

UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA



# Microscopia a fluorescenza e confocale

# Microscopia in fluorescenza

- Costituisce uno dei principali mezzi di indagine nel settore biomedico
- Permette di acquisire immagini di microrganismi, cellule, organelli citoplasmatici, macrocomplessi molecolari
- E' una tecnica poco invasiva. Ciò consente di preservare la citoarchitettura dei campioni in un ambiente il più possibile conforme alla loro realtà biologica
- In fluorescenza è possibile eseguire analisi quantitative su uno o più antigeni e in quest'ultimo caso di evidenziare una loro possibile colocalizzazione
- E' possibile seguire e descrivere processi quali la diffusione di molecole tra i compartimenti citoplasmatici o processi intracellulari legati ad es. a variazioni di pH o processi indotti da specifiche reazioni enzimatiche
- Consente di studiare la localizzazione di complessi farmacologici o di agenti antinfestanti

# Microscopia in fluorescenza

- L'uso di fluorocromi (materiali fluorescenti) permette di identificare cellule e componenti sub-cellulari distinguendoli facilmente dal resto degli elementi non fluorescenti
- La risoluzione è più elevata rispetto ad un microscopio ottico tradizionale

# La fluorescenza

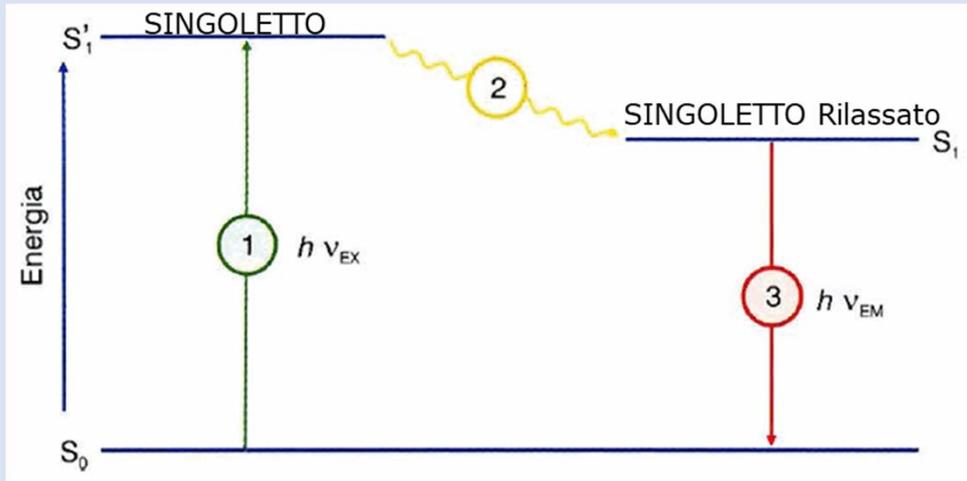
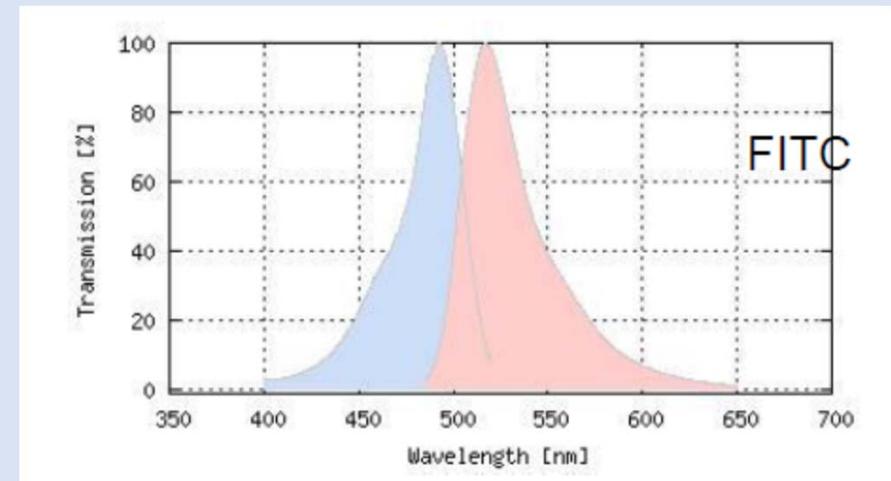


Diagramma di Jablonski

I fluorocromi sono molecole che hanno la caratteristica di assorbire luce ad una determinata lunghezza d'onda (eccitazione) ed emettere fotoni di una lunghezza d'onda maggiore (emissione)

Spettro di emissione e di eccitazione



# La fluorescenza

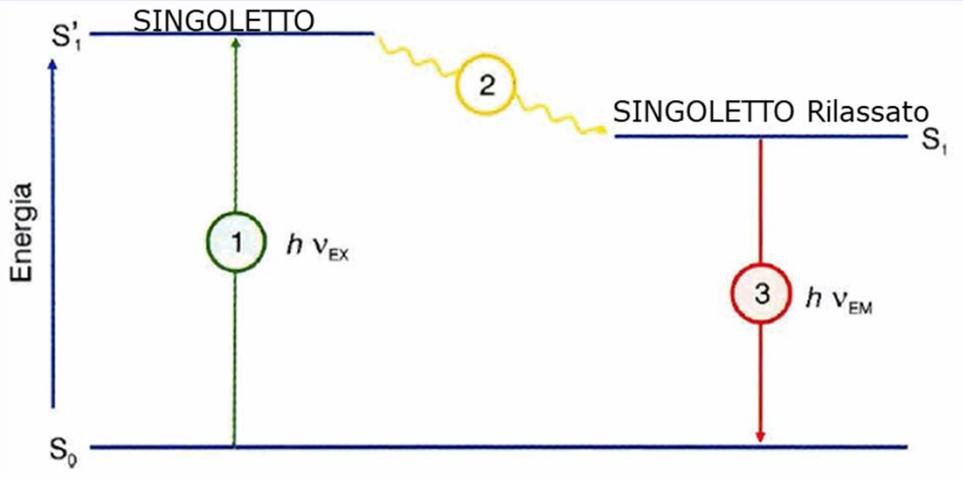
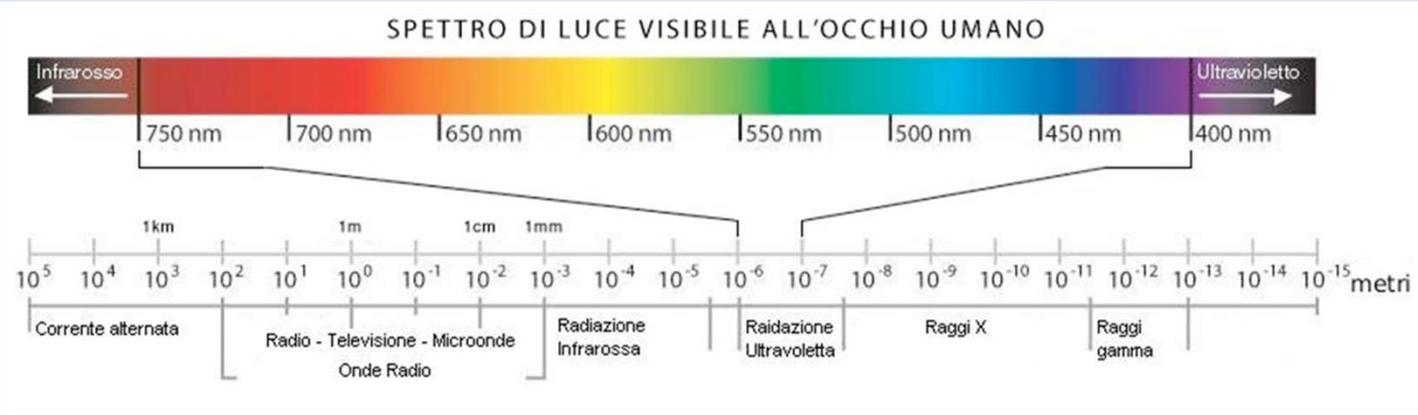


Diagramma di Jablonski

L'energia del fotone emesso è inferiore a quella del fotone assorbito. La lunghezza d'onda del fotone assorbito è più bassa di quella del fotone emesso. Questo fenomeno si chiama *spostamento di Stokes*.

$$E = h \nu = h \frac{c}{\lambda}$$



# La fluorescenza

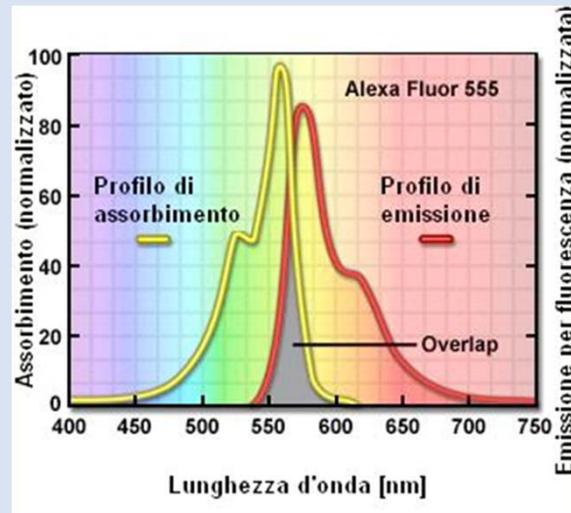
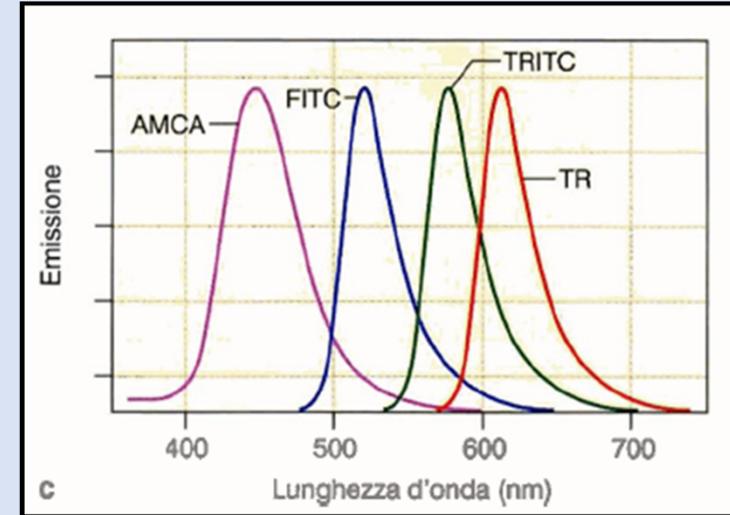
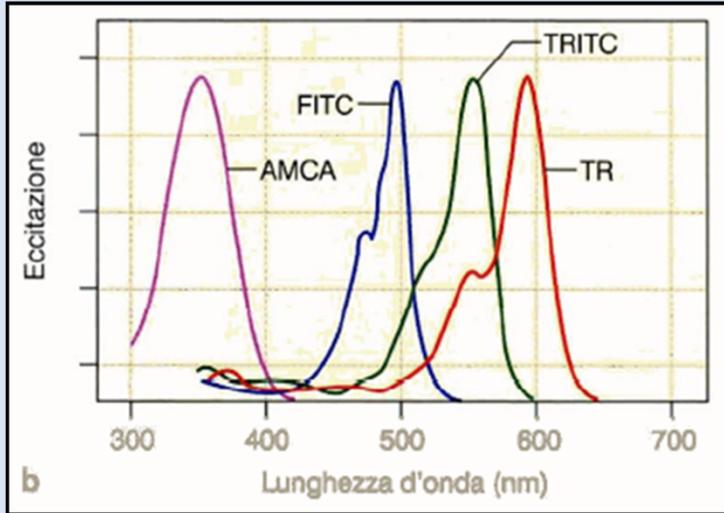
La fluorescenza è un fenomeno fisico che consiste nell'emissione di luce da parte di una sostanza sottoposta ad irraggiamento.

Gli elettroni degli atomi di una sostanza fluorescente assorbono l'energia della radiazione che li colpisce e saltano ad un livello energetico superiore.

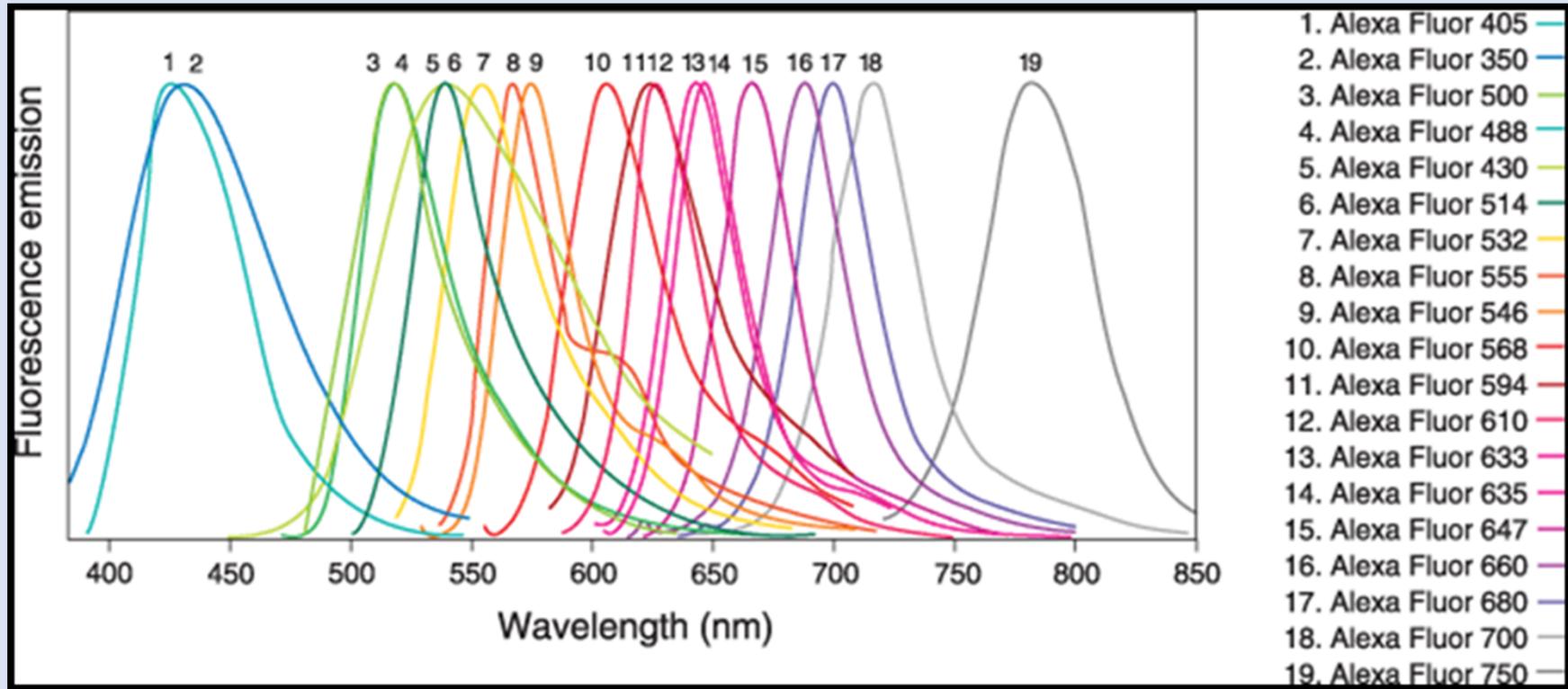
Dopo un brevissimo intervallo di tempo, dell'ordine dei  $10^{-8}$  s, tali elettroni tornano al livello energetico iniziale, restituendo buona parte dell'energia precedentemente assorbita sotto forma di fotoni, cioè di luce.

La lunghezza d'onda della radiazione emessa può cadere nel campo dell'ultravioletto, del visibile, o dell'infrarosso.

# Fluorofori

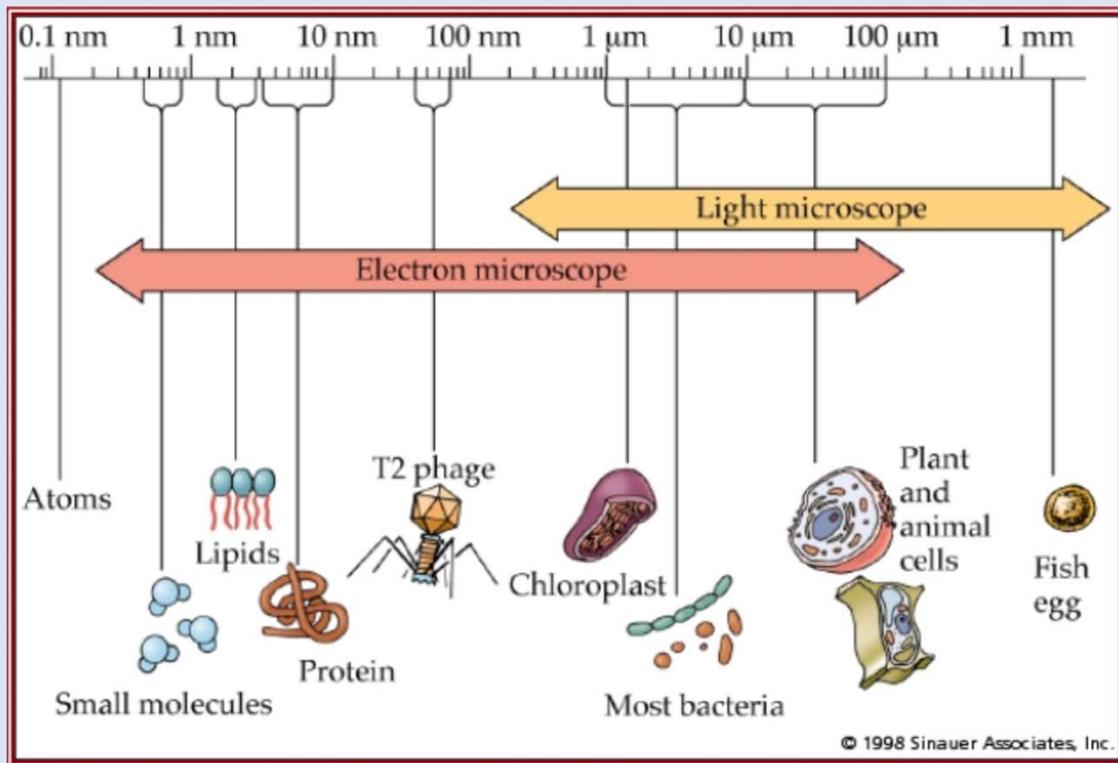


# Fluorofori



# Limite di risoluzione

La distanza minima alla quale due punti sono visibili come distinti

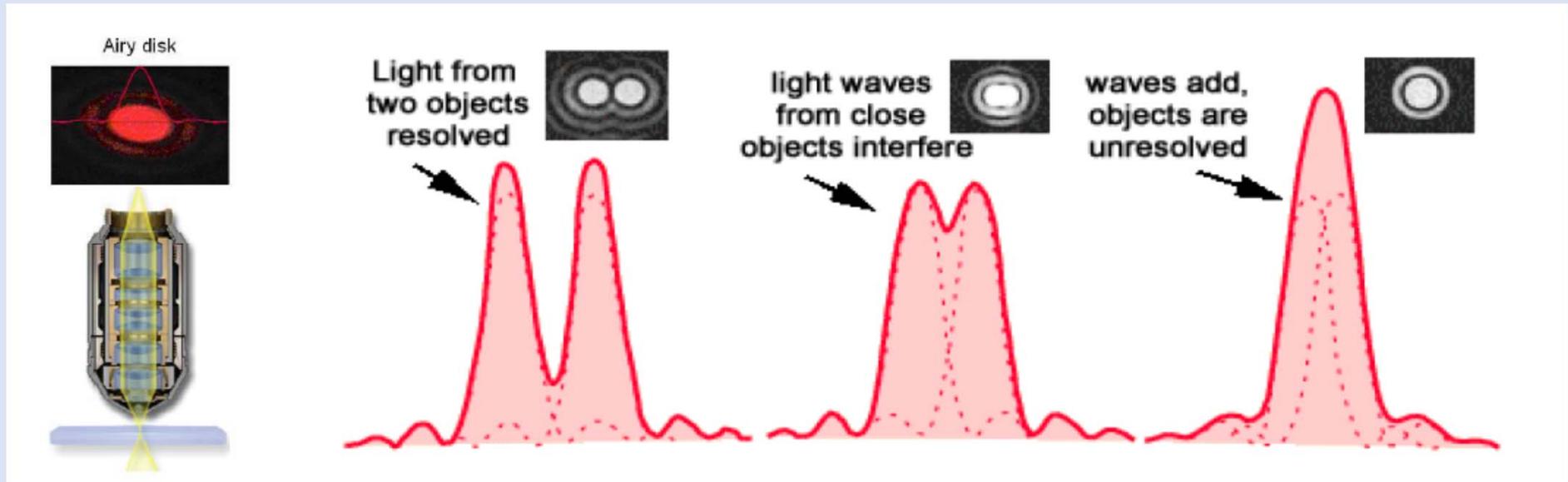


Occhio umano: 85 micrometri  
MO: 200nm  
SEM: 10nm  
TEM: 0.1nm

# Limite di risoluzione

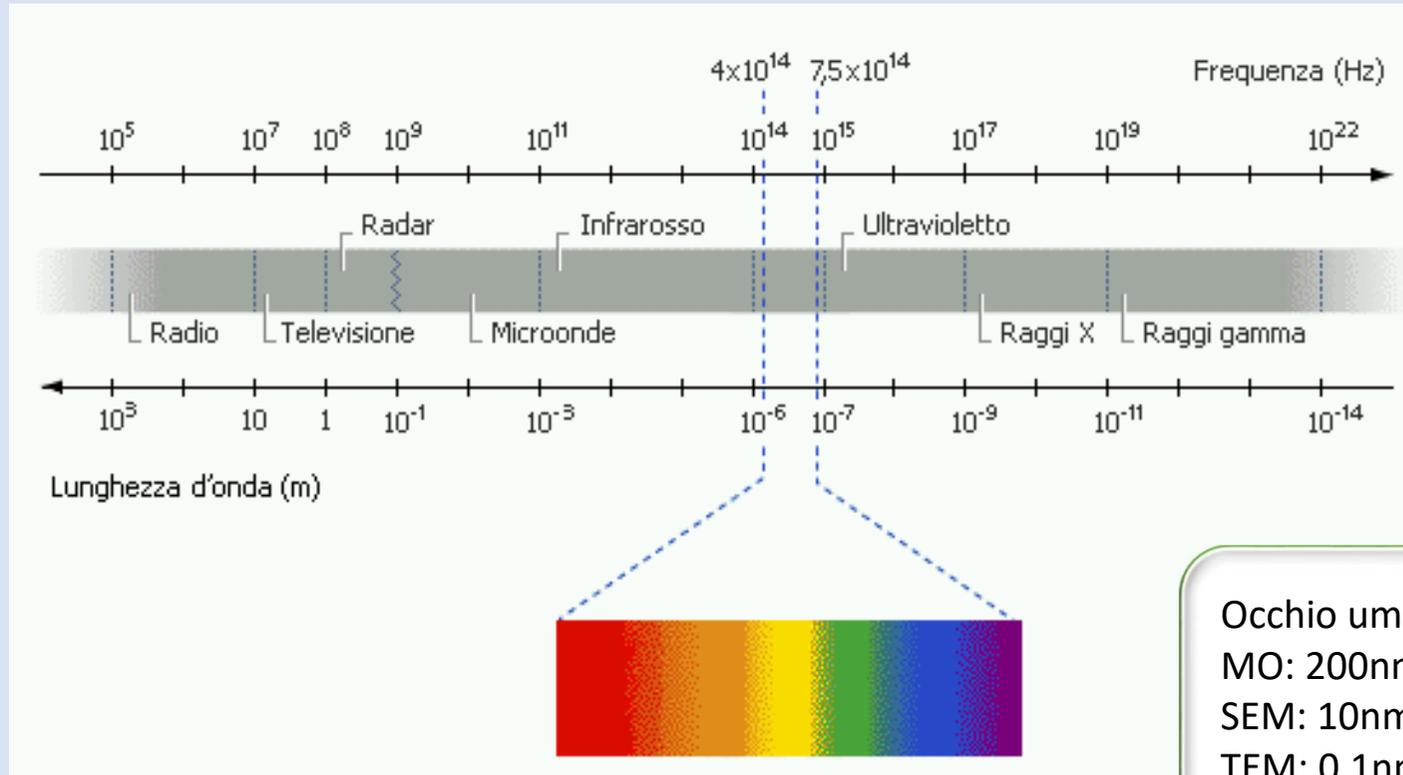
La distanza minima alla quale due punti sono visibili come distinti

Per la luce visibile il fattore limitante è dovuto al fenomeno di diffrazione (Criterio di Rayleigh).



La minima distanza fra i **dischi di AIRY** perché i punti siano distinguibili deve essere uguale al loro raggio

# Limite di risoluzione



Occhio umano: 85 micrometri  
MO: 200nm  
SEM: 10nm  
TEM: 0.1nm

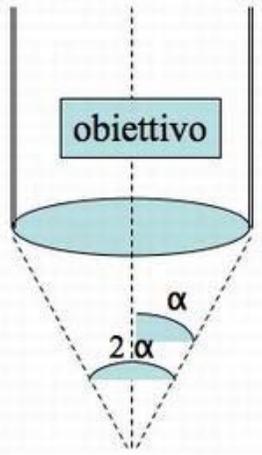
$$R = 0.6098 \times \lambda / \Delta n$$

# Limite di risoluzione

Potere di Risoluzione =  $\frac{\lambda}{2 n \sin \alpha}$   
Apertura numerica (A.N.) =  $n \sin \alpha$

$\lambda$  = lunghezza d'onda della sorgente luminosa

$\alpha$  = semiangolo del cono di luce che penetra nell'obiettivo



$\lambda = 400 - 700 \text{ nm}$  (v.m. 550 nm circa)  
 $n = 1,53$  (olio immersione)  
 $\alpha = 70^\circ$   
P.R. =  $\frac{550 \text{ nm}}{2 \times 1,53 \times \sin 70} = \frac{550 \text{ nm}}{2,75} \approx 200 \text{ nm}$

Occhio umano: 85 micrometri  
MO: 200nm  
SEM: 10nm  
TEM: 0.1nm

$$R = 0.6098 \times \lambda / An$$

# Come migliorare il Potere di Risoluzione

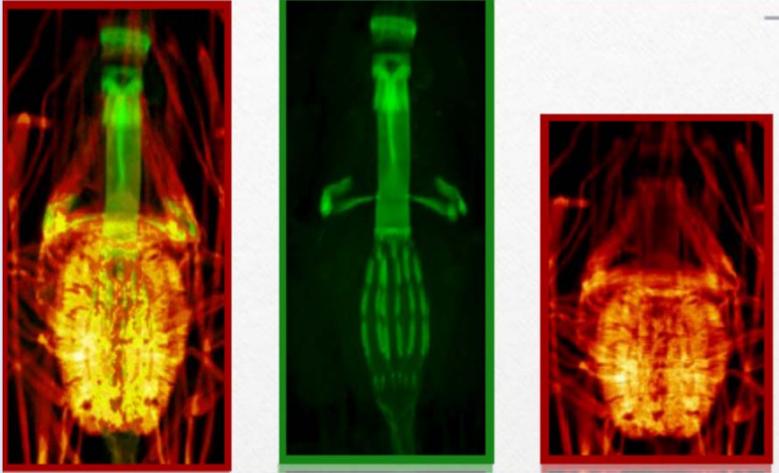
Può essere definito dal criterio di **Rayligh** e dalla teoria di **Abbe**

$$d = 1.22 \lambda / 2 n \sin \alpha$$

Indice di rifrazione	↑↑	Obiettivi ad immersione	1.56
Angolo $\alpha$	↑↑	Avvicinare il campione alla lente obiettivo	$\alpha = 70^\circ$ $\sin \alpha = 0.94$
Lunghezza d'onda	↓↓		$\lambda = 450\text{nm}$ (luce blu)

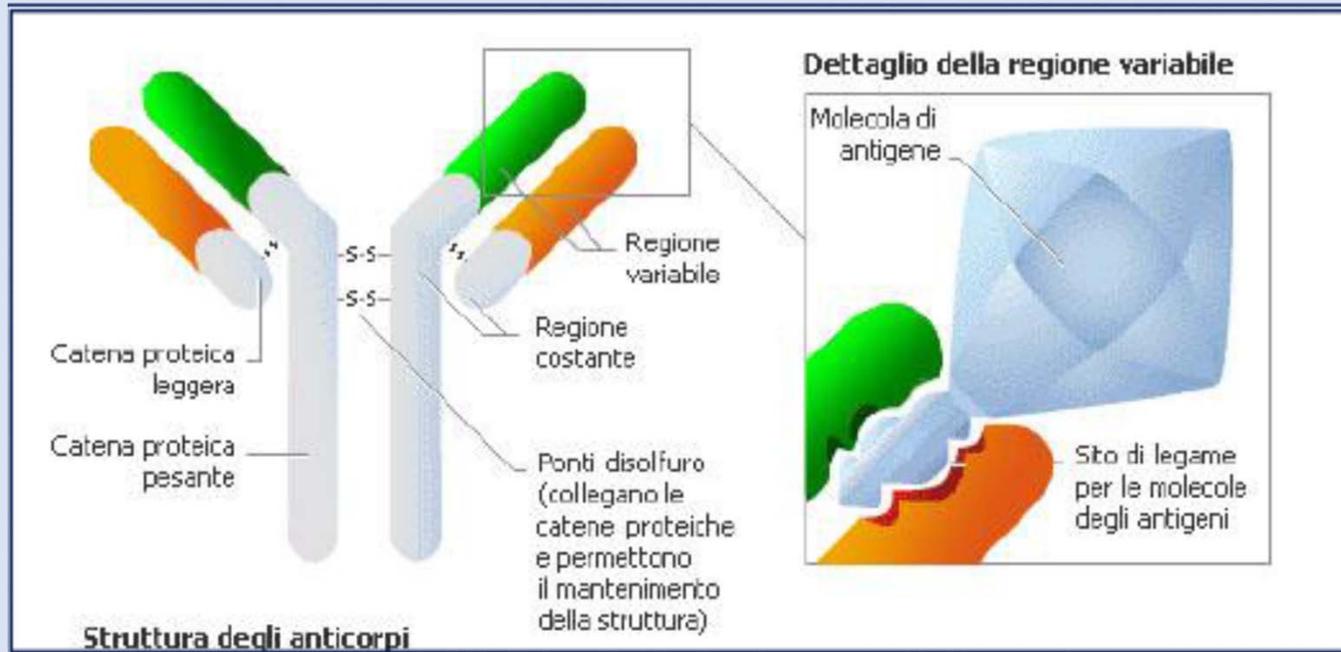
Potere risolutivo  $d = 187\text{nm}$

# Immunofluorescenza



L'immunofluorescenza permette la visualizzazione di un antigene (Ag) mediante un suo specifico anticorpo (Ab) marcato con un fluorocromo. Il cromoforo rende l'intero immunocomplesso fluorescente.

# Antigene/Anticorpo



Gli antigeni (Ag) sono molecole di natura proteica capaci di stimolare il sistema immunitario a produrre anticorpi contro se stesse.

Gli anticorpi (Ab) sono complessi proteici che legano in modo altamente specifico agli antigeni da cui sono indotti.

# Antigene/Anticorpo

Ogni passaggio necessario all'allestimento dei campioni può causare alterazioni delle caratteristiche antigeniche del preparato.

Variazioni della conformazione dell'Ag

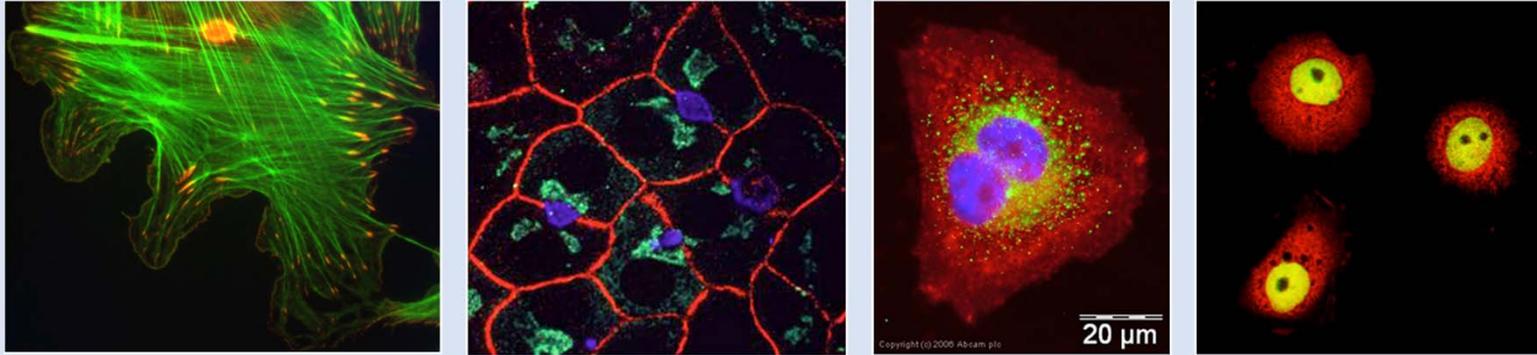
Mascheramento dei siti antigenici

Modificazioni chimiche dell'epitopo

Estrazione dell'Ag

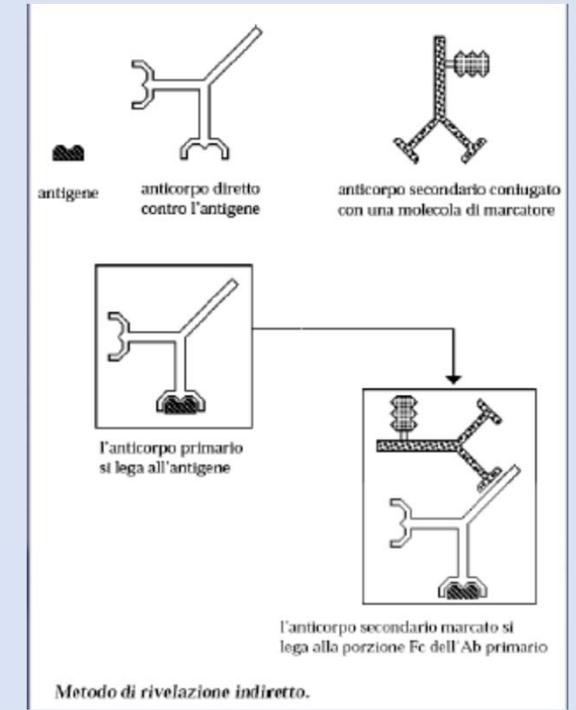
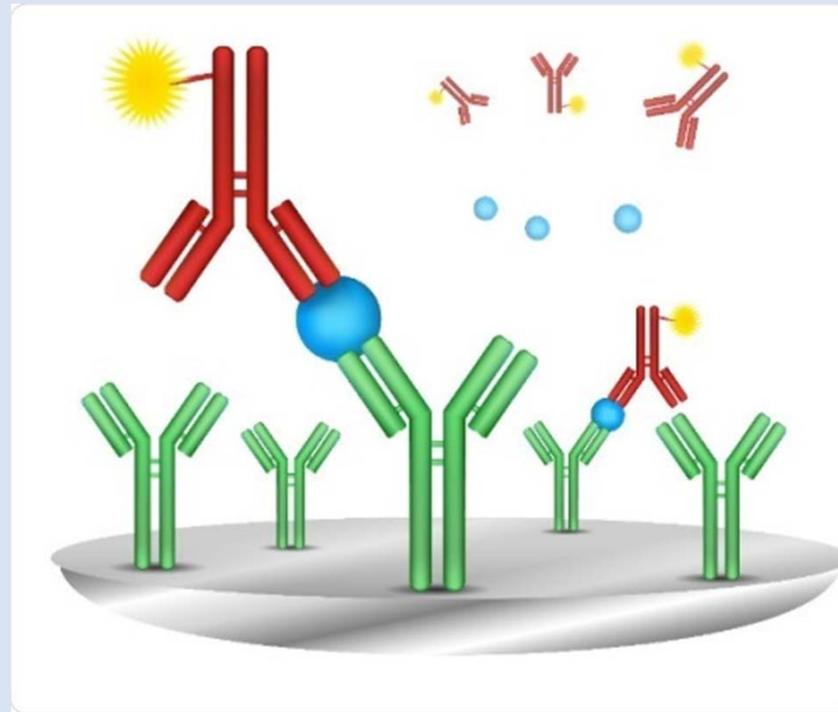
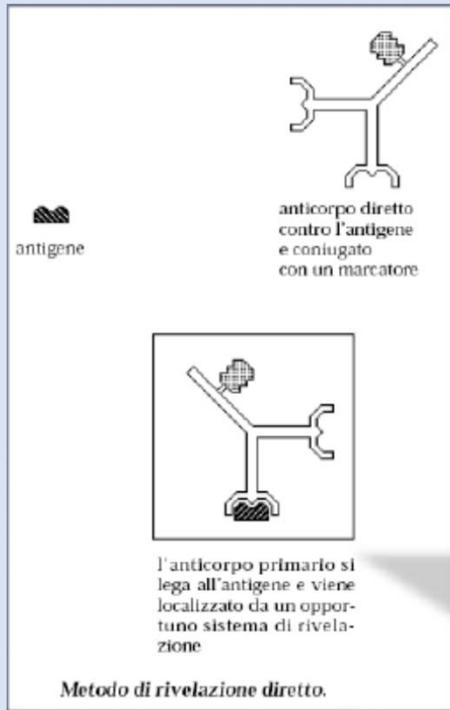
Formazione di una barriera che limita la penetrazione degli immunoreagenti

# Esperimento di Immunocitochimica



- **Specificità**: capacità dell' Abl di riconoscere l'epitopo e di legarsi ad esso con alta affinità
- **Sensibilità**: capacità dell' Abl di riconoscere minime quantità di antigene  
*Dipende dal tipo di fissazione/inclusione, dalla natura dell' epitopo dal tipo di reagente*
- **Risoluzione**: capacità di distinguere prodotti di reazione localizzati in sedi vicine ma distinte
- **Riproducibilità**: indice di affidabilità della tecnica

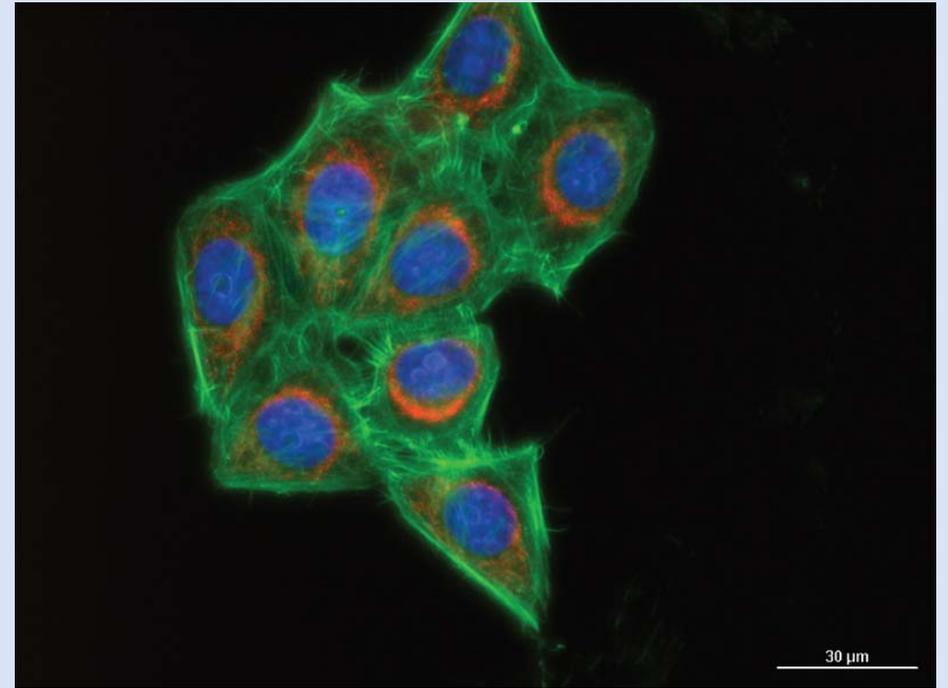
# Immunocomplesso



FITC-mouse anti X → X

FITC-goat anti mouse → mouse anti X → X

# Doppia marcatura



## Primario

Mouse anti-fibronectina

Rabbit anti L-CAM

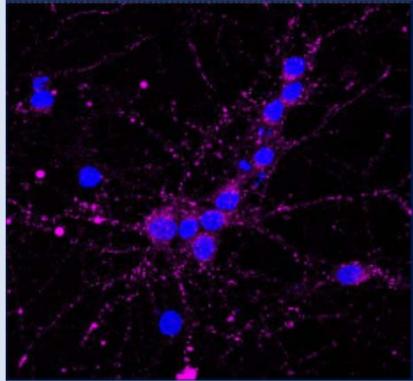
## Secondario

Goat anti-mouse-FITC

Donkey anti-rabbit Cy5



# Controlli



I controlli sono necessari per verificare l'accuratezza della reazione e per una corretta interpretazione dei risultati.

## Controllo positivo

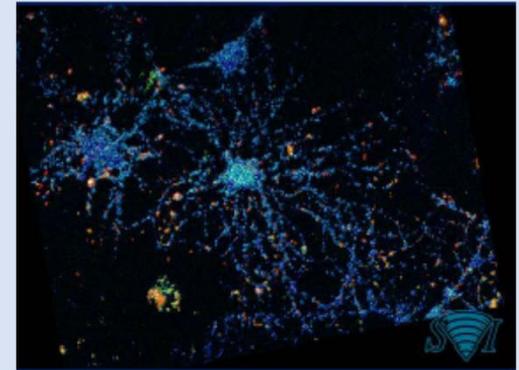
Utilizzare un campione che sicuramente esprime l'Ag ricercato per testare la specificità dell'Ab I

## Controllo negativo

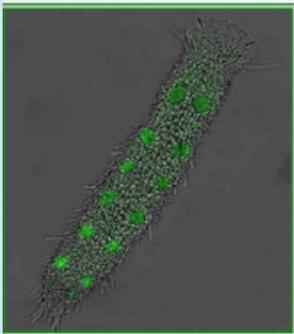
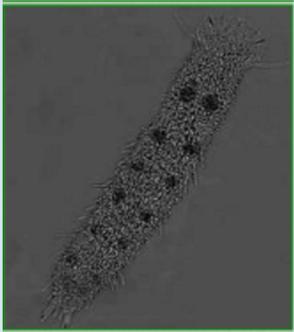
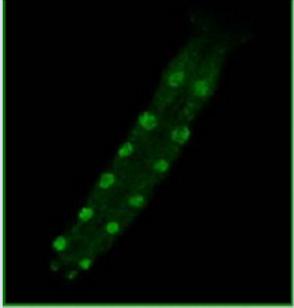
Specificità dell'Ab II

Utilizzare un campione privo dell'Ag ricercato

Omettere l'Ab I



# Fluorocromi



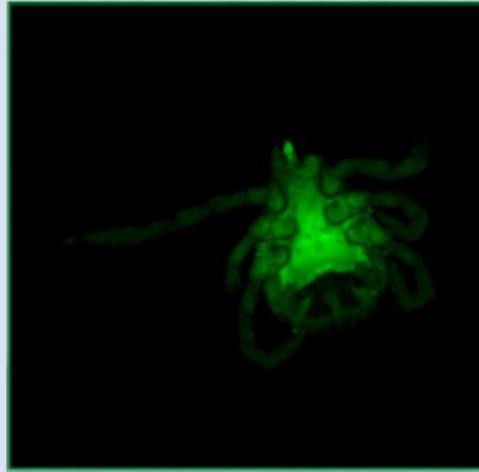
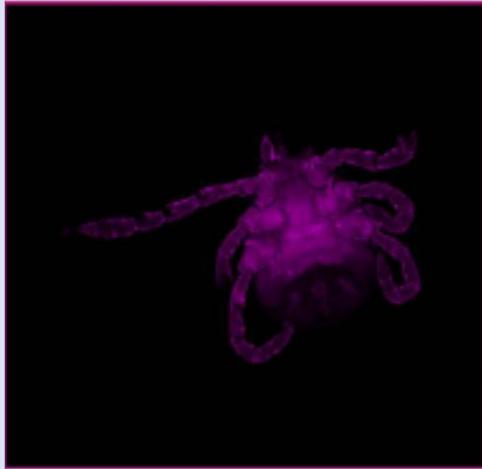
Il fluorocromo non deve modificare le proprietà delle proteine a cui si lega. Non devono comparire segni di:

- Denaturazione
- Precipitazione
- Perdita di capacità di legame con altre componenti funzionali o strutturali del campione in esame
- Presentare un'adeguata specificità
- Non deve andare incontro a processi di idrolisi e rilascio di colorante libero con aumento del segnale di fondo

Il fluoroforo deve possedere minima tossicità e/o attività biologica in modo da poter essere utilizzato su campioni in vivo.

# Autofluorescenza

Emissione spontanea di luce da parte di organelli citoplasmatici quali mitocondri o lisosomi e molecole biologiche quali collagene ed elastina, se opportunamente eccitati



↓  
Biomolecole con funzioni strutturali  
collagene ed elastina

↓  
Biomolecole funzionali o coinvolte in processi metabolici  
flavine, coenzimi porfirine clorofilla

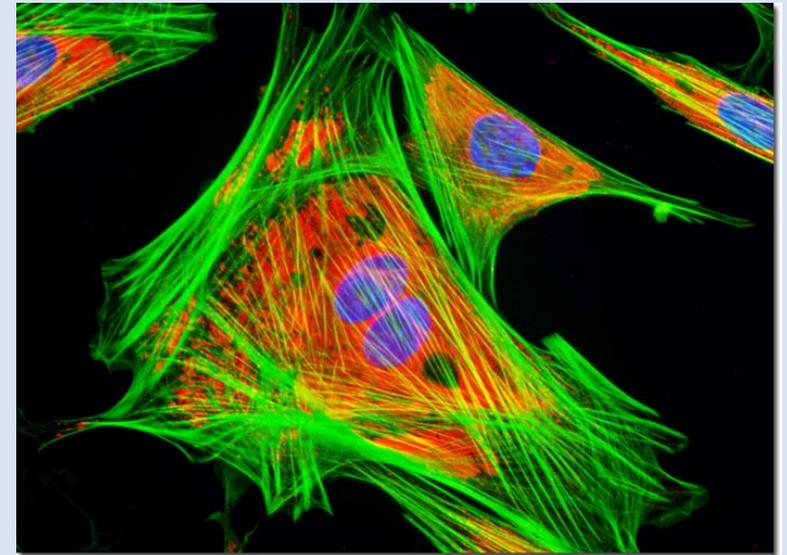
↓  
Proteine contenenti triptofano, tirosina e fenilalanina

I fissativi aldeidici, reagendo con ammine e proteine, possono generare molecole fluorescenti

# Intensità del segnale

Fattori che influenzano la quantità di fluorescenza emessa da un campione trattato con una certa quantità di fluoroforo:

- Concentrazione del fluorocromo
- Spessore del campione
- Coefficiente di estinzione del colorante
- Efficacia quantica del colorante
- Quantità di campione colorato presente nel campo visivo



# Coefficiente di estinzione



Riflette le caratteristiche d'assorbimento di luce da parte del colorante, ad una certa lunghezza d'onda, espresse dallo spettro di eccitamento del cromoforo.

Rappresenta la probabilità che una mole di fluorocromo riesca effettivamente ad assorbire un fotone incidente.

# Efficienza quantica

I fluorocromi hanno di solito un'efficienza quantica di circa 0.3 - 0.6.

Rapporto tra fluorescenza emessa ed energia luminosa assorbita.

In altre parole riflette la probabilità che una mole di fluorocromo che abbia assorbito un fotone, ne emetta un altro.

$$\text{n}^\circ \text{ fotoni emessi} / \text{n}^\circ \text{ fotoni assorbiti} = I_{Em}/I_{ex}$$

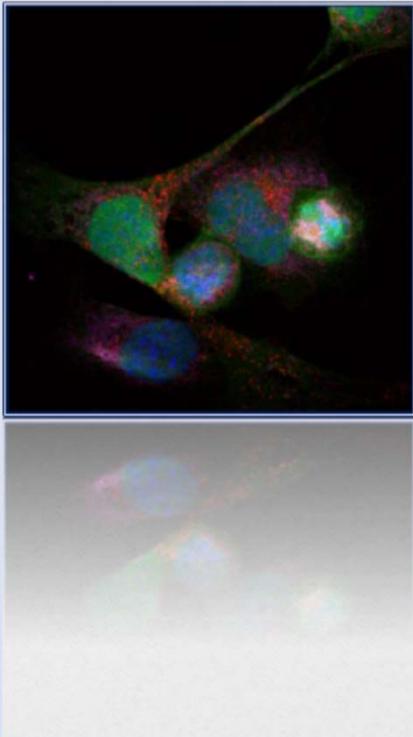
# Brillantezza del segnale

$$B = NEQ^*$$

*N=numero di molecole di colorante   E=coefficiente di estinzione   Q=efficienza quantica*

I risultati migliori in termini di intensità del segnale, per tempi relativamente lunghi d'analisi, si possono ottenere aumentando la concentrazione del fluoroforo ed abbassando l'intensità della luce eccitante, per ridurre la velocità di estinzione del colorante.

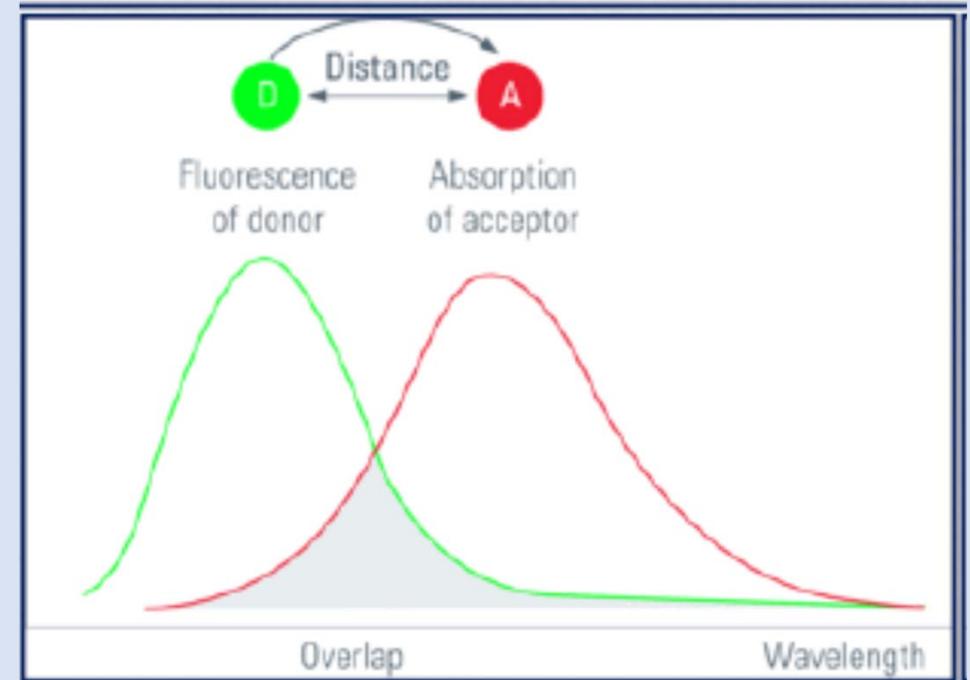
# Decadimento del segnale



Il fenomeno di fading (decadimento) del fluoroforo comprende il quenching (spegnimento) ed il photobleaching (fotodecadimento)

# Decadimento del segnale

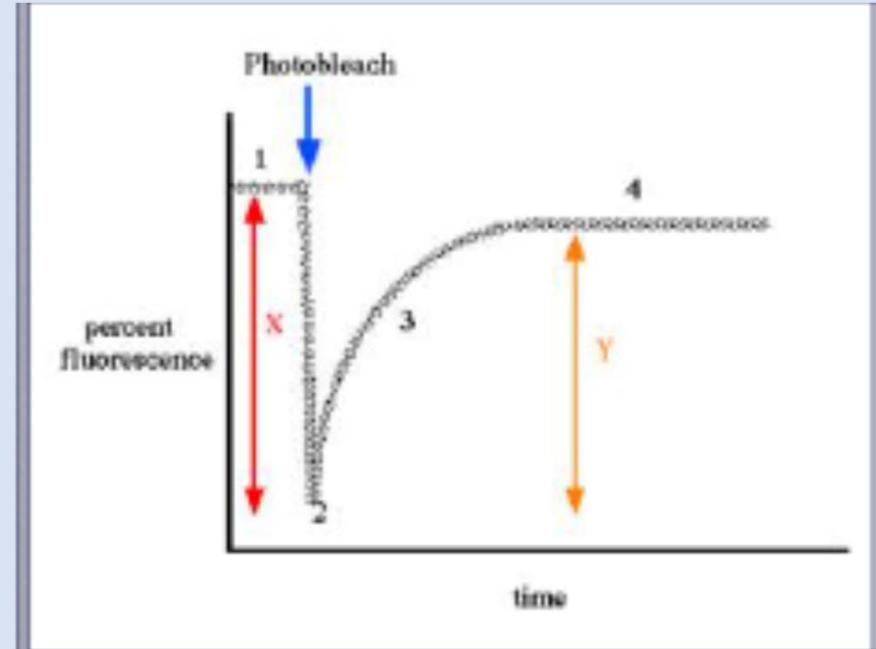
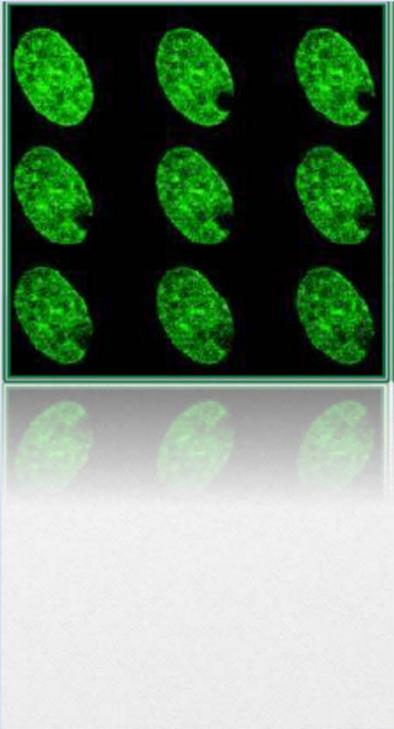
## Quenching



Il quenching è il trasferimento di energia dal fluorocromo ad un accettore che interagisce con il colorante (collisione, interferenza chimica, combinazione posizionale tra molecole in risonanza energetica). Di solito il fluorocromo non subisce modificazioni chimiche. Il quenching di risonanza sta alla base di una tecnica relativamente recente nota come FRET, in grado di misurare distanze al di sotto della risoluzione laterale del microscopio.

# Decadimento del segnale

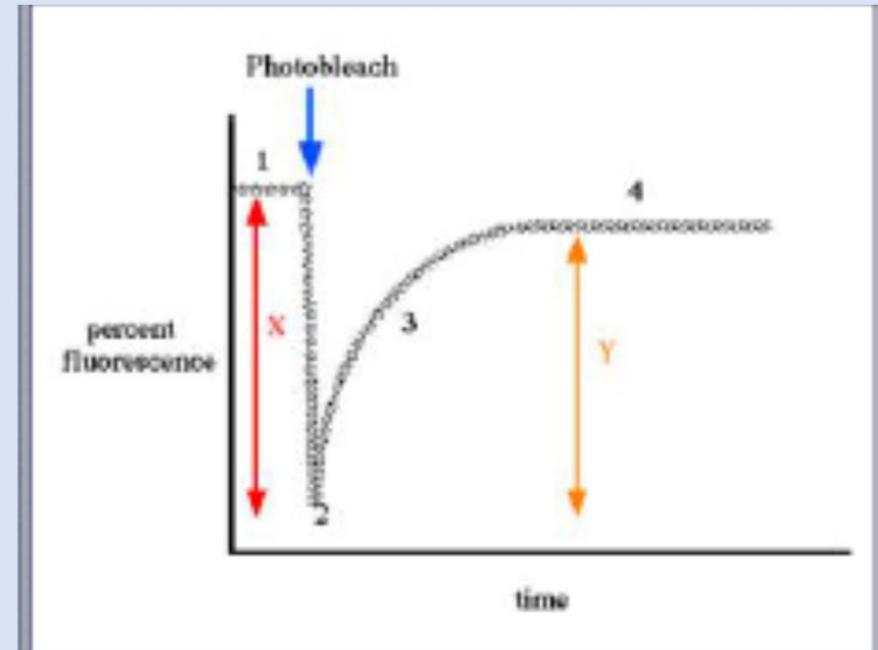
## *photobleaching*



Il photobleaching comporta la decomposizione irreversibile del colorante. Il tasso di fotodecadimento dipende da diversi fattori: reattività chimica del fluorocromo, ambiente intracellulare, intensità e lunghezza d'onda eccitante

# Decadimento del segnale

## *photobleaching*



Il fenomeno del photobleaching viene utilizzato nelle tecniche di recupero della fluorescenza nota come FRAP, o di perdita di fluorescenza in aree adiacenti a quella di photobleaching nota come FLIP. Entrambe permettono di studiare i flussi molecolari inter - ed intracellulari.

Il fotodecadimento del fluoroforo può essere rallentato utilizzando un antiossidante (antifade reagent), quale la p-fenilendiammina o n-propilgallato, aggiunti al montante. L'antifade è incompatibile con le cellule in vivo.

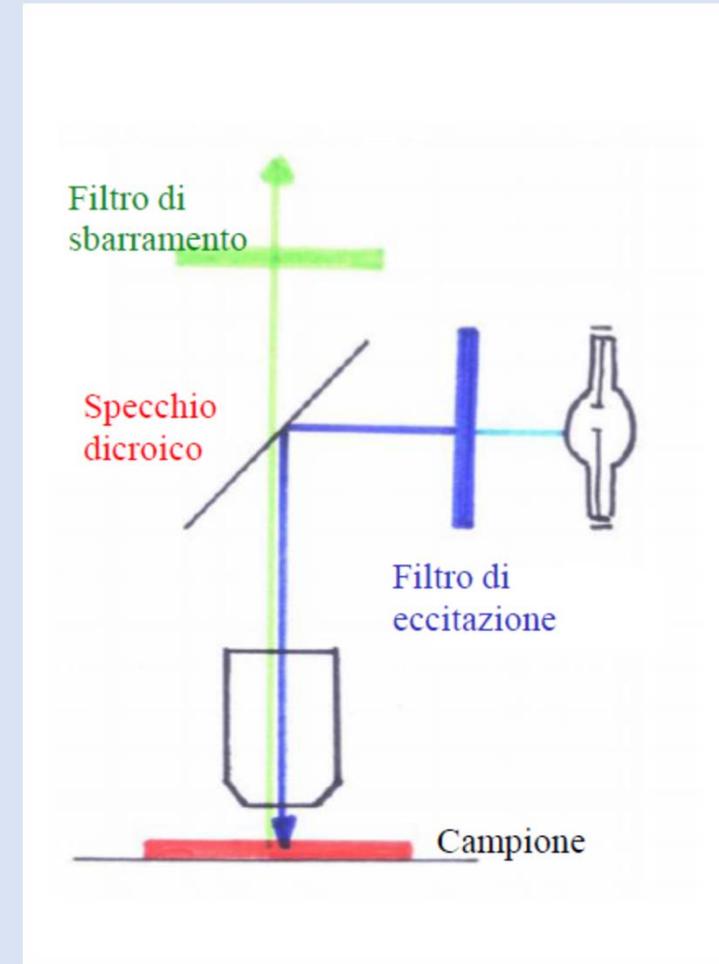
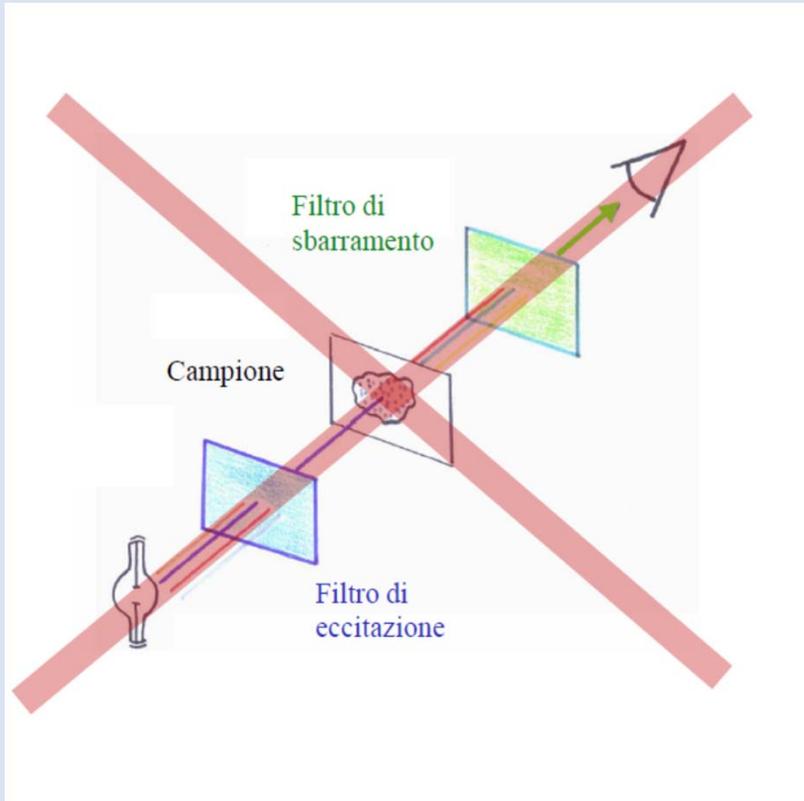
# Fluorofori per proteine

<i>Probe</i>		<i>Eccitazione</i>		<i>Emissione</i>	
FITC	488		525		
PE	488		575		
APC	630		650		
PerCP™	488		680		
Cascade Blue	360		450		
Coumerin-phalloidin	350		450		
Texas Red™	610		630		
Tetramethylrhodamine-amines	550		575		
CY3 (indotrimethinecyanines)	540		575		
CY5 (indopentamethinecyanines)	640		670		

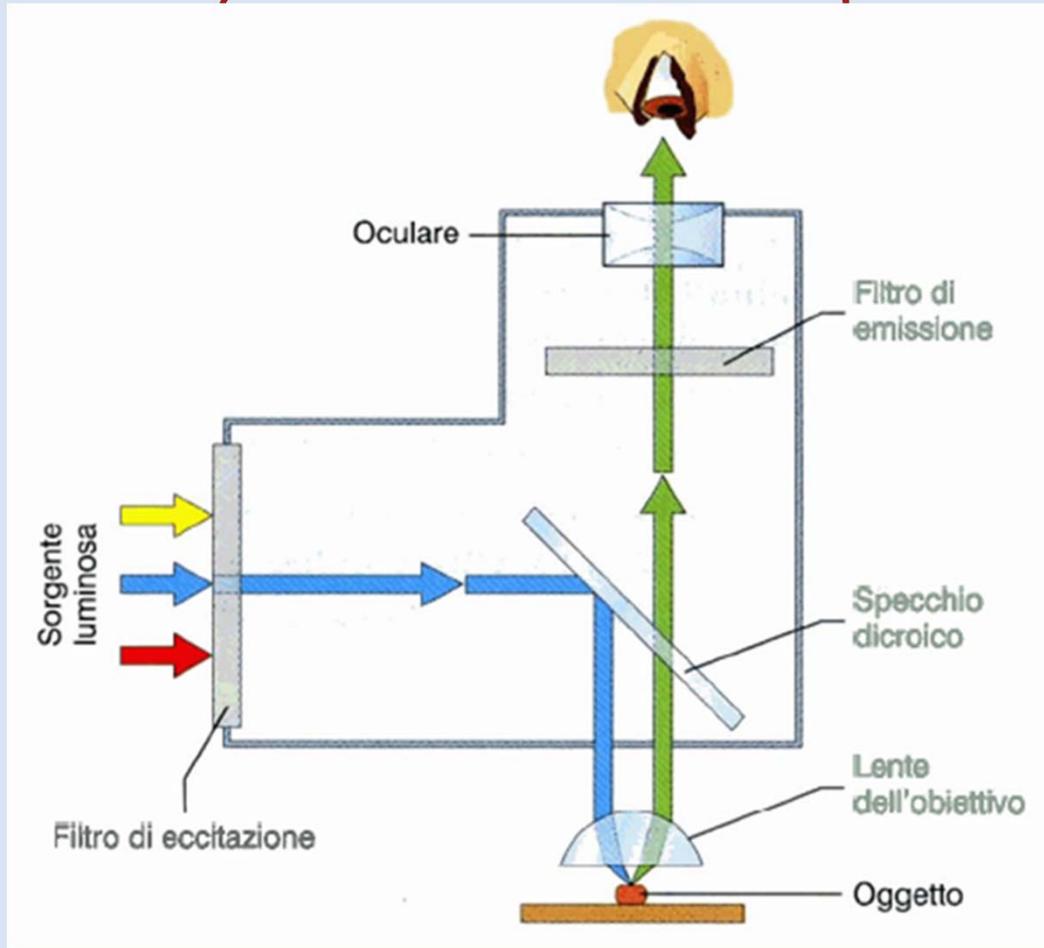
# Fluorofori per acidi nucleici

• Hoechst 33342 (AT rich) (uv)	346			460
• DAPI (uv)	359			461
• POPO-1	434			456
• YOYO-1	491			509
• Acridine Orange (RNA)	460			650
• Acridine Orange (DNA)	502			536
• Thiazole Orange (vis)	509			525
• TOTO-1	514			533
• Ethidium Bromide	526			604
• PI (uv/vis)	536			620
• 7-Aminoactinomycin D (7AAD)	555			655

# Principio di un microscopio ad epifluorescenza



# Principio di un microscopio ad epifluorescenza



Il filtro di eccitazione lascia passare solo luce blu (450-490nm)

Lo specchio dicroico riflette la luce al di sotto dei 510nm ma è trasparente alla luce con lunghezze d'onda superiori

Il filtro di emissione esclude i segnali che non sono di interesse

# Principio di un microscopio ad epifluorescenza



## **Sistemi di illuminazione:**

Lampade a Mercurio o Xenon

## **Filtri:**

Eccitazione, Dicroico, Emissione

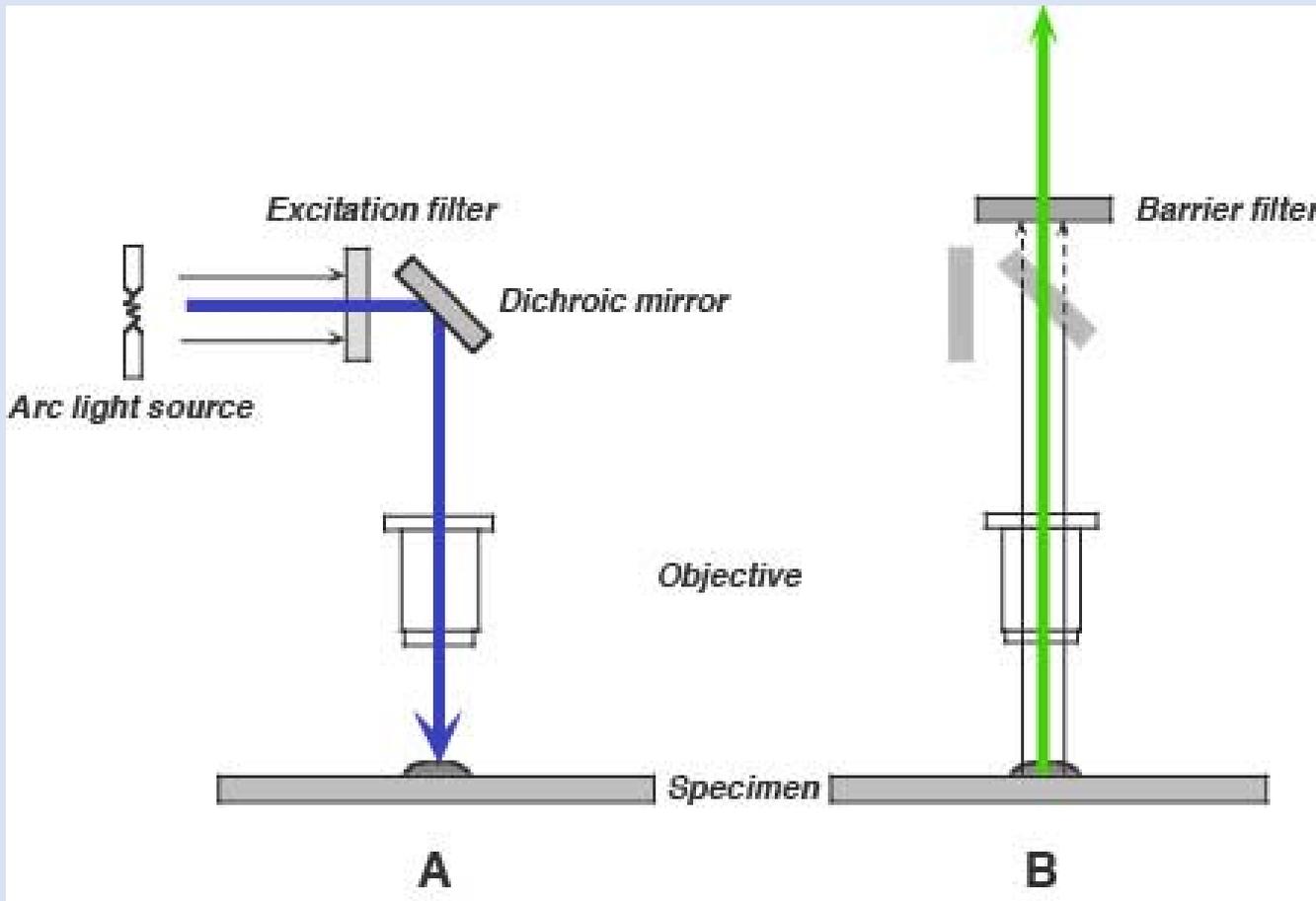
## **Obiettivo (condensatore):**

Alta apertura numerica, bagno d'olio per ingrandimenti superiori a 40X

## **Dispositivi di detezione del segnale:**

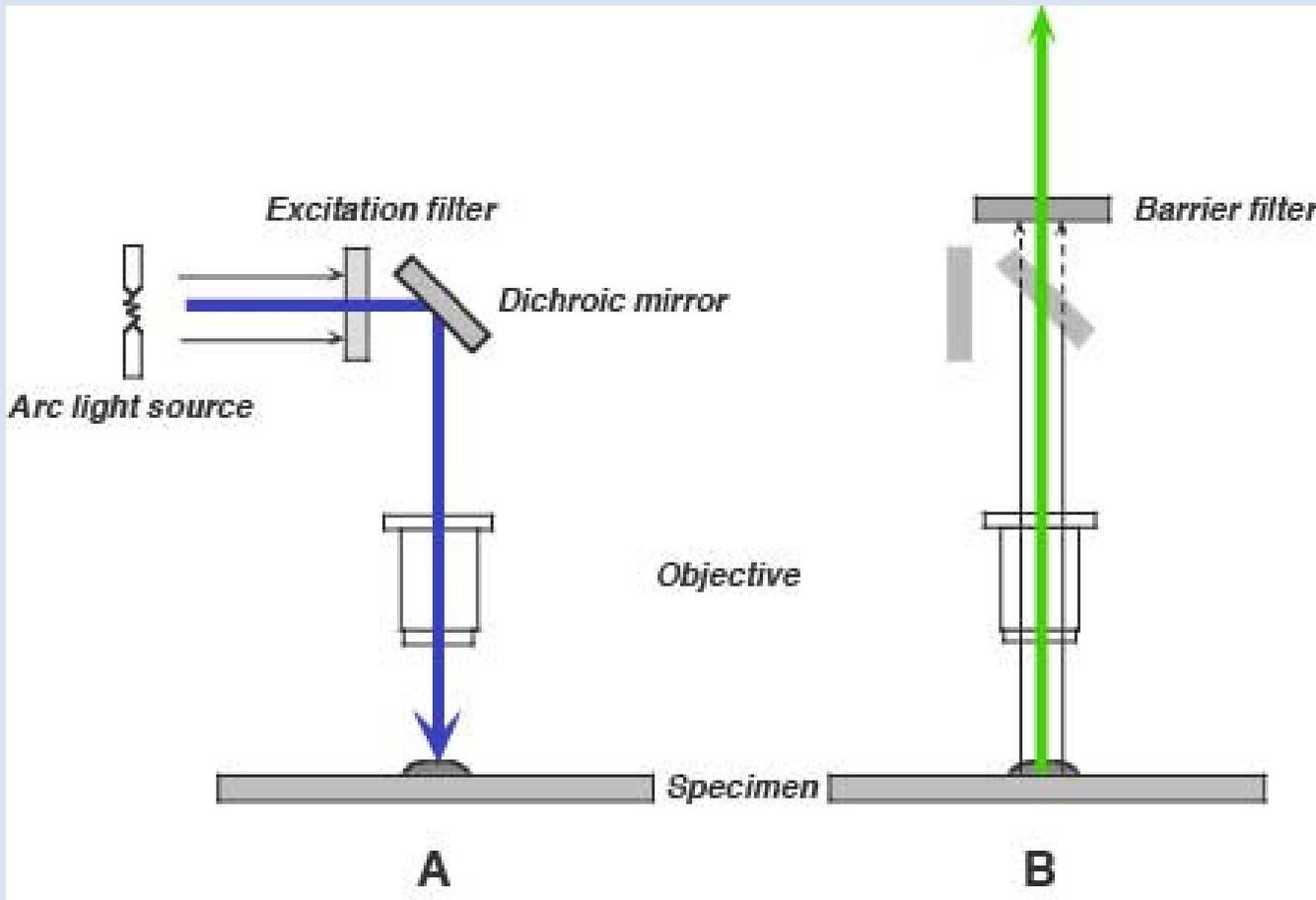
Oculari, Pellicola fotografica,  
Sensore fotografico (CCD), Fotomoltiplicatore

# Principio di un microscopio ad epifluorescenza



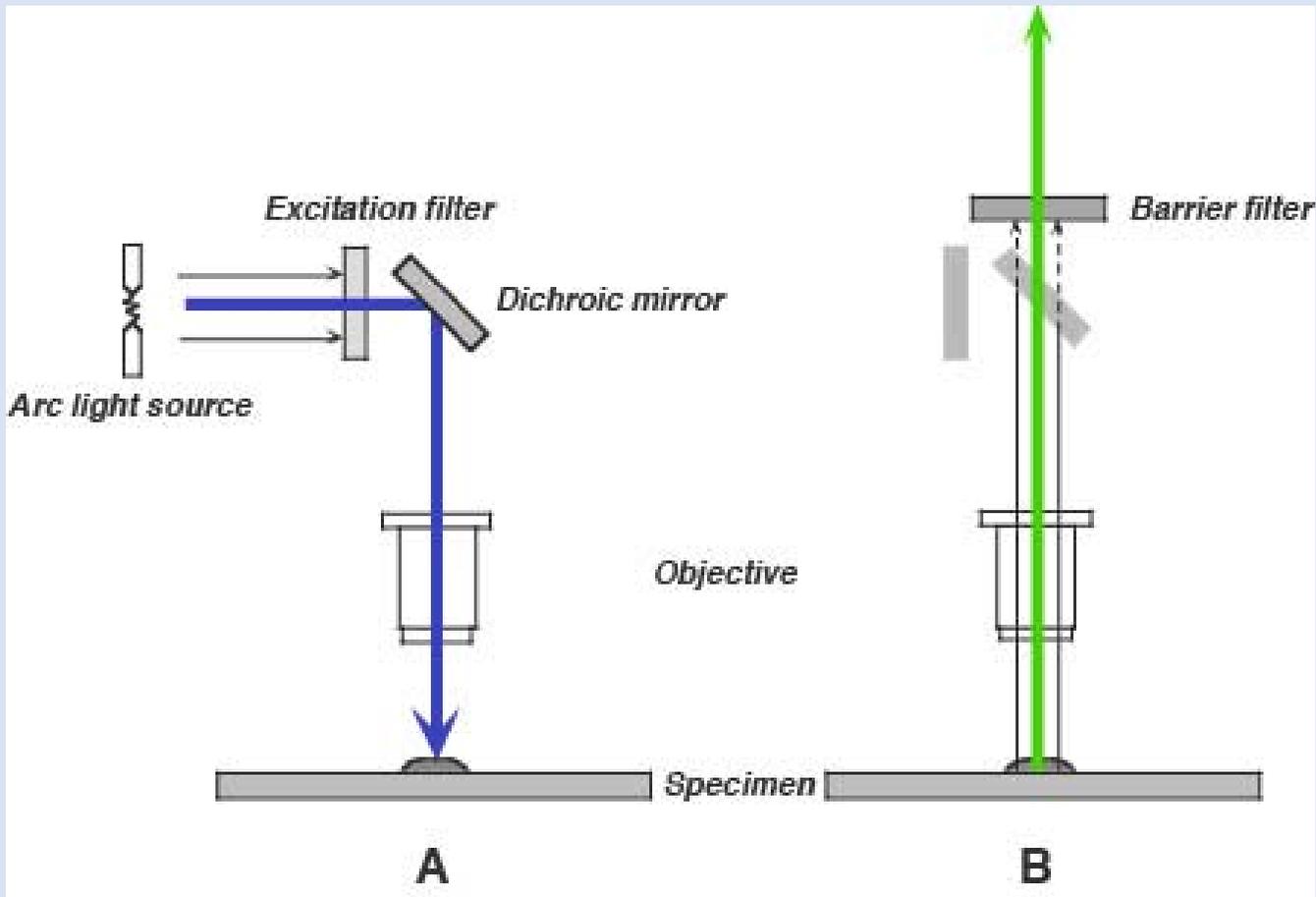
La lunghezza d'onda dell'illuminazione (eccitazione:  $\lambda_{ex}$ ) viene scelta posizionando un filtro dopo la sorgente di luce che limita la trasmissione della luce a un intervallo ristretto di lunghezze d'onda.

# Principio di un microscopio ad epifluorescenza



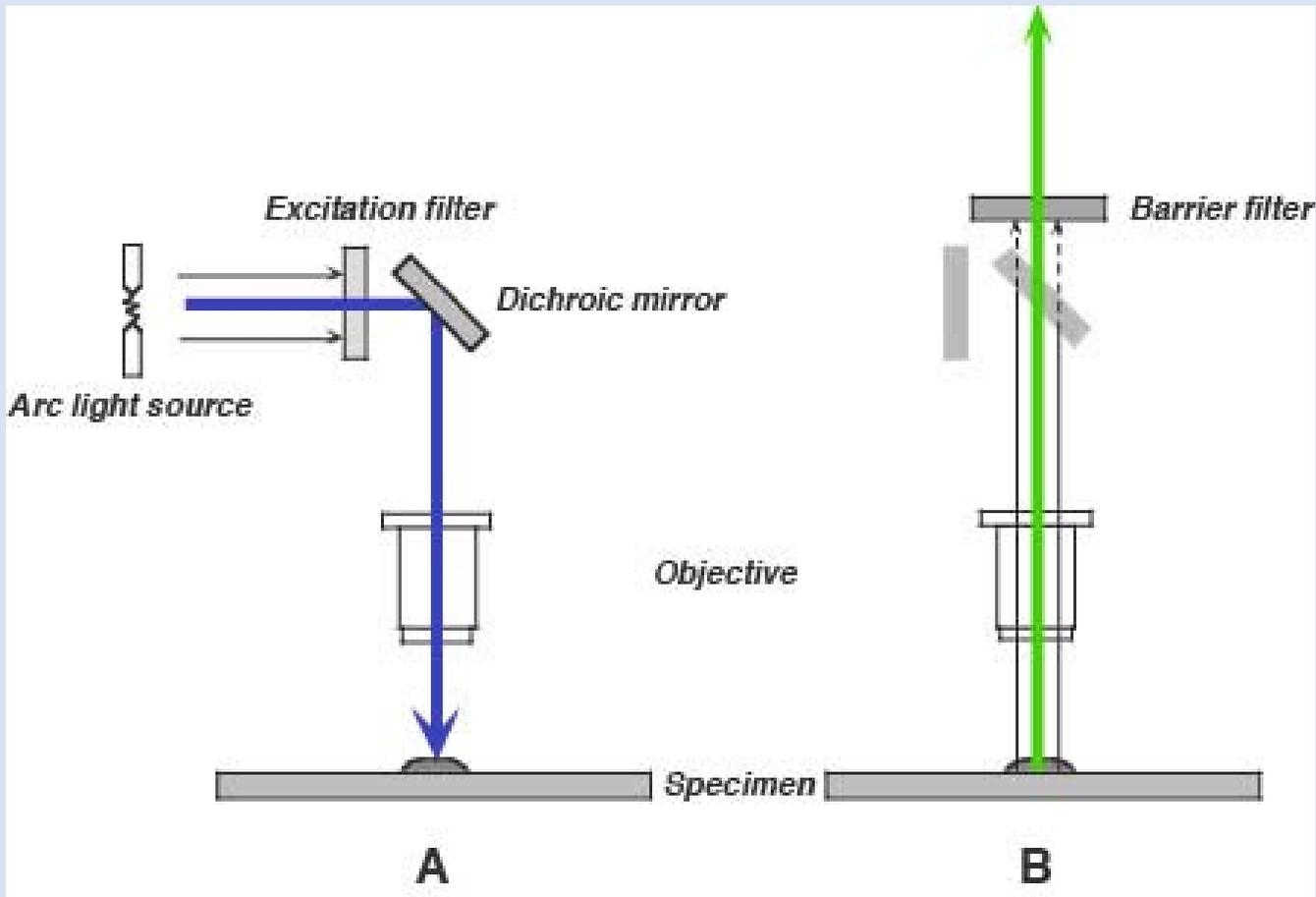
La luce quindi colpisce uno specchio dicroico (beam splitter) e viene riflessa attraverso la lente dell'obiettivo e sul campione. Le molecole di pigmento all'interno del campione (sia intrinseche che applicate) assorbono la luce e reirradiano l'energia a una lunghezza d'onda maggiore: questa è la fluorescenza.

# Principio di un microscopio ad epifluorescenza



La lente dell'obiettivo raccoglie questa luce fluorescente emessa (emissione:  $E_m$ ), che passa quindi attraverso lo specchio dicroico.

# Principio di un microscopio ad epifluorescenza



Solo la luce emessa da molecole fluorescenti all'interno del campione viene osservata o fotografata

# Principio di un microscopio ad epifluorescenza

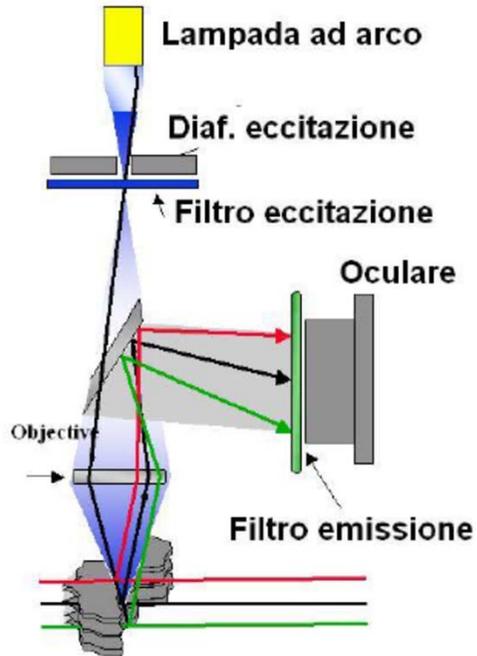
Questa disposizione di tre filtri ottici è indicata come un cubo di fluorescenza, poiché sono quasi sempre montati insieme in una montatura metallica cubica. L'utente seleziona diverse lunghezze d'onda selezionando diversi set di filtri. La disposizione meccanica può essere un supporto per cubetti filtrante scorrevole o rotante.



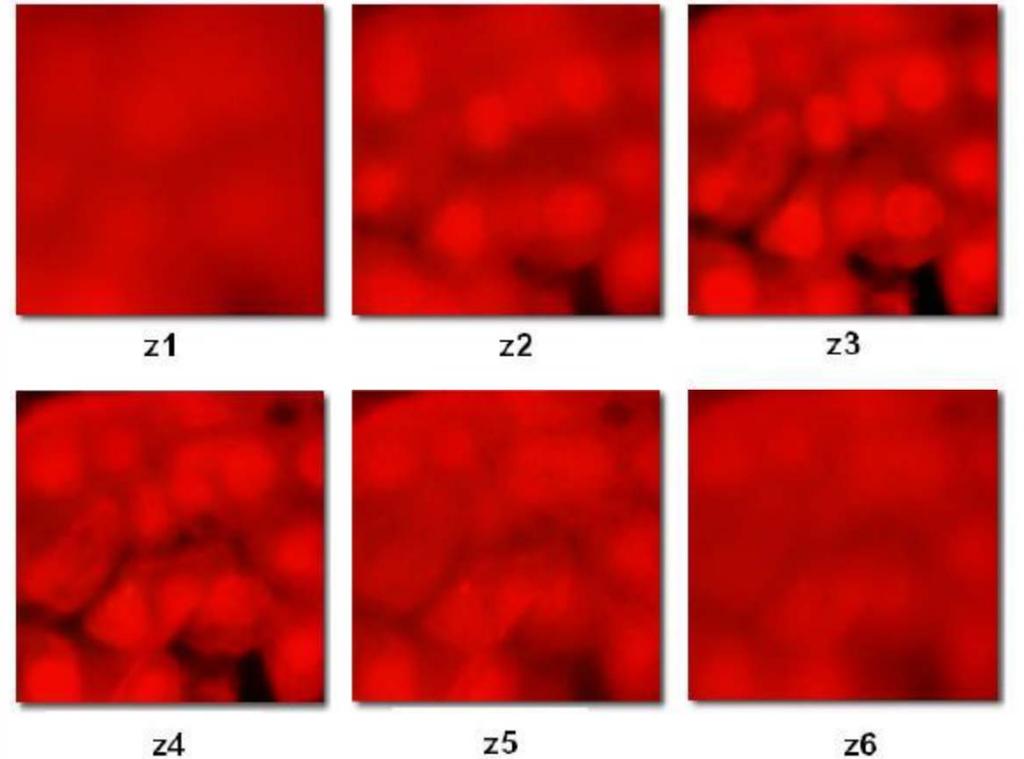
- 1: Ex filter
- 2: Dichroic mirror
- 3: Em (barrier) filter

# Effetto della profondità di campo

Microscopio a Fluorescenza

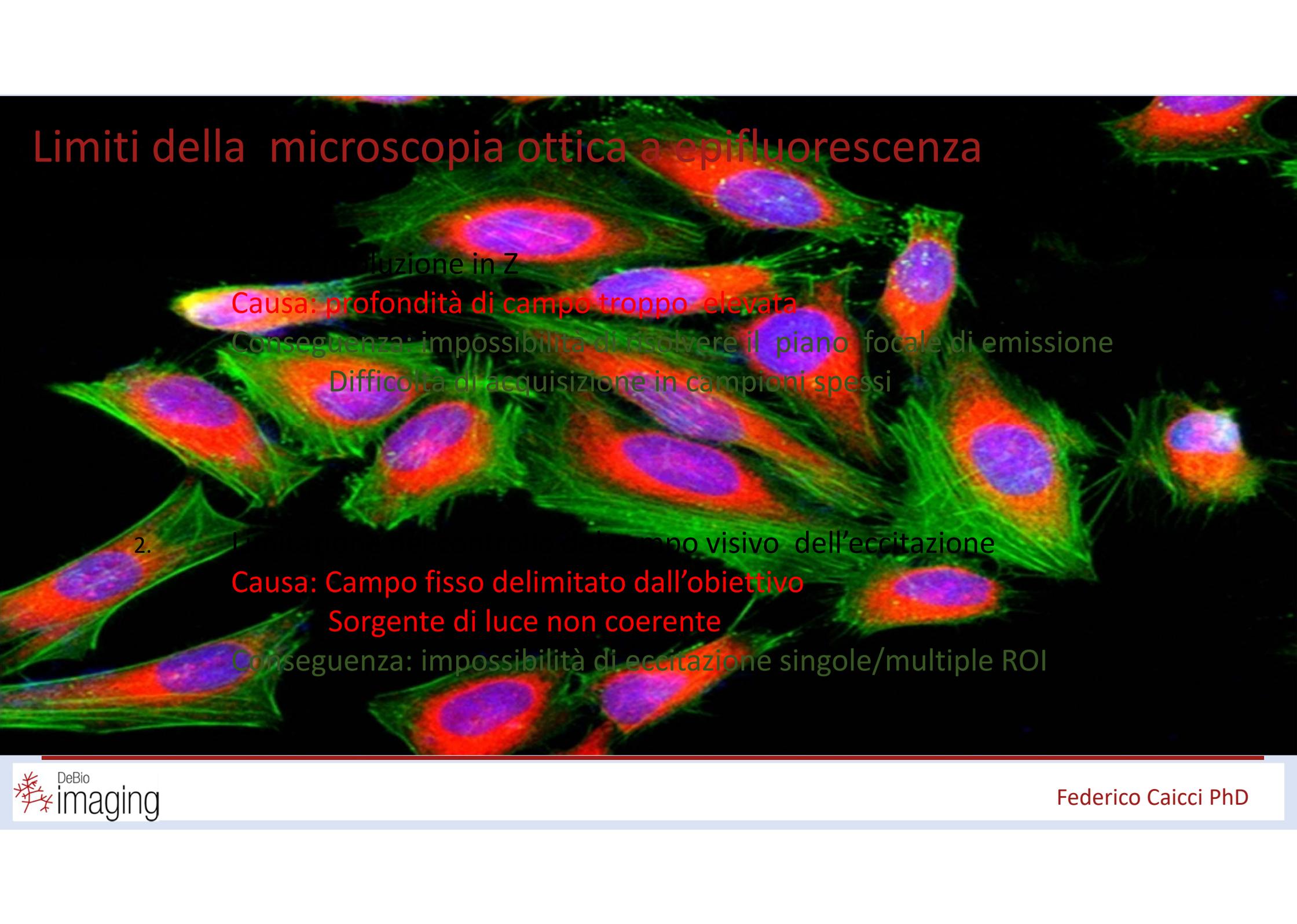


© 1993-2004 J. Paul Robinson -  
Purdue University Cytometry Laboratories



La luce proviene da piani diversi da quello del fuoco e produce immagini poco nitide

# Limiti della microscopia ottica a epifluorescenza



1. Diffusione in Z

**Causa: profondità di campo troppo elevata**

Conseguenza: impossibilità di risolvere il piano focale di emissione

Difficoltà di acquisizione in campioni spessi

2.

1. Campo visivo dell'eccitazione

**Causa: Campo fisso delimitato dall'obiettivo**

**Sorgente di luce non coerente**

Conseguenza: impossibilità di eccitazione singole/multiple ROI

# Limiti della microscopia ottica a epifluorescenza

Cosa significa in realtà?

Microscopio a epifluorescenza non può risolvere o distinguere tra due oggetti distanti tra loro meno di 200 nm.

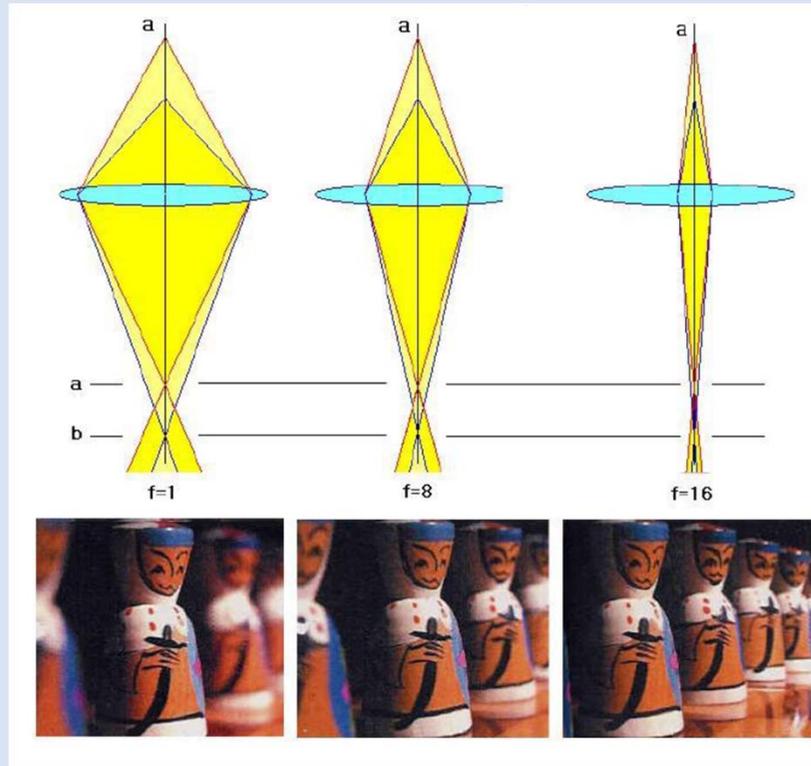
Rilevo tutta la luce messa a fuoco e quella fuori fuoco nel campione

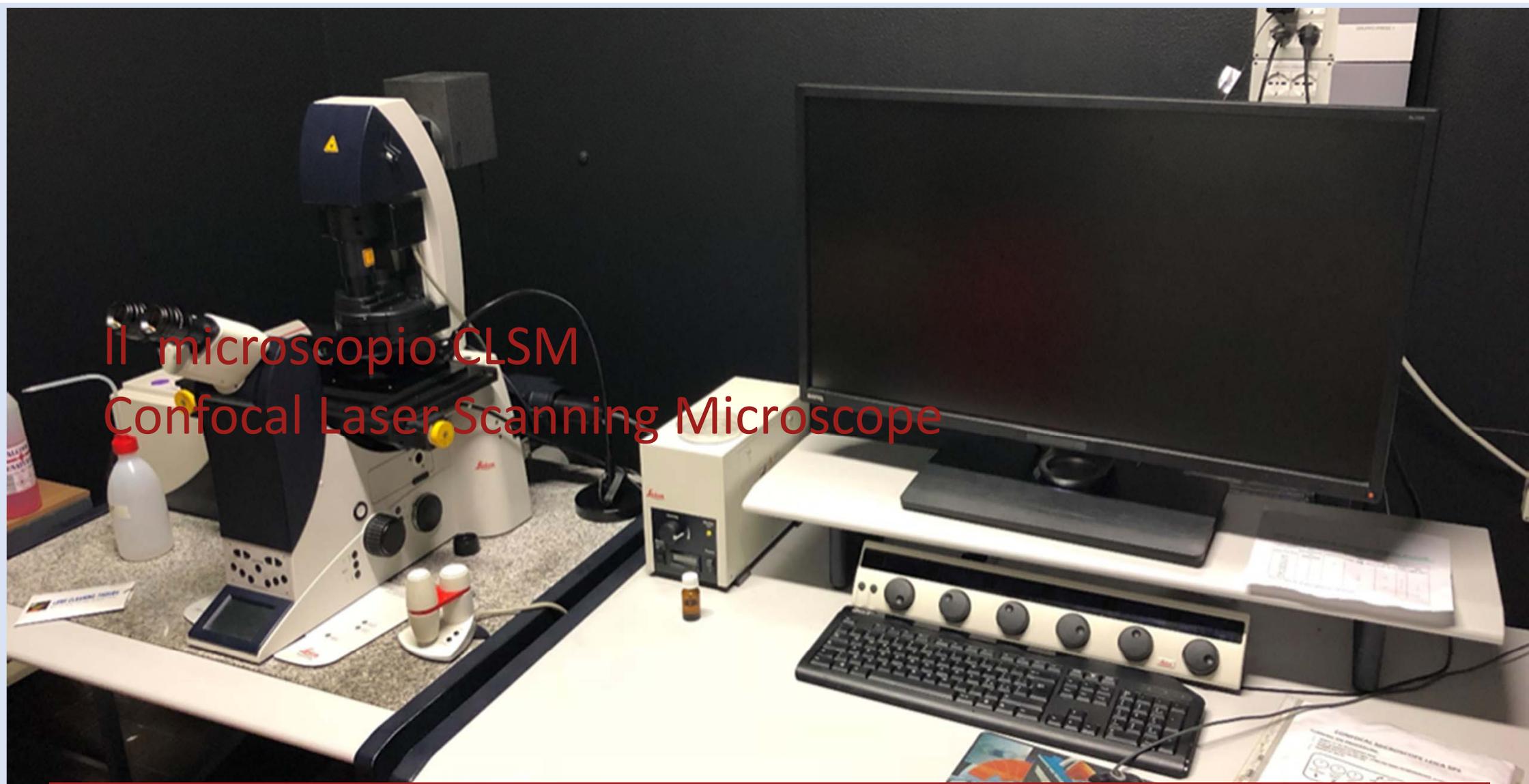
Se ho due sonde, non potrei essere sempre in grado di risolvere la loro relazione spaziale l'una con l'altra

Non si hanno informazioni sulla profondità, dunque non è possibile trarre alcuna conclusione sui volumi

# Risoluzione spaziale Z

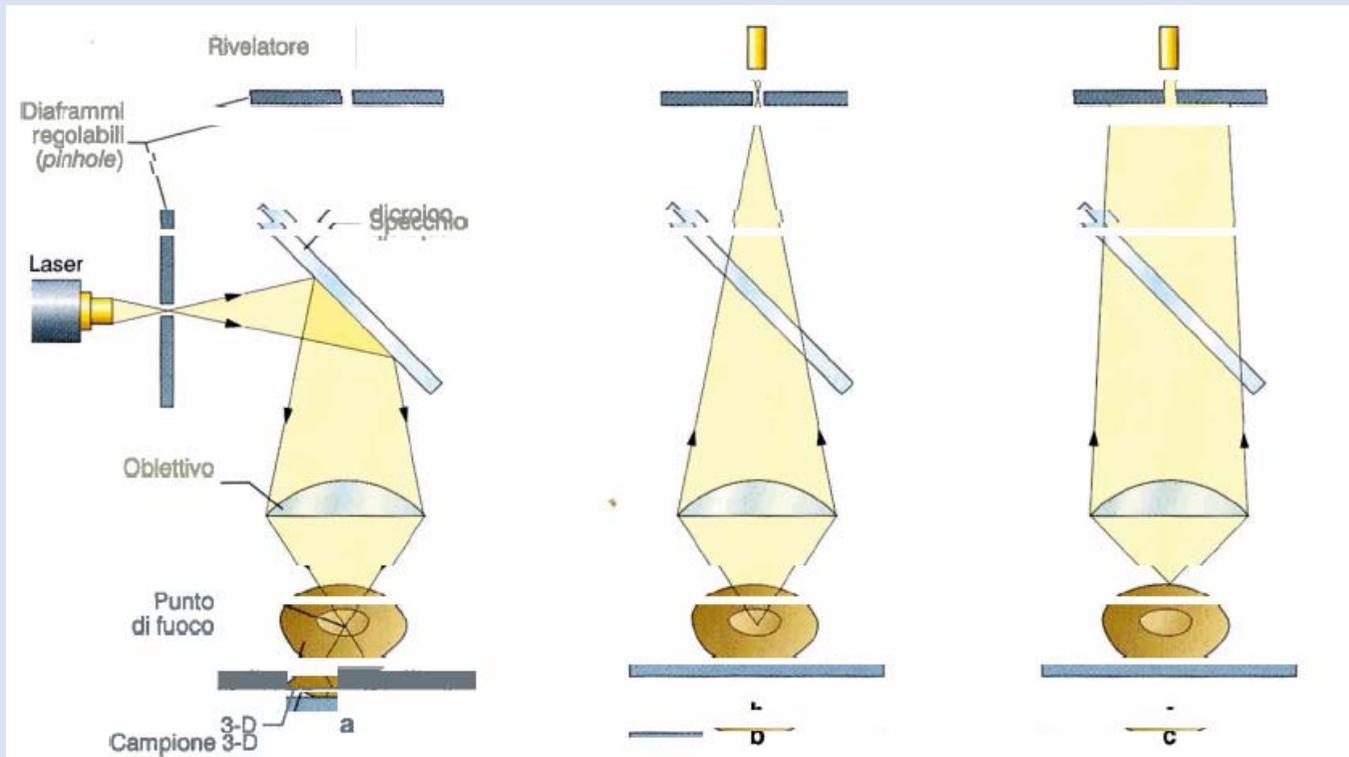
Profondità di campo





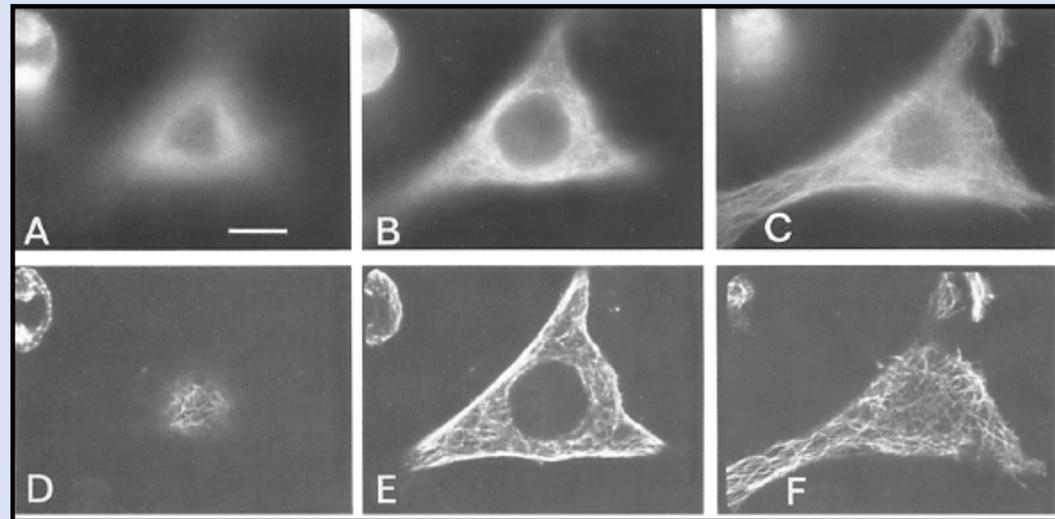
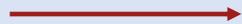
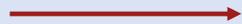
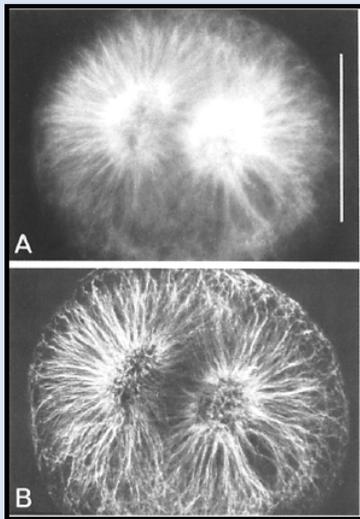
Il microscopio CLSM  
Confocal Laser Scanning Microscope

# Il microscopio confocale

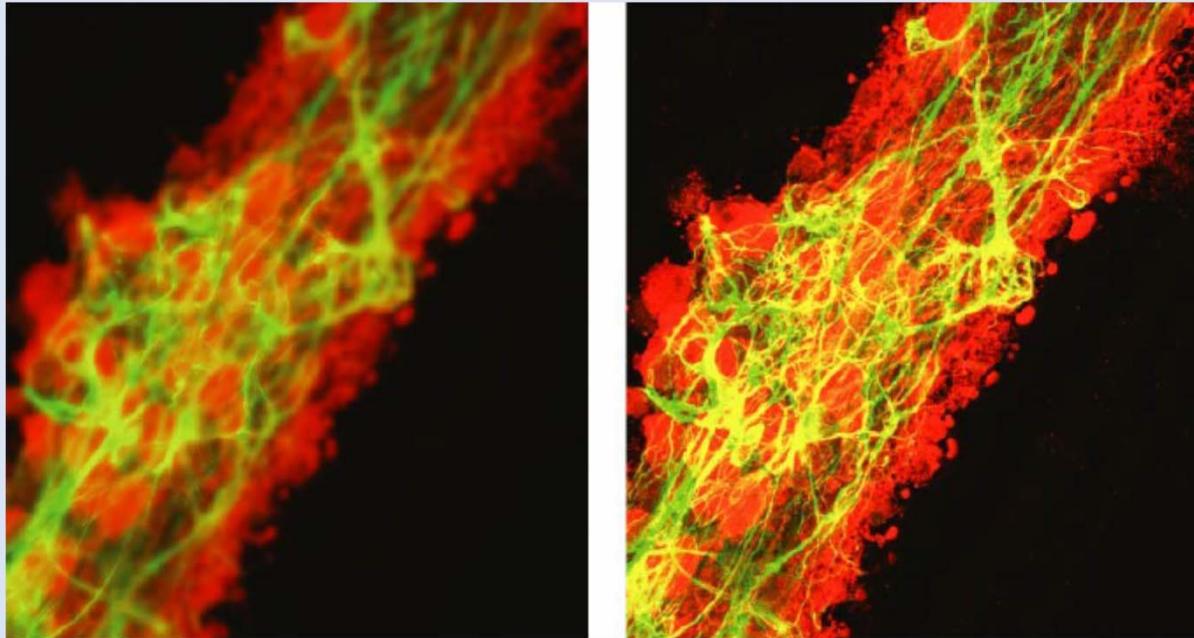


La microscopia confocale si avvale di una particolare configurazione ottica messa a punto da M. Minsky nel 1957, che consiste essenzialmente nell'illuminare non tutto il campione, ma solo il piano focale che si sta osservando e nel raccogliere la luce solo dal medesimo

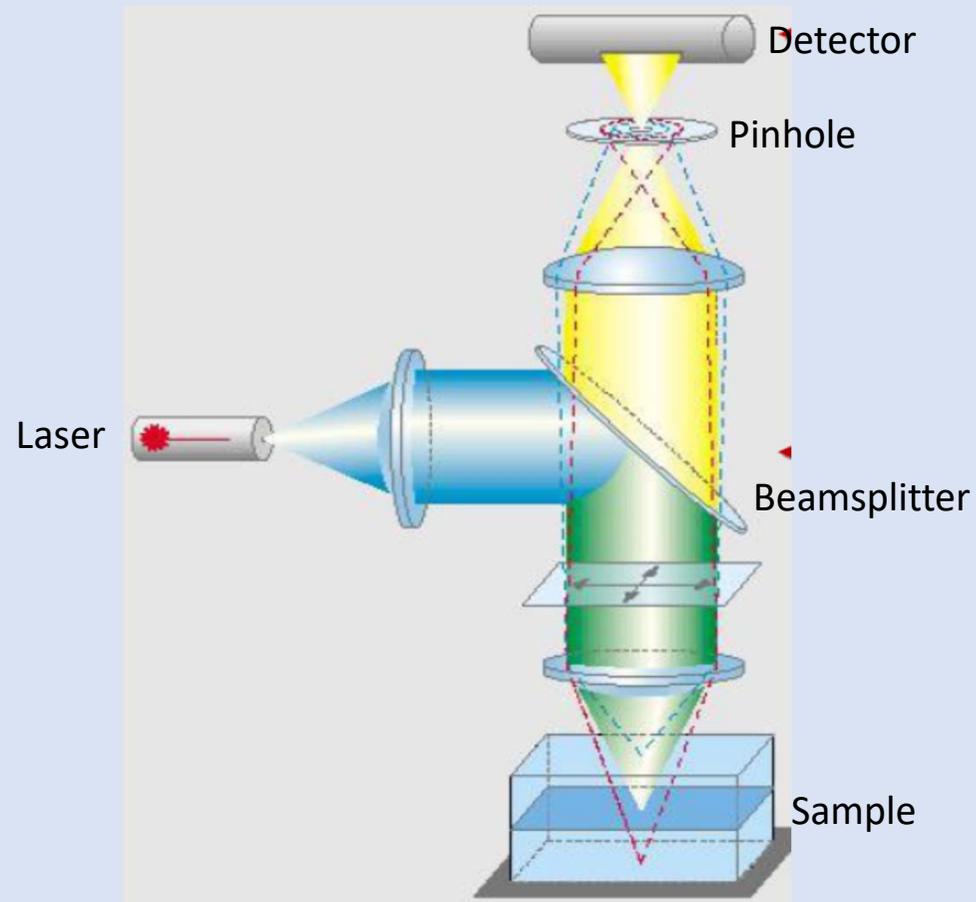
## Il Microscopio confocale vs Microscopio a epifluorescenza



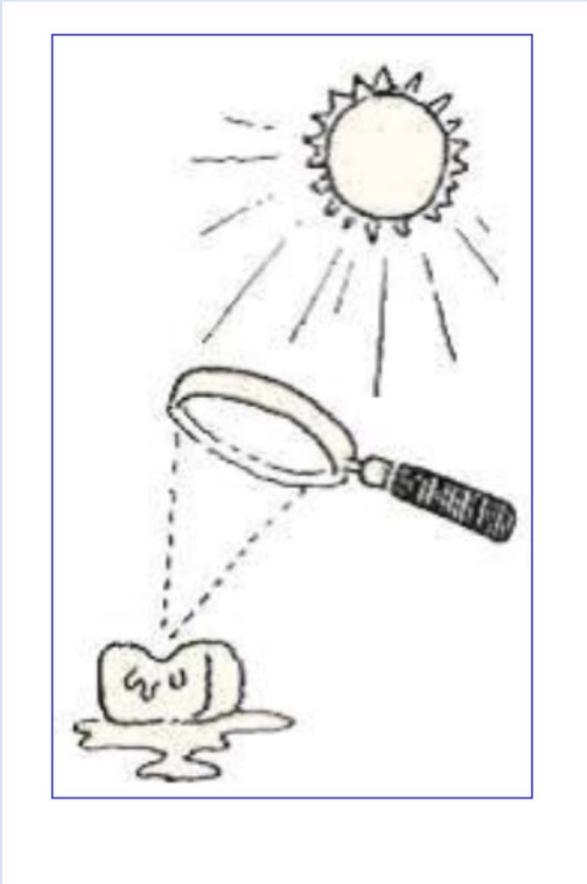
## II Microscopio confocale vs Microscopio a epifluorescenza



# Il microscopio CLSM (Confocal Laser Scanning Microscopy)

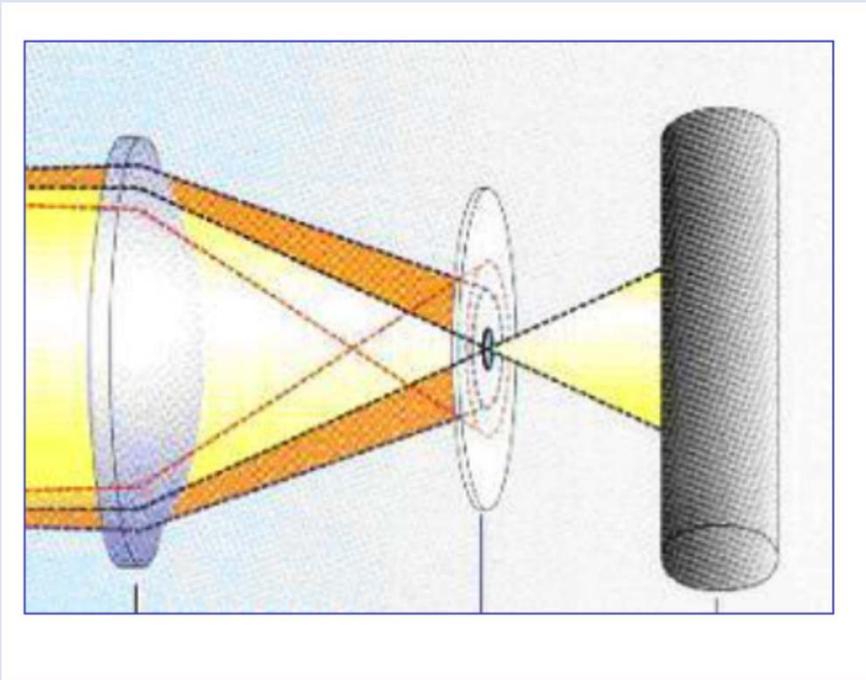


# Proprietà del fuoco di una lente



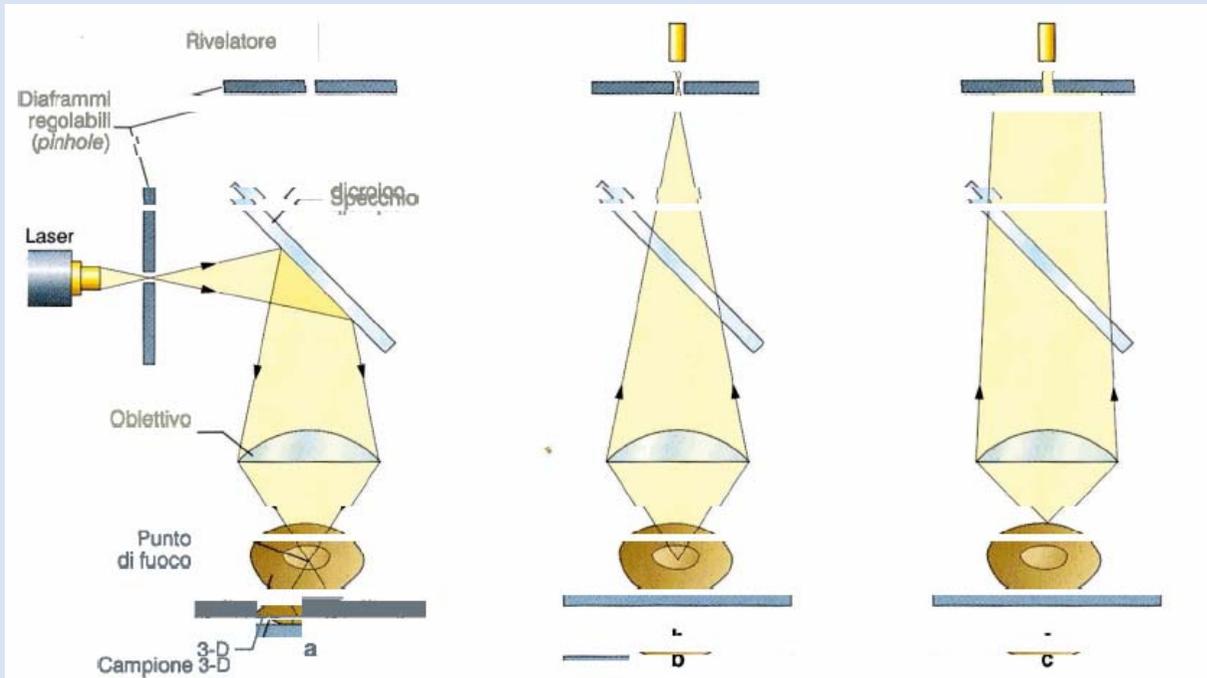
Zona dello spazio in cui viene concentrata tutta l'energia luminosa che attraversa una lente

## Pinhole (foro stenoscopico)



Diaframma posto lungo l'asse ottico di una lente nella posizione di fuoco

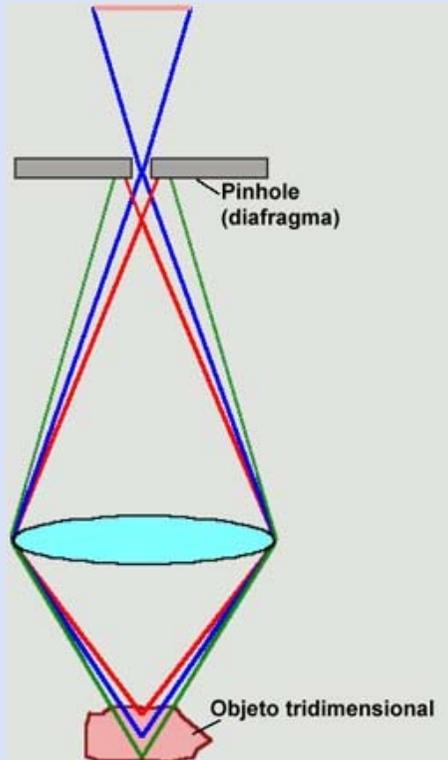
# Il microscopio confocale



Il pinhole di illuminazione e quello di rivelazione appartengono a piani focali coniugati e si dicono dunque **confocali**, da cui il nome di questa particolare tecnica microscopica.

L'immagine risultante viene quindi depurata dalle componenti fuori fuoco e si ha un incremento della risoluzione massima.

# Pinhole (foro stenoscopico)

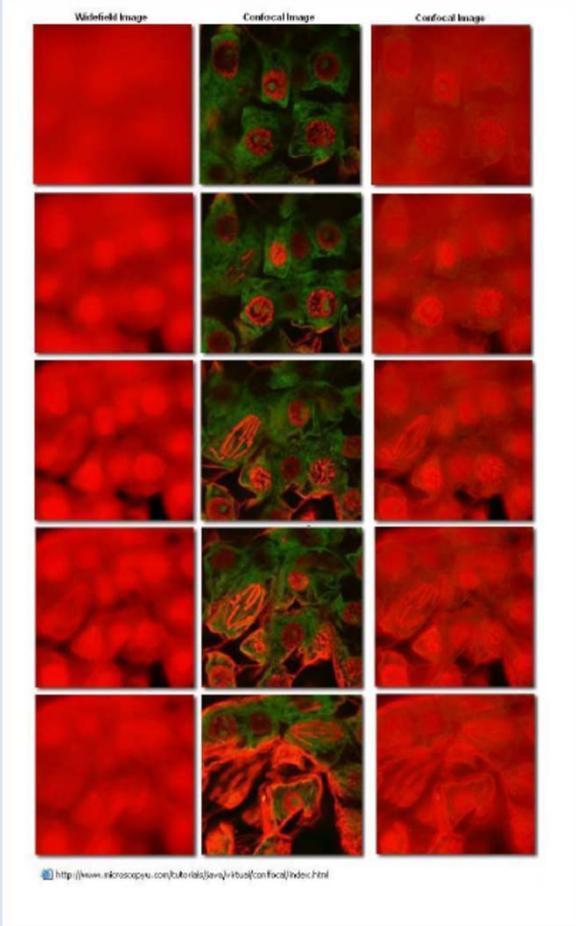
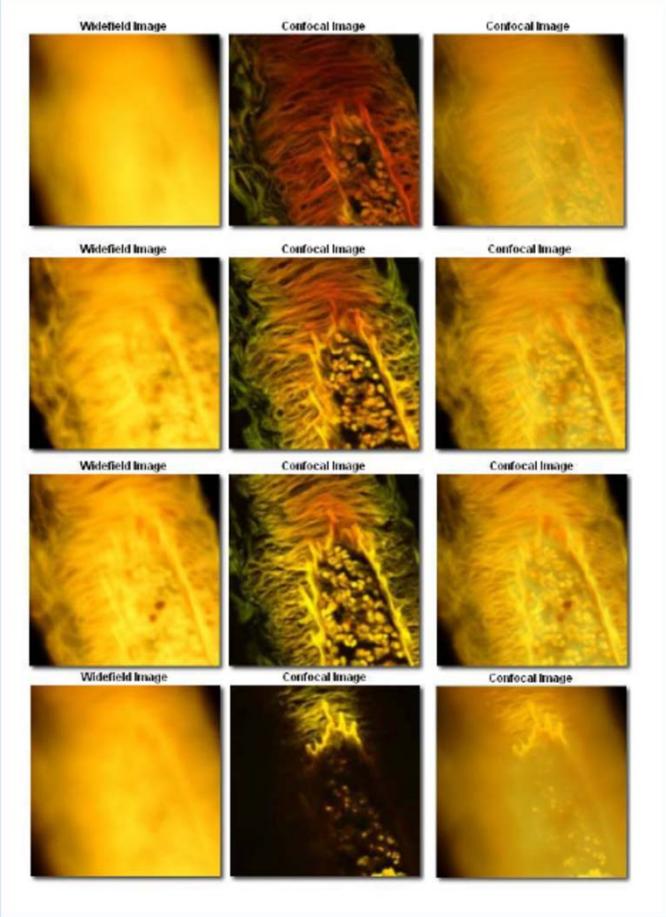


Oggetto tridimensionale (rosa) che ha diversi piani focali

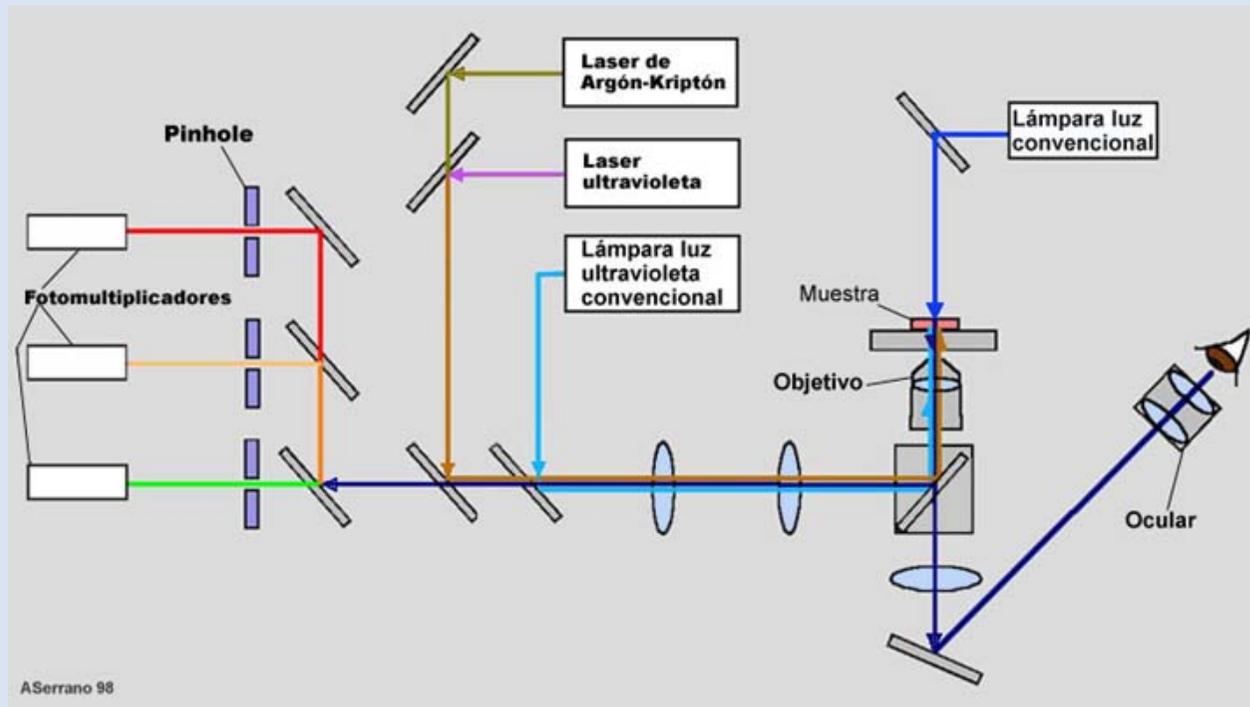
La luce di tutti i piani viene rifratta dalla lente, ma solo quella che proviene dal piano centrale, è a fuoco (fascio blu), ed è in grado di passare attraverso il **pinhole**

L'immagine delle strutture situate nel piano focale non risente delle interferenze dalla luce proveniente dal resto dell'oggetto.

# Effetto del Pinhole



# Il microscopio CLSM (Confocal Laser Scanning Microscopy)



**Lampada a luce visibile** standard di qualsiasi microscopio che ci consente di localizzare campioni in campo chiaro o contrasto di fase.

**Lampada a vapori di mercurio.** Solitamente viene utilizzato per osservare i campioni e individuare le aree di interesse da sottoporre a scansione in condizioni di confocale.

**Laser.** Il più usato è l'argon-kriptón che dà tre linee di output. È possibile montare simultaneamente più sorgenti laser.

Nelle installazioni dove c'è più di un laser, il secondo è solitamente quello che emette nell'ultravioletto.

# Il microscopio CLSM (Confocal Laser Scanning Microscopy)

Si utilizzano laser a gas ionizzato e ciascun laser ha delle linee di emissione per un limitato numero di  $\lambda$

ARGON



Blu (488nm) e Verde (514nm)

He-Ne



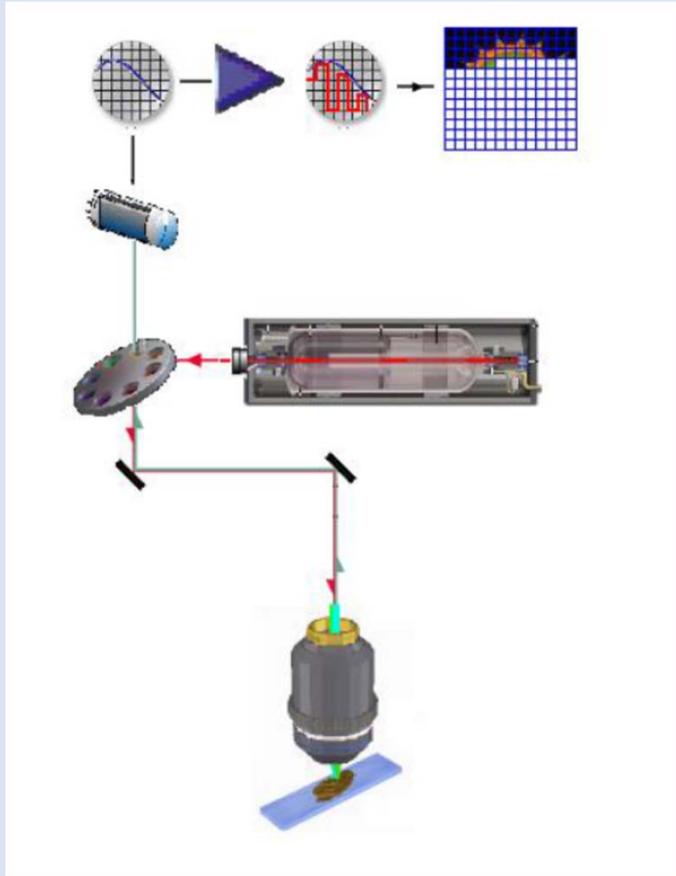
Verde (543nm) e Rosso (633nm)

Krypton



Giallo (568nm) e Rosso (647nm)

# Il microscopio CLSM (Confocal Laser Scanning Microscopy)



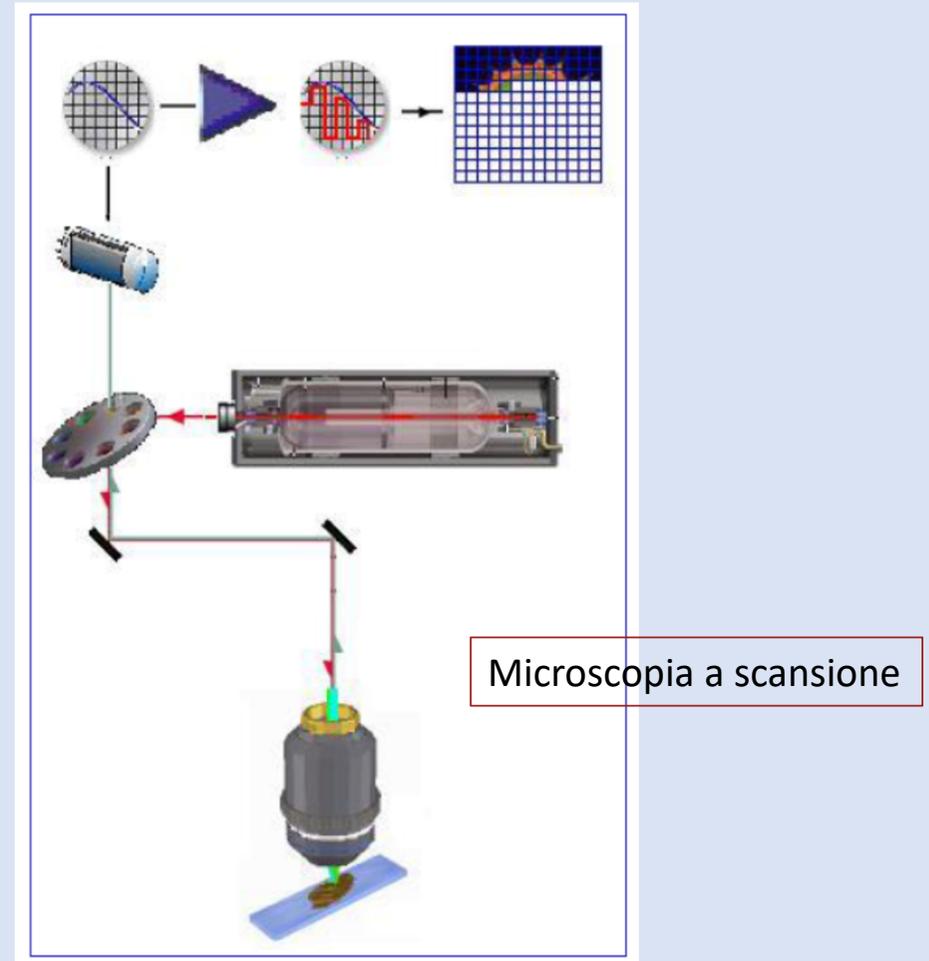
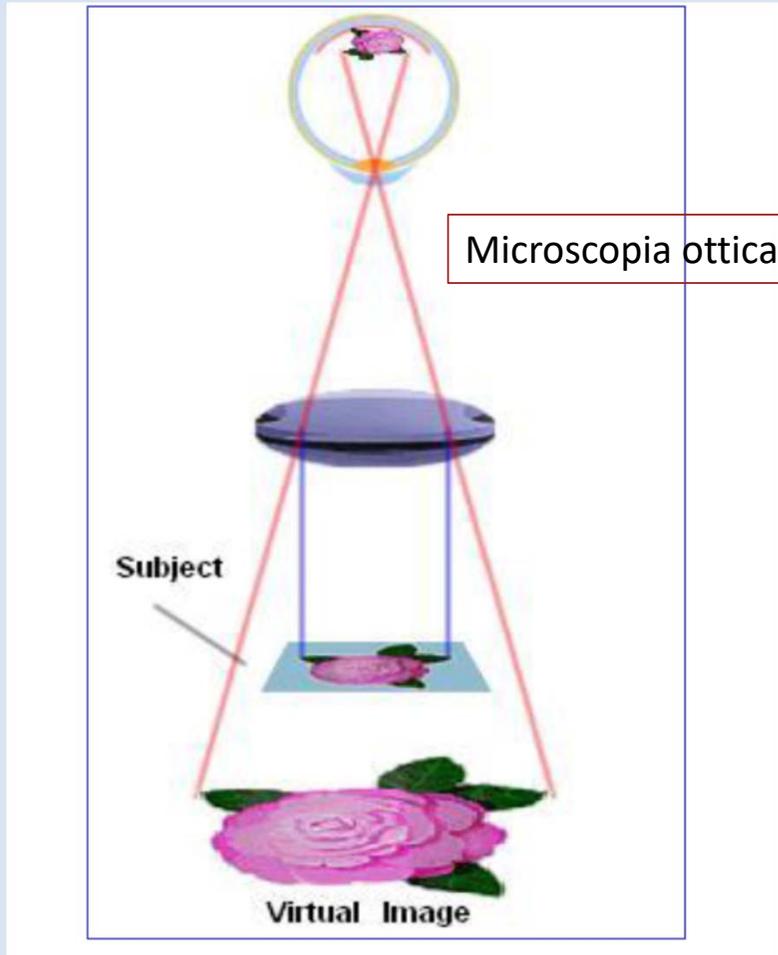
## Laser

Il fascio di luce non illumina tutto il preparato ma solo una piccola parte (puntiforme), di conseguenza il rivelatore non vede un'immagine completa ma solo l'intensità di luce proveniente da un punto del preparato

## Scanning

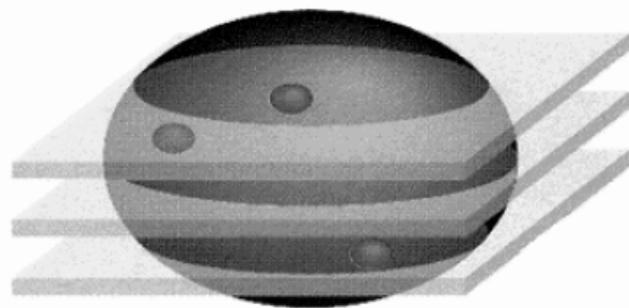
Una coppia di specchi mobili muovono il fascio laser sul campione consentendo così la costruzione digitale dell'immagine

# Il microscopio CLSM (Confocal Laser Scanning Microscopy)

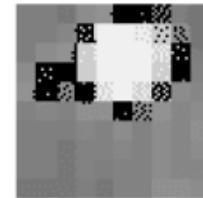
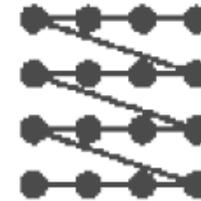


# La scansione

Sezioni ottiche diverse  
permettono di  
ricostruire l'informazione  
tridimensionale



Una scansione di tipo "raster"  
genera l'immagine di una  
sezione planare



# Sistemi di scansione

Stage-scanning

Single-beam-scanning

Multiple-beam-scanning

movimento del campione

movimento di un fascio di illuminazione singolo

generazione di fasci di illuminazione multipli.

# Sistemi di scansione

Stage-scanning

movimento del campione

Il percorso ottico è fisso e il campione viene fatto traslare con precisione, spostandosi continuamente rispetto allo spot luminoso.

Poco preciso, in quanto i mezzi fluidi in cui sono immerse la maggioranza delle strutture biologiche di interesse non ne assicurano la stabilità durante gli spostamenti.

Tempi lunghi, incompatibili con l'imaging in tempo reale.

# Sistemi di scansione

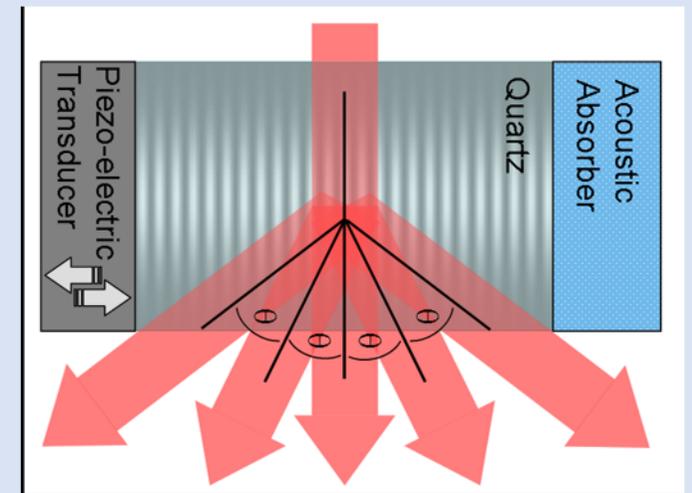
## Single-beam-scanning

movimento di un fascio di illuminazione singolo

Il fascio di illuminazione si muove sul campione in modo controllato.

### Deflettore acustico-ottico

E' costituito da un cristallo fotoelastico (un materiale fotoelastico esibisce birifrangenza quando sottoposto a tensione meccanica) che viene sollecitato da un trasduttore piezoelettrico



# Sistemi di scansione

## Single-beam-scanning

movimento di un fascio di illuminazione singolo

Il fascio di illuminazione si muove sul campione in modo controllato.

### Specchio galvanometrico

Specchi che possono ruotare e riflettere il laser in modo che vada in un specifico punto del campione



# Sistemi di scansione

## Single-beam-scanning

movimento di un fascio di illuminazione singolo

Il fascio di illuminazione si muove sul campione in modo controllato.

## Specchio risonante

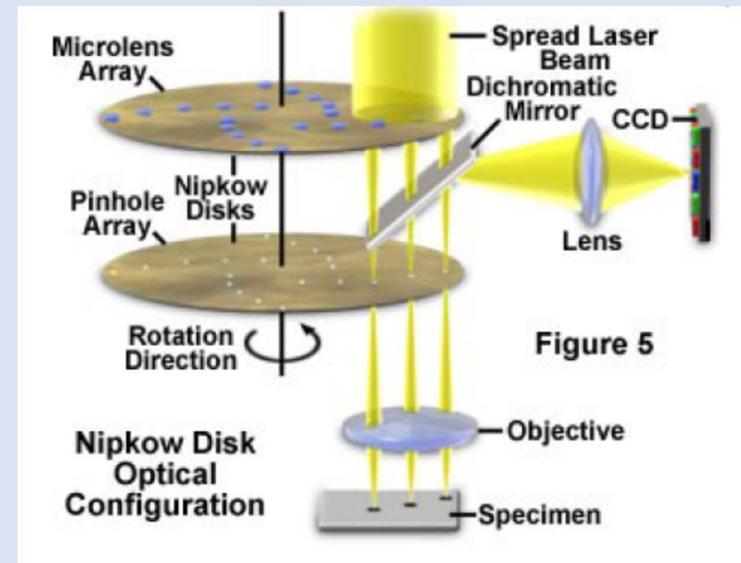
Simile al galvanometro,  
ma raggiunge frequenze di  
scansione ben più elevate  
ma area ridotta

# Sistemi di scansione

**Multiple-beam-scanning** generazione di fasci di illuminazione multipli.

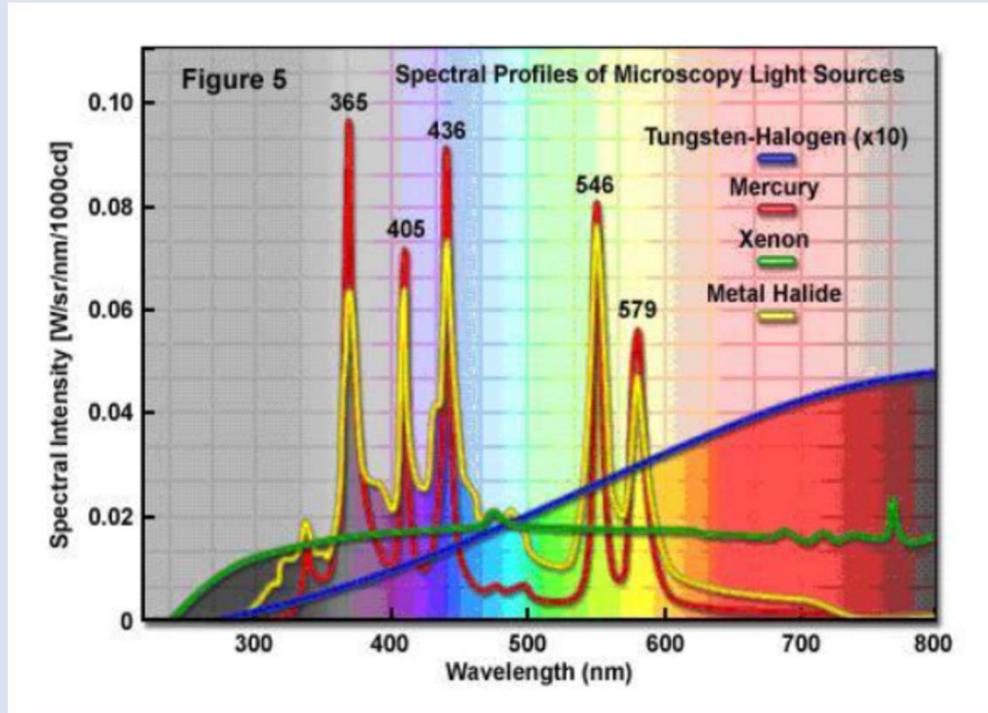
Uso di più spot illuminati.

Disco rotante con pinhole disposti spirale



Disco di Nipkow

# Il microscopio CLSM (Confocal Laser Scanning Microscopy)



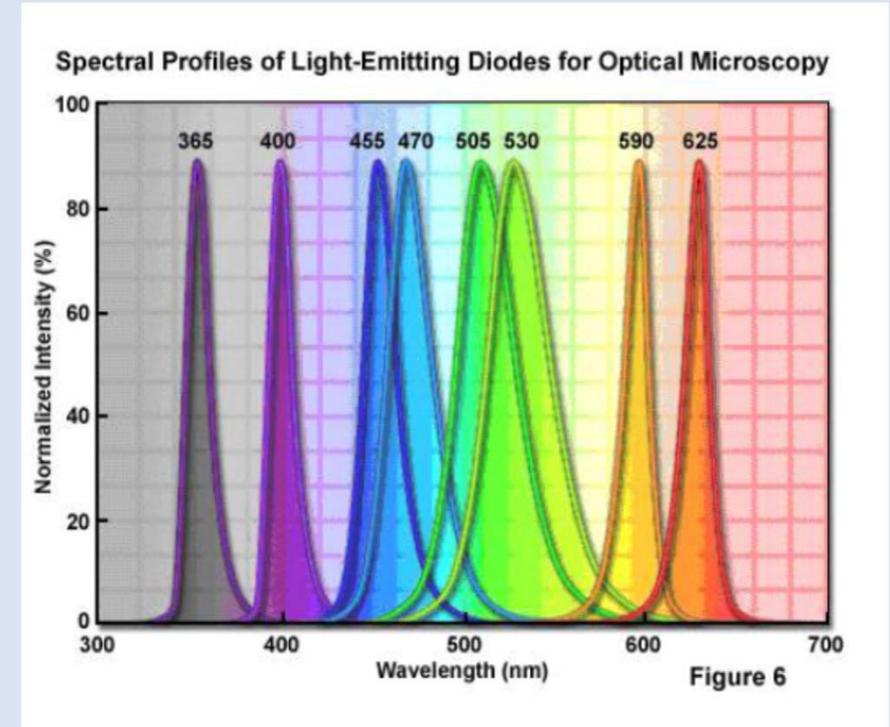
Lampade ad arco:

Bassa coerenza spaziale

Ampio spettro di emissione

Bassa brillantezza

Bassi costi di gestione



Laser:

Elevata coerenza spaziale

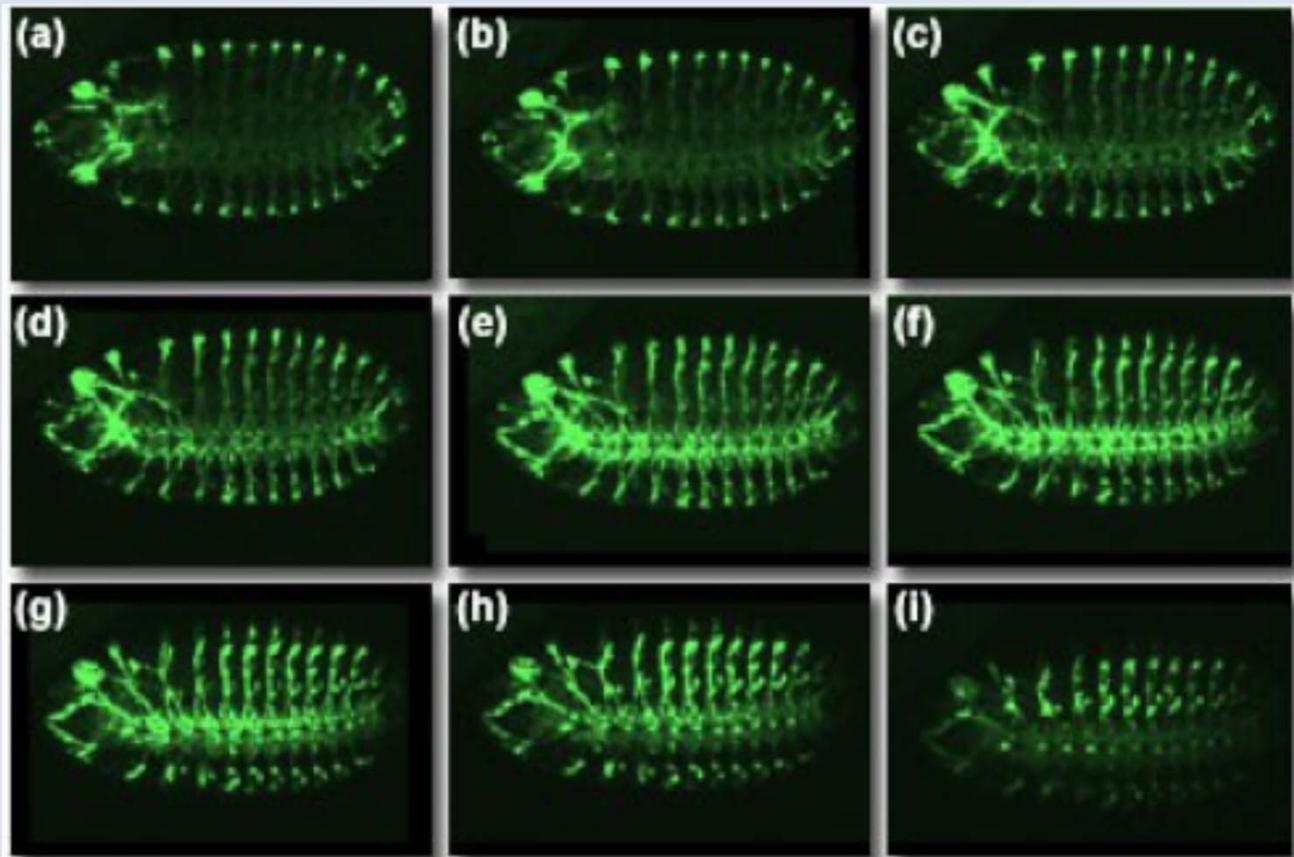
Emissione quasi monocromatica

Elevata brillantezza

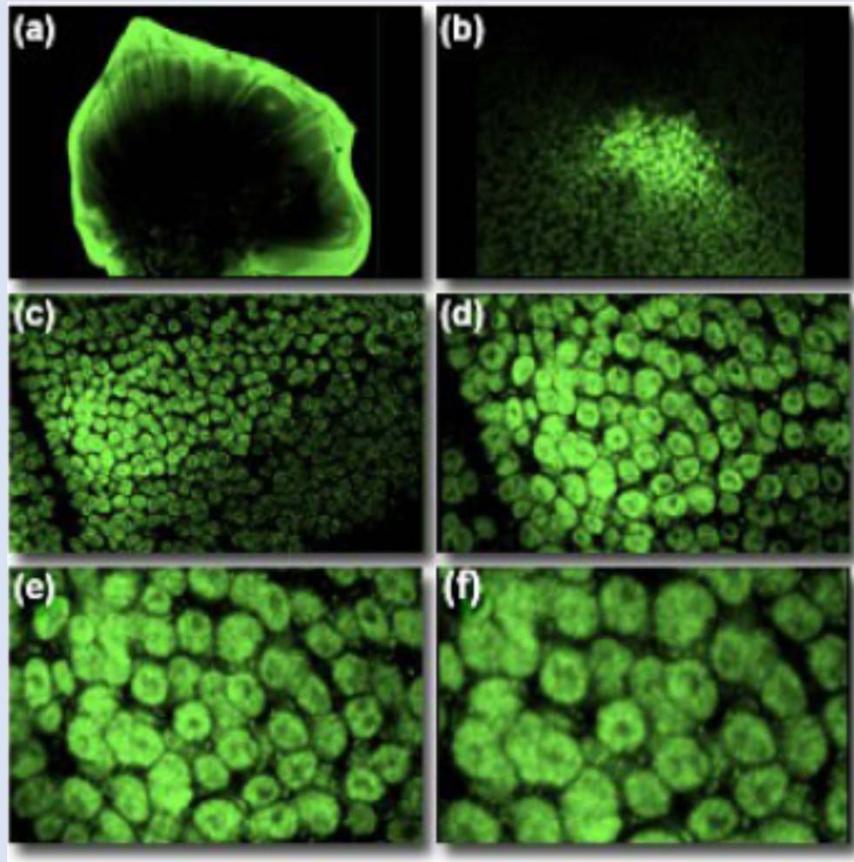
Elevati costi di gestione

# Formazione dell'immagine

Sezione ottica Z stach

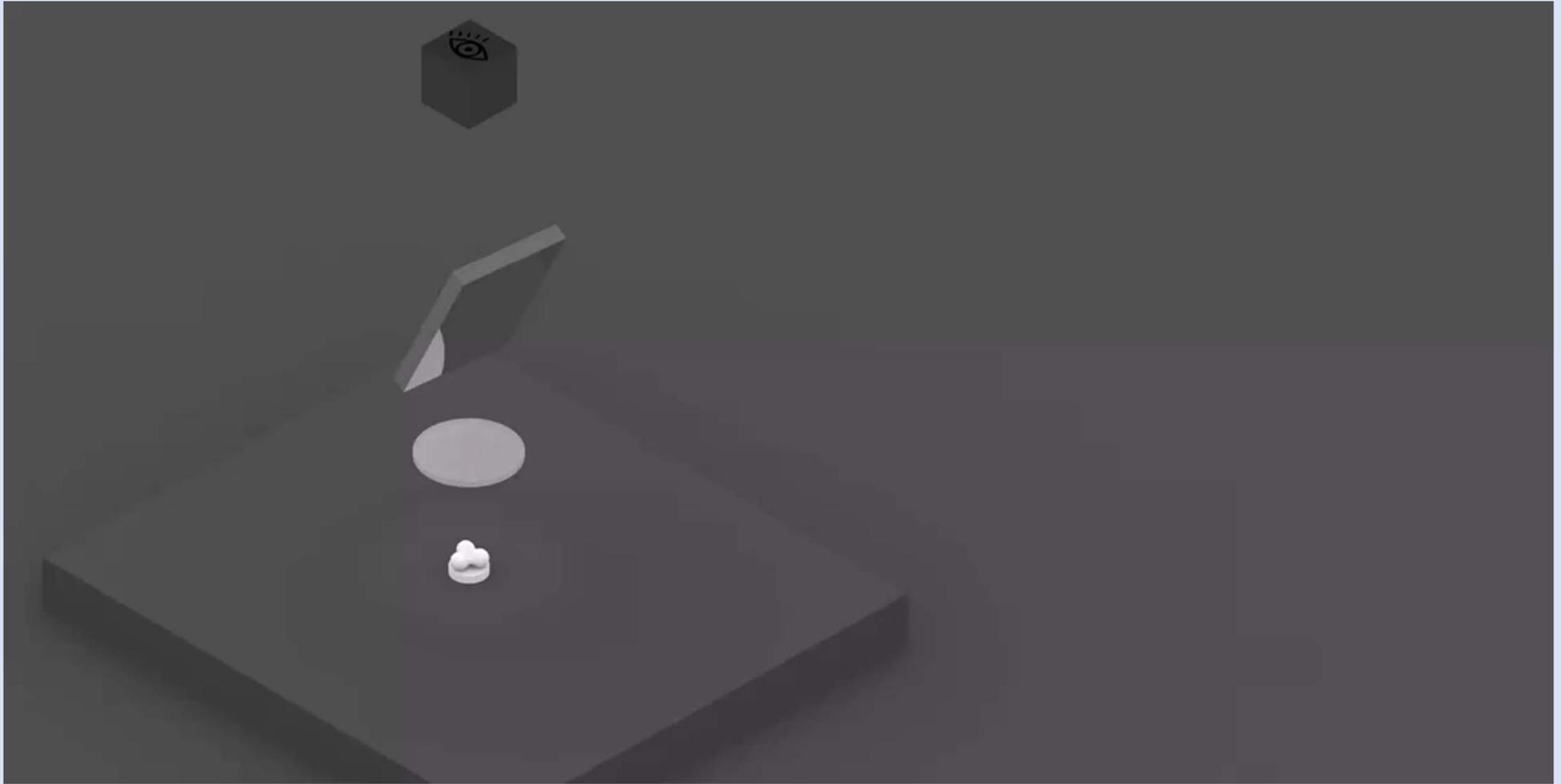


# Aumentare la risoluzione

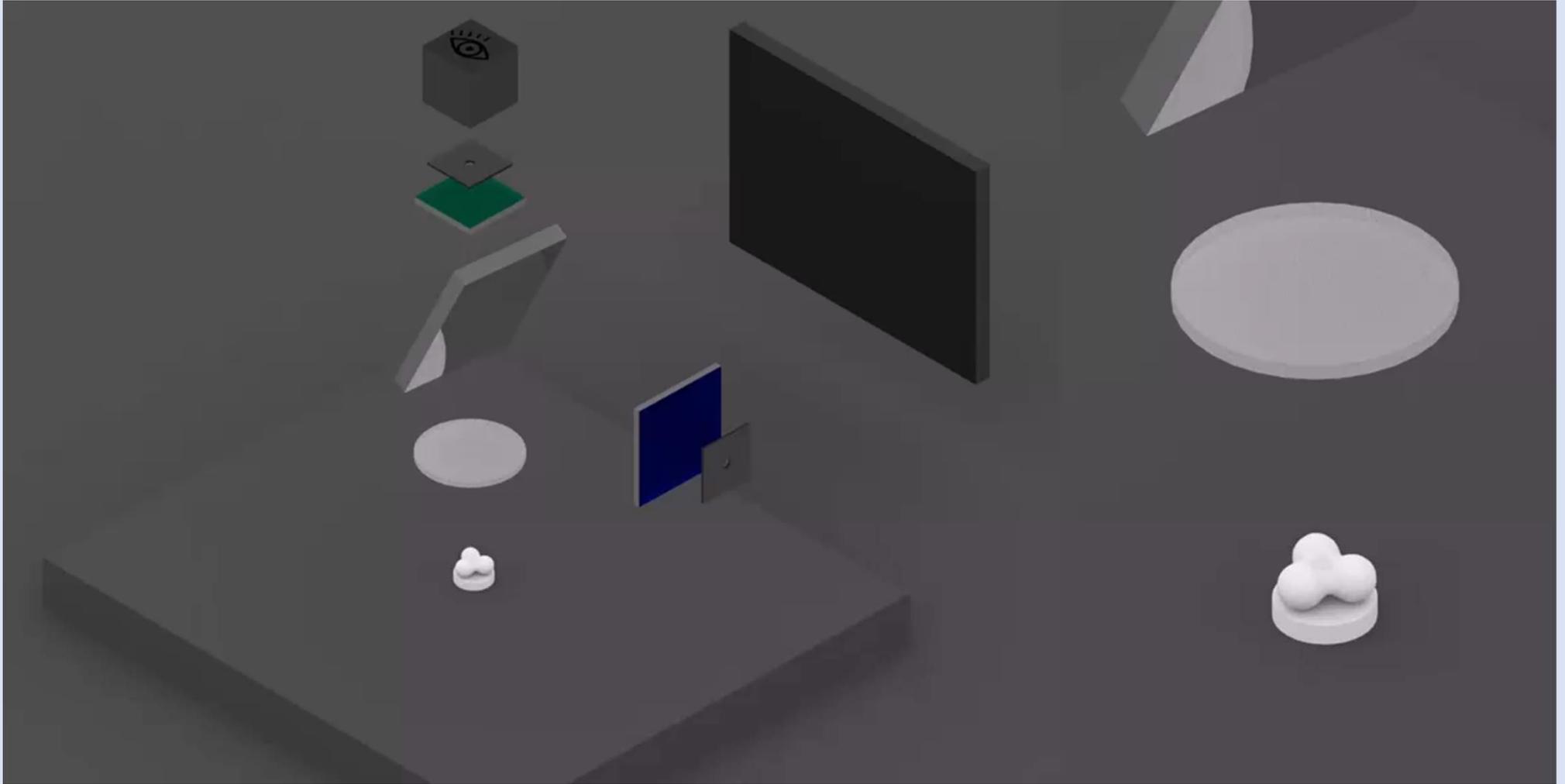


Riducendo l'area del campione analizzata e mantenendo la stessa apertura sul rivelatore (quindi lo stesso numero di dati dell'immagine) la risoluzione aumenta senza cambiare l'obiettivo.

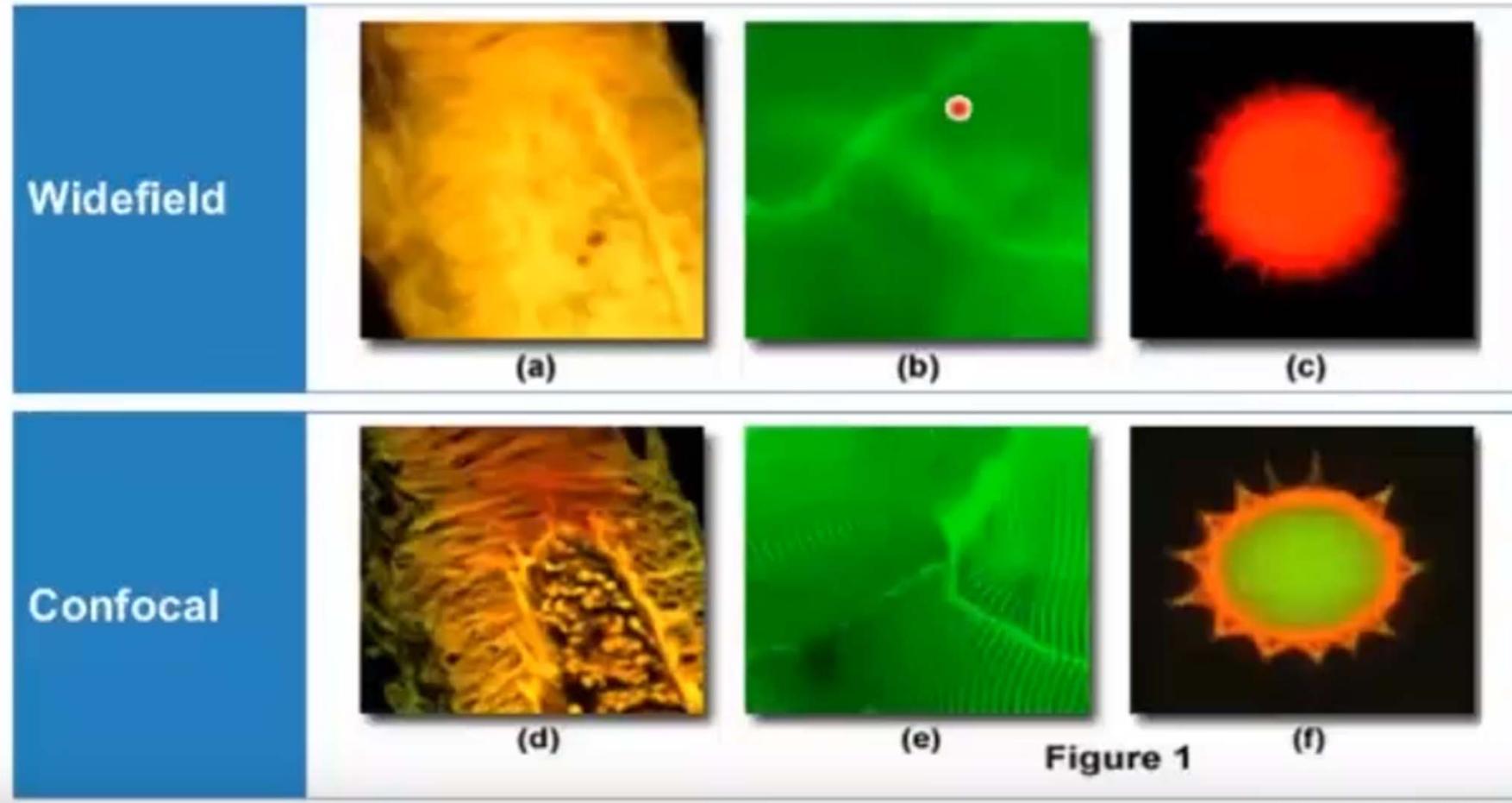
## Microscopio a fluorescenza VS Microscopio a confocale:



## Microscopio a fluorescenza VS Microscopio a confocale:



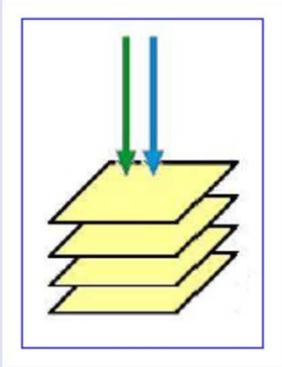
## Confocal and widefield Fluorescence Microscopy



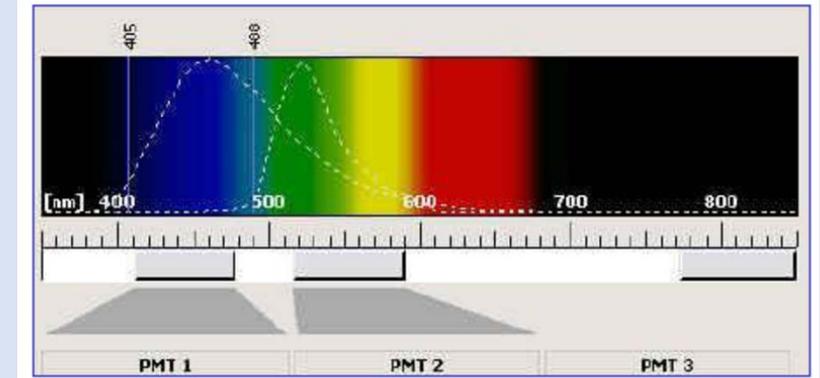
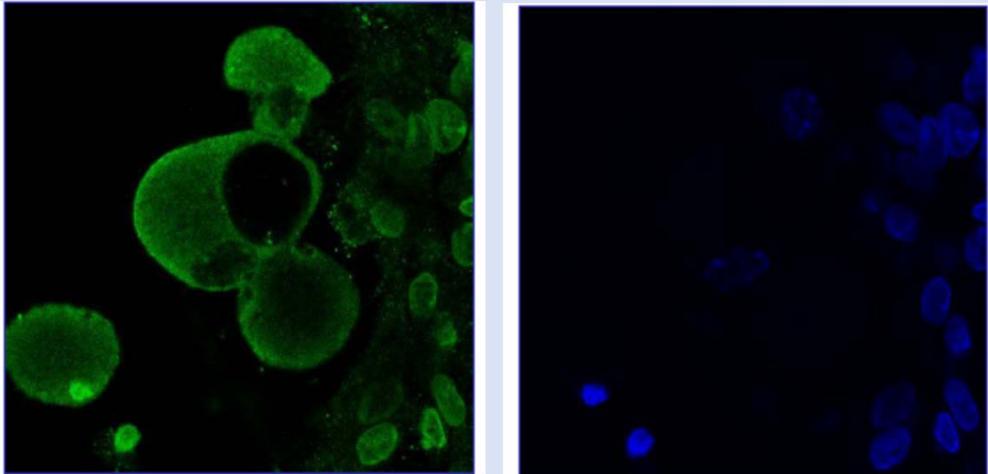
# Modalità di acquisizione

(simultanea, by frame, by stack, by line)

# Acquisizione simultanea???



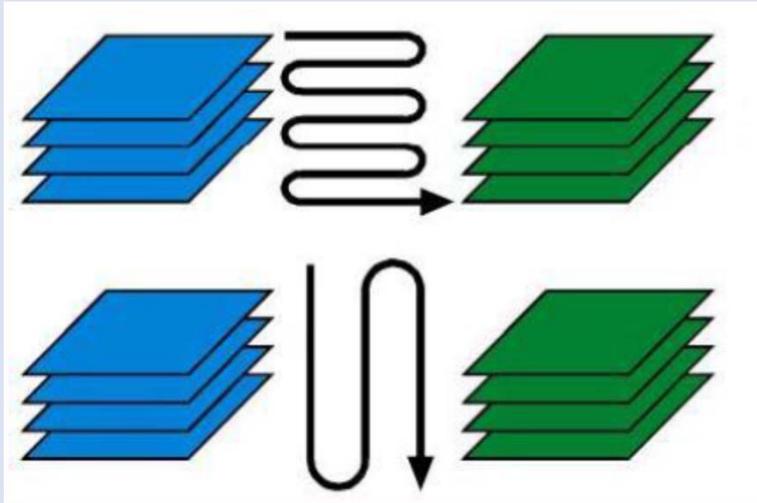
Un fascio di luce composto da due differenti Lunghezze d'onda analizza il campione



I segnali generati dal campione vengono letti simultaneamente da due differenti PMT

Il segnale verde proviene realmente da una marcatura ficht o è un segnale spurio dovuto al DAPI?

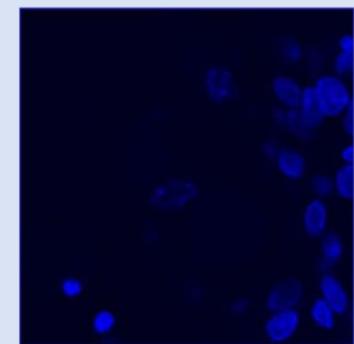
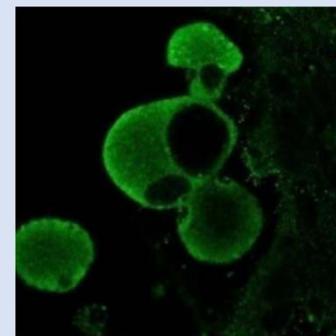
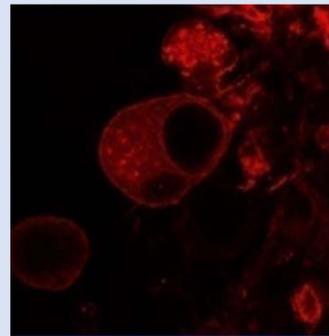
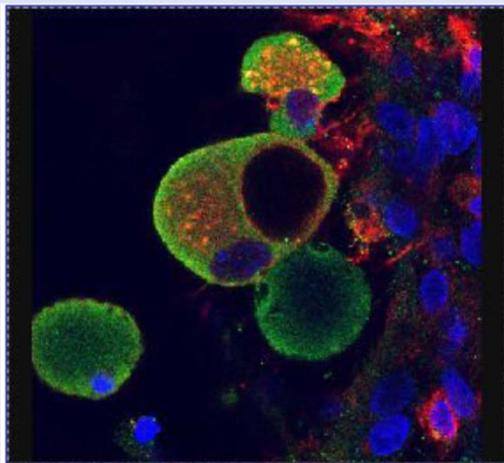
# Acquisizione sequenziale



Si analizza un piano alla volta a diverse lunghezza d'onda

Si analizza una sequenza di piani alla volta

Il campione viene analizzato utilizzando un fascio di luce composto da una sola lunghezza d'onda alla volta



# Acquisizione simultanea vs sequenziale

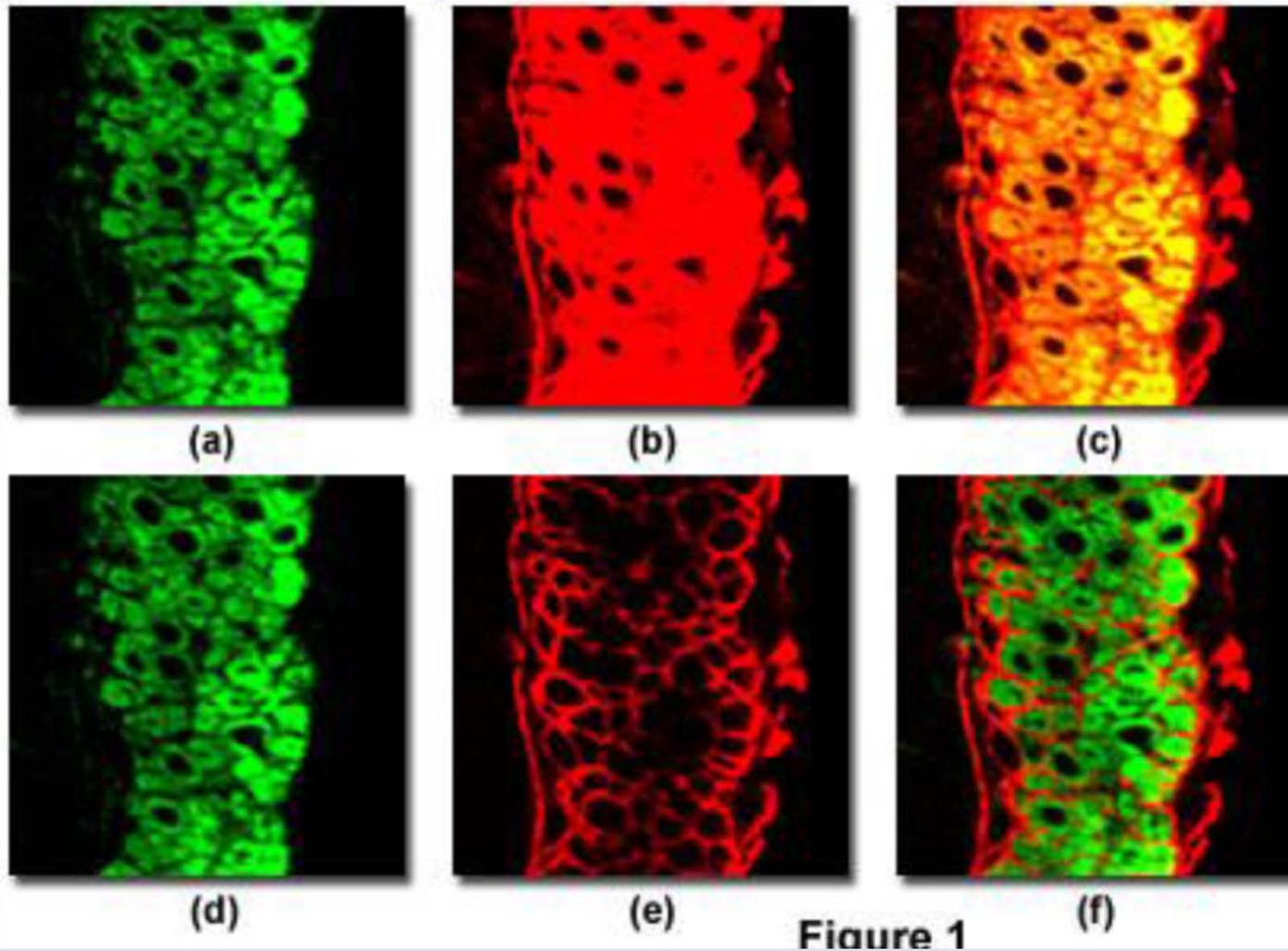
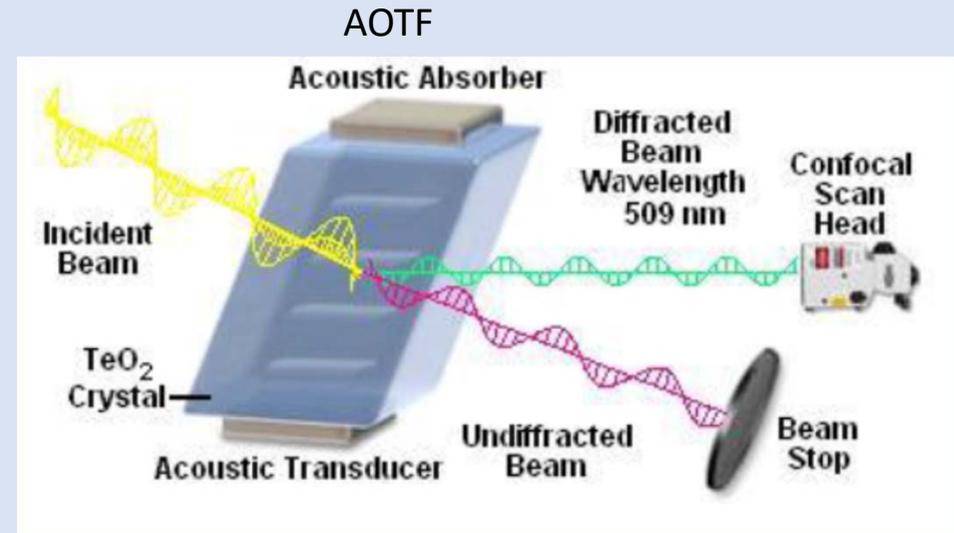
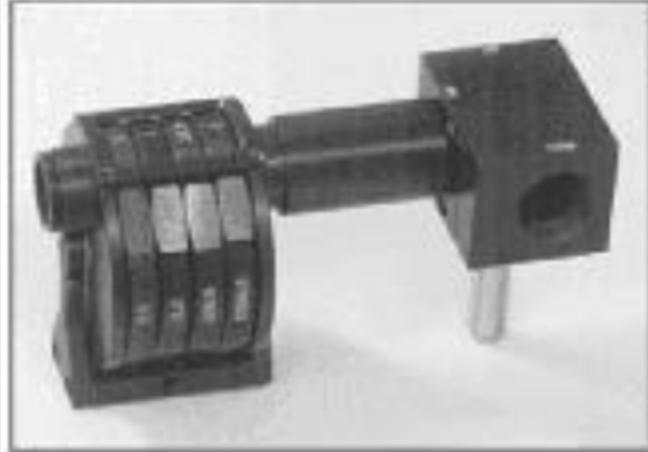


Figure 1

# Filtri di attenuazione

Filtri motorizzati

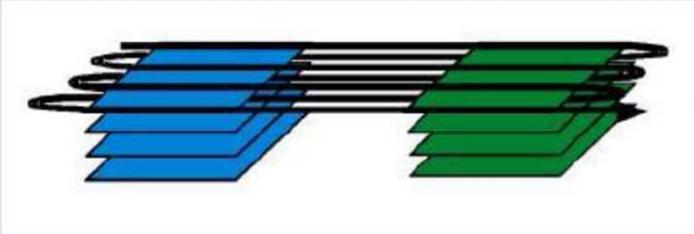


Acoustic Optic Tunable Filter

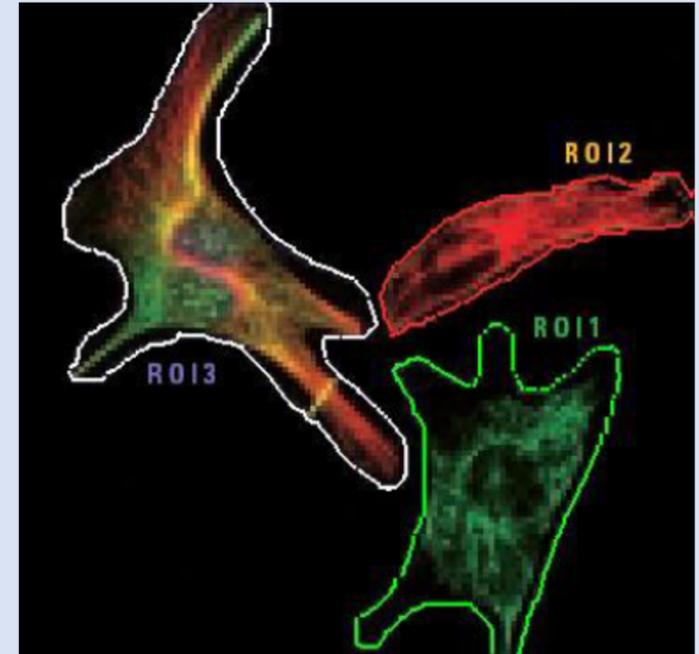
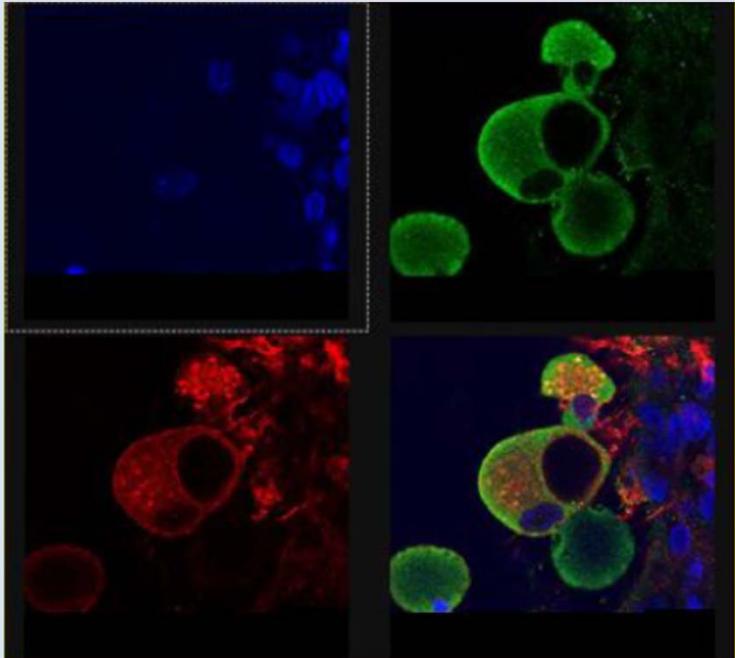
Vantaggi AOTF

- Elevata velocità di comunicazione
- Variazione continua intensità di luce
- Possibilità di selezionare la lunghezza d'onda da attenuare

# AOTF acquisizione simultanea by line



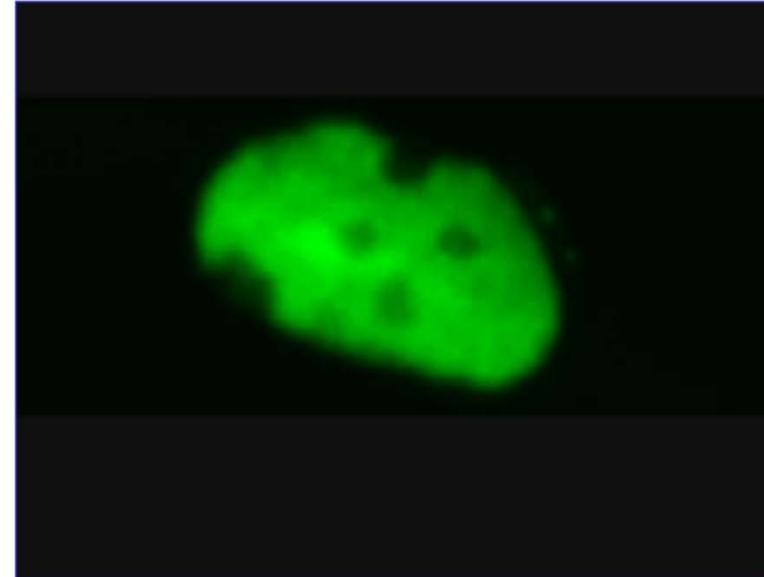
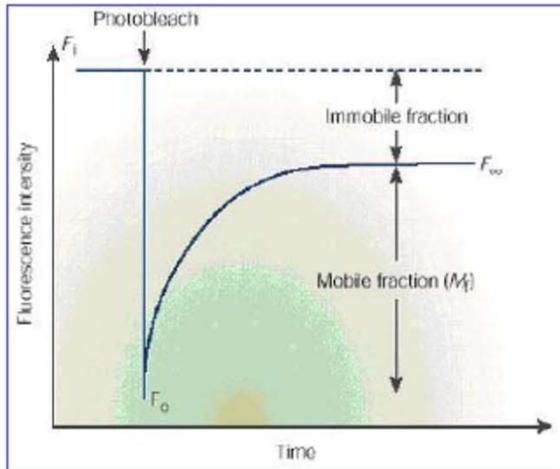
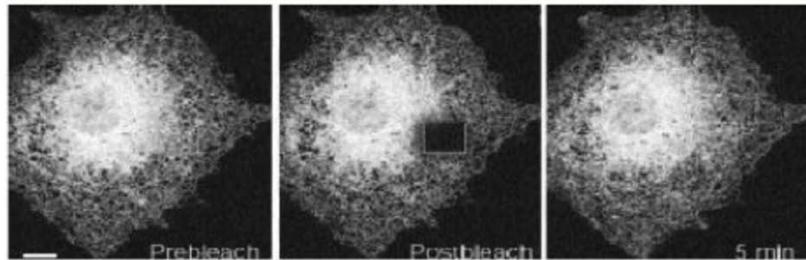
E' possibile accendere e spegnere determinate lunghezza d'onda durante la scansione del fascio



ROI1 eccitata solo con 488  
ROI2 eccitata solo con 633  
ROI3 eccitata con 488 e 633

# Alcune applicazioni

# FRAP Fluorescence Recovery After Photobleaching



512x128 – Freq 1400 Hz – Bidirectional  
PreBleach=5 - Bleach=5 PostBleach = 30

Una porzione del campione viene sottoposta ad una intensa e prolungata eccitazione (bleaching) per vedere le modalità di recupero della fluorescenza

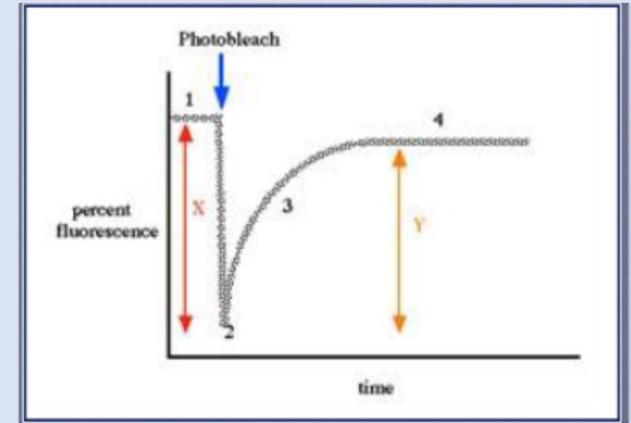
# FRAP Fluorescence Recovery After Photobleaching

La tecnica FRAP è stata inizialmente sviluppata per osservare la diffusione laterale di molecole fluorescenti all'interno di superfici bidimensionali (proteine di membrana marcate con un fluoroforo all'interno di una membrana cellulare al fine di determinarne il tipo di movimento e il coefficiente di motilità)

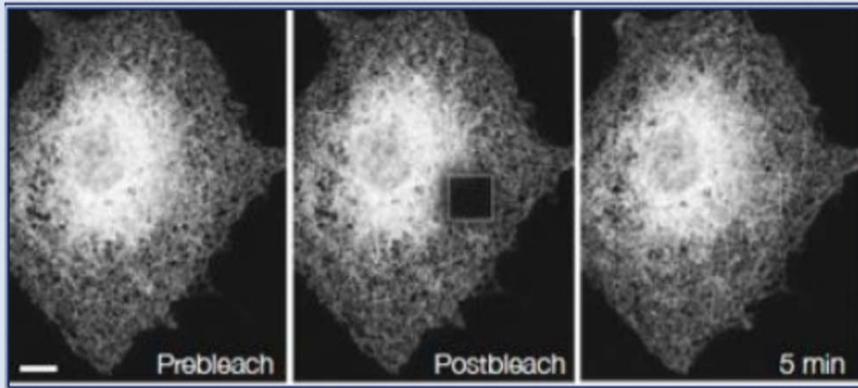
La FRAP è utilizzata anche per effettuare studi di dinamica tra recettore e ligando tramite la misura del coefficiente di diffusione di quest'ultimo.

Si possono studiare i movimenti di determinate proteine sintetizzandole in fusione con la green fluorescent protein (GFP) e osservandone la diffusione e il movimento dopo la procedura di bleaching.

Il sistema permette di distinguere tra fenomeni di diffusione spontanea e flussi in determinate direzioni: i movimenti direzionati, notati già nelle prime osservazioni, possono essere dovuti ad un flusso netto del citoplasma o a meccanismi di trasporto lungo i microtubuli del citoscheletro mediato da motori molecolari.

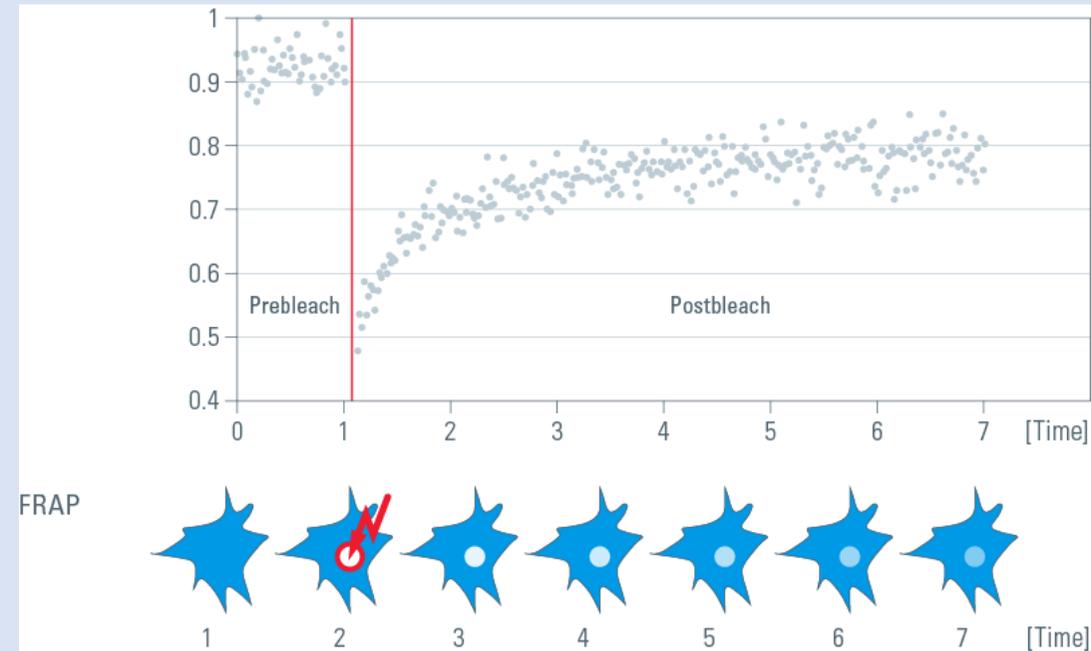


# FRAP Fluorescence Recovery After Photobleaching



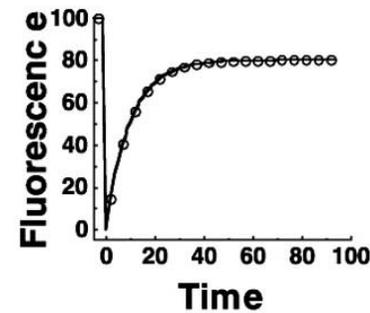
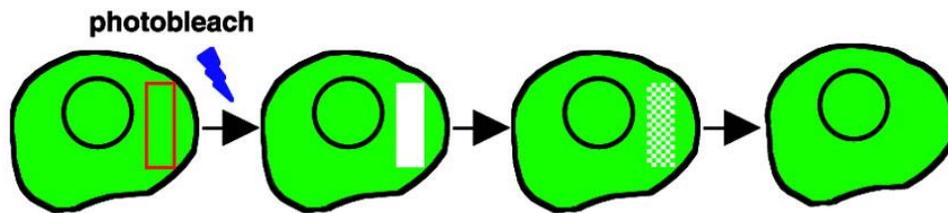
Una regione del campione viene sottoposta ad una intensa e prolungata eccitazione tanto da indurre un photobleaching localizzato.

Con la tecnica Frap si registrano informazioni circa il recupero di fluorescenza nell'area di interesse.



# FRAP e FLIP (Fluorescence Loss in Photobleaching)

## A Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP)

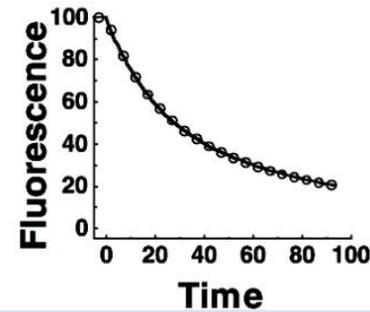
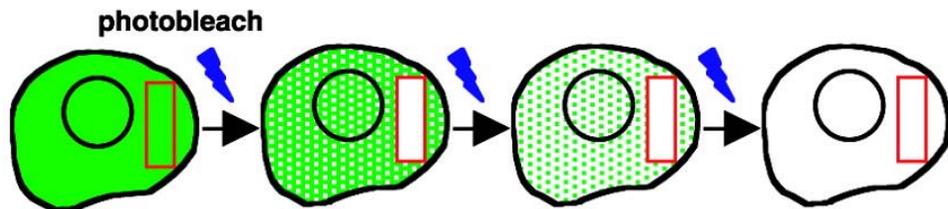


## Tecniche di microscopia cinetica.

(A) In FRAP, una regione della cellula (indicata in rosso) è selettivamente e intensamente irradiata (photobleach). Il recupero delle molecole fluorescenti in quella regione viene valutato

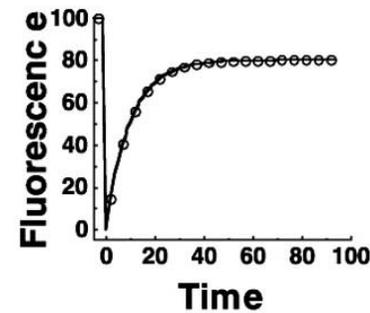
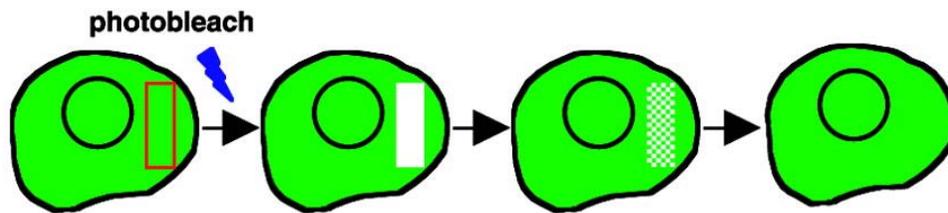
quantitativamente per determinare i coefficienti di diffusione e le frazioni mobili.

## B Fluorescence Loss in Photobleaching (FLIP)

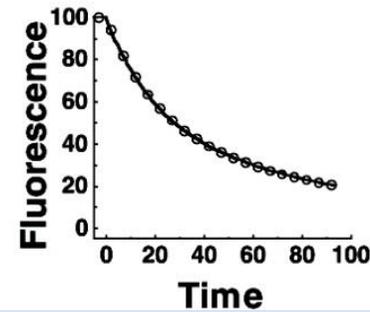
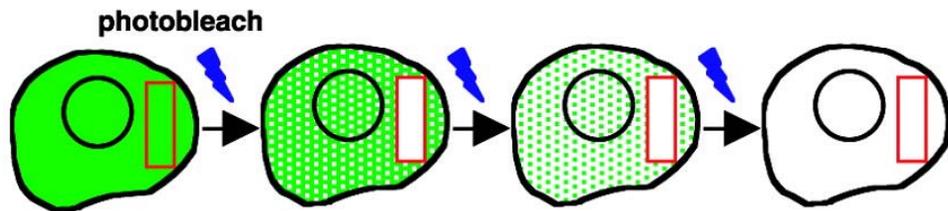


# FRAP e FLIP (Fluorescence Loss in Photobleaching)

## A Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP)

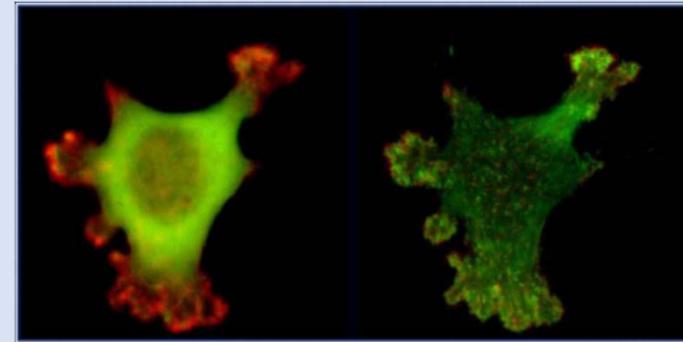
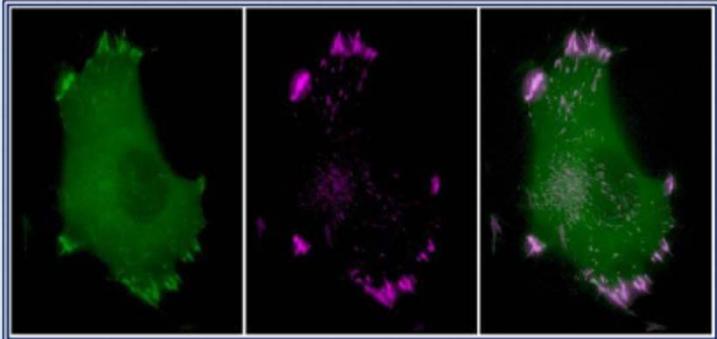


## B Fluorescence Loss in Photobleaching (FLIP)

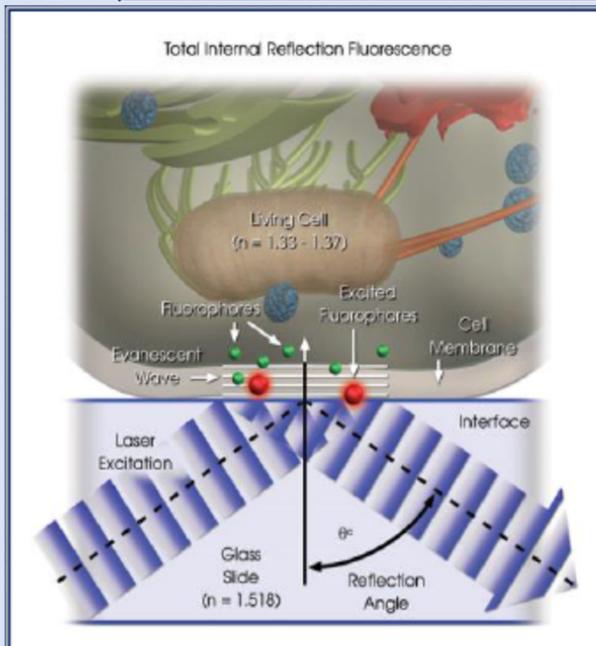


**Tecniche di microscopia cinetica.** (B) In FLIP, una regione della cellula (indicata in rosso) viene ripetutamente «photobleaciata». Il movimento delle molecole fluorescenti nella regione che viene fotografata porta alla perdita di fluorescenza dalle aree esterne a quelle del box e può essere utilizzato per accedere ai limiti del movimento diffusivo di una proteina all'interno di una cellula.

# TIRF: Total Internal Reflection Fluorescence

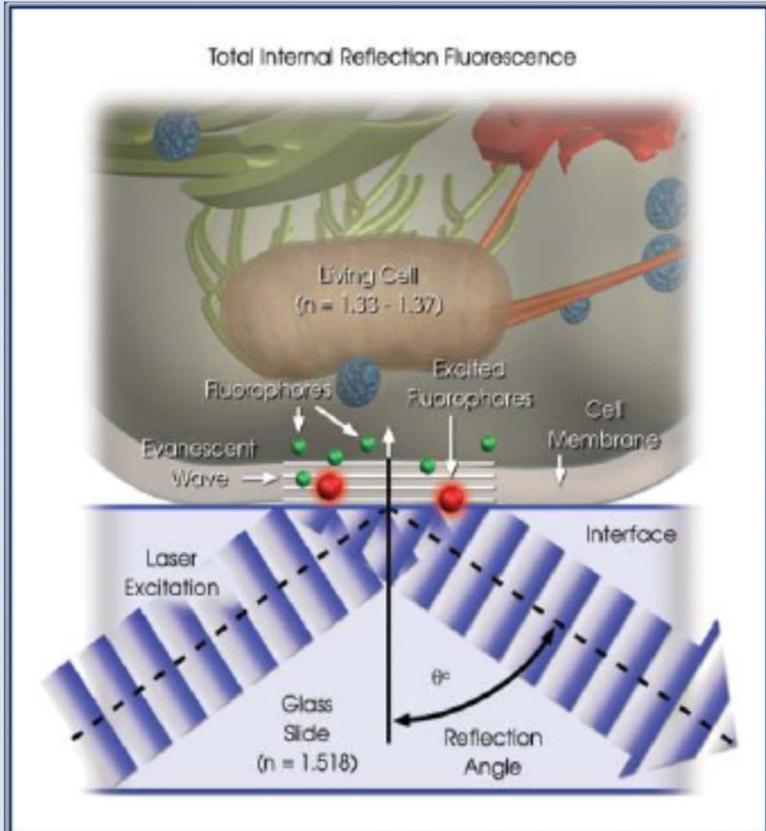


Melanoma cells (mouse) – Multi-color TIRF  
Green: EGFP-Myosin. Red: mRFP-Aktin.  
*Oberbanscheidt, van den Boom*



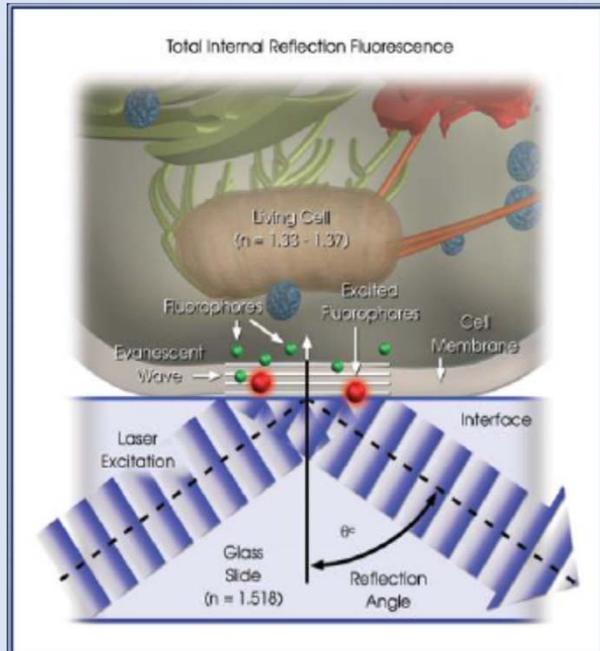
Consente di eccitare molecole fluorescenti che si trovano in ambiente acquoso (cellula) vicine ad una superficie solida (vetro) e ad una distanza molto piccola (meno di 100 nm)

# TIRF: Total Internal Reflection Fluorescence



L'eccitazione della fluorescenza in questa regione (campo di evanescenza) consente di ottenere immagini con basso rumore di fondo, fluorescenza ben focalizzata e minima esposizione alla luce in altri piani della cellula (cellule vive)

# TIRF: Total Internal Reflection Fluorescence



## Applicazioni della TIRF

Visualizzazione delle regioni contatto cellula substrato

Visualizzazione di singole molecole fluorescenti vicine alla membrana (movimenti molecolari)

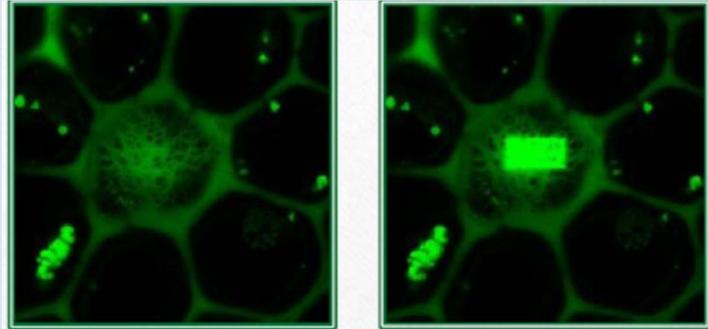
Analisi cinetica dei granuli di secrezione (granuli dispersi di 2nm)

Cinetica delle interazioni tra proteine extracellulari con recettori di superficie

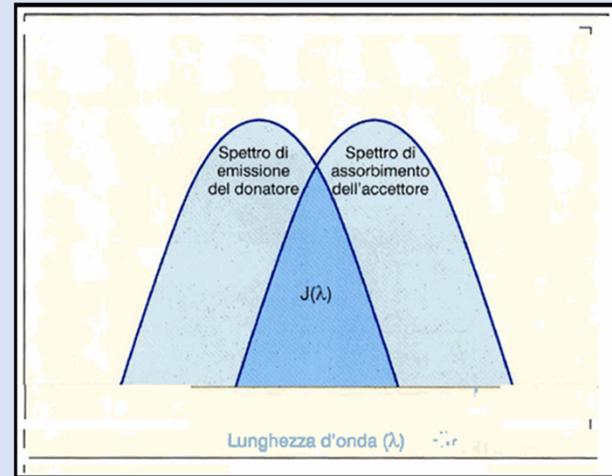
Turnover delle proteine

Cinetica di variazione del volume cellulare (trasporto di acqua e soluti)

# FRET: Förster Resonance Energy Transfer



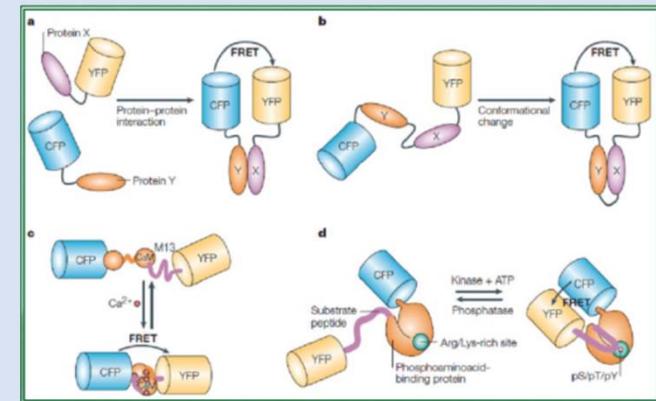
FRET-AP  
Gabriele Burger-Leica Microsystems



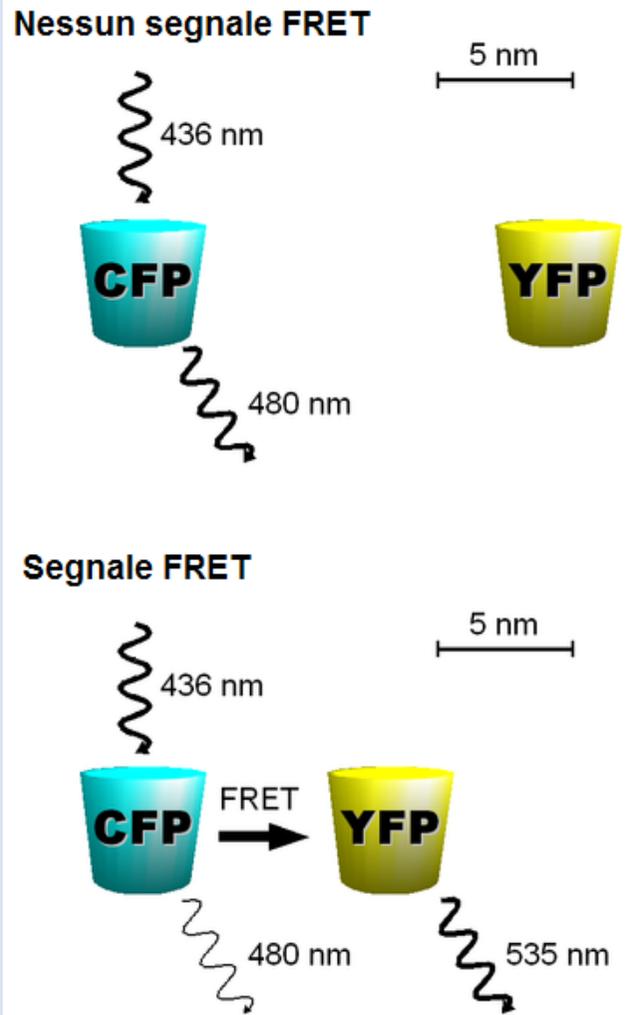
Trasferimento di energia per risonanza (senza emissione di fotoni)

Distanza tra le molecole  $< 100 \text{ \AA}$  e ben orientate

Permette di studiare: interazione tra domini di una proteina (a), interazione tra proteine (b)

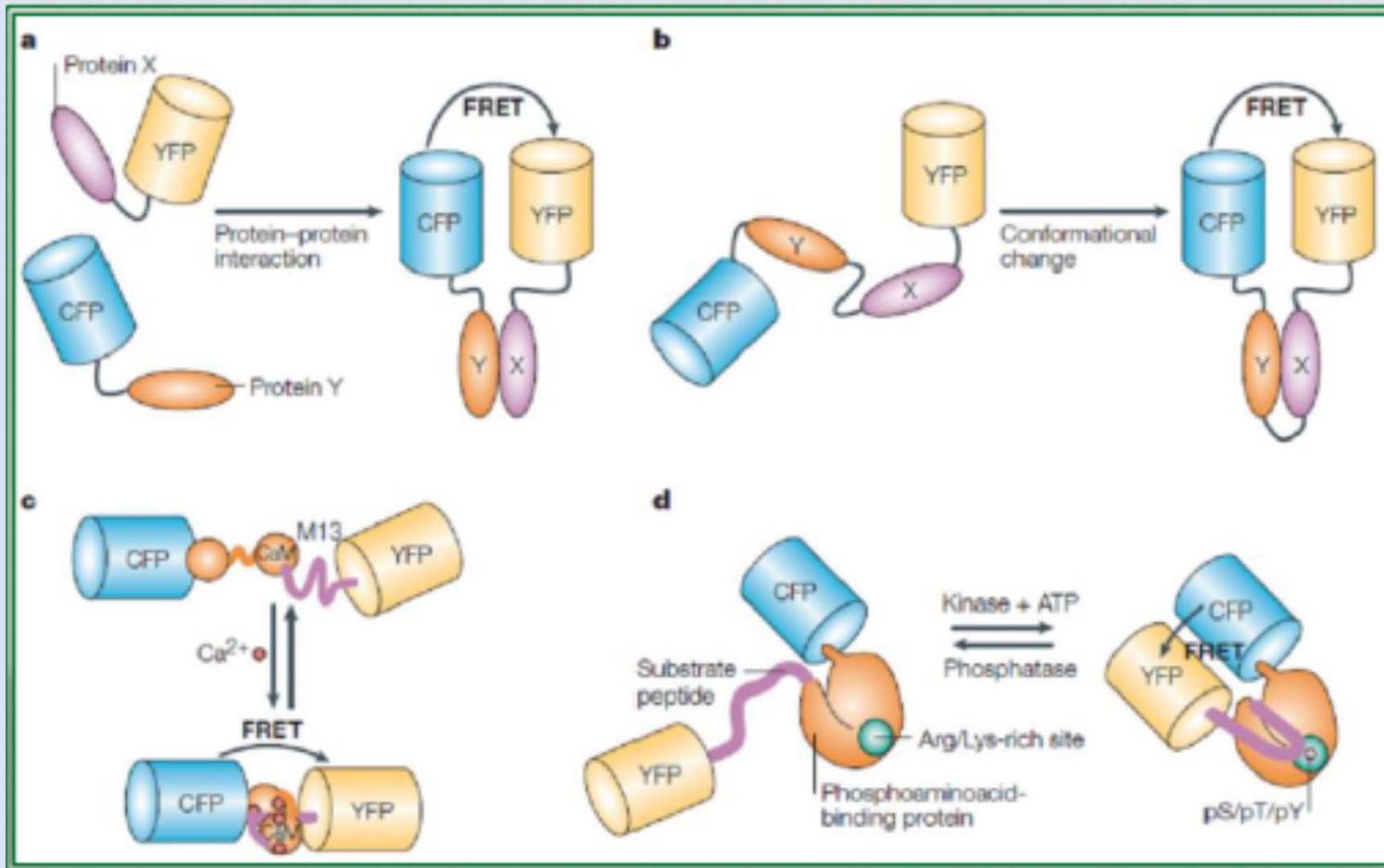


# FRET: Förster Resonance Energy Transfer

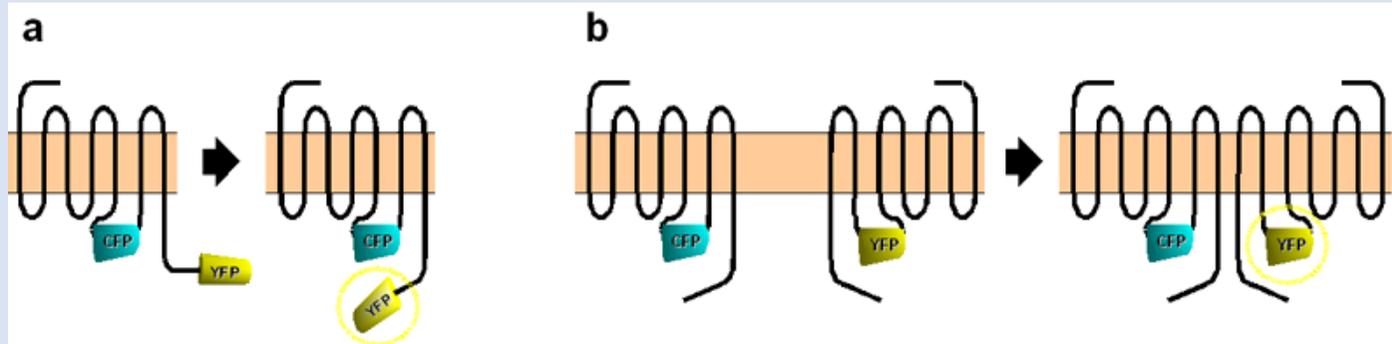


Schema della FRET: il donatore viene eccitato da un'onda luminosa esterna; le molecola emette energia che può essere trasmessa all'accettore; se l'accettore non si trova ad una distanza ristretta, non c'è segnale FRET; se si trova nelle strette vicinanze, invece, è possibile rilevare un segnale FRET.

# FRET: Förster Resonance Energy Transfer



# FRET: Förster Resonance Energy Transfer

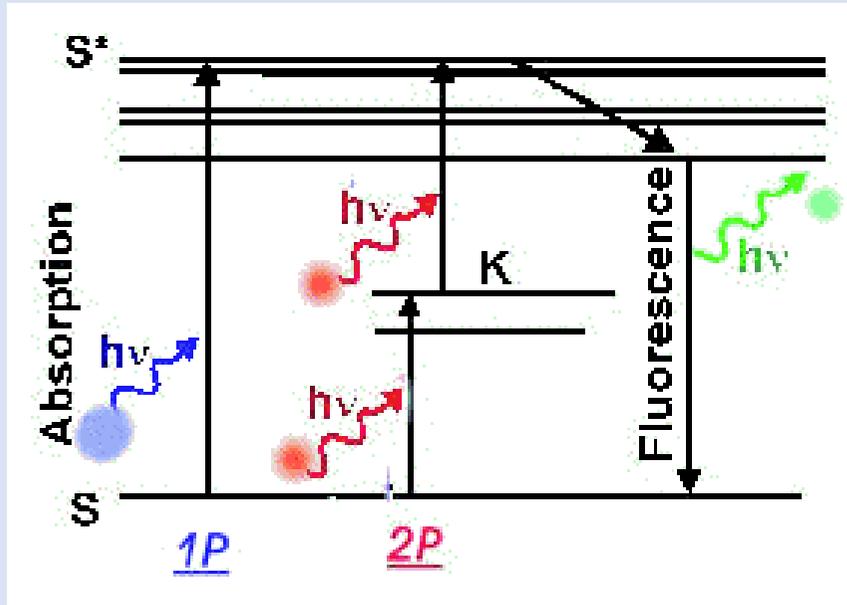


Per monitorare i cambiamenti conformazionali all'interno della macromolecola, ad esempio, è possibile marcarla in due siti differenti, lontani tra loro più di 10 nm: se la proteina cambia conformazione, avvicinando i due siti, la FRET può avere luogo ed è in grado di dare segnale.

a: è visibile un esempio di cambiamento conformazionale, che avvicina i due fluorofori.

b: rappresentato un approccio FRET per lo studio delle interazioni tra due proteine. La prima è associata a BFP (donatore), la seconda a YFP (accettore). Se le due proteine non sono tra loro associate, non è rilevabile alcun segnale FRET. Se le due proteine sono associate, invece, l'operatore individuerà un segnale FRET (al picco di emissione di YFP).

# Microscopio confocale a due fotoni



**Figura 1** - Due modi per portare allo stato eccitato una molecola di fluoroforo:

- 1P a un fotone
- 2P a due fotoni simultanei

Tuttavia, a differenza dei laser utilizzati per microscopia confocale, che forniscono singoli fotoni di luce visibile, i laser usati in microscopia a due fotoni eccitano il campione sfruttando l'assorbimento simultaneo di due fotoni nell'infrarosso (800-900 nm) in rapida successione temporale, nell'ordine dei femtosecondi ( $10^{-15}$  s).

# Microscopio confocale a due fotoni



La microscopia a due fotoni è attualmente la tecnica di elezione per l'imaging di cellule e tessuti viventi.

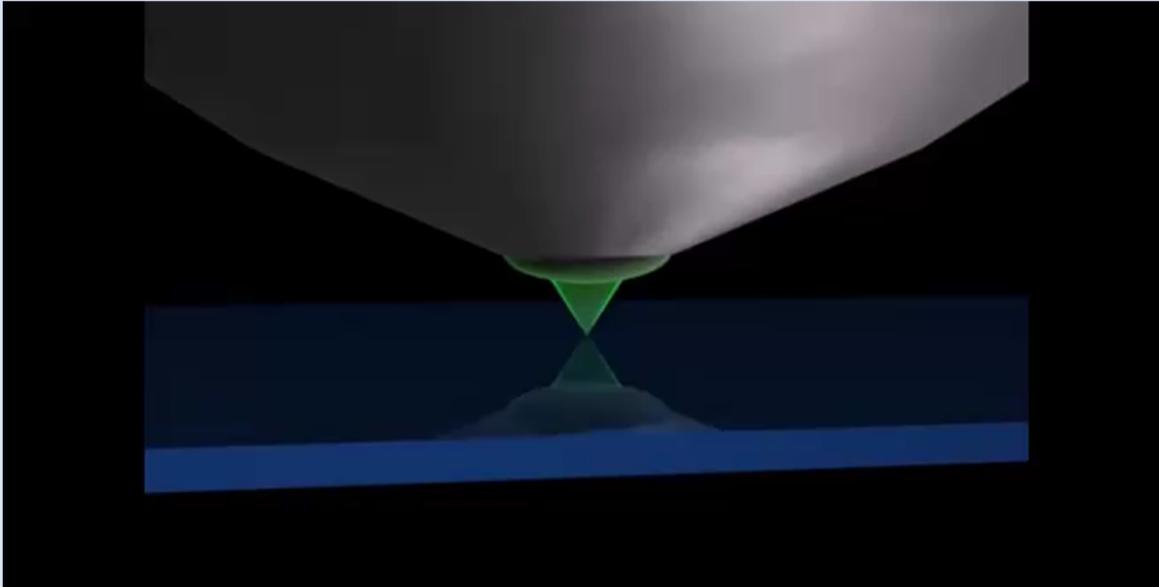
Utilizza un laser per eccitare molecole fluorescenti in un campione, e opportuni rivelatori per misurare la luce emessa.

# Microscopio confocale a due fotoni



- Ridotto danneggiamento del preparato, perché la luce infrarossa ha meno energia di quella visibile;
- Luce fornita è pulsante e, quindi, il preparato è mediamente illuminato per un tempo inferiore e si ha una notevole riduzione del photobleaching, che si verifica solo nel piano focale;
- L'infrarosso ha una capacità di penetrazione maggiore nei tessuti rispetto al visibile.
- L'unico inconveniente è costituito dal fatto che il tipo di laser necessario è molto costoso e raddoppia i costi rispetto a un sistema di microscopia confocale convenzionale.

# Microscopio STED



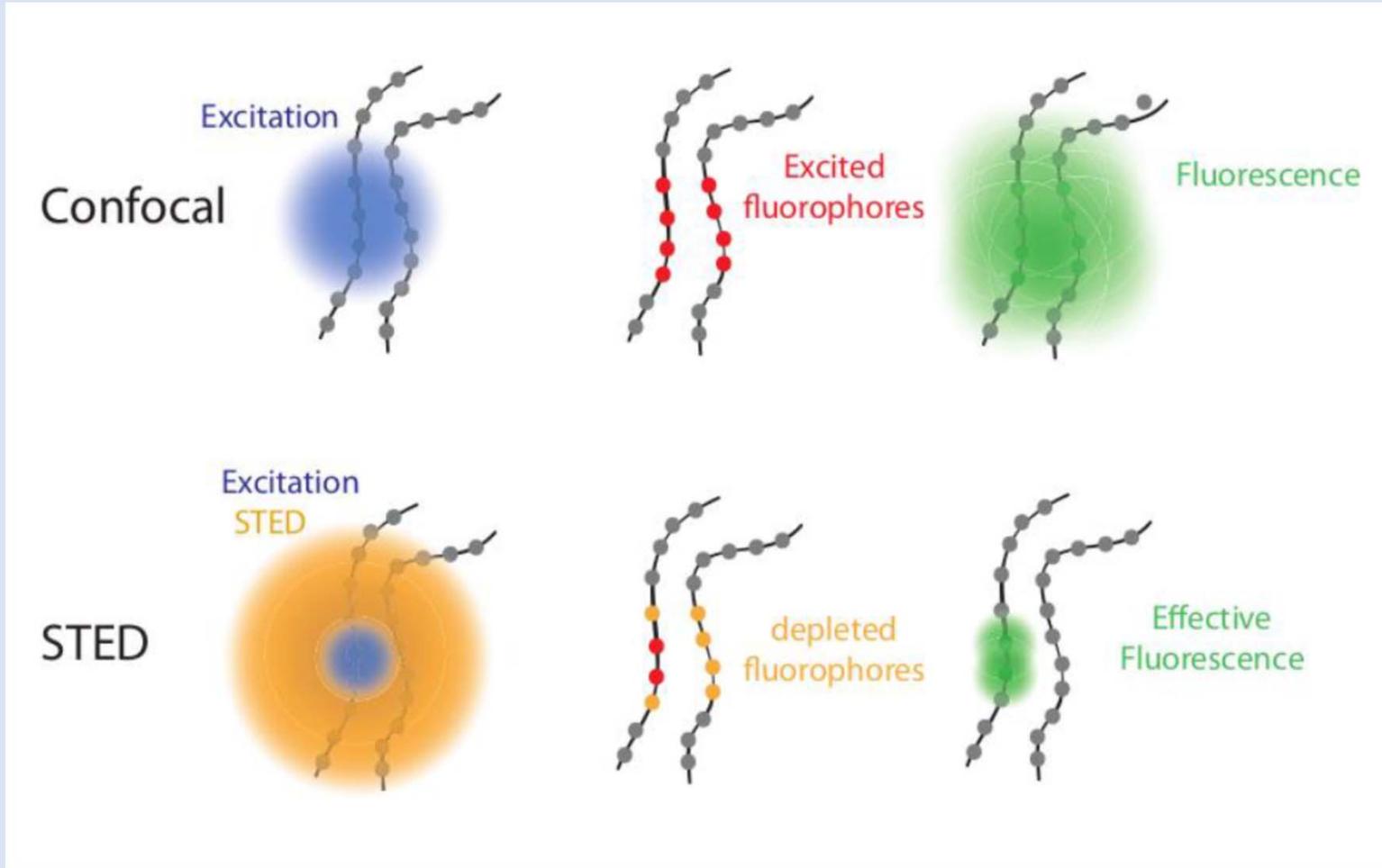
Con microscopia confocale, l'illuminazione è raggiunta scandendo con uno o più raggi laser che attraversano un esemplare.

Non può superare il limite di diffrazione

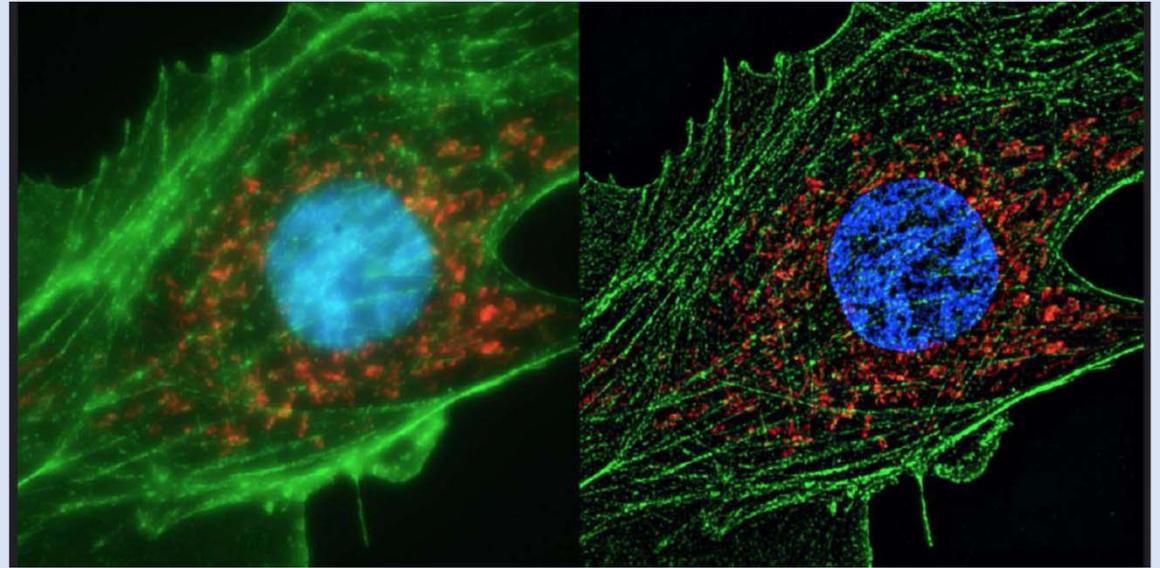
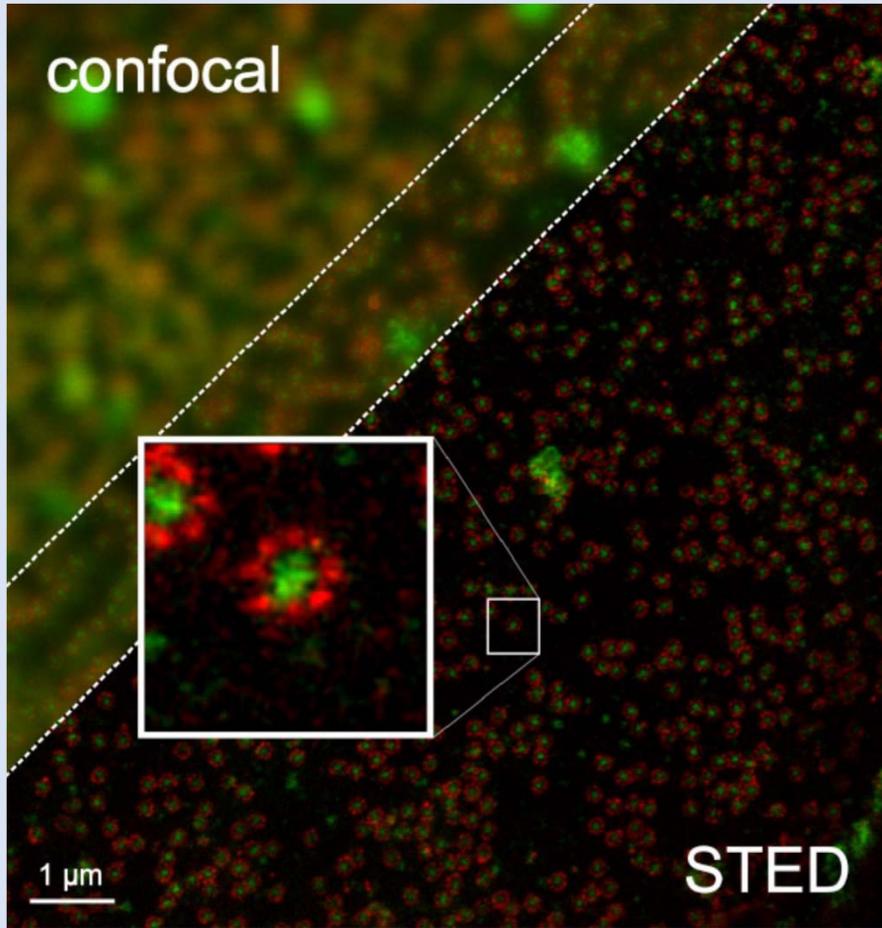
STED usa una simile impostazione a microscopia confocale. Usa due fasci laser. Uno per eccitare gli indicatori fluorescenti all'interno di un campione ed uno per svuotamento.

Il punto focale del raggio di eccitazione sovrappone il punto focale a forma di ciambella del raggio di svuotamento. Ciò permette all'ottimizzazione selettiva delle molecole all'interno di un campione o di un esemplare, tenendo conto la rappresentazione ad alta definizione.

# Microscopio STED



# Microscopio STED





<https://www.biologia.unipd.it/servizi/servizi-alla-ricerca/servizi-dipartimentali/imaging-facility/>