

## ESPECTROSCOPIA DE CORRELACIÓN DE FLUORESCENCIA (FCS)

La espectroscopia de correlación de fluorescencia (FCS) realiza un análisis de fluctuaciones de intensidad de fluorescencia emitida por moléculas y/o partículas de pequeño tamaño, en solución y/o en células. La fluorescencia emitida es analizada en un volumen muy pequeño de solución donde la intensidad de fluorescencia fluctúa debido al movimiento browniano de las partículas. En otras palabras, el número de partículas en el subespacio definido por el sistema óptico cambia aleatoriamente alrededor del número promedio. FCS es una herramienta analítica muy sensible porque observa un pequeño número de moléculas (concentraciones nanomolares a picomolares) en un pequeño volumen ( $\sim 1\mu\text{m}^3$ ). El análisis proporciona el número promedio de partículas fluorescentes y el tiempo promedio de difusión, cuando la partícula está pasando por el espacio. Los experimentos de FCS pueden realizarse en una amplia variedad de especímenes, que van desde la ciencia de los materiales hasta la biología. Debido a que los marcadores fluorescentes vienen en una variedad de colores y pueden unirse específicamente a una molécula particular (por ejemplo, proteínas, polímeros, complejos metálicos, etc.), es posible estudiar el comportamiento de moléculas individuales. Eventualmente, se determinan tanto la concentración como el tamaño de la partícula (molécula) ambos parámetros importantes en numerosos campos de la investigación bioquímica, biofísica, química. En biología celular, FCS permite la observación de moléculas marcadas con fluorescencia en células vivas intactas, lo que representa una nueva área de "bioquímica in situ o in vivo".

Comúnmente, FCS se emplea en el contexto de la microscopía óptica, en particular microscopía confocal o microscopía de excitación de dos fotones. La resolución espacial se consigue a través de la óptica del microscopio. La luz laser se enfoca en una muestra y las fluctuaciones de intensidad de fluorescencia medidas (debido a la difusión, reacciones físicas o químicas, agregación, etc.) se analizan utilizando la autocorrelación temporal. La propiedad medida está esencialmente relacionada con la magnitud y/o la cantidad de fluctuaciones de las especies individuales cuando entran o salen del volumen de observación (o se encienden y apagan en el volumen).

Cuando se conoce un modelo apropiado, FCS se puede utilizar para obtener información cuantitativa, como:

- coeficientes de difusión
- radios hidrodinámicos
- concentraciones promedio
- velocidades de reacción química cinética
- dinámica singlete-triplete

Aparte de ensayos FCS clásicos, medición de autocorrelación temporal de un solo punto, existen variaciones denominadas con otros nombres (generalmente un acrónimo). Algunas de las más utilizadas en biología celular:

1) Espectroscopia de correlación de fluorescencia de variación puntual (svFCS), en la que el punto de observación se varía para medir los tiempos de difusión en diferentes tamaños de punto. La relación entre el tiempo de difusión y el área puntual es lineal y podría trazarse para descifrar la mayor contribución del confinamiento. La curva resultante se llama ley de difusión.

Esta técnica se usa en Biología para estudiar la organización de la membrana plasmática en células vivas.

2) Espectroscopia de correlación cruzada de fluorescencia (FCCS), en la que se utilizan dos especies moleculares que están tenidas independientemente con dos sondas fluorescentes de colores diferentes. Estas sondas fluorescentes son excitadas y detectadas por dos fuentes de luz láser diferentes y detectores generalmente etiquetados como "verde" y "rojo", atendiendo a la longitud de onda de emisión. FCCS se usa, por ejemplo, para estudiar interacciones moleculares usando diferencias en los tiempos de difusión (por ejemplo, el producto de una reacción de asociación será mayor y, por lo tanto, tendrá tiempos de difusión mayores que los reactivos individualmente). En otros casos, FCCS puede ser útil para medir el brillo molecular de diferentes estados de asociación de una misma molécula. Por ejemplo, los dímeros contendrán, a priori, el doble de marcadores fluorescentes que los monómeros, por lo que su brillo molecular será aproximadamente el doble que el de los monómeros. Como resultado, el brillo relativo es sensible a una medida de oligomerización.

3) Espectroscopia de correlación de imágenes (ICS). Cuando el movimiento es lento (en biología, por ejemplo, difusión en una membrana), obtener estadísticas adecuadas de un experimento FCS de punto único puede tomar un tiempo prohibitivamente largo. Se pueden obtener más datos realizando el experimento en múltiples puntos espaciales en paralelo, usando un microscopio confocal de barrido láser, promediándose las medidas. Otra variación de ICS realiza una autocorrelación espacial en imágenes, que proporciona información sobre la concentración de partículas. La correlación luego se promedia en el tiempo. También existen versiones de correlación cruzada de ICS, que pueden producir la concentración, distribución y dinámica de las moléculas fluorescentes co-localizadas. Las moléculas se consideran co-localizadas cuando las contribuciones de fluorescencia individuales son indistinguibles debido a la superposición de funciones de propagación de puntos de intensidades de fluorescencia.

## Fluorescence correlation spectroscopy (FCS) (ingles)

Fluorescence correlation spectroscopy (FCS) performs a fluorescence intensity fluctuation analysis emitted by small molecules and / or particles, in solution and / or in cells. The emitted fluorescence is analyzed in a very small volume of solution where the fluorescence intensity fluctuates due to the Brownian motion of the particles. In other words, the number of particles in the subspace defined by the optical system changes randomly around the average number. FCS is a very sensitive analytical tool because it observes a small number of molecules (nanomolar to picomolar concentrations) in a small volume ( $\sim 1\mu\text{m}^3$ ). The analysis provides the average number of fluorescent particles and the average diffusion time, when the particle is passing through space. FCS experiments can be performed on a wide variety of specimens, ranging from material science to biology. Because fluorescent labels come in a variety of colors and can bind specifically to a particular molecule (eg, proteins, polymers, metal complexes, etc.), it is possible to study the behavior of individual molecules. Eventually, both the concentration and the size of the particle (molecule) are determined, both important parameters in many fields of biochemical, biophysical, and chemical research. In cell biology, FCS allows the observation of fluorescently labeled molecules in intact living cells, which represents a new area of "biochemistry in situ or in vivo.

Commonly, FCS is used in the context of optical microscopy, in particular confocal microscopy or two-photon excitation microscopy. The spatial resolution is achieved through the optics of the microscope. The laser light is focused on a sample and the measured fluorescence intensity fluctuations (due to diffusion, physical or chemical reactions, aggregation, etc.) are analyzed using the temporal autocorrelation. The measured property is essentially related to the magnitude and / or the amount of fluctuations of the individual species when entering or leaving the observation volume (or turning on and off in the volume).

When an appropriate model is known, FCS can be used to obtain quantitative information, such as:

- diffusion coefficients
- hydrodynamic radii
- average concentrations
- kinetic chemical reaction rates
- dynamic singlet-triplet

Apart from classical FCS tests, i.e. measurement of single-point temporal autocorrelation, there are variations denominated with other names (usually an acronym). Some of the most used in cell biology:

**1) Spot variation fluorescence correlation spectroscopy (svFCS)**, in which the observation point is varied to measure diffusion times in different spot sizes. The relationship between diffusion time and point area is linear and could be plotted to decipher the greatest contribution of confinement. The resulting curve is called the law of diffusion. This technique is used in Biology to study the organization of the plasma membrane in living cells.

**2) Fluorescence cross-correlation spectroscopy (FCCS)**, in which two molecular species are used that are held independently with two fluorescent probes of different colors. These fluorescent probes are excited and detected by two different laser light sources and detectors generally labeled "green" and "red", depending on the emission wavelength. FCCS is used, for example, to study molecular interactions using differences in diffusion times (for example, the product of an association reaction will be higher and, therefore, will have longer diffusion times than the reagents individually). In other cases, FCCS can be useful for measuring the molecular brightness of different association states of the same molecule. For example, the dimers will contain, a priori, twice as many fluorescent labels as the monomers, so their molecular brightness will be approximately double that of the monomers. As a result, the relative brightness is sensitive to a measure of oligomerization.

**3) Image correlation spectroscopy (ICS)**. When the movement is slow (in biology, for example, diffusion on a membrane), obtaining adequate statistics from a single-point FCS experiment can take a prohibitively long time. More data can be obtained by performing the experiment at multiple spatial points in parallel, using a confocal laser scanning microscope, averaging the measurements. Another variation of ICS performs a spatial autocorrelation in images, which provides information on the concentration of particles. The correlation is then averaged over time. There are also cross-correlation versions of ICS, which can produce the concentration, distribution and dynamics of co-localized fluorescent molecules. The molecules are considered co-localized when the individual fluorescence contributions are indistinguishable due to the superposition of fluorescence intensity spot propagation functions.