

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

BioRep Universidade Federal de São Paulo	POP N. 002 MICROSCÓPIO LEICA DMI4000B	Elaboração: 09/2018 Versão: 2.0 (07/2025)
--	--	--

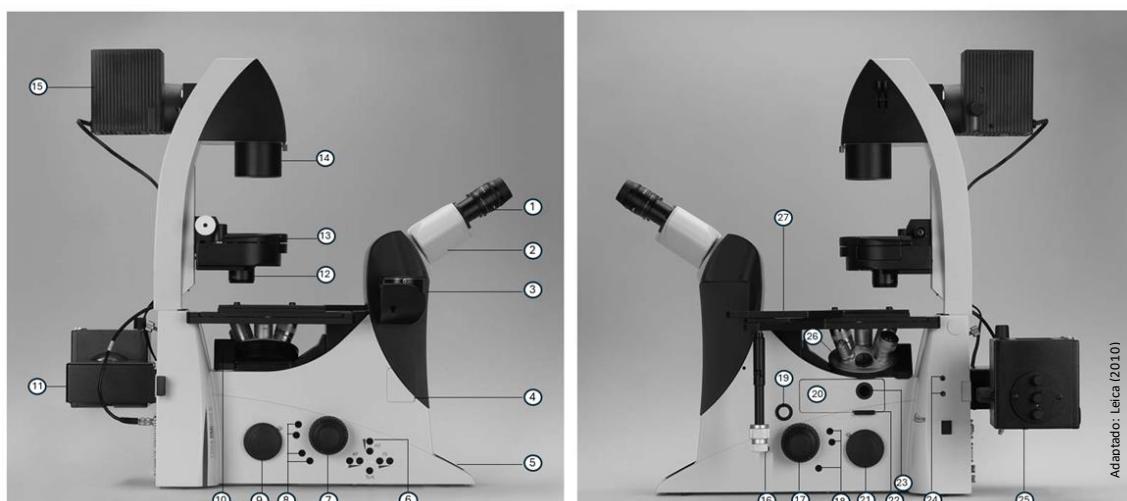
1. DESCRIÇÃO

Microscópio invertido, automatizado, para pesquisa Leica é ideal para a varredura de células e culturas de tecidos. O sistema apresenta um eixo de fluorescência para imagens de fluorescência ultrabrilhantes, com roda de filtro interno com gerenciador de excitação motorizado e gerenciador de intensidade de fluorescência FIM (Fluorescence Intensity Manager).

Modelo: DMI 4000 B

Especificações:

- Objetivas: 10x, 20x, 40x e 100x
- Filtros:
 - A4 – Faixa de excitação UV (BP 360/40);
 - L5 – Faixa de excitação azul (BP 480/40);
 - N2.1 - Faixa de excitação verde (BP 515-560).
- Câmeras: Leica DMC2900 e DFC340FX (fluorescência)
- Software: Leica Application Suite – LAS V4.12 e LAS AF (Advanced Fluorescence)



- 1 – Oculares
2 – Tubo das oculares
3 – Porta superior
4 – Filtro IMC
5 – Tela de informações
6 – Botões de função fixa
7 – Ajuste de foco
8 – Botões de função variável
9 – Porta lateral esquerda
10 – Seletor de técnica
11 – Lâmpada (incidente)
12 – Lente do condensador
13 – Base do condensador
14 – Diafragma

- 15 – Lâmpada (transmitida)
16 – Charriot
17 – Ajuste de foco
18 – Botões de função variável
19 – Botão acesso aos filtros
20 – Caixa de filtros
21 – Porta lateral direita (indisponível)
22 – Slot do analisador
23 – Janela de centralização
24 – Centralização do diafragma
25 – Lâmpada (incidente)
26 – Revolver
27 – Platina

Figura 1 – Componentes gerais das faces laterais do microscópio DMI4000B

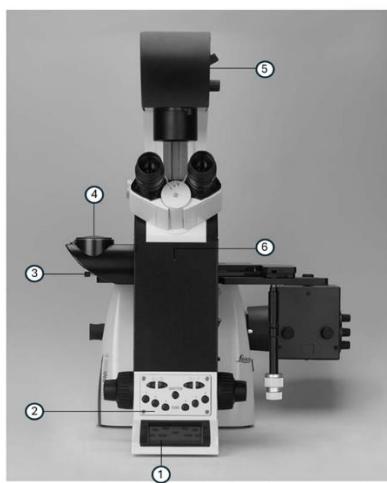
PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

 	POP N. 002 MICROSCÓPIO LEICA DMI4000B	Elaboração: 09/2018 Versão: 2.0 (07/2025)
---	--	--

2. OPERAÇÃO

2.1 LIGANDO E CONFIGURANDO O MICROSCÓPIO (CAMPO CLARO)

- Ligar o computador e o monitor (os dois nobreaks devem ficar sempre conectados à rede elétrica);
- Ligar a fonte de energia do microscópio (LEICA CTR 4000);
- Abrir o programa "LAS V4.12" (ícone na área de trabalho);
- Posicionar a lâmina na platina e ajustar canhão de aumento (para aumento de 100x usar óleo de imersão);
- Focar o campo desejado e efetuar os ajustes de intensidade nos botões "INT" na lateral esquerda do microscópio;
- Puxar o pino na lateral esquerda do microscópio (Fig. 2 - 3) para transpor a imagem da câmera para o computador;
- No software não alterar nada na aba "Setup";
- Na aba "Acquire > Camera" selecionar "Automatic exposure" ou configurar manualmente as (Exposure/Gain/Saturation/Gamma);
- Efetuar os ajustes e clicar em "ACQUIRE IMAGE" para fazer o registro da imagem;
- Criar ou selecionar a pasta onde o arquivo será salvo dentro de "Usuários Microscópio > Usuários externos" (para colaboradores) ou "Usuários Microscópio > BioRep" (para integrantes do Laboratório);
- Na aba "Browse" é possível visualizar as informações das imagens adquiridas;
- Na aba "Process" é possível inserir informações nas imagens tais como barra de escala;
- Na aba "Analysis" encontram-se as ferramentas de medição das imagens.



- 1 – Tela de informações
 2 – Painel frontal
 3 – Pino de troca de porta
 4 – Porta superior
 5 – Filtros de luz transmitida
 6 – Centralizador de lente de Bertrand
 7 – 100% para oculares (Inativo)
 8 – Seleção de porta (Inativo)



- 9 – Seleção de aumento (Inativo)
 10 – Lente 1X (Inativo)
 11 – Abre/fecha Shutter (interrompe luz para fluorescência)
 12 – Cubo de filtro A4
 13 – Cubo de filtro L5
 14 – Cubo de filtro N2.1

Adaptado: Leica (2010)

Figura 2 – Componentes gerais da face frontal do DMI4000B

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

 Universidade Federal de São Paulo	POP N. 002 MICROSCÓPIO LEICA DMI4000B	Elaboração: 09/2018 Versão: 2.0 (07/2025)
---	---	--

2.2 MÉTODOS DE CONTRASTE

2.2.1 Campo Claro (BF)

- Selecionador de técnica (Fig. 3 – a – 1) na posição BF – DF;
- Condensador na posição 7 (verificar manualmente no microscópio e no software);
- Retirar o polarizador do caminho óptico (Fig. 3 – c – 4);
- Retirar o analisador do caminho óptico (Fig. 3 – d – 5);
- Posicionar o filtro de IMC em 0 (zero, Fig.).

2.2.2 Campo Escuro (DF)

- Selecionador de técnica (Fig. 3 – a – 1) na posição BF – DF;
- Condensador na posição 1 (verificar manualmente no microscópio e no software);
- Retirar o polarizador do caminho óptico (Fig. 3 – c – 4);
- Retirar o analisador do caminho óptico (Fig. 3 – d – 5);
- Posicionar o filtro de IMC em 0 (zero, Fig. 3 – b – 2).

2.2.3 Integrated Modulation Contrast (IMC)

- Selecionador de técnica (Fig. 3 – a – 1) na posição BF – DF;
- Condensador na posição 3, 4 ou 5 de acordo com a objetiva utilizada (verificar manualmente no microscópio);
- Inserir o polarizador do caminho óptico (Fig. 3 – c – 4);
- Retirar o analisador do caminho óptico (Fig. 3 – d – 5);
- Posicionar o filtro de IMC em B ou C de acordo com a objetiva utilizada (Fig. 3 – b – 2).

2.2.4 Difference Intensity Contrast (DIC)

- Apenas na objetiva de 100x;
- Selecionador de técnica (Fig. 3 – a – 1) na posição DIC;
- Condensador na posição 2 (verificar manualmente no microscópio);
- Inserir o polarizador do caminho óptico (Fig. 3 – c – 4);
- Inserir o analisador do caminho óptico (Fig. 3 – d – 5);
- Posicionar o filtro de IMC em 0 (zero, Fig. 3 – b – 2).

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

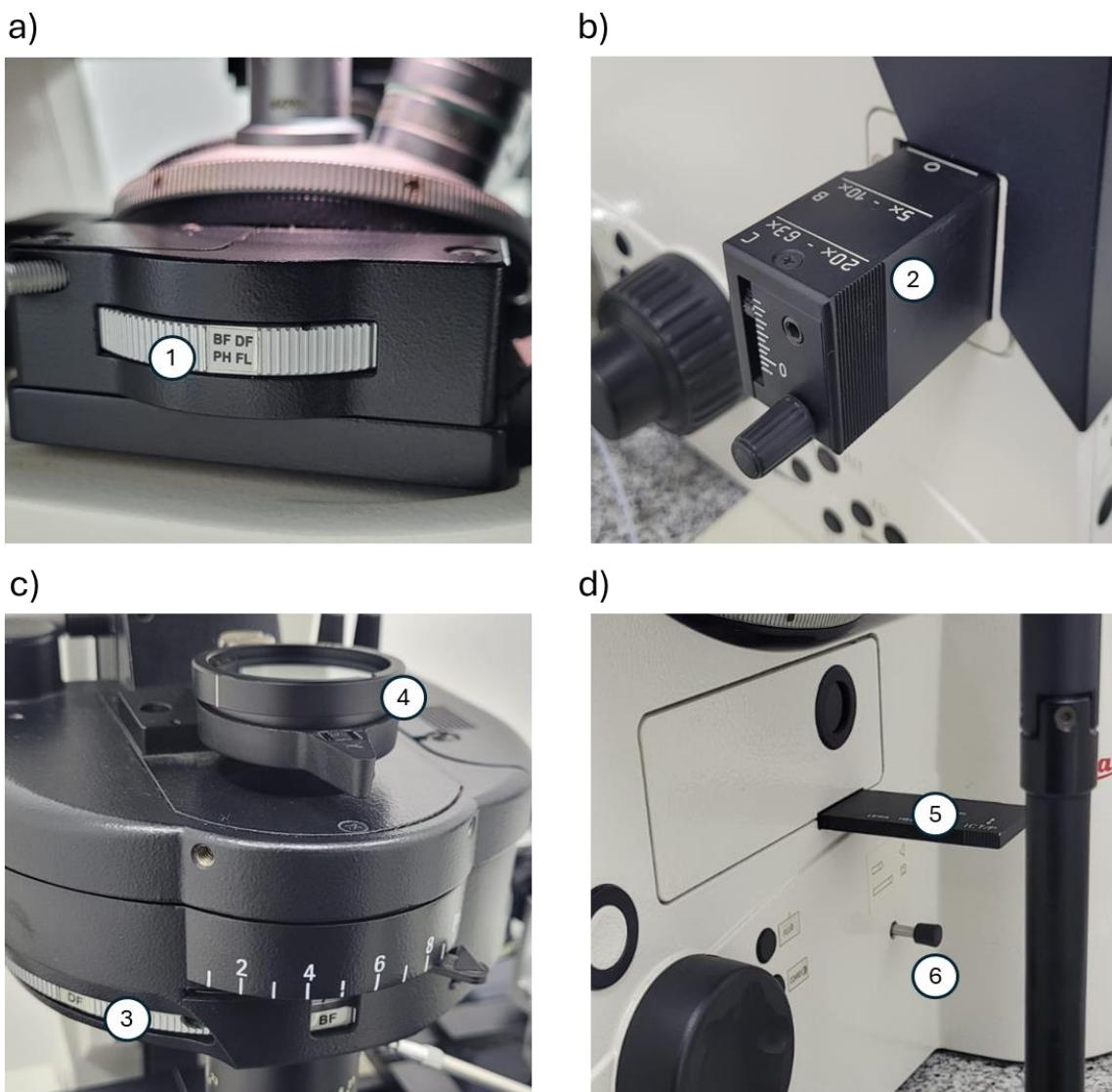


POP N. 002

Elaboração: 09/2018

MICROSCÓPIO LEICA DMI4000B

Versão: 2.0 (07/2025)



Adaptado: Leica (2010)

Figura 3 – a) Seletor de técnica; b) Filtro de IMC; c) Condensador; d) Analisador e pino de seleção de porta lateral.

2.3 UTILIZANDO A FLUORESCÊNCIA

- Após ligar e configurar o microscópio usando o campo claro (Item 2.1)
- Ligar a fonte da lâmpada de fluorescência (ebq 100);
- **Anotar na ficha de uso o horário de início e término do uso da lâmpada;**
- Abrir o programa "LAS AF" (ícone na área de trabalho);
- No software não alterar nada na aba "Configuration";
- Na aba "Acquire > Experiments" clicar em "New" (para criar um novo experimento);
- Na aba "Acquisition" manter o tempo de exposição para todas as imagens ou configurar manualmente (Exposure/Gain/Intensity);
- Na aba "Light Path > Contrast method" selecionar "FLUO";

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		
 	POP N. 002	Elaboração: 09/2018
	MICROSCÓPIO LEICA DMI4000B	Versão: 2.0 (07/2025)

- Configurar os filtros de fluorescência no software ou nos botões do painel frontal (azul/verde/vermelho) - Fcr1, Fcr2, Fcr3;
 - a) A4 – Faixa de excitação UV (BP 360/40);
 - b) L5 – Faixa de excitação azul (BP 480/40);
 - c) N2.1 - Faixa de excitação verde (BP 515-560).
- Colocar a lâmina virada para baixo na platina;
- Ajustar canhão de aumento (Obs.: para aumento de 100x usar óleo de imersão);
- Botão "SHUTTER" do microscópio (ativa/desativa fluorescência);
- Botão de intensidade na lateral esquerda do microscópio (controle de luminosidade);
- Puxar o pino na lateral direita do microscópio para transpor a imagem da câmera para o computador (Fig. 3 – d – 6);
- Clicar em “LIVE” para visualizar em tempo real a imagem;
- Clicar em “SINGLE IMAGE” para fazer o registro de uma única imagem;
- Clicar em “CAPTURE IMAGE” para capturar as imagens nos diferentes filtros além da imagem com sobreposição dos filtros;
- Em "Acquire > Experiments" clicar com botão direito na imagem desejada e "EXPORT" para exportar a imagem;

2.3 DESLIGANDO O MICROSCÓPIO

- Ao finalizar fechar o programa em uso "LAS V4.12" ou "LAS AF";
- Desligar a fonte de energia da fluorescência;
- Desligar a fonte de energia do microscópio;
- Desligar o computador e o monitor;
- **Não cobrir o microscópio com a capa imediatamente, esperar 20 minutos** para o resfriamento das lâmpadas.
- **Obs.:** manter sempre ligados os nobreaks e limpar o óleo de imersão com lenço Kimwipes se usar a objetiva de 100x;
- **Assinar a ficha de uso do microscópio preenchendo o horário de início e término de uso e se foi utilizada a fluorescência.**

REFERÊNCIAS

LEICA MICROSYSTEMS. Leica DMI3000B, DMI4000B, DMI6000B Instructions. 2010.

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO



POP N. 002 (ANEXO I)

Elaboração: 09/2018

MICROSCÓPIO LEICA DMI4000B

Versão: 2.0 (07/2025)

FICHA DE USO DO MICROSCÓPIO LEICA DMI4000B

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO



POP N. 002 (ANEXO II)
MICROSCÓPIO LEICA DMI4000B

Elaboração: 09/2018

Versão: 2.0 (07/2025)

Range of Filter Cubes Light Microscopes

Filter Cube	Excitation Range	Excitation Filter	Dichromatic Mirror	Suppression Filter
A4	UV	BP 360/40	400	BP 470/40
L5	blue	BP 480/40	505	BP 527/30
N2.1	green	BP 515-560	580	LP 590

Correlation of Fluorochromes and Filter Cubes

Fluorochrome	Filter Cube
Acid fuchsin	M2 N2.1
ACMA	E4
Acridine blue	A
Acridine orange	H3 I3
Acridine red	N2.1 N3
Acridine yellow	H3 I3
Acriflavin	E4 H3
Acriflavin-Feulgen-SITS (AFS)	D
Alexa 350	A4
Alexa 488	L5
Alexa 532	N3
Alexa 546	Y3
Alexa 555	Y3
Alexa 568	TX2
Alexa 594	Alexa 594 TX2
Alexa 633	Y5
Alexa 647	Y5
Alexa 700	Y7
Alizarin complexion	N2.1
Alizarin red	N2.1
Allophycocyanin (APC)	Y3 Y5
AMCA (Aminocoumarin)	A
AMCA/FITC/Texas Red	B/G/R
Aminoactinomycin D-AAD	N2.1 N3
Aniline blue	A
Astrazone Brilliant Red 4G	N2.1
Astrazone Orange R	I3 L5

Astrazone Red 6B	N2.1
Astrazone Yellow 7 CLL	H3
Atabrine	E4 H3
Auramine	H3 I3
Aurophosphine, Aurophosphine G	H3 I3
BCECF	FURA2 L5
Benzoxanthen Yellow	D
Berberine sulphate	H3
Beta-Lactamase	S Blue/Aqua
BFP/GFP (simultaneous)	BFP/GFP
BisAminophenyl Oxdiazol (BAO)	A
Bisbenzimidole (Hoechst)	A D
Blancophor BA	A D H3
Blancophor SV	A
BODIPY FL	I3 K3 L5
Brilliant Sulphaflavine FF	D H3
Bromobimane (Thiolite)	D
Calcein	I3
Calcein blue	A
Calcium Crimson	Alexa 594 Y3
Calcium Green	I3 K3 L5
Calcium Green-1	YFP2
Calcium Orange	M2 N2.1
Calcofluor White	D H3

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO



POP N. 002 (ANEXO II)

MICROSCÓPIO LEICA DMI4000B

Elaboração: 09/2018

Versão: 2.0 (07/2025)

Calcofluor White standard solution	A
Carboxyfluorescein diacetate C-FDA	I3 L5
Cascade Blue	A D
Catecholamines (adrenalin, noradrenalin, dopa, dopamine)	D
CFP	CFP
CFP/YFP (simultaneous)	CFP/YFP
Chromomycin A (mithramycin, olivomycin)	E4
Coriphosphine O	H3 I3
Coumarin-phalloidin	D
Cy 2(TM)	GFP CY2
Cy 3	CY3/CY5 Y3
Cy 5	CY3/CY5 CY5 Y5
Cy 5.5	Y 5.5
Cy 7	Y7
Cy3/TRITC	CY3/TRITC
Cyan-Yellow-/Red-FP (simultaneous)	CFP/YFP/DsRed
CyQuant	GFP CY2
DANS (diamino-naphtyl sulphonic acid)	A
Dansyl chloride	A
DAPI	A D
DAPI (selective)	A4
DAPI/FITC	B/G
DAPI/FITC/CY3	DAPI/FITC/CY3
DAPI/FITC/Texas Red (simultaneous)	B/G/R
DAPI/TRITC	B/R
DHE	DHE
Dil	Y3
DIO	GFP CY2 I3 K3
Diphenyl brilliant flavine 7 GFF	H3
DIPI	A
Dopamine	A
DPH (diphenyl hextariene)	A
EGFP	Alexa 594 GFP CY2
Eosin B	N2.1 YFP2
Ethidium bromide	N2.1
Euchrysin	D H3
Evans Blue	N2.1
Fast Blue	A
Fast Green FC G	M2 N2.1

FDA (fluorescein diacetate)	H3 I3 K3 L5
Feulgen	N2.1 TX2
FIF (formaldehyde induced fluorescence)	D A
FITC (fluorescein isothiocyanate)	H3 I3 K3 L5
FITC (selective)	L5
FITC/CY3/CY5	FITC/CY3/CY5
FITC/ethidium bromide	I3 L5 N2.1
FITC/phycoerithrin (PE) (simultaneous)	G/R
FITC/Texas Red (simultaneous)	FITC/Texas Red G/R
FITC/TRITC (simultaneous)	FI/RH
Fluo 3	I3 L5 YFP2
Fluoro Gold	A
Fluram (fluorescamine)	A
FURA2	FURA2
Genacryl Brilliant Red B	N2.1
Genacryl Brilliant Yellow	E4
Generic Blue	D
GFP (Green Fluorescent Protein)	GFP GFP CY2 GFP (Narrowband)
Granular Blue	A
Haematoxylin	N2.1
Hoechst dye no. 33258	A A4 D
Hoechst dye no. 33342	A A4 D
Hydroxy-4-methylcoumarin	A
JP1	JP1
JP2	JP2
Lissamine-rhodamine B (RB 200)	M2 N2.1
Lucifer Yellow	E4
Magdala Red	N2.1
Maleimide	A
Mepacrin	D
Merocyanin 540	N2.1
Mithramycin	E4
MPS (methyl Green Pyronine stilbene)	A
Nile Red	TX2
Nuclear Fast Red	M2 N2.1 N3
Nuclear Yellow	A

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO



POP N. 002 (ANEXO II)

MICROSCÓPIO LEICA DMI4000B

Elaboração: 09/2018

Versão: 2.0 (07/2025)

Olivomycin	E4
Oregon Green (488, 500, 514)	L5
Oxytetracycline	D
Pararosaniline (Feulgen)	N2.1 TX2
Phosphine 3 R	H3 I3
Phycoerythrin (PE)	N2.1 N3
Primulin Q	D
Procion Yellow	D E4 H3
Propidium iodide	N2.1
Pyronine B	M2 N2.1
Qdot605	Qdot 605
Quinacrine mustard (QM)	E4
Resorufin	N2.1 Y3
Reverine	D
RFP	Red GFP
Rhodamine B	I3 L5 YFP2
Rhodamine B	N2.1
RS-GFP (Narrowband)	Alexa 594
Serotonin	A D
sgGFP (TM)	GFP CY2
SITS acriflavine Feulgen	D
SITS (stilbene isothiosulphonic acid)	A
Spectrum Aqua	S Aqua
Spectrum Blue	S Blue
Spectrum Blue/Aqua	S Blue/Aqua
Spectrum FRED	S FRED
Spectrum Gold	S Gold
Spectrum Green	S Green
Spectrum Orange	M2 N2.1 S Orange
Spectrum Red	S Red
Sulphaflavine	A
Tetracyclines: oxytetracycline, tetracycline, reverine (pyrrolidinomethyltetracycline), chlortetracycline, dimethylchlortetracycline	D
Texas Red	TX2
Texas Red (selective)	TX2
Thiazin red R	M2 N2.1
Thioflavine S	D H3
Thioflavine TCN	A

Thiolyte (bromobimane)	D A
TRITC (selective)	N3
TRITC (selective)	N3
TRITC (tetramethyl rhodamin isothiocyanate)	N2.1 N3
True Blue	A
Uranine B	H3
Uvitex 2 B	A D
wtGFP (non UV)	GFP CY2
XRITC	N2.1 N3
Xylene orange	M2 N2.1
YFP	YFP YFP2
YO-PRO-1	GFP CY2
YOYO-1	GFP CY2