



Soporte a las ciencias de la vida

Microscopio Invertido TE2000 Imagen Multí-modo.

En años recientes, con el dramático desarrollo del equipo periférico (láser, sensores, cámaras, computadoras personales, escáner, etc.) para microscopios ópticos, los microscopios ópticos para investigación en particular han jugado un papel que ha incrementado su importancia en las ciencias de la vida. Nikon ha estado produciendo microscopios invertido para la investigación desde 1964 cuando se desarrolló el modelo MD bajo el liderazgo del Profesor Hajimu Katsuta, del Instituto de Ciencia Médica de la Universidad de Tokio. En 1980 Nikon lanzó el modelo TMD incorporando los conceptos básicos de desarrollo del Shinya-scope producido por el Profreso Shinya Inoue de los Laboratorios de Biología Marina en Woods Hole Massachussets E. U. A. el cual disfrutó de una alta reputación entre muchos investigadores. A este siguió el modelo TMD300 el cual se benefició de mejoras y luego el TE300, que incorporó la óptica al infinito. En el



Configuración con el sistema de imagen confocal Nikon C1, Epi-FI y sistema TIRF

2001, Nikon presentó el microscopio invertido de imagen múltiple TE2000 en respuesta a las peticiones de varios investigadores que trabajan con tecnología de punta en las ciencias de la vida. Aquí queremos describir nuestras metas en desarrollar este microscopio y sus características.

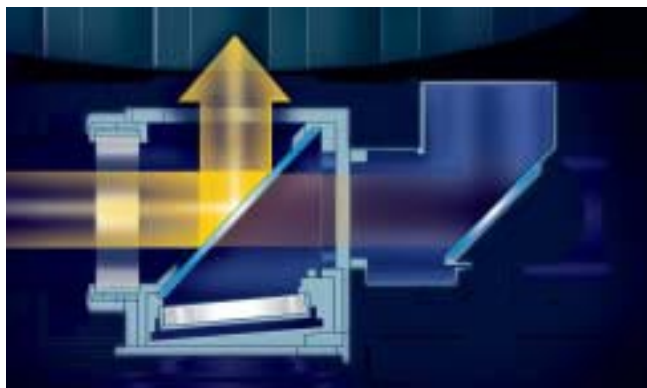
Metas del Desarrollo

1 Considerando que los microscopios ópticos son la fuente de aditamentos de entrada en los sistemas de investigación completos, es esencial maximizar el desempeño básico. En particular se debe mejorar, la calidad de imagen bajo la epí-fluorescencia, confocal, y microscopia TIRF usando ondas de iluminación evanescente. También es vital crear un microscopio que no cambie fácilmente su posición focal debido a las vibraciones y al calor.

2 Los microscopios deben ser capaces de modos de imagen múltiple y debe ser flexible en su expansión de acuerdo a las aplicaciones, acomodando simultáneamente varios aditamentos y accesorios.

Características Principales

Con el TE2000, el contraste en imágenes fluorescentes se mejora dramáticamente, permitiendo la visualización de mecanismos de una sola molécula en células vivas con el método ordinario de epí-fluorescencia. Esto se ha obtenido principalmente gracias a la adopción del mecanismo Terminador de Ruido y el zoom iluminador para las ópticas de epí-fluorescencia aunado con notables mejoras en sus aditamentos ópticos tales como objetivos y filtros que se encuentran optimizados para aplicaciones fluorescentes.



Mecanismo Terminador de Ruido incorporado en los cubos de filtro brinda un radio S/R sin paralelo

Nosotros hemos creado dos tipos de objetivos dedicados para la microscopia TIRF: CFI Plan Apo TIRF 100x/1.45 y CFI Plan Apo TIRF 60x/1.45. Tanto los cubre objetos como el aceite convencional se pueden usar con estos objetivos. El objetivo CFI Plan Apo TIRF 60x/1.45, en particular, es el primer objetivo de inmersión en aceite que incorpora un anillo de corrección para cambios de temperatura, y espesor de cubre objetos. Girando este anillo de corrección, los investigadores pueden contra atacar la influencia de la calidad de la imagen por los cambios inducidos por la temperatura en el índice de refracción del aceite de inmersión dentro del rango que va de los 23° C (temperatura ambiente) a los 37° C (temperatura física) y la influencia de la variación del espesor de cubre objetos. Este mecanismo asegura imágenes óptimas sin importar la temperatura o espesor del cubre objetos. Más aun, este objetivo brinda imágenes óptimas no solo bajo microscopia TIRF, sino que también con DIC Nomarski, epí-fluorescencia, confocal multifotón, y deconvolución, mientras brinda una zona poderosa para trampas durante aplicaciones que usan

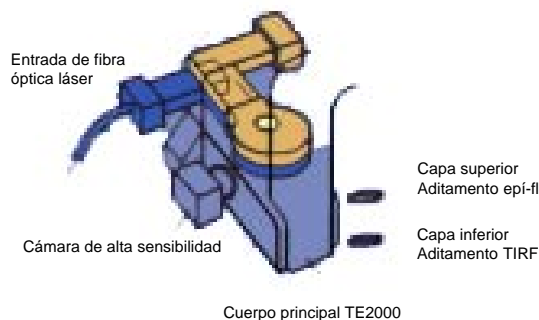


Izq. CFI Plan Apo TIRF 60x/1.45, derecha: CFI Plan Apo TIRF 100x/1.45

pinzas láser. Por lo tanto, este objetivo ha sido optimizado para microscopios de imagen múltiple.

Los méritos del único sistema óptico al infinito CFI60 (con lente de tubo con distancia focal de 200mm y distancia parafocal de 60mm) han sido llevados al máximo, así la distancia entre la unidad principal del microscopio y el objetivo se pudo extender. Esto hizo posible incorporar nuestra única "estructura de estrato" en el TE2000. Esta estructura de estratos brinda un espacio en el cual dos juegos de torretas cada una de las cuales tiene la capacidad para colocar seis cubos filtros, se pueden apilar simultáneamente. Este diseño niega la necesidad de modificar el cuerpo del microscopio para introducir la luz láser, permitiendo la observación simultánea de epí-fluorescencia y la iluminación evanescente, junto con pinzas láser o fotólisis láser. Además, soporta la transferencia de resonancia energética fluorescente (FRET), la imagen obtenida por el objetivo se puede exportar a dos unidades externas diferente, siendo dividida en longitudes de onda duales por un espejo dicroico. Por lo tanto la estructura de estrato permite el montaje simultaneo de aditamentos de importación y exportación de iluminadores láser, o dos sistemas de iluminación láser en un solo microscopio. Más aun, las imágenes se pueden dirigir a 5 diferentes puertos para cámaras CCTV o fotomultiplicadores u otros detectores usando un cambio de 5 salidas en el microscopio. Por lo tanto, este microscopio de imagen múltiple permite a los investigadores para usar fácilmente todos los métodos como son, campo claro, contraste de fases, polarización, DIC Nomarski, epí-fluorescencia, Reflexión Interna Total Fluorescente (TIRF), así como confocal, con un solo microscopio para observar las reacciones de especímenes vivos aplicando luz láser o estímulos eléctricos o químicos usando un micromanipulador.

"Estructura de estratos" extendible, única del microscopio invertido TE2000 de Nikon.



Ejemplos de configuraciones de sistema

1. Epi-FL + TIRF

Debido tanto a la epí-fluorescencia (posición superior) y al TIRF (posición inferior) los sistemas de iluminación se pueden montar simultáneamente, utilizando la estructura de estratos, tanto la imagen epí-fluorescencia y la TIRF pueden obtenerse en diferentes longitudes de onda simultáneamente para su observación. Además, ya que el sistema ahora brinda un alto radio S/R – el resultado de la adopción de un nuevo mecanismo terminador de ruido – es posible usar el método SRIC (Contraste de Interferencia Reflexivo de Superficie) sin el uso de objetivos y accesorios dedicados. El método SRIC se puede operar fácilmente con la apertura del diafragma de campo del sistema de epí-fluorescencia, permitiendo al investigador enfocar o verificar si el espécimen es visible o no con TIRF antes de la excitación fluorescente. El cambio a la observación TIRF es muy sencillo.

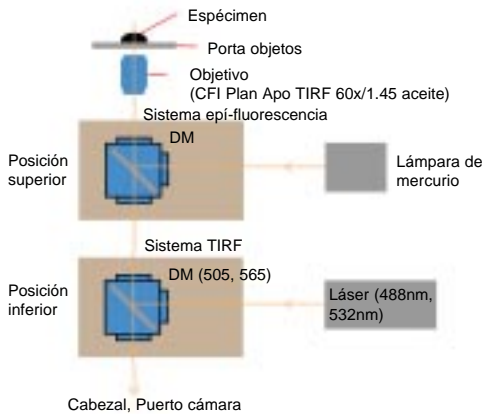
Imágenes cortesía de Dr. Gregg. G Gundersen Universidad de Columbia



Imagen bajo observación TIRF

Imagen bajo observación epí-fluorescencia

Sobre-posicionamiento TIRF + Epi-FL (pseudo color)

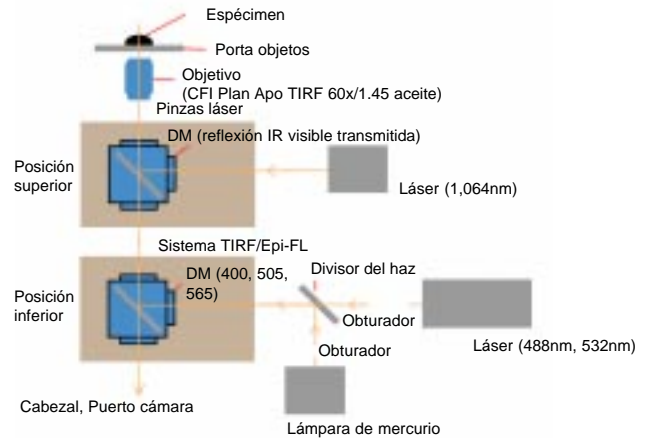


2. Sistema de Imagen Confocal (Nikon C1) + Iluminaciones Epi-FL + TIRF

Utilizando la estructura de estratos, el sistema confocal de imágenes C1 de Nikon, se puede combinar con estos dos sistemas de iluminación. Es posible proveer la imagen confocal y la TIRF utilizando la misma fuente láser ya que tanto el C1 como el TIRF usan una fibra óptica introducida al láser.

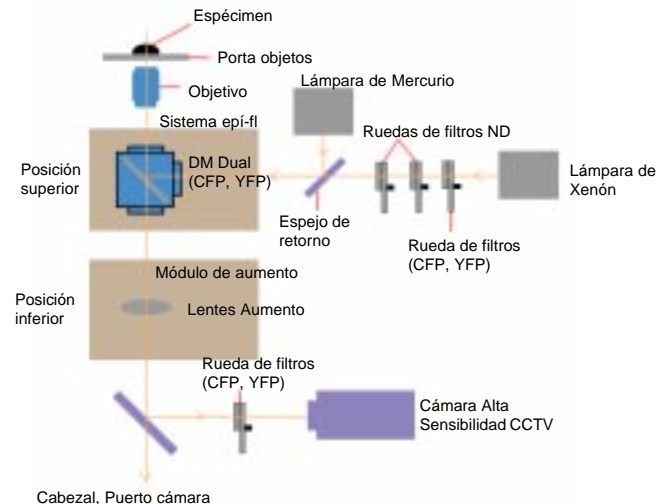
3. Pinzas láser + Epi-FL + TIRF

Utilizando la estructura de estratos, es posible atrapar al espécimen con pinzas láser (montadas en la posición superior) y brindar observación simultánea ya sea con TIRF o con epí-fluorescencia con tan solo cambiar la fuente de luz.



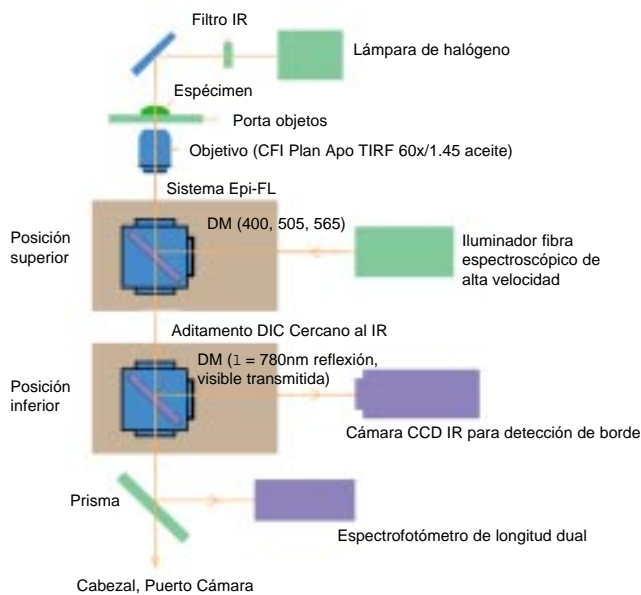
4. Iluminación Epi-FL + Módulo de aumento + Cámara CCTV de alta sensibilidad

Utilizando la estructura de estratos, es posible montar el sistema de epí-fluorescencia en la posición superior y lentes de aumento y torreta de filtros en la posición inferior. Esto es óptimo para observar fluorescencia débil usando cámaras de alta sensibilidad de CCTV ya que los aumentos variables (0.66x, 1x, 1.5x, 2x) combinados con los lentes 1x y 1.5x dentro del microscopio hacen posible obtener un amplio rango de aumentos de 0.66x a 3x. Para reducir la influencia de las vibraciones, es posible cambiar a la fuente de mercurio del sistema de epí-fluorescencia por una fuente de fibra óptica externa.



5. Iluminación Epi-FL + DIC-cercano-IR/ sistema FRET + cámara CCTV

Utilizando la estructura de estratos, es posible montar un sistema de epí-fluorescencia en la (posición superior) y un aditamento DIC cercano al infrarrojo (posición inferior). La imagen se puede observar simultáneamente bajo iluminación Epi-FL con la observación de la dinámica de las células vivas con iluminación cercana al IR ya que la imagen se puede dividir en dos longitudes de onda por espejos dicróicos dentro de la torreta de filtros del aditamento DIC cercano al IR. Además, las imágenes FRET se pueden capturar con un espectrofotómetro. Más aun, la fotometría simultánea de múltiples longitudes de onda fluorescentes con excitación multi-fotónica es posible.



© 2003 NIKON CORPORATION

En Conclusión

Nosotros en Nikon estamos comprometidos constantemente en el desarrollo y refinamiento de microscopios en respuesta a los requerimientos de todos los que están comprometidos en la investigación. No exageramos en decir que los microscopios Nikon son traídos a la realidad a través de sus esfuerzos. Estaremos muy complacidos de seguir recibiendo sus ideas y retroalimentación.

Referencias:

1. Inoue, S. et al. (1997), Video Microscope: 170
2. Sokabe, M. et al. (2001), Journal of Cell Science, 114: 3125–3135
3. Tokunaga, M. et al. (1997), Biochem. Biophys. Res. Commun., 235: 47-53
4. Ashikin, A. et al. (1986), Optics.Letters, 11, 288–290
5. Opas, M. (1984), J. Microsc. 133: 291–306
6. Miyawaki, A. et al. (1997), Nature 388: 882-887
7. Webb, W. et al. (1996), Bioimaging, 4: 198–207

Escrito por: Katsuji Rikukawa
Nikon Instech Co., Ltd.

NIKON INSTECH CO., LTD.

Parale Mitsui Bldg., 8, Higashida-cho, Kawasaki-ku, Kawasaki, Kanagawa 210-0005, Japón
Tel.: +81-44-223-2169 fax: +81-44-223-2181
<http://www.ave.nikon.co.jp/inst/>

NIKON SINGAPORE PTE LTD

SINGAPORE Tel.: +65-5593618 fax: +65-5593668

NIKON MALAYSIA SDN. BHD.

MALAYSIA Tel.: +60-3-78763887 fax: +60-3-78763387



NIKON CORPORATION

Fuji Bldg., 2-3 Marunouchi 3-chome, Chiyoda ku
Tokio 100-8331, Japón

NIKON INSTRUMENTS EUROPE B.V.

P.O. Box 222, 1170 AE Badhoevedorp, The Netherlands
Tel.: +31-20-44-96-222 fax: +31-20-44-96-298

<http://www.nikon-instruments.com/>

NIKON FRANCE S.A.

FRANCE Tel.: +33-1-45-16-45-16 fax: +33-1-45-16-00-33

NIKON GMBH

GERMANY Tel.: +49-211-9414-0 fax: +49-211-9414-322

NIKON INSTRUMENTS S.p.A.

ITALY Tel.: +39-55-3009601 fax: +39-55-300993

NIKON AG

SWITZERLAND Tel.: +41-1-913-62 00 fax: +41-1-910-37 44

NIKON UK LTD.

UNITED KINGDOM Tel.: +44-20-8541-4440 fax: +44-20-8541-4584

<http://www.nikon.com/>

NIKON INSTRUMENTS INC.

1300 Walt Whitman Road, Melville, N.Y. 11747-3064, U.S.A.
Tel.: +1-631-547-8500; +1-800-52-NIKON (within the U.S.A.only) fax: +1-631-547-0306

<http://www.nikonusa.com/>

NIKON CANADA INC.

CANADA Tel.: +1-905-625-9910 fax: +1-905-625-0103



TÉCNICA EN LABORATORIOS, S. A.

México
Tapachula # 10 Col. Roma
México D. F. C. P. 06700
Tels (01-55) 55-74-58-83 y 55-74-11-38
Fax: (01-55) 55-64-16-63
<http://www.tecnicaenlaboratorios.com/>
E-mail info@tecnicaenlaboratorios.com