

Clase 1

Introducción a las técnicas de fluorescencia

1

Bibliografía general

1. Principles of Fluorescence Spectroscopy. Joseph Lakowicz. Plenum Press, New York (3ra. edición)
2. Molecular Fluorescence: Principles and Applications. Bernard Valeur, Wiley-VCH

2

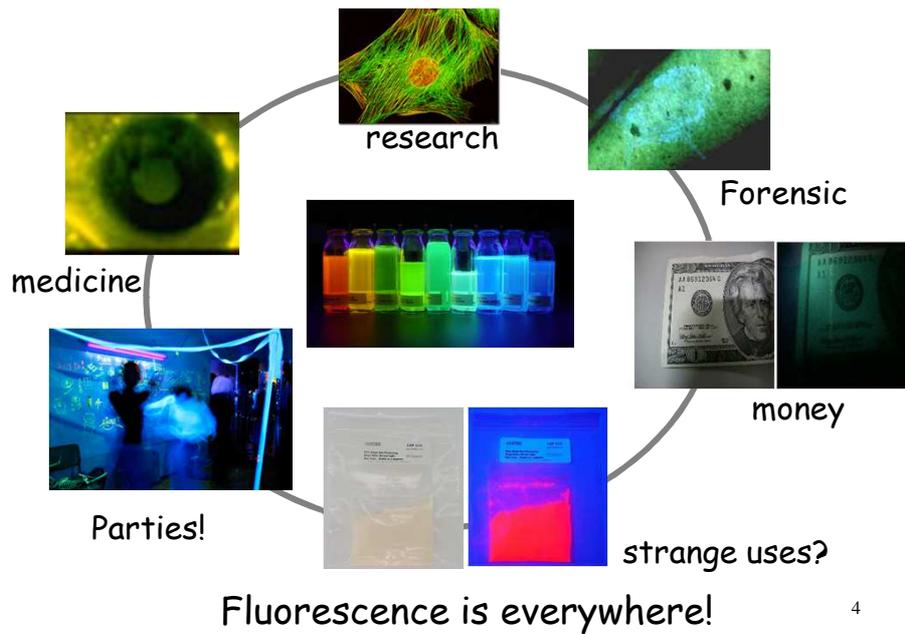
Guía general de la clase:

. Técnicas de fluorescencia. Fundamentos y aplicaciones:

- Características generales de los espectros de fluorescencia
- Cómo se mide? Instrumentación básica
- Tiempo de vida.

3

Where do we see fluorescence?



Fluorescence in 1943

Many of the basic principles of fluorescence had already been developed during the 1920's and 1930's.

Excited state lifetime (Gaviola)

Quantum yield (Wavilov)

Polarization of fluorescence (Weigert, F. Perrin)

Fluorescence resonance energy transfer (J. and F. Perrin)

The use of fluorescence in biology and biochemistry was, however, *descriptive* in nature and primarily limited to a role in the isolation, purification and quantification of fluorescent substances such as riboflavin and porphyrins.

D. Jameson Lectures



Gregorio Weber
1916-1997

Desarrollo de técnicas
(anisotropía, tiempo de vida,
mediciones de alta presión,
etc, etc)

Síntesis de sondas
fluorescentes

Fluorescencia
intrínseca de
proteínas

uso de sondas fluorescentes para
estudios de proteínas

6

Why is fluorescence so important?

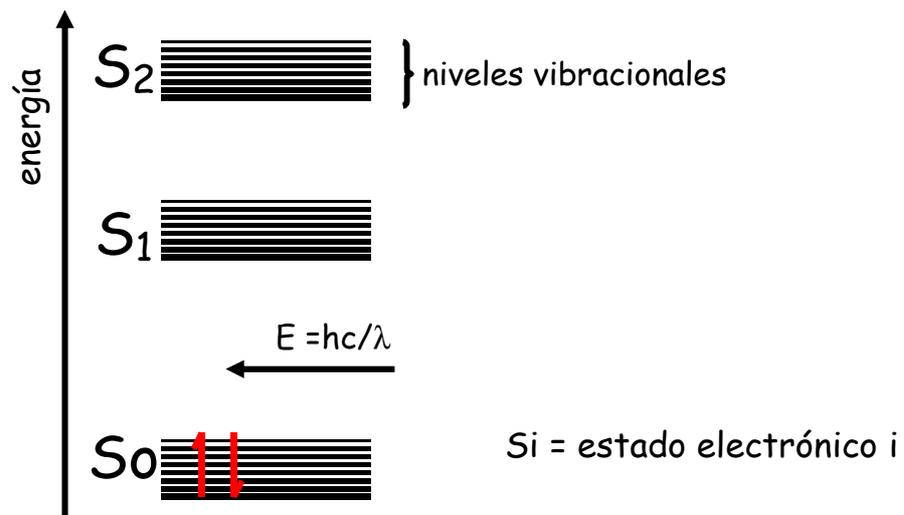
Because it give us information regarding:

1. Structure
2. Environment
3. Orientation
4. Interaction with other sample components
5. Dynamics
6. Etc, etc



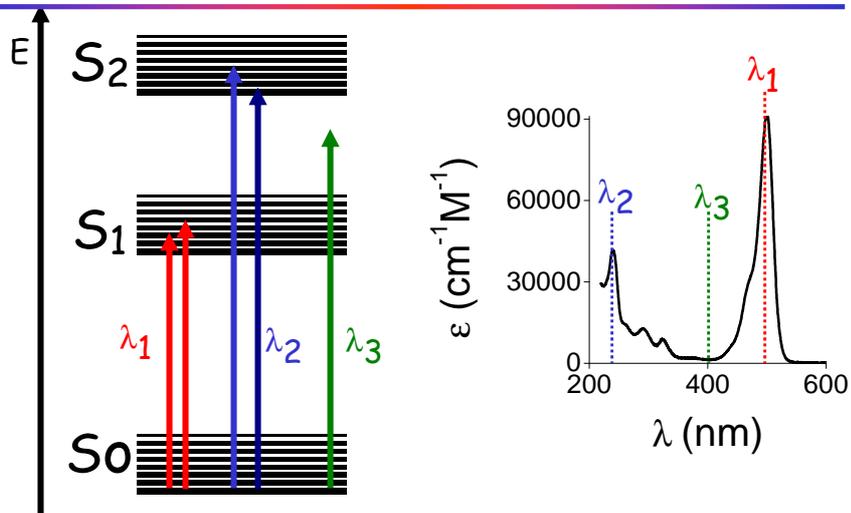
7

Absorción de luz UV-visible



a Tamb, el estado vibracional más poblado es el de menor energía⁸

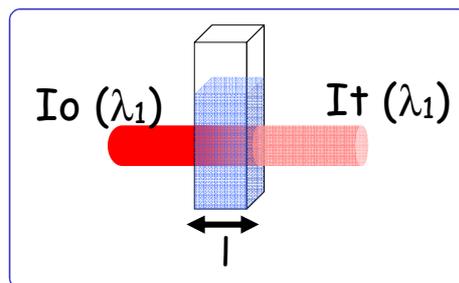
El coeficiente de absortividad molar



El espectro de absorción nos da información sobre la estructura del estado excitado

9

Absorption of light. Law of Lambert-Beer



$$T(\lambda) \equiv \frac{I(\lambda)}{I(\lambda)_0}$$

$$A(\lambda) \equiv -\log(T(\lambda))$$

$$A(\lambda) = \epsilon(\lambda)lc$$

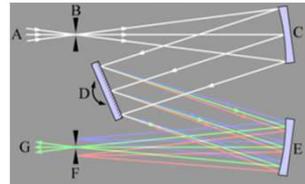
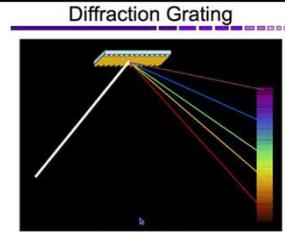
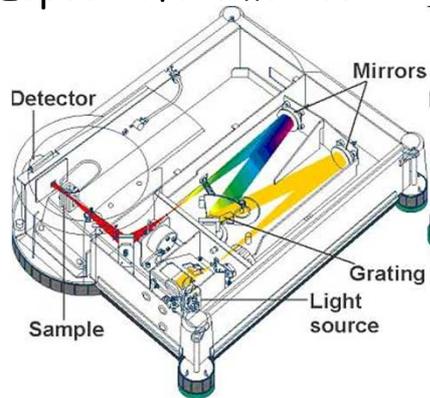
ϵ = absorption coefficient

C = concentration

Cómo se mide la absorbancia?

10

Espectrofotómetros



Monocromadores: Redes de difracción

D = red de difracción
C y E, espejos

Detectores

PMT (photomultiplier tube)

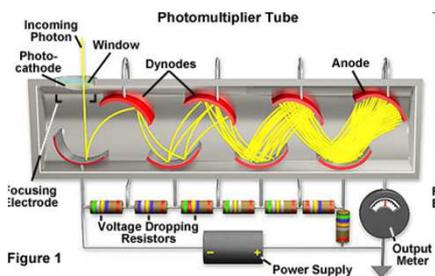
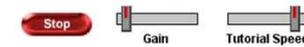
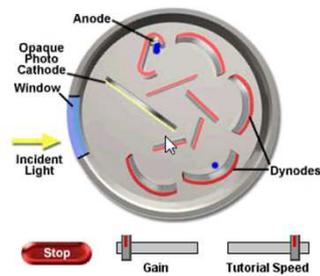
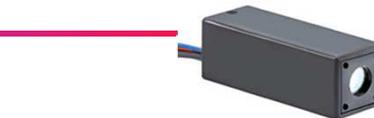
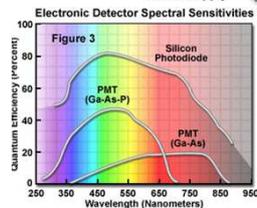
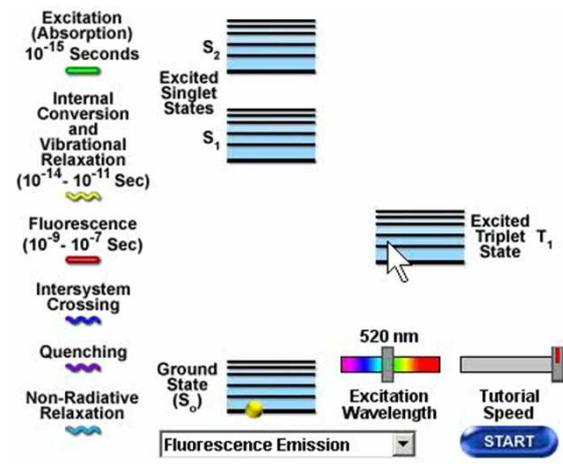


Figure 1



Fotocátodo se encuentra a -1000 a -2000 V
Los dínodos se encuentra a un potencial más positivo respecto al dínodo anterior

Fluorescencia: Diagrama de Jablonski



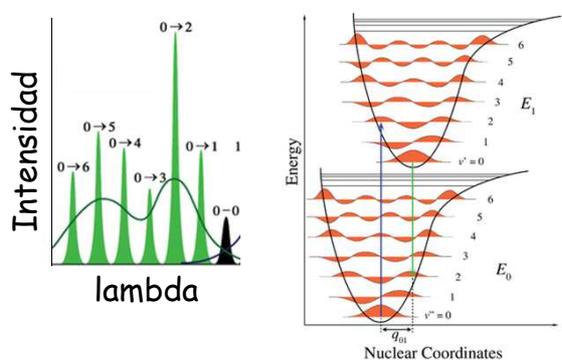
Regla de Kasha: la emisión ocurre desde $v=0$ de S_1

<http://www.olympusmicro.com/primer/java/jablonski/jabintro/index.html>¹³

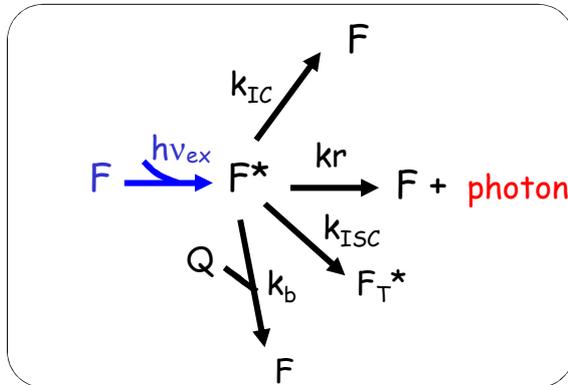
Principio de Franck-Condon

Durante las transiciones electrónicas, se puede considerar que los núcleos están fijos (transiciones verticales)

Process	Time (s)
absorption	10^{-15}
vibrational relaxation	10^{-12} - 10^{-10}



Ojo, esto no quiere decir que no haya acomodamientos de los núcleos posteriores a la transición!



Cuál es la probabilidad de emisión?



Cuánto tiempo la molécula permanece en el estado excitado?

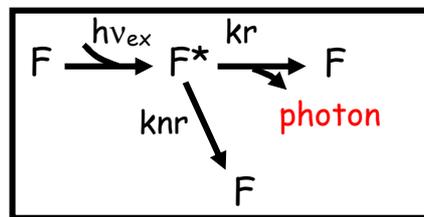
15

El rendimiento cuántico de fluorescencia (ϕ_f)

$$\phi_f \equiv \frac{\text{emitted photons}}{\text{absorbed photons}} = \frac{I_f}{I_{\text{abs}}}$$

$$I = \text{photons}/(\text{time} \cdot \text{volume})$$

A simple kinetic approach



$$\frac{d[F^*]}{dt} = I_{\text{abs}} - kr[F^*] - k_{nr}[F^*]$$

16

A simple kinetic approach: steady-state

$$\frac{d[F^*]}{dt} = I_{\text{abs}} - kr[F^*] - knr[F^*] = 0$$

$$[F^*] = \frac{I_{\text{abs}}}{kr + knr}$$

$$I_f = kr[F^*]$$

$$\Phi_f \equiv \frac{I_f}{I_{\text{abs}}} = \frac{kr}{kr + knr}$$

fluorescence
quantum yield

$$\Phi_f = 1, knr = 0$$

$$\Phi_f = 0, kr = 0$$

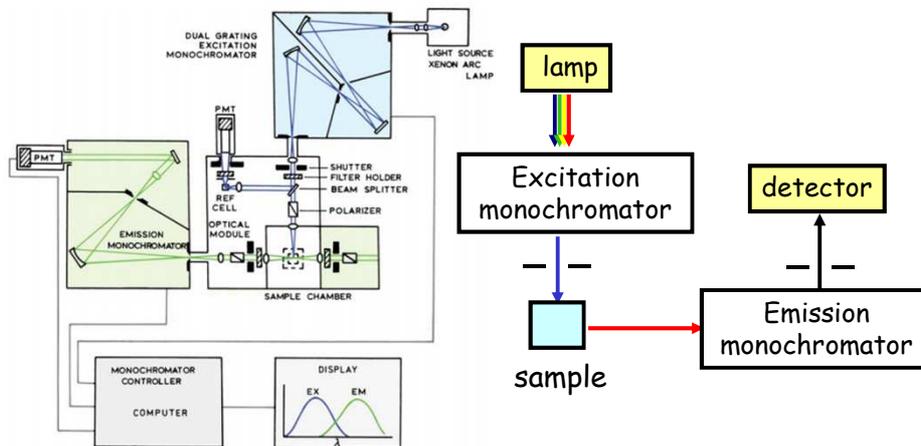
17

Characteristic times

Process	Time (s)
absorption	10^{-15}
internal conversion	10^{-11} - 10^{-9}
vibrational relaxation	10^{-12} - 10^{-10}
fluorescence	10^{-10} - 10^{-7}
Intersystem crossing	10^{-10} - 10^{-8}
phosphorescence	10^{-6} - 1

Valeur B, Molecular Fluorescence Principles and Applications (2001)₁₈

Cómo se cuantifica la Intensidad de fluorescencia?



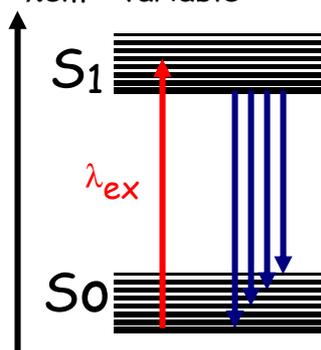
Geometría de la celda: porqué se mide (comúnmente) a 90°?

19

Espectros de emisión de fluorescencia

λ_{ex} = constante

λ_{em} = variable



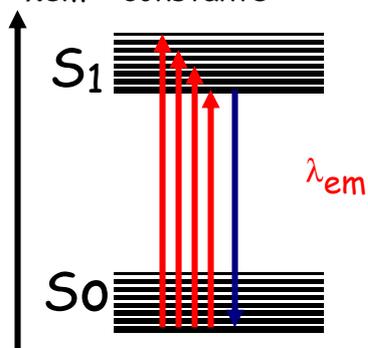
El espectro de emisión da información sobre la estructura vibracional de S_0

Pregunta: qué cambios esperan en el espectro de emisión al variar λ_{ex} ?

20

Espectros de excitación de fluorescencia

λ_{ex} = variable
 λ_{em} = constante



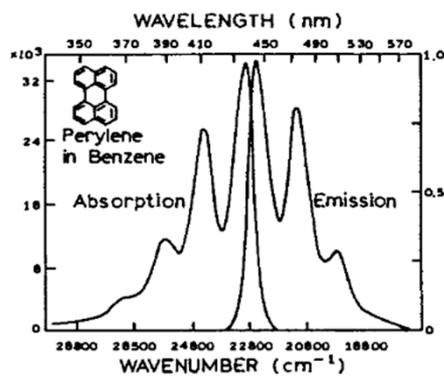
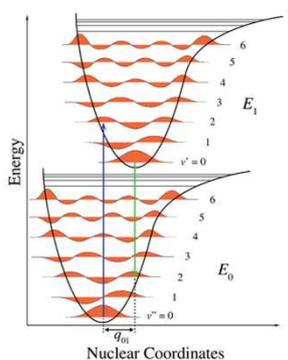
El espectro de excitación da información sobre la estructura vibracional de S₁

Que diferencia hay entre espectros de absorción y de excitación?

21

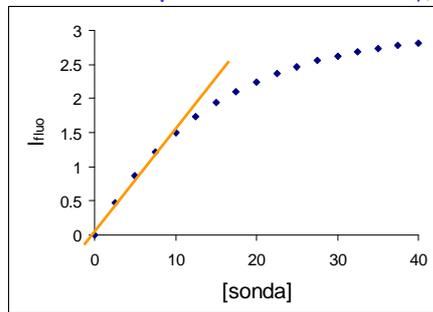
Regla de la imagen especular

La estructura vibracional del estado excitado es similar a la del estado fundamental: los espectros de excitación y emisión son imágenes especulares.



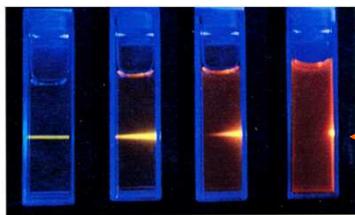
22

Cual es la dependencia de la $I_{\text{fluorescencia}}$ con la concentración?



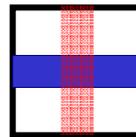
Ejercicio: deducir que $I_{\text{fluo}} = \text{cte} * (1 - 10^{-\epsilon l c})$

además...



[Rodamina B]

luz de excitación



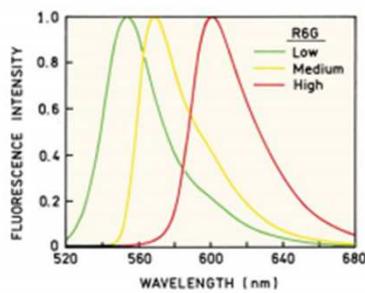
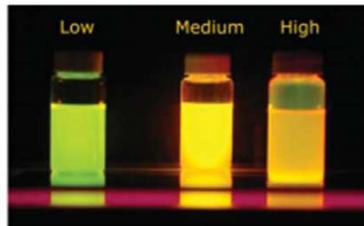
filtro interno de excitación

filtro interno de emisión (reabsorción de fluorescencia)

23

Jameson et al Methods Enzymol (2003)

Puede haber efectos más raros al variar la [sonda]

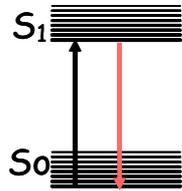


qué está pasando?

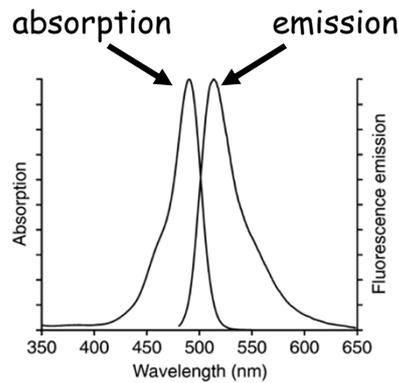
Figure 2.49. Effect of concentrations on the color and emission spectra of rhodamine 6G. The concentrations of R6G are 5×10^{-6} , 1.6×10^{-5} , and 5.7×10^{-5} M. From [64].

24

Corrimiento de Stokes

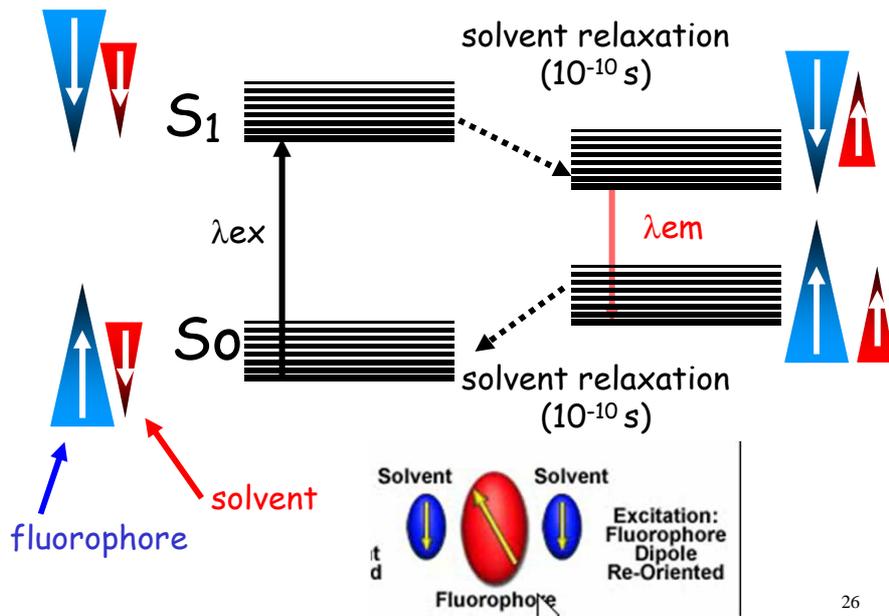


We would expect $\lambda_{ex} = \lambda_{em}$ for $S_0(v=0) \rightarrow S_1(v=0)$ but...



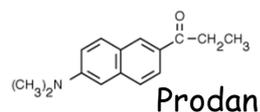
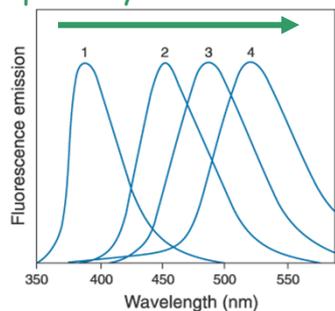
fluorescein, www.probes.com

Efectos del solvente: corrimiento de Stokes



Corrimiento de Stokes

polarity of the solvent



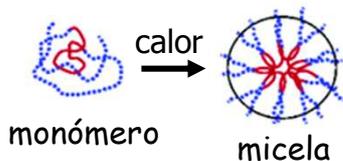
Weber and Farris, Biochemistry (1979)

λ_{em} is related to the environment of the fluorophore

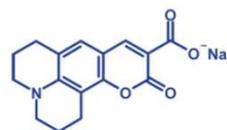
27

Ejercicio:

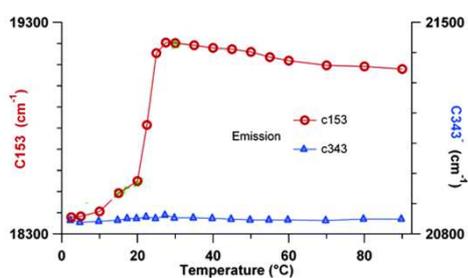
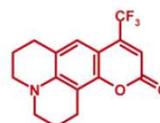
Explicar los cambios observados en el espectro de fluorescencia de las sondas C153, C343 observados durante la transición monómero \rightarrow micela de soluciones del polímero F88.



coumarin 343/Na⁺



coumarin 153



29

Grant et al. Langmuir, 2005

Corrimiento de Stokes

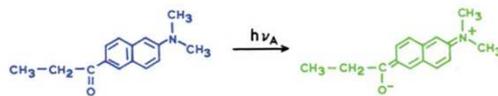
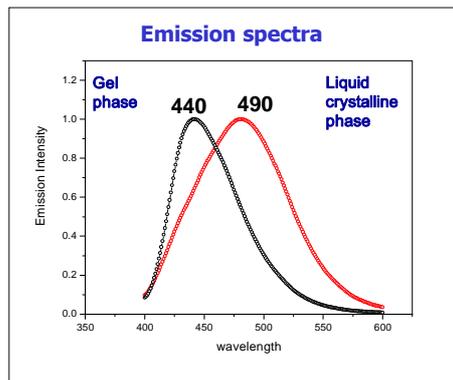
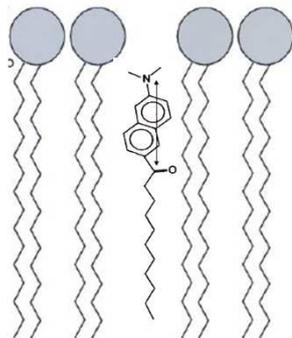


Figure 6.21. Charge separation in the excited state of Prodan (6-propionyl-2-(dimethylamino) naphthalene).



Weber, G. and Farris, F. J. *Biochemistry*, 18, 3075-3078 (1979).

30

Corrimiento de Stokes

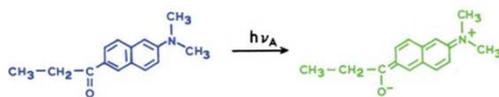
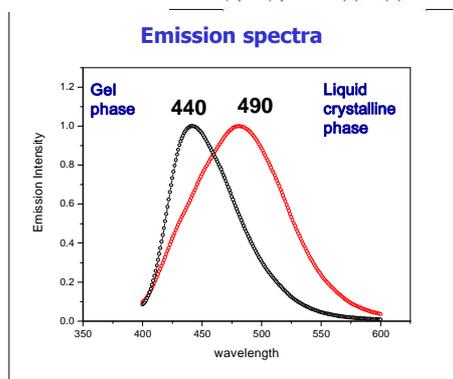
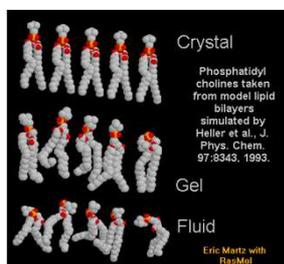
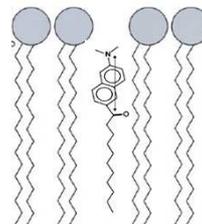


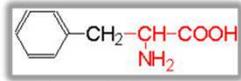
Figure 6.21. Charge separation in the excited state of Prodan (6-propionyl-2-(dimethylamino) naphthalene).



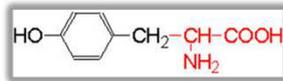
Weber, G. and Farris, F. J. *Biochemistry*, 18, 3075-3078 (1979).

31

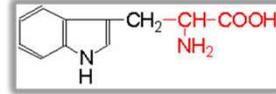
Naturally Occurring Fluorophores Aromatic Amino Acids



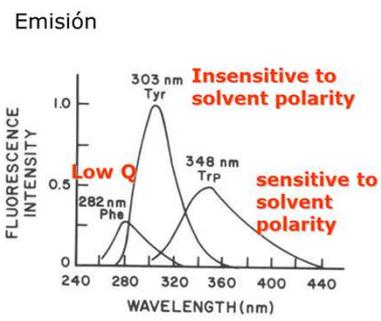
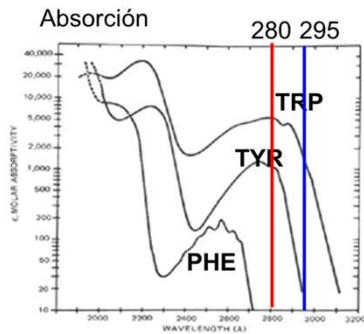
Phenylalanine



Tyrosine



Tryptophan

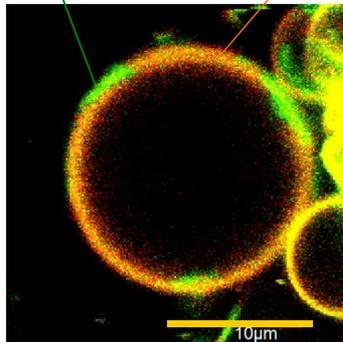


6

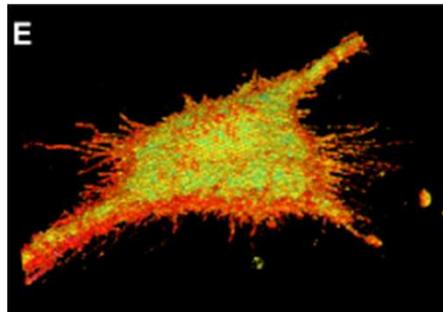
Sondas para estudiar biomembranas

emisión
al azul

emisión
al rojo



vesículas con 2
fosfolípidos distintos

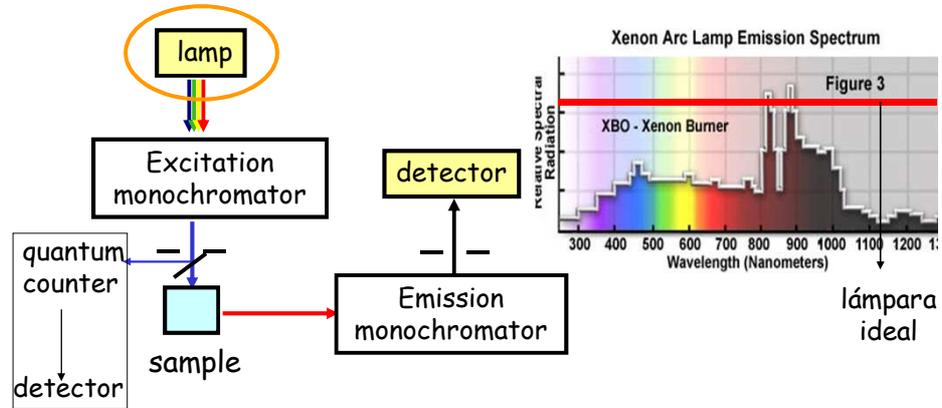


células (reconstrucción 3D
de imágenes confocales)

Dodes, JLR 2012

33

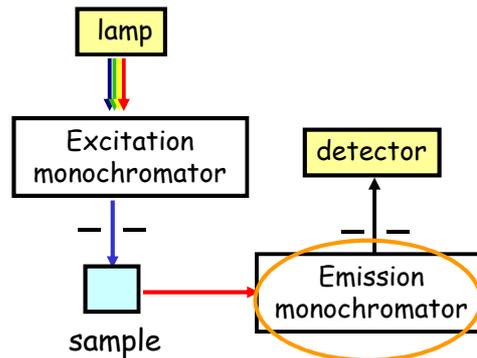
Correcciones instrumentales: Espectro de excitación



- Hay que medir a cada λ los fotones irradiados por la lámpara:
- 1) contador de fotones (sc. concentrada de fluoróforo de $\phi \cong 1$ en celda triangular o fotodiodo)
 - 2) corrección midiendo espectros de sustancias patrón (no hay problemas con la geometría de la celda)

34

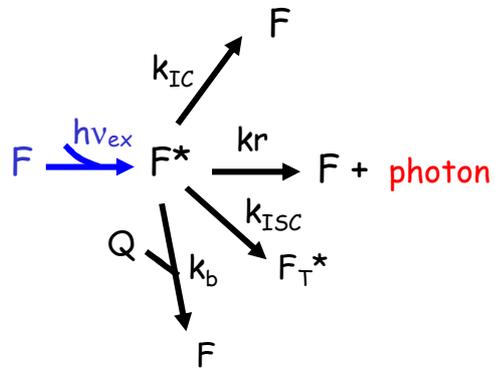
Correcciones instrumentales: Espectro de emisión



Se corrige comparando la emisión de una lámpara de tungsteno (hidrógeno o deuterio, para UV) con la registrada por el detector (se pone un espejito en el portacubeta)

35

Tiempo de vida



How long the molecule stays in the excited state?

36

How long the molecule stays in the excited state?

$$\frac{d[F^*]}{dt} = I_{abs} - kr[F^*] - knr[F^*]$$

$$[F^*] = [F^*]_0 e^{-(kr+knr)t}$$

$$[F^*] = [F^*]_0 e^{-t/\tau}$$

$$I_f = kr[F^*] = I_0 e^{-t/\tau}$$

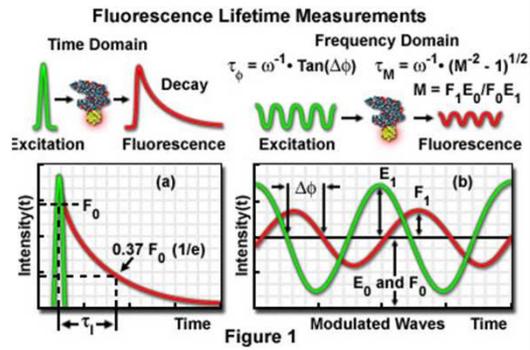
tiempo de vida
del estado
excitado

$$\tau = 1/(kr+knr)$$

37

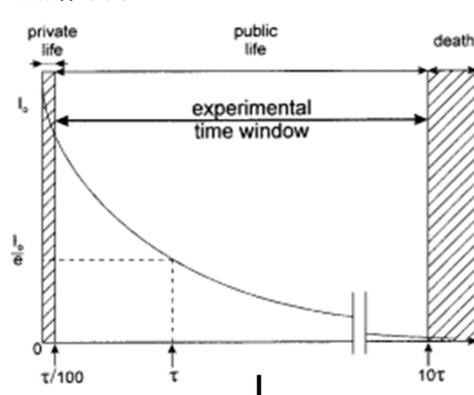
Algunos tiempos de vida

Fluorophore	Lifetime [ns]
ATTO 655	3.6
Acridine Orange	2.0
Alexa Fluor 488	4.1
Alexa Fluor 647	1.0
BODIPY FL	5.7
Coumarin 6	2.5
CY3B	2.8
CY3	0.3
CY5	1.0
Fluorescein	4.0
Oregon Green 488	4.1
Ru(bpy) ₂ (dcbpy) [PF ₆] ₂	375
Pyrene	> 100
Indocyanine Green	0.52
Rhodamine B	1.68



38

τ es uno de los parámetros más importantes en fluorescencia porque define la ventana temporal de observación de fenómenos dinámicos



cualquier fenómeno que ocurra en este rango temporal y cambia alguna propiedad de la fluorescencia podrá ser detectado (clase siguiente, anisotropía de fluorescencia³⁹)

La importancia de τ

$$\tau = 1/(kr+k_{nr})$$

Dos fluoróforos idénticos en distinto entorno pueden diferenciarse por tener distinto τ

Process	Time (s)
absorption	10^{-15}
internal conversion	10^{-11} - 10^{-9}
vibrational relaxation	10^{-12} - 10^{-10}
fluorescence	10^{-10} - 10^{-7}
Intersystem crossing	10^{-10} - 10^{-8}
phosphorescence	10^{-6} - 1

40

La importancia de τ

$$I_f = kr[F^*] = I_0 e^{-t/\tau}$$

Generalmente el decaimiento no es monoexponencial (porque?), en esos casos:

$$I_f = \sum I_i e^{-t/\tau_i}$$

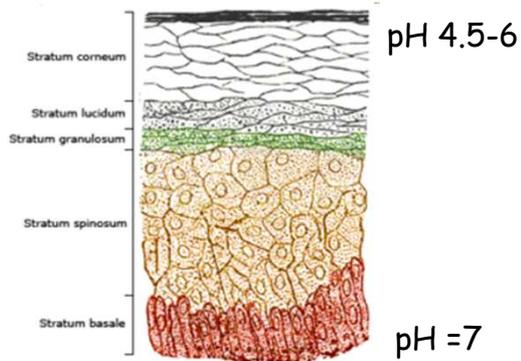
$$\langle t \rangle = \frac{\int_0^{\infty} t I(t) dt}{\int_0^{\infty} I(t) dt}$$

$\langle t \rangle = \tau$ para decaimiento monoexponencial

41

El tiempo de vida es un parámetro de gran importancia en microscopía

Ejemplo: Determinación de la "distribución" de pH del stratum corneum

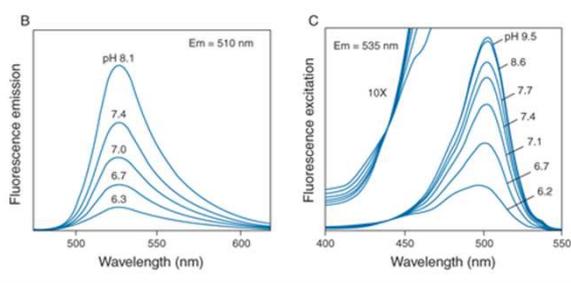


la piel en wikipedia

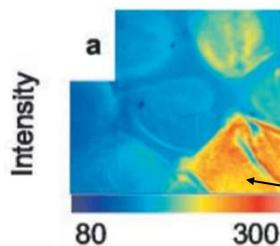
- 1) Cuales son los mecanismos que mantienen este gradiente de pH?
- 2) el pH es homogéneo en cada capa?

42

Podemos usar sonda con propiedades que varíen con el pH (clase sondas)



sonda: BCECF

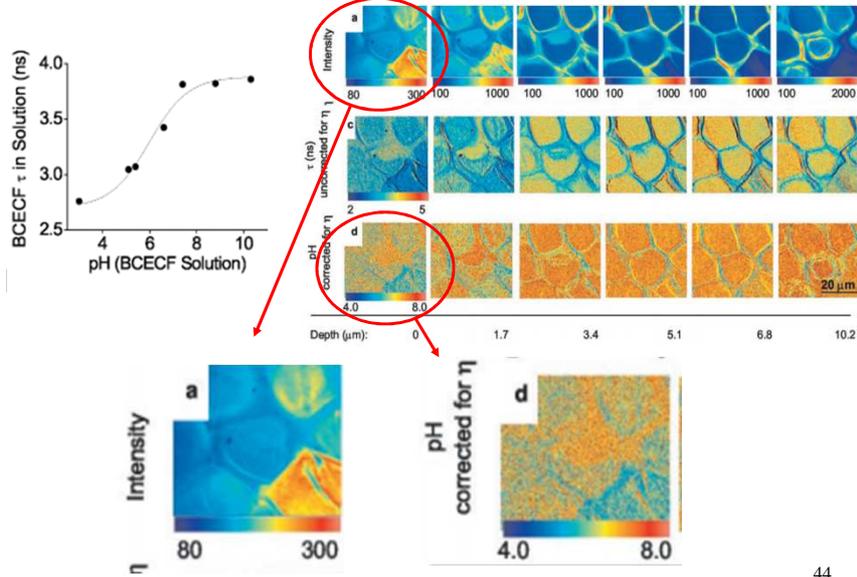


pH mayor? pero...la sonda se distribuye homogéneamente?

43

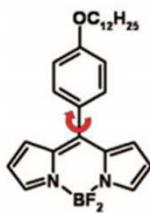
Hanson et al (Biophys J 2002)

El tiempo de vida también cambia con el pH (y es independiente de la concentración)



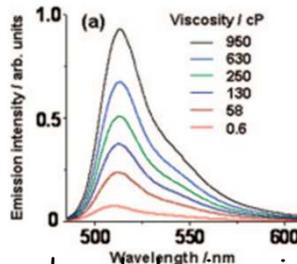
44
Hanson et al (Biophys J 2002)

Integrando algunos conceptos: medición de la microviscosidad de la célula con un rotor molecular

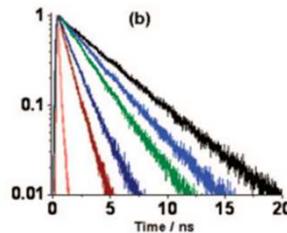


4,4'-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (el rotor)

1) Depende el ϕ_{fluor} de la viscosidad?



2) Depende τ de la viscosidad?



Kuimova y col, (JACS 2008)

Medición de la microviscosidad de la célula con un rotor molecular

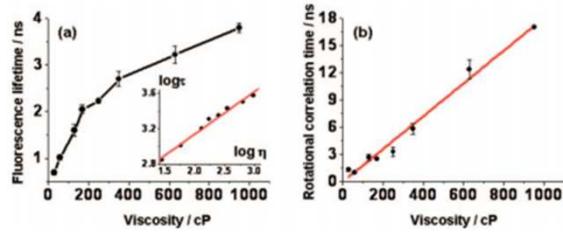


Figure 2. The changes of fluorescence lifetime (a) and rotational correlation time (b) for 1 as a function of viscosity.

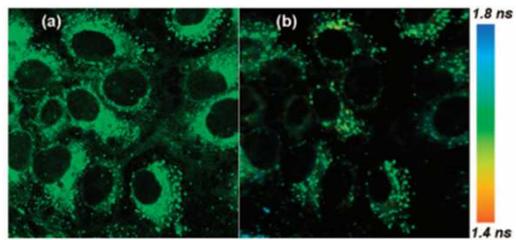


Figure 3. (a) Confocal fluorescence image ($114 \times 114 \mu\text{m}$) obtained following 488 nm excitation, $550 \pm 25 \text{ nm}$ fluorescence detection from SK-OV-3 cells incubated with $1 \mu\text{M}$ solution of 1; (b) FLIM image obtained following 467 nm pulsed excitation of the same layer of cells.