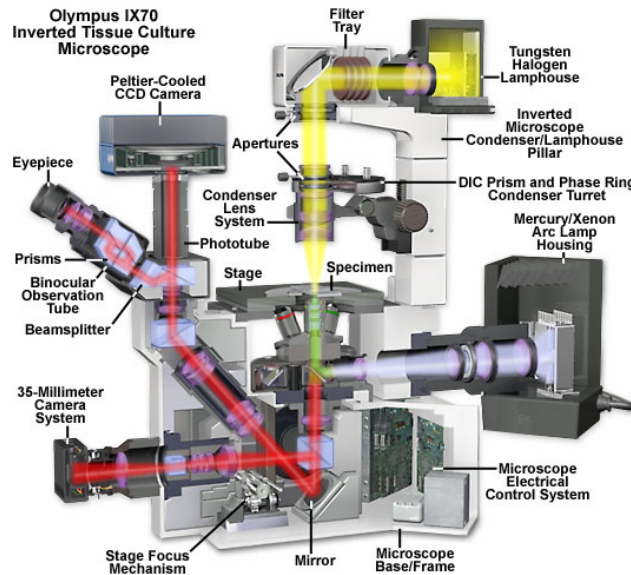


FLUORESCENCIA

JUAN BARBOSA - 201325901

La microscopía de fluorescencia es una importante técnica de microscopía ya que permite observar objetos diminutos con gran magnificación y resolución. En el caso de la fluorescencia no se usa luz transmitida sino luz reflejada (o luz emitida por la muestra).



El esquema general del camino óptico de un microscopio de fluorescencia se muestra en la figura anterior. Un haz de luz se hace incidir sobre un filtro pasa bandas, el cual se conoce como el filtro de excitación. Posteriormente el haz pasa por el espejo dicróico, el cual refleja y transmite longitudes de onda específicas. Parte de la luz va en dirección a la muestra, donde la luz incidente excita los fluoróforos en la muestra. Estos pueden ser propios de la muestra (autofluorescencia) o tintes agregados a la misma. La luz emitida pasa a través del dicróico hasta alcanzar el filtro de emisión, el cuál permite limitar la cantidad de fluoróforos detectados. Finalmente la luz llega al ocular, o a una cámara CCD.

1. Qué es un filtro de densidad neutra

Los filtros de densidad neutra son filtros que reducen la intensidad de la luz de forma homogénea para todas las longitudes de onda de la luz incidente.

2. Para qué la apertura numérica está optimizada para la cámara si se considera un factor de muestreo de 3?

En el datasheet se especifica que el tamaño de los pixeles es de $6.45 \times 6.45 \mu\text{m}$. En una ccd la luz se proyecta sobre el plano de los pixeles. Existen dos posibles efectos en la proyección, por un lado es posible que demasiados pixeles contengan al mismo punto de Airy, lo cual implica información redundante. En el caso opuesto cada pixel tendrá la información de varios círculos de Airy, lo cual no permite resolver los detalles.

El tamaño de la proyección será entonces:

$$P = \left(\frac{1.22\lambda}{2NA} \right) M \quad \text{M: magnificación, NA: apertura numérica} \quad (1)$$

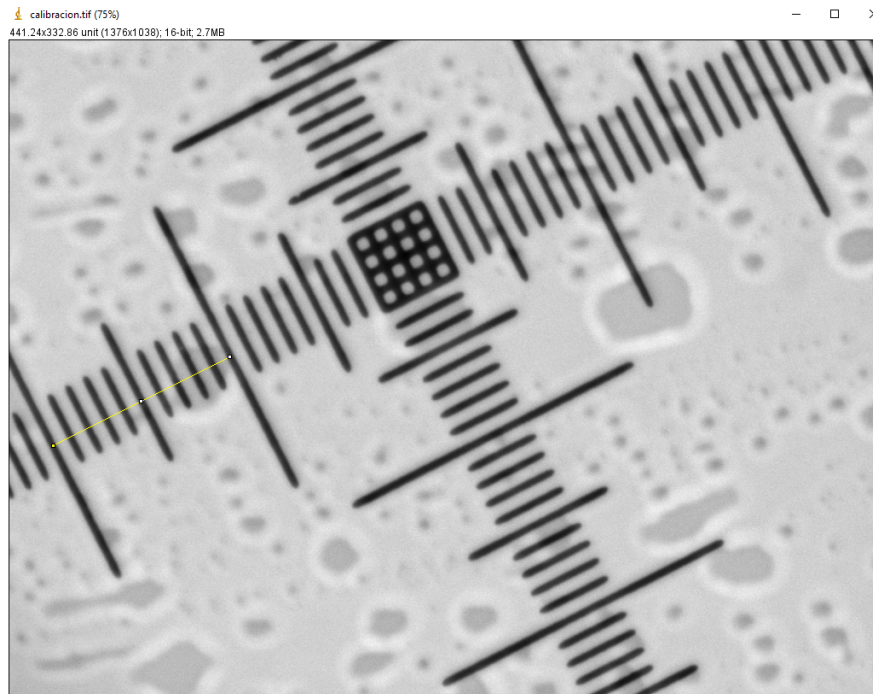
La idea es que el tamaño de la proyección sea de 3 pixeles:

$$\left(\frac{M}{NA} \right) \approx \frac{3(6.45)}{0.244} \approx 60 \quad \text{con } \lambda = 500 \text{ nm} \quad (2)$$

3. Cubo de filtros

Molécula	1	2	5	6
Alexa Fluor 488		X		
Mito Tracker		X	X	
DAPI	X			

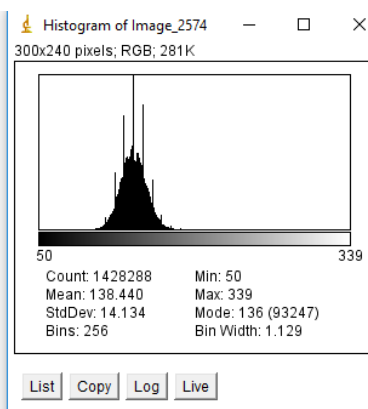
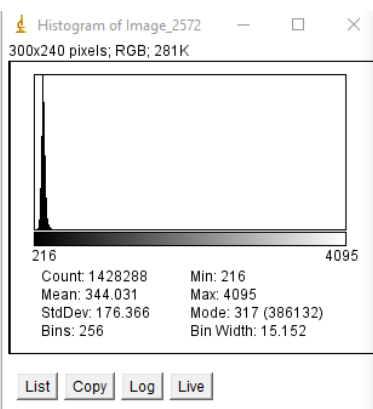
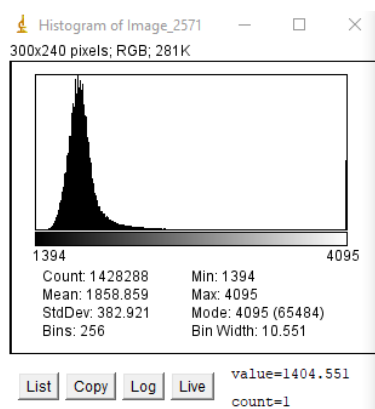
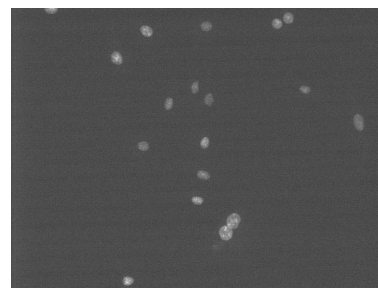
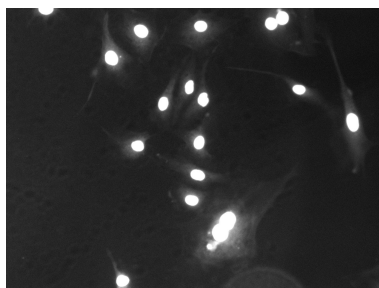
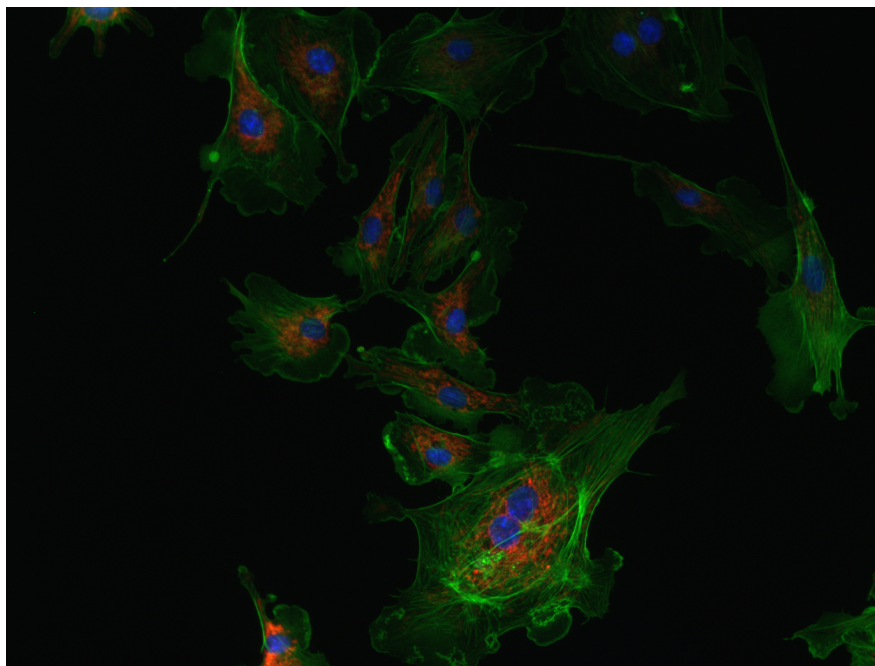
A nivel de laboratorio la calibración del microscópio se realiza usando una guía de escala, para la cual cada línea representa 10 μm . Usando **ImageJ** se mide la distancia entre dos líneas grandes (100 μm), usando la función **Analyze->Set scale...** se determina la escala. El campo observado corresponde entonces con 441 x 333 μm .



La combinación de los cromóforos da lugar a tres tipos distintos de tinción en las estructuras celulares. La superposición de las imágenes se da de la siguiente manera:

Usando la escala es posible calcular el tamaño de los núcleos celulares, los cuales tienen forma ovalada con semieje menor de 4.88 μm , y semieje mayor de 7.03 μm .

Imagen	Canal
Image_2567	Rojo
Image_2570	Verde
Image_2573	Azul



Finalmente se toman varias fotografías usando distintos tiempos de exposición con el objetivo de observar la importancia del rango dinámico de la cámara.

A la izquierda se tiene una imagen saturada, como se observa en el histograma correspondiente existe una densidad de la imagen que se encuentra justo en el límite de los 4095 bits de la cámara, en la imagen central se tiene un buen contraste porque se usa toda la mayor parte del rango dinámico de la cámara, sin embargo si se recorta el rango se observa una disminución en el contraste de las imágenes.

Por esta razón se resalta la importancia de un tiempo de exposición adecuado, si la fotografía se obtiene con sobre exposición la mayoría de los detalles se perderán porque no entra suficiente luz al detector para tenerla en cuenta, por el otro lado un exceso de luz satura el detector y no permite obtener información nueva.