

Microscopia confocal

Principio de funcionamiento de microscopios fluorescentes y confocales

El corte óptico es el proceso mediante el cual un microscopio diseñado adecuadamente puede producir imágenes nítidas de planos focales en el interior de una muestra gruesa. El buen seccionamiento óptico, a menudo denominado buena profundidad o resolución z, es popular en la microscopía moderna ya que, por ejemplo, permite la reconstrucción tridimensional (3D) de una muestra a partir de imágenes capturadas en diferentes planos focales. En microscopía de fluorescencia, los objetos que se encuentran fuera del plano focal solo interfieren con la imagen si están iluminados y emiten fluorescencia. Esto agrega una forma adicional en la que el seccionamiento óptico se puede mejorar haciendo que la iluminación sea específica solo para el plano focal.

En un microscopio confocal de barrido laser se usa iluminación puntual y un orificio en un plano ópticamente conjugado en frente del detector para eliminar la señal desenfocada: el nombre "confocal" proviene de esta configuración. La microscopía confocal usa un punto de escaneo o puntos de luz para iluminar la muestra. Junto con un agujero estenopeico en un plano focal conjugado, este actúa para filtrar la luz de las fuentes fuera del plano focal para mejorar el corte óptico. La intensidad de la luz emitida por la muestra es detectada por un detector sensible, generalmente un tubo fotomultiplicador (PMT) o fotodiodo de avalancha, transformando la señal de luz en una eléctrica que es finalmente digitalizada para generar las imágenes. Los microscopios confocales trabajan según el principio de la excitación puntual en la muestra (punto de difracción limitado) y la detección puntual de la señal fluorescente resultante. De este modo, la microscopía confocal puede definirse como una técnica de imagen óptica para aumentar la resolución óptica y el contraste de una micrografía, todo lo cual se consigue mediante el uso de una pieza, denominada iris, diafragma o pinole, que bloquea la luz desenfocada en la formación de imágenes. La captura de múltiples imágenes bidimensionales (2D) a diferentes profundidades en una muestra permite la reconstrucción de estructuras tridimensionales (un proceso conocido como sección óptica) dentro del objeto. Esta técnica se utiliza ampliamente en las comunidades científicas e industriales y las aplicaciones son muy amplias desde ciencias de la vida hasta ciencias de los materiales, en óptica cuántica e imágenes de nanocristales y espectroscopía.

Como solo se ilumina un punto de la muestra a la vez, las imágenes 2D o 3D requieren escanear sobre una trama regular (es decir, un patrón rectangular de líneas de escaneo paralelas) en la muestra. El rayo se escanea a través de la muestra en el plano horizontal utilizando uno o más espejos oscilantes (servocontrolados). Este método de escaneo generalmente tiene una baja latencia de reacción y la velocidad de escaneo puede variarse. Los escaneos más lentos proporcionan una mejor relación señal / ruido, lo que resulta en un mejor contraste y una resolución más alta.

El grosor alcanzable del plano focal se define principalmente por la longitud de onda de la luz utilizada dividida por la apertura numérica de la lente objetivo, pero también por las propiedades ópticas de la muestra. Los cortes sucesivos forman una 'pila Z' que puede ser procesada por cierto software para crear una imagen 3D o se fusiona en una pila 2D.

La microscopía confocal proporciona la capacidad para el seccionamiento óptico en serie directo, no invasivo, de especímenes vivos, gruesos y vivos, con un mínimo de preparación de muestras y una

mejora marginal en la resolución lateral. Las muestras a menudo se tratan con tintes fluorescentes para hacer que los objetos seleccionados sean visibles y/o aprovechando sus propiedades autofluorescentes.

Parámetros básicos de análisis.

La m. confocal de barrido laser genera informacion multidimensional, por pixel, por combinaciones de los siguientes parametros:

- Multicolor: atendiendo al número de lasers y detectores del sistema utilizado es posible identificar más de 8 fluorescencias distintas.
- Cuantificación: es posible correlacionar intensidad de luz con abundancia de material.
- Temporal: los registros pueden realizarse acorde a intervalos regulares de tiempo (microsegundos a horas)
- Espacial: información x, y, z en la muestra.

Las aplicaciones de la m. confocal son innumerables y atendiendo al tipo de muestra analizada permite diversas aproximaciones al estudio de procesos bioquímicos y/o celulares tanto en muestras materiales como biológicas. En algunos casos, el m. confocal puede, además, ser utilizado a modo de m. electronico de barrido, de modo que podemos generar superficies atendiendo a las propiedades de reflexion del material.

Confocal Microscopy

Optical cutting is the process by which a properly designed microscope can produce sharp images of focal planes inside a thick sample. The good optical sectioning, often called good depth or z-resolution, is popular in modern microscopy since, for example, it allows the three-dimensional (3D) reconstruction of a sample from images captured in different focal planes. In fluorescence microscopy, objects that are outside the focal plane only interfere with the image if they are illuminated and emit fluorescence. This adds an additional form in which the optical sectioning can be improved by making the illumination specific only for the focal plane.

In a confocal laser scanning microscope, point lighting and a hole are used in an optically conjugated plane in front of the detector to eliminate the defocused signal: the name "confocal" comes from this configuration. Confocal microscopy uses a scanning point or points of light to illuminate the sample. Together with a pinhole in a conjugate focal plane, it acts to filter the light from the sources outside the focal plane to improve the optical cut. The intensity of the light emitted by the sample is detected by a sensitive detector, usually a photomultiplier tube (PMT) or avalanche photodiode, transforming the light signal into an electrical one that is finally digitized to generate the images. The confocal microscopes work according to the principle of point excitation in the sample (limited diffraction point) and the point detection of the resulting fluorescent signal. In this way, confocal microscopy can be defined as an optical imaging technique to increase the optical resolution and contrast of a micrograph, all of which is achieved through the use of a piece, called iris, diaphragm or pinole, which blocks light defocused in the formation of images. The capture of multiple two-dimensional (2D) images at different depths in a sample allows the reconstruction of three-dimensional structures (a process known as optical section) within the object. This technique is widely used in the scientific and industrial communities and the applications are very wide from life sciences to materials sciences, in quantum optics and nanocrystal images and spectroscopy.

Because only one point of the sample is illuminated at a time, 2D or 3D images require scanning over a regular pattern (ie, a rectangular pattern of parallel scan lines) in the sample. The beam is scanned through the sample in the horizontal plane using one or more oscillating mirrors (servo-controlled). This scanning method generally has a low reaction latency and the scanning speed can be varied. Slower scans provide a better signal-to-noise ratio, resulting in better contrast and higher resolution.

The achievable thickness of the focal plane is mainly defined by the wavelength of the light used divided by the numerical aperture of the objective lens, but also by the optical properties of the sample. The successive cuts form a 'Z stack' that can be processed by certain software to create a 3D image or merge into a 2D stack.

Confocal microscopy provides the capacity for direct, non-invasive series direct optical sectioning of live, coarse, and live specimens, with minimal sample preparation and marginal improvement in lateral resolution. The samples are often treated with fluorescent dyes to make the selected objects visible and / or taking advantage of their autofluorescent properties.

Basic parameters of analysis.

The m. Confocal laser scanning generates multidimensional information, by pixel, by combinations of the following parameters:

- Multicolor: depending on the number of lasers and detectors of the system used it is possible to identify more than 8 different fluorescents.
- Quantification: it is possible to correlate intensity of light with abundance of material.
- Temporary: records can be made according to regular time intervals (microseconds to hours)
- Spatial: information x, y, z in the sample.

The applications of the m. confocal are innumerable and depending on the type of sample analyzed allows various approaches to the study of biochemical and / or cellular processes in both material and biological samples. In some cases, the m. confocal can also be used as a m. electronic scanning, so that we can generate surfaces taking into account the reflection properties of the material.