

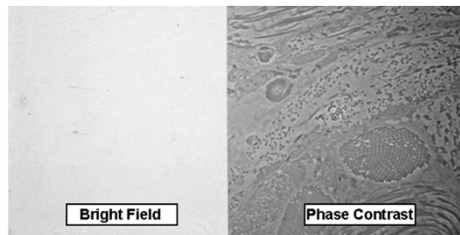
Microscopía de fluorescencia

Sondas fluorescentes para microscopía

Bibliografía:

Light and video microscopy. Randy Wayne. Capítulos 4, 6 y 11
(los capítulos 2 y 3 para repasar óptica)
<http://www.olympusmicro.com/>

Introducción: Microscopía de campo claro



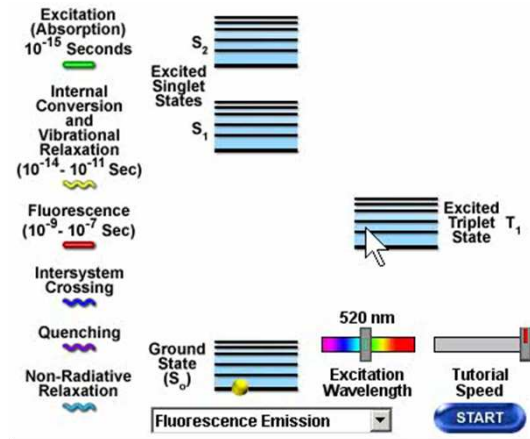
$$\text{contraste} = (I_m - I_b) / I_b$$

I_b = intensidad del fondo

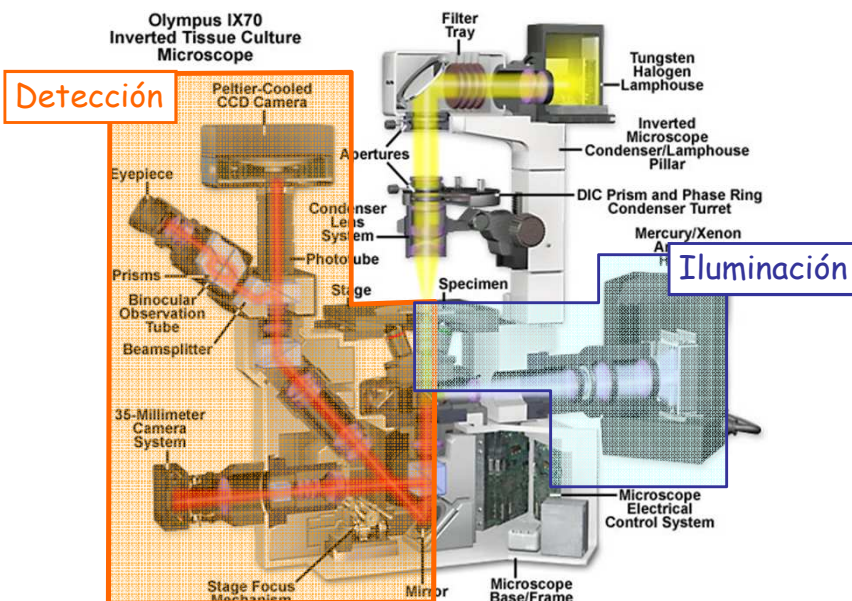
I_m = intensidad de la muestra

Cómo podemos generar contraste para ver específicamente una molécula en estudio?

Introducción: Fluorescencia



Microscopía de fluorescencia por epiiluminación



Iluminación

Lámparas de arco de mercurio



Figure 1

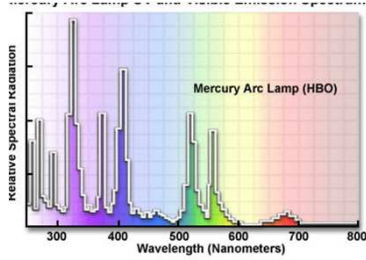
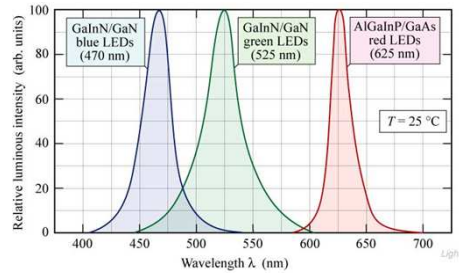


Figure 2

- caros
- rango amplio de λ
- baja duración

LEDs (light emitting diodes)



- baratos
- rango estrecho de λ (salvo LEDs blancos)
- alta duración
- potencia ?

Separando luz de excitación de luz de emisión

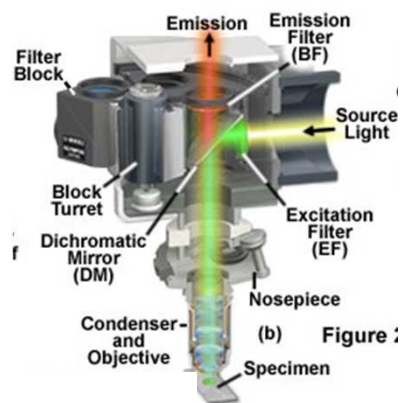
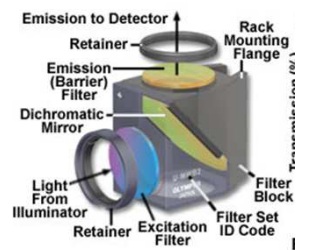
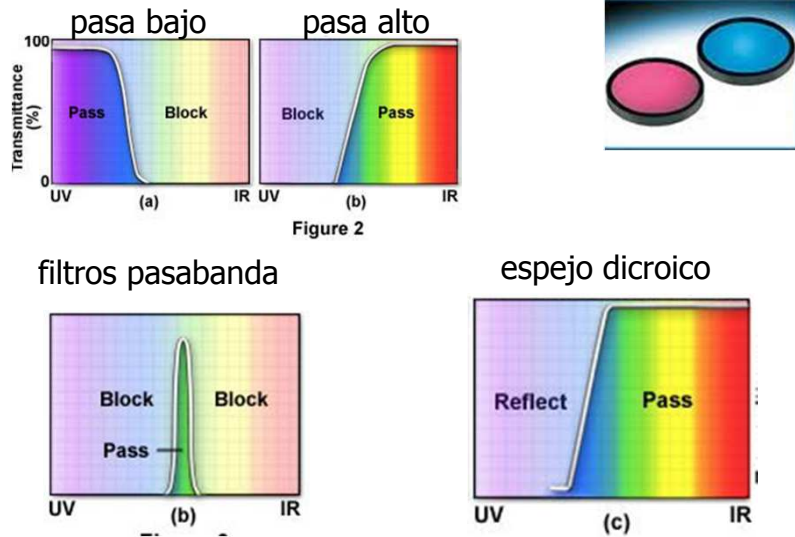


Figure :

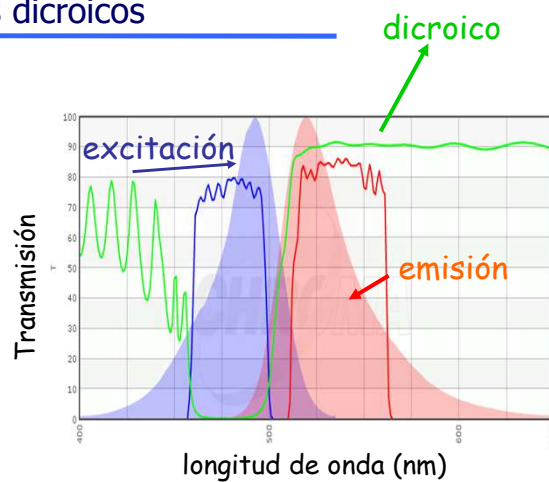


"cubo" de fluorescencia

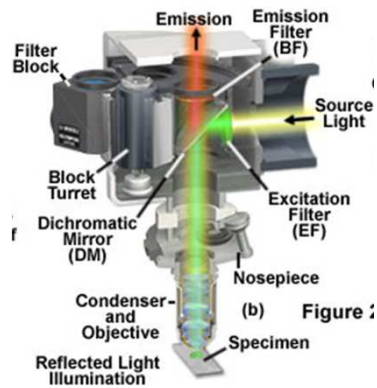
Separando luz de excitación de luz de emisión: filtros y espejos dicróicos



Separando luz de excitación de luz de emisión: filtros y espejos dicróicos



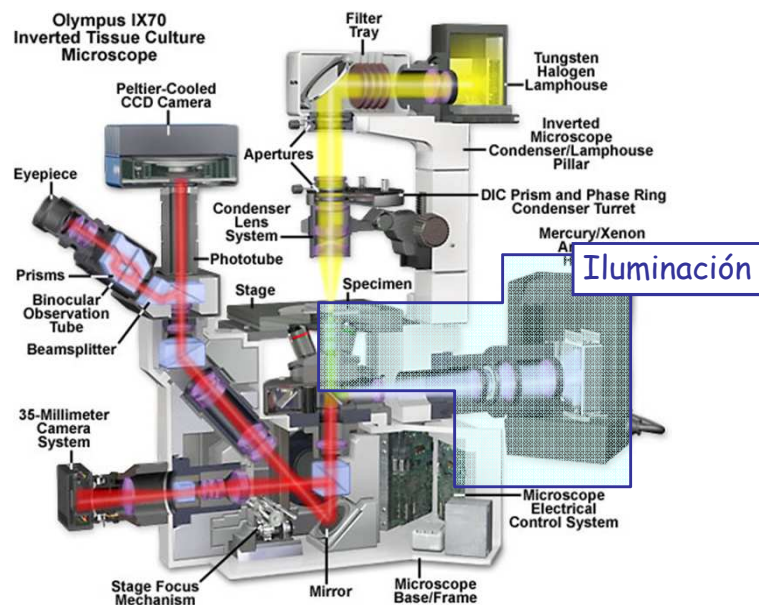
La función del objetivo en epiiluminación



El objetivo cumple doble función: ilumina la muestra y colecta la fluorescencia

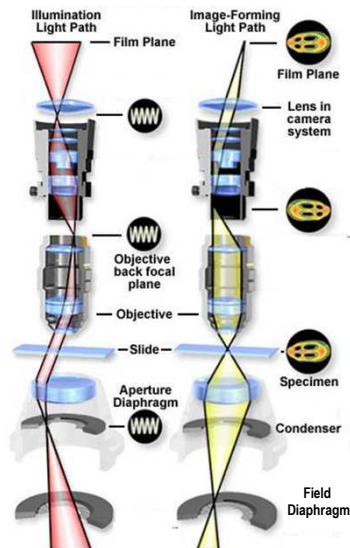
Resolución: $0.61 \lambda / NA$

Microscopía de fluorescencia por epiiluminación



Iluminación de Kohler en epiiluminación

Campo claro



Fluorescencia por epiiluminación

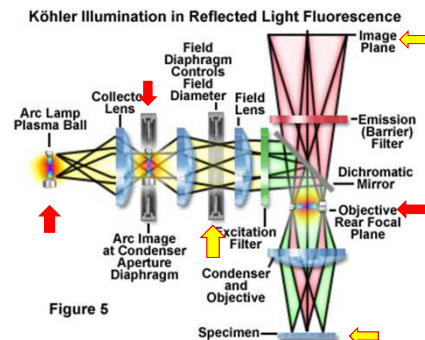


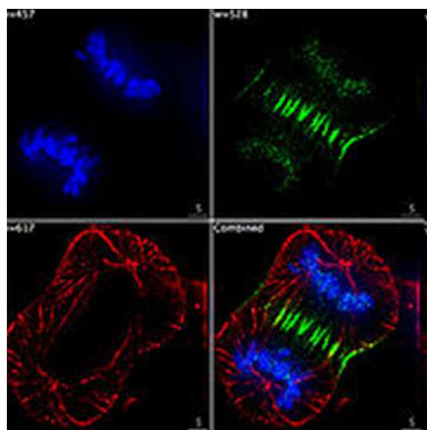
Figure 5

→ image-forming light path (conjugated planes)

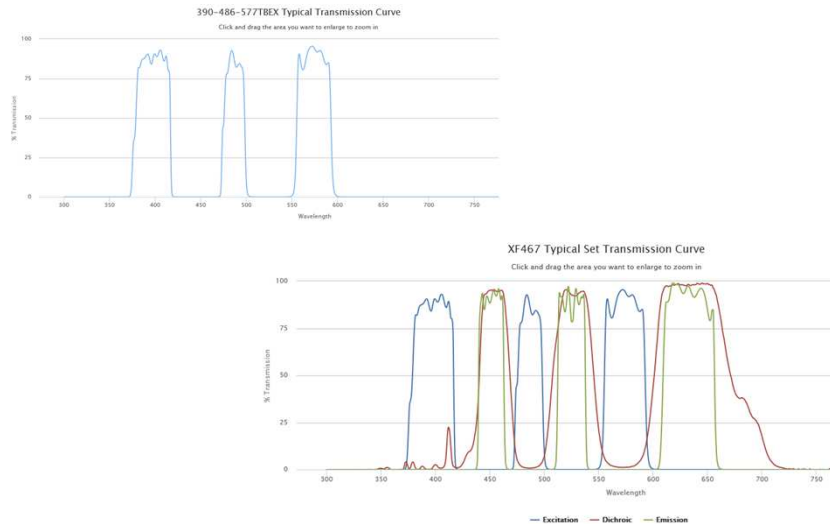
→ illumination light path (conjugated planes)

Microscopía de fluorescencia: un color, muchos colores.

Cómo medir la fluorescencia de sondas distintas?



Observando múltiples sondas al mismo tiempo Espejos dicroicos/ filtros multibandas + cámara color



Desventaja: no es cuantitativa

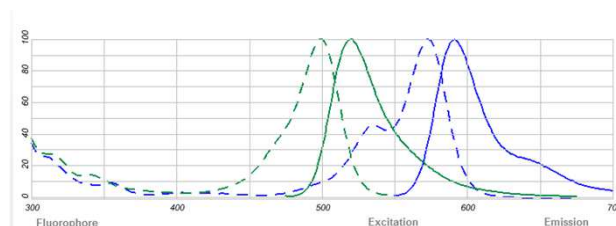
Observando múltiples sondas secuencialmente

Se quiere observar una muestra de células en la cual se han marcado dos proteínas utilizando fluoróforos distintos, uno que emite en el rojo (Rodamina-red, líneas azules) y otro que emite en el verde (Alexa488, líneas verdes).

Para observarlos, se utiliza un microscopio con los cubos de fluorescencia que se detallan en la tabla adjunta.

Determinar si es posible hacer la observación de cada una de las proteínas por separado y, en caso negativo, qué controles haría para solucionar el problema.

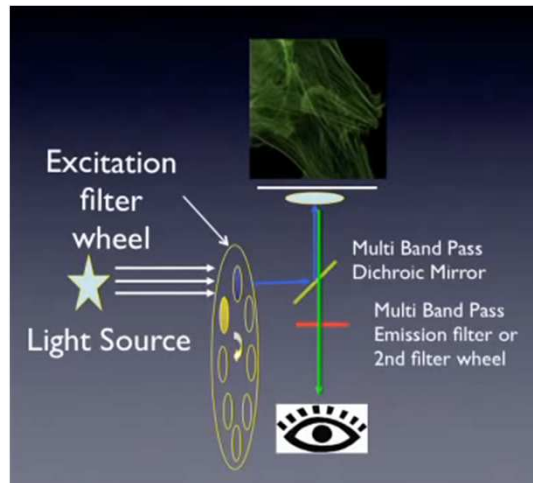
Cubo	Filtro Ex (nm)	Dicroico (nm)	Filtro pasa alto Em (nm)
1	330-380	400	420
2	400-410	450	455
3	450-490	510	520
4	510-550	570	590



Observando múltiples sondas secuencialmente Selección rápida de λ excitación

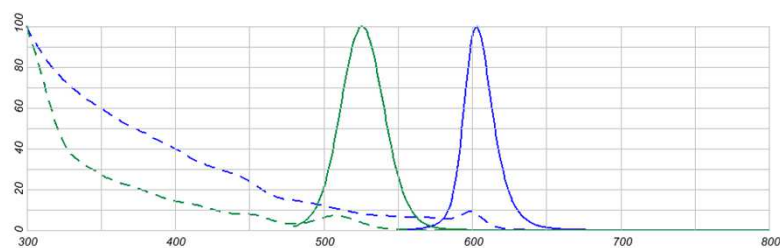


rueda de filtros

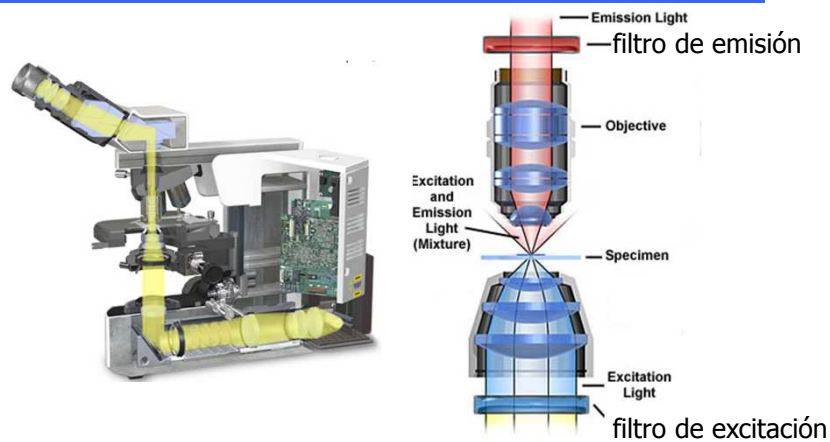


Observando múltiples sondas simultáneamente

Se tiene una muestra marcada con dos qDots y se desea observar la fluorescencia de los mismos en forma simultánea e independiente. ¿Qué modificaciones introduciría en el microscopio para lograrlo?



Microscopía de fluorescencia por transiluminación



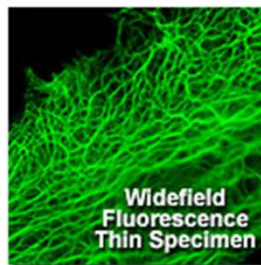
Ventaja: se puede combinar con técnicas de generación de contraste (simultáneamente)

Desventaja: mucho cuidado con la alineación, no sirve para muestras con espesor no despreciable, peor contraste

Limitaciones de microscopía de fluorescencia



Se excita y observa un volumen muy grande de la muestra: la luz de fluorescencia fuera de foco disminuye el contraste de la muestra



Cómo eliminamos la luz fuera de foco?

Sondas fluorescentes

Muchas aplicaciones, muchas sondas. Cómo decidir?

Qué biomolécula quiero marcar?

Cuál es la señal que quiero medir? Intensidad, tiempo de vida, anisotropía?

Cuál es la mayor limitación en el sistema?: Brillo, varios colores, permeabilidad, fotoestabilidad?

Clasificación completamente arbitraria (en base a la química)

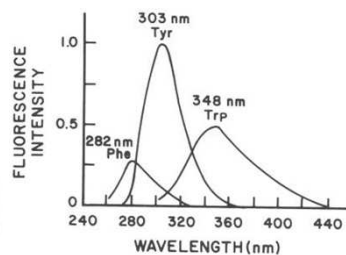
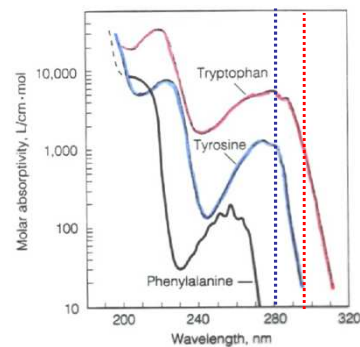
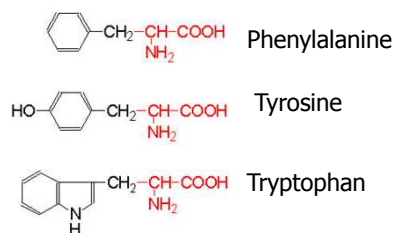
1. sondas intrínsecas
2. sondas no covalentes
3. sondas covalentes

Clasificación completamente arbitraria (en base a la biomolécula)

1. proteínas
2. ácidos nucleicos
3. lípidos

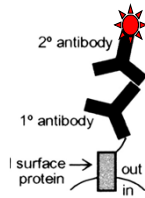
Sondas intrínsecas de proteínas

Aminoácidos aromáticos



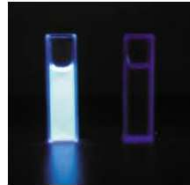
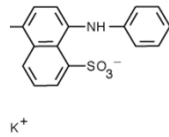
Sondas no covalentes

La sonda posee gran afinidad por la biomolécula de interés

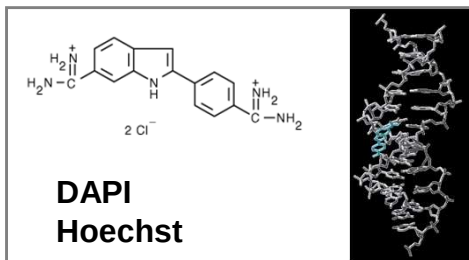


Las propiedades fotofísicas cambian al interactuar con la biomolécula de interés

1,8-ANS



Sondas no covalentes: DNA



- Atraviesan la membrana celular.
- Se unen al surco menor del DNA
- Al unirse al DNA, desplazan H₂O y aumentan el ϕ fluor 20 veces
- son citotóxicos

Sondas no covalentes: DNA

Name	Excitation	Emission	Comments
Acridine orange	500	526 (broad spectrum)	Taken up by live cells, especially acidic vesicles
Propidium iodide	536	617	Dead/fixed cells
Ethidium bromide	518	617	Dead/fixed cells, higher background
UV dyes DAPI, Hoeschst 33258	358/352	461/461	Semi-permeant/permeant
Syto dyes (Molecular Probes)	Various	Various	Cell permeant
Sytox dyes (Molecular Probes)	445/504/547 + others	470/523/570 + others	Highly impermeant

Sondas no covalentes: biomembranas

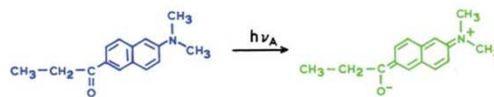
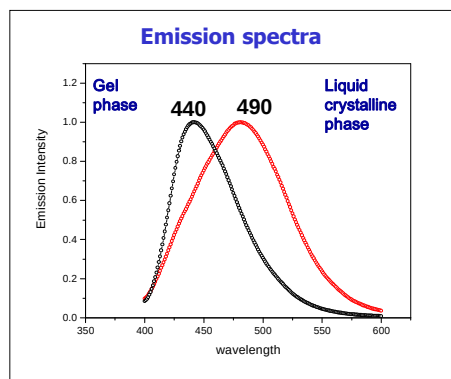
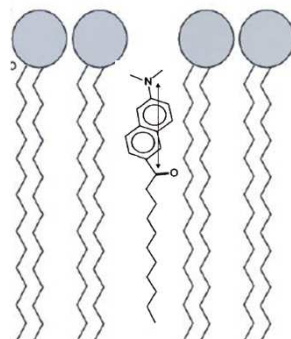


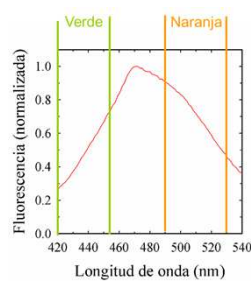
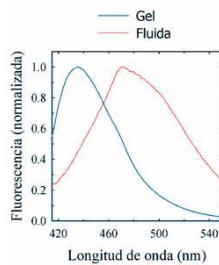
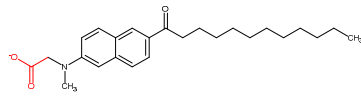
Figure 6.21. Charge separation in the excited state of Prodan (5-propionyl-2-(dimethylamino) naphthalene).



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

27

Sondas no covalentes: GP (generalized polarization)



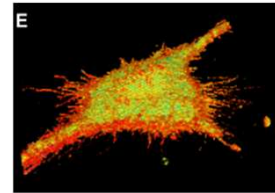
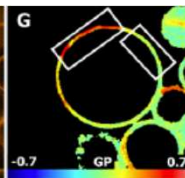
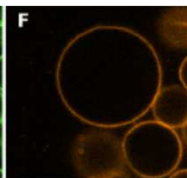
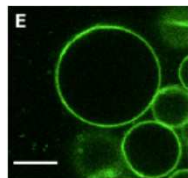
$$GP = \frac{I_{\text{verde}} - I_{\text{naranja}}}{I_{\text{verde}} + I_{\text{naranja}}}$$

canal verde

canal naranja

GP

GP en células



Dodes, JLR 2012

Sondas covalentes

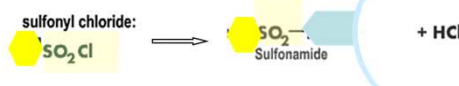
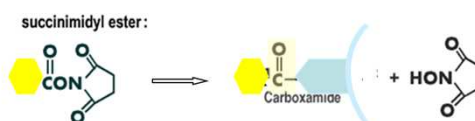
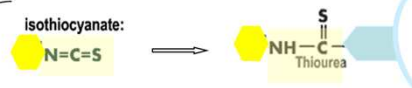
Reacciones de marcación (modifican aminos y tioles)



pH 8.5 to 9.5 for modifying lysine residues.

near neutral pH: labeling of N-terminus (pKa 7)

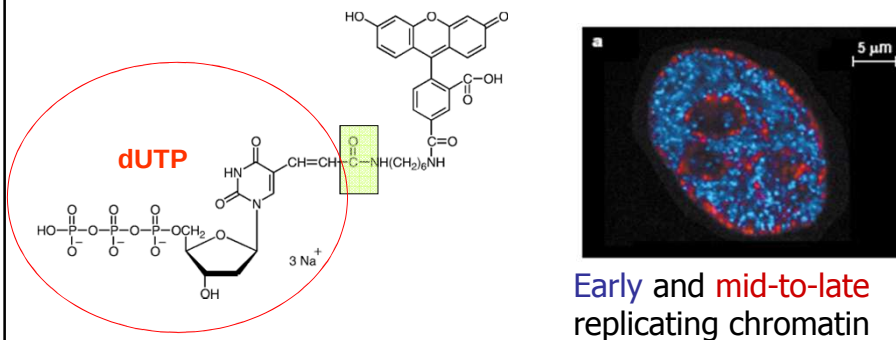
no usar buffer con aminos!



29

Sondas covalentes: Análogos de bases fluorescentes

succinimidyl-ester derivatives of fluorescent dyes

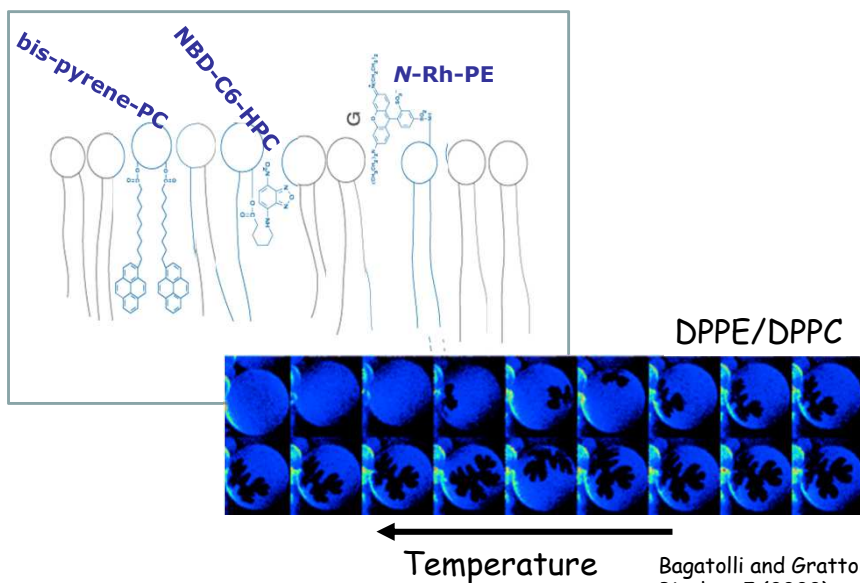


Early and mid-to-late
replicating chromatin

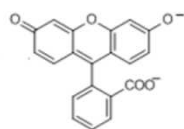
Schermelleh, L et al .
Chromosome Res. 2001

Ventaja: se pueden usar en células vivas

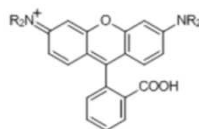
Sondas covalentes: Análogos de fosfolípidos y ácidos grasos fluorescentes



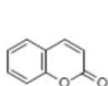
Familias de sondas fluorescentes orgánicas



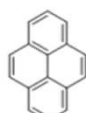
Fluorescein Type



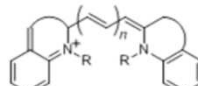
Rhodamine Type



Coumarin Type

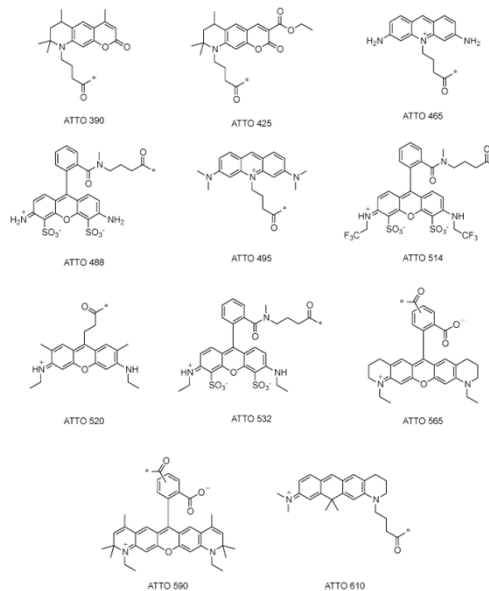


Pyrene Type

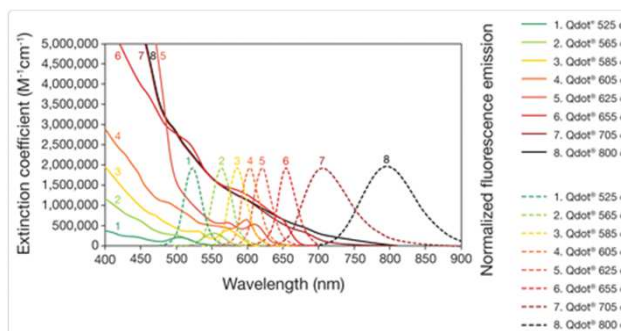
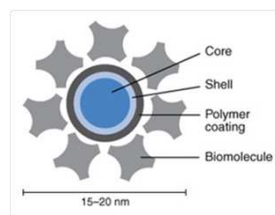


Series de sondas (los nombres dependen del fabricante)

Atto (Atto Tec-Sigma)



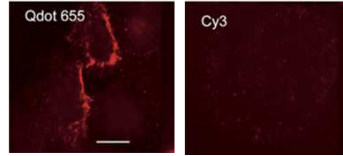
Sondas basadas en nanopartículas: Quantum dots



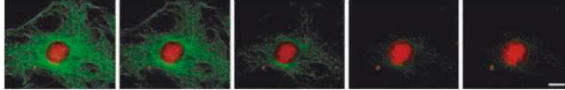
Quantum dots: ventajas y desventajas

1. Brillo (10x vs. sondas orgánicas)

Young et al, Am J Physiol 2006

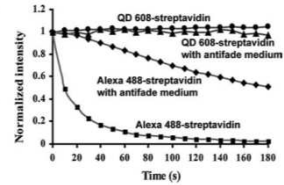


2. Fotoestabilidad (100x vs. sondas orgánicas)

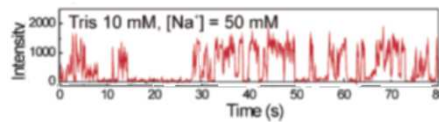


microtúbulos (sonda orgánica)
núcleo (Qdots)

Medintz et al, Nature Materials 2005



3. Desventaja: Blinking (parpadeo)



Hohng et al, JACS 2004

Review general: Resch-Genger, Nature Methods 2008

Cómo elegir la sonda fluorescente? Qué propiedades tenemos que analizar?

Espectros de excitación y emisión

Rendimiento cuántico, tiempo de vida, etc

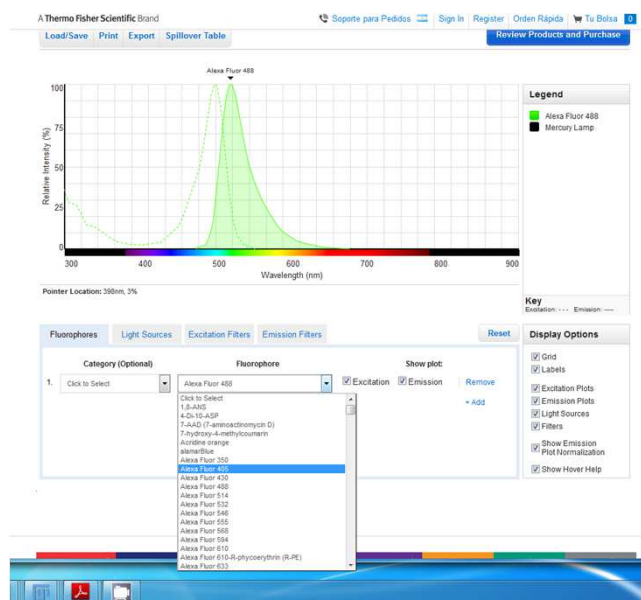
Sensibilidad al entorno

Estabilidad frente al fotoblanqueo

Toxicidad

Interacciones inespecíficas

Espectros de fluorescencia (spectra viewer)



Otras propiedades fotofísicas

Home > Technical Reference Library > The Molecular Probes® Handbook

Download print-ready PDFs of the 2010 print edition of *The Molecular Probes® Handbook*.

The Molecular Probes® Handbook

Molecular Probes® Handbook

Table of Contents

Fluorescence Fundamentals
Chapter 1—Fluorophores and Their Amine-Reactive Derivatives
Chapter 2—Thiol-Reactive Probes
Chapter 3—Click Chemistry and other Functional Group Modifications
Chapter 4—Biotin and Hapten Derivatives
Chapter 5—Crosslinking and Photoactivatable Reagents
Chapter 6—Ultrasensitive Detection Technology
Chapter 7—Antibodies, Avidins and Lectins
Chapter 8—Nucleic Acid Detection and Analysis
Chapter 9—Protein Detection and Analysis
Chapter 10—Enzyme Substrates and Assays
Chapter 11—Probes for Cytoskeletal Proteins
Chapter 12—Probes for Organelles
Chapter 13—Probes for Lipids and



11th Edition

The most complete fluorescent labeling and detection reference available, *The Molecular Probes® Handbook—A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies* contains over 3,000 technology solutions representing a wide range of biomolecular labeling and detection reagents. The significantly revised 11th Edition features extensive references, reorganized content, and new technical notes and product highlights.

Get your free copy today

Search *The Molecular Probes® Handbook*

Enter your search term to search across the entire online handbook.

Table of Contents

Fluorescence Fundamentals

Part I—Choosing a Fluorescent Label: Their Properties and Labeling Chemistries

Chapter 1 — Fluorophores and Their Amine-Reactive Derivatives
Chapter 2 — Thiol-Reactive Probes
Chapter 3 — Click Chemistry and Other Functional Group Modifications
Chapter 4 — Biotin and Hapten Derivatives
Chapter 5 — Crosslinking and Photoactivatable Reagents

Sondas incorporadas genéticamente

El descubrimiento de la GFP (green fluorescent protein)



Photo: U. Montan

Osamu Shimomura



Photo: U. Montan

Martin Chalfie



Photo: U. Montan

Roger Y. Tsien

Premio Nobel en Química 2008

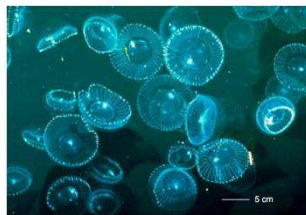
http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2008

Shimomura



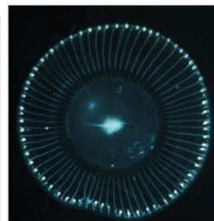
Photo: U. Montan

Osamu Shimomura



Aequorea aequorea

In Daylight



Luminescence in Dark

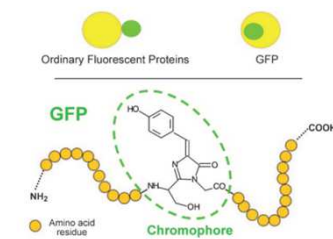
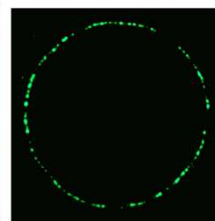


Figure 19. The structure of the chromophore in the molecules of GFP.

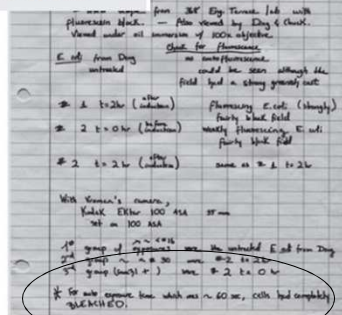
- Aisló GFP como un producto secundario de la purificación de acuorina. Para ello usó 50 000 aguavivas!
- El cromóforo no era el complejo entre una proteína y una molécula fluorescente sino que se formaba por una reacción entre 3 aminoácidos

Chalfie



Photo: U. Montan

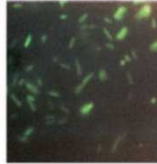
Martin Chalfie



Objetivo: usar GFP para marcar endógenamente proteínas de interés

Problema: se necesitarán otras enzimas del aguaviva para producir el grupo cromóforo?

B)



C)

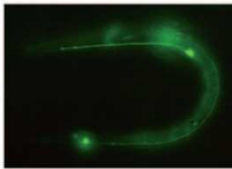


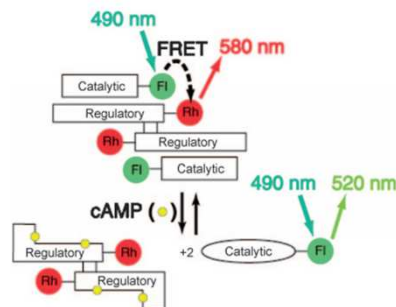
Figure 8. The cover of Science for February 11, 1994 showing GFP in *C. elegans* neurons.¹⁰ Reprinted with permission from the AAAS.

Tsien



Photo: U. Montan

Roger Y. Tsien



Objetivo: Detectar AMPc, mediante FRET utilizando PKA

Marcaciones con sondas químicas hacían que PKA perdiese actividad.

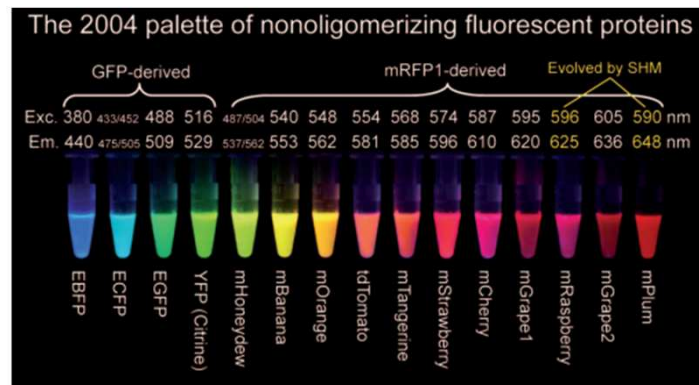
Problema: sólo existía GFP, para FRET se necesitan 2 colores.

Solución

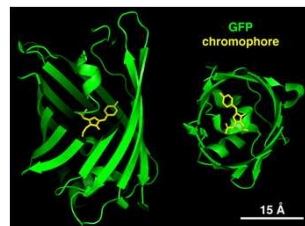
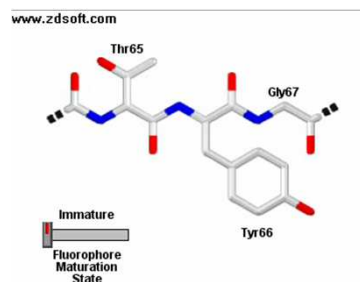
Mutaciones random (no se conocía la estructura) dio lugar a cyan, entre otras. Una vez que se conoció la estructura, se pudo racionalizar mutaciones: poniendo un anillo aromático cerca del fluoróforo corrió la lambda al rojo: YFP



Photo: U. Montan
Roger Y. Tsien



Cómo es la estructura de la GFP?

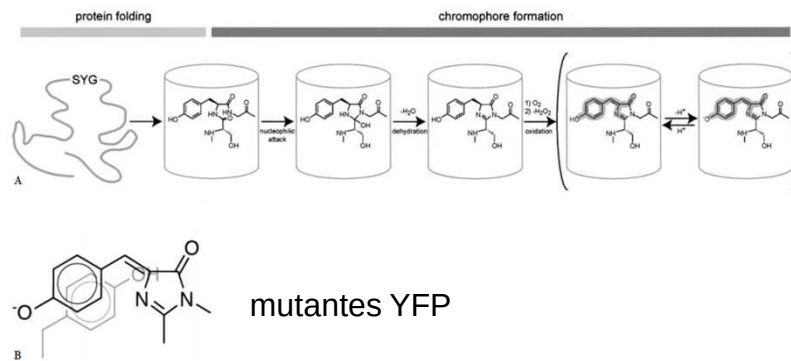


- β -barrel structure, with chromophore housed within the barrel.

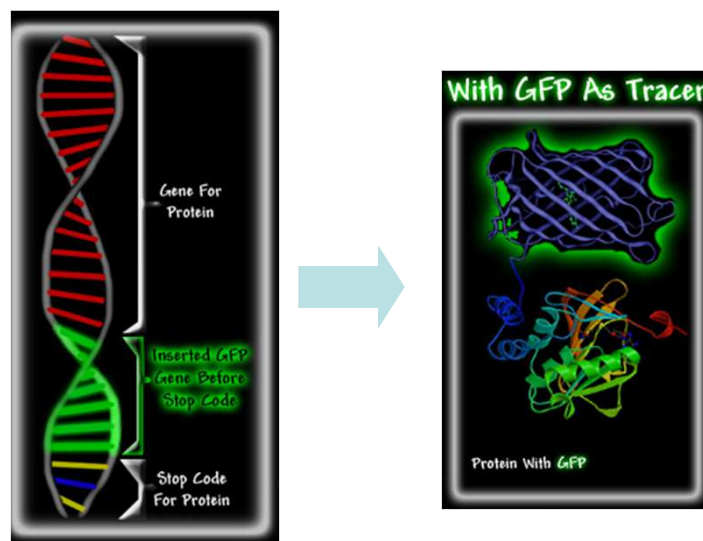
- El cromóforo se forma espontáneamente (*from Serine-65, Tyrosine-66, Glycine-67*) sin la necesidad de la maquinaria celular. Se libera H_2O_2 durante la síntesis
- 27 kDa

Tsien (Annual Review Biochem 1998)

Cómo es la estructura de la GFP?

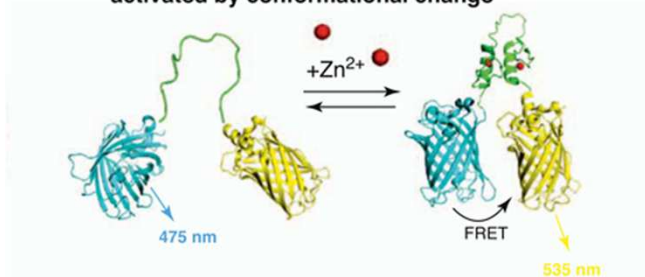


It is possible to insert the gene for GFP into cells and use the resulting protein as a reporter for a variety of applications.



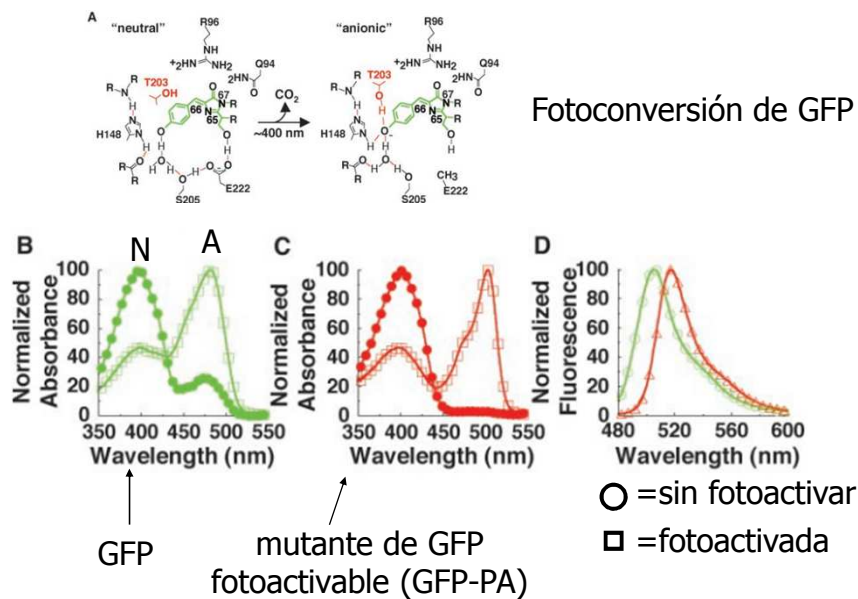
Biosensores basados en la tecnología de GFP

(d) FRET-based sensor:
activated by conformational change



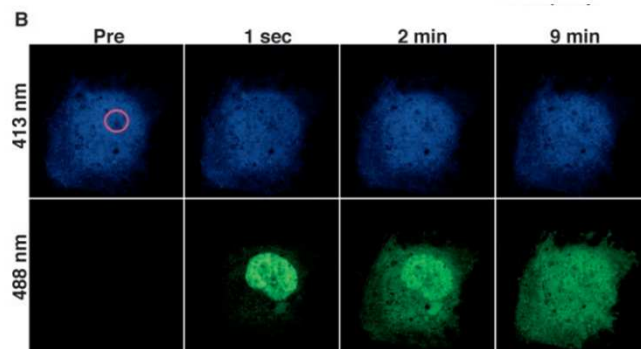
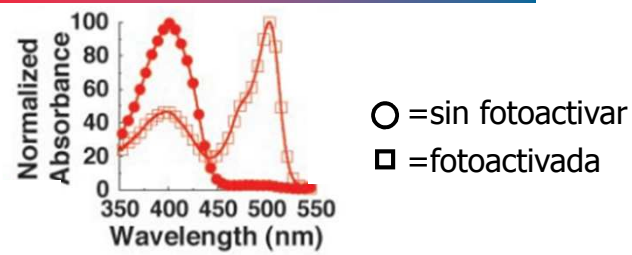
Relatively recent review: Palmer et al, Trends Biotechnol. 2011

Variantes fotoactivables/fotoswitchables de GFP



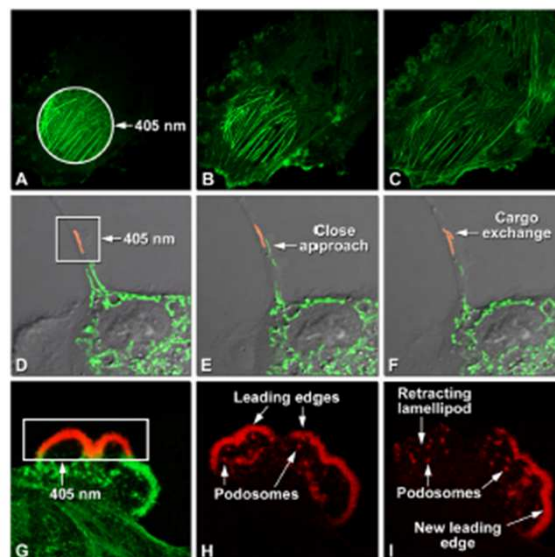
Patterson et al Science, 2002

Fotoactivación



Patterson et al Science, 2002

Aplicaciones



Shanner J Cell Sci 2007

Cómo elegir la proteína fluorescente que me conviene?

REVIEW ARTICLE

PUBLISHED ONLINE: 17 JUNE 2014 | DOI: 10.1038/NCHEMBIO.1556

nature
chemical biology

Advances in fluorescence labeling strategies for dynamic cellular imaging

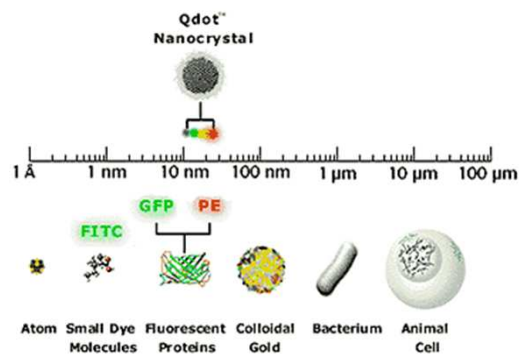
Kevin M Dean^{1,2} & Amy E Palmer^{1,2*}

Table 1 | Photophysical properties of some leading FPs.

FP	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	ϕ Fl	Brightness (nm) ^a	λ_{exc}/FP (nm) ^b	λ_{em} (nm) ^b	λ_{em} (nm) ^b	pK _a ^c
Constitutively fluorescent							
Sirius	15,000	0.24	4	–	355	424	<3.0
TagBFP2	50,600	0.64	35	–	399	454	2.7
mCerulean3	40,000	0.87	34	–	434	474	3.2
mTurquoise2	30,000	0.93	30	–	434	474	4.5
ECFP	32,500	0.4	14	–	434	477	4.7
EGFP	55,000	0.6	36	–	489	509	5.9
T-Sapphire	44,000	0.6	28	–	399	511	4.9
Clover	111,000	0.76	91	–	505	515	6.2
mNeonGreen	116,000	0.8	100	–	506	517	6.7

2014

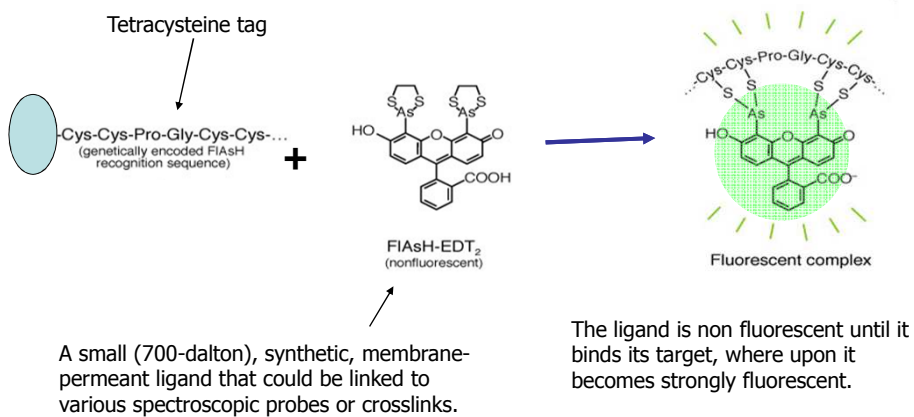
Tamaños de las sondas



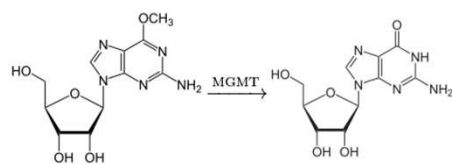
Limitaciones proteínas fluorescentes:

- Tamaño (60 kDa)
- Propiedades fotofísicas limitada por la genética (y generalmente peores que las de las sondas orgánicas)

Otras estrategias de marcación de proteínas in situ: FIAsh



Otras estrategias de marcación de proteínas in situ: Snap tag y derivados



DNA repair protein O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase (MGMT)

SNAP-tag: 20 kDa mutant of MGMT that reacts specifically and rapidly with benzylguanine (BG) derivatives

