

Utilización del microscopio confocal Olympus Fluoview FV500

Índice

A) Descripción del microscopio confocal Fluoview FV500

B) Encendido del equipo:

1. *Encendido del SAI*
2. *Encendido de los controladores del módulo confocal, del microscopio y del PC*
3. *Encendido de los láseres y de las lámparas de luz transmitida y de fluorescencia*
4. *Encendido del software Fluoview*

C) Manejo del microscopio:

1. *Cómo poner la muestra en el microscopio*
2. *Visualización de la muestra con luz transmitida*
3. *Visualización mediante fluorescencia convencional*
4. *Cambio a modo de visualización y captura de imágenes confocales*

D) Adquisición de imágenes en modo confocal

1. *Selección de fluorocromos*
2. *Selección del modo de adquisición (XY, XYZ, XYt, XYZt, modo secuencial...)*
3. *Optimización de las condiciones de captura*
4. *Captura de imágenes*
5. *Procesamiento y almacenamiento de imágenes*

E) Apagado del equipo

NOTA: Ante cualquier duda, consultar con el personal del Servicio. Es importante no dañar ningún componente (por ejemplo, el objetivo de aceite), ahorrar tiempo, sacar las mejores imágenes posibles, etc.

A) Descripción del microscopio confocal Fluoview FV500



Microscopio Olympus IX81 Motorizado.
Objetivos disponibles

UPLFLN4x/0.13 WD 17mm
 UPLAPO10x/0.40 U Plan Apochromat, WD 3.1mm
 UPLAPO20x/0.70 U Plan Apochromat (spring), WD 0.65mm
 LUCPLFLN 20x/0.45 (larga distancia de trabajo) WD 6.6-7.8mm
 UPLAPO40x/0.85 U Plan Apochromat (spring, cc), WD 0.20mm
 PLAPO60xO3/1.40 Plan Apochromat (spring, oil), WD 0.15mm

Condensador NA0.55 WD27.0mm con polarizador y prismas DIC para todos los aumentos
SISTEMA DE CONTROL DE TEMPERATURA: Controlador y platina termostatizada Linkam.

Filtros de fluorescencia

U-MWU-2 Cubo para microscopía de fluorescencia , excitación de banda ancha UV, filtro de excitación BP330-385, espejo dicroico DM400, filtro de barrera BA421. Filtro para Alexa 350, DAPI, Hoechst, EBFP, GFPY66H, GFPY66F, etc.
 U-M51017 Cubo para microscopía de fluorescencia CFP/YFP
 U-MNB2 Cubo para microscopía de fluorescencia. Excitación de banda estrecha Azul, filtro de excitación BP470-490, espejo dicroico DM500, filtro de barrera BA516. Filtro para Alexa 488, FITC, Cy2, EGFP, GFPS65A, GFPS65L, GFPS65T, etc.
 U-MWG2 Cubo para microscopía de fluorescencia. Excitación de banda ancha Verde, filtro de excitación BP510-550, espejo dicroico DM570,filtro barrera BA591. Filtro para Alexa 546, TRITC, Cy3, EYFP, DsRed, etc.

- Módulo confocal FV500: Unidad de escaneo y de control del sistema. Consta de 4 detectores confocales, permitiendo la captura simultánea de 4 señales de fluorescencia más una de luz transmitida (no confocal). Filtros barrera y espejos dicroicos controlables mediante software. Pinholes individuales para cada detector (4 pinholes).

Más información en: <http://www.olympusfluoview.com/products/fv500/index.html>

- 4 láseres con 7 líneas de excitación con control mediante AOTF.
 - Diodo láser a 405nm
 - Láser de Argón con 3 líneas de excitación (457, 488 y 514nm)
 - Laser HeNe verde (543nm)
 - Laser HeNe rojo (633nm)

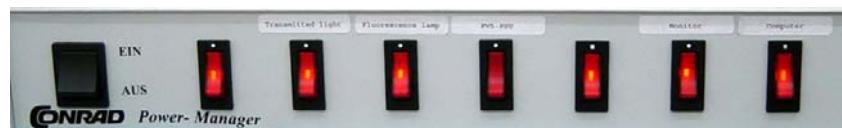
B) Encendido del equipo:

1. Encendido del SAI.

Hay dos sistemas de alimentación ininterrumpida (SAI 1 y SAI 2). El número 1 alimenta el confocal Olympus y el SAI 2 el Leica. Para encenderlo, subir los 2 interruptores de la parte posterior del SAI 1 y a continuación, encender el interruptor del frontal del SAI. Hace un ruido bastante desagradable.

2. Encendido de los controladores del módulo confocal, del microscopio y del PC

- Poner regleta de la balda superior en posición ON (EIN) y subir todos los interruptores desde la izquierda hacia la derecha



De esta forma se enciende la PSU general (balda inferior derecha, junto al PC) y la PSU del LD405 (Si no se va a utilizar, no es necesario encenderla), el controlador de motorización del microscopio (junto al monitor)



b. Encender el PC.

3. Encendido de los láseres y de las lámparas de luz transmitida y de fluorescencia

- Encender la luz transmitida (balda superior) y la lámpara de fluorescencia (balda inferior izquierda, fuente de color blanco) **sólo si se van a utilizar**.



b. Encender las fuentes de alimentación de los láseres **que se vayan a utilizar** (balda inferior izquierda, menos el diodo LD 405, que está en la balda

superior). Para encender el láser de Argon, se enciende primero el interruptor en posición I y luego se gira la llave hacia la derecha.



4. Encendido del software Fluoview

Una vez encendido el PC (lleva Windows XP) hay que esperar dos minutos para abrir el software que controla el confocal. Para ello, hacer doble click en el acceso directo **Fluoview**, que se encuentra en el escritorio

Nombre de usuario: usuario

NOTA: tarda un rato cargar el programa (un par de minutos aproximadamente)

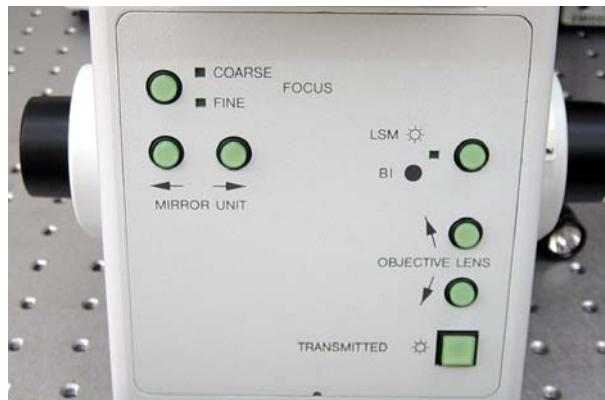
Apuntar la hora de inicio en el registro de usuarios

C) Manejo del microscopio:

El IX81 es un microscopio invertido motorizado de muy fácil manejo. Todos los cambios de objetivos, los filtros de fluorescencia, los prismas DIC o los *shutter* de luz transmitida y de fluorescencia se cambian desde el panel situado a la izquierda el microscopio.



Desde el frontal del microscopio se cambia el modo de enfoque macro o micrométrico (coarse o fine) y el cambio de la ruta óptica de visualización por los binoculares (BI) a modo confocal (LSM), aunque esto también lo hace automáticamente el software.



1. Cómo poner la muestra en el microscopio

El principal punto a tener en cuenta es que el IX81 es un microscopio **invertido**, por lo que el portaobjetos se coloca al revés, con el cubreobjetos en la parte inferior, que es donde se encuentran los objetivos.



Este detalle es muy **importante** si no se está familiarizado con este tipo de microscopios, ya que corremos el **riesgo de dañar el objetivo**, sobre todo en el momento de **poner la muestra y enfocar**. Veamos, por ejemplo, cómo colocar la muestra con la óptica de 60x, que es de inmersión en aceite.

- Enfocar la muestra con un objetivo de menor aumento (por ejemplo, 20x o 40x)
- Retirar la muestra y poner el objetivo de 60x, sobre el que se deposita una *pequeña* gota de aceite de inmersión.
- Bajar el objetivo apretando el botón verde del panel de control del microscopio.

- Colocar de nuevo la preparación (sin sujetar aún con las pinzas), volver a apretar el botón verde para que el objetivo suba de nuevo hasta contactar con el cubreobjetos y enfocar la preparación.
- Poner las pinzas *suavemente* para fijar la preparación y volver a enfocar
- En caso de querer localizar con óptica de aceite una zona visualizada previamente con óptica de seco, hay un adaptador para portaobjetos que lo permite. Consulta con el personal del Servicio si deseas utilizarlo.

2. Visualización de la muestra con luz transmitida

Con el microscopio en modo BI, abrir el *shutter* de luz transmitida (botón TSHT del panel de control), encender previamente la lámpara (balda superior) y regular la intensidad con el potenciómetro. Realizar un ajuste de iluminación de Köhler con el objetivo a utilizar. Si se desea ver en modo Nomarski, poner el prisma DICT en el panel de control, introducir el polarizador en el condensador e introducir el analizador que se encuentra debajo del revolver de objetivos.

Nota 1: Si se utiliza el diodo láser, no se puede poner el polarizador, ya que se estropea.

Nota 2: El analizador interfiere en la captura de imágenes confocales, disminuyendo ligeramente la fluorescencia que llega al detector.

3. Visualización mediante fluorescencia convencional

Con el microscopio en modo BI, abrir el *shutter* de luz reflejada o de fluorescencia (botón RSHT del panel de control), encender previamente la lámpara de fluorescencia y dejar que se caliente. Poner el filtro adecuado para visualizar el fluorocromo a estudio en el panel de control. Si queremos quemar menos la muestra, se puede intercalar un filtro que limita la intensidad de excitación un 25% (está junto a la lámpara de mercurio)

4. Cambio a modo de visualización y captura de imágenes confocales

Apretando el botón de BI o LSM del frontal del microscopio o del software, o bien se pasa directamente a modo confocal al comenzar a visualizar una imagen mediante el botón Focus del software Fluoview

D) Adquisición de imágenes en modo confocal

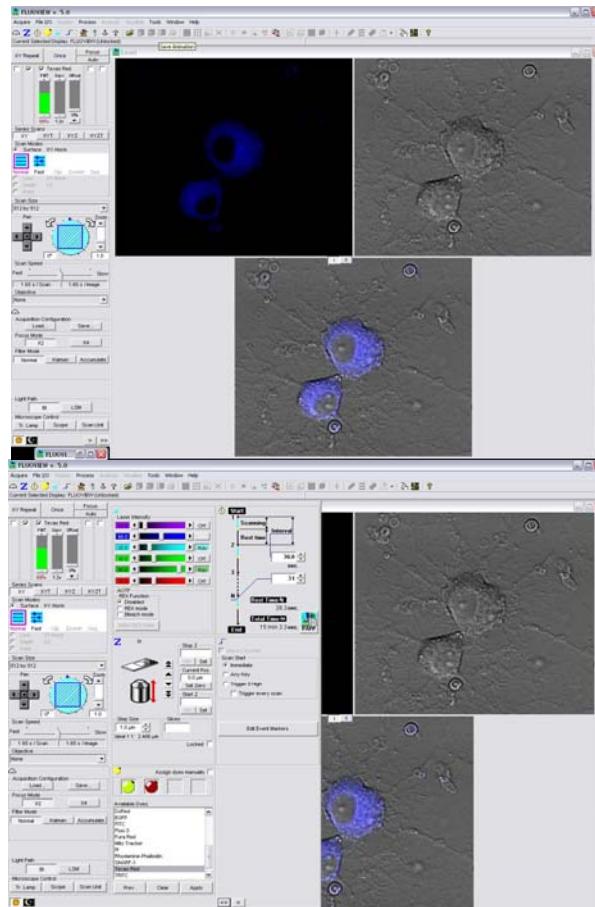
Debido a la extensión de este apartado, únicamente se van a enumerar las principales consideraciones a tener en cuenta en la captura de imágenes confocales. Aconsejamos la lectura del manual del software Fluoview (disponible en pdf y del que hay una copia impresa en el Servicio a vuestra disposición).

La aplicación de software Fluoview es intuitiva y de fácil manejo. El interfaz de usuario está diseñado mediante un sistema de paneles compuesto por dos partes principales: (1) menú de control con un sistema de pestañas con las distintas opciones de captura y procesamiento (que ocupa el 20% de la pantalla) y (2) visualización de la imagen (80% de la pantalla). Posee un menú de Ayuda que sugiere la ruta óptica y el juego de filtros más apropiado para la unidad de escaneo y para el microscopio.

Olympus tiene una web con un simulador de manejo del software de adquisición del microscopio confocal FV1000. Es muy útil para practicar.

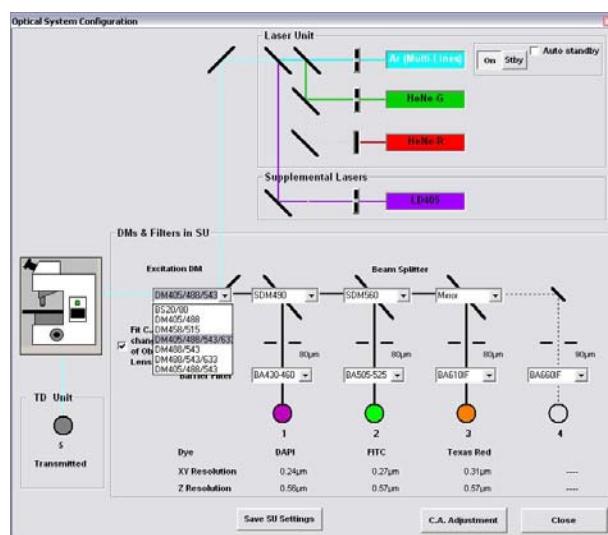
<http://www.olympusfluoview.com/java/confocalsimulator/index.html>

Ejemplos del interfaz del software Fluoview del m. confocal Olympus FV500



1. Selección de fluorocromos

En la pestaña *Dyes*, seleccionar de la lista los fluorocromos a examinar y pulsar el botón *Apply*. Si no aparece el fluorocromo requerido, seleccionar uno de características espectrales similares (preguntar si no se sabe). Dependiendo de los fluorocromos seleccionados, la ruta óptica se modificará automáticamente (láser para cada excitación, dicroico principal, dicroicos secundarios, pinhole, filtros barrera, PMTs, etc.)



2. *Selección del modo de adquisición: XY, XYZ, XYt, XYZt, modo secuencial...*

3. *Optimización de las condiciones de captura*

- Resolución de las imágenes: Son imágenes de 12 bits (4096 niveles de grises). La resolución espacial depende de la óptica y zoom utilizados. En principio, el muestreo correcto debería cumplir el criterio de Nyquist. Sin embargo, en muchas ocasiones, esto conlleva, mayor tiempo de captura, mayor tamaño de las imágenes, mayor apagamiento del fluorocromo, etc. Normalmente capturamos imágenes de 1024x1024 pixels para modo XY y de 512x512 para modo XYZ, XYt, XYZt.

- Intensidades habituales de cada láser. La apertura del AOTF por defecto para cada uno de los láseres es la siguiente:

LD 405 nm: 10%

Multi Argon a 488 nm: 10-25%

HeNe G 543nm: 80%

HeNe R 633nm: 50-80 %

Estas intensidades se pueden modificar fácilmente.

- Sensibilidad de los detectores: Para variar la sensibilidad de cada fotomultiplicador se puede trabajar con 3 parámetros: el *voltaje*, el *gain* y el *offset*. El rango de voltaje de los fotomultiplicadores con los que trabajamos habitualmente está en torno a 450-600 v. En base a nuestra experiencia, si la señal es muy tenue en los oculares, será difícil obtener una imagen decente, el confocal no hace milagros. Por encima de 700v la señal no es muy fiable. Hay que tener todos los controles negativos necesarios. El *offset* es muy útil para muestras con bastante ruido de fondo (por ejemplo, secciones histológicas gruesas).

- Captura secuencial: En caso de tener sobrecruzamiento de espectros de emisión entre los fluorocromos utilizados, se realiza una excitación y captura en modo secuencial de cada uno de los fluorocromos. Muy útil en estudios de colocalización.

- Zoom: El confocal dispone de un zoom bastante eficiente y de gran utilidad. Básicamente, lo que hace al aumentar el zoom es disminuir el área de barrido y obtener el mismo número de puntos (pixels) del área scaneada, aumentando la resolución de la imagen utilizando el mismo objetivo. Siguiendo el criterio de Nyquist, para cada objetivo y cada resolución de captura existe un nivel de zoom a partir del cual no se aumenta la resolución.

4. *Captura de imágenes*

Una vez configuradas las condiciones de adquisición, se aprieta una vez al botón de capturar, que aparecerá como XY, XYZ, etc., dependiendo del modo de captura seleccionado. Cuando está capturando no se debe tocar nada del equipo, ni mover el microscopio.

5. *Procesamiento y almacenamiento de imágenes*

Una vez capturada la imagen, ésta se guarda en formato multifit que, además de las imágenes, posee toda la información acerca de la configuración del equipo durante la adquisición.

Guardar todas las imágenes en su carpeta correspondiente. La ruta a seleccionar será:
D:/Usuarios/Departamento/Nombre de usuario/fecha del día

Posteriormente, estas imágenes se procesarán y guardarán en el formato necesario (por ejemplo, TIFF, AVI, etc.). Para ello, el Servicio dispone de estaciones de trabajo *off-line* con el mismo software, con lo que se evita la saturación del equipo de captura con el procesamiento de imágenes. También existe un visualizador gratuito de Olympus que permite trabajar con imágenes multitiplif en un ordenador propio. Se puede descargar en:

http://downloads.olympus-europa.com/microscopy/software/FV_Viewer.exe

NOTA: El Servicio no se responsabiliza de las imágenes almacenadas en ninguno de los equipos. Cada usuario deberá guardar copias de sus imágenes. Por cuestiones de seguridad informática, no se recomienda el uso de Pendrives. Todos los equipos poseen grabador de CD y DVD.

E) Apagado del equipo

- **IMPORTANTE: si se ha utilizado el objetivo de aceite (60x), limpiarlo utilizando únicamente papel limpiador de lente.** Si no tienes experiencia, habla con el personal del Servicio.
- IMPORTANTE: Una vez encendidos los láseres y la lámpara de fluorescencia, no se deben apagar en 15-30 minutos
- IMPORTANTE: Apagado de láseres y lámpara de Hg.

Una vez apagados los láseres y la **lámpara de fluorescencia, no se pueden volver a encender hasta que se han enfriado** (unos 30 minutos). Es necesario COMPROBAR si alguien los va a utilizar a continuación antes de apagarlos. Si alguien va a utilizarlo, dejarlos encendidos y comunicárselo al personal del Servicio antes de irlos. Si se va a esperar más de 2 horas hasta utilizar de nuevo los láseres, es conveniente apagarlos.

- Salir del Software Fluoview y apagar el PC.
- Apagar todos los interruptores de la regleta de la balda superior desde la derecha hacia la izquierda. Apagar el botón general de la regleta.
- Cuando se apaga el láser de Argon, es necesario ESPERAR a que pare el ventilador y apagar la fuente de alimentación antes de desconectar la corriente del SAI 1 (tarda unos pocos minutos).
- Cubrir el microscopio con su funda, evitando cubrir la lámpara de Hg si ha estado encendida (está caliente).
- Apuntar el tiempo de utilización del equipo, la lectura del contador de la lámpara de fluorescencia y cualquier observación importante en el libro de registro de usuarios.