

MICROSCOPIA ÓPTICA

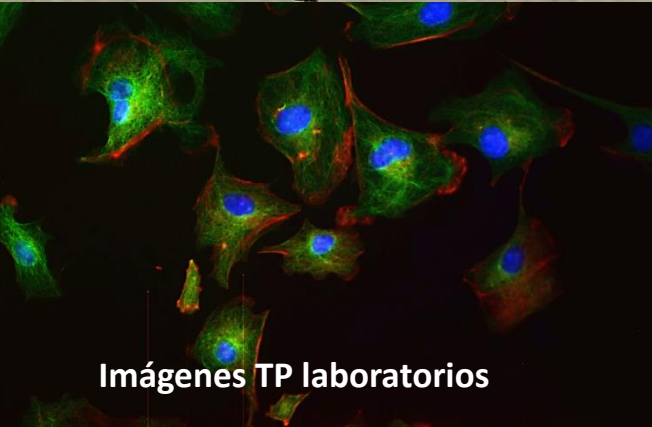
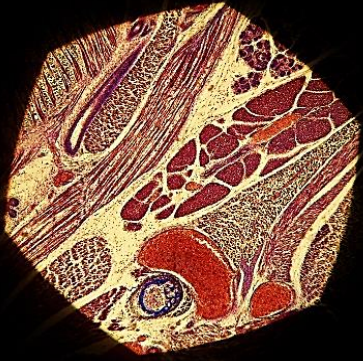
Generalidades

Fluorescencia

TÓPICOS EN BIOFÍSICA MOLECULAR – 1C 2022

Microscopía óptica y fluorescencia

- ✓ ***Conceptos básicos***
- ✓ ***Iluminación: iluminación Köhler***
- ✓ ***Lentes objetivo y ocular***
- ✓ ***Óptica corregida a infinito***
- ✓ ***Magnificación***
- ✓ ***Apertura numérica***
- ✓ ***Profundidad de campo***
- ✓ ***Resolución y difracción***
- ✓ ***Microscopía de fluorescencia***

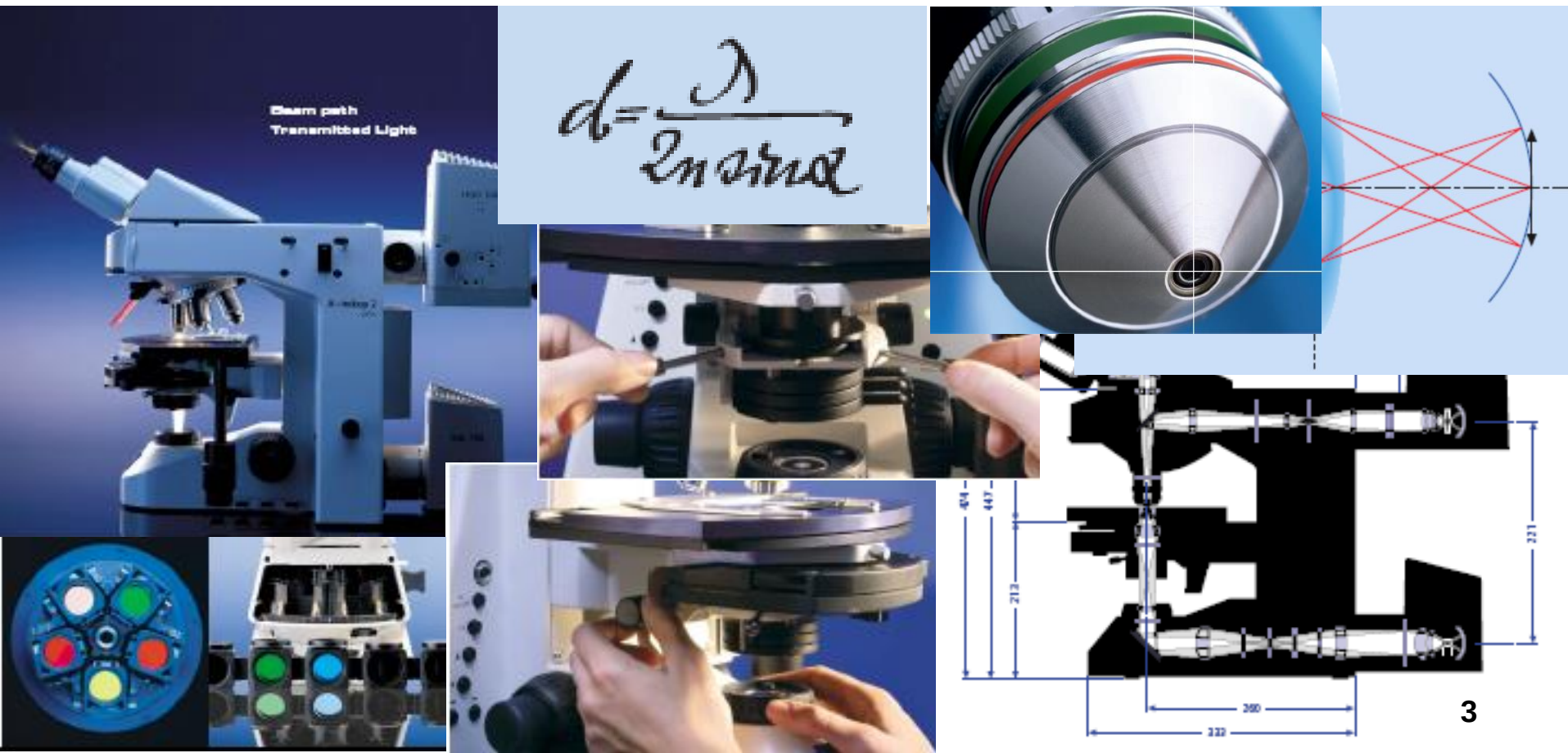


Microscopio

microscopio.

(De *micro-* y *-scopio*).

1. m. Instrumento óptico destinado a observar objetos extremadamente diminutos, haciendo perceptible lo que no lo es a simple vista.



Breve historia de la microscopía



Ernst Karl Abbe
1840 – 1905
Físico



Otto Schott
1851 – 1935
Químico

$$d = \frac{\lambda}{2n \sin \alpha}$$

Köhler's Original Woodcut

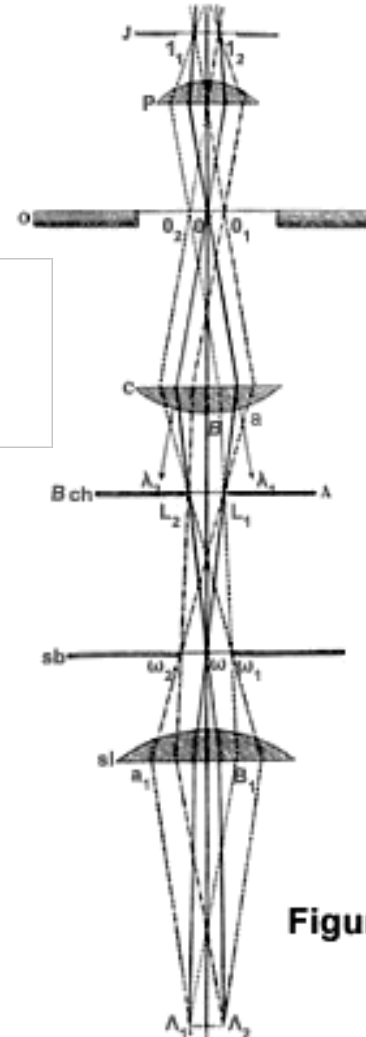


Figure 1



Carl Zeiss
1816 – 1888
Óptico

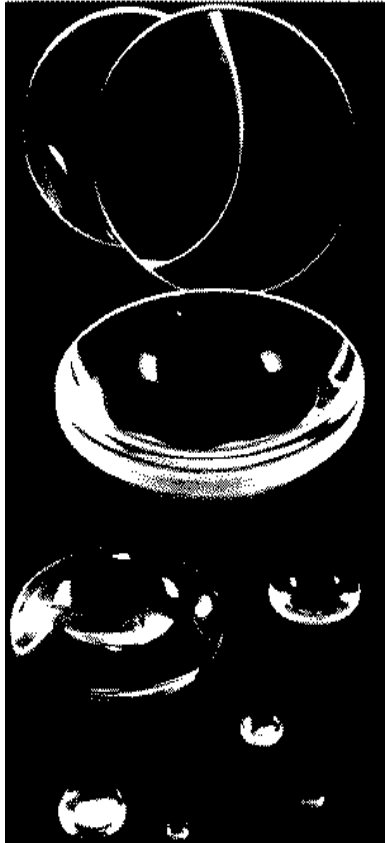


August Köhler
1866 – 1948
Físico

Fines del Siglo XIX

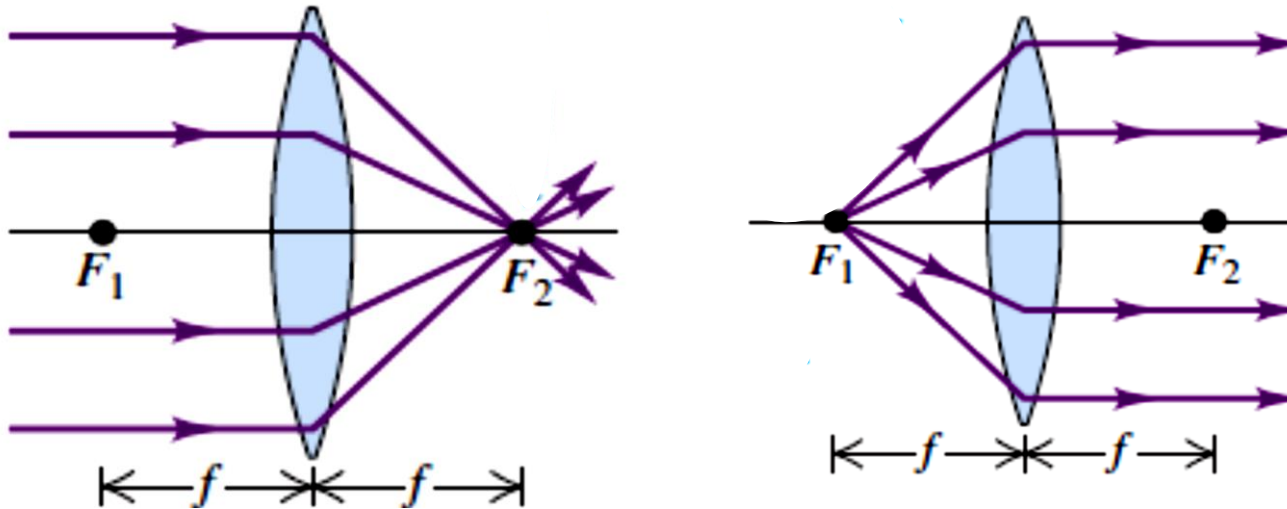
Conceptos básicos: lentes delgadas

Lente: sistema óptico con dos superficies refractivas.



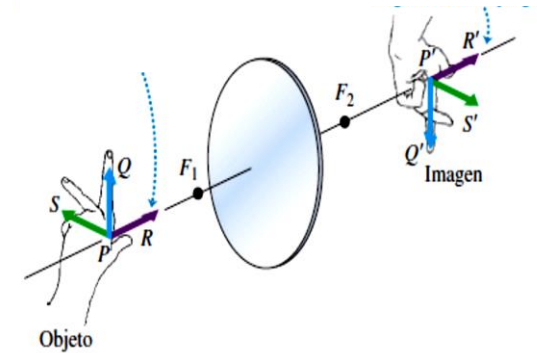
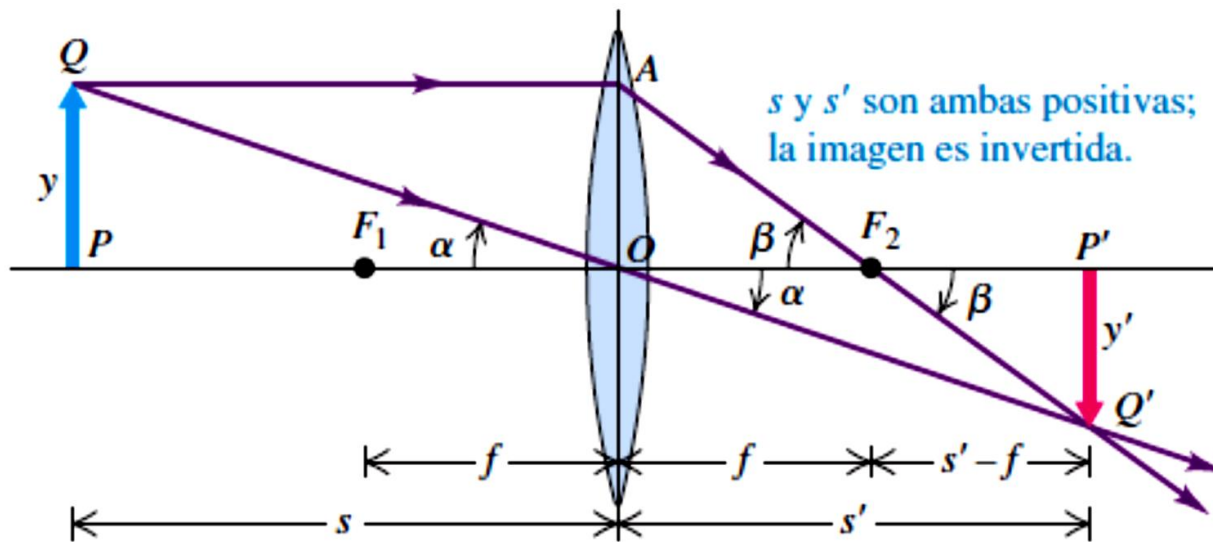
lentes convergentes (**positivas**) y divergentes (**negativas**)

Conceptos básicos: lentes delgadas- propiedades



- lentes convergentes (**positivas**)
- imagen real

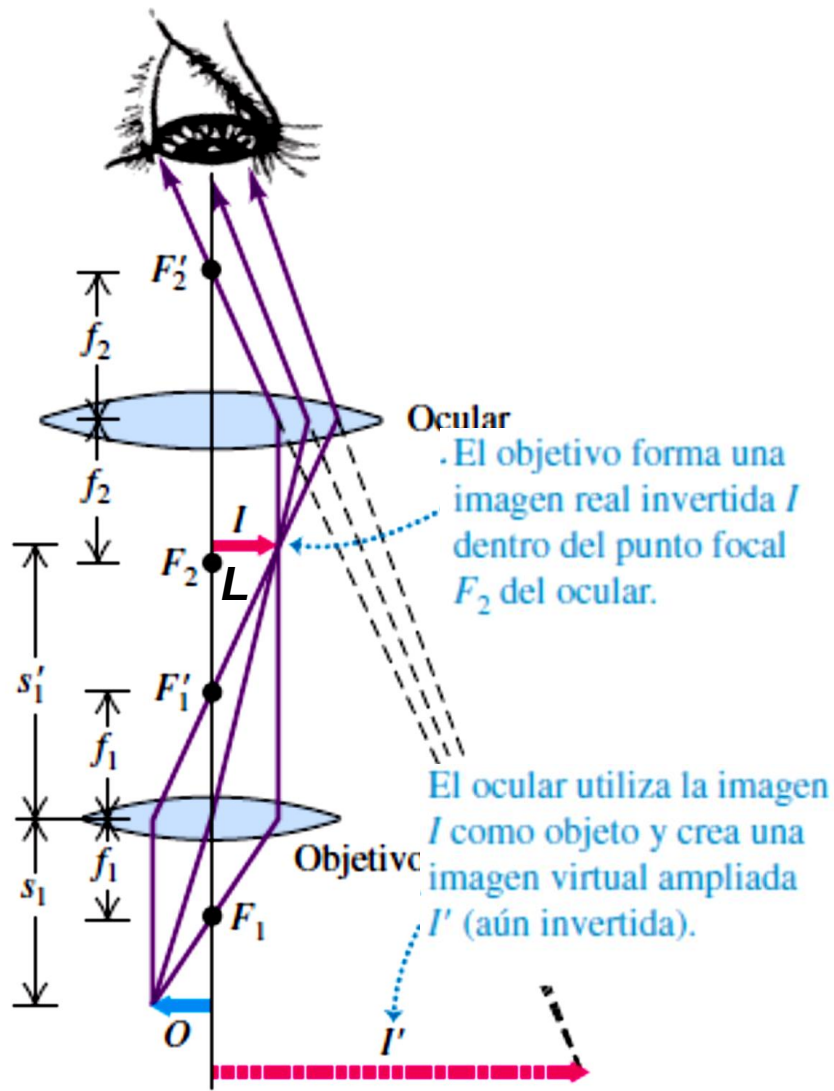
Conceptos básicos: lentes delgadas- propiedades



$$\frac{1}{s} + \frac{1}{s'} = \frac{1}{f} \quad (\text{relación objeto-imagen, lente delgada})$$

$$m = -\frac{s'}{s} \quad (\text{aumento lateral, lente delgada})$$

Conceptos básicos: microscopio- sistema de lentes



- L , longitud del tubo
- el aumento *lateral* m_1 del objetivo
- el aumento *angular* M_2 del ocular

$$m_1 = -\frac{s'_1}{s_1} \quad M_2 = (25 \text{ cm})/f_2$$

$$M = m_1 M_2 = \frac{(25 \text{ cm}) s'_1}{f_1 f_2}$$

Conceptos básicos: microscopio- sistema de lentes

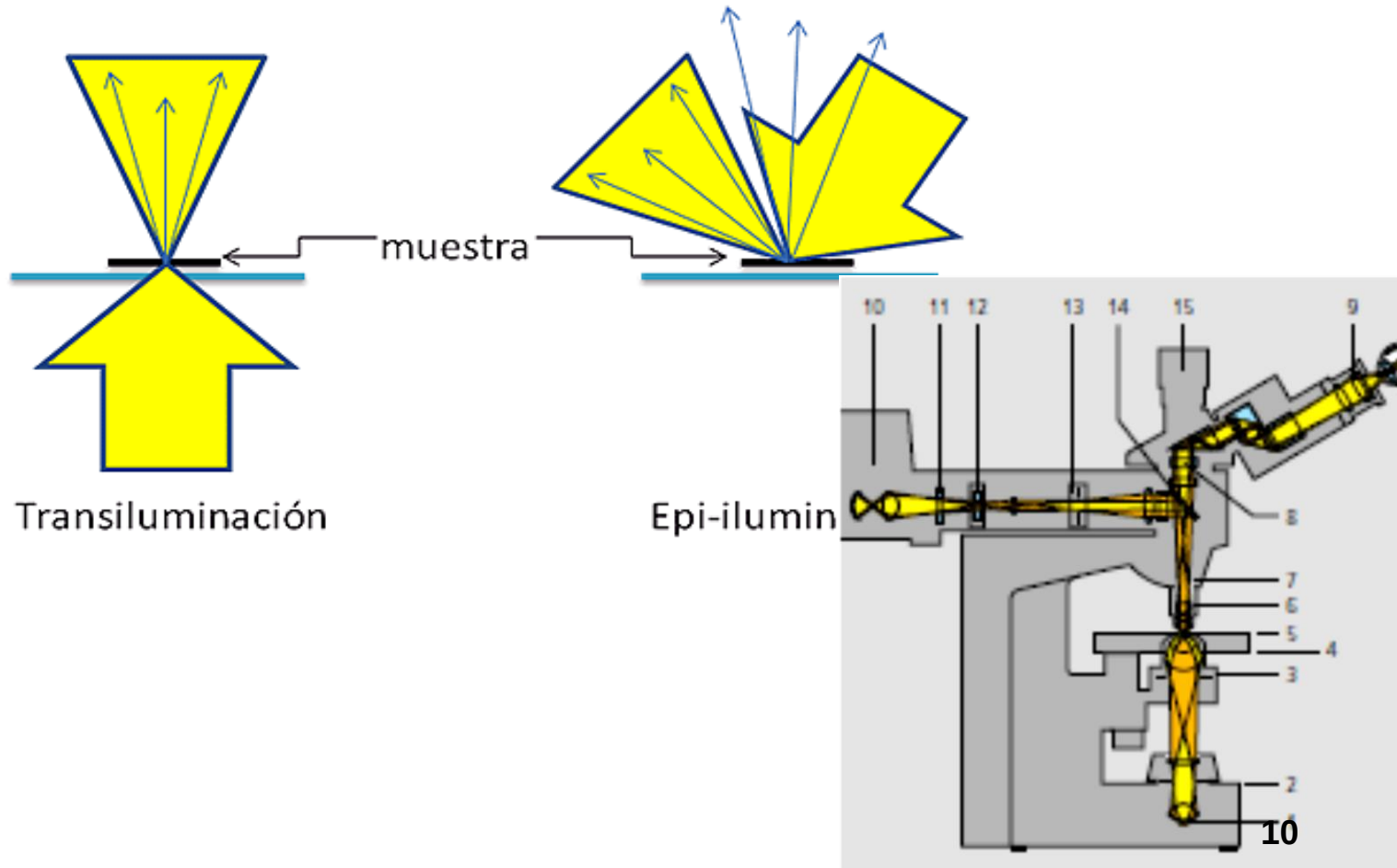
Está constituido por cuatro grupos de dispositivos o sistemas articulados:

- **Sistema mecánico**
- **Sistema óptico**
- **Sistema de iluminación**
- **Accesorios**



Conceptos básicos: iluminación

Para iluminar el objeto se pueden emplear dos mecanismos, ya sea que el rayo de luz lo atraviese o que simplemente incida en cierto ángulo sobre el objeto.



Microscopio: iluminación Köhler

➤ La iluminación Köhler crea un campo de visión iluminado **HOMOGENEAMENTE** mientras la muestra es iluminada por un cono de luz muy ancho.

➤ Se forman dos planos conjugados (separados) de imagen:

1. imagen de la muestra
2. imagen del filamento de la fuente de iluminación.

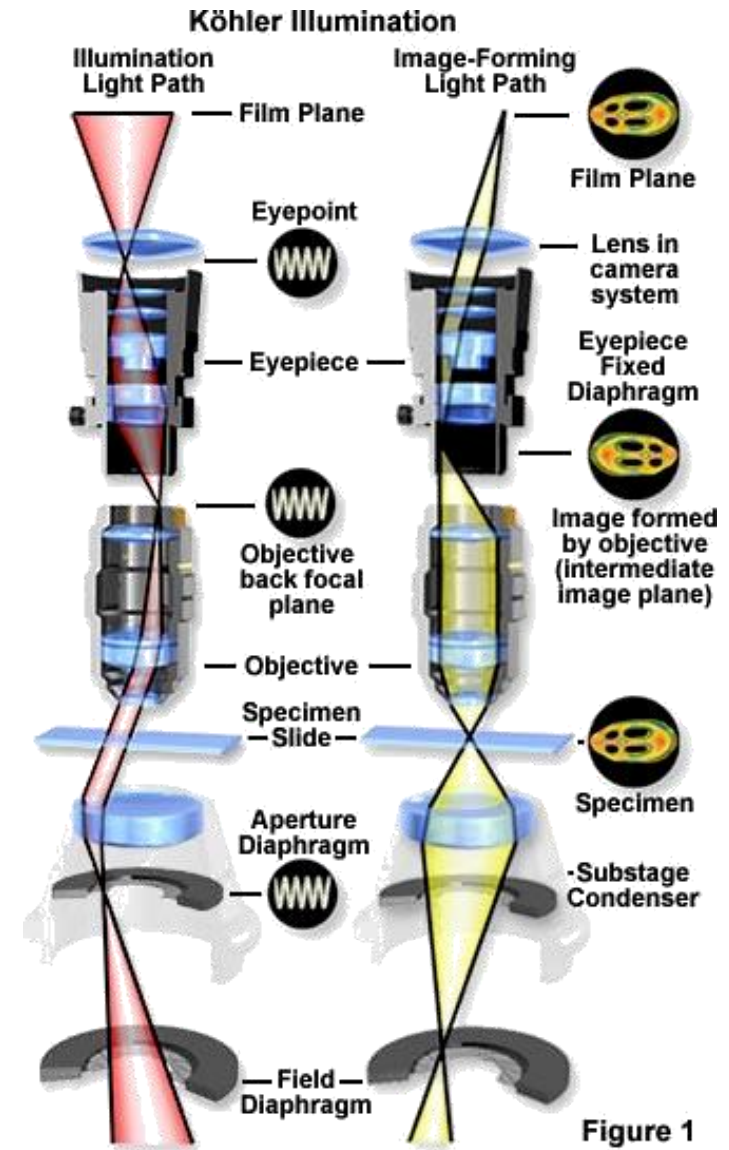
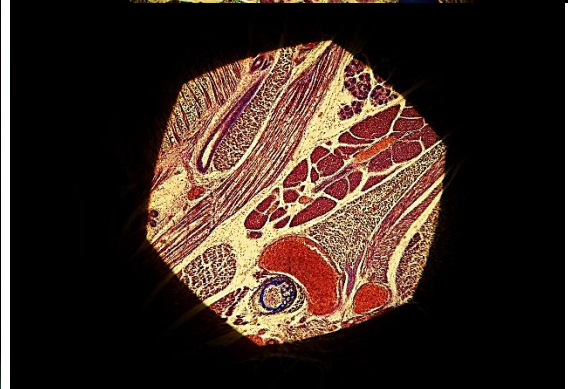
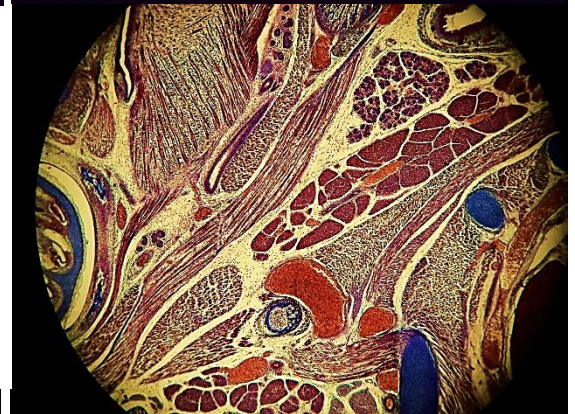
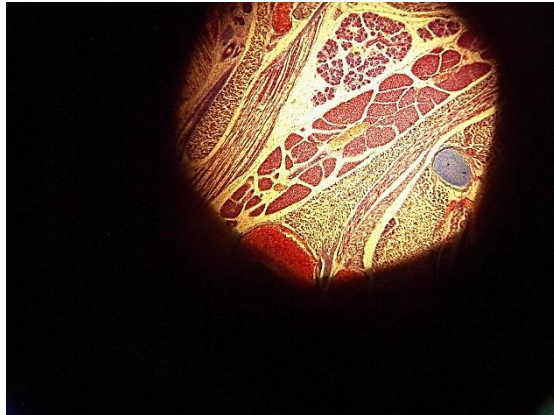


Figure 1

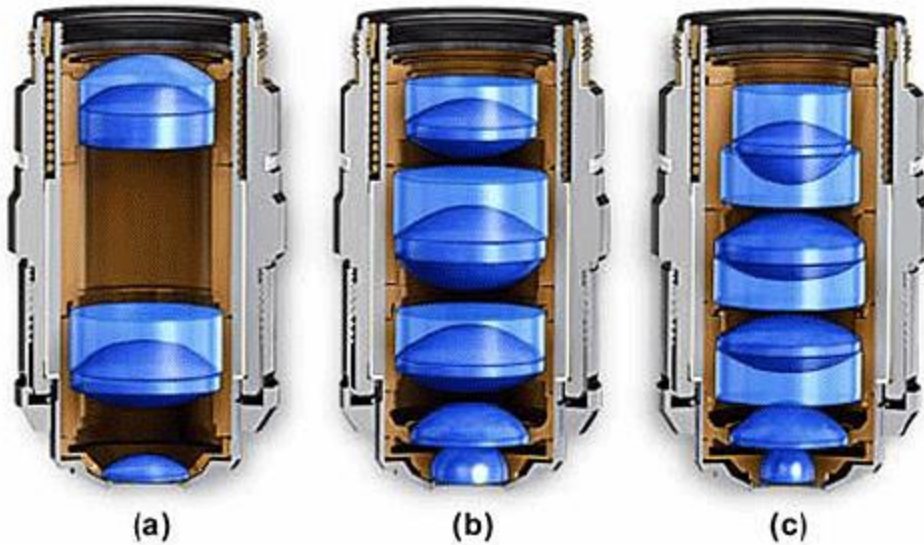
Planos conjugados para los rayos de la fuente de iluminación
Planos conjugados para los rayos formadores de imagen



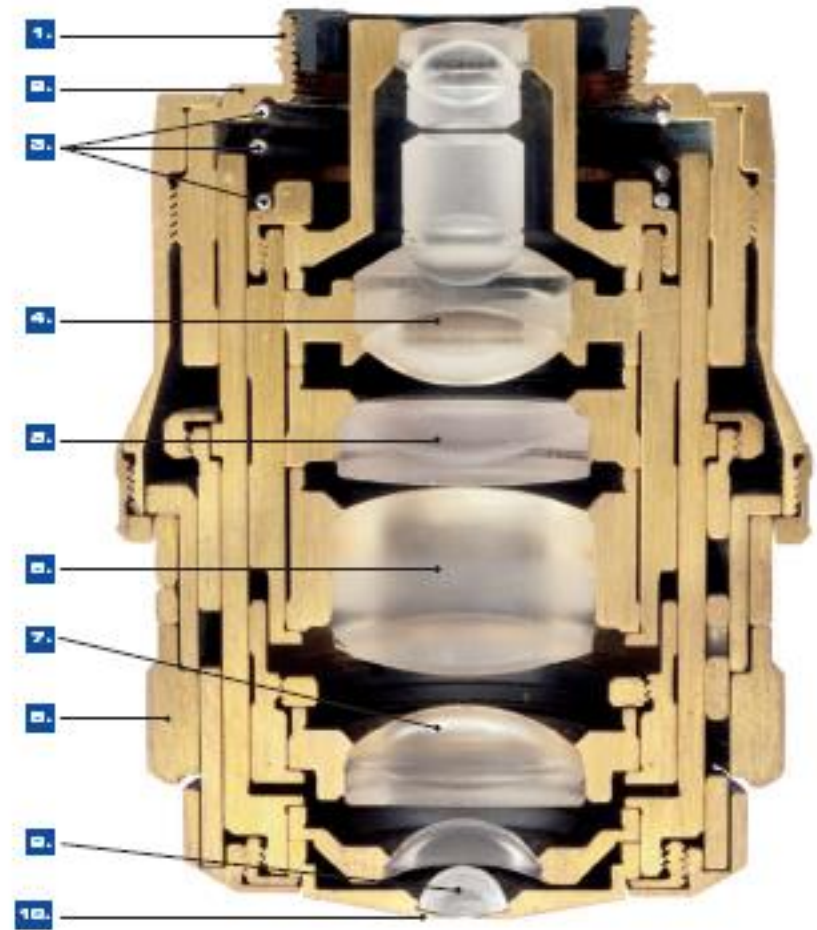
Microscopio óptico: iluminación Köhler



Microscopio: lente objetivo



Tipos de objetivos. (a) Objetivo acromático que contiene una lente frontal y dos pares internos, (b) objetivo semi-apocromático o fluorita, con cuatro pares de lentes y (c) objetivo apocromático que contiene un triplete, dos pares, un menisco y una lente esférica frontal



Cross section of an objective

1. Objective thread
2. Stop face of the objective
3. Spring system for the specimen-protection mechanism
- 4 - 7. Lens groups for the correction of image errors
8. Correction collar for adapting to deviating cover glass thicknesses or temperatures
9. Front lens system
10. Front lens holder

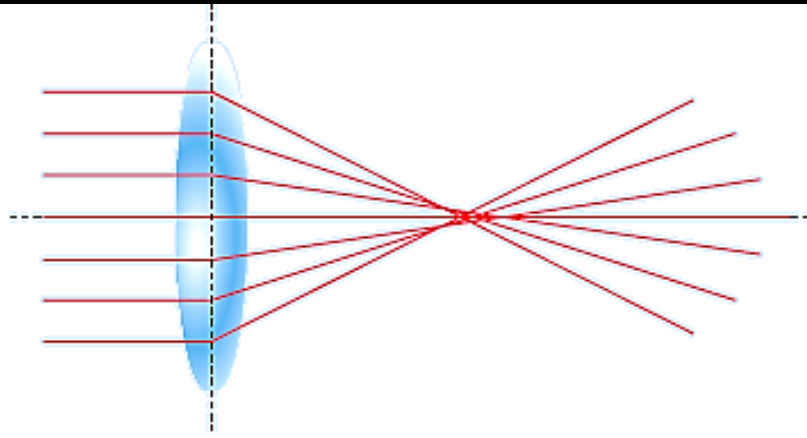
Estructura de los objetivos

Microscopio: lente objetivo

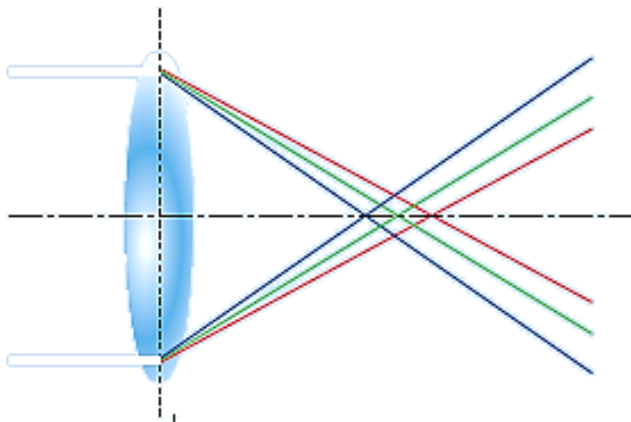
Lente Objetivo → coleccionar la luz proveniente del espécimen y proyectar una imagen nítida real, invertida y aumentada hacia el cuerpo del microscopio.



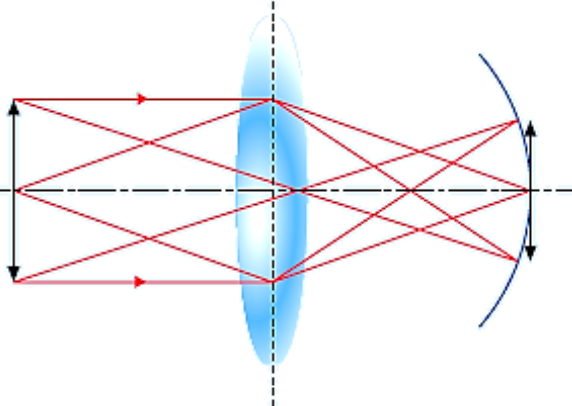
Microscopio: lente objetivo-aberraciones



Aberración de esfericidad. Los rayos que inciden paralelamente al eje principal no convergen todos en un mismo punto.



Aberración cromática. La luz blanca se descompone al atravesar la lente y las diversas longitudes de onda convergen en varios puntos focales diferentes.



Aberraciones geométricas:

Astigmatismo

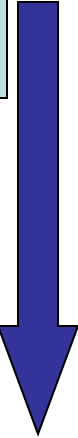
Coma

Distorsión

Curvatura del campo

Microscopio: lente objetivo-aberraciones

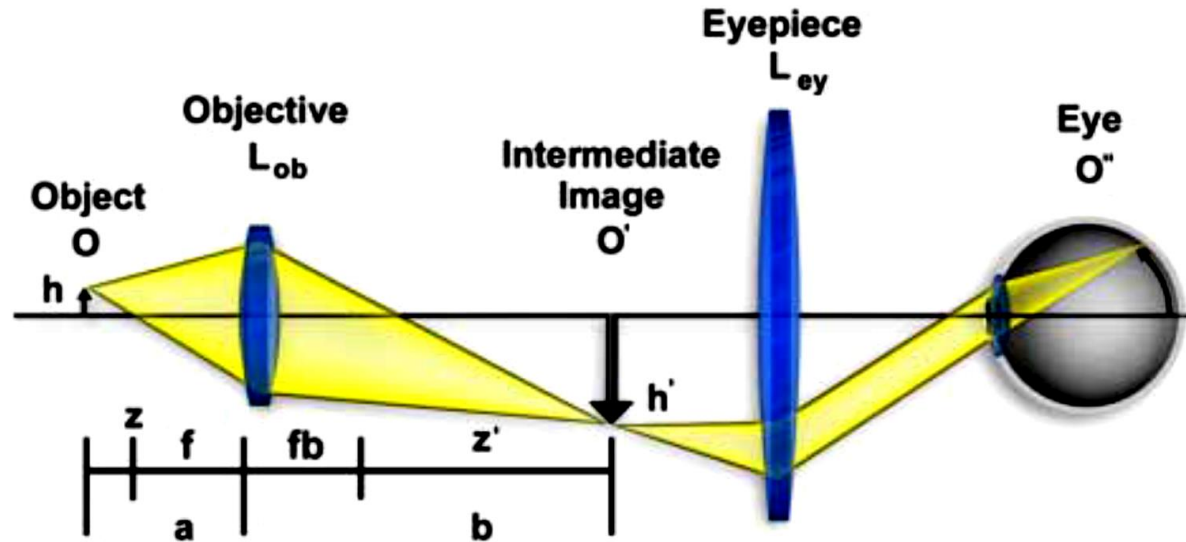
Objective Type	Spherical Aberration	Chromatic Aberration	Field Curvature
Achromat	1 Color	2 Colors	No
Plan Achromat	1 Color	2 Colors	Yes
Fluorite	2-3 Colors	2-3 Colors	No
Plan Fluorite	3-4 Colors	2-4 Colors	Yes
Plan Apochromat	3-4 Colors	4-5 Colors	Yes



PLAN - corregidos para curvatura del campo (plan-acromáticos, plan-fluoritas o plan-apocromáticos).

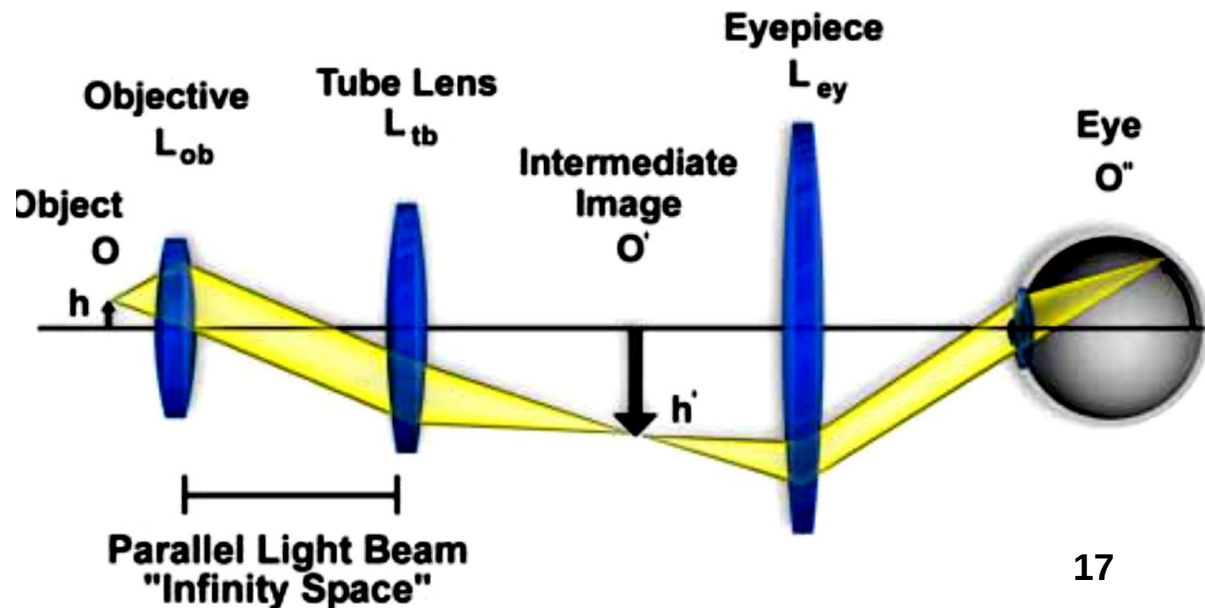


Microscopio: ICS, óptica corregida al infinito



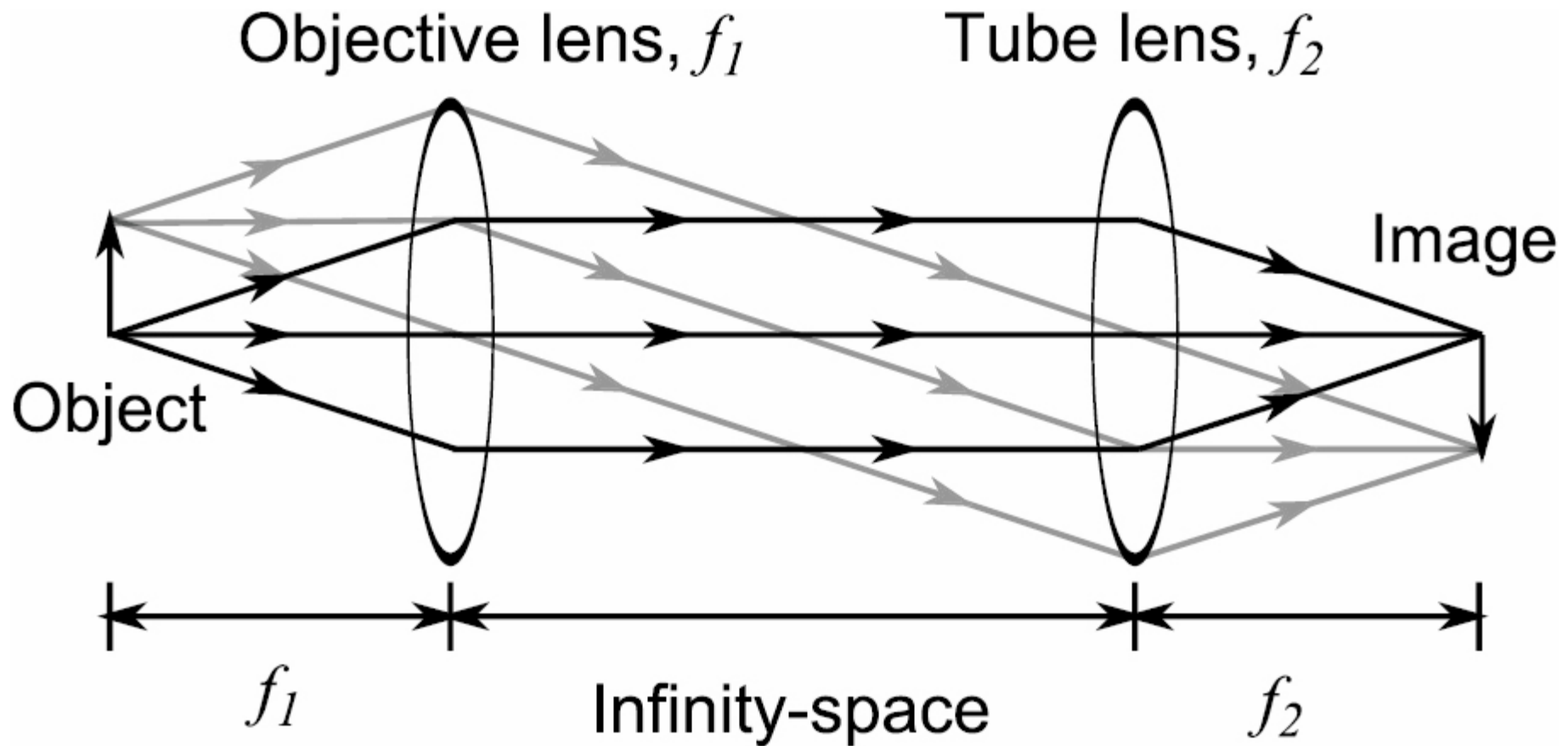
✓ *mayores distancias de trabajo*

Infinity-Corrected Microscope Ray Paths



✓ *posibilita accesorios*

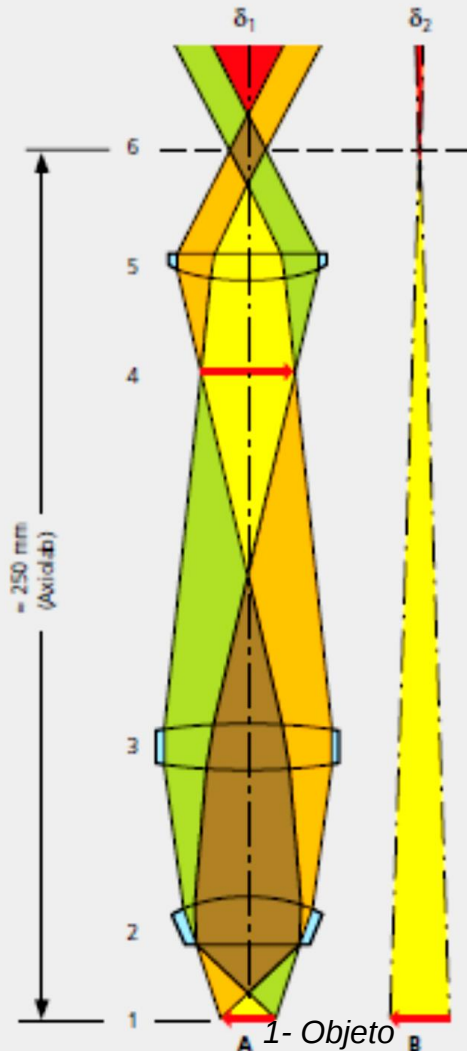
Microscopio: ICS, óptica corregida al infinito



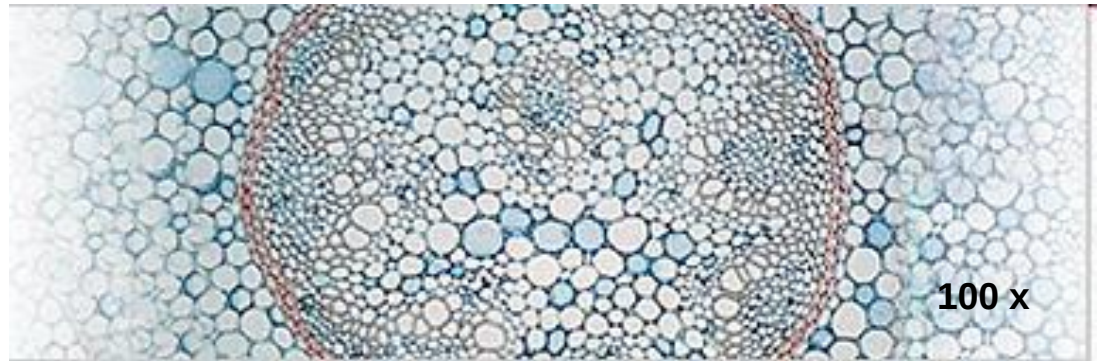
Microscopio: magnificación

Los microscopios magnifican en dos pasos

AUMENTO TOTAL: Aumento del objetivo x Aumento del ocular



- 1- Objeto
- 2- Objetivo
- 3- Lente de tubo
- 4- Imagen intermedia
- 5- Ocular
- 6- Ojo



Considerar únicamente el **aumento** no es suficiente para sacar el mejor partido del microscopio, pues otro factor, la **resolución**, determina lo que se verá.

Microscopio: resolución – conceptos básicos

Resolución. Es la capacidad que tiene un sistema óptico de aislar dos puntos que se encuentran muy próximos entre sí, de manera que se puedan ver individualizados uno del otro

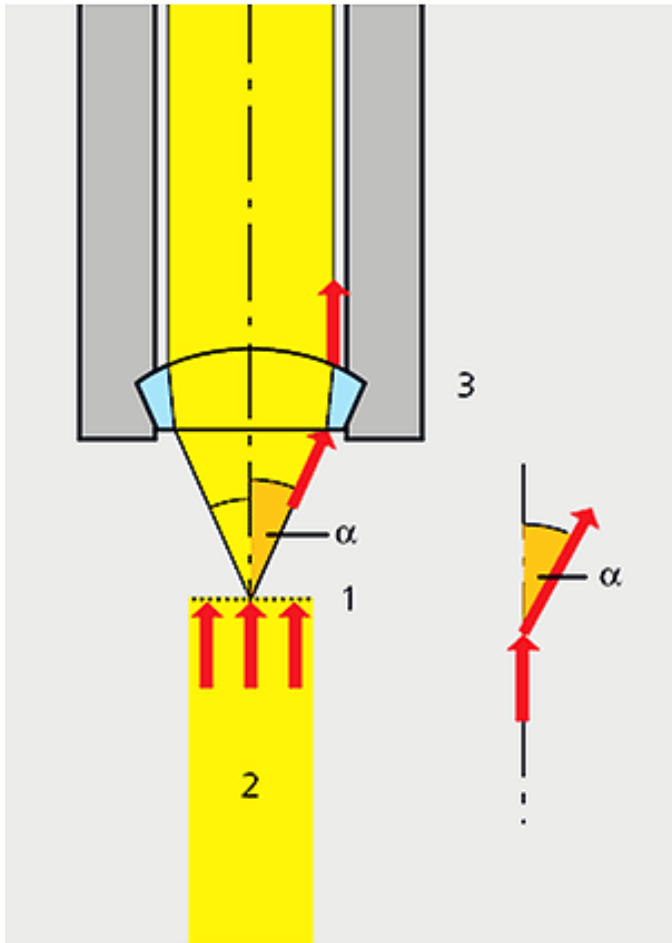
Criterio de Rayleigh

El límite de la ***distancia mínima*** apreciable d entre dos puntos es:

$$d_0 = 1.22 \lambda_0 / NA_{obj} + NA_{cond}$$

Microscopio: apertura numérica

Resolución. Es la capacidad que tiene un sistema óptico de aislar dos puntos que se encuentran muy próximos entre sí, de manera que se puedan ver individualizados uno del otro



$$NA = \eta \sen \alpha$$

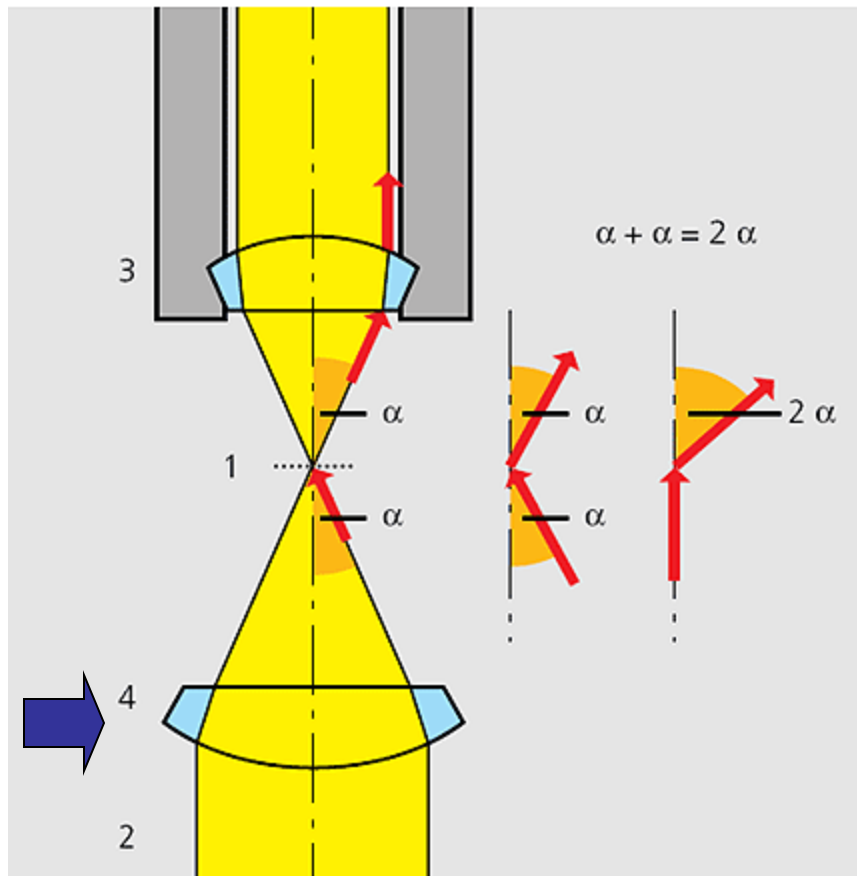
- *NA es la apertura numérica*
- *η = el índice de refracción*
- *α es 1/2 de la apertura angular del objetivo*

$\eta = 1$ para aire

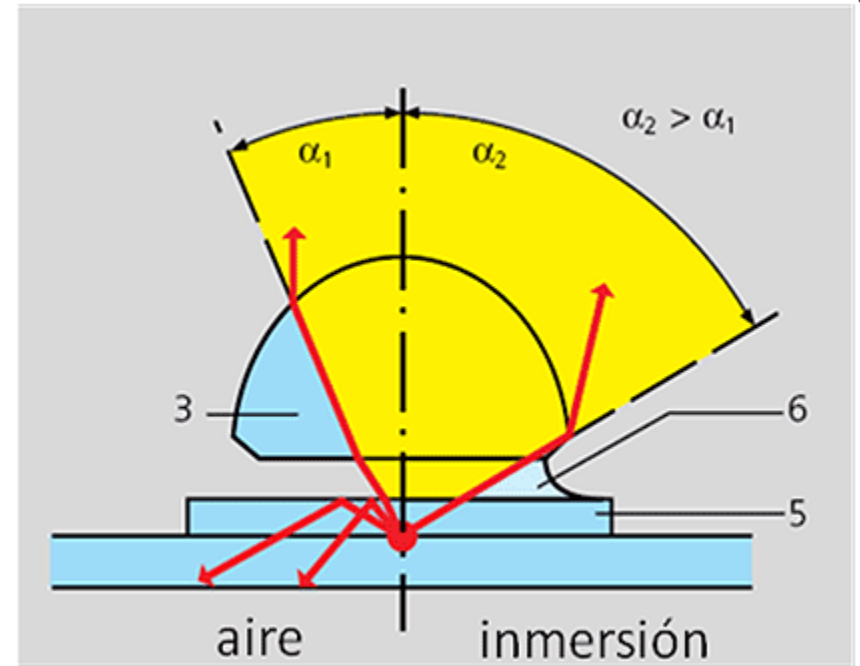
$\eta = 1.33$ para agua

$\eta = 1.515$ para aceite o vidrio

Microscopio: apertura numérica



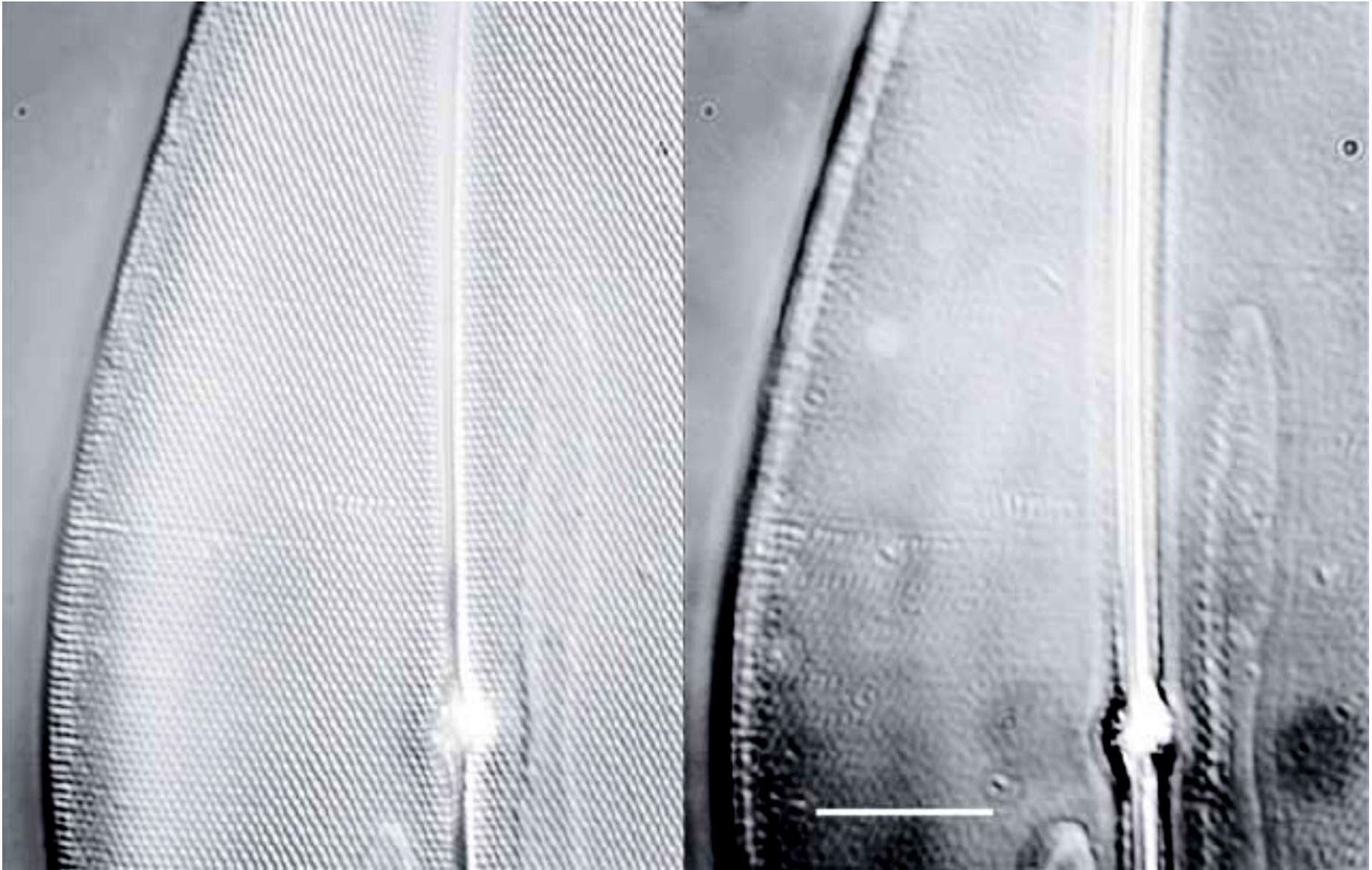
El objeto (1) es iluminado con un rayo de luz (2) que formará un cono luminoso frente al objetivo. Se colocó otra lente (4) que recoge y condensa la luz antes que ilumine al objeto.



A la izquierda el espacio entre el cubreobjeto (5) y el objetivo (3) es ocupado por el aire; a la derecha el espacio es ocupado por un líquido de inmersión (6). Apréciase que el cono de luz y el ángulo α son mayores con inmersión.

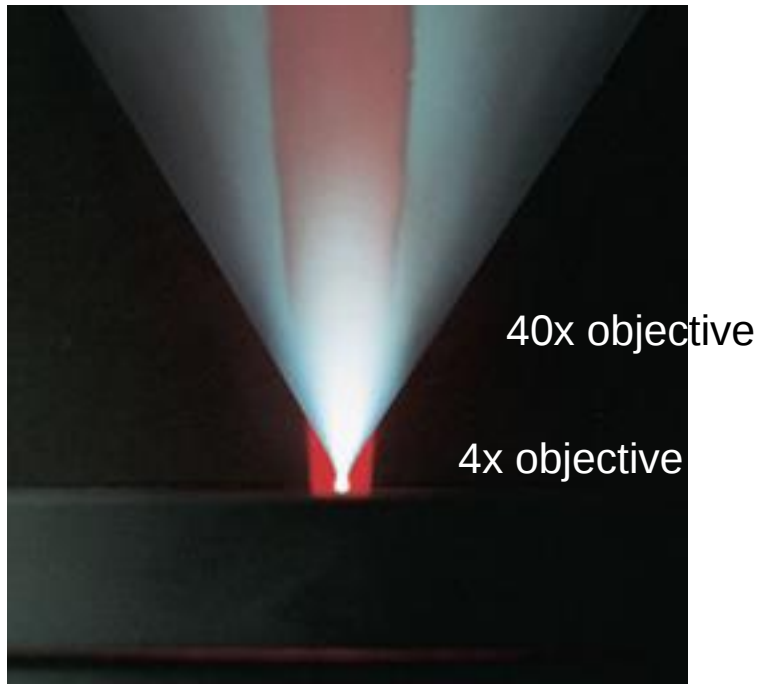
información

Microscopio: apertura numérica



Efecto de la NA sobre la resolución. Muestra: diatomea *Pleurosigma*. Bar 10 μm .

Microscopio: apertura numérica- brillo en la imagen



$$NA = \eta \sin \alpha$$

$$B \propto \frac{(N.A.)^2}{M^2}$$

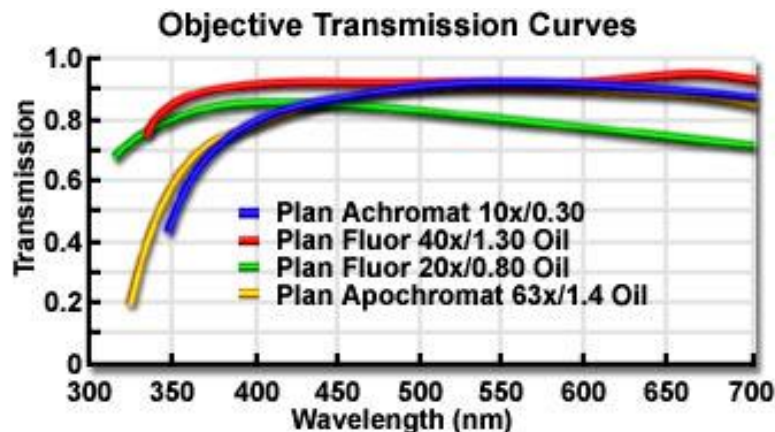
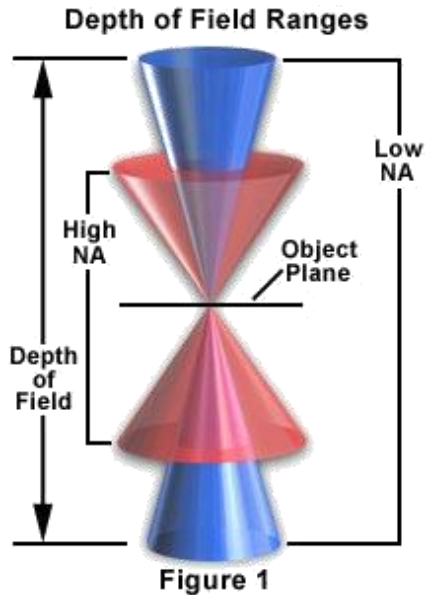


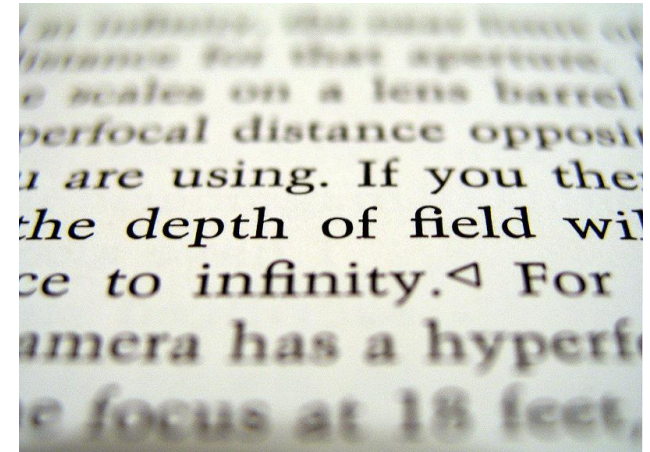
Figure 1

- La intensidad de la luz *colectada* disminuye con el cuadrado de la magnificación.
- La intensidad colectada de la luz aumenta con el cuadrado de la apertura numérica.

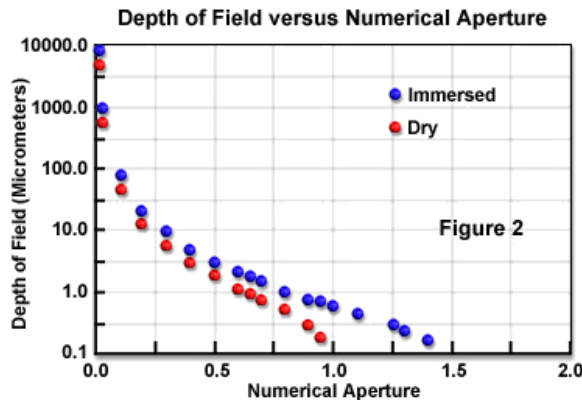
Microscopio: Z- profundidad de campo



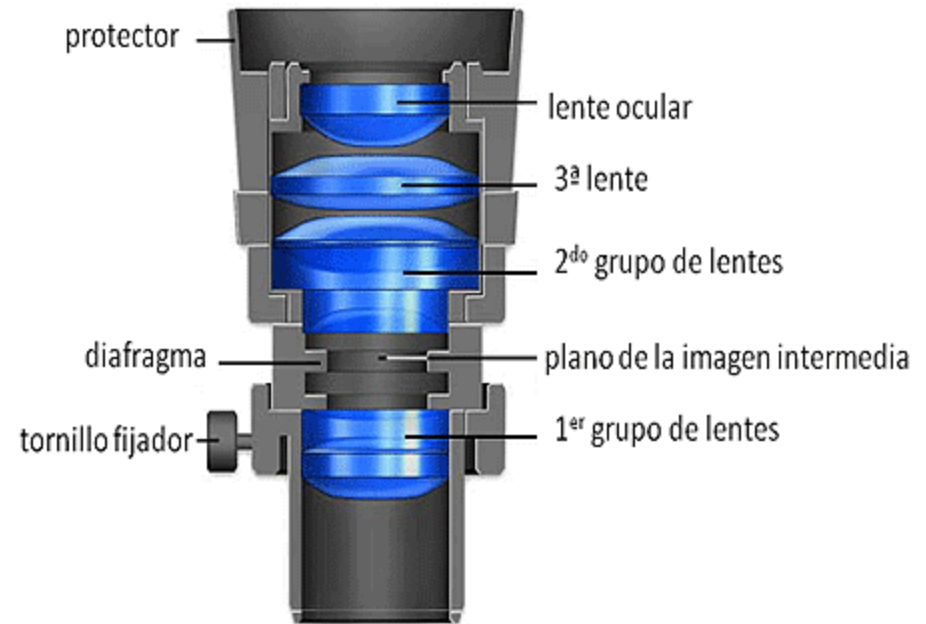
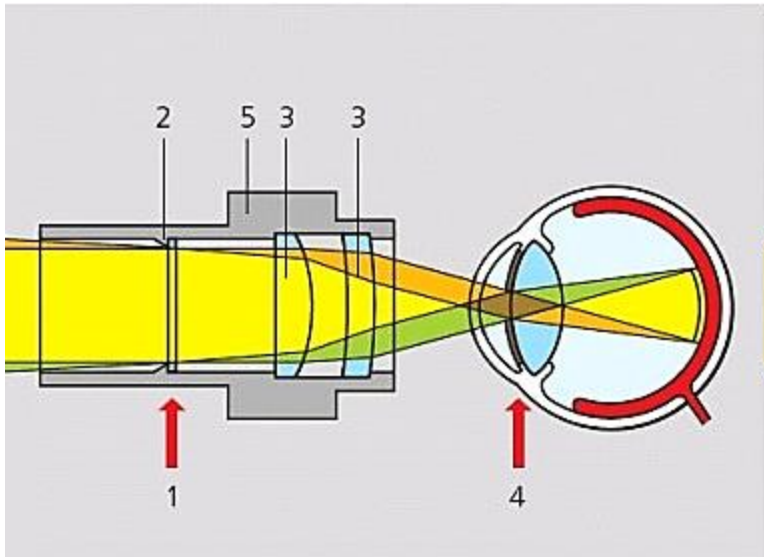
$$Z = n\lambda/NA^2$$



Magnification	Numerical Aperture	Depth of Field (μm)	Image Depth (mm)
4x	0.10	55.5	0.13
10x	0.25	8.5	0.80
20x	0.40	5.8	3.8
40x	0.65	1.0	12.8
60x	0.85	0.40	29.8



Microscopio: lente ocular

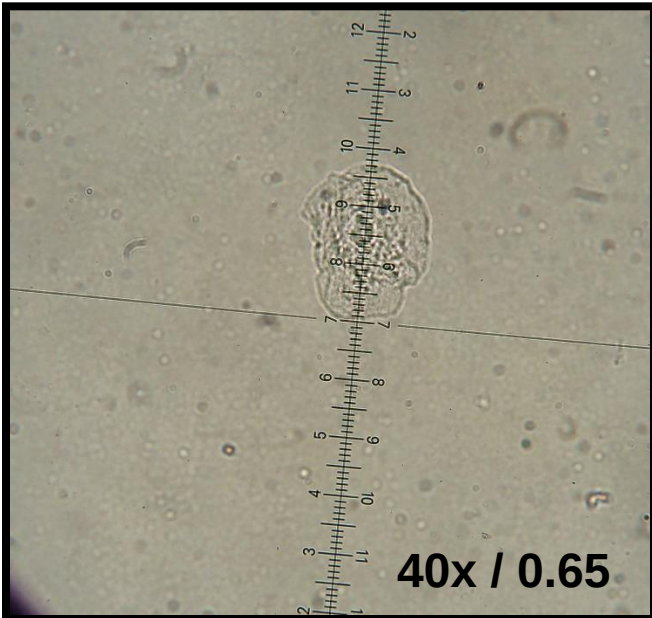
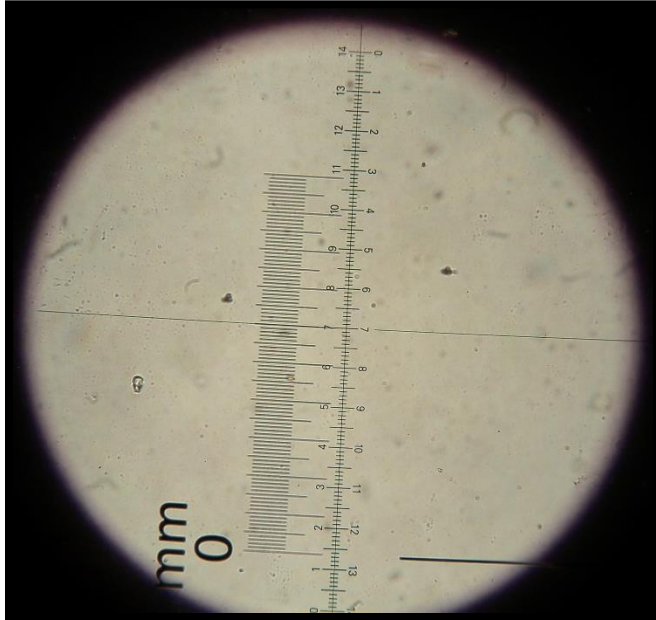


Ocular

- Aumenta la imagen y la transforma en una imagen virtual, derecha con respecto a la imagen del objetivo, pero aun invertida, con respecto al objeto. Posteriormente el ojo endereza la imagen.
- Aplana y aclara el campo óptico o plano circular en el que aparece el objeto.

Aplicación: cuantificación o medición de estructuras del espécimen en estudio

TRABAJO PRÁCTICO: MICROSCOPIA ÓPTICA

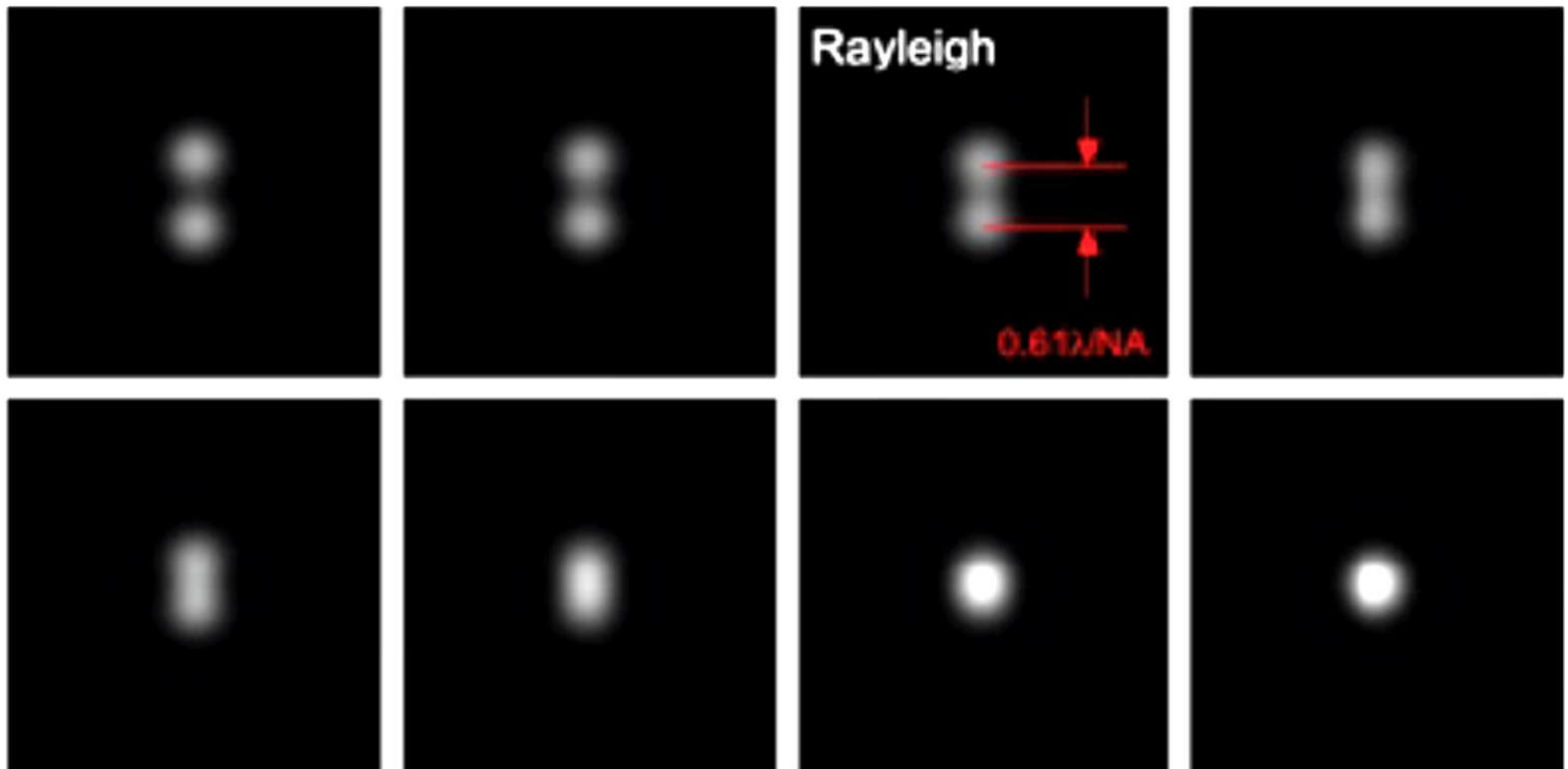


Imágenes 2C 2016

Microscopio: resolución – conceptos básicos

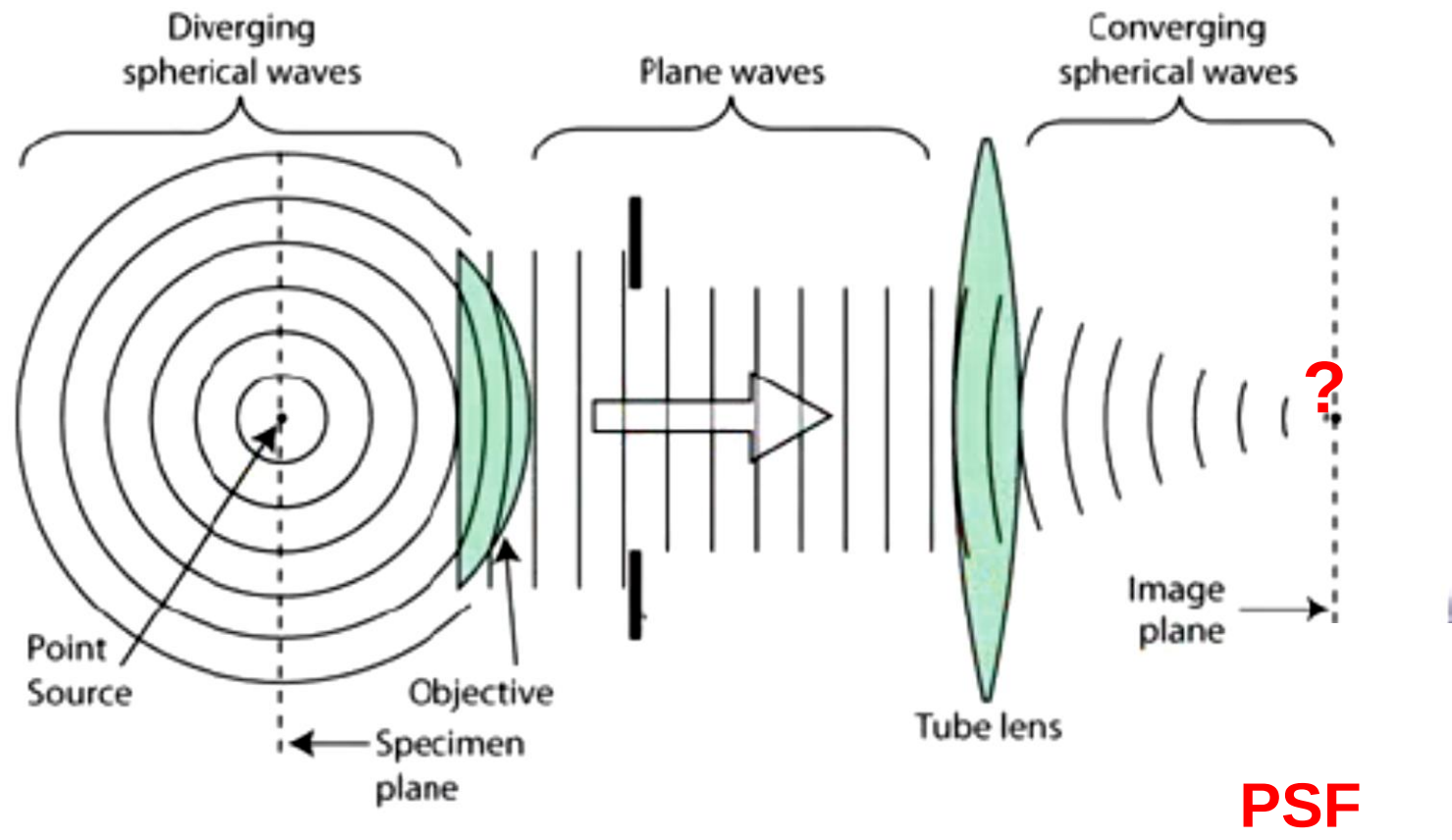
Cuán cerca deben estar dos fuentes puntuales iguales para que se vean como dos puntos?

Difracción y PSF

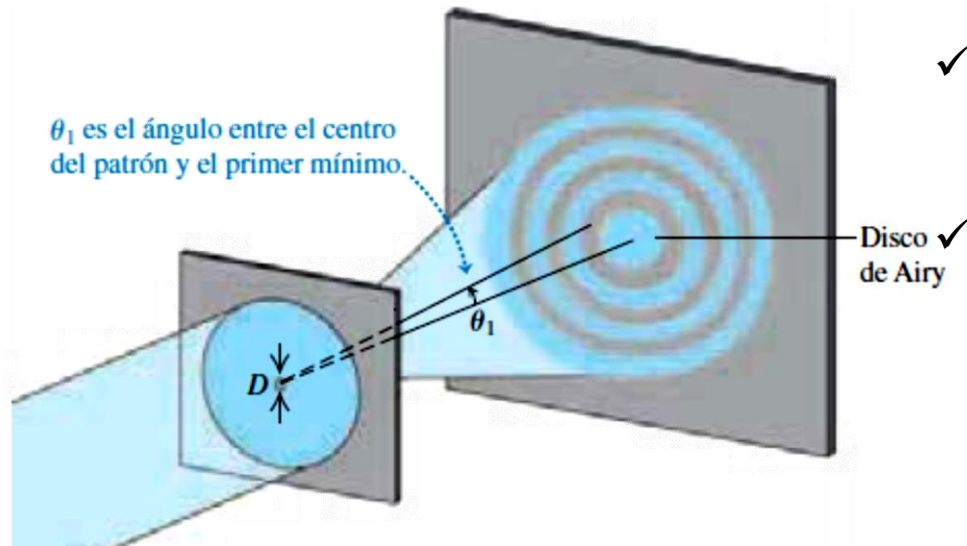


Para un objeto puntual en el plano focal, cuál es la distribución de luz en y cerca del plano imagen?

Wave optic view of the effect of the microscope lenses



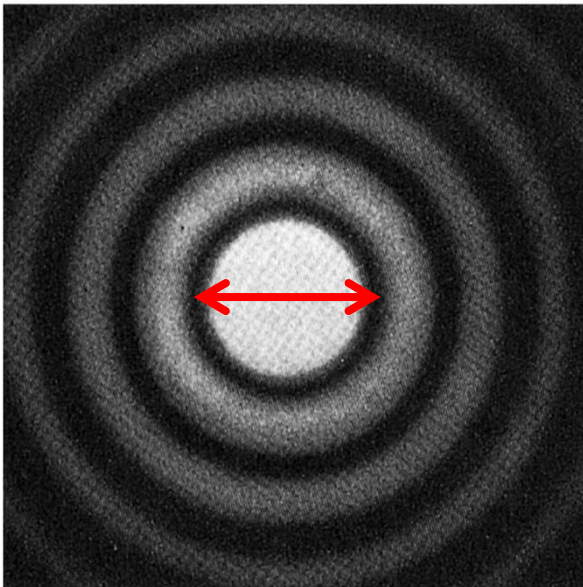
Microscopio: difracción y resolución – conceptos básicos



✓ figura de difracción formado por una abertura circular de diámetro D

✓ Disco de Airy ✓ centro brillante, así como en anillos oscuros y brillantes alternados

$$\text{sen } \theta = 1.22 \frac{\lambda}{D}$$



$$\theta \approx 1.22 \frac{\lambda}{D}$$

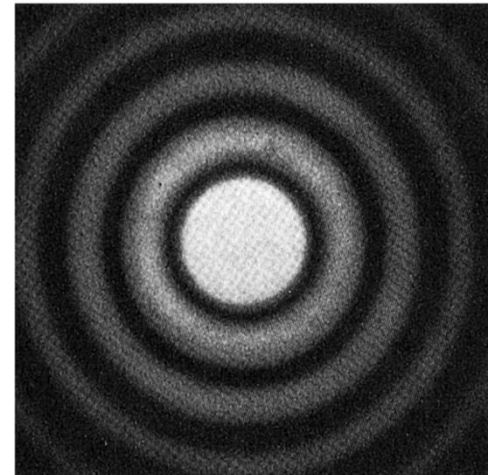
✓ radio angular del **disco de Airy** es el del **primer anillo oscuro**

PSF, *Point Spread Function*

La **PSF** es la función que define la forma que toma una fuente puntual (es decir, un objeto idealmente adimensional) de luz al pasar a través de un sistema óptico de características particulares al formar una imagen.

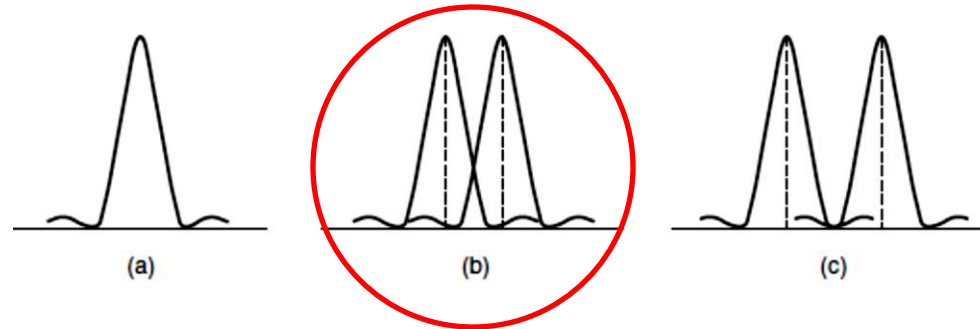
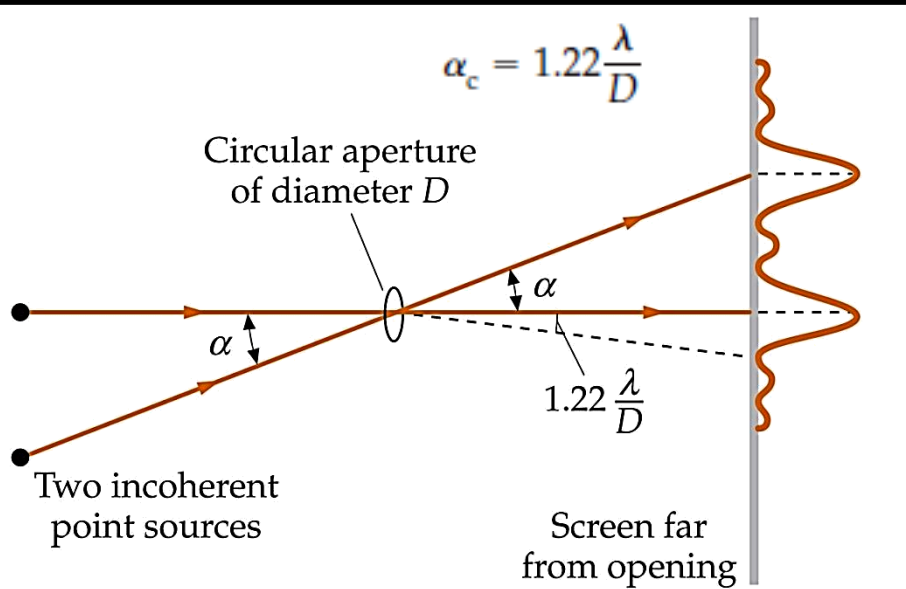
$$\text{Imagen} = \text{Objeto} \otimes \text{PSF}$$

Se define como el patrón de difracción tridimensional de la luz emitida por un punto infinitesimalmente pequeño en el espécimen y transmitido al plano imagen a través de una lente objetivo de apertura numérica NA.



patrón de difracción de Airy

Microscopio: difracción y resolución – conceptos básicos



Un criterio de uso muy extendido de la resolución de dos objetos puntuales, conocido como **criterio de Rayleigh**, es que los objetos están apenas resueltos si *el centro de un patrón de difracción coincide con el primer mínimo del otro*.

$$d = 1.22 \frac{\lambda}{2NA}$$

Microscopio: óptica limitada por difracción

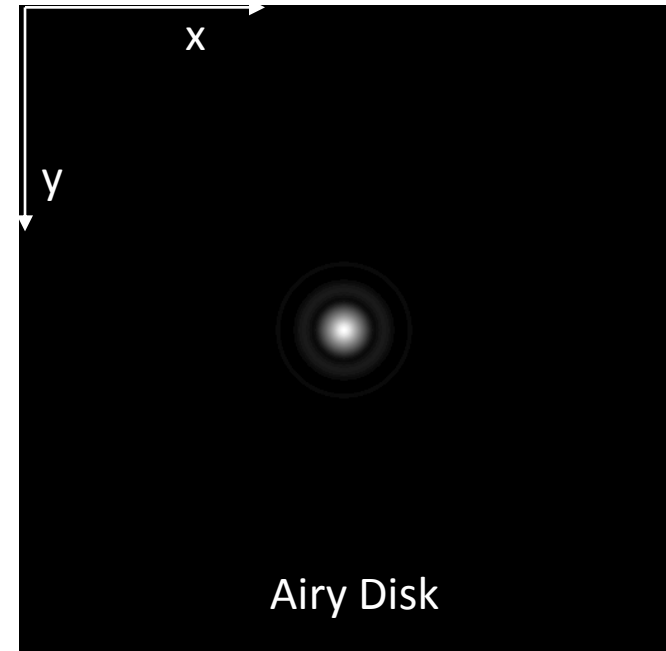
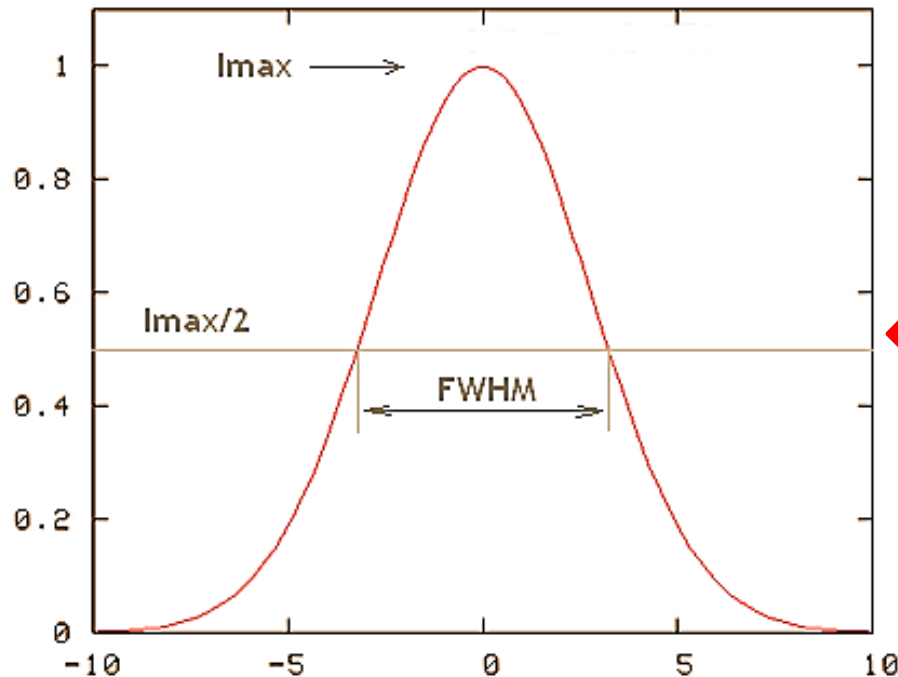
Microscopía de campo claro
donde la $NA_{cond} < NA_{obj}$

$$d_{x,y} = 1.22 \frac{\lambda}{NA_{obj} + NA_{cond}}$$

Microscopía de fluorescencia (o
microscopía de campo claro donde
la $NA_{cond} \geq NA_{obj}$)

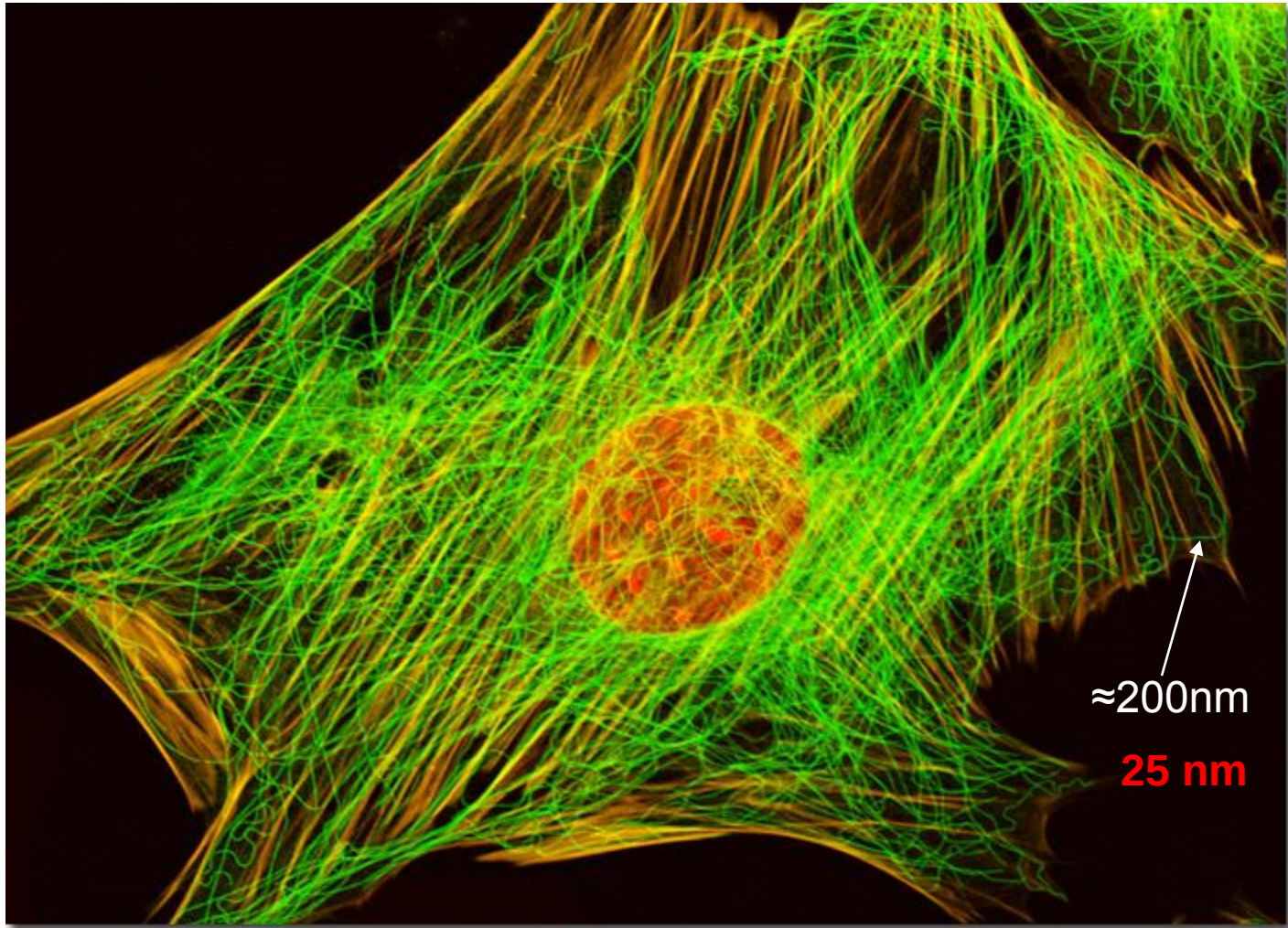
$$d_{x,y} = \frac{0.61\lambda}{NA} = \frac{0.61\lambda}{\eta \sin \alpha}$$

$\approx 200 \text{ nm}$



otros factores

Microscopio: óptica limitada por difracción

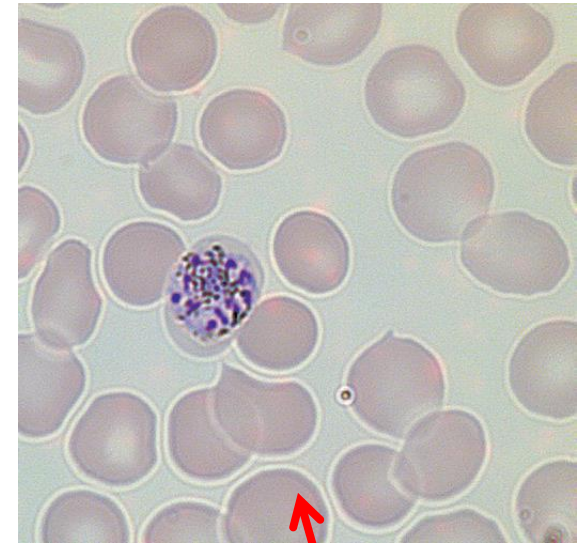


Técnicas especiales: contraste

¿Cómo podemos mejorar el contraste de las células en MO?



Micrografía en campo claro de una célula epitelial de la mucosa bucal antes (izquierda) y después (derecha) de modificación digital para mejorar el contraste.

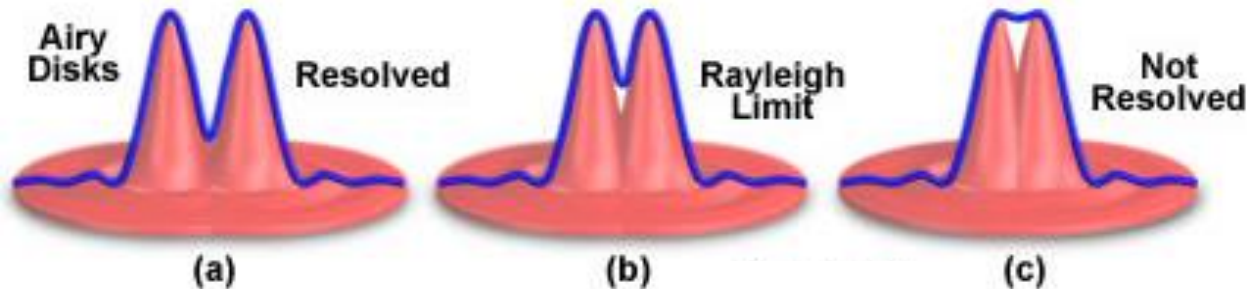


glóbulos rojos

Técnicas especiales: contraste

Se han diseñado técnicas microscópicas más complejas que incrementan el contraste sin afectar la resolución. Los principios básicos de estas técnicas especiales de microscopía se basan en:

- **La modificación de la manera como incide la luz sobre el espécimen:** *empleo de condensadores y filtros.*

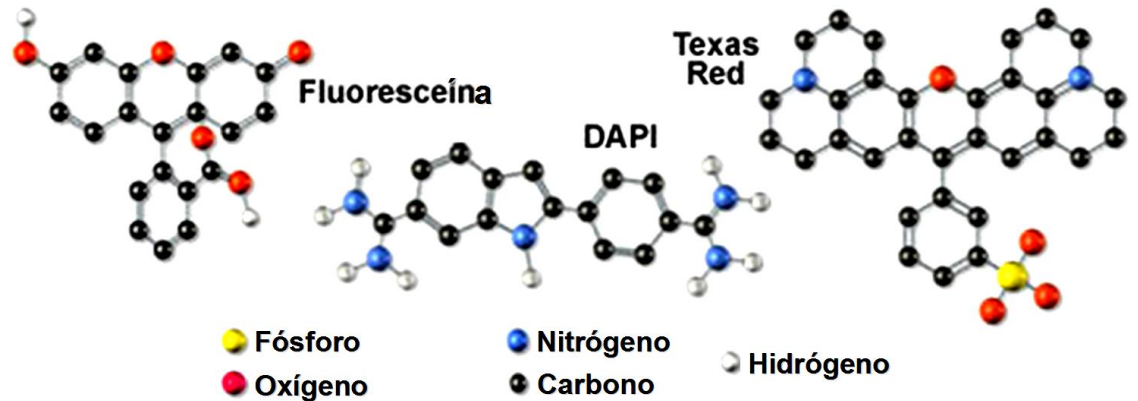
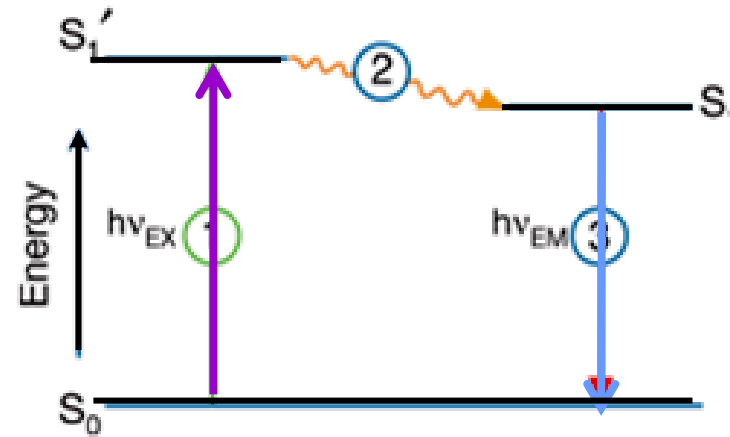
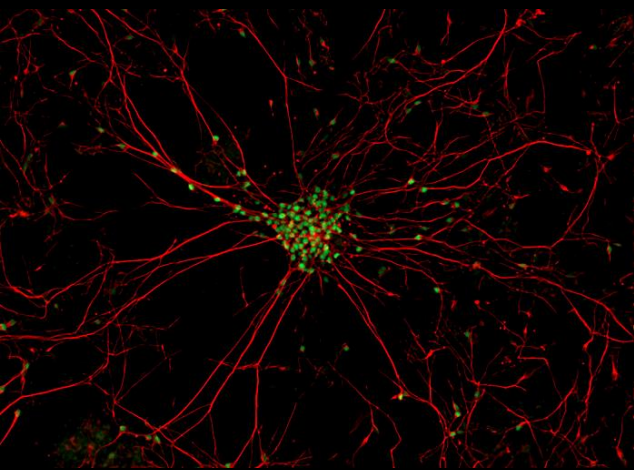
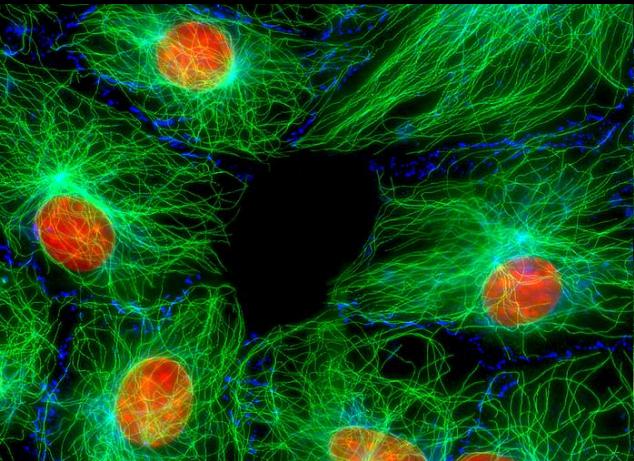
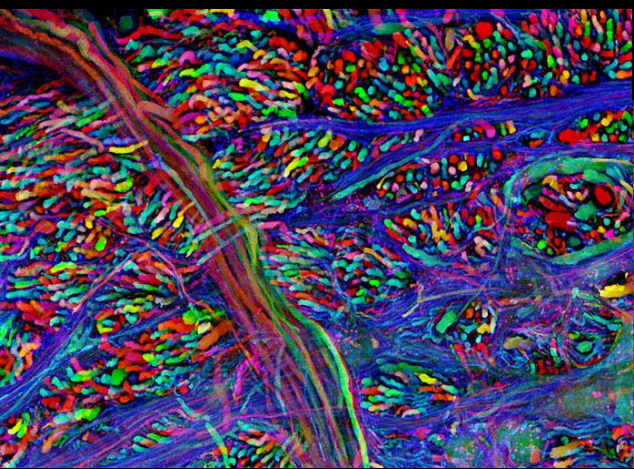


- **La modificación de la fuente emisora de luz:** *cambiando la luz blanca por luz ultravioleta o un láser.*

FLUORESCENCIA



Microscopía de fluorescencia: ¿qué es?

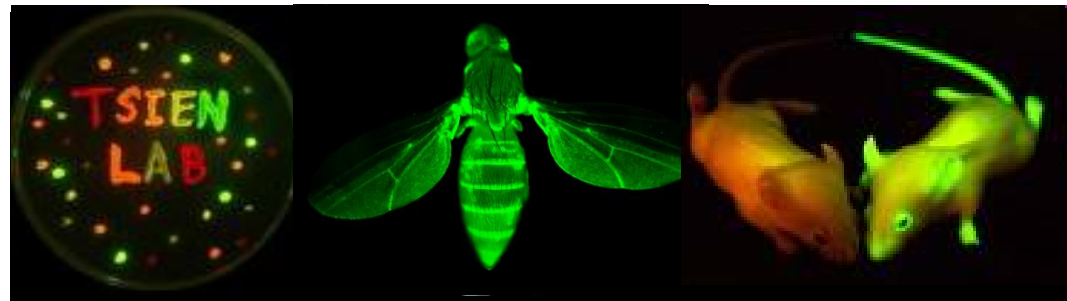


Los **fluoróforos** son moléculas que tienen la capacidad de absorber luz de una longitud de onda (color) y emitir luz en una longitud de onda mayor.

Microscopía de Fluorescencia



- *especificidad*
- *contraste*
- *in vivo*
- *desde microorganismos a mamíferos*

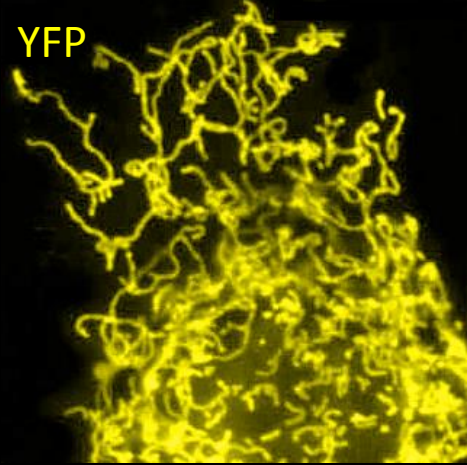


The Microtubule Plus-End Protein γ -EB1 - YFP

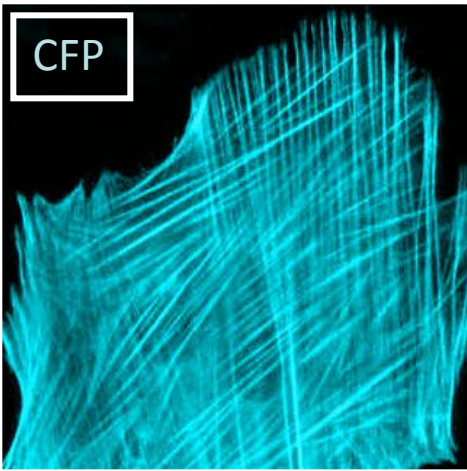
Fluorescencia & fluoróforos

sondas fluorescentes

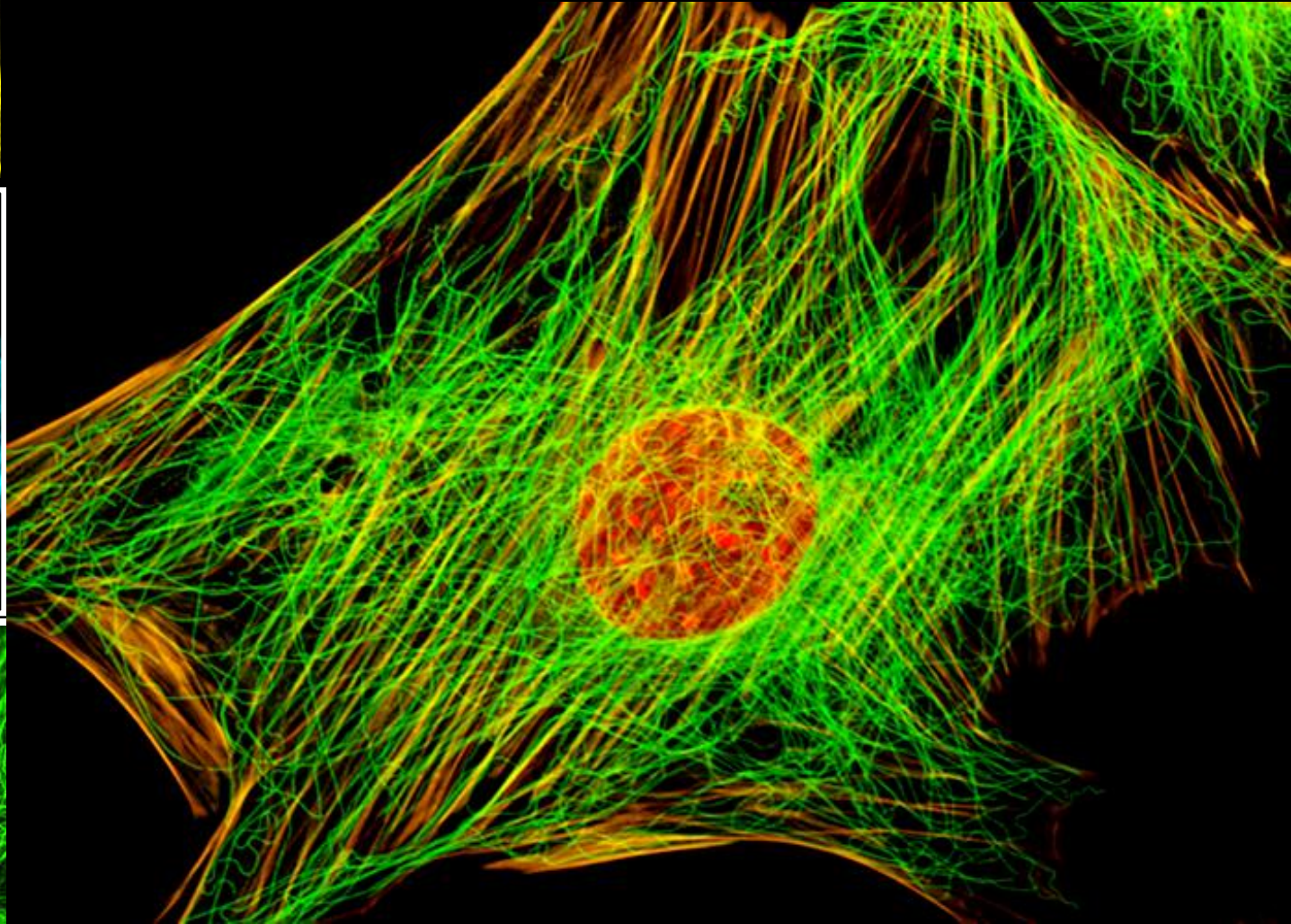
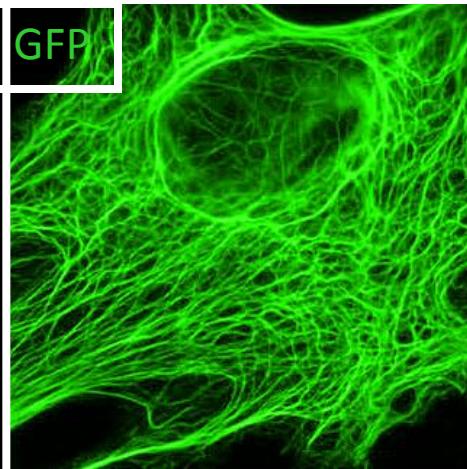
YFP



CFP



GFP



Fluorescencia & fluoróforos

340-400 n

400-430 n

430-500 n

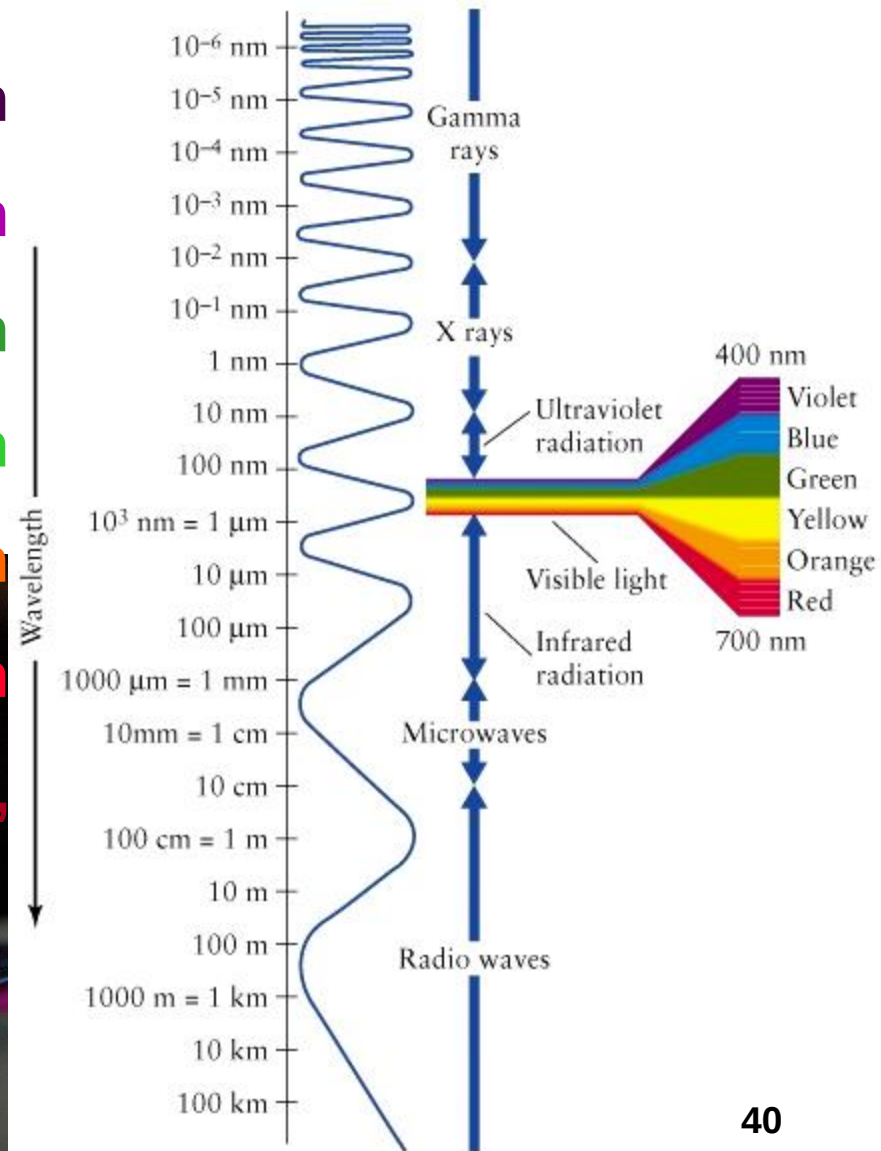
500-560 n

560-620 n

620-700 n

> 700 nm,

λ & color



Fluorescencia & fluoróforos

340-400 nm, UV

400-430 nm

430-500 nm

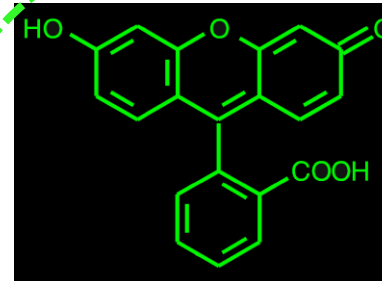
500-560 nm

560-620 nm

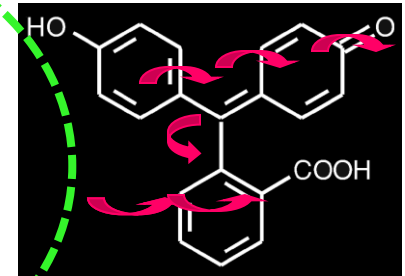
620-700 nm

> 700 nm, IR

λ & color



Fluoresceína



Fenolftaleína

- espectro de excitación & emisión (**Stokes**)
- rendimiento cuántico
- ciclo de servicio
- sensibilidad a entorno (**sondas versus sensores**)

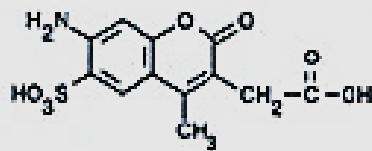


sondas fluorescentes

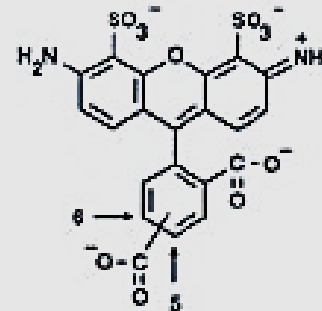
Fluorescencia & fluoróforos

marcadores fluorescentes

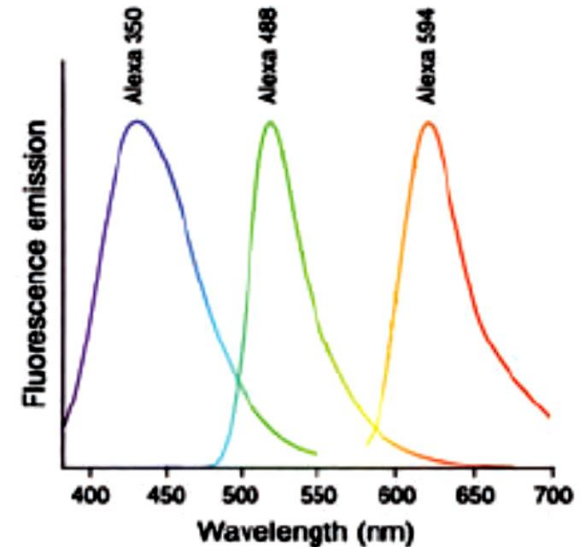
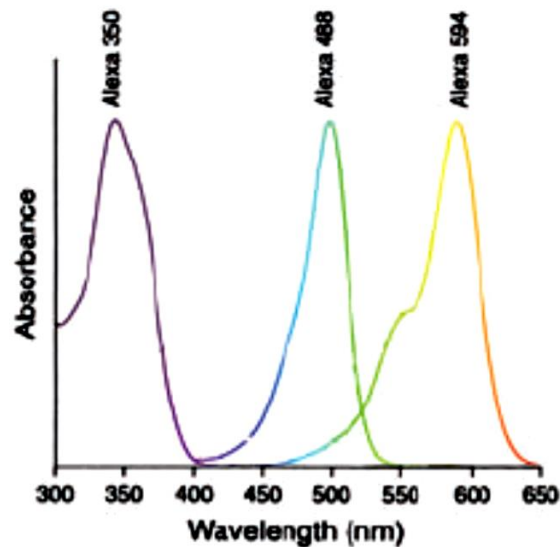
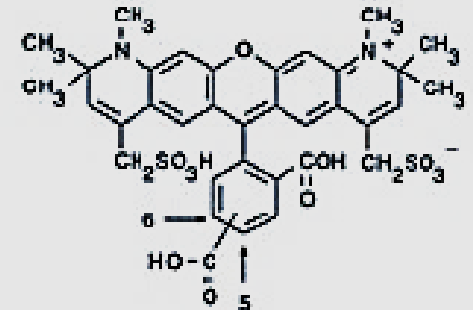
Alexa 350 (ex)
443 (em)



Alexa 488 (ex)
520 (em)

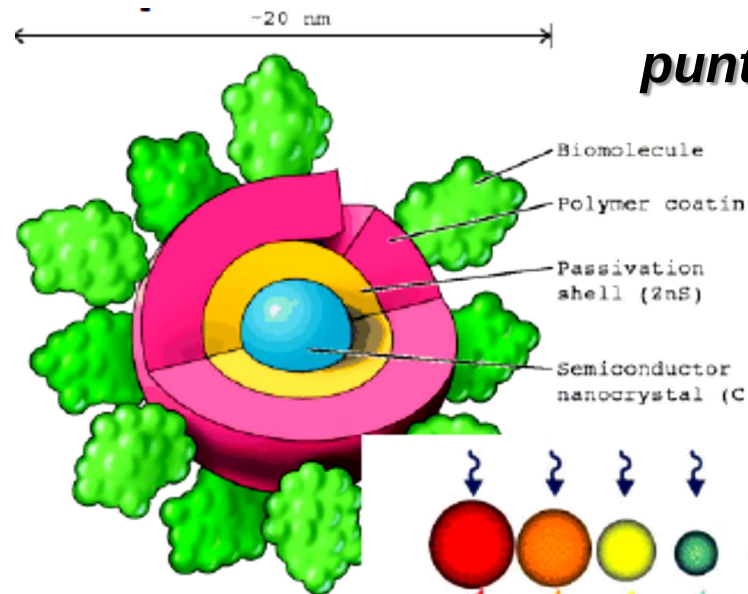


Alexa 594 (ex)
620 (em)



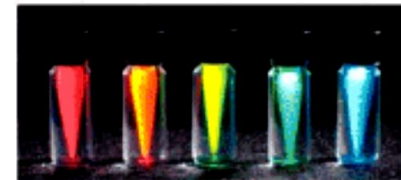
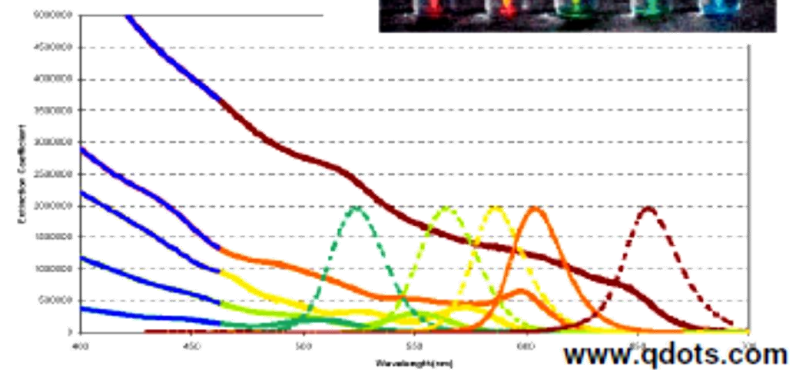
Fluorescencia & fluoróforos

puntos cuánticos



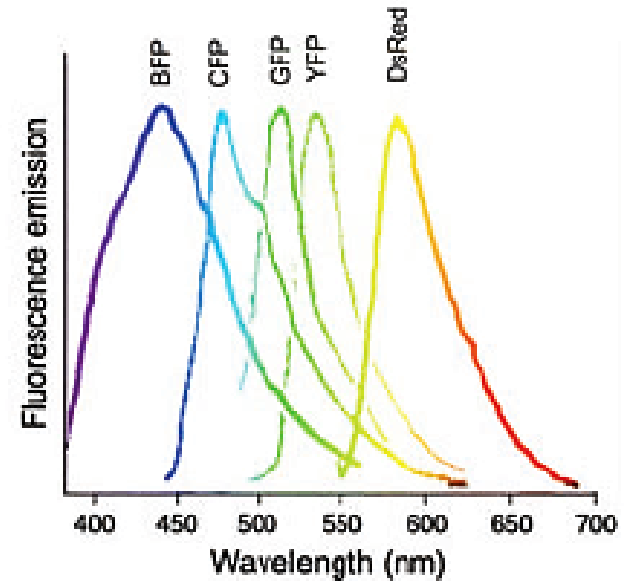
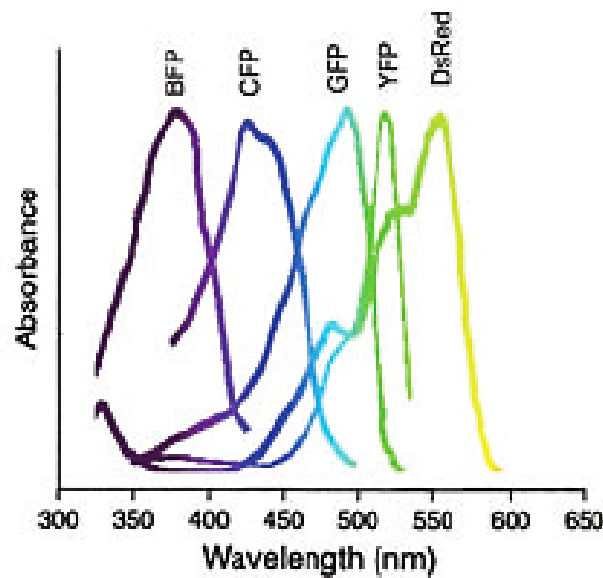
Quantum dots

Extinctie



Fluorescencia & fluoróforos

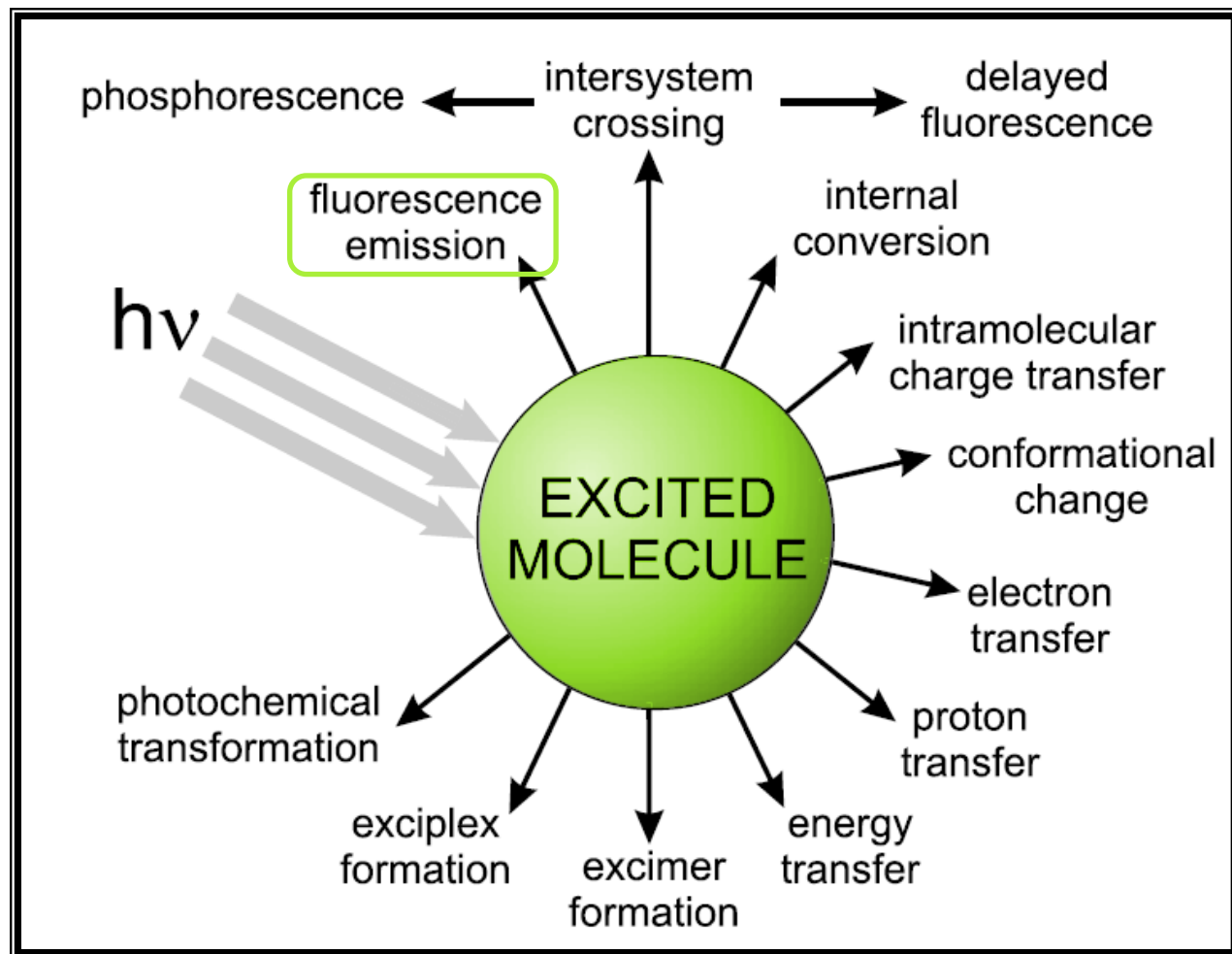
VFP : sonda codificada genéticamente



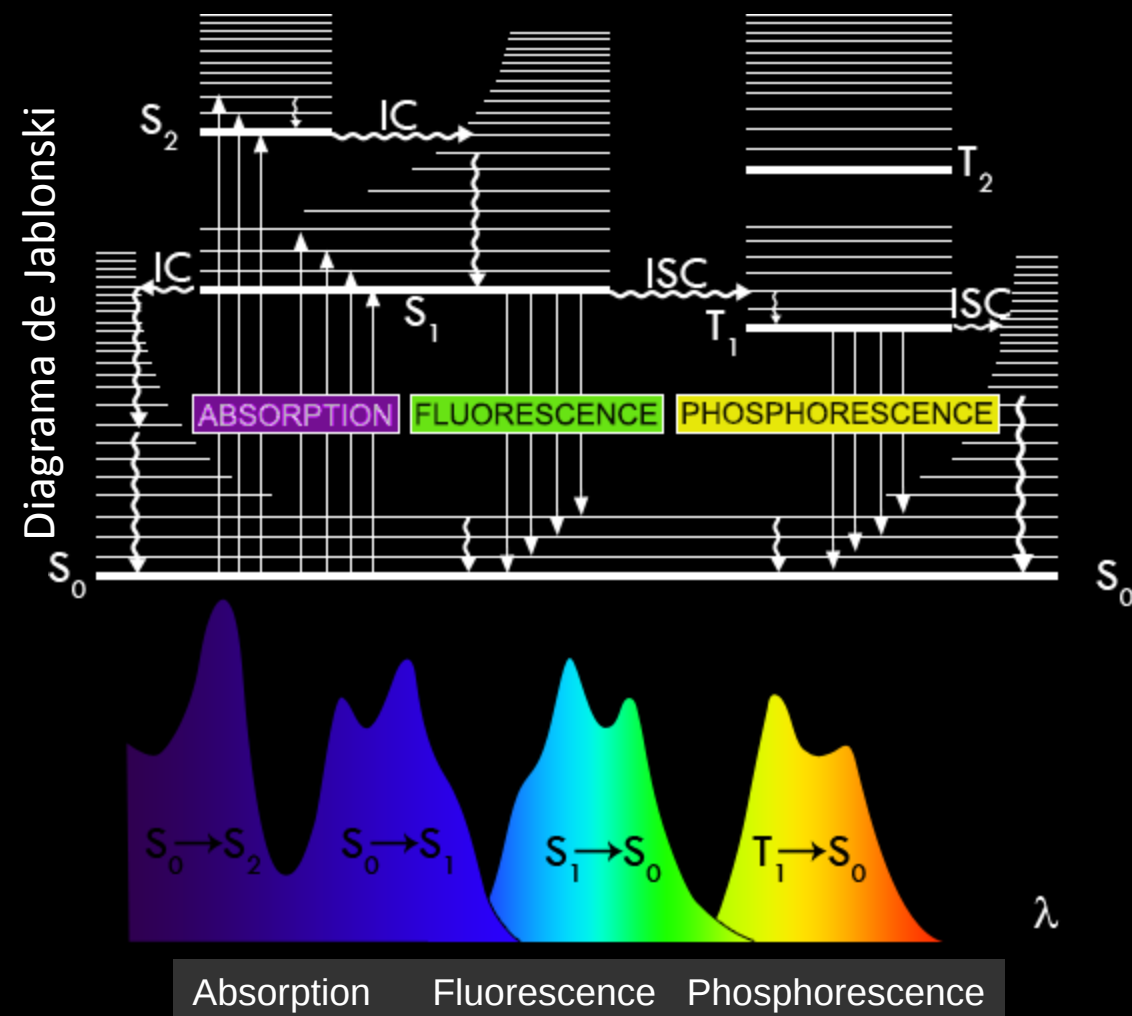
Aequorea victoria



De-excitation pathways of the excited molecule



Perrin - Jablonski Diagram



Lifetimes (seg)

Absorption	10^{-15}
Relaxation Vibrational	10^{-12} - 10^{-10}
Lifetime S_1	10^{-10} - 10^{-7}
ISC	10^{-10} - 10^{-8}
Internal Conversion	10^{-11} - 10^{-9}
Lifetime T_1	10^{-6} - 1

S número cuántico total de spin

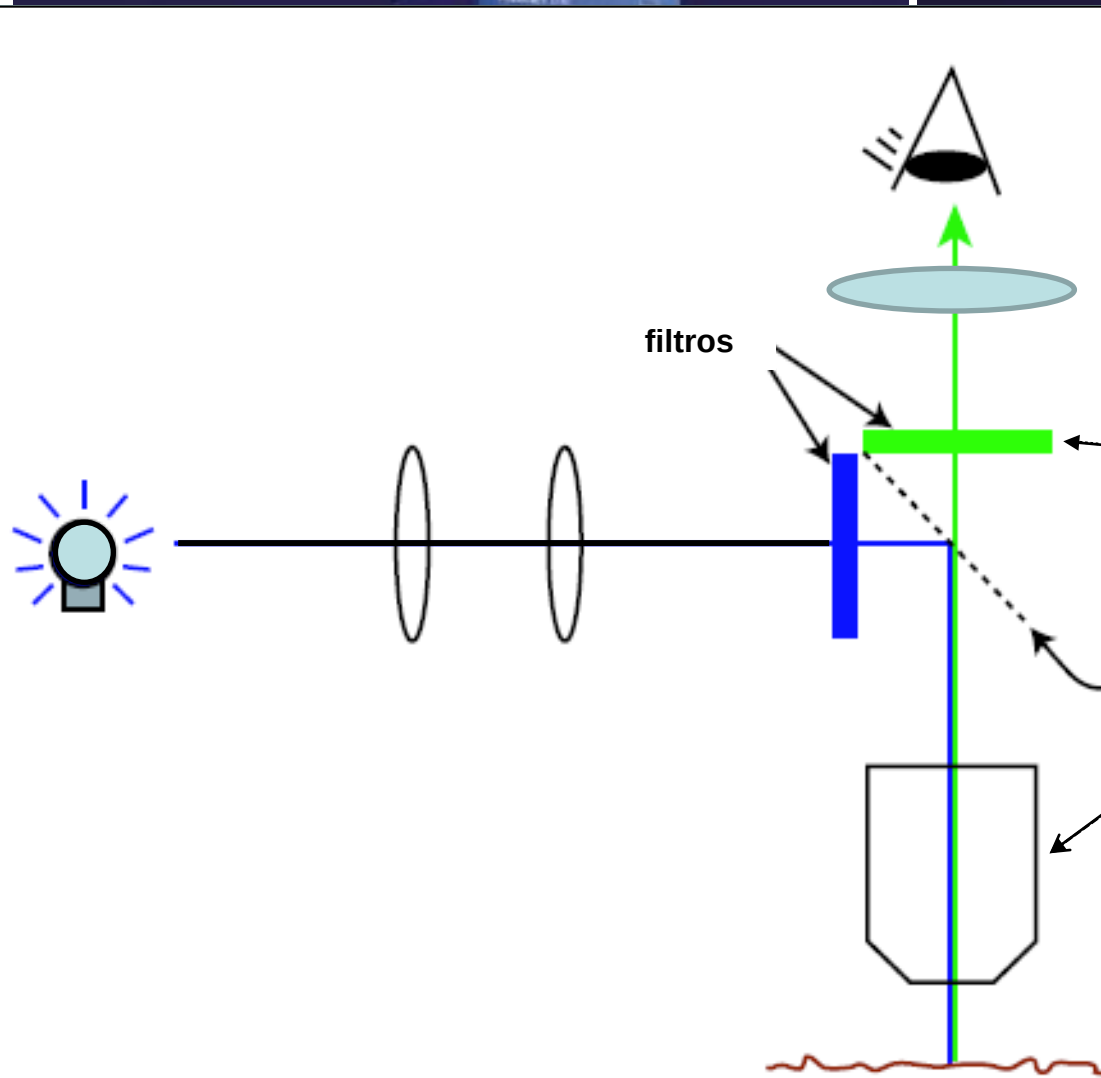
M multiplicidad

$M = (2S+1)$

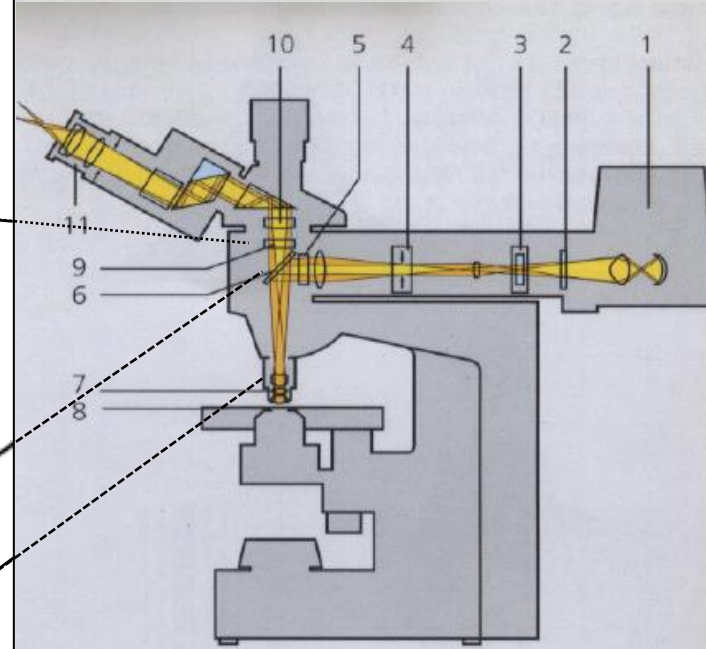
S singlete ($S=0$) $M=1$

T triplete ($S=1$) $M=3$

Microscopio de Fluorescencia



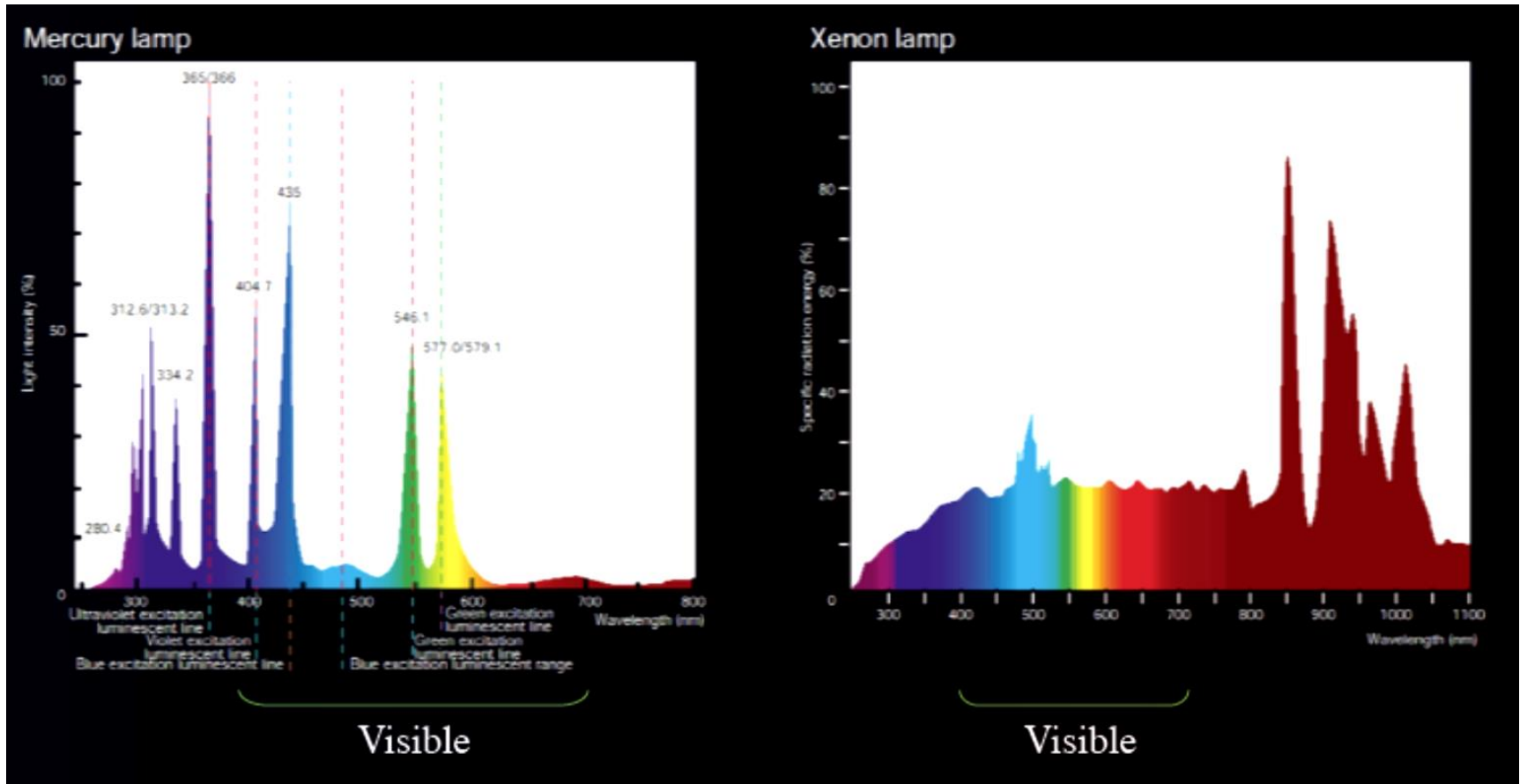
Axioskop 2 plus



Microscopio de Fluorescencia: sistema de iluminación

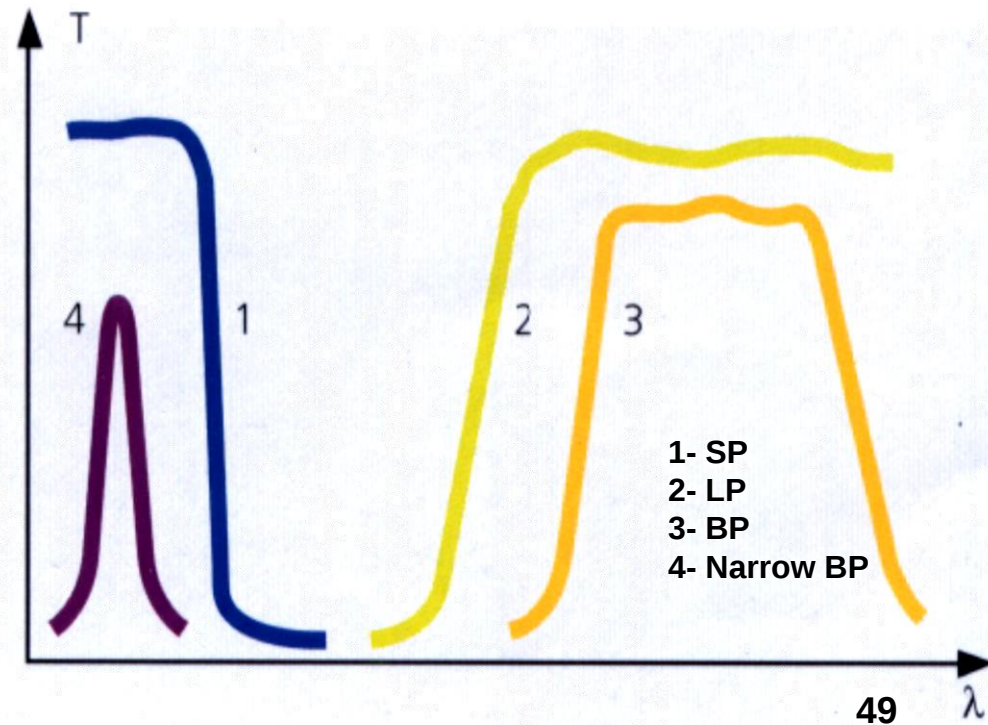
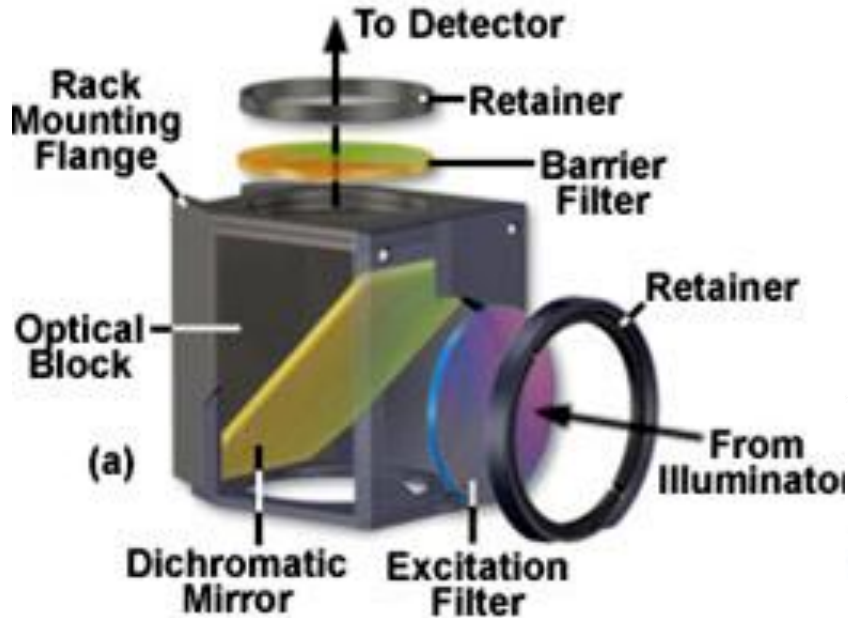
MERCURY LAMP 100 W

XENON LAMP 300 o de 150 W

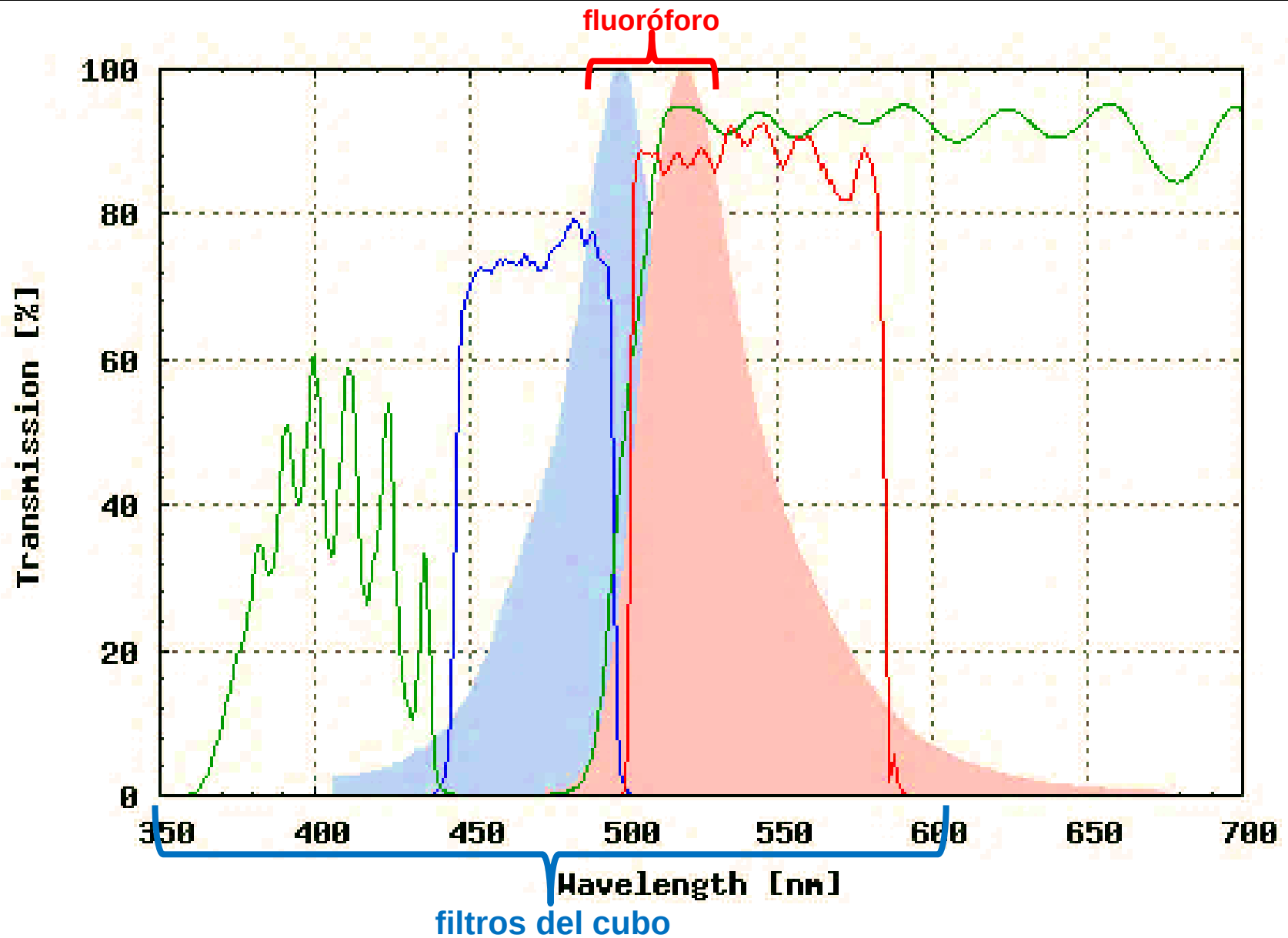


Microscopio de Fluorescencia: filtros

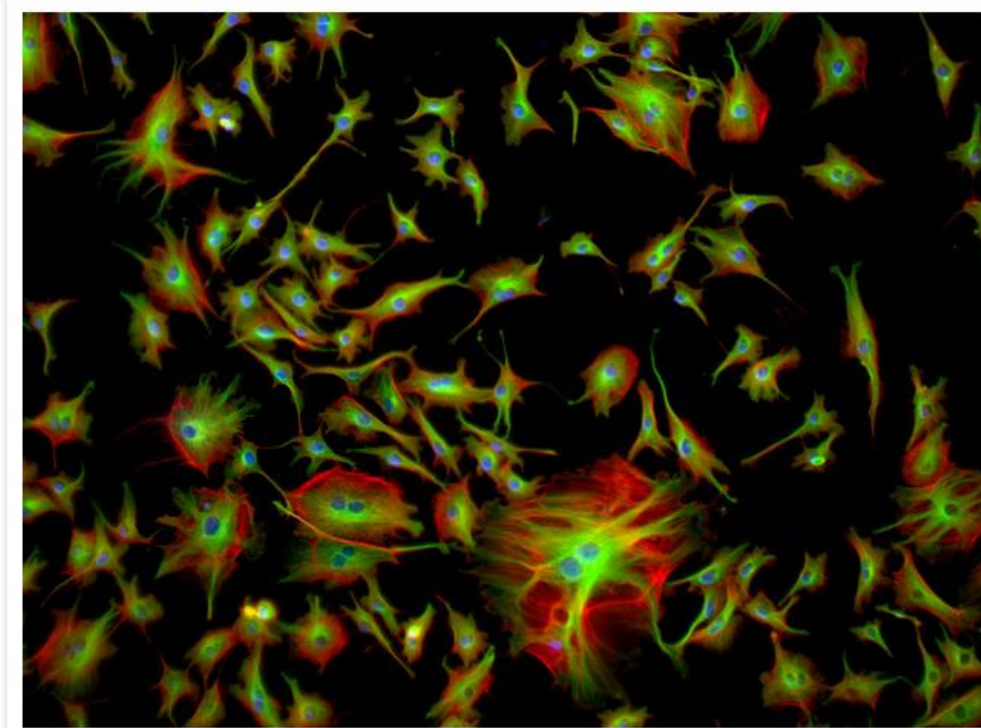
Filtros



Microscopio de Fluorescencia: filtros- fluoróforos

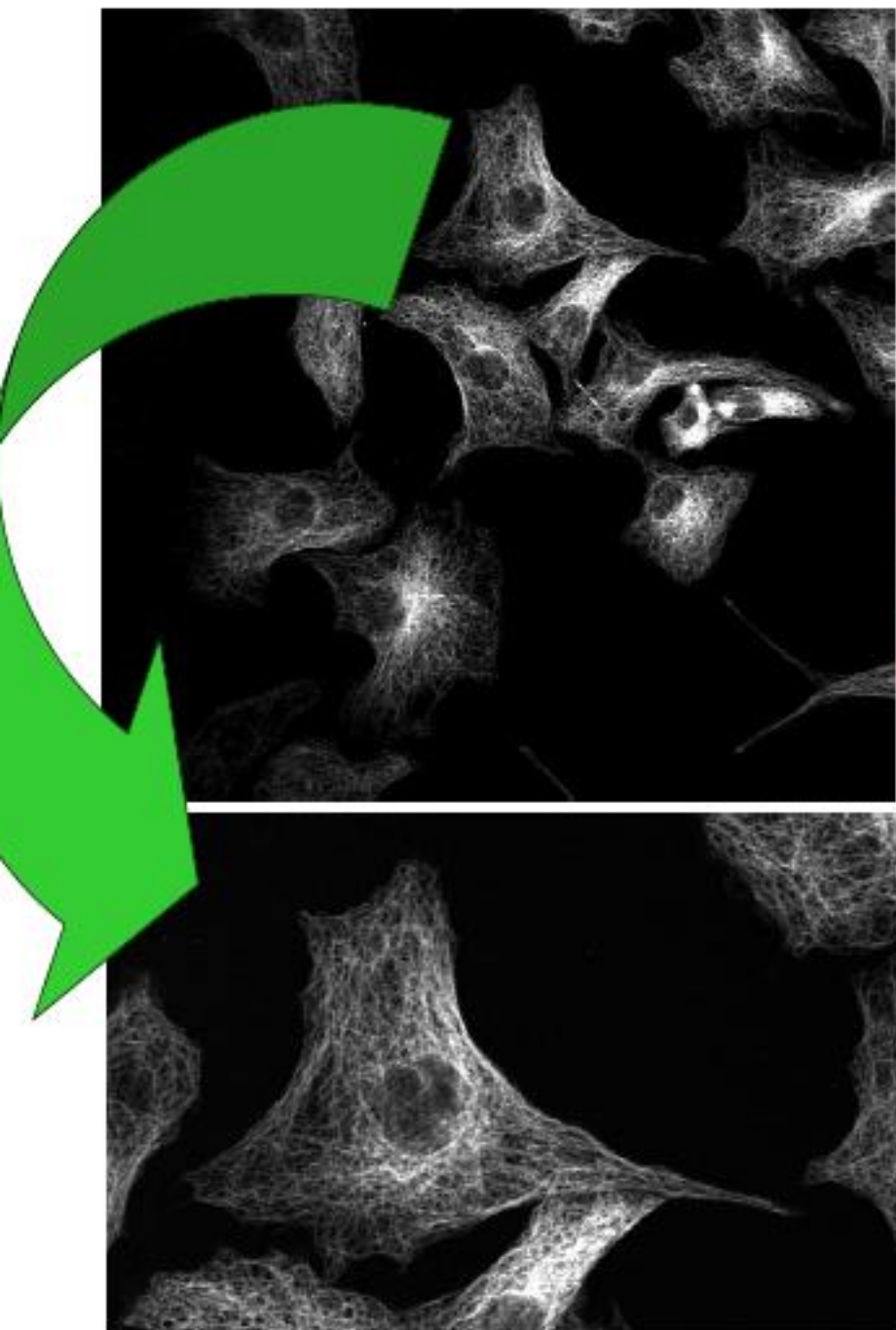


TRABAJO PRÁCTICO: bovine pulmonary artery endothelial cell

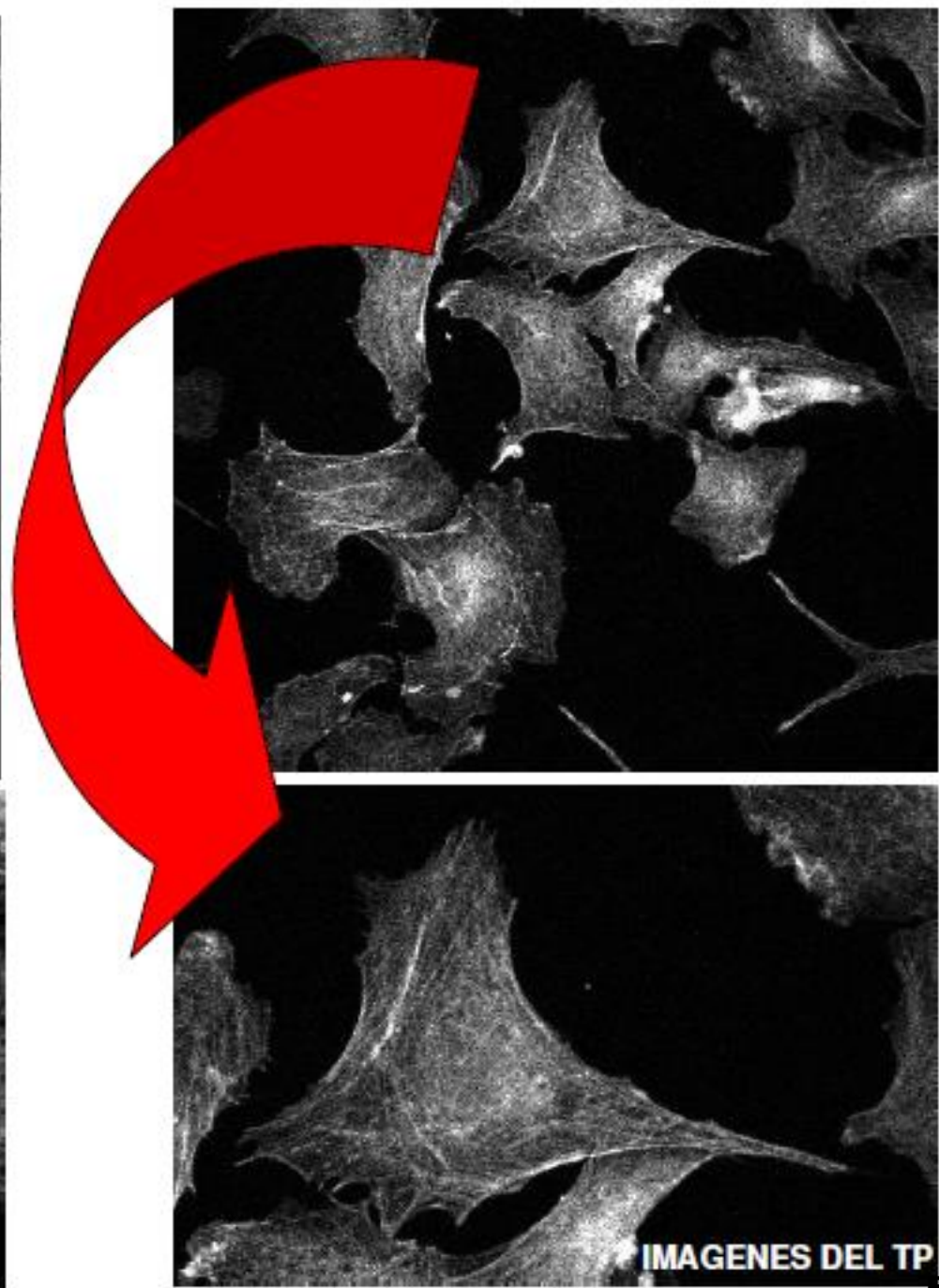


Multicolor cytoskeletal staining of a bovine pulmonary artery endothelial cell. **Actin filaments** were detected using Texas Red®-X phalloidin. Tubulin was labeled with a primary antibody directed against **α -tubulin** and visualized using green-fluorescent BODIPY® FL goat anti-mouse IgG. **Nuclei** were counterstained with blue-fluorescent DAPI.

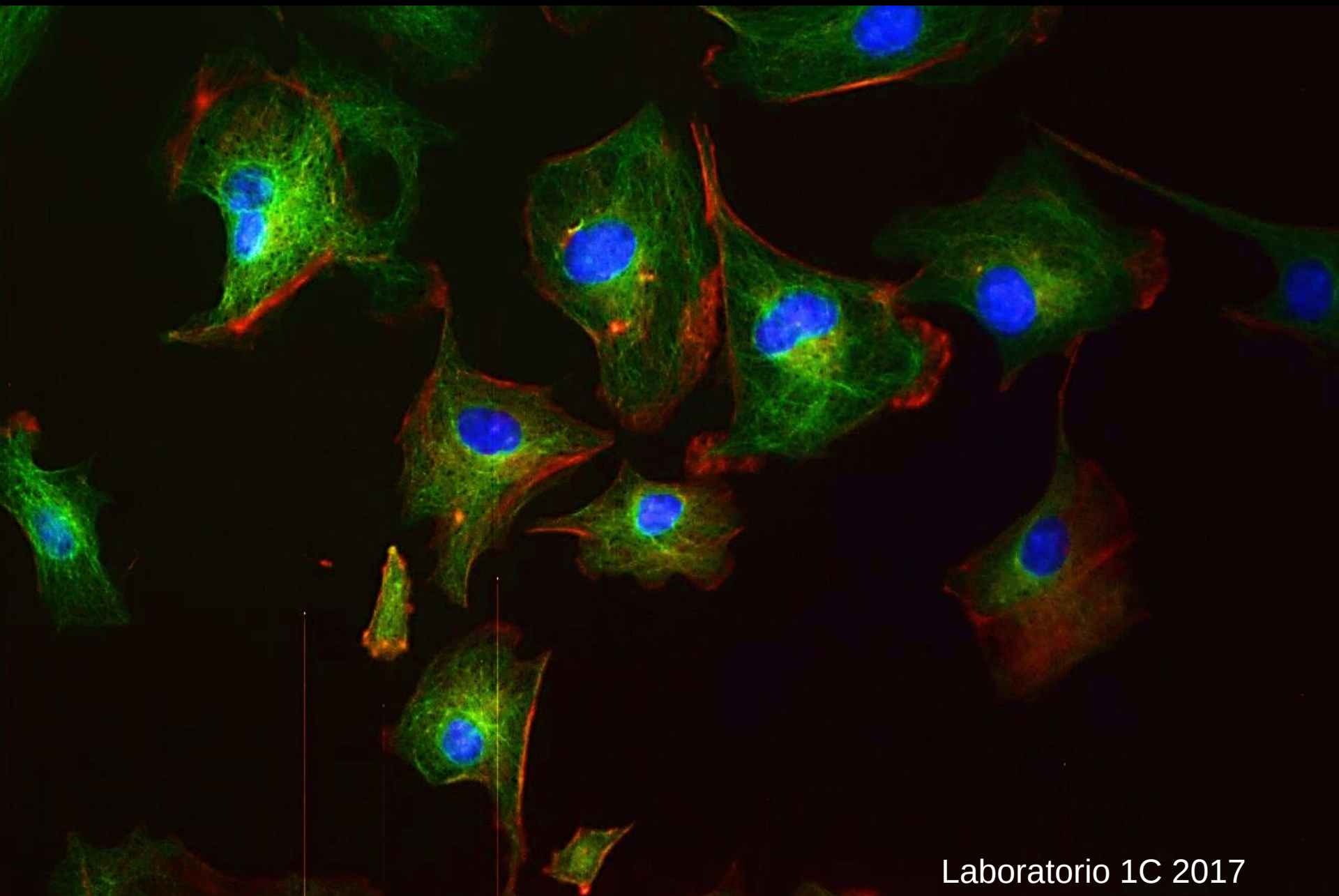
α -tubulina-BODIPY-FLUORESCEINA



actina-TEXAS-RED



IMAGENES DEL TP

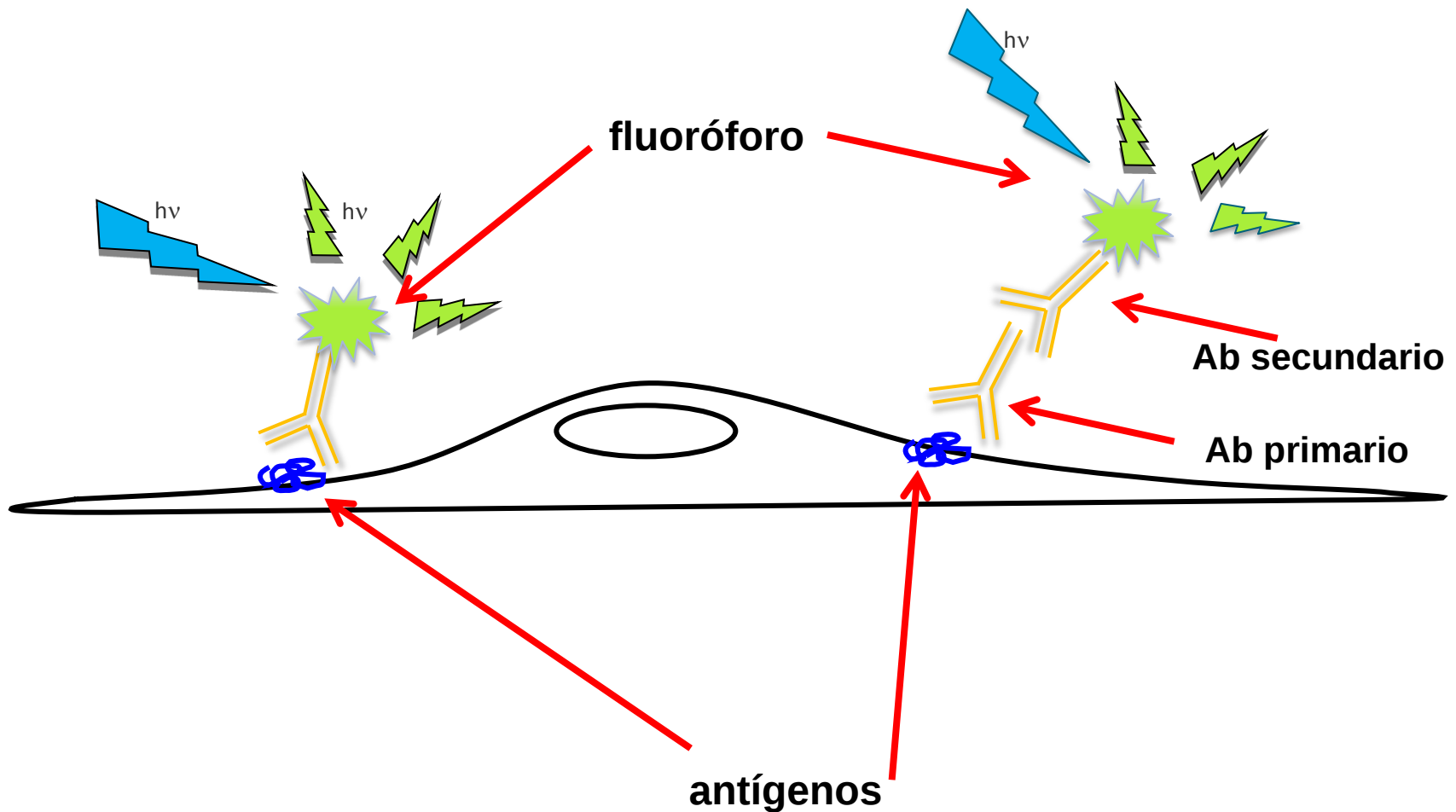


¿Cómo marcamos estructuras en la célula?

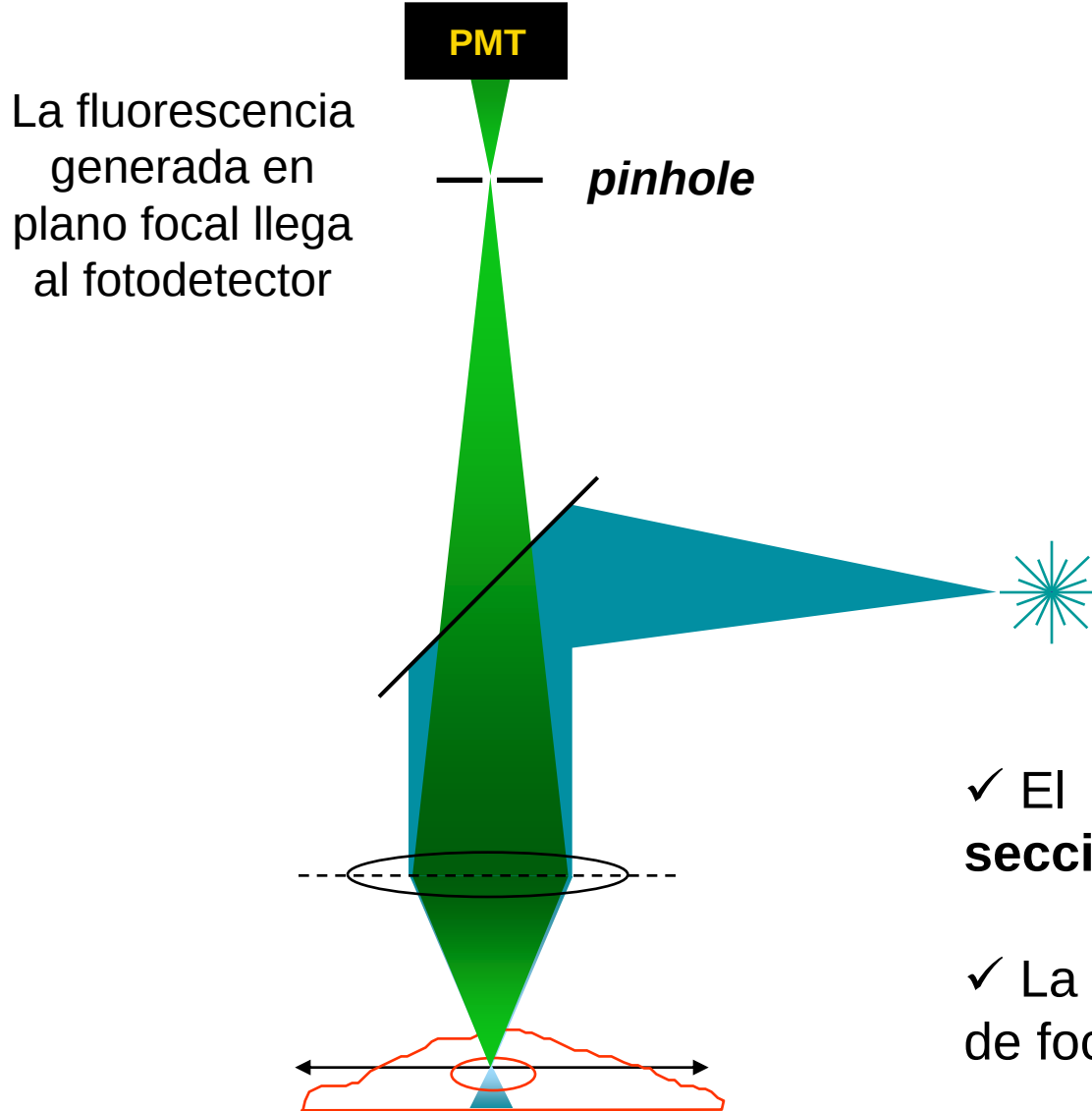
Protocolo de inmunquímica

Directo

Indirecto



Microscopía confocal de fluorescencia

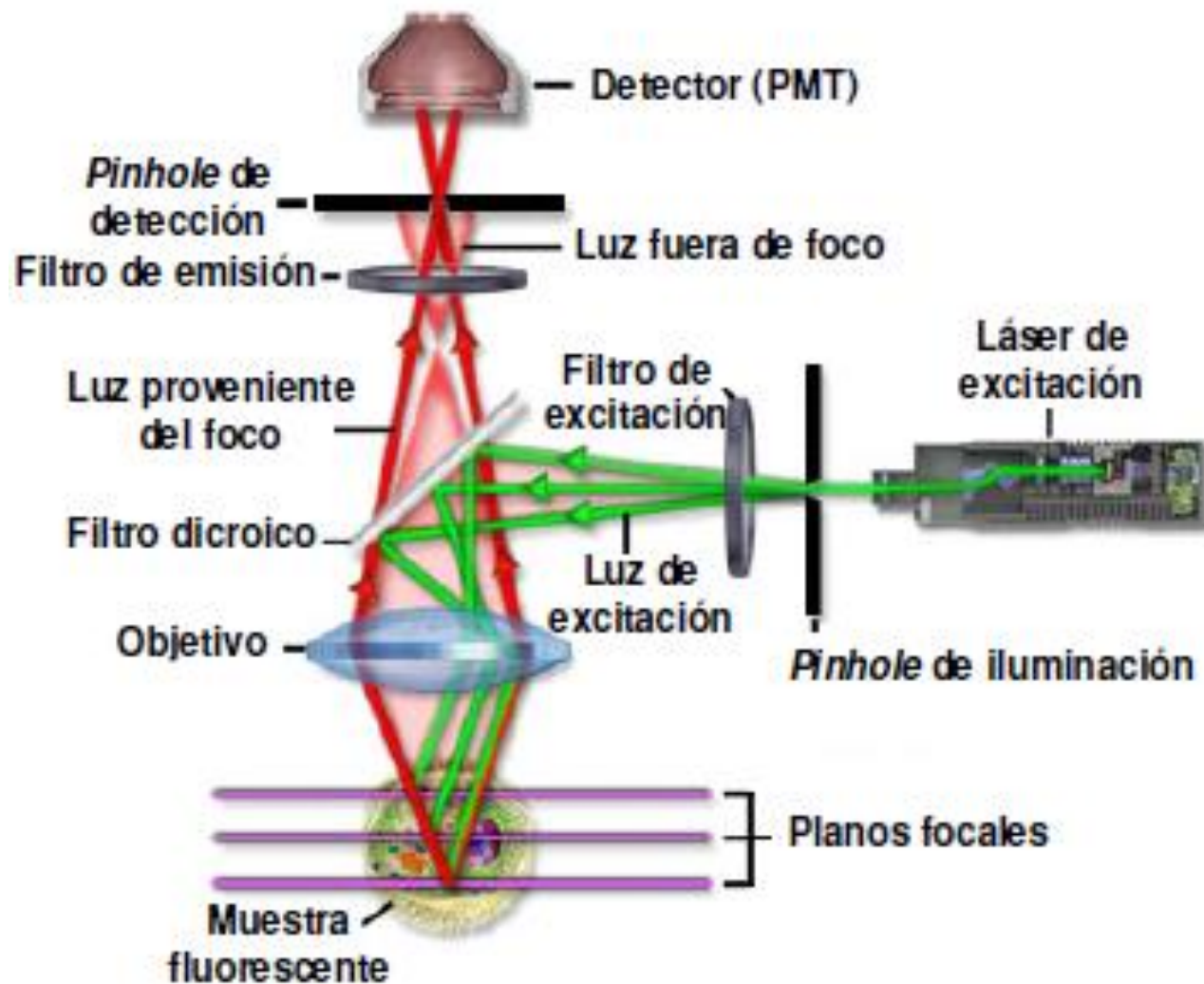


✓ El **pinhole** proporciona el **seccionamiento óptico**

✓ La fluorescencia emitida fuera de foco no llega al PMT

El láser es reflejado en un espejo
dicroico y se enfoca en la muestra

Microscopía confocal de fluorescencia



¿Cuándo vale la pena trabajar en confocal?

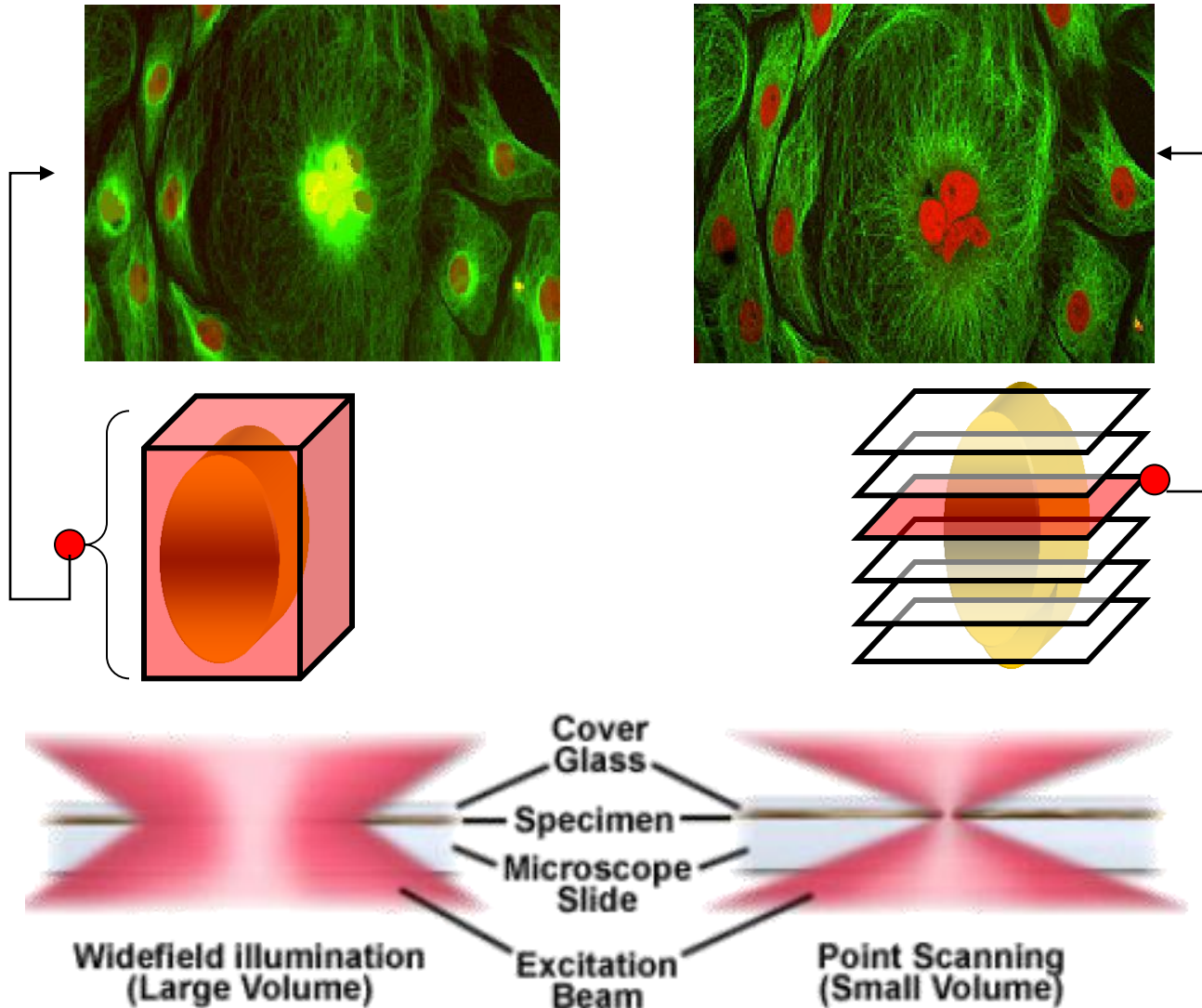
Cuando

- ✓ la muestra es gruesa
- ✓ la señal del fluoróforo es alta
- ✓ el fluoróforo tiene un buen ciclo de servicio
- ✓ se quiere colocalizar en el eje óptico (z)
- ✓ uno tiene MUY buenas lentes objetivo
- ✓ la escala temporal es apropiada

Microscopía confocal de fluorescencia: multidimensional

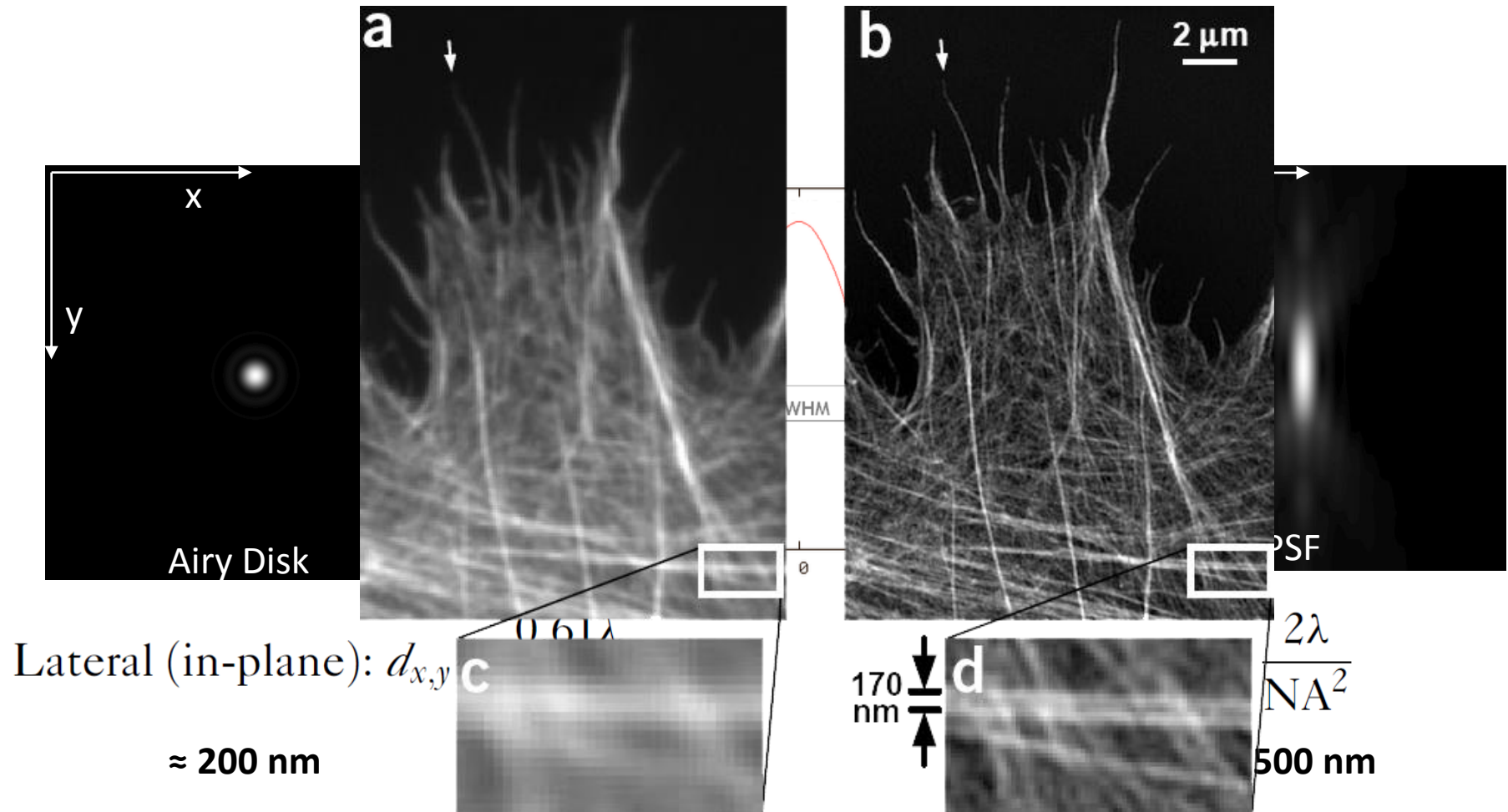
WIDEFIELD MICROSCOPE

CONFOCAL MICROSCOPE

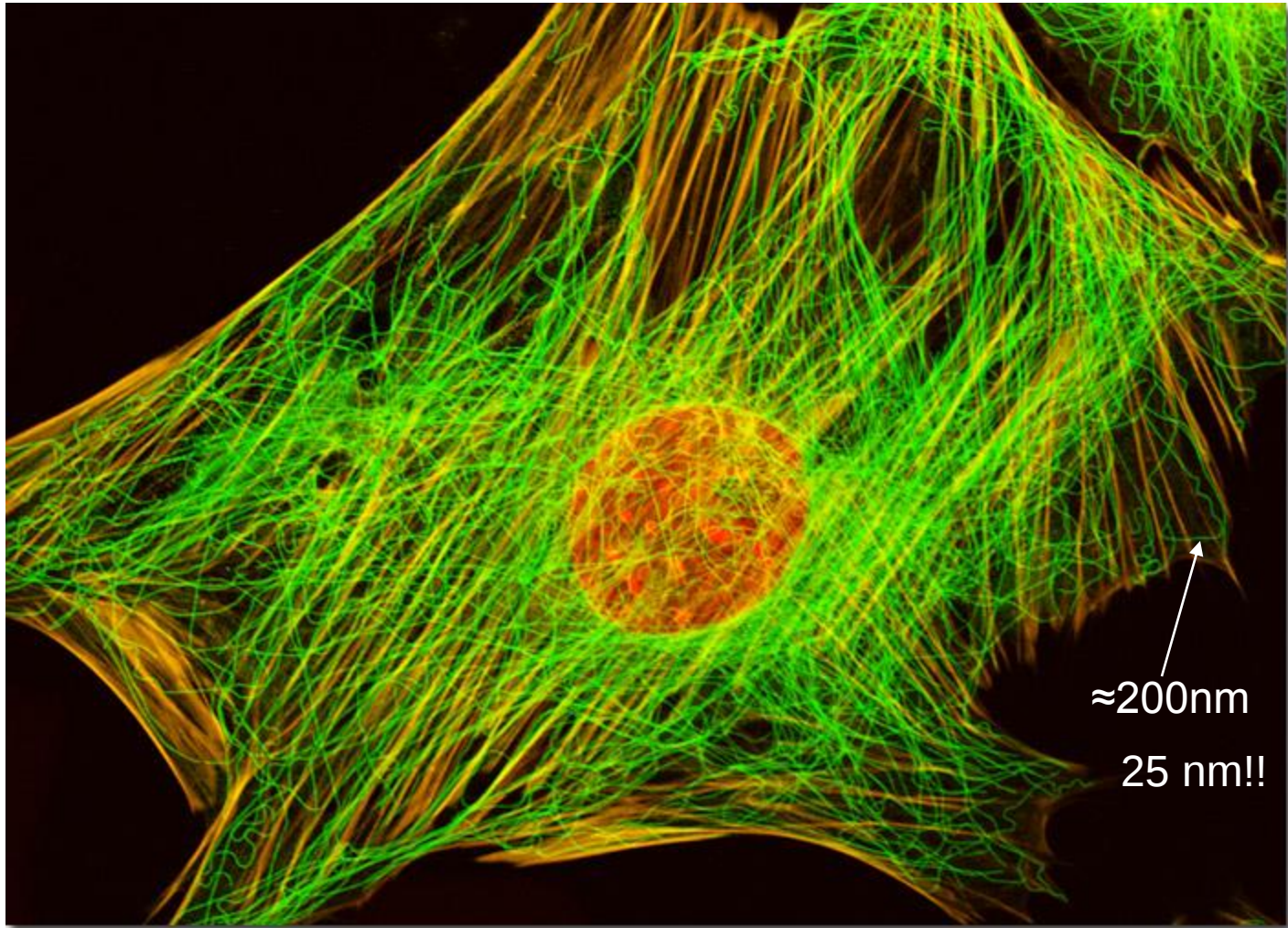


Microscopía confocal de fluorescencia: resolución

La resolución está **limitada** por la difracción.



Límite de Resolución Óptica



Microscopía confocal de fluorescencia: resolución

La resolución final y el contraste en las imágenes tomadas con el microscopio, estará determinada por

- la PSF,
- el número de fotones colectados,
- el rango dinámico de la señal,
- las aberraciones ópticas del sistema,
- el número de píxeles por unidad de área con los que se tome la imagen.

PSF, *Point Spread Function*

La **PSF** es la función que define la forma que toma una fuente puntual (es decir, un objeto idealmente adimensional) de luz al pasar a través de un sistema óptico de características particulares al formar una imagen.

$$\text{Imagen} = \text{Objeto} \otimes \text{PSF}$$

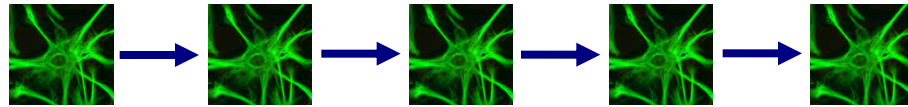
$$\text{PSF total (confocal)} = \text{PSF excitación} * \text{PSF detección}$$

producido por el campo del haz enfocado

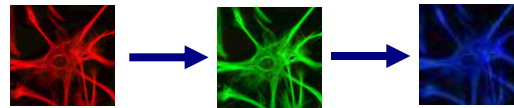
producido por el pinhole

Microscopía confocal de fluorescencia: multidimensional

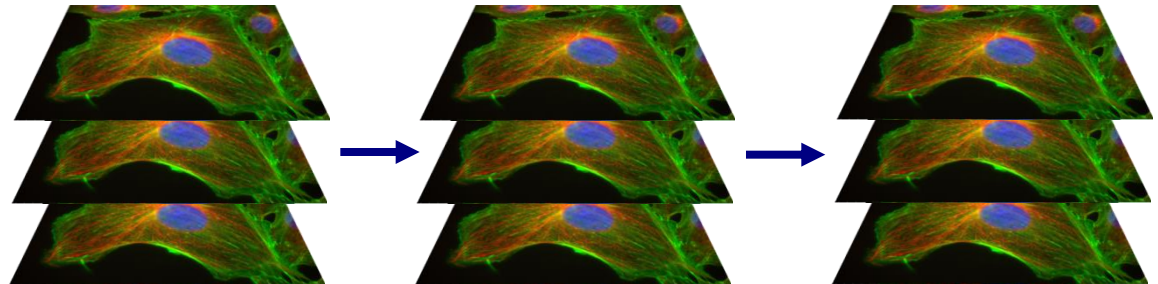
✓ Time-lapse



✓ detección múltiple

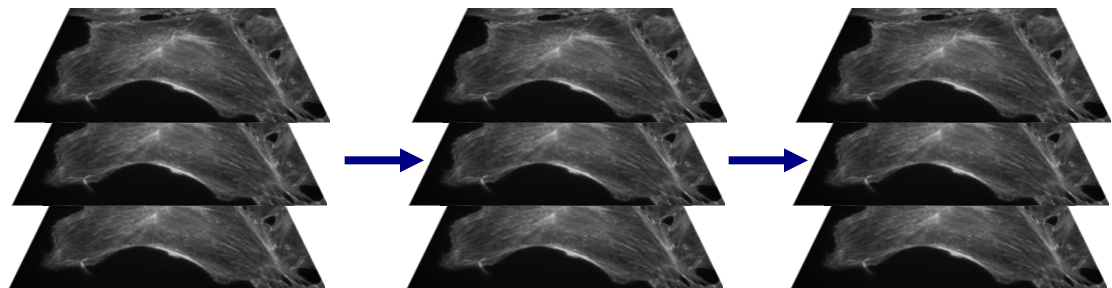


✓ 3-D Time-lapse



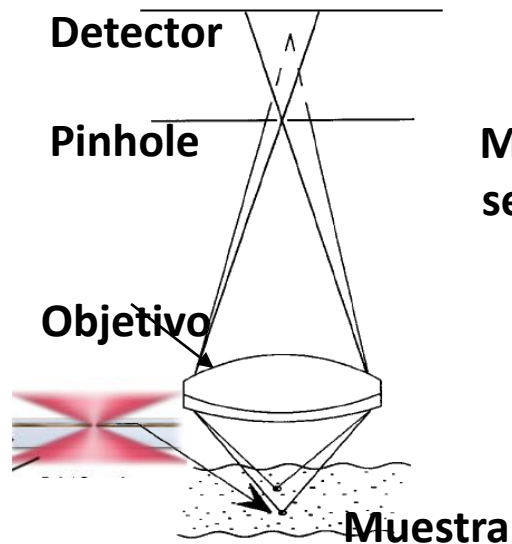
✓ Barrido en

λ



Multidimensión

Microscopía confocal de fluorescencia: multidimensional



**Eliminación
Mecánica de la
señal fuera del
plano focal.**

**Scanner
(AOTF)**

- ✱ Mejora en la resolución axial
 - ✱ Localización Subcelular
 - ✱ Observación de tejidos de espesor hasta 200 μm
 - ✱ Co-localización, FRET
 - ✱ Seccionamiento axial
 - ✱ Barrido xz, yz
- ✱ Reconstrucción 3D
 - ✱ Proyección axial

- ✱ Regiones de interés (ROI)
- ✱ Zoom

✱ FRAP

✱ FLIP

✱ FCS

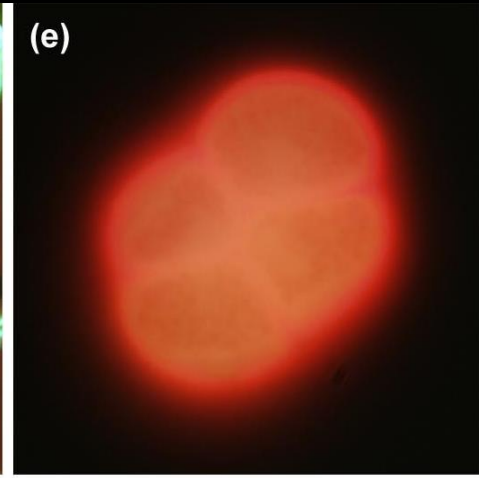
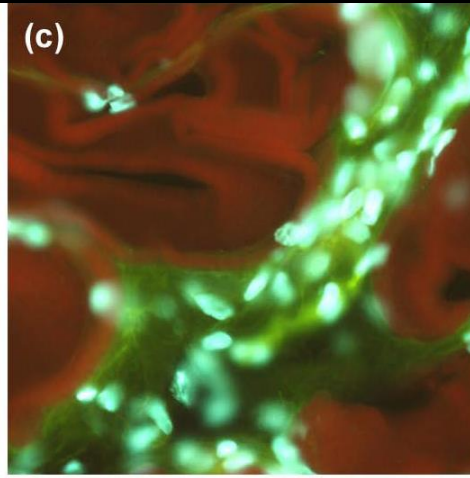
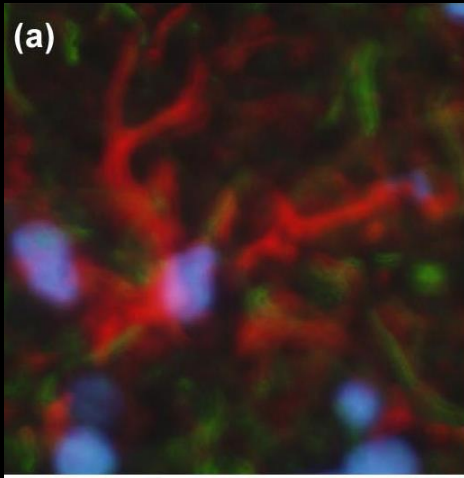
✱ Fotoconversión

Procesos celulares dinámicos

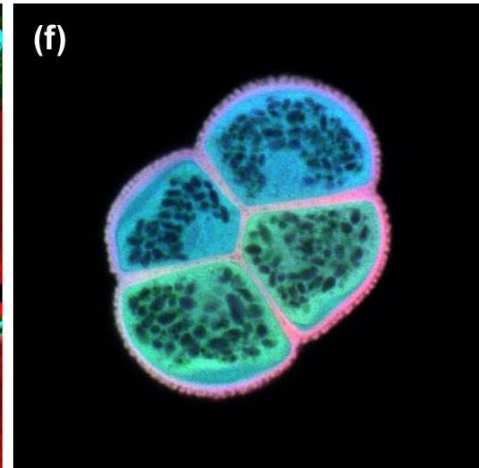
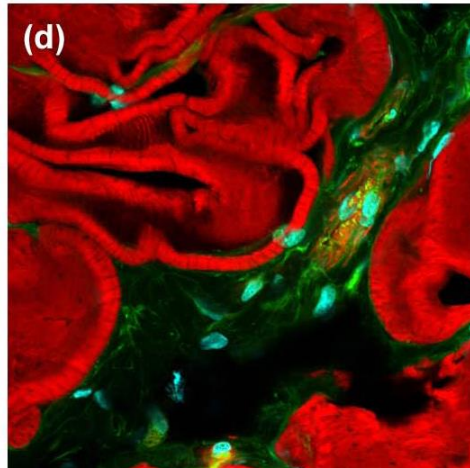
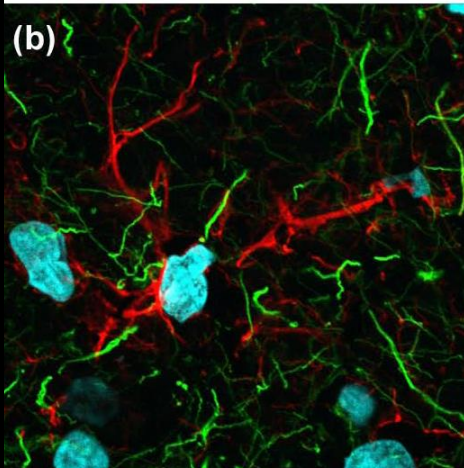
Eliminación mecánica de la señal de fluorescencia por encima y debajo del plano focal

Mejora en el contraste de la señal de fluorescencia

Convencional

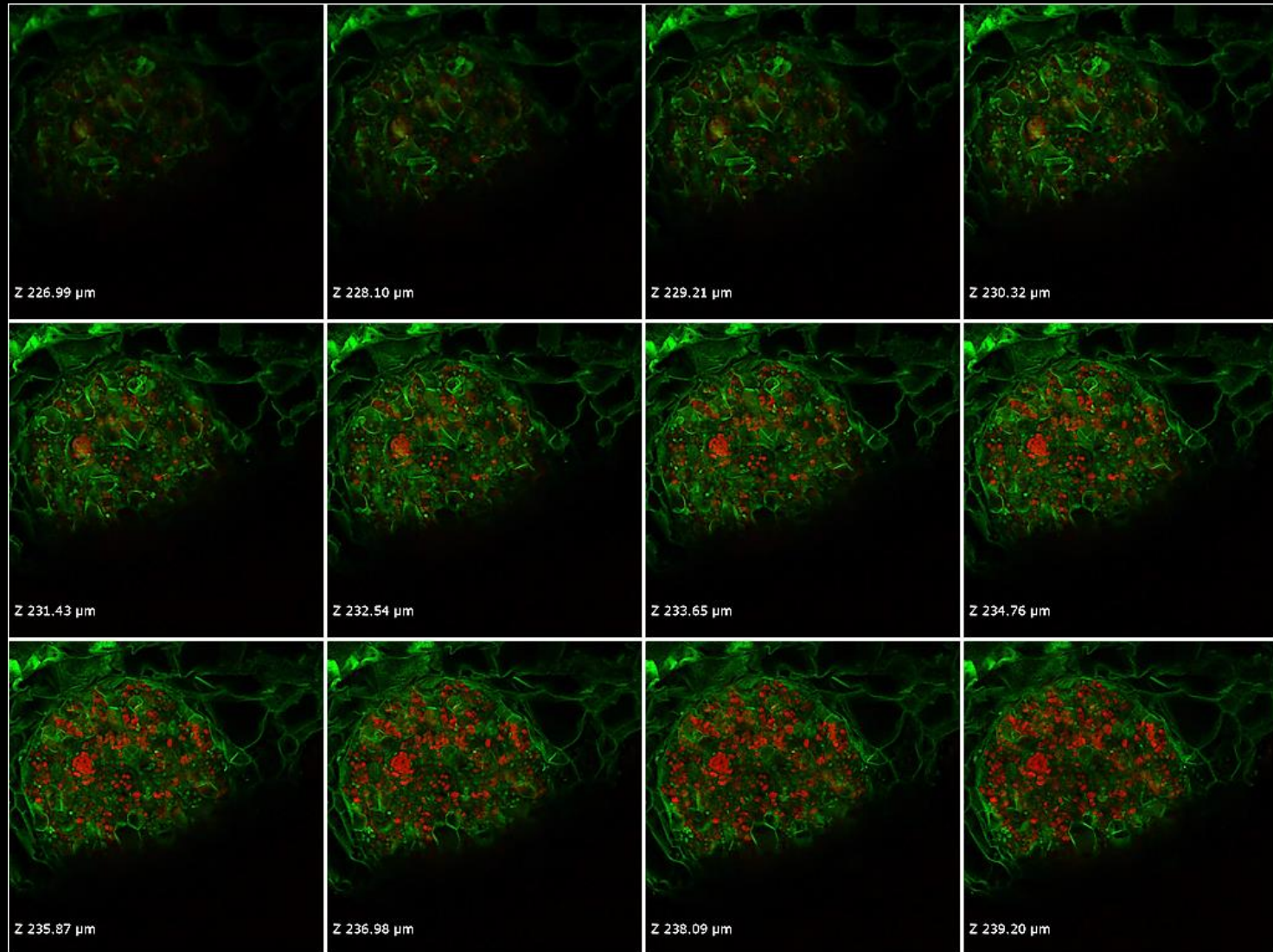


Confocal



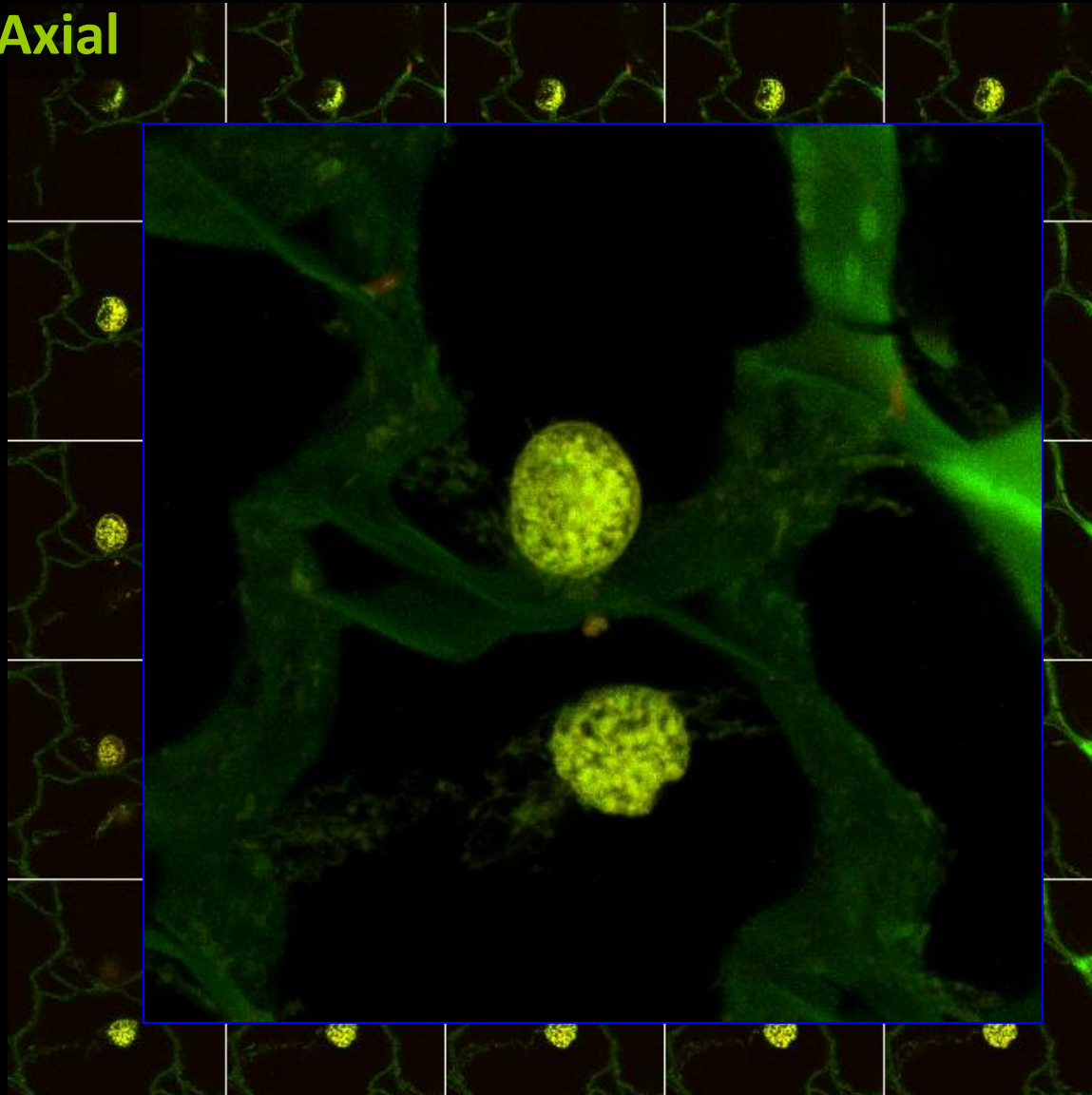
Eliminación mecánica de la señal de fluorescencia por encima y debajo del plano focal

Seccionamiento Axial



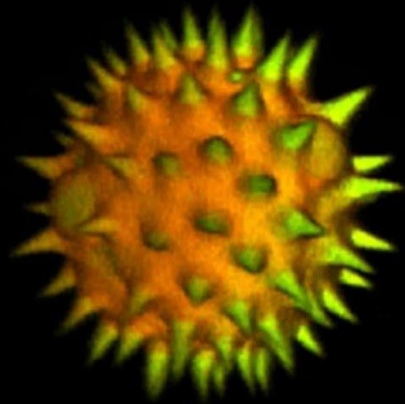
Eliminación mecánica de la señal de fluorescencia por encima y debajo del plano focal

Proyección Axial

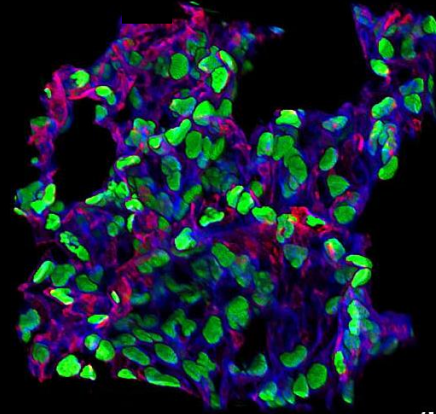


Eliminación mecánica de la señal de fluorescencia por encima y debajo del plano focal

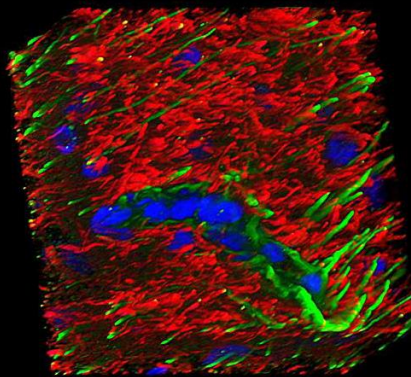
Renderización - Reconstrucción 3D



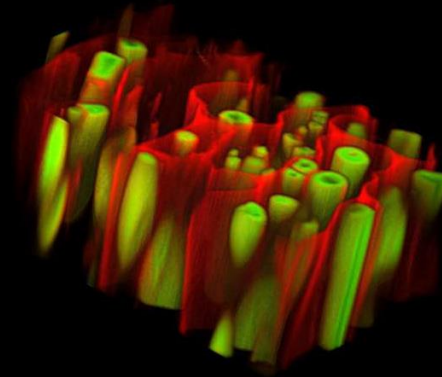
(a)



(b)



(c)



(d)

Tutorials

<http://www.olympusmicro.com/primer/java/index.html>

<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/support/Tutorials.html>

<http://www.zeiss.com>, is a Fluorescence Dye and Filter Database

<http://www.leica-microsystems.com/products/light-microscopes/accessories>

Köhler Illumination

<http://www.olympusmicro.com/primer/anatomy/kohler.html>

Fluorescence Microscopy

<http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/fluorescence/fluorhome.html>