

TRABAJOS PRÁCTICOS 2 y 3

MICROSCOPIA ÓPTICA

MICROSCOPIA DE CAMPO CLARO Y CAMPO OSCURO

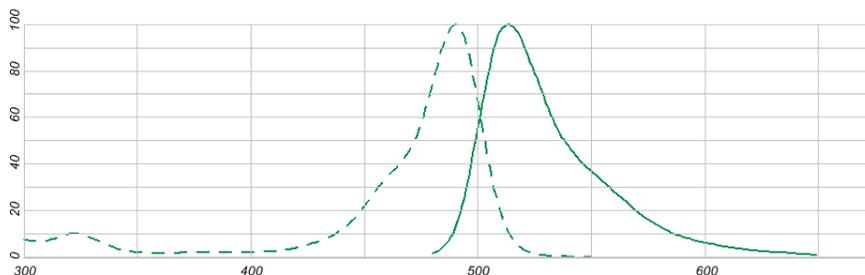
- 1.1. Usando un objetivo de baja magnificación configurar el microscopio para iluminación de Köhler.
- 1.2. Configurar el microscopio para campo oscuro y observar distintas muestras, utilizando un objetivo de baja apertura numérica y un objetivo de alta apertura numérica. Comparar con campo claro
- 1.3. Configurar el microscopio para contraste de fases empleando el objetivo 40X. Observar distintas muestras y comparar con campo claro.
- 1.4. *Calibración del área observada.* Con el microscopio configurado para iluminación de Köhler, registrar imágenes de una grilla de TEM (agujeros y barras de 132 y 33 μm de lado, respectivamente) utilizando objetivos de magnificación 10x (NA: 0,3) y 60x (1,25). Calcular el tamaño del pixel en la imagen y el campo observado.
- 1.5. Comparar el resultado obtenido en el punto anterior con las especificaciones de la cámara (tamaño del pixel de la cámara es de 6,45 μm ; la cámara es de 1392x1040 pixeles²)

MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA DE CAMPO AMPLIO

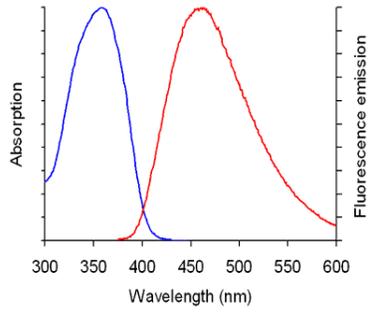
- 2.1. Elegir el set-up (diodo para iluminar y cubo) adecuado para mirar una muestra de microesferas marcadas con fluoresceína. Usando la configuración elegida registrar imágenes con el objetivo 10 X (N.A. 0,3) y 60X (empleando aperturas numéricas de 0,65 y 1,25). Tomar imágenes eligiendo un campo donde haya microesferas y un campo que sirva para hacer la corrección de "background".
Calcular el diámetro de la imagen de las microesferas, empleando la calibración realizada en la parte anterior. Discutir las diferencias observadas.
- 2.2. Elegir el set-up adecuado para observar y registrar imágenes de una muestra de células endoteliales de arteria pulmonar donde se marcó el núcleo con DAPI, actina con BODIPY FL Phalloidin y las mitocondrias con Mitotracker Red CMXRos.

Espectros de las sondas

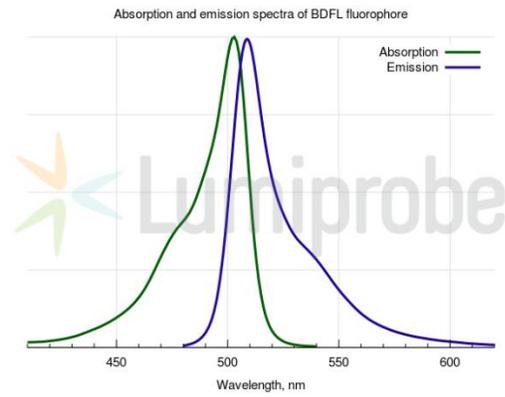
Fluoresceína. (Espectro de excitación (----) y de emisión (—))



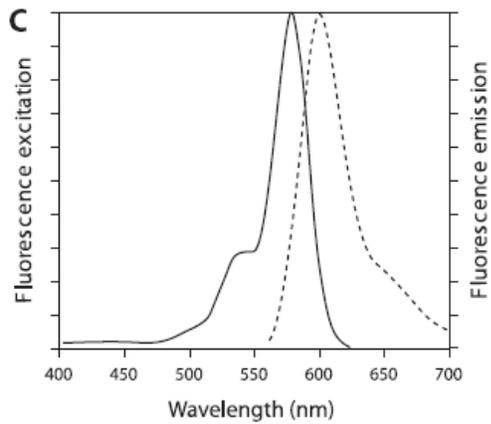
DAPI



BOPDIPY FL



Mitotracker Red CMXRos



Diodos para epi-fluorescencia

365 nm

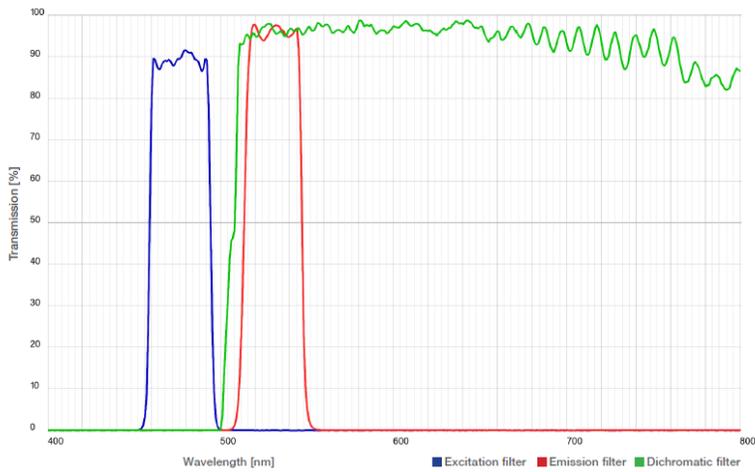
450 nm

530 nm

Cubos del microscopio

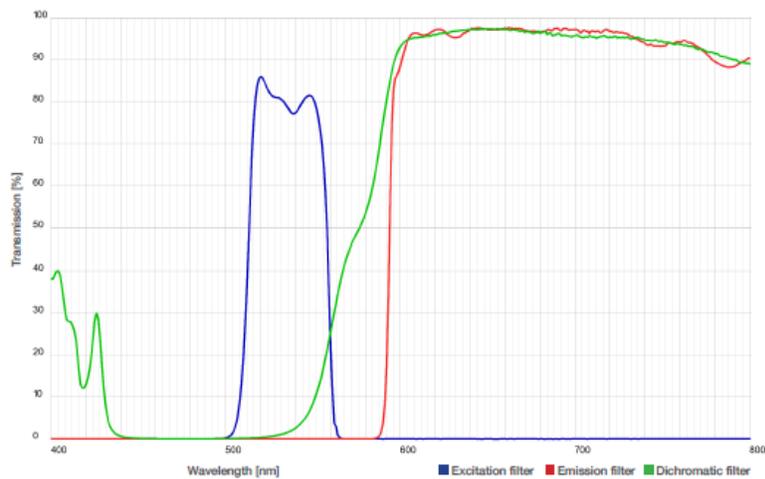
Cubo 1(U-MWIBA3)

Excitation filter	BP 460-495
Dichromatic mirror	DM 505
Emission filter	BP 510-550



Cubo 2 (U-MWG2)

Excitation filter	BP 510-550
Dichromatic mirror	DM 570
Emission filter	LP 590



Cubo 3 (U-MWU2)

Excitation filter	BP 330-385
Dichromatic mirror	DM 400
Emission filter	LP 420

