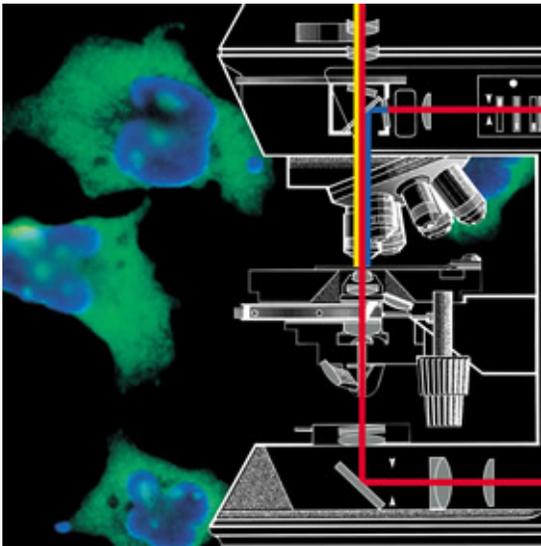
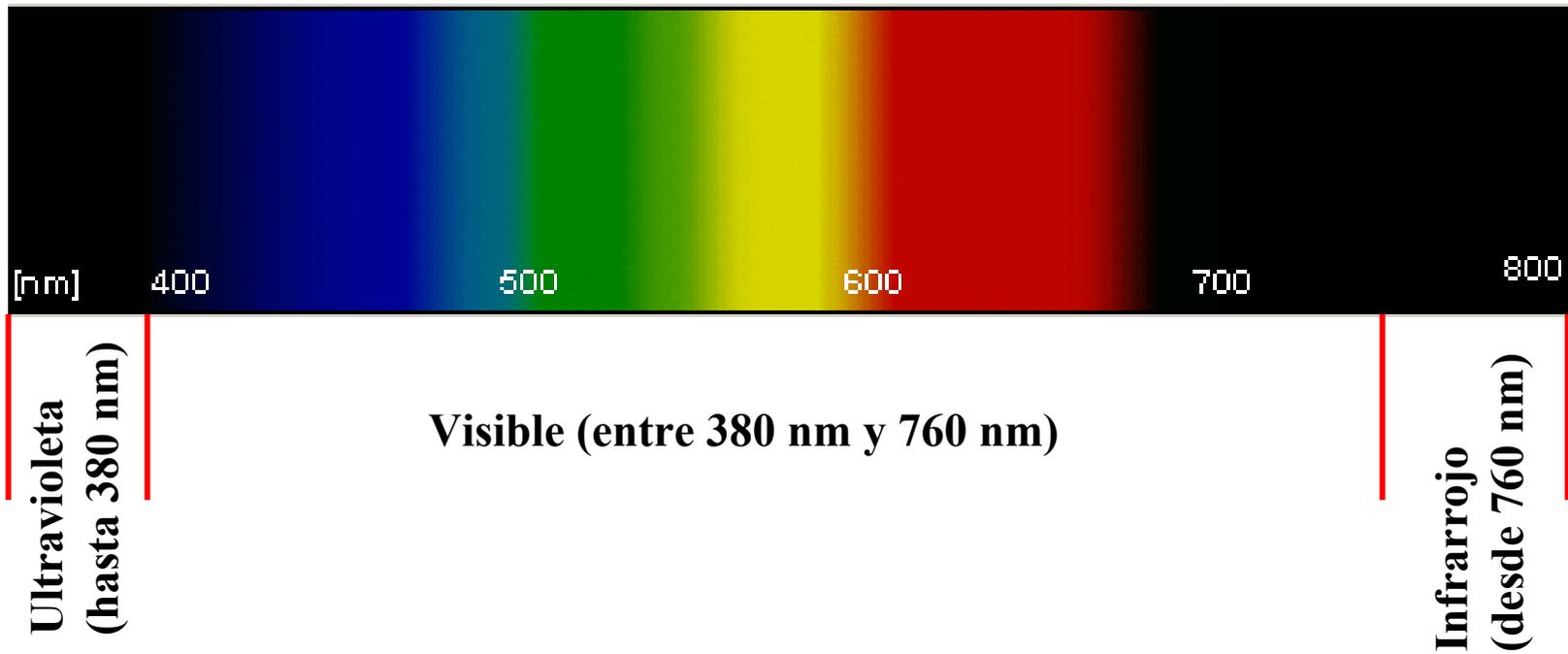


CONCEPTOS DE MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA APLICADOS A LA MICROSCOPIA CONFOCAL



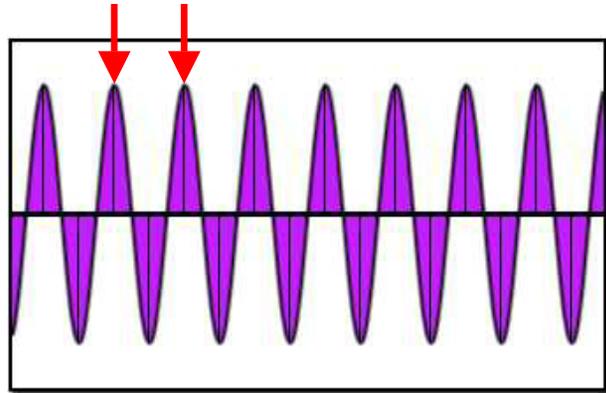
Juan Luis Monteagudo, Leica Microsistemas, S.A.

Espectro

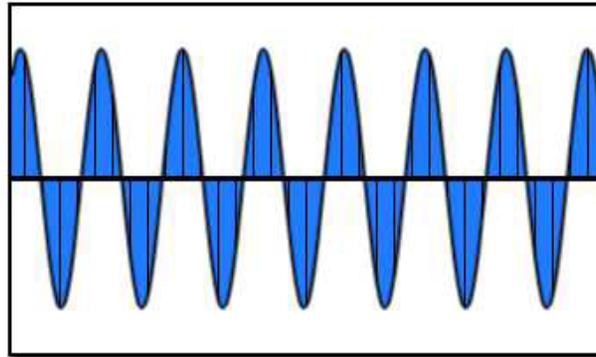


Color

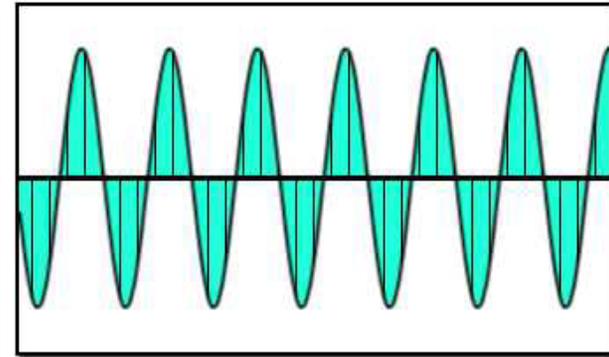
-La longitud de onda determina el color



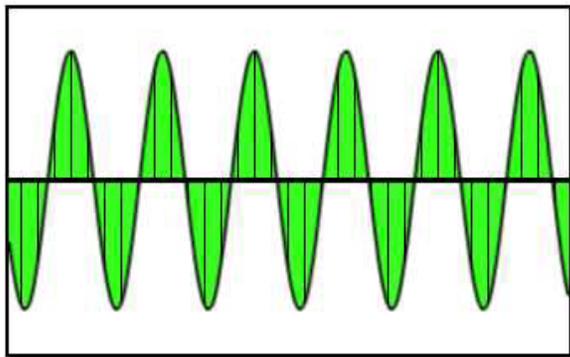
350 nm



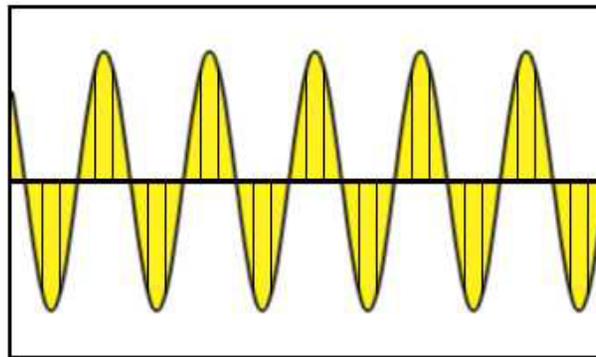
400 nm



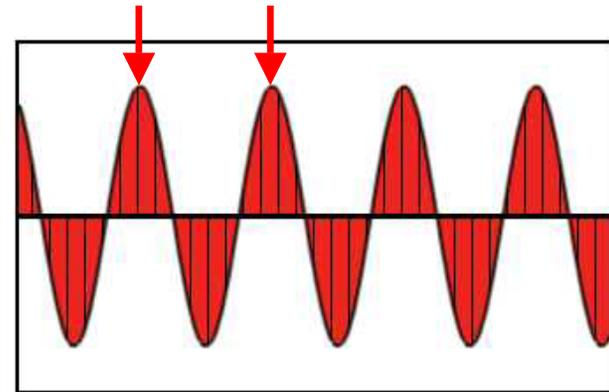
450 nm



500 nm



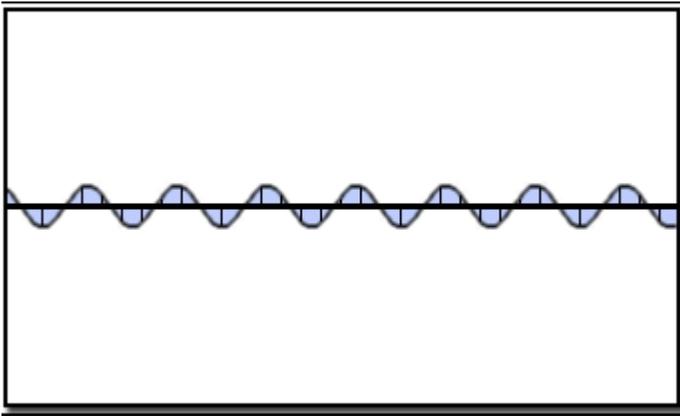
550 nm



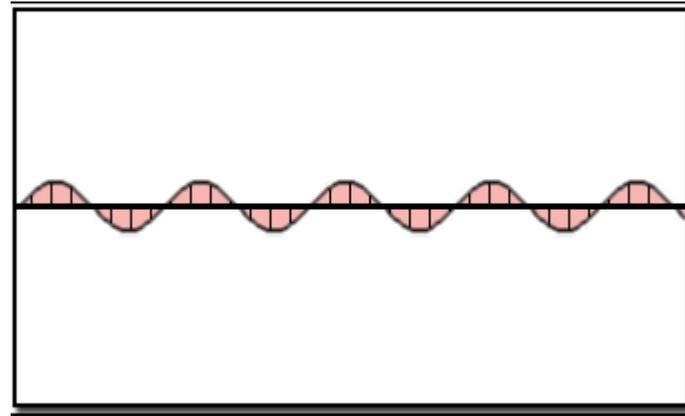
700 nm

Intensidad

-La amplitud de la onda determina la intensidad de la luz



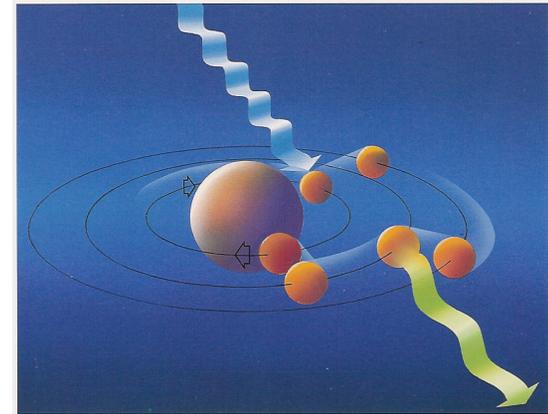
450 nm



750 nm

¿Qué es fluorescencia?

Es un tipo de luminiscencia, en la que seguidamente a la absorción de la energía de la luz, se produce una emisión de una longitud de onda mayor por un corto periodo de tiempo



¿Cómo se produce la Fluorescencia?

- La absorción de la luz de excitación eleva la molécula del fluorocromo a un estado de excitación con un mayor contenido de energía.
- La molécula permanece en el estado de excitación por un periodo de tiempo muy corto (nano segundos).
- El retorno al nivel de energía inicial es acompañado por la emisión de luz (fluorescencia).
- Debido a la disipación interna de energía la luz emitida tiene siempre una longitud de onda mayor (esto equivale a menor energía) que la luz de excitación.
- La cantidad de luz emitida es muy pequeña en comparación con la utilizada para la excitación.

Tipos de fluorescencia

➤ Fluorescencia Primaria:

Es la propiedad que tienen algunas sustancias de emitir luz fluorescente cuando son excitados con una determinada longitud de onda.

- **Clorofila**
- **Aceite de inmersión**
- **Tejidos frescos, Celulas**
- **GFP**

➤ Fluorescencia Secundaria:

Es la fluorescencia que se genera al teñir una sustancia con una reacción inmunoquímica y excitarla con una determinada longitud de onda.

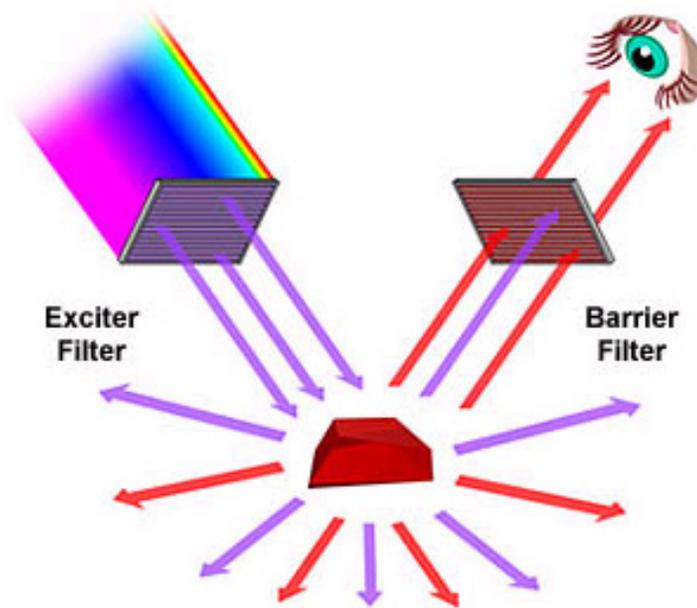
- **Fluorocromos**

Photobleaching



- Es la disminución de la intensidad de emisión de la muestra debido a la descomposición irreversible de la fluorescencia de las moléculas.
- Este fenómeno está directamente relacionado con la intensidad de la excitación y con el tiempo durante el cual estamos excitando la muestra.
- Para reducir este efecto podemos utilizar “anti-fading” en la preparación de la muestra.
- El “bleaching” que normalmente es un gran problema en fluorescencia, es muy útil para algunas técnicas, como FRAP, FRET, etc. En los que gracias a este efecto podemos medir distancias por debajo de la resolución óptica.

Excitación - Emisión



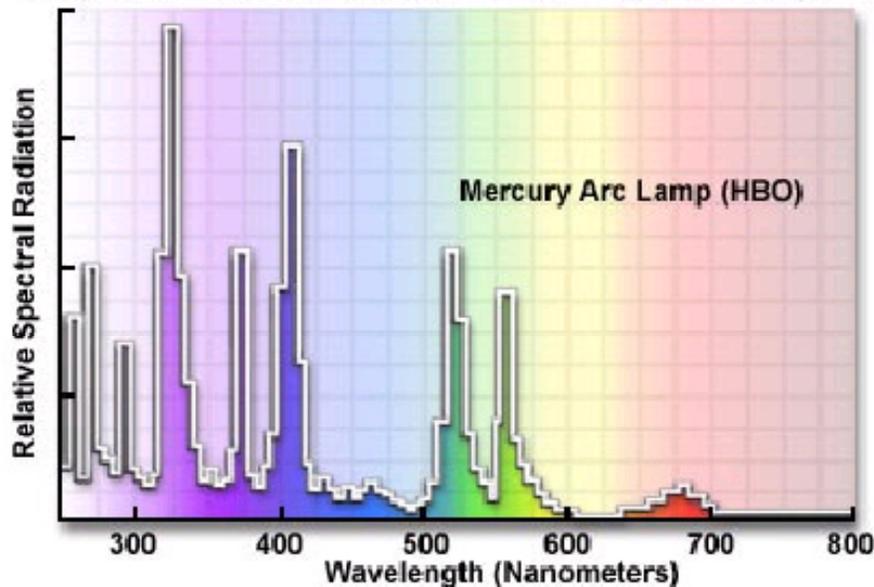
- Con el filtro de excitación seleccionamos la parte del espectro que utilizaremos para excitar la muestra.
- La muestra emite fluorescencia en un espectro distinto al de excitación y al mismo tiempo refleja parte del espectro utilizado para la excitación.
- El filtro barrera se encarga de eliminar la parte del espectro reflejado y nos permite visualizar el espectro de emisión correspondiente al fluorocromo.

Fuentes de Iluminación

➤ Lámpara Mercurio

Tienen una potencia muy irregular a lo largo del espectro, hay unos picos de intensidad en las siguientes longitudes de ondas: 313, 334, 365, 406, 435, 546, y 578 (Vida corta)

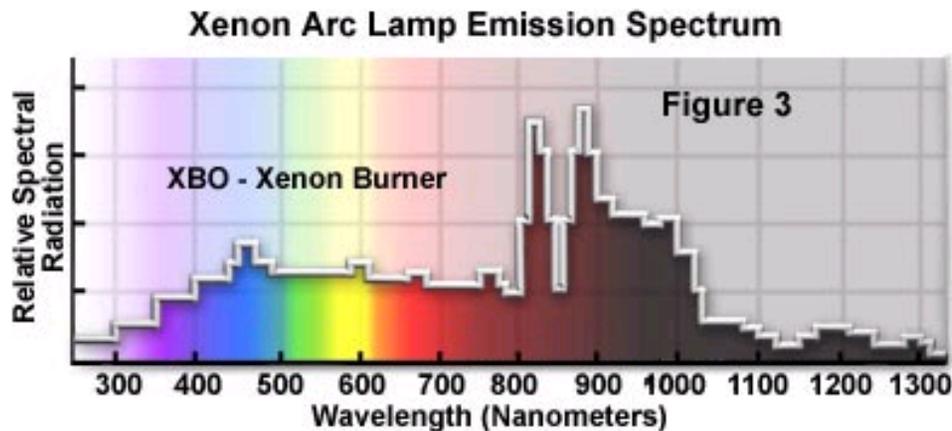
Mercury Arc Lamp UV and Visible Emission Spectrum



Fuentes de Iluminación

➤ Lámpara de Xenón

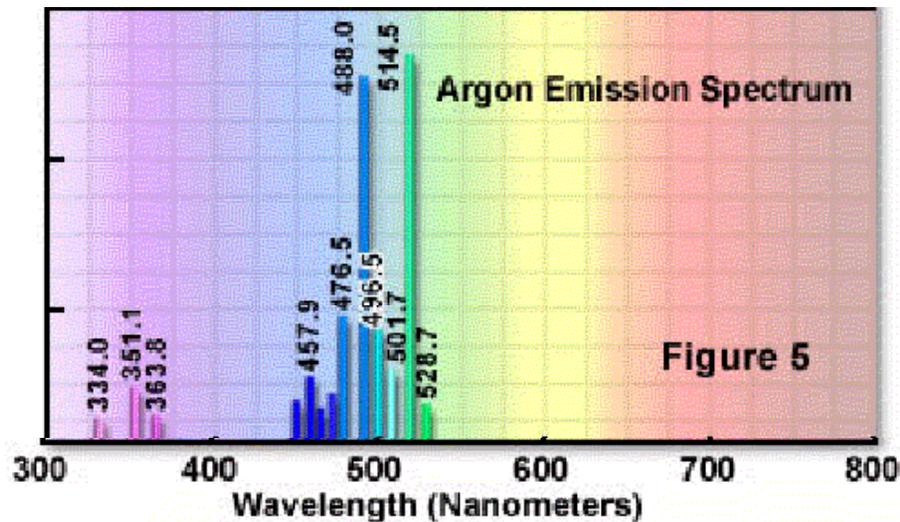
Tiene un espectro de emisión mucho mas regular, es deficiente en ultravioleta. (Vida mas larga que las de mercurio)



Fuentes de Iluminación

➤ Láser Argón

Tienen una gran potencia entre 488 y 514 nm, se utilizan especialmente en microscopia confocal

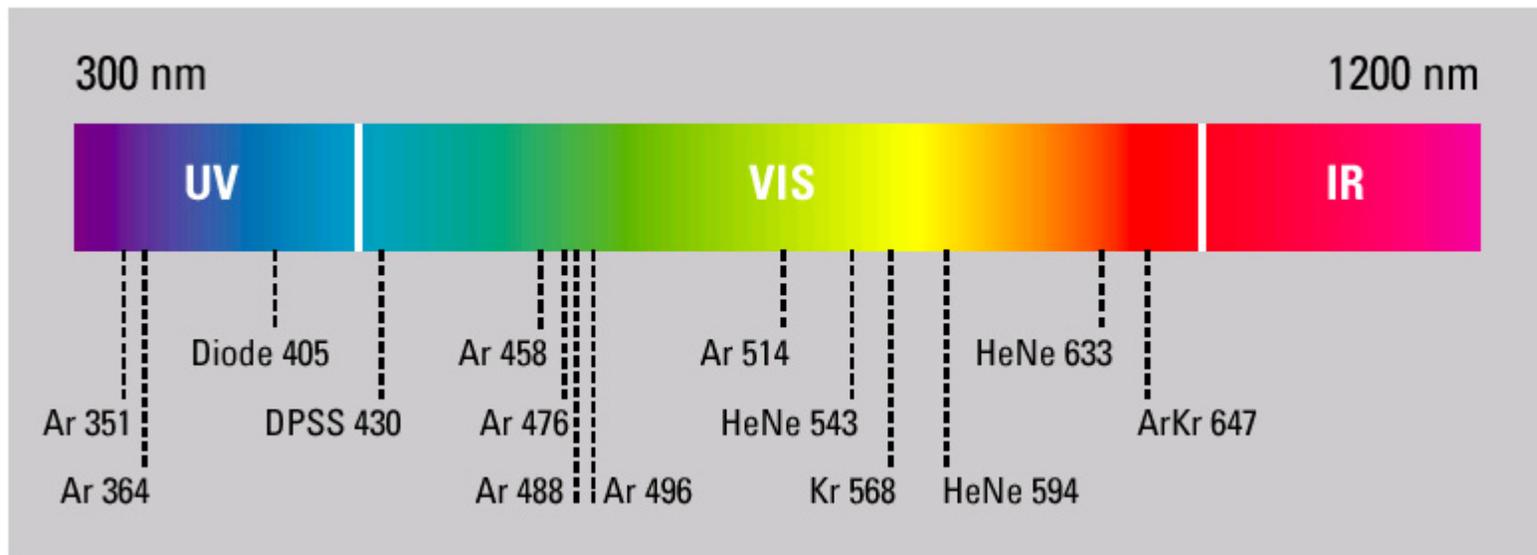


Especificaciones Láser



| <i>Tipo Láser</i> | <i>Longitud de Onda (nm)</i> |
|--------------------------|-------------------------------------|
| ArKr | 488, 568,647 |
| Ar | 458, 476, 488, 496, 514 |
| Ar-UV | 351, 364 |
| Kr | 568 |
| GrHe | 543 |
| HeNe (Naranja) | 594 |
| HeNe | 633 |

Líneas de Láser



Tipos de filtros y espejos para fluorescencia

➤ FILTRO EXCITACIÓN

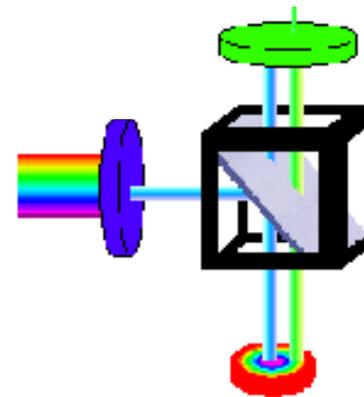
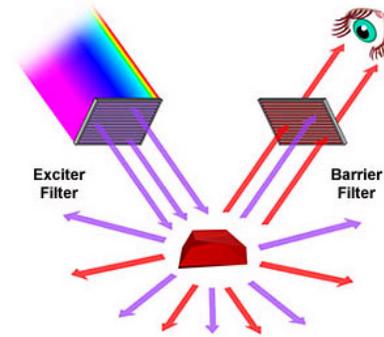
Selecciona el espectro de excitación

➤ ESPEJO DICROICO

Refleja la parte del espectro necesaria para la excitación y transmite el resto

➤ FILTRO BARRERA

Deja pasar la parte de la emisión de la muestra que nos interesa

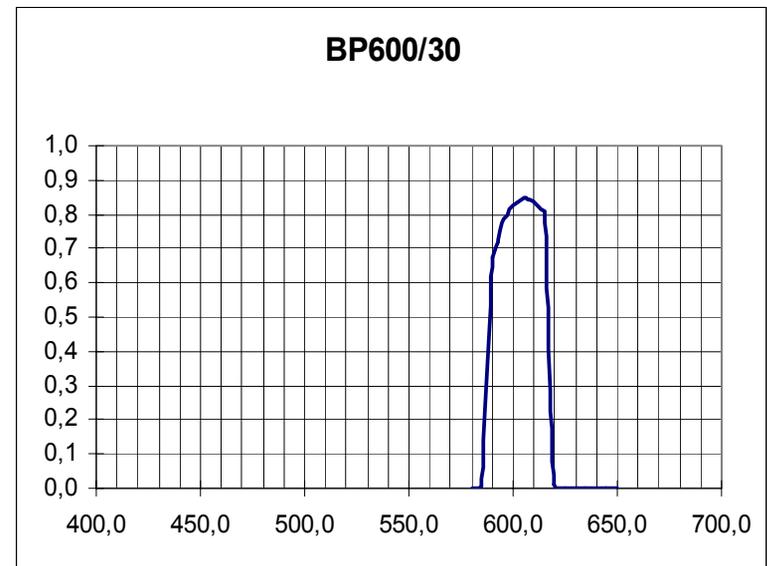
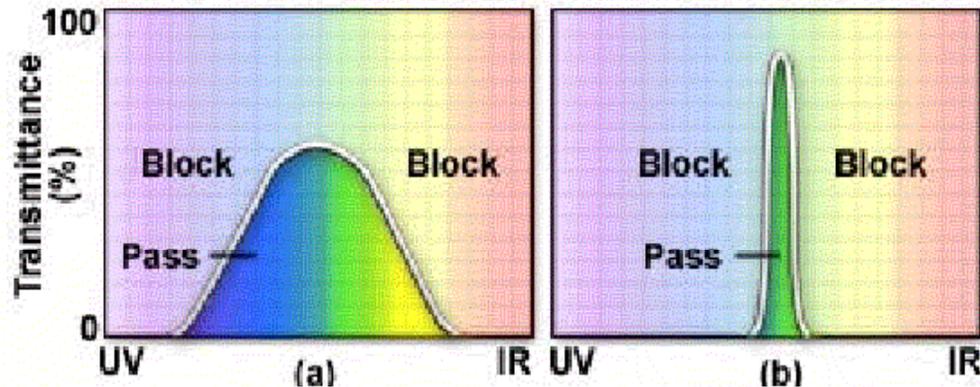


Tipos de filtros y espejos para fluorescencia

➤ Filtros de Excitación y Barrera:

BPxxx – Filtro Pasa Banda (Band Pass)

Deja pasar una banda determinada del espectro, bloquea el resto

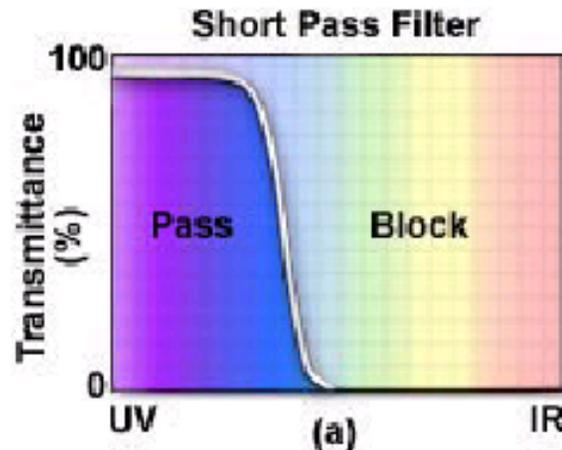


Tipos de filtros y espejos para fluorescencia

➤ Filtros de Excitación y Barrera:

SPxxx – Filtro Pasa Bajos (Short Pass)

Deja pasar el espectro por debajo de un valor determinado y bloquea lo que esta por encima de dicho valor

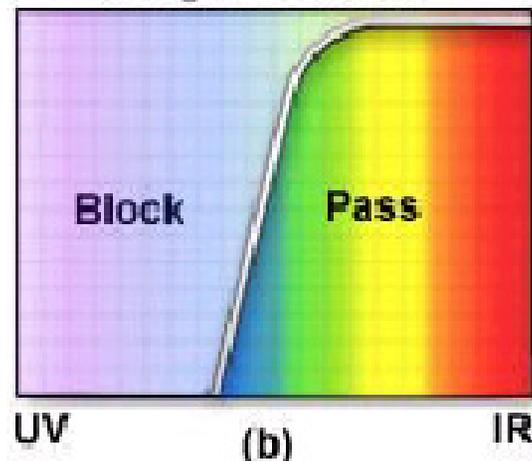


Tipos de filtros y espejos para fluorescencia

➤ Filtros de Excitación y Barrera:

LPxxx – Filtro Pasa Altos (Long Pass)

Deja pasar el espectro de luz por encima del valor del filtro y bloquea lo que esta por debajo del valor indicado

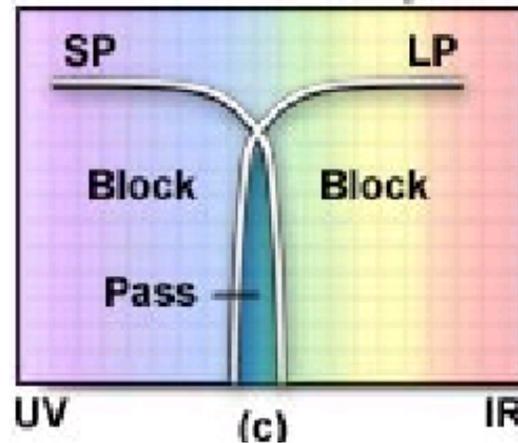


Tipos de filtros y espejos para fluorescencia

➤ Filtros de Excitación y Barrera:

Combinación de filtros SP y LP

El filtro SP recorta el espectro por debajo de su valor y el LP recorta por encima de su valor, de esta manera se consiguen bandas muy estrechas

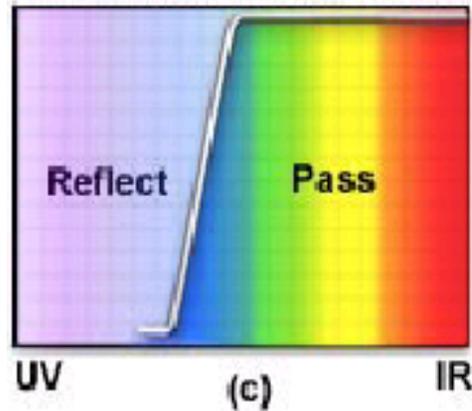


Tipos de filtros y espejos para fluorescencia

➤ Espejos dicroicos:

RSPxxx – Espejo Dicroico Reflexión Pasa Bajos

Refleja por debajo del valor indicado y transmite el resto del espectro



Tipos de filtros y espejos para fluorescencia

➤ Espejos dicroicos:

DDxxx/xxx – Filtro Dicroico Doble

Tienes dos picos en los que refleja y en el resto del espectro transmite.

TDxxx/xxx/xxx – Filtro Dicroico Triple

Tiene tres picos en los que refleja la luz y en el el resto del espectro transmite

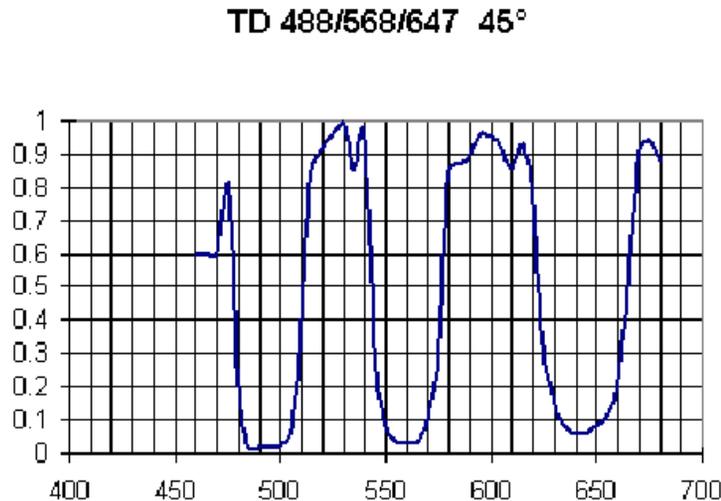


Tabla Fluorocromos

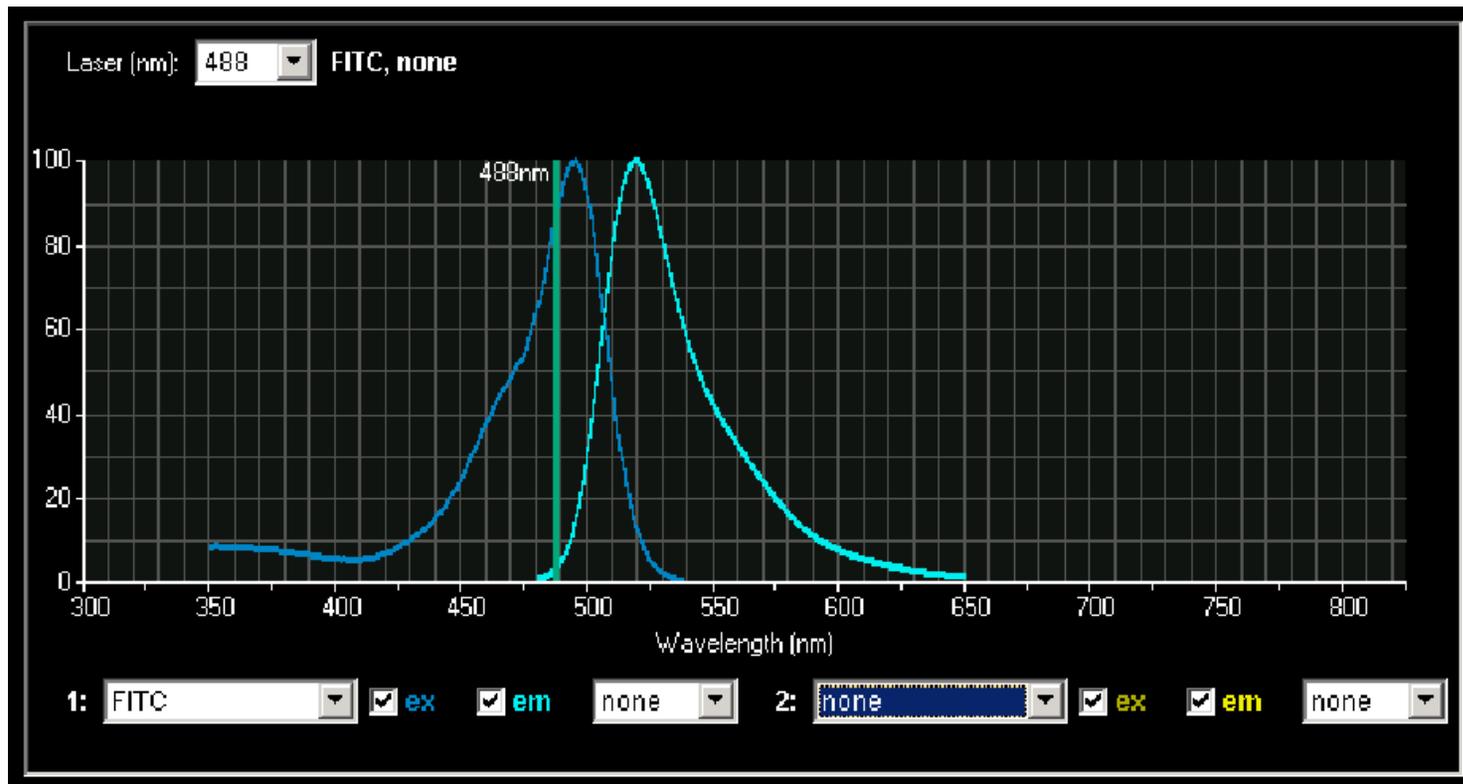
| Dye | Excitation wavelength (nm) | Emission wavelength (nm) | Laser excitation (nm) |
|--------------------|----------------------------|--------------------------|-----------------------|
| Alexa 488 | 495 | 520 | 488 |
| Alexa 546 | 555 | 575 | 543 |
| Cy3 | 552 | 565 | 543 |
| | | | 568 |
| Cy5 | 650 | 667 | 633 |
| | | | 647 |
| DAPI | 372 | 456 | 351 / 364 |
| FITC | 490 | 520 | 488 |
| FITC / TRITC | 490 / 541 | 520 / 572 | 488 / 543 |
| | | | 488 / 568 |
| FITC / TRITC / Cy5 | 490 / 541 / 650 | 520 / 572 / 667 | 488 / 543 / 633 |
| | | | 488 / 568 / |
| | | | 488 / 568 / |

Ejemplos de algunos marcadores fluorescentes

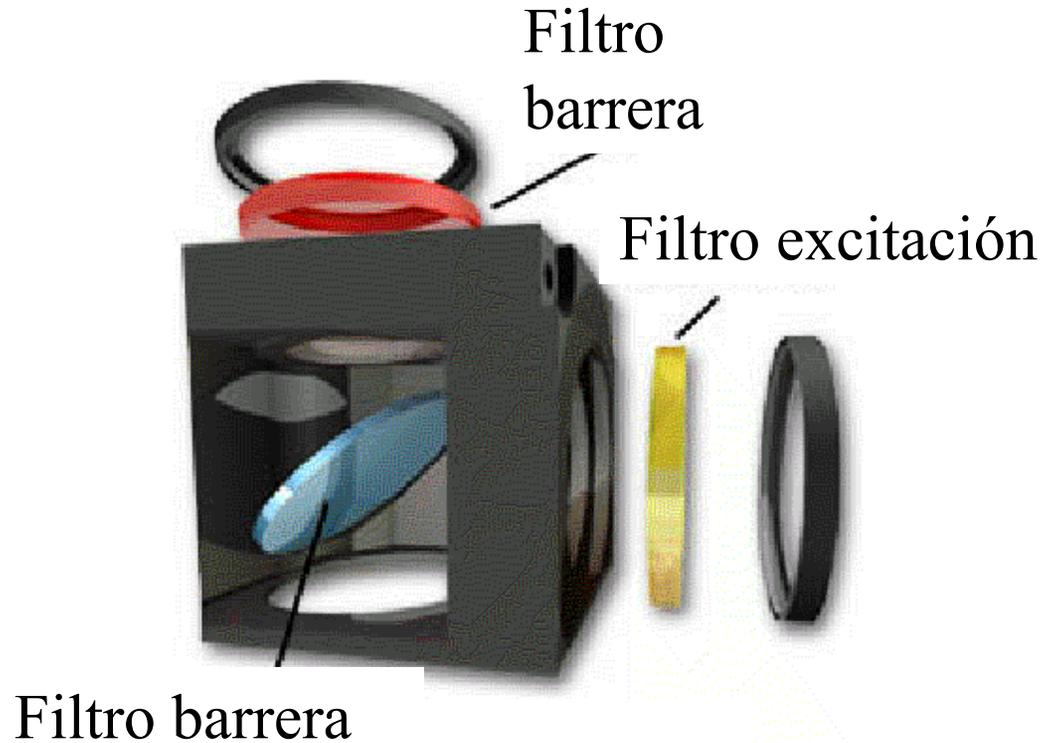
FITC



| Marcador | Excitación (nm) | Emisión (nm) | Láser excitación (nm) |
|----------|-----------------|--------------|-----------------------|
| FITC | 490 | 520 | 488 |

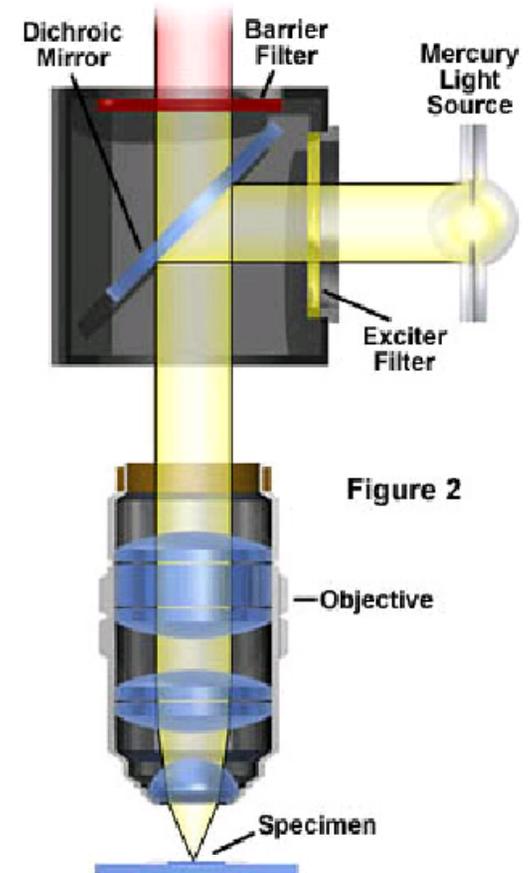


Combinación de los Filtros



Combinación de los Filtros

- I. La lámpara emite luz en todo el espectro
- II. El filtro de excitación solo deja pasar la parte del espectro necesaria para excitar la muestra
- III. El espejo dicroico refleja hacia la muestra la excitación correspondiente
- IV. La muestra se excita con la luz que le llega y emite en un espectro superior al de la excitación
- V. El espejo dicroico transmite la emisión de la muestra
- VI. El filtro barrera hace una selección exacta del espectro de emisión que nos interesa

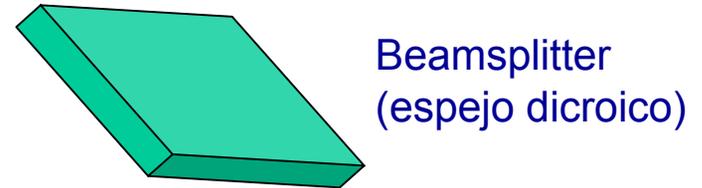
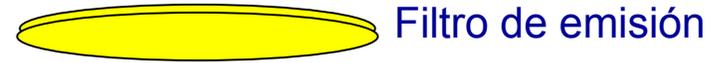
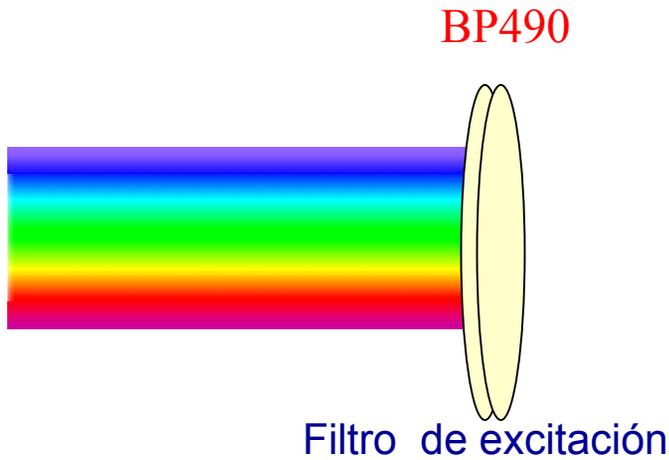


Combinación de los Filtros para FITC

I. La lámpara emite luz en todo el espectro

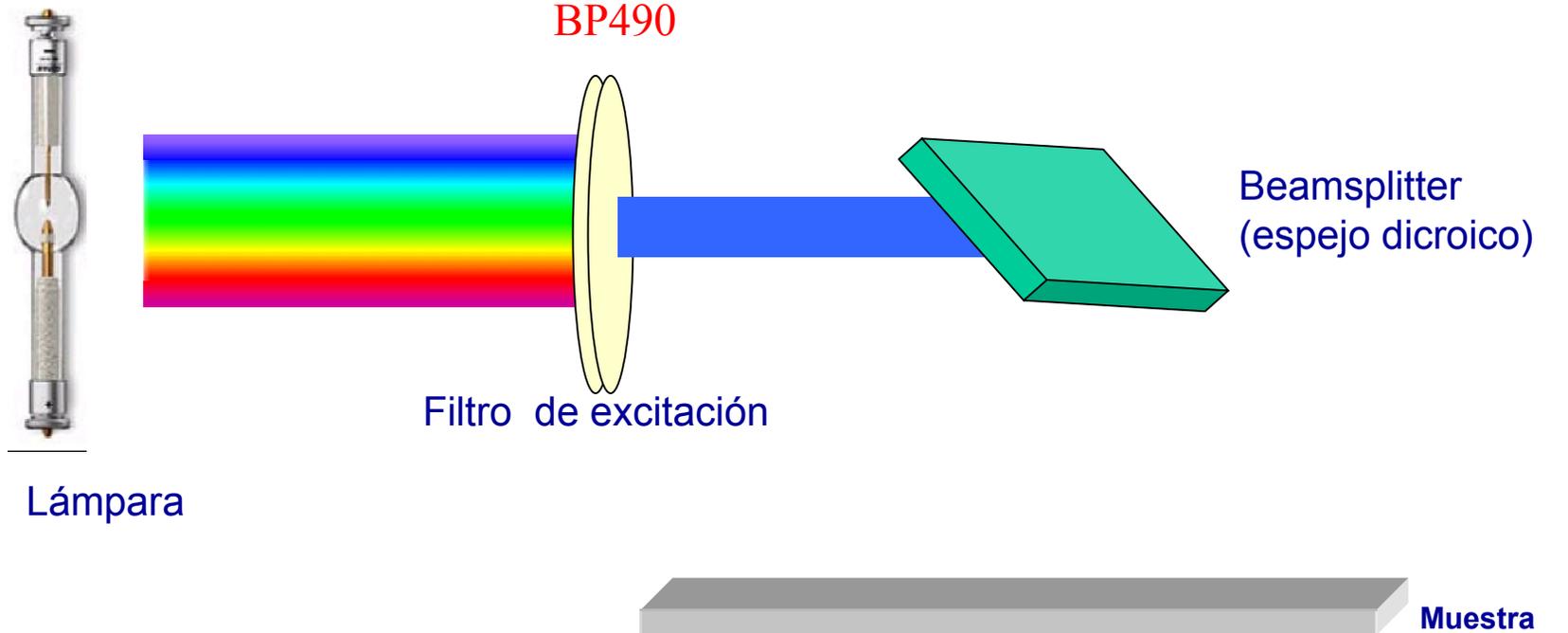


Lámpara



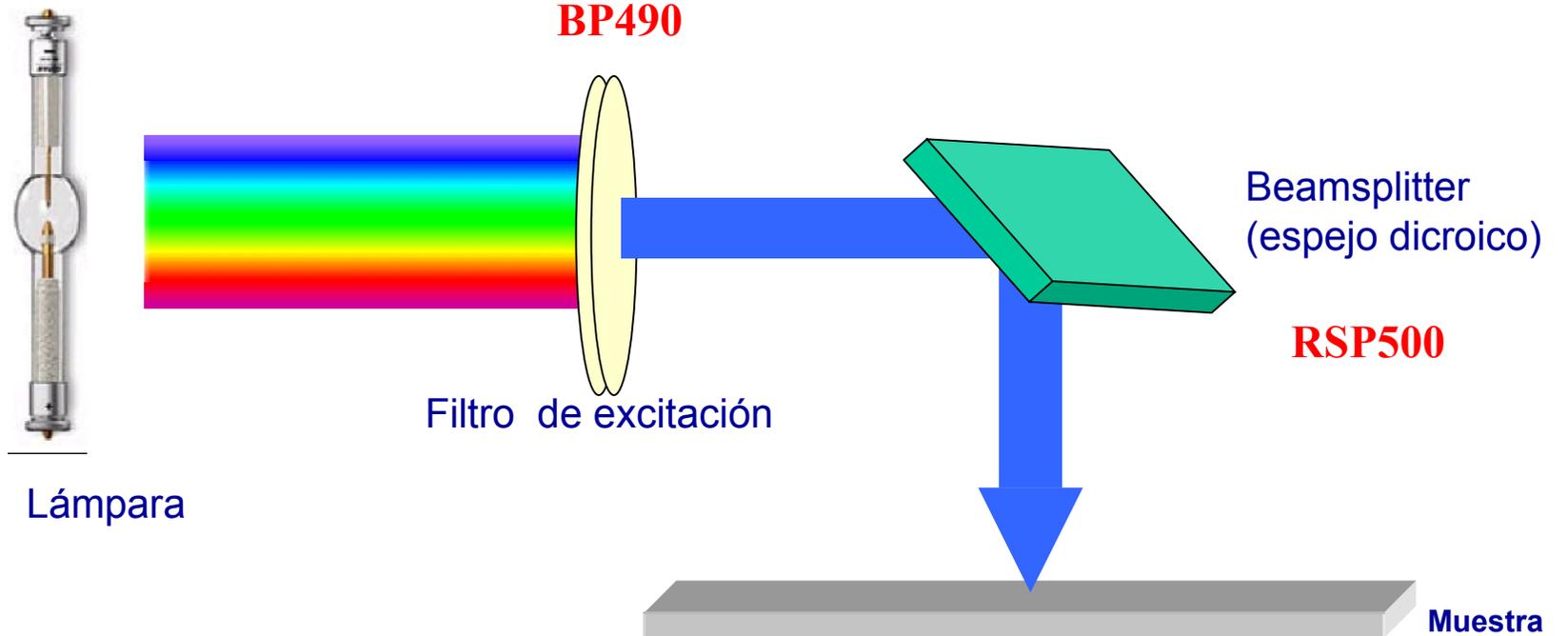
Combinación de los Filtros para FITC

II. El filtro de excitación solo deja pasar la parte del espectro necesaria para excitar la muestra. (Excitación FITC: 490nm – Filtro Excitación: BP490)



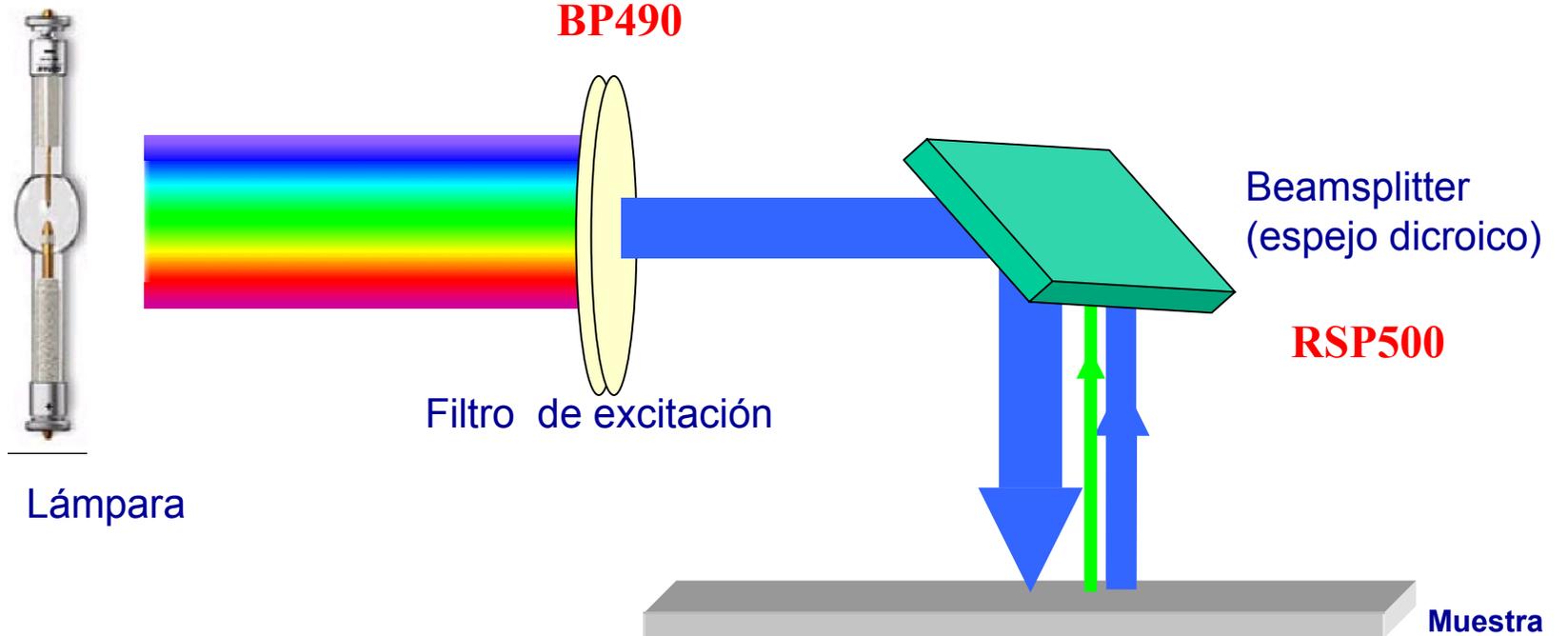
Combinación de los Filtros para FITC

III. El espejo dicroico refleja hacia la muestra la excitación correspondiente.
(Dicroico: RSP500)



Combinación de los Filtros para FITC

IV. La muestra se excita con la luz que le llega y emite en un espectro superior al de la excitación. (Emisión FITC: 520nm). También refleja parte de la excitación.

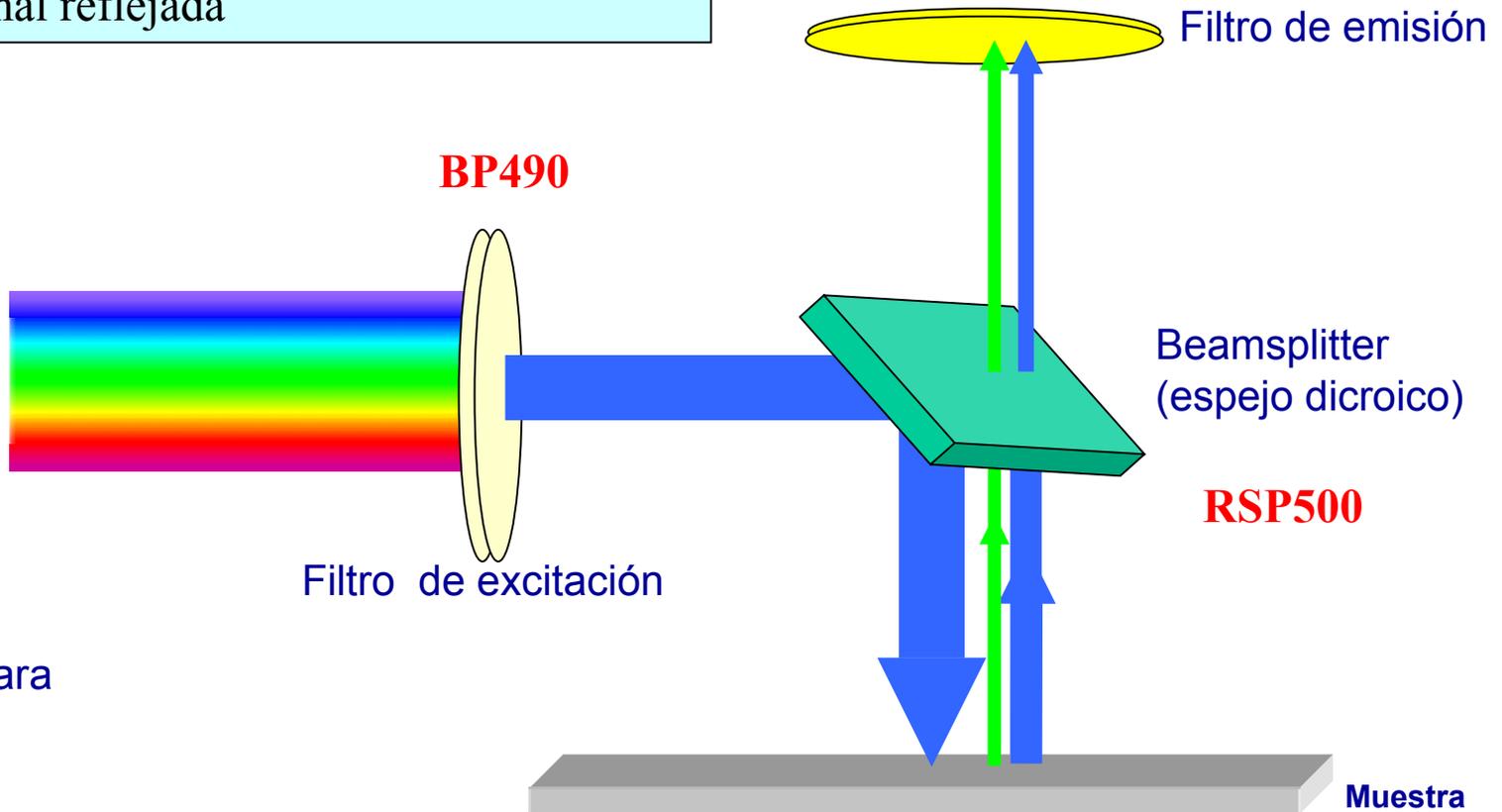


Combinación de los Filtros para FITC

V. El espejo dicroico transmite la emisión de la muestra. (**Dicroico: RSP500**) y filtra parte de la señal reflejada



Lámpara

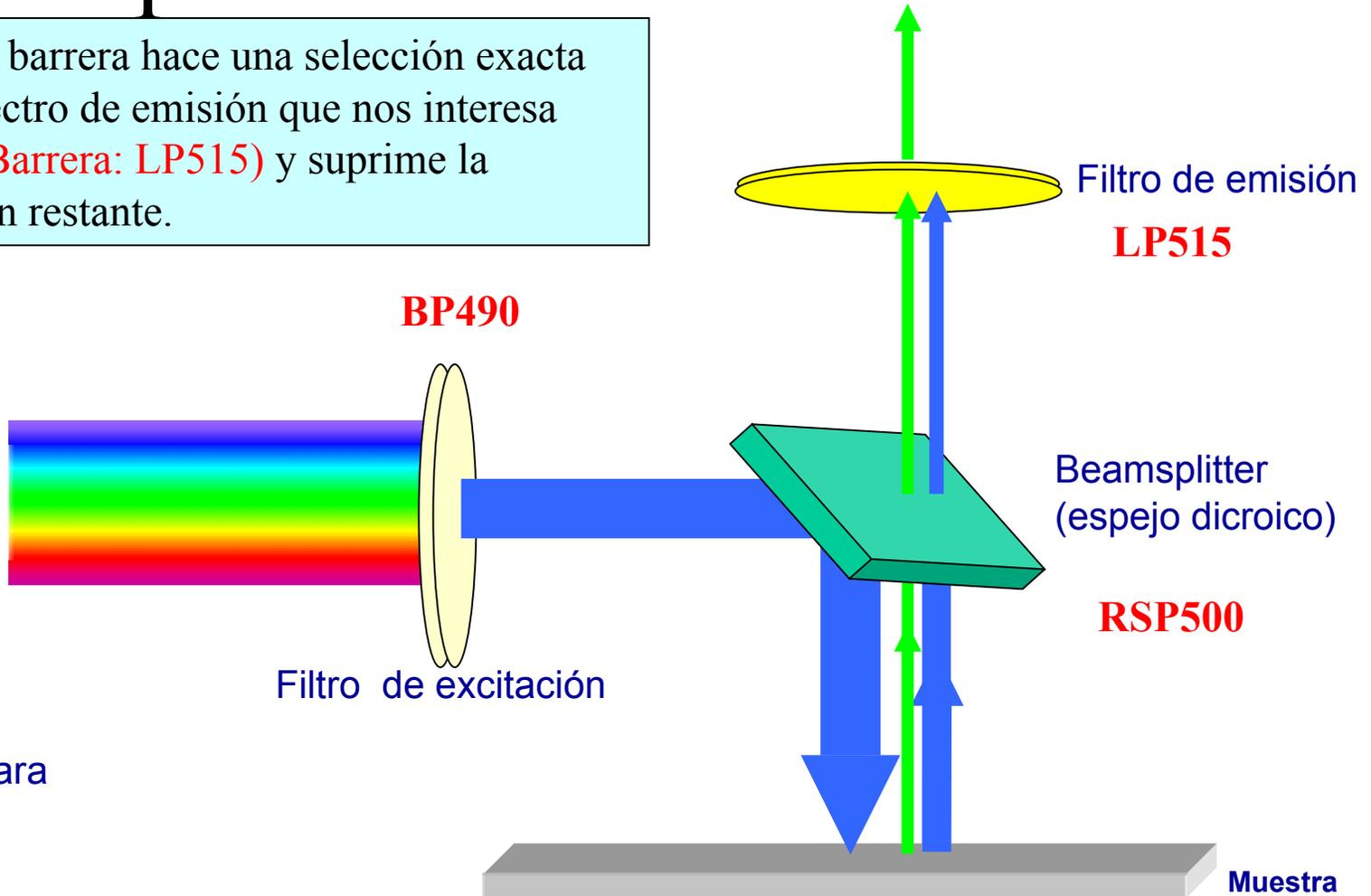


Combinación de los Filtros para FITC

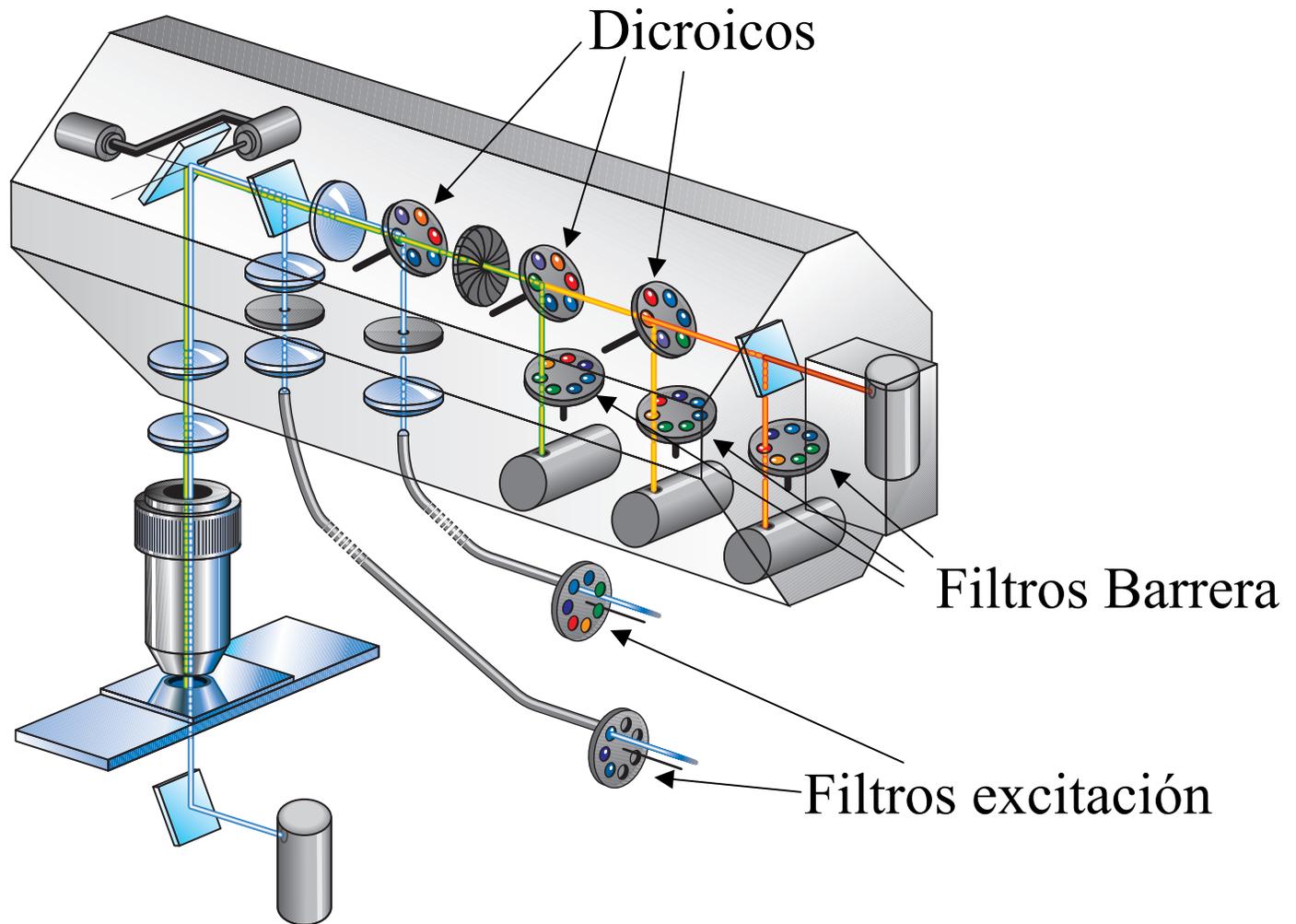
VI. El filtro barrera hace una selección exacta del espectro de emisión que nos interesa (**Filtro Barrera: LP515**) y suprime la reflexión restante.



Lámpara



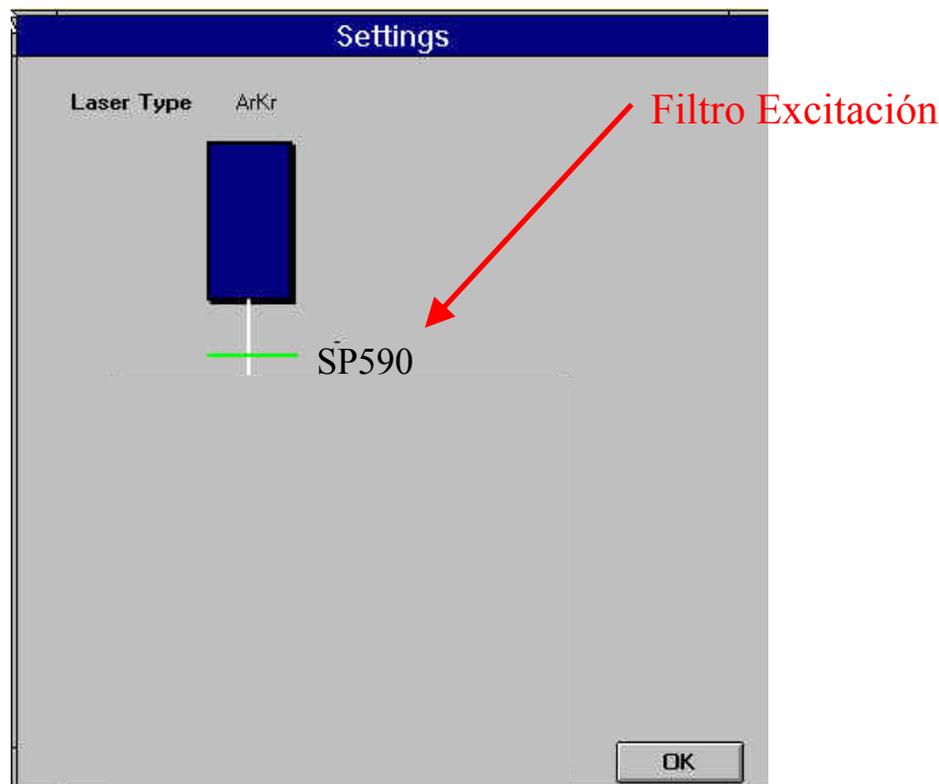
Leica TCS NT modulo confocal



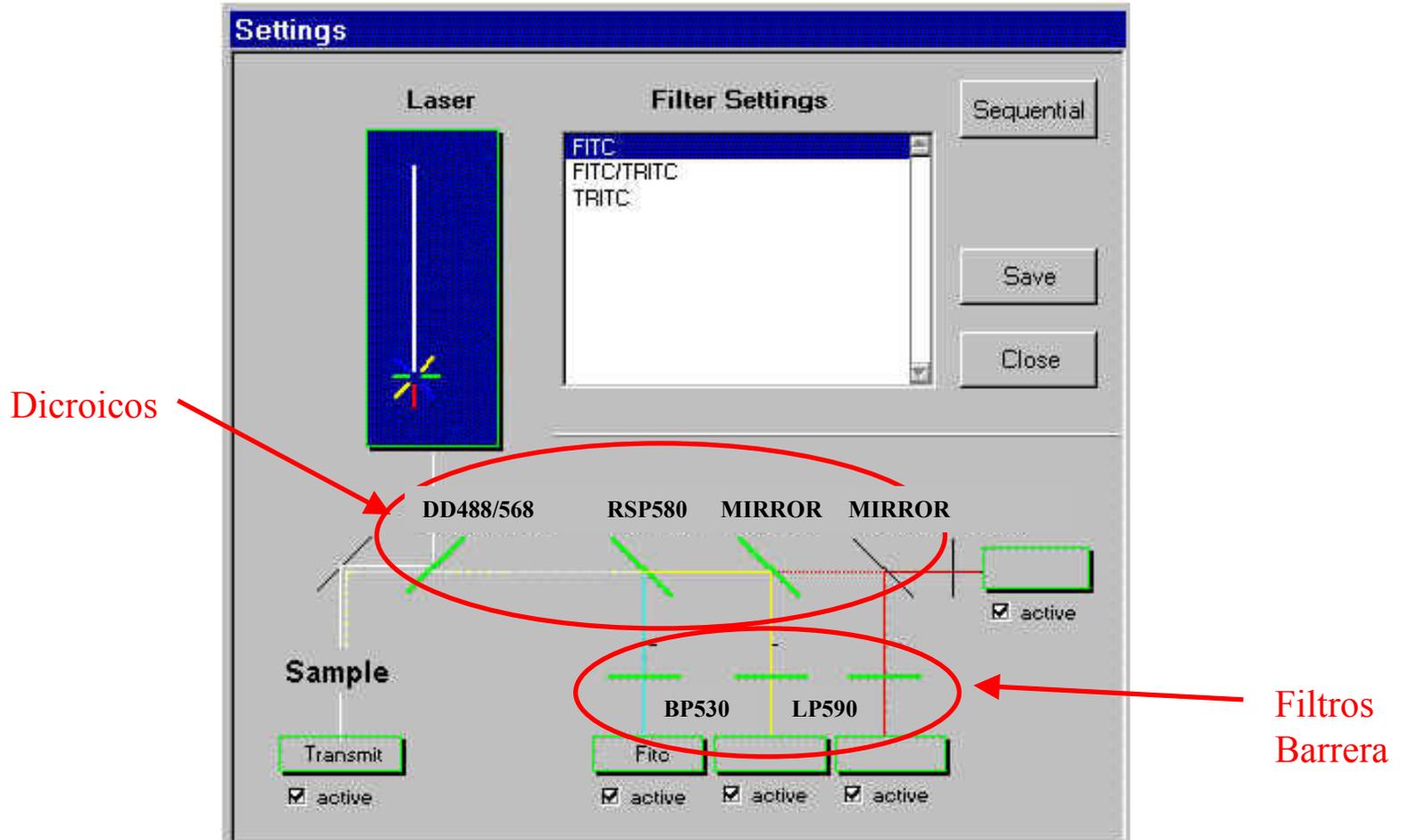
Configuración de la adquisición



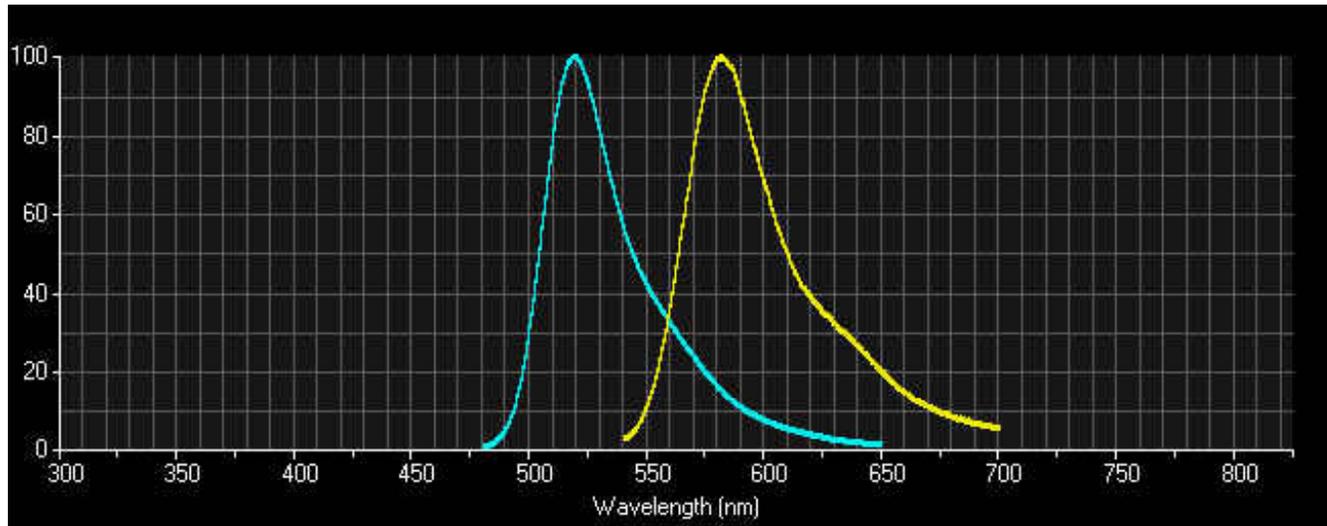
FITC-TRITC



Configuración de la adquisición FITC-TRITC



Cruce de espectros de emisión entre fluorocromos



Espectros de emisión del FITC y TRITC

Podemos ver como la cola del espectro de emisión del FITC se solapa con el espectro del TRITC

Cruce entre DAPI y FITC

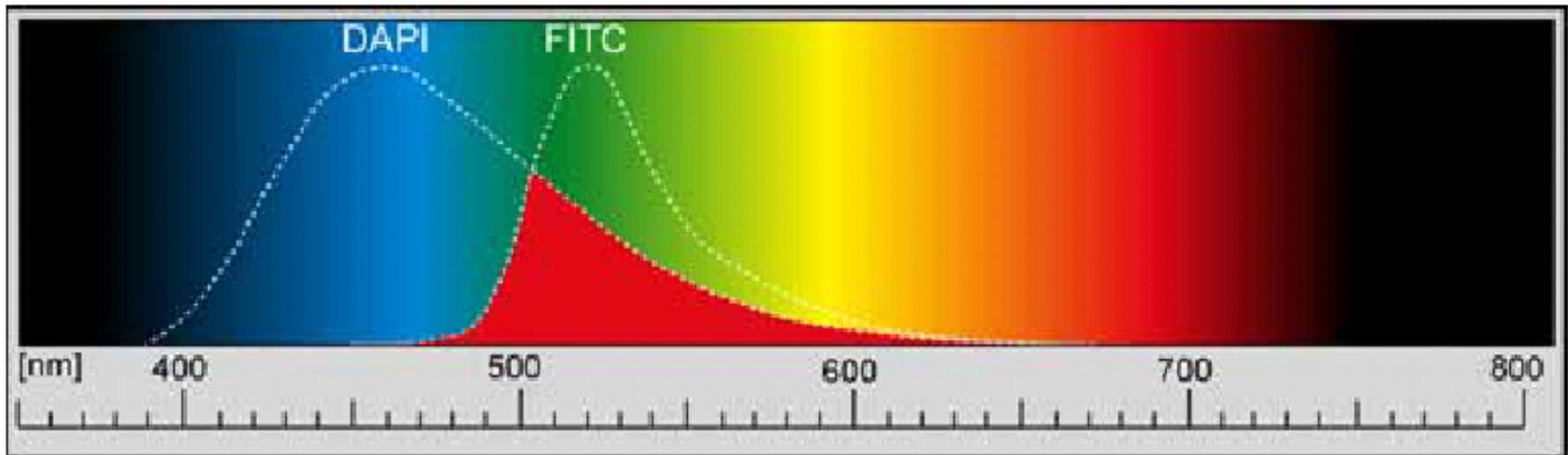
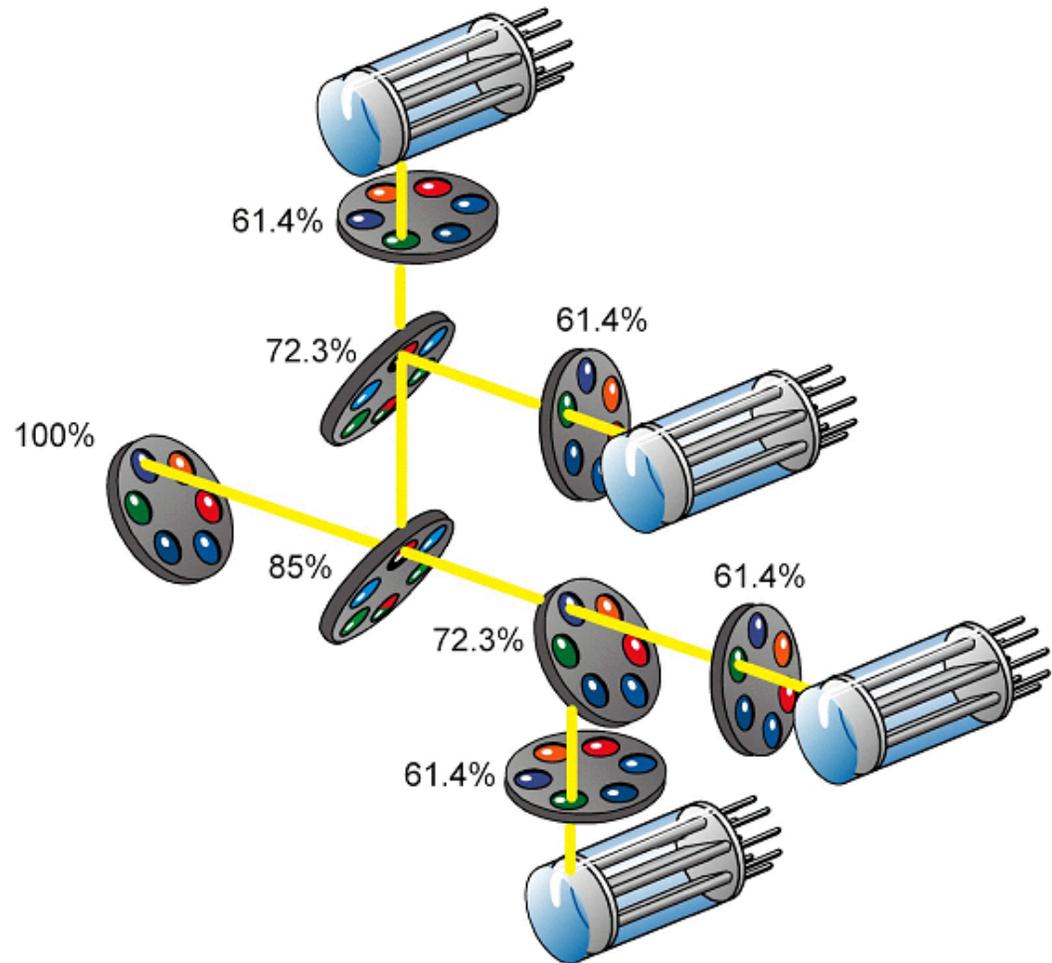


Fig. 4: The emissions spectra of DAPI and FITC (literature values) overlap over a wide range of about 480 to 600 nm.

Eficiencia sistema de filtros

En cada filtro que la luz atraviesa se produce una pérdida de intensidad, llegando solo un 61% de la intensidad medida después del filtro dicróico.



Primer gran cambio en el sistema de filtros

Sustituir el filtro de excitación por el AOTF

AOTF Filtro Sintonizable

Óptico-Acústico

(Acousto-Optical Tunable Filter)

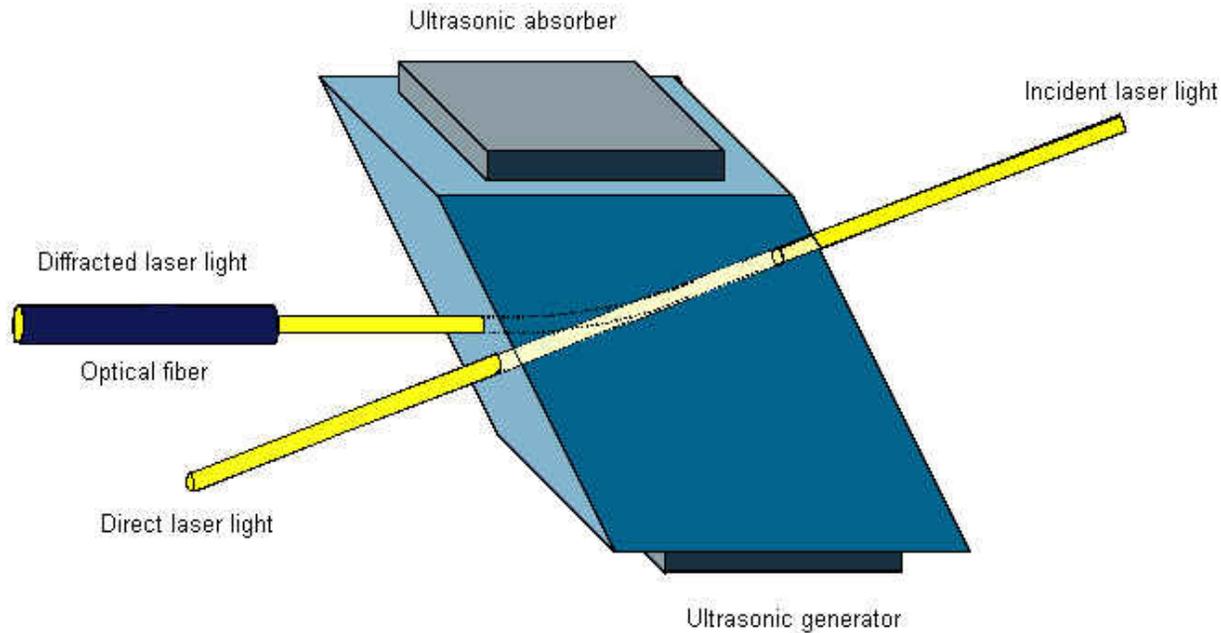


- Es un cristal con un generador y receptor de ultrasonidos
- Sustituye a los filtros de excitación
- Variando la frecuencia del ultrasonido que se le aplica podemos seleccionar las líneas de excitación
- Variando la potencia del ultrasonido aplicado podemos variar la potencia de las líneas seleccionadas
- Evitamos las limitaciones de los filtros

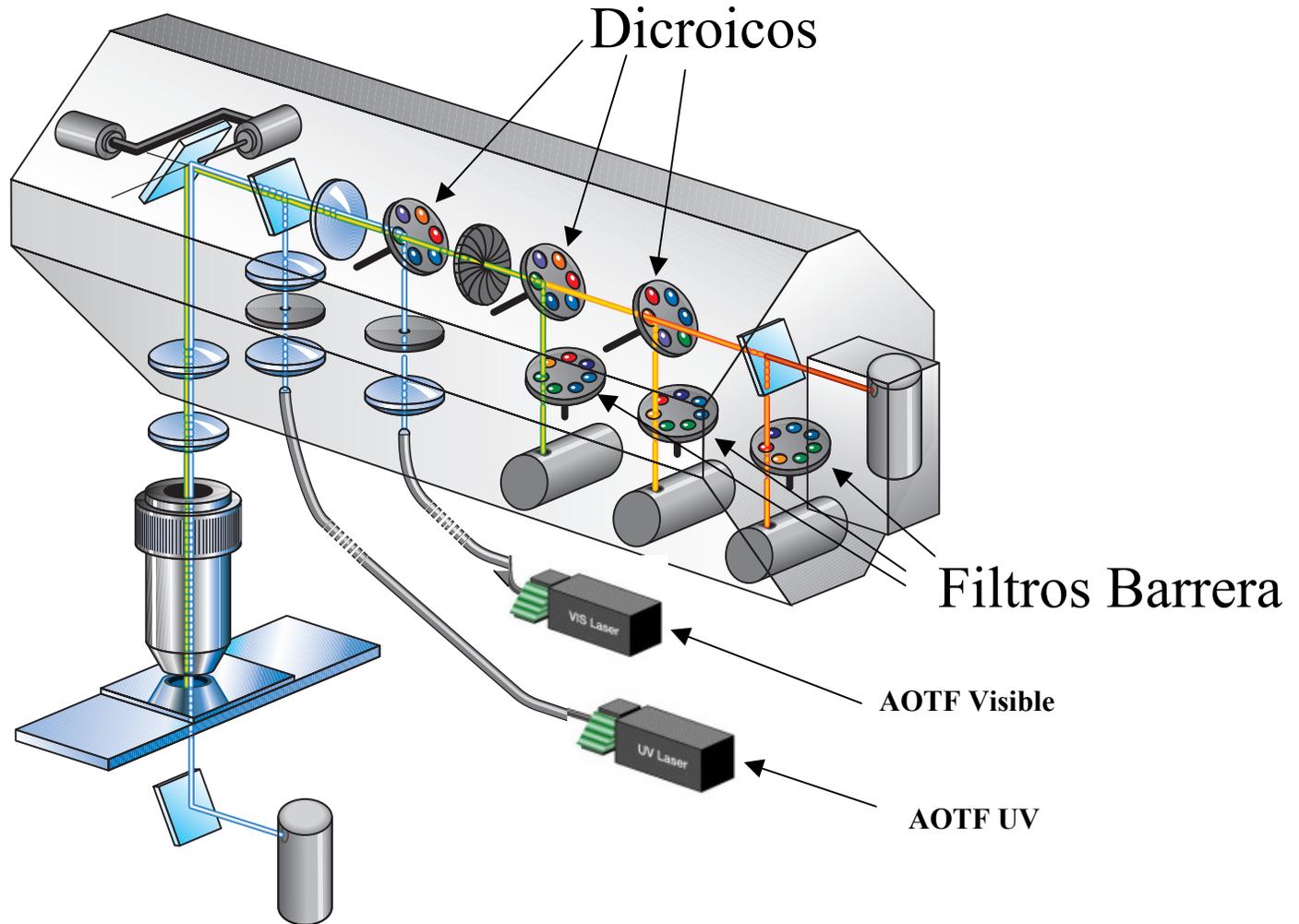
AOTF Filtro Sintonzable

Óptico-Acústico

(Acousto-Optical Tunable Filter)



Leica TCS NT modulo confocal con AOTF



AOTF Filtro Sintonizable

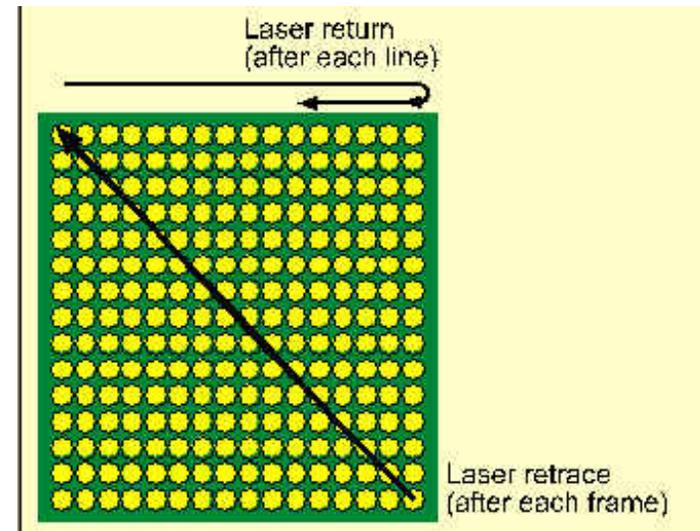
Óptico-Acústico

(Acousto-Optical Tunable Filter)

Blanking

El AOTF se utiliza también para desactivar el láser durante el “fly-back” después de cada línea y cada cuadro.

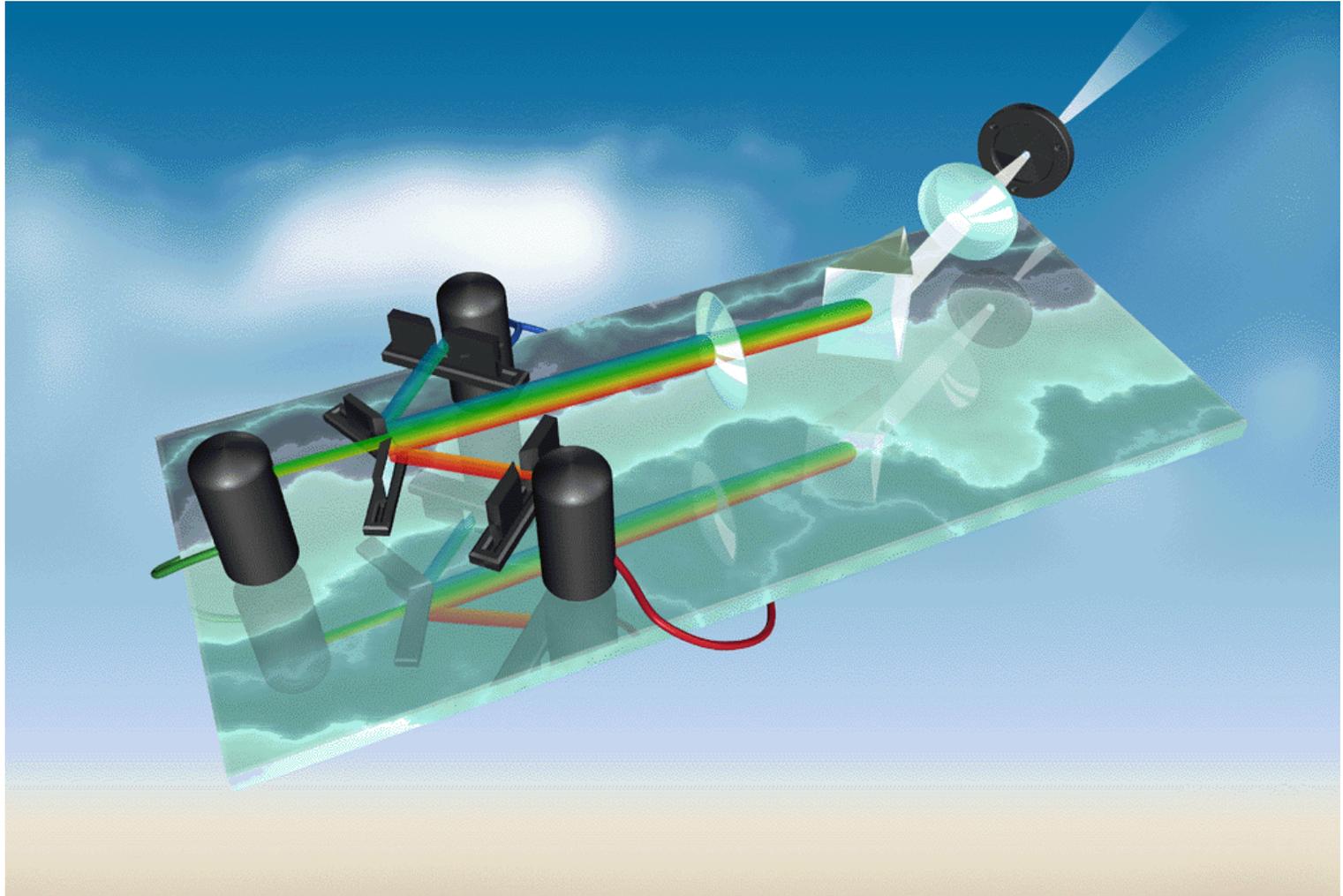
Esto reduce el “bleaching” de la muestra ya que no excita la muestra durante los tiempos en los que no se está adquiriendo



Segundo gran cambio en el sistema de filtros

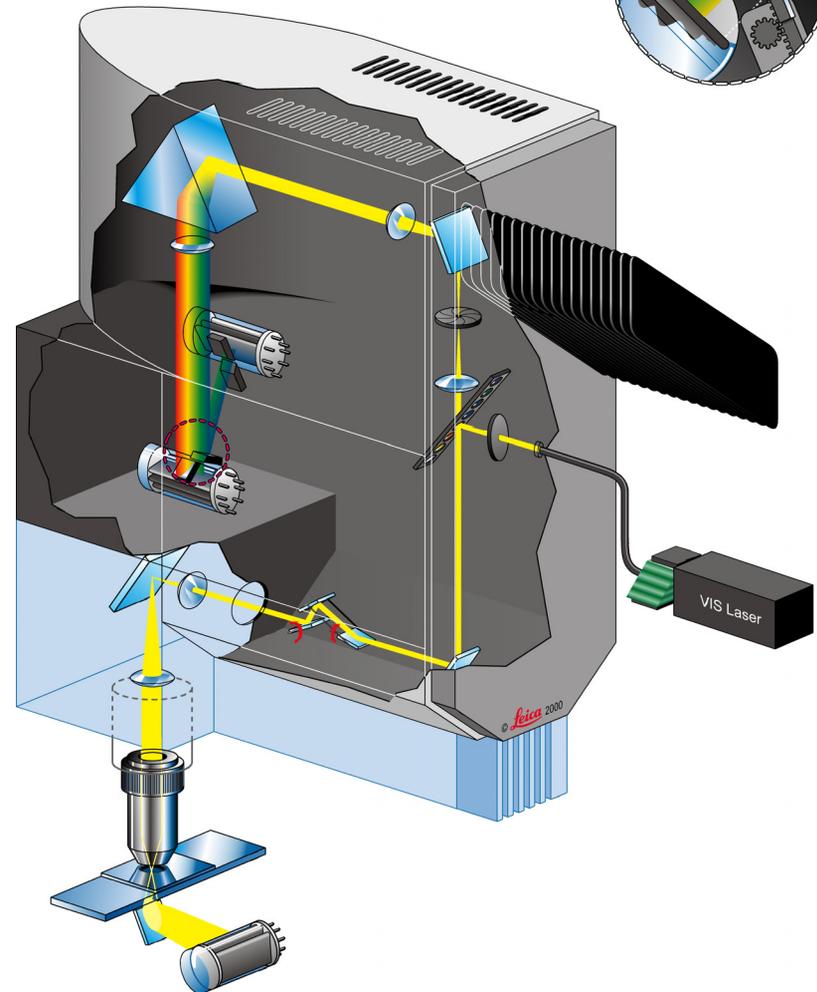
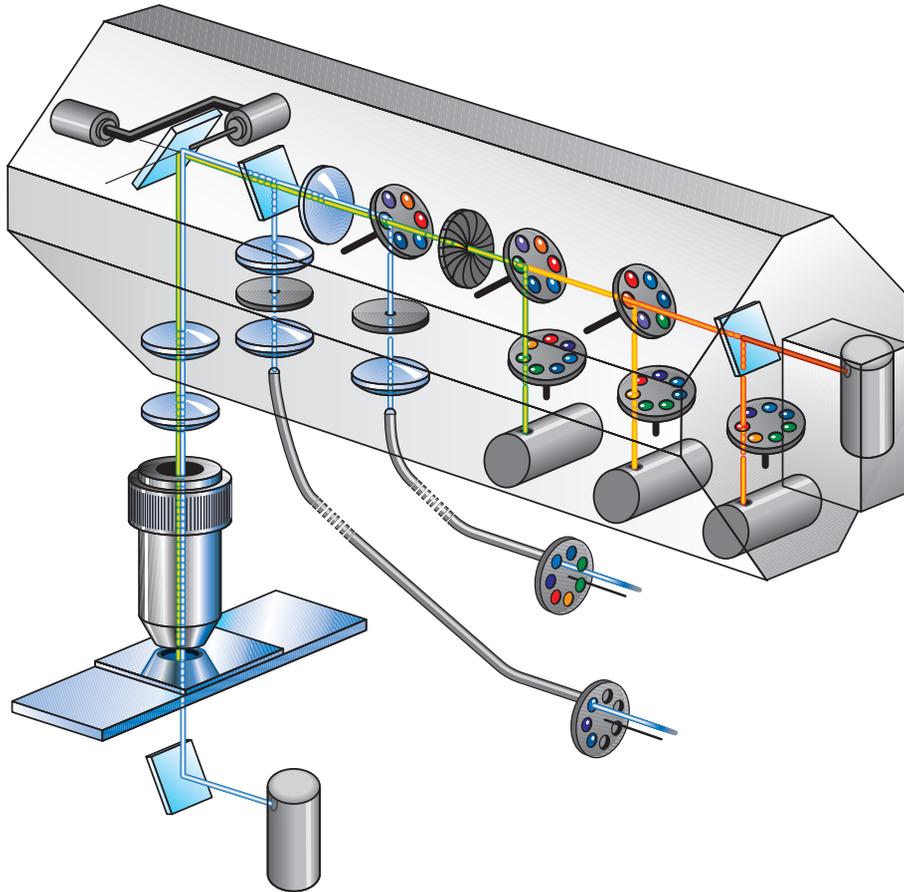
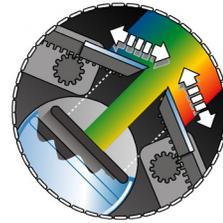
Aparición del sistema de adquisición espectral

Sistema Espectral

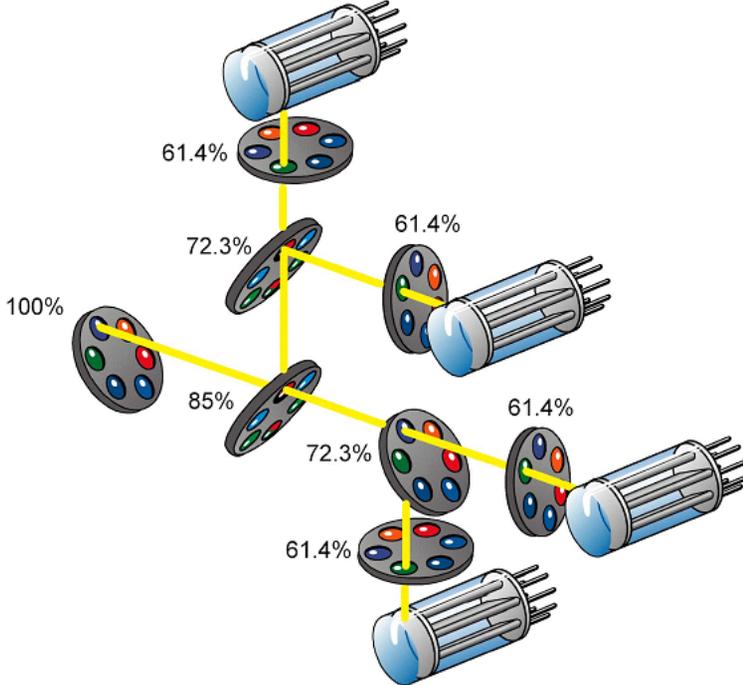
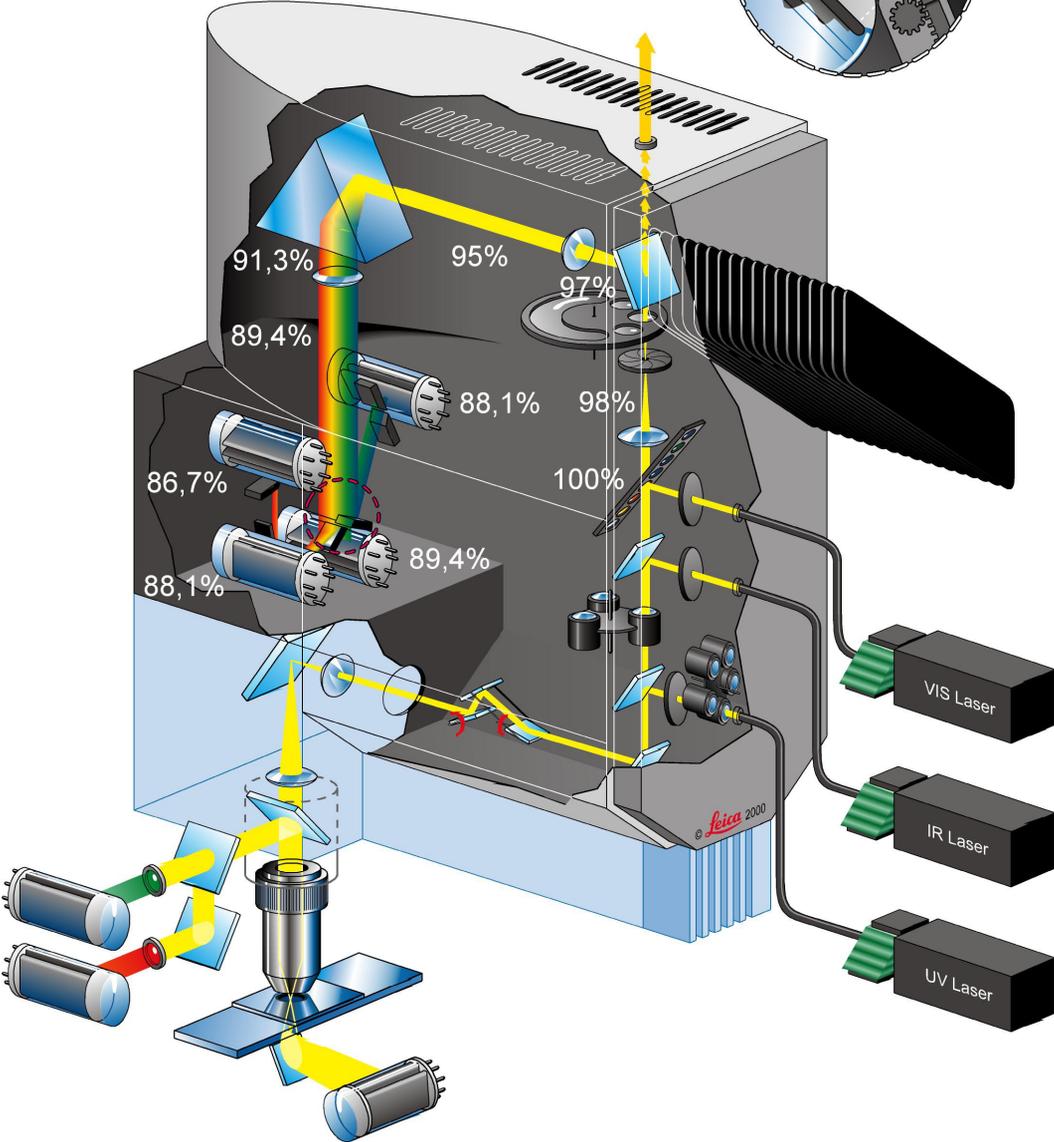
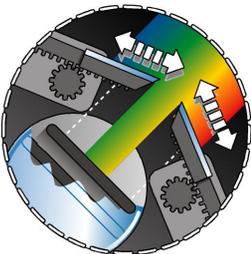


Leica TCS SL Microscopio confocal espectral

Leica
MICROSYSTEMS



Eficiencia Leica Microscopio Confocal Espectral



Confocal espectrofotómetro: Detectores Multi Banda

Ventajas vs filtros fijos:

- *Mayor transmisión, imágenes mas intensas, menos ruido*
- *Mejor respuesta espectral que con filtros: menos “crosstalk”*
- *La longitud de onda puede ser adaptada a las características reales de emisión de la muestra*
- *Fácilmente adaptable a nuevos fluorocromos*
- *Medidas del espectro de un fluorocromo*
- *Selección automática del ancho de banda*

Confocal espectrofotómetro: Detectores Multi Banda

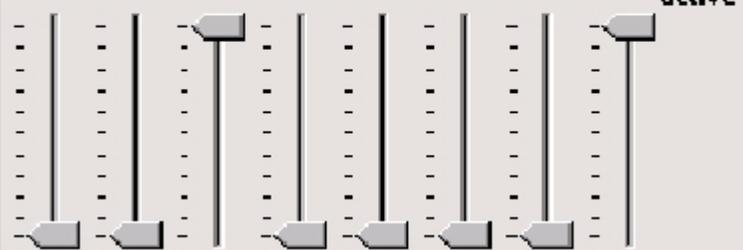
Especificaciones:

- *Transmisión superior al 85%*
- *Rango de longitudes de onda 400 ... 700 nm*
- *Factor de pendiente < 1.2 %*
 - Dichroic: 2.5 %*
 - Filtro: 3.3%*

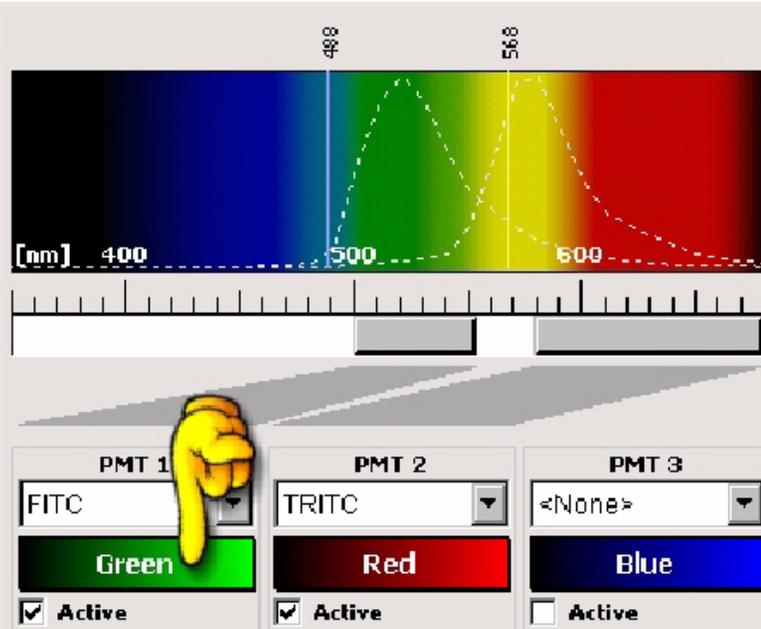
Configuración de la adquisición

HeNe/Kr
 Ar/UV
 IR/Kr

0% 0% 100% 0% 0% 0% 0% 100% active



458 nm 476 nm 488 nm 501 nm 514 nm 520 nm 568 nm 647 nm



| PMT 1 | PMT 2 | PMT 3 |
|--|--|---------------------------------|
| FITC | TRITC | <None> |
| Green | Red | Blue |
| <input checked="" type="checkbox"/> Active | <input checked="" type="checkbox"/> Active | <input type="checkbox"/> Active |

Configuración de la adquisición

TCS_Settings

ArKr Laser active

100 100 100 100

476 nm 488 nm 568 nm 647 nm

4 channel
FITC/TRITC
red wide
yellow wide

Save Close

DD488/568

Specimen
Transmission

[nm] 400 500 600 700 800

Stain: Dapi FITC TRITC Cy5.18

Clut: Blue Green Red Glow

active
 Ext.Dyn.

active
 Ext.Dyn.

active
 Ext.Dyn.

active
 Ext.Dyn.

active
 Ext.Dyn.

The screenshot displays the 'TCS_Settings' window. At the top, the 'ArKr Laser' is set to 'active' with four intensity sliders, each at 100. Below these are four vertical bars representing emission lines at 476 nm, 488 nm, 568 nm, and 647 nm. To the right, a list shows '4 channel' with 'FITC/TRITC', 'red wide', and 'yellow wide'. A spectral graph below shows emission curves for these channels, with a yellow arrow indicating the 488 nm line and a green arrow indicating the 568 nm line. At the bottom, four channels are configured: 'Dapi' (Blue), 'FITC' (Green), 'TRITC' (Red), and 'Cy5.18' (Glow). Each channel has an 'active' checkbox checked and an 'Ext.Dyn.' checkbox unchecked. A 'Specimen Transmission' section is also visible on the left.

Tercer gran cambio

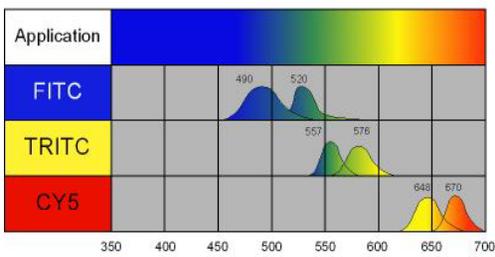
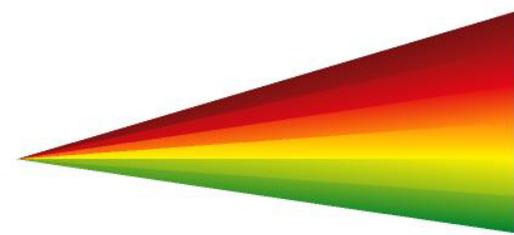
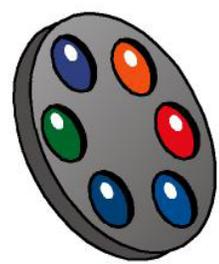


Confocal Ultra
Espectral

Emisión variable

Acousto Optical Beam Splitter

Conventional Filters

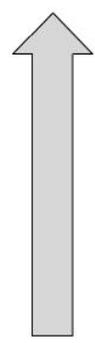
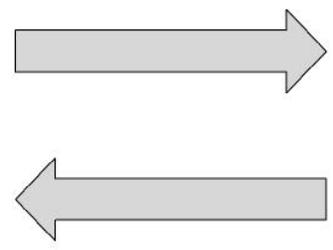


Dyes

Fluorescence

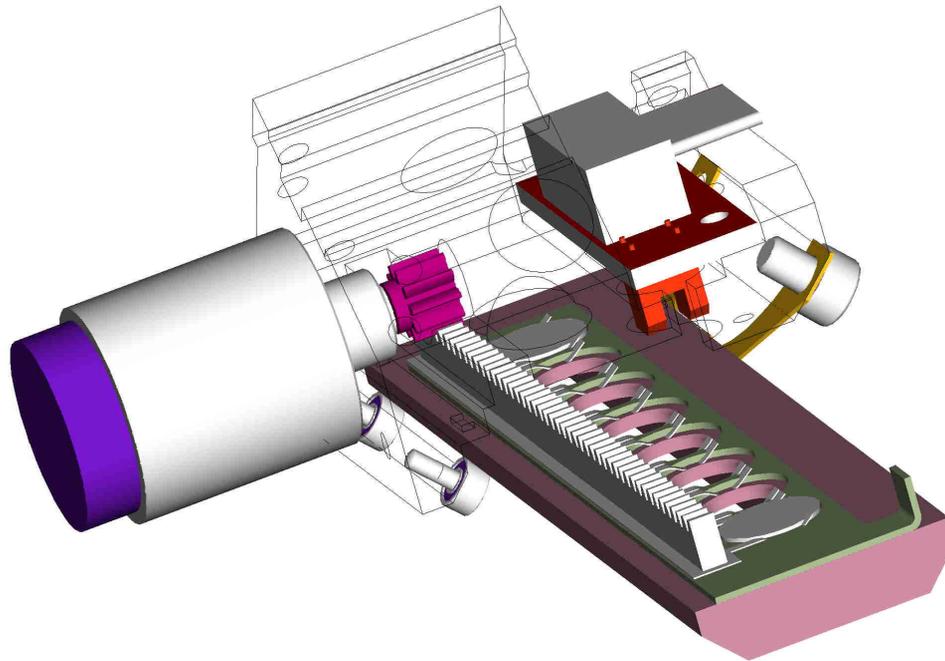


Excitation



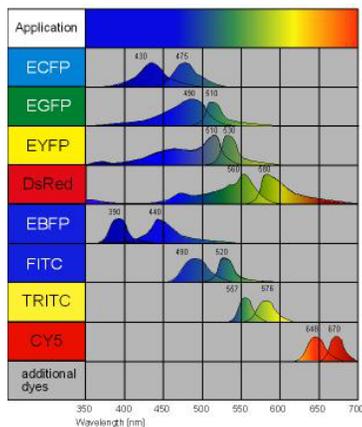
Mean Beam Splitter

Leica
MICROSYSTEMS

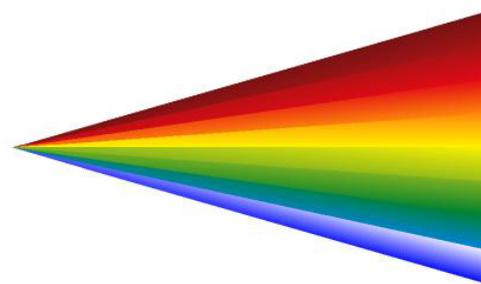
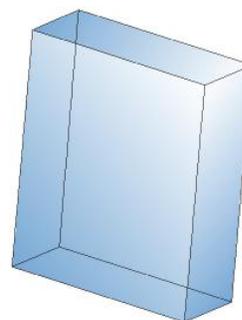


Leica AOBS

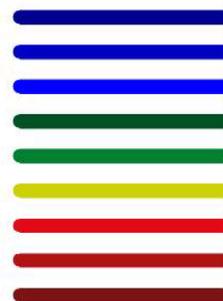
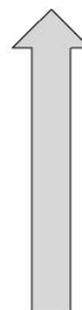
AOBS



Dyes

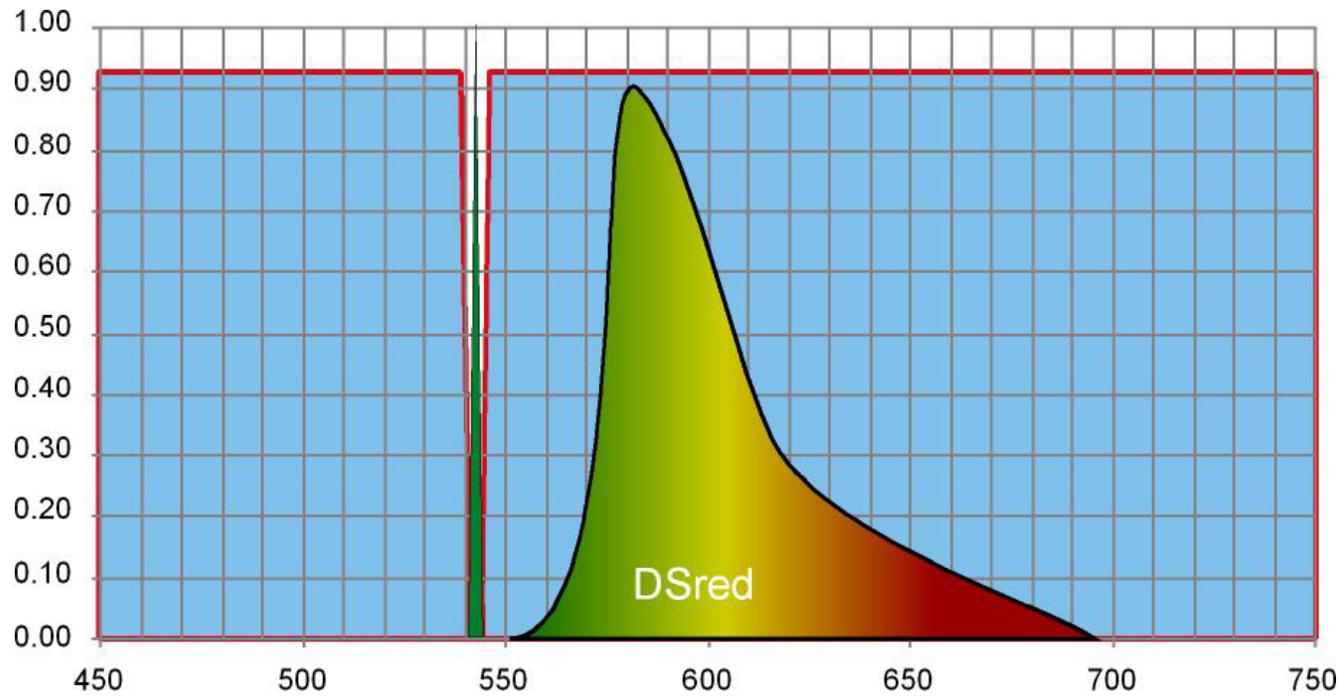


Fluorescence



Excitation

Curva del AOBS

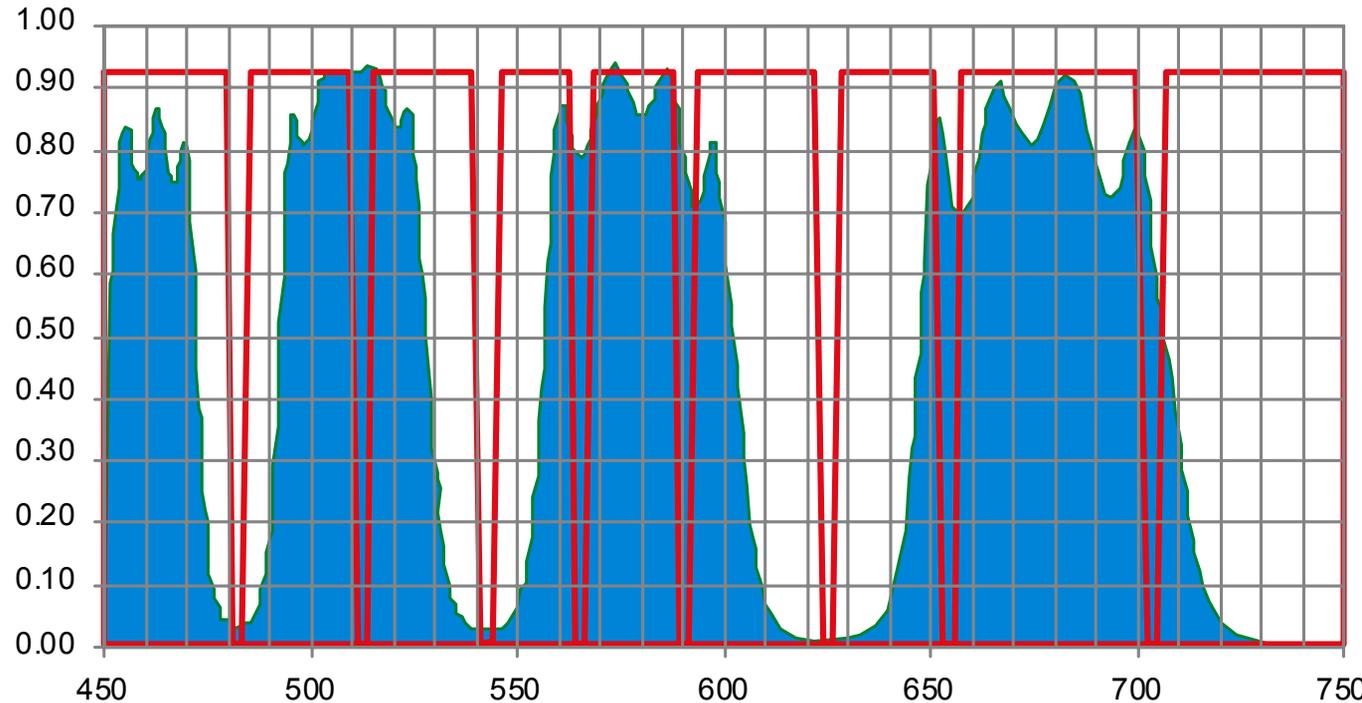


Combinación varios fluorocromos



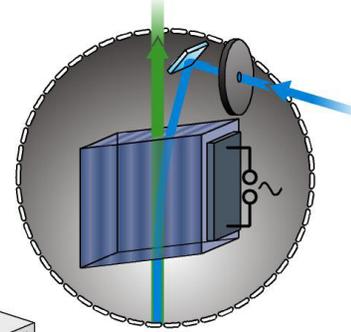
Triple Dichroic 488/543/633
(Chroma design curve)

Transmission 45°

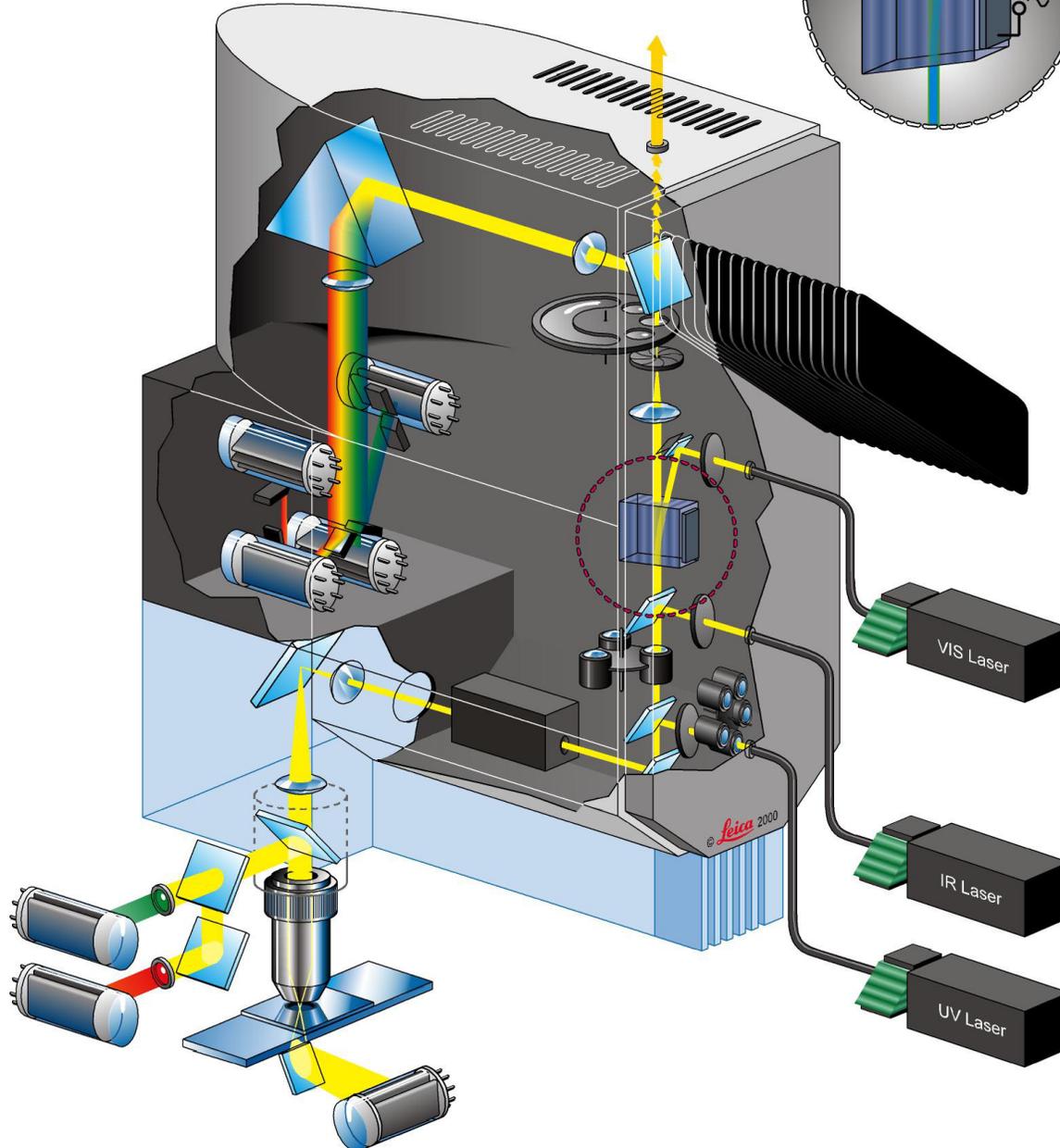


- Posibilidad de usar hasta 8 líneas simultáneamente
- Entre 0,6 y 2 nm. de ancho de banda

SP2-AOBS



Leica
MICROSYSTEMS



Configuración SP2-AOBS

Beam Path Setting

HeNe/Kr Ar/UV IR/Kr

0% 0% 0% 0% 0% 0% 0% 0% active

458 nm 476 nm 488 nm 501 nm 514 nm 520 nm 568 nm 647 nm

Leica

- L 2ph
- L Cy5
- L FITC-TRITC-Cy5 glowov
- L FITC-TRITC-Cy5
- L FITC-TRITC
- L FITC
- L FITCwide
- L GFP_458

AOBS

Specimen

PMT Trans

Cyan

Active
 Ext. Dyn.

PMT 1: <None> Green Active Ext. Dyn.

PMT 2: <None> Red Active Ext. Dyn.

PMT 3: <None> Blue Active Ext. Dyn.

PMT 4: <None> Gray Active Ext. Dyn.

Sequential Scan

Save Close