# Cytation 5

# STARTUP – SHUTDOWN MANUAL

## CAPI
## (Centro de Aquisição e Processamento de Imagens)

http://www.icb.ufmg.br/capi/

**2018**

O Cytation 5 é um leitor híbrido multi-modal de placas microbiológicas, que inclui os modos de intensidade de fluorescência (FI), fluorescencia polarizada (FP), fluorescência resolvida por tempo (TRF), luminescência, absorbância de UV-visivel, imaging, and alpha. O leitor é controlado pelo software Gen5, para a operação, tratamento dos dados e análises.

## Componentes externos

### Figura 1

| | |
|---|---|
| 1 | Entrada para a dispensa dos injetores |
| 2 | Porta de acesso dos cubos de filtro |
| 3 | Botão de ejeção do suporte de placas |
| 4 | Tampa do suporte de placas |
| 5 | The power switch |
| 6 | Porta de acesso dos cubos de LED, filtros de imagem e objetivas |

- **Considerações gerais**

O nobreak APC é mantido ligado sempre!

Usar o protetor plástico para proteção do equipamento após o uso.

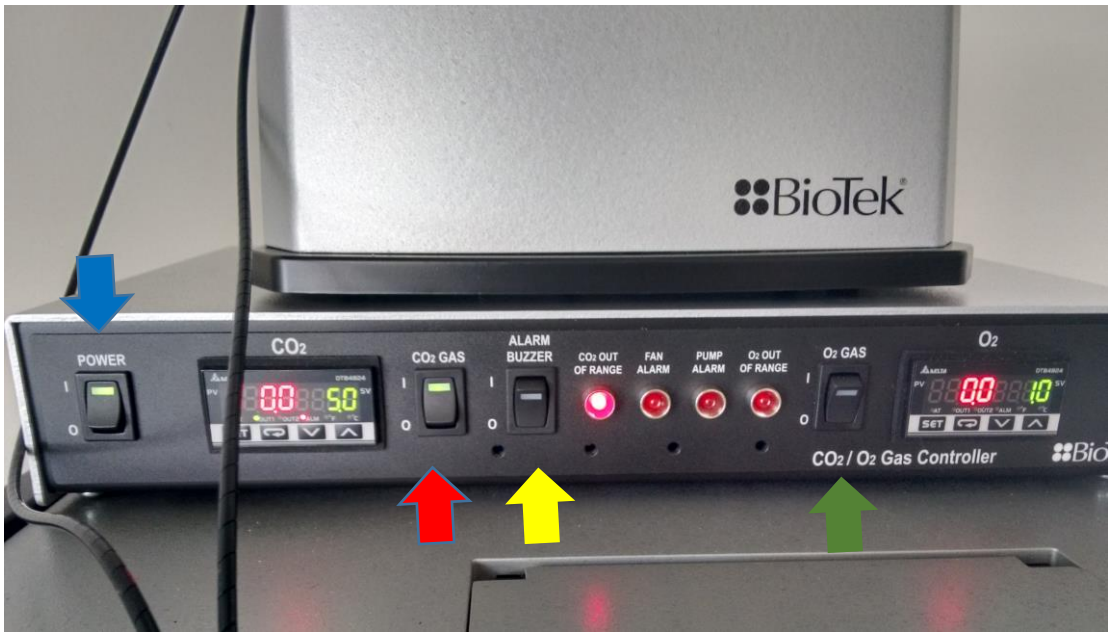
Assegure que a superfície da placa/lâmina esteja completamente seca. Gotículas condensadas podem comprometer o equipamento.

Retorne com a suporte branco de plástico para o suporte de placas (4 da figura 1) após o experimento. Nunca deixar um adaptador ou placa dentro do equipamento ao desliga-lo.

# 1. Para ligar o controlador de incubação com gases

**1)** Para experimentos em incubação com gases, demanda-se 20 minutos para a completa estabilização das condições.

**2)** Inicie ligando o controlador de gás (seta azul), em seguida o controlador de $CO_2$ (seta vermelha).




**3) Regular a pressão de $CO_2$ nos cilindros:** pressão na válvula reguladora do cilindro de $CO_2$ deve estar entre 10 e 15 psi, **nunca ultrapassar 15psi**. No regulador da mangueira "Airgas" a pressão **não deve ultrapassar 600**. No controlador, a pressão de $CO_2$ está estabilizada quando atingir 5,0.

## 2. Para iniciar o equipamento Cytation 5

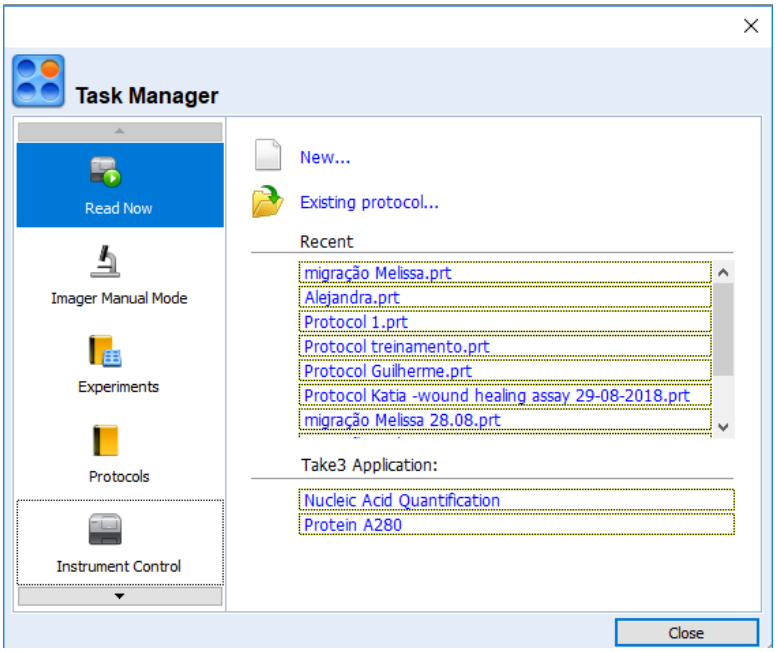
**1)** Ligar o equipamento no botão power switch (Seta verde). O equipamento levará um tempo para reconhecer os componentes, e, por fim, a luz do botão de ejecção do suporte de placas (Seta amarela) passará de vermelho para a cor verde.

**2)** Nesse momento, o compartimento de suporte de placas será aberto. Retire a placa branca (vermelho) e coloque sua placa, ou suporte adaptador com a lâmina/dish.

**3)** Para fechar o suporte, aperte o botão de ejecção do suporte para fechar tampa e assim manter a ambientação no interior do leitor.

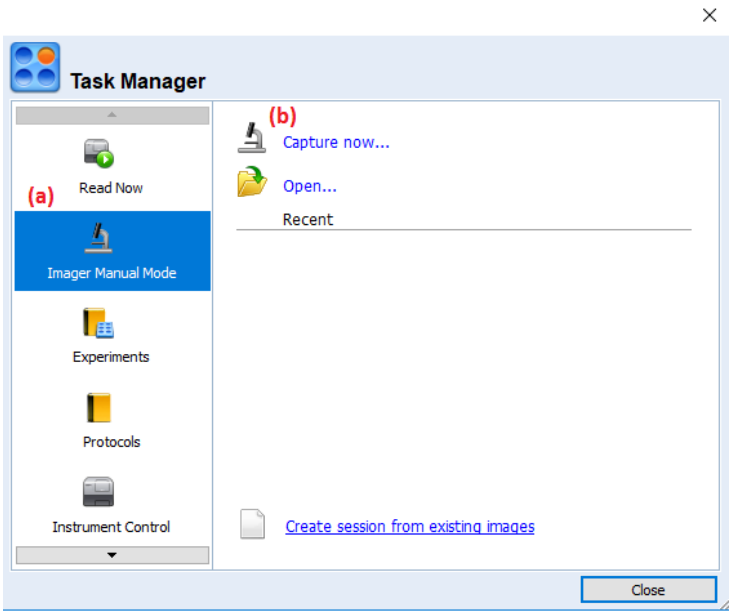
# 3. Programa Gen 5

1) Apenas inicie o programa Gen 5 após o equipamento ter completado o procedimento inicial (botão de ejeção em verde).
2) Ao iniciar o programa, abrirá o Menu com as opções:
   a. **Read Now:** para realizar leituras rápidas ou execução de protocolos;
   b. **Imager Manual Mode:** para aquisição rápida de imagens;
   c. **Experiments:** acessar experimentos já realizados;
   d. **Protocols:** configurar protocolos.

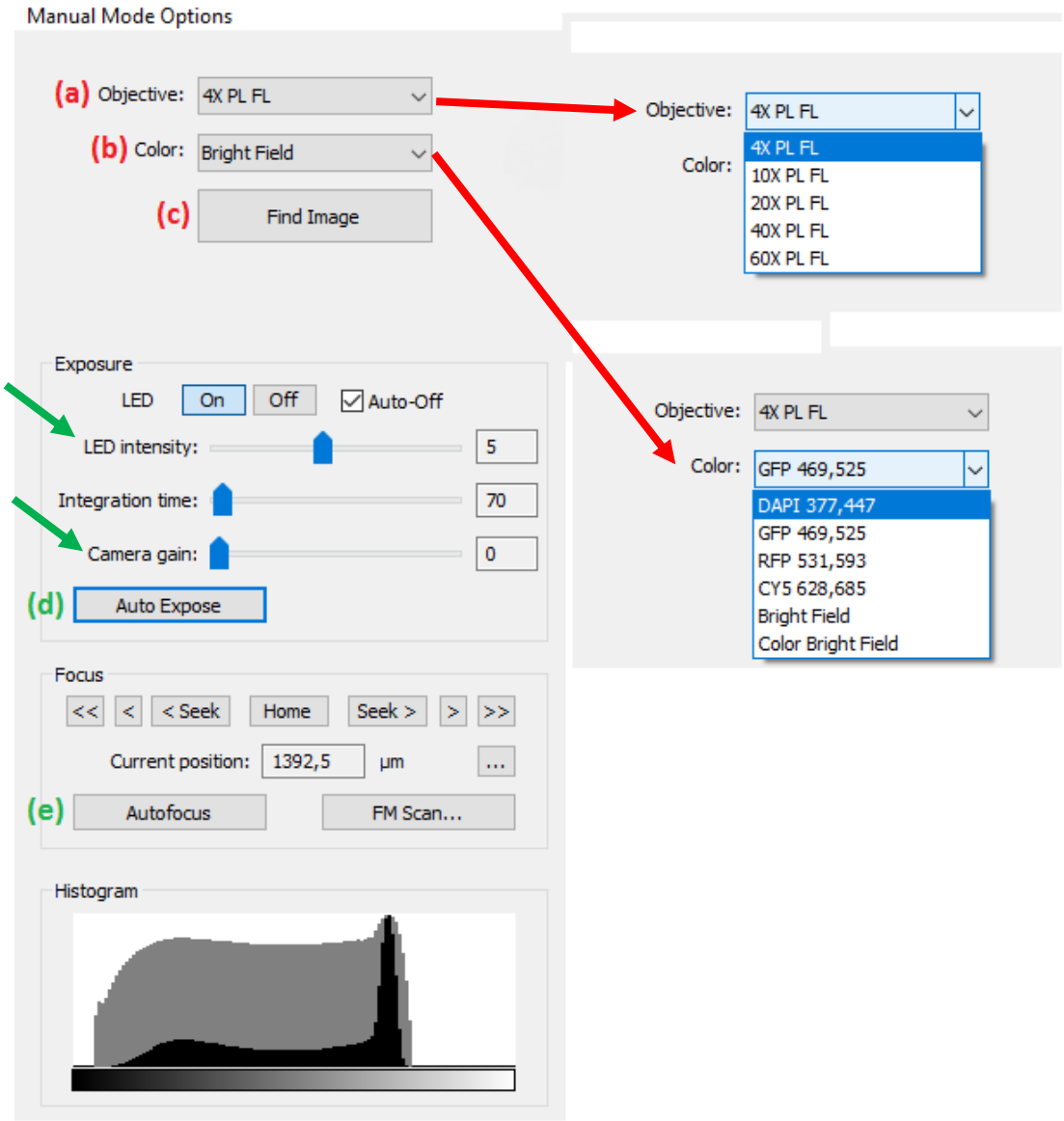



## 3.1 Aquisição rápida de imagem

1) **Caminho:** Imager Manual Mode (a) --> Capture now (b)



**2)** Selecione a objetiva (a), o filtro (b) e aperte o botão “Find Image” (c)

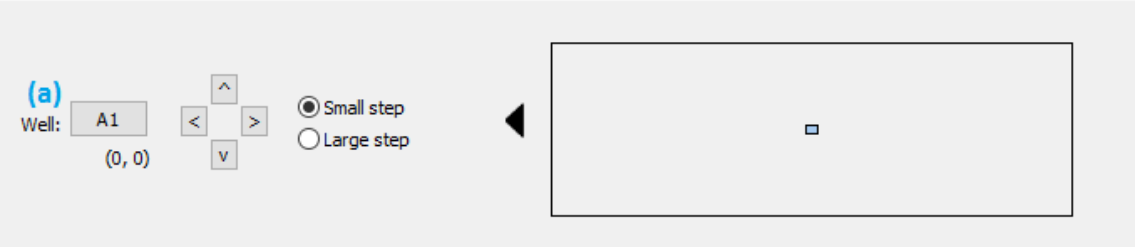



Caso o programa não consiga regular automaticamente a Exposição e o Foco, você poderá realizar este procedimento manualmente.

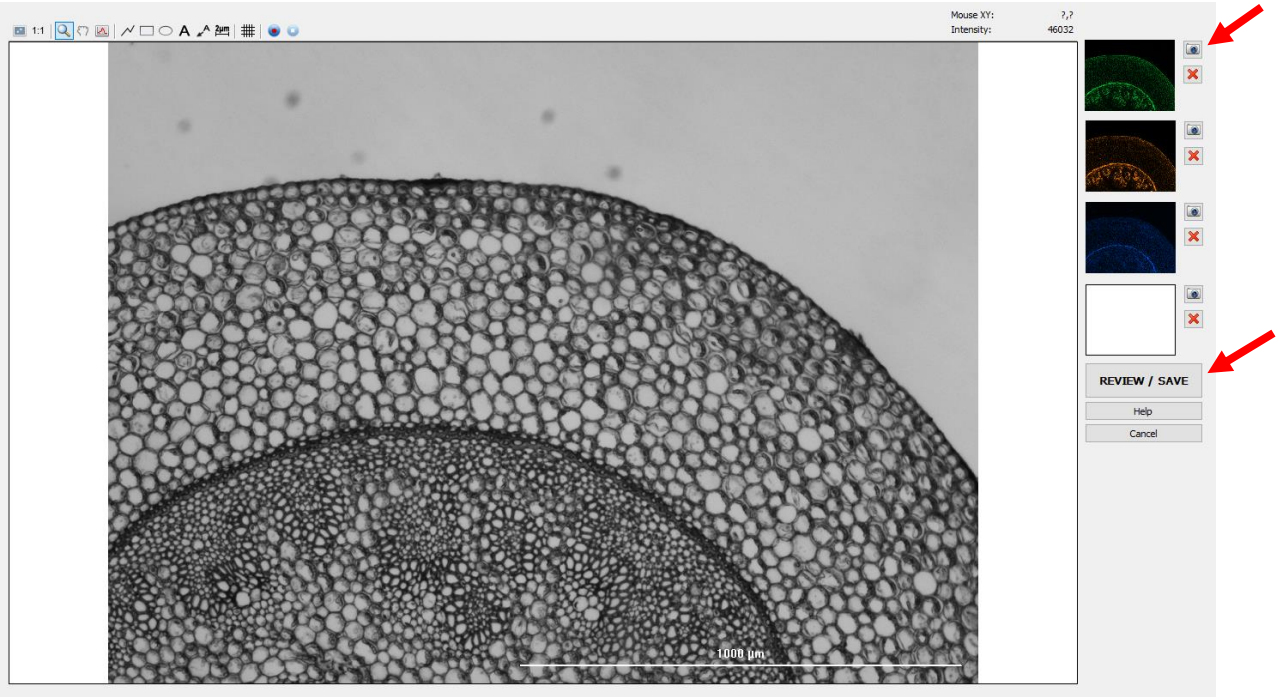
a. **Exposição:** selecione o botão “Auto Expose” (d). Após estabilizar, você poderá alterar o ganho da câmera e a intensidade do LED (Setas verdes).
b. **Foco:** selecione o botão “Autofocus”(e) e regule manualmente nos botões << < e > >>.

**Se o problema de encontrar o foco persistir, siga o procedimento na página 17/18.**

**3)** Selecione a lâmina ou poço desejado (a). Encontre os cortes/tecidos/células utilizando as setas > para movimentar a posição da câmera.
**Obs.:** você pode alterar o tamanho do salto que a câmera irá fazer selecionando “Small step” (menor salto) ou “Large step” (maior salto).

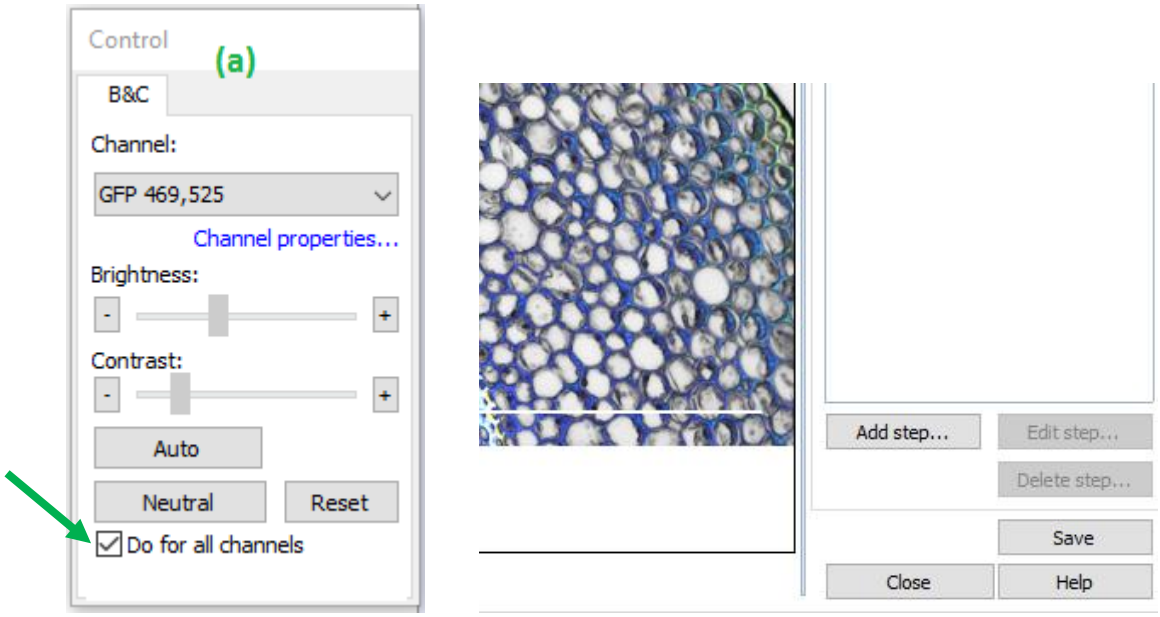



**4)** Para realizar a aquisição da imagem basta clicar no ícone . Você poderá adquirir até quatro imagens. Após adquirir todas as imagens, clique no botão “Review/Save”




**IMPORTANTE:** para a aquisição do Campo Claro Colorido só é permitido adquirir uma imagem.

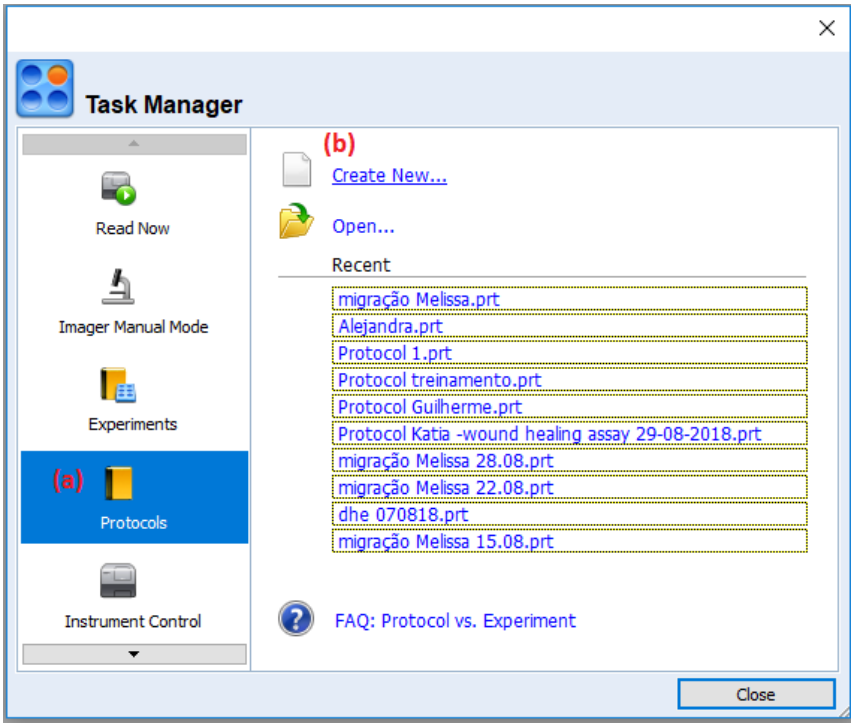
5) Poderá feito o processamento por regulação do contraste e brilho da imagem (a) de todos os canais utilizados. Você pode alterar cada canal separadamente, basta desmarcar a opção “Do for all channels” (Seta verde).



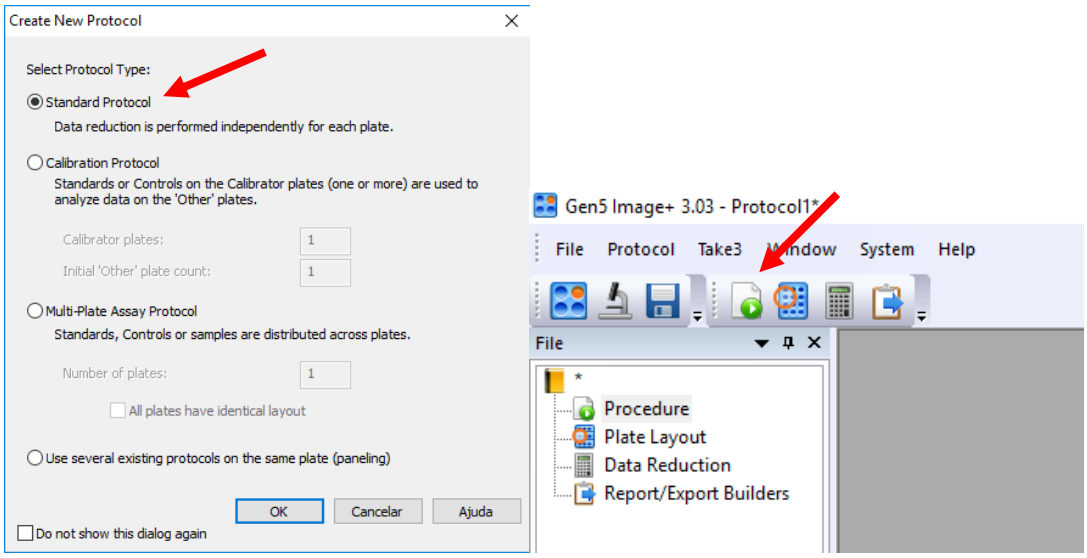

6) Para salvar clique no botão “Save” (O procedimento de salvar as imagens é descrito na página 21)

## 3.2 Configuração de protocolos

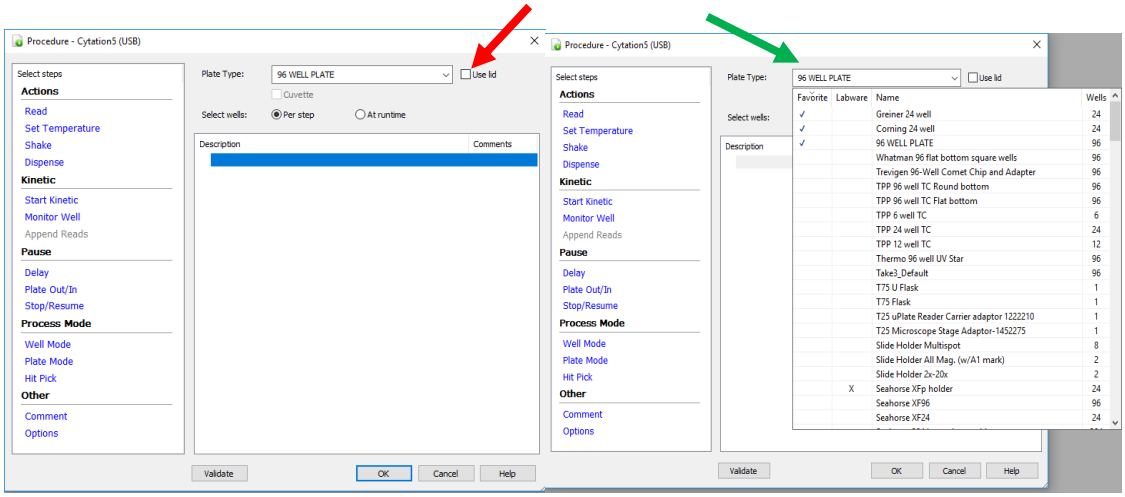
1) **Caminho:** Protocols (a) --> Create New... (b)

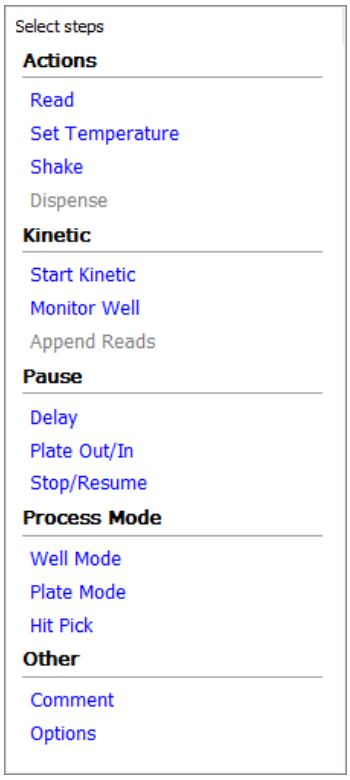


**2)** Selecione a opção “Standard Protocol” e após Selecione o ícone “Procedure”




**3)** Selecione o tipo de placa/lâmina/garrafas/placa de petri que irá usar (seta verde) considerando o fabricante (caso não saiba/exista, use as configurações default). Caso for usar placas, **<u>é OBRIGATÓRIO o uso da tampa</u>**, nesse caso selecione “use lid” (seta vermelha).

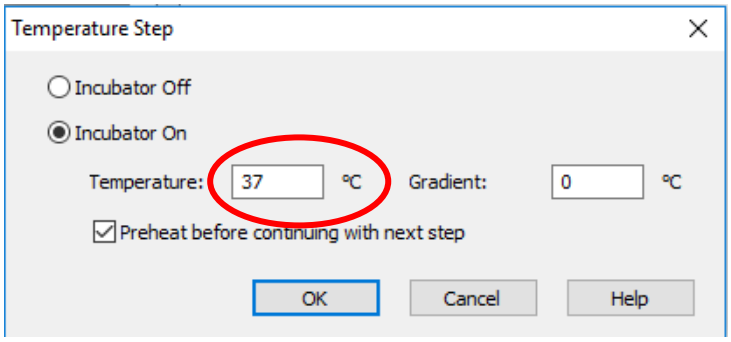




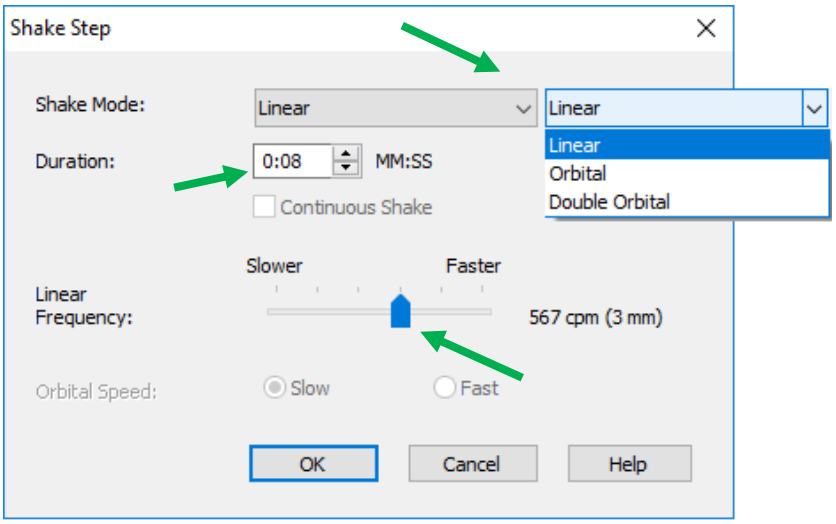

**4)** As opções presentes para configurar um protocolo são:

a. **Set Temperature:** controle de temperatura.
b. **Shake:** configuração para agitação de placas.
c. **Start Kinetic:** configuração de ciclos de procedimentos ao longo do tempo.
d. **Delay:** para configuração uma pausa no procedimento.
e. **Read:** todos os tipos de leitura.
f. **Hit Pick:** realiza leitura de fluorometria e imagem.

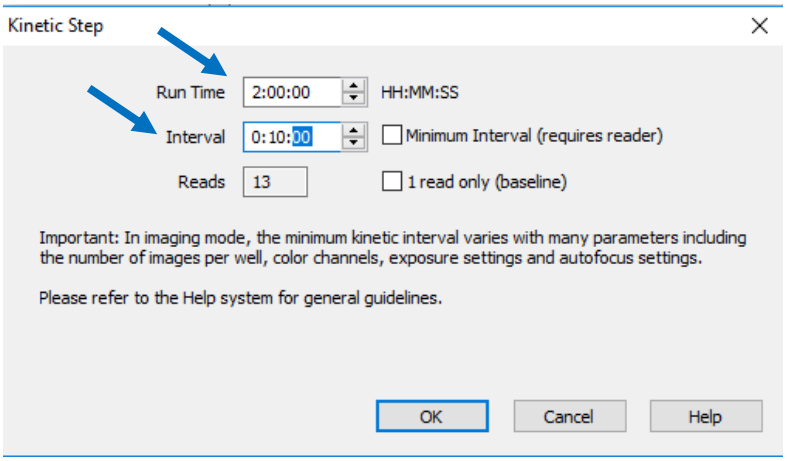
**a) Set Temperature:** configure a temperatura desejada no espaço "Temperature".



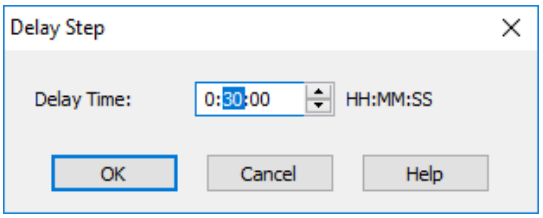

**b) Shake:** configure o modo do movimento ("Shake Mode"), a duração ("Duration") e a velocidade ("Linear Frequency").



**c) Start Kinetic:** insira o tempo total do experimento em “Run Time” e, após, insira a duração dos intervalos entre cada ciclo de procedimento em “Interval”. O programa irá calcular automaticamente a quantidade de leituras que irão ser realizadas em “Reads”.



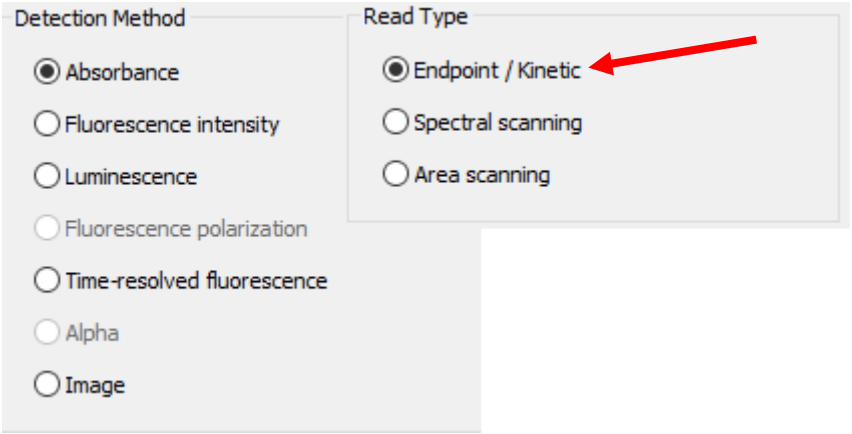

**d) Delay:** insira a duração de interrupção dos procedimentos em “Delay Time”.



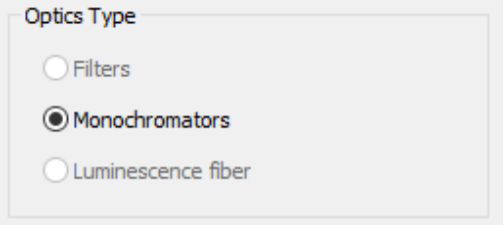

**e) Read:** as opções para leituras são:

i. **Absorbance:** leitura de absorbância.
ii. **Fluorescence intensity:** leitura de fluorometria.
iii. **Image:** aquisição de imagens

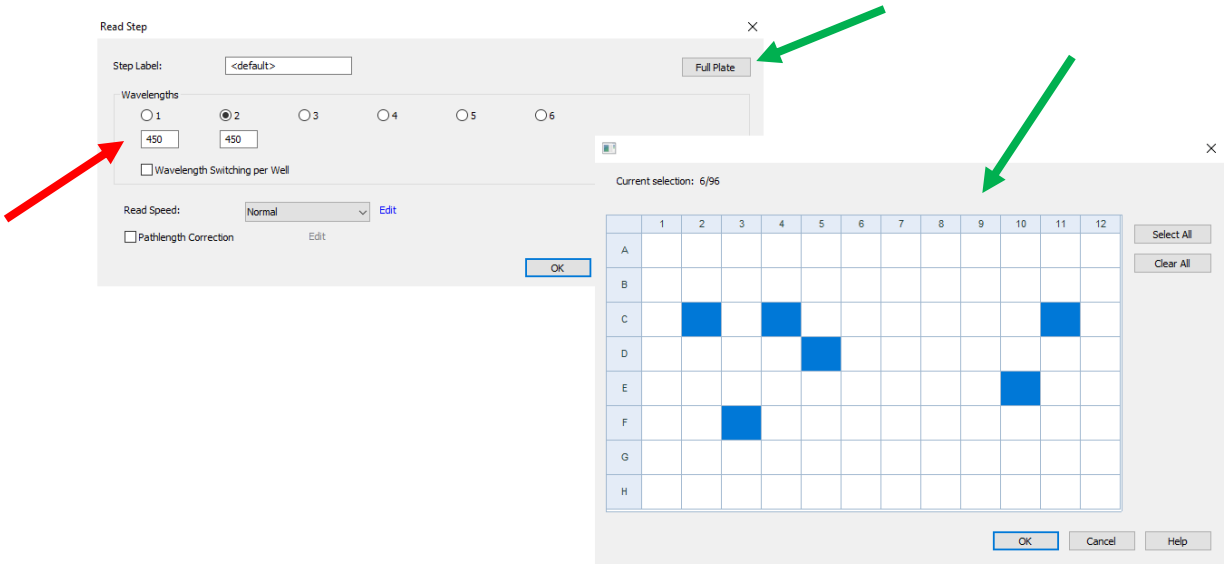
Para <u>TODAS</u> as opções, deve ser selecionado a opção “Endpoint / Kinetic”



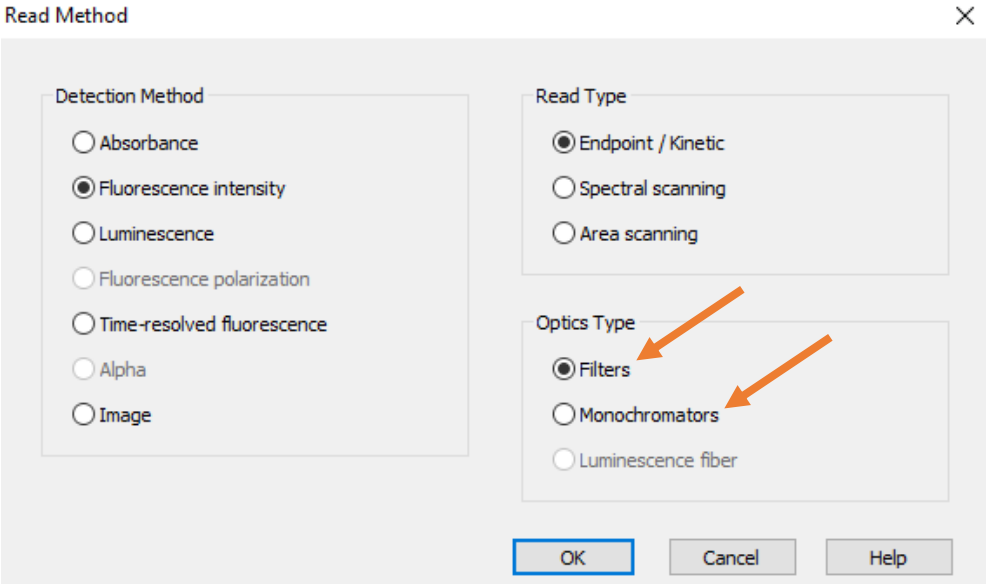
i. **Absorbance**: ao selecionar esta opção de leitura, na seção "Optics Type" permite apenas a opção "Monochromators".




Na próxima janela, você poderá selecionar quais poços que serão lidos em "Full Plate" (seta verde), adiciona o(s) comprimento(s) de onda que serão emitidos para a realização da leitura (seta vermelha). Você poderá configurar até 6 canais de comprimento de onda para realizar as leituras desejadas.

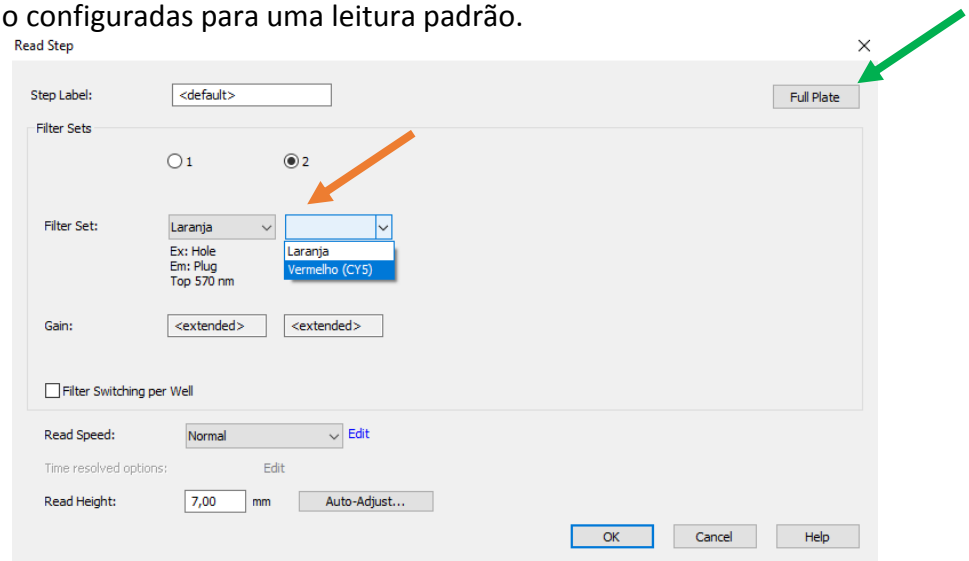



ii) **Fluroescence Intensity:** na opção de fluorometria escolha entre duas opções na seção "Optics Type": "Filters" ou "Monochromators".

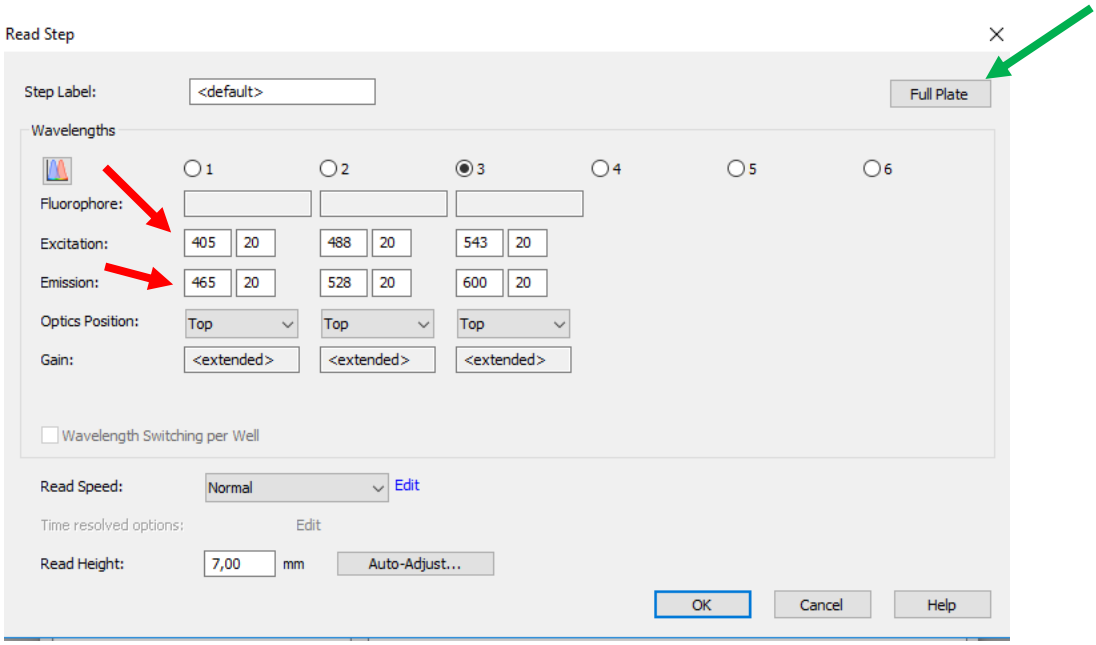



**"Filters"** = laranja ou Cy5**; "Monochromators"** = escolha o comprimento de onda

**a)** “Filters”: Você escolha quais poços serão realizados a leitura em sua placa e escolher até os dois filtros (laranja ou Cy5 – Vermelho). As outras configurações são configuradas para uma leitura padrão.

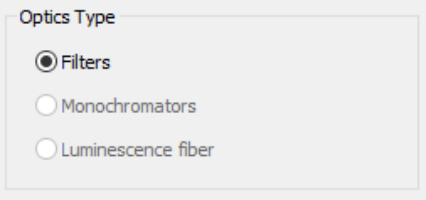



**b)** Monochromators: Escolha os poços que serão realizados a leitura em sua placa. Acione para cada canal os intervalos dos valores de comprimento de onda de Excitação (“Excitation”) e de Emissão (“Emission”). Utilize até seis canais diferentes para realizar a leitura. As outras configurações são configuradas para uma leitura padrão.

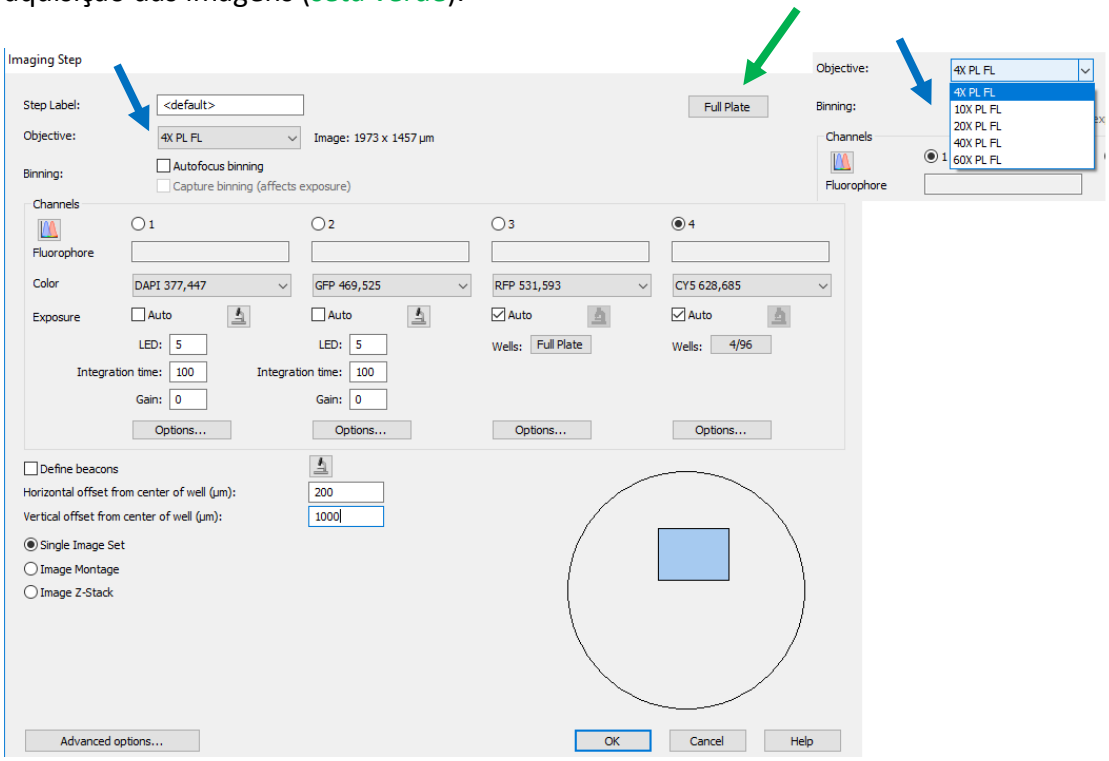



**Observação:** Os valores de comprimento de onda, devem entrar como um intervalo. Adiciona um valor centrar e um intervalo deste valor. Exemplo da imagem: Comprimento de onda de excitação = 405 ± 20 e de emissão = 465 ± 20.

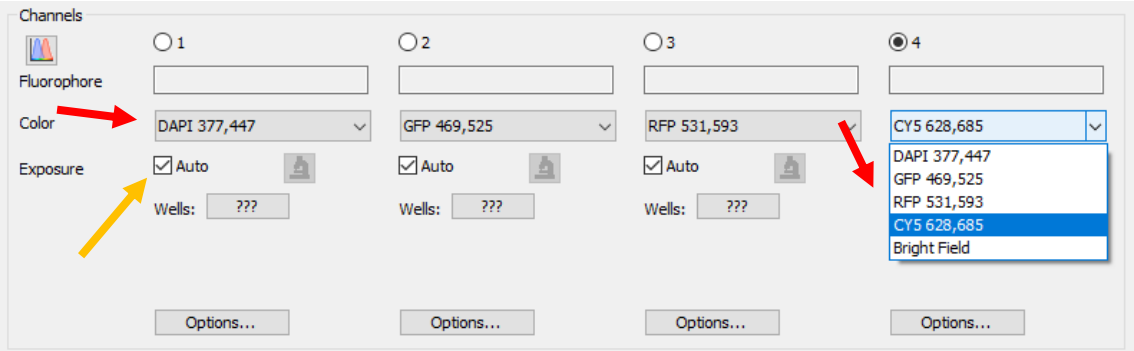
**f) Image**: ao selecionar esta opção de leitura, na seção “Optics Type” permite apenas a opção “Filters”.




Selecione a objetiva desejada (seta azul) e quais os poços que será realizado a aquisição das imagens (seta verde).




Você poderá escolher até 4 canais de luz (setas vermelhas) sendo eles: DAPI, GFP, RFP, CY5. Além do campo claro monocromátioco (“Bright Field”) e campo claro colorido*.

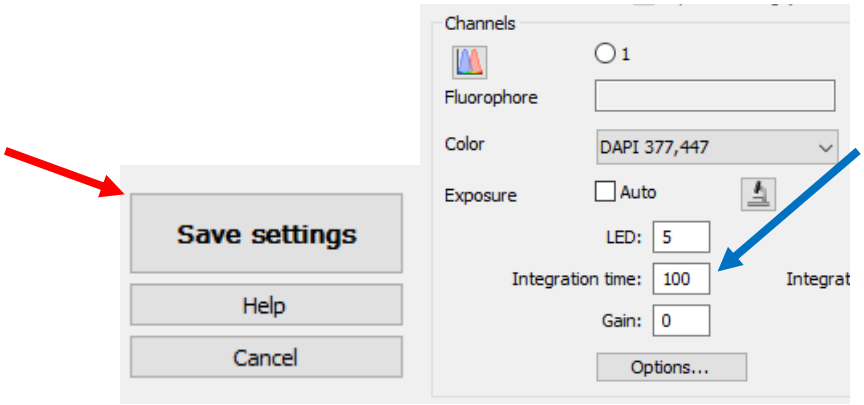



*Realizar campo claro colorido permite utilizar apenas um canal.

Para configurar os elementos de exposição (“Exposure”) o sistema possui duas opções: “Auto” (automático) e no modo manual. O padrão do programa é o “Auto” (seta amarela). Porém, você poderá realizar a configuração manualmente. Basta desmarcar a opção “Auto” e aperta no ícone .

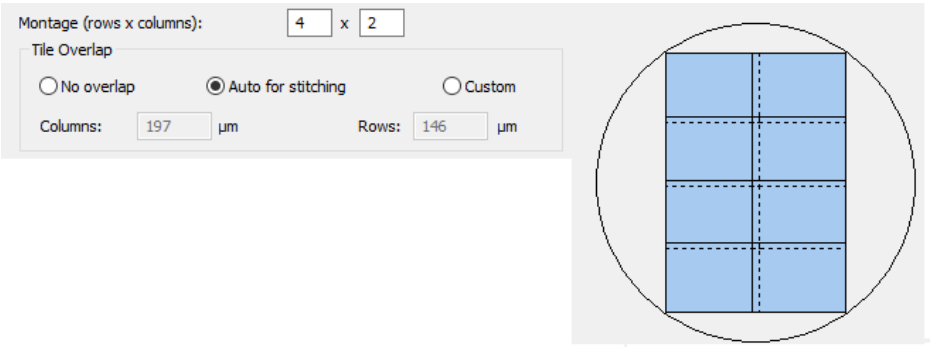
O procedimento de configuração de exposição é igual ao procedimento de aquisição rápida de imagem (seção 2.1). Após configurar a exposição, o foco e a posição no espaço, basta clicar em “Save settings” no canto direito (seta vermelha).

A partir disso, as configurações de aquisição irão aparecer na janela anterior (seta azul):

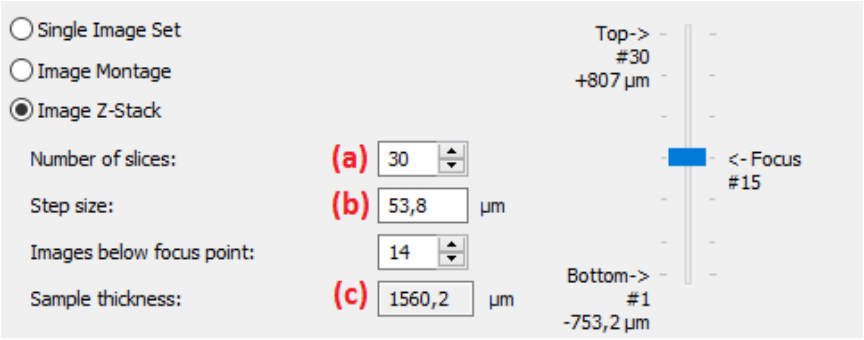



O programa permite ainda realizar dois tipos de experimentos: “Image Montage”, que é a aquisição de uma série de imagem em um mesmo plano, e “Image Z-Stack”, aquisição de uma série de imagens ao longo do eixo z (planos diferentes).

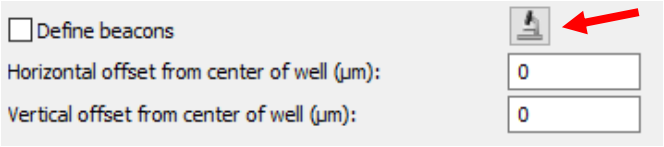
Para configurar o experimento de montagem basta inserir o número de colunas e linhas que formarão a montagem desejada (seta verde).




Para configurar o Z-stack basta inserir o número de camadas que serão adquiridas ao longo do eixo (a) e/ou a distância entre as camadas (b) e/ou a espessura total desejado (c).

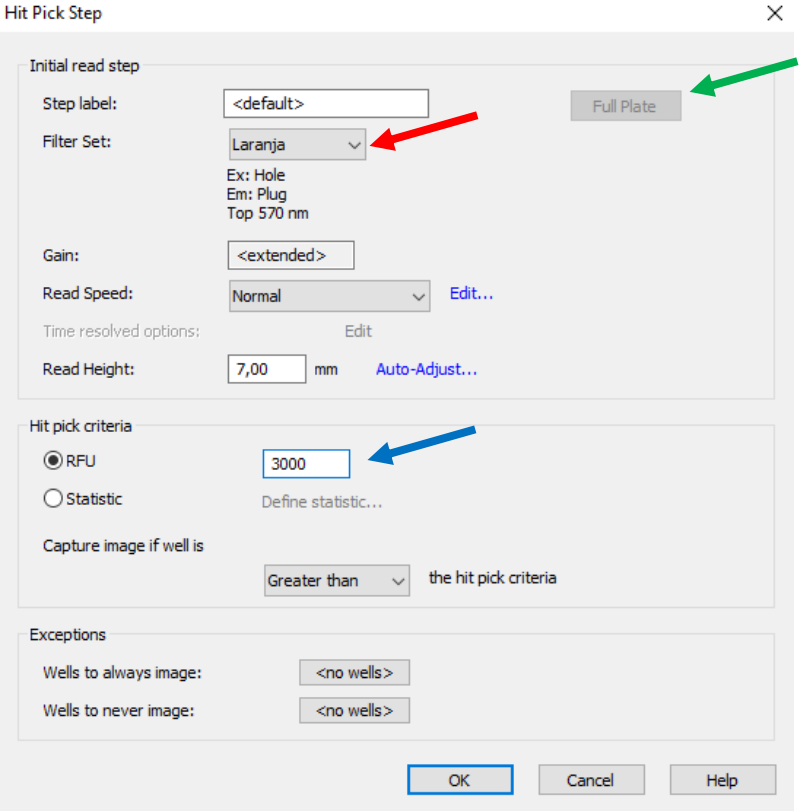


Se você deixou a configuração de exposição no “Auto”, se necessário, selecionar a posição no poço/placa/lâmina que será adquirido a imagem, deve clicar no ícone e posicionar.

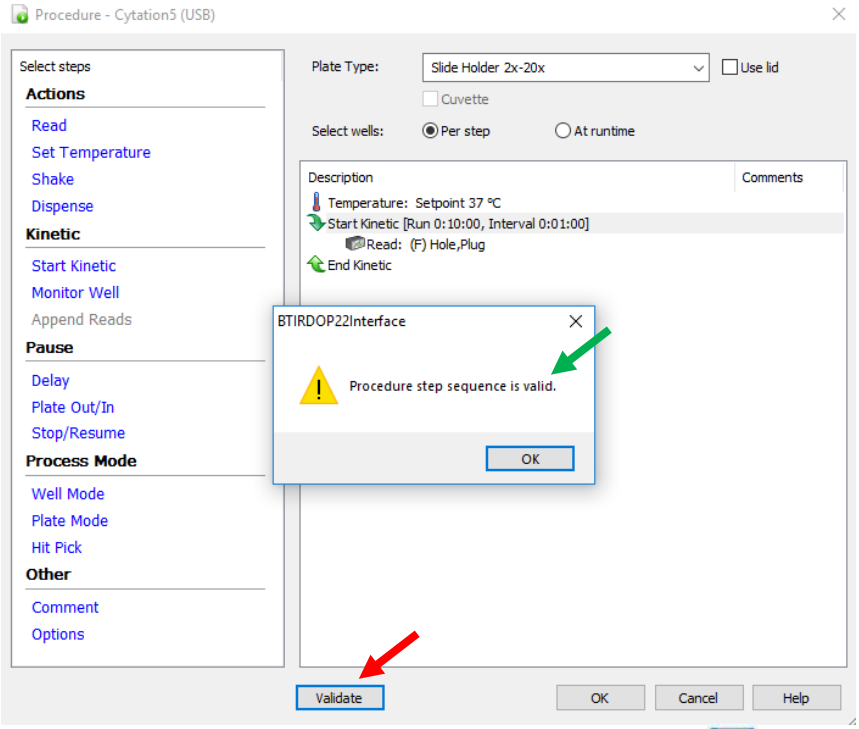



**g) Hit Pick:** esta função permite realizar uma leitura de fluorometria e posteriormente a aquisição de imagens apenas dos poços que atingiram um determinado valor de intensidade de fluorescência.

Para realizar este experimento você deve escolher qual dos filtros será utilizado, laranja ou Cy5 (seta vermelha), escolher em quais poços serão realizados os procedimentos (seta verde) e ajustar qual o valor referência para escolher os poços que deveram ser fotografados (seta azul).



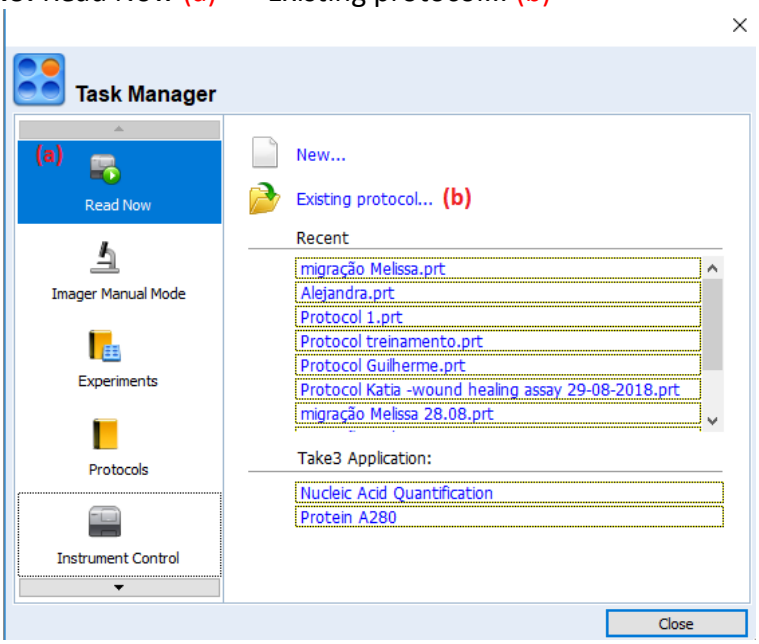
5) Após configurar todos os passos do protocolo, deve-se validá-lo. Basta conferir se todos os passos constam na lista de tarefas e após clicar em "Validate" (seta vermelha). Se o protocolo não possui nenhum problema ele será validado (seta verde).



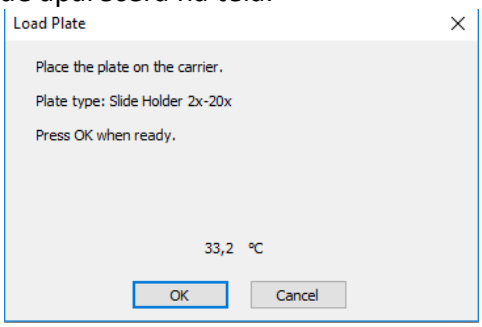

6) Clique em "OK" e salve seu protocolo clicando no ícone e indique a pasta de destino para o protocolo.

## 3.3 Execução de protocolos

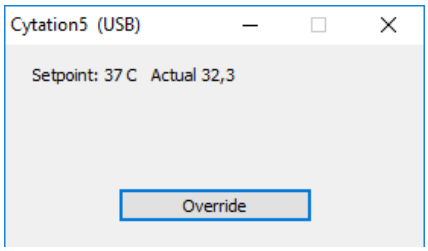
1) **Caminho:** Read Now (a) --> Existing protocol... (b)



**2)** O programa, antes de iniciar a execução do protocolo, pede para indicar o local que será salvo os resultados (no formato do Gen5). Selecione a pasta desejada. Após ele abrirá a gaveta para que você confira sua placa e fechará após você clicar OK no aviso que aparecerá na tela.

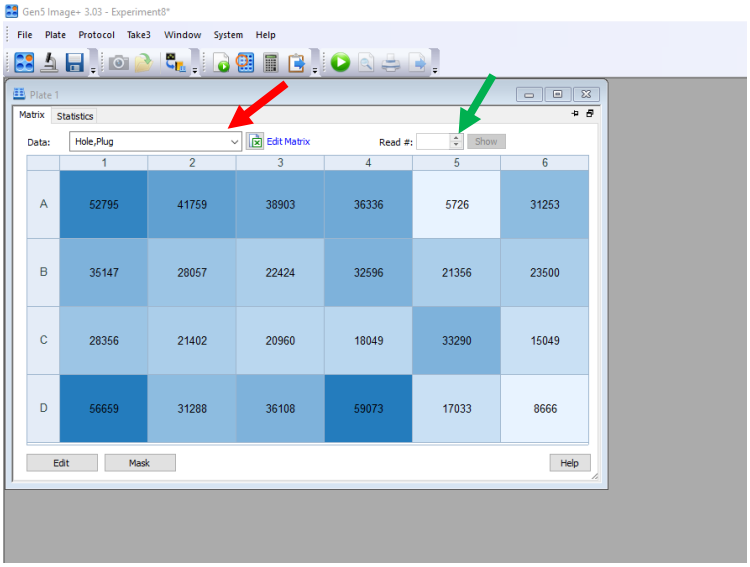



**3)** Caso você tenha pedido o controle de temperatura, ele abrirá uma janela para indicar a temperatura atual da câmara até atingir o valor desejado.



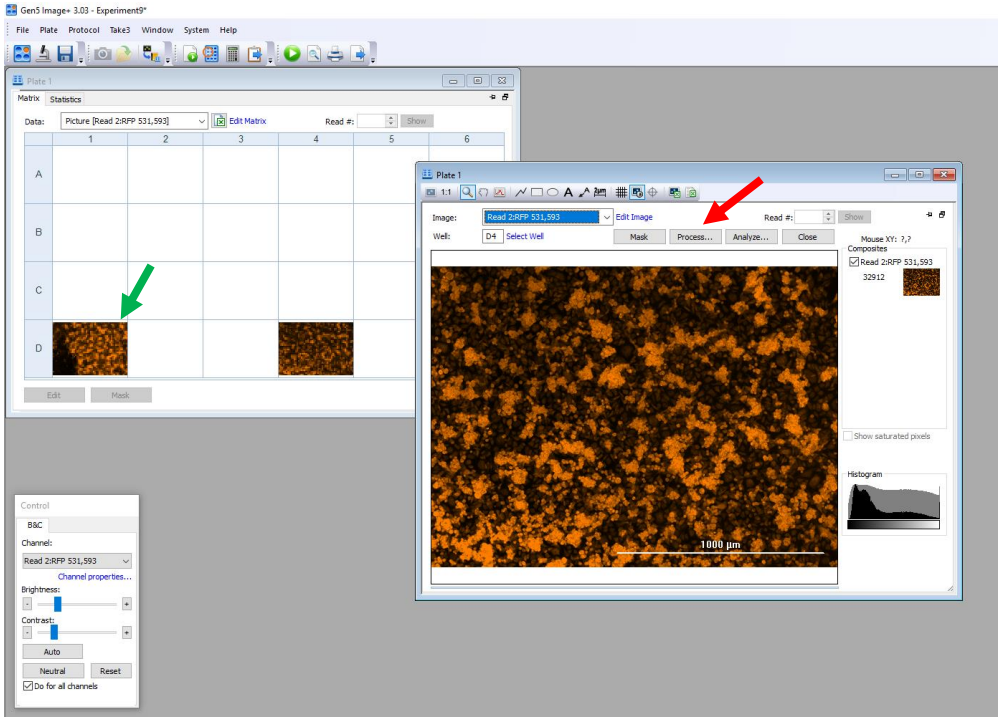

**4)** Para cada tipo de leitura haverá um tipo de saída dos dados.

**a. Absorbância e Fluorometria:** se for realizada utilizando ciclo (Kinetic mode), basta mudar as leituras no local indicado pela seta verde. Para mudar entre os canais utilizados basta mudar no local indicado pela seta vermelha.

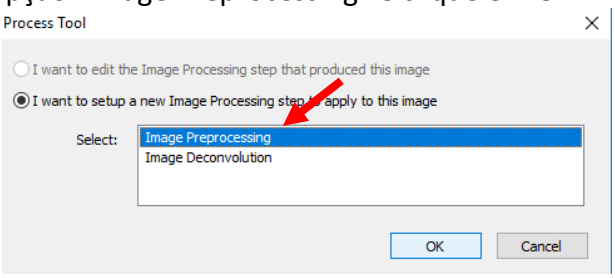



Você poderá exportar esta tabela em formato de Excel. Basta clicar no ícone . Após abri-la no Excel, você deve salvá-la na pasta desejada.

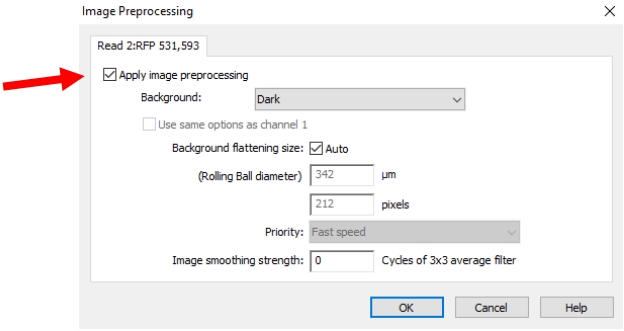
**b. Imagem:** Clique nas miniaturas das imagens adquiridas para ampliá-las (seta verde). Para fazer o processamento das imagens clique em "Process..." (seta vermelha);



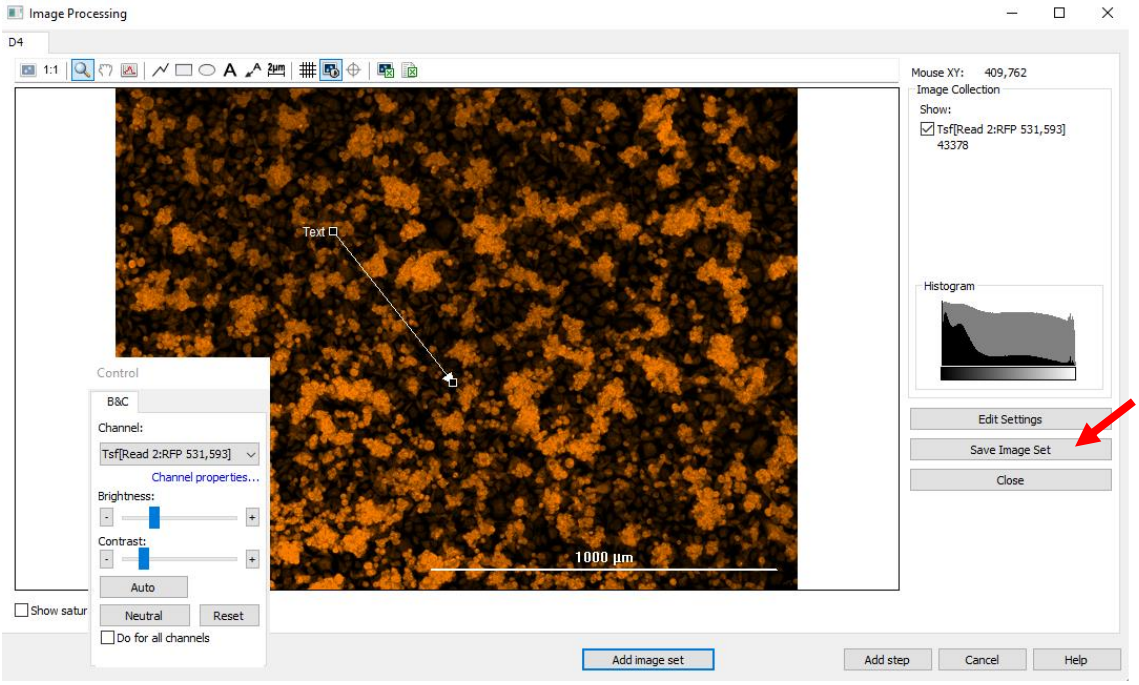

Selecione a opção "Image Preprocessing" e clique em OK.




Selecione os canais que deseja fazer o processamento. Para excluir um canal basta desmarcar a caixa "Apply image preprocessing" e clique em ok.



Na janela de processamento, você poderá alterar o brilho, contraste, adicionar escalas, setas, etc. Após o processamento, aperte no botão “Save Image Set” (seta vermelha). As opções de salvar as imagens estão descritas na página 21.

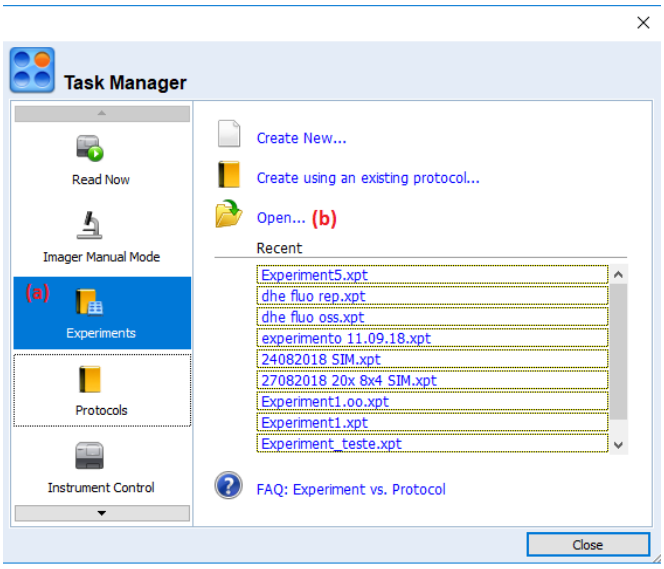



Atenção: para salvar as imagens em TIFF ou JPEG, é necessário realizar esses passos.

c. **Hit Pick:** Como o experimento realiza leitura de fluorometria e aquisição de imagem, a saída dos resultados e os procedimentos são os mesmos.

## 3.3 Análise de experimentos

Para analisar, exportar imagens, processar imagem ou recuperar dados basta clicar em “Experiments” (a) e selecionar o arquivo referente aos resultados desejados (b).



## 3.4 Salvando Imagens em outros formatos

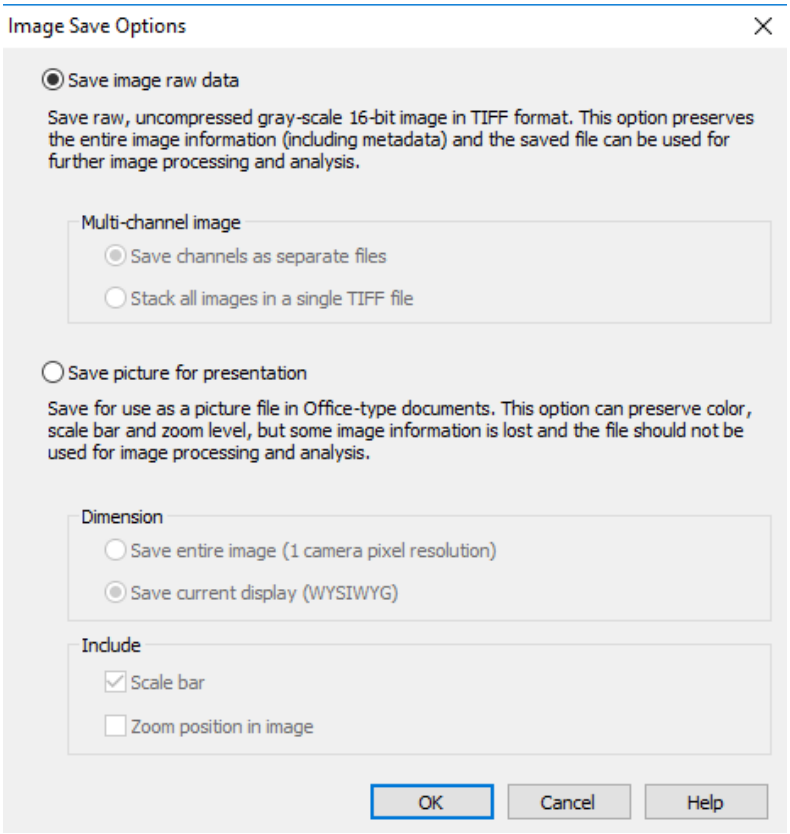
Para salvar as imagens em outros formatos você possui duas opções:

1) **Save image raw data**: As opções de salvar a imagem consistem em salvar o dado **em escala de cinza no formato TIFF** (arquivo original). Essa opção permite a abertura do arquivo pelo programa e modificações posteriores. Não é salva com barra de escala.

**i)** Save Channels as separate files: salva uma imagem para cada canal (aconselhável)
**ii)** Stack all images in a single TIFF file: salva uma imagem com todos os canais sobrepostos.

2) **Save image for presentation**: salva a imagem em JPEG, PNG. **Obs:** Não é mais aberta no programa. É salva com barra de escala.

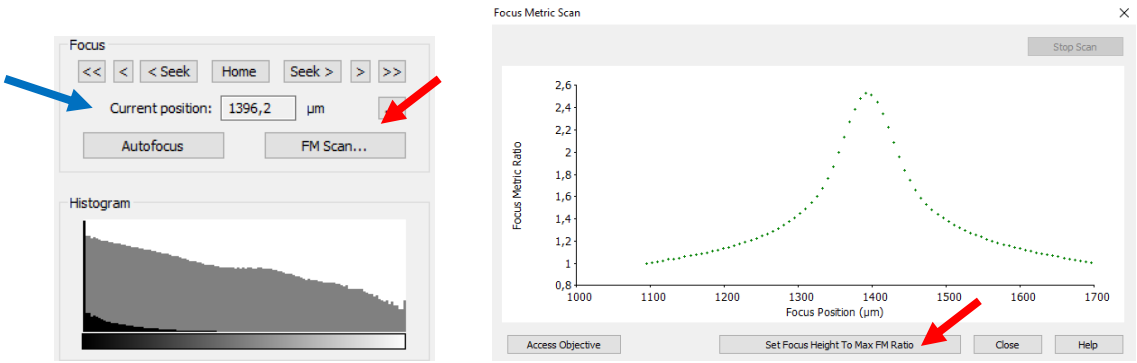
**i)** Save entire image: salva imagem independe da mesma ter alterações no processamento.
**ii)** Save current display: a imagem salva é a mesma observada na tela (pós processamento).



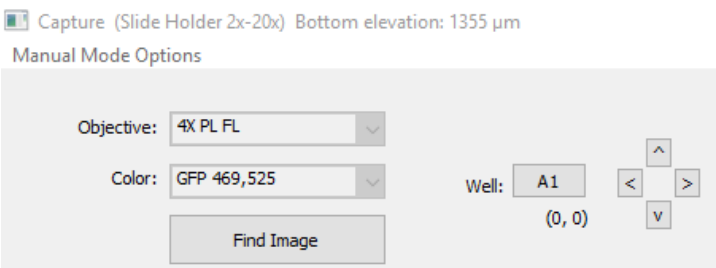
# 4. Soluções de Problemas recorrentes

## PARA DAR FOCO MANUALMENTE

Caso não consiga configurar o foco utilizando a função “Autofocus” ou pelas setas << < e > >>. Existe ainda outra opção. Clique em “FM Scan...”. Nesta função, o programa irá tentar localizar o melhor sinal de imagem para o foco. O programa gera um gráfico que deverá ser próximo da imagem abaixo. Após ficar pronto, clique em “Set Focus Height to Max FM Ratio”.




Compare o valor que irá aparecer no campo “Current position” (seta azul) e o valor que aparece na barra superior da janela (seta verde) no campo “Botton elevation: xxxx µm” e anote o novo valor.



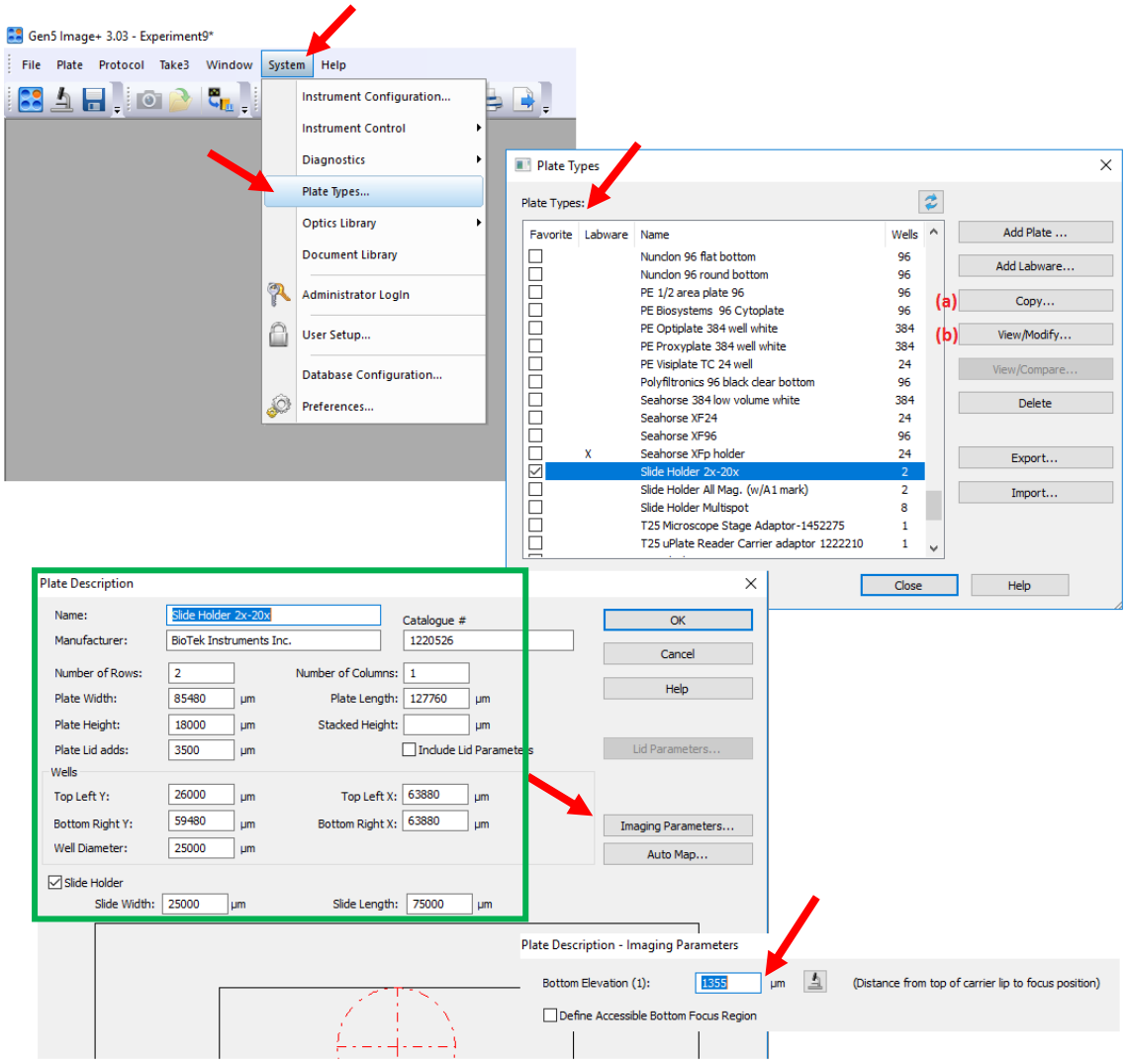

O “Bottom elevation” é o ponto inicial para o “Autofocus”. Quando o valor do “Bottom elevation” para essa o tipo de placa está diferente do valor onde se encontrou o foco. Caso o valor seja muito diferente, você deverá configurar o “Botton elevation” no sistema para que o equipamento consiga encontrar o foco automaticamente.

Para configurar o “Botton Elevation” de lâminas siga o caminho (setas vermelhas) a partir da janela inicial.

Na Barra inicial: System -> Plate Type. Escolha em “Plate Types” selecione o modelo “Slide Holder 2x-20x”. Clique em “View/Modify” (a) e posteriormente em “Imaging Parameters”. No topo da janela, insira o valor gerado a partir do gráfico da função “Set Focus Height to Max FM Ratio”.

Para configurar o “Botton Elevation” para placas siga o caminho (setas vermelhas) a partir da janela inicial.

Na Barra inicial: System -> Plate Type. Escolha o tipo de placa mais próximo do modelo que você está utilizando e clique em “Copy” (b). Insira as especificações da placa (informada pelo fabricante) nos campos destacados pelo retângulo verde. Posteriormente em “Imaging Parameters”. No topo da janela, insira o valor gerado a partir do gráfico da função “Set Focus Height to Max FM Ratio”.



# 5. Finalizando os trabalhos

Ao finalizar todos os procedimentos:

**1º)** Salvar os arquivos em CD/DVD ou enviar via e-mail/nuvem de armazenamento.

**2º)** Fechar o programa Gen5

**3º)** Desligar o equipamento no botão “Power switch”.

**4º)** Desligar o controle de gases (quando usado): feche as válvulas, e posteriormente, desligue o equipamento de encubação de $CO_2$.

**5º)** Cubra o aparelho com a capa.