

“10000 times volume reduction for fluorescence correlation spectroscopy using nano-antennas”

L. E. Estrada, P. F. Aramendía, O. E. Martínez

Caldarola Martín

Feliz cumple Lau!
1 de noviembre

Premio J. J. Giambiagi 2010



Esquema de la charla

- Introducción a FCS
- Propuesta nueva: NPs para aumentar la resolución
- Emisión de moléculas cerca de NPs.
- Modificación de la función de autocorrelación
- Resultados experimentales
- Conclusiones

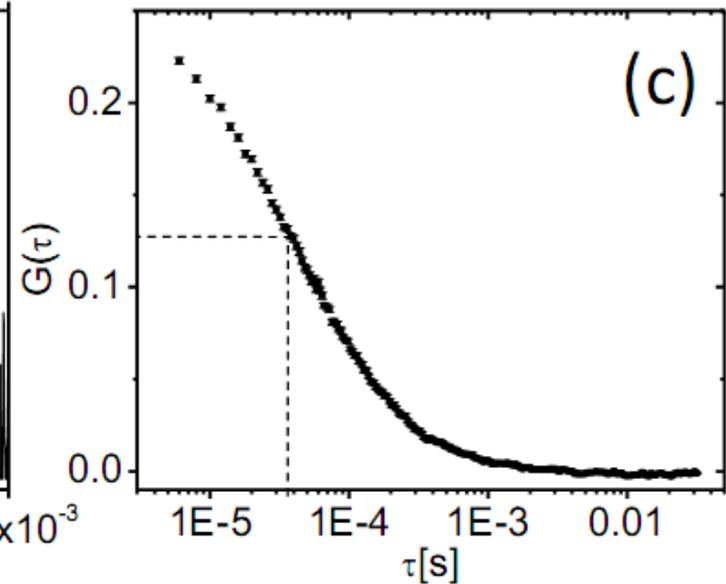
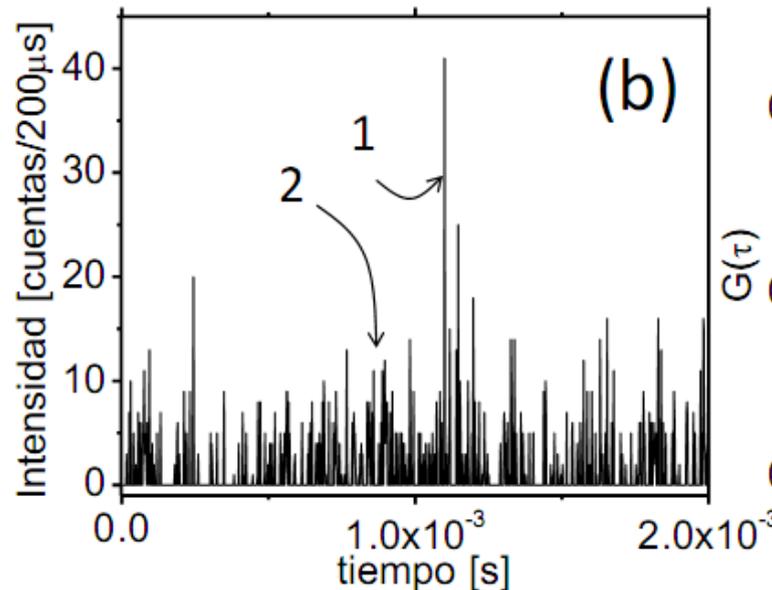
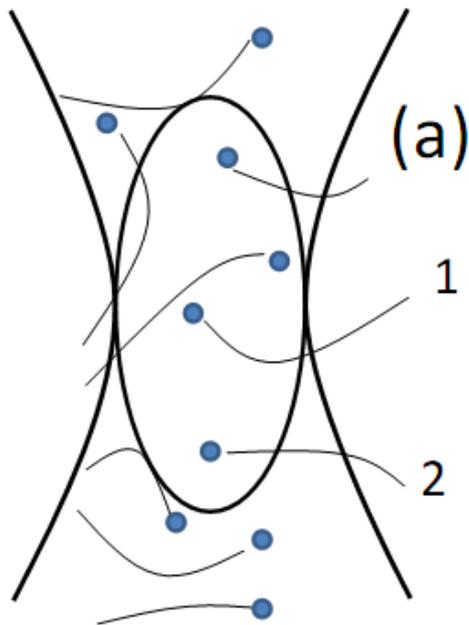
Introducción FCS

(a) Esquema del volumen de excitación

(b) Se miden las fluctuaciones de intensidad en función del tiempo.

(c) Se calcula la función correlación

$$\tilde{G}(\tau) = \frac{\langle I(t)I(t+\tau) \rangle}{\langle I \rangle^2} = \frac{\langle \delta I(t)\delta I(t+\tau) \rangle}{\langle I \rangle^2} + 1 = G(\tau) + 1$$



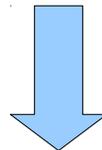
Valores típicos de trabajo

Volúmen confocal $\cong \mu\text{m}^3$

Concentraciones $\cong \text{nM}$

Resolución espacial $\cong 500$
nm

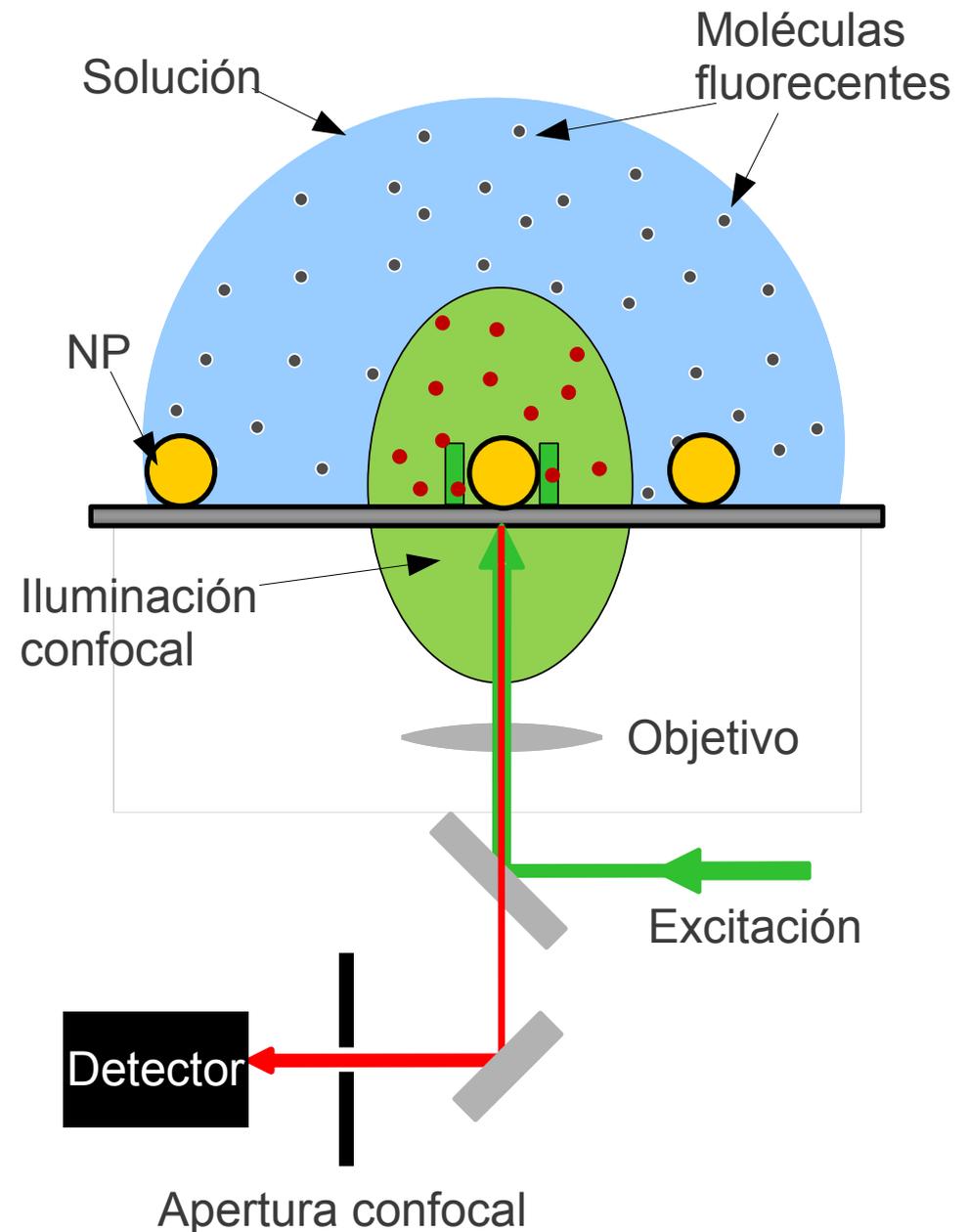
Característica de la técnica:
MODELO DEPENDIENTE a la hora de
interpretar los datos



Modelado de la función correlación

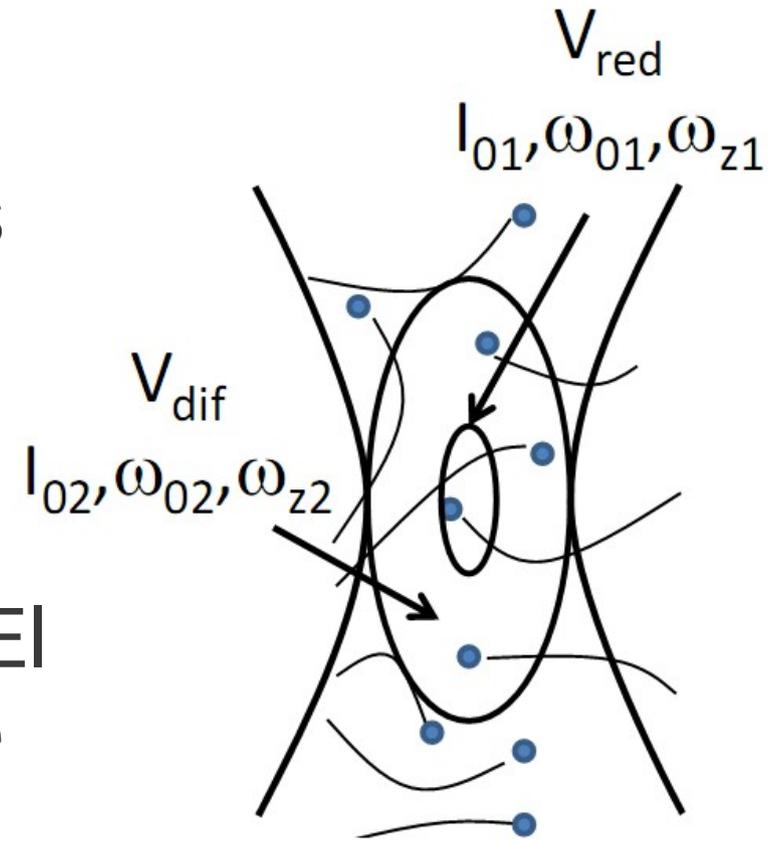
Propuesta: nanoantenas

- Para mejorar la resolución se propone la utilización de nanopartículas metálicas
- Se generan dos nuevos volúmenes de excitación



Modelo simple para la función correlación

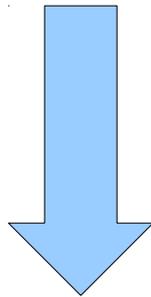
- En el caso confocal, se pueden aproximar los volúmenes por gaussianas 3D, con simetría de revolución*.
- Se consideran dos volúmenes de excitación. El pequeño tiene un factor de intensificación α (en intensidad)
- Se obtiene una expresión analítica para la función correlación.



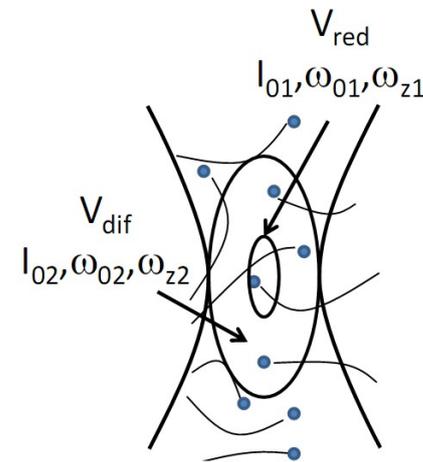
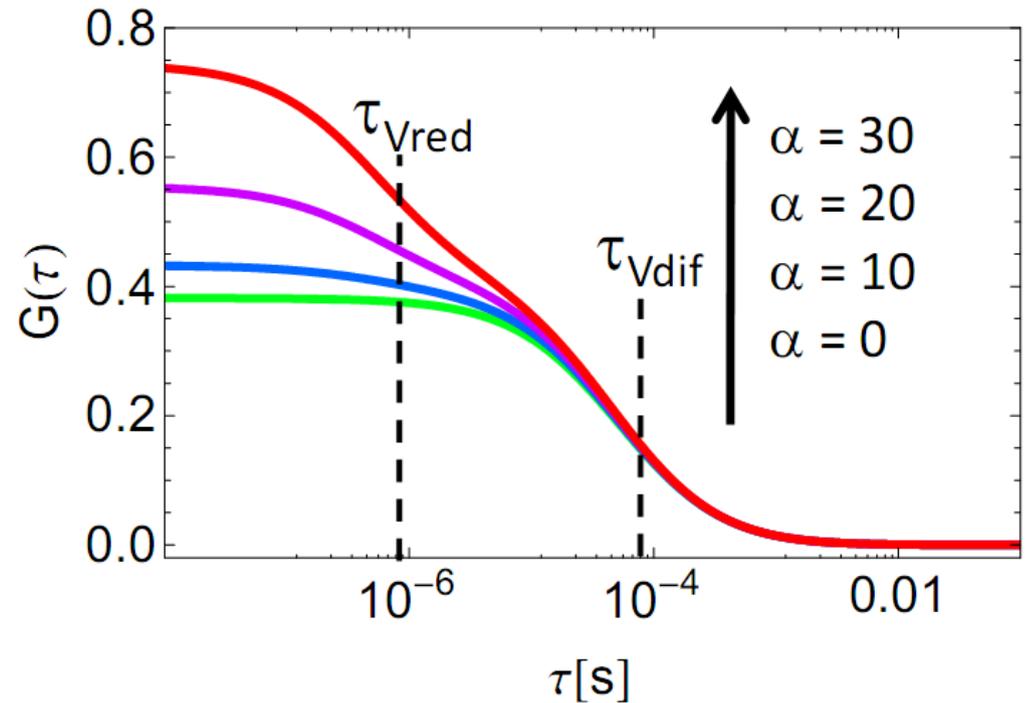
Esquema de los dos volúmenes de excitación

Modelo simple para la función correlación

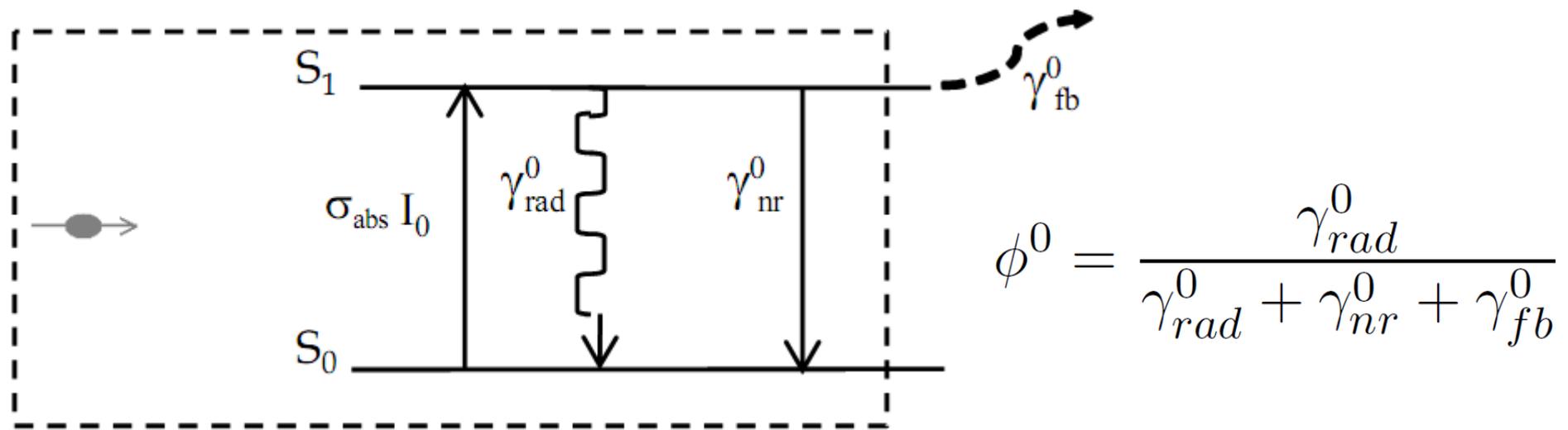
- Al aumentar la intensificación, se ve la aparición de un nuevo tiempo de correlación $\tau_{V_{red}}$



Difusión en el volumen pequeño

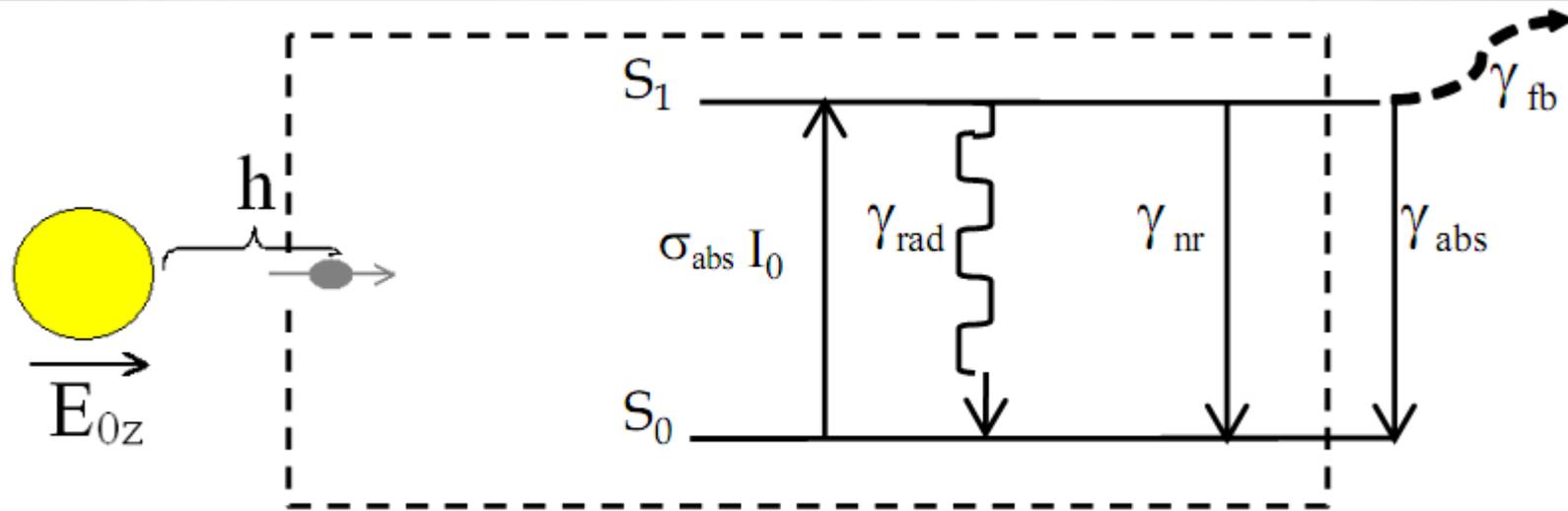


Interacción NP-moléculas fluorescentes



- ϕ^0 es la eficiencia cuántica “intrínseca” de fluorescencia de la molécula, cuando se la considera un sistema aislado.
- γ = constante de velocidad de los distintos procesos (radiativos, no radiativos y fotoblanqueo)

Interacción NP-moléculas fluorescentes



- Con NP: aparece un mecanismo no radiativo extra: la disipación a través de la NP.
- γ_{rad} = constante de velocidad de emisión radiativa con NP

$$\phi = \frac{\gamma_{\text{rad}}}{\gamma_{\text{rad}} + \gamma_{\text{nr}} + \gamma_{\text{fb}} + \gamma_{\text{abs}}}$$



Normalizo y uso la ec de ϕ^0

$$\phi = \frac{\gamma_{\text{rad}}/\gamma_{\text{rad}}^0}{\gamma_{\text{rad}}/\gamma_{\text{rad}}^0 + \gamma_{\text{abs}}/\gamma_{\text{rad}}^0 + \frac{1-\phi^0}{\phi^0}}$$

Ganancia en brillo

- La velocidad de emisión de una molécula fluorescente, γ_{em} , depende de la velocidad de excitación, γ_{exc} , y de la eficiencia cuántica ϕ :

$$\gamma_{em} = \gamma_{exc} \phi$$

- La ganancia en brillo se define como

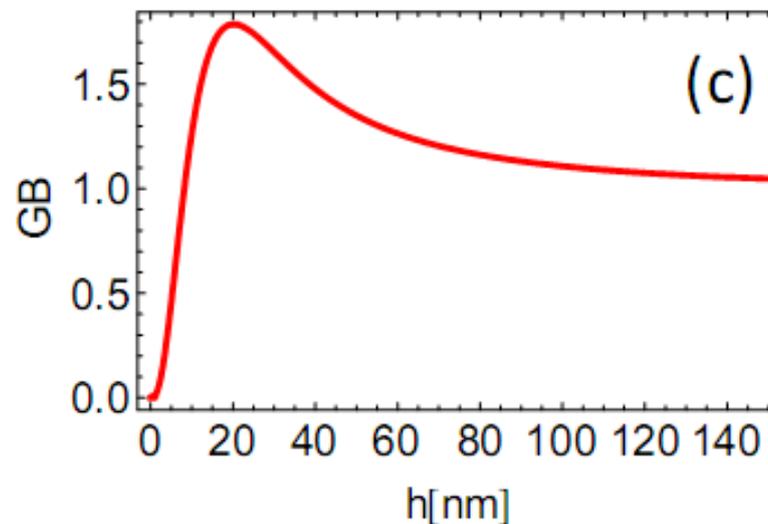
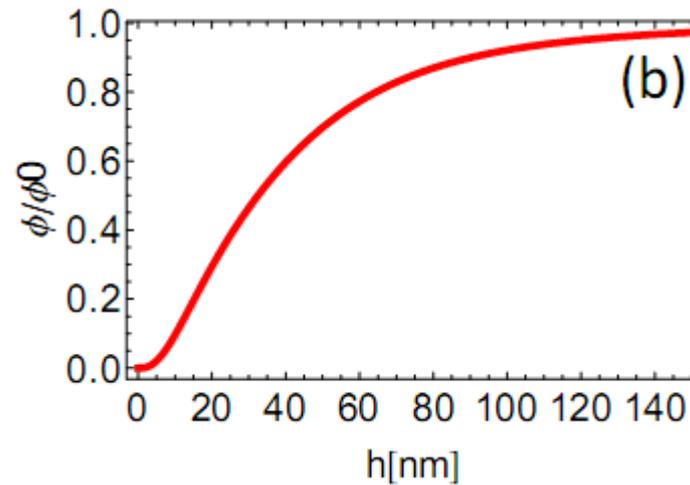
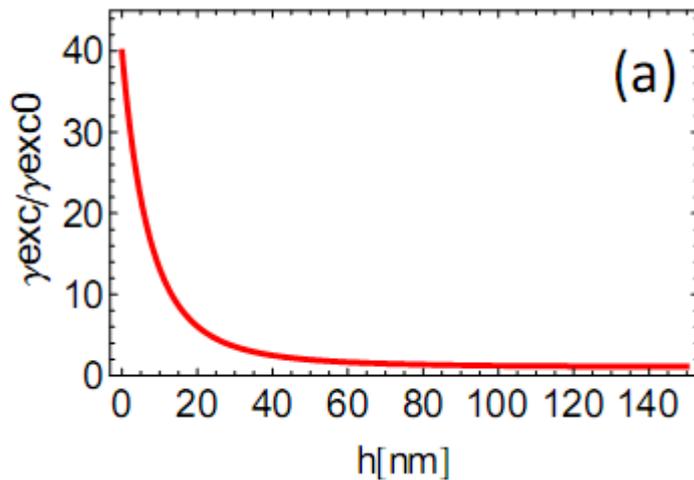
$$GB = \frac{\gamma_{em}}{\gamma_{em}^0} = \frac{\gamma_{exc}}{\gamma_{exc}^0} \frac{\phi}{\phi^0}$$

Competencia entre
quenching e
intensificación

Resultados: NP+molécula fluorescente

$$GB = \frac{\gamma_{exc}}{\gamma_{exc}^0} \frac{\phi}{\phi^0}$$

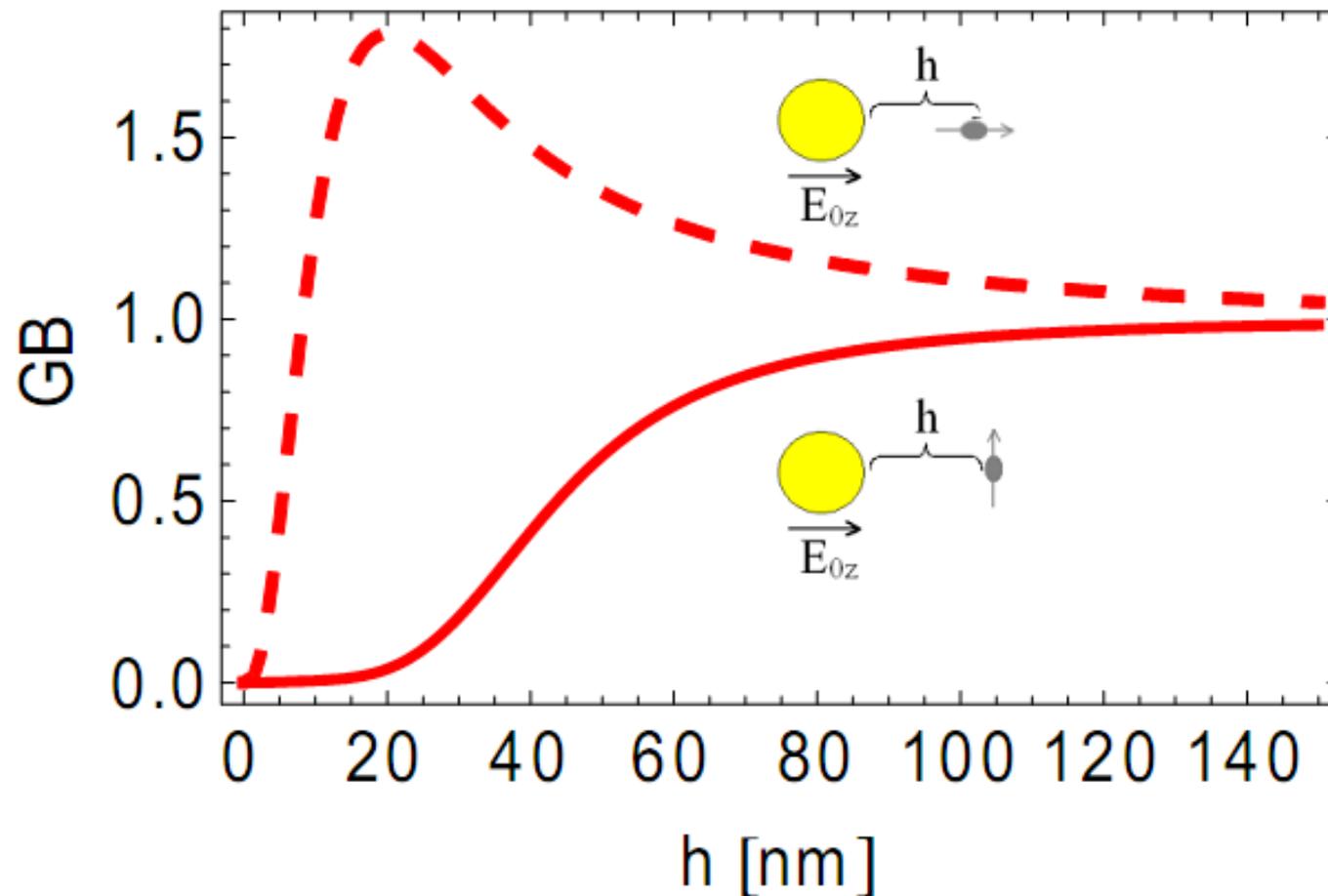
NP oro
radio = 40 nm
medio = agua
 $\phi^0 = 1$
 $\lambda_{ec} = 540$ nm
 $\lambda_{em} = 570$ nm
Mol // E_{irc}



- El producto da la ganancia en brillo:

Resultados: NP+molécula fluorescente

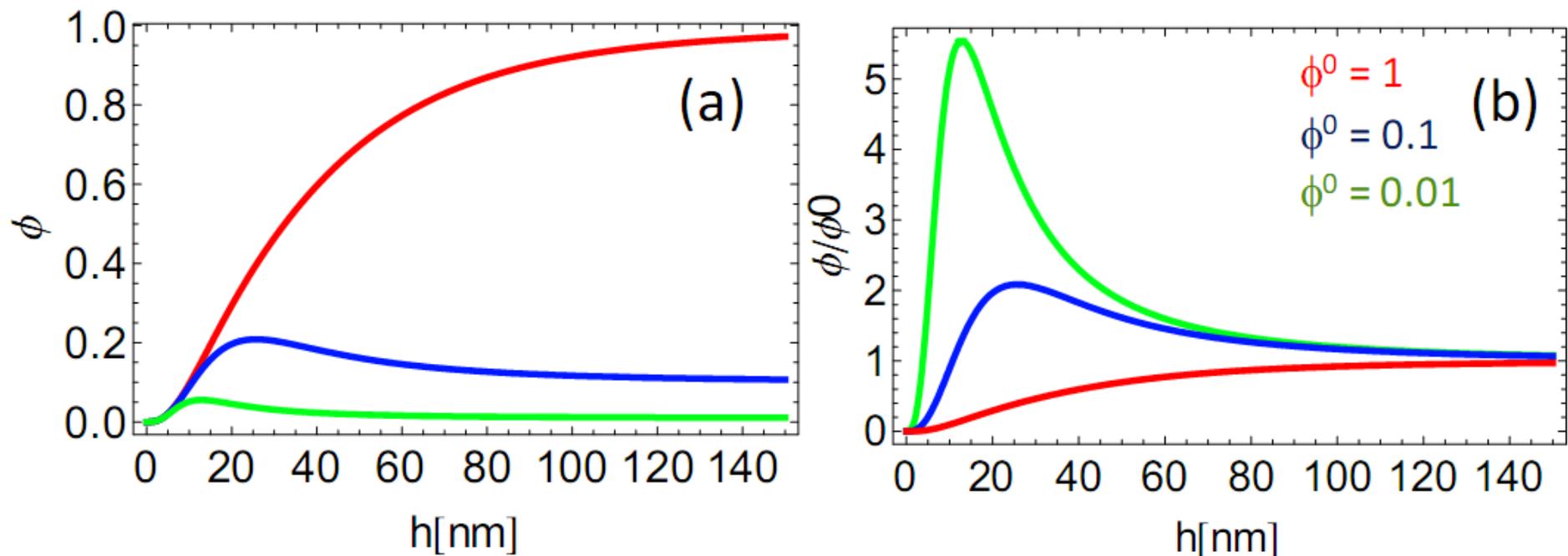
- Si cambia la orientación de la molécula



NP oro
radio = 40 nm
medio = agua
 $\phi_0 = 1$
 $\lambda_{ec} = 540$ nm
 $\lambda_{em} = 570$ nm
Mol // E_{irc}

Resultados: NP+molécula fluorescente

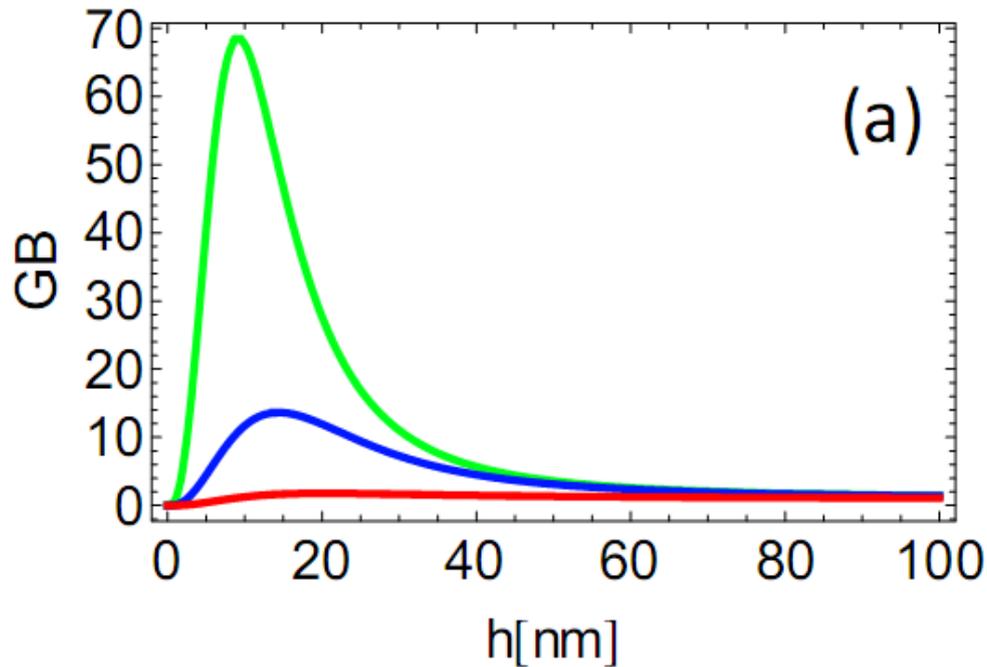
- Dependencia de la GB con ϕ^0 :
 - Se fija el material y la geometría de la NP la ganancia en la excitación queda determinada.
 - Solo queda modificar la ganancia en la eficiencia cuántica, que depende de ϕ^0



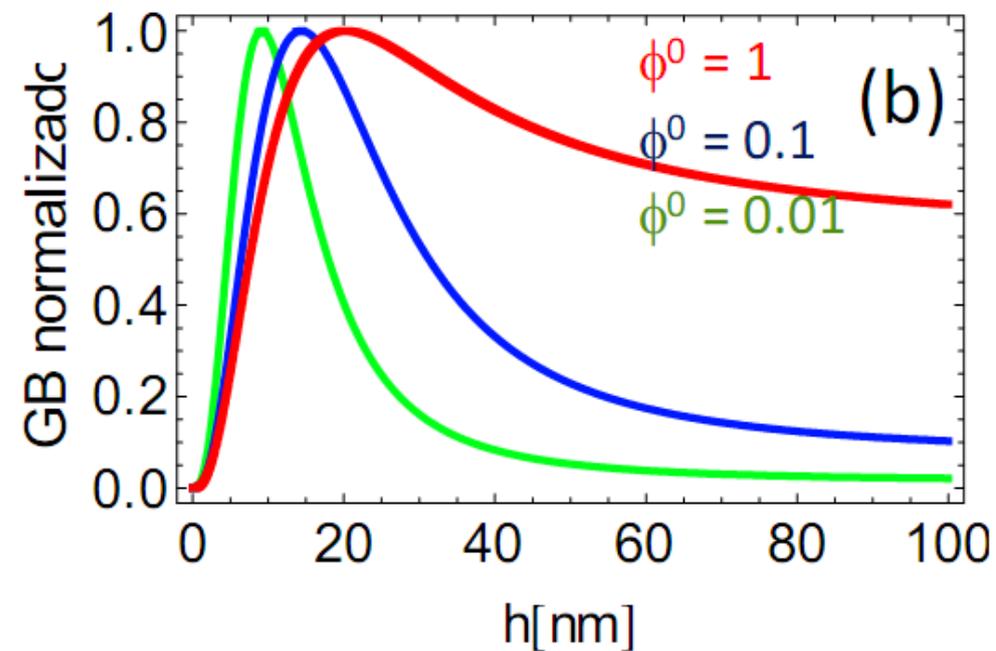
Para moléculas menos eficientes se obtiene mayor GB

Resultados: NP+molécula fluorescente

- Contraste y resolución espacial



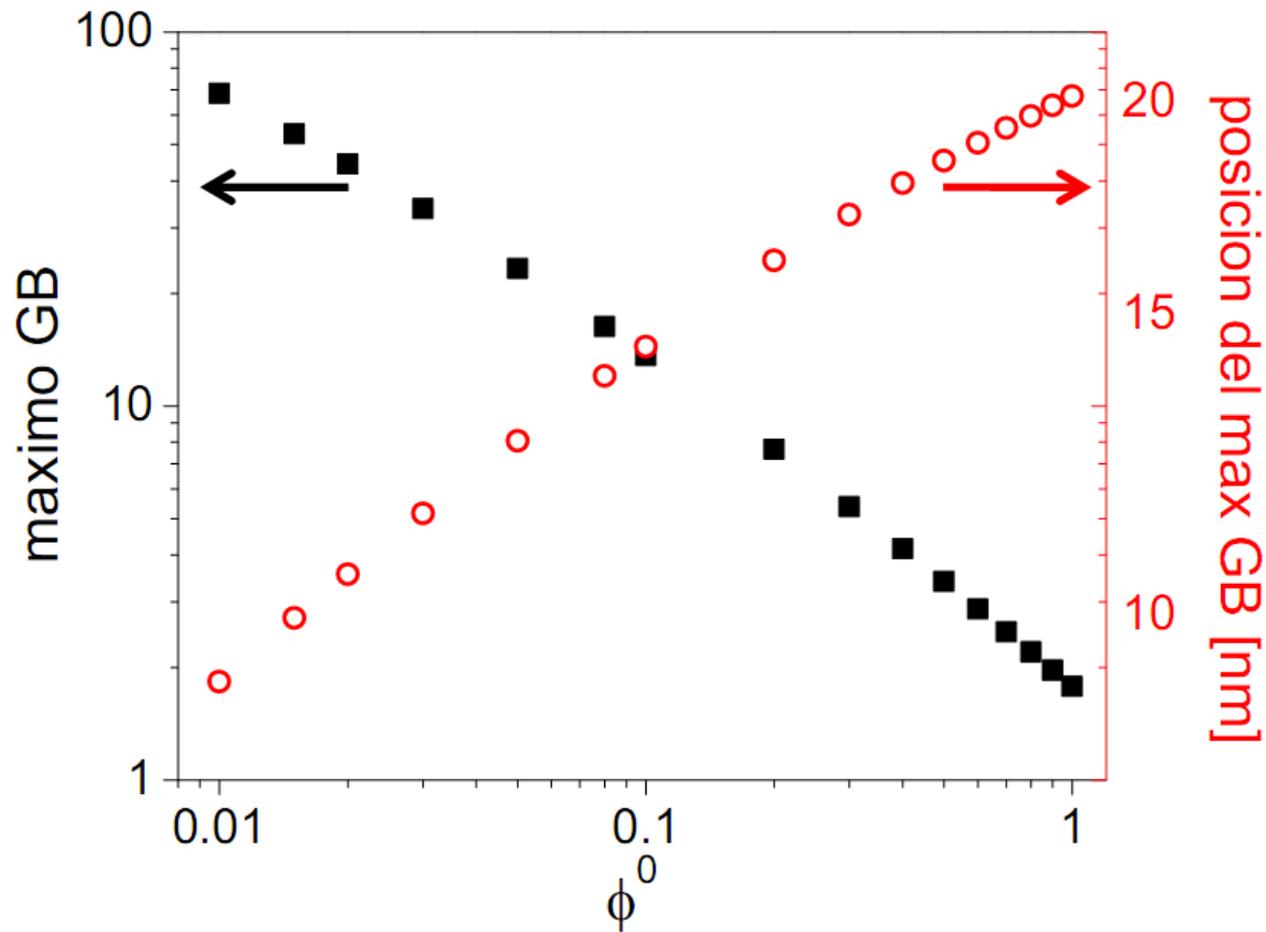
Disminuir ϕ^0
Aumenta GB



Disminuir ϕ^0
Disminuye el máximo de GB

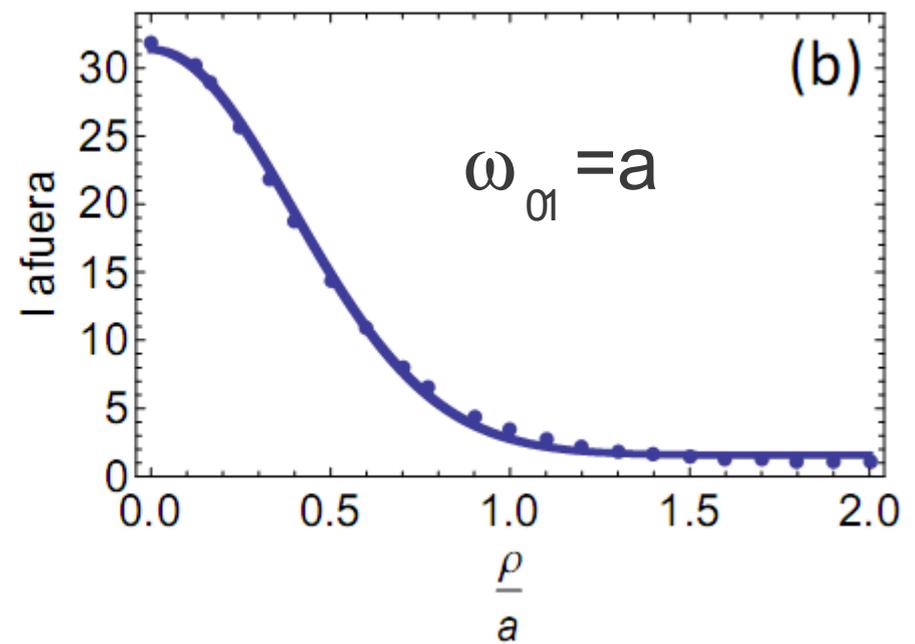
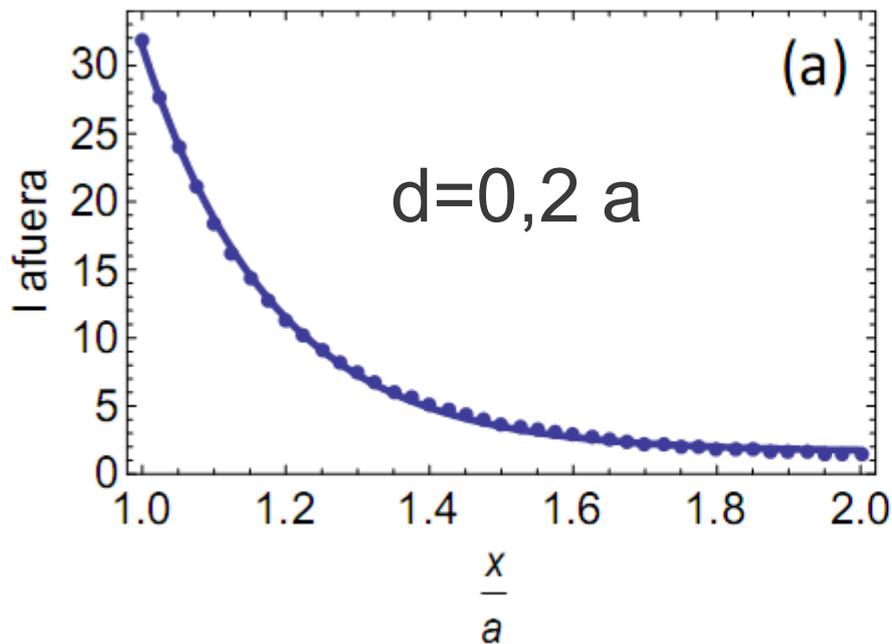
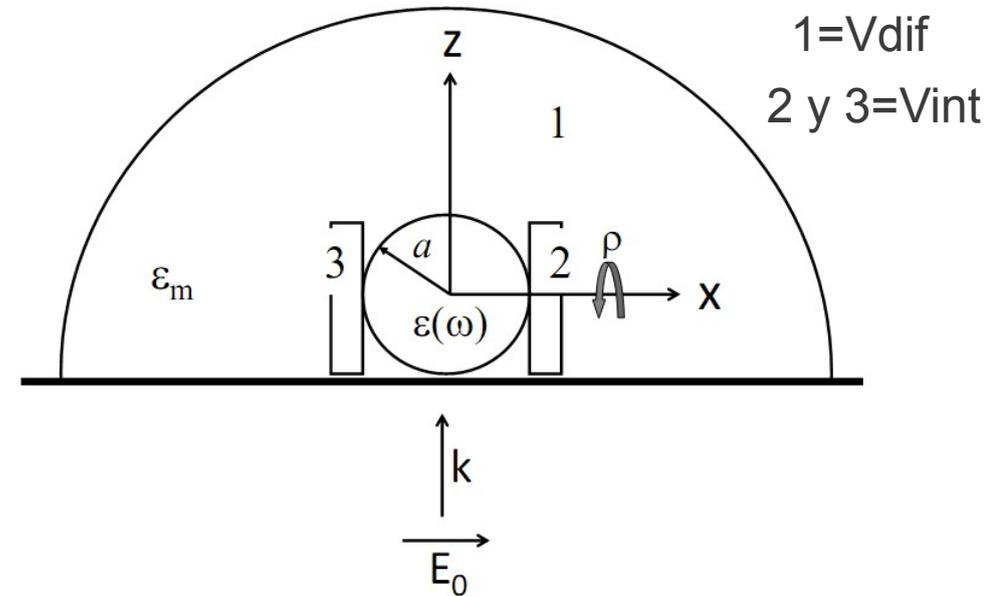
Resultados: NP+molécula fluorescente

- Gráfico de diseño: cómo elegir ϕ^0



Modelo detallado para la función correlación

- La presencia de NP genera dos volúmenes adicionales de excitación, 2 y 3, sumado al confocal 1
- Se grafica la intensidad



Función correlación completa

- La distribución espacial de la fluorescencia colectada se puede aproximar por

Intensificación α

$$\alpha \underbrace{e^{-2(z^2+y^2)/\omega_{01}^2} e^{-x/d}}_{V_{red}} + \underbrace{e^{-2(x^2+y^2)/\omega_{02}^2} e^{-2z^2/\omega_{z2}^2}}_{V_{dif}}$$

- Esto da lugar a la función correlación

$$G(\tau) = \left(\frac{1}{\frac{\langle N_{dif} \rangle}{4\sqrt{2}} + \alpha \langle N_{red} \rangle} \right)^2 (f_0 + f_1 + f_2)$$

- f_0 : independiente de α . Difusión en V_{df} .
- f_1 : proporcional a α . Describe la correlación entre V_{df} y V_{red} .
- f_2 : proporcional a α^2 . Difusión en V_{red} .

Aproximación

- Con parámetros realistas para los volúmenes de excitación, el término más importante en $G(\tau)$ es f_2 , lo que simplifica la expresión

$$\begin{aligned} G(\tau) &\sim \frac{32}{\langle N_{dif} \rangle^2} f_2 \\ &= \frac{\beta}{\left(\frac{4\tau}{\tau_{red}} + 1\right)} \left[\frac{2}{\sqrt{\pi}} \sqrt{\frac{\tau}{\tau_{red}}} + \left(1 - 2\frac{\tau}{\tau_{red}}\right) e^{-\frac{\tau}{\tau_{red}}} \operatorname{Erfc} \left(\sqrt{\frac{\tau}{\tau_{red}}} \right) \right] \end{aligned}$$

Se tiene un único tiempo de difusión:

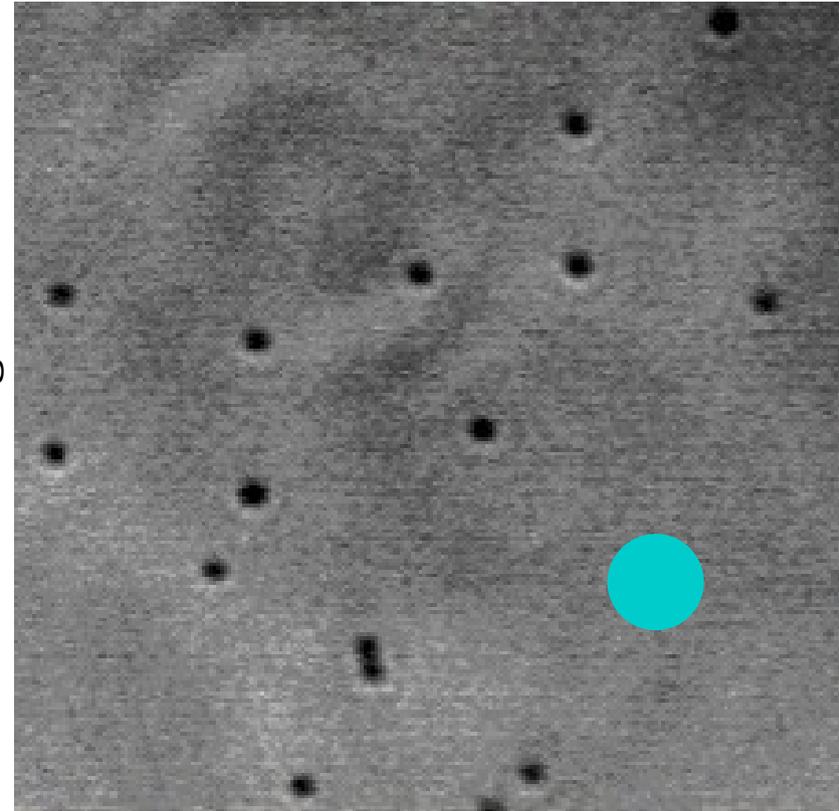
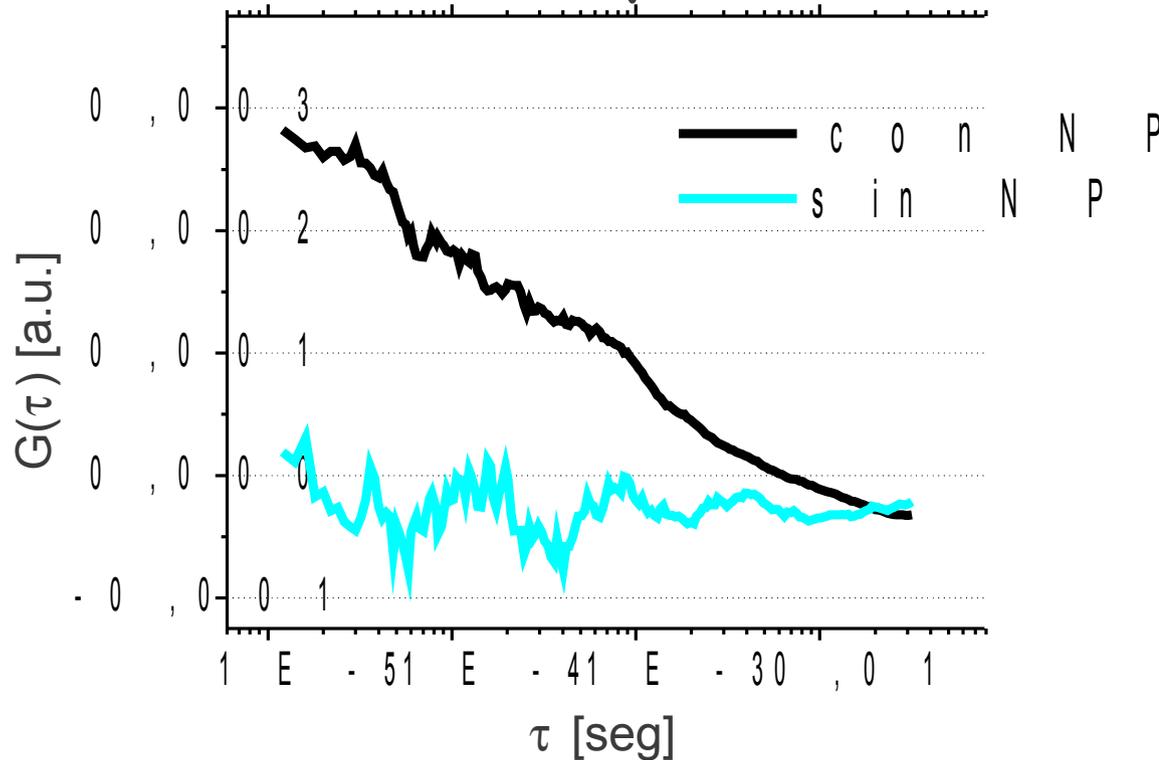
τ_{red}

Resultados experimentales

Rosa de bengala/glicerol

$$\phi^0 = 0,02$$

$$C = 150 \mu M$$



Se aumentó la concentración un factor

10^4 !

Conclusiones

- Se propone una técnica para realizar FCS en campo cercano, utilizando NP metálicas
- Se estudió la emisión de moléculas fluorescentes en presencia de NP metálicas.
- Se modela la función correlación para el caso propuesto.
- Se obtienen resultados experimentales que muestran un factor de aumento en la concentración de trabajo cercano a 10000.

Muchas gracias