

Laboratorio de Física II (ByG)
1er cuat. 2016

Guía 9: Microscopía óptica y de fluorescencia.

Objetivos

Identificar las partes y familiarizarse con el funcionamiento del Microscopio de Fluorescencia. Observar muestras de microesferas fluorescentes y estudiar la resolución del microscopio. Analizar una muestra de células marcada con tres sondas fluorescentes. Discutir la configuración de los filtros para cada muestra en base a los espectros de los fluoróforos utilizados y de los cubos disponibles en el microscopio. Procesar y analizar las imágenes de fluorescencia. Estudiar cómo afecta la resolución del microscopio en la visualización de las diferentes muestras.

Introducción

Microscopía de fluorescencia

La microscopía de fluorescencia es una herramienta de inestimable valor para la investigación científica, ya que permite alcanzar altos niveles de sensibilidad y resolución microscópica, permitiendo una apreciación diferente de la información que se puede obtener de los especímenes y que generalmente pasa desapercibida.

La fluorescencia refiere al proceso mediante el cual un espécimen absorbe y subsecuentemente irradia luz, en un intervalo de tiempo (entre la absorción de la luz de excitación y la emisión de la luz fluorescente) que es usualmente de pocos nanosegundos. La Microscopía de Fluorescencia es la herramienta que permite estudiar materiales fluorescentes, ya sea de manera natural (materiales autofluorescentes) o tratados con sondas fluorescentes.

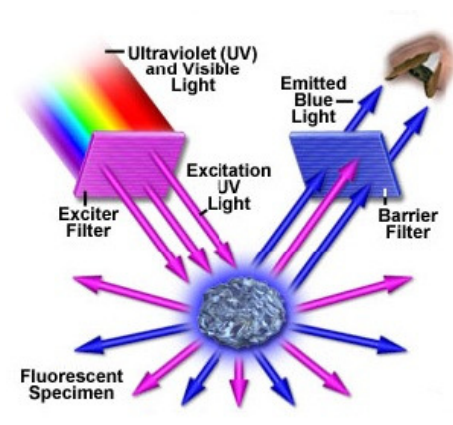


Figura 1. Representación de una muestra en el Microscopio de Fluorescencia. Por medio de un filtro de excitación se seleccionan las longitudes de onda específicas de la luz de una fuente UV-visible. Un filtro de barrera permite el paso de la luz fluorescente emitida bloqueando la luz UV reflejada. La fluorescencia se irradia en todas las direcciones independientemente de la dirección de la luz de excitación. Tomado de Davison M, Abramowitz M, *Introduction to Fluorescence*. Olympus Microscopy Resource Center.

El Microscopio de Fluorescencia fue desarrollado a principios del siglo veinte por August Köhler, Carl Reichert, y Heinrich Lehmann, entre otros. Sin embargo no fue sino hasta décadas después que se descubrió su potencial, siendo hoy una técnica indispensable en biología celular.

La principal diferencia del Microscopio de Fluorescencia es que permite irradiar al espécimen con la luz de excitación y separar la luz fluorescente emitida, que es mucho más débil, de la luz de excitación. Así, sólo la luz emitida por el espécimen es detectada por el ojo o el detector (usualmente una cámara digital). Como resultado, las partes fluorescentes de la muestra brillan contra un fondo (*background*) oscuro con suficiente contraste como para permitir la detección. Cuanto más oscuro es el fondo, más eficiente será el instrumento. La Figura 1 presenta un esquema de lo que ocurre cuando un espécimen fluorescente es observado a través de un Microscopio de Fluorescencia.

Filtros para Fluorescencia

Los filtros juegan un papel muy importante en un Microscopio de Fluorescencia ya que son los que permiten separar la luz emitida de la luz de excitación. Básicamente hay tres categorías de filtros: filtros de excitación, filtros de barrera y espejos dicroicos usualmente combinados para producir un cubo de filtros como el de la Figura 2a. La selección de los filtros apropiados es la clave para que esta microscopía funcione.

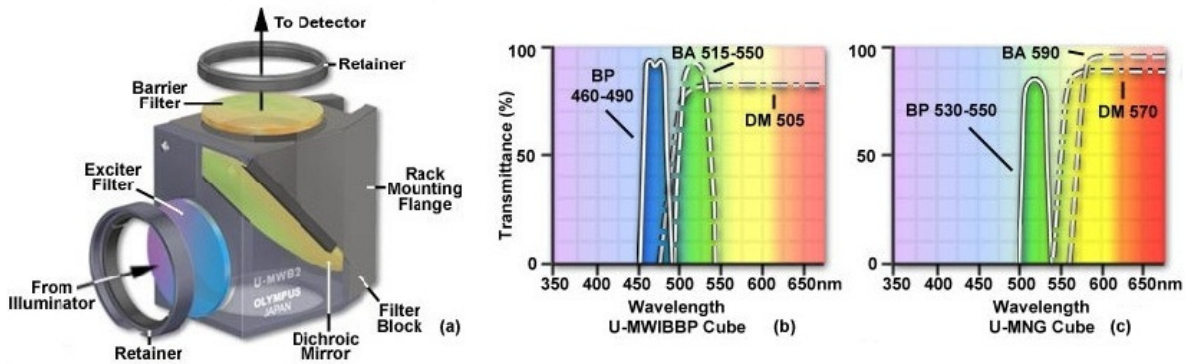


Figura 2. (a) Cubo de filtros de un Microscopio de Fluorescencia. (b) Espectros de los filtros que conforman el cubo U-MWIBBP: excitación BP 460-490, emisión BA 515-550 y dicroico DM 505. (c) Espectros de los filtros del cubo U-MNG: excitación BP 530-550, emisión BA 590 y dicroico DM 570. Modificado de Davison M, Abramowitz M, *Fluorescence Filters*. Olympus Microscopy Resource Center.

Los filtros de excitación permiten que sólo las longitudes de onda seleccionadas de la fuente de luz pasen a través del camino de iluminación del espécimen. Los filtros de barrera o filtros de emisión están diseñados para suprimir o bloquear (absorber) las longitudes de onda de excitación en el paso hacia el detector. Los espejos dicroicos son filtros especializados diseñados para reflejar las longitudes de onda de excitación y dejar pasar las de emisión eficientemente. Los dicroicos se posicionan en el camino óptico después del filtro de excitación pero antes del de emisión, a un ángulo de 45 grados respecto de cada uno de ellos, como se ve en la Figura 2a. Las características de cada filtro se pueden ver en su espectro, que muestra el porcentaje de transmisión en función de la longitud de onda. En la Figura 2b,c se presentan los espectros de los filtros de excitación y emisión y filtros dicroicos para dos cubos comerciales de la firma Olympus.

Sistema de detección y procesamiento de imágenes

Para la adquisición de imágenes, el microscopio de fluorescencia tiene instalado un dispositivo CCD de Astronomical Instruments, modelo ST8. Mediante imágenes de transmisión de una grilla de calibración, se determinará el tamaño del píxel de las imágenes obtenidas a partir de diferentes objetivos del microscopio. También se caracterizará el ruido de oscuridad del detector que luego será descontado de las imágenes adquiridas. El procesamiento y análisis de las imágenes se efectuará en la plataforma abierta y gratuita FIJI (*Fiji Is Just ImageJ*).

En la clase teórica discutimos: las características de las sondas fluorescentes, los tipos y su aplicación; los requerimientos instrumentales como fuente de luz, filtros, lente objetivo; dificultades en la obtención de las imágenes, así también como la naturaleza de la muestra que observaremos. El objetivo del trabajo práctico será identificar las partes y sus funciones para la microscopía de fluorescencia. Discutir la configuración de los filtros para cada muestra en base a los espectros de los fluoróforos utilizados y de los cubos disponibles en el microscopio. Estudiar cómo afecta la resolución del microscopio en la visualización de las diferentes muestras. Además, mediante FIJI, procesaremos imágenes obtenidas empleando una cámara CCD, y luego las procesaremos.

Actividades

ANTES de usar el microscopio leer atentamente las normas para el uso correcto del microscopio óptico (apéndice A).

B.1. Identificar las partes específicas y familiarizarse con el funcionamiento del Microscopio de Fluorescencia. Identifique las fuentes de iluminación y los sistemas de detección. Analizar los espectros de los cubos de filtros (filtro de excitación, espejo dicróico y filtro de emisión) disponibles en el microscopio.

El microscopio cuenta con cuatro posiciones para cubos de filtros, tres de ellas están dispuestas para fluorescencia:

- (1) 450-490/ FT 510/ LP520 (*Zeiss*)
- (2) Para transmisión
- (3) Cubo QD 655 (*Chroma*)
- (4) BP 365/ FT 395/ LP 397 (*Zeiss*)

B.2. Muestra de microesferas de látex fluorescentes de diferentes tamaños. Observarlas al microscopio (elegir el cubo indicado para cada fluoróforo).

B.3. Determine el tamaño del píxel en las imágenes adquiridas.

B.4. ¿Se puede medir el tamaño de las partículas a partir de las imágenes tomadas? Calcule la resolución teórica del microscopio.

B.5. Muestra de células endoteliales de arteria pulmonar bovina que tiene marcados con distintas sondas fluorescentes componentes del citoesqueleto y núcleo (Figura 3):

Actina: filamentos detectados con faliodina Texas Red®-X (rojo)

Tubulina: marcado con un anticuerpo primario contra α -tubulina y visualizado con un anticuerpo secundario conjugado a BODIPY® Fluoresceína (verde)

Núcleo: marcado con DAPI (azul)

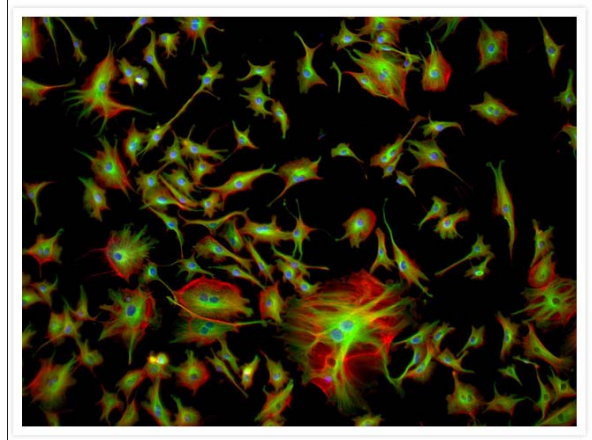


Figura 3. Imagen de fluorescencia de células endoteliales de arteria pulmonar bovina.

B.6. Proponga la configuración de los cubos (filtro de excitación, espejo dicroico y filtro de emisión) de acuerdo a cada fluoróforo presente en la muestra. Compare la misma con los cubos que se utilizará en el TP.

En la Figura 4 se muestran los espectros de excitación y emisión de los distintos fluoróforos empleados.

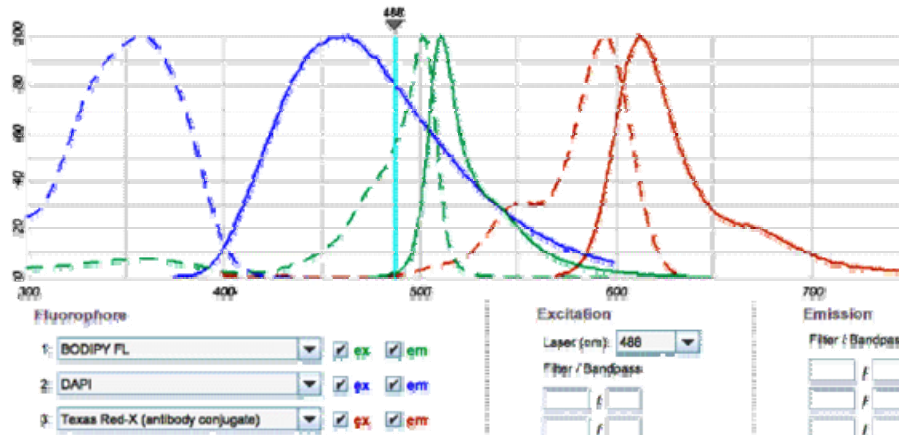


Figura 4. Espectros de excitación (línea de puntos) y emisión (línea llena) de los tres fluoróforos presentes en la muestra: DAPI (azul), BODIPY (verde) y Texas Red (rojo). Tomado de <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/support/Research-Tools/Fluorescence-SpectraViewer.html>.

B.7. Observe la muestra en los diferentes canales, identifique los componentes celulares marcados, su localización y distribución.

B.8. Procese y analice las imágenes obtenidas (lea el tutorial de FIJI subido a la página web de la materia). Discuta los resultados obtenidos.

Referencias

- [1] Douglas B. Murphy, *Fundamentals of light microscopy and electronic imaging*. Editorial Wiley-Liss, Inc., 2001.
- [2] Axioskop 2 Routine Microscope, Operating Instructions. Carl Zeiss Mikroskopie.
- [3] Medición, Manual de empleo de Leica Microsystems Ltd.
- [4] José L. Cabrera T., José A. Salas, Juan A. Guardado, José M. Juárez. Simposio de Metrología 2008, Santiago de Querétaro, México.
- [5] ASTM (American Society for Testing and Materials) Standards: E 1951 -02, *Standard Guide for Calibrating Reticles and Light Microscope Magnifications*.
- [6] Davison, M., Abramowitz, M. *Optical Microscopy*. Olympus Microscopy Resource Center. <http://www.olympusmicro.com>
- [7] Guía de trabajos prácticos de la materia optativa Tópicos en Biofísica Molecular, de la FCEN-UBA. Docentes Lía Pietrasanta, Catalina von Bilderling

Tutoriales

- <http://www.olympusmicro.com/primer/>
- <http://www.zeiss.com> ir a Fluorescence Dye and Filter Database
- <http://www.leica-microsystems.com/products/light-microscopes>
- <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/support/Research-Tools/Fluorescence-SpectraViewer.html>

Apéndices

A. NORMAS PARA EL USO CORRECTO DEL MICROSCOPIO ÓPTICO

- 1- Quitar la funda protectora del microscopio.
- 2- Enchufar/encender el microscopio.
- 3- Colocar en primera instancia el objetivo de menor aumento para lograr un enfoque correcto. Este paso es muy importante y se debe realizar siempre, ya que permitirá la observación de una panorámica del preparado y la ubicación de áreas de interés para su análisis posterior.
- 4- Subir el condensador utilizando el tornillo correspondiente.
- 5- Colocar el preparado sobre la platina, con el cubre-objetos hacia arriba y sujetándola con las pinzas/guías.
- 6- Enfoque el preparado mirando a través del ocular y lentamente mueva el tornillo macrométrico.
- 7- Recorra todo el preparado y haga sus observaciones. Elija el sitio donde debe seguir observando a mayor aumento.
- 8- Cambie al objetivo de mediano aumento (20 X) y para lograr el enfoque siga moviendo lentamente el tornillo macrométrico. Al cambiar de objetivo, la imagen debe estar ligeramente enfocada gracias a que la mayoría de microscopios son parafocales, es decir, una vez logrado el primer enfoque, al pasar al objetivo de aumento inmediato superior la imagen queda en un foco aproximado y solo se debe realizar un ajuste.

- 9- Realice la observación y haga sus anotaciones. Determine cuál es la estructura que va a observar a mayor aumento y colóquela en el centro del campo.
- 10- Cambie al objetivo de mayor aumento. Si realizó el enfoque de manera correcta con el objetivo anterior, al colocar el objetivo de mayor aumento la imagen solo se debe enfocar girando **única y lentamente** el tornillo **MICROMÉTRICO**. NUNCA se debe utilizar el tornillo macrométrico con los objetivos de mayor aumento, pues al estar éste muy cerca del preparado, se corre el riesgo de partirlo.
- 11- Al lograr el enfoque con el objetivo de mayor aumento debe realizar la observación moviendo constantemente el tornillo micrométrico para variar los planos de enfoque. De igual manera, abra o cierre el diafragma para regular la intensidad de la luz y mejorar el contraste. Haga sus observaciones.
- 12- Una vez finalizada la observación, aleje la platina y coloque nuevamente el objetivo de menor aumento.
- 13- Retire la muestra.
- 14- Limpie la lente objetivo si usó medio de inmersión, apague la/s lámpara/s.
- 15- Cubra el microscopio con la funda protectora.

Recomendaciones

NUNCA dañar, rayar, dejar caer las lentes u otros componentes ópticos.

NUNCA forzar los controles de foco.

NUNCA tocar las superficies ópticas.

Durante la clase se discutirá cuál es el procedimiento para limpiar las lentes objetivos correctamente.