1/\tau I(t)$$

což udává kinetiku depopulace excitovaného stavu. Pokud současně vzorek excitujeme světlem s časovým průběhem  $L(t)$ , pak pro populaci excitovaného stavu platí

$$dI(t)/dt = -1/\tau I(t) + L(t)$$

Dosazením vztahu pro  $F(t)$  dostaneme vztah mezi  $\tau$ ,  $\Phi$  a demodulací

$$\omega B \cos(\omega t - \Phi) = -1/\tau [A + B \sin(\omega t - \Phi)] + a + b \sin(\omega t)$$

# Odvození vztahů pro posun fáze a demodulaci

S použitím vztahů

$$\sin(x-y) = \sin x \cos y - \cos x \sin y$$

$$\cos(x-y) = \cos x \cos y + \sin x \sin y$$

můžeme rovnici upravit na

$$\omega B [\cos(\omega t) \cos \Phi + \sin(\omega t) \sin \Phi] = -1/\tau \{A + B [\sin(\omega t) \cos \Phi - \cos(\omega t) \sin \Phi]\} + a + b \sin(\omega t)$$

Tato rovnice musí platit pro všechny časy, sdružíme tedy konstantní členy, sinové a kosinové členy a dostáváme rovnice

$$a - A/\tau = 0$$

$$\omega \cos \Phi - (1/\tau) \sin \Phi = 0$$

$$\omega \sin \Phi + (1/\tau) \cos \Phi = b/B$$

Z druhé rovnice pak plyne

$$\sin \Phi / \cos \Phi = \text{tg } \Phi = \omega \tau_{\Phi}$$

Ze součtu druhých mocnin druhé a třetí rovnice s použitím  $A = a \tau$  dostaneme

$$m = (B/A) / (b/a) = [1 + (\omega \tau_m)^2]^{-1/2}$$

# Indikace 1-exponenciální kinetiky

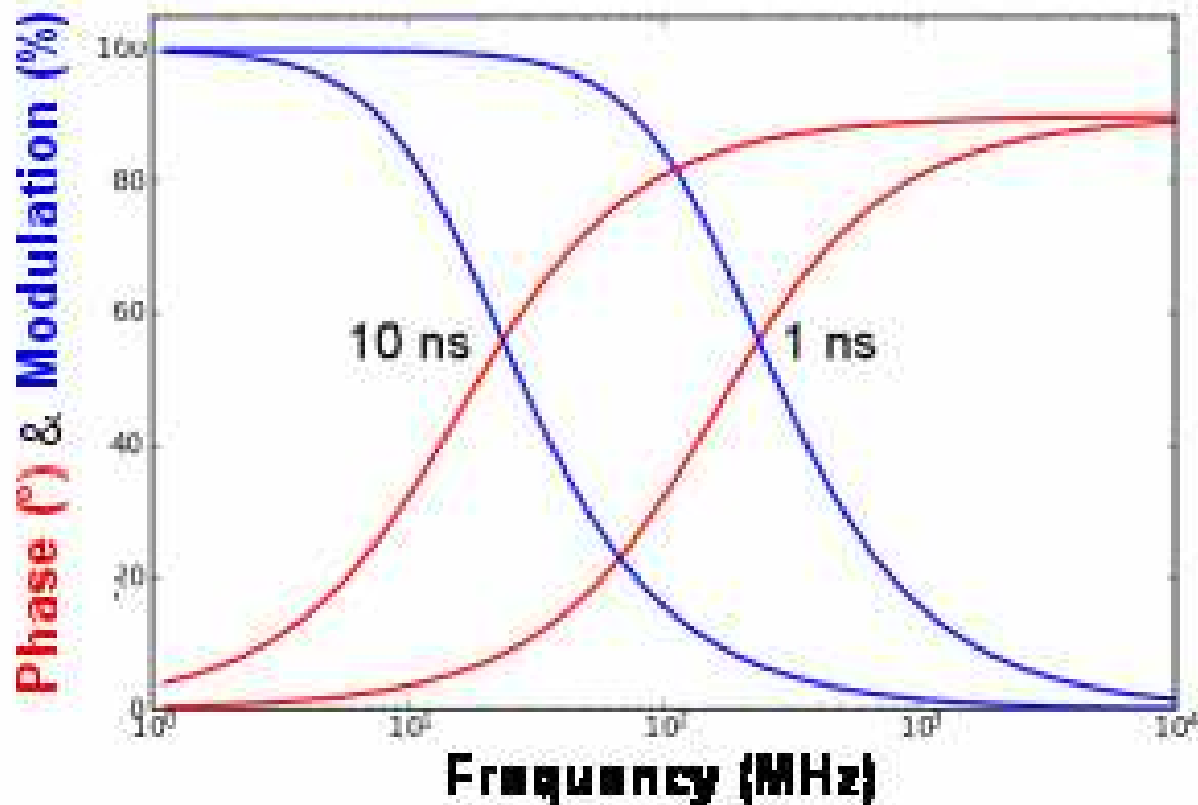
$\tau_{\Phi}$  i  $\tau_m$  jsou stejné pro všechny frekvence

$\tau_{\Phi} = \tau_m$  na každé frekvenci

Pro zjištění hodnoty  $\tau$  při 1-exponenciálním dohasínání stačí měřit na 1 frekvenci, pro složitější kinetiky je potřeba proměřit  $\Phi$  a  $m$  na více frekvencích.

**Příklad 9.2:** Při měření na frekvenci 30 MHz jsme naměřili fázový posun  $\Phi = 30^\circ$  a demodulaci  $m = 0,5$ . Má měřený fluorofor jednoexponenciální kinetiku dohasínání ? Je potřeba měřit ještě na dalších frekvencích ?

# Rozsah frekvencí



<http://www.lfd.uci.edu/research/>

Rozsah měřících frekvencí je třeba přizpůsobit době života fluoroforu, typicky frekvence zhruba v intervalu  $0,1/(2\pi\tau)$  až  $10/(2\pi\tau)$



# Analýza dat

Obecně pro kinetiku dohasínání  $I(t)$   
(jakoukoliv i neexponenciální)

Pro sumu exponenciál

sinová  
transformace

$$N_{\omega} = \frac{\int_0^{\infty} I(t) \sin(\omega t) dt}{\int_0^{\infty} I(t) dt}$$

$$N_{\omega} = \frac{\sum_i \frac{\alpha_i \omega \tau_i^2}{1 + \omega^2 \tau_i^2}}{\sum_i \alpha_i \tau_i}$$

cosinová  
transformace

$$D_{\omega} = \frac{\int_0^{\infty} I(t) \cos(\omega t) dt}{\int_0^{\infty} I(t) dt}$$

$$D_{\omega} = \frac{\sum_i \frac{\alpha_i \tau_i}{1 + \omega^2 \tau_i^2}}{\sum_i \alpha_i \tau_i}$$

normalizace na celkovou  
steady-state intenzitu

# Analýza dat

Vypočítané hodnoty fázového posunu  $\Phi_{c\omega}$  a demodulace  $m_{c\omega}$  jsou pak dány

$$\tan \Phi_{c\omega} = \frac{N_{\omega}}{D_{\omega}}$$

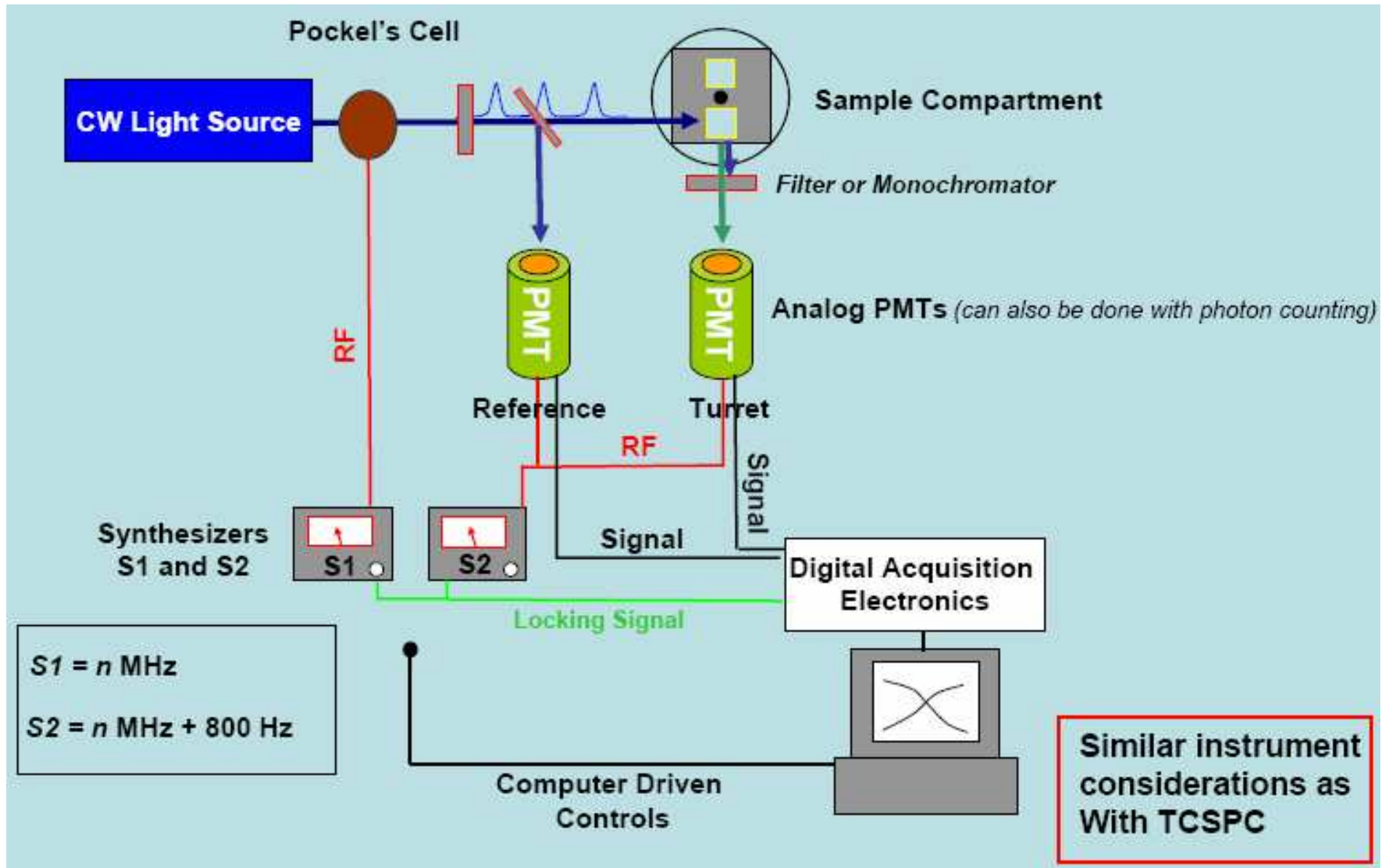
$$m_{c\omega} = \sqrt{N_{\omega}^2 + D_{\omega}^2}$$

Kvalita fitu

$$\chi_R^2 = \frac{1}{\nu} \sum_{\omega} \left( \frac{\Phi_{\omega} - \Phi_{c\omega}}{\delta\Phi} \right)^2 + \frac{1}{\nu} \sum_{\omega} \left( \frac{m_{\omega} - m_{c\omega}}{\delta m} \right)^2$$

$\delta\Phi$  a  $\delta m$  jsou empiricky určené chyby měření pro  $\Phi$  a  $m$

# Experimentální uspořádání - MHz oblast



# Cross-correlation detection

umožňuje zpracování signálu na nízkých frekvencích

Časová závislost intenzity signálu

$$I(t) = I_0 [1 + m \cos(\omega t + \Phi)]$$

Zesílení na detektoru je také sinusově modulováno

$$G(t) = G_0 [1 + m_C \cos(\omega_C t + \Phi_C)]$$

Vynásobením dostaneme, že signál je roven

$$S(t) = I_0 G_0 [1 + m \cos(\omega t + \Phi) + m_C \cos(\omega_C t + \Phi_C) + m m_C \cos(\omega t + \Phi) \cos(\omega_C t + \Phi_C) ]$$

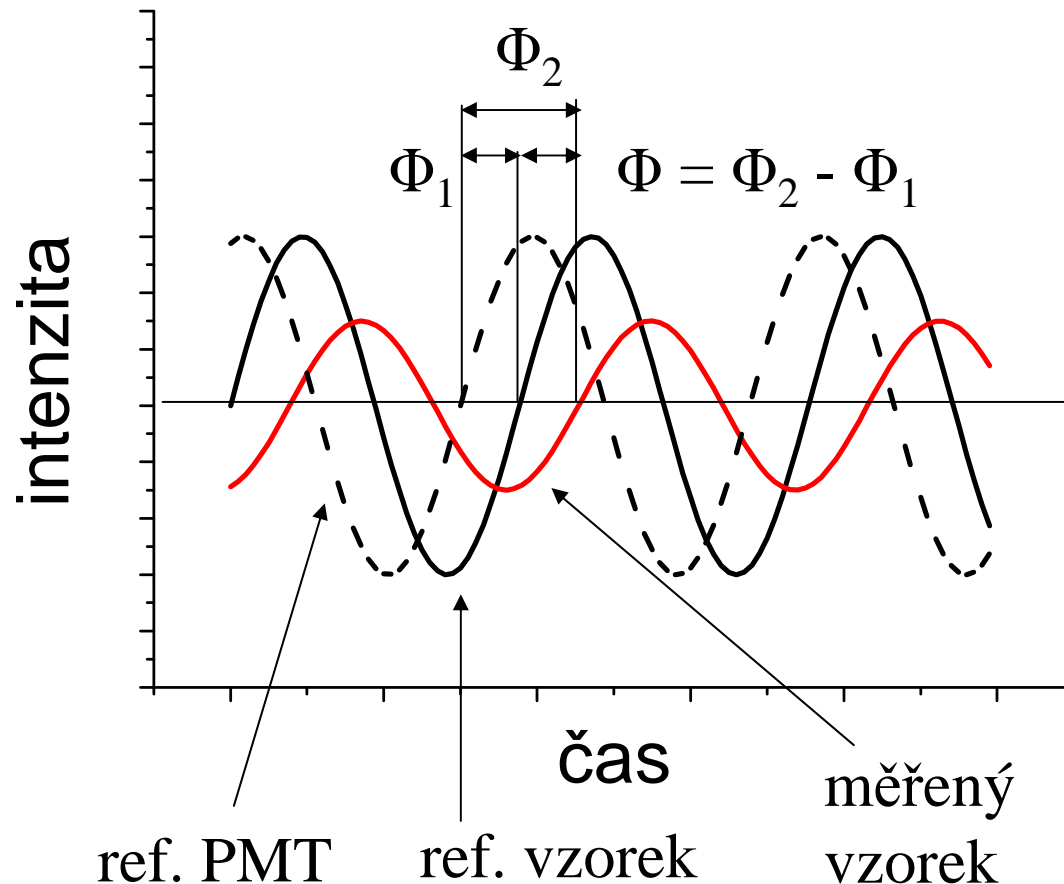
Poslední člen je pak roven

$$m m_C / 2 [\cos(\Delta \omega t + \Delta \Phi) + \cos(\omega_C t + \omega t + \Delta \Phi)]$$

kde  $\Delta \omega = \omega_C - \omega$  a  $\Delta \Phi = \Phi_C - \Phi$

Máme tedy členy s frekvencemi  $\omega$ ,  $\omega_C$ ,  $\omega + \omega_C$  a  $\Delta \omega$ . První tři jsou elektronicky odfiltrovány a poslední člen stále nese informaci o demodulaci a fázovém posunu.

# Měření v MHz oblasti



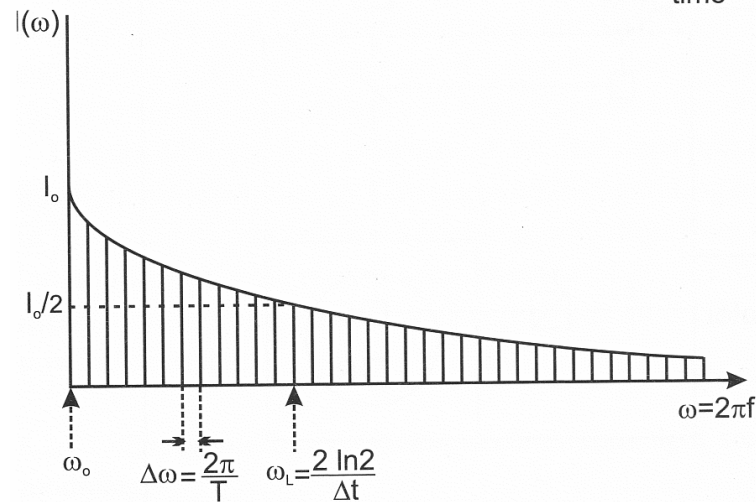
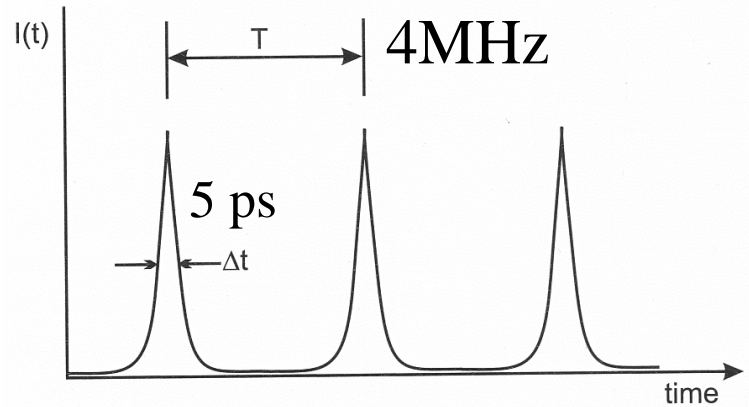
Měření je omezeno vlastnostmi elektro-optického modulátoru (do zhruba 200 MHz) a frekvenčními vlastnostmi fotonásobiče (300 - 1000 MHz). Omezení EO modulátoru je možno obejít použitím modulovaného zdroje světla (LED).

referenční vzorek - rozptyl, nebo vzorek se známým  $\tau$

# Experimentální uspořádání - GHz oblast

Excitace pulsním laserem

Jako detektor nutno použít  
MCP-PMT nebo rychlou  
fotodiodu



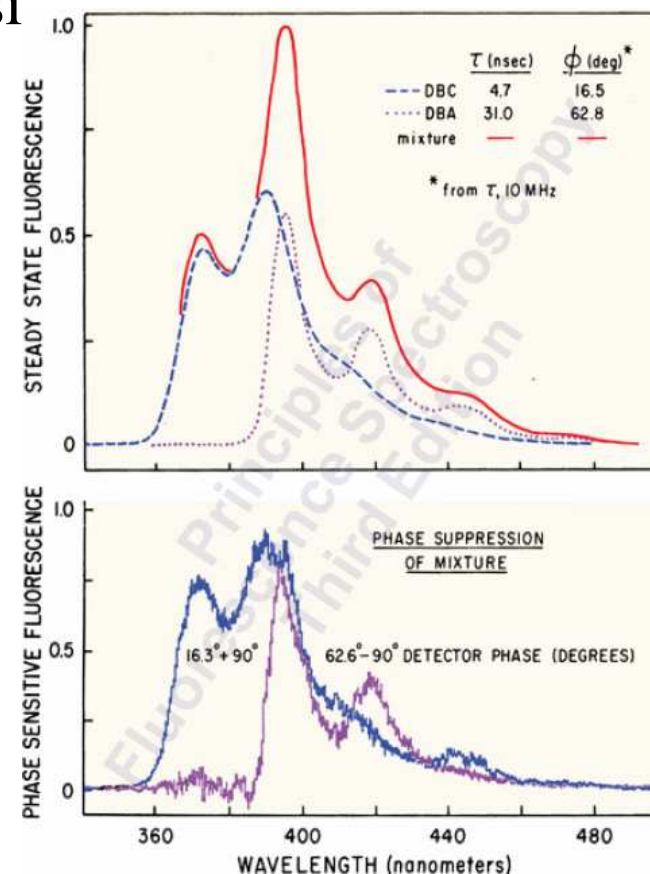
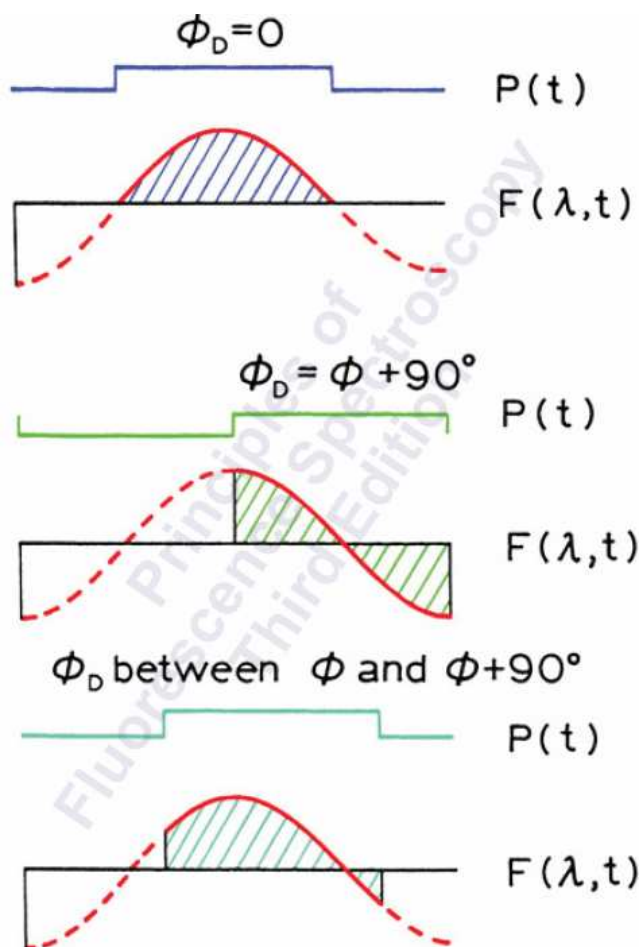
25,1 MHz    277 GHz

# Fázově rozlišená spektra

Detektor zapnut jen na půl periody s fázovým posuvem  $\Phi_D$

$$F(\lambda, \Phi_D) = k F(\lambda) m \cos(\Phi_D - \Phi) \quad \text{Pro } \Phi_D = \Phi + 90^\circ \text{ je } F = 0$$

Možnost selektivního potlačení spektra jedné komponenty v komplexní směsi



# Srovnání měření v časové a fázové doméně

- Obě metody jsou teoreticky ekvivalentní, poskytují stejné informace, neboť harmonická odezva je jen Fourierovou transformací odezvy na  $\delta$ -puls.
- Moderní přístroje používají stejné zdroje světla, detektory i optický modul, odlišná je pouze elektronika, takže i cena je srovnatelná.
- Rozdílné jsou metodiky, přičemž každá má své výhody a nevýhody
- Pulsní metoda umožňuje vizualizaci kinetiky dohasínání, zatímco představit si ji na základě posunu fáze nebo demodulace je problém.
- Pulsní metoda je založena na detekci jednotlivých fotonů a má tedy obrovskou citlivost, zatímco pro přesné vyhodnocení analogového signálu ve fázové doméně potřebujeme silnější signál.
- Ve fázové doméně nepotřebujeme dělat dekonvoluci, zatímco v pulsni doméně je to často nezbytné a zejména pro velmi rychlé kinetiky je potřeba změřit IRF s velkou pečlivostí.
- Dobře definovaná statistika v TCSPC je velkou výhodou pulsni domény při analýze dat, ve fázové doméně určení směrodatné odchylky pro fázi a demodulaci nemusí být jednoduché.
- V časové doméně je jednodušší měření TRES.
- Dekompozice spekter na základě doby života je jednodušší ve fázové doméně.
- Rychlost měření závisí na složitosti signálu. Pro 1-exponenciální kinetiku je rychlejší měření ve fázové doméně (výhoda v mikroskopii), pro více-exponenciální jsou časy srovnatelné (buďto je potřeba nasbírat mnoho fotonů, nebo měřit při mnoha frekvencích)



# Shrnutí

Princip měření doby života ve fázové doméně - **excitace harmonicky modulovaným světlem**

Měřené veličiny - **fázový posuv**  $\Phi$  a **demodulace emise**  $m$ , výpočet doby života z těchto parametrů

**Analýza dat** - velmi rychlá pro jednoexponenciální kinetiky, velmi složitá pro složitější modely

Experimentální uspořádání, princip „cross-correlation detection“

Experimentální uspořádání pro měření v GHz oblasti (excitace pulzním laserem, detektory s rychlou frekvenční odpovědí)

**Fázově rozlišená spektra**

Výhody a nevýhody měření v časové a fázové doméně