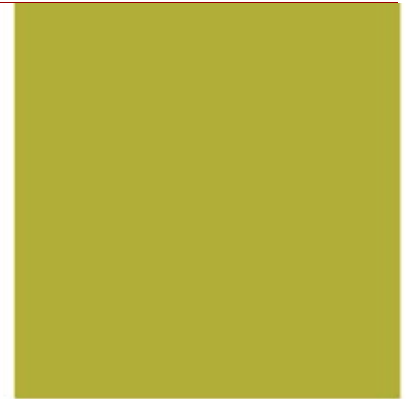




Bases de La Fluorescencia

Alejandra Lozano | Viviana Torres | Luis Baeza



Luminiscencia

Definición

Tipos de Luminiscencia

Fluorescencia

Fosforescencia

Definición

- Luminiscencia es la emisión de luz por parte de una sustancia y ocurre en estados excitados electrónicamente.
- Para inducir fluorescencia se usa luz y no temperatura porque en este último caso la diferencia de energía es mayor entre S_0 y S_1 .

Tipos de luminiscencia

- Fluorescencia y Fosforescencia, dependiendo de la naturaleza del estado excitado.

Fluorescencia

- Orbital excitado con spin contrario al electrón en estado basal.
- Vida media: (Tiempo entre la excitación y el regresado al estado basal) es corto (10 ns)
- Fluoróforos típicos: quinina, fluoresceína, rodamina, antraceno, perileno.

Fosforescencia

- Orbital excitado con spin en la misma dirección que el orbital en estado basal
- Vida media es más larga que en fluorescencia, milisegundos o segundos.

¿Siempre lo uno o lo otro?

- No, complejos moleculares grandes, como por ejemplo metal con orgánico, pueden tener ambos tipos de excitación de orbitales.



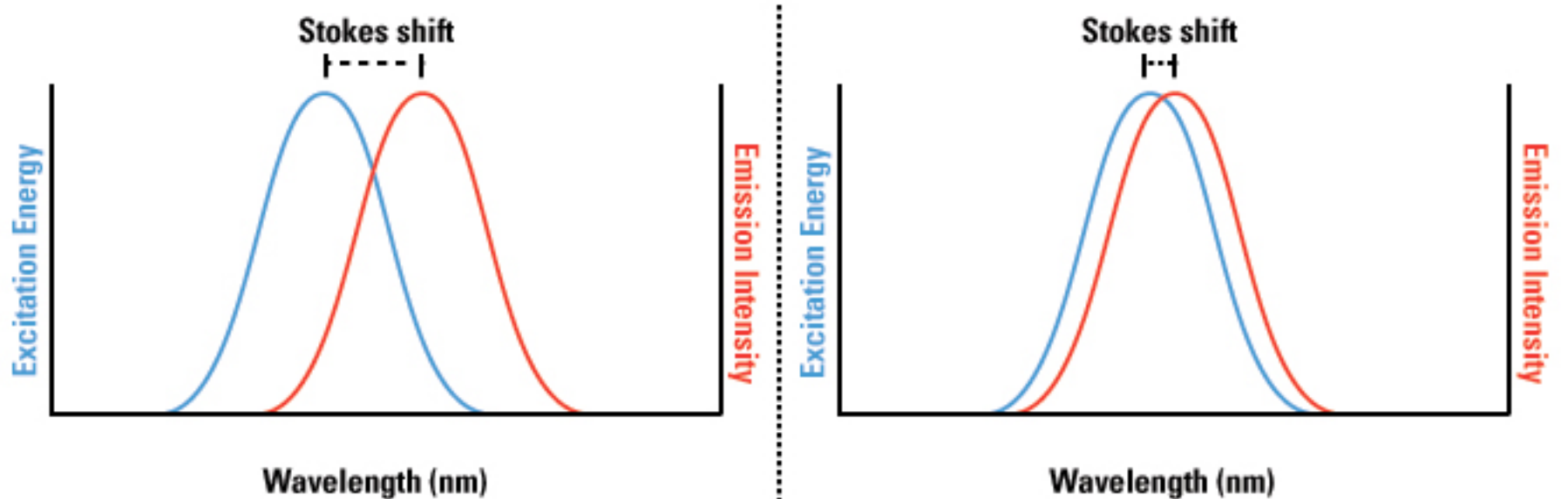
Características



Stokes Shift

- Cuando un sistema (molécula o átomo) absorbe un fotón, gana energía y entra en un estado excitado. Una forma de volver al estado basal es emitir un fotón, perdiendo así energía (otra forma sería perder calor).
- Cuando el fotón emitido tiene menos energía que el fotón absorbido, esta diferencia de energía se llama Stokes Shift.
- Cuando el fotón emitido tiene más energía que el fotón absorbido, se habla de anti Stokes Shift.
- La absorción es instantánea. En contraste con ésta, la emisión ocurre sobre un período largo de tiempo.

Stokes Shift



Regla de Kasha

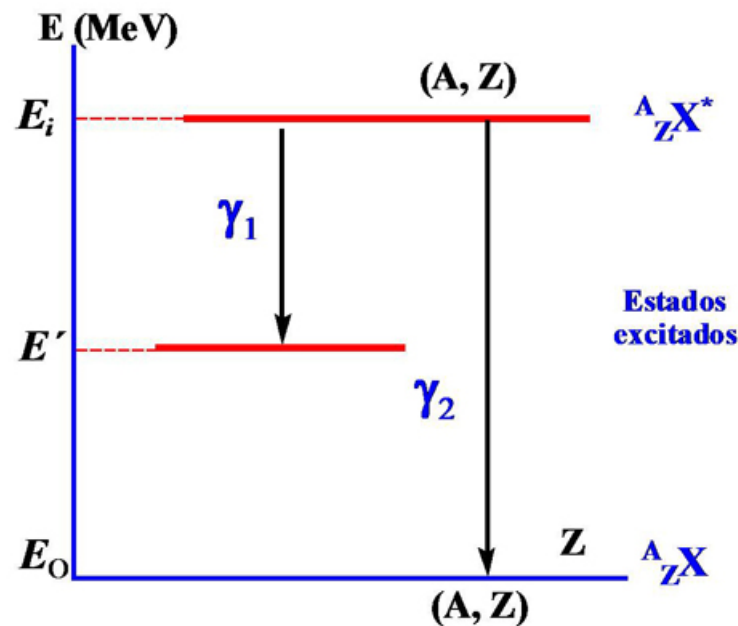
- Para un mismo sistema se observa usualmente el mismo espectro de emisión, independiente de cuál haya sido la longitud de onda de excitación.
- Se puede llegar a diferentes niveles de excitación pero rápidamente se regresa al más bajo de los niveles de excitación.

Regla de imagen de espejo

- La emisión es la imagen de espejo de la absorción de S0 a S1, no del espectro total de absorción. Esto es verdad para la mayoría de los fluoróforos.

Conversión interna

- Es el regreso del máximo estado vibracional alcanzado en la excitación al nivel S1.



Principio de Franck-Condon

- De acuerdo con este principio, todas las transiciones son verticales, es decir, ocurren sin cambio en la posición del núcleo y mientras más sobreposición haya entre el nivel vibracional máximo alcanzado y S1, más rápido regresará a S1.

Vida media de la fluorescencia

- Tiempo promedio que un fluoróforo permanece en estado excitado después de la excitación.

Rendimiento (Quantum yield)

- Es la razón entre el número de fotones emitidos partido por el número de fotones absorbidos
- $N^\circ \text{ fotones emitidos} / N^\circ \text{ fotones absorbidos}$
- El quantum yield es proporcional a la vida media del fluoroforo

Extinción (Quenching)

- Consiste en la disminución de la intensidad de emisión.
- La intensidad de la fluorescencia puede decaer por una amplia variedad de procesos.

Extinción colisional

- Ocurre cuando el fluoróforo en estado excitado es desactivado al entrar en contacto con otra molécula en solución, la que llamamos quencher. El quencher actúa de distinta forma sobre el fluoróforo dependiendo de cuan expuesto esté éste a la colisión. Mientras más accesible sea el fluoróforo a este fenómeno, con mayor velocidad decaerá la intensidad.
- Un fluoróforo incluido en el interior de una macromolécula es usualmente inaccesible a los quenchers hidrosolubles, de manera que el valor de K es bajo. Este conocimiento se puede usar cuando necesitamos prolongar la fluorescencia. Valores mayores de K se encuentran si el fluoróforo está libre o en la superficie de una biomolécula.

Formación de complejos

- Además de la extinción colisional, la disminución de fluorescencia puede ocurrir por la formación de complejos moleculares no fluorescentes con quenchers.

Polarización o anisotropía

- Los fluoróforos absorben luz a lo largo de una dirección específica en relación con el eje molecular. Ej: DPH sólo absorbe luz polarizada a lo largo de su eje mayor. La rapidez con un fluoróforo rota durante el estado excitado determina su polarización o anisotropía.
- La polarización puede ser usada para medir volumen aparente (o peso molecular) de proteínas. Esta medición es posible porque las proteínas más grandes rotan más lento. Cuando una proteína se une a otra su tasa rotacional decrece y la anisotropía aumenta
- La polarización también ha sido usada para determinar la viscosidad aparente de membranas.

Mediciones de anisotropía

- Están basadas en el principio de excitación fotoselectiva de fluoróforos mediante luz polarizada.
- Los fluoróforos preferentemente absorben fotones cuyos vectores eléctricos están alineados con el momento de transición del fluoróforo.

Mediciones con fluorescencia

Continua (Steady state)

- Es el más común, es aquel que usa luz continua y observación. La muestra se ilumina con un haz continuo y se registra la intensidad de emission (Escala de tiempo de ns)
- Es simplemente un promedio de fenómenos resueltos por tiempo sobre el descenso de intensidad de la muestra. Es proporcional a la vida media.

Mediciones con fluorescencia

Resuelta por tiempo (Time resolved)

- La muestra se expone a un pulso de luz, donde el ancho del pulso es típicamente más corto que el tiempo de descenso de la muestra.
- La disminución de la intensidad es registrada con un sistema de detección de alta velocidad que permite medir la intensidad de la anisotropía (Escala de tiempo de ns)

¿Por qué usar fluorescencia resuelta por tiempo si técnicamente es más complejo?



- Por la información molecular que entrega. La curva específica del descenso de la anisotropía contiene información acerca de la forma de la macromolécula y su flexibilidad.
- En principio, el valor de r refleja el descenso de la anisotropía y la forma de la molécula. Pero no es suficiente como para revelar la forma de molécula por sí solo en forma exacta.
- El descenso de la intensidad puede revelar dos tiempos, dando a entender la presencia de más de un estado conformacional.
- La fluorescencia continua solo revelará una intensidad promedio, dependiente de un promedio ponderado de los dos tiempos de descenso.

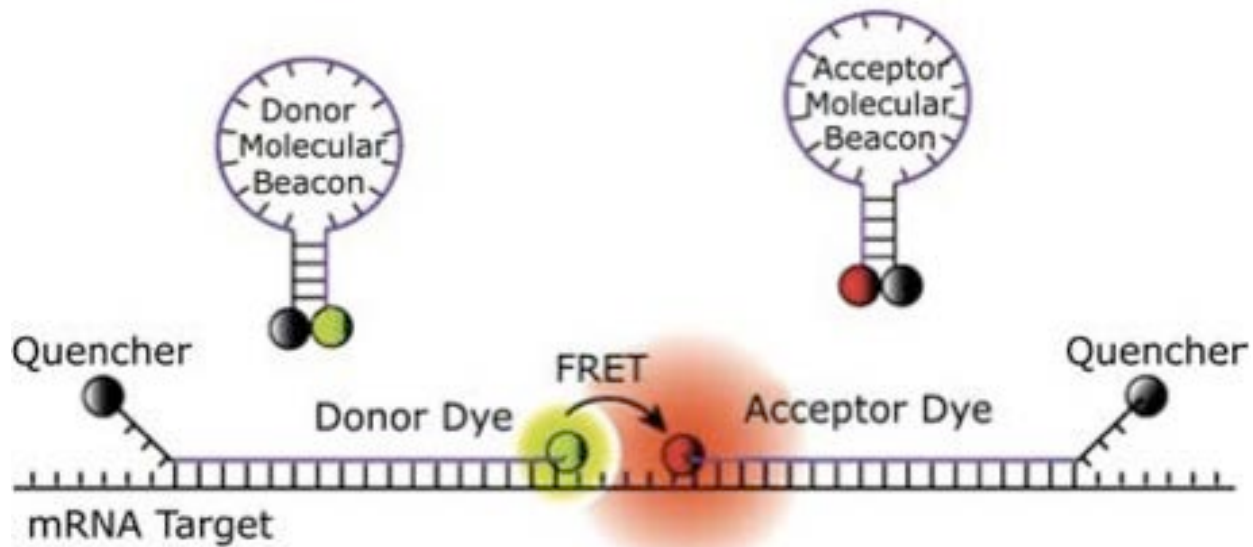
Indicadores fluorescentes

- Los fluoróforos bioquímicos se dividen en intrínsecos y extrínsecos. Los primeros son aquellos que ocurren naturalmente y los extrínsecos son aquellos que se agregan a una muestra para transmitirle propiedades específicas.
- Son fluoróforos cuyas propiedades son sensibles a una sustancia de interés. Al unirse a la molécula de interés aumenta la intensidad de la emisión y se puede medir, de esa manera, la cantidad de esa sustancia. Se pueden usar para sodio, Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^{+} , Cl^{-} , y O_2 , as well as pH.

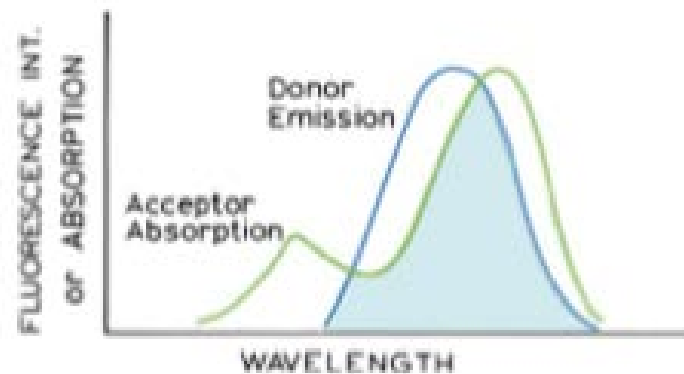
Transmisión de energía de resonancia (RET)



- También llamada transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET)
- Se basa en que la excitación de un cromóforo puede transferirse a otro cercano, generalmente cuando ambos se sitúan en la misma molécula.
- En el caso de que se trate de fluoróforos el mecanismo subyacente continúa siendo el mismo: la energía se transfiere, lo que desemboca en la aparición de fluorescencia (pero no es la fluorescencia la transferida)
- RET provee la posibilidad de medir la distancia entre dos sitios de macromoléculas. La extinción del donador puede ser usada para calcular la distancia entre donador y aceptador.



$$k_T = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{r} \right)^6$$





Nuevas tecnologías fluorescentes



Excitación Multifotón

- La estimulación debe ocurrir en una escala de tiempo de femtosegundos (10^{-15} segundos) porque el período de absorción es muy corto.
- La excitación multifotón permite imágenes de sólo un plano focal del microscopio. Esto es una ventaja, porque de otra forma podría haber distorsión por fluorescencia que viniera de otros planos.
- Ciertas moléculas sólo son excitadas por una longitud de onda que no se alcanza con un solo fotón y es necesario recurrir a más de un fotón.
- La excitación localizada por dos fotones ha encontrado amplio uso en microscopía de fluorescencia.

Espectroscopía de correlación de fluorescencia

- FCS se basa en las fluctuaciones temporales que ocurren en un volumen pequeño observado.
- La amplitud y velocidad de las fluctuaciones se miden en una serie temporal y se usan para calcular la función de correlación.
- Esta función permite conocer la dinámica molecular de la solución:
- el número medio de moléculas fluorescentes observadas simultáneamente
- el tiempo de residencia molecular, t_d , relacionado con la constante difusión
- los tiempos característicos de "encendido/apagado" de la fluorescencia, t_f , relacionados con dinámicas intramoleculares ultra-rápidas.

Detección de molécula única

- Cuando se observa una molécula única no hay promedio por mezcla, lo que permite estudiar el comportamiento de una molécula individual.
- La vida media de moléculas individuales puede ser medida al mismo tiempo que se van recogiendo las imágenes de intensidad.
- Esta técnica se usa para incluir fluoróforos que absorben UV, considerado improbable hace poco.
- DMU muestra que un ribosoma fluctúa entre conformaciones según la cantidad de energía transferida, que depende de la emisión de donadores y aceptadores de energía. Y revela la tasa de dichos cambios.

Espectroscopía de fluorescencia

- Puede aportar variada información, interacción de solventes con fluoróforos, distancias entre sitios de biomoléculas, cambios conformacionales, etc.
- Y se está extendiendo su uso gracias a la disminución de costos y complejidades.

Precauciones al trabajar con microscopía de fluorescencia

- Se debe tomar en cuenta los objetivos del trabajo en relación con la preparación de la muestra seleccionada, los fluoróforos elegidos para trabajar y los equipos seleccionados.

Preparación de la muestra

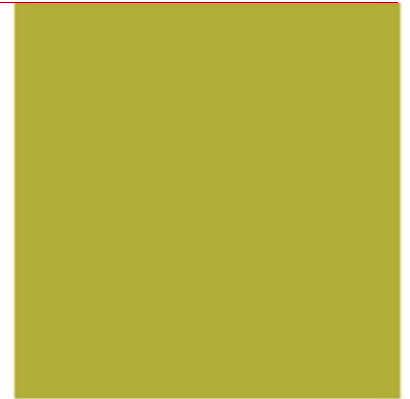
- Ni el software de deconvolución ni los microscopios confocales son capaces compensar
- Fijación
- Permeabilización
- Medio en que monta la muestra

Fluoróforos elegidos

- Absorción
- Emisión
- Brillo
- Fotoestabilidad
- Espectros superpuestos

Equipos seleccionados

- Lente objetivo
 - Medio de inmersión
 - Aberraciones esféricas
- Tamaño del pinole
- Correspondencia entre las diferentes piezas de los equipos
- Corrección de aberraciones cromáticas
- Seteo constante



Muchas gracias