

**INSTRUCCIONES
GENERALES
DE USO
DEL
MICROSCOPIO
CONFOCAL
LEICA LCS SP5**

Febrero de 2009

INSTRUCCIONES DE USO DEL MICROSCOPIO CONFOCAL LEICA LCS SP5

INTRODUCCION: CARACTERISTICAS GENERALES

Láseres que tenemos en el microscopio confocal LEICA TCS SP5

Diodo Ultravioleta con una frecuencia de 405 nm para fluorocromos como el DAPI

Láser de Argón que dan frecuencias de 458 nm, 476 nm, 488 nm, 496 nm, 514 nm.
Van desde el azul clarito hasta el amarillo. Fluorocromos como CFP hasta Yellow

Láser de HeNe con una frecuencia de 543 nm. (Es de baja potencia)
Básicamente es verde. Fluorocromos como Rodamina, Alexas 543, 555, 594

Láser de HeNe con una frecuencia de 633 nm. (Es de baja potencia)
Rojo lejano. Fluorocromos como Topro, Topro 3, empleados como marcadores de DNA.

Estos fluorocromos son orientativos, es mejor ver en páginas especializadas sus características exactas y sus aplicaciones.

Objetivos que poseemos actualmente:

Objetivo 10x seco se puede utilizar para campo claro, contraste de fases y contraste de polarización, no está disponible para DIC.

Objetivo 40x de aceite

Objetivo 63x de aceite

Objetivo 100x de aceite.

En ellos se pueden utilizar para DIC y microscopia confocal, para UV se recomiendan sólo utilizar el 40x y 63x ya que poseen sus lentes correctoras, el de 100x se ve pero no posee lente correctora de UV.

Poseemos lámpara de fluorescencia con filtros Ultravioleta verde y azul, pero principalmente su uso son como buscadores para después utilizar el confocal.

Los filtros poseen estas longitudes de onda:

Filtro A: UV BP 340-380 para visualizar de 400 a 425 por encima no deja pasar nada

Filtro I3: Verde BP 450-490 para visualizar de 510 a 515 por encima no deja pasar nada

Filtro N21 Rojo BP 515-560 para visualizar de 580 a 590 por encima no deja pasar nada

No poseemos cámara fotográfica para fluorescencia.

Los cubres a emplear para que la eficacia de la observación sea máxima son cubres de 1 ½ ó 0'17 mm.

1. PUESTA EN SERVICIO DEL SISTEMA

1.1 Inicio e identificación

Para iniciar su sistema TCS SP5, proceder de la siguiente manera:

1. Encender el ordenador en la consola de control.

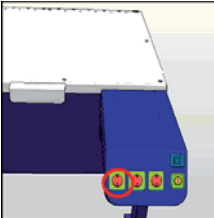


Figura 1: Encendido de la Workstation TCS

El sistema operativo arranca de forma automática al encender la Workstation TCS .

Esperar hasta que la operación de arranque de la Workstation TCS se haya completado.

2. Iniciar la sesión.

El nombre de usuario estándar para el sistema TCS SP5 de Leica es "TCS_User".

No existe una contraseña estándar. El software LAS AF se basa en la administración del usuario del sistema operativo, por lo que también se crean archivos propios del software LAS AF para la administración de perfiles específicos de usuario.

Los discos duros montados de fábrica tienen dos particiones (C:\ y D:\). El directorio del usuario debe crearse en la partición D:\.

1.2 Puesta en funcionamiento

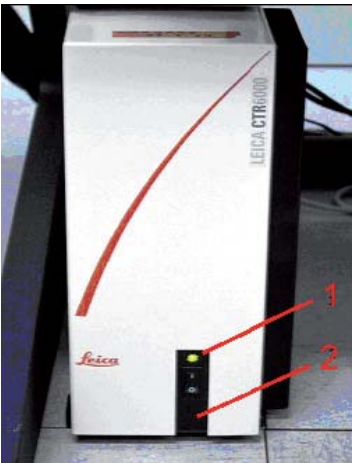


Figura 2: Conexión del microscopio

1. Encender el ordenador en la consola de control (véase Figura 1).
2. Comprobar que el estativo del microscopio está conectado.
Si el indicador que muestra la disponibilidad de funcionamiento (Figura 2, posición1) se ilumina en la caja electrónica, el estativo está en servicio. En caso de que el indicador de disponibilidad de funcionamiento no se ilumine, debe accionar el interruptor (Figura 2, posición 2) de la caja electrónica.
3. Esperar hasta que la operación de arranque de la TCS Workstation finalice .

4. Encender ahora el escáner TCS SP5 en la consola de control.(figura 3).

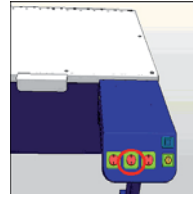


Figura 3: Encienda el escáner

5. Encender el láser en la consola de control.

A continuación se ponen en marcha las fuentes de alimentación y el ventilador del sistema.

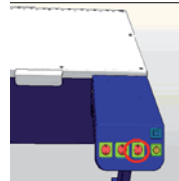


Figura 4: Conecte el láser

6. Pulse el interruptor de llave en la consola de control.

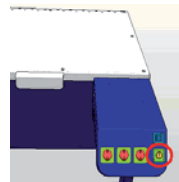


Figura 5: Pulse el interruptor de llave

EN RESUMEN:

A) Encendido del Microscopio

- 1) Pulsar botón “PC microscope”
- 2) Pulsar “TCS-User” esperar a que se inicie windows totalmente.
- 3) Pulsar botón “Scaner- power”
- 4) Pulsar botón “Laser power” y girar la llave hasta posición ON

2. EJECUCIÓN DEL PROGRAMA LAS AF

1. Iniciar el software haciendo clic en el símbolo LAS AF en el escritorio.

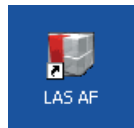


Figura 6: Icono LAS AF en el escritorio

2. Seleccionar si desea trabajar con el sistema TCS SP5 en modo resonante o no resonante.

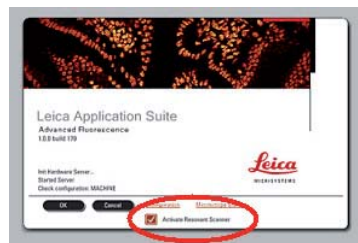


Figura 7: Modo de servicio resonante o no resonante

3. Iniciar ahora el LAS AF haciendo clic en la tecla de pantalla "OK".



Figura 8: Ventana de inicio LAS AF

Ahora nos encontramos en la vista básica del LAS AF.



Figura 9: Vista básica LAS AF

EN RESUMEN:

B) Utilización del programa

- 1) Pulsar "LAS-AF"
- 2) Pulsar "OK"

3. ESTRUCTURA DE LA INTERFAZ DE USUARIO

3.1 Generalidades de la estructura de la interfaz de usuario

La interfaz de usuario del LAS AF se divide en cinco campos:

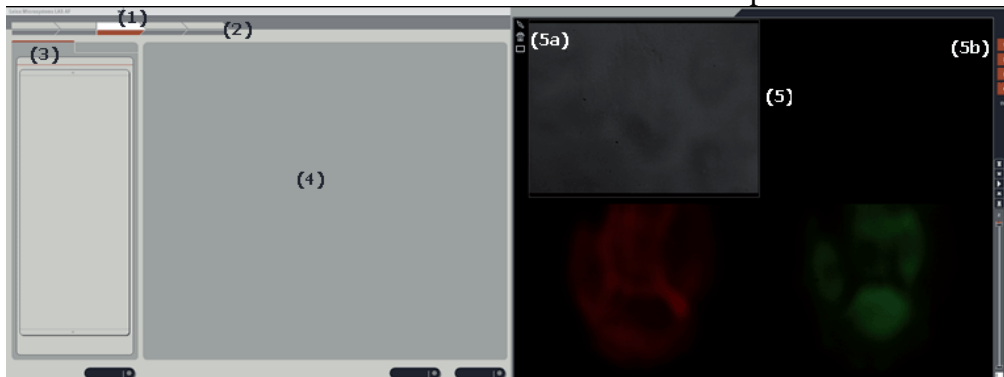


Figura 10: Interfaz de usuario de LAS AF

1 **Barra de menús:** Aquí encontrarás los diferentes menús para activar funciones

2 **Símbolo de flecha:** Etapas de trabajo para cada una de las funciones. Estas etapas de trabajo reflejan el método normal de captación de la imagen y la consiguiente edición de imagen. Las funciones se han agrupado en función de este método.

- Configuración
- Acquire
- Process
- Quantify
- Aplicacion

3 **Campo registro:** A cada etapa de trabajo (símbolo de flecha) le corresponden varios registros, en los que se pueden hallar los ajustes para el experimento.

Acquire Experiments: Árbol de directorios del archivo abierto

Setup: Configuración de hardware para el experimento actual

Acquisition: Configuración de parámetros para la captación de la imagen

Process Experiments: Árbol de directorios del archivo abierto

Tools: Árbol de directorios con todas las funciones disponibles de la etapa de trabajo actual

Quantify Experiments: Árbol de directorios del archivo abierto

Tools: Registro con las funciones disponibles en la etapa de trabajo actual

Graphs: Representación gráfica de los valores medidos en la zona de interés (ROI)

Statistics: Presentación de los valores estadísticos que se han calculado en la zona de interés (ROI) establecida

4 **Área de trabajo:** En este campo puede acceder al cuadro de diálogo Beam Path

Settings, en el que figuran los elementos de control para configurar los parámetros de captura.

5 **Visor Viewer:** Sirve para visualizar las imágenes tomadas. En la configuración estándar, el visor Viewer consta del cuadro de imagen central y las teclas de pantalla para editar imágenes (5a) y mostrar los canales (5b).

3.2 Combinaciones de teclas

Las combinaciones de teclas siguientes también permiten ejecutar determinadas funciones del programa que se repiten con frecuencia:

CTRL + N Abre un experimento nuevo

CTRL + O Abre el cuadro de diálogo Open para abrir un archivo existente.

4. TRABAJO CON EL MICROSCOPIO CONFOCAL

4.1 Colocación y enfoque de la muestra

1) Elegir objetivo (en la pantalla aparece una opción) y añadir gota de aceite si la necesitase el objetivo. El de 10x no necesita es seco.

2) Colocar la muestra inmediatamente para que el aceite no se escurra.

NOTA IMPORTANTE:

Al encender el microscopio el objetivo siempre está bajado al mínimo, se sube pulsando “z coarse” (en el panel de mandos de color blanco(a la izquierda del teclado) formado por dos ruletas) y girar hacia la derecha con mucho cuidado, la ruleta blanca pequeña hasta que el objetivo con la gota de aceite toque el cubre de la muestra.

3) Inmediatamente pulsar “z fine” (en el panel de mandos de color blanco)

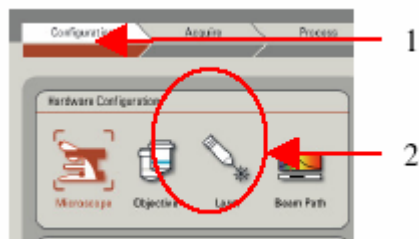
- Enfocar la muestra con campo claro o DIC (pulsar botón superior izquierdo del microscopio CHG TL).

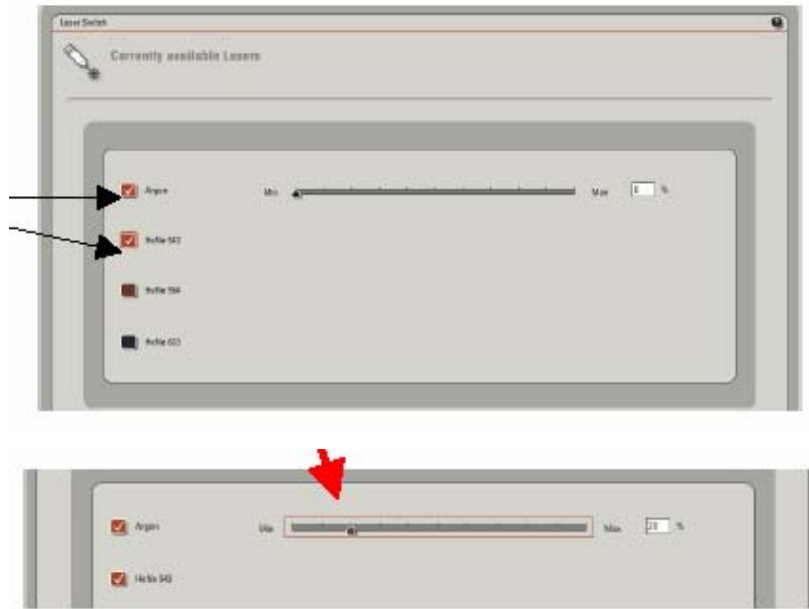
- Enfocar la muestra con fluorescencia (pulsar botón frontal N2.1 o I3 o A) (rojo, verde, UV) con esto se elige la luz deseada, después pulsar botón Shutter. Esta fluorescencia no posee filtros en los que puedan servir como investigación, sirven como orientación de búsqueda en la muestra.

Para estudios con fluorescencia utilizar los otros microscopios.

4.2 Encendido de láseres y aplicación de settings

4.2.1 Pulsar “Configuración” ⇒ “Laser” ⇒ activar todos necesarios para la observación y subir el láser argón al 20% si este se utiliza.





4.2.2 Aplicación de los settings

Vamos al menú Adquire \Rightarrow En el submenú Experiments \Rightarrow Pulsamos Open, se abre una pantalla de búsqueda \Rightarrow Buscamos en D:\ Images\ nuestro laboratorio \ archivo.tif que deseemos \Rightarrow Pulsamos abrir.

Una vez abierto el archivo elegimos la imagen que deseemos y que en la sesión inicial decidimos las mejores condiciones para su observación. Se pincha y se pulsa el botón derecho del ratón, aparece un menú en el que pulsamos PROPERTIES OF “Experiments”, se abre una ventana en la que aparecen las propiedades de la imagen deseada. Pulsamos “ Apply Settings” y cerramos la ventana.

El microscopio se ajusta para aplicar las mismas condiciones que estaba cuando se tomó la anterior imagen.

4.2 Escaneo con el láser y toma de fotos y zoom

De manera habitual, cuando vayamos a realizar una primera observación de nuestras muestras con el microscopio, esta se realizará junto con el técnico responsable, de manera que se puedan establecer unos “setting” adecuados a la observación de las muestras. En esta primera sesión se establecerán las potencias de los láseres, ganancias, aperturas de espejos para las longitudes de onda de fluorescencias, etc., de forma que en las siguientes sesiones sólo se tenga que aplicar esos “setting” para la observación.

Una vez enfocado con el microscopio óptico.

Se aplican los settings que teníamos guardados de la primera sesión.

EN RESUMEN:

1) Pulsar “Configuración” ⇒ “Laser” ⇒ activar todos necesarios para la observación y subir el láser argón al 20% si este se utiliza.

2) Pulsar “Acquire” ⇒ “Experiments” ⇒ “Local disk D:/ ⇒ “images” ⇒ buscar carpeta propia de otros experimentos ⇒ elegir una imagen ya guardada que actuará como settings.

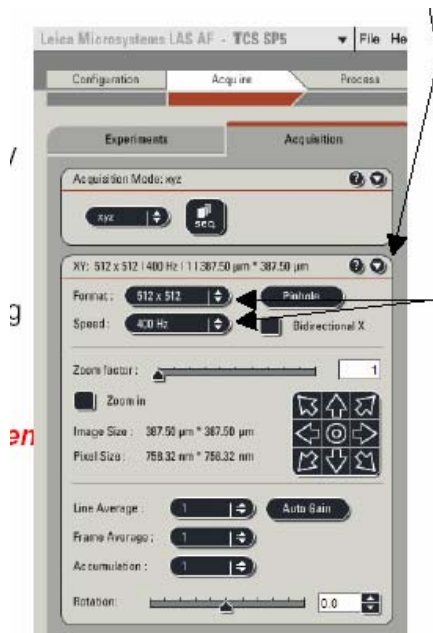
3) Pinchar con el botón derecho del ratón la imagen elegida y elegir la opción “properties of” ⇒ “Apply settings” ⇒ “close”

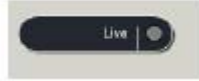
Por lo general la forma de búsqueda la realizaremos de la siguiente manera para no deteriorar demasiado la fluorescencia de las muestras:

Se recomienda utilizar unas condiciones de búsqueda.

CONDICIONES DE BUSQUEDA RECOMENDADAS

1) Poner “resolución” = 512x512 ; “Zoom” = 1 ; “Frame average” = 1





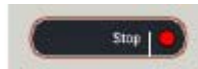
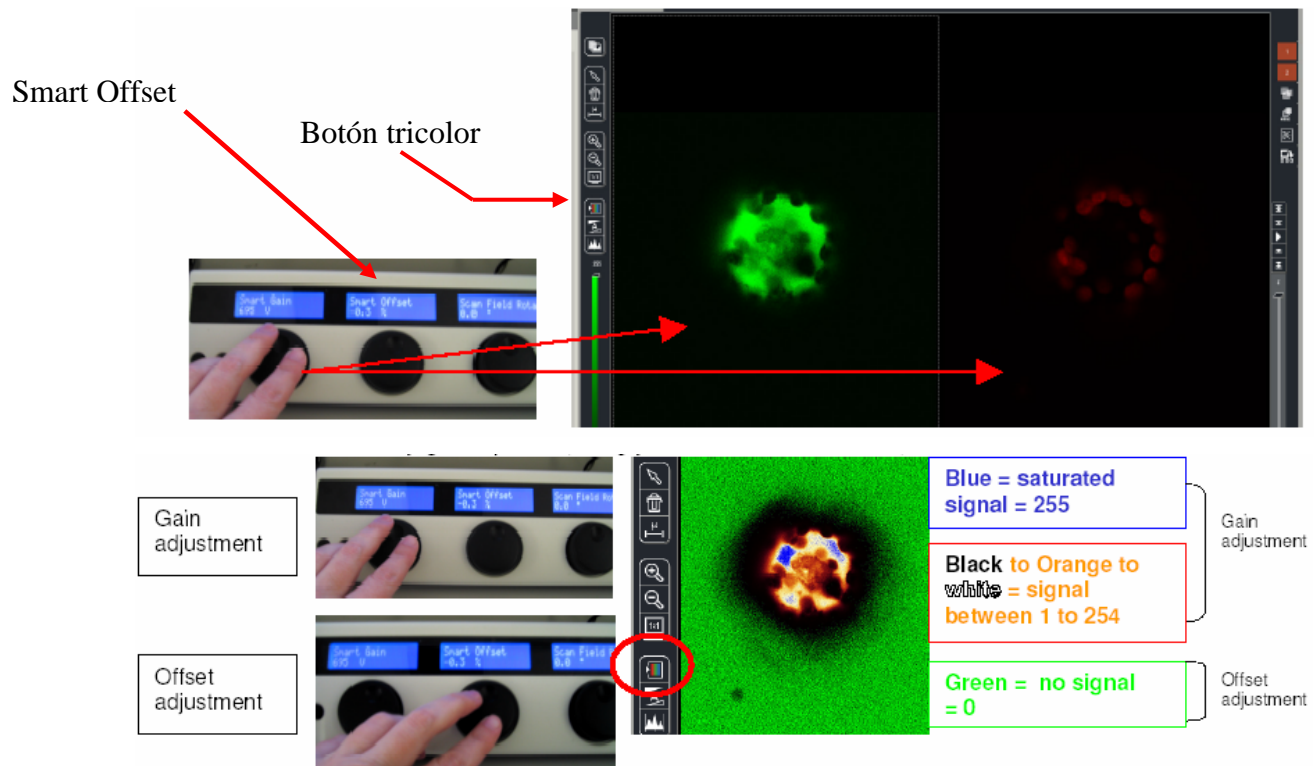
2) Pulsar “Live”

Se comprueba el enfoque y la ganancia, comprobando que no está saturada la visión (demasiados puntos de color azul), utilizando los botones giratorios

Modificar ganancia (Smart Gain)

Enfocar moviendo (Z position).

También se controlará el fondo de la imagen con Smart Offset hasta que comience a aparecer el fondo verde. Esto se comprueba pulsando el botón tricolor que hay en el lado izquierdo del visor de imágenes.



3) Pulsamos “Stop”.

Una vez corregidos parámetros y comprobadas estas cosas:

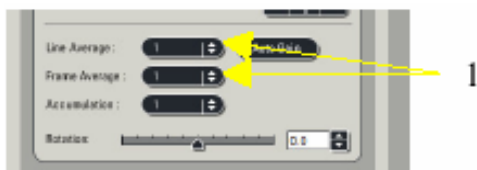
- ENFOQUE
- SETTINGS
- CONDICIONES DE BUSQUEDA RECOMENDADAS

5. SE PUEDEN REALIZAR VARIAS OPCIONES:

5.1 Tomar una fotografía general:

Seleccionamos la resolución deseada. Recomendada 1024*1024

Si la imagen está “sucia” se cambiará “frame average”, una, dos, tres, cuatro...pasadas



Pulsar “Capture image”

Si en los settings se ha establecido que la captura se haga de manera secuencial y dentro de esa manera se ha seleccionado de la manera between frames deberá comprobarse que:

En el menú z-stack no están pulsados los máximos ni mínimos y que los steps son 1 y su distancia entre pasadas son 0.

Entonces Pulsar “START”

De no hacerse así sólo cogerá la secuencia que tengamos seleccionada.

5.2 Realizar zoom sobre la muestra:

- Se recomienda con las opciones: En Menú “adquisición” \Rightarrow “XY” \Rightarrow Poner “resolución” = 512x512 ; “Zoom” = 1 ; “Frame average” = 1
- Pinchar cuadrado “Zoom In”, seguidamente en la otra pantalla pulsamos el botón en el que aparece un cuadrado que aparece junto a las imágenes y elegir la zona adecuada (Se selecciona un ROI) \Rightarrow Pulsamos “Live” \Rightarrow Ajustamos el zoom de manera que el Pixel Size no baje de 69-70 nm. Dependiendo del objetivo será: para objetivo 63x y 1024*1024 unos 3.45x, para objetivo 100x y 1024*1024 unos 2.45x para objetivo 40x son 78nm, para objetivo 10x 325nm.

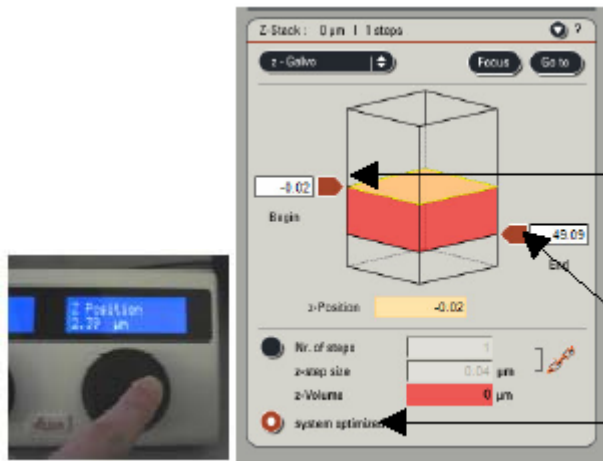
OBSERVACIÓN: Si estoy al límite de resolución del objetivo da igual coger el formato de la imagen, sólo consigo coger más puntos, porque el objetivo no es capaz de diferenciar más puntos. Sólo aumento el tamaño de la imagen.

- Ajustamos ganancia, enfoque.
- Pulsamos Stop
- Si queremos tomar foto de ese zoom entonces cambiar “resolution”, “frame average”
- Pulsamos “capture image”

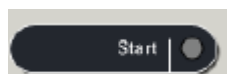
5.4 Realizar “z-stack”

Si se quiere realizar un “z-stack”

- Poner condiciones de búsqueda iniciales
- Abrir minimenú z-stack
- Pulsar <<Live>>
- Con la ruleta Z-position elegir las alturas máximas y mínimas a las que se quiere realizar el barrido pinchando las flechas que hay a ambos lados del cubo que aparece en el menú.



- Pulsar botón nº Steps y determinamos la distancia de cada pasada o el nº de pasadas que deseemos.
- Cambiar “resolution” y “frame average” que se desea ⇒ Pulsar “Start”



Nota1: para todos los objetivos y resolución 1024x1024 el píxel de zoom debe ser $\geq 69-70$

Nota2: Cada vez que se quiera realizar una foto de un campo de muestra diferente se recomienda volver a poner condiciones de búsqueda: “zoom”=1, “resolution”=512x512 y “frame average” = 1

Y despinchar los laterales del cubo, porque pueden que si no lo hacemos se vuelva a realizar el Z-stack que teníamos anteriormente.

También observar el nº de steps para la siguiente observación que hagamos ya que si no es Z-stack este se queda fijado de la anterior captación y puede repetirla.

6. OTRAS APLICACIONES

En casos de diferentes fluorocromos que tengan diferentes ruidos en cada canal, se puede modificar el nº de pasadas en cada secuencia.

Esto se consigue de la siguiente manera:

Pulsamos Configuración => IPS Masks => Confocal secuencial frame => Pinchar Frame-Average y se sale de configuración

Después en Acquire => Submenú XY en Frame Average podemos modificar el nº de pasadas en el Frame Average de cada secuencia.

Esto es válido sólo para capturas en modo secuencial y dentro de este en modo Between Frame, no sirve para el Between line.

7. DESCONEXIÓN DEL SISTEMA

IMPORTANTE : SI ALGUIEN LO VA A USAR DESPUÉS NO APAGAR NADA

- Guardar los datos de la imagen: Seleccionar en la barra de menús: **File->Save as** para guardar el bloque de datos.

Se pueden renombrar los experimentos en el propio programa pinchando el experimento con el botón derecho del ratón y se abre un submenú \Rightarrow RENAME, pulsamos cambiamos el nombre y pulsar ENTER

- En la barra de menús de configuración pulsamos láser ahí desclavamos los láseres y el láser de Argón lo bajamos al 0%.

Ya podemos proceder al:

- Cierre LAS AF: En la barra de menús, seleccionar **File->Exit**. Cierra las aplicaciones LAS AF.

- Desconectar la alimentación el láser en la consola de control mediante el interruptor de llave (Figura 11, posición 2). Se apaga la indicación de advertencia de emisión (Figura 11, posición1).
- Pocos minutos después se desactiva automáticamente el ventilador externo del láser de argón. Ahora también puede colocar el interruptor para el láser (Figura 11, posición 3) en la posición "O".
- A continuación, desconectar el interruptor del escáner TCS SP5 (Figura 11, posición 4)

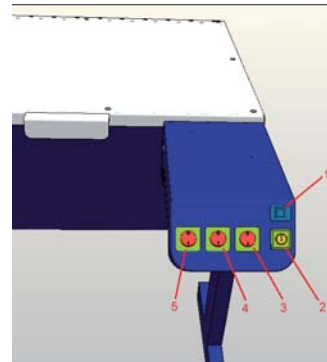


Figura 11: Consola de control

La marcha en inercia de la refrigeración del láser sirve para la seguridad de servicio del sistema TCS SP5.

6. Apagar ahora el ordenador. En la barra de herramientas, seleccione **Start ->Shutdown** para apagar la Workstation TCS TCS.

Desconectar el microscopio y las lámparas fluorescentes que pudiera haber encendidas.



Figura 12: Apagado del ordenador

- Desconectar el interruptor de la Workstation TCS en la consola de control (Figura 11, posición 5).

EN RESUMEN

C) Apagado del Confocal

- 1) Pulsar “Configuración” ⇒ “Laser” ⇒ desactivar todos y bajar el láser de argón al 0%
- 2) Cerrar programa, si fuese necesario también apagar la lámpara de mercurio.
- 3) Girar llave a OFF y pulsar “Laser-Power” hacerlo de forma pausada, no inmediatamente para refrigerar un rato los láseres.
- 4) Desconectar “Scan-Power”
- 5) Apagar el ordenador desde la pantalla, (cerrar windows)
- 6) Desconectar “PC-Microscope”

NOTAS MUY IMPORTANTES:

- Los láseres no deben de encenderse antes de haber transcurrido al menos de 3 a 4 horas si hay un intervalo en el que no se use se recomienda poner el láser de Argón al 0% y no apagarlo.
- La lámpara de fluorescencia recomiendan al menos 1 hora de espera.

8. CUANDO SURGEN PROBLEMAS:

Un problema habitual consiste en que se bloquean los espejos del Fotomultiplicador con lo que la unidad se bloquea y deja de funcionar, cuando esto ocurra se recomienda seguir el siguiente procedimiento:

1. Pulsar Control-Alt-Supr
2. Ir a Administrador de tareas
3. Pulsar Procesos
4. Buscar los archivos “ LAS AF aplicación.exe “ y “ LCS.exe” pulsarlos y finalizar procesos.
5. Paso seguido apagar y encender el SCANNER POWER de la consola de control (figura 11, posición 4)
6. Volver a inicializar el programa LAS AF
7. Poner el láser de Argón al 20% sin desclavarlo.
8. Aplicar otra vez los setting que teníamos.

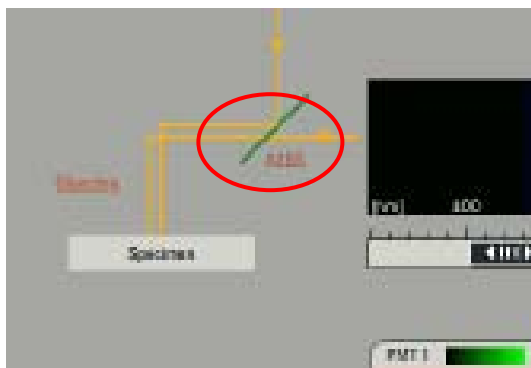
NUNCA APAGAR LOS LÁSERES

9. Si vuelven a surgir problemas consultar con el Técnico responsable del servicio y si no está. Apagar el microscopio de manera habitual. Y comunicárselo al Técnico.

9. OTROS PROBLEMAS QUE PUEDEN SURGIR:

9.1 Si cuando aplicamos settings y algún láser no tiene la potencia suficiente, es decir, que haya que aumentar de una manera desproporcionada la intensidad del láser, (y creemos que nuestra muestra está bien....) una de las posibilidades es que la AOBS no esté funcionando bien, conviene intentar reiniciar el programa de la misma manera que en el apartado número 8 anterior, a ver si se soluciona y vuelve a las condiciones de potencia con las que fue tomada la imagen inicial.

9.2 Si se viesen rayas verticales en las imágenes, sobre todo con el láser de argón, puede solucionarse pulsando en la pantalla básica de comandos la palabra AOBS y aparece una ventana llamada AOBS configuration con los láseres que estén funcionando en ese momento, despinchamos el botón colorado en la línea Enhanced dynamic, observamos que se eliminan esas rayas y cerramos la ventana. Si no se eliminan podemos probar a bajar y subir el láser que estamos utilizando.



9.3 Otro problema que puede surgir es el en el que sale un error de posicionamiento o algo por el estilo, se ve además que el enfoque está en un Z demasiado alto, esto se soluciona en el submenú Z-Stack, clavando las flechas que hay a ambos lados del cubo y con un nº de steps de 1, de manera que el z-position este igual que lo señalado en los laterales del cubo, se hace capture image y ya no vuelve a salir el error. Luego después ya se pueden desclavar para seguir operando habitualmente. Esto puede ocurrir cuando se aplican algunos settings.

Si surgen otros problemas y consideráis que no podéis arreglarlo o tenéis alguna duda llamar al técnico responsable, él amablemente os lo resolverá o intentará hacerlo, las iniciativas propias a veces no son buenas.

Jose Luis Luque Técnico del Servicio de Microscopia
Agradecimientos: Rocio y Angélica
Se admiten sugerencias sobre esta pequeña guía.