

Preparación de muestras para microscopía confocal

*Andrés Esteban Cantos y Covadonga Alonso Martí
Laboratorio de Interacción virus-célula
Departamento de Biotecnología del INIA*



La buena preparación de las muestras es crucial para la obtención de una buena calidad de la imagen

- ✓ No utilizar materiales ni sustancias que emitan autofluorescencia

***Preparación de muestras:
células fijadas***

Principales etapas en un protocolo de inmunofluorescencia de células fijadas

1. Fijación
2. Permeabilización
3. Bloqueo
4. Incubación con anticuerpo primario
5. Incubación con anticuerpo secundario
6. Montaje

1) Fijación

La fijación es un proceso que conserva la estructura de las células y evita los procesos de autólisis y destrucción celular.

Un fijador ideal es aquel que:

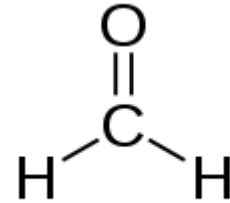
- ✓ Previene la autólisis celular
- ✓ Preserva la estructura celular y tisular
- ✓ Preserva el epítipo a estudiar
- ✓ No produce cambios osmóticos
- ✓ Preserva el tejido en un estado similar al “estado vivo”

Principales fijadores utilizados en microscopia

1. Fijadores que actúan por **reticularización (crosslinking)**: interacciones con grupos químicos de las moléculas de los tejidos, creando una malla que entrelaza y endurece el tejido. Ejemplos:
 - ✓ Formaldehído
 - ✓ Glutaraldehído

2. Fijadores que actúan por **deshidratación (solventes orgánicos)**: tienden a absorber el agua, favoreciendo la precipitación de proteínas. Ejemplos
 - ✓ Alcohol etílico
 - ✓ Acetona

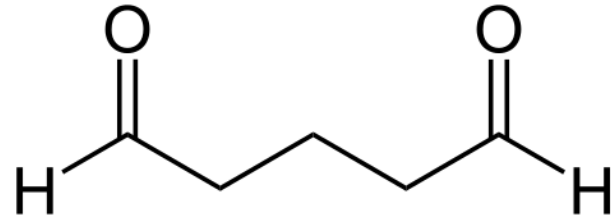
Formaldehído/paraformaldehído



Es el fijador más comúnmente utilizado en microscopía confocal. Se caracteriza por:

- Buen fijador de proteínas y ácidos nucleicos
- Penetra de forma rápida y eficaz
- Producen bajos niveles de autofluorescencia
- Fijación reversible
- No preserva bien los lípidos, los carbohidratos y los microtúbulos

Glutaraldehído



Por su gran capacidad de preservar la ultraestructura celular, es el fijador más recomendado para microscopía electrónica. Se caracteriza por ser:

- Buen fijador de proteínas, ácidos nucleicos y membranas
- Mayor tamaño que el formaldehído (penetra más lentamente)
- Produce mayor autofluorecencia que el formaldehído
- Fijación irreversible
- No preserva bien los lípidos ni los carbohidratos

Metanol, etanol y acetona (solventes orgánicos)

No son tan buenos fijadores como el paraformaldehído y el glutaraldehído, por lo que se utilizan menos. Se caracterizan por:

- Penetrar muy rápidamente en la muestra
- Fijan proteínas pero pueden extraer lípidos de la muestra
- Al deshidratar la muestra disminuyen su volumen, preservando mal la ultraestructura celular.
- No son aptos para realizar imágenes en 3D
- Pueden producir alteraciones en la estructura de proteínas

Mezcla de fijadores: PLP (periyodato, lisina, paraformaldehído):

- ✓ Buen fijador de carbohidratos gracias a la presencia de periyodato sódico
- ✓ Preserva bien la ultraestructura celular

2) Permeabilización

Permeabilización de las membranas celulares para permitir el paso de los anticuerpos. Suelen utilizarse detergentes como el Triton X100, saponina, etc.

3) Bloqueo

El bloqueo de la unión inespecífica, se realiza para evitar la unión de los anticuerpos. Suele utilizarse una solución de albúmina de suero bovino fetal en PBS.

4) Incubación con anticuerpos

- ✓ Inmunomarcaje primario: anticuerpo primario unido a un fluorocromo
- ✓ Inmunomarcaje secundario: anticuerpo secundario unido a un fluorocromo
- ✓ Inmunomarcaje terciario: anticuerpo secundario biotinilado unido a un conjugado de estreptavidina-fluorocromo

5) Montaje de muestras

Para el correcto montaje de las muestras tiene un importante papel:

- El tamaño del cubreobjetos. La mayoría de los objetivos de los microscopios están corregidos ópticamente para trabajar con un cubreobjetos de 0,17 mm de grosor.

- El medio de montaje utilizado, que vendrá caracterizado por:
 - ✓ Su índice de refracción

 - ✓ Su capacidad para alterar las uniones antígeno-anticuerpos

 - ✓ Su grado de polimerización

 - ✓ Su potencial anti-fading (preservación de la fluorescencia)

 - ✓ Su potencial para evitar la contaminación bacteriana

***Preparación de muestras:
células vivas***

Los ensayos in vivo pueden ir destinados a estudiar:

- ✓ **Procesos biológicos muy rápidos.** En estos casos la prioridad se encuentra en la velocidad de captación y menos en la calidad de la imagen (es importante modular los siguientes parámetros: velocidad, formato y modo de adquisición).

- ✓ **Procesos biológicos lentos.** En estos casos la prioridad es la supervivencia celular y una mayor calidad de imagen. Se utilizan láseres a baja intensidad y es importante mantener el plano focal y la fluorescencia en el tiempo.

¿Qué variables hay que controlar en la realización de un experimento in vivo?

- ✓ pH y concentración de CO₂
- ✓ Temperatura
- ✓ Osmolaridad
- ✓ Iluminación (fototoxicidad, autofluorescencia)
- ✓ Medio de cultivo (Optimem)
- ✓ Tipo de soporte (importante utilizar soportes de vidrio y placas con un fondo de vidrio 0,17 mm de grosor)

Preparación de muestras: células vivas



Los microscopios confocales pueden adaptarse para la realización de experimentos in vivo mediante la instalación de sistemas de regulación térmica y de flujo de CO₂ que simulan las condiciones existentes in vivo