

GUIA DE PROBLEMAS: Microscopía

1) La imagen formada por el objetivo de un microscopio con distancia focal = 5 mm se encuentra a 160 mm de f' . El ocular tiene una distancia focal de 26 mm.

- Determinar la magnificación angular del microscopio.
- El ojo puede diferenciar 2 puntos si estos se encuentran separados más de 0,1 mm. ¿Cual es la mínima separación entre 2 puntos en la muestra que puede ser observada (o resuelta) por este microscopio?

2) La distancia focal del ocular y objetivo de un microscopio son 18 y 8 mm, respectivamente. Estas lentes se encuentran localizadas a una distancia de 19,7 cm entre ellas. La imagen final formada por el ocular se localiza en el infinito.

- ¿Cual es la distancia entre el objetivo y el objeto?
- ¿Cual es la magnificación producida por el objetivo?
- ¿Cual es la magnificación angular total del microscopio?
- Haga el trazado de rayos.

3) Un microscopio posee objetivos con distancia focal de 16, 4 y 1,9 mm y oculares con magnificación angular 5x y 10x. Cada objetivo forma una imagen localizada a una distancia de 120 mm detrás de f' . Determinar la magnificación angular máxima y mínima alcanzable con este microscopio.

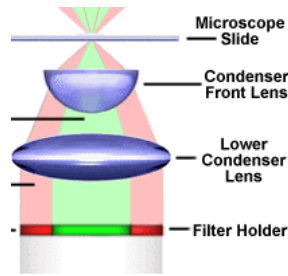
4) Un microscopio Olympus con objetivos corregido a infinito tiene un lente de tubo de 180 mm de distancia focal, mientras que en un microscopio Zeiss es de 165 mm. ¿Cuál es la magnificación efectiva si se utiliza un objetivo 60x de Zeiss en un microscopio Olympus?

5) Un microscopio cuenta con los siguientes objetivos y oculares:

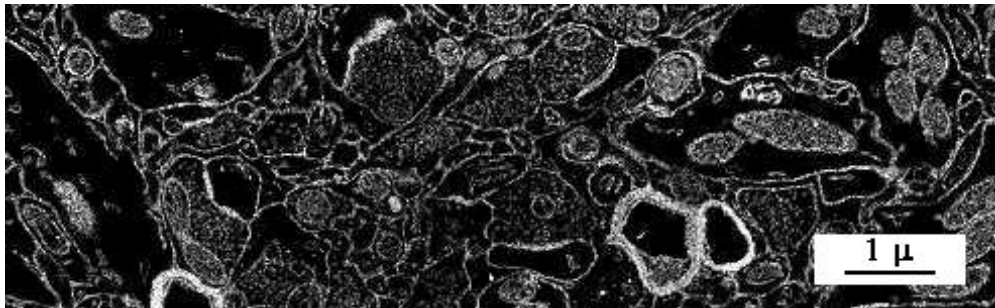
Objetivo		Ocular
M	NA	M
40X	0,70	10X
100X	1,40	25X

- Indique las diferentes magnificaciones que se puede obtener en dicho microscopio. Si dos combinaciones otorgan la misma magnificación total, indique cual es la diferencia entre ellas.
- ¿Cuál es la máxima magnificación utilizable, para un dado objetivo, y qué es la magnificación vacía (empty magnification)?

5) Una modificación de microscopía de campo oscuro consiste en, en lugar de usar un condensador de campo oscuro, colocar en el plano focal del condensador de campo claro un anillo en el cual la parte central posee un filtro de un color mientras que la parte externa posee otro filtro de otro color (ver figura a continuación). Discuta como vería una muestra transparente utilizando este anillo.



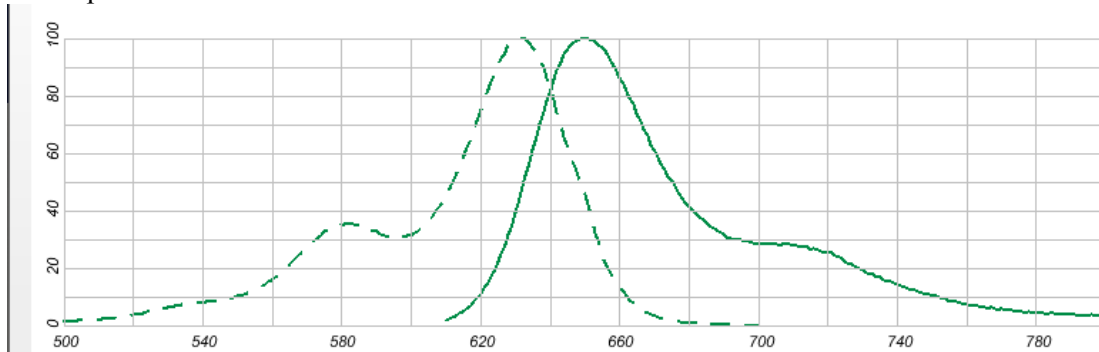
6) Un investigador asegura haber obtenido la imagen que se muestra usando un microscopio de fluorescencia. Otros dicen que la imagen es falsa. ¿ Puede Ud. determinar quien tiene razón? La barra negra representa una distancia de $1\ \mu\text{m}$.



7) ¿Cuál es la mínima distancia entre dos moléculas fluorescentes para diferenciarlas si se utiliza un objetivo de a) $\text{NA}=0,9$, b) $\text{NA}=1,25$ y c) $\text{NA}=1,6$? Suponga que las moléculas emiten a $600\ \text{nm}$. ¿Qué pasaría si una emite a $600\ \text{nm}$ y la otra a $660\ \text{nm}$? Incluya en la discusión la configuración necesaria del microscopio para lograr la máxima resolución posible.

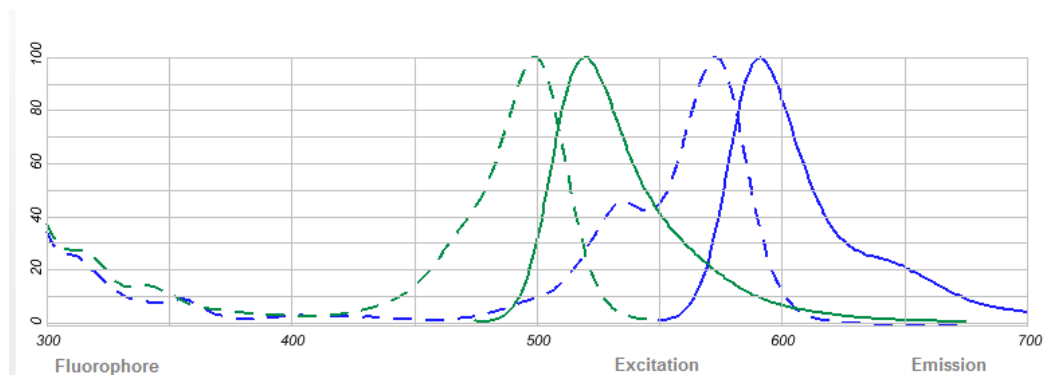
8) Calcule el tamaño y la cantidad de pixeles que ocupará la imagen de una molécula única, sobre una cámara de tamaño de píxel de $8\ \mu\text{m}$, $16\ \mu\text{m}$ y $24\ \mu\text{m}$, si se utiliza un objetivo de $40\times$ $\text{NA}=1,25$ y un objetivo de $100\times$ $\text{NA} = 1,42$.

9) Se quiere observar una muestra marcada con la sonda fluorescente AlexaFluo633 en un microscopio de fluorescencia cuya fuente de excitación es una lámpara de mercurio. Grafique los espectros de los filtros de excitación y emisión y del espejo dicroico que usaría para detectar la fluorescencia de esta sonda. Justificar brevemente.

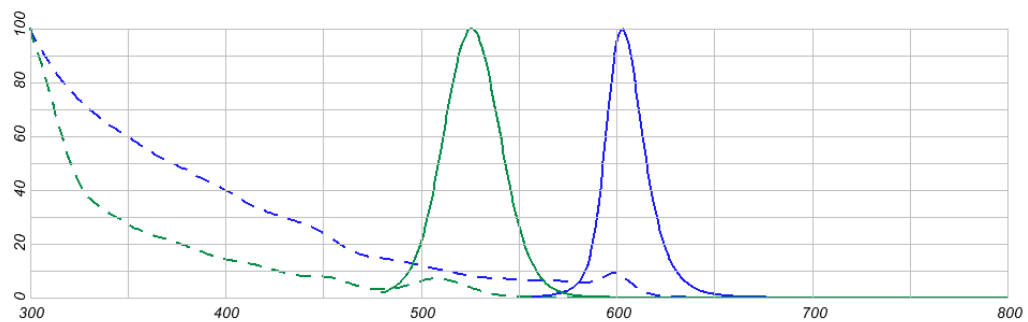


10) Se quiere observar una muestra de células en la cual se han marcado dos proteínas utilizando fluoróforos distintos, uno que emite en el rojo (Rodamina-red, líneas azules) y otro que emite en el verde (Alexa488, líneas verdes). Para observarlos, se utiliza un microscopio con los cubos de fluorescencia que se detallan en la tabla adjunta. Determinar si es posible hacer la observación de cada una de las proteínas por separado y, en caso negativo, qué controles haría para solucionar el problema.

Cubo	Filtro Ex (nm)	Dicroico (nm)	Filtro pasa alto Em (nm)
1	330-380	400	420
2	400-410	450	455
3	450-490	510	520
4	510-550	570	590



11) Elija la configuración de un microscopio para observar en forma simultánea e independiente la fluorescencia de los siguientes quantum dots.



Discuta si es posible realizar medidas de FRET en este microscopio y cómo las realizaría. Discutir cómo realizaría dichas mediciones en muestras fijadas o en muestras en las cuales se esperan cambios de FRET en función del tiempo.