

Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF)

Ann. Rev. Biophys. Bioeng. **1984** 13: 247-268

Daniel Axelrod, Thomas P. Burghardt, Nancy L. Thompson

Guadalupe Díaz Costanzo

Martín Caldarola

Esquema

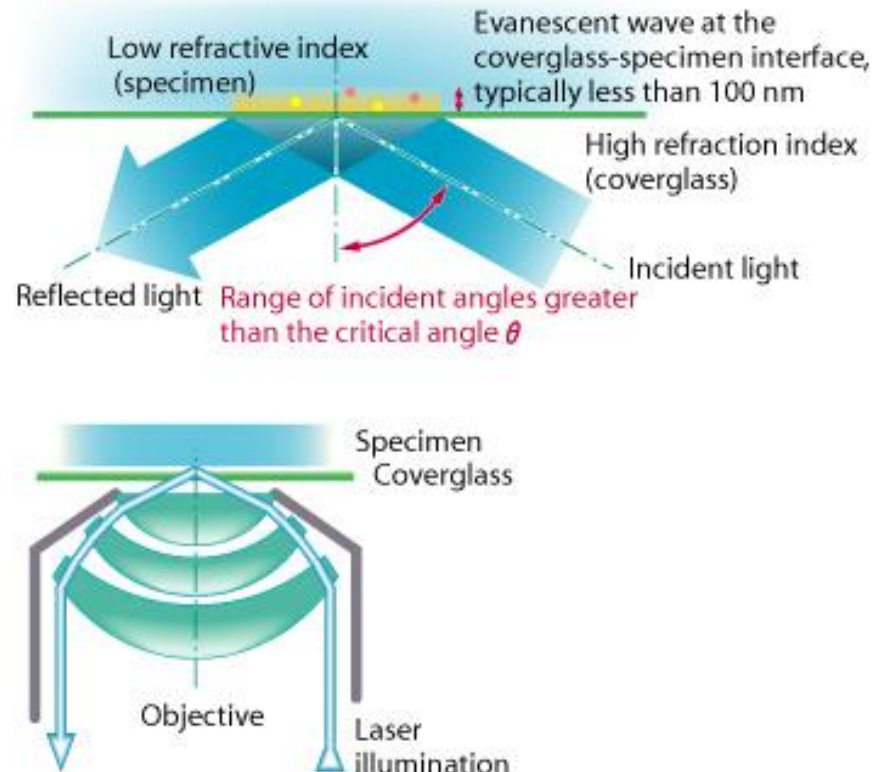
- Configuración general
- Ondas evanescentes
- Capas intermedias
- Aplicaciones
 - Mediciones en el equilibrio
 - Cinética Química
 - Saltos de concentración
 - TIRF/FCS o /FRAP
 - Conformación molecular
 - Substratos celulares
- Ventajas generales de la técnica

Configuración general

La capa delgada que se ilumina es un campo evanescente; la intensidad decae exponencialmente a medida que aumenta la distancia en la dirección normal a la superficie

ANGULO CRÍTICO

$$\theta_c = \text{ArcSen}\left[\frac{n_2}{n_1}\right]$$

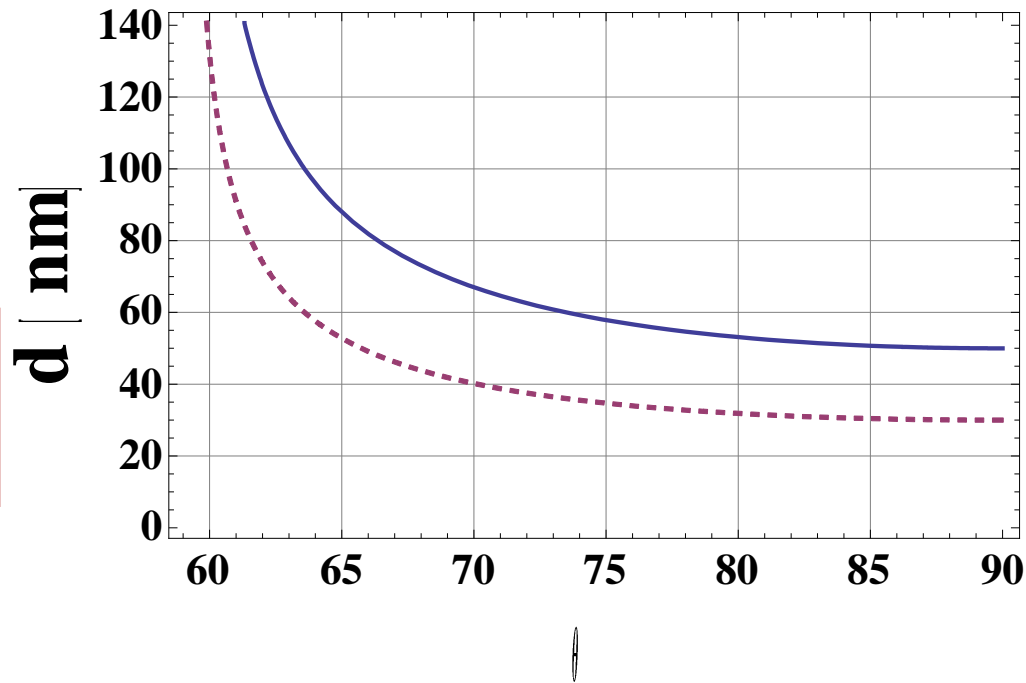


Intensidades evanescentes

La capa delgada que se ilumina es un campo evanescente; la intensidad decae exponencialmente a medida que aumenta la distancia en la dirección normal a la superficie

$$I(z) = I_0 e^{-z/d}$$

$$d(\theta) = \frac{\lambda_0}{4\pi} [n_1^2 \text{Sen}^2 \theta - n_2^2]^{-1/2}$$



La distancia de penetración de la onda evanescente se modifica con el ángulo θ

$n_1=1.33$, $n_2=1.55$,
500 nm y 300 nm (--)

Layers intermedios

Inteface entre dos medios



Dispositivo multicapa

- Membrana biológica
- *Coating* metálico

Observaciones:

- 1) No importa el índice de refracción, n_2 , de la capa intermedia
- 2) La capa intermedia es a lo sumo, de unas decenas de nanometros
- 3) Independientemente de n_2 y del espesor de la capa intermedia, la onda evanescente en el medio 3, caerá exponencialmente

Layers intermedios

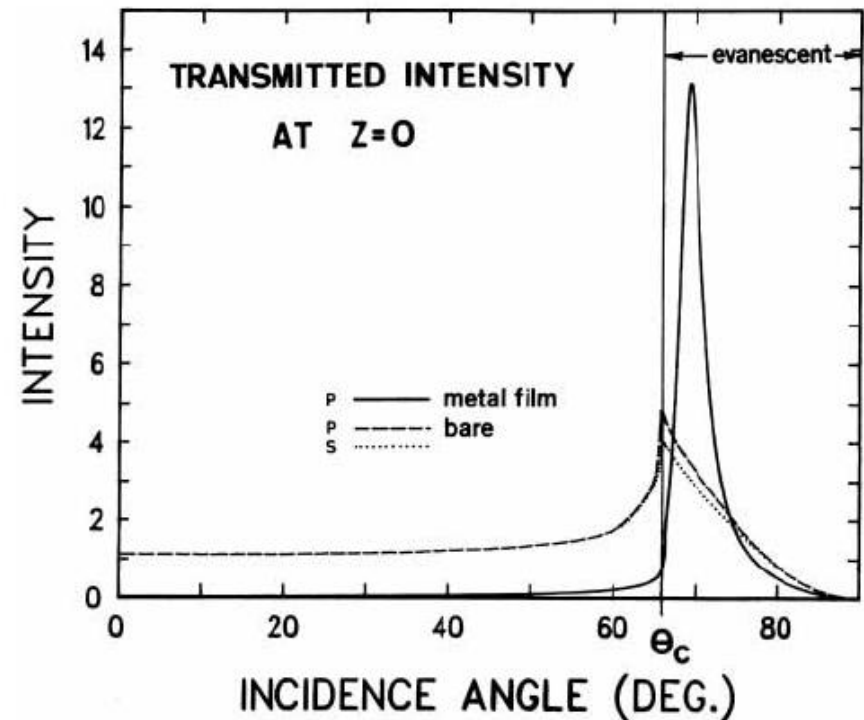
Intensificación de la intensidad evanescente por agregado de un *layer* metálico

Hasta un orden de magnitud mayor
que la intensidad incidente

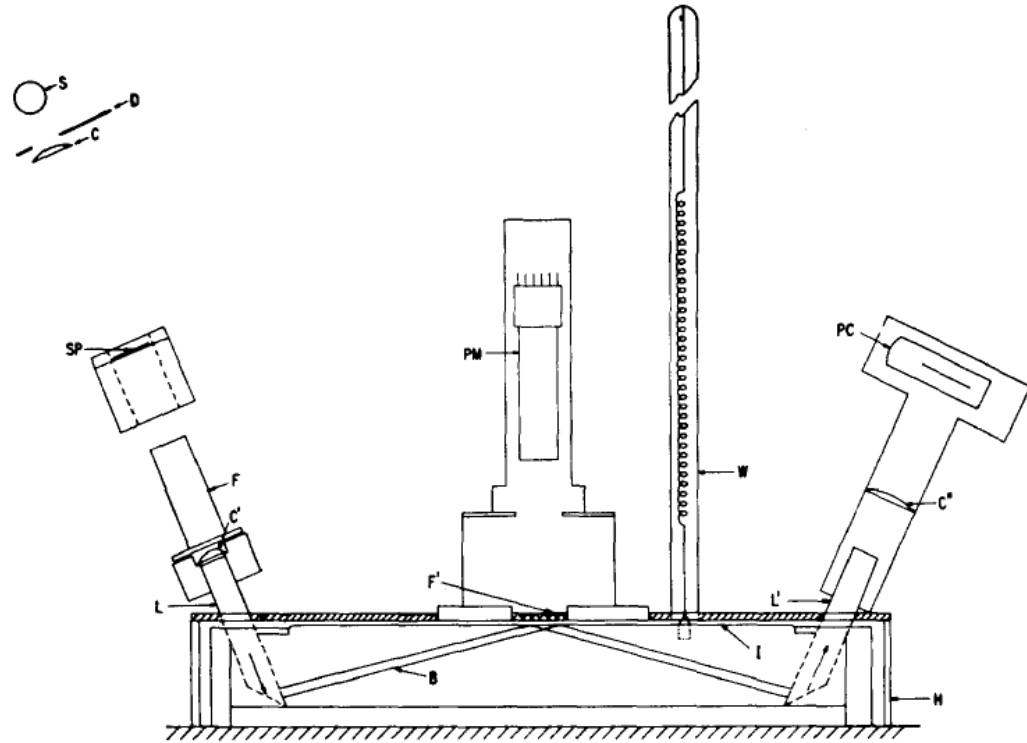
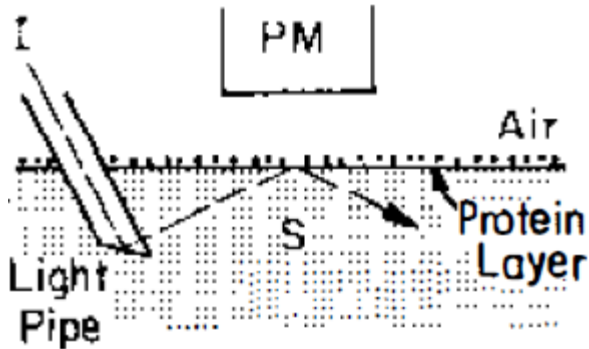
Excitación resonante colectiva
electrónica en la interfaz



PLASMONES



Mediciones en el equilibrio: *El caso de la clorofila¹*



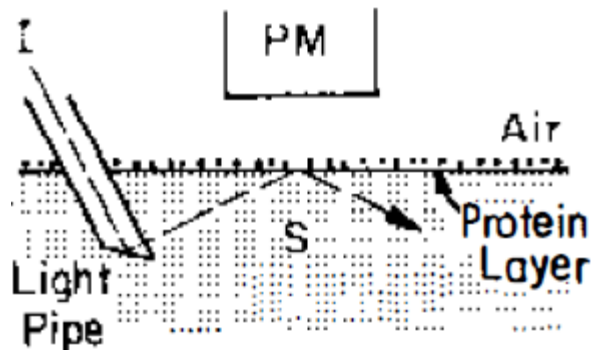
- Interfaz: agua-aire
- Clorofila depositada como film
- El fotomultiplicador PM detecta la fluorescencia.

$$\begin{aligned} n_{\text{agua}} &= 1,33 \\ n_{\text{aire}} &= 1 \end{aligned}$$



$$\theta_c = 48,75^\circ$$

Mediciones en el equilibrio: *El caso de la clorofila*¹



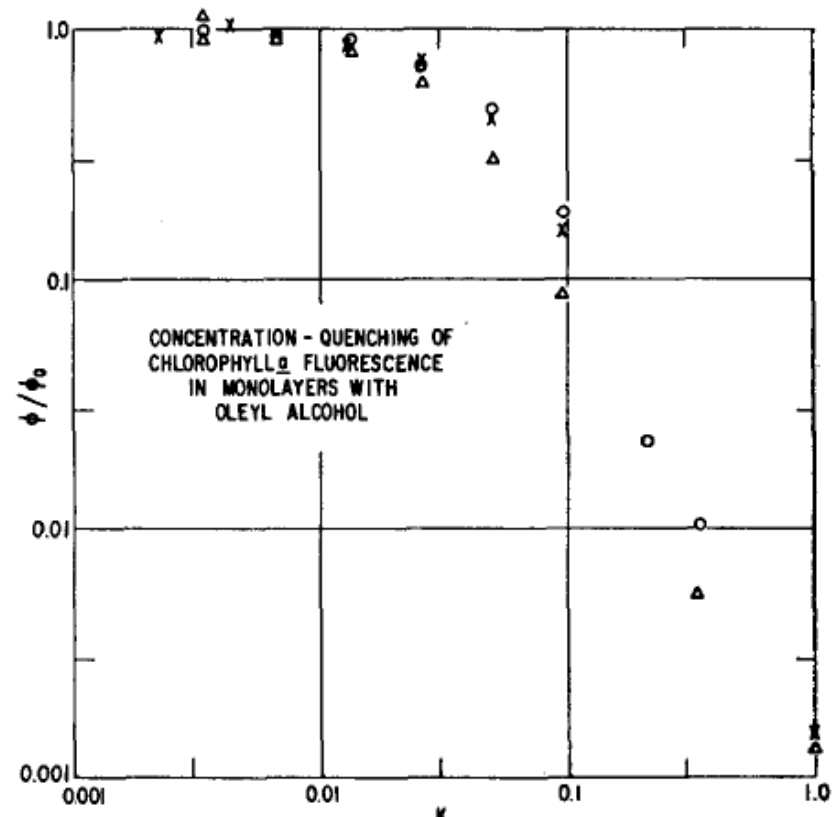
Interpretación de datos



Quenching por concentración

Mecanismos de transferencia de energía

Rendimiento de fluorescencia vs.
fracción del area del film ocupado por clorofila

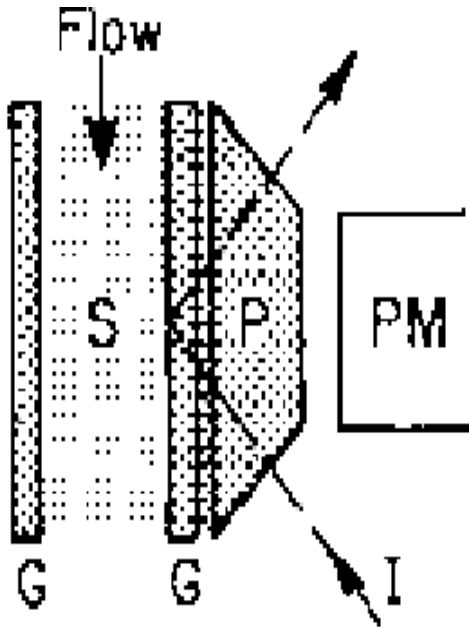


¹Tweet, A. G.; Gaines, Jr., G. L.; Bellamy, W. D. *J. Chem. Phys.* **1964**, 40, 2596-2600

Cinética química

- Con TIRF se puede estudiar:
 - Constantes de adsorción en superficies.
 - Cuánto tiempo se quedan “pegadas” las moléculas a la superficie.
- Para estos fenómenos hay varios modelos, entre ellos el de Langmuir.
- También se puede combinar con otras técnicas, como FRAP o FCS.

Cinética química: *concentration jump*

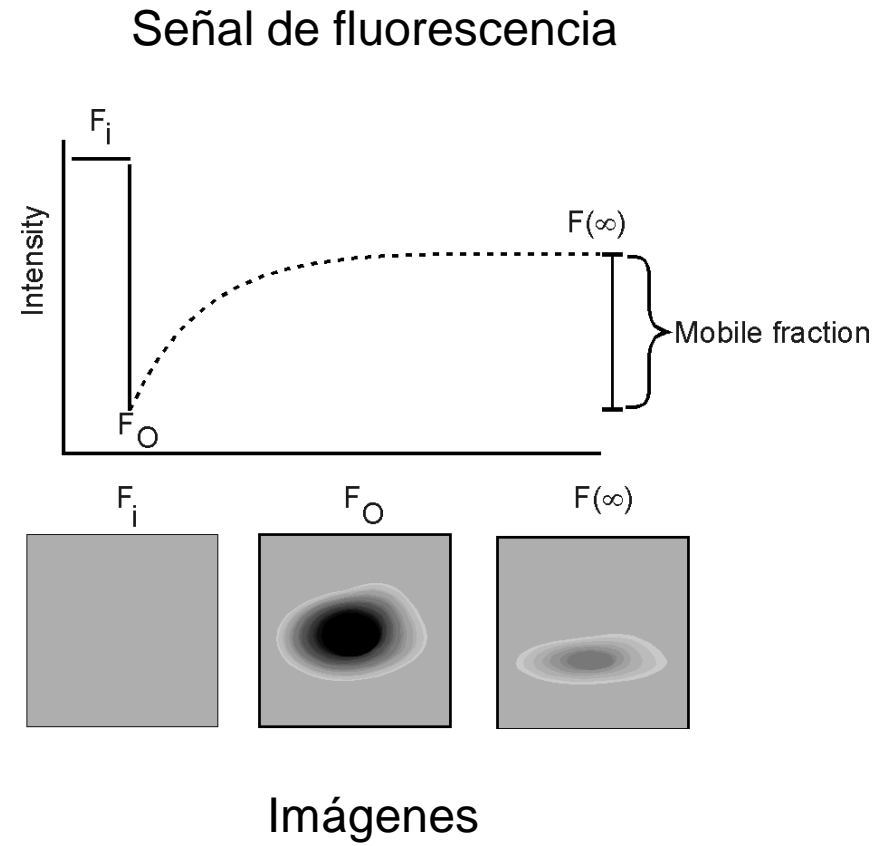


- Se detecta la fluorescencia con el PM.
- Se genera un flujo para cambiar bruscamente la concentración de fluoróforo desde 0 hasta C_f .
- La señal del PM es proporcional a la cantidad de moléculas en la superficie.

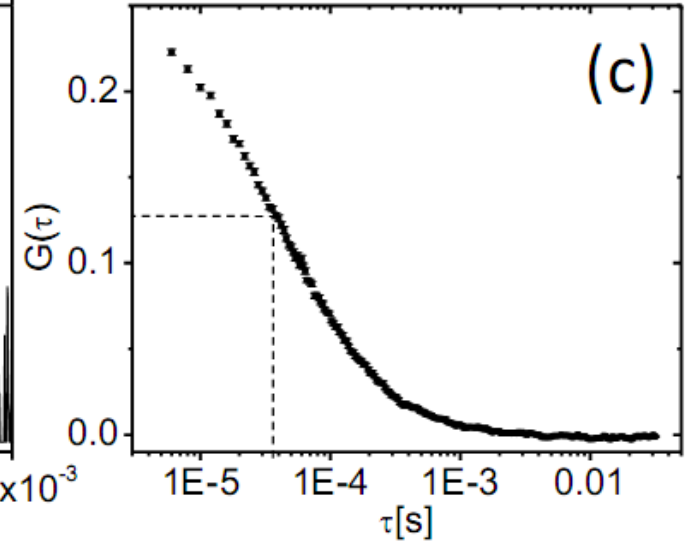
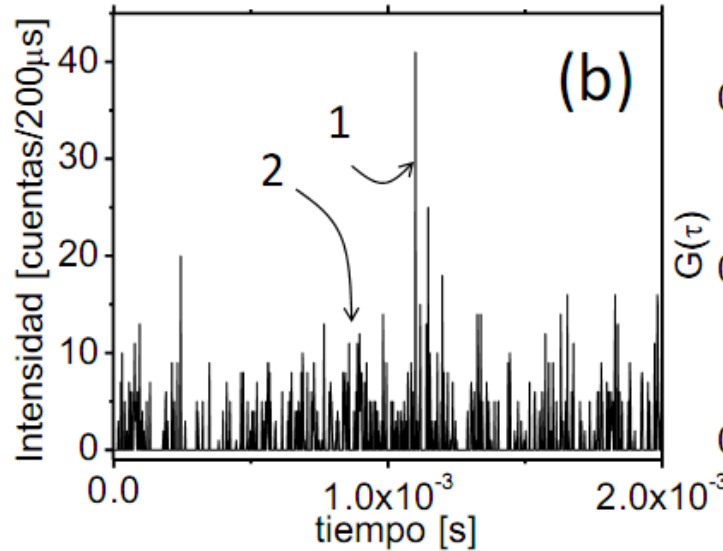
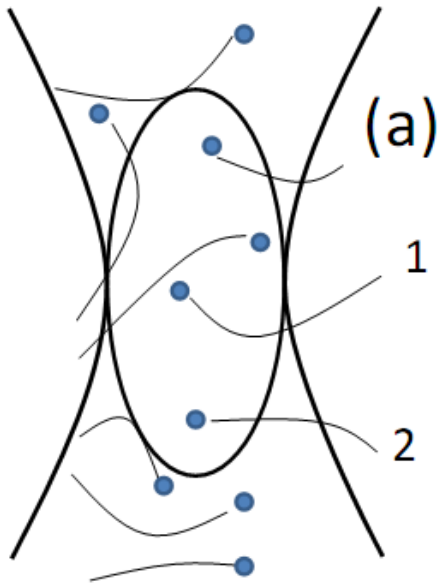
- El tiempo que tarda en saturar da información de las constantes de adsorción.
- El valor de saturación se puede relacionar con el factor de recubrimiento.

Cinética química: *FRAP*

- Se detecta la señal de fluorescencia continuamente.
- Se blanquea una zona particular y se observa cómo se recobra la señal:
 - F_f/F_i : fracción de recuperación.
 - El tiempo que tarda en recuperarse la fluorescencia se relaciona con las constantes de difusión del medio.



Cinética química: *FCS*



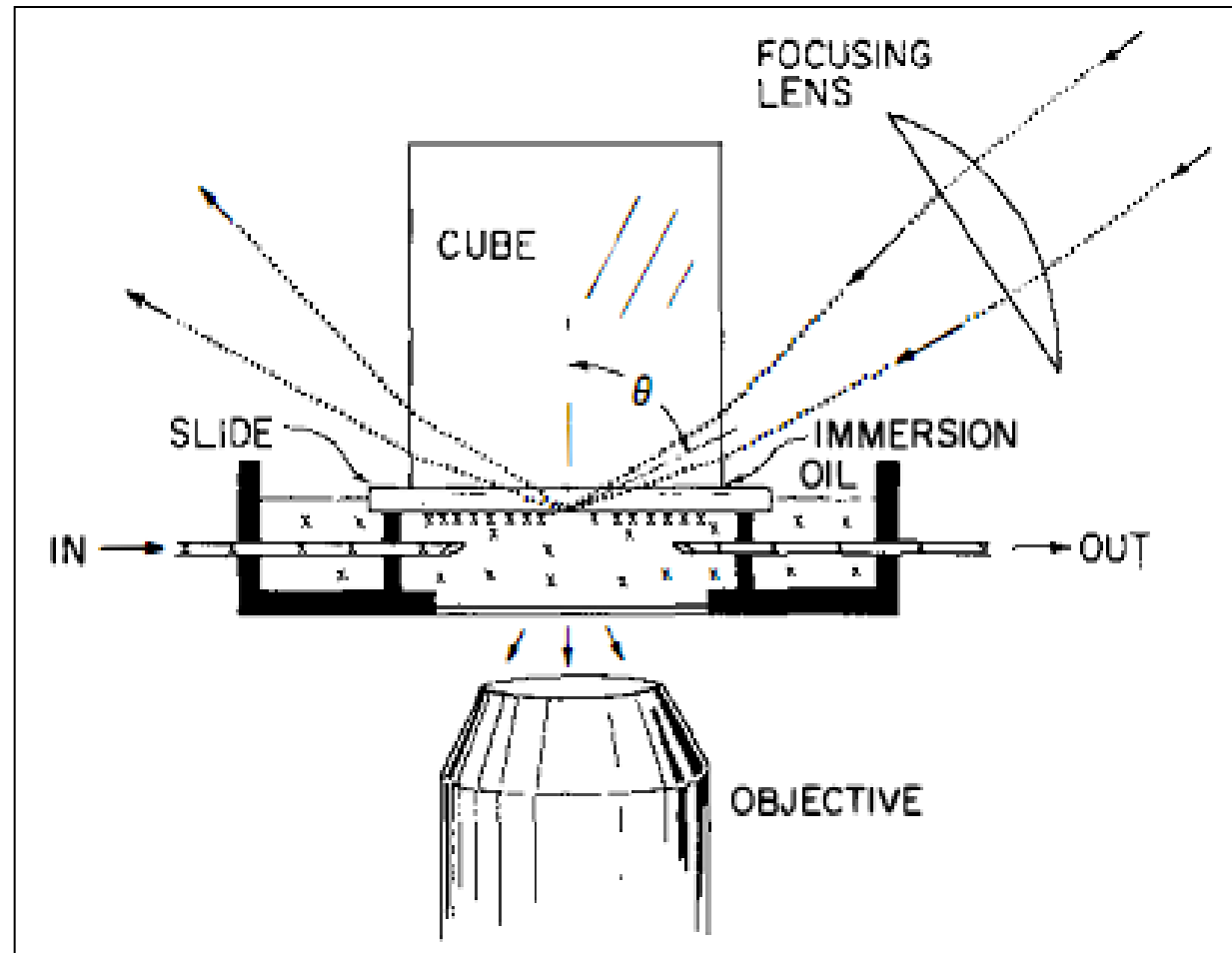
Función de Autocorrelación:
$$G(\tau) = \frac{\langle \delta I(t) \delta I(t + \tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} = \frac{\langle I(t) I(t + \tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} - 1$$

- Volumen confocal típico: $V_{dif} \approx 0.3$ fl
- Concentraciones típicas de trabajo: nM
- Resolución espacial $\cong 500$ nm
- Modelo dependiente: ¿cómo interpreto la señal (c)?.

Ref: Tesis Doctoral,
L. Estrada

Cinética química: *TIRF/FRAP* o *FCS*

- Arreglo común a ambas técnicas.
- El volumen de excitación es un cilindro, de alto aprox. 100 nm y diámetro dado por el tamaño de haz.
- Se puede variar el alto con el ángulo.



Cinética química: *conformación molecular*¹

Reflexión Total Interna/Transferencia de Energía
(TIRF/ET)

IDEA: el haz de excitación de un espectrofluorímetro produce reflexión total interna en un **interfaz sólido/líquido**

Se iluminan sólo las moléculas muy cerca de la superficie



Es posible caracterizar las moléculas fluorescentes que están en equilibrio químico con aquellas disueltas en *bulk*

Qué puedo estudiar?



Mecanismos de Transferencia de Energía: **Förster**

¹ Burghardt, T. P.; Axelrod, D. *Biochem.* **1983**, 22, 979-985

Cinética química: *conformación molecular*¹

Incidencia a 80°

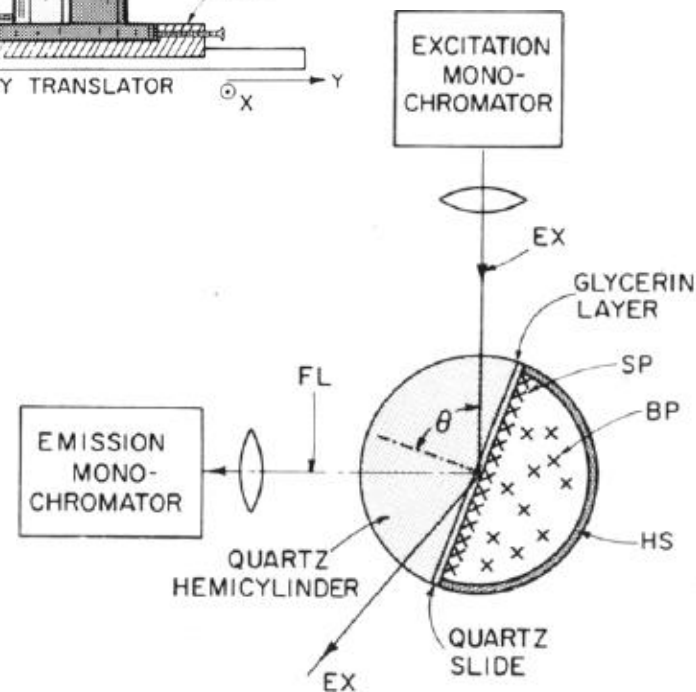
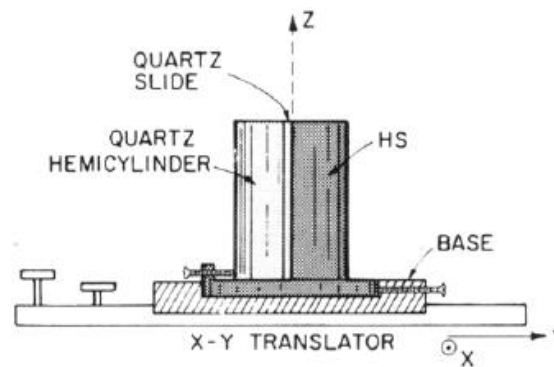


$\theta_c = 65,4^\circ$ para cuarzo/agua



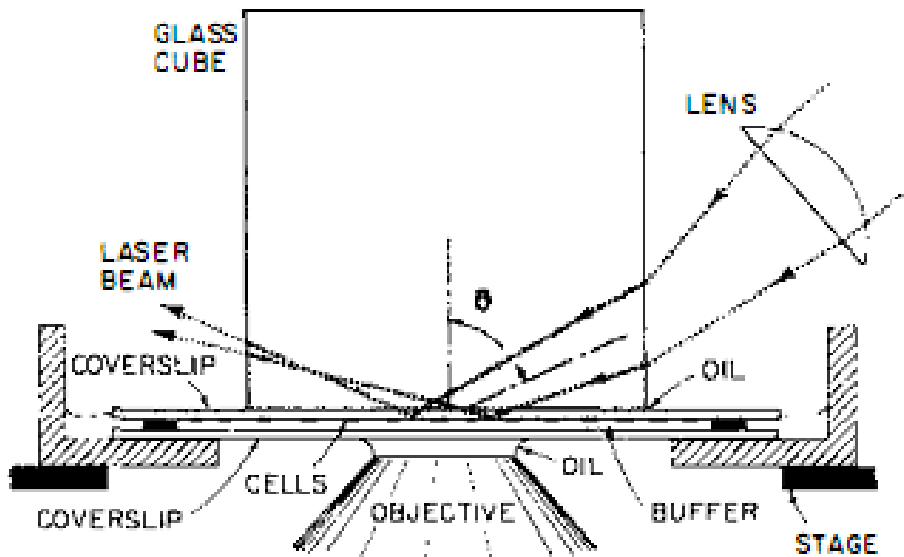
Se incide en condiciones de Reflexión Total Interna

Midiendo los espectros de fluorescencia, es posible inferir si el mecanismo de transferencia energía de Förster, que es **NO RADIATIVO**, se ve o no favorecido para moléculas adsorbidas en la superficie.

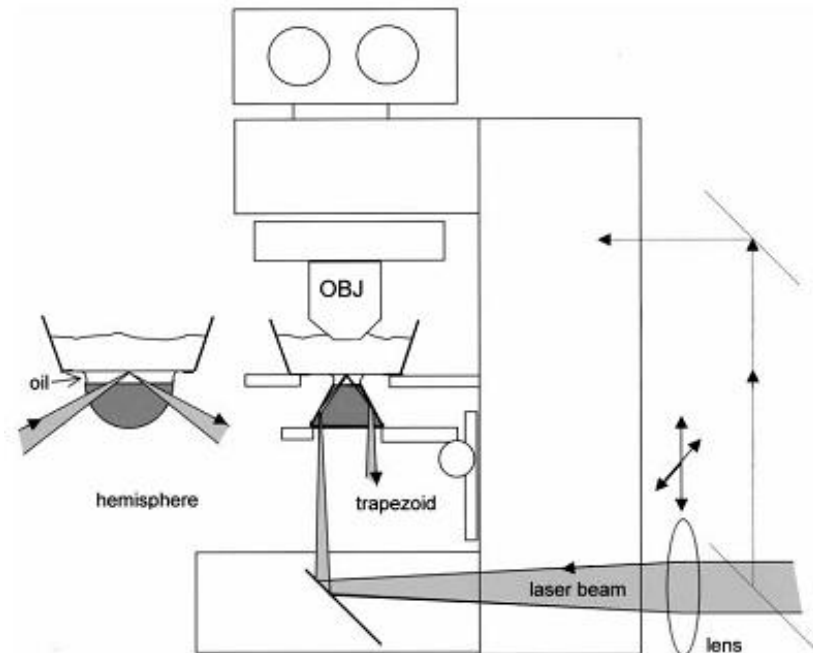


Cinética química: *cell substrate*

En ambas configuraciones se excita los fluoróforos con la onda evanescente



Microscopio Invertido
Detección: Cámara CCD



Microscopio derecho
Detección: PMT + Barrido del haz
(moviendo la lente)

Cinética química: *cell substrate*, *Imágenes*

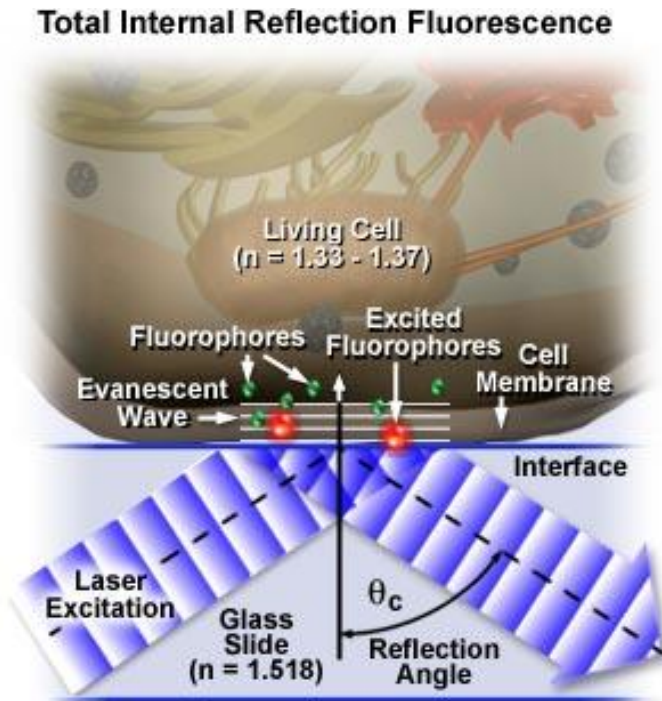
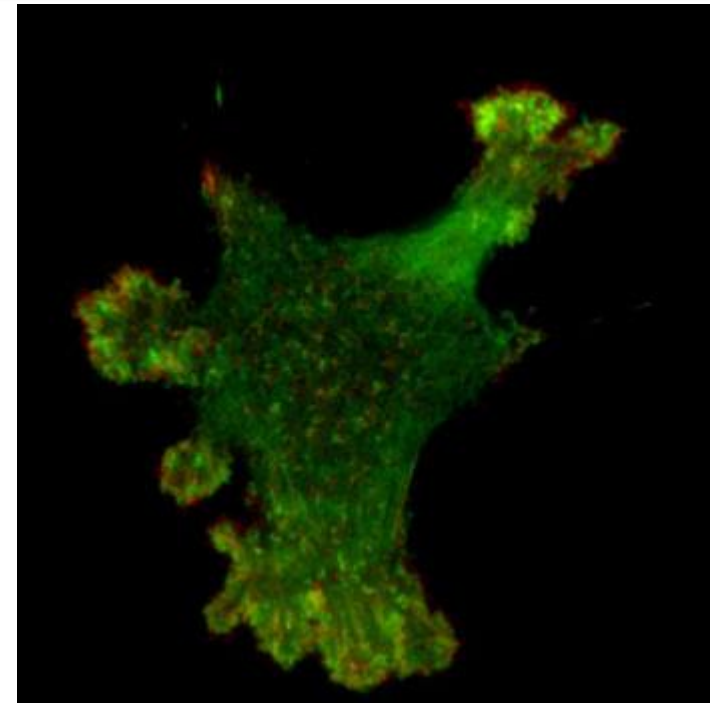


Figure 1



Sample:

B16/F1 melanoma cells (mouse) – Multi-color TIRF
Green: EGFP-Myosin. Excitation 488 nm,
Red: mRFP-Aktin. Excitation 514 nm

Ventajas de la técnica

- Permite excitar selectivamente y controladamente fluoróforos en un medio acuoso o celular, cerca de una superficie ($d \approx 100\text{nm}$).
- No se excitan moléculas no deseadas: poco fondo y virtualmente ninguna excitación de moléculas fuera de foco.
- Baja exposición de las células a la luz en otros planos.
- Detección de:
 - zonas de adhesión
 - posicionamiento
 - imágenes de la membrana celular
 - cinética molecularasociadas a una superficie.

¡Muchas gracias!

Modelo de Langmuir

- Hipótesis
 - Superficie plana
 - Una vez absorbidas las moléculas no se mueven ni interaccionan entre sí.
 - Todos los sitios son equivalentes y pueden tener solo una molécula.