



SERVICIO DE MICROSCOPIA ÓPTICA AVANZADA

PRESTACIONES DE LOS SCTs DEL IBVF 2025



EQUIPOS DEL SERVICIO



EQUIPOS DEL SERVICIO

➤ EQUIPOS NO INCLUIDOS EN EL CATÁLOGO DEL CSIC



➤ EQUIPOS INCLUIDOS EN EL CATÁLOGO DEL CSIC





EQUIPOS DEL SERVICIO

EQUIPOS NO INCLUIDOS EN EL CATÁLOGO DEL CSIC

LUPA OLYMPUS SZ-ST



LUPA LEICA M205C



MICROSCOPIO OLYMPUS BX-60



MICROSCOPIO LEICA DMRE



EQUIPOS DEL SERVICIO



EQUIPOS INCLUIDOS EN EL CATÁLOGO DEL CSIC

MICROSCOPIO DE FLUORESCENCIA LEICA
DM6000B



MICROSCOPIO CONFOCAL OLYMPUS
FLUOVIEW FV3000

OLYMPUS
Your Vision, Our Future

Confocal Laser Scanning Microscope
FV3000
FLUOVIEW





MICROSCOPIO LEICA DM6000B

➤ Concesión FAS2020: 17.000 €

- WORKSTATION: Window 10 64-BITS, procesador Intel de última generación, 64 GB de RAM, dos discos duros uno SSD 512GB y otro HDD de 4TB, tarjeta gráfica NVIDIA QUADRO P1000 4G 4MDP
- SOFTWARE LASX: de captura y análisis.
- Aumento número de cubos fluorescencia:
 - + A4 (DAPI)
 - + L5 (FITC)
 - + TX2 (TEXAS-RED)
 - **Y7 (CY7)**
 - **YFP**
 - **CFP**
 - **A (DAPI LP)**



MICROSCOPIO CONFOCAL OLYMPUS FLUOVIEW FV3000: CONFIGURACIÓN



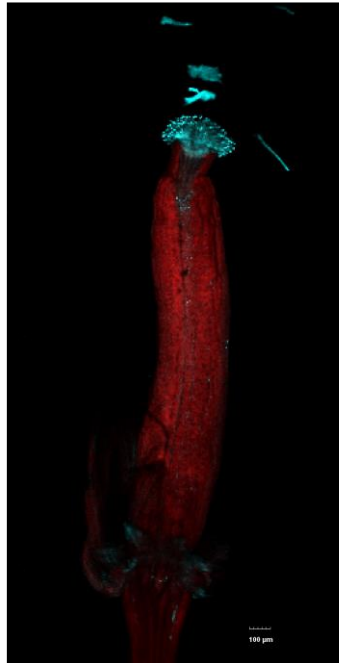
- **Categoría:** microscopio confocal láser espectral de barrido
- **Microscopio Invertido Olympus IX-83:** permite ZDC (Z-Drift compensation) y facilita la manipulación de las muestras.
- **Cambio de objetivo automático y platina motorizada en X, Y y Z:** permite guardar posiciones, MAP, Macro to Micro.
- **6 láseres:** 405 nm, 446 nm, 488 nm, 514 nm, 545 nm y 633 nm.
- **4 fotodetectores:** 2 HSD y 2 SD
- **Módulo de barrido híbrido:** Galvanométrico (16 fps) y Resonante (438 fps). Libre rotación (360°)
- **Capacidad Deep-Imaging:** objetivo 30x de silicona alta penetrancia.
- **Super-resolución:** objetivo 60X 1.5 AN y deconvolución (3D TruSight™) resolución lateral de hasta 120 nm.
- **Tecnología TruSpectral™:** Separación espectral hasta 2 nm. Algoritmo Spectral Unmixing.



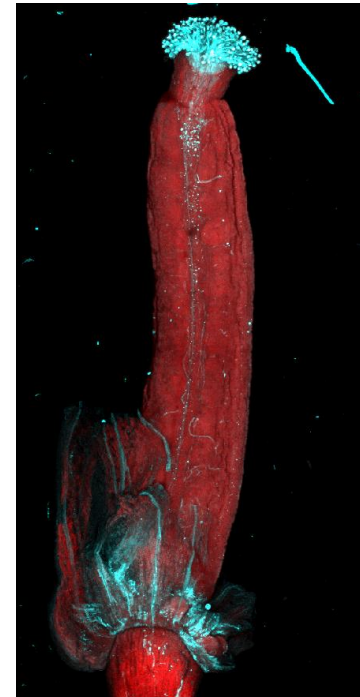
MICROSCOPIO CONFOCAL OLYMPUS FLUOVIEW FV3000



➤ Macro to Micro



Objetivo 4x



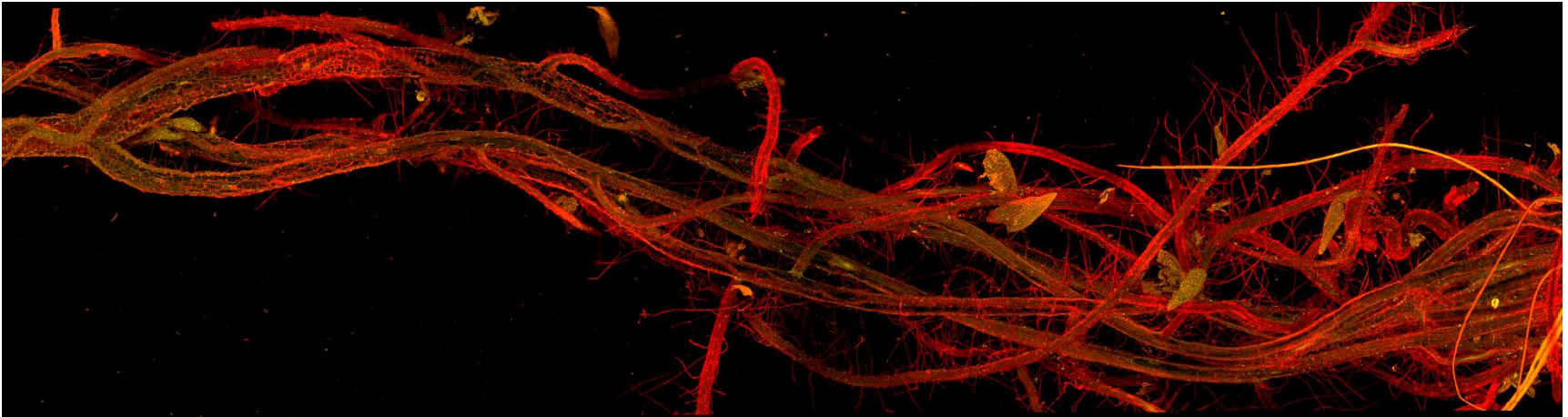
Objetivo 10x

Pistilo de *Arabidopsis* clarificado y teñido con *aniline blue* en cian (depósitos de calosa) y la AUTFL de la clorofila en rojo.
Imagen cortesía de Javier Pérez- Hormaeche.

MICROSCOPIO CONFOCAL OLYMPUS FLUOVIEW FV3000



➤ Macro to Micro

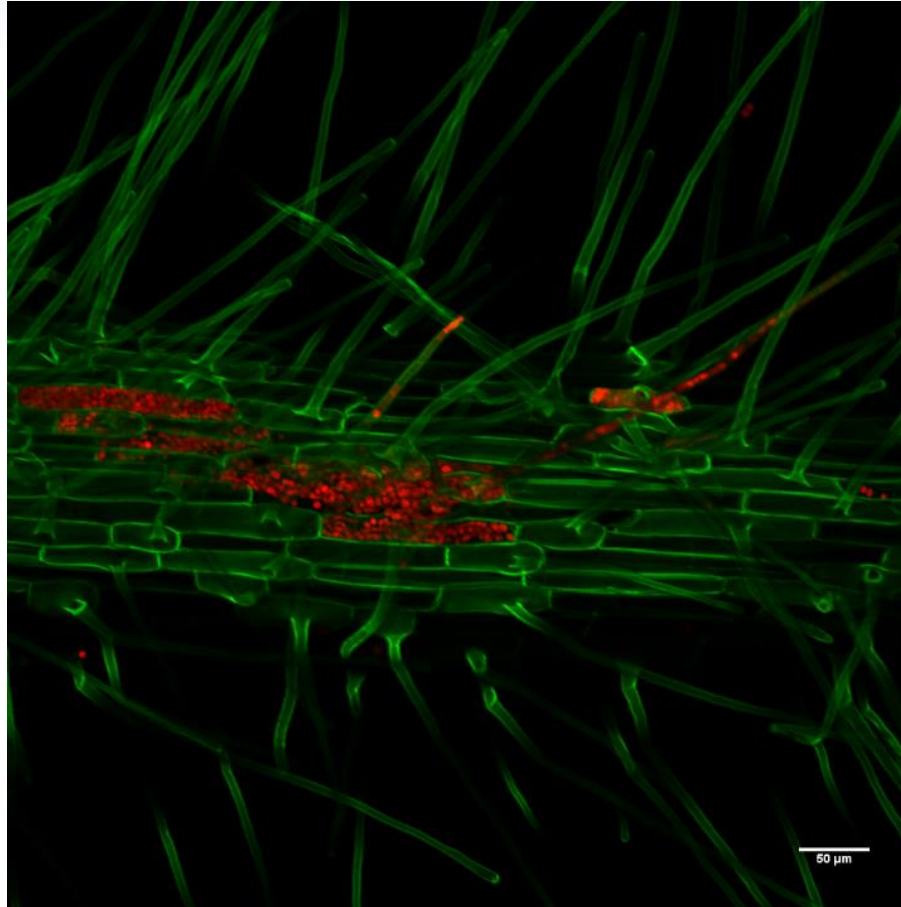


Raíces de *Arabidopsis* (IP) inoculadas con esporas de *Fusarium*
Imagen cortesía de Irene García y Pablo Díaz

MICROSCOPIO CONFOCAL OLYMPUS FLUOVIEW FV3000



- Imagen tomada con objetivo 30x de silicona



Raíz (verde) colonizada con cianobacterias (roja).
Imagen cortesía de Vicente mariscal y Consolación Álvarez.

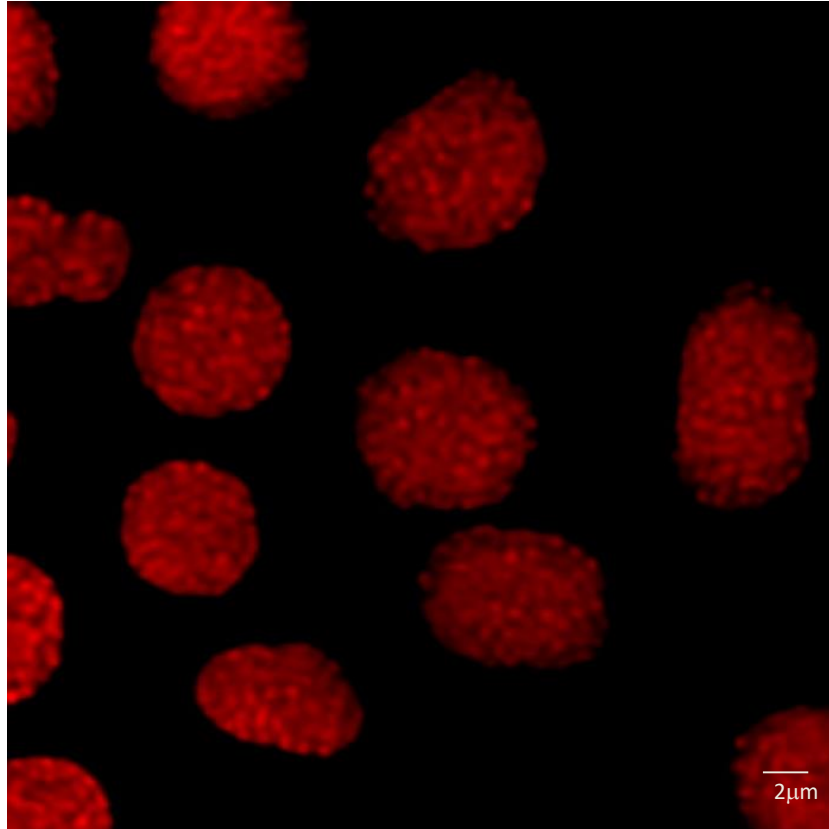
Servicio de Microscopía Óptica Avanzada del IBVF
<http://www.ibvf.csic.es/servicios>



MICROSCOPIO CONFOCAL OLYMPUS FLUOVIEW FV3000



➤ Imagen de Super-resolución



Cloroplastos de *Marchantia*.
Imagen cortesía de Fran Romero y Marcos Ramos





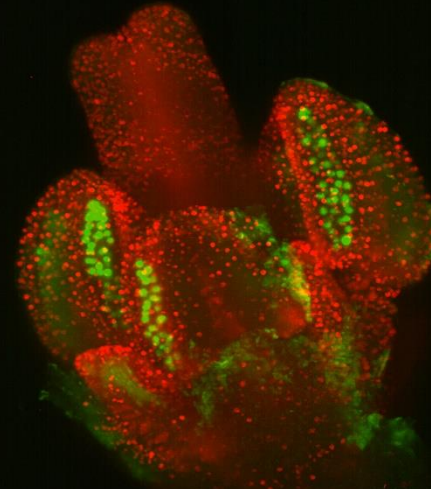
EQUIPOS DEL SERVICIO

SOLICITUD DE UN NUEVO CONFOCAL

- Convocatoria del Plan Estratégico Estatal de Infraestructura 2025:
800.000 €

Observación de procesos vivos
Con rapidez y sensibilidad en 4D.

Tecnología lightsheet / lightfield



Desarrollo de flores de Arabidopsis. Cortesía del laboratorio Riha, CEITEC, Universidad de Masaryk, Brno, República Checa (Lightsheet de Zeiss)



MICROSCOPIA CONFOCAL

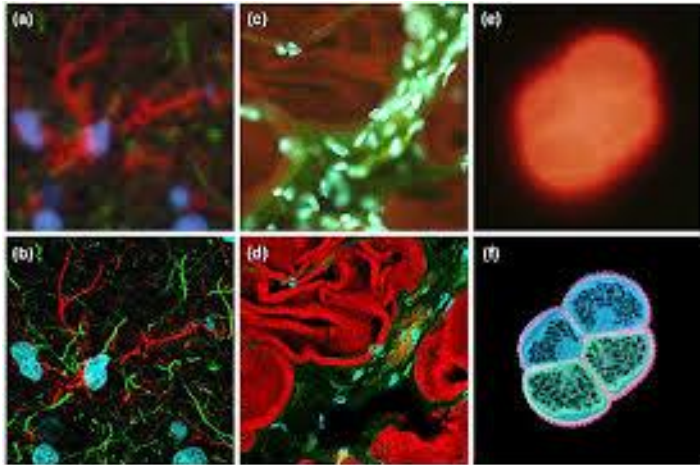
FUNDAMENTOS Y APLICACIONES

MICROSCOPIA CONFOCAL

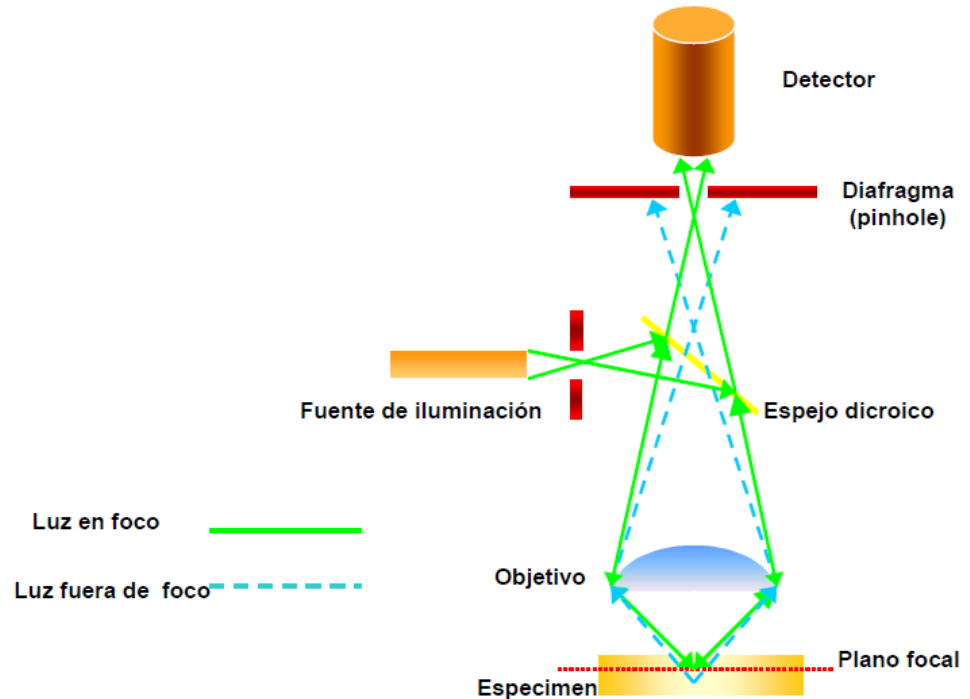
FUNDAMENTOS TEÓRICOS



Principio de confocalidad



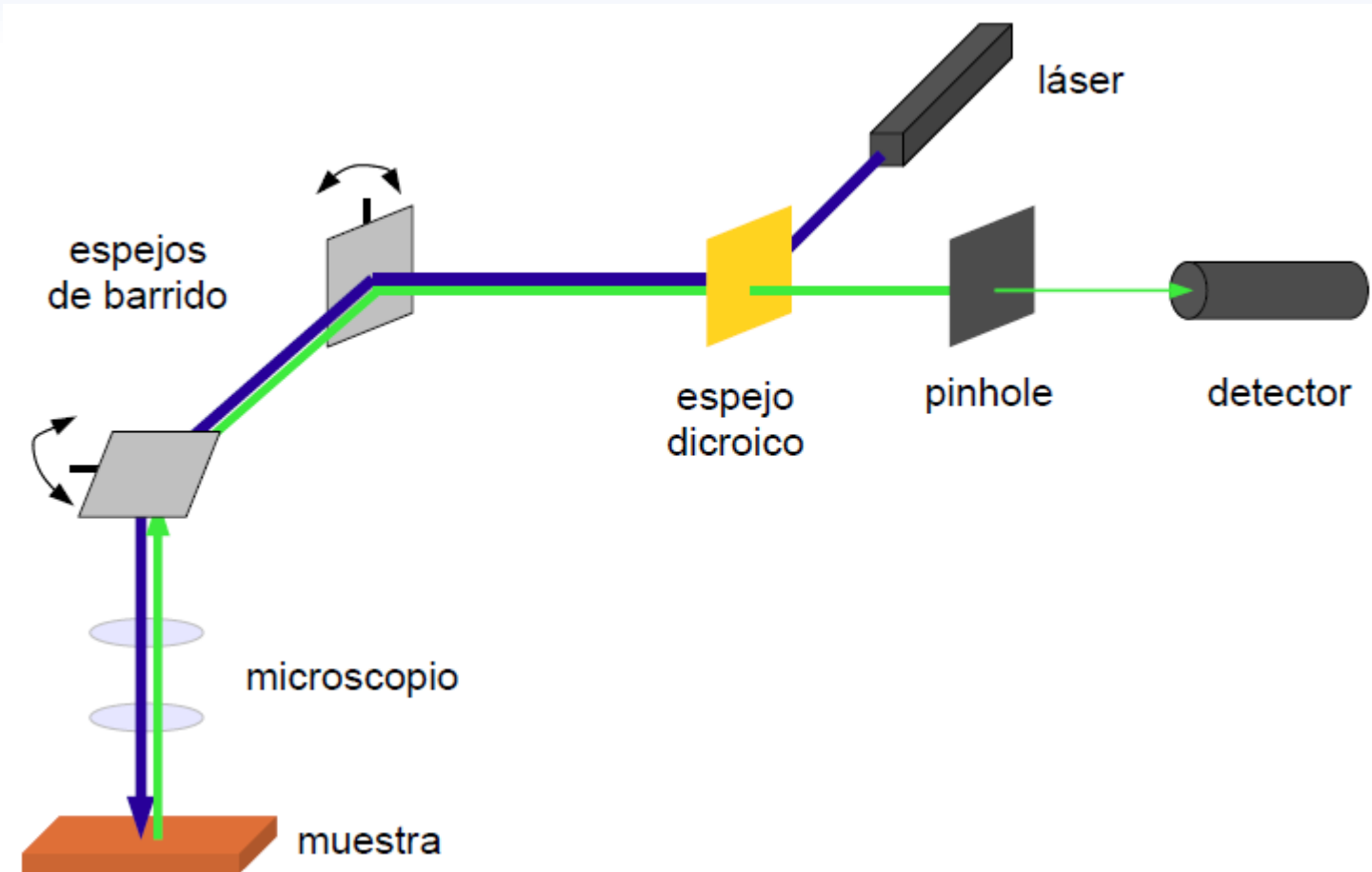
Microscopía de Fluorescencia: a, c y e
Microscopía confocal: b, d y f



Tanto la iluminación como la detección están enfocados en la muestra en el mismo punto focal.

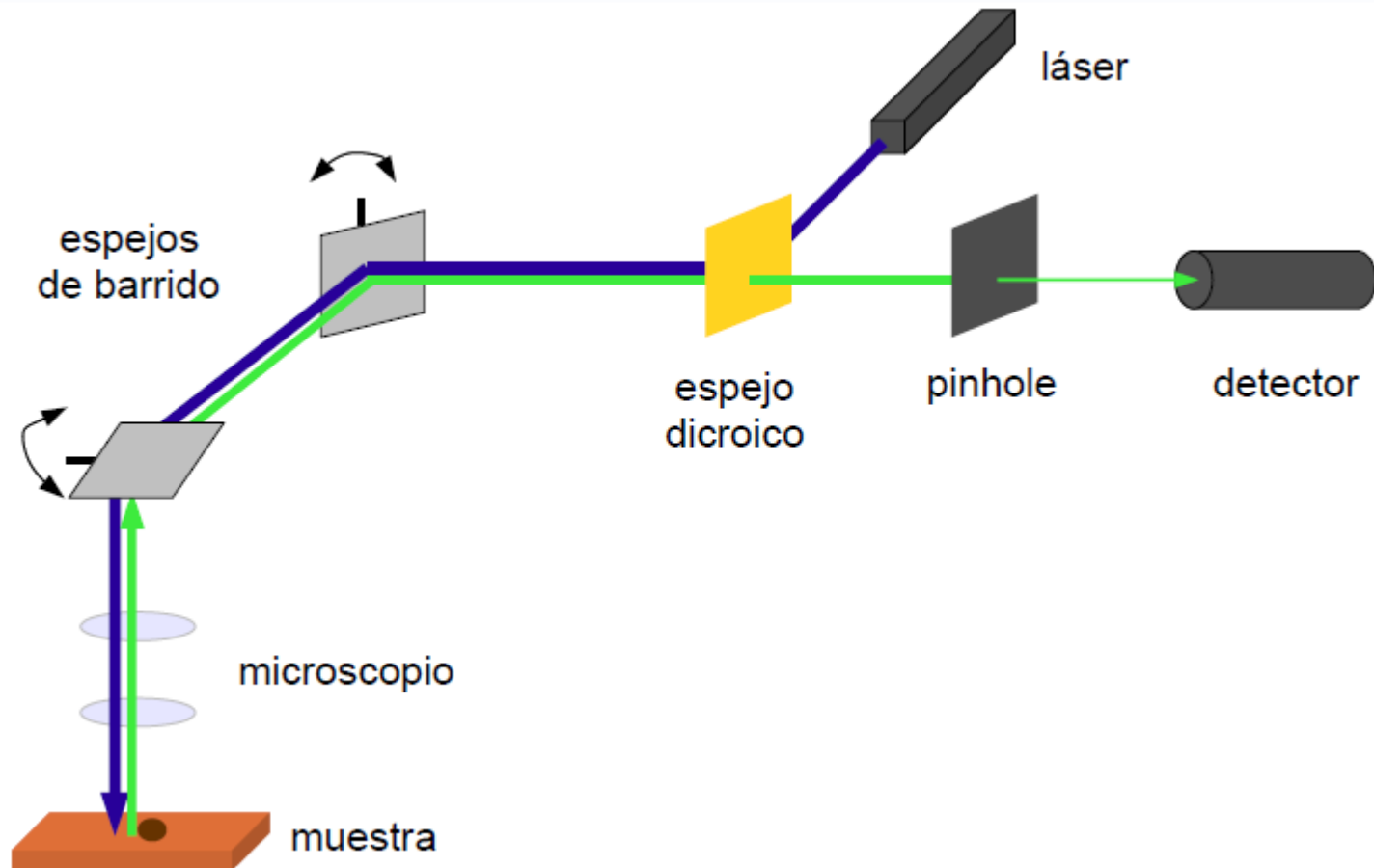
MICROSCOPIA CONFOCAL

FUNDAMENTOS TEÓRICOS



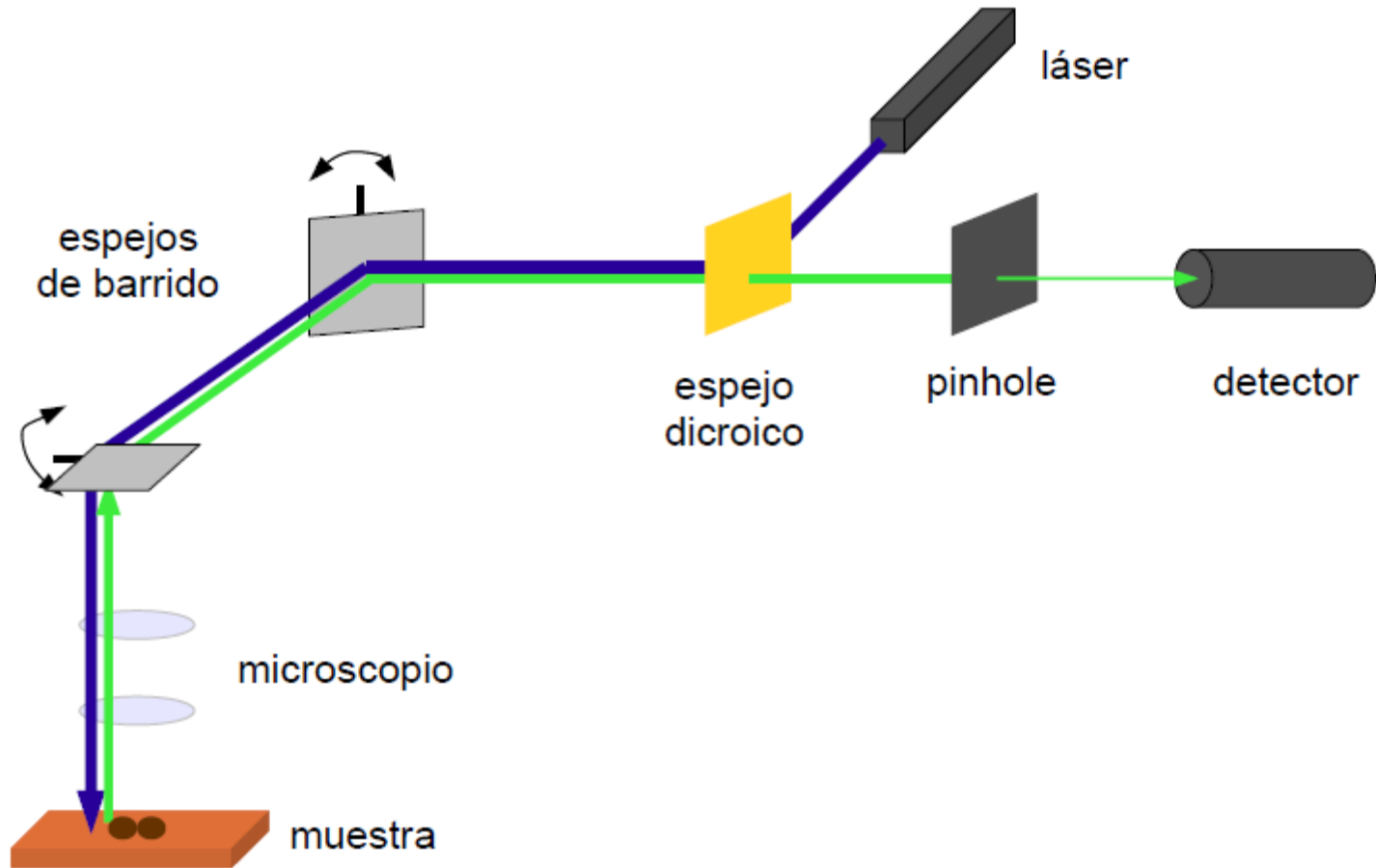
MICROSCOPIA CONFOCAL

FUNDAMENTOS TEÓRICOS



MICROSCOPIA CONFOCAL

FUNDAMENTOS TEÓRICOS

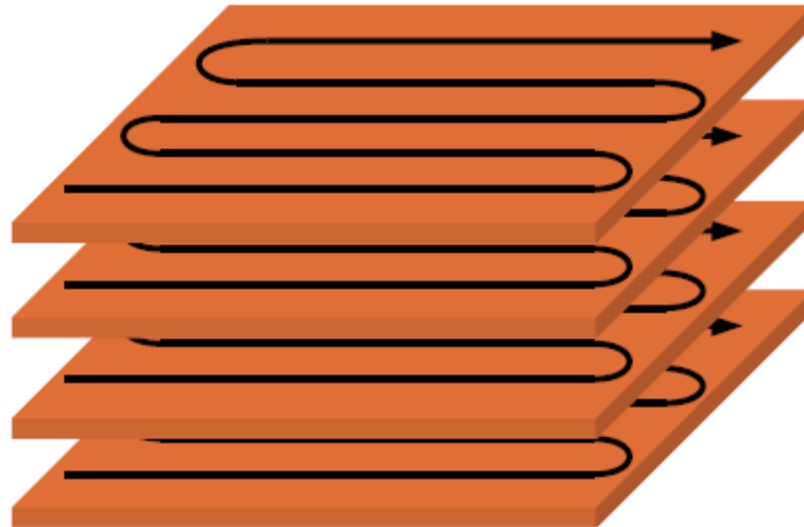


MICROSCOPIA CONFOCAL

FUNDAMENTOS TEÓRICOS



La imagen se forma punto a punto
y sección a sección.





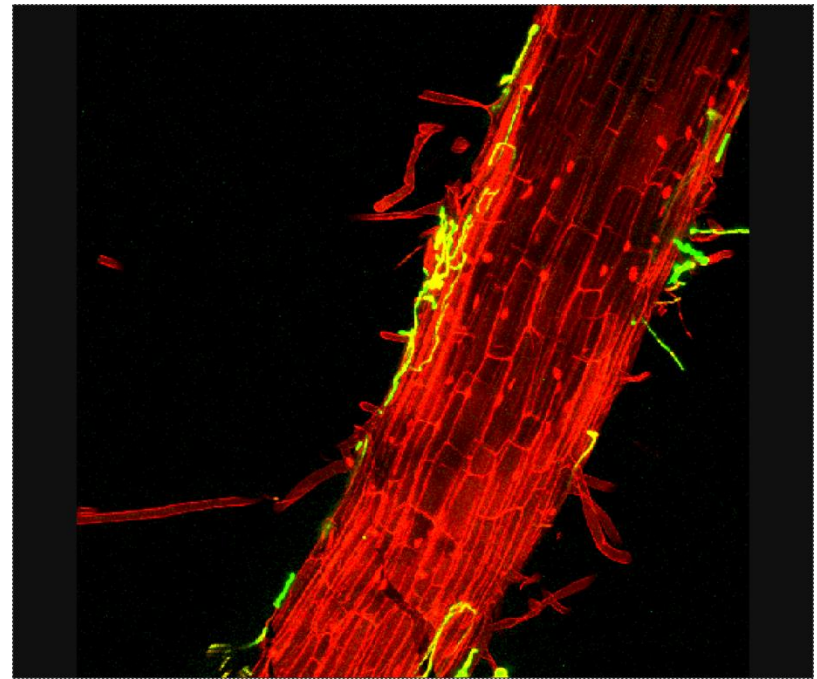
MICROSCOPIA CONFOCAL

FUNDAMENTOS TEÓRICOS

Secciones xy a distintas z



Proyección máxima



Raíz de *Arabidopsis* (IP) infectada con *Trichoderma* expresando GFP.

MICROSCOPIA CONFOCAL

APLICACIONES



- **RECONSTRUCCIONES 3D:** escaneado xyz

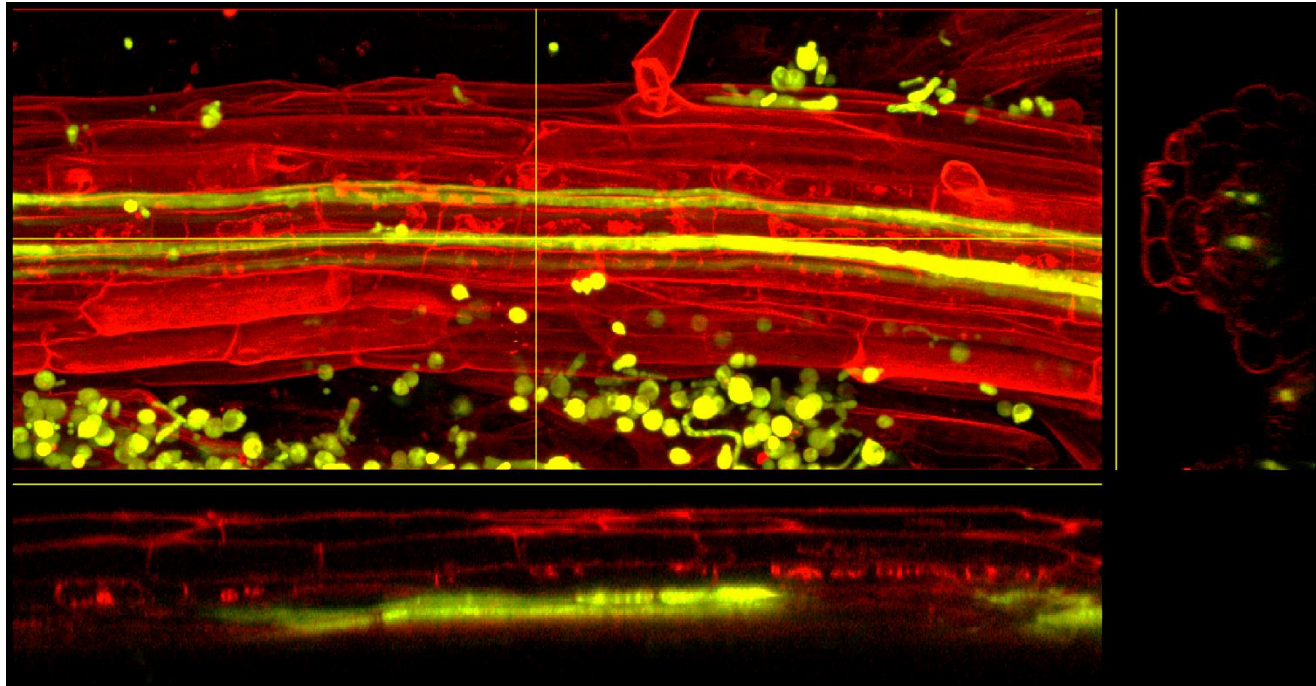


MICROSCOPIA CONFOCAL

APLICACIONES



- PROYECCIONES ORTOGONALES XZ/YZ: escaneado xyz



Raíces de *Arabidopsis* (IP) infectada con *Fusarium* expresando GFP.
Imagen cortesía de Irene García y Pablo Díaz.

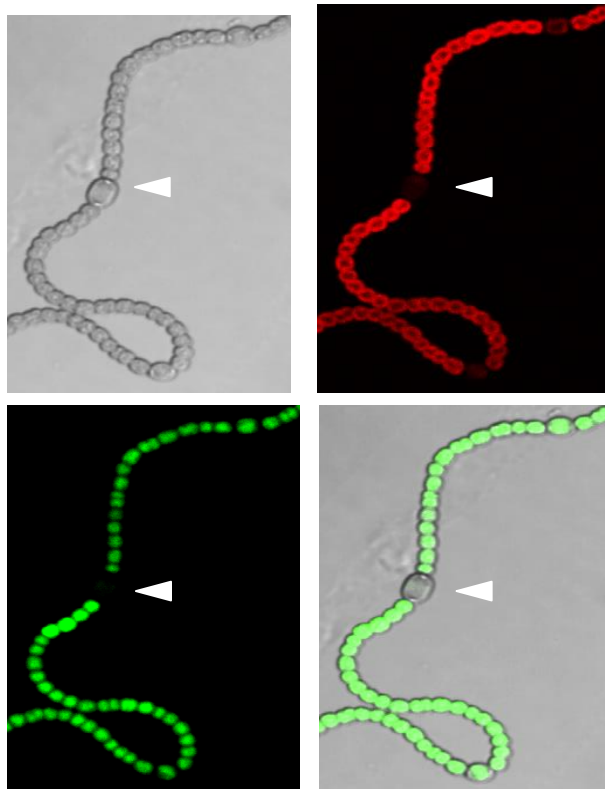
MICROSCOPIA CONFOCAL

APLICACIONES

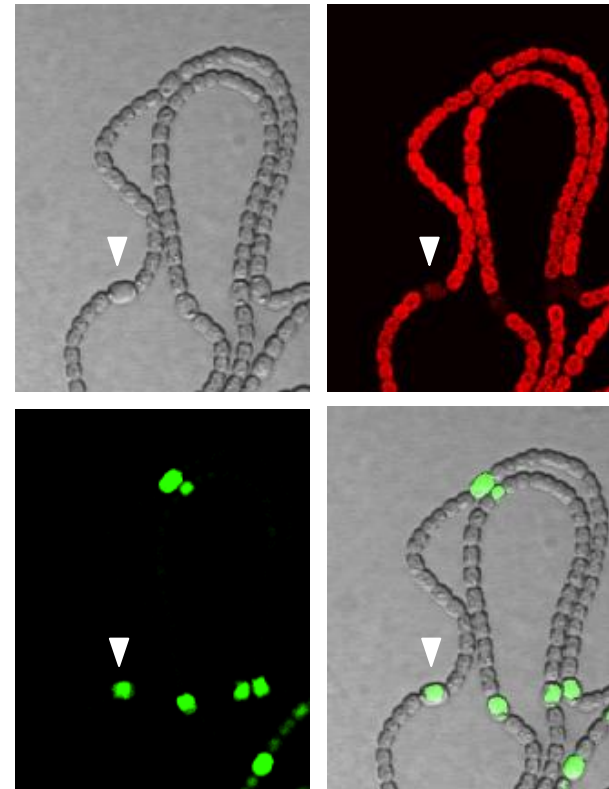


- **Estudios de expresión celular** mediante fusión de promotores con genes reporter de proteínas fluorescentes (GFP, YFP,CFP,...).

Células vegetativas



Heterocistos



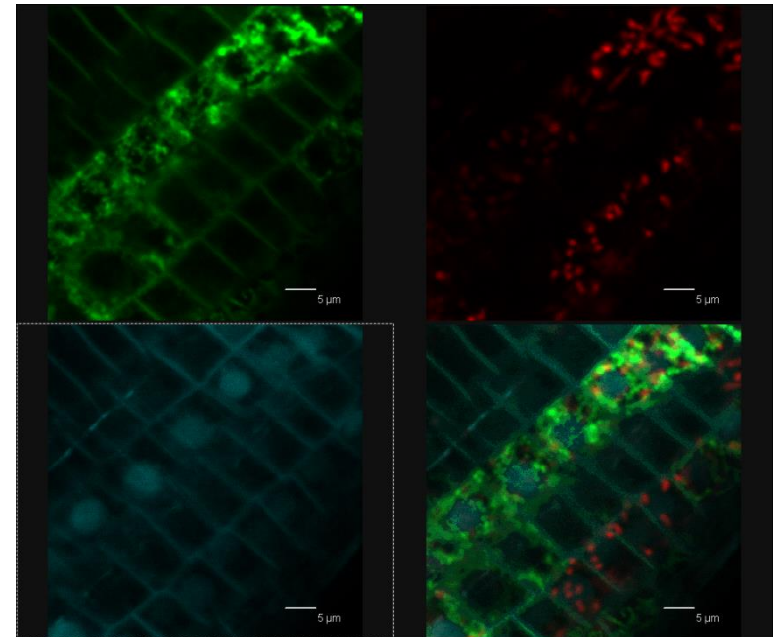
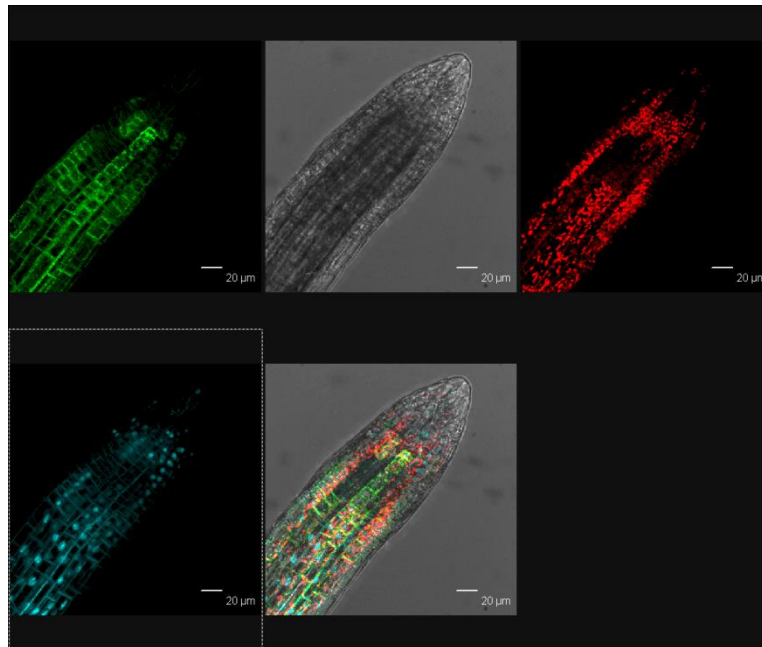
Imágenes cortesía de Alicia Muro

MICROSCOPIA CONFOCAL

APLICACIONES



- **Localización** subcelular de proteínas *in vivo* mediante el uso de fusiones con proteínas fluorescentes (GFP, YFP, CFP, ...)



Proteína **mitocondrial-GFP**, proteína **plastídica-RFP**, proteína **nuclear-CFP**.

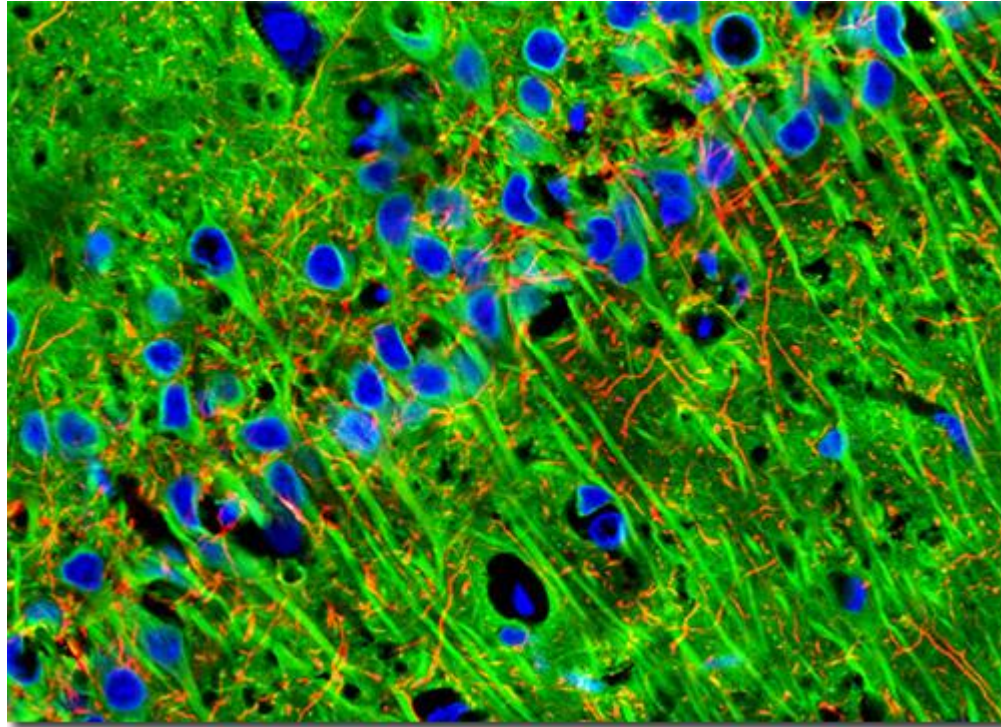
Localizaciones en líneas Kaleidocell de Arabidopsis (Kato *et al.*, 2008)

Imágenes cortesía Teresa Ruíz.

MICROSCOPIA CONFOCAL

APLICACIONES

- Detección de marcajes inmunocitoquímicos e inmunohistológico.



Córtex cerebral de rata. Marcaje de Microtúbulos (Alexa Fluor 488), Neurofilamentos (Alexa Fluor 568) y Núcleos (DRAQ 5).

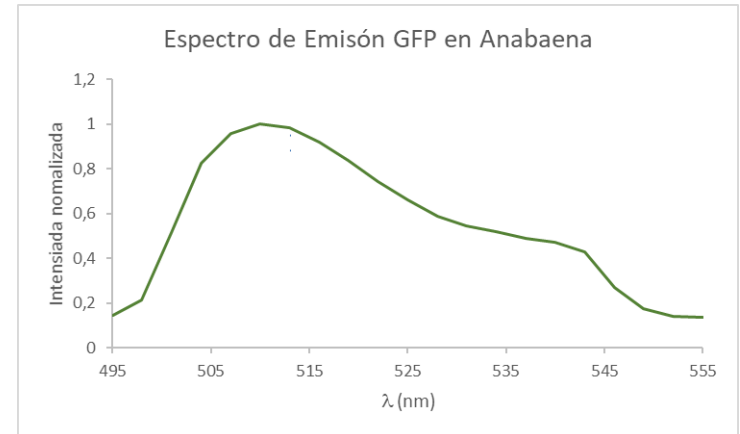
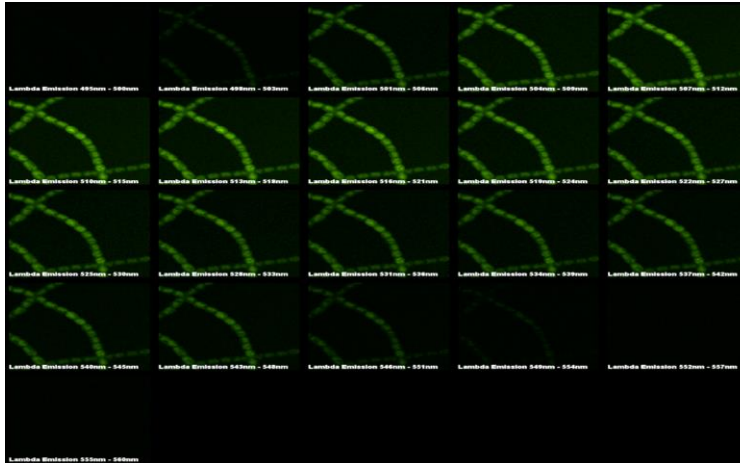
Imagen cortesía de Olympus Corporation.

MICROSCOPIA CONFOCAL

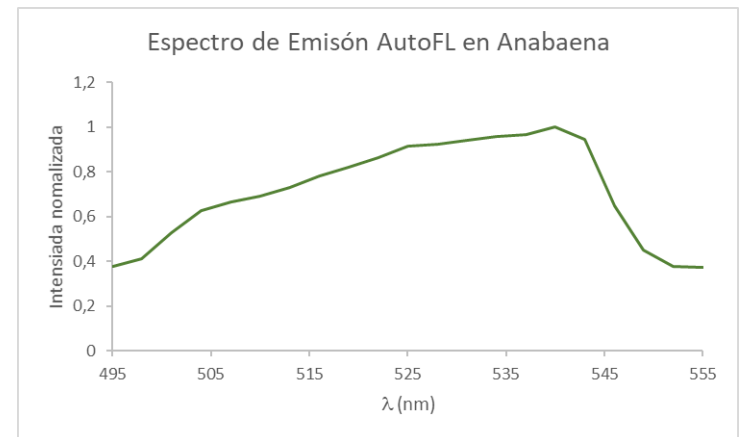
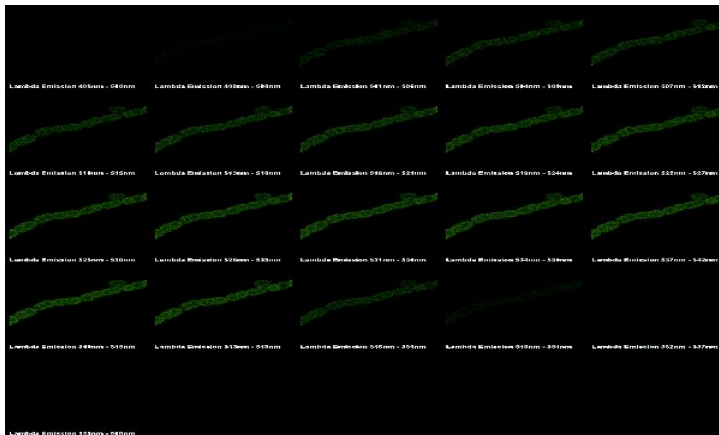
APLICACIONES



- **Determinación del espectro de fluorescencia (Lambda scan):** escaneado $xy\lambda$
Anabaena expresando GFP



Autofluorescencia de *Anabaena*

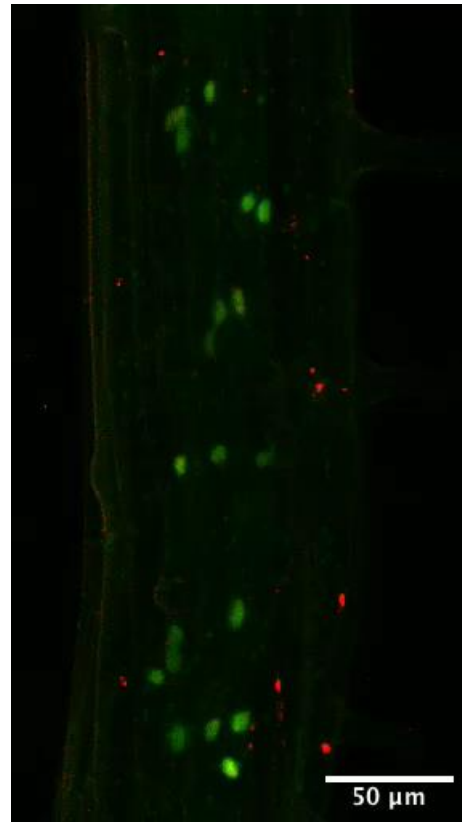


MICROSCOPIA CONFOCAL

APLICACIONES



- Experimentos de Time-lapse: escaneado xyt o xyzt



Expresión diferencial espacio temporal de dos TF fusionados a las proteínas fluorescentes (NeoGreen o mScarlet) en endodermis de raíz de *Arabidopsis*.

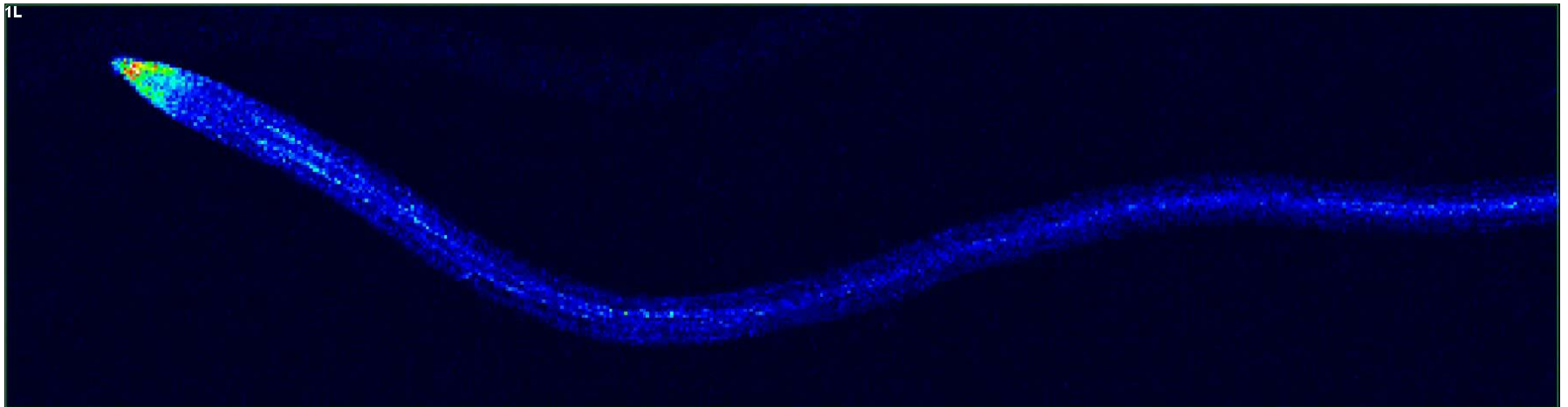
Imagen cortesía de Javier Pérez-Hormaeche.

MICROSCOPIA CONFOCAL

APLICACIONES



- Señalización por Ca^{++} : escaneado xyt



Medida del cambio de la concentración de Ca^{++} por medio del sensor GECO.
Imagen cortesía de Javier Pérez-Hormaeche

MICROSCOPIA CONFOCAL

APLICACIONES

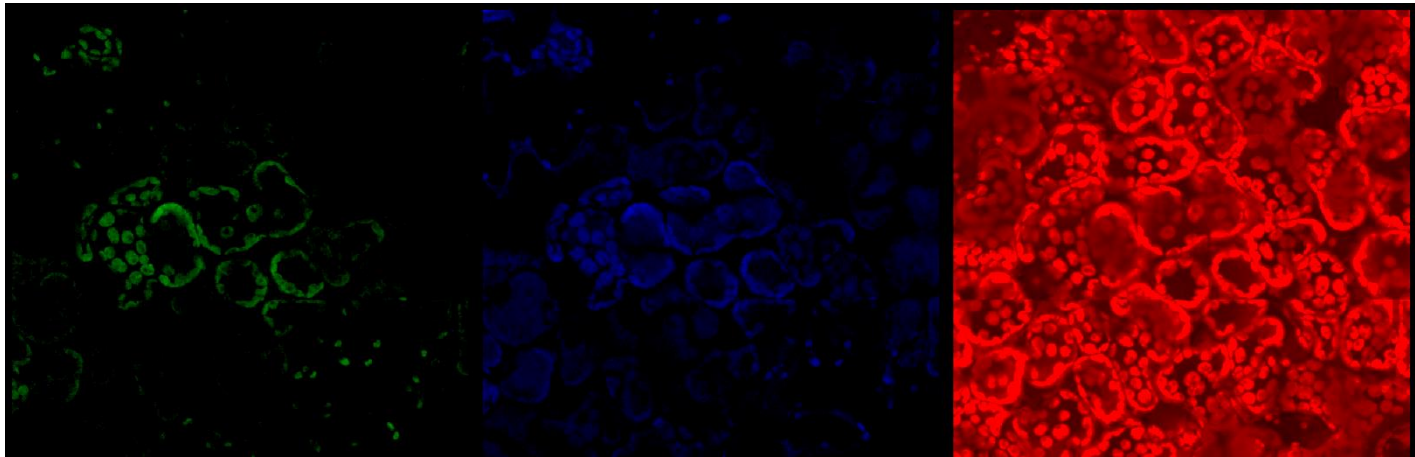


- **Detección de cambios de pH o de estados redox** reportados por proteínas fluorescentes sensibles a dichos cambios.

Excitación a 488 nm

Excitación a 405 nm

Autofluorescencia

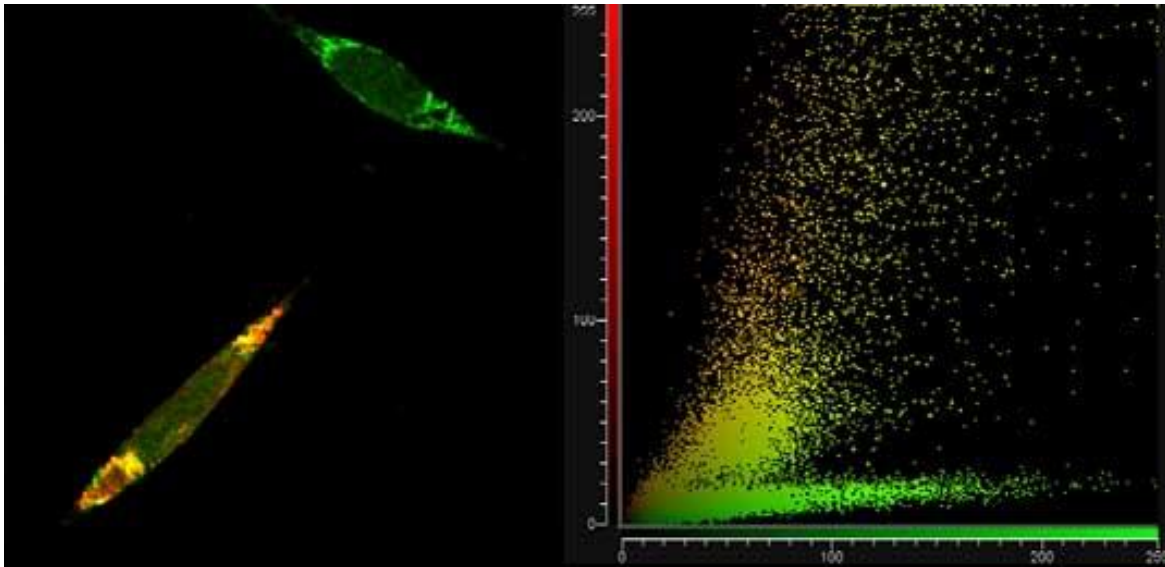


Imágenes cortesía de M^a Cruz González.

MICROSCOPIA CONFOCAL

APLICACIONES

➤ **Análisis de Colocalización.**



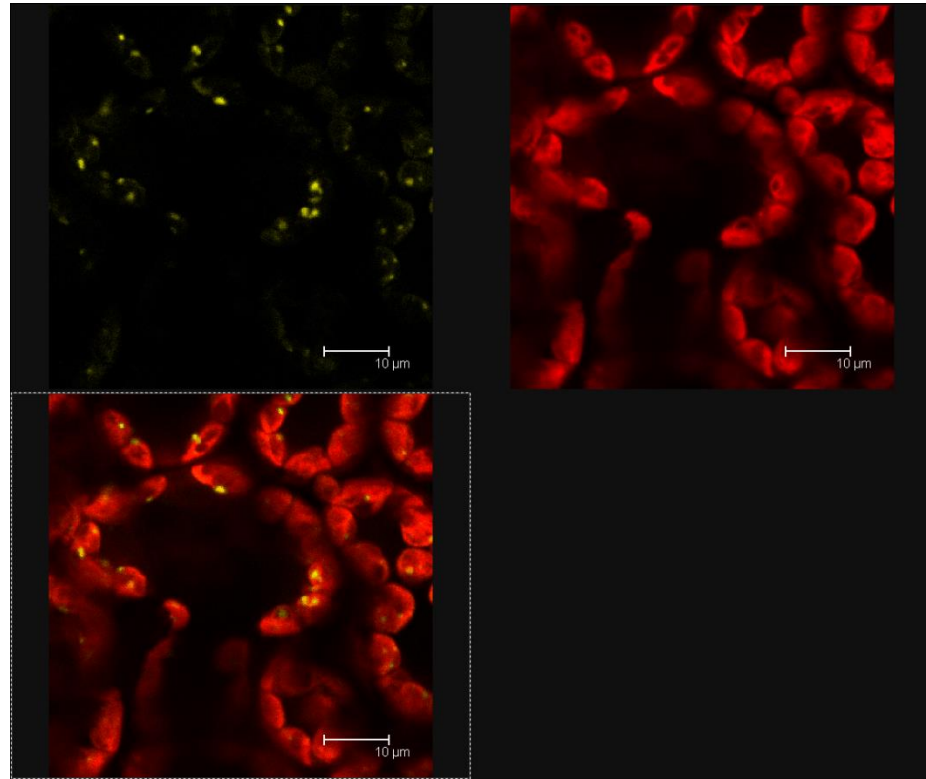
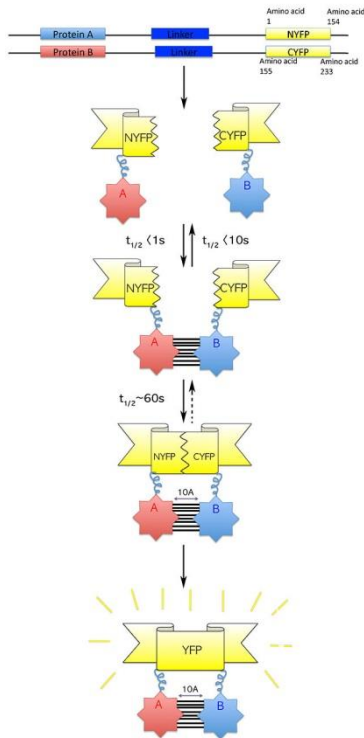
Derecha : células marcadas Cys2 y Cys3. Izquierda: citofluorograma.
Imagen cortesía Dio-Photonic Microscopy Facility.

MICROSCOPIA CONFOCAL

APLICACIONES



- **Interacciones entre proteínas mediante BIFC (Biomolecular Fluorescence Complementation)**



Interacción proteína-proteína en cloroplastos.
Imágenes cortesía de Sandy Raynaud.

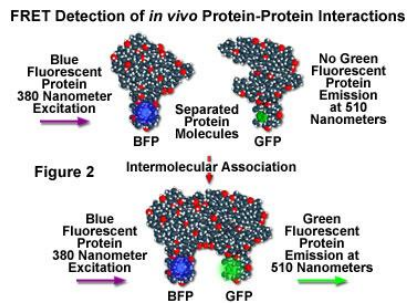
MICROSCOPIA CONFOCAL

APLICACIONES



- **Estudios de mecanismo fisiológicos** tales como: comunicación celular, movilidad de componentes de membranas, cambios conformacionales de proteínas, etc, mediante **FRET** (Fluorescence Resonance Energy Transfer), **FRAP** (Fluorescence Recovery After Photobleaching) y **FLIP** (Fluorescence Loss in Photobleaching.)

Experimento de FRET



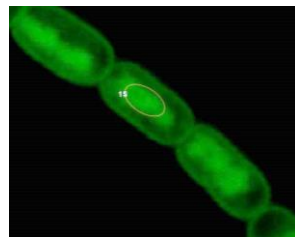
Interacción Proteína-Proteína Nucleares



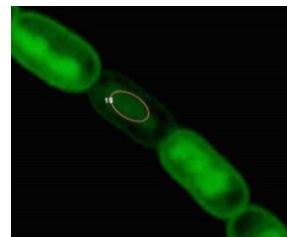
Imágenes cortesía de Gloria Gutiérrez .

Estudio de transporte usando Fluorescencia

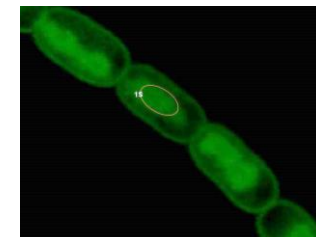
Experimento de FRAP



Antes del photobleaching
Imágenes cortesía de Mercedes Nieves



Después del photobleaching



Recuperación del photobleaching



¡MUCHAS GRACIAS POR VUESTRA ATENCIÓN!

