

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

Disciplina: Curso Avançado de Microscopia de Fluorescência I

Créditos: 1 crédito (teórico)

Professores Responsáveis: Carlos Mas, Cecilia Sampedro, Guillermo Gomez e Andreza Fabro de Bem

Ementa:

Microscopia Óptica e de Fluorescência. Imagens Digitais. Microscopia Confocal. Microscopia de filtro giratório (DSU). Microscopia de Fluorescência usando reflexão interna total (TIRFM). FRAP. FCS. FRET.

Programa:

Módulo Teórico

Microscopia Óptica e de Fluorescência: Introdução à microscopia. Microscópios de transmissão e de epifluorescência. Lentes e objetivas. Condensadores, Fontes de iluminação. Filtros. Aberrações cromáticas e esféricas. Limite de difração. Resolução óptica de microscópio. Câmeras digitais. Fluoróforos. Processos de excitação e emissão. Espectros de excitação e emissão. Avaliação de “stokes”.

Imagens Digitais: Conceito de imagens digitais. Obtenção de imagens digitais no microscópio. Conceito de pixel e voxel. Critério de resolução “Nysquit” em uma imagem. Quantificação de imagens. Sinal e ruído de uma imagem. Background. Filtros. Máscaras.

Microscopia Confocal: Princípios de microscopia confocal. Perspectiva histórica. Unidade de Barrido. Detectores. Função de “esparciamento puntual” e resolução axial em um microscópio confocal. A função de “pinhole” no microscópio confocal. Sinal e ruído em imagens obtidas por microscopia confocal. Preparação de amostras. Vantagens da microscopia confocal em relação à microscopia de epifluorescência. Microscópios confocais de segunda geração. AOTF, detectores espectrais, SIM. Aplicações.

Microscopia de filtro giratório (DSU): Elementos de um microscópio DSU. Princípios de DSU e discos giratórios (Discos Nipkow y Olympus). Fontes de iluminação e detectores. Vantagens da microscopia de disco giratório. Resolução lateral e axial de um microscópio DSU. Aplicações de DSU na biologia celular.

Microscopia de Fluorescência usando reflexão interna total (TIRFM): Fundamentos. Reflexão interna total. Campo evanescente. Propriedades de campo evanescente. Tipos de microscópios de TIRFM. Objetivas para TIRFM. Resolução axial de microscopia TIRFM. Detectores. Aplicações.

FRAP: Generalidades. Modelos de difusão em duas dimensões. Processo de foto-branco. Representação gráfica e análise de dados de FRAP. Aplicações de FRAP.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

Transporte intracelular. Análise temporal e espacial para difusão usando FRAP. Difusão em três dimensões. Absorção de proteínas de membrana.

FCS: Princípios de FCS. Função de auto-relação. Implementação de FCS em microscópio de fluorescência. Análise de dados. FCS aplicado a difusão de proteínas e associação de componentes macromoleculares. Pontos de FCS para análise de interação entre proteínas (FCCS). Comparação entre FCS e FRAP.

FRET: Princípios de FRET. Características de transferência de energia por acoplamento dipolo dipolo. Métodos de medição de FRET. Emissão sensibilizada. Lifetime Imaging. Anisotropia. Incremento de fluorescência de doador de foto-decomposição do acceptor. Considerações sobre captura de imagem de FRET. Métodos para medição de FRET em células vivas. Aplicações de FRET. Uso de biosensores e análises de interações proteína-proteína.

Referências:

Joseph R. Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy, Springer; 2nd edition (1999), ISBN-10: 0306460939

James B. Pawley, Handbook of Biological Confocal Microscopy, Springer; 3rd edition (2006), ISBN-10: 038725921X

Studying protein dynamics in living cells., Lippincott-Schwartz J, Snapp E, Kenworthy A., Nat Rev Mol Cell Biol. 2001, 444-56.