

Fundamentos de la microscopía de fluorescencia

*Andrés Esteban Cantos y Covadonga Alonso Martí
Laboratorio de Interacción virus-célula
Departamento de Biotecnología del INIA*



MINISTERIO
DE ECONOMÍA, INDUSTRIA
Y COMPETITIVIDAD



1) La fluorescencia y sus propiedades

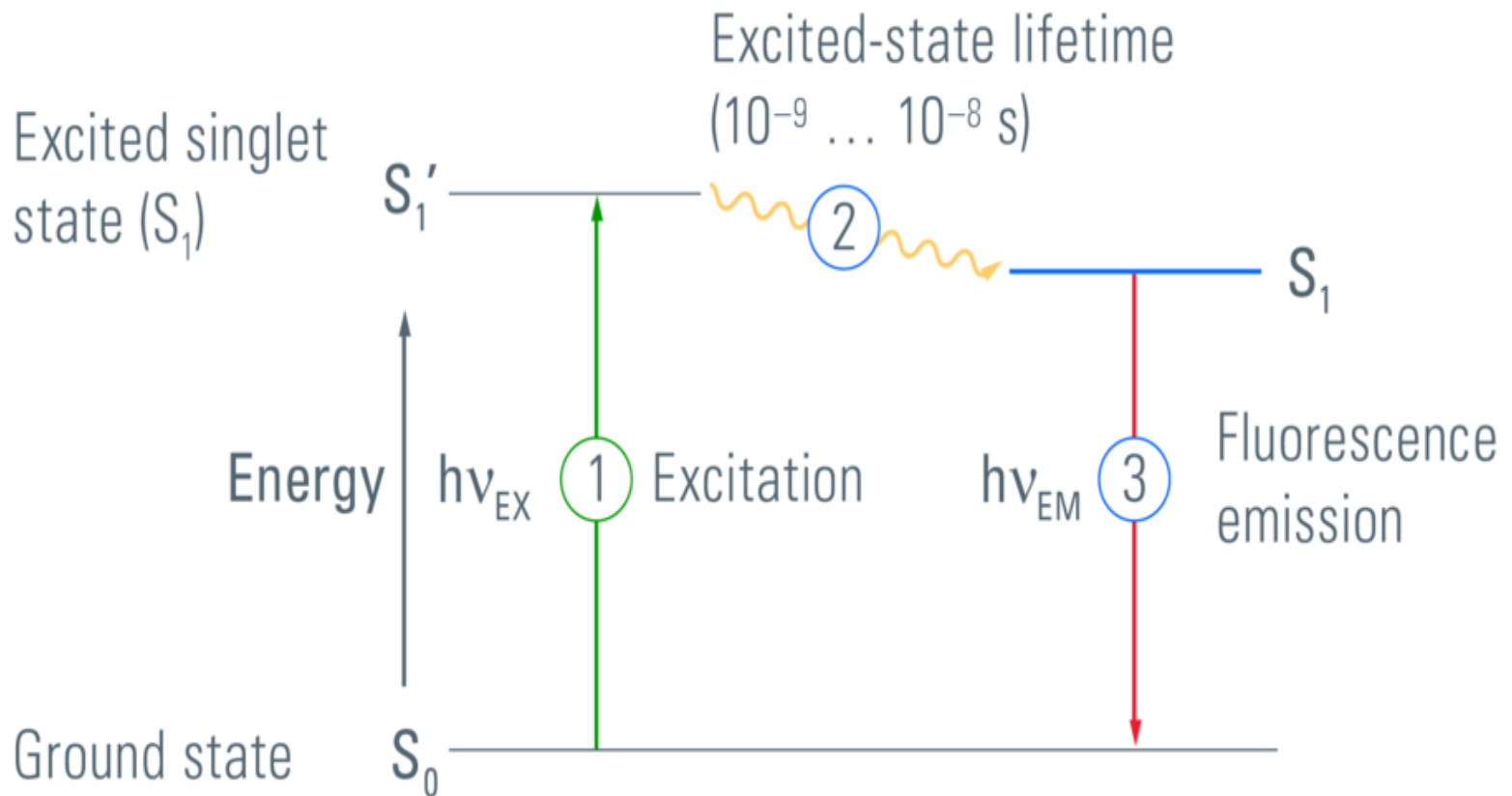
¿Qué es la fluorescencia?



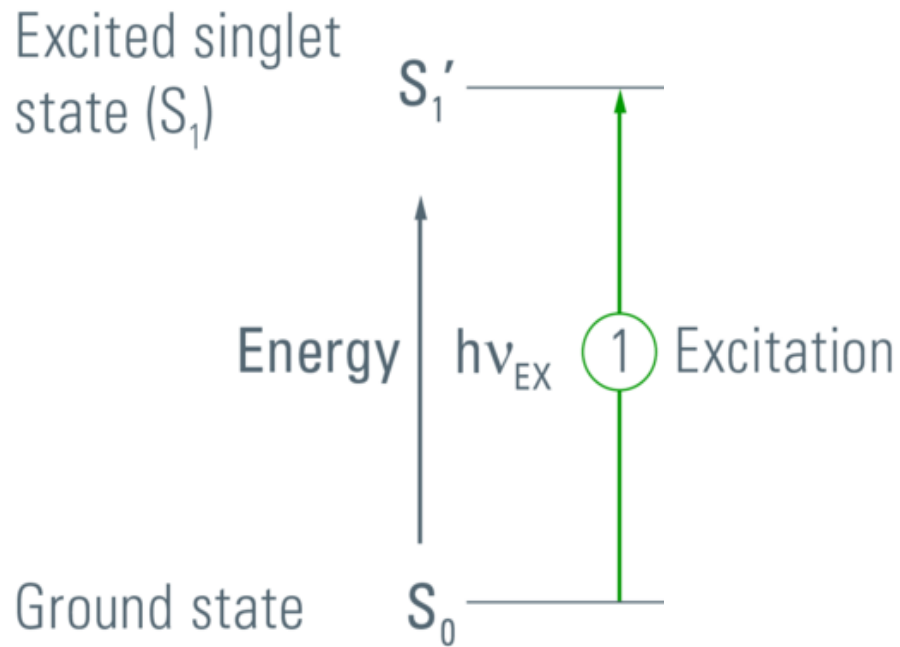
Es un fenómeno físico por el cual ciertas moléculas (fluorocromos) emiten luminiscencia tras ser excitadas previamente por un haz de luz de una determinada longitud de onda (λ)

En base a esto, la **microscopía de fluorescencia** es una herramienta de gran utilidad científica que utiliza la fluorescencia para la visualización y el estudio de la localización celular de estructuras biológicas que han sido previamente etiquetadas con fluorocromos

Fundamento de la fluorescencia: diagrama de Jablonski

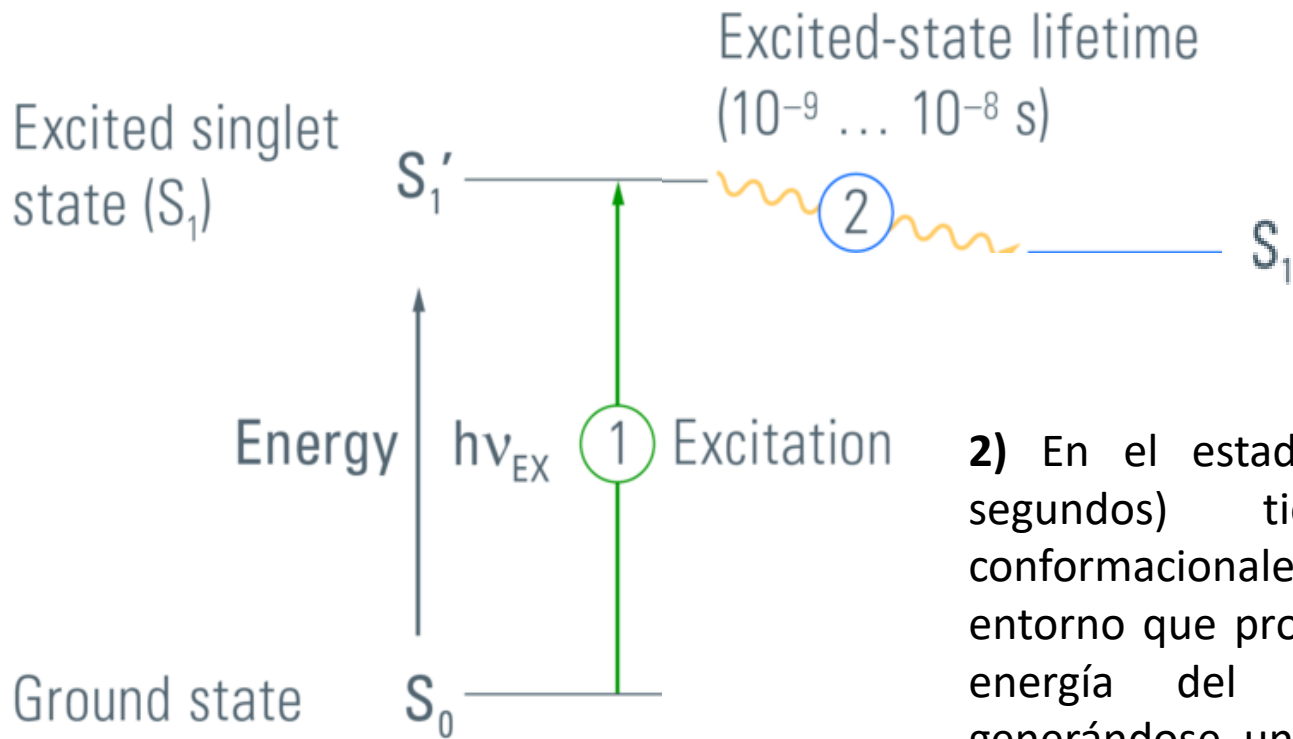


Fundamento de la fluorescencia: diagrama de Jablonski



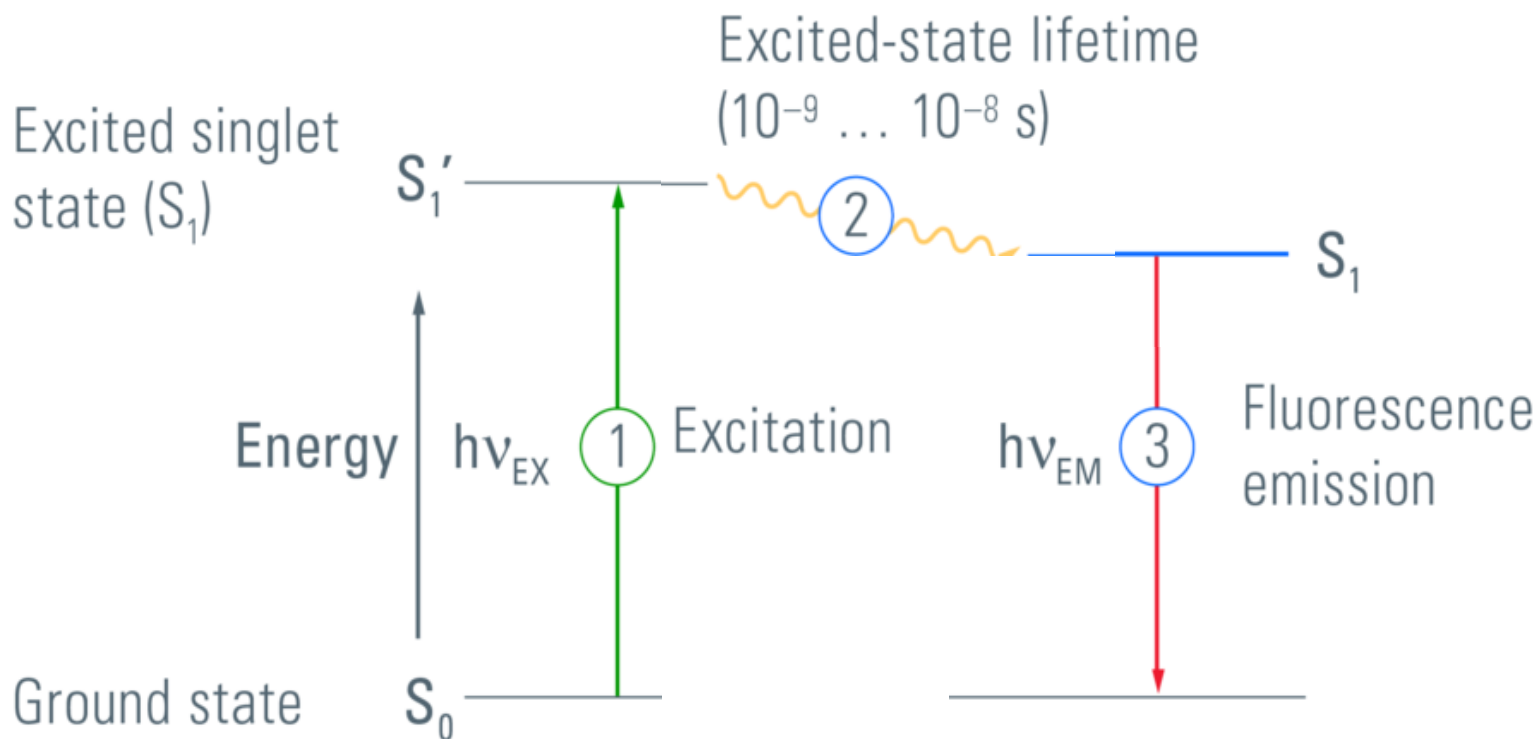
1) La absorción de energía durante la excitación genera una inestabilidad química dentro de las moléculas fluorescentes, de modo que alcanzan un estado energético excitado denominado S_1'

Fundamento de la fluorescencia: diagrama de Jablonski



2) En el estado S_1' (alrededor de 10^{-9} segundos) tienen lugar cambios conformacionales e interacciones con el entorno que provocan que una parte de la energía del estado S_1' se disipe, generándose un estado de menor energía denominado S_1

Fundamento de la fluorescencia: diagrama de Jablonski



3) Una vez finalizada la excitación, la molécula vuelve a su estado energético basal (S_0), emitiéndose en el proceso fotones de luz de una menor energía y mayor longitud de onda que los presentes en la fuente de excitación debido a la disipación interna de energía entre los estados S_1' y S_1

La fluorescencia está definida por una serie de propiedades que dependen de la naturaleza y el tipo de fluorocromo y de factores externos:

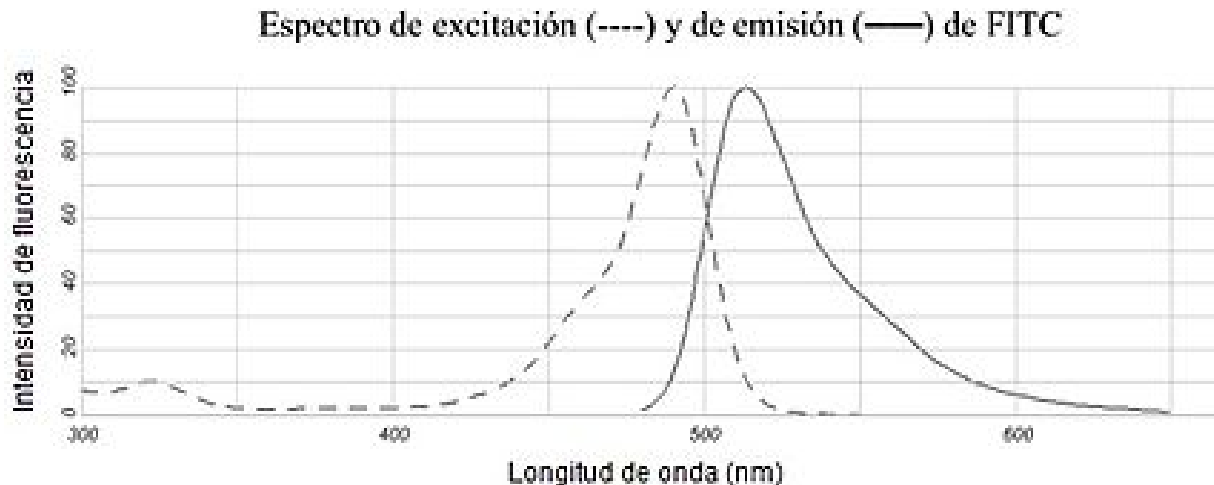
1. **Coeficiente de extinción molar (ϵ):** es la eficiencia de absorción de energía en una longitud de onda determinada (suele referirse a la λ de excitación máxima).
2. **Rendimiento cuántico (φ):** expresa la proporción de fotones emitidos en función de los fotones absorbidos.

- 3. *Vida media de fluorescencia***: tiempo medio que una molécula fluorescente puede estar en estado excitado antes de volver a su estado energético basal.
- 4. *Fotoblanqueo (fotobleaching)***: fotodestrucción de los fluorocromos que estamos excitando de forma irreversible. Se debe a un daño químico inducido por fotones y a modificaciones covalentes fruto de la interacción con otras moléculas.
- 5. *Desactivación de la fluorescencia (quenching)***: disminución de la intensidad de la fluorescencia emitida debida a agentes oxidantes e interacciones entre moléculas del fluorocromo. Es reversible

2) Fluorocromos y su elección

Existe gran variedad de fluorocromos diferentes, y todos ellos vienen definidos por un espectro de excitación y otro de emisión característicos

1. **El espectro de excitación** muestra la intensidad de la emisión fluorescente a diferentes λ de excitación
2. **El espectro de emisión** muestra la intensidad de la fluorescencia de emisión a diferentes λ cuando se excita con la λ de excitación máxima

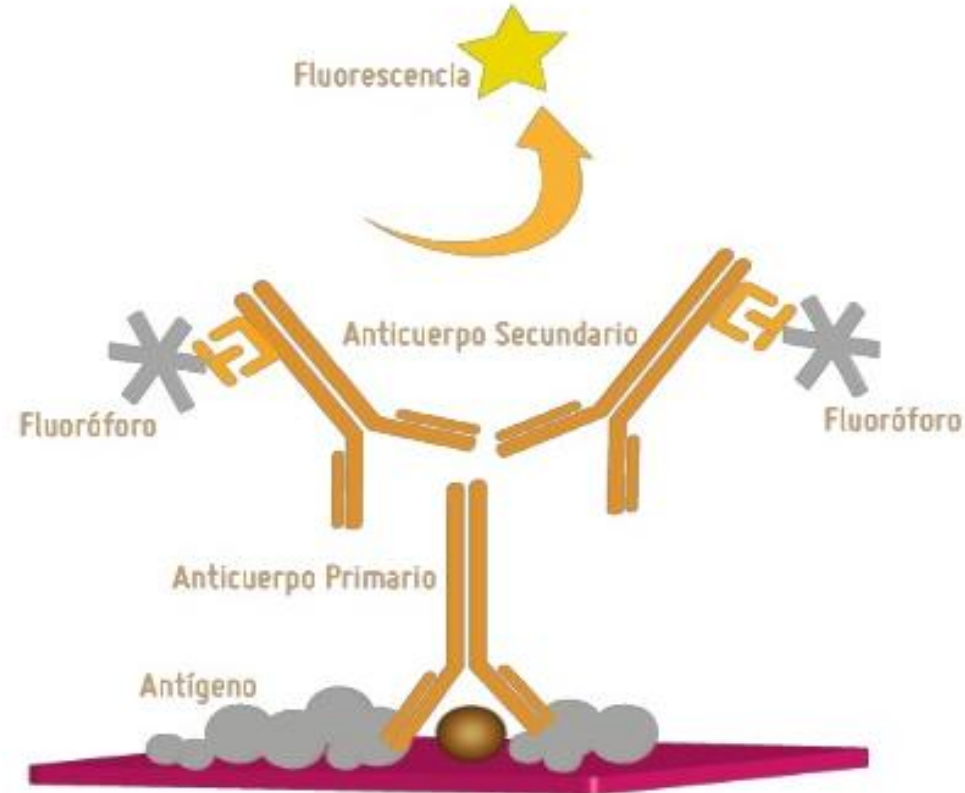


Ejemplo de los espectros de emisión y excitación de FITC

Criterios a tener en cuenta a la hora de elegir los fluorocromos:

1. Su **especificidad** frente a la molécula que queremos estudiar

La mayoría de fluorocromos utilizados en microscopía de fluorescencia están acoplados a anticuerpos secundarios (inmunofluorescencia indirecta), lo que asegura una alta especificidad



2. Que los **espectros de excitación y emisión sean los adecuados** (tamaño, solapamiento, adecuación a los sistemas de excitación, etc.)

En ensayos en los que se utilizan simultáneamente **dos o más fluorocromos, es importante:**

Que los espectros de los fluorocromos sean lo más estrechos posible

Comprobar que no se produce solapamiento entre los espectros de excitación ni que la emisión de un fluorocromo sea capaz de excitar a un fluorocromo adyacente

3. El **brillo**, que viene determinado por el coeficiente de extinción molar (ϵ) y el rendimiento cuántico (ϕ) del fluorocromo. A mayor valor de la ecuación $\epsilon \times \phi$, mayor brillo tendrá el fluorocromo
4. Su **resistencia al fotoblanqueo y a la desactivación de la fluorescencia**
5. Su **viabilidad celular** (permeabilidad, que no produzcan toxicidad en la célula, compatibilidad para ensayos in vivo)

***3) Elementos y funcionamiento
básico de un microscopio de
fluorescencia***

Principales tipos

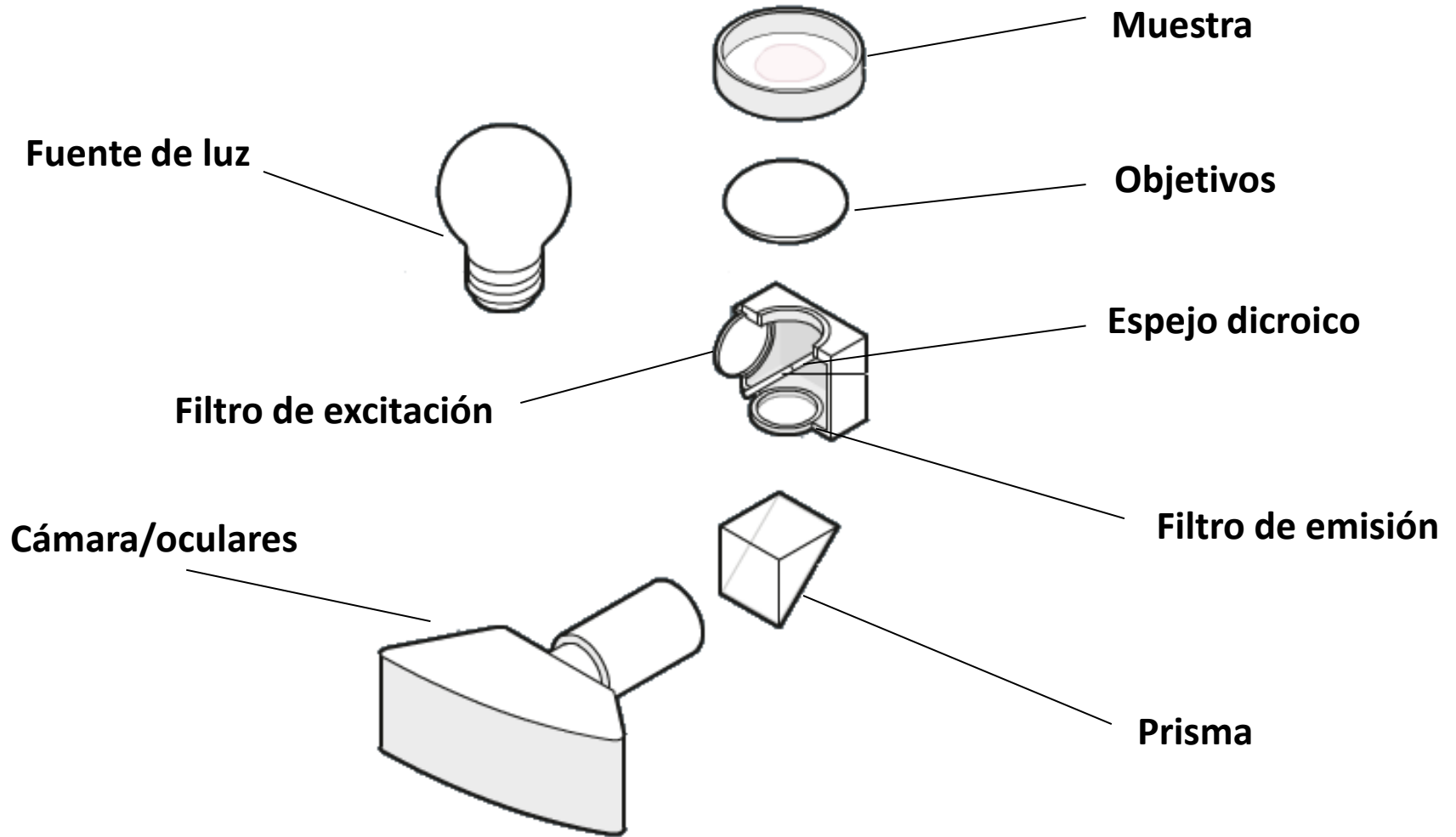


Microscopio de fluorescencia convencional

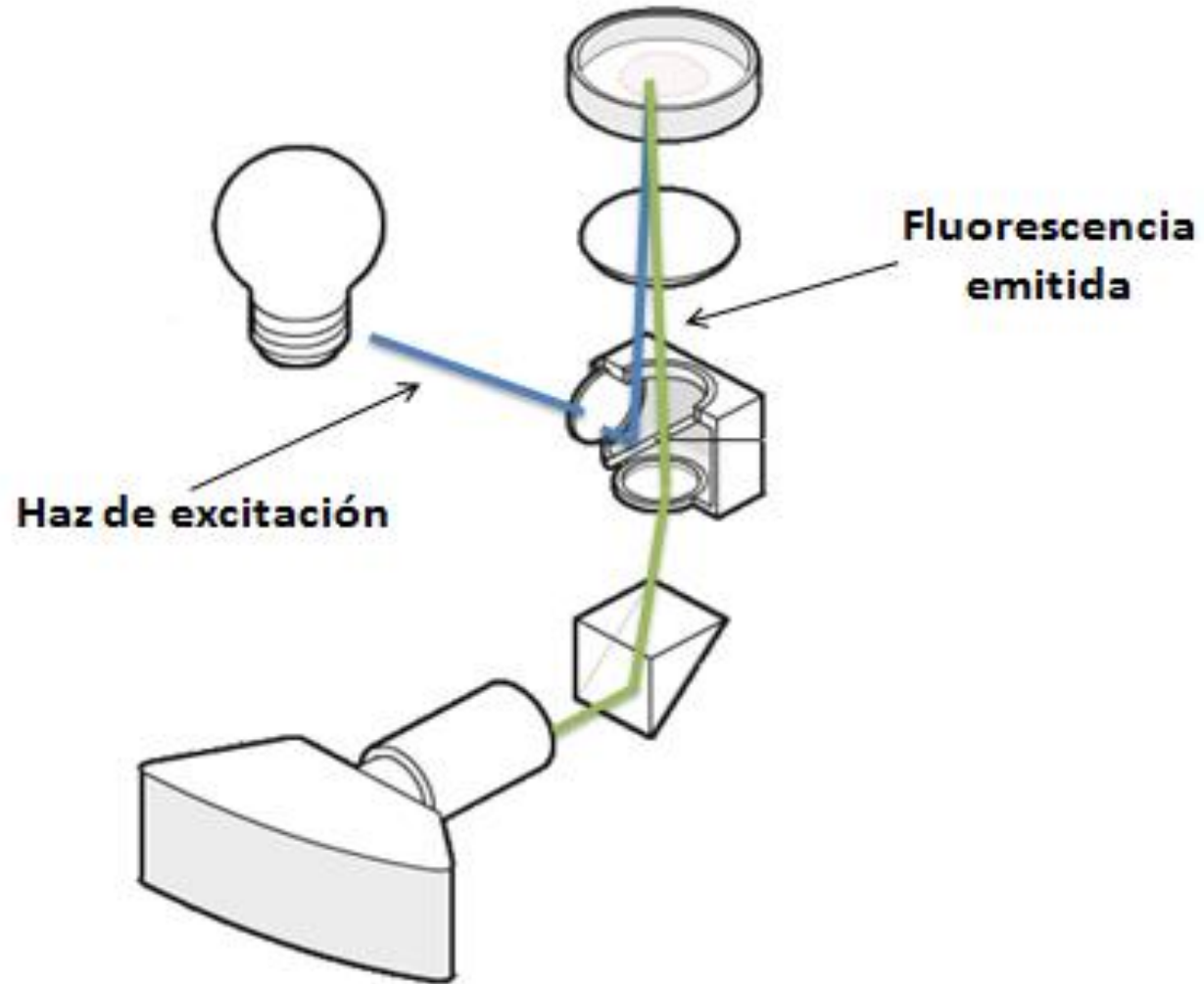
Microscopio confocal espectral

Aunque existen notables diferencias entre ellos, ambos tipos de microscopio presentan unos elementos básicos que permiten la detección de las señales de fluorescencia: ***una fuente de excitación, un filtro de excitación, un espejo dicróico, un filtro de emisión, los objetivos, el prisma y los sistemas detectores***

Elementos y funcionamiento básico de un microscopio de fluorescencia



Elementos y funcionamiento básico de un microscopio de fluorescencia



Elementos y funcionamiento básico de un microscopio de fluorescencia

1. **La fuente de excitación:** emite un haz de fotones a una determinada longitud de onda.

Las fuentes de excitación más comunes son:

- ✓ *Lámparas de mercurio*
- ✓ *Lámparas de Xenon*
- ✓ *Láseres*



2. El haz de excitación llega al **filtro de excitación**, que deja pasar únicamente los rayos con una longitud de onda determinada.

Existen 3 tipos de filtros de excitación:

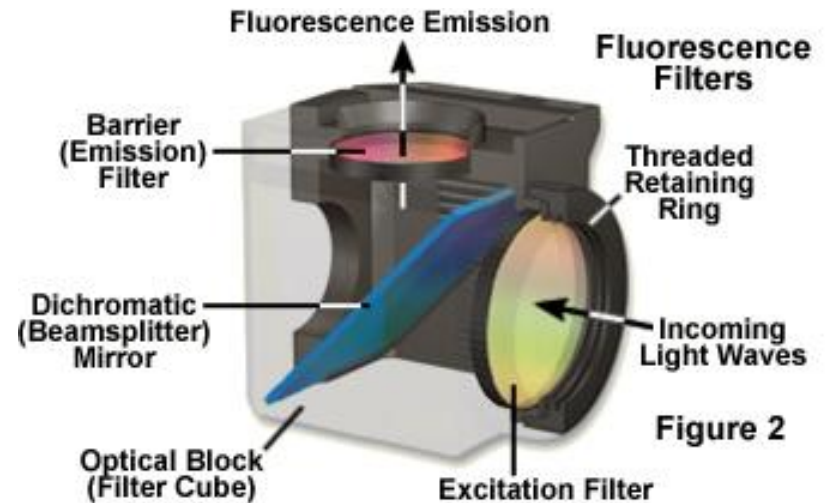
- ✓ **Filtros Short Pass:** dejan pasar el espectro por debajo de un valor determinado de longitud de onda y bloquea lo que está por encima.
- ✓ **Filtros Long Pass:** dejan pasar el espectro por encima de un valor determinado y bloquea lo que está por debajo.
- ✓ **Filtros Band Pass:** dejan pasar una banda determinada del espectro y bloquea el resto por encima y por debajo.

3. La luz filtrada impacta sobre el **espejo dicroico** y es reflectada hacia los objetivos, los cuales concentran el haz de luz sobre la muestra de estudio.
4. Al ser excitada la muestra, los fluorocromos emiten fluorescencia, que al ser de una longitud de onda mayor a la presente en la fuente de excitación puede atravesar el espejo dicroico y dirigirse hacia el **filtro de emisión**.

Los filtros de emisión son filtros Band Pass que dejan pasar únicamente la fluorescencia emitida por la muestra

Elementos y funcionamiento básico de un microscopio de fluorescencia

El espejo dicróico y los filtros de excitación y emisión forman parte de una estructura denominada cubo de filtros.

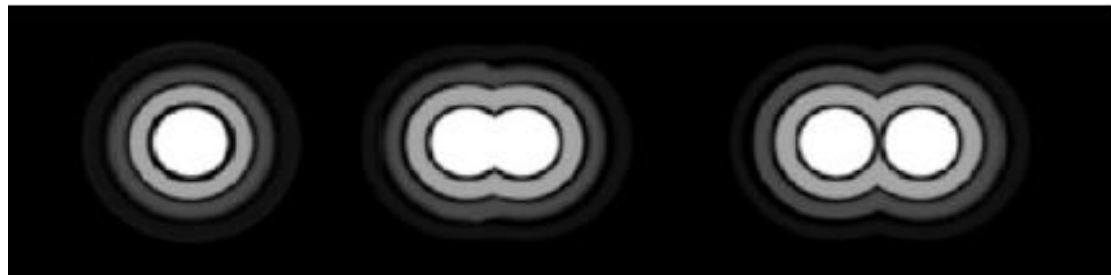


5. La fluorescencia de la muestra filtrada choca contra un **prisma** que proyecta la luz hacia los **sistemas de detección** del microscopio (cámaras, fotomultiplicadores), haciendo posible su visualización por el investigador .

Eficiencia cuántica de un sistema detector: indica el % de fotones que logra arrancar un electrón y por tanto producir una señal eléctrica detectable por el detector

Límite de resolución: determina la mínima distancia a la que dos objetos pueden verse separados. Depende principalmente de:

- ✓ **La apertura numérica de los objetivos** (relación directamente proporcional)
- ✓ **La λ de la luz empleada** (relación inversamente proporcional)



Aumento de resolución →

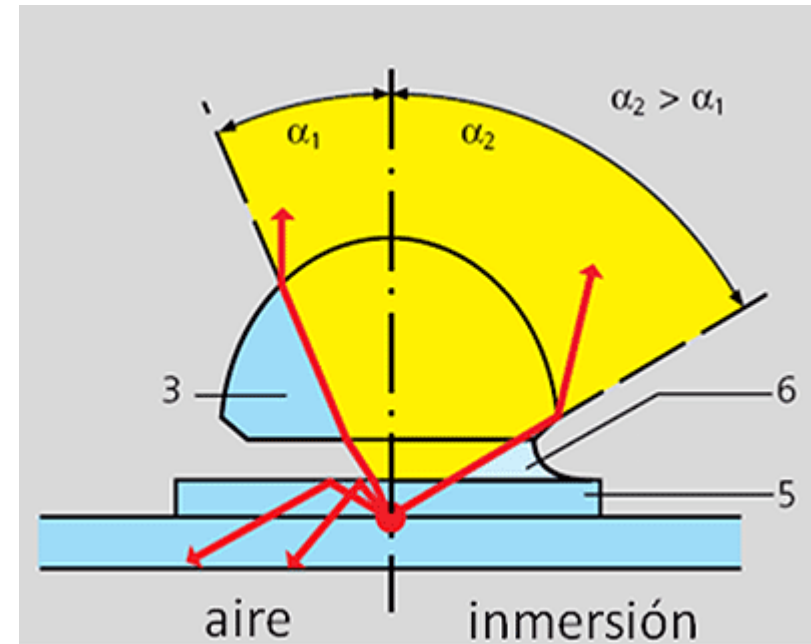
Elementos y funcionamiento básico de un microscopio de fluorescencia

La **apertura numérica** del objetivo es un número adimensional que determina el rango de ángulos en los que el sistema óptico puede recoger luz.

$$AN = n \sin \theta$$

n = índice de refracción del medio en el que se encuentra la lente

θ = mitad del ángulo de aceptación máximo de la lente



Tomado de Kapitza H G. Microscopy from the very beginning

Elementos y funcionamiento básico de un microscopio de fluorescencia

La apertura numérica y el medio de inmersión que necesita el objetivo, entre otros parámetros, suelen aparecer detallados en los objetivos.

Medio de inmersión	Índice de refracción
Aire	1
Agua	1,333
Glicerol 80% (H2O)	1,451
Glicerol	1,462
Aceite	1,518

Principales medios de inmersión y sus índices de refracción



Ejemplo de un objetivo (Leica mycosystems) con sus características detalladas