

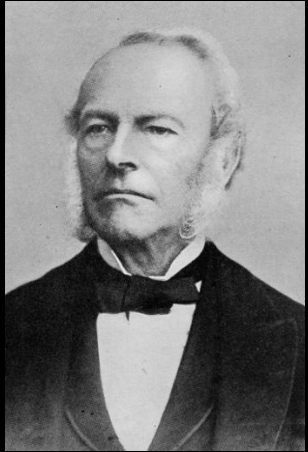
Fluorescência

Microscopia

Electrónica

Fluorescência

Mais sobre...

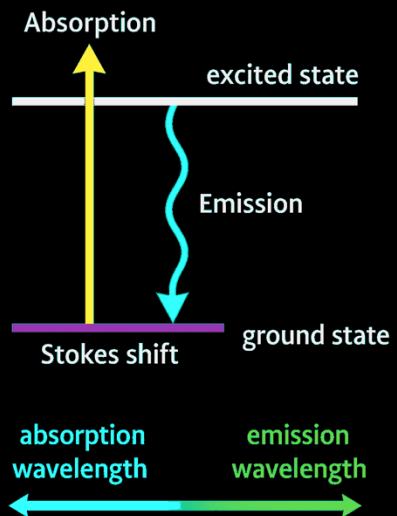


George G. Stokes (1819–1903)

Físico e matemático irlandês;

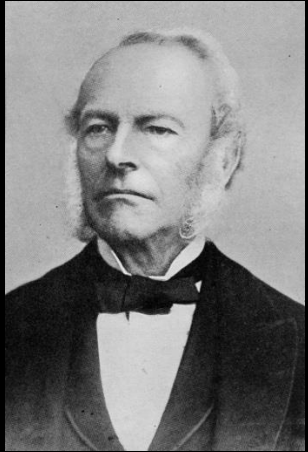
1º a descrever o fenómeno de forma científica;

Stokes shift.



Fluorescência

Mais sobre...



George G. Stokes (1819–1903)

Físico e matemático irlandês;

1º a descrever o fenómeno de forma científica;

Stokes shift.



Final séc. XIX – Início séc. XX

Lâmpadas de mercúrio (1892) e filtros (maus!);

Microscópios de fluorescência primitivos

Fluorescência

Mais sobre...

Anos 1940 – 1960: Os primeiros testes

Fluorocromos sintéticos – inicialmente indústria têxtil

A. Coons, imunologista, realizou a primeira marcação celular

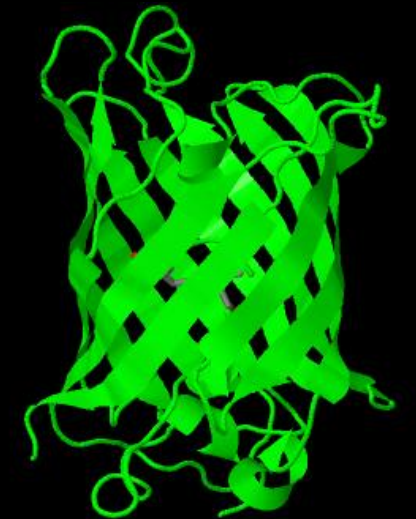


Anos 1990: O *comeback* da GFP

D. Prashler (1992) descobriu como clonar

M. Chalfie, O. Shimomura e R. Y. Tsien ganharam o Nobel (2008)

Iniciou-se a corrida ao arco-íris - YFP, CFP, mCherry, tdTomato, etc.



Fluorescência

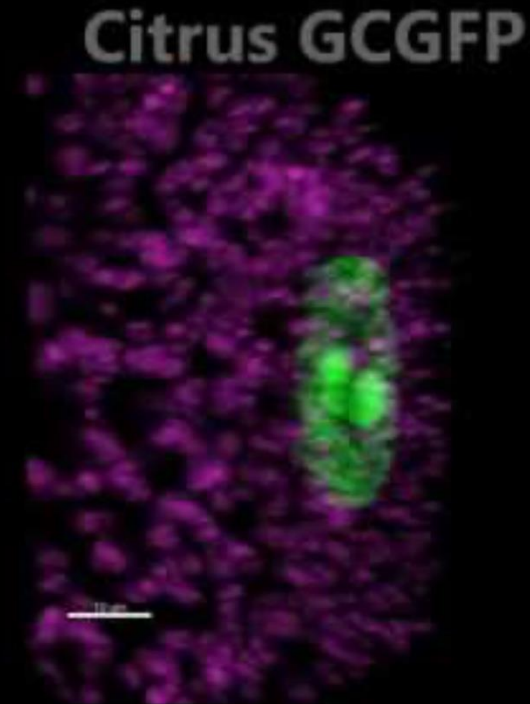
Onde estamos agora? Séc XXI

Confocal, super-resolução e FLIM

Confocal foi inventado nos anos 1960



Mais sobre...



Fluorescência

Onde estamos agora? Séc XXI

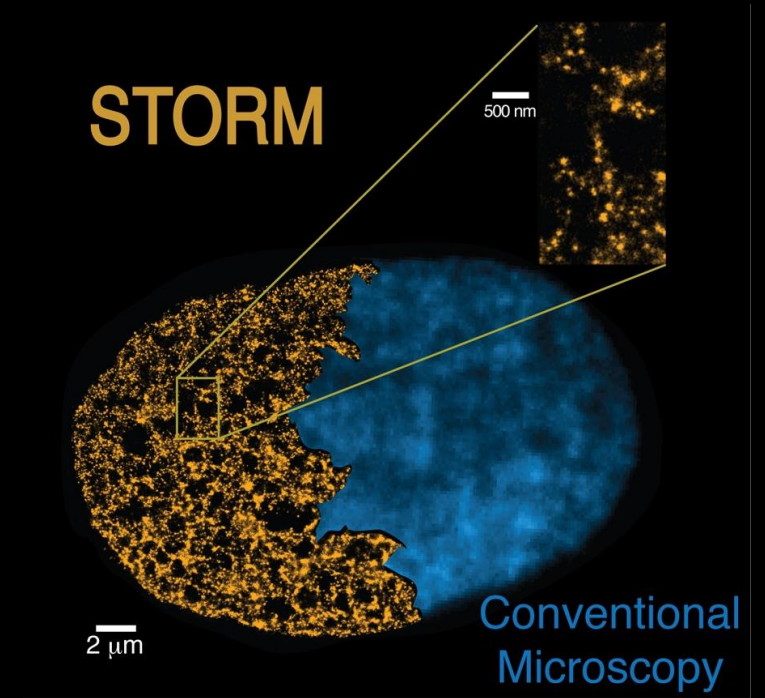
Confocal, super-resolução e FLIM

Confocal foi inventado nos anos 1960

Super-resolução



Mais sobre...



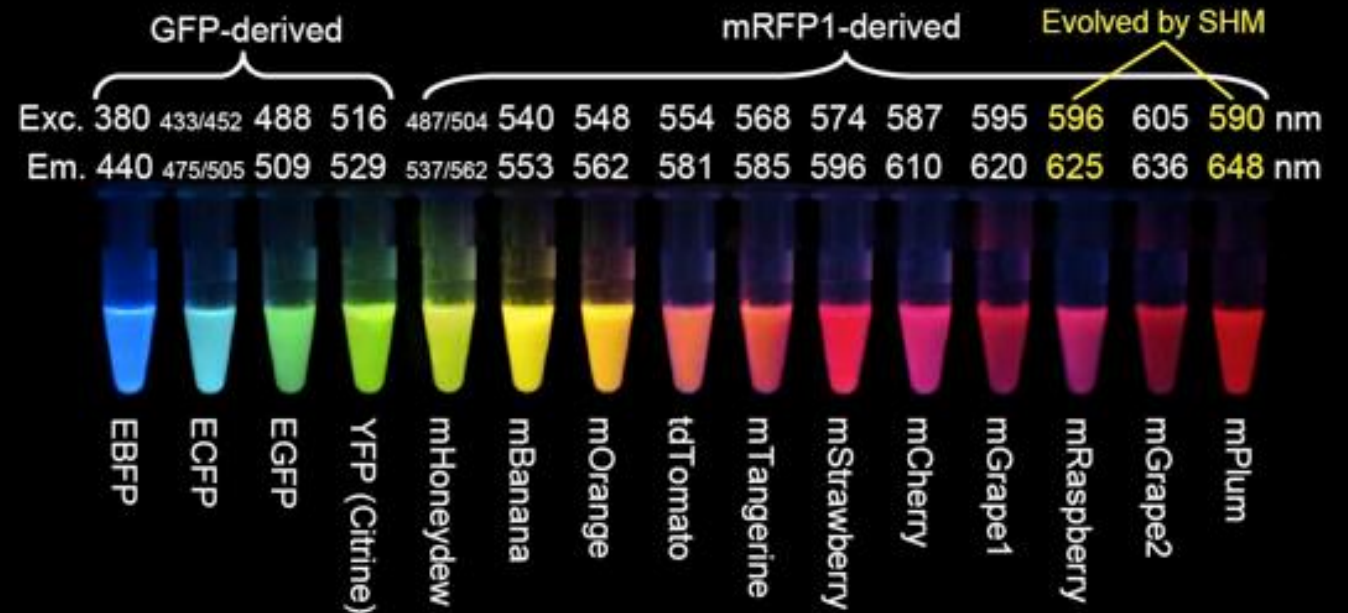
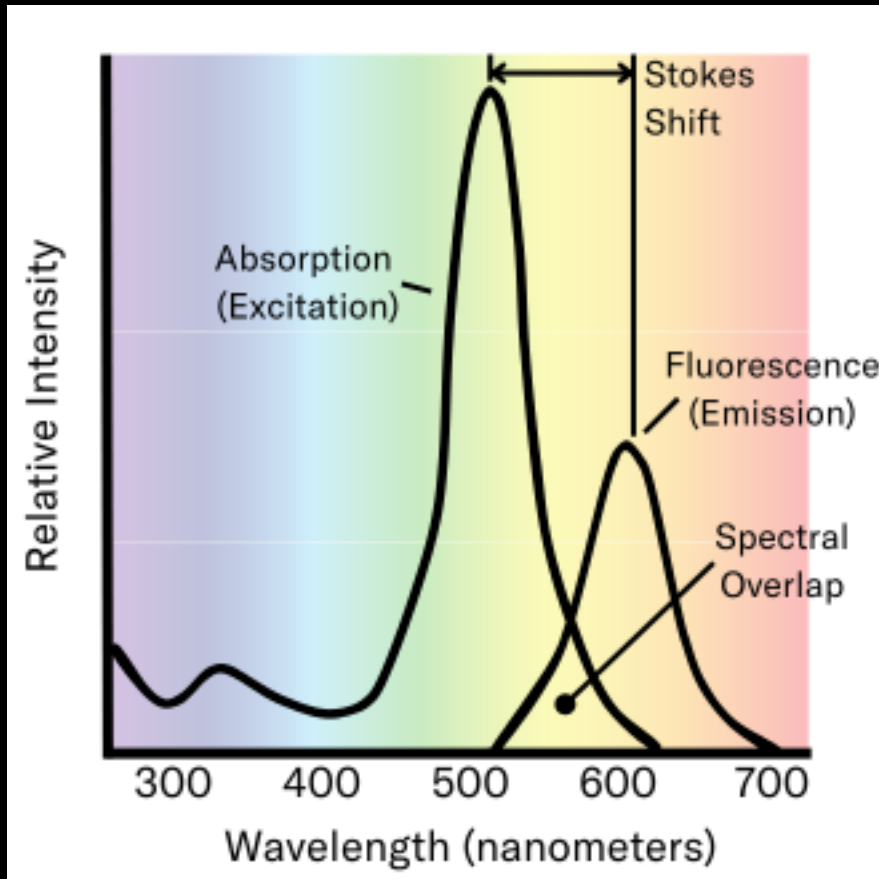
Fluorescência

Para que serve?

- Fluoróforos absorvem uma cor e emitem outra.
- Permite ver moléculas específicas em células vivas.
- Ferramenta para estudar dinâmica e localização.

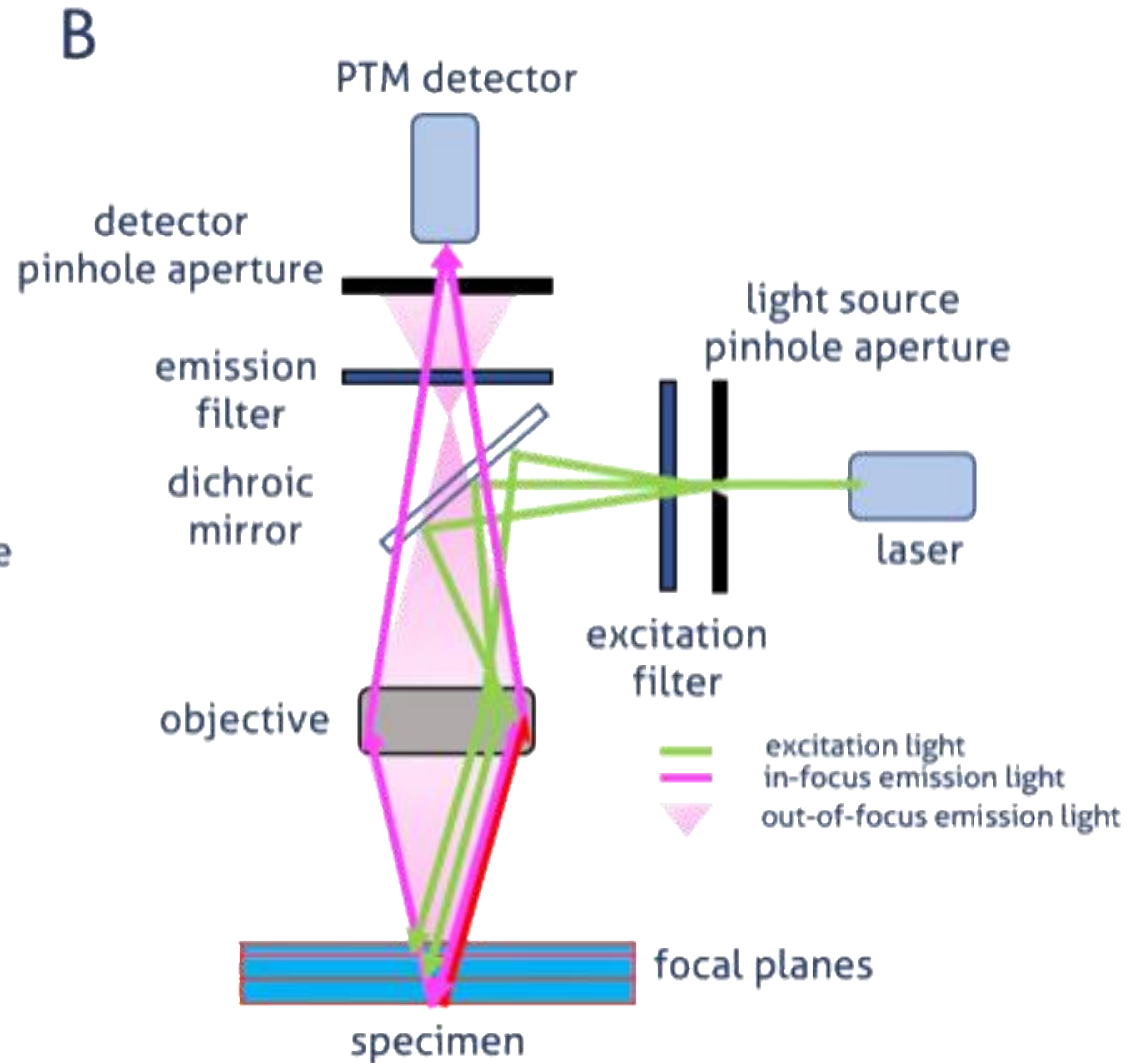
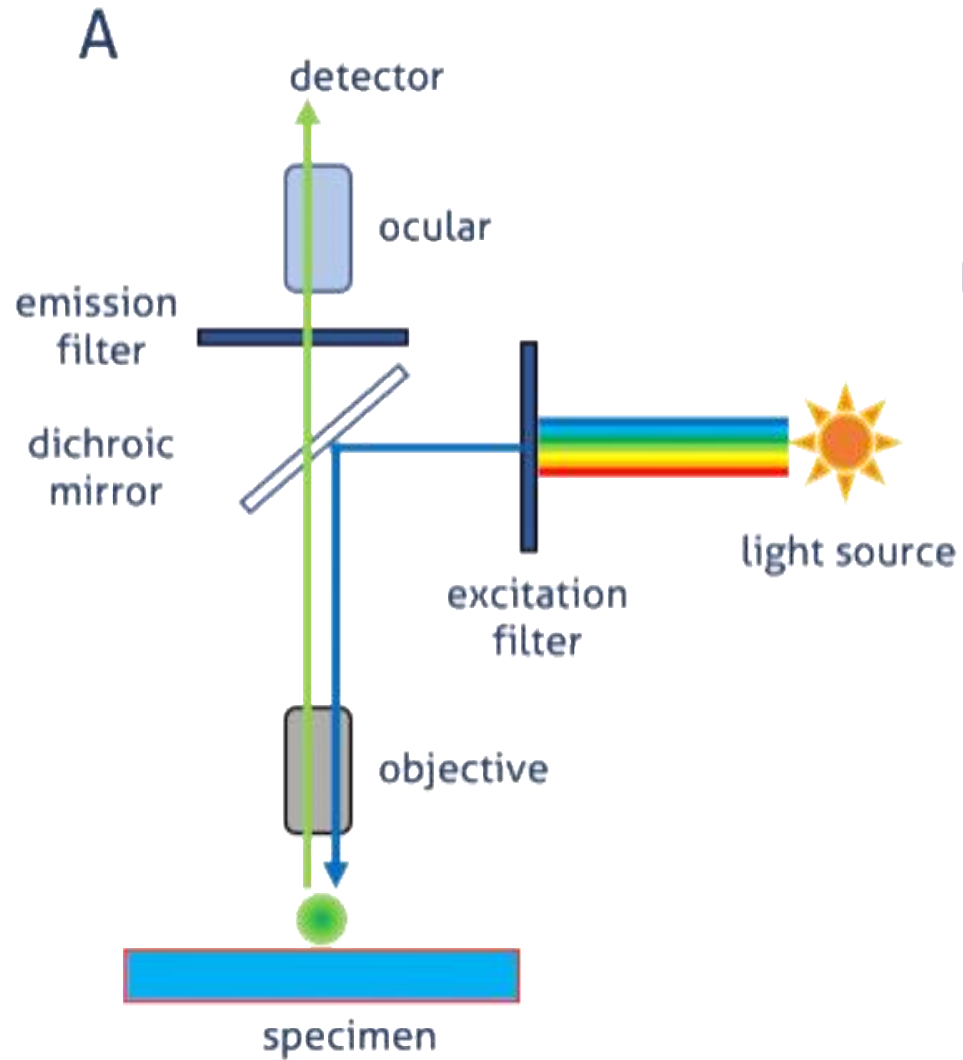
Fluorescência

Para que serve?



Fluorescência

Wide-field vs Confocal



Fluorescência

Wide-field vs Confocal

Qual é que escolho?

Wide-field	Confocal
Fácil de manipular	Requer formação mais avançada
Rápida aquisição	Laser + Pinhole → Nítidez
Mais barato	Co-localização e amostras espessas
Sem z-stack/time-course	Z-stack/time-course
Vários comprimentos de onda	Comprimentos de onda específicos

Fluorescência

Wide-field vs Confocal

Qual é que escolho?

Wide-field

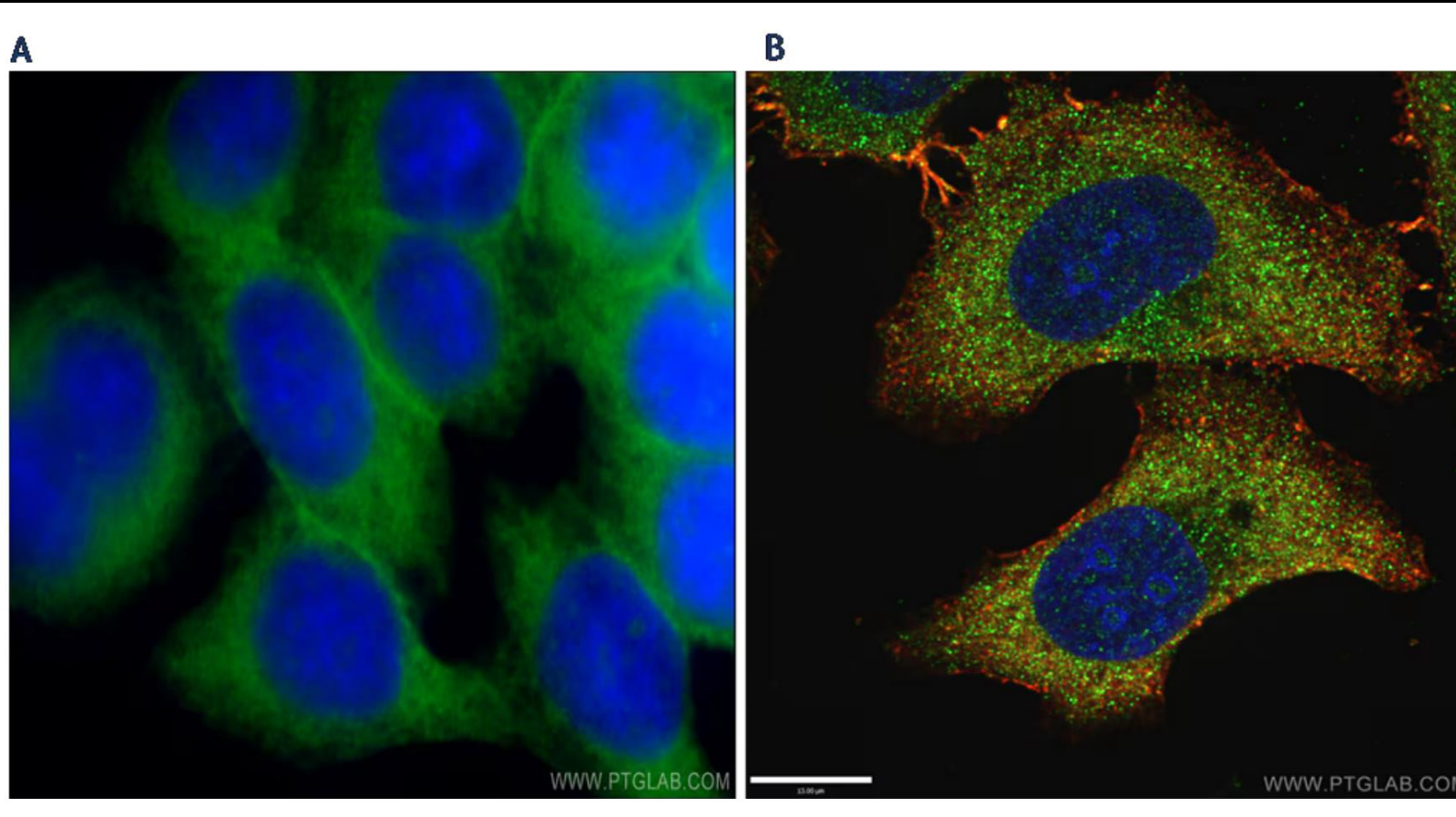
Fácil de usar

Rápida aquisição

Mais barata

Sem z-stack

Vários canais



Resolução

espessas

específicos

Fluorescência

Uma experiência...



1. **Transformar** com cassete de expressão – proteína de fusão fluorescente

2. Marcação com sondas de proteínas de interesse

- Fixar os tecidos
- Permeabilizar as células
- Adicionar sondas/anticorpos específicos



Figure 12.5.4 DAPI-stained condensed chromatin in PtK2 cells during the later stages of mitosis. DAPI (D1306, D3571, D21490) binds to the minor groove of DNA with significant fluorescence enhancement.

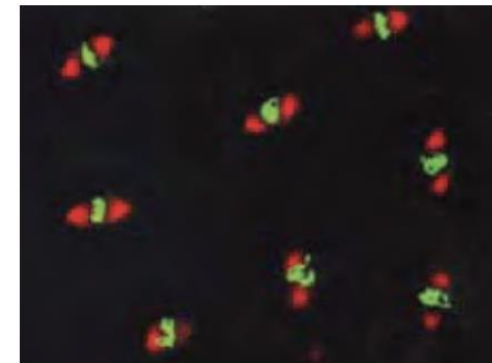


Figure 12.5.5 Mitotic divisions in early *Drosophila* embryos. The spindles were labeled with an anti- α -tubulin primary antibody and probed with a secondary antibody labeled with Lissamine rhodamine B sulfonyl chloride (L20, L1908). After a brief RNase treatment to reduce background fluorescence, the chromosomes were counterstained with SYTOX® Green nucleic acid stain (S7020). The image was contributed by Tulle Hazelrigg and Amy MacQueen, Columbia University.

Fluorescência

Muito importante!!

Os controles são o que validam a experiência

- Densidade celular
- Câmara húmida
- Concentração do Fluorocromo
- Transporte da amostra

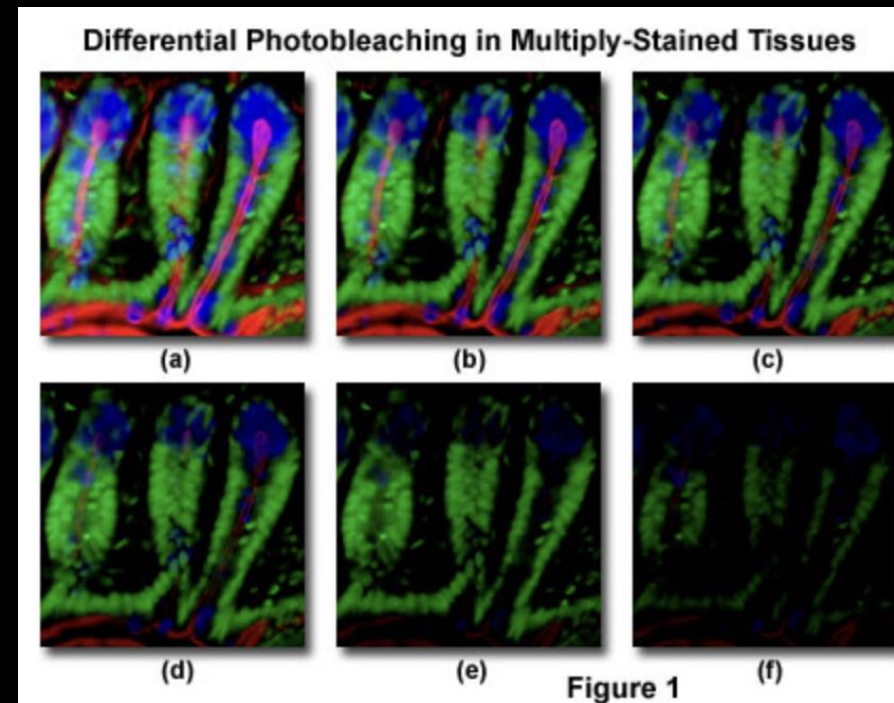
Viabilidade Celular

Photobleaching

Data acquisition

- Definições (gain, exposure, brightness, contrast, etc)
- Time (exposure, incubation, etc)

Cuidados a ter



Fluorescência

vs

Electrónica

Dinâmica

Proteínas específicas

Células vivas

Ultraestrutura

Alta resolução (<200 nm)

Superfícies e texturas

Mais sobre

Electrónica

Anos 1920 – 1930:

Electrões como 'fonte de luz' com comprimento de onda menor

1931: surge o primeiro protótipo

Universidade Técnica de Berlin, Ernst Ruska & Max Knoll (1986 Nobel for Ruska)



Mais sobre

Electrónica

A black and white electron micrograph showing cellular structures, including what appears to be a nucleus with a nucleolus and various organelles, used as a background for the title 'Electrónica'.

Anos 1920 – 1930:

Electrões como 'fonte de luz' com comprimento de onda menor

1931: surge o primeiro protótipo

Universidade Técnica de Berlin, Ernst Ruska & Max Knoll (1986 Nobel for Ruska)

1938: primeiro MET comercial

Produzido pela Siemens, Ernst Ruska & Bodo von Borries

Anos 1950 - 1970: a padronização da ferramenta para Bio Molecular

Melhoria dos instrumentos e melhores protocolos de preparação de amostras

Mais sobre

Electrónica

Anos 1920 – 1930:

Electrões como 'fonte de luz' com comprimento de onda menor

1931: surge o primeiro protótipo

Universidade Técnica de Berlin, Ernst Ruska & Max Knoll (1986 Nobel for Ruska)

1938: primeiro MET comercial

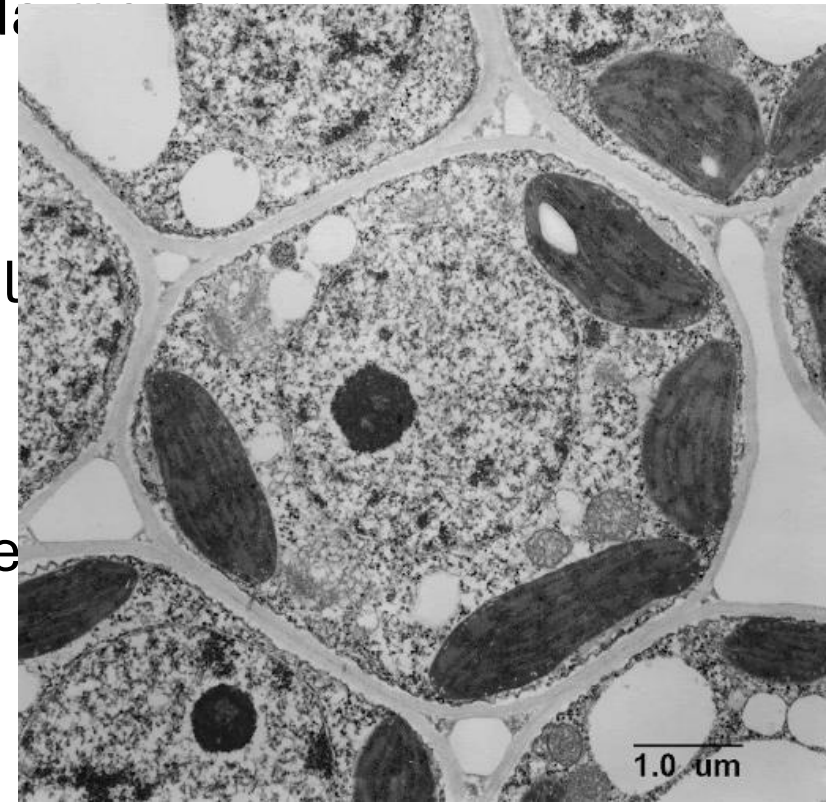
Produzido pela Siemens, Ernst Ruska & Bodo von Borries



Mais sobre

Electrónica

Anos 1920 – 1930:



Mais sobre

Electrónica

1937: primeiro microscópio de varrimento

Manfred Von Ardenne e Ernst Ruska

Recolhe informação sobre a topografia da amostra e da sua estrutura

1965: primeiro MEV comercial

Cambridge Instruments

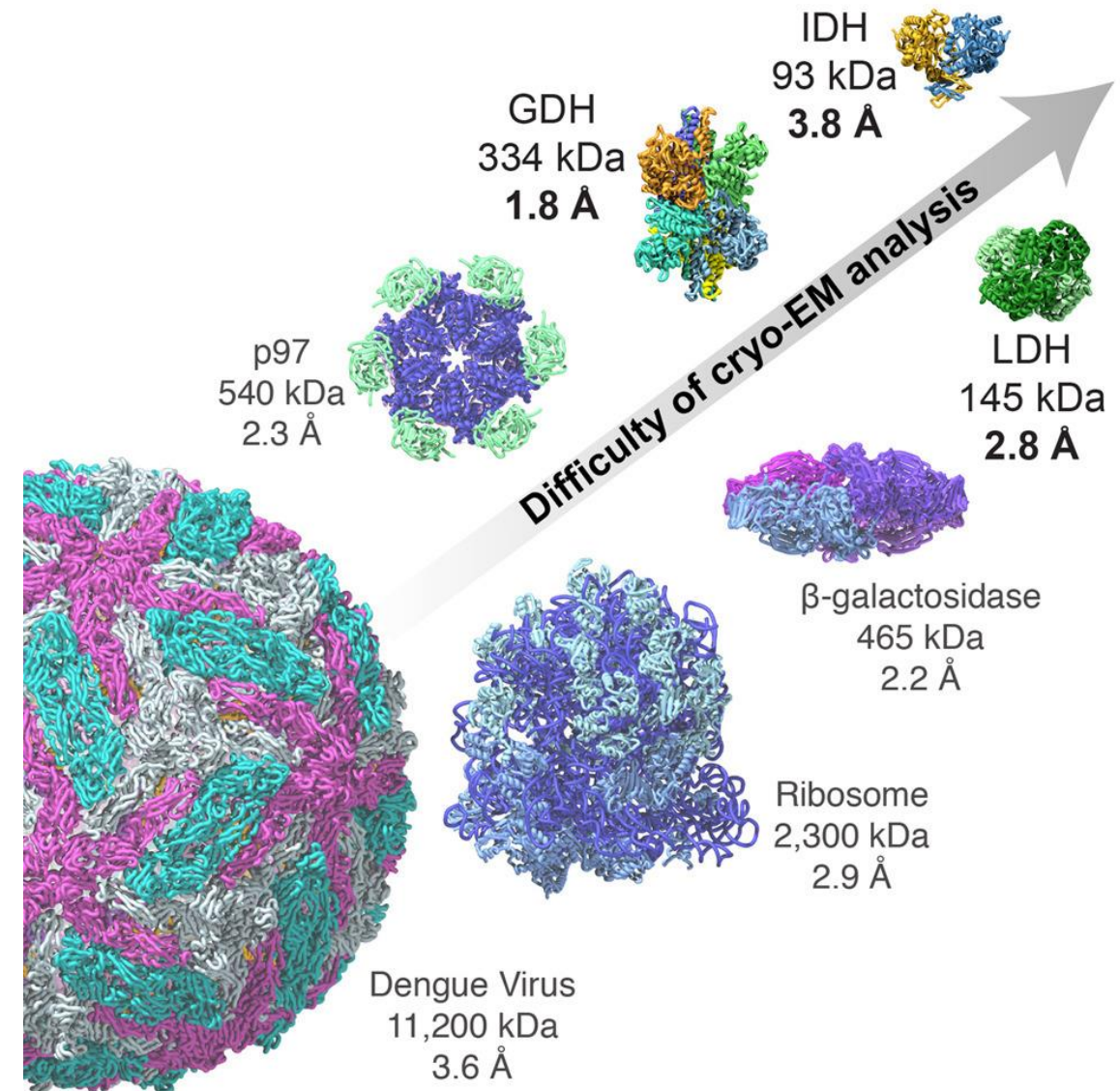
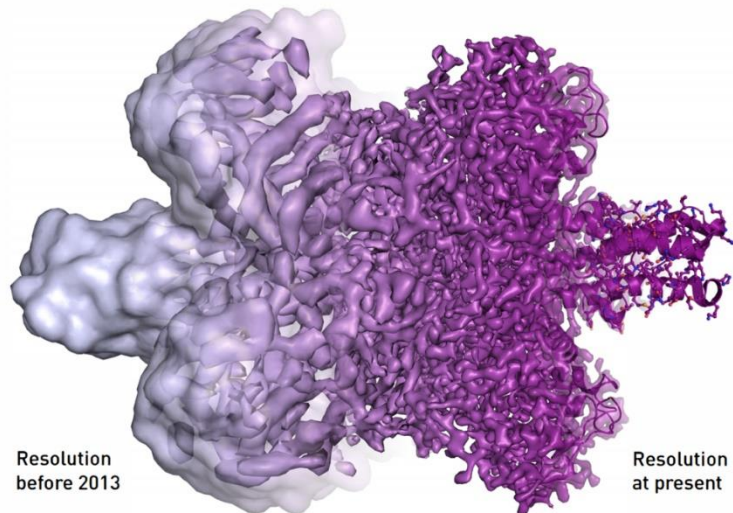
Complemento para estudar superfícies



Mais sobre

Séc. XXI: Cryo-EM

Macromoléculas perto do estado nativo
em alta resolução



Para que serve?

Electrónica

A black and white electron micrograph showing the internal structure of a cell. Several large, dark, oval-shaped mitochondria with internal folds (cristae) are visible. The surrounding cytoplasm is filled with various organelles and a network of fine lines representing the endoplasmic reticulum.

TEM = resolução atómica/nanométrica + interior da célula

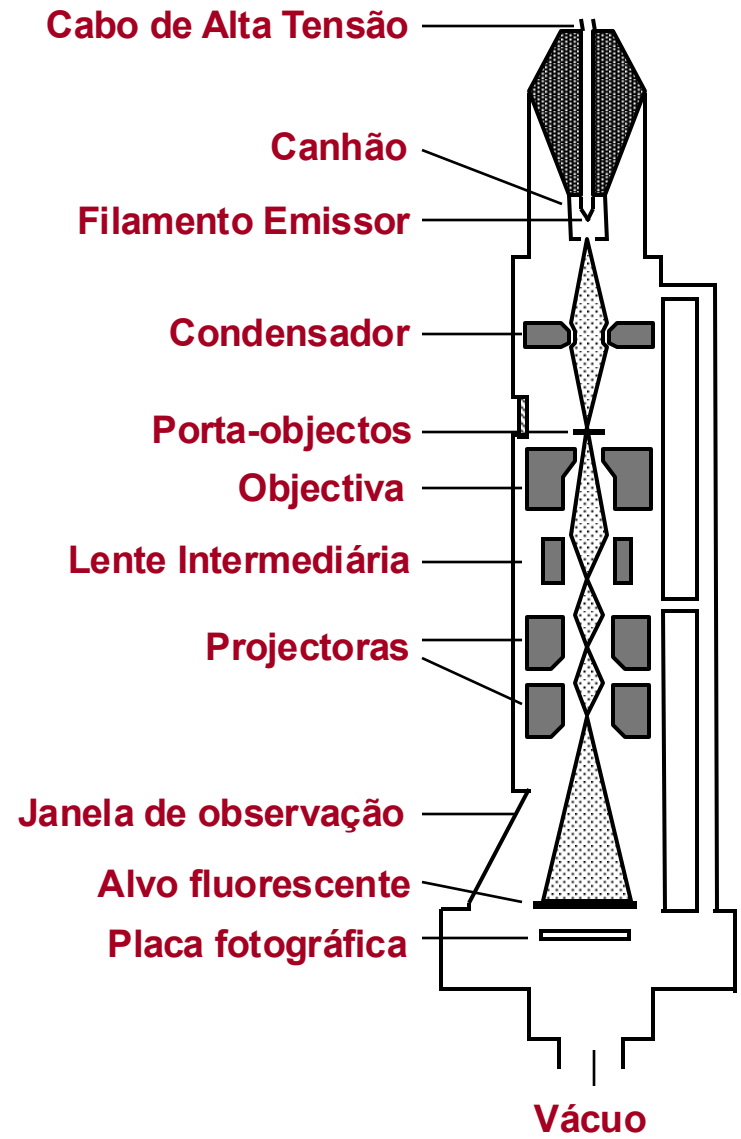
1. Morfologia e organização interna de células e tecidos
2. Medicina e diagnóstico
3. Biotecnologia e materiais
4. Biologia estrutural a nível celular

Mais sobre

Como é um MET?

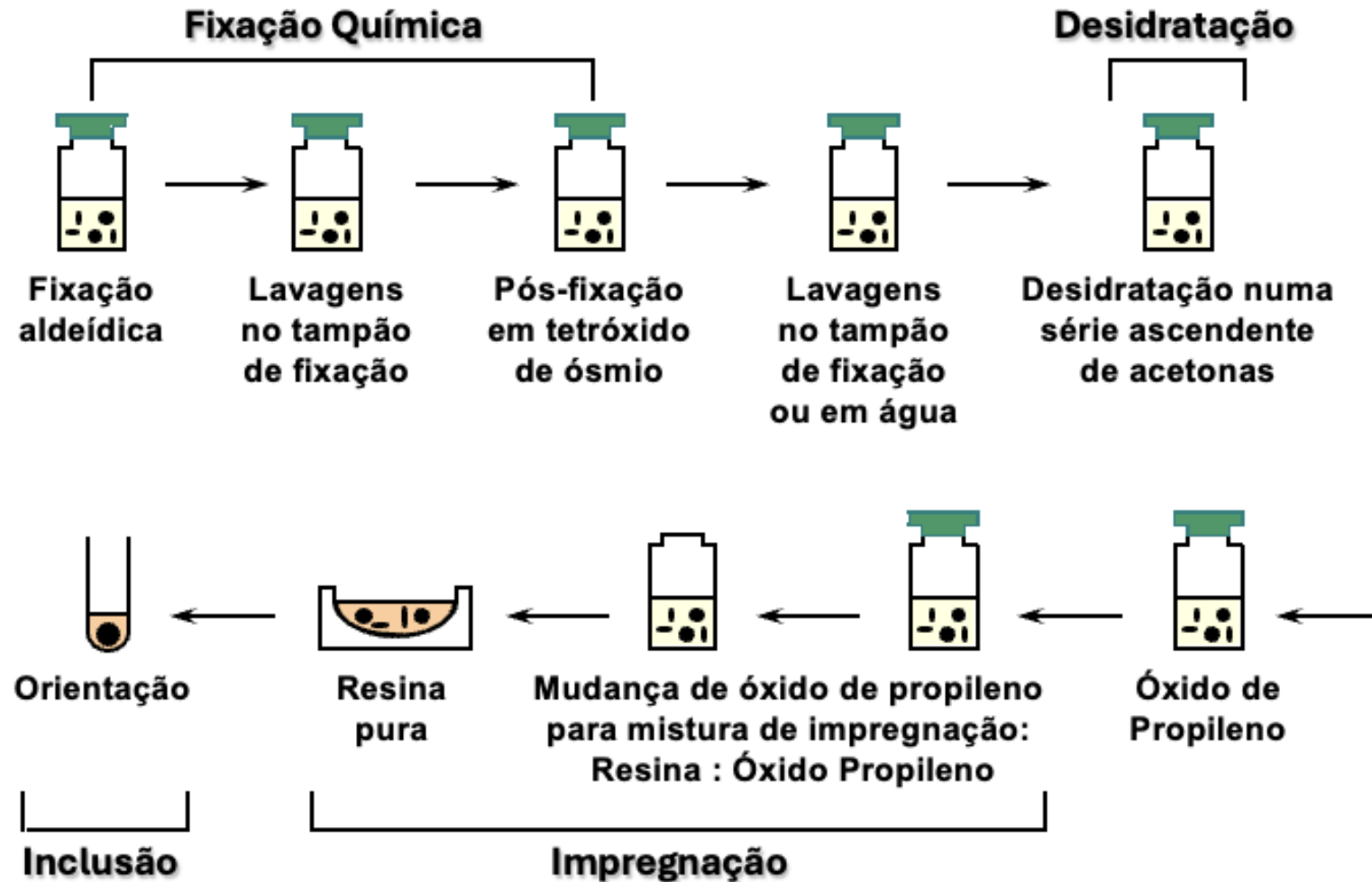


Electrónica



Uma experiência...

Electrónica



Uma experiência...

Electrónica

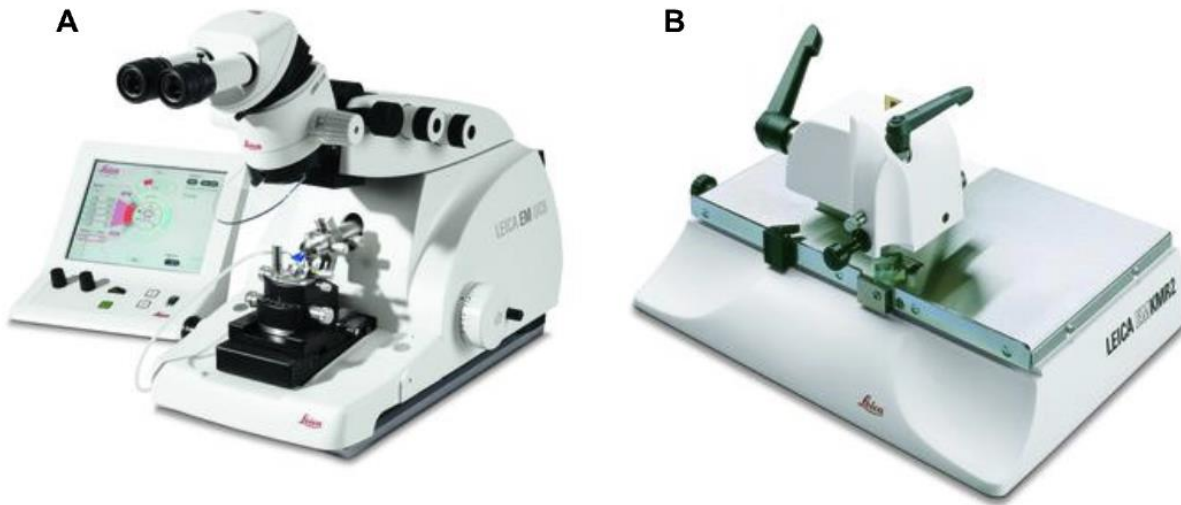


Figure 2.4.3.1 – Ultramicrotome Leica EM UC6 (A) and Glass Knife maker Leica EM KMR2 (B).

Santos, R.B. 2012



Uma experiência...



Electrónica

Análise sub celular

Marcação de proteínas/estruturas de interesse

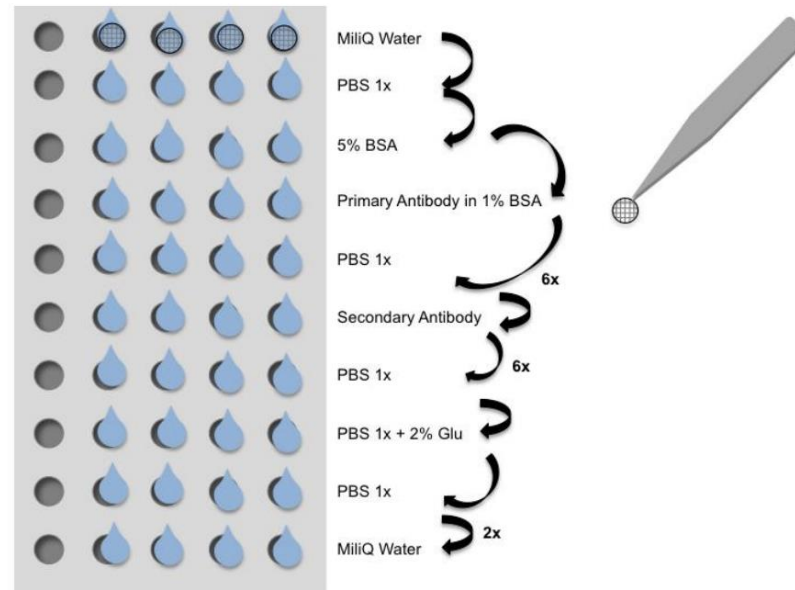
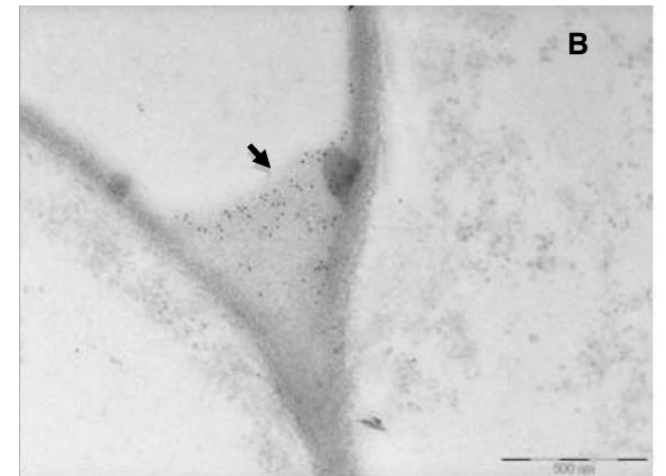


Figure 2.4.4.1 – Immunolocalization scheme.



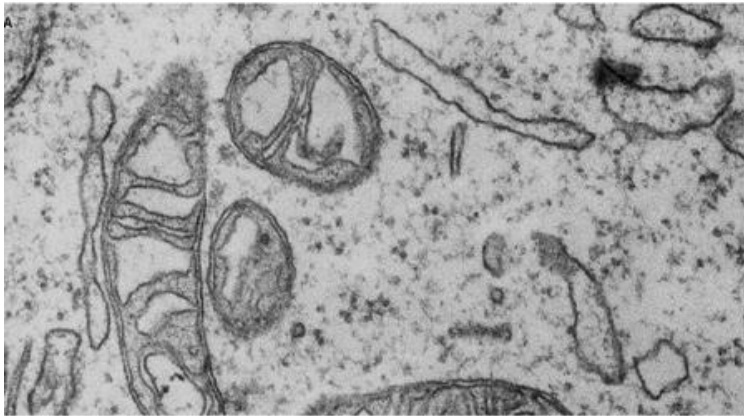
O que vemos em



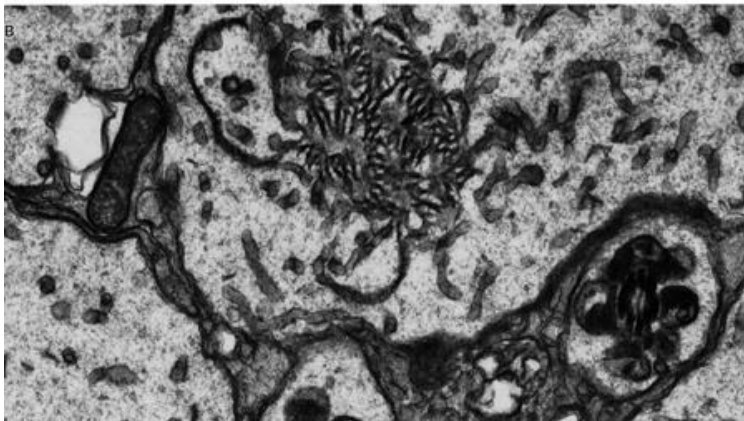
Electrónica

Cortes ultrafinos – 10 a 100 nm

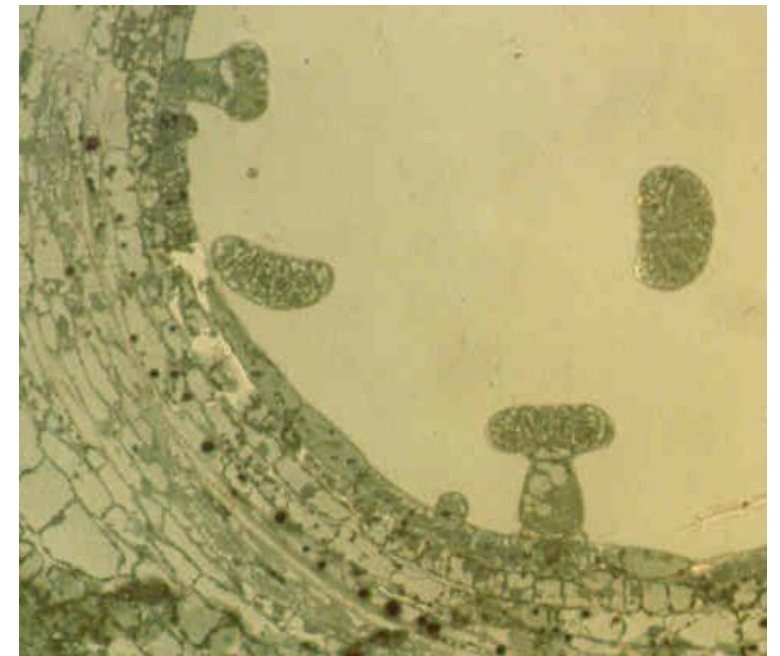
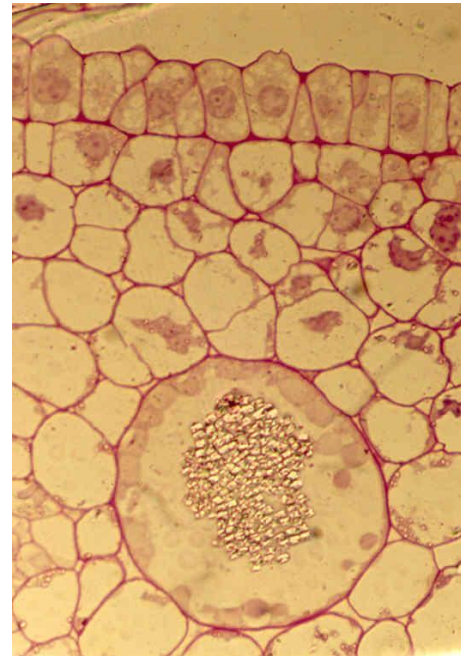
Thin Section



Thick Section

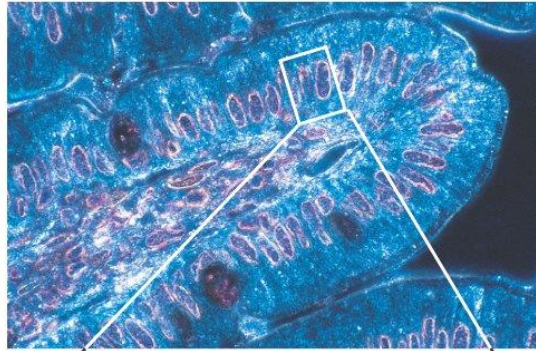


Cortes semi-finos – 0.5-10 μm



O que vemos em

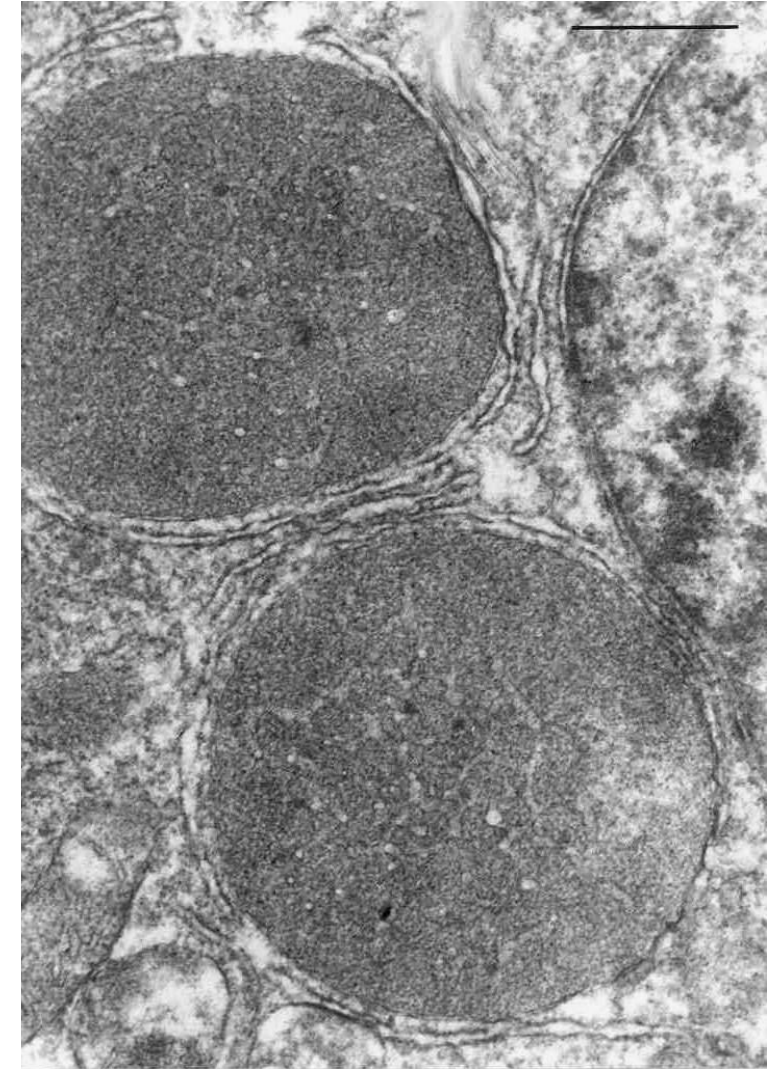
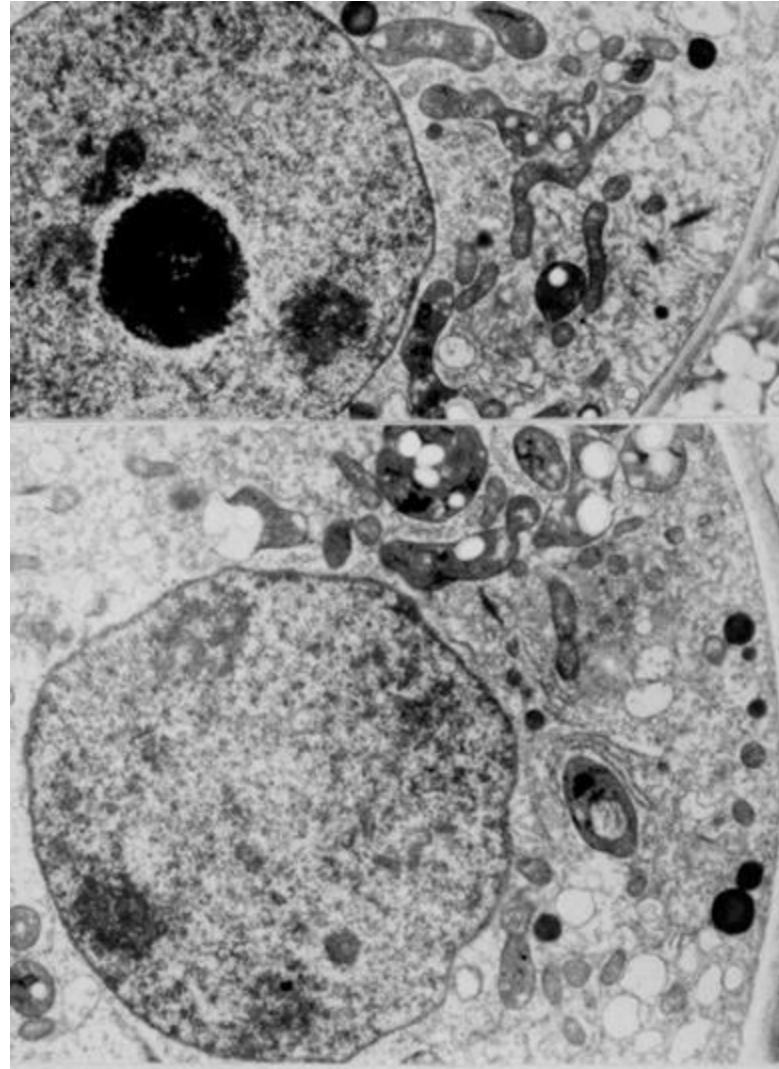
Electrónica



Apical
microvilli



Mitochondria



Para que serve?

Electrónica



SEM = topografia 3D + superfícies + grande profundidade de campo

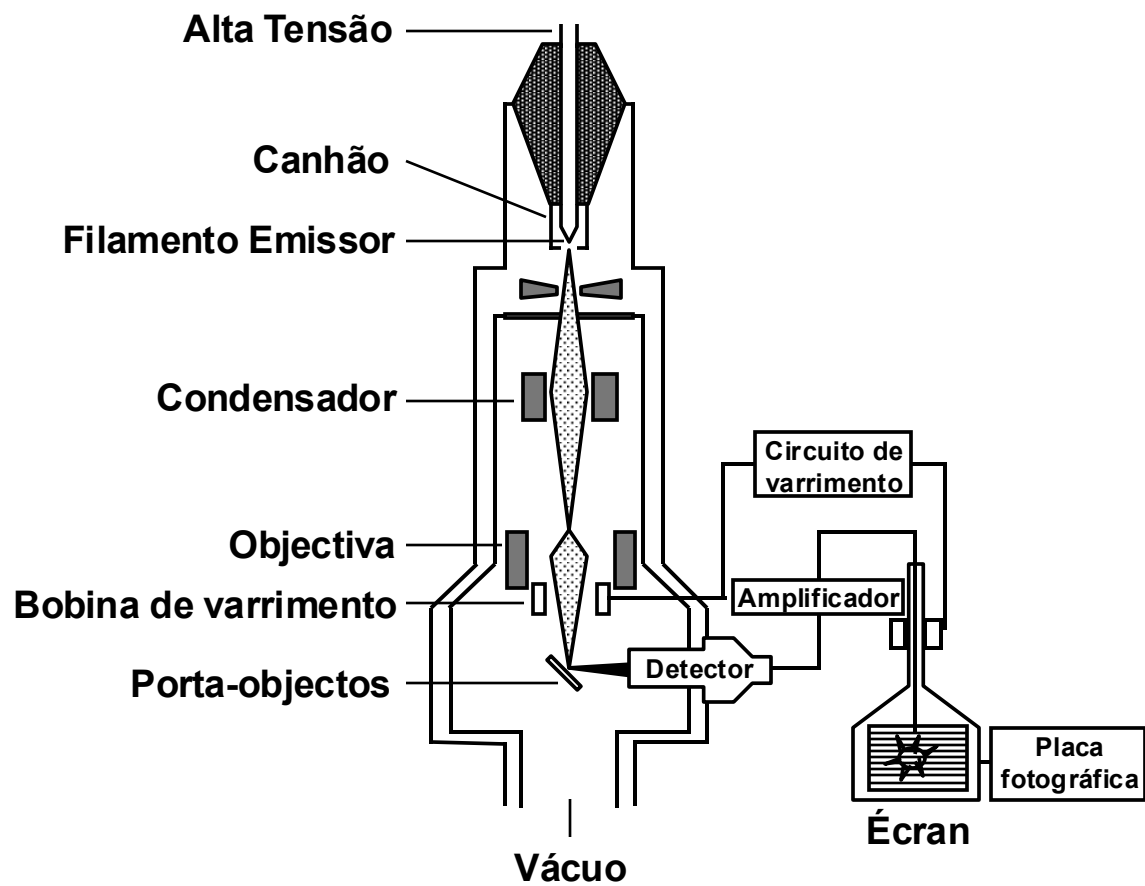
1. Determinar estruturas de proteínas complexas
2. Tomografia cryo-EM (cryo-ET): “filmar” a célula por dentro
3. Nanotecnologia e biomateriais

Mais sobre

Como é um MEV?

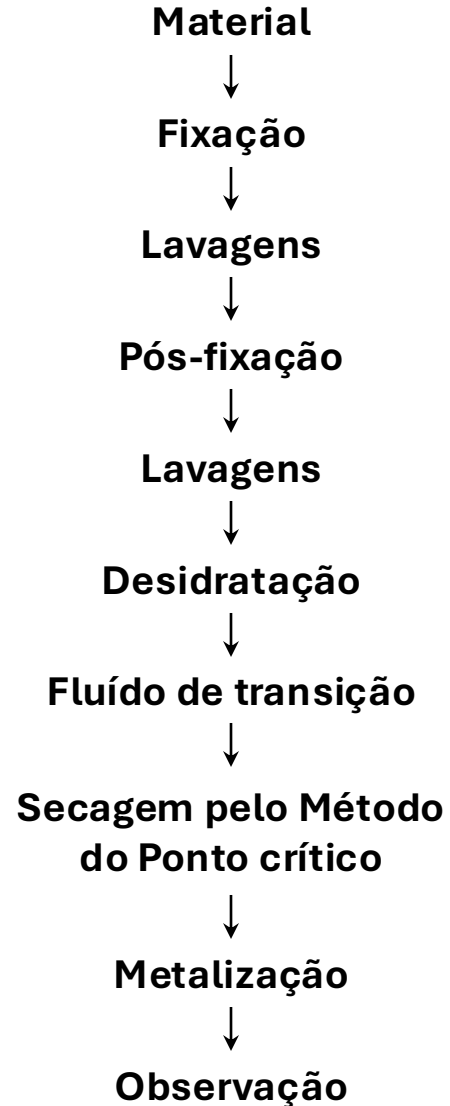


Electrónica

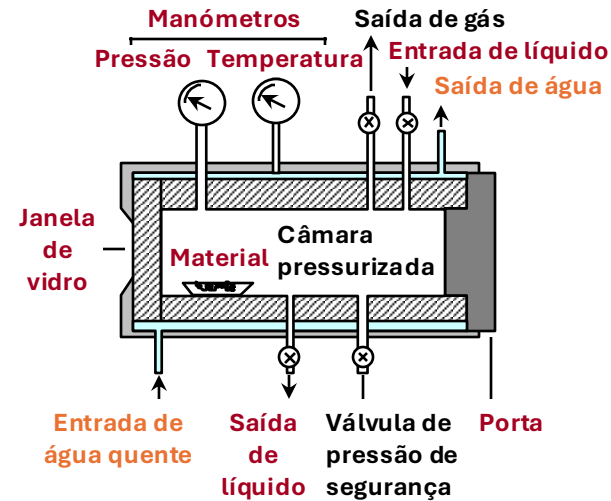


Uma experiência...

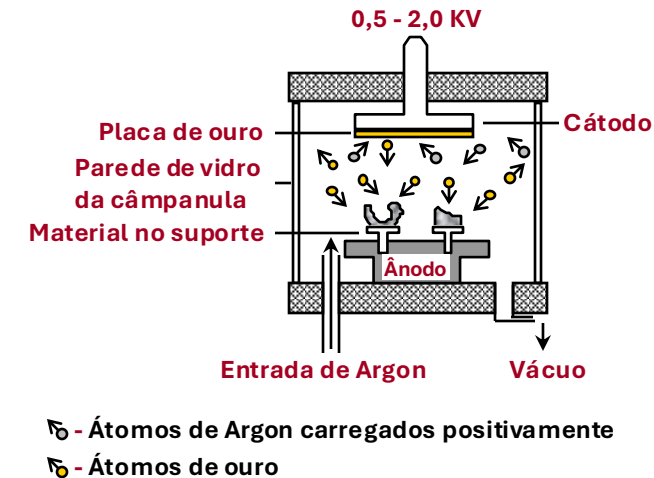
Electrónica



Aparelho de secagem pelo método do ponto crítico

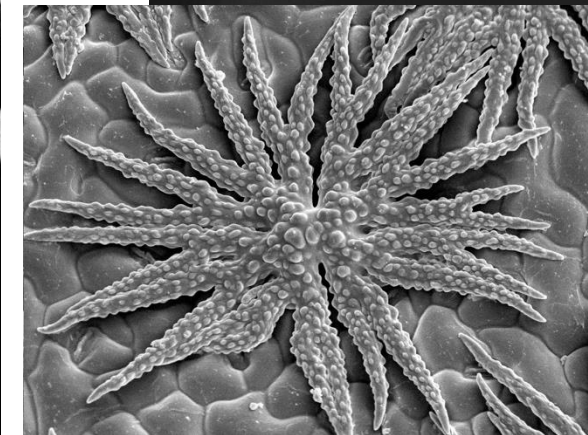
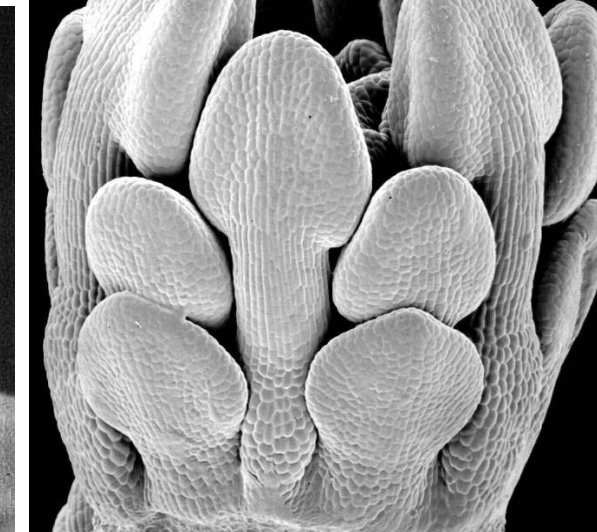
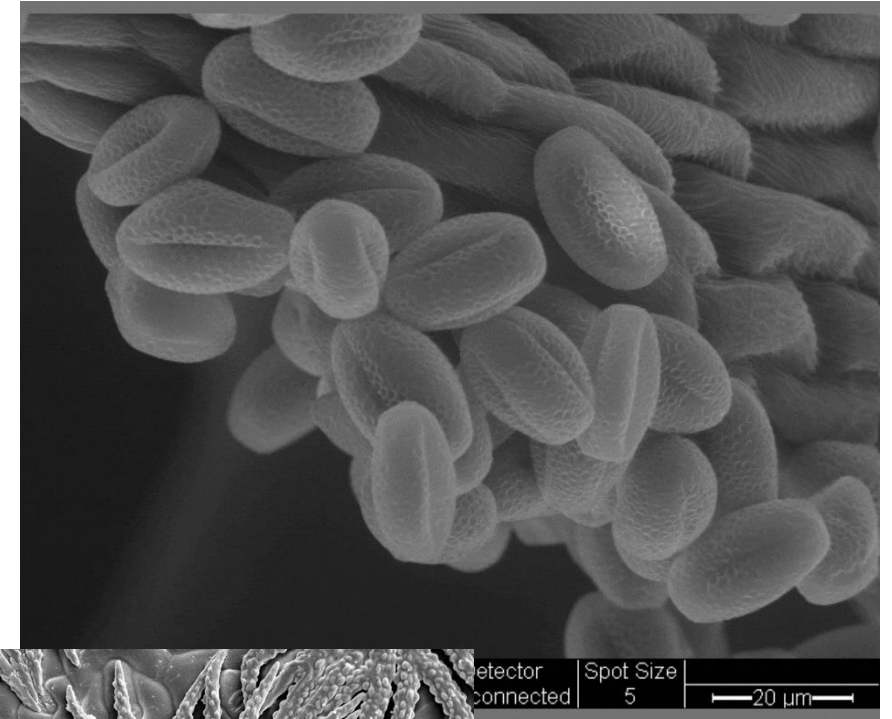
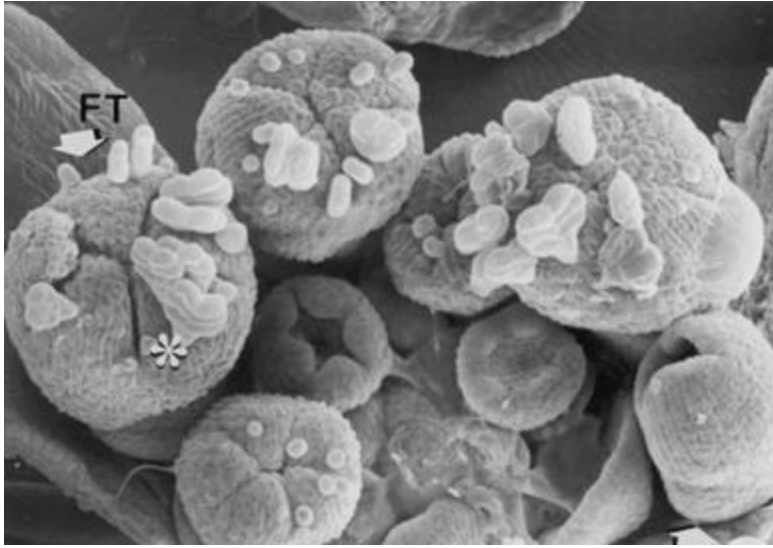


Aparelho de metalização



O que vemos em

Electrónica



Detector connected | Spot Size 5 | 20 μ m

	Microscópio Óptico	MEV	MET
Fonte de Radiação	Filamento de Tungsténio	Filamento de Tungsténio	Filamento de Tungsténio
Tipo de radiação	Fotões	Electrões	Electrões
Meio de propagação	Atmosfera	Vácuo $<10^{-4}$ Pa	Vácuo $<10^{-6}$ Pa
Lentes	Vidro ou Quartzo	Electromagnéticas	Electromagnéticas
Resolução	$\approx 200\text{nm}$	$\approx 5\text{nm}$	$\approx 0,14\text{nm}$
Profundidade de foco	Reduzida	Muito elevada	Elevada
Modo de ampliação	Substituição das lentes	Alteração da largura de varrimento	Alteração da corrente das lentes de ampliação
Contraste	Absorção / Reflexão	Electrões secundários	Dispersão / Difracção
Observação	Directa da imagem luminosa	Conversão de electrões em fotões e análise em monitor de televisão	Conversão de electrões em fotões por um alvo fluorescente
Espessura do espécime	$> 0,5\mu\text{m}$	$< 10\mu\text{m}$	$< 1\mu\text{m}$
Preparação de espécime	Fácil	Relativamente fácil	Difícil