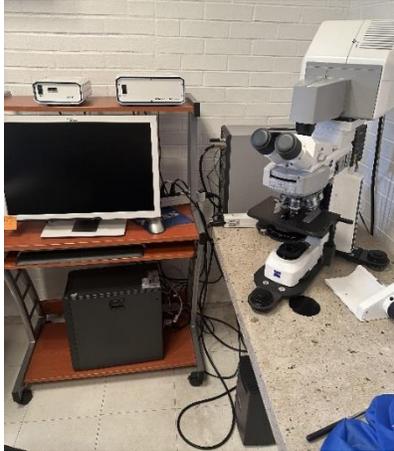


Microscopio confocal Zeiss 700



Contenido

Introducción	1
Encendido del Microscopio confocal	3
Observación a ojo.....	6
Componentes que pueden modificarse para obtener imágenes óptimas.....	9
Apertura del pinhole.	9
Áreas de barrido: la relación entre píxeles y resolución	10
Apagado del microscopio confocal.....	11

Introducción

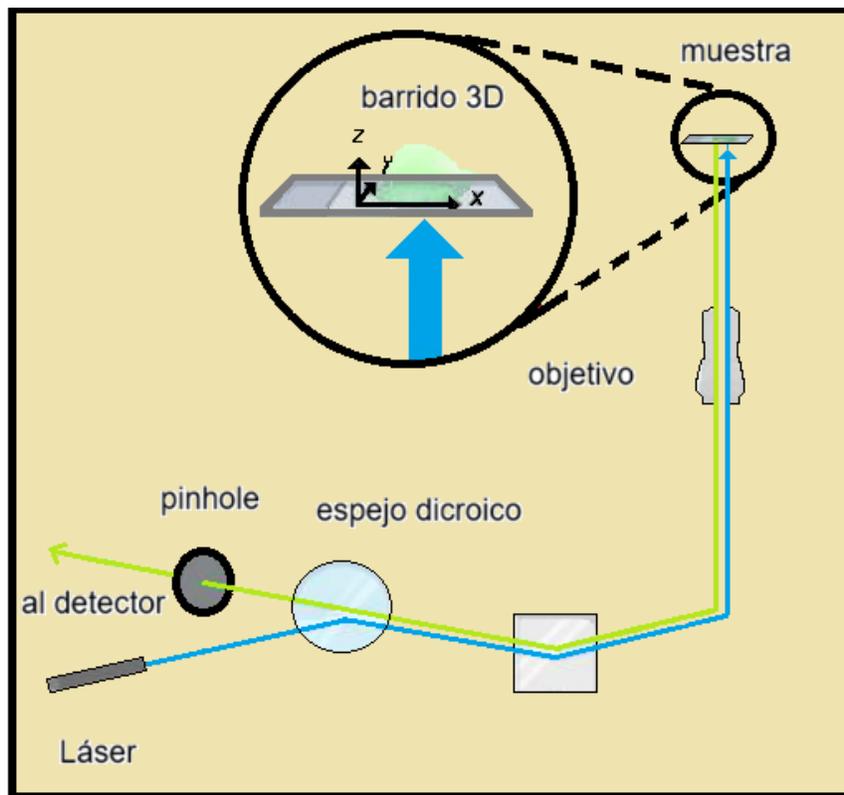
El microscopio confocal es una herramienta de alta tecnología que se utiliza en diversos campos como la biología, la medicina, la física y la química, para estudiar y analizar estructuras y procesos a nivel microscópico. Este tipo de microscopio utiliza un haz de luz láser coherente para iluminar la muestra y un sistema de detección sensible para recopilar información detallada en tres dimensiones.

El principio de funcionamiento del microscopio confocal se basa en la eliminación de la luz dispersa que se produce al iluminar una muestra con un haz de luz convencional. Para ello se utiliza un pequeño agujero llamado “pinhole” o (colimador de orificio delimitante) que permite el paso de la luz reflejada o emitida solo desde el punto de enfoque obteniéndose una imagen más nítida.

La microscopía confocal es una forma de microscopía óptica donde la luz de iluminación y la luz colectada se enfocan en el mismo punto limitado por la difracción en la muestra. El microscopio confocal ilumina solo un punto de la muestra, en lugar de todo el campo de visión de la lente del objetivo, en el detector. Para generar una imagen completa, la muestra es iluminada punto por punto, de manera que las secciones de la muestra que

no están en el punto focal contribuyen muy poco a la imagen enfocada, lo que elimina de manera efectiva el problema de la luz desenfocada.

La iluminación de una fuente de luz coherente (láser) es reflejada por un espejo dicroico (es aquel que puede reflejar la luz selectivamente en función de una determinada longitud de onda) y conducida a diferentes planos mediante los espejos de barrido a la abertura posterior del objetivo (trayectoria de la línea azul), hasta iluminar a la muestra. La lente del objetivo enfoca la luz en un punto de difracción limitada (un disco de Airy) dentro de la muestra. La fluorescencia (o reflexión) en el punto focal y dentro de los conos de iluminación por encima y por debajo del punto enfocado, se excitan y emiten fluorescencia en todas las direcciones (observe el círculo de aumento del espécimen). La fluorescencia capturada por el objetivo (trayectoria de la línea verde) pasa a través del espejo dicroico porque la fluorescencia tiene una longitud de onda más larga que la excitación. El orificio confocal "pinhole" permite que la fluorescencia del punto focal llegue al fotodetector y bloquea la fluorescencia de las áreas desenfocadas.



Microscopio confocal de barrido láser. La iluminación de una fuente de luz coherente (láser) es reflejada por un espejo dicroico y conducida a diferentes planos mediante los espejos de barrido a la abertura posterior del objetivo (trayectoria de la línea azul), hasta iluminar al espécimen. La lente del objetivo enfoca la luz en un punto de difracción limitada (un disco de Airy) dentro de la muestra. La fluorescencia (o reflexión) en el punto focal y dentro de los conos de iluminación por encima y por debajo del punto enfocado, se excitan y emiten fluorescencia en todas las direcciones (observe el círculo de aumento del espécimen). La fluorescencia capturada por el objetivo (trayectoria de la línea verde) pasa a través del espejo dicroico porque la fluorescencia tiene una longitud de onda más larga

que la excitación. El orificio confocal “pinhole” permite que la fluorescencia del punto focal llegue al fotodetector y bloquea la fluorescencia de las áreas desenfocadas.

En el laboratorio de Fluidos complejos (laboratorio 44. Edificio principal) del grupo de fluidos complejos y superficies tenemos un microscopio confocal marca Zeiss 700.

Encendido del Microscopio confocal



Imagen 1

- 1) Como se observa en la imagen 1, el equipo del Microscopio confocal tiene dos computadoras marcadas con flechas: la computadora indicada de color azul es donde se encuentra el módulo de los láseres y la de color verde es la computadora de control del microscopio.



Imagen 2

- 2) El equipo cuenta con dos multicontactos numerados: el número 1 es para el sistema LSM700 (multicontacto 1) y el número 2 es en donde se encuentran conectadas las clavijas de la computadora de control (multicontacto 2). Encender primero el sistema LSM 700 (multicontacto 1) y después el multicontacto 2. (Imagen 2)

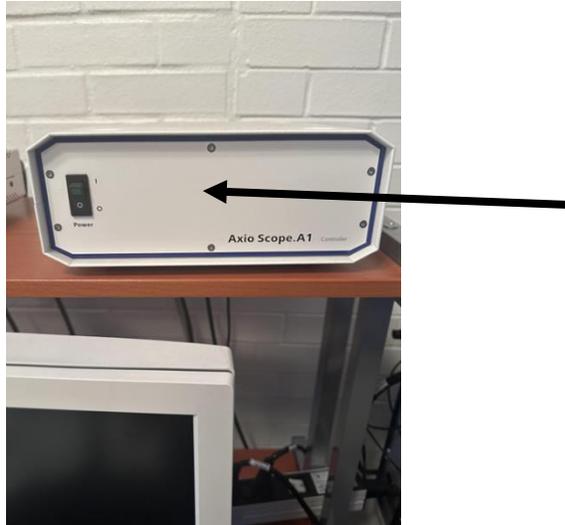


Imagen 3

3) Encender el módulo *axiovert*, (*Axio Scope. A1*). Imagen 3.

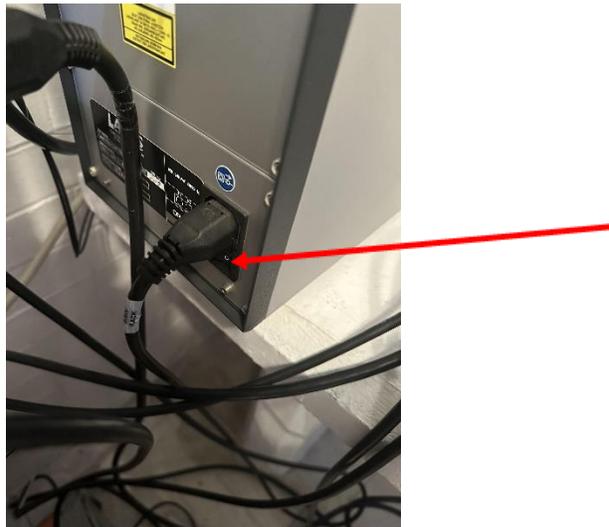


Imagen 4

4) Encender la computadora que tiene el módulo de los láseres. El switch de encendido se encuentra en la parte de atrás de la computadora, exactamente abajo del enchufe, como se indica por la flecha roja. Por organización de los cables este switch da al frente del equipo. (Imagen 4).



Imagen 5

- 5) Mover hacia la derecha la llave del módulo de los láseres que se encuentra en la parte del frente de la computadora de los láseres (flecha negra), pero debido a las necesidades de organización de los cables, el frente de la computadora ve a la pared de la parte de atrás. (imagen 5).
- 6) Verificar el foco de encendido de la computadora de los láseres con un espejo extensor que se encuentra junto a la llave del módulo de los láseres. (imagen 5)
- 7) Encender la computadora de control.
- 8) En la computadora de control, acceder el programa **Zen**, dando doble click en el icono **ZEN**.
- 9) En la primera pantalla, escoger cualquiera de las opciones que aparecen: *start system*, si se van a adquirir imágenes de una muestra, o *Image processing* para editar imágenes ya existentes.
- 10) En el momento en que se da la vuelta a la llave del módulo de los láseres y de encender la computadora de control también se enciende un pequeño foco que indica el encendido del microscopio. Imagen 6

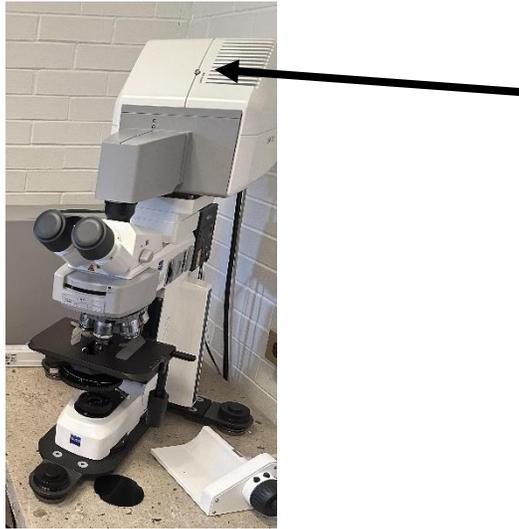


Imagen 6

11) Colocar la muestra que va a ser analizada en el microscopio y observar, primero “a ojo”, para seleccionar una región y enfocar adecuadamente.

Observación a ojo

- a) Quitar el protector plástico que tienen los binoculares en la imagen 7, flecha roja.
- b) Quitar el protector plástico negro que se encuentra en la parte baja del microscopio y que sirve para cubrir y proteger el lente que ahí se encuentra. Imagen 7, flecha verde.

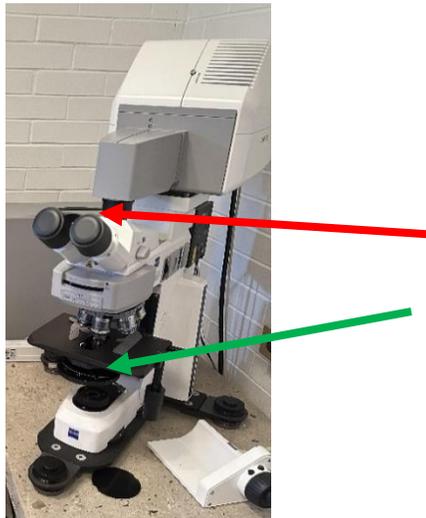


Imagen 7

c) Quitar el selector mecánico para dejar pasar la luz blanca. Este selector se encuentra del lado izquierdo del microscopio a la altura de los binoculares y es una varilla que se introduce o se jala. **Imagen 8 y 9**. Al introducir la varilla se tapa la luz que va hacia la muestra y si se jala la varilla se abre el paso de luz hacia la muestra. Para observación a ojo se jala la varilla

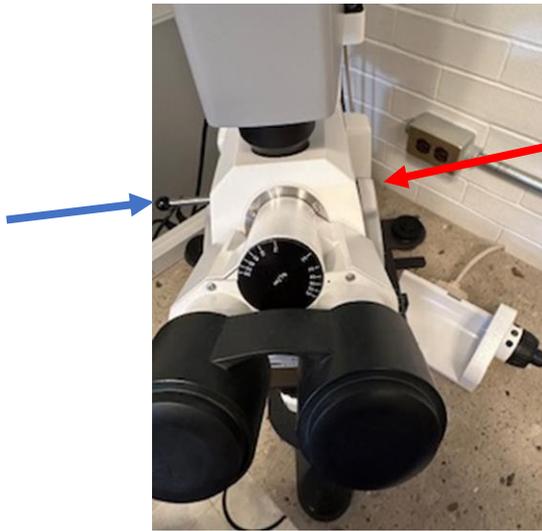


Imagen 8



Imagen 9

- d) En este punto también debe de tomarse en cuenta el selector que se encuentra a la misma altura de la varilla, solo que del lado derecho de los binoculares que es el que abre o cierra el paso del haz de luz láser, (imagen 8, flecha roja). Cuando se quiere observar a ojo una muestra, este selector debe estar hacia el frente y cuando se va a observar con el modo confocal debe estar hacia atrás en las siglas LSM. Imagen 10.



Imagen 10

- a) Ya que la muestra está en posición y puede observarse la luz con los binoculares, iniciar la observación, primero, con los objetivos de baja amplificación (5x, 10x) para seleccionar la zona deseada.
- b) Enfocar con el maneral que se encuentra en el lado derecho sobre la mesa (imagen 11 a y b).



a



b

Imagen 11

- e) Si no se observa que sale luz del objetivo cuando se han realizado todos los pasos arriba mencionados, verificar que los obturadores ubicados del lado izquierdo en la parte baja del microscopio no estén muy cerrados. Mover para aumentar la luz. Imagen 12.



Imagen 12

- f) Cuando se tenga la zona de interés ubicada, introducir la varilla del lado izquierdo para empezar a observar en forma confocal la imagen; para esto cambiar el selector descrito en la imagen 10 a LSM.
- g) Ya encendida la computadora y seleccionado el software de control, en el programa **Zen** seleccionar la opción **acquisition** que abre una hoja con diferentes opciones y que es exactamente que se empieza a trabajar con la opción confocal.
- h) En opciones de **acquisition** (opción para adquirir imágenes) se puede seleccionar:
 - **cromóforo** que se está usando
 - **wide field**
 - **fluorescence** del escaneo del láser
 - potencia del **láser**
 - tamaño del **pinhole**
 - **ganancia (gain)**,
 - color, brillo, y contraste,
 - **stray light** para obtener experimentos de alta sensibilidad
- i) El botón **auto exposure** se usa para obtener imágenes preliminares.
- j) El botón **snap** se utiliza cuando ya se escogió la imagen seleccionada para estudio y se requiere un escaneo rápido.
- k) Inmediatamente aparece **New document** en **Open images área**. No olvidar guardar cada imagen importante. El programa no salva automáticamente las imágenes, ya que sobre escribe cada imagen adquirida.
- l) Cuando se oprime el botón de **Smart setup** (los láseres se encienden automáticamente (después de 15 minutos de inactividad, se apagan de forma automática).

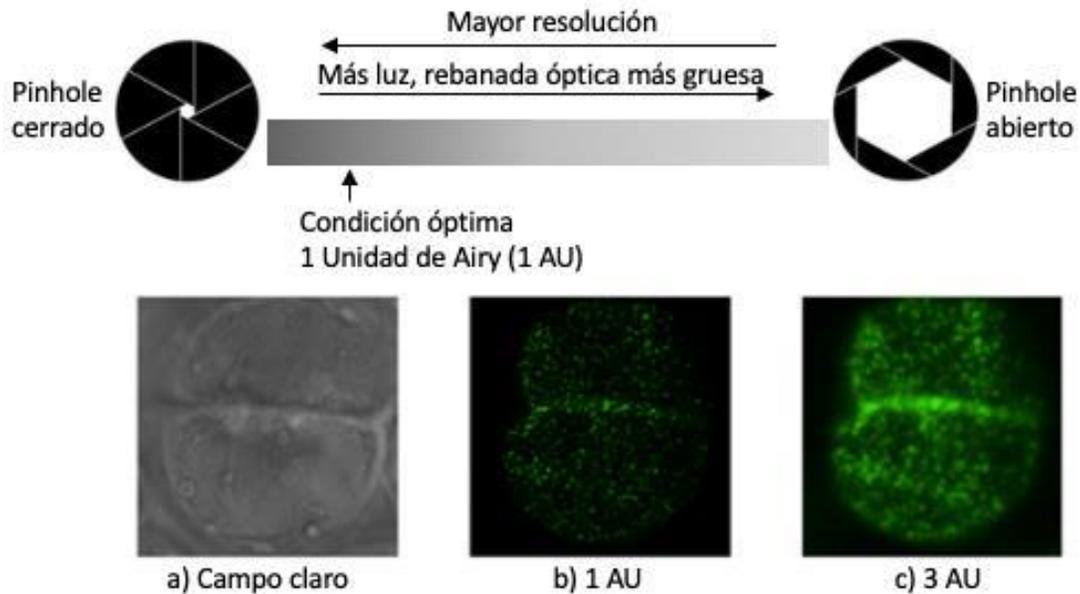
Nota: El concepto *show all* activado muestra las utilidades más comunes desplegadas. Para cada utilidad, el usuario puede activar el modo *show all* para desplegar y usar funciones adicionales.

Componentes que pueden modificarse para obtener imágenes óptimas

Apertura del pinhole.

El pinhole bloquea la luz fuera de foco y por tanto no llega al detector.

- Pinhole pequeño (<1 AU), la luz desenfocada es bloqueada.
- Si el diámetro del pinhole aumenta, entra luz por arriba y por debajo del plano enfocado.
- Usando el pinhole a su valor máximo, se pierde la confocalidad.



Apertura del Pinhole.

Áreas de barrido: la relación entre píxeles y resolución

No confundir resolución digital de la imagen adquirida con la resolución óptica, la cual está dada por la apertura numérica (NA) del objetivo empleado y la longitud de onda del láser de excitación (Criterio de Resolución de Rayleigh).

Criterio de Resolución lateral (x, y) de Rayleigh para un sistema de microscopía confocal:

$$R(x,y) = (0.4 \cdot \lambda) / NA$$

Los tres parámetros más importantes para obtener buenas imágenes en un microscopio confocal son:

1. La relación señal/ruido o sensibilidad debe ser alta (mucho señal y poco ruido).
2. La velocidad o rapidez con la que se adquiere la imagen (el tiempo en el que el láser estará incidiendo en la muestra punto por punto).
3. La resolución, que deberá ser el mejor parámetro si se desean resolver estructuras muy pequeñas.

Como datos importantes habría que considerar que:

- A más potencia del láser, menos ganancia, esto reduce el ruido, pero se pierde definición.
- Un láser con más alta longitud de onda produce imágenes de mayor calidad.
- A mayor potencia del láser se aumenta el **bleaching**.
- Si se hace **averaging** de cada imagen en un **stack** de imágenes, se eleva la calidad de la imagen final.
- A menor velocidad se obtienen imágenes con menos ruido.

Apagado del microscopio confocal

1. Apagar la computadora de control.
2. Mover hacia la izquierda la llave del módulo de los láseres. (acción que apaga los láseres).
3. Checar que el foco de indicación se apague.
4. Apagar la computadora del módulo de los láseres.
5. Apagar el módulo **axiovert**.
6. Apagar el multicontacto 2.
7. Apagar el multicontacto 1.