

Microscopio Nikon Eclipse TS (Fluorescencia invertida & Unidad de barrido confocal)

Consejos prácticos antes de utilizar el microscopio

- Limpiar el objetivo y los oculares con papel para microscopio (lens cleansing tissues). En caso de querer hacer una limpieza más a fondo utilizar una mezcla de alcohol absoluto y éter etílico al 50% (también es correcto utilizar alcohol solamente pero siempre absoluto!, no la 70%).
- Jugar con las pestañas de luz para obtener más o menos señal. Cuanto más se abran tendremos mejor fluorescencia, pero también quemaremos más la muestra.
- Filtros superiores en el microscopio: no los vamos a utilizar, por lo que todas las pestañas han de estar fuera. Si vemos una sombra sobre la preparación podría ser que alguno de estos filtros no estuviese sacado del todo.
- Mientras se haga uso de la fluorescencia se recomienda tener la luz apagada (se aconseja tener un flexo de luz indirecta para poder trabajar correctamente y que nuestra vista se acomode mejor). También se recomienda tapar los oculares mientras miramos a través de la cámara, para que la luz no entre por estos.
- Antes de cambiar de objetivo asegurarnos de bajar lo suficiente con el macrométrico para que no choque contra la preparación. Mucho cuidado cuando usamos el objetivo de 60X porque es más alto que el resto y si giramos el revolver sin quitar la parte de la pletina (disco) se podría dañar (de hecho ya tiene algún pique).
- Cuando estemos trabajando con preparaciones fijadas en un porta, es mejor mirar a través del cubre que del porta (poner el porta hacia abajo), ya que el grosor que la luz tendrá que atravesar es menor.
- Si tenemos duda de qué filtro usar con un determinado fluoróforo, en el programa del microscopio podemos consultarla (nos proporciona longitudes de onda de emisión y excitación). Devices → Matching fluorescent probes and filters.
- Si tenemos DAPI, hacer esas fotos las últimas para causar menos photobleaching.
- Binning: agrupa píxeles para que quepan más fotones y aumente la sensibilidad. Sin embargo, se pierde resolución. Además, es más rápido, la luz incide menos sobre la muestra y nos ayuda a no quemar tanto la preparación. En modo confocal, siempre poner No binning.
- LUT: Look Up Table: la parte que vemos de la imagen.

- Usar objetivo de 60X
 - Es deseable que la preparación esté sobre vidrio
 - Se enrosca el objetivo al lado del de 40X
 - Se echa una pequeña gota de aceite de inmersión sobre el objetivo. Para limpiarla, pasar papel de limpieza (lens creansing tissue).
 - Para guardar el objetivo se ha de enroscar en la tapa de la funda y después ya cerrar.
- Para hacer pantallazos dentro del programa, se puede utilizar snipping tool (una mano dentro de un cuadrado rojo).
- Para enfocar con la rueda del ratón: View: enable mouse joystick (es como usar el micrométrico).
- Para descargar el NIS F Viewer en nuestros ordenadores: Help: HASP info: te da el key que necesitas.

Consideraciones antes de utilizar la unidad de barrido confocal

- Cuando la lámpara confocal esté encendida, no es recomendable mirar a través de los oculares, ya que la luz es muy potente y podría ser perjudicial. Solo usamos los oculares para enfocar la muestra y después se trabaja directamente desde la pantalla del ordenador y con el micrométrico externo al ordenador.
- A mayor apertura numérica, mejor seccionado óptico. Por ello las imágenes obtenidas, serán mejores con objetivos de alto aumento. Cuando la carcasa de un objetivo es negra, este será de peor calidad que uno con cubierta metálica. En concreto, nuestro objetivo de 10X es bastante malo. Es interesante es que para confocal el objetivo sea APO, para evitar que los distintos filtros de color den señales diferentes.
- Para poder determinar la imagen tridimensional, nuestra preparación debe ser fluorescente. Por ejemplo, en el caso de nuestras cápsulas, si la cápsula en sí no es fluorescente, no me podrá hacer una imagen tridimensional.
- El bloque de filtros es cuádruple, aunque aparezcan 6 líneas en el spectra pad, realmente solo tenemos 4 (440nm y 510nm no los tenemos, por eso en OC Panel directamente no aparecen).
- Cuando se gastan las lámparas de confocal, hay que llamar a servicio técnico, no las podemos cambiar nosotros.

Utilización del equipo

1. Encendido. Encender lo que necesitemos en función del modo en el que trabajemos y siempre, lo último que se enciende es el ordenador (al apagar, seguir el orden contrario):

- Lámpara de mercurio para la fluorescencia (power e ignition)
- Lámpara de luz blanca
- Iluminador confocal
- Enfoque motorizado
- Cámara (al encenderse pitará)
- PC

2. Software NIS. En el PC:

- I. Abrir el programa NIS
- II. Se abrirá una ventana en la que hay que seleccionar “with DSD2”.
- III. En el programa contamos con 3 pestañas distintas en las que trabajar (panel inferior, bajo la imagen):

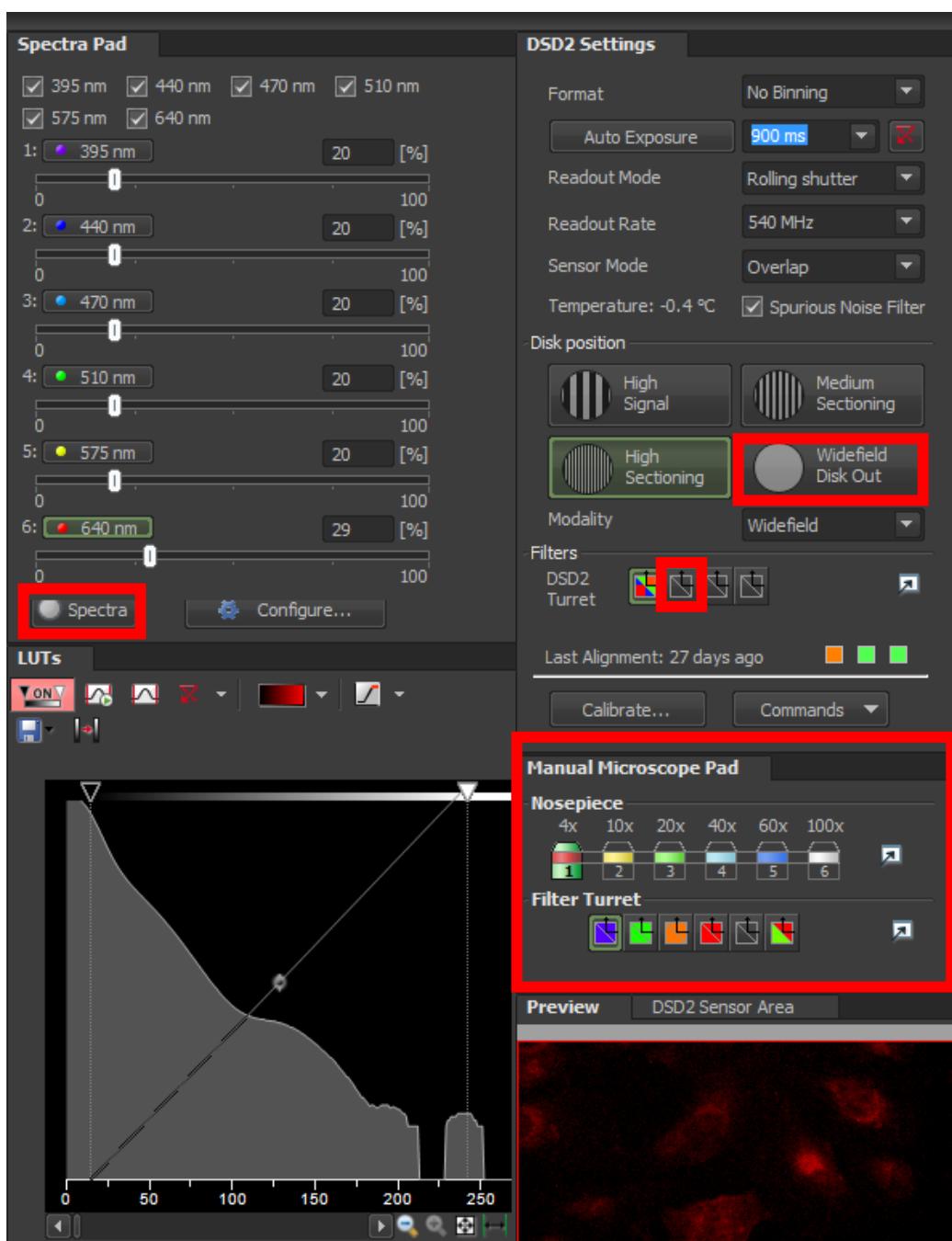


- Docked controls: será el menú con el que trabajemos habitualmente
- Full screen
- Measurement: será el menú a través del cual podremos analizar la imagen

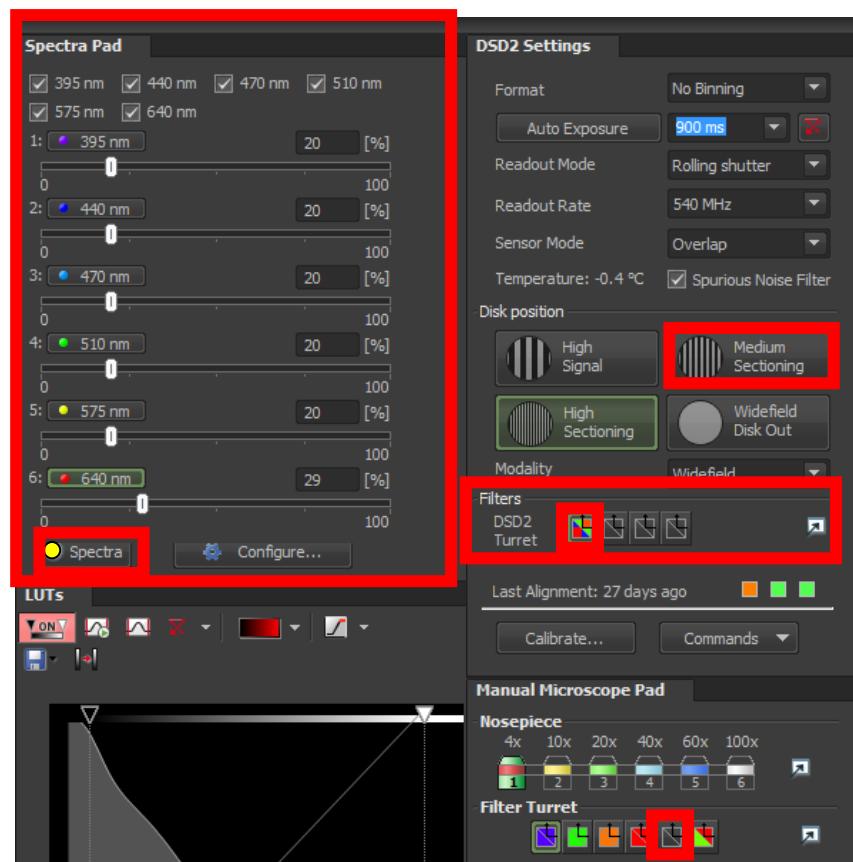
3. Ajuste de Settings. Ajustar los Settings del modo en el que vamos a trabajar: fluorescencia (lámpara de mercurio) o confocal. Fluorescencia se manejará desde Manual microscope Pad y confocal desde Spectra Pad. Se han de seleccionar los parámetros adecuados para la modalidad que nos interese (en la imagen en rojo aparece lo que tenemos que seleccionar):

a. El modo fluorescencia (lo que hemos venido usando hasta ahora)

- Disk position: Widelfield disk **out**
- Filters: DSD2 Turret: seleccionar uno de los huecos en el que **no** haya filtro. La idea es que ni este paso ni el anterior estén interfiriendo con el paso de la luz, han de estar vacíos los dos.
- Spectra: el botón amarillo de la parte inferior del panel spectra pad debe estar desactivado. Es el obturador de la lámpara confocal y ha de estar cerrado.
- Manual microscope pad: elegir el color del filtro que manualmente hemos seleccionado en el microscopio

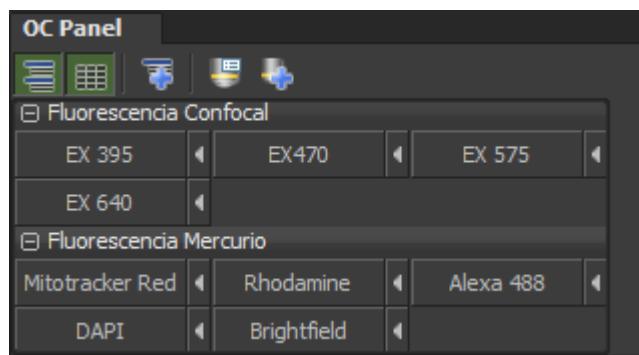


- Disk position: **medium** sectioning (aunque hay más opciones, nos han recomendado trabajar con esta)
- Filters: DSD2 turret: primer filtro con colores
- Manual microscope Pad: Filter torrent: filtro vacío (número 5. Asegurarnos que en el microscopio, tenemos esto vacío! Hay que hacerlo manualmente)
- Siempre que se utilice la microscopía confocal, hay que poner el filtro del microscopio en la posición 5 (importante!)
- Spectra: el botón amarillo de la parte inferior del panel spectra pad se debe activar. Es el obturador y ha de estar abierto.
- No binning (siempre!)
- Los tiempos de exposición pueden rondar sobre 70-200ms...esto dependerá de la señal que nos de la muestra. A más tiempo, más señal, pero la fluorescencia se irá perdiendo más rápido. Otra opción para tener más señal sería aumentar en Spectra Pad la intensidad de la exposición de la lámpara que estemos usando pero esto es poco recomendable porque habría más photobleaching. → Es mejor aumentar el tiempo de exposición que la intensidad de la lámpara.
- En el apartado Manual Microscope Pad, habrá que especificar el objetivo con el que estamos trabajando para que las calibraciones a la hora de hacer medidas (como diámetros o la barra de calibración que se puede añadir sobre la imagen) sean correctas.



Para no tener que configurar todas las opciones cada vez que cambiamos de modo vamos al panel inferior, que básicamente son configuraciones que nos han guardado para que en un click se nos cambien todas las opciones anteriores. Lo único que tenemos que tener en cuenta y mucho cuidado es de las cosas que tenemos que hacer manualmente en el microscopio ya que no es totalmente automático.

OC Panel: Elegir el modo en el que se quiere trabajar (Fluorescencia mercurio=la que hemos venido usando hasta ahora o Fluorescencia confocal=iluminación con diodo) y pulsar la longitud de onda adecuada para tu experimento (en spectra Pad se pueden ver los colores de las distintas longitudes de onda). Al seleccionar cada opción se establece la configuración adecuada. También se determinarán automáticamente los DSD2 Settings más adecuados (tiempos de exposición, binning, etc.) pero después podremos modificarlo en base a nuestra preparación.

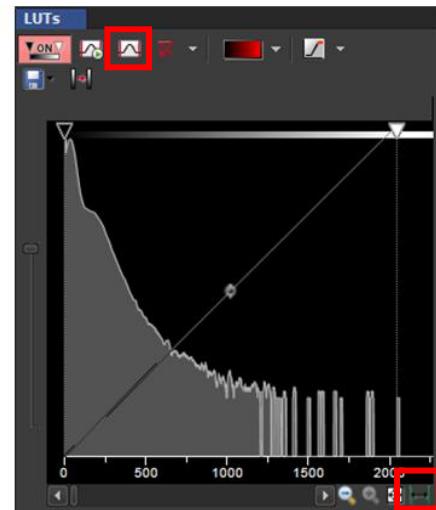


*Estas condiciones que nos ha determinado, las ha guardado en la carpeta “Configuración backup”, el archivo se llama “Default OC”. Así, **si alguien modifica o elimina las plantillas** (conveniente no mover nada!!), **puedes volver a importarlo desde optical configuration panel**. Cuando estás mirando con estas especificaciones, puedes modificar algunas cosas: tiempos de exposición, o filtros, etc. Te aparecerá una exclamación al lado de EX para indicar que han cambiado. Si le das a la flechita de al lado de EX, se van a guardar estas nuevas condiciones sobre la plantilla (**preferiblemente no guardar los cambios! O si se cambian, dejar la configuración original cargada para que el siguiente usuario lo encuentre en las condiciones originales**).

Dentro de la parte de Fluorescencia de mercurio, hemos puesto una pestaña que es Brightfield. Sería la que debemos usar para hacer una foto sin fluorescencia (porque la queramos así o porque queramos hacer un “merge” entre esta imagen y otra imagen de fluorescencia). En el microscopio, en la ruleta de arriba, debemos elegir la “A” y el iris tiene que estar al 80% abierto (aunque se puede modificar en función de la luz que queramos darle a nuestra foto). En este caso, la exposición puede ser de unos 50ms y el histograma se moverá desde 0 hasta 50000.

4. **Captura.** El histograma muestra los niveles de gris. Se aconseja que muestre unos 1000 niveles de gris (rango dinámico).

- Para encontrar la imagen que queremos ver, seleccionar Autoscale (3º botón de la parte superior)
- Para que nos muestre la parte de histograma en la que nos encontramos, seleccionar el último botón de la fila inferior (Auto Range). También se puede aumentar el histograma en el eje vertical, pulsar sobre este y mover el ratón hacia arriba.
- Para quitar el ruido del fondo (por ejemplo, que el fondo salga más negro para dar contraste a la imagen), podemos mover hacia la derecha el límite izquierdo del histograma.
- Si cambiamos el tiempo de exposición, hay que volver a hacer un Autoscale.
- Para hacer la foto hay dos opciones:



- ❖ **Captura normal:** icono de la cámara en la fila superior sobre la imagen o pulsar “+”. Aparecerá en la parte inferior la captura, para guardarla habrá que ir a File → Save as → Guardarla como .TIFF (En LUTS hay que seleccionar “saved LUTS” para que se guarde lo que hemos capturado. Compression: none)
- ❖ **Autocapture:** se hace la foto y se guarda directamente en .TIFF en la carpeta que determines (para cambiar la carpeta, bajo la cámara hay una barra en la que pone Users → Browse)

* Siempre que se nos activa el botón rosa es que estamos viendo una parte de la imagen (la que hemos seleccionado en el histograma), pero al guardarla se guardará todo el fichero. Al clickar el botón rosa, nos aparece la imagen “raw”.

Modo confocal

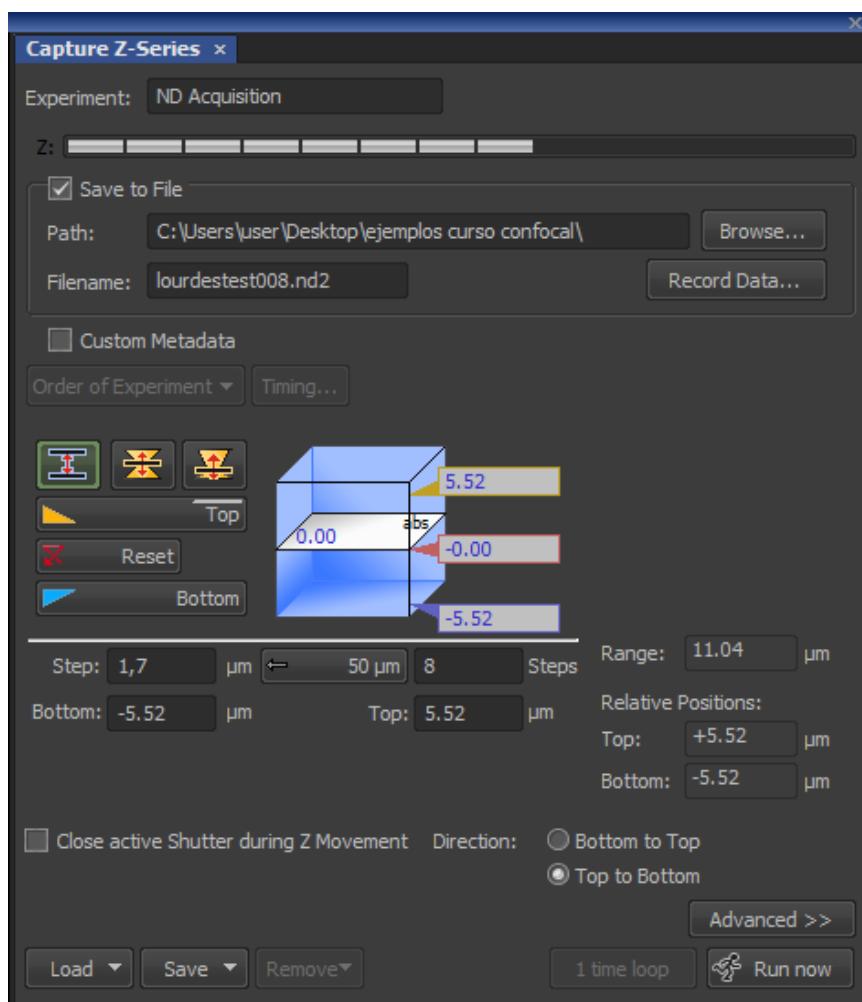
Al hacer el seccionado óptico, cuando se enfoca un plano, lo que está en otros planos no aparece, a diferencia de widefield, en el que ves otros planos pero desenfocados. Aquí el rango dinámico va a ser mucho menor, por lo que hay que aumentar los tiempos de exposición para llegar al rango dinámico ideal (sobre 1000 niveles de gris).

Z stack

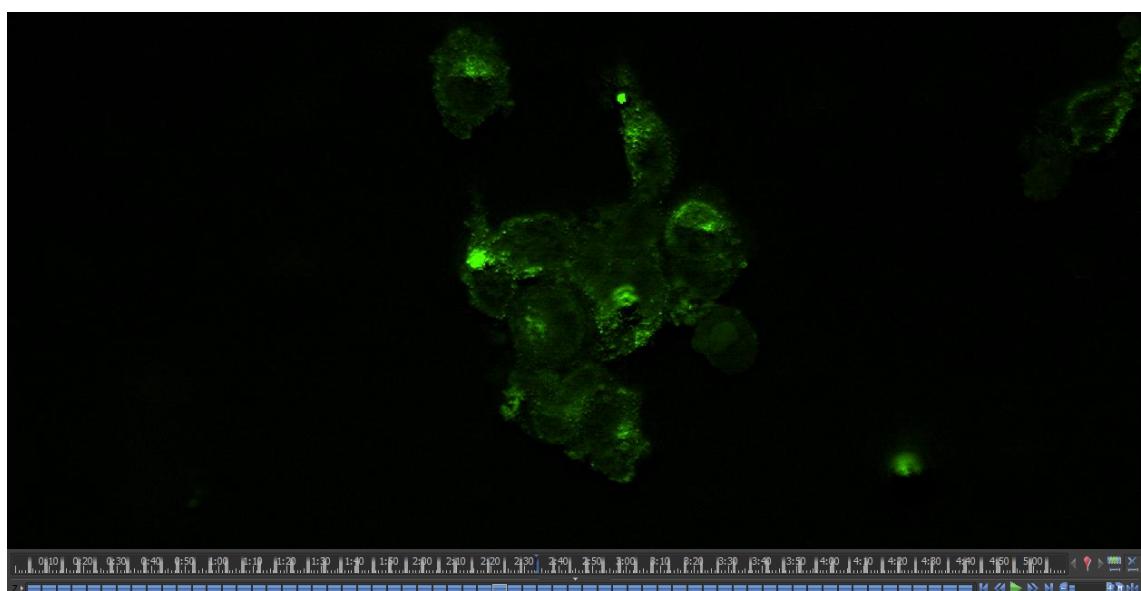
Se trata de realizar fotos a lo largo de todo el grosor de nuestra muestra.

No nos recomiendan usar el objetivo de 10X, deberíamos usar mayores aumentos.

Para ello, primero se ha de enfocar en el plano que nos interese (en la mitad de la muestra, aproximadamente), y posteriormente programar la captura: adquire → capture Z series → capture automatically. Se abrirá un cuadro de diálogo en el que aparece un cubo mostrando en qué plano estás. Pulsar en el enfoque motorizado “Set zero” para que tome este plano como el punto de partida.



- I. Existen 3 maneras de realizar el Z stack atendiendo a los 3 botones que aparecen:
 - a. **Definir top y bottom:** la más usada. Partiendo de nuestro zero, con el enfoque motorizado se enfoca (o se va desenfocando más bien) hacia arriba hasta que la fluorescencia se deje de ver (pantalla en negro). Ese valor lo fijamos como top clickando sobre dicho botón. Hacer lo mismo bajando y establecer el bottom (para saber si estás yendo a top o a botón, fijarse en el dibujo del cubo). Así, el programa determina cuál es el grosor de nuestra muestra y sugiere el número de cortes que hacer (Steps).
 - b. Establecer un rango desde donde estás hacia arriba y abajo
 - c. Establecer un rango donde vayas hacia arriba una distancia y hacia abajo otra
- II. Save to file: si está activado con un tick, el stack se guardará en el directorio especificado en "Path".
- III. Elegir top to bottom en microscopios invertidos (en directos será al revés)
- IV. Run now
- V. La imagen obtenida cuenta con una barra inferior en la que puedes ir viendo las distintas capturas que ha tomado. Pulsando Alt se seleccionan los distintos planos. Si sobre los seleccionados pulsamos botón derecho podemos eliminarlos: delete selected frames. Así, en caso de en los primeros y últimos planos ya no encontramos la muestra, podemos eliminarlos.
- VI. El archivo obtenido es un único documento, un stack de varias imágenes.



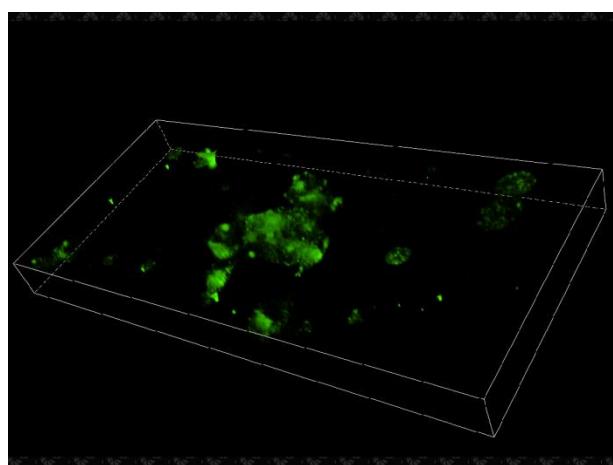
VII. En la ventana que se abre con la nueva foto, encontramos los iconos de rendering: para seleccionarlos se ha de pinchar y soltar sobre la imagen.



- Se recomienda eliminar los primeros 500 niveles de gris.
 - **Show maximum intensity projection:**  De toda la columna de píxeles, elige el nivel de gris máximo en cada plano. De este modo, vamos a apreciar por ejemplo, en una cápsula todas las células que están en distintos planos y que antes veíamos desenfocadas. **Esta es la foto buena que guardar.** Se le puede poner la escala y después convertirla a RGB 8 bits. Si quieres que solo se te guarde la parte de la imagen que estás viendo: Edit Create view snapshot 8 bit RGB. File Save as: .tiff.

*Esta imagen no nos servirá para hacer colocalización, ya que falsearía los resultados de dicho análisis.

- Para guardar un video del z stack: file → save as .avi. En el apartado “Experiment loop” seleccionar z stack loop. Compression: no compression (porque al comprimir podría ocurrir que lo haga de tal manera que otros ordenadores no puedan descomprimirlo y por lo tanto no lo puedan reproducir).
 - Para ver la vista de nuestra muestra dentro del clásico cubo: volume view 



- Si quieres guardar un video de nuestra muestra dentro de este clásico cubo: en la barra de esa ventana de cubo: show movie maker (camarita). Definir posiciones de la vista:



- Primero elegir dónde empieza el video: add/update key frame. Seleccionar cuantos segundos quieras que pasen hasta la segunda vista, seleccionar cual quieras que sea la segunda vista y vuelves a darle a add/update key frame. Cuando acabes: create movie. File → save as: .avi, sin compresión.
- *El .avi de mac no funciona igual que el de Windows, por lo que este formato puede dar problemas en ordenadores Apple.
- En este tipo de vista, se podría quitar la silueta del cubo. Si quisieras guardar un video sin el cubo se debe quitar antes de entrar en el movie maker.

***Z stack con varios colores a la vez no se puede hacer directamente.** Habría que hacer las fotos con cada canal por separado, y después merge. En concreto, habría que determinar las condiciones buenas para un color, meterte en el asistente de Z-stack, determinar tu top y tu bottom y hacer el z-stack. Sin cerrar el asistente, se cambia de color y se establecen los parámetros tiempo de exposición, etc. Con los mismos parámetros en el asistente, se hace otro Z-stack con ese color. Ahora vamos a File → merge channels y seleccionamos esos 2 archivos, nos unirá todas las fotos del stack.

*Es posible hacer un “crop” dentro del Z-stack para hacer una serie de imágenes (película) pero solo de un área de interés. El “crop” se aplica a toda la serie de imágenes.

Procesamiento de imágenes con NIS

Merge channels

Cuando haces varias fotos del mismo plano de enfoque pero con distintos filtros (como calceína-etidio o más bien, con marcaje de distintos fluoróforos o de campo claro más un fluoróforo)

- Una vez has sacado fotos con los distintos filtros: File → Merge channels → Browse (elegir la imagen adecuada para cada color)
- Habrá que hacer un Autoscale que podremos modificar a nuestro gusto bien, los dos (o más) canales juntos o bien cada uno por separado.
- Save as .TIFF

Cambiar el tipo de imagen obtenida.

Es mejor hacerlo a través de este programa que de photoshop. Este paso será necesario a veces, ya que las fotos obtenidas con este microscopio son muy grandes y algunos programas (Photoshop, power point, etc.) no las soportan. Image → Convert to y elegir 8 bit o lo que sea adecuado en cada caso.

Reutilizar unos settings.

Si haces una foto con unos determinados settings y al tiempo quieres volver a utilizar esos mismos parámetros: abrir la imagen → click derecho sobre ella → reuse device settings.

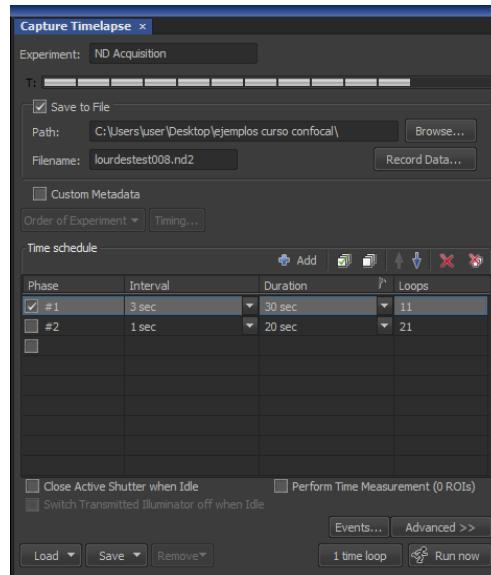
Time lapse

Adquiere → Capture time lapse → Capture automatically (podría hacerse en manual e ir haciendo click en cada momento en el que se quiere tomar una foto). Se generan fases (fase=velocidades, por ejemplo: los primeros 30 segundos, tomar imágenes cada 2 segundos, luego, los siguientes 30 segundos, tomar imágenes cada 5 segundos, etc...). Se ha de establecer el tiempo que se quiere que dure esa fase y cuantas imágenes se quieren tomar. Si las fases no están seleccionadas con un tick, no se tendrán en cuenta. Browse: guardar dónde quiera. Run now.

Para determinar la intensidad en unos determinados ROI (región of interest) a lo largo del tiempo: Botón derecho → analysis → time measurement. Seleccionar todos los ROI → finish

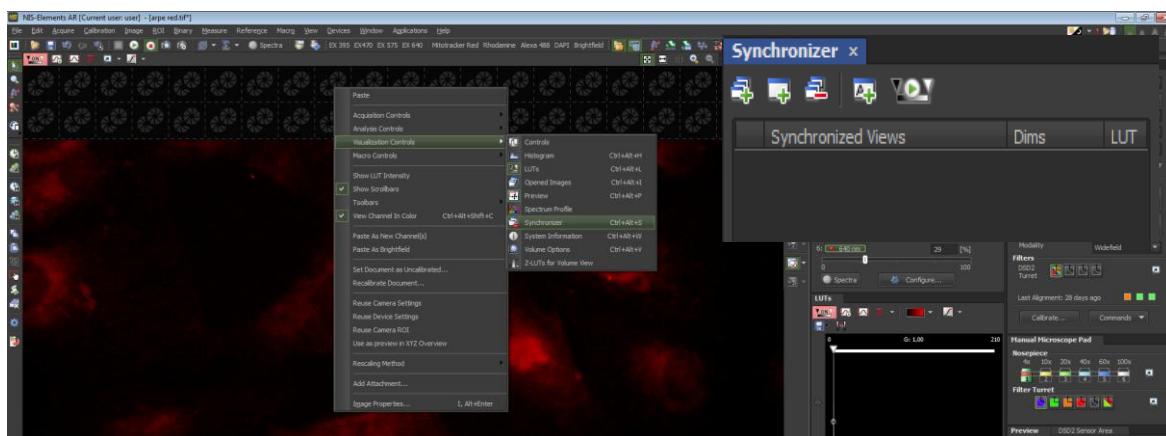
Nos dará las medidas de intensidad de cada ROI por separado y podemos identificar cada uno de ellos en la imagen. Esto es interesante a la hora de hacer ensayos de FURA-2.

Los ROIs que usemos se pueden guardar como tal, de manera independiente a la fotografía, de manera que los podemos cargar otro día en otra imagen para comparar, por ejemplo.



Navegar por varias imágenes a la vez

- Botón derecho sobre los bordes grises de la imagen: Visualization controls → synchronizer



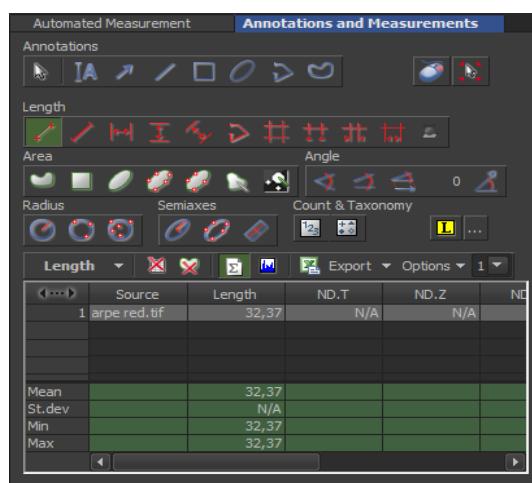
- Se nos abre un asistente. Con el segundo botón (Add current view) se añade la foto que estás viendo en ese momento. Hacer lo mismo con todas las fotos por las que quieras navegar a la vez.

Colocalización sobre merged images

- Botón derecho sobre la foto → Analysis controls → Colocalization.
- Nos dará información sobre el nivel de colocalización a través de la medida numérica de diversos parámetros y también lo podemos ver en modo de gráfica.

Medir diámetros

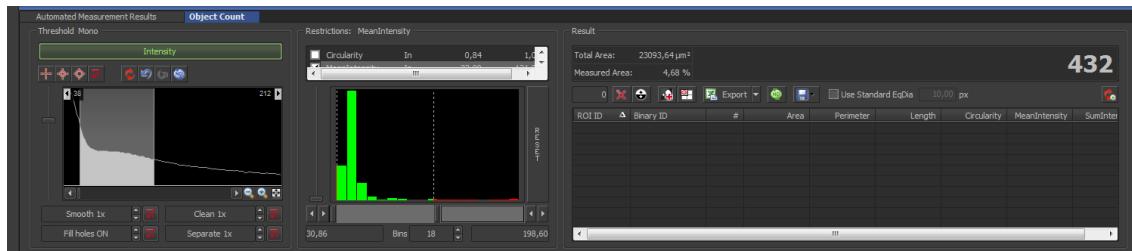
- Ir a la pestaña de measurements (todos los datos que obtengamos de esta pestaña, se pueden exportar a Excel).
- En el panel izquierdo "Annotations and Measurements" elegir la herramienta que nos convenga del menú "Length"
- Nos saldrá automáticamente la medida en el recuadro inferior



En este mismo panel de “Annotations and measurements” se pueden seleccionar objetos con la “varita mágica”: “Autodetect” . Así pinchas sobre el objeto que quieres seleccionar y rodea todo su perímetro. Además, en este menú, podemos cambiar “Length” y hacer muchas otras medidas: área, radio, taxonomía, etc. En concreto, en taxonomía, puedes crear categorías. Imaginemos que tenemos una foto en la que aparecen dos tipos celulares. Podríamos asignarle a cada uno un ícono e ir haciendo click en la foto sobre los que vamos viendo. Así, una vez seleccionados todos, cada tipo celular estará marcado con un ícono, y en la categoría de ese ícono nos dará el número que hay de cada uno y los parámetros que nos interesen.

Contar objetos

En la pestaña de measurement en el panel inferior: object count



Lo primero es definir en el programa, qué es para nosotros un objeto.

En la parte derecha aparece el histograma. Se ha de seleccionar lo que es positivo. Para ello, sobre el histograma, elegir con qué parámetro queremos discriminar (RGB, intensidad, etc) y con uno de los 3 iconos con forma de cruz se seleccionan automáticamente los puntos de igual intensidad. Bajo el histograma, hay una serie de botones. Si le damos a "clean" va eliminando objetos en función de su tamaño (seleccionas el tamaño que quieras borrar). Esto es muy útil para eliminar ruido. Los demás filtros sirven para suavizar bordes, separar objetos que están unidos o llenar agujeros.

En la parte central, se hacen restricciones. Si le das al botón derecho aparecen más opciones. Por ejemplo, se pueden quitar los objetos alargados estableciendo que los objetos seleccionados sean circulares. Para ello, se selecciona circularity con un tick. En la gráfica de este panel central, se ha de seleccionar el rango en el que queremos trabajar.

En la parte derecha aparece el número de objetos. Además, aparece una tabla con las características de cada objeto.

Contar objetos dentro de un elemento

Hacer un ROI en el elemento dentro del cual queramos contar (por ejemplo una cápsula en la que queremos contar el número de células). Para el caso de las cápsulas es útil el ROI de círculo en 3 puntos.

Ayuda sobre los comandos: 2 maneras:

- Help search: buscar lo que necesitemos
- Help on cursor (F1). El ratón se convierte en una interrogación y puedes pulsar sobre lo que te interese.