

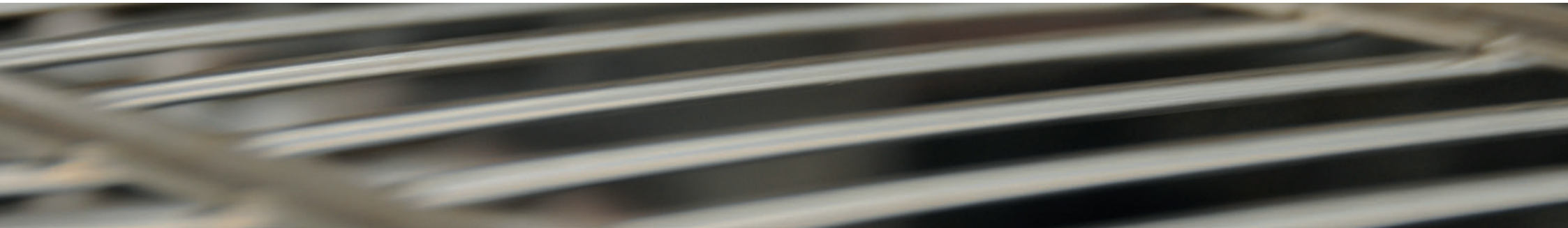
microscopio
epi-fluorescencia



microscopio epi-fluorescencia

Ciertas sustancias en virtud de su estructura química son capaces de emitir luz de una determinada longitud de onda tras absorber luz de una longitud de onda menor. Esta propiedad es denominada fluorescencia y es característica de ciertas moléculas como por ejemplo colágeno, elastina, lignina o clorofila y de una serie de compuestos químicos, los fluorocromos (FITC, DAPI, TRITC) con aplicaciones muy numerosas y variadas; entre ellas dos técnicas de rutina en laboratorios de investigación y diagnóstico para las cuales se hace indispensable el uso del microscopio de fluorescencia:

- Inmunofluorescencia (IF): consiste en la detección y marcaje de determinadas moléculas de interés en biopsias o cortes histológicos mediante la utilización de anticuerpos específicos conjugados con un determinado fluorocromo lo que permite el diagnóstico de ciertas enfermedades.
- Hibridación in situ con fluorescencia (FISH): consiste en la hibridación de determinados fragmentos de DNA con sondas marcadas con fluorocromos, permitiendo la detección de mutaciones y alteraciones genéticas y resultando por tanto de gran utilidad en el diagnóstico prenatal y la detección y diagnóstico de ciertos tumores.



fundamentos teóricos

La epi-fluorescencia o fluorescencia de luz reflejada se basa en la incidencia de un haz de luz de una determinada longitud de onda sobre la muestra a observar. Esta muestra absorbe la energía de la luz incidente emitiendo a su vez luz a una longitud de onda mayor.

Para permitir este fenómeno es necesaria la utilización de un sistema de filtros (cubos) con los siguientes componentes:

- Filtro de excitación (EX): selecciona la luz de la longitud de onda incidente.
- Espejo dicroico (DM): refleja la luz de ciertas longitudes de onda mientras que deja pasar la luz de longitudes de onda mayores. Refleja, por tanto, la luz de excitación haciendo que llegue a la muestra mientras que deja pasar la luz emitida por la sustancia fluorescente.
- Filtro de emisión o barrera (BA): selecciona la longitud de onda fluorescente emitida por el fluorocromo permitiendo que llegue hasta los oculares.

En el siguiente gráfico se muestra un esquema del funcionamiento del microscopio de epi-fluorescencia. La luz procedente de la fuente (lámpara de mercurio), atraviesa un primer filtro que selecciona la longitud de onda capaz de excitar al fluorocromo. Esta luz se refleja en un espejo dicroico e incide sobre la muestra, excitando al fluorocromo que emite fotones de una longitud de onda mayor que la incidente. La luz emitida por la muestra no se refleja sino que atraviesa el espejo dicroico y llega a un segundo filtro que selecciona la longitud de onda de emisión del fluorocromo, permitiendo que llegue a los oculares.

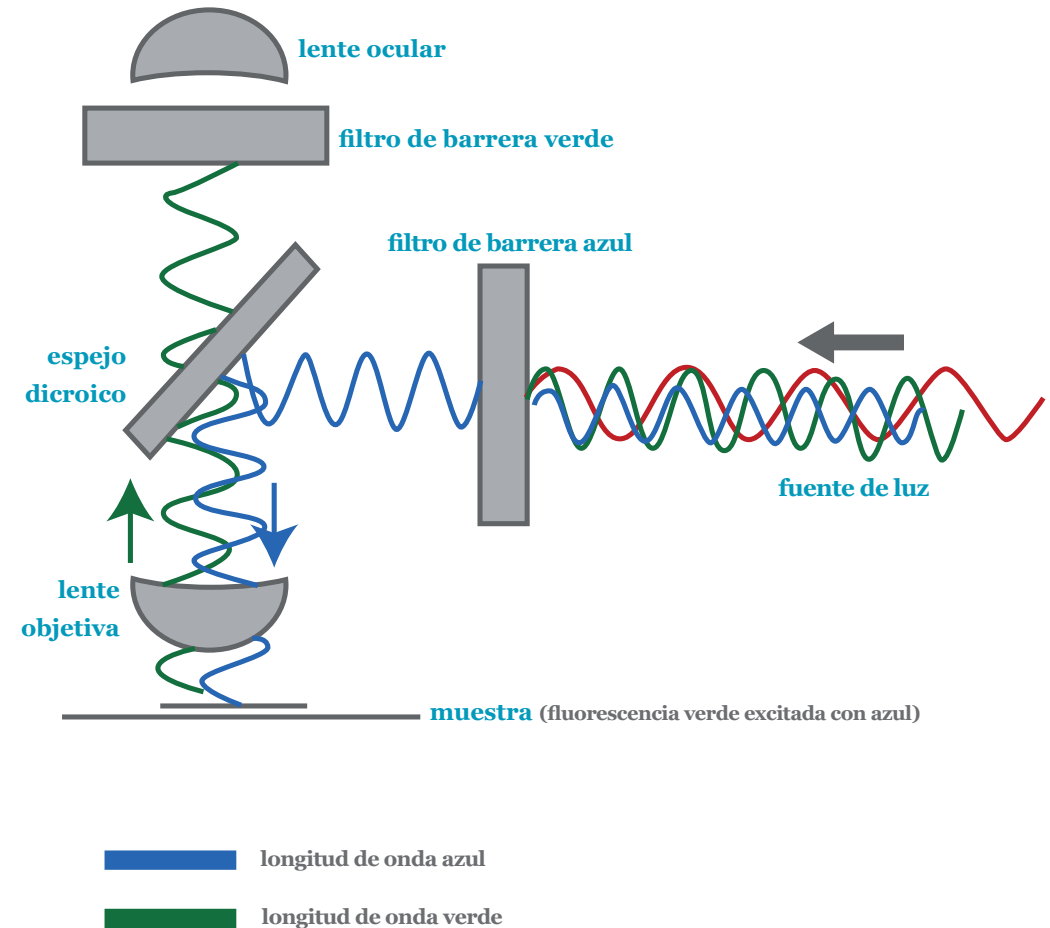
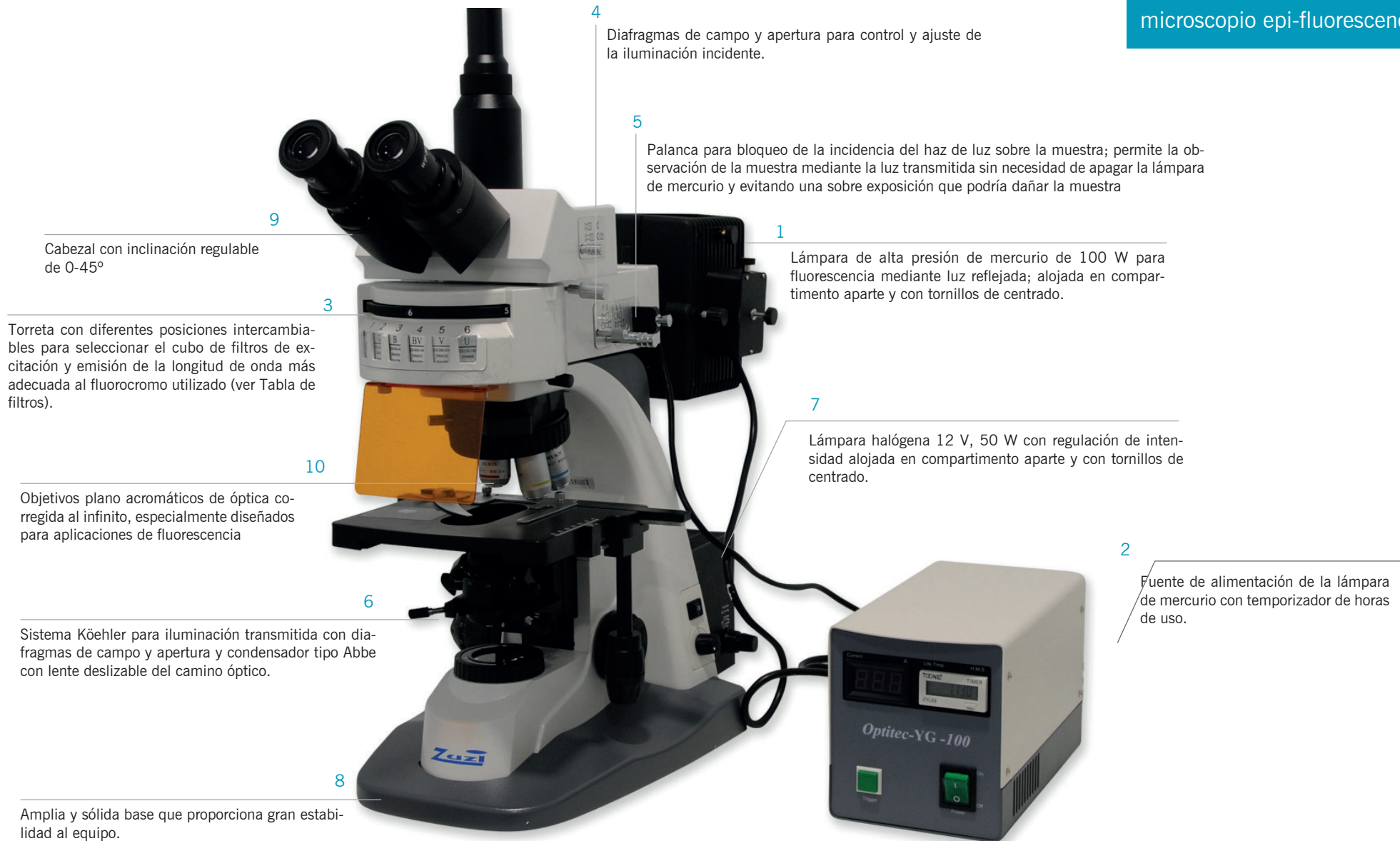


tabla
de
filtros



Posición torreta	Filtro excitación (EX)	Filtro emisión (BA)	Espejo dicroico (DM)	Fluorocromo aplicable
V (verde)	510-560	590	575	TRITC Ficoeritrina Bromuro de etidio
B (azul)	450-490	520	505	FITC GFP Cy2
BV (azul/violeta)	400-440	470	455	Naranja de acridina Amarillo de acridina Alexa flúor 488
V (violeta)	380-420	450	430	---
U (ultravioleta)	330-380	420	400	DAPI Alexa flúor 350

microscopio epi-fluorescencia



4 Diafragmas de campo y apertura para control y ajuste de la iluminación incidente.

5 Palanca para bloqueo de la incidencia del haz de luz sobre la muestra; permite la observación de la muestra mediante la luz transmitida sin necesidad de apagar la lámpara de mercurio y evitando una sobre exposición que podría dañar la muestra

9 Cabezal con inclinación regulable de 0-45°

1 Lámpara de alta presión de mercurio de 100 W para fluorescencia mediante luz reflejada; alojada en compartimento aparte y con tornillos de centrado.

3 Torreta con diferentes posiciones intercambiables para seleccionar el cubo de filtros de excitación y emisión de la longitud de onda más adecuada al fluorocromo utilizado (ver Tabla de filtros).

7 Lámpara halógena 12 V, 50 W con regulación de intensidad alojada en compartimento aparte y con tornillos de centrado.

10 Objetivos plano acromáticos de óptica corregida al infinito, especialmente diseñados para aplicaciones de fluorescencia

6 Sistema Köehler para iluminación transmitida con diafragmas de campo y apertura y condensador tipo Abbe con lente deslizable del camino óptico.

2 Fuente de alimentación de la lámpara de mercurio con temporizador de horas de uso.

8 Amplia y sólida base que proporciona gran estabilidad al equipo.

características técnicas

Referencia	HBFO01
Cabezal	Triocular, inclinación regulable 0-45°; ajuste de distancia interpupilar (50-75 mm) y corrección dióptrica
Óptica	Corregida a infinito
Oculares	WF10x/20
Revólver	Séxtuple
Objetivos	Plano apo-cromáticos de fluorescencia corregidos al infinito 4x, A.N.: 0.15 10x, A.N.: 0.35 40x (R), A.N.: 0.75 100x (R), A.N.: 0.90
Platina	Mecánica de doble lecho (180x160 mm); desplazamiento (80x50 mm)
Condensador	Abbe (AN: 1.25), con lente condensadora deslizable
Iluminación	Tipo Köehler con diafragmas de campo y apertura
Fuente luz	
Epi-fluorescencia	Lámpara de alta presión de mercurio 220 V, 100 W
Transmitida	Lámpara halógena 12 V, 30 W

**tabla
características
objetivos**



Objetivo	4x	10x	40x	100x
Apertura numérica	0.15	0.35	0.75	0.90
Long. tubo mecánico	∞	∞	∞	∞
Grosor cubre	0.17	0.17	0.17	0.17
Color ref.	Rojo	Amarillo	Azul	Blanco
Sistema	Seco	Seco	Seco	Seco
Distancia trabajo	21.6	2.9	0.6	0.62
Diámetro campo visión	6	2.4	0.60	0.24
Resolución	2.24	0.96	0.45	0.37