

Bases de la Microscopía Confocal



Integrantes:

Oscar Arellano
Alexis Díaz
Mario Pavez
Roxana Sagüés

Temario

- Introducción
- Tecnología
- Microscopía de Disco Giratorio
- Usos
- Conclusiones

Introducción

¿Qué es la microscopía confocal?

Primera Aproximación:

Tecnología que permite observaciones a una resolución mayor que aquella con microscopía óptica convencional.

Tipos de microscopios:

Ópticos (haz de fotones)

- Microscopio simple
- Microscopio compuesto
- Microscopio de luz ultravioleta
- Microscopio de fluorescencia
- Microscopio petrográfico
- Microscopio de campo oscuro
- Microscopio de contraste de fases
- Microscopio de luz polarizada
- Microscopio confocal
- Microscopios interferencia

Eléctricos (haz de electrones)

- Microscopio electrónico
- Microscopio electrónico de transmisión
- Microscopio electrónico de barrido
- Microscopio de iones en campo
- Microscopio de sonda de barrido
- Microscopio de efecto túnel

Otros

- De Fuerza Atómica
- Microscopía Virtual

Introducción

Segunda Aproximación

Microscopio Confocal

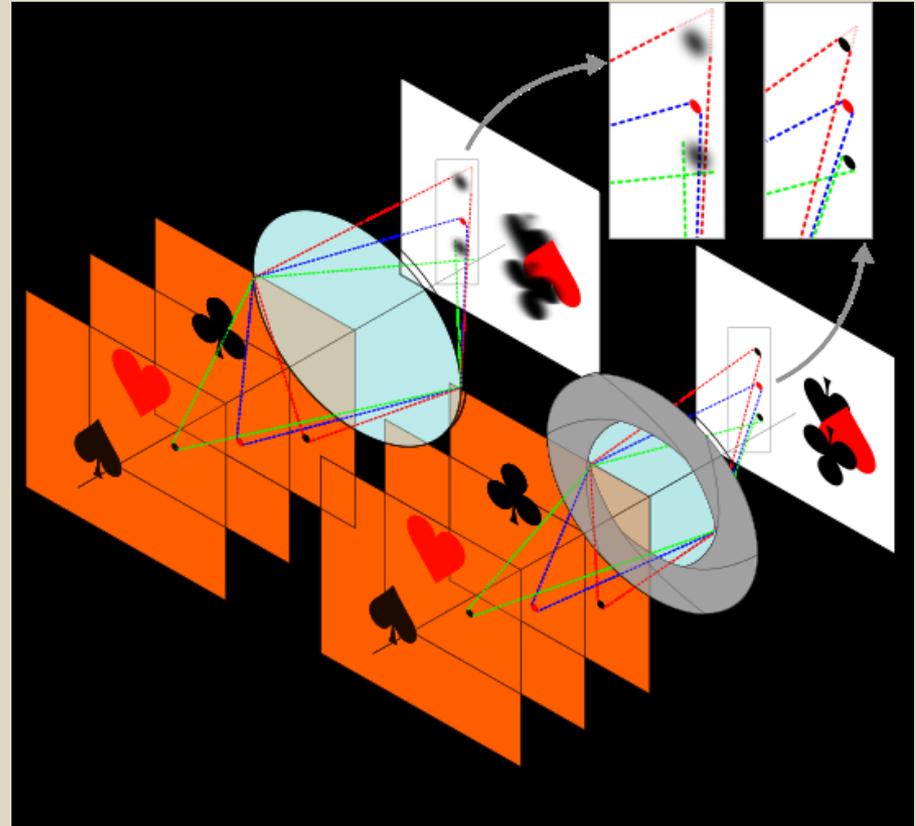
Emplea técnica óptica de imagen para incrementar el contraste y reconstruir imágenes 3D utilizando un “pinhole” para eliminar la luz desenfocada o destellos. (espacio y tiempo)

Pinhole: apertura localizada delante del fotomultiplicador que evita el pasaje de fluorescencia de las regiones de la muestra que no están en foco.



Introducción

Analogía con las máquinas fotograficas antiguas (de pin hole):



Introducción

¿dónde se usa esta tecnología?

En ciencias biológicas y en la inspección de semiconductores.

Historia:

- Patentado 1957 (imagen confocal)
- Microscopio de fluorescencia vs Microscopio Confocal

M. de Fluorescencia

Todo el espécimen sobresaturado de luz y la fluorescencia detectada por el fotodetector (cámara)

M. Confocal

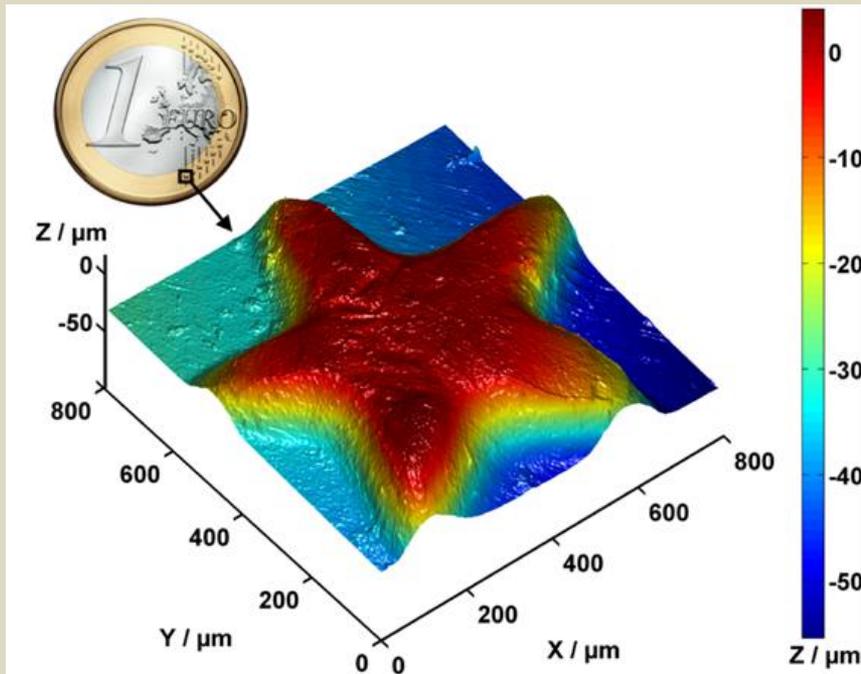
Iluminación puntual y pinhole sólo la luz en ese plano se detecta (no se detecta la información fuera del plano focal)

Requiere de scanning sobre raster regular del espécimen para imágenes

Introducción

Tipos de microscopios confocales comercializados:

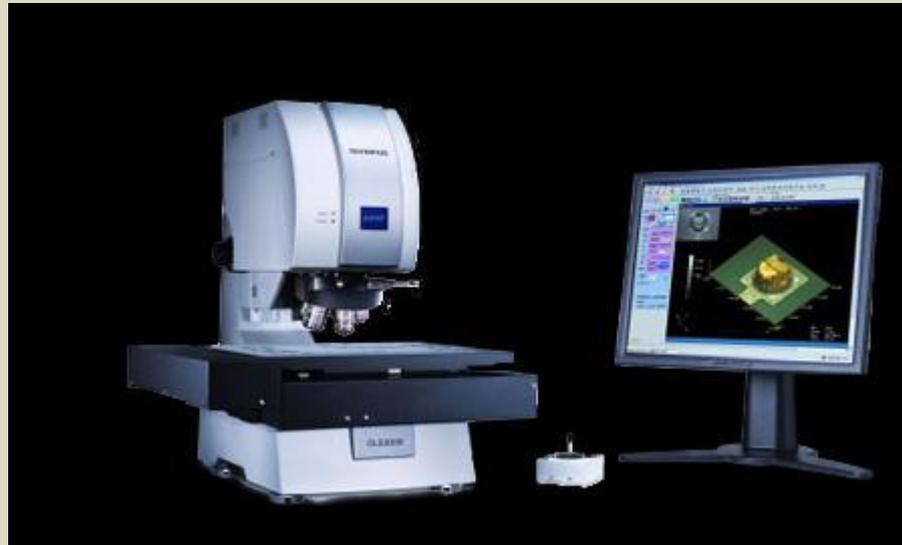
- Microscopio confocal láser de barrido
- el microscopio confocal de disco giratorio (disco de Nipkow)
- microscopios de matriz programable, (Programmable Array Microscope, PAM).



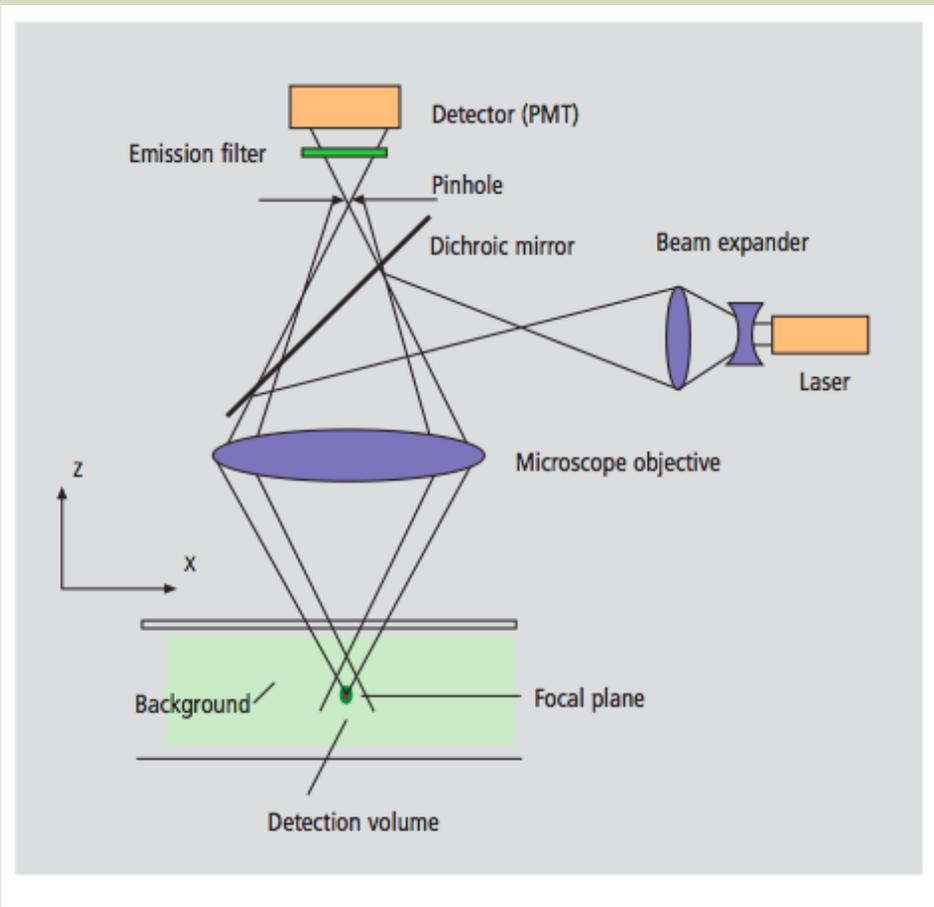
moneda de 1 Euro medido con un microscopio confocal de disco de Nipkow

Introducción

¿Qué apariencia tienen estos microscopios?



La microscopía confocal combina un láser enfocado para la excitación y un orificio (pinhole) para la detección, mejorando así la resolución espacial.



Pasos para la obtención de una imagen bi-dimencional desde un plano focal:

1. Barrido línea por línea de la muestra con un haz de láser desviado a los ejes X e Y.
2. Detección de la fluorescencia emitida, píxel por píxel por medio de un tubo fotomultiplicador (PMT).
3. Digitalización de los objetos contenidos en la señal eléctrica.

Con el microscopio confocal es posible generar una delgada rebanada óptica de la muestra cuyo espesor (dimensión Z) puede ser inferior a 500nm.

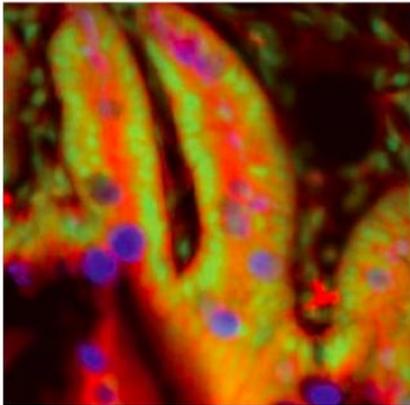


Imagen no confocal

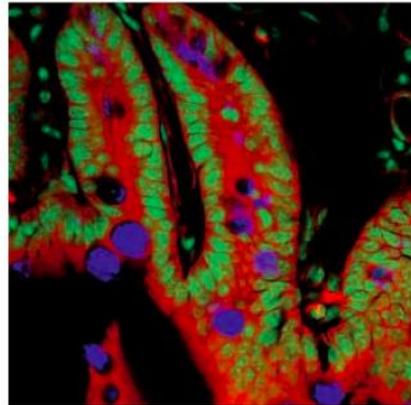
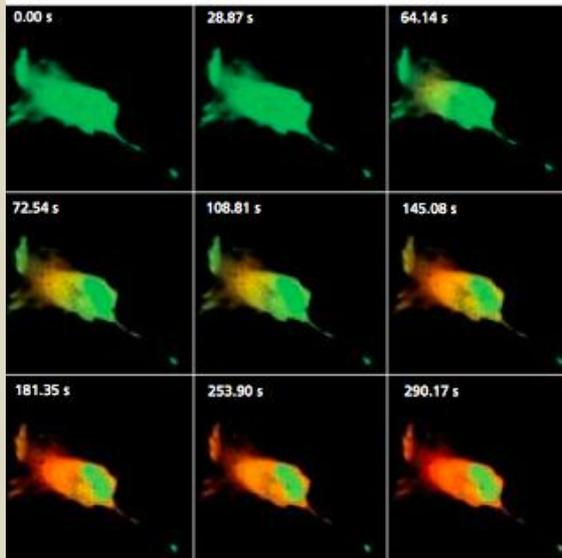
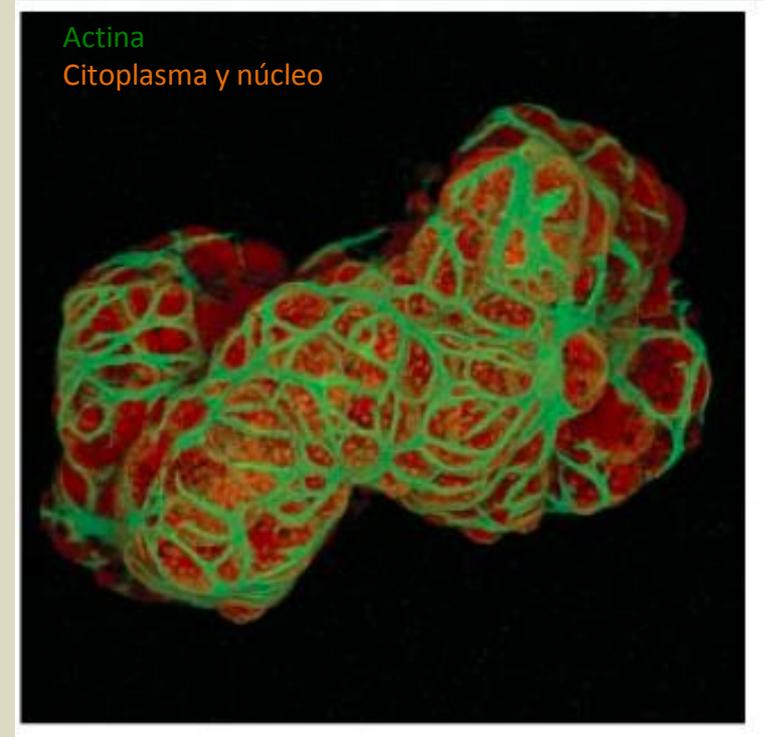


Imagen confocal

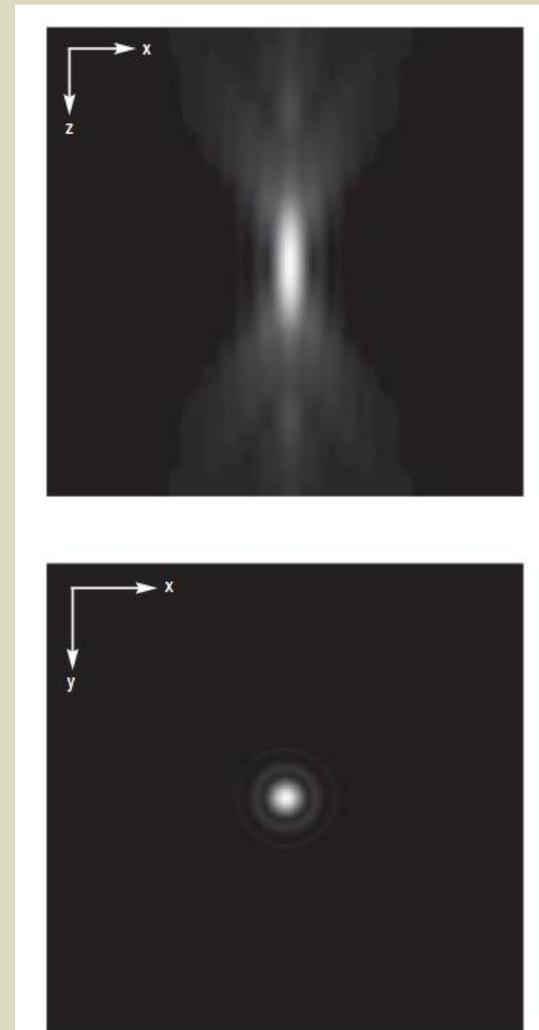
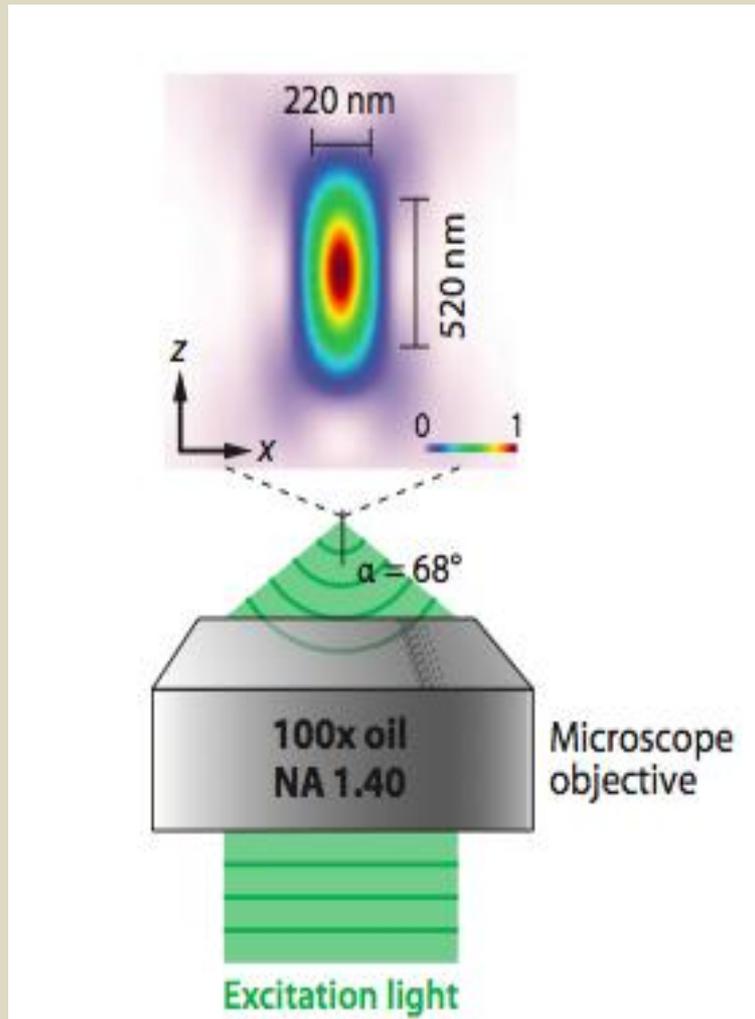
Time series (rango de microsegundos)



Reconstrucción 3D de glándula lacrimonal (108 slide ópticos)

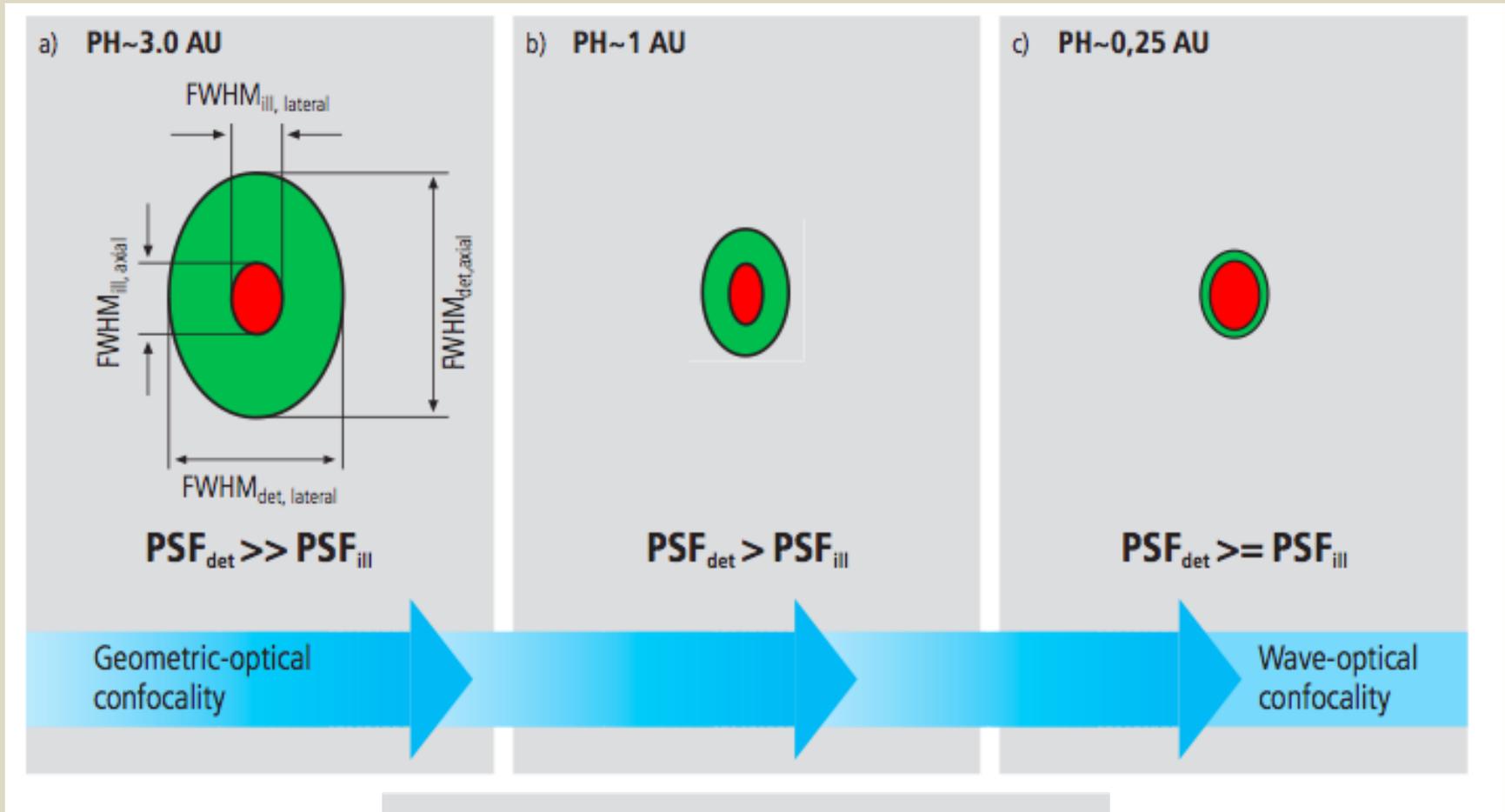


La PSF es la imagen bidimensional de un punto del espacio objeto y su tamaño determina la resolución del microscopio



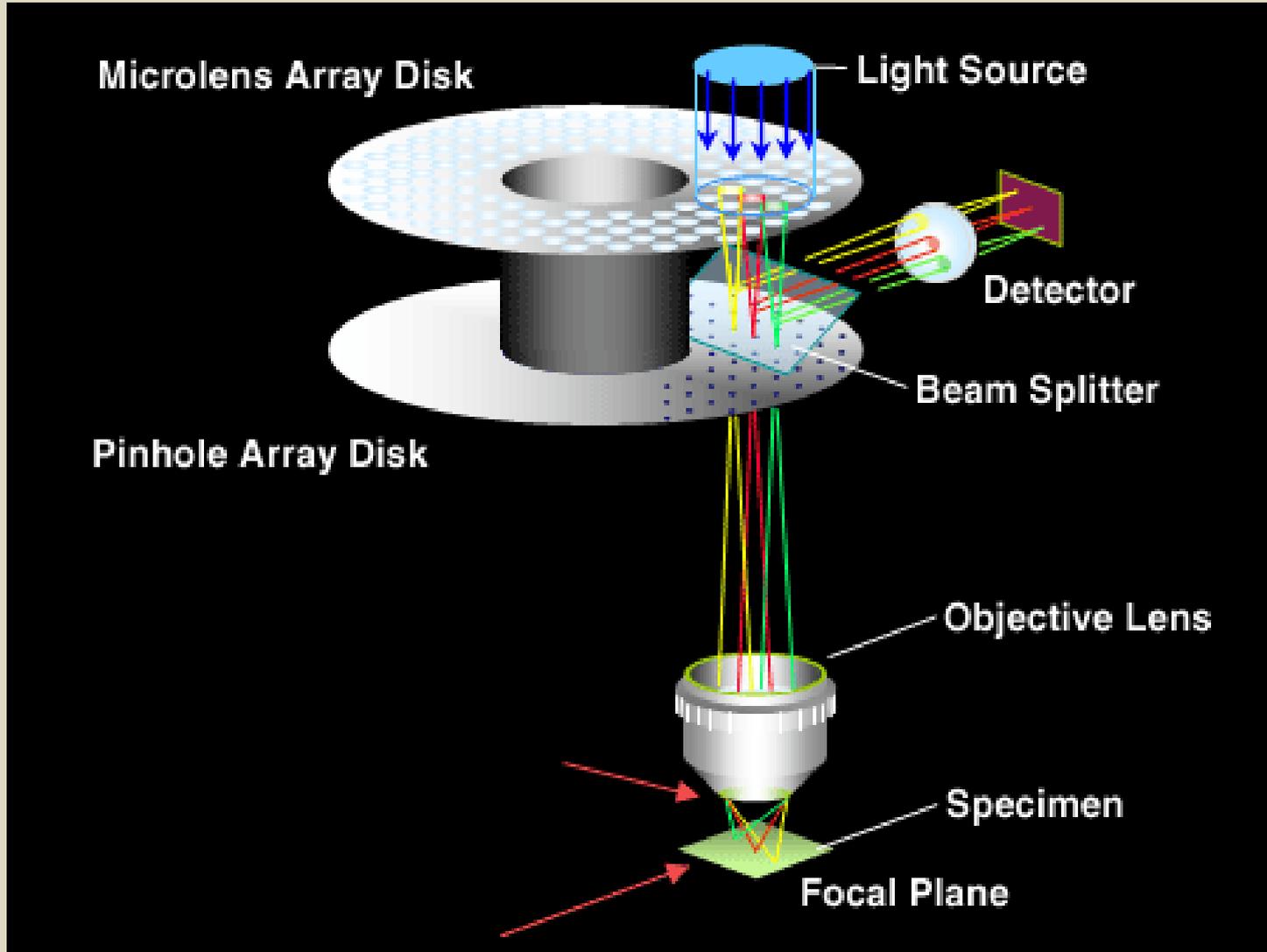
Índice de refracción = 1,515

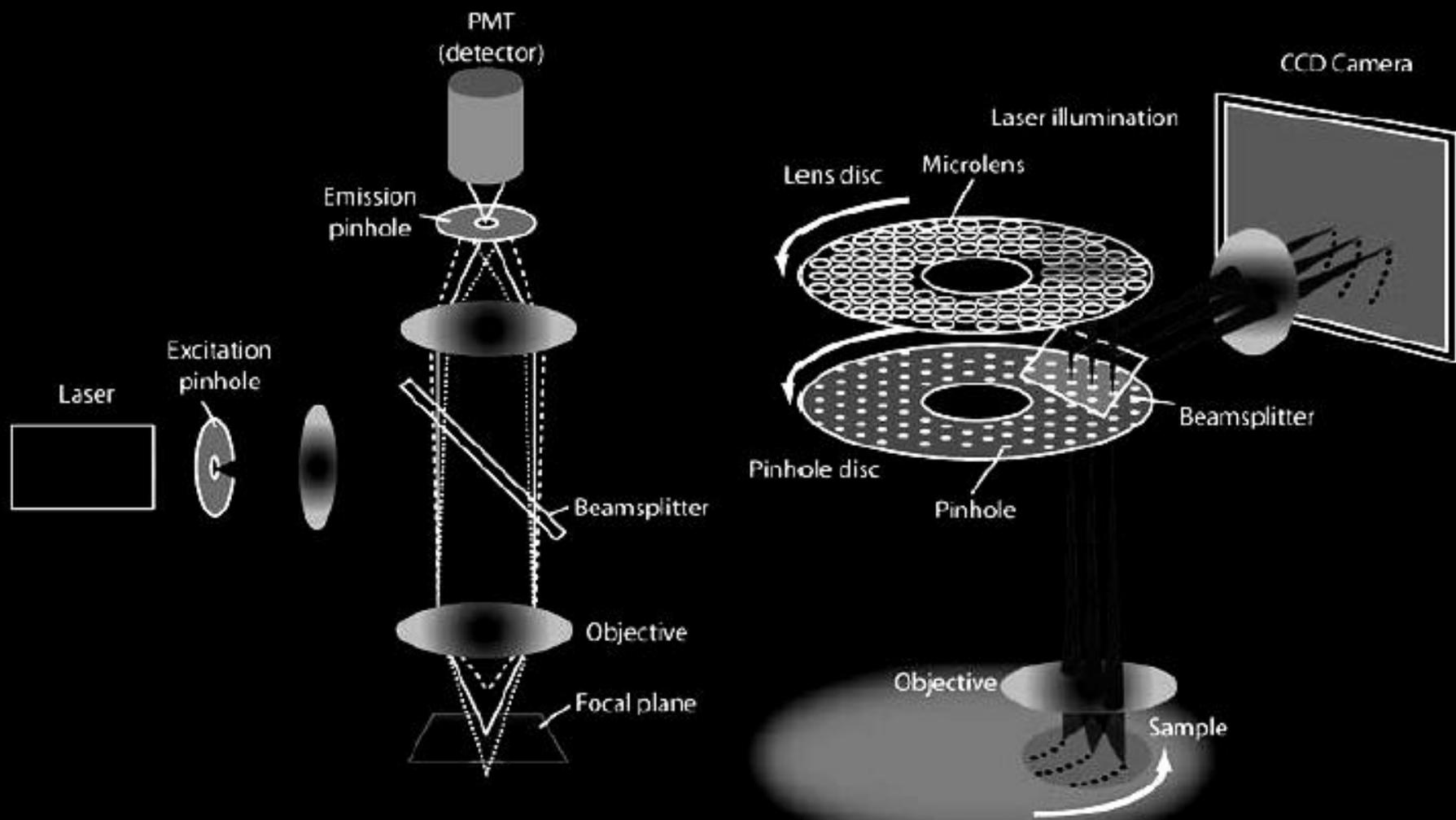
La PSF depende de la PSF de iluminación y de la PSF de detección

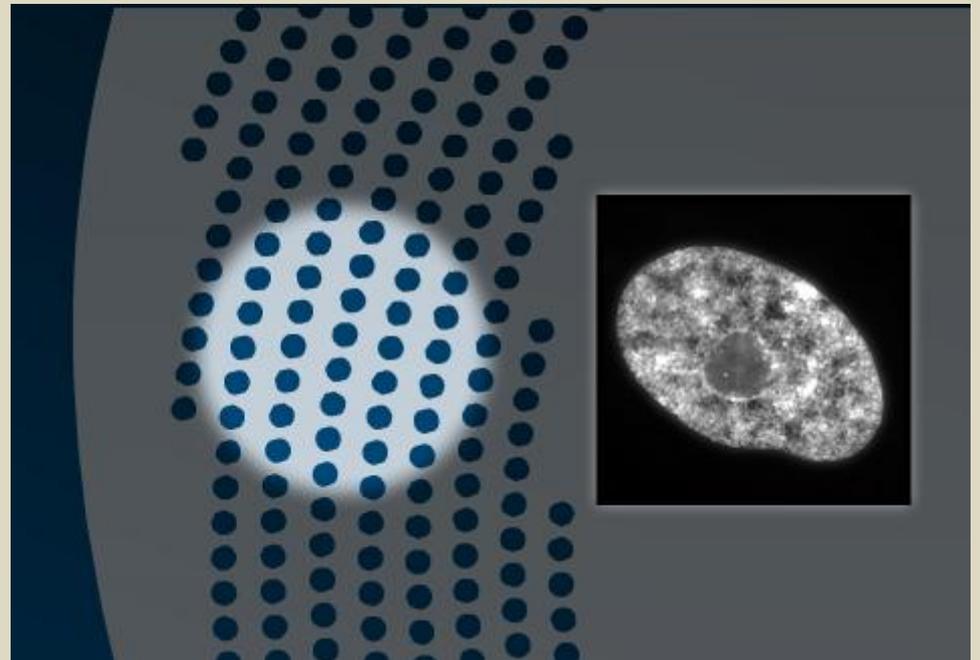
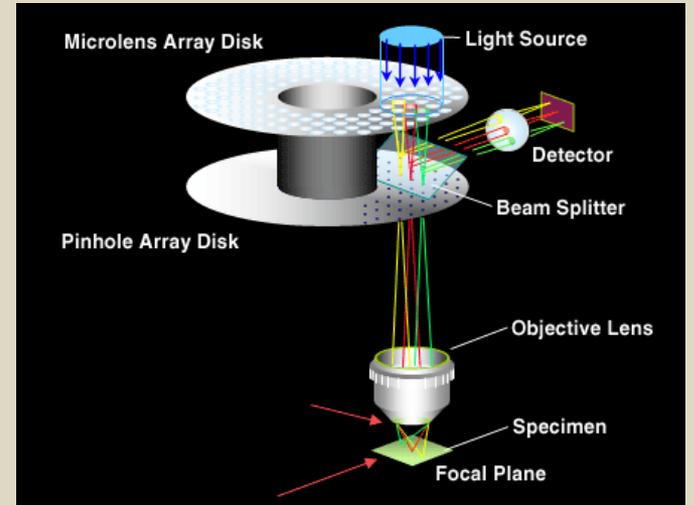
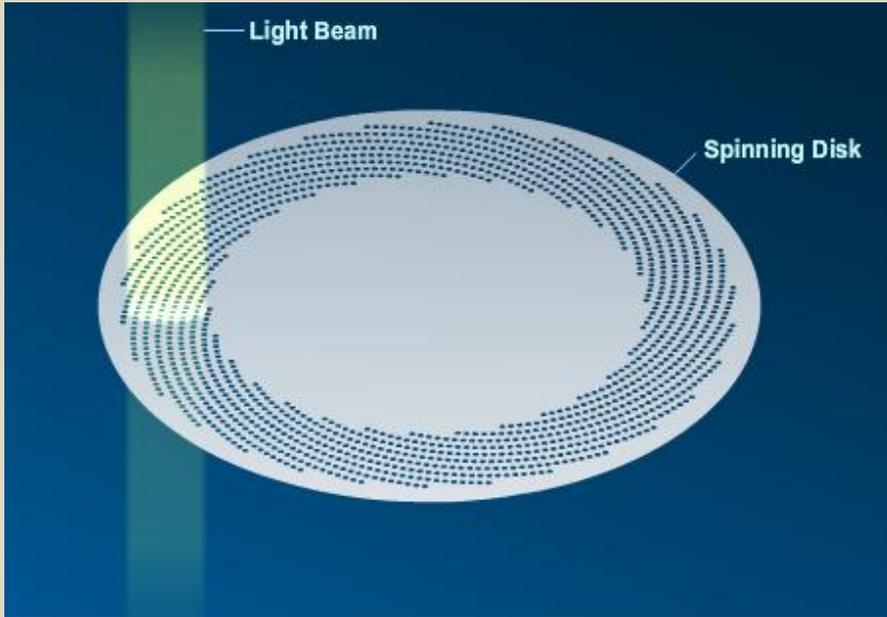


$$PSF_{tot}(x,y,z) = PSF_{ill}(x,y,z) \cdot PSF_{det}(x,y,z) \quad (1)$$

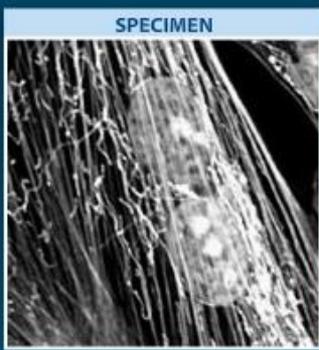
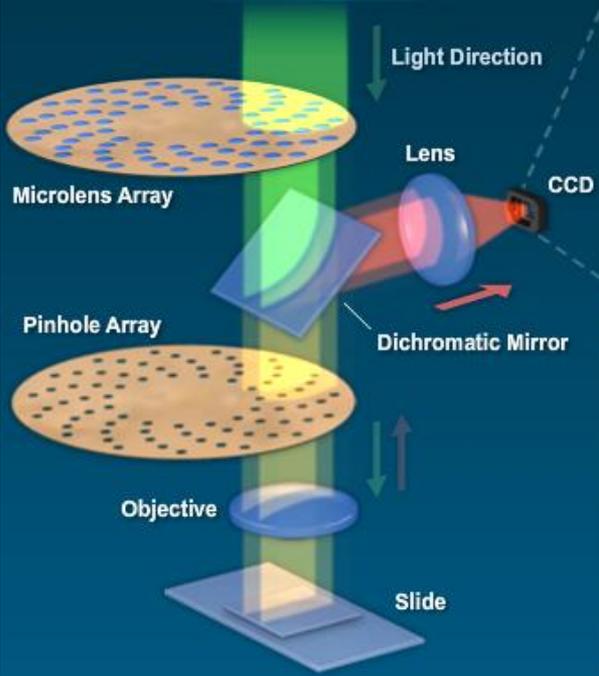
Spinning Disk Microscopy



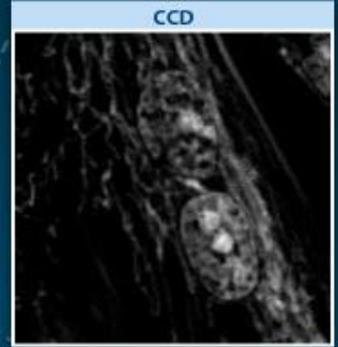
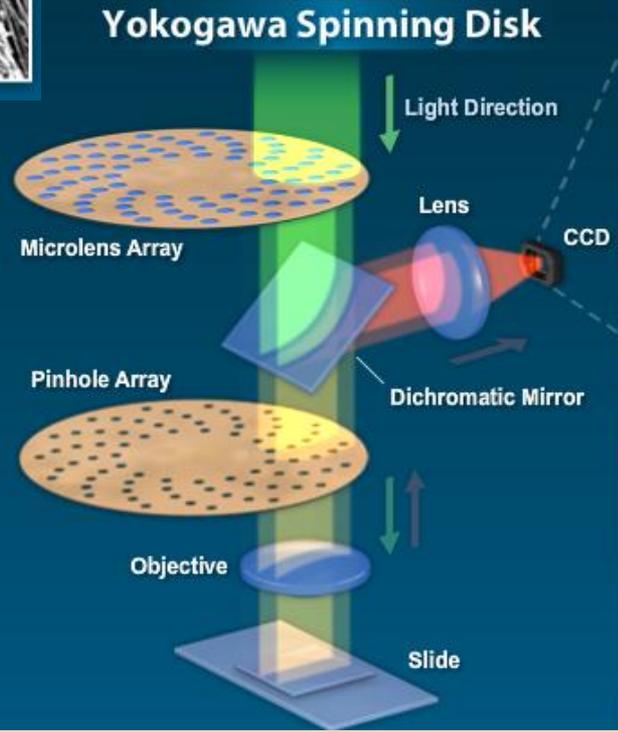




Yokogawa Spinning Disk



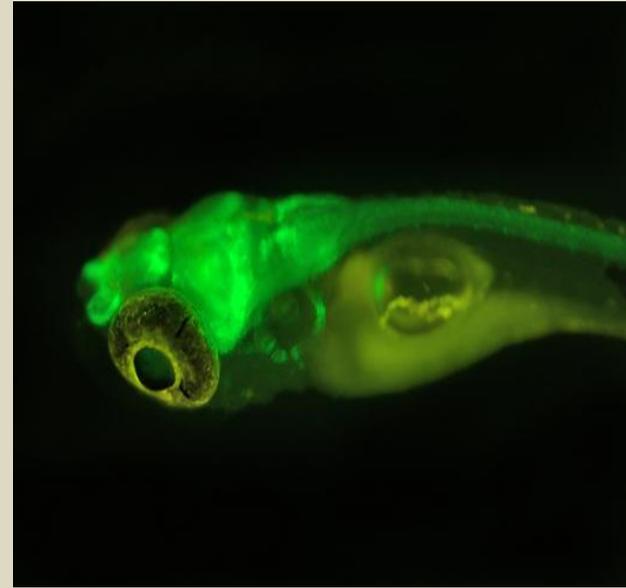
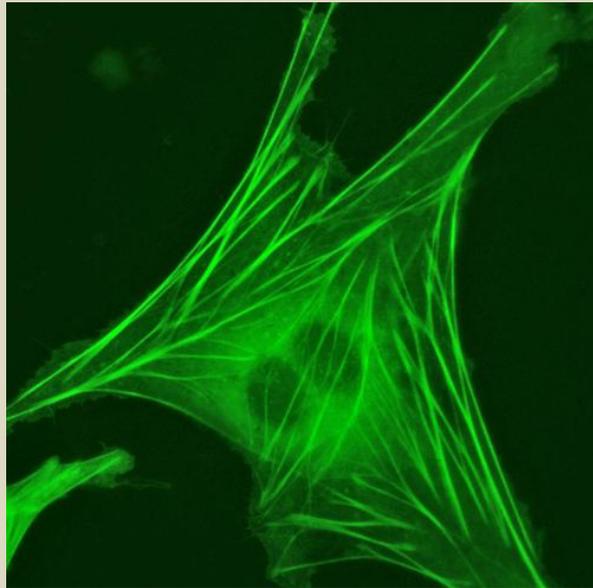
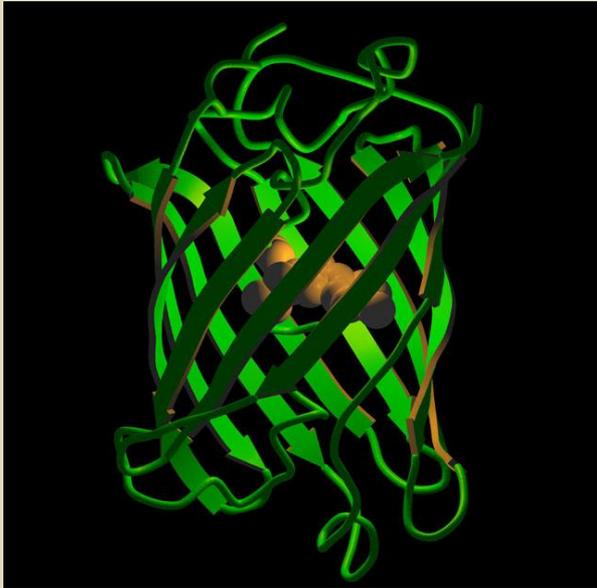
Yokogawa Spinning Disk



Microscope type	Single beam confocal microscope	Multi beam confocal microscope
Acquisition speed	Limited frame rate +	High frame rate +++
Detection efficiency	Photomultiplier tube +	CCD camera ++
Bleaching rates for equivalent images	Higher, more emission photons required +	Lower, less emission photons required ++
Multichannel imaging	Simultaneous detection, sequential detection ++	Sequential detection +
Region specific bleaching	Possible ++	Not possible (w/o additional hardware) -
Optical sectioning, axial resolution	Adjustable pinhole diameter ++	Fixed pinhole diameter, possible crosstalk between neighboring pinholes +

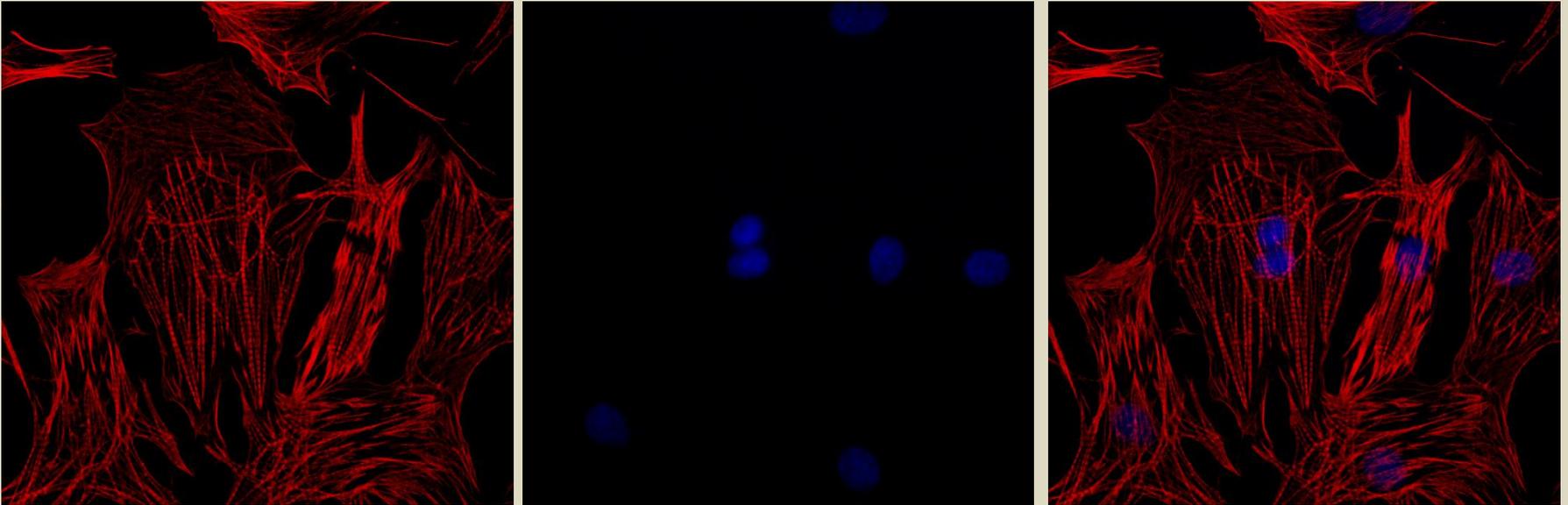
Usos del microscopio confocal

1. Permite la adquisición de imágenes de células, tejidos u órganos tanto vivas como fijadas.



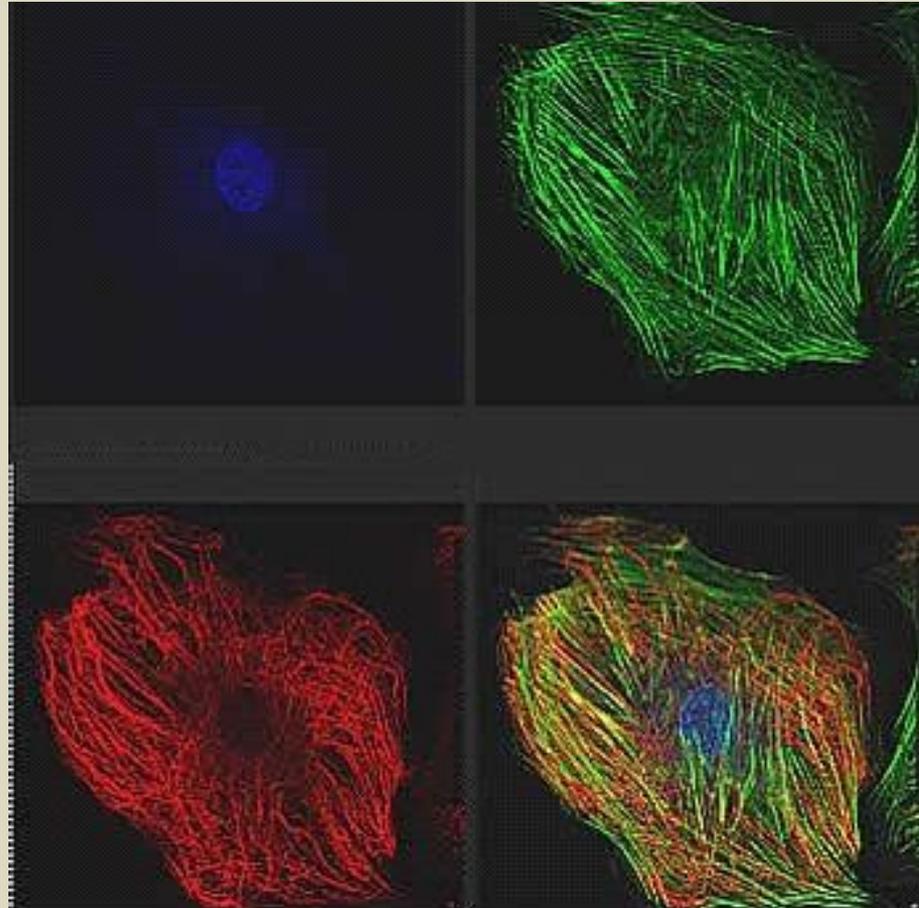
Usos del microscopio confocal

2. Localización de estructuras subcelulares.



Usos del microscopio confocal

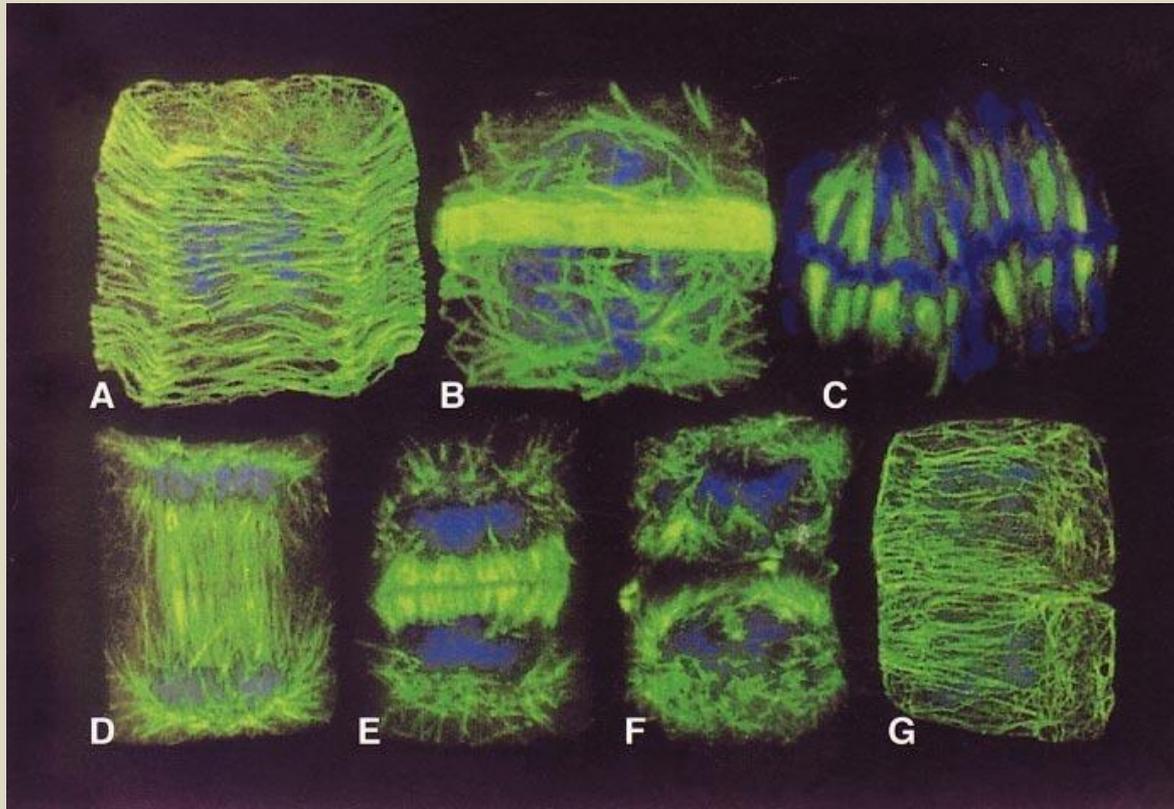
3. Colocalización de estructuras subcelulares.



**Análisis de Colocalización con 3 marcadores:
1-dapi; 2-verde; 3-rojo; 4-Mezcla**

Usos del microscopio confocal

4. Cinéticas de estructuras subcelulares.

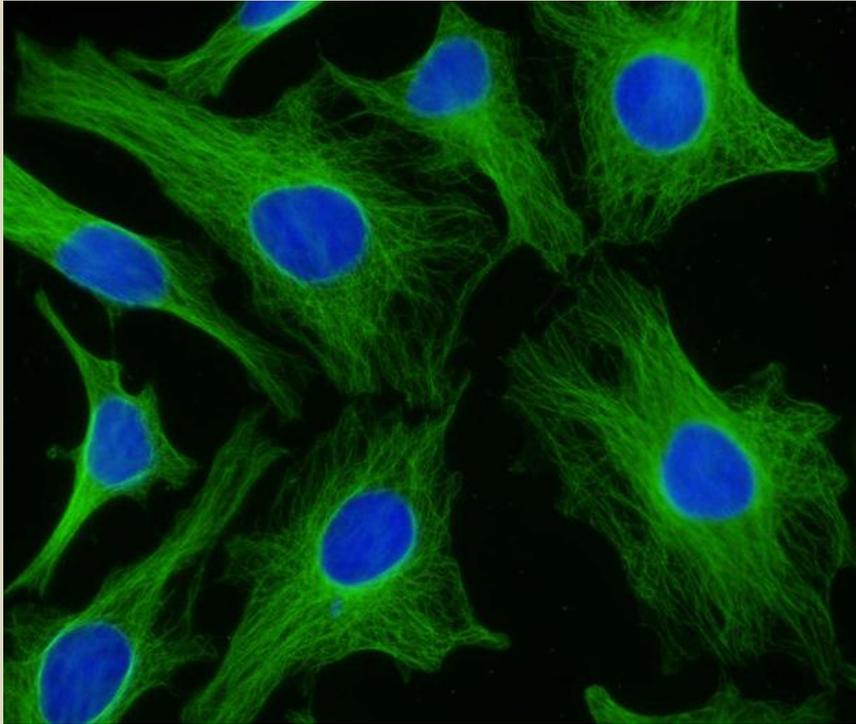


Algunas Desventajas

- 1) La adquisición de imágenes por confocal emplea mas tiempo que la captura por fluorescencia, ya que el láser emplea un tiempo en el barrido.
- 2) El láser provoca citotoxicidad debido a que genera radicales libres.
- 3) El confocal capta, gracias al pinole, solo la luz que procede de un plano, pero el laser ilumina, y por tanto va apagando, todo el grosor de la muestra.



En conclusión



3) Permite técnicas de ubicación subcelular, tisular, cinéticas y colocalización.

- 1) El microscopio confocal permite capturar planos ópticos y reconstituirlos para formar una imagen tridimensional
- 2) Los elementos que diferencian un confocal de un microscopio convencional son el laser y el pinhole.
 - a) Evita el cruce de canales.
 - b) Permite una mejor resolución.



...



JORGE CHAM © 2008



WWW.PHDCOMICS.COM