

1. INTRODUCCIÓN

Las técnicas de microscopía de epifluorescencia aplicadas a las muestras vivas son muy extensas, y han sido una gran herramienta para dilucidar muchos de los procesos que tienen lugar en las células y organismos vivos de forma directa. Además, cuando estas técnicas se han implementado en microscopios confocales espectrales, la mayoría de estas aplicaciones se han visto claramente mejoradas. Asimismo, ha sido posible desarrollar otras aplicaciones que han demostrado ser muy útiles para discernir y visualizar con mayor precisión y resolución muchos de estos eventos.

La Unidad de Microscopía se dedica a la adquisición de imágenes digitales a partir de muestras biológicas mediante microscopía óptica de epifluorescencia y microscopía confocal espectral. Las muestras se preparan en base a la utilización de diversos marcadores fluorescentes *in vivo* en la muestra, o bien, mediante el uso de técnicas de inmunofluorescencia.

CABIMER cuenta con una serie de microscopios de fluorescencia de diferentes características distribuidos en varias salas del centro, cubriendo la mayoría de las aplicaciones más frecuentes en microscopía óptica.

2. OBJETO

El objeto del presente documento es definir cuáles son las normas básicas de funcionamiento de los equipos de microscopía.

3. ALCANCE

El contenido de esta Norma afecta a todos los usuarios de los equipos de microscopía de CABIMER.

4. RESPONSABILIDAD

Es responsabilidad de cada usuario conocer y cumplir adecuadamente las normas.

Es responsabilidad del técnico de Microscopía detectar malas prácticas respecto al uso de los equipos y ponerlas en conocimiento de los usuarios causantes, de sus investigadores principales y de la Gerencia del Centro.

Es responsabilidad de cada Investigador Principal el hacer cumplir las normas, o denunciar ante la Gerencia de centro un mal uso reiterativo.

En caso de que se realice una mala utilización de los equipos o se incumpla esta normativa, se podrán tomar medidas que supongan la responsabilidad económica de su grupo por las reparaciones necesarias.

5. EQUIPAMIENTO DE LA UNIDAD

La Unidad de Microscopía dispone del siguiente equipamiento:

Sala de microscopía confocal (primera planta):

- [Microscopio Confocal Leica TCS SP5 \(AOBS\)](#) (Confocal 1), equipado con 9 líneas de láser (405, 458, 476, 488, 496, 514, 561, 594 y 633nm), 5 canales de detección de emisión y uno adicional para luz transmitida. Este sistema está equipado con incubador de temperatura y suministro de CO₂ para aplicaciones *in vivo*
- [Microscopio Confocal Leica TCS SP5 \(Dic. Conv.\)](#) (Confocal 2), equipado con 8 líneas de láser (405, 458, 476, 488, 496, 514, 543 y 633nm), 3 canales de detección de emisión y uno adicional para luz transmitida.

Sala de microscopía de fluorescencia junto a la unidad de imagen 2 (primera planta):

- [Microscopio time-lapse](#): Microscopio de fluorescencia invertido Leica DMI 6000B con cabina termostatzada y suministro de CO₂ para adquisición de imágenes a tiempo real, con una cámara Hamamatsu ORCA ERA I.
- *Sistema de tijeras láser y pinzas láser.*
- *Lupa de disección Leica MZ.*

Sala de microscopía de fluorescencia junto a los Servicios de Informática (primera planta):

- [Microscopio de fluorescencia Zeiss ApoTome](#), con técnicas de luz transmitida (incluye campo claro y Nomarski); iluminación de fluorescencia con una lámpara HXP 120W, y una cámara AxioCam 503 para la adquisición de imágenes monocromáticas de gran resolución y amplio campo de visión. Una de las principales características de este equipo es que permite incorporar un dispositivo de iluminación estructurada, ApoTome.2, en la ruta de iluminación que mejora tanto la sensibilidad como la presentación en una imagen integrada.

Sala de fluorescencia de la primera planta:

- [Microscopio de fluorescencia Leica DM6000B \(AF6000\)](#) con técnicas de luz transmitida y fluorescencia con cámaras digitales DFC390 (monocromática) y DFC500 (a color)-*Microscopio de fluorescencia A.*
- [Microscopio de fluorescencia automático Nikon NiE- eclipse](#) con técnicas de luz transmitida (incluye contraste de fases y Nomarski); con una lámpara Nikon Intensilight para la iluminación con fluorescencia. Este sistema tiene una cámara Hamamatsu 1360, que junto a la pletina motorizada permiten la adquisición de imágenes de gran tamaño (mosaico).
- *Ordenador* de gran capacidad configurado para el procesamiento y cuantificación de imágenes mediante programas específicos de análisis de imagen.

Sala de fluorescencia de la planta baja:

- [Microscopio de fluorescencia Leica DM6000B \(AF6000\)](#) con técnicas de luz transmitida (incluye contraste de fases y Nomarski) y fluorescencia con cámaras digitales DFC390 (monocromática) y DFC500 (a color)- *Microscopio de fluorescencia C.*
- [Microscopio de fluorescencia Leica DM6000B \(AF6000\)](#) con técnicas de luz transmitida y fluorescencia con cámara digital DFC390 (monocromática)- *Microscopio de fluorescencia B.*
- [Lupa de fluorescencia Nikon](#) para disección y visualización de muestras.

Salas de líneas celulares:

Primera planta:

Sala de líneas celulares 1

Sala 1, dentro de la unidad de cultivos de la primera planta:

- 2 Microscopios invertidos de rutina ZEISS Axiovert 40 C.

Sala de Seguridad Biológica (P2):

- Microscopio invertido de fluorescencia Leica DL IL con cámara digital DFC500 para la adquisición de imágenes.
- Microscopio invertido de rutina ZEISS Axiovert 40 C.

Sala de líneas celulares 3:

- Microscopio invertido de fluorescencia ZEISS Axiovert 40 C
- 2 Microscopios invertidos de rutina ZEISS Axiovert 40 C.

Planta baja:

Sala de líneas celulares 2:

- Microscopio invertido de fluorescencia LEICA DM IL HC con cámara digital DFC490.
- 2 Microscopios invertidos de rutina ZEISS Axiovert 40 C.

Sótano:

Sala de cultivos primarios no humanos (junto a Animalario):

- Lupa de fluorescencia Leica MZ16 FA con cámara digital Leica DFC500.
- Microscopio invertido de fluorescencia ZEISS Axiovert 40 C.
- Microscopio invertido de rutina ZEISS Axiovert 40 C.

6. CONDICIONES DE USO DEL EQUIPAMIENTO Y PRESTACIONES DE SERVICIO

Algunas de las aplicaciones que se pueden llevar a cabo con este equipamiento se ofrecen como servicios a los usuarios (Servicios de la Unidad) y otras, es directamente el usuario el encargado de realizar el experimento y utilizar el instrumento habilitado para ese uso según las Nomas de la Unidad (Equipos de uso autónomo).

6.1. SERVICIOS OFERTADOS

Los Servicios ofertados por la Unidad de Microscopía, están disponibles en el siguiente enlace:

<http://www.cabimer.es/web/es/unidades-apoyo/microscopia/>

La Unidad de Microscopía de CABIMER centra su cartera de servicios en diversas líneas de actuación.

Entre las aplicaciones desarrolladas más frecuentemente en nuestra Unidad, destacan la adquisición de imágenes mediante microscopía confocal a partir de muestras fijadas y marcadas mediante técnicas de inmunofluorescencia, con uno o múltiples fluorocromos. Este tipo de imágenes son utilizadas posteriormente para la presentación de resultados, o bien para realizar en ellas mediciones y cuantificaciones.

Por otra parte, hay determinados procesos biológicos que por sus características requieren una visualización directa, por lo que la muestra debe estar viva (ya sea un cultivo celular o un organismo).

En estos casos, nuestra Unidad ofrece aplicaciones como las siguientes:

- Time lapse fluorescence imaging
- FRAP: Fluorescence Recovery After Photobleaching
- FLIP: Fluorescence Loss in Photobleaching
- FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer
- Photoactivation y Photoswitching
- Fluorescencia combinada: adquisición de imágenes con fluorescencia y luz transmitida simultáneamente.

La mayoría de las aplicaciones ofertadas por nuestra Unidad necesitan plataformas de análisis de imagen específicas tras la adquisición de imágenes. Es por ello que también ofrecemos asesoramiento para la cuantificación y procesamiento de imágenes con programas como Metamorph, ImageJ y Fiji.

Para solicitar cualquiera de nuestros servicios, previamente debe hacerse una reserva con, al menos, una semana de antelación.

En todos los casos el responsable técnico de la unidad controlará y manejará el microscopio y software.

6.2. EQUIPOS DE USO AUTÓNOMO

Todos ellos son exclusivamente de uso interno para investigadores de Cabimer. El personal de la Unidad se encargará de impartir la formación inicial en el manejo de estos equipos. Está prohibido hacer uso de los equipos sin haber recibido la formación inicial. En caso contrario, el grupo al que pertenezca el usuario, se hará cargo de los posibles costes derivados de un mal uso.

✓ **Sistemas de epifluorescencia (microscopios de fluorescencia A, B y C, Nikon y ApoTome)**

1. Consultar con la Unidad (disponibilidad y normas de uso).
2. Es obligatorio que todas las personas interesadas en usar el equipo por primera vez lo soliciten al servicio de Microscopía. Los técnicos de Microscopía son las personas encargadas de aconsejar y aprobar el uso del equipo y, es importante que la persona interesada en la realización de un experimento concrete una cita previa con la unidad y explique qué quiere obtener.
3. El equipo solo podrá ser utilizado por personas con los conocimientos suficientes para su manejo.
4. Los técnicos responsables de la Unidad de Microscopía son las únicas personas encargadas de formar a los usuarios y de autorizar el uso del equipo exclusivamente a aquellos que estén capacitados. Para ello, se desarrollan jornadas de formación, que son impartidas por la Unidad de Microscopía de manera periódica. Tras la realización de esta formación se autorizará el acceso al nuevo usuario a las salas de microscopía.
5. Es obligatorio realizar reservas de los microscopios antes de utilizarlos, (menos los que se consideran de rutina) indicando fecha, nombre y laboratorio al que pertenece, con un teléfono, de manera que el usuario pueda ser localizado si fuera necesario. Las reservas se harán en la intranet de CABIMER.
6. Se consideran equipos de rutina los microscopios localizados en las salas de líneas celulares, (con la excepción de la lupa de fluorescencia con cámara digital instalada en la sala de cultivos primarios no humanos (junto al animalario) que puede reservarse a través de la intranet).
7. La reserva del equipo se realizará como máximo 15 días antes de su uso.
8. Consultar la guía de usuario para realizar las reservas del equipamiento de esta Unidad:

Reservas:

- Cuando un usuario se reserva un microscopio se hace responsable de ese equipo (su encendido y apagado) y su correcto funcionamiento.
- Para acceder a las salas es obligatorio que cada usuario se identifique mediante la huella digital/tarjeta, cada vez que entre.
- Cada microscopio lo debe utilizar exclusivamente la persona que lo ha reservado.
- Cada usuario puede tener un máximo de 2.5h/día y 10h en total a la semana repartidos entre los microscopios Leica A, B, C, Nikon y Zeiss ApoTome. En situaciones excepcionales, los usuarios podrán solicitar más horas a la Unidad de Microscopía y se les podrá dar una autorización puntualmente.
- Cuando un usuario cancele su reserva, deberá anular su reserva en la intranet y avisar por correo electrónico al resto de los usuarios. Además, deberá comprobar que el usuario anterior a él no ha dejado encendido el equipo. Si se trata del último usuario del día, deberá asegurarse de que el equipo se apaga correctamente.
- No se pueden reservar dos equipos a la vez, incluyendo el microscopio automático Nikon.
- Se permiten un máximo de 2 cancelaciones de reservas a la semana.

- Además, para mantener la temperatura de las salas, las puertas de acceso a las salas de microscopía deben permanecer cerradas siempre.
 - Para los microscopios confocales y el time-lapse, los usuarios deberán contactar con la Unidad de Microscopía directamente para realizar sus reservas.
9. Cualquier cambio en la configuración del microscopio (filtros, etc...), o de los programas de adquisición de imágenes LAS y LAS AF, serán realizados ÚNICAMENTE por la unidad de Microscopía.
 10. Los datos de cada usuario serán guardados temporalmente en una carpeta creada para tal fin con el nombre del usuario al que pertenece. Debido al tamaño de los archivos que se crea en este tipo de experimentos, es necesario que los usuarios graben sus datos al finalizar la sesión, a través de la red de Cabimer.
 11. Todas las semanas se realizará una limpieza de los discos duros de los ordenadores.
 12. La Unidad de Microscopía no se hace responsable de la pérdida imprevista o daño de los archivos de las carpetas de datos de los ordenadores.
 13. Al finalizar la sesión, y antes de apagar, consultar los usuarios de ese equipo en la intranet. Si no se va a usar en un periodo de al menos 1 hora, hay que apagar el sistema.
 14. Una vez apagado, hay que esperar al menos 30 minutos para volverlo a encender.
 15. En caso de que el usuario se retrase más de 30 min. a la incorporación de su sesión, la reserva se anula a todos los efectos y el equipo queda disponible para que otros usuarios lo utilicen.
 16. En los casos en que un usuario no cumpla las normas y/o haga un mal uso de los equipos, se podrán tomar medidas que supongan la responsabilidad económica de su grupo por las reparaciones necesarias.
 17. Si se observara alguna negligencia, ésta deberá ser comunicada al responsable de la unidad y al gerente, quien podrá negar el uso de los equipos a los usuarios implicados.
 18. Queda totalmente prohibido COMER o BEBER en las salas de microscopía.
 19. Requerimientos de las muestras y procedimiento
 - Todos los objetivos del centro están optimizados para enfocar a una distancia de trabajo específica, para cubreobjetos de 0.17 mm de espesor (Nº.1.5).
 - Las muestras tienen que estar montadas en portaobjetos y cubiertas por un cubreobjetos de vidrio.
 - Queda prohibido utilizar muestras cuyo cubreobjetos está roto, manchado de medio de montaje, laca de uñas o producto sellador de forma excesiva, ya que se pueden dañar los objetivos.

6.3. EQUIPOS DE USO AUTORIZADO

✓ MICROSCOPIOS CONFOCALES LEICA TCS-SP5

- La única persona autorizada para el manejo de los microscopios confocales es el técnico o bien, aquellas personas que hayan recibido la formación y cuenten con su autorización por escrito.
- Para reservar los microscopios confocales, los usuarios deberán contactar con la Unidad de Microscopía directamente para realizar sus reservas.
- Es necesario que la persona interesada en la realización del experimento concrete una cita previa con el técnico y explique qué quiere obtener.
- Cuando se trate de un experimento con células vivas de larga duración se coordinará con el técnico la mejor manera de hacerlo, de tal forma que perturbe lo menos posible el uso general de los equipos.
- Los objetivos de este equipo están preparados para trabajar con cubreobjetos 0.17 mm de espesor.
- Debido al tamaño de los archivos que se crea en este tipo de experimentos es obligatorio que los usuarios graben sus datos al finalizar la sesión.
- Este equipamiento está reservado para la adquisición de imágenes, se ruega a los usuarios que preferentemente utilicen el ordenador de procesamiento de imágenes para la cuantificación, análisis y procesamiento de imágenes.
- Las tarifas propuestas para el uso de los confocales se calculan según lo anotado en la agenda de reserva y cualquier cambio o cancelación se hará con el técnico responsable.
- Para información adicional consultar los siguientes anexos:
[Microscopio Confocal Leica TCS SP5 \(AOBS\)](#)
[Microscopio Confocal Leica TCS SP5 \(Dic. Conv.\)](#)

✓ MICROSCOPIO DE FLUORESCENCIA INVERTIDO LEICA DMI 6000B

- Es obligatorio que todas las personas interesadas en usar este equipo por primera vez tengan una entrevista con el técnico para concretar la fecha de la formación.
- El técnico es la única persona encargada de formar a los usuarios y de autorizar el uso del equipo exclusivamente a aquellos que estén capacitados.
- Para reservar el microscopio time-lapse, los usuarios deberán contactar con la Unidad de Microscopía directamente para realizar sus reservas, y no deberán exceder de más de 3 días a la semana.
- El uso de este microscopio queda reservado exclusivamente para trabajar con células vivas, ya sea empleando técnicas de fluorescencia o de luz transmitida.
- Los objetivos de este equipo están preparados para trabajar con cubreobjetos 0.17 mm de espesor.
- Al manejar las placas con células vivas dentro de la cámara de incubación del microscopio, si se derrama medio de cultivo hay que limpiar de inmediato con un pañuelo de papel y avisar al técnico responsable.
- Hay una agenda donde se tiene que apuntar: las horas de reserva o uso, los números que aparecen en la pantalla de la lámpara de fluorescencia antes de comenzar y al finalizar la sesión y cualquier incidencia que se observe.
- Para información adicional consultar el siguiente anexo: [Microscopio time-lapse](#).

7. PUBLICACIONES

Tal y como se indica en la Normativa general de CABIMER:

Todos los experimentos realizados con el equipamiento de la Unidad de Microscopía de CABIMER que sean publicados, deberán indicarse en el apartado de agradecimientos de la publicación correspondiente.

Además, cuando el usuario haya recibido ayuda adicional por parte de la Unidad, deberá indicarse en el apartado de Materiales y Métodos. Y si se ha establecido una colaboración de acuerdo con todas las partes implicadas, deberá reflejarse en la autoría de la publicación que se trate.

ANEXO I.

La Unidad de Microscopía de CABIMER, dentro de esta normativa, establece que el uso de equipamiento avanzado, como son los microscopios confocales, tienen una tarifa asociada por horas de uso. Esta tarifa varía dependiendo de si el investigador requiere la asistencia técnica del técnico de apoyo de la unidad (con o sin operador), y del número de horas de uso. De manera que, si el investigador es autónomo para el manejo del equipo (sin operador) la tarifa es menor, y a mayor número de horas de uso, se aplican tarifas reducidas. Además, la Unidad de Microscopía ofrece servicio para la cuantificación, procesamiento y análisis de imágenes (ver más abajo)

Para optimizar las horas de uso y potenciar el manejo autónomo de este tipo de equipamiento, la Unidad de Microscopía organiza cursos de formación frecuentemente para explicar a nuevos investigadores el funcionamiento, técnicas y manejo de este tipo de equipamiento.

Por otra parte, la Unidad de Microscopía ofrece a investigadores de otros centros de investigación y empresas privadas sus instalaciones para realizar sus experimentos, contando siempre con la asistencia técnica del personal de apoyo. En estos casos, la tarifa asociada dependerá del tipo de centro o entidad (colaborador del CSIC, US, UPO o FPS) o empresa que solicite el servicio.

Respecto a las reservas de los microscopios confocales, deberán ser anuladas con una antelación de 24 horas. Si la anulación no se produce en este plazo, el servicio se facturará igualmente.