

MICROSCOPIA COMBINADA AFM-ÓPTICA I: TOPOGRAFÍA, INTERACCIÓN Y LOCALIZACIÓN MOLECULAR EN CÉLULAS VIVAS.

M. Caldarola^{1*}, C. von Bilderling², L. I. Pietrasanta^{2,3}, A. V. Bragas^{1,3}

¹Laboratorio de Electrónica Cuántica, Departamento de Física, FCEyN, Universidad de Buenos Aires - IFIBA CONICET, ²Centro de Microscopías Avanzadas, FCEyN, Universidad de Buenos Aires y ³CONICET, Buenos Aires, Argentina. *caldarola@df.uba.ar

INTRODUCCIÓN

La combinación de la microscopía óptica y la microscopía/espectroscopía de fuerza atómica, permite simultáneamente localizar, cuantificar y manipular interacciones moleculares relevantes al complejo funcionamiento de una célula viva. En este trabajo presentamos un microscopio de fuerza atómica (AFM) combinado con un microscopio óptico que permite realizar imágenes topográficas y ópticas de fluorescencia simultáneamente. Estas técnicas proveen ventajas complementarias: mientras que la fluorescencia ofrece alta resolución temporal para localización molecular específica, el AFM aporta información topográfica en escala nanométrica y permite la detección de fuerzas de interacción molecular a nivel de molécula única [1,2].

MATERIALES Y MÉTODOS

El microscopio combinado fue totalmente desarrollado en nuestro laboratorio y consta de un cabezal de AFM colocado sobre un microscopio óptico, de manera que pueden tomarse imágenes ópticas al mismo tiempo que se opera el AFM en cualquiera de sus modos (contacto, contacto intermitente o espectroscopías de fuerza). El diseño permite trabajar en medio líquido y, en particular, en células vivas.

En este microscopio la muestra se coloca sobre una platina piezoeléctrica de 3 ejes con acceso óptico y precisión sub-nanométrica en la dirección axial (PI P517), de manera de poder controlar la distancia punta-muestra con una electrónica de control (SPM100-AFM100, RHK Tech.) y realizar barridos en las direcciones laterales. En cuanto al microscopio óptico, se trata de un microscopio multifunción: permite realizar imágenes por transmisión y en fluorescencia de campo extenso con una cámara CCD (Apogee Imaging Systems, Alta U2000).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se relevaron imágenes simultáneas AFM-óptica en células vivas HC11, que se muestran en la Fig 1. Pueden observarse imágenes de transmisión, fluorescencia y topografía de fuerza atómica.

Además se realizó un experimento de espectroscopía de fuerza entre el par biotina-estreptavidina para demostrar la *performance* del equipo en la detección de eventos únicos de reconocimiento molecular. En la Fig. 1 (D) se muestra el histograma de fuerzas con los eventos de interacción observados, y, en el inserto, una curva de fuerza con un evento típico.

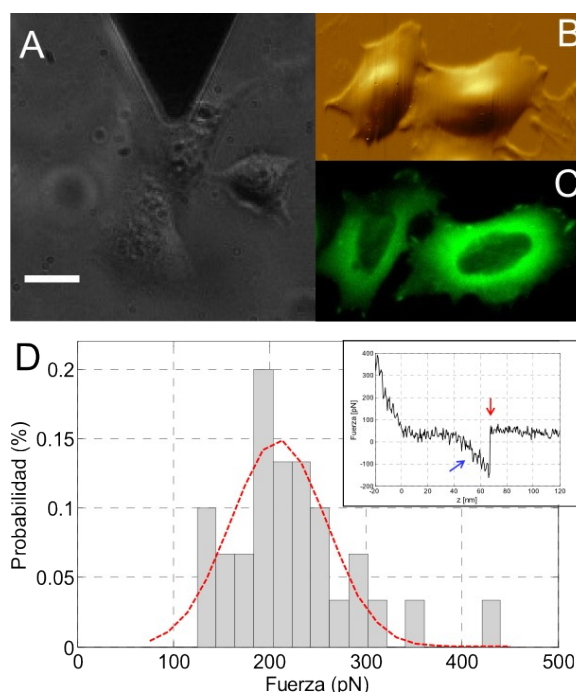


Fig 1: **Microscopía combinada AFM-óptica en células vivas.** (A) Imagen en modo transmisión. Se puede observar el sensor de fuerza y las células HC11 en cultivo. (B) Imagen topográfica de AFM de dos células HC11 y (C) Imagen de fluorescencia tomada en simultáneo. Las células han sido transfectadas para expresar las proteínas quimera EGFP-vinculina. (D) Histograma del experimento de reconocimiento molecular del par biotina-estreptavidina. El inserto muestra una curva de fuerza con un evento único de interacción.

REFERENCIAS

- [1] P. Hinterdorfer, Y. F. Dufrene, Nat. Meth, 1 3: 347-355 (2006). [2] Y. F. Dufrene *et al.* Nature Methods 8, 123-127 (2011)