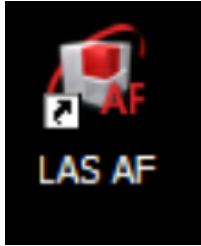


Captación y optimización de la imagen en microscopía confocal

*Andrés Esteban Cantos y Covadonga Alonso Martí
Laboratorio de Interacción virus-célula
Departamento de Biotecnología del INIA*

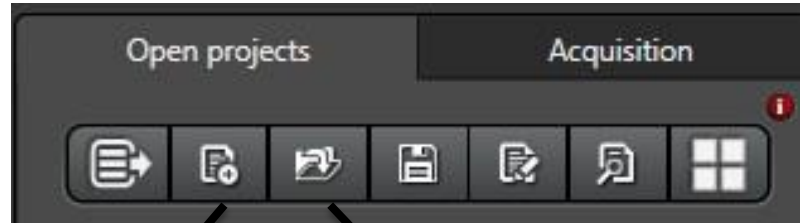


Panel de control de programa LAS AF



A screenshot of the LAS AF software interface. The top navigation bar includes 'Configuration', 'Acquire', 'Process', 'Quantify', and 'Analysis'. The 'Acquire' tab is active. The interface is divided into several sections: 'Open projects' and 'Acquisition' on the left; a central control area with 'Load | Save | Roi' and 'Load/Save single setting: User Settings'; a 'Visible' control panel with three sliders for 488, 532, and 635 nm; a 'Specimen' section with a diagram of the optical path; a 'Configuration' panel with 'Objective: Empty 1x/0.00', 'Beamsplitter: DD 488/635', and 'Fluo Turret: Scan-BF'; and a 'Spectral' section with a color scale from 400 to 700 nm and a 'PMT 1' control set to 'ON' with 'Gain [V]: 100.0' and 'Offset [%]: 0.00'.

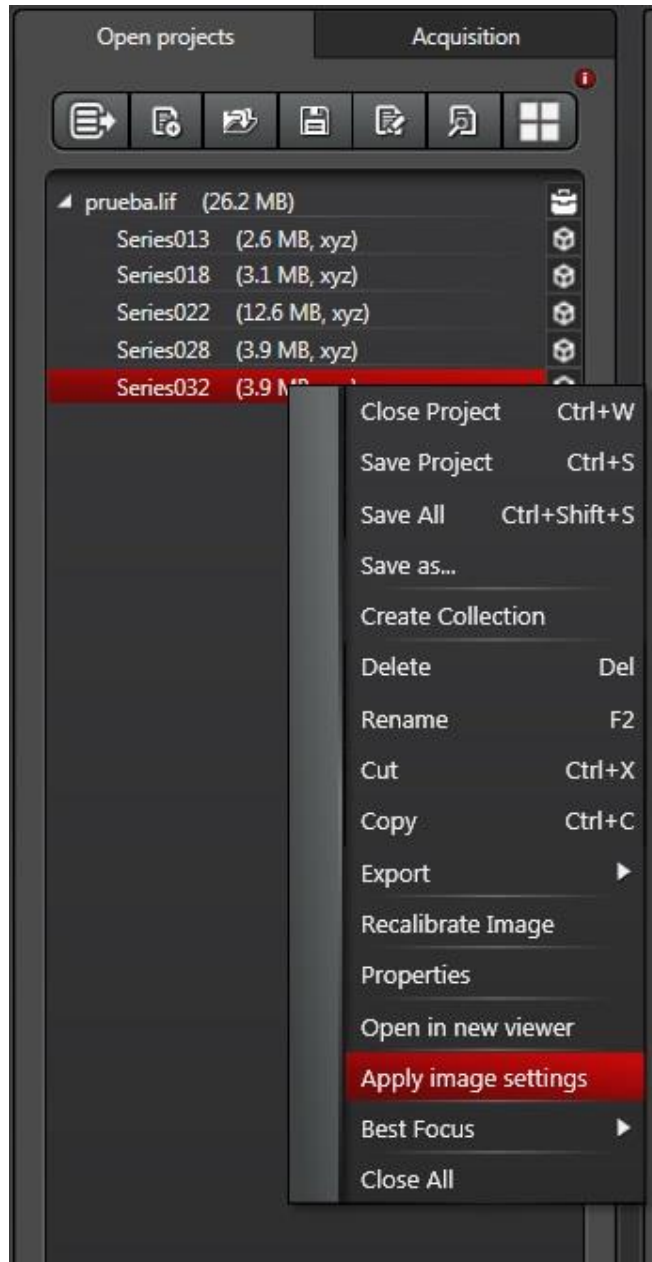
Apertura y creación de experimentos



crear nuevo experimento

Abrir un experimento previamente guardado

Captación y optimización de la imagen

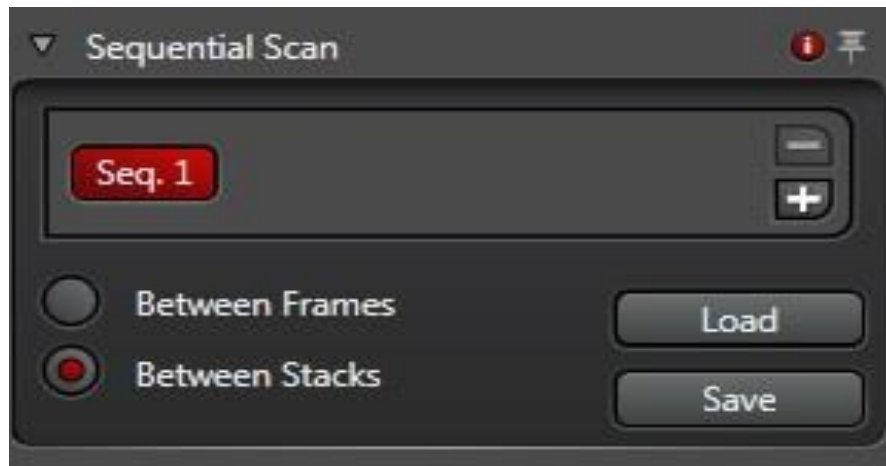


Abriendo un experimento previo y marcando la opción **“apply”**, se aplicarán automáticamente las condiciones que se fijaron en dicho experimento

Establecimiento de condiciones para un nuevo experimento:

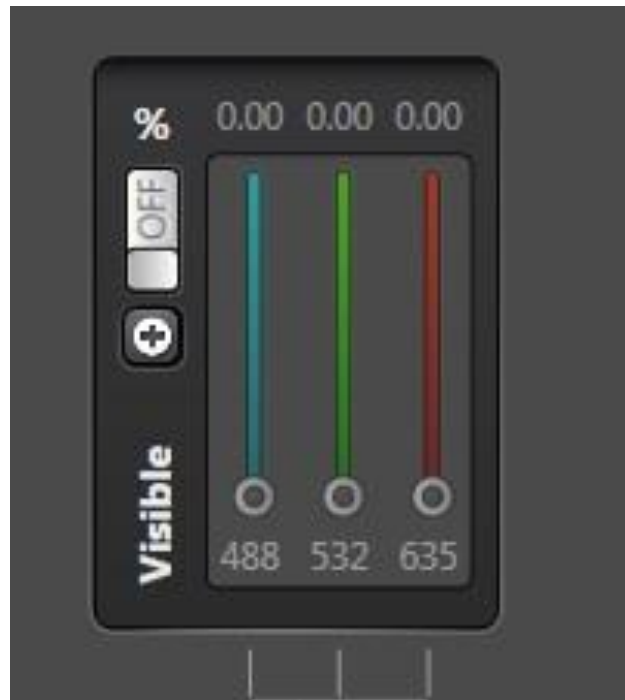


El comando “seq” abre el panel “sequential scan”



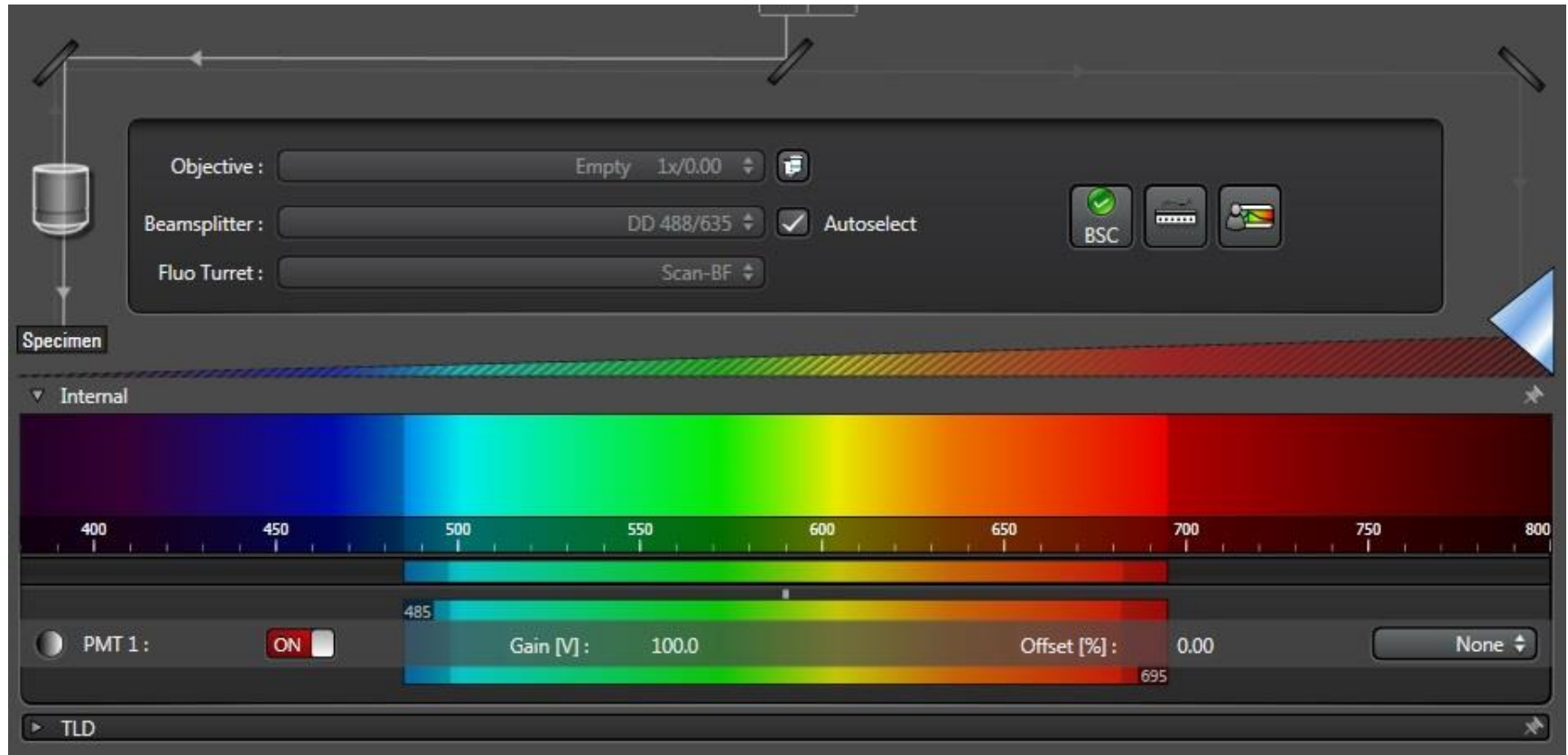
Se pueden cargar o crear diferentes “scan” o canales de fluorescencia. Al seleccionar “Between stacks”, se captan todas las imágenes de un canal antes de pasar al siguiente

Parámetros a ajustar para cada uno de los canales seleccionados



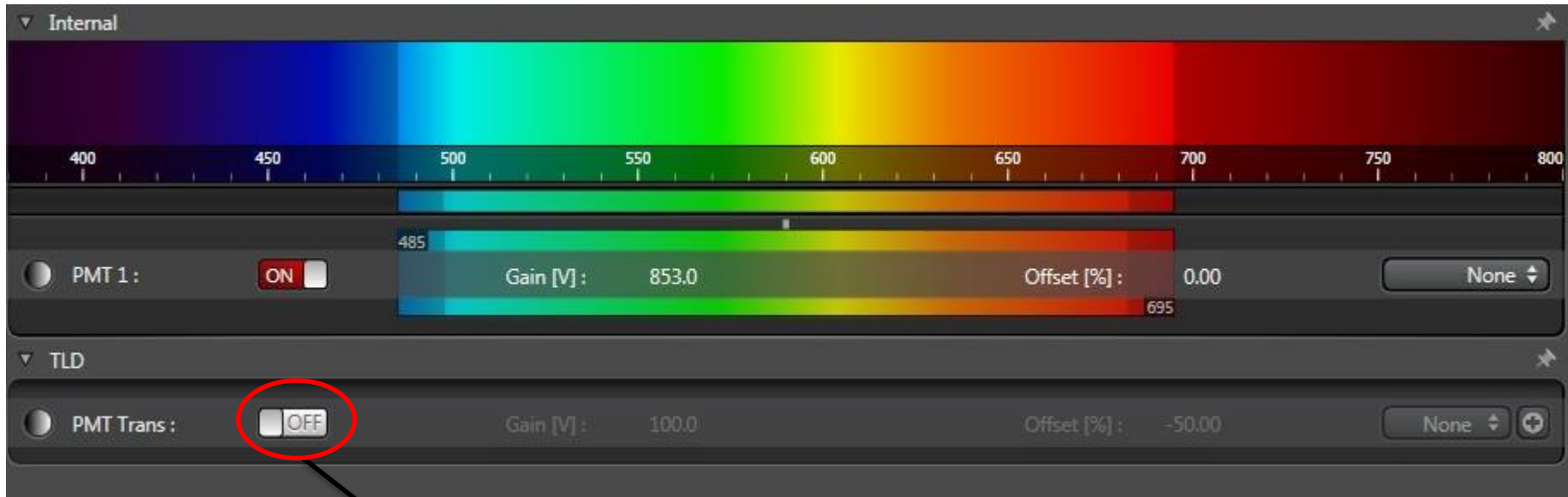
AOTF: seleccionar el láser de excitación de interés y su intensidad (a mayor intensidad mayor de fotoblanqueo de la muestra)

Parámetros a ajustar para cada uno de los canales seleccionados



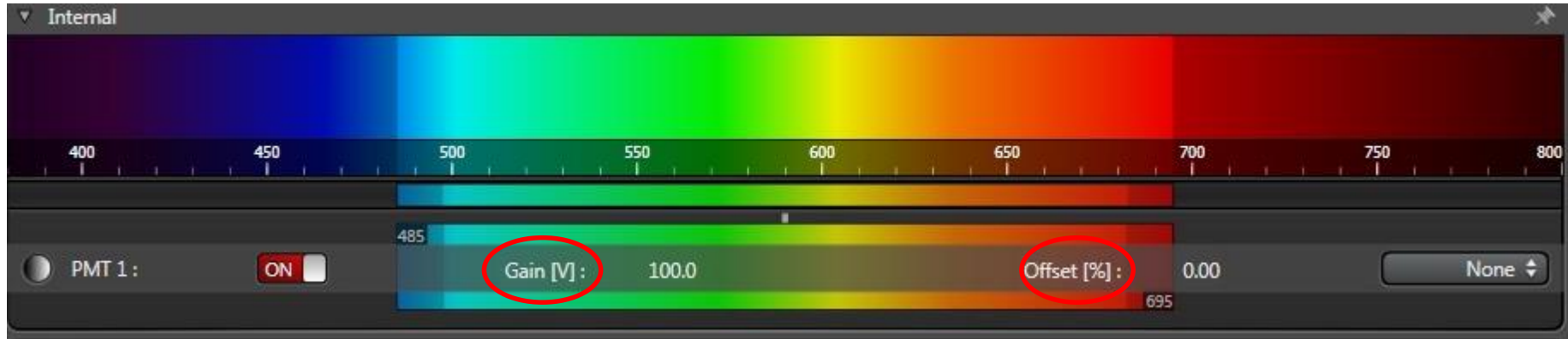
Ajuste de la barra espectral: para determinar las longitudes de onda de emisión captadas por el sistema. Debe ajustarse en función de los espectros de los fluorocromos empleados

Parámetros a ajustar para cada uno de los canales seleccionados



Canal de transmisión: seleccionar y activar cuando sea necesario

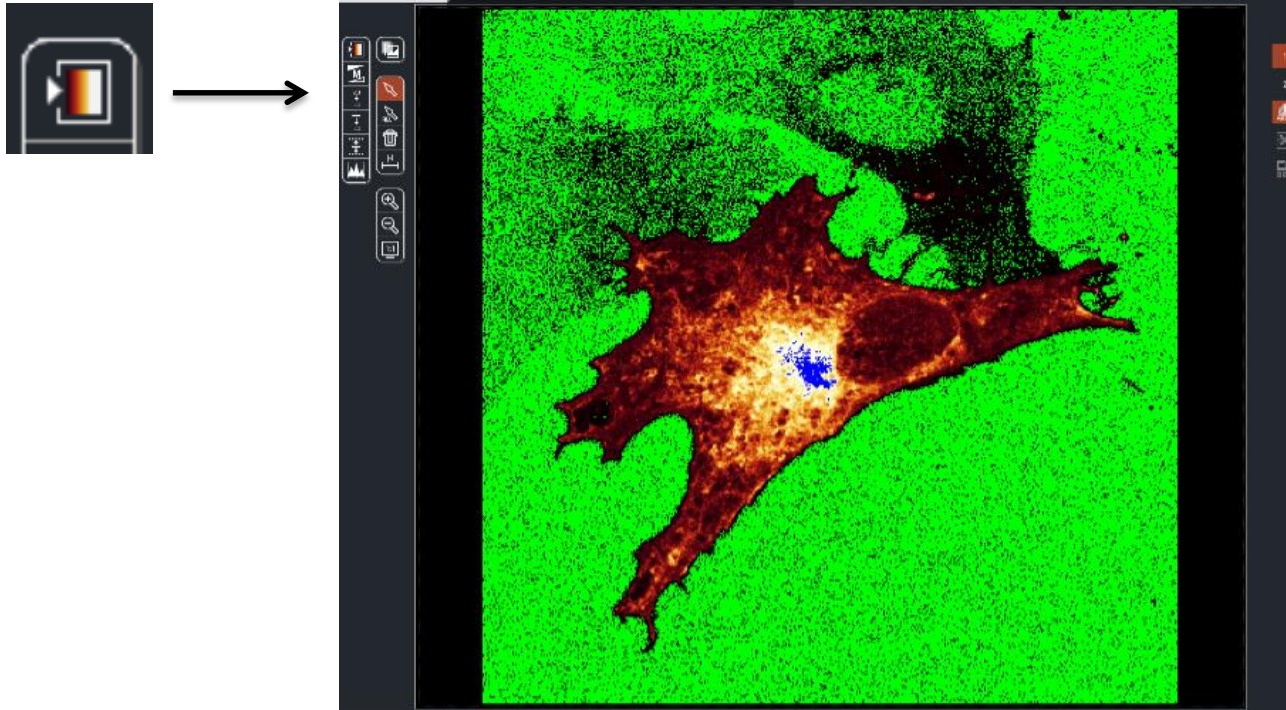
Parámetros a ajustar para cada uno de los canales seleccionados



Ajustar Gain: factor amplificador de la señal

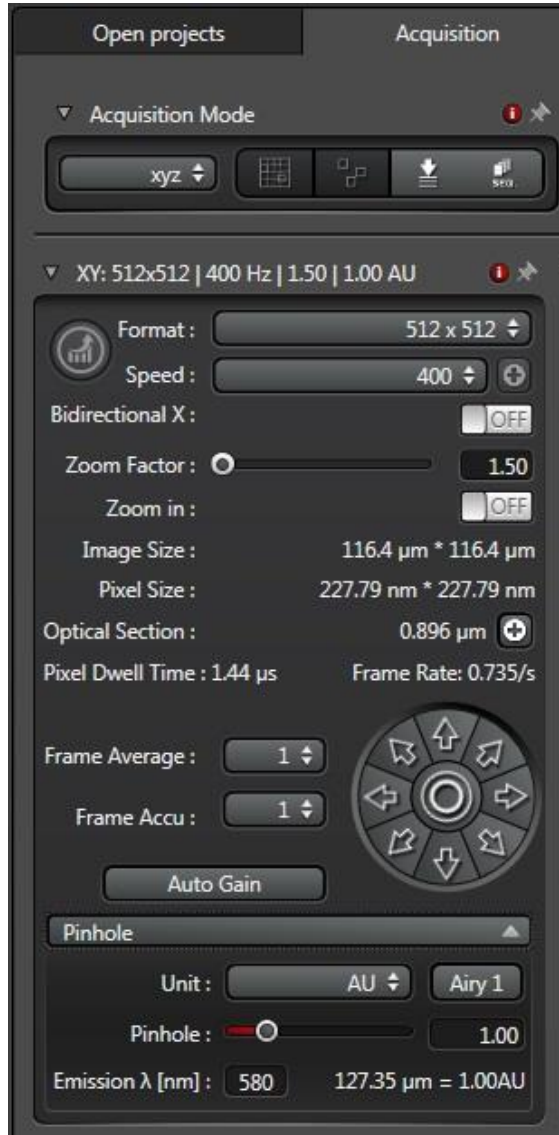
Ajustar Offset: factor que determina el fondo de la imagen

Parámetros a ajustar para cada uno de los canales seleccionados



- Píxeles **azules** = saturación.
Ajustar el “gain” hasta que solo se vean unos pocos píxeles saturados.
- Píxeles **verdes** = ausencia de señal.
Ajustar el “offset” hasta que en el fondo se vean píxeles verdes

Parámetros de adquisición de la imagen



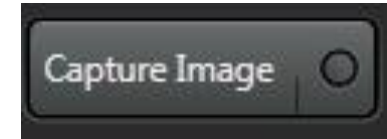
- Formato: 512 x 512, 1024 x 1024, etc.
- Velocidad: 400 Hz (recomendada), 600 Hz, etc.
- Pinhole: seleccionar airy 1 para obtener la máxima confocalidad
- Frame average: indica el número de pasadas que el láser realiza sobre la muestra

▪ Zoom

* En función del tipo de muestra y de lo que se quiera observar, el investigador podrá modificar estos parámetros

Captación y optimización de la imagen

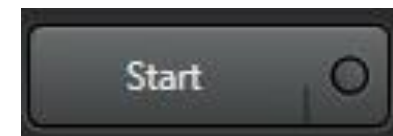
Para capturar una imagen de un solo plano, abrir el **panel “Z stack”**, seleccionar aquel de interés y pulsar “capture image”



Para hacer imágenes de diferentes planos:

- 1- Seleccionar los planos superiores y los inferiores de la muestra en los comandos “begin” y “end”.
- 2- Determinar el número de planos y su grosor en los comandos “Nr. Of steps” y “Z-step size”

A continuación, pulsar “start”



Captación y optimización de la imagen



En muestras gruesas se corre el riesgo de que el láser no llegue con la suficiente intensidad a los planos más inferiores



Para evitar esto se dispone de la opción de “**compensación**”, basada en el aumento gradual de la intensidad del láser conforme va incidiendo sobre los planos más inferiores

Optimización de la imagen para obtener una buena relación señal/ruido (SNR)

- ✓ La utilización de objetivos con mayor apertura numérica mejoran la SNR
- ✓ Un valor de “gain” muy elevado aumenta el ruido de la imagen
- ✓ El aumento de la intensidad del láser puede ayudar a no tener un valor de gain elevado, pero corremos el riesgo de fotoblanqueo de la muestra
- ✓ A mayor velocidad de toma de imagen, mayor ruido
- ✓ A mayor valor de average menor ruido tendrá la imagen, aunque puede aumentar el fotoblanqueo de la muestra

Optimización de la imagen según el criterio de Nyquist

El criterio de Nyquist indica el tamaño que debería tener el pixel (eje XY) o el voxel (eje Z) para que la imagen tuviera la máxima resolución que permite el microscopio.



Para el eje XY establece que el tamaño del píxel debe ser entre $1/2$ y $1/3$ de la resolución lateral (en XY) del objetivo que estamos utilizando.

Para el eje Z establece que el tamaño del vóxel (grosor de plano) debe ser entre $1/2$ y $1/3$ de la resolución axial (en Z) del objetivo que estamos utilizando.

Captación y optimización de la imagen

¿Dónde podemos ver la resolución axial y lateral de nuestro objetivo?

The image shows a software interface for microscope configuration. At the top, there are three tabs: 'Configuration' (highlighted in red), 'Acquire', and 'Process'. Below the 'Configuration' tab, there is a grid of icons for different settings: 'IPS', 'Laser Config', 'USB Panel', 'Objective' (highlighted in red), and 'Hardware'. An arrow points from the 'Objective' icon to a window titled 'Objective Attributes'. This window displays a table of objective parameters. The 'Resolution XY(488nm)' and 'Resolution Z(488nm)' values are highlighted with a red box.

Objective Attributes			
Type :	HGX PL APO	Resolution XY(488nm) :	139.43
Magnification :	63	Resolution Z(488nm) :	235.82
Numerical Aperture :	1.4	Free Working Distance :	100
Immersion :	OIL	Focus Depth :	0
Coverglass :	0,17	Focus Offset :	0
Phase Ring :		IC Prisms :	E;E1-P
Technique :		Cond. Prism DIC :	K10
Order Number :		Order Number :	11506187

Resolución lateral = 139 nm → El píxel debería tener un valor comprendido entre los 46,3 y los 69,5 nm

Resolución axial = 236 nm → El vóxel o grosor de los planos debería estar comprendido entre 78,66 y 118 nm.

¿Cómo podemos reducir el tamaño del píxel?

- ✓ Aumentando el formato de la imagen (pasando de 512x512 a 1024x1024)
- ✓ Aumentando el zoom óptico.

Hay que tener en cuenta que:

- Cuanto más cerca estamos de cumplir el criterio de Nyquist, ganamos resolución espacial pero la muestra se expone más al láser y el tamaño del archivo de la imagen puede ser excesivamente grande
- Cuanto más lejos estamos de cumplir el criterio de Nyquist, perdemos resolución pero evitamos el fotoblanqueo de la muestra.